

Aus dem Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin der Universität zu Köln
Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. J. Dötsch

Auswirkungen einer Ernährungsintervention mit Docosahexaensäure, Cholin und/oder Lutein im frühen Leben auf die zelluläre Zusammensetzung des Hippocampus weiblicher Ratten im späteren Leben

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Luisa Nathan
aus Köln

promoviert am 30. April 2025

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln
Druckjahr 2025

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink
1. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. J. Dötsch
2. Gutachterin: Universitätsprofessorin Dr. N. Kononenko

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich keine Unterstützungsleistungen erhalten.

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente (Entnahme und Einbettung der Gehirne, Anfertigung und Auswertung histologischer Schnitte) sind nach entsprechender Anleitung durch Dr. Kai-Dietrich Nüsken sowie die biologisch-technischen Assistent:innen Frau Maria Wohlfarth und Herrn Gregor Fink von mir selbst ausgeführt worden.

Des Weiteren unterstützte ich bei im Rahmen des Projekts anfallenden sonstigen Arbeiten (Füttern, Messen und Wiegen der Versuchstiere, Herstellung der Kontrollnahrung, Vorbereitung der metabolischen Käfige).

Die statistischen Analysen der in den Experimenten erhobenen Daten wurden von mir selbst mit dem Programm GraphPad durchgeführt unter Anleitung durch Dr. Kai-Dietrich Nüsken. Für die ebenfalls durch mich selbst unter Anleitung durch Herrn Gregor Fink durchgeführten Bildanalysen wurde das Programm ImageJ verwendet.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 11.12.2024

Danksagung

Großer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Jörg Dötsch sowie meinen Betreuern Frau Dr. Eva Nüsken und Herrn Dr. Kai-Dietrich Nüsken für die hervorragende Unterstützung und Betreuung.

Des Weiteren möchte ich Frau Maria Wohlfarth und Herrn Gregor Fink dafür danken, mich über das gesamte Projekt begleitet zu haben und auch Julia Schnitzler, die mir bei der praktischen Arbeit zur Seite stand.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und Geschwistern, meinem Schwager Kilian Nathan und Daniel Marvin Gonner, die mich jederzeit unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
1. ZUSAMMENFASSUNG	8
2. EINLEITUNG	10
2.1 Entwicklungsabhängige Programmierung und Neuroplastizität	10
2.2 Der Einfluss von Ernährung auf die neuronale und neurokognitive Entwicklung	11
2.2.1. Die Bedeutung von Docosahexaensäure	11
2.2.2. Cholin, Lutein und mögliche synergistische Effekte	13
2.3 Die Bedeutung des Hippocampus	15
2.3.1. Morphologie und Funktion	15
2.3.2. Das zelluläre Stützgerüst des Hippocampus	17
2.3.3. Der Gyrus dentatus als Ort kindlicher und adulter Neurogenese	19
2.3.4. Die Entwicklung des Hippocampus bei Ratte und Mensch	19
2.4 Fragestellungen und Ziel der Arbeit	21
3. MATERIAL UND METHODEN	22
3.1 Studiendesign	22
3.2 Herstellung des Interventionsfutters	23
3.3 Präparation und Gehirnentnahme	24
3.4 Einbettung des Gehirns und Anfertigung der Schnitte	25
3.5 Histologie	25
3.5.1. Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE)	25
3.5.2. Immunfluoreszenz-Färbung (IF)	26
3.6 Analyse der Immunfluoreszenzfärbungen mittels ImageJ	28
3.6.1. Olig2	28
3.6.2. NeuN und DCX	29
3.6.3. GFAP	30
3.6.4. Iba1	30
3.7 Statistische Auswertung	31

4.	ERGEBNISSE	32
4.1	Olig2	32
4.2	NeuN und DCX	35
4.2.1.	Auswertungen im Bereich der Regionen CA1-3	35
4.2.2.	Auswertung im Bereich des Gyrus dentatus	37
4.3	GFAP	40
4.4	Iba1	42
5.	DISKUSSION	47
5.1	Effekte der Intervention auf die einzelnen Zelllinien	47
5.1.1.	Vereinzelte Auswirkungen auf die Zahl der Oligodendrozyten	47
5.1.2.	Vereinzelte Auswirkungen auf die Zahl reifer Neurone	47
5.1.1.	Unveränderte Zahl neuronaler Vorläuferzellen im Bereich des Gyrus dentatus	49
5.1.2.	Kein Einfluss der Intervention auf die Zahl der Astrozyten	49
5.1.3.	Kein Einfluss der Intervention auf die Zahl der Mikroglia	50
5.1.4.	Zusammenfassung der Resultate	50
5.2	Methodische Limitationen der Arbeit	51
5.3	Keine Übertragbarkeit der Ergebnisse auf eine Grundgesamtheit aus männlichen und weiblichen Individuen	52
5.4	Eingeschränkte Übertragbarkeit des Studiendesigns auf den Menschen	53
5.5	Mögliche Handlungsempfehlungen und Ausblick	53
	LITERATURVERZEICHNIS	57
6.	ANHANG	73
6.1	Abbildungsverzeichnis	76
6.2	Tabellenverzeichnis	76

Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
ACSF	artificial cerebrospinal fluid
AI	adequate intake
ALA	α -Linolensäure
Al	Alveus
AMA	American Medical Association
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionsäure-Rezeptoren
BrdU	Bromodeoxyuridin
C	control group
CA1	cornu ammonis, 1. Subregion
CA2	cornu ammonis, 2. Subregion
CA3	cornu ammonis, 3. Subregion
CC	corpus callosum
CH	Cholin
CX3CL1	Fractalkine
DCX	doublecortin
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung
DHA	Docosahexaensäure
DHA-PC	Docosahexaensäure-Phosphatidylcholin
DG	dentate gyrus
EFSA	European Food Safety Authority
Ex	embryonaler Tag x
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Associations
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GrDG	stratum granulosum des Gyrus dentatus
HE	Hämatoxylin-Eosin
Iba1	ionized calcium-binding adaptor molecule 1
IF	Immunfluoreszenz
IUGR	intrauterine growth restriction
Ki67	Ki67-Proliferationsmarker
LC-PUFA	long-chain polyunsaturated fatty acids
LMol	stratum lacunosum moleculare
LTP	long term potentiation
Lu	stratum lucidum
L	Lutein

MoDG	molekulare Schicht des Gyrus dentatus
NMDAR	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren
NSC	neural stem cells
NeuN	neuronal Nuclei
Olig2	oligodendrocyte transcription factor 2
Or	stratum oriens
PBS	phosphate-buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
PoDG	polymorphe Schicht des Gyrus dentatus
Px	postnataler Tag x
Py	stratum pyramidale
Rad	stratum radiatum
ROI	region of interest
SGZ	subgranuläre Zone
SPF	specific pathogen free
SSW	Schwangerschaftswoche
VEP	visuell evozierte Potenziale
ZNS	zentrales Nervensystem

1. Zusammenfassung

Klinische Studien konnten mögliche positive Einflüsse sowohl der mehrfach ungesättigten langkettigen Fettsäure Docosahexaensäure (DHA)¹⁻⁴ als auch des Cholin und des Lutein⁵⁻⁷ auf die Kognition in der Kindheit zeigen. Auf Zellebene ergab sich zudem Anhalt für ein gesteigertes Neuritenwachstum, eine verbesserte Synaptogenese⁸, eine Beförderung anti-inflammatorischer Wirkung⁹ sowie für positive Einflüsse der einzelnen Substanzen auf die Differenzierung von Vorläuferzellen, die Neurogenese und die Myelinisierung von Neuronen¹⁰. Aber auch synergistische Effekte der drei Substanzen wurden gefunden^{1,11-13}. Ziel dieser Studie war es, Auswirkungen einer Ernährungsintervention mit Docosahexaensäure, Cholin und/oder Lutein im frühen Leben auf die zelluläre Zusammensetzung des Hippocampus weiblicher Ratten im späteren Leben zu beleuchten.

Es wurden die Hippocampi weiblicher Ratten am postnatalen Tag (P) 143 untersucht, welche ab dem Tag P14 bis zum Tag P56, d.h. nach Abschluss der Neurogenese, aber während der Wachstumsphase des Gehirns, über insgesamt 6 Wochen entweder eine Kontrollnahrung erhalten hatten oder eine Interventionsnahrung mit entweder einzeln zugesetztem Cholin, Lutein und DHA, oder einer Zwei- bzw. Dreifachkombination der Wirkstoffe (n=8 pro Gruppe). Es wurden in Kryo-Medium eingebettete 8 µm dicke Schnitte des Hippocampus angefertigt und mit Hilfe von Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Schnitten die Zielebene Bregma -3,24 ausfindig gemacht. Anschließend erfolgten Immunfluoreszenz-Färbungen der sich in der Zielebene befindlichen Schnitte mit DAPI (Anfärbung der Zellkerne) sowie zusätzlich den folgenden Antikörper-Kombinationen: (1) anti-oligodendrocyte transcription factor 2 Antikörper (Olig2; Anfärbung der Oligodendrozyten, d.h. Zellen, die die Myelinscheide der Axone bilden) + anti-Ki67 Antikörper (Anfärbung proliferierender Zellen), (2) anti-neuronal nuclei Antikörper (NeuN; Anfärbung vor allem der Zellkerne von Neuronen) + anti-doublecortin Antikörper (DCX; Anfärbung unreifer Neurone), (3) anti-glial fibrillary acidic protein Antikörper (GFAP; Anfärbung von Astrozyten, d.h. die Stütz-, Grenz- und auch Versorgungszellen des ZNS) + anti-Ki67 Antikörper sowie (4) anti-ionized-calcium-binding-adaptor-molecule 1 Antikörper (Iba1; Anfärbung von Mikroglia, d.h. Zellen des monozytär-phagozytären Systems im ZNS). Nach Anfertigung von Scans mittels Olympus Mikroskop werteten wir die Färbungen mit dem Programm ImageJ aus, wobei Analysen im Bereich des Corpus callosum, der Regionen CA 1-3 sowie im Gyrus dentatus erfolgten.

In den Ergebnissen ergab sich jeweils im Vergleich mit der Kontrollgruppe eine signifikant erhöhte Anzahl Olig2-positiver Zellen im Corpus callosum der DHA-Gruppe sowie der Cholin + Lutein-Gruppe. Die NeuN-positiven Zellen der Region CA1-3 fanden sich in der Gruppe Cholin + Lutein + DHA vermehrt, im Bereich des Gyrus dentatus in den Gruppen Cholin + Lutein und Lutein + DHA, während sich bei Analyse von DCX keine signifikanten Unterschiede zeigten. Auch die Analysen von GFAP und Iba1 erbrachten keine signifikanten Ergebnisse.

Zusammenfassend zeigten sich auch 12 Wochen nach Ende der frühen Ernährungsintervention noch vereinzelt nachweisbare Effekte, insbesondere auf die Anzahl reifer Neuronen sowie teils auch der Oligodendrozyten. Signifikante Auswirkungen auf neuronale Vorläuferzellen, Mikroglia oder Astroglia ließen sich jedoch nicht verzeichnen. Hinsichtlich der getesteten Substanzen zeigten sich hauptsächlich synergistische Effekte, denn es führten fast ausschließlich Kombinationen von Wirkstoffen zu signifikanten Zellzahlveränderungen. Jede dieser Kombinationen enthielt Lutein sowie zusätzlich DHA und/oder Cholin.

Die Ergebnisse unserer Arbeit im Tiermodell decken sich mit dem aktuellen Forschungsstand rund um die Thematik und spiegeln sich auch in den aktuellen Richtlinien zur Zusammensetzung von Babynahrung wider. Seit Februar 2021 enthalten diese aufgrund der unabdingbaren Bedeutung von DHA als Baustein für die Gehirnentwicklung^{14,15} einen mindest-DHA-Gehalt, während bereits seit 2007 standardmäßig Cholin enthalten ist¹⁶. Zusätzlich ergeben sich in unserer Arbeit interessante neue Aspekte hinsichtlich synergistischer Effekte des Luteins mit DHA und/oder Cholin, welche aufgrund der Eigenschaft des Luteins als Antioxidans plausibel sind. Unter erhöhter DHA-Aufnahme wurden in der Literatur nicht nur „positive“ Effekte, sondern auch die Möglichkeit eines erhöhten zellulären oxidativen Stresses beschrieben. Eine Kombination könnte also eine synergistisch anti-apoptotische, gehirnentwicklungsfördernde Wirkung haben. Da Cholin die enterale DHA-Resorption steigert und die Aufnahme über die Blut-Hirn-Schranke erleichtert, wäre auch hier plausibel, dass eine Kombination mit einem Antioxidans sinnvoll sein kann. Weitere Studien diesbezüglich wären daher auch beim Menschen von großem Interesse. Insbesondere Untersuchungen, die auch die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen mit einem Fokus auf oxidativen Stress und Apoptose erfassen, könnten interessant sein. Da wir eine Untersuchung bis ins junge Erwachsenenalter durchgeführt haben, können wir aus unseren Daten bei Ratten zudem schließen, dass die Effekte einer Ernährungsintervention im frühen Leben trotz ihrer zeitlichen Begrenzung im Sinne einer entwicklungsabhängigen Programmierung bis ins spätere Leben erhalten bleiben. Langfristig bleibt abzuwarten, ob die neuen, auf die postnatale Phase bezogenen Handlungsempfehlungen auch beim Menschen die Plastizität des Organismus beeinflussen werden.

2. Einleitung

„Auswirkungen einer Ernährungsintervention mit Docosahexaensäure, Cholin und/oder Lutein im frühen Leben auf die zelluläre Zusammensetzung des Hippocampus weiblicher Ratten im späteren Leben“

2.1 Entwicklungsabhängige Programmierung und Neuroplastizität

Die kindliche Entwicklung wird durch genetische, epigenetische und physiologische Faktoren beeinflusst. Diese existieren jedoch nicht losgelöst von äußeren Gegebenheiten, sondern stehen vielmehr im ständigen Wechselspiel zwischen sich selbst und der Umwelt, die vielerlei Gestalt annehmen kann¹⁷. So kommt die Umwelt beispielsweise in Form des intrauterinen Milieus, welchem der Fötus ausgesetzt ist, bereits vor der Geburt vollständig zum Tragen. Ist das intrauterine Milieu verändert, kann es vor allem während sensibler Entwicklungsphasen zu strukturellen und funktionellen Veränderungen des Organismus kommen, die die Entwicklung und Gesundheit nicht nur kurzfristig beeinflussen, sondern auch eine veränderte Vulnerabilität gegenüber Krankheiten im späteren Leben zur Folge haben können¹⁸. Dieses Phänomen ist als „entwicklungsabhängige Programmierung“ bekannt¹⁹.

Solcherlei „Umweltfaktoren“, die diese Programmierung und damit auch Anpassungsprozesse bis ins Erwachsenenalter beeinflussen, sind beispielsweise maternale Hormonkonzentrationen²⁰, intrauterine Wachstumsrestriktion (IUGR) durch utero-plazentare Insuffizienz²¹, oder aber die Ernährung des Kindes, sowohl prä- als auch postnatal²¹. Der US-amerikanische Ernährungsausschuss beschreibt hierbei die ersten 1000 Tage, also die Phase von der Konzeption bis zum abgeschlossenen zweiten Lebensjahr, als besonders bedeutsam hinsichtlich einer Versorgung des Kindes mit entsprechenden Nährstoffen^{22,23}. Neben den Vitaminen A, B6, B12 und D sowie Spurenelementen finden auch langkettige, mehrfach ungesättigte Fettsäuren eine Nennung²³. Als Grundlage dieser Empfehlung dienen zahlreiche Studien, die einen Zusammenhang zwischen der Ernährung während der Pränatal- und Neugeborenenperiode und einer Prädisposition für Erkrankungen im Erwachsenen belegen. Hierbei kann es sich um metabolische Störungen handeln^{21,24–27}, aber auch um Prozesse, welche die kognitive Leistungsfähigkeit insbesondere hinsichtlich der Erinnerungsleistung beeinflussen¹, unter anderem auch in Bezug auf neurodegenerative Erkrankungen im späteren Leben wie Morbus Alzheimer²⁸.

Grund für die große Beeinflussbarkeit der kognitiven Entwicklung in der frühen Lebensphase ist die ausgeprägte Vulnerabilität des Gehirns gegenüber äußeren Einflüssen während des Entstehungsprozesses. Hierbei kommt die große Plastizität des Gehirns zum Tragen sowie seine deutlich protrahierte Entwicklungsphase¹⁸. Diese schreitet von der dritten Gestationswoche mit einer großen Dynamik und Komplexität bis ins Erwachsenenalter fort²⁹.

Selbst kleine Veränderungen zu Beginn der Entwicklungsphase können große Auswirkungen auf die spätere neuronale und neurokognitive Entwicklung haben²⁹. Dies stellt einen wichtigen Ansatzpunkt therapeutischen Eingreifens dar. Möglicherweise kann mittels einer Intervention während der vulnerablen Phase der Gehirnentwicklung nicht nur eine Prävention langfristig schädlicher Programmierung erfolgen, sondern auch potenziell eine positive Beeinflussung der Entwicklung an sich^{29,30}. Das Prinzip der entwicklungsabhängigen Programmierung ist also Grundvoraussetzung für die Möglichkeit einer Beeinflussung der späteren Entwicklung durch Interventionen wie beispielsweise einer Supplementation von Nährstoffen im frühen Leben.

2.2 Der Einfluss von Ernährung auf die neuronale und neurokognitive Entwicklung

2.2.1. Die Bedeutung von Docosahexaensäure

Docosahexaensäure (DHA, C22:6 ω -3) ist eine mehrfach ungesättigte, langkettige Fettsäure (LC-PUFA) mit 22 Kohlenstoffatomen und sechs Doppelbindungen. Sie gehört zu den ω -3-Fettsäuren und muss, auch wenn sie teilweise in der Leber aus der essenziellen α -Linolensäure (ALA, C18:3) gebildet werden kann, hauptsächlich über die Nahrung aufgenommen werden. Für die Entwicklung des Gehirns und des visuellen Systems ist DHA unabdingbar. Es ist Bestandteil der grauen Substanz des zentralen Nervensystems (ZNS) sowie der Membranen der retinalen Fotorezeptoren³¹ und akkumuliert dort in großen Mengen. Mit etwa 80 Prozent stellt es dort den Großteil der mehrfach ungesättigten Fettsäuren dar³². Neben dem Gehirn wird in utero eine noch größere absolute Menge an DHA in den fetalen Fettspeichern angereichert. Dies findet überwiegend im dritten Trimester der Schwangerschaft statt³³. Bereits in den ersten zwei postnatalen Monaten wird dieser Speicher für wichtige Entwicklungsprozesse von Gehirn und Retina aufgebraucht. Falls nach der Geburt keine DHA-Zufuhr erfolgt, kann es hier schnell zu einer Mangelsituation kommen³⁴. Es besteht also eine enge Verzahnung der prä- und postnatalen Nutrition.

Da DHA eine mehrfach ungesättigte Fettsäure ist, kann sie allerdings sehr leicht in der pro-oxidativen Umgebung des Gehirns oxidiert werden und Lipotoxizität bzw. oxidativen Stress vermitteln, was letztendlich zum Zelltod durch Apoptose führen kann. Daher muss es insbesondere im Gehirn, aber auch allgemein molekulare Mechanismen geben, die dem begegnen. Dazu gehört, dass DHA selbst als „indirektes Antioxidans“ agiert, also die Gen- und letztendlich auch Proteinexpression antioxidativer Systeme induziert³⁵. Außerdem ist hier die ausreichende Verfügbarkeit von Antioxidantien und Radikalfängern bedeutsam. Das Redox-Gleichgewicht im Gehirn hat somit einen wichtigen Einfluss darauf, ob sich DHA voll positiv oder doch neurotoxisch auswirkt, was letztendlich die Zellzahl beeinflusst³⁶. Vor der Geburt erfolgt die Aufnahme von DHA über die Plazenta, postnatal über die Muttermilch³⁷. Dass eine

maternale DHA-Supplementation bereits während der Schwangerschaft einen Einfluss auf die DHA-Werte im fetalen Kreislauf hat, konnte in einer Studie nachgewiesen werden: Nötig waren hierbei jedoch um das drei- bis fünffach höhere Konzentrationen der normalerweise empfohlenen DHA-Aufnahme (500-1000mg/d)³⁸. Ein Versuch der maternalen Substitution von ALA als Precursor des DHA zeigte hingegen kaum Einfluss auf die Menge von DHA im Neugeborenen. Grund hierfür ist die zu geringe Umsetzung von ALA zu DHA, um wirksam zu werden. Somit ist wahrscheinlich eine direkte DHA-Substitution vonnöten, um einen Effekt zu erzielen³⁹. Dabei besteht bezüglich der vorhandenen DHA-Menge eine große Variabilität bei schwangeren bzw. stillenden Frauen und damit auch bei den Säuglingen⁴⁰. Grund hierfür ist, dass DHA nur in wenigen Nahrungsmitteln enthalten ist und fast ausschließlich über den Verzehr von Fisch aufgenommen wird⁴¹. Es ist also kritisch zu hinterfragen, inwiefern der während der fetalen und frühkindlichen Entwicklung erhöhte Bedarf an DHA wirklich abgedeckt wird⁴².

Dass DHA möglicherweise einen positiven Einfluss auf die Kognition in der frühen Kindheit hat, ergibt sich aus mehreren Beobachtungs- und Interventionsstudien^{2,3}. So konnte Kohlboeck zeigen, dass im Nabelschnurblut gemessene DHA-Konzentrationen mit Verhaltensauffälligkeiten derselben Kinder im Alter von 10 Jahren invers korrelierten⁴³. Andere Studien konnten bei maternaler Substitution von 200 mg/d DHA während der ersten 4 Monate des Stillens neben höheren kindlichen DHA-Plasmaspiegeln auch eine gebesserte psychomotorische Entwicklung im Alter von 30 Monaten nachweisen⁴⁴. Dieselbe Arbeitsgruppe fand zudem Hinweise für eine bessere Aufmerksamkeitsspanne fünfjähriger Kinder nach DHA-Substitution über die Muttermilch⁴⁵.

Auch eine positive Korrelation zwischen den DHA-Werten in kindlichen Erythrozyten und der Sehschärfe konnte festgestellt werden⁴⁶, sowie zwischen erhöhtem DHA-Status und kürzeren P100 Latenzen der visuell evozierten Potentiale (VEPs)⁴⁷, was damit einen möglichen Einfluss auf die Entwicklung des visuellen Systems zeigte. Andere Studien dieser Art erbrachten jedoch keine eindeutige Wirksamkeit^{48,49}.

Auf zellulärer Ebene konnten in experimentellen Versuchsreihen ebenfalls Effekte einer Supplementation von Docosahexaensäure nachgewiesen werden. Im Hippocampus von Mäusen kam es hierunter zu verbessertem Neuritenwachstum mit gesteigerter Länge und Anzahl der Äste⁸. Da eine direkte Korrelation zwischen Astlänge bzw. -anzahl und der Zahl synaptischer Verbindungen besteht⁵⁰, kann davon ausgegangen werden, dass auch diese durch die DHA-Gabe erhöht wurde. Weiterhin zeigte sich eine verbesserte synaptische Aktivität, die wiederum über eine Stabilisierung der dendritischen Struktur und einen Ausbau der Verästelung die synaptische Plastizität befördert⁵¹. Laut Studienlage kann die durch DHA verbesserte Synaptogenese, insbesondere bezogen auf Glutamat-Rezeptoren wie die NMDA-

Rezeptoren im Hippocampus, möglicherweise einen positiven Einfluss auf Lern- und Erinnerungsprozesse haben⁸.

Im Umkehrschluss konnte gezeigt werden, dass bei Vorhandensein von Omega-3-Fettsäure-Defiziten im frühen Leben die Gedächtnisleistung sowohl bereits bei Neugeborenen unmittelbar nach dem Abstillen⁵² als auch im Erwachsenen beeinträchtigt war. Eine gezielte DHA-Deprivation während der Embryonalperiode führte in einer Interventionsstudie im Tiermodell ebenfalls zu nachteiligen Effekten. Dass diese durch eine anschließende DHA-Supplementation nach Geburt der Jungtiere wieder rückgängig gemacht werden konnten, untermauert die Bedeutung der Postnatalperiode für die Entwicklung des Nervensystems⁸.

Die alleinige Gabe von Docosahexaensäure kann also laut aktueller Studienlage gegebenenfalls bereits positive Effekte erzielen. Zusätzlich scheint jedoch sogar eine Augmentation der Wirksamkeit durch eine Kombination aus Wirkstoffen möglich zu sein, wobei sich diese Arbeit im Folgenden mit Synergismen rund um DHA, Cholin und Lutein beschäftigt.

2.2.2. Cholin, Lutein und mögliche synergistische Effekte

Bei Lutein handelt es sich um ein Carotinoid mit anti-oxidativer Wirkung, welches mit etwa 59 Prozent den größten Anteil der zerebralen Carotinoide ausmacht⁷. Es kann über die Nahrung aufgenommen werden und ist unter anderem für die Farbe von Lebensmitteln wie Mais, Spinat oder Möhren verantwortlich. Lutein spielt eine wichtige Rolle bei der Gesundheit des Auges³⁰, unter anderem bei der Prävention degenerativer Erkrankungen wie der altersbedingten Makuladegeneration⁵³. Außerdem hat es möglicherweise einen positiven Einfluss auf die Gedächtnisleistung bei Menschen mittleren bis hohen Alters, wie eine Studie zeigte, in deren Rahmen eine Supplementation von Carotenoiden stattfand⁵. So reicherte sich Lutein bei diätetischer Supplementation in zahlreichen Regionen des Gehirns an, unter anderem auch im Hippocampus, welcher für Gedächtnis und Kognition von großer Bedeutung ist¹¹. Im Allgemeinen fanden sich bei Probanden bessere kognitive Leistungen bei Vorliegen eines hohen zerebralen Lutein-Gehalts sowie bei hohem Lutein-Anteil im Serum im Vergleich zu geringeren Serumkonzentrationen^{6,54}.

Bei Neugeborenen scheinen diese Serumkonzentrationen stark in Abhängigkeit zur Aufnahme über die Muttermilch zu stehen. Bei gestillten Säuglingen zeigten sich deutlich höhere Konzentrationen als bei Säuglingen, die reguläre Babynahrung ohne Lutein-Anreicherung erhielten. Grund hierfür ist möglicherweise der aktive Transport von Lutein in die Muttermilch, um diese mit dem Carotinoid anzureichern und somit die suffiziente Versorgung des Neugeborenen zu gewährleisten^{54,55}. Bei dem Versuch einer Substitution war aufgrund einer geringeren Bioverfügbarkeit das Vierfache an Lutein nötig, um mit dem Stillen vergleichbare Werte zu erzielen⁵⁶.

Synergistische Effekte mit anderen Substanzen zeigen sich in Studien insbesondere bezogen auf die inhärente anti-oxidativen Wirkung des Luteins. So wird eine mögliche protektive Wirkung auf die Oxidation von DHA beschrieben, was ebenfalls ein wichtiger Aspekt für unsere Studie ist¹¹.

Bei Cholin handelt es sich um 2-hydroxyethyl-trimethyl-Ammoniumsalz. Es ist Bestandteil des in Lipidmembranen enthaltenen Lecithin sowie des Neurotransmitters Acetylcholin. Cholin wird vom menschlichen Körper nur in geringem Maße de novo synthetisiert und muss daher über Nahrungsmittel wie Nüsse, Ei, Fisch, Rind- und Schweinefleisch zugeführt werden. Die empfohlene Menge des über die Nahrung zugeführten Cholin pro Tag liegt laut Institute of Medicine (1998) für Frauen bei einem Adequate Intake (AI) von 425 mg/d, für Männer sowie Schwangere und Stillende bei bis zu 550 mg/d⁵⁷.

Im Zeitraum von 2009 bis 2012 wurden die empfohlenen Werte in den USA von über 90 Prozent der Bevölkerung nicht erreicht. Zudem war bei etwa einem Drittel der zwei- bis dreijährigen Kinder keine suffiziente Aufnahme gewährleistet⁵⁸. Insbesondere in der frühen kindlichen Entwicklung ist dies jedoch von großer Wichtigkeit. Schon vor der Geburt ist ein Mangel an Cholin beispielsweise mit Neuralrohrdefekten des Embryos assoziiert⁵⁹. Zudem scheint es eine Assoziation zwischen der Entwicklung einer regelrechten Leberfunktion und einer suffizienten Cholinaufnahme zu geben⁶⁰. Weiterhin ist die Synthese von Lipidmembranen bei der Entwicklung von Plazenta und Fetus cholinabhängig sowie über Histon-Methylierung auch die epigenetische Programmierung, welche möglicherweise das Risiko für gewisse Krankheiten wie Brustkrebs⁶¹ oder Morbus Wilson⁶² senken kann.

Um eine ausreichende Versorgung des Kindes mit Cholin schon im Mutterleib zu gewährleisten, existieren spezifische Cholin-Transporter in der Plazenta⁶³. Nach der Geburt findet eine Konzentrierung des Cholins in der Muttermilch statt⁶⁴.

Bei adulten Ratten, denen in einer Studie prä- und postnatal zusätzlich Cholin zugeführt wurde, fand sich eine Verbesserung des Arbeitsgedächtnisses sowie der räumlichen Orientierung⁶⁵. Auf zellulärer Ebene konnte ein möglicher Einfluss auf die Differenzierung von Vorläuferzellen, auf die Neurogenese, die Myelinisierung von Neuronen¹⁰ und auf Apoptose-Prozesse im Hippocampus nachgewiesen werden^{66,67} sowie ein erhöhter Schwellenwert für Langzeitpotentierung im Falle eines Cholin-Defizits⁶⁸. In einer Beobachtungsstudie mit menschlichen Säuglingen waren hohe Cholin-Plasmakonzentrationen während der ersten Hälfte der Schwangerschaft mit besseren Leistungen der Neugeborenen in kognitiven Testungen assoziiert⁶⁹. Mehrere randomisierte kontrollierte Studien konnten ebenfalls positive Effekte bezüglich Gedächtnis und Informationsverarbeitung nachweisen, insbesondere bei hohen substituierten Cholin-Mengen von 930 mg/d während der Schwangerschaft^{70,71}.

Neben den Vorteilen eines suffizienten Cholin-Gehalts konnten außerdem synergistische Effekte durch additive DHA- oder Lutein-Gabe festgestellt werden. So zeigte eine Beobachtungsstudie aus dem Jahr 2015 eine gebesserte Erinnerungsleistung sechs Monate alter Neugeborener bei Vorliegen eines hohen Cholin- und DHA- sowie eines hohen Cholin- und Lutein-Gehalts in der Muttermilch¹. Auch im Tiermodell konnte bei Kombination einer Supplementation aus Cholin und DHA eine gebesserte Gedächtnisleistung von Mäusen nachgewiesen werden⁷².

Als möglicher zugrundeliegende Mechanismus wird zum Beispiel die über DHA gesteigerte Expression der Cholinacetyltransferase diskutiert, welche die Bildung von Acetylcholin katalysiert⁷³. Dieses spielt als Neurotransmitter cholinergischer Neurone bei der Neurotransmission eine wichtige Rolle⁷³. Auch die wechselseitige Beeinflussung der jeweiligen Substrataufnahme spielt wahrscheinlich eine Rolle in der Wirkaugmentations. So konnte DHA zum Beispiel die Cholinaufnahme in menschlichen Retinazellen erhöhen⁷⁴. Andererseits unterstützt die gleichzeitige Supplementation von Cholin und DHA die Methylierung des letzteren zu DHA-Phosphatidylcholin (DHA-PC)⁷⁵ und DHA-Lysophosphatidylcholin (DHA-LPC)⁷⁶, wodurch der plasmatische Transport befördert⁷⁵ sowie die Überwindung der Darmbarriere und der Blut-Hirn-Schranke ermöglicht wird⁷⁷⁻⁷⁹. In einer Studie führte eine vermehrte Aufnahme von DHA-LPC so zu einem vermehrten DHA-Gehalt im Gehirn, während die Aufnahme von DHA nicht denselben Effekt hatte. Als mögliche Ursache wurde hierbei unter anderem auch die Anfälligkeit von DHA bezüglich einer Oxidierung diskutiert⁷⁹.

Bei der Entwicklung des Hippocampus konnte bezüglich der Neuronenzahl in der CA1-Region ebenfalls eine bessere Wirksamkeit der Kombination von Cholin und DHA im Vergleich zur alleinigen Gabe nachgewiesen werden¹². In Zellkulturen ergab sich eine Verbesserung der Reifung der postsynaptischen Membran sowie des Überlebens von Neuronen infolge der Substitution einer Kombination besagter Substanzen¹³. Weitere Studien erbrachten Hinweise auf eine verbesserte Synaptogenese bei Kombination von DHA, Cholin und Uridin, welches ebenfalls in der Muttermilch vorhanden ist⁸⁰.

2.3 Die Bedeutung des Hippocampus

2.3.1. Morphologie und Funktion

Der Hippocampus ist im Lobus temporalis des Gehirns lokalisiert und erfüllt als Teil des limbischen Systems wichtige Aufgaben im Bereich Lernen und Gedächtnis⁸¹. Er wird in drei verschiedene Zonen, Cornu Ammonis 1-3 (CA1-3), unterteilt und ist Teil der sogenannten Hippocampusformation, welche außerdem aus dem Gyrus dentatus, dem entorhinalen Cortex, dem Subiculum, Presubiculum und Parasubiculum zusammengesetzt ist⁸². Der Hippocampus besteht aus mehreren Schichten (siehe Abbildung 1). Direkt an den Seitenventrikel angrenzend liegt der in die Fimbrie übergehende Alveus. Adjazent befindet sich das Stratum

oriens, welches die aus der darunter liegenden Pyramidenzellschicht stammenden Axone enthält. Das an das Stratum pyramidale angrenzende Stratum radiatum und das darunter liegende Stratum lacunosum moleculare enthalten die Apikaldendriten der Pyramidenzellen. Das Stratum radiatum lässt sich in CA3 nochmal in das Stratum lucidum unterteilen. Dieses enthält die Moosfasern, deren Zellkörper in dem Stratum granulosum der Fascia dentata liegen und ihre Dendriten an das Stratum moleculare abgeben^{83,84}.

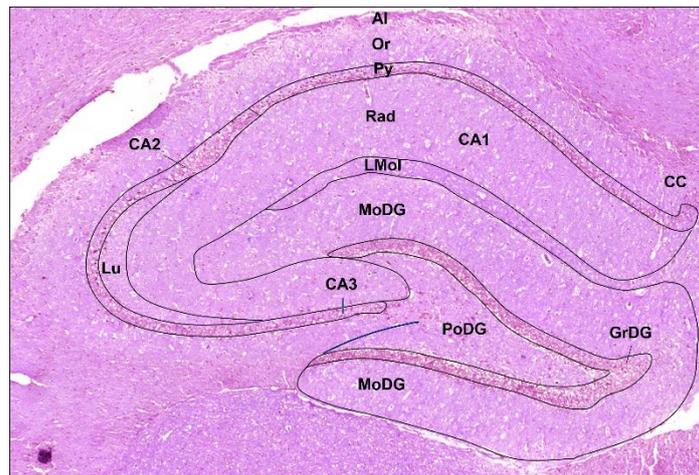


Abb. 1: Histologisches Schnittbild Hippocampus im koronaren Schnitt. DG – Gyrus dentatus, MoDG - molekulare Schicht des DG, PoDG - polymorphe Schicht des DG (Hilus), GrDG - Stratum granulosum des DG, LMol - Stratum lacunosum moleculare, Rad - Stratum radiatum, Py - Stratum pyramidale, Or - Stratum oriens, Al - Alveus, Lu - Stratum lucidum, CA1-3 - Cornu Ammonis 1-3, CC - Corpus callosum

Der Hippocampus empfängt Signale von Teilen des limbischen Systems und der Hippocampusformation. Die verschiedenen Regionen sind verbunden durch einen trisynaptischen Schaltkreis, beginnend mit dem entorhinalen Cortex. Etwas simplifiziert projiziert dieser exzitatorisch über den Tractus perforans zu den Körnerzellen des Gyrus dentatus. Von dort übermitteln die Axone der Körnerzellen, die Moosfasern, Informationen an die Pyramidenzellen von CA3⁸⁵ und anschließend die Schaffer Kollateralen an CA1. CA1 projiziert dann zurück zum entorhinalen Cortex und an die kortikalen Regionen, von welchen die Informationen ursprünglich stammten⁸⁶, wodurch der Kreislauf geschlossen wird⁸². Zwischen den Synapsen der Axone in CA3 besteht zudem eine Interkonnektivität, weshalb CA3 als Ort autoassoziativer Prozesse des Gedächtnisses diskutiert wird⁸⁷.

Grundvoraussetzung für den Erwerb neuer Gedächtnisinhalte und deren Konsolidierung ist die synaptische Plastizität. Diese ist größtenteils aktivitätsabhängig. Im Jahr 1973 konnten Studien erstmals eine gesteigerte Effizienz der synaptischen Übertragung sowie eine höhere Erregbarkeit der Körnerzellen des Hippocampus nach repetitiver Stimulation des Tractus perforans zeigen⁸⁸. Resultiert eine solche hochfrequente, lediglich über Millisekunden andauernde Induktion in einer mehrstündigen Expression, also einer über molekulare

Mechanismen vermittelten Verstärkung, und sogar teils in einer mehrtägigen Erhaltung, wird von Langzeitpotenzierung (LTP) gesprochen⁸⁹. Diese kann grundsätzlich als synaptisches Korrelat der Speicherung von Informationen gesehen werden. Damit stellen zeitliche und örtliche Muster neuronaler Aktivität eine Repräsentation externer Ereignisse und unserer Reaktion auf diese dar⁹⁰.

Im Hippocampus findet NMDAR-abhängige Langzeitpotenzierung vor allem zwischen den Pyramidenzellen der CA3 und CA1 Regionen entlang der Schaffer Kollateralen statt⁸⁹. CA3 ist bekannt für seine Bedeutung in der schnellen Verarbeitung von erstmaligen Erfahrungen und Eindrücken sowie deren Speicherung als Erinnerung⁹¹. Weiterhin scheint dieses Areal eine Rolle für das assoziative Gedächtnis zu spielen, also die Fähigkeit, von bestimmten Erinnerungen auf verknüpfte Gedächtnisinhalte zurückgreifen zu können⁹². Entsprechend der sogenannten Hebb-Lernregel wird die unter anderem in CA1 und CA3 stattfindende Langzeitpotenzierung durch die hiermit einhergehende Stärkung der synaptischen Verbindung zweier Neuronen als physiologische Grundlage assoziativer Lernprozesse gesehen, welche beispielsweise in der klassischen Konditionierung eine Rolle spielen⁹³, aber auch bei Lernprozessen im Allgemeinen. Dass unter anderem auch DHA-abhängige Prozesse bei der Langzeitpotenzierung eine Rolle spielen, konnte eine an Mäusen durchgeführte Studie zeigen. In dieser fand sich eine Korrelation zwischen einer DHA-Deprivation während der Entwicklung und einer reduzierten Induktion von Langzeitpotenzierung sowie einer geringeren NMDAR-Expression insbesondere in der CA3-Region⁸.

2.3.2. Das zelluläre Stützgerüst des Hippocampus

Die synaptozentrische Sicht verschiebt sich zunehmend in Richtung einer neuronenzentrischen⁹⁴. Nicht allein den Synapsen, sondern Charakteristika der gesamten Zelle wird Wichtigkeit bei Lernprozessen zugemessen. Somit werden auch Zellen eingeschlossen, welche modulatorische Funktionen im zentralen Nervensystem besitzen, wie Mikroglia und Astrozyten⁹⁵.

Mikroglia (Marker: Iba1) sind die Makrophagen des zentralen Nervensystems und damit meist für ihre Funktion als Immunzellen bei Infektion, Ischämie oder Degeneration des Gehirns bekannt⁹⁶. Studien zeigten jedoch, dass Mikroglia über Signalstoffe wie Chemokine, z.B. Fractalkine (CX3CL1), auch die Funktionalität von Neuronen und neuronalen Schaltkreisen modulieren⁹⁷. Gleichzeitig beeinflusst die Aktivität von Neuronen die der Mikroglia, wodurch ein wechselseitiges Verhältnis entsteht⁹⁸. Unter anderem über die Expression von Thrombospondinen⁹⁹ können Mikroglia die Synaptogenese induzieren¹⁰⁰ sowie über weitere Mechanismen die synaptische Aktivität erhöhen¹⁰¹. So können sie die Entstehung von Langzeitpotenzierung bewirken und Lernprozesse befördern^{102,103}. Eine weitere wichtige Funktion der Mikroglia ist die Induktion entwicklungsabhängiger Apoptose über eine

Phagozytose von Neuronen einerseits und die Verlängerung des Überlebens sowie die Proliferation und Differenzierung von Neuronen andererseits. Die Apoptose-Induktion erfolgt hierbei via Sekretion verschiedener Signalmoleküle wie Glutamat¹⁰⁴ oder Cathepsin B¹⁰⁵, die Vermittlung der Proliferation über eine Sekretion anti-inflammatorischer oder trophischer Faktoren^{106,107}.

Hierdurch wird die Homöostase der Neurogenese in der Subgranulären Zone (SGZ) des adulten Hippocampus erhalten¹⁰⁶. Mikroglia stellen somit einen wichtigen Bestandteil der neurogenen Nische in der SGZ dar¹⁰⁸ und spielen eine Rolle in dem Erhalt und der Unterstützung der Neurogenese sowie des räumlichen Gedächtnisses¹⁰⁹.

Auch bei maternalem n-3-PUFA-Mangel spielen Mikroglia-vermittelte Prozesse rund um die Phagozytose von hippocampalen synaptischen Bestandteilen eine Rolle⁵². Sind diese Prozesse fehlerhaft, können kognitive Defizite die Folge sein^{52,103}. Andererseits kann die anti-inflammatorische Wirkung von Mikroglia unter anderem über DHA induziert werden¹¹⁰. Dies geschieht, indem DHA bei einer Exposition gegenüber entzündungsfördernden Faktoren eine Mikroglia-Überaktivierung verhindert⁹. In einer Studie konnten so neuronale Schäden der Pyramidenzellen der CA1-Region des Hippocampus verhindert werden⁹ und nach experimentellem ischämischem Schlaganfall eine vermehrte Proliferation Doublecortin (DCX)- und NeuN-positiver Zellen sowie eine verbesserte Neurogenese und Angiogenese erzielt werden¹¹¹.

Auch Astrozyten (Marker: GFAP) sind bedeutend für die neuronale Plastizität. Sie unterstützen kalziumvermittelt die Verarbeitung von Informationen^{112,113} und enthalten als fast einzige Zellen des ZNS Glykogen, welches die Energie für Umbauprozesse der Synapse sowie für die Noradrenalin-vermittelte Bildung des Neurotransmitters Glutamat liefert. Somit machen sie synaptische Plastizität erst möglich¹¹⁴. Weiterhin besteht über gliale Rezeptoren und Signalmoleküle eine bidirektionale Kommunikation zwischen Astroglia und Neuronen. Hierdurch ist eine direkte Partizipation von Astrozyten an neuronalen Schaltkreisen und deren Modulation möglich^{115,116}.

In der CA1-Region des Hippocampus konnte gezeigt werden, dass Astroglia Glutamat-vermittelt eine synchrone Exzitation von benachbarten Pyramidenzellen bewirken und somit zur Entstehung von Langzeitpotentierung beitragen¹¹⁷. Sie beenden andererseits aber auch die Transmitteraktivität und damit die Lernprozesse, indem sie das freigesetzte Glutamat wieder aufnehmen und es zurück in den Glutamat-Glutamin-Kreislauf der Neuronen überführen¹¹⁸. Auch der Astrozyten-Kontakt zu neuronalen Synapsen allein kann über noch unbekannte Mechanismen eine Wachstumshemmung der Synapsen während der Konsolidierung von Gedächtnisinhalten bewirken bzw. einen Wegfall dieser Hemmung durch den Rückzug der Astrozyten-Fortsätze ermöglichen. Damit lässt sich in der ausgeprägten

Plastizität der Astroglia eine regulatorische Funktion vermuten, die zum Beispiel bei kognitiven Prozessen von Bedeutung ist¹¹⁹.

Einen weiteren zentralen Bestandteil des ZNS stellen Oligodendrozyten (Marker: Olig2) dar. Unter anderem produzieren sie das Myelin, welches ein wichtiger Grundbestandteil der weißen Substanz ist¹²⁰. Myelin umgibt die Axone von Neuronen in Form einer Markscheide, unterstützt diese bei metabolischen Prozessen und stellt eine elektrische Isolation dar^{121,122}. Dies ist Voraussetzung für die saltatorische Erregungsweiterleitung, welche wiederum Grundlage für höhere kognitive Funktionen darstellt^{122,123}.

2.3.3. Der Gyrus dentatus als Ort kindlicher und adulter Neurogenese

Der Hippocampus ist aus zahlreichen Gründen ein Gehirnareal von großem Interesse. Insbesondere der Gyrus dentatus bietet in seiner Funktion als Gatekeeper einen guten Angriffspunkt für Interventionen. Er leitet die konvergierenden kortikalen Inputs zunächst unverzweigt weiter, bevor sie nach der Passage wieder divergieren, und stellt damit eine Möglichkeit dar, den Informationsfluss vom Cortex zum limbischen System zu regulieren¹²⁴. Außerdem ist er bekannt für seine besondere Bedeutung als Region der adulten Neurogenese, welcher ein Einfluss auf Lernprozesse zugeschrieben wird. Bereits in den 60er Jahren wurde sie im Hippocampus erwachsener Nagetiere in vivo nachgewiesen¹²⁵, in den 90ern dann auch beim Menschen¹²⁶. Möglich ist die adulte Neurogenese durch das Vorhandensein neuronaler Stammzellen (NSCs), welche sich in der subgranulären Zone an der Grenze zwischen Hilus und Körnerzellschicht des Gyrus dentatus befinden. Sie sind durch ihre Fähigkeit zur multipotenten Differenzierung in verschiedene Zelllinien, zur Selbsterneuerung und zur unbegrenzten Proliferation definiert¹²⁷. Der Gyrus dentatus generiert also neben dem Bulbus olfactorius¹²⁸ als eine von nur zwei Regionen des Nervensystems auch im Erwachsenen noch kontinuierlich neue Neuronen^{82,125,126} und ist daher als zerebrale Struktur von besonderer Bedeutung. Insbesondere die Nische der subgranulären Zone hat hierbei durch ihre Funktion als Ort der adulten Neurogenese Einfluss auf Prozesse bis ins Erwachsenenalter hinein¹²⁷.

2.3.4. Die Entwicklung des Hippocampus bei Ratte und Mensch

Bezogen auf den Zeitpunkt und die Zeitspanne der Entwicklung des Hippocampus, aber auch des gesamten Gehirns, zeigen sich zwischen Ratte und Mensch große Unterschiede. So liegt zum Zeitpunkt der Geburt das Gewicht des Gehirns der Ratte bei 12 Prozent des adulten Gehirngewichts, beim Menschen bereits bei 27 Prozent.¹²⁹ Die Reife des Rattenhirns entspricht in dieser Instanz zudem erst der eines 18 Wochen alten menschlichen Fötus.¹³⁰ Andererseits entwickelt es sich aber auch in einer deutlich kürzeren Zeitspanne.

Abgesehen von der zeitlichen Komponente sind die grundlegenden Entwicklungsschritte jedoch weitestgehend vergleichbar. Bei beiden Spezies werden die Neuronen der jeweiligen Regionen des Hippocampus aus drei verschiedenen Ursprungsepithelien generiert, dem fimbrischen Glioepithel, dem primären dentatischen Neuroepithel und dem ammonischen Neuroepithel.

Beim Menschen findet die neuronale Proliferation in der 12.-18. Schwangerschaftswoche (SSW) statt, also gegen Ende des 1. Trimesters. Dies ist eine geschützte Periode, die zwar beispielsweise durch Chromosomenanomalien, Rötelninfektion oder Strahlenbelastung negativ beeinflusst werden kann, nicht aber durch Faktoren wie die intrauterine Wachstumsrestriktion (IUGR) durch Malnutrition oder plazentare Insuffizienz. Diese kommen erst später zum Tragen, beeinflussen also weniger die neuronale Zellzahl als später ablaufende Entwicklungsprozesse.¹³⁰

Die verschiedenen Regionen des menschlichen Hippocampus können ab der 15.-19. Schwangerschaftswoche unterschieden werden. Ab etwa der 32. SSW reifen die Neuronen in CA2 und CA3 heran. Die Entwicklung von CA1 erfolgt etwas verzögert und zuletzt hat nach etwa 34 Wochen auch der Gyrus dentatus sein Reifestadium erreicht. Die Zytoarchitektur ist zum Zeitpunkt der Geburt vollständig etabliert¹³¹.

Die sogenannte „Phase des schnellen Hirnwachstums“ beginnt beim Menschen etwa zur Mitte des zweiten Trimesters und dauert etwa bis zum zweiten Lebensjahr an. Diese Phase ist deutlich vulnerabler äußeren Einflüssen gegenüber als die Phase, in welcher die menschliche Neurogenese stattfindet. Im Falle eines schädlichen Einflusses während dieser kritischen Zeitperiode können beispielsweise intellektuelle Defizite entstehen¹³⁰, da eine erhöhte Vulnerabilität äußeren Faktoren gegenüber besteht¹²⁹. Durch den protrahierten Zeitraum bis zum 2. Lebensjahr bietet sich andererseits jedoch auch mehr Potential für Interventionen.¹³⁰

Die Neurogenese der Ratte beginnt in der Embryonalperiode (E10) und ist auf das gesamte Gehirn gesehen am postnatalen Tag 15 (P15) größtenteils beendet¹³².

Im Gyrus dentatus erfolgt hierbei ein beträchtlicher Teil der Neurogenese bereits pränatal mit Entstehung der pyramidalen Neurone an E16-E21^{82,133}, jedoch proliferieren Teile der Zellsubpopulationen, wie beispielsweise die Körnerzellen, vorwiegend auch erst nach der Geburt¹³⁴. So werden zwischen dem 5. und 8. postnatalen Tag (P5-P8) im Gyrus dentatus täglich noch mindestens 50.000 Neuronen neu gebildet⁸³, wobei dieser Zeitraum auch auf das gesamte Gehirn gesehen bis zum Abschluss der Neurogenese an P15 die Phase mit der größten Zunahme der Neuronenzahl darstellt¹³⁵. Bis ins Erwachsenenalter erfolgt lediglich im Bulbus olfactorius und dem Gyrus dentatus ein geringes Maß an Neurogenese.

Parallel dazu findet bei der Ratte etwa von P2-P25 die "Phase des schnellen Hirnwachstums" statt mit etwa 80% des postnatalen Wachstums bezogen auf die Hirnmasse^{130,135}. Die Phase

ist ausgezeichnet durch die Proliferation von Gliazellen, die Myelinisierung von Nervenzellen einschließlich der Oligodendrozytogenese und den Ausbau dendritischer Komplexität und synaptischer Verbindungen im Rahmen der Synaptogenese^{134,136}. Eine wichtige Bedeutung kommt jedoch auch der Apoptose bzw. dem programmierten Zelltod zu, in dessen Rahmen die Neuronenzahl zwischen P7 und P15 zwischenzeitig um ca. 60-70% reduziert wird¹³⁵. Hierbei wird Platz geschaffen für das Stützgerüst im Rahmen der Astrozytenproliferation, welche ihr Maximum um P11-P16 erreicht¹³³.

Im Zeitraum der durch uns gewählten Intervention (P14 – P56) ist somit die Neurogenese im Hippocampus bereits größtenteils abgeschlossen. Die Phase des schnellen Hirnwachstums dauert jedoch noch bis zu P25 an, mit Fortschreiten in geringerem Ausmaß bis P60, sodass die dort beschriebenen Prozesse (Zellwachstum, Synaptogenese, Modulation durch Apoptose, Oligodendrozytogenese) möglicherweise durch unsere Intervention beeinflusst werden können.

2.4 Fragestellungen und Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit werden die Auswirkungen einer Ernährungsintervention mit Docosahexaensäure, Cholin und/oder Lutein im frühen Leben auf die zelluläre Zusammensetzung des Hippocampus weiblicher Ratten im späteren Leben untersucht. In der Untersuchung des Hippocampus hinsichtlich seiner Funktion rund um Lernen und Gedächtnis werden in dieser Arbeit nicht nur Neuronen (Marker: NeuN) und deren Vorläuferzellen (Marker: DCX) untersucht, sondern auch unterstützende Zellen wie Mikroglia (Marker: Iba1), Astrozyten (Marker: GFAP) und Oligodendrozyten (Marker: Olig2), in dem Verständnis, dass für Lernprozesse und kognitive Leistungsfähigkeit das gesamte komplexe zelluläre Netzwerk des Hippocampus notwendig ist.

Die folgenden Fragen werden hierbei im Einzelnen erörtert:

1. Unterscheidet sich die zelluläre Zusammensetzung des Hippocampus weiblicher Versuchstiere zwischen den acht Versuchsgruppen?
2. Gibt es bestimmte Zelllinien, die mehr oder weniger durch die Ernährungsintervention beeinflusst wurden?
3. Gibt es synergistische Effekte durch bestimmte Kombination der supplementierten Substanzen?

3. Material und Methoden

3.1 Studiendesign

Bei den Versuchstieren handelt es sich um sechzehn weibliche Wistar-Ratten des Züchters Janvier (Janvier Labs, Rte du Genest, 53940 Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) und 128 ihrer Nachkommen. Von diesen sind für diese Arbeit nur 64 weibliche Nachkommen relevant.

Beim Züchter erfolgte bereits ab dem Trächtigkeitstag E0 eine Kontrolldiät der Muttertiere mit Altromin C1000 mit der folgenden Zusammensetzung: 500 kcal/kg, 17% Protein, 5% Fett, 11% Disaccharide, 47% Stärke. Die trächtigen Muttertiere wurden am Tag E14 geliefert und von dem Zeitpunkt in insgesamt 5 Haltungsräumen in einer experimentellen S1-Tierhaltung mit Hygienestatus SPF (specific pathogen free) im Gebäude 51, Robert-Koch-Str. 10, 50931 Köln untergebracht, wo auch die Versuchsdurchführung stattfand (die Nahrungsintervention in den Tierhaltungsräumen 052, 052a, 053 und 053a, die Organentnahmen in Raum 15). Die Ratten wurden in Käfigen mit einem Tag-Nacht-Rhythmus von je 12 Stunden gehalten, in denen eine individuelle Temperatur- und Luftfeuchtigkeitskontrolle gewährleistet war. Die Luftwechselrate betrug hierbei 6–8-mal pro Stunde, die Temperatur lag zwischen 20-24°C und die Luftfeuchtigkeit zwischen 45-65 rH. Käfigwechsel fanden einmal wöchentlich statt.

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurden die Tiere während der Tragezeit einzeln untergebracht. Nach der Geburt der Jungtiere am Tag E23 (entsprechend dem postnatalen Tag P1) erfolgte die Unterbringung jeweils eines Muttertiers mit acht Nachkommen. Hierbei wurden die Würfe am postnatalen Tag P2 durch so genanntes Cross-fostering auf je acht Tiere pro Ammenmutter vereinheitlicht (4m, 4w, siehe Abbildung 2).

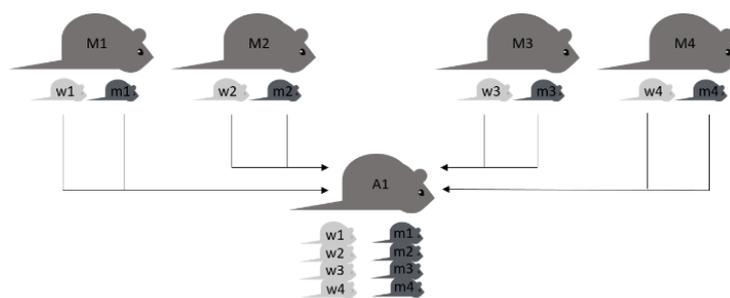


Abb. 2: Cross-fostering. Aufteilung der Jungtiere (w1-4; m1-4) von 4 Muttertieren (M1-4) auf eine Ammenmutter (A1). Ein Ammenwurf besteht also aus 4w+4m.

Innerhalb des Zeitraums zwischen Tag P14 und Tag P56 wurden je zwei Ammen-Würfe, also insgesamt sechzehn Tiere (acht Weibchen und acht Männchen), in acht Gruppen eingeteilt, welche durch die jeweilige Ernährung begründet waren. Ab Tag P21 erfolgte die Haltung in gleichgeschlechtlichen Gruppen, deren Anzahl gewichtsabhängig war ($n=2-4$). Zu jedem Zeitpunkt waren hierbei Nagematerial sowie Rückzugsmöglichkeiten vorhanden, während der

Schwangerschaft auch Nistmaterial. Ein grundlegendes Hygienemonitoring erfolgte quartalsweise entsprechend den Empfehlungen der FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations), um die Gesundheit der Versuchstiere bestmöglich zu gewährleisten.

Der Beginn der Supplementation wurde entsprechend dem Beginn der Aufnahme der Beikost am Tag P14 gewählt. Die Kontrollgruppe erhielt weiterhin die Altromin C1000 Diät, eine Gruppe Cholin-angereicherte Nahrung (CH), eine andere DHA-angereicherte (DHA), eine weitere Lutein-angereicherte (L), die fünfte Cholin- + DHA-angereicherte, die sechste DHA- + Lutein-angereicherte, die siebte Cholin- + Lutein-angereicherte und die letzte Cholin- + DHA- + Lutein-angereicherte (siehe Abbildung 3). Hierbei wurde die Dosis der Nahrungszusätze nach Literaturrecherche so gewählt, dass sicher keine Toxizität bestand und die Nahrungsaufnahme in normaler Menge erfolgte¹³⁷⁻¹³⁹. Im Verlauf wurden weitere Untersuchungen (laborchemische Kontrollen retroorbital entnommenen Bluts, metabolische Käfige mit Bestimmung der Nahrungsaufnahme und Trinkmenge sowie Untersuchungen von Stuhl und Urin, kraniale MRT-Bildgebungen, Verhaltenstests) durchgeführt, die nicht Teil dieser Arbeit sind und daher an dieser Stelle nicht genauer erläutert werden. An den postnatalen Tagen P141-143 wurden die Tiere schließlich getötet, präpariert und die Organe entnommen.

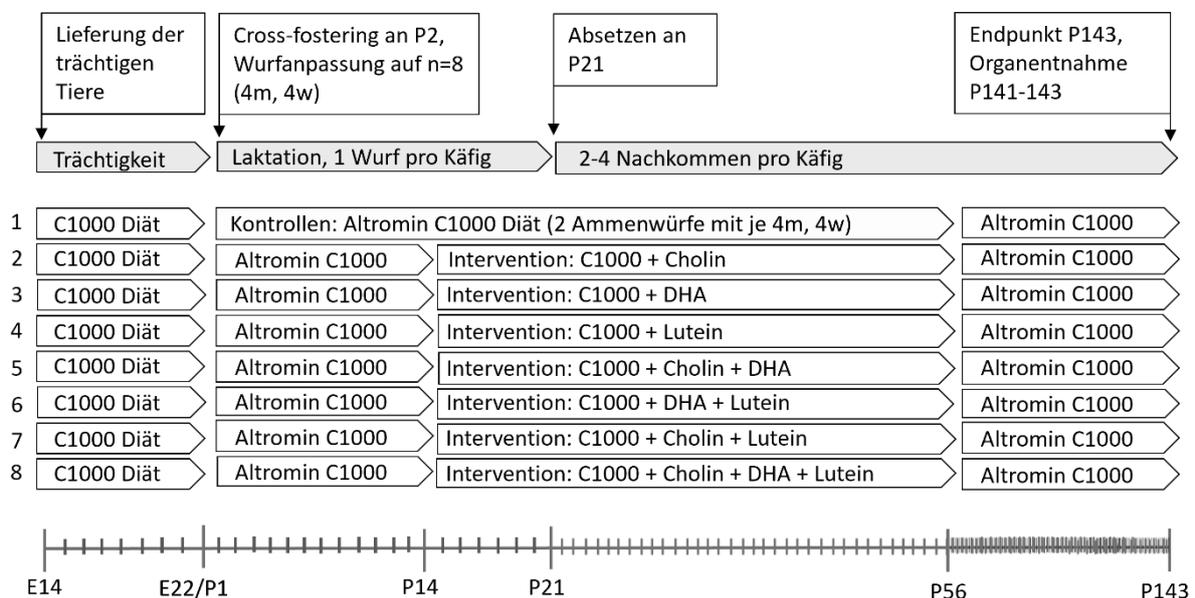


Abb. 3: Versuchsaufbau.

3.2 Herstellung des Interventionsfutters

Das Interventionsfutter wurde je nach Gruppe in individueller Zusammensetzung vorbereitet (siehe Tabelle 1). Als Grundlage dienten in allen Gruppen ohne Cholin 690 72g des Futters C1000 sowie 280ml MilliQ-Wasser.

In der DHA-Gruppe (DHA) wurden dem Basisfutter 8,75g DHA und 0,525g Sonnenblumenöl beigefügt. In der Lutein-Gruppe (L) erfolgte eine Hinzunahme von 0,525g Lutein sowie 8,75g Sonnenblumenöl. Die Gruppe DHA + L enthielt von Ersterem 8,75g, von Letzterem 0,525g. In den Cholin (CH) Gruppen wurde Cholin-angereichertes Spezialfutter (C1000 modifiziert mit 5g Cholinchlorid/kg) verwendet. Diesem wurden in der Cholin-Gruppe (CH) noch 9,28g Sonnenblumenöl hinzugefügt. In der Gruppe CH + L wurden 0,525g Lutein sowie 8,75g Sonnenblumenöl zugesetzt. In der Gruppe CH + DHA wurde das Cholin-angereicherte Spezialfutter mit 8,75g DHA sowie 0,525g Sonnenblumenöl gemischt und in der Gruppe mit der Dreifachkombination CH + L + DHA 8,75g des DHA und 0,525g des Luteins. Das entstandene Futter wurde zu handtellergroßen Kugeln geformt und bis zur Verwendung bei -4°C gelagert.

Tab. 1: Zusammensetzung des Futters

Gruppe	Futter (g)	Cholin (C1000 modifizier t #100230)	DHA (g)	Lutein (g)	Sonnenblumenöl (g)
C 1000	690,72	-	-	-	9,28
C1000 + Cholin	690,72	ja	-	-	9,28
C1000 + Lutein	690,72	-	-	0,525	8,75
C1000 + DHA	690,72	-	8,75	-	0,525
C1000 + Ch + L	690,72	ja	-	0,525	8,75
C1000 + Ch + DHA	690,72	ja	8,75	-	0,525
C1000 + L + DHA	690,72	-	8,75	0,525	-
C1000 + Ch + L + DHA	690,72	ja	8,75	0,525	-

+ je 280ml MilliQ Wasser

3.3 Präparation und Gehirnentnahme

Die Präparation der Tiere erfolgte an den postnatalen Tagen P141-143. Die Tiere wurden zunächst durch Inhalation von Isofluran 5% in eine tiefe Narkose versetzt. Anschließend injizierten wir Pentobarbitalarbitat i.p. (Narcoren 16g/100mL) und perfundierten mit phosphatgepufferter, physiologischer Kochsalzlösung (PBS) über eine Punktion des rechten Vorhofs in den Kreislauf des Tieres. In der Folge trat dessen Tod ein. Mit Hilfe einer Guillotine erfolgten nun die Dekapitation und die Entnahme des Gehirnes.

Zunächst wurde die verbleibende Nackenmuskulatur mit Hilfe einer spitzen Schere vom Ansatz am okzipitalen Schädel getrennt. Von dort wurde mittig mit derselbigen die Haut bis zu den Augen inzidiert, sodass darunter der Knochen frei gelegt wurde. Im Falle eines Bestehenbleibens des ersten Halswirbels nach der Dekapitation wurde dieser nun durch eine Drehbewegung mit der Zange abgetrennt. Die Freipräparation des Gehirns erfolgte durch sukzessives Entfernen kleiner Knochenfragmente. Mit Hilfe einer Sonde konnten die Hirnnerven und schließlich mit der spitzen Schere das Chiasma opticum möglichst weit frontal durchtrennt werden. Nun wurde das Gehirn in eine in gekühltem künstlichen Liquor cerebrospinalis (ACSF) befindliche Acryl-Matrix für Rattenhirne platziert. Mit Rasierklingen erfolgten drei Schnitte: Der erste auf Höhe der Auftrennung des Chiasma opticum in die Nervi optici, der zweite bei Bregma +2 und der dritte bei Bregma -7. Hierdurch entstanden letztlich vier Gehirnscheiben: Die Scheiben 0 bis +2, das frontale Stück und das okzipitale Stück wurden zur molekularen Untersuchung bei -80 Grad Celsius asserviert. Die Scheibe 0 bis -7, welche den Hippocampus enthielt, wurde zur histologischen Weiterverarbeitung eingebettet.

3.4 Einbettung des Gehirns und Anfertigung der Schnitte

Zur Vorbereitung der Einbettung des Gehirns wurde die Scheibe Bregma 0 bis -7 24h bei +4°C in 4%-igem Paraformaldehyd (PFA) mit einem pH von 7,4 fixiert. Anschließend erfolgte eine ca. 48-stündige Inkubation in 30% Sucrose, bis das Gewebe vollständig aufgesättigt auf den Boden des Gefäßes sank. Nun konnte das Gehirn mit der weiter okzipital gelegenen Seite nach oben in das Kryo gegeben werden, welches anschließend mit Tissue Tec gefüllt wurde. Das Förmchen wurde abschließend in auf ca. -40°C bis -60°C heruntergekühltes Isobutanol gehalten, bis das Tissue Tec komplett durchgefroren war. Die eingebetteten Gehirnscheiben wurden bei -80°C gelagert.

Die Schnittanfertigung erfolgte mit dem Leica Cryotom im Zentrum für molekulare Medizin (ZMMK, Gebäude 66, Robert-Koch-Str. 21, 50931 Köln). Bei einer Temperatur von -25°C wurden von Beginn des Hippocampus bis zur Zielebene (Ebene 60, Bregma -3,24) 8µm dicke Schnitte angefertigt und auf Superfrost® Objektträger aufgezogen. Diese wurden bei -80°C gelagert.

3.5 Histologie

3.5.1. Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE)

Um eine Schablone für die Immunfluoreszenz-gefärbten Schnitte herzustellen, wurde pro Gehirn jeweils ein Schnitt in der Zielebene, Bregma -3,24, mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt.

Das für die Färbung verwendete Hämalaun entsteht aus dem Naturfarbstoff Hämatoxylin, indem es im ersten Schritt oxidiert und anschließend mit einem Alaun gebeizt wird¹⁴⁰. Es färbt basophile Strukturen, wie die Zellkerne mitsamt der darin befindlichen DNA, den Kalk in Knochen, grampositive Bakterien sowie die Knorpelgrundsubstanz blau¹⁴¹, während Eosin andere Gewebestrukturen, das Cytoplasma, Kollagenfasern und Erythrozyten rötlich-gelb anfärbt¹⁴¹. Eosin dient hierbei im Anschluss an die Verwendung der Hämalaunlösung zur Gegenfärbung und sorgt mittels Ansäuerung durch Zusatz von Eisessig zur Beendigung des Bläuens. Es wurde nach laborinternem Standard vorgegangen, basierend auf Bancroft und Gamble^{140,142,143}. Zur Vorbereitung wurden die beiden Farbstoffe filtriert und dem wässrigen Eosin je 1-2 Tropfen Eisessig pro 100 ml zugesetzt. Zunächst wurden die Cryo-Schnitte zwei bis drei Stunden oder über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend zweimalig über 5 Minuten mit MilliQ-Wasser gewaschen. Im Anschluss wurden sie für 4-7 Minuten in Hämalaunlösung gegeben, und dann nach erneutem Waschen mit MilliQ-Wasser zum Bläuen der Zellkerne für 5 Minuten in kaltes Leitungswasser gehalten. Dieses wurde nun durch MilliQ-Wasser abgewaschen. Anschließend erfolgte die Färbung mit Eosin über 3-5 Minuten und schließlich nach zweimaligem kurzem Waschen mit MilliQ-Wasser die Gabe der Schnitte in Ethanol aufsteigender Konzentration. Es wurde 70%-iges, 80%-iges, 96%-iges und 100%-iges Ethanol verwendet, in welchem die Schnitte je eine Minute verweilten, um das Gewebe zu entwässern. Zuletzt wurden diese schließlich in zwei Schritten von je 5 Minuten Dauer in Neo-Clear inkubiert und mit dem Eindeckmedium Neo-Mount eingedeckelt.

3.5.2. Immunfluoreszenz-Färbung (IF)

Die der über insgesamt drei Tage durchgeführten Immunfluoreszenz-Färbung zugrunde liegenden Prinzipien^{144,145} wurden nach laborinternen Standards entsprechend den folgenden Abläufen angepasst:

Am ersten Tag wurden die Schnitte zunächst 3-4 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet und dann zweimalig über drei Minuten in MilliQ-Wasser gewaschen. Anschließend erfolgte die Blockierung mittels Sea Block Solution über zwei Stunden sowie die Liegend-Inkubation mit Primärantikörper über insgesamt 24 Stunden bei 4°C. Die jeweiligen Antikörperkombinationen pro Schnitt können Tabelle 2 entnommen werden.

Tab. 2: Antikörperkombinationen

Antikörper-Kombinationen	Angefärbte Struktur
anti-oligodendrocyte transcription factor 2 Antikörper (Olig2) anti-Ki67 Antikörper	Oligodendrozyten Proliferationsmarker
anti-neuronal nuclei Antikörper (NeuN) anti-doublecortin Antikörper (DCX)	RNA-bindendes Protein neuronale Vorläuferzellen

anti-glia fibrillary acidic protein Antikörper (GFAP) anti-Ki67 Antikörper	Gliazellen, v.a. Astrozyten Proliferationsmarker
anti-ionized-calcium-binding-adapter-molecule 1 Antikörper (Iba1)	Mikroglia

Am zweiten Tag wurden die Schnitte zunächst dreimalig über 5 Minuten in Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) mit zugesetztem 0,3% Tween® 20 gewaschen. Anschließend wurde der jeweilige mit einem Fluoreszenzfarbstoff gelabelte Sekundärantikörper (siehe Tabelle 3) mittels Pipette aufgebracht und dieser für eine Stunde belassen, wobei sowohl für die goat anti-mouse Antikörper als auch für die goat anti-rabbit Antikörper eine Verdünnung von 1:200 gewählt wurde. Nachdem die Schnitte erneut dreimalig in PBS + Tween® 20 gewaschen wurden, dieses Mal je 10 Minuten, erfolgte die DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) Gegenfärbung über 15 Minuten, durch welche die Zellkerne blau gefärbt wurden. Es wurde hierbei 1:1000 in PBS verdünntes DAPI verwendet. Im Anschluss folgte wieder eine dreimal zehninütige Waschung mit PBS + Tween® 20, ein kurzes Abwaschen der Schnitte mit MilliQ-Wasser und zuletzt das Eindeckeln mit Fluoromount. Am darauffolgenden Tag wurden noch bestehende Fluoromount-Reste entfernt und die Schnitte abschließend lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

Tab. 3: Verwendete Primär- und Sekundär-Antikörper (AK)

Artikel	Verdünnung	Hersteller
1. AK: Olig2, Maus	1:1000	Millipore, #MABN50
2. AK: goat anti-mouse Alexa 546, rot	1:200	
1. AK: NeuN, Maus	1:1000	Abcam, #ab104224
2. AK: goat anti-mouse Alexa 546, rot	1:200	
1. AK: Doublecortin (DCX), Hase	1:300	Cell Signaling, #4604S
2. AK: goat anti-rabbit GFP, grün	1:200	
1. AK: GFAP, Maus	1:1000	Covance, #SMI-22
2. AK: goat anti-mouse Alexa 546, rot	1:200	
1. AK: Ki67, Hase	1:1000	ThermoFisher, #PA5-19462
2. AK: goat anti-rabbit GFP, grün	1:200	
1. AK: Iba1, Maus	1:500	Wako, #016-20001
2. AK: goat anti-mouse Alexa 546, rot	1:200	

Verdünnung mit Antibody Diluent

3.6 Analyse der Immunfluoreszenzfärbungen mittels ImageJ

Die Schnitte wurden zunächst mit dem Olympus Mikroskop BX43 eingescannt und dann mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ (Version 1.54b) analysiert.

Die als .vsi Dateien abgespeicherten Scans der Hippocampus-Schnitte wurden zunächst via *Plugins > Olympus viewer* in dem Programm geöffnet und anschließend färbungsspezifisch ausgewertet.

3.6.1. Olig2

Nach Öffnen der Datei wurden initial die auf verschiedenen Kanälen parallel aufgenommenen Färbungen (Olig2/Ki67/DAPI, entsprechend den Kanälen Cy1/Cy2/Cy3) getrennt und sowohl die Kanäle mit Ki67 als auch mit DAPI geschlossen.

Anschließend wurde die region of interest (ROI) mittels der Funktion *Edit > Selection > Specify* in ihrer Höhe und Breite definiert und so ausgewählt, dass sie für alle Schnitte in das gewählte Hippocampus-Areal passte. Aufgrund der hohen Zelldichte entlang des Corpus Callosum wurde die ROI mittig in diese Region gelegt. Über die Befehle *Image > Adjust > Threshold* wurde dann der Schwellenwert festgelegt, ab welchem die Zellen als solche vom Programm registriert werden sollten. Hierfür fand der *Particle Count* Verwendung, welcher unter Ausschluss der Ränder der ROI und ab einer Partikelgröße von 5µfgm und mit einer *Circularity* von 0-1 die Zellen automatisiert zählte. Somit erhielten wir die absolute Zellzahl in dem vordefinierten Bereich und deren absolute Fläche sowie den Anteil der Fläche der Zellen bezogen auf die Fläche der ROI.

Da die Ki67-Färbung kein messbares Signal erbrachte, wird diese im Folgenden keine Erwähnung mehr finden.

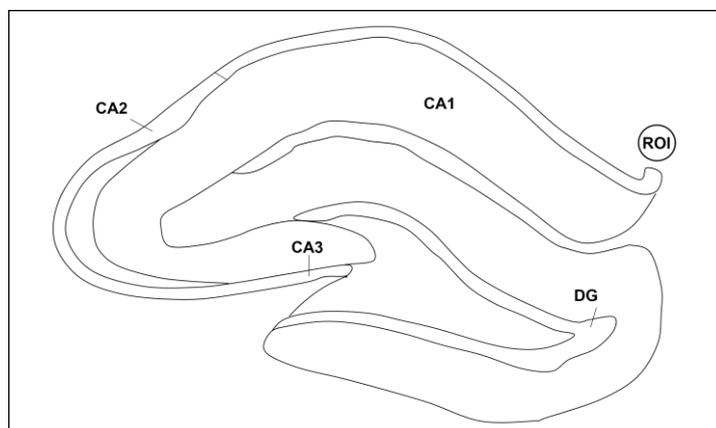


Abb. 4: Region of interest der Olig2-Färbung im Corpus callosum. Bestimmung der Zellzahl mittels Particle Count

3.6.2. NeuN und DCX

Auch bei dieser Auswertung wurden die auf verschiedenen Kanälen aufgenommenen Färbungen (NeuN/DCX/DAPI, entsprechend den Kanälen Cy1/Cy2/Cy3) zu Beginn getrennt, um daraufhin unter Ausschluss der DAPI Färbung NeuN und DCX wieder übereinander zu legen. Mittels *Polygon* Funktion wurde nun das Zellband des Gyrus dentatus so umfahren, dass auch das positive Signal von Double Cortin inkludiert war. Diese Region wurde in einem ROI (Region of interest) Manager abgespeichert und dann nach erneuter Trennung der Kanäle einmal über die NeuN Färbung und einmal über die DCX-Färbung gelegt. Wie auch bei der Olig2 Analyse wurde der *Threshold* genutzt, um Hintergrund von positivem Signal zu differenzieren. Mittels Messung der von NeuN bzw. DCX eingenommenen Fläche über die Funktion *measure* konnte bezogen auf die Gesamtfläche des Gyrus dentatus das positive Signal quantifiziert werden.

Neben der flächenbezogenen Analyse des positiven Signals von NeuN und DCX im Bereich des Gyrus dentatus wurde außerdem das Zellband des Stratum Pyramidale der Regionen CA1, CA2 und CA3 unter den Schnitten verglichen. Hierzu wurde in einem Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitt derselben Ebene (Ebene 60, Bregma -3,24) das Zellband mit der *Polygon* Funktion umfahren und die so entstandene Fläche gemessen.

In der Immunfluoreszenzfärbung wurden nun die mit dem NeuN Antikörper positiv angefärbten Zellen unter Benutzung des *Cell Counter* manuell ausgezählt und das Verhältnis zu der Fläche des Zellbandes berechnet.

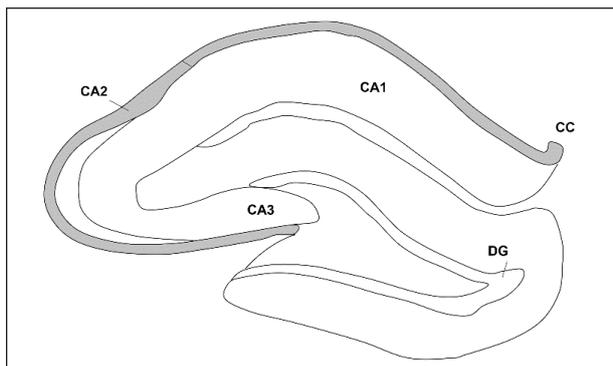


Abb. 5: Region of interest für die NeuN-Färbung im Stratum pyramidale von CA1-3. Auszählen der NeuN-positiven Zellen in der Immunfluoreszenzfärbung mittels Cell Counter

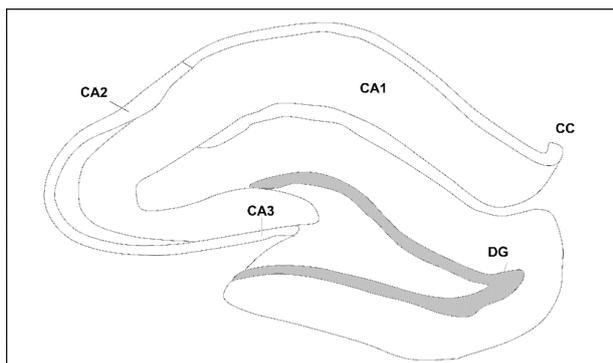


Abb. 6: Region of interest für die NeuN-Färbung und die DCX-Färbung im Stratum granulosum des Gyrus dentatus. Bestimmung von RawIntDen und Area fraction.

3.6.3. GFAP

Für die Auswertung der Färbung mit GFAP und Ki67 wurden die auf verschiedenen Kanälen aufgenommenen Färbungen (GFAP/Ki67/DAPI, entsprechend den Kanälen Cy1/Cy2/Cy3) zu Beginn wieder getrennt und nur auf dem GFAP-Kanal ausgewertet. Mit den Befehlen *Analyze* > *Set measurements* wurde eine region of interest entsprechend der Größe der ROI der Olig2-Auswertung festgelegt und ebenso in den Bereich des Corpus callosum gelegt. Der Anteil der Fläche der ROI, der von GFAP-positive Zellen eingenommen wurde (*Area fraction*), sowie deren *RawIntDen* wurden bestimmt. *RawIntDen* steht hierbei für raw integrated density und entspricht der Summe der Werte der Pixel innerhalb des Bildes.

Da die Ki67-Färbung kein messbares Signal erbrachte, wird diese im Folgenden keine Erwähnung mehr finden.

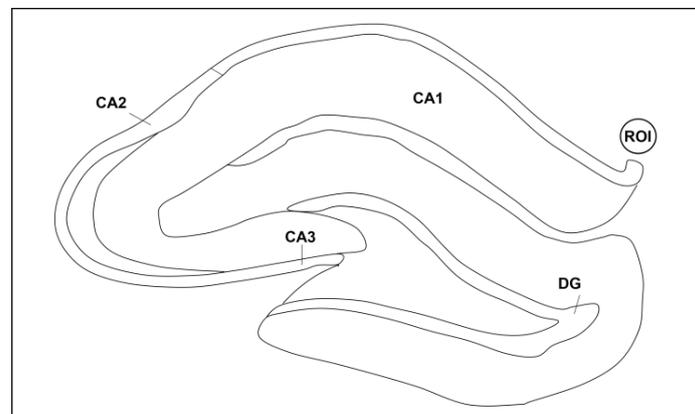


Abb. 7: Region of interest der GFAP-Färbung im Corpus callosum. Bestimmung der Area fraction sowie der RawIntDen.

3.6.4. Iba1

Für die Auswertung der Färbung mit Iba1 wurden die beiden auf verschiedenen Kanälen aufgenommenen Färbungen (Iba1/DAPI, entsprechend den Kanälen Cy1/Cy2) getrennt und zunächst die regions of interest auf Basis der DAPI-Färbung festgelegt. Hierbei wurde eine Achse entlang der beiden Enden des Stratum granulosum des Gyrus dentatus gelegt, eine weitere entlang des Verlaufs des oberen Bogens des DG. Nun konnten entlang der Achsen je drei ROIs in das Stratum radiatum der CA1- und CA3-Regionen gelegt werden sowie eine weitere im Bereich des Corpus Callosum. Die Größe einer einzelnen kreisförmigen ROIs entsprach hierbei der Größe der ROI der Olig2- und der GFAP-Färbung. Es wurde entsprechend der Auswertung der GFAP-Färbung erneut der Anteil der Fläche von Iba1 innerhalb der ROI (*Area fraction*) sowie deren *RawIntDen* bestimmt.

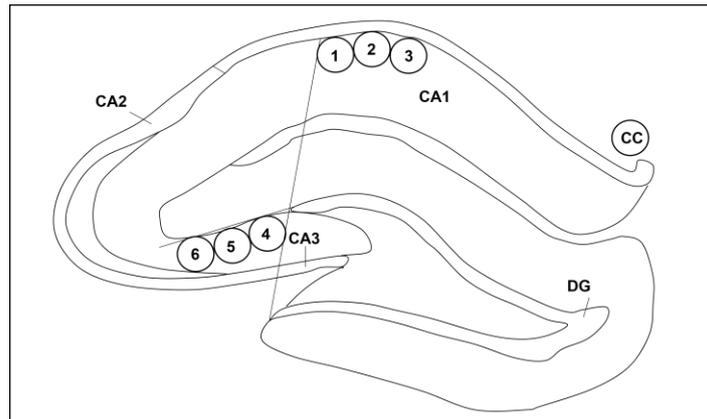


Abb. 8: Regions of interest für die Iba1-Färbung. ROI 1-3: Stratum radiatum der CA1-Region, ROI 4-6: Stratum radiatum der CA3-Region, ROI CC: Corpus Callosum. Bestimmung des Anteils der Fläche von Iba1 innerhalb der ROIs sowie deren RawIntDen.

3.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe von GraphPad Prism (Version 9.5.1). Da insgesamt 8 Gruppen untereinander zu vergleichen waren, erfolgte initial ein nichtparametrischer Kruskal-Wallis Test (One-Way ANOVA) mit anschließendem Dunn's Posttest. Im Falle eines signifikanten Ergebnisses wurde der Bonferroni-adjustierte Mann-Whitney U-Test herangezogen. Als Konfidenzintervall wurden 95% gewählt.

Alle Datensätze mit einem Grubbs-Test ($p < 0,05$) auf Outlier überprüft. Lediglich in 4 Datensätzen wurde so ein einziger Outlier identifiziert. Die weit überwiegende Anzahl an Datensätzen enthielt keine Outlier.

Bei den in dieser Arbeit dargestellten Datensätzen handelt es sich um normalisierte Daten, um eine bessere Vergleichbarkeit zu erzielen.

4. Ergebnisse

Um den Effekt der Ernährungsintervention auf die frühe neuronale Entwicklung zu untersuchen, wurden die abhängigen Variablen, z.B. die Zellzahlen der Oligodendrozyten (Marker: Olig2), der neuronalen Vorläuferzellen (Marker: DCX), der reifen Neuronen (Marker: NeuN), der Gliazellen (vor allem der Astrozyten, Marker: GFAP) und der Mikroglia (Marker: Iba1) in den acht verschiedenen Gruppen (C, CH, L, DHA, CH + L, L + DHA, CH + L + DHA) quantifiziert. Eine Auswertung der Ki67-Färbung als Proliferationsmarker konnte bei fehlendem messbaren Signal nicht erfolgen.

Mit dem Kruskal-Wallis-Test (One-Way ANOVA) soll hierbei zunächst der Einfluss der Ernährungsintervention auf die jeweilige abhängige Variable der verschiedenen Gruppen untereinander geprüft werden. Hierbei wird die Nullhypothese getestet, die besagt, dass alle Daten von Gruppen mit sich untereinander nicht relevant unterscheidenden Rangsummen stammen¹⁴⁶, also die erhobenen Daten der Gruppen sich untereinander nicht relevant unterscheiden. Im Anschluss wurde der Dunn's Posttest für Mehrfachvergleiche verwendet, um zwei Gruppen (die Kontrollgruppe mit der jeweiligen Interventionsgruppe) nochmals miteinander zu vergleichen. Aufgrund der gezielteren Ausrichtung des Posttests im Vergleich zur One-Way-ANOVA weist dieser eine höhere Teststärke zur Identifizierung von Unterschieden zwischen zwei Gruppen auf. Es wurden hierbei die Unterschiede der Rangsummen der Kontrollgruppe und der jeweiligen Interventionsgruppe mit den anhand der Gruppenzahl und -größe zu erwartenden Unterschieden der Rangsummen verglichen¹⁴⁷. Hierfür fand ein an die Anzahl der angestellten Vergleiche angepasster p-Wert Verwendung (multiplicity adjusted p-value). Gemessen wird dieser an einem family-wise α -Grenzwert von 0,05¹⁴⁸. Die 5%ige Wahrscheinlichkeit, dass ein Posttest fälschlicherweise trotz bestätigter Nullhypothese einen p-Wert von $<0,05$ ergibt (Fehler 1. Art) wird hierbei auf die gesamte Familie der Vergleiche und nicht auf die einzelnen Vergleiche bezogen und damit bereits hinsichtlich der zu erwartenden Zunahme der Wahrscheinlichkeit eines Fehlers 1. Art beim multiplen Testen korrigiert. Im Folgenden wird in dem Zusammenhang von einem „adjustierten p-Wert“ gesprochen werden.

Zur Überprüfung des Dunn's Test wurde im Falle einer Signifikanz der nichtparametrische Bonferroni-adjustierte Mann-Whitney U-Test ergänzt, also ebenfalls die Rangsummen der jeweiligen Interventionsgruppe und der Kontrollgruppe verglichen.

4.1 Olig2

Abbildung 9(a) zeigt repräsentative Bilder der Olig2-Färbungen aller Gruppen im Corpus Callosum. In der Abbildung 9(b) sind die mittels Cell Counter quantifizierten, normalisierten Zellzahlen Olig2-positiver Zellen (y-Achse) der jeweiligen Gruppen in Form von Säulendiagrammen einschließlich der berechneten Standardabweichungen dargestellt (x-

Achse). Es fällt auf, dass die Standardabweichung aller Gruppen recht gering ist und damit eine geringe Varianz innerhalb der Gruppen besteht.

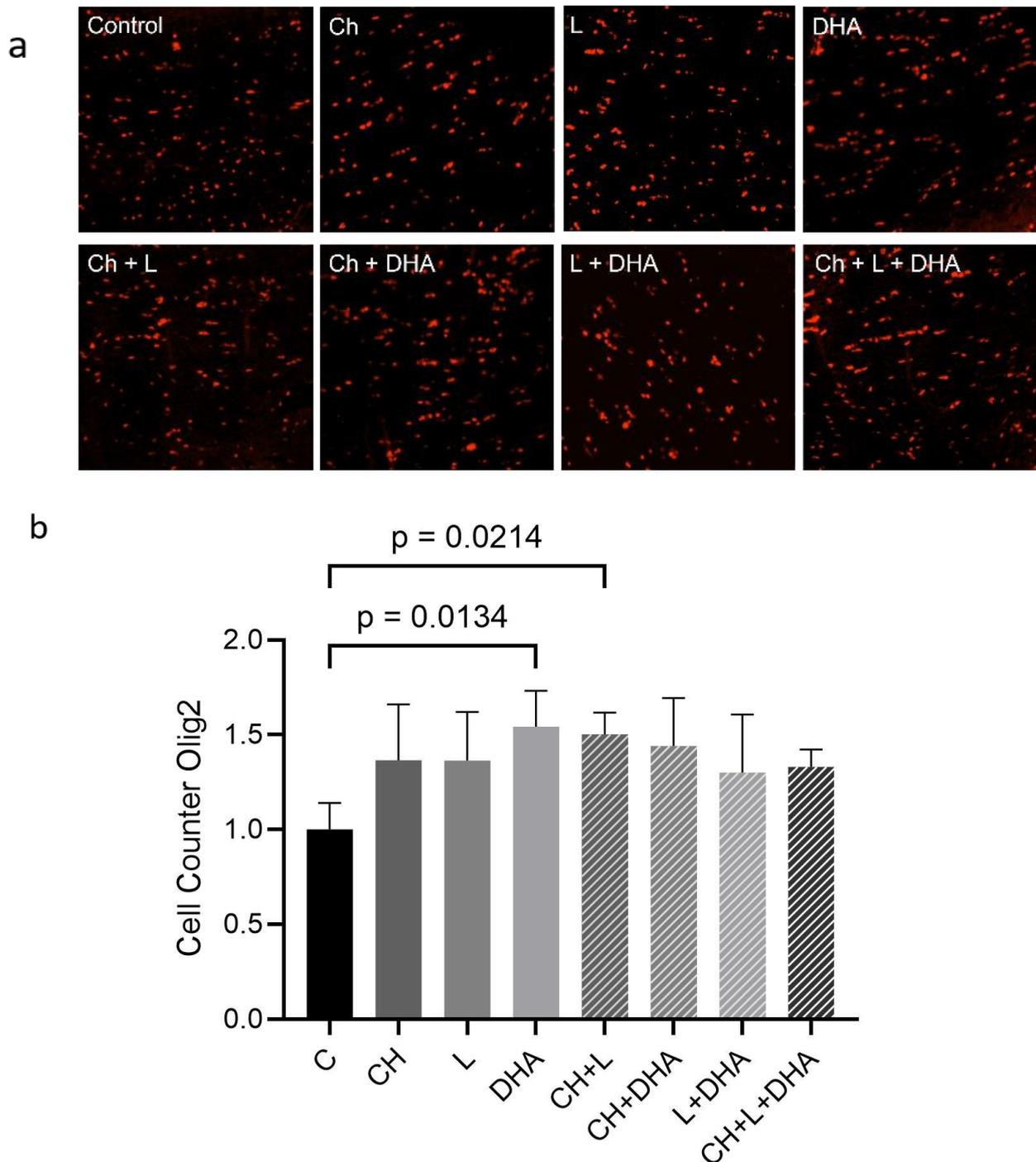


Abb. 9: Auswertung der Olig2-Färbung. (a) Repräsentative Abbildungen der Olig2-positiven Zellen im Corpus Callosum aus der Kontroll-, Cholin-, Lutein-, DHA-, Cholin + Lutein-, Lutein + DHA- und Cholin + Lutein + DHA-Gruppe. (b) Normalisierte Zellzahlen der Olig2-positiven Zellen im Bereich des Corpus Callosum in den verschiedenen Gruppen ($P < 0.05$, Kruskal-Wallis-Test, Re-Test mit Mann-Whitney-Test bei signifikanten Werten, hier in den Gruppen DHA und Cholin + Lutein).

Der Kruskal-Wallis-Test ergibt in diesem Fall knapp keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf die abhängige Variable der Zellzahl Olig2-positiver Zellen in den verschiedenen Gruppen und bestätigt daher bei einem adjustierten p-Wert von 0,080 die Nullhypothese. Der Dunn's Test für Mehrfachvergleiche erbringt jedoch bei Vergleich von C vs. DHA einen adjustierten p-Wert von 0,013 und bei C vs. CH + L einen adjustierten p-Wert von 0,021 und damit eine Zurückweisung der Nullhypothese. Die Vergleiche zwischen der Kontrollgruppe und den anderen Interventionsgruppen erbringen keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$, siehe Tabelle 4).

Tab. 4: Dunn's Test für die Auswertung der Olig2-Färbung

Verglichene Gruppen	Mittlerer Rang 1	Mittlerer Rang 2	Mittlere Rang-Differenz	Angepasster p-Wert	Signifikanz
C vs. CH	5,375	22,88	-17,50	0,182	Nein
C vs. L	5,375	22,25	-16,88	0,292	Nein
C vs. DHA	5,375	32,10	-26,73	0,013	Ja
C vs. CH + L	5,375	29,92	-24,54	0,021	Ja
C vs. CH + DHA	5,375	24,63	-19,25	0,238	Nein
C vs. L + DHA	5,375	19,50	-14,13	0,618	Nein
C vs. CH + L + DHA	5,375	19,30	-13,93	0,741	Nein

Der Mann-Whitney U-Test bestätigt die im Dunn's Test erhobene Signifikanz bei einem adjustierten p-Wert von 0,016 für C vs. DHA und einem adjustierten p-Wert von 0,009 für C vs. CH + L. Für die Gruppe DHA ergibt sich hierbei eine Rangsumme von 35 und ein Median von 1,564, für CH + L eine Rangsumme von 45 und ein Median von 1,500, die der Rangsumme der Kontrollgruppe von 10 und dem Median von 0,982 entgegengesetzt wird.

Bezogen auf die via Cell Counter erhobene Zellzahl Olig2-positiver Zellen im Bereich der gesetzten ROI im Corpus Callosum ergeben sich somit signifikante Werte im Vergleich der Kontrollgruppe mit der DHA-Gruppe sowie mit der Cholin- + Lutein-Gruppe.

4.2 NeuN und DCX

4.2.1. Auswertungen im Bereich der Regionen CA1-3

Abbildung 10(a) zeigt repräsentative Bilder von NeuN-Färbungen aller Gruppen im Stratum pyramidale der Regionen CA1, CA2 und CA3. Die Abbildung 10(b) stellt auf der y-Achse die via Cell Counter erhobenen NeuN positiven Zellen bezogen auf die jeweilige Fläche des Stratum pyramidale der CA1-3 Region dar und auf der x-Achse die acht zu vergleichenden Gruppen in Form von Säulendiagrammen einschließlich der berechneten Standardabweichungen. Diese zeigt sich in allen Gruppen recht gering als Zeichen einer geringen Varianz innerhalb einer Gruppe.

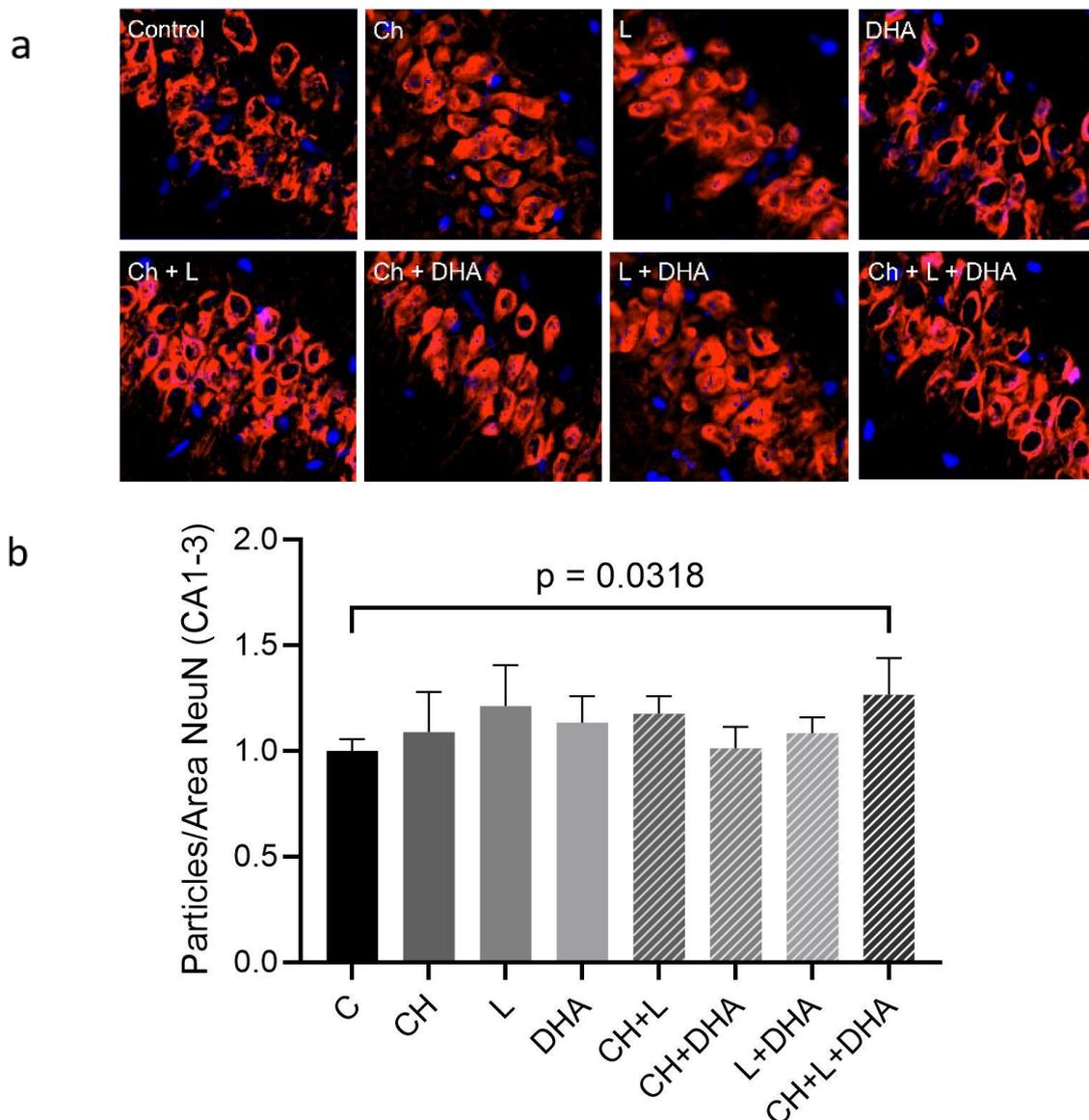


Abb. 10: Auswertung der NeuN-Färbung in der Region CA1-3. (a) Exemplarische NeuN-Färbungen des Stratum pyramidale der Regionen CA1, CA2 und CA3 aus Kontroll-, Cholin-, Lutein-, DHA-, Cholin + Lutein-, Lutein + DHA- und Cholin + Lutein + DHA-Gruppe. **(b)** Normalisierte Zellzahlen der NeuN-positiven Zellen bezogen auf die Fläche des jeweiligen Stratum pyramidale der o.g. Regionen in den verschiedenen Gruppen ($P < 0.05$, Kruskal-Wallis-Test, Re-Test mit Mann-Whitney-Test bei signifikanten Werten, hier in der Gruppe Cholin + Lutein + DHA).

Bei Auswertung der Daten mittels Kruskal-Wallis-Test One-Way ANOVA ergibt sich mit einem adjustierten p-Wert von 0,041 ein signifikanter Unterschied zwischen dem den Medianen einzelner Gruppen.

Mit dem Dunn's Posttest mit paarweiser Gegenüberstellung der Kontroll- und Interventionsgruppen kann die Signifikanz bei Vergleich der Kontrollgruppe mit der Gruppe CH + L + DHA im Speziellen festgestellt werden, es imponiert ein adjustierter p-Wert von 0,032 (siehe Tabelle 5). Die Vergleiche mit den anderen Gruppen können keine signifikanten Unterschiede festmachen ($p > 0,05$).

Tab. 5: Dunn's Test für die Auswertung der NeuN-Färbung in der Region CA1-3

Verglichene Gruppen	Mittlerer Rang 1	Mittlerer Rang 2	Mittlere Rang-Differenz	Angepasster p-Wert	Signifikanz
C vs. CH	8,750	19,75	-11,00	>0,999	Nein
C vs. L	8,750	28,17	-19,42	0,134	Nein
C vs. DHA	8,750	25,40	-16,65	0,373	Nein
C vs. CH + L	8,750	29,33	-20,58	0,091	Nein
C vs. CH + DHA	8,750	12,50	-3,75	>0,999	Nein
C vs. L + DHA	8,750	18,17	-9,42	>0,999	Nein
C vs. CH + L + DHA	8,750	33,20	-24,45	0,032	Ja

Der Mann-Whitney U-Test bestätigt die im Dunn's Test erhobene Signifikanz bei einem adjustierten p-Wert von 0,016 für C vs. CH + L + DHA, wobei sich eine Rangsumme von 35 und ein Median von 1,252 der Interventionsgruppe einer Rangsumme von 10 und einem Median von 1,011 der Kontrollgruppe entgegenstellt.

Es ergibt sich somit ein signifikanter Unterschied zwischen der via Cell Counter erhobenen Zellzahl im Bereich der gesetzten ROI im Stratum pyramidale der Regionen CA1-3 der Kontrollgruppe und der Zellzahl NeuN-positiver Zellen in der Cholin + Lutein + DHA-Gruppe. Aufgrund des Fehlens eines Nachweises von DCX-positiven Zellen in den Regionen CA1-3 entfallen in diesem Areal die diesbezüglichen Auswertungen.

4.2.2. Auswertung im Bereich des Gyrus dentatus

In der Abbildung 11(a) werden repräsentative Färbungen von NeuN, DCX sowie deren übereinandergelegte Bilder („Merge“) gezeigt. Die darunter folgenden Balkendiagramme der Abbildung 11 zeigen auf der y-Achse die Raw Integrated Density (RawIntDen) als Maß der Quantifizierung NeuN-positiven Signals (b) bzw. DCX-positiven Signals (c) im Bereich des Gyrus dentatus bezogen auf die acht untersuchten Gruppen, welche auf der x-Achse aufgeführt sind. Es finden sich hier Säulendiagramme mit Darstellung der Standardabweichungen. Für NeuN zeigt sich bei Betrachtung des Graphen in Bezug auf die Standardabweichung in der Gruppe Cholin eine breite Streuung innerhalb der Gruppe, während diese z.B. in der Gruppe CH + L oder CH + DHA verhältnismäßig gering ausfällt. Bei Betrachtung von DCX zeigt sich insbesondere in der Gruppe CH + L + DHA eine erhebliche Standardabweichung und damit eine große Varianz innerhalb der Gruppe.

Die Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Tests, durchgeführt als One-Way-ANOVA, weisen bei einem adjustierten p-Wert von 0,003 auf eine signifikante Differenz zwischen den Gruppen hinsichtlich der Menge positiven Signals hin.

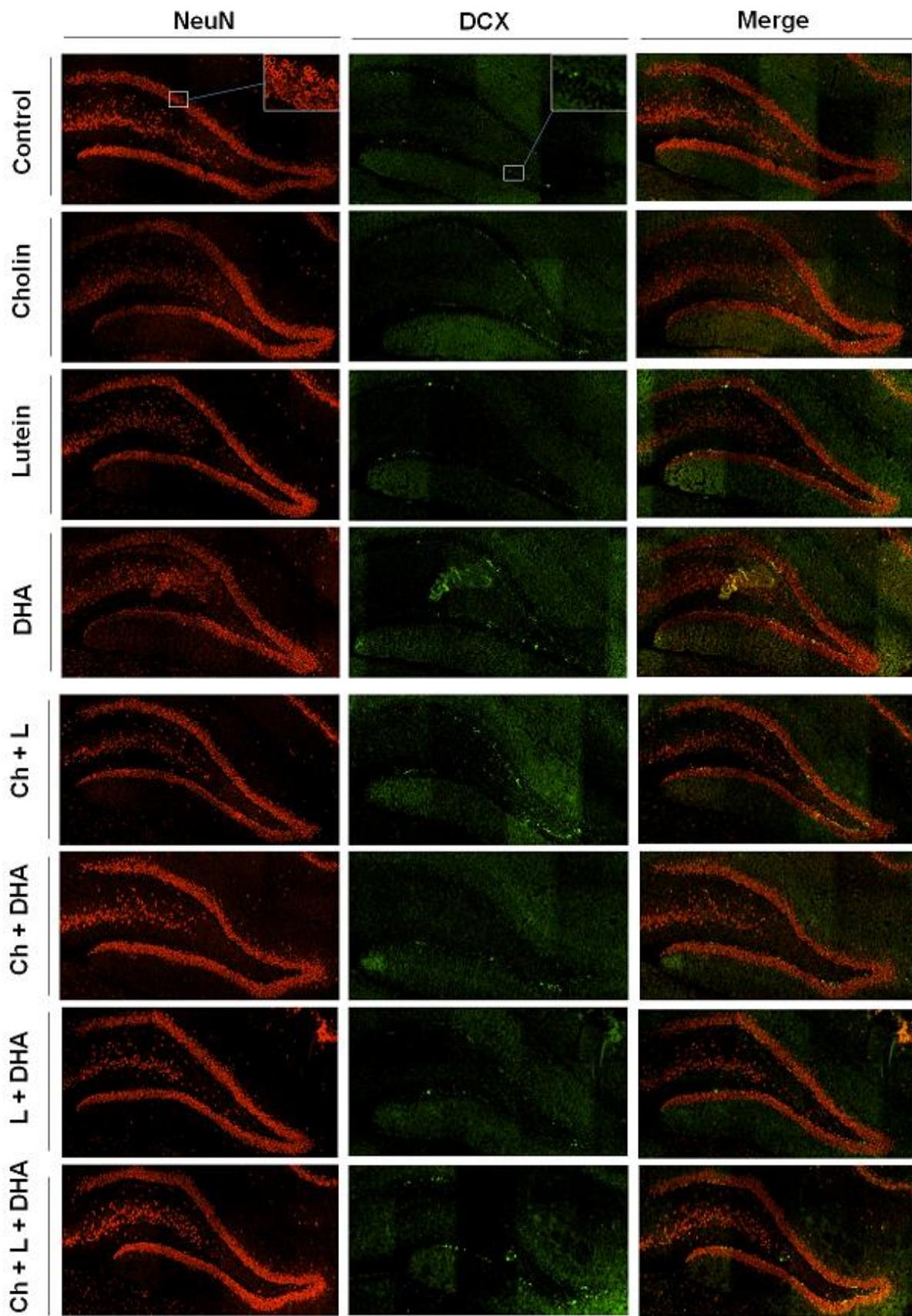
Der Dunn's Posttest bestätigt diese in den Gruppen CH + L sowie L + DHA. Erstere zeigt bei Vergleich mit der Kontrollgruppe einen adjustierten p-Wert von 0,007 bei auch ausgeprägter mittlerer Rangdifferenz von -27,25, letztere einen adjustierten p-Wert von 0,045 und eine mittlere Rangdifferenz von -22,58 (siehe Tabelle 6).

Der Mann-Whitney U-Test bestätigt die Signifikanz bei einem p-Wert von 0,010 und einer Rangsumme von 11 vs. 45 beim Vergleich C vs. CH + L und einem p-Wert von 0,019 sowie einer Rangsumme von 11 vs. 44 bei C vs. L + DHA.

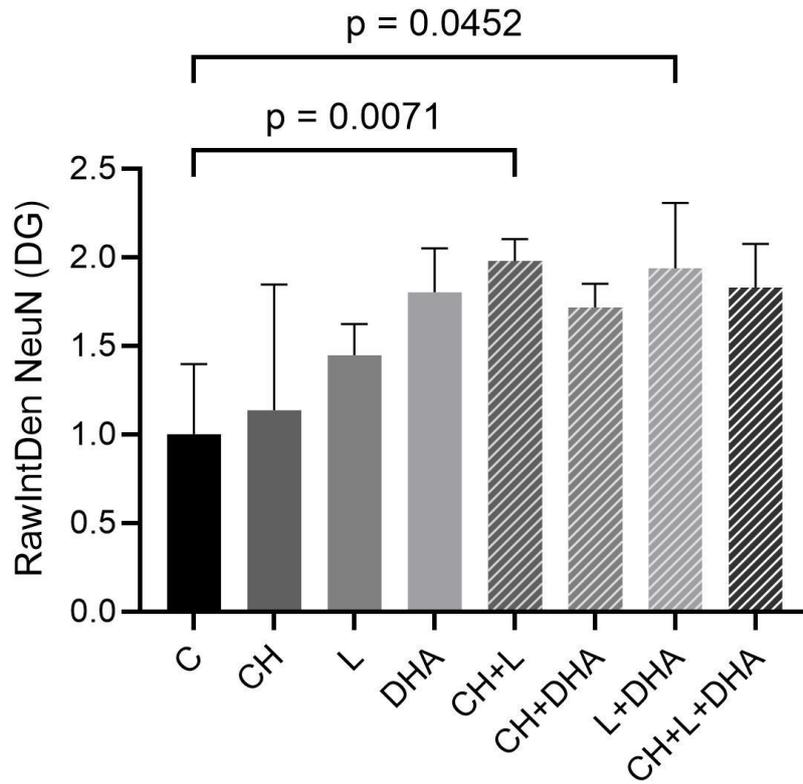
Das NeuN-positive Signal ist somit im Bereich des Gyrus dentatus der Gruppe Cholin + Lutein sowie der Gruppe Lutein + DHA signifikant mehr vorhanden als in der Kontrollgruppe.

In Bezug auf die Doublecortin-Färbung ergibt sich im Kruskal-Wallis-Test One-Way ANOVA bei einem adjustierten p-Wert von 0,010 Anhalt für signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen. Dies bestätigt sich jedoch nicht im Dunn's Posttest bei adjustierten p-Werten $>0,05$ in allen Gruppen. In der Gruppe CH + L + DHA zeigt sich ein mit 0,058 knapp über dem Cutoff liegender adjustierter p-Wert mit einer mittleren Rangdifferenz von -22,25 (siehe Tabelle 7).

a



b



c

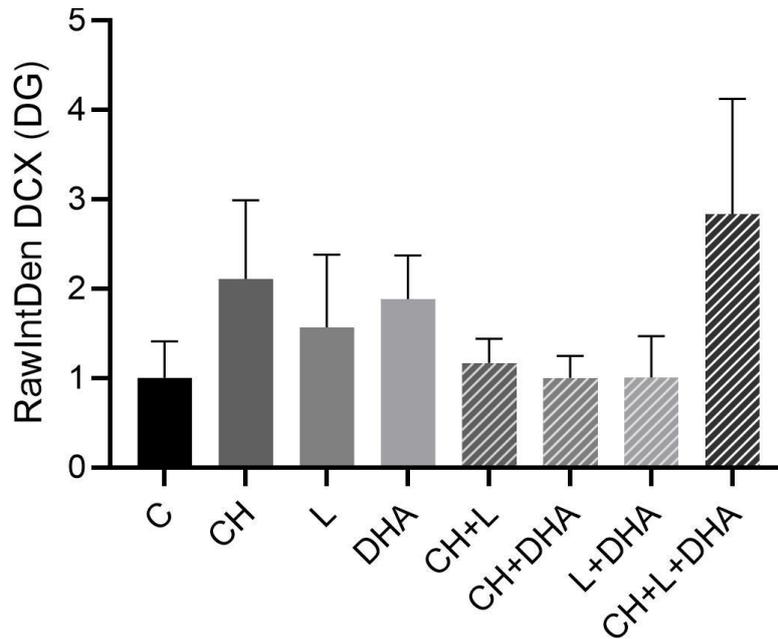


Abb. 11: Auswertung der NeuN-Färbung im Gyrus dentatus. (a) Exemplarische NeuN und DCX-Färbungen des Gyrus dentatus aus Kontroll-, Cholin-, Lutein-, DHA-, Cholin + Lutein-, Lutein + DHA- und Cholin + Lutein + DHA-Gruppe. (b) Normalisierte RawIntDen der NeuN-Färbungen in den verschiedenen Gruppen ($P < 0.05$, Kruskal-Wallis-Test, Re-Test mit Mann-Whitney-Test bei signifikanten Werten, hier in den Gruppen Cholin + Lutein und Lutein + DHA). (c) Normalisierte RawIntDen der DCX-Färbungen in den verschiedenen Gruppen ($P < 0.05$, Kruskal-Wallis-Test).

Tab. 6: Dunn's Test für die Auswertung der NeuN-Färbung im Gyrus dentatus

Verglichene Gruppen	Mittlerer Rang 1	Mittlerer Rang 2	Mittlere Rang-Differenz	Angepasster p-Wert	Signifikanz
C vs. CH	7,75	14,00	-6,25	>0,999	Nein
C vs. L	7,75	13,17	-5,42	>0,999	Nein
C vs. DHA	7,75	27,20	-19,45	0,168	Nein
C vs. CH + L	7,75	35,00	-27,25	0,007	Ja
C vs. CH + DHA	7,75	23,25	-15,50	0,615	Nein
C vs. L + DHA	7,75	30,33	-22,58	0,045	Ja
C vs. CH + L + DHA	7,75	29,40	-21,65	0,084	Nein

Tab. 7: Dunn's Test für die Auswertung der DCX-Färbung im Gyrus dentatus

Verglichene Gruppen	Mittlerer Rang 1	Mittlerer Rang 2	Mittlere Rang-Differenz	Angepasster p-Wert	Signifikanz
C vs. CH	12,75	29,38	-16,36	0,214	Nein
C vs. L	12,75	21,83	-9,08	>0,999	Nein
C vs. DHA	12,75	29,00	-16,25	0,376	Nein
C vs. CH + L	12,75	16,80	-4,05	>0,999	Nein
C vs. CH + DHA	12,75	11,50	1,25	>0,999	Nein
C vs. L + DHA	12,75	13,17	-0,417	>0,999	Nein
C vs. CH + L + DHA	12,75	35,00	-22,25	0,058	Nein

4.3 GFAP

Die Abbildung 12(a) zeigt repräsentative Bilder der GFAP-Färbung aller Gruppen im Corpus Callosum. Die Abbildung 12(b) stellt auf der y-Achse das in Form der Raw Integrated Density (RawIntDen) quantifizierte GFAP-positive Signal im Bereich der ROI im Corpus Callosum dar, auf der x-Achse die Säulendiagramme der acht Gruppen einschließlich der berechneten Standardabweichungen.

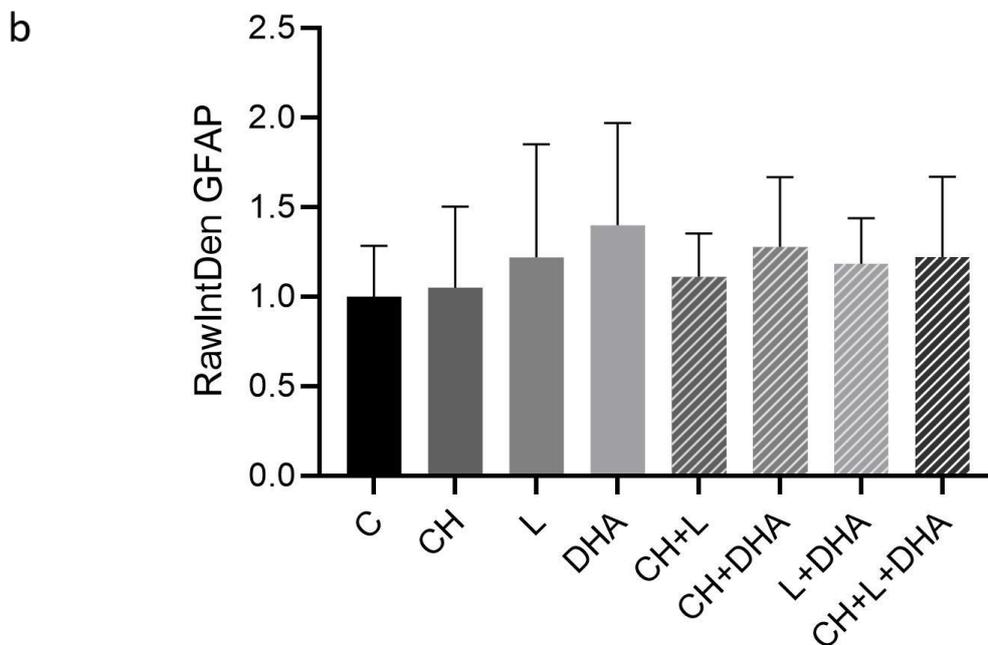
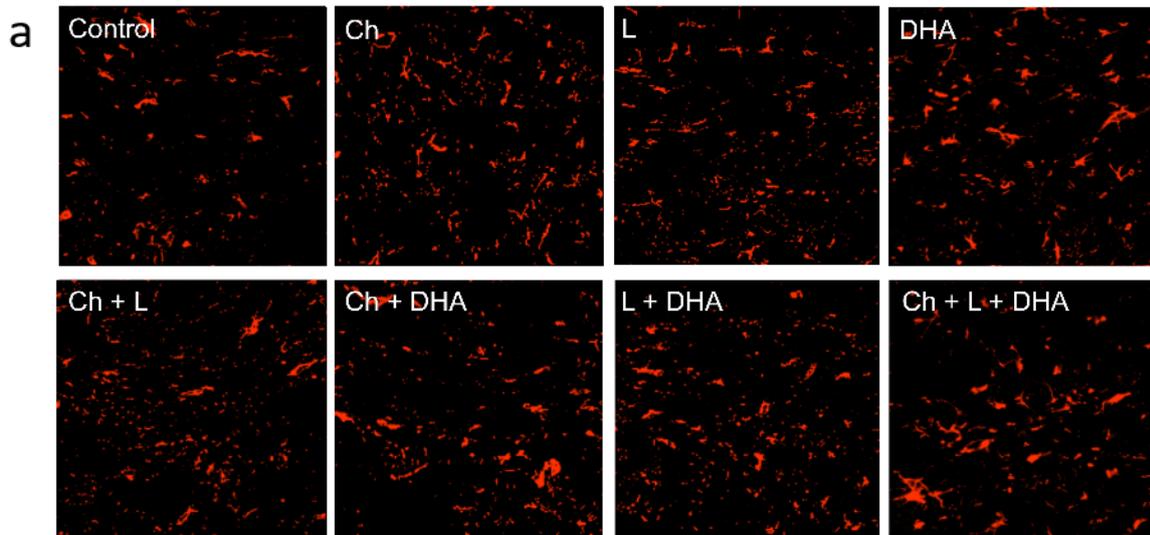


Abb. 12: Auswertung der GFAP-Färbung. (a) Repräsentative Abbildungen der GFAP-positiven Zellen im Corpus Callosum aus der Kontroll-, Cholin-, Lutein-, DHA-, Cholin + Lutein-, Lutein + DHA- und Cholin + Lutein + DHA-Gruppe. (b) Normalisierte Raw Integrated Density der GFAP-positiven Zellen im Bereich des Corpus Callosum in den verschiedenen Gruppen ($P < 0.05$, Kruskal-Wallis-Test).

Der Kruskal-Wallis-Test One-Way ANOVA ergibt in diesem Fall keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf die abhängige Variable der RawIntDen in den verschiedenen Gruppen und bestätigt daher bei einem adjustierten p-Wert von 0,819 die Nullhypothese. Auch der Dunn's Posttest zeigt im paarweisen Vergleich der Kontroll- und Interventionsgruppen keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$), sodass kein ergänzender

Mann-Whitney Test erfolgt. Bezogen auf das GFAP-positive Signal ergibt sich somit kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

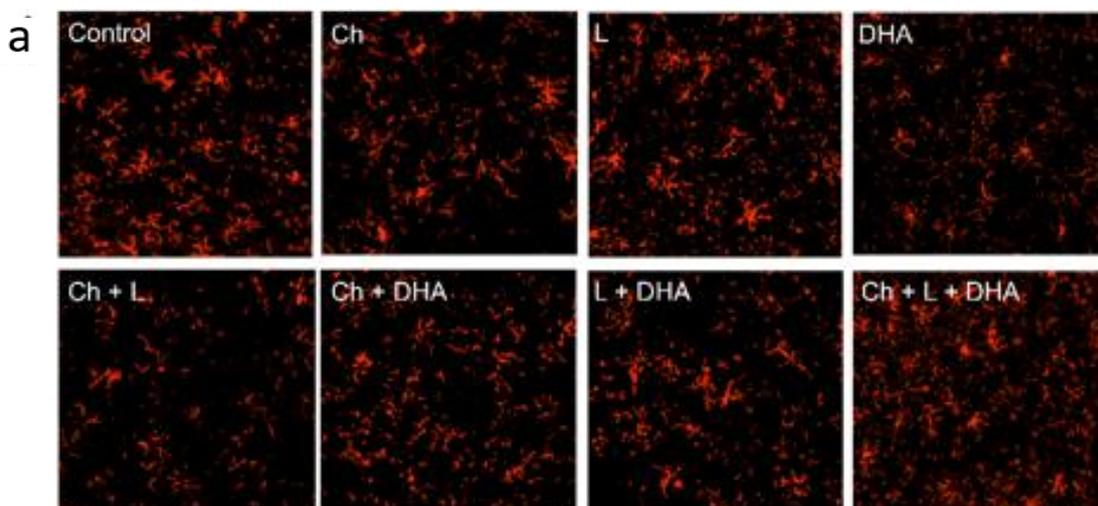
Tab. 8: Dunn's Test für die Auswertung der GFAP-Färbung

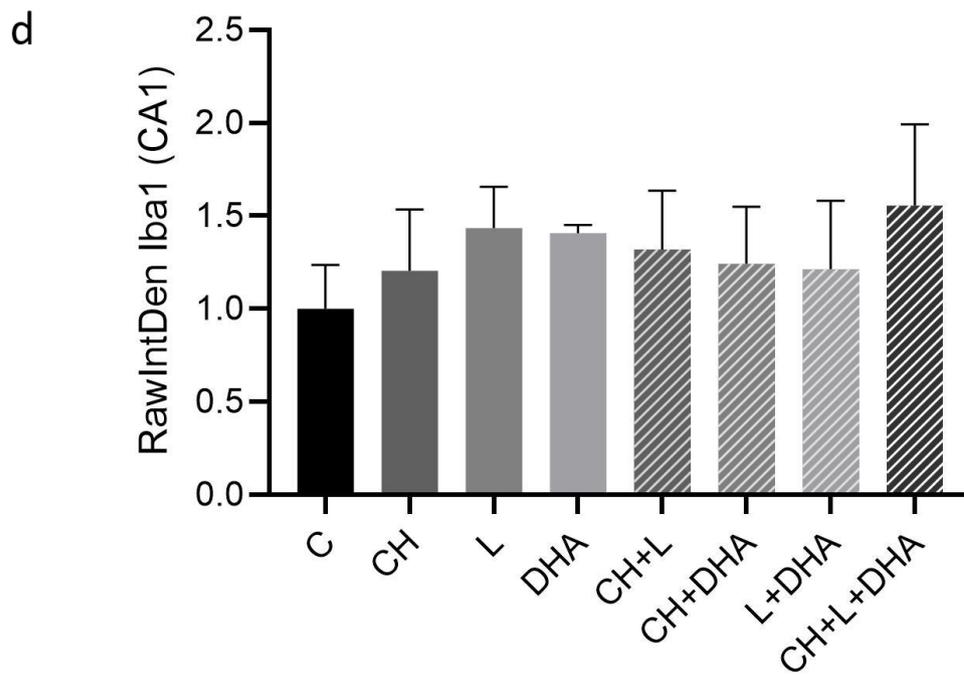
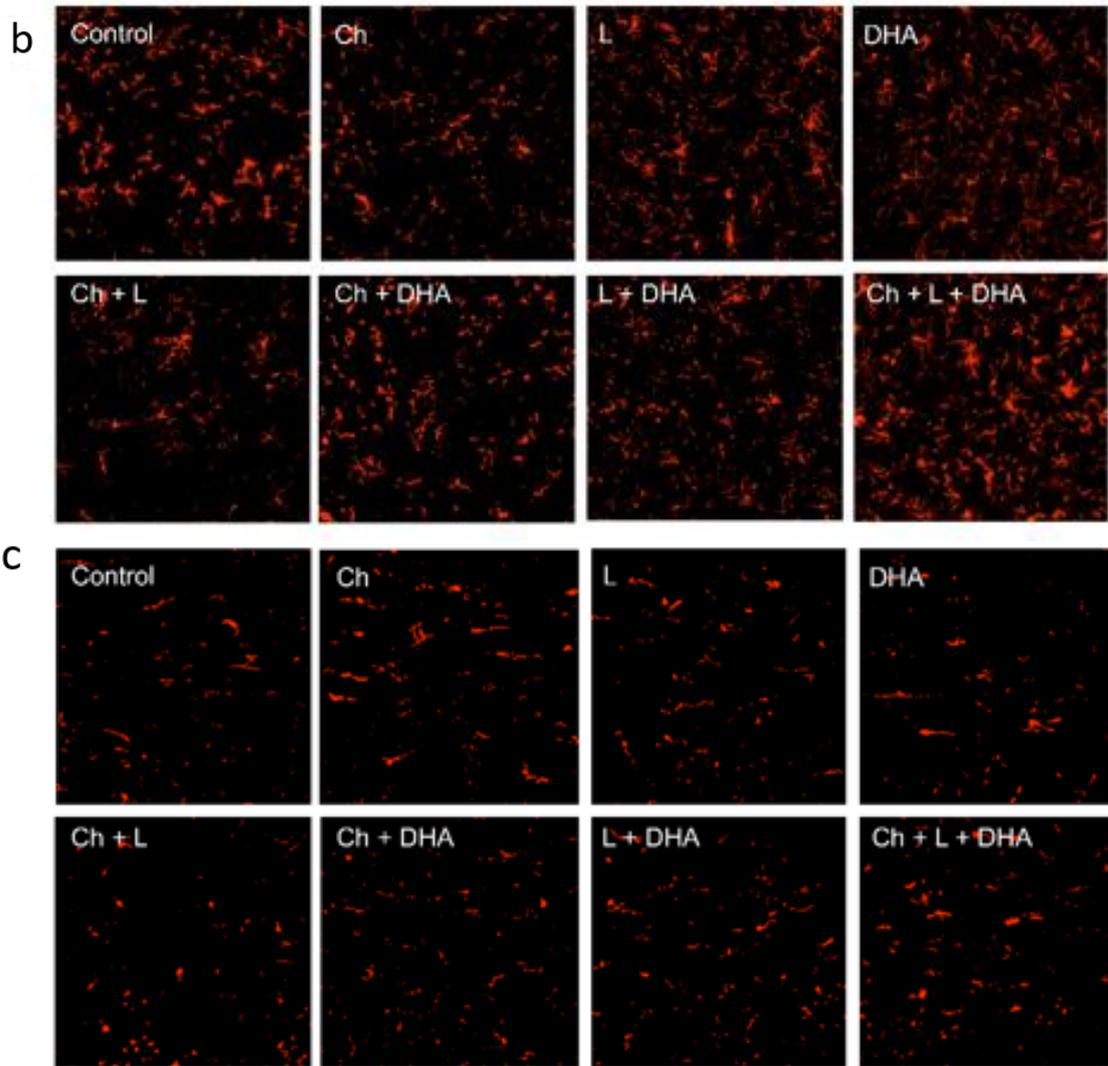
Verglichene Gruppen	Mittlerer Rang 1	Mittlerer Rang 2	Mittlere Rang-Differenz	Angepasster p-Wert	Signifikanz
C vs. CH	17,25	17,50	-0,25	>0,999	Nein
C vs. L	17,25	21,83	-4,58	>0,999	Nein
C vs. DHA	17,25	27,40	-10,15	>0,999	Nein
C vs. CH + L	17,25	21,67	-4,42	>0,999	Nein
C vs. CH + DHA	17,25	27,75	-10,50	>0,999	Nein
C vs. L + DHA	17,25	24,67	-7,42	>0,999	Nein
C vs. CH + L + DHA	17,25	24,80	-7,55	>0,999	Nein

4.4 Iba1

Die Abbildung 13(a) zeigt repräsentative Abbildungen der Iba1-positiven Zellen aller Gruppen in der CA1-Region, 13(b) der CA3-Region und 13(c) im Corpus Callosum.

In der Abbildung 13(d-f) wird auf der y-Achse das in Form der Raw Integrated Density (RawIntDen) quantifizierte Iba1-positive Signal im Bereich der jeweiligen ROI ersichtlich, auf der x-Achse die Säulendiagramme der acht Gruppen einschließlich der berechneten Standardabweichungen. Hierbei stellt 13(d) die ROI im Bereich des Stratum radiatum der CA1-Region dar, 13(e) die ROI im Bereich des Stratum radiatum der CA3-Region und 13(f) die ROI im Bereich des Corpus callosum.





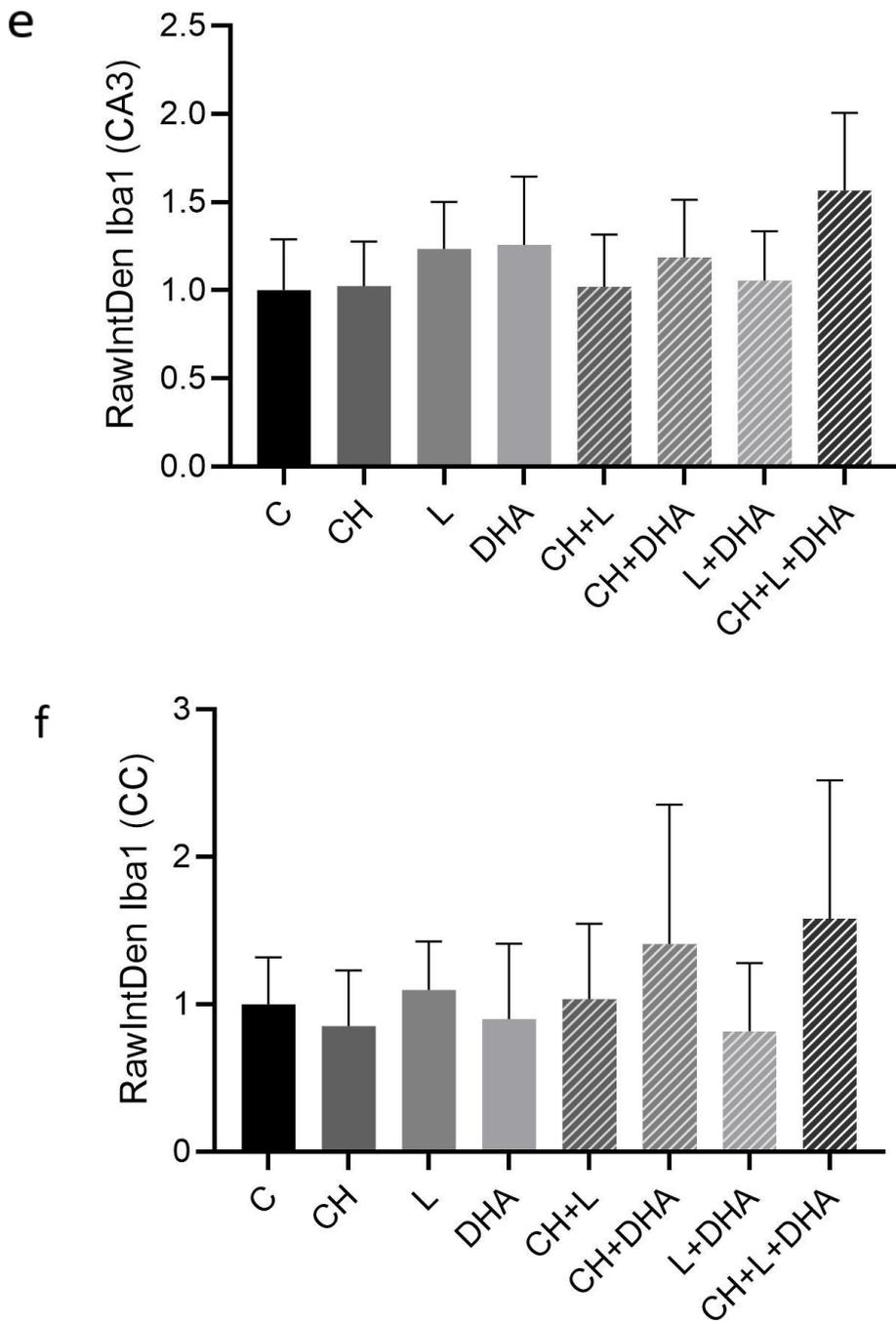


Abb. 13: Auswertung der Iba1-Färbung. (a) Repräsentative Abbildungen der Iba1-positiven Zellen in der CA1-Region der Kontroll-, Cholin-, Lutein-, DHA-, Cholin + Lutein-, Lutein + DHA- und Cholin + Lutein + DHA-Gruppe. (b) Repräsentative Abbildungen der Iba1-positiven Zellen in der CA3-Region der Kontroll-, Cholin-, Lutein-, DHA-, Cholin + Lutein-, Lutein + DHA- und Cholin + Lutein + DHA-Gruppe. (c) Repräsentative Abbildungen der Iba1-positiven Zellen in der Corpus Callosum-Region der Kontroll-, Cholin-, Lutein-, DHA-, Cholin + Lutein-, Lutein + DHA- und Cholin + Lutein + DHA-Gruppe. (d) Normalisierter RawIntDen der Iba1-positiven Zellen im Bereich der CA1-Region in den verschiedenen Gruppen ($P < 0.05$, Kruskal-Wallis-Test). (e) Normalisierter RawIntDen der Iba1-positiven Zellen im Bereich der CA3-Region in den verschiedenen Gruppen ($P < 0.05$, Kruskal-Wallis-Test). (f) Normalisierter RawIntDen der Iba1-positiven Zellen im Bereich der Corpus Callosum-Region in den verschiedenen Gruppen ($P < 0.05$, Kruskal-Wallis-Test).

Der Kruskal-Wallis-Test One-Way ANOVA ergibt beim Vergleich der Gruppen in allen drei ROIs keinen signifikanten Unterschied der RawIntDen in Bezug auf Iba1-positives Signal. Der Dunn's Posttest bestätigt dies im paarweisen Vergleich der Kontroll- und Interventionsgruppen ohne Nachweis signifikanter Unterschiede ($p > 0,05$).

Tab. 9: Dunn's Test für die Auswertung der Iba1-Färbung in der CA1-Region

Verglichene Gruppen	Mittlerer Rang 1	Mittlerer Rang 2	Mittlere Rang-Differenz	Angepasster p-Wert	Signifikanz
C vs. CH	9,75	18,38	-8,63	>0,999	Nein
C vs. L	9,75	28,08	-18,33	0,166	Nein
C vs. DHA	9,75	27,38	-17,63	0,330	Nein
C vs. CH + L	9,75	23,50	-13,75	0,629	Nein
C vs. CH + DHA	9,75	20,50	-10,75	>0,999	Nein
C vs. L + DHA	9,75	18,17	-8,42	>0,999	Nein
C vs. CH + L + DHA	9,75	30,00	-20,25	0,114	Nein

Tab. 10: Dunn's Test für die Auswertung der Iba1-Färbung in der CA3-Region

Verglichene Gruppen	Mittlerer Rang 1	Mittlerer Rang 2	Mittlere Rang-Differenz	Angepasster p-Wert	Signifikanz
C vs. CH	17,00	16,75	0,25	>0,999	Nein
C vs. L	17,00	26,75	-9,75	>0,999	Nein
C vs. DHA	17,00	28,70	-11,70	>0,999	Nein
C vs. CH + L	17,00	17,00	0,00	>0,999	Nein
C vs. CH + DHA	17,00	24,50	-7,50	>0,999	Nein
C vs. L + DHA	17,00	18,00	-1,00	>0,999	Nein
C vs. CH + L + DHA	17,00	35,20	-18,20	0,243	Nein

Tab. 11: Dunn's Test für die Auswertung der Iba1-Färbung im Bereich des Corpus callosum

Verglichene Gruppen	Mittlerer Rang 1	Mittlerer Rang 2	Mittlere Rang-Differenz	Angepasster p-Wert	Signifikanz
C vs. CH	23,75	17,88	5,88	>0,999	Nein
C vs. L	23,75	24,92	-1,17	>0,999	Nein
C vs. DHA	23,75	19,90	3,85	>0,999	Nein
C vs. CH + L	23,75	22,83	0,92	>0,999	Nein
C vs. CH + DHA	23,75	27,50	-3,75	>0,999	Nein
C vs. L + DHA	23,75	17,00	6,75	>0,999	Nein
C vs. CH + L + DHA	23,75	30,80	-7,05	>0,999	Nein

Bezogen auf das Iba1-positive Signal ergibt sich somit weder im Bereich der CA1-Region (siehe Abbildung 13(d)), noch in der CA3-Region (siehe Abbildung 13(e)) oder im Bereich des Corpus callosum (siehe Abbildung 13(f)) ein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und Interventionsgruppen.

5. Diskussion

Studien ergaben Hinweise dafür, dass DHA positive Einflüsse auf die Gehirnentwicklung sowie auf die Kognition haben könnte. Es wurden zudem Hinweise für eine mögliche Synergie von DHA mit Cholin und/oder Lutein erbracht, durch welche die positiven Effekte potenziell verstärkt werden könnten. Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Arbeit im Kontext der aktuellen Studienlage interpretiert, Limitierungen diskutiert und ein Ausblick gegeben.

5.1 Effekte der Intervention auf die einzelnen Zelllinien

5.1.1. Vereinzelte Auswirkungen auf die Zahl der Oligodendrozyten

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind vereinbar mit einem möglichen positiven Effekt von DHA sowie Cholin + Lutein in Bezug auf die Oligodendrozytenzahl im Bereich des Corpus callosum. Dass DHA möglicherweise positive Auswirkungen auf das Wachstum von Oligodendrozyten hat, konnte zum Beispiel auch Xie et al. zeigen. Hierbei trieb DHA die Differenzierung von Vorläuferzellen in reife Oligodendrozyten voran und beförderte auch deren Proliferation¹⁴⁹, was durch weitere Studien bestätigt werden konnte^{150,151}.

In einem Oligodendrozyten-Modell konnte zudem eine protektive Komponente von DHA gegenüber zytotoxischen Effekten¹⁵² sowie eine Protektion hinsichtlich einer nach IUGR reduzierten Oligodendrozytenzahl nachgewiesen werden¹⁵³. Eine positive Wirkung von DHA auf die Oligodendrozyten in Form einer verbesserten Myelinisierung konnte Deoni et al. feststellen. Diese war in der Studie zudem auch mit einem erhöhtem Cholin-Gehalt assoziiert.¹²³ Da Cholin mit 10% einen wichtigen Bestandteil des Lipid-Anteils des Myelin darstellt¹⁵⁴, liegt dieser Zusammenhang nahe.

Der Einfluss von Lutein auf Oligodendrozyten im Besonderen findet in der aktuellen Studienlage soweit ersichtlich bislang keine Erwähnung. Ein möglicher Aspekt für die positive Beeinflussung der Zellzahlen im Allgemeinen kann jedoch durch einen verringerten Zellverlust durch die Modulation von Apoptose diskutiert werden. Da der programmierte Zelltod u.a. durch oxidativen Stress beeinflusst wird, welcher, wie bereits etabliert, durch Lutein als Antioxidans mit protektiver Wirkung auf die Oxidation von DHA¹¹ sowie durch die Funktion von DHA selbst als „indirektes Antioxidans“³⁵ reduziert wird, ist in dem Rahmen ein möglicherweise verringerter Zellverlust durch Substitution von DHA und Lutein zu diskutieren.

5.1.2. Vereinzelte Auswirkungen auf die Zahl reifer Neurone

In dieser Arbeit ergeben sich Hinweise für den positiven Effekt einer Supplementation von Cholin + Lutein + DHA auf die Zahl reifer Neuronen im Bereich der hippocampalen CA1-3

Region, ohne dass die Substitution einzelner Bestandteile einen relevanten Effekt erzielte. Zweifachkombinationen von Cholin + Lutein sowie Lutein + DHA konnten dafür im Bereich des Gyrus dentatus einen positiven Effekt auf die Menge reifer Neuronen nachweisen.

Rajarethnem et al. konnte in einer vorherigen Studie bereits eine synergistische Wirkung von Cholin + DHA in Bezug auf die Zahl der Neuronen in der hippocampalen CA1-Region zeigen¹², wobei Lutein in dieser Studie keine Anwendung fand. Auch andere Studien mit gezielten Untersuchungen der CA1-Region, der CA3-Region und des Gyrus dentatus bestätigten die Wirksamkeit von Cholin + DHA in Form einer erhöhten Neuronenzahl. Als möglicher Grund hierfür wird ein gemeinsamer Pathway von Cholin und DHA angeführt, welcher die Membranbildung als Voraussetzung der Neurogenese befördert¹². Diskutiert wird auch eine durch Cholin vermittelte Steigerung der Verfügbarkeit von DHA¹⁵⁵ sowie eine Hochregulation plazentarer DHA-Transportproteine durch Cholin¹⁵⁶.

Die Dreifachkombination von Cholin, Lutein und DHA findet in wenigen anderen Studien Verwendung, oftmals werden nur synergistische Effekte von vor allem Cholin + DHA oder Lutein + DHA untersucht. Da die drei Substanzen jedoch unter anderem in Eiern enthalten sind, prüfte zum Beispiel Christifano et al. über Fragebögen den Konsum von Eiern während der Schwangerschaft und fand Anhalt dafür, dass die Kombination von Cholin, Lutein und DHA sowie Zeaxanthin die fetale neuronale Entwicklung positiv beeinflussen könnte¹⁵⁷. Als Maß hierfür wurden Scores über das funktionelle Reifealter der fetalen Gehirne verwendet. Da die Aufnahme der Menge an Cholin, Lutein und DHA lediglich indirekt über den Konsum von Eiern geschätzt wurde, kann jedoch a.e. nur von hinweisenden Ergebnissen gesprochen werden, die sich aber in der Summe mit den Ergebnissen dieser Arbeit decken.

Cheatham et al. fand in Beobachtungsstudien Hinweise für positive Effekte einer Kombination aus Cholin + Lutein auf das Wiedererkennungsgedächtnis von Kindern¹, welche in dieser Arbeit einen positiven Effekt auf die Neuronenzahl im Gyrus dentatus erzielte. Auch der Synergismus aus Lutein + DHA schlug sich in dieser Arbeit in Form einer gesteigerten Neuronenzahl im Gyrus dentatus nieder.

Laut Studienlage ist dieser Effekt möglicherweise in der antioxidativen Wirkung von Lutein und der Anfälligkeit von DHA für oxidativen Stress zu begründen¹¹. Die Minderung von oxidativem Stress beeinflusst u.a. Apoptose-Prozesse positiv mit hierdurch vermindertem Zellverlust. Zudem entstehen bei der Oxidation von DHA sogenannte Neuroprostane, welche sich in neuronalen Membranen anreichern und deren Funktion beeinträchtigen¹⁵⁸. Hierüber werden möglicherweise degenerative Prozesse im Gehirn sowie eine Beeinträchtigung der Kognition begünstigt³⁶. Eine Studie mit einer diätetischen Supplementation von Lutein erbrachte eine inverse Korrelation zwischen der Anzahl besagter Neuroprostane und den Lutein-Leveln in den Membranen von Mitochondrien, was auf die Möglichkeit einer protektiven Wirkung des Lutein bezüglich der Oxidation von DHA schließen lässt¹¹. Als Erklärungsansatz für die in

dieser Studie gesteigerte Anzahl von Neuronen nach Substitution von Lutein + DHA ist also denkbar, dass durch den Wegfall der Beeinträchtigung neuronaler Membranen über besagte Neuroprostate indirekt die Bildung von Neuronen befördert werden könnte. Andererseits ist DHA auch grundsätzlich als Baustein der Phospholipid-Membranen für die Stabilität der zellulären Strukturen sowie für deren Wachstum von Bedeutung, sodass eine positive Beeinflussbarkeit der Neurogenese auch in dem Rahmen diskutiert werden kann.

Zur Prüfung dieser Thesen wäre jedoch weitere Forschung vonnöten, zumal in vorausgegangenen Studien vor allem von einer Bedeutung des Synergismus für degenerative Prozesse die Rede ist³⁶ und der direkte Einfluss dieser Wirkkombination auf Neuronen soweit ersichtlich bislang noch nicht gezielt untersucht wurde.

5.1.1. Unveränderte Zahl neuronaler Vorläuferzellen im Bereich des Gyrus dentatus

Relevante Unterschiede bezüglich der Menge neuronaler Vorläuferzellen (Marker DCX) im Bereich des Gyrus dentatus konnten in dieser Arbeit zwischen den Gruppen nicht nachgewiesen werden. Die Studienlage zeigt jedoch, dass sich in der Vergangenheit beispielsweise bei höheren DHA-Mengen in Zellkulturen durchaus Anhalt für einen positiven Effekt auf die Zahl unreifer Neurone¹⁵⁹ und die Neurogenese an sich als Grundlage behavioristischer Endpunkte ergab¹⁶⁰. Bei in der Gruppe Cholin + Lutein + DHA mit 0,058 knapp über dem Cutoff liegendem adjustierten p-Wert kann diskutiert werden, ob ggf. bei höheren Fallzahlen auch in dieser Arbeit eine Signifikanz hätte erzielt werden können. Möglich ist jedoch auch, dass das Alter der Tiere zum Zeitpunkt der Gehirnentnahme bereits zu hoch war, um eine größere Menge neuronaler Vorläuferzellen darzustellen.

5.1.2. Kein Einfluss der Intervention auf die Zahl der Astrozyten

In dieser Arbeit ließ sich kein relevanter Effekt der Intervention auf die Anzahl der Astrozyten (Marker: GFAP) feststellen, was vereinbar mit der derzeitigen Studienlage ist. So konnte van Deijk et al. in Zellkulturen ebenfalls keinen Effekt auf Astrozyten-Zahlen nach Aufbringung unter anderem von Cholin und DHA nachweisen, wohingegen sich in Bezug auf Neuronen-Zahlen ein positiver Effekt zeigte¹³. Auch ein Effekt von Cholin auf das Neuronenwachstum von Astrozyten zeigte sich in-vitro nicht. Es ergab sich lediglich eine mögliche protektive Wirkung von Cholin bei gleichzeitiger Aufbringung von Alkohol¹⁶¹. Grundsätzlich konnten bislang lediglich Effekte von Omega-3-Fettsäuren auf die Regulation von Astroglia im Hippocampus gezeigt werden, zum Beispiel im Rahmen einer Mangelsituation¹⁶². Der Einfluss von Cholin, Lutein und DHA auf die Anzahl der Astrozyten im Speziellen erfordert jedoch weitere Nachforschungen.

5.1.3. Kein Einfluss der Intervention auf die Zahl der Mikroglia

Nach Intervention ließ sich weder im Bereich der CA1-Region noch in der CA3-Region oder im Bereich des Corpus callosum eine zur Kontrollgruppe veränderte Zahl der Mikroglia (Marker: Iba1) feststellen.

Die aktuelle Studienlage suggeriert jedoch, dass mögliche Effekte von z.B. DHA auf die Funktion von Mikroglia existieren. So kann zum Beispiel Neuroinflammation über eine durch DHA induzierte Normalisierung der Aktivität von Mikroglia verhindert werden^{9,110}. Auch Lutein kann möglicherweise zur Hemmung inflammatorischer Aktivität von Mikroglia beitragen und besitzt zudem die bereits erörterte antioxidative Wirkung¹⁶³.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass, auch wenn sich durch diese Arbeit keine Hinweise für eine Beeinflussung der Mikroglia-Anzahl durch Cholin, Lutein und/oder DHA ergeben, die in anderen Studien gefundene Beeinflussung der Wirkweise damit nicht ausgeschlossen ist. Um diesbezüglich synergistische Effekte feststellen zu können, wären jedoch weitere Studien nötig.

5.1.4. Zusammenfassung der Resultate

In Summe fanden sich vereinzelt positive Auswirkungen der Ernährungsintervention mit Docosahexaensäure, Cholin und/oder Lutein im frühen Leben auf die zelluläre Zusammensetzung des Hippocampus weiblicher Ratten im späteren Leben. Insbesondere die Anzahl der Neuronen ließ sich hierbei positiv beeinflussen, aber auch vereinzelt die der Oligodendrozyten. Auswirkungen auf die Mikroglia oder Astroglia ließen sich jedoch nicht verzeichnen.

Synergistische Effekte zeigten sich insofern, als vermehrt Wirkstoffkombinationen zu positiven Effekten führten. Eine besondere Wirkstoffkombination stach jedoch nicht heraus, da in verschiedenen Untersuchungen auch unterschiedliche Kombinationen positive Auswirkungen zeigten. Mögliche zugrunde liegende Mechanismen für die synergistischen Effekte könnten zusammenfassend in einer vermehrten Bereitstellung von DHA durch Cholin über Vermittlung von Transportprozessen der Darmbarriere und Blut-Hirn-Schranke⁷⁷⁻⁷⁹, Hochregulation plazentarer DHA-Transportproteine durch Cholin¹⁵⁶, in den anti-oxidativen Effekten des Lutein auf Apoptose-Prozesse, sowie in der Protektion des DHA vor oxidativem Stress¹¹ liegen. Hierbei kommt der Funktion von Antioxidantien eine besondere Bedeutung zu, da auch das DHA selbst als „indirektes Antioxidans“ agiert, also die Gen- und letztendlich auch Proteinexpression antioxidativer Systeme induziert³⁵. Eine Übersichtsarbeit benannte eine Vielzahl weiterer möglicher Effekte von Antioxidantien u.a. auf entzündliche und neurodegenerative Prozesse, programmierten Zelltod, Schädigung von DNA sowie

epigenetische Modifizierungen¹⁶⁴, die möglicherweise ebenfalls durch die Substitution von Antioxidantien wie z.B. Lutein beeinflusst werden könnten.

In der Literatur wurden Studien auf Zellebene meist in Form von in-vitro-Untersuchungen von Zellkulturen durchgeführt und beschränkten sich oftmals auf die Zelllinie der Neuronen. In diesem Rahmen wurde mehrfach ein Effekt auf Anzahl und Konfiguration der Neuronen nachgewiesen, was sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit deckt. Positive Einflüsse von DHA, Cholin und Lutein auf neuroinflammatorische Prozesse mit Beteiligung von Mikroglia und Astroglia wurden in der Literatur zwar festgestellt, jedoch bezogen diese sich stets auf die Wirkmechanismen und nicht auf eine mögliche Veränderung der Zellzahl, sodass auch diese Ergebnisse prinzipiell vereinbar mit denen dieser Arbeit sind.

Die Ergebnisse dieser Arbeit spiegeln die aktuelle Studienlage also insgesamt gut wider. Grundsätzlich gibt es eine Vielzahl an Studien, die positive Effekte von DHA, Cholin und Lutein auf die Kognition im Einzelnen oder teils in Kombination proklamieren¹⁶⁵, jedoch ebenso viele, die keine Auswirkungen auf die neurokognitive Entwicklung nachweisen konnten.

Übersichtsarbeiten kamen zu dem Schluss, dass ein Einfluss auf die Entwicklung des kindlichen Nervensystems grundsätzlich nicht sicher festgemacht werden kann¹⁶⁶. Auch ein systematischer Review der Cochrane Datenbank, in dem der Nutzen einer LC-PUFA-Supplementation in Babynahrung untersucht wurde, ergab ein gemischtes Bild. Positive Effekte auf die kognitive Entwicklung zeigten sich lediglich in 4 von 11 untersuchten Studien, auf die psychomotorische Entwicklung lediglich bei 2 von 9 Studien, sodass letztlich keine Empfehlung für eine Supplementation ausgesprochen wurde¹⁶⁷.

5.2 Methodische Limitationen der Arbeit

Bezüglich der in dieser Arbeit erfolgten Analysen muss der zentrale Aspekt der Fallzahlen als klare Limitation herausgestellt werden. Angelegt war die Studie mit insgesamt acht Tieren pro Gruppe, welche auch notwendig gewesen wären, um die üblicherweise geforderte statistische Teststärke von 80% (d.h. Fehlerwahrscheinlichkeit 2. Art von 20%) zu erreichen. Aufgrund von methodischen Problemen fielen jedoch einige Versuchstiere im Laufe der Analysen weg, sodass die Analysen letztlich nur noch 44 von den ursprünglichen 64 Versuchstieren beinhalteten (n(C)=4, n(Ch)=8, n(L)=6, n(DHA)=5, n(Ch+L)=6, n(Ch+DHA)=4, n(L+DHA)=6, n(Ch+L+DHA)=5 mit n(gesamt)=44). Möglich ist also durchaus, dass hierdurch signifikante Ergebnisse übersehen wurden.

Bei Erstellung der mittels Olympus Mikroskop eingescannten Schnitte führte ein technischer Fehler zudem zu einer sichtbaren Felderung durch unregelmäßige Belichtung der einzelnen Abschnitte. Eine Messung der Fluoreszenz-Intensität wurde damit unmöglich. Wir entschieden uns daher für die Verwendung eines standardisierten Threshold, um positives von nicht-positivem Signal zu unterscheiden und damit flächenassoziierte Auswertungen und

Zellzählungen zu ermöglichen. Möglich ist, dass trotz des standardisierten Threshold teils positives Signal verloren ging. Um hinsichtlich überbelichteter Artefakte zu korrigieren, musste der Threshold zudem vereinzelt manuell angepasst werden, was wiederum die Vergleichbarkeit der Auswertungen untereinander etwas reduziert.

Die Fehlerquellen sind somit im Falle eines zukünftigen Projekts dieser Art prinzipiell einfach zu korrigieren und würden die Qualität und Aussagekraft der Ergebnisse nochmals deutlich verbessern.

5.3 Keine Übertragbarkeit der Ergebnisse auf eine Grundgesamtheit aus männlichen und weiblichen Individuen

Zahlreiche Studien fanden Hinweise darauf, dass bezüglich der Gehirnentwicklung von Mensch und Ratte geschlechtsspezifische Unterschiede bestehen. Einerseits ist dies durch die Ausschüttung von Geschlechtshormonen wie dem Testosteron gegeben¹⁶⁸, aber auch durch die Geschlechtschromosomen selbst¹⁶⁹. So erbrachten Studien an Ratten bei Untersuchungen von Zellkulturen den Nachweis einer geschlechtsabhängig unterschiedlichen Anzahl dopaminerger Neurone bereits am 14. Gestationstag (E14)^{169,170}, d. h. noch vor der ab E18 nachgewiesenen, exponentiellen Testosteron-Ausschüttung männlicher Ratten¹⁶⁸. In der ersten Woche nach Geburt zeigte sich in einer anderen Studie eine doppelt so hohe Anzahl neu generierter Neurone im Gyrus dentatus männlicher Tiere im Vergleich zu weiblichen Tieren, wobei a.e. epigenetische Einflüsse als ursächlich vermutet wurden¹⁷¹.

Auch die weitere zelluläre Zusammensetzung des Gehirns zeigt sich laut Schwarz et al. je nach Entwicklungsstand bei männlichen und weiblichen Ratten unterschiedlich¹⁷². So variieren während der Entwicklung die Konfiguration und Anzahl der Mikroglia bei männlichen und weiblichen Tieren in den unterschiedlichen Regionen des Hippocampus¹⁷² sowie die Astrozytenzahl in weiteren Hirnregionen adulter Tiere¹⁷³.

Bilbo et al. etablierte des Weiteren eine erhöhte Vulnerabilität männlicher Ratten bezüglich kognitiver Defizite nach einer Infektion am postnatalen Tag 4 (P4) im Vergleich zu weiblichen Tieren¹⁷⁴. Eine derartige erhöhte Vulnerabilität männlicher Abkömmlinge nach frühkindlicher Schädigung des Gehirnes wurde darüber hinaus auch in anderen Studien proklamiert¹⁷⁵⁻¹⁷⁷.

Auch beim Menschen lassen sich laut Studienlage deutliche geschlechtsspezifische Unterschiede feststellen. So zeigte sich beispielsweise in einer Studie ein deutlich geringerer Anteil von DHA an der Gesamtheit von (Phospho-)Lipiden bei Männern im Vergleich zu Frauen¹⁷⁸. Auch bei Versuch einer Intervention im Sinne einer maternalen LC-PUFA-Supplementation während der ersten vier Monate der Stillzeit zeigten sich unterschiedliche Auswirkungen auf Jungen und Mädchen. Während sich bei den Mädchen positive Effekte auf die Problemlösekompetenzen feststellen ließen, ergab sich bei den Jungen kein relevanter

Unterschied. Die Jungen wiesen zudem ein geringeres Vokabelverständnis auf als die Mädchen¹⁷⁹.

Die Ergebnisse dieser Arbeit mit isolierter Betrachtung weiblicher Versuchstiere sind somit nicht übertragbar auf eine Grundgesamtheit, die männliche Tiere einschließt, was bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden sollte. Eine Auswertung der Ergebnisse der männlichen Tiere zwecks Herausarbeitung geschlechtsspezifischer Unterschiede ist noch ausstehend.

5.4 Eingeschränkte Übertragbarkeit des Studiendesigns auf den Menschen

In der vorliegenden Arbeit fand die durchgeführte Nahrungsintervention postnatal statt (P14-P56). Die Muttertiere erhielten zu keinem Zeitpunkt Interventionsnahrung, sodass die Phase der Embryonalentwicklung sowie der Laktation in dieser Arbeit keine Berücksichtigung findet. Es sollte aber durchaus diskutiert werden, welcher Zeitpunkt am erfolgversprechendsten für eine derartige Substitution ist und inwiefern sich dieser gewählte Zeitpunkt vom Tiermodell auf den Menschen übertragen lässt, da die Hirnentwicklung in unterschiedlichen Zeiträumen erfolgt.

Die Übertragung auf das Tiermodell setzt voraus, dass eine Vergleichbarkeit der Gehirnentwicklung von Ratte und Mensch nur unter Berücksichtigung der bereits in der Einleitung beschriebenen unterschiedlichen Entwicklungsspannen erreicht werden kann.

Die "Phase des schnellen Hirnwachstums" mit der Gliazell-Proliferation, der Myelinisierung von Nervenzellen, dem Zellwachstum, programmiertem Zelltod und dem Ausbau synaptischer Verbindungen findet beim Menschen wie bei der Ratte zu einem großen Teil nach der Geburt statt. Da die Phase beim Menschen bis zum zweiten Lebensjahr andauert, also der Zeit, in der Säuglinge zunächst Muttermilch und dann Breikost zu sich nehmen, hat sie also auch beim Menschen eine große Bedeutung bezüglich der Nutrition¹³⁰, insbesondere, da zu diesem Zeitpunkt eine Supplementation gut praktikabel ist und somit möglicherweise gezielt Einfluss auf die Hirnentwicklung genommen werden kann.

In Bezug auf die zentrale Gemeinsamkeit der Gehirnentwicklung lässt sich daher eine begrenzte Übertragbarkeit des in dieser Arbeit verwendeten Tiermodells auf den Menschen ableiten, wobei die genannten Limitationen zu berücksichtigen sind.

5.5 Mögliche Handlungsempfehlungen und Ausblick

Die in dieser Arbeit untersuchten möglichen positiven Effekte einer Substitution von DHA, Cholin und Lutein sowie synergistischer Effekte finden in der aktuellen Studienlage bereits viel Beachtung mit mehr als 18000 wissenschaftlichen Artikeln auf PubMed¹⁵. Hierbei wurden viele verschiedene Ansätze gewählt, mit unterschiedlichen Dosierungen, Applikationszeitpunkten und Endpunkten. Im Folgenden wird diskutiert, inwiefern sich aus der Studienlage bereits konkrete Handlungsempfehlungen ergeben.

Grundsätzliche Empfehlungen der European Food Safety Authority (EFSA) zur DHA-Substitution für Erwachsene enthalten Dosierungen zwischen 250 und 500 mg/d, wobei DHA-Mengen bis zu 1 g/d als ungefährlich gelten. Die Empfehlungen beziehen sich jedoch vorwiegend auf das kardiovaskuläre Risiko Erwachsener und nicht auf Schwangere oder Stillende¹⁸⁰. Um über eine maternale Substitution eine Anhebung der DHA-Werte im fetalen Kreislauf zu erreichen, waren in einer Studie von Velzing-Aarts et al. zum Beispiel deutlich höhere Dosen notwendig (500-1000 mg/d)³⁸. Käuflich erwerbbar Omega-3-Kapseln enthalten jedoch lediglich etwa 150 mg DHA, was damit um ein Vielfaches unter der in der Studie verwendeten Dosis liegt¹⁸¹. In den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE) aus dem Jahr 2020 für Schwangere findet weiterhin lediglich die Supplementation von Jod und Folsäure Erwähnung, die Empfehlung einer Supplementation z.B. von DHA, Cholin und/oder Lutein wird nicht ausgesprochen¹⁸².

In den Empfehlungen der American Medical Association (AMA) aus dem Jahr 2017 und der American Academy of Pediatrics aus dem Jahr 2018²³ wird jedoch unter anderem auf die Wichtigkeit einer adäquaten Cholin-Supplementation hingewiesen. Die European Food Safety Authority (EFSA) empfiehlt grundsätzlich bereits seit 2016 für Schwangere eine Cholin-Aufnahme von 480 mg/d und für stillende Frauen eine von 520 mg/d, wobei durch das US-Institute of Medicine die Obergrenze der Cholin-Aufnahme bei 3,5 g/d angesetzt wurde^{60,183}. Für Säuglinge im Alter von 0-6 Monaten wird durch die EFSA eine tägliche Aufnahme von 120 mg Cholin nahegelegt, im Alter zwischen 7 und 12 Monaten 160 mg/d. Anschließend erfolgt eine schrittweise Steigerung bis zu den aktuell empfohlenen 400 mg/d für Erwachsene¹⁸⁴.

Nicht nur die absoluten Werte, sondern auch das Verhältnis der Aufnahme von Omega-6- zu den Omega-3-Fettsäuren scheint jedoch bedeutsam zu sein. Studien ergaben im Falle einer Imbalance zugunsten der Omega-6-Fettsäuren Anhalt für eine Prädisposition psychischer Erkrankungen, u.a. durch eine Überproduktion proinflammatorischer Zytokine^{185,186}. Auch das Risiko immunvermittelter entzündlicher Erkrankungen stieg in dem Rahmen¹⁸⁷. Ein möglicher Erklärungsansatz ist eine wechselseitige Regulation der Fettsäuren untereinander. Zudem stehen diese miteinander in Konkurrenz um Enzyme, die im Metabolismus der Fettsäuren eine wichtige Rolle spielen¹⁸⁸.

Im Gehirn besteht ein nahezu ausgeglichenes Verhältnis von Omega-6- zu Omega-3-Fettsäuren (1:1 bis 2:1), sodass laut Simopoulos et al. auch bei der Nahrungsaufnahme grundsätzlich ein solches Verhältnis anzustreben ist. In westlichen Ländern beläuft sich das Verhältnis jedoch im Durchschnitt auf 10:1 bis 20:1¹⁸⁸, was damit deutlich zu Ungunsten der Omega-3-Fettsäuren liegt.

Auch andere Gewebe im menschlichen Körper wie Darm, Leber und Herz reagieren empfindlich auf die Verhältnisse der Fettsäuren^{189,190}. Studien konnten zeigen, dass bei

alleiniger Supplementation von Omega-3-Fettsäuren wie DHA rasch auch ein Mangel an Omega-6-Fettsäuren entstand¹⁸⁹.

Als Möglichkeit, beispielsweise in Babynahrung einen Ausgleich zu schaffen, wird eine Co-Supplementation von DHA mit der Omega-6-Fettsäure Arachidonsäure (AA) genannt^{49,191}. Im Tiermodell konnte hierdurch eine maximale DHA-Aufnahme im Gehirn ohne Veränderung der Zusammensetzung anderer Gewebe erzielt werden¹⁸⁹.

Bezüglich der Zusammensetzung von Babynahrung gibt es hierbei klare Richtlinien. Die darin vorgeschriebenen Inhaltsstoffe wie z.B. Vitamine, Spurenelemente, Antioxidantien etc. sind streng reglementiert. Im Codex Alimentarius, einem Regelwerk zur Sicherheit von Lebensmitteln, welcher in Zusammenarbeit mit der Weltgesundheitsorganisation (WHO) erstellt wird, ist bereits 2007 u.a. ein vorgesehener Mindest-Cholingehalt von 7 mg/100 kcal (1,7 mg/100 kJ) enthalten. DHA ist zu dem Zeitpunkt jedoch noch nicht als zwangsläufiger Bestandteil aufgeführt¹⁶.

In einer Stellungnahme der EFSA aus dem Jahr 2010 wurde zunächst lediglich die Empfehlung der Einnahme von 100 mg DHA/d für Kinder zwischen 7 und 24 Monaten ausgesprochen¹⁹², in einer zweiten aus dem Jahr 2013 dann auch für Kinder von 0 bis 6 Monaten¹⁹³ und in einer dritten die grundsätzliche Empfehlung der Integration von DHA in Babynahrung¹⁹⁴.

Erstmals seit Februar 2021 schreibt die Europäische Union nun für Babynahrung einen Mindest-DHA-Gehalt vor, welcher sich auf mindestens 20 mg/100 kcal (4,8 mg/100 kJ) bis maximal 50 mg/100 kcal (128 mg/100 kJ) beläuft^{14,15}.

Warum sich 2021 trotz der stark durchwachsenen Studienlage, die sich auch mit den Ergebnissen dieser Arbeit deckt, für diese Regelung entschieden wurde, kann kritisch hinterfragt werden. Grundsätzlich ist jedoch allen Studien gemein, dass die DHA-, Cholin- oder Lutein-Supplementation in Summe bislang keine nachgewiesene schädliche Komponente mit sich brachte und sich somit im Zweifel für die Nutzung möglicher positiver Effekte entschieden wurde. Mit der neuen Richtlinie einer standardisierten DHA-Supplementation über die Babynahrung werden sich langfristig gegebenenfalls neue Möglichkeiten großflächiger Studien ergeben. Das Lutein findet bislang jedoch kaum Erwähnung und auch synergistische Effekte mit diesem, für welche sich in dieser Arbeit an vielen Stellen Hinweise ergeben, sind bislang nur in geringem Ausmaß untersucht. Weitere Studien diesbezüglich wären daher von großem Interesse, insbesondere auch mit einem Fokus auf oxidativen Stress und Apoptose. Weiterhin ist der Forschungsbereich rund um Gliazellen als zelluläres Stützgerüst und Mediatoren der Neuroinflammation deutlich weniger erschlossen als die Forschung um neuronale Zelllinien. Insbesondere hinsichtlich einer möglichen Einflussnahme durch Ernährungsinterventionen besteht also noch viel Potenzial für weitere Forschung.

Langfristig bleibt abzuwarten, ob die neuen, auf die postnatale Phase bezogenen Handlungsempfehlungen auch auf lange Sicht die Plastizität des Organismus im Sinne einer entwicklungsabhängigen Programmierung sichtbar beeinflussen werden.

Literaturverzeichnis

- 1 Cheatham CL, Sheppard KW. Synergistic Effects of Human Milk Nutrients in the Support of Infant Recognition Memory: An Observational Study. *Nutrients* 2015; **7**: 9079–95.
- 2 Colombo J, Kannass KN, Shaddy DJ, et al. Maternal DHA and the development of attention in infancy and toddlerhood. *Child Dev* 2004; **75**: 1254–67. <https://doi.org/10.1111/j.1467-8624.2004.00737.x>.
- 3 Helland IB, Smith L, Saarem K, Saugstad OD, Drevon CA. Maternal supplementation with very-long-chain n-3 fatty acids during pregnancy and lactation augments children's IQ at 4 years of age. *Pediatrics* 2003; **111**: e39-44. <https://doi.org/10.1542/peds.111.1.e39>.
- 4 Helland IB, Saugstad OD, Smith L, et al. Similar effects on infants of n-3 and n-6 fatty acids supplementation to pregnant and lactating women. *Pediatrics* 2001; **108**: E82. <https://doi.org/10.1542/peds.108.5.e82>.
- 5 Power R, Coen RF, Beatty S, et al. Supplemental Retinal Carotenoids Enhance Memory in Healthy Individuals with Low Levels of Macular Pigment in A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial. *J Alzheimers Dis* 2018; **61**: 947–61. <https://doi.org/10.3233/JAD-170713>.
- 6 Johnson EJ, Vishwanathan R, Johnson MA, et al. Relationship between Serum and Brain Carotenoids, alpha-Tocopherol, and Retinol Concentrations and Cognitive Performance in the Oldest Old from the Georgia Centenarian Study. *J Aging Res* 2013; **2013**: 951786. <https://doi.org/10.1155/2013/951786>.
- 7 Vishwanathan R, Kuchan MJ, Sen S, Johnson EJ. Lutein and preterm infants with decreased concentrations of brain carotenoids. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2014; **59**: 659–65. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000000389>.
- 8 Cao D, Kevala K, Kim J, et al. Docosahexaenoic acid promotes hippocampal neuronal development and synaptic function. *J Neurochem* 2009; **111**: 510–21. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06335.x>.
- 9 Chang PK-Y, Khatchadourian A, McKinney RA, Maysinger D. Docosahexaenoic acid (DHA): a modulator of microglia activity and dendritic spine morphology. *J Neuroinflammation* 2015; **12**: 34. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0244-5>.
- 10 Gould RM, Dawson RM. Incorporation of newly formed lecithin into peripheral nerve myelin. *J Cell Biol* 1976; **68**: 480–96. <https://doi.org/10.1083/jcb.68.3.480>.
- 11 Mohn ES, Erdman JW, Kuchan MJ, Neuringer M, Johnson EJ. Lutein accumulates in subcellular membranes of brain regions in adult rhesus macaques: Relationship to DHA oxidation products. *PLoS One* 2017; **12**: e0186767. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186767>.
- 12 Thomas Rajarethnem H, Megur Ramakrishna Bhat K, Jc M, Kumar Gopalkrishnan S, Mugundhu Gopalram RB, Rai KS. Combined Supplementation of Choline and

Docosahexaenoic Acid during Pregnancy Enhances Neurodevelopment of Fetal Hippocampus. *Neurol Res Int* 2017; **2017**: 8748706.

<https://doi.org/10.1155/2017/8748706>.

- 13 van Deijk A-LF, Broersen LM, Verkuyl JM, Smit AB, Verheijen MHG. High Content Analysis of Hippocampal Neuron-Astrocyte Co-cultures Shows a Positive Effect of Fortasyn Connect on Neuronal Survival and Postsynaptic Maturation. *Front Neurosci* 2017; **11**: 440. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00440>.
- 14 Commission Delegated Regulation (EU) 2016/127 of 25 September 2015 supplementing Regulation (EU) No 609/2013 of the European Parliament and ..., 2016.
- 15 Decsi T, Marosvölgyi T, Szabó É. Docosahexaenoic Acid in Formulas for Term Infants: The Way from Pioneer Idea to Mandatory Dietary Recommendation. *Life (Basel)* 2023; **13**. <https://doi.org/10.3390/life13061326>.
- 16 Standard for infant formula and formulas for special medical purposes intended for infants, 2007.
- 17 Hanson M, Godfrey KM, Lillycrop KA, Burdge GC, Gluckman PD. Developmental plasticity and developmental origins of non-communicable disease: theoretical considerations and epigenetic mechanisms. *Progress in biophysics and molecular biology* 2011; **106**: 272–80. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2010.12.008>.
- 18 Lindsay KL, Buss C, Wadhwa PD, Entringer S. The Interplay Between Nutrition and Stress in Pregnancy: Implications for Fetal Programming of Brain Development. *Biological psychiatry* 2019; **85**: 135–49. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2018.06.021>.
- 19 Barker DJ. Developmental origins of adult health and disease. *J Epidemiol Community Health* 2004; **58**: 114–15. <https://doi.org/10.1136/jech.58.2.114>.
- 20 Miranda A, Sousa N. Maternal hormonal milieu influence on fetal brain development. *Brain Behav* 2018; **8**: e00920. <https://doi.org/10.1002/brb3.920>.
- 21 Nüsken K-D, Schneider H, Plank C, et al. Fetal programming of gene expression in growth-restricted rats depends on the cause of low birth weight. *Endocrinology* 2011; **152**: 1327–35. <https://doi.org/10.1210/en.2010-1116>.
- 22 Cusick SE, Georgieff MK. The Role of Nutrition in Brain Development: The Golden Opportunity of the "First 1000 Days". *The Journal of Pediatrics* 2016; **175**: 16–21. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2016.05.013>.
- 23 Schwarzenberg SJ, Georgieff MK. Advocacy for Improving Nutrition in the First 1000 Days to Support Childhood Development and Adult Health. *Pediatrics* 2018; **141**. <https://doi.org/10.1542/peds.2017-3716>.
- 24 Barker DJ, Osmond C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *The Lancet* 1986; **327**: 1077–81. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(86\)91340-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(86)91340-1).

- 25 Fall CH, Barker DJ, Osmond C, Winter PD, Clark PM, Hales CN. Relation of infant feeding to adult serum cholesterol concentration and death from ischaemic heart disease. *BMJ* 1992; **304**: 801–05. <https://doi.org/10.1136/bmj.304.6830.801>.
- 26 Nüsken K-D, Dötsch J, Rauh M, Rascher W, Schneider H. Uteroplacental insufficiency after bilateral uterine artery ligation in the rat: impact on postnatal glucose and lipid metabolism and evidence for metabolic programming of the offspring by sham operation. *Endocrinology* 2008; **149**: 1056–63. <https://doi.org/10.1210/en.2007-0891>.
- 27 Marmot MG, Page CM, Atkins E, Douglas JW. Effect of breast-feeding on plasma cholesterol and weight in young adults. *J Epidemiol Community Health* 1980; **34**: 164–67. <https://doi.org/10.1136/jech.34.3.164>.
- 28 Calon F, Lim GP, Morihara T, et al. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acid depletion activates caspases and decreases NMDA receptors in the brain of a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Eur J Neurosci* 2005; **22**: 617–26. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04253.x>.
- 29 Stiles J, Jernigan TL. The basics of brain development. *Neuropsychol Rev* 2010; **20**: 327–48. <https://doi.org/10.1007/s11065-010-9148-4>.
- 30 Abdel-Aal E-SM, Akhtar H, Zaheer K, Ali R. Dietary sources of lutein and zeaxanthin carotenoids and their role in eye health. *Nutrients* 2013; **5**: 1169–85. <https://doi.org/10.3390/nu5041169>.
- 31 Sastry PS. Lipids of nervous tissue: Composition and metabolism. *Prog Lipid Res* 1985; **24**: 69–176. [https://doi.org/10.1016/0163-7827\(85\)90011-6](https://doi.org/10.1016/0163-7827(85)90011-6).
- 32 Innis SM. Perinatal biochemistry and physiology of long-chain polyunsaturated fatty acids. *The Journal of Pediatrics* 2003; **143**: 1–8. [https://doi.org/10.1067/S0022-3476\(03\)00396-2](https://doi.org/10.1067/S0022-3476(03)00396-2).
- 33 Haggarty P. Effect of placental function on fatty acid requirements during pregnancy. *Eur J Clin Nutr* 2004; **58**: 1559–70. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602016>.
- 34 Farquharson J, Cockburn F, Patrick WA, Jamieson EC, Logan RW. Effect of diet on infant subcutaneous tissue triglyceride fatty acids. *Arch Dis Child* 1993; **69**: 589–93. <https://doi.org/10.1136/adc.69.5.589>.
- 35 Díaz M, Mesa-Herrera F, Marín R. DHA and Its Elaborated Modulation of Antioxidant Defenses of the Brain: Implications in Aging and AD Neurodegeneration. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 2021; **10**. <https://doi.org/10.3390/antiox10060907>.
- 36 Lukiw WJ, Bazan NG. Docosahexaenoic acid and the aging brain. *J Nutr* 2008; **138**: 2510–14. <https://doi.org/10.3945/jn.108.096016>.
- 37 Innis SM. Polyunsaturated fatty acids in human milk: an essential role in infant development. *Adv Exp Med Biol* 2004; **554**: 27–43. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-4242-8_5.

- 38 Velzing-Aarts FV, van der Klis FR, van der Dijs FP, et al. \citep{VelzingAarts.2001}Effect of three low-dose fish oil supplements, administered during pregnancy, on neonatal long-chain polyunsaturated fatty acid status at birth. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2001; **65**: 51–57. <https://doi.org/10.1054/plaf.2001.0288>.
- 39 Groot RHM de, Hornstra G, van Houwelingen AC, Roumen F. Effect of alpha-linolenic acid supplementation during pregnancy on maternal and neonatal polyunsaturated fatty acid status and pregnancy outcome. *Am J Clin Nutr* 2004; **79**: 251–60. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.2.251>.
- 40 Innis SM. Dietary omega 3 fatty acids and the developing brain. *Brain Res* 2008; **1237**: 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.08.078>.
- 41 Swanson D, Block R, Mousa SA. Omega-3 fatty acids EPA and DHA: health benefits throughout life. *Adv Nutr* 2012; **3**: 1–7. <https://doi.org/10.3945/an.111.000893>.
- 42 Cunnane SC. Problems with essential fatty acids: time for a new paradigm? *Prog Lipid Res* 2003; **42**: 544–68. [https://doi.org/10.1016/s0163-7827\(03\)00038-9](https://doi.org/10.1016/s0163-7827(03)00038-9).
- 43 Kohlboeck G, Glaser C, Tiesler C, et al. Effect of fatty acid status in cord blood serum on children's behavioral difficulties at 10 y of age: results from the LISApplus Study. *Am J Clin Nutr* 2011; **94**: 1592–99. <https://doi.org/10.3945/ajcn.111.015800>.
- 44 Jensen CL, Voigt RG, Prager TC, et al. Effects of maternal docosahexaenoic acid intake on visual function and neurodevelopment in breastfed term infants. *Am J Clin Nutr* 2005; **82**: 125–32. <https://doi.org/10.1093/ajcn.82.1.125>.
- 45 Jensen CL, Voigt RG, Llorente AM, et al. Effects of early maternal docosahexaenoic acid intake on neuropsychological status and visual acuity at five years of age of breast-fed term infants. *The Journal of Pediatrics* 2010; **157**: 900–05. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2010.06.006>.
- 46 Lauritzen L, Jørgensen MH, Mikkelsen TB, et al. Maternal fish oil supplementation in lactation: effect on visual acuity and n-3 fatty acid content of infant erythrocytes. *Lipids* 2004; **39**: 195–206. <https://doi.org/10.1007/s11745-004-1220-8>.
- 47 Malcolm CA, McCulloch DL, Montgomery C, Shepherd A, Weaver LT. Maternal docosahexaenoic acid supplementation during pregnancy and visual evoked potential development in term infants: a double blind, prospective, randomised trial. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2003; **88**: F383-90. <https://doi.org/10.1136/fn.88.5.F383>.
- 48 Jensen CL, Prager TC, Zou Y, et al. Effects of maternal docosahexaenoic acid supplementation on visual function and growth of breast-fed term infants. *Lipids* 1999; **34** **Suppl**: S225. <https://doi.org/10.1007/BF02562299>.
- 49 Gibson RA, Neumann MA, Makrides M. Effect of increasing breast milk docosahexaenoic acid on plasma and erythrocyte phospholipid fatty acids and neural indices of exclusively

- breast fed infants. *Eur J Clin Nutr* 1997; **51**: 578–84.
<https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1600446>.
- 50 Jan YN, Jan LY. Dendrites. *Genes Dev* 2001; **15**: 2627–41.
<https://doi.org/10.1101/gad.916501>.
- 51 Cline HT. Dendritic arbor development and synaptogenesis. *Current opinion in neurobiology* 2001; **11**: 118–26. [https://doi.org/10.1016/s0959-4388\(00\)00182-3](https://doi.org/10.1016/s0959-4388(00)00182-3).
- 52 Madore C, Leyrolle Q, Morel L, et al. Essential omega-3 fatty acids tune microglial phagocytosis of synaptic elements in the mouse developing brain. *Nat Commun* 2020; **11**: 6133. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19861-z>.
- 53 Snodderly DM. Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins. *Am J Clin Nutr* 1995; **62**: 1448S-1461S.
<https://doi.org/10.1093/ajcn/62.6.1448S>.
- 54 Vishwanathan R, Iannaccone A, Scott TM, et al. Macular pigment optical density is related to cognitive function in older people. *Age Ageing* 2014; **43**: 271–75.
<https://doi.org/10.1093/ageing/aft210>.
- 55 Lietz G, Mulokozi G, Henry JCK, Tomkins AM. Xanthophyll and hydrocarbon carotenoid patterns differ in plasma and breast milk of women supplemented with red palm oil during pregnancy and lactation. *J Nutr* 2006; **136**: 1821–27.
<https://doi.org/10.1093/jn/136.7.1821>.
- 56 Bettler J, Zimmer JP, Neuringer M, DeRusso PA. Serum lutein concentrations in healthy term infants fed human milk or infant formula with lutein. *Eur J Nutr* 2010; **49**: 45–51.
<https://doi.org/10.1007/s00394-009-0047-5>.
- 57 Pitkin RM, Allen L, Bailey LB, Bernfield M. Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin, and choline. Washington, D.C: National Academy Press, 1998.
- 58 Wallace TC, Fulgoni VL. Assessment of Total Choline Intakes in the United States. *J Am Coll Nutr* 2016; **35**: 108–12. <https://doi.org/10.1080/07315724.2015.1080127>.
- 59 Shaw GM, Finnell RH, Blom HJ, et al. Choline and risk of neural tube defects in a folate-fortified population. *Epidemiology* 2009; **20**: 714–19.
<https://doi.org/10.1097/EDE.0b013e3181ac9fe7>.
- 60 Outcome of a public consultation on the Draft Scientific Opinion of the EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA) on Dietary Reference Values for choline. *EFSA Supporting Publications* 2016; **13**: 1036E. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2016.EN-1036>.
- 61 Kovacheva VP, Davison JM, Mellott TJ, et al. Raising gestational choline intake alters gene expression in DMBA-evoked mammary tumors and prolongs survival. *FASEB J* 2009; **23**: 1054–63. <https://doi.org/10.1096/fj.08-122168>.

- 62 Medici V, Shibata NM, Kharbanda KK, et al. Maternal choline modifies fetal liver copper, gene expression, DNA methylation, and neonatal growth in the tx-j mouse model of Wilson disease. *Epigenetics* 2014; **9**: 286–96. <https://doi.org/10.4161/epi.27110>.
- 63 Sweiry JH, Page KR, Dacke CG, Abramovich DR, Yudilevich DL. Evidence of saturable uptake mechanisms at maternal and fetal sides of the perfused human placenta by rapid paired-tracer dilution: studies with calcium and choline. *J Dev Physiol* 1986; **8**: 435–45.
- 64 Chao CK, Pomfret EA, Zeisel SH. Uptake of choline by rat mammary-gland epithelial cells. *Biochem J* 1988; **254**: 33–38. <https://doi.org/10.1042/bj2540033>.
- 65 Meck WH, Smith RA, Williams CL. Pre- and postnatal choline supplementation produces long-term facilitation of spatial memory. *Dev Psychobiol* 1988; **21**: 339–53. <https://doi.org/10.1002/dev.420210405>.
- 66 Albright CD, Tsai AY, Friedrich CB, Mar M-H, Zeisel SH. Choline availability alters embryonic development of the hippocampus and septum in the rat. *Developmental Brain Research* 1999; **113**: 13–20. [https://doi.org/10.1016/S0165-3806\(98\)00183-7](https://doi.org/10.1016/S0165-3806(98)00183-7).
- 67 Craciunescu CN, Albright CD, Mar M-H, Song J, Zeisel SH. Choline availability during embryonic development alters progenitor cell mitosis in developing mouse hippocampus. *J Nutr* 2003; **133**: 3614–18. <https://doi.org/10.1093/jn/133.11.3614>.
- 68 Meck WH, Williams CL. Simultaneous temporal processing is sensitive to prenatal choline availability in mature and aged rats. *Neuroreport* 1997; **8**: 3045–51. <https://doi.org/10.1097/00001756-199709290-00009>.
- 69 Wu BTF, Dyer RA, King DJ, Richardson KJ, Innis SM. Early second trimester maternal plasma choline and betaine are related to measures of early cognitive development in term infants. *PLoS One* 2012; **7**: e43448. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043448>.
- 70 Bahnfleth C, Canfield R, Nevins J, Caudill M, Strupp B. Prenatal Choline Supplementation Improves Child Color-location Memory Task Performance at 7 Y of Age (FS05-01-19). *Current Developments in Nutrition* 2019; **3**. <https://doi.org/10.1093/cdn/nzz052.FS05-01-19>.
- 71 Caudill MA, Strupp BJ, Muscalu L, Nevins JEH, Canfield RL. Maternal choline supplementation during the third trimester of pregnancy improves infant information processing speed: a randomized, double-blind, controlled feeding study. *FASEB J* 2018; **32**: 2172–80. <https://doi.org/10.1096/fj.201700692RR>.
- 72 Li J, Jian Y, Liu R, et al. Choline and Fish Oil Can Improve Memory of Mice through Increasing Brain DHA Level. *Foods* 2023; **12**. <https://doi.org/10.3390/foods12091799>.
- 73 Machová E, Nováková J, Lisá V, Dolezal V. Docosahexaenoic Acid Supports Cell Growth and Expression of Choline Acetyltransferase and Muscarinic Receptors in NG108-15 Cell Line. *JMN* 2006; **30**: 25–26. <https://doi.org/10.1385/JMN:30:1:25>.

- 74 Treen M, Uauy RD, Jameson DM, Thomas VL, Hoffman DR. Effect of docosahexaenoic acid on membrane fluidity and function in intact cultured Y-79 retinoblastoma cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1992; **294**: 564–70. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(92\)90726-D](https://doi.org/10.1016/0003-9861(92)90726-D).
- 75 Bernhard W, Böckmann K, Maas C, et al. Combined choline and DHA supplementation: a randomized controlled trial. *Eur J Nutr* 2020; **59**: 729–39. <https://doi.org/10.1007/s00394-019-01940-7>.
- 76 Klatt KC, McDougall MQ, Malysheva OV, Brenna JT, Roberson MS, Caudill MA. Reproductive state and choline intake influence enrichment of plasma lysophosphatidylcholine-DHA: a post hoc analysis of a controlled feeding trial. *Br J Nutr* 2019; **122**: 1221–29. <https://doi.org/10.1017/S0007114519002009>.
- 77 Nguyen LN, Ma D, Shui G, et al. Mfsd2a is a transporter for the essential omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid. *Nature* 2014; **509**: 503–06. <https://doi.org/10.1038/nature13241>.
- 78 Kitson AP, Metherel AH, Chen CT, et al. Effect of dietary docosahexaenoic acid (DHA) in phospholipids or triglycerides on brain DHA uptake and accretion. *J Nutr Biochem* 2016; **33**: 91–102. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2016.02.009>.
- 79 Sugasini D, Thomas R, Yalagala PCR, Tai LM, Subbaiah PV. Dietary docosahexaenoic acid (DHA) as lysophosphatidylcholine, but not as free acid, enriches brain DHA and improves memory in adult mice. *Sci Rep* 2017; **7**: 11263. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11766-0>.
- 80 Wurtman RJ. A nutrient combination that can affect synapse formation. *Nutrients* 2014; **6**: 1701–10. <https://doi.org/10.3390/nu6041701>.
- 81 Squire LR, Asbury AK. Memory and Brain. New York, Oxford, 1987. *Ann Neurol*. 1989; **25**: 315. <https://doi.org/10.1002/ana.410250327>.
- 82 Li Y, Mu Y, Gage FH. Chapter 5 Development of Neural Circuits in the Adult Hippocampus. *Current topics in developmental biology* 2009; **87**: 149–74. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(09\)01205-8](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(09)01205-8).
- 83 Schlessinger AR, Cowan WM, Gottlieb DI. An autoradiographic study of the time of origin and the pattern of granule cell migration in the dentate gyrus of the rat. *J Comp Neurol* 1975; **159**: 149–75. <https://doi.org/10.1002/cne.901590202>.
- 84 Stephan H. Allocortex - Ontogenetische Entwicklung Archicortex. Berlin, Heidelberg, New York: 128-201: Springer, 1975.
- 85 Claiborne BJ, Amaral DG, Cowan WM. A light and electron microscopic analysis of the mossy fibers of the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol* 1986; **246**: 435–58. <https://doi.org/10.1002/cne.902460403>.

- 86 Köhler C. Intrinsic connections of the retrohippocampal region in the rat brain: III. The lateral entorhinal area. *J Comp Neurol* 1988; **271**: 208–28.
<https://doi.org/10.1002/cne.902710204>.
- 87 Knierim JJ. The hippocampus. *Curr Biol* 2015; **25**: R1116–21.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.10.049>.
- 88 Bliss TV, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 1973; **232**: 331–56. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1973.sp010273>.
- 89 Lüscher C, Malenka RC. NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012; **4**.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005710>.
- 90 Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 1993; **361**: 31–39. <https://doi.org/10.1038/361031a0>.
- 91 Nakazawa K, Sun LD, Quirk MC, Rondi-Reig L, Wilson MA, Tonegawa S. Hippocampal CA3 NMDA Receptors Are Crucial for Memory Acquisition of One-Time Experience. *Neuron* 2003; **38**: 305–15. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00165-x](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00165-x).
- 92 Nakazawa K, Quirk MC, Chitwood RA, et al. Requirement for hippocampal CA3 NMDA receptors in associative memory recall. *Science* 2002; **297**: 211–18.
<https://doi.org/10.1126/science.1071795>.
- 93 Hebb DO. *The Organization of Behavior. A Neuropsychological Theory*. New York: John Wiley and Sons, Inc., 1949.
- 94 Titley HK, Brunel N, Hansel C. Toward a Neurocentric View of Learning. *Neuron* 2017; **95**: 19–32. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.05.021>.
- 95 Singh A, Abraham WC. Astrocytes and synaptic plasticity in health and disease. *Exp Brain Res* 2017; **235**: 1645–55. <https://doi.org/10.1007/s00221-017-4928-1>.
- 96 Béchade C, Cantaut-Belarif Y, Bessis A. Microglial control of neuronal activity. *Front Cell Neurosci* 2013; **7**: 32. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00032>.
- 97 Paolicelli RC, Bisht K, Tremblay M-È. Fractalkine regulation of microglial physiology and consequences on the brain and behavior. *Front Cell Neurosci* 2014; **8**: 129.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00129>.
- 98 Bessis A, Béchade C, Bernard D, Roumier A. Microglial control of neuronal death and synaptic properties. *Glia* 2007; **55**: 233–38. <https://doi.org/10.1002/glia.20459>.
- 99 Chamak B, Dobbertin A, Mallat M. Immunohistochemical detection of thrombospondin in microglia in the developing rat brain. *Neuroscience* 1995; **69**: 177–87.
[https://doi.org/10.1016/0306-4522\(95\)00236-C](https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00236-C).

- 100 Christopherson KS, Ullian EM, Stokes CCA, et al. Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell* 2005; **120**: 421–33. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.020>.
- 101 Ji K, Miyauchi J, Tsirka SE. Microglia: an active player in the regulation of synaptic activity. *Neural Plast* 2013; **2013**: 627325. <https://doi.org/10.1155/2013/627325>.
- 102 Rogers JT, Morganti JM, Bachstetter AD, et al. CX3CR1 deficiency leads to impairment of hippocampal cognitive function and synaptic plasticity. *J. Neurosci.* 2011; **31**: 16241–50. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3667-11.2011>.
- 103 Roumier A, Béchade C, Poncer J-C, et al. Impaired synaptic function in the microglial KARAP/DAP12-deficient mouse. *J. Neurosci.* 2004; **24**: 11421–28. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2251-04.2004>.
- 104 Piani D, Frei K, Do KQ, Cuénod M, Fontana A. Murine brain macrophages induce NMDA receptor mediated neurotoxicity in vitro by secreting glutamate. *Neuroscience letters* 1991; **133**: 159–62. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(91\)90559-c](https://doi.org/10.1016/0304-3940(91)90559-c).
- 105 Kingham PJ, Pocock JM. Microglial secreted cathepsin B induces neuronal apoptosis. *J Neurochem* 2001; **76**: 1475–84. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00146.x>.
- 106 Liao H, Bu W, Wang T-H, Ahmed S, Xiao Z-C. Tenascin-R plays a role in neuroprotection via its distinct domains that coordinate to modulate the microglia function. *J Biol Chem* 2005; **280**: 8316–23. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412730200>.
- 107 Morgan SC, Taylor DL, Pocock JM. Microglia release activators of neuronal proliferation mediated by activation of mitogen-activated protein kinase, phosphatidylinositol-3-kinase/Akt and delta-Notch signalling cascades. *J Neurochem* 2004; **90**: 89–101. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02461.x>.
- 108 Sierra A, Encinas JM, Deudero JJP, et al. Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell* 2010; **7**: 483–95. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.08.014>.
- 109 Ziv Y, Ron N, Butovsky O, et al. Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nat Neurosci* 2006; **9**: 268–75. <https://doi.org/10.1038/nn1629>.
- 110 Fourrier C, Remus-Borel J, Greenhalgh AD, et al. Docosahexaenoic acid-containing choline phospholipid modulates LPS-induced neuroinflammation in vivo and in microglia in vitro. *J Neuroinflammation* 2017; **14**. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0939-x>.
- 111 Belayev L, Hong S-H, Menghani H, et al. Docosanoids Promote Neurogenesis and Angiogenesis, Blood-Brain Barrier Integrity, Penumbra Protection, and Neurobehavioral Recovery After Experimental Ischemic Stroke. *Mol Neurobiol* 2018; **55**: 7090–106. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1136-3>.

- 112 Verkhratsky A, Orkand RK, Kettenmann H. Glial calcium: homeostasis and signaling function. *Physiol Rev* 1998; **78**: 99–141. <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.1.99>.
- 113 Zorec R, Araque A, Carmignoto G, Haydon PG, Verkhratsky A, Parpura V. Astroglial excitability and gliotransmission: an appraisal of Ca²⁺ as a signalling route. *ASN Neuro* 2012; **4**. <https://doi.org/10.1042/AN20110061>.
- 114 Zorec R, Horvat A, Vardjan N, Verkhratsky A. Memory Formation Shaped by Astroglia. *Front Integr Neurosci* 2015; **9**: 56. <https://doi.org/10.3389/fnint.2015.00056>.
- 115 Vesce S, Bezzi P, Volterra A. The active role of astrocytes in synaptic transmission. *Cell Mol Life Sci* 1999; **56**: 991–1000. <https://doi.org/10.1007/s000180050488>.
- 116 Haydon PG. GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci* 2001; **2**: 185–93. <https://doi.org/10.1038/35058528>.
- 117 Angulo MC, Kozlov AS, Charpak S, Audinat E. Glutamate released from glial cells synchronizes neuronal activity in the hippocampus. *J. Neurosci.* 2004; **24**: 6920–27. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0473-04.2004>.
- 118 Gibbs ME, Hutchinson D, Hertz L. Astrocytic involvement in learning and memory consolidation. *Neurosci Biobehav Rev* 2008; **32**: 927–44. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2008.02.001>.
- 119 Ostroff LE, Manzur MK, Cain CK, Ledoux JE. Synapses lacking astrocyte appear in the amygdala during consolidation of Pavlovian threat conditioning. *J Comp Neurol* 2014; **522**: 2152–63. <https://doi.org/10.1002/cne.23523>.
- 120 O'Brien JS, Sampson EL. Lipid composition of the normal human brain: gray matter, white matter, and myelin. *J Lipid Res* 1965; **6**: 537–44.
- 121 Masson M-A, Nait-Oumesmar B. Emerging concepts in oligodendrocyte and myelin formation, inputs from the zebrafish model. *Glia* 2023; **71**: 1147–63. <https://doi.org/10.1002/glia.24336>.
- 122 Nave K-A. Myelination and support of axonal integrity by glia. *Nature* 2010; **468**: 244–52. <https://doi.org/10.1038/nature09614>.
- 123 Deoni S, Dean D, Joelson S, O'Regan J, Schneider N. Early nutrition influences developmental myelination and cognition in infants and young children. *Neuroimage* 2018; **178**: 649–59. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2017.12.056>.
- 124 Cotman CW. Synapse Formation and Plasticity in the Developing Dentate Gyrus. In: Livingston KE, Hornykiewicz O, eds. *Limbic Mechanisms. The Continuing Evolution of the Limbic System Concept*. Boston, MA: Springer US; Imprint; Springer, 1978: 47–65.
- 125 Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 1965; **124**: 319–35. <https://doi.org/10.1002/cne.901240303>.

- 126 Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 1998; **4**: 1313–17. <https://doi.org/10.1038/3305>.
- 127 Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science* 2000; **287**: 1433–38. <https://doi.org/10.1126/science.287.5457.1433>.
- 128 Sohur US, Emsley JG, Mitchell BD, Macklis JD. Adult neurogenesis and cellular brain repair with neural progenitors, precursors and stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006; **361**: 1477–97. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1887>.
- 129 Dobbing J, Sands J. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Human Development* 1979; **3**: 79–83. [https://doi.org/10.1016/0378-3782\(79\)90022-7](https://doi.org/10.1016/0378-3782(79)90022-7).
- 130 Dobbing J. <https://doi.org/10.1542/peds.53.1.2>. *Pediatrics* 1974; **53**: 2–6.
- 131 Arnold SE, Trojanowski JQ. Human fetal hippocampal development: I. Cytoarchitecture, myeloarchitecture, and neuronal morphologic features. *J Comp Neurol* 1996; **367**: 274–92. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19960401\)367:2<274::AID-CNE9>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19960401)367:2<274::AID-CNE9>3.0.CO;2-2).
- 132 Babikian T, Prins ML, Cai Y, et al. Molecular and physiological responses to juvenile traumatic brain injury: focus on growth and metabolism. *Dev Neurosci* 2010; **32**: 431–41. <https://doi.org/10.1159/000320667>.
- 133 Catalani A, Sabbatini M, Consoli C, et al. Glial fibrillary acidic protein immunoreactive astrocytes in developing rat hippocampus. *Mech Ageing Dev* 2002; **123**: 481–90. [https://doi.org/10.1016/s0047-6374\(01\)00356-6](https://doi.org/10.1016/s0047-6374(01)00356-6).
- 134 Diamond A. Rate of maturation of the hippocampus and the developmental progression of children's performance on the delayed non-matching to sample and visual paired comparison tasks. *Ann N Y Acad Sci* 1990; **608**: 394-426; discussion 426-33. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1990.tb48904.x>.
- 135 Bandeira F, Lent R, Herculano-Houzel S. Changing numbers of neuronal and non-neuronal cells underlie postnatal brain growth in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; **106**: 14108–13. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804650106>.
- 136 Crain B, Cotman C, Taylor D, Lynch G. A quantitative electron microscopic study of synaptogenesis in the dentate gyrus of the rat. *Brain Res* 1973; **63**: 195–204. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(73\)90088-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(73)90088-7).
- 137 Stevens KE, Choo KS, Stitzel JA, Marks MJ, Adams CE. Long-term improvements in sensory inhibition with gestational choline supplementation linked to $\alpha 7$ nicotinic receptors through studies in *Chrna7* null mutation mice. *Brain Res* 2014; **1552**: 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.01.022>.
- 138 Fatani AJ, Al-Rejaie SS, Abuohashish HM, Al-Assaf A, Parmar MY, Ahmed MM. Lutein dietary supplementation attenuates streptozotocin-induced testicular damage and

- oxidative stress in diabetic rats. *BMC Complement Altern Med* 2015; **15**: 204.
<https://doi.org/10.1186/s12906-015-0693-5>.
- 139 Högyes E, Nyakas C, Kiliaan A, Farkas T, Penke B, Luiten PGM. Neuroprotective effect of developmental docosahexaenoic acid supplement against excitotoxic brain damage in infant rats. *Neuroscience* 2003; **119**: 999–1012. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(03\)00198-2](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(03)00198-2).
- 140 Bancroft JD. Theory and practice of histological techniques. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2008.
- 141 Hadley G. Basic Histology. *J Anat* 2007; **211**: 412. https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2007.771_1.x.
- 142 Underwood JCE. The Use of Stains. In: Underwood JCE, Underwood JCE, eds. Introduction to biopsy interpretation and surgical pathology. London, Heidelberg: Springer, 1987: 39–54.
- 143 Thomas N. A Manual for Histological Technicians (3rd edition). *J Anat* 1973; **114**: 284.
- 144 Childs GV. History of Immunohistochemistry. In: McManus LM, ed. Pathobiology of human disease. Oxford: Elsevier Acad. Press, 2014: 3775–96.
- 145 van Epps HL. Michael Heidelberger and the demystification of antibodies. *J Exp Med* 2006; **203**: 5. <https://doi.org/10.1084/jem.2031fta>.
- 146 Software G. GraphPad Prism 10 Statistics Guide - Interpreting results: Kruskal-Wallis test. https://www.graphpad.com/guides/prism/latest/statistics/how_the_kruskal-wallis_test_works.htm (accessed Dec 13, 2023).
- 147 Dunn OJ. Multiple Comparisons Using Rank Sums. *Technometrics* 1964; **6**: 241–52. <https://doi.org/10.1080/00401706.1964.10490181>.
- 148 Software G. GraphPad Prism 10 Statistics Guide - Options tab: Multiple comparisons: One-way ANOVA. https://www.graphpad.com/guides/prism/latest/statistics/stat_options_tab_1wayanova.htm (accessed Dec 13, 2023).
- 149 Xie Q, Zhang Y, Zhang J, Cui D, Zhou Q, Guo M. Promotion effect of the blend containing 2'-FL, OPN and DHA on oligodendrocyte progenitor cells myelination in vitro. *Front Nutr* 2022; **9**: 1054431. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1054431>.
- 150 Bernardo A, Giammarco ML, Nuccio C de, et al. Docosahexaenoic acid promotes oligodendrocyte differentiation via PPAR- γ signalling and prevents tumor necrosis factor- α -dependent maturational arrest. *Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids* 2017; **1862**: 1013–23. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.06.014>.
- 151 Hauser J, Sultan S, Rytz A, Steiner P, Schneider N. A blend containing docosahexaenoic acid, arachidonic acid, vitamin B12, vitamin B9, iron and sphingomyelin

- promotes myelination in an in vitro model. *Nutr Neurosci* 2020; **23**: 931–45.
<https://doi.org/10.1080/1028415X.2019.1580918>.
- 152 Nury T, Doria M, Lizard G, Vejux A. Docosahexaenoic Acid Attenuates Mitochondrial Alterations and Oxidative Stress Leading to Cell Death Induced by Very Long-Chain Fatty Acids in a Mouse Oligodendrocyte Model. *Int J Mol Sci* 2020; **21**.
<https://doi.org/10.3390/ijms21020641>.
- 153 Kühne BA, Vázquez-Aristizabal P, Fuentes-Amell M, et al. Docosahexaenoic Acid and Melatonin Prevent Impaired Oligodendrogenesis Induced by Intrauterine Growth Restriction (IUGR). *Biomedicines* 2022; **10**.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines10051205>.
- 154 Norton WT, Cammer W. Isolation and Characterization of Myelin. In: Morell P, ed. *Myelin*. New York, NY: Springer, 1984: 147–95.
- 155 van Wijk N, Balvers M, Cansev M, Maher TJ, Sijben JWC, Broersen LM. Dietary Crude Lecithin Increases Systemic Availability of Dietary Docosahexaenoic Acid with Combined Intake in Rats. *Lipids* 2016; **51**: 833–46. <https://doi.org/10.1007/s11745-016-4139-8>.
- 156 Kwan STC, King JH, Yan J, et al. Maternal Choline Supplementation Modulates Placental Nutrient Transport and Metabolism in Late Gestation of Mouse Pregnancy. *J Nutr* 2017; **147**: 2083–92. <https://doi.org/10.3945/jn.117.256107>.
- 157 Christifano DN, Chollet-Hinton L, Hoyer D, Schmidt A, Gustafson KM. Intake of eggs, choline, lutein, zeaxanthin, and DHA during pregnancy and their relationship to fetal neurodevelopment. *Nutr Neurosci* 2023; **26**: 749–55.
<https://doi.org/10.1080/1028415X.2022.2088944>.
- 158 Roberts LJ, Montine TJ, Markesbery WR, et al. Formation of isoprostane-like compounds (neuroprostanes) in vivo from docosahexaenoic acid. *J Biol Chem* 1998; **273**: 13605–12. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.22.13605>.
- 159 Ma D, Zhang M, Larsen CP, et al. DHA promotes the neuronal differentiation of rat neural stem cells transfected with GPR40 gene. *Brain Res* 2010; **1330**: 1–8.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.03.002>.
- 160 He C, Qu X, Cui L, Wang J, Kang JX. Improved spatial learning performance of fat-1 mice is associated with enhanced neurogenesis and neuritogenesis by docosahexaenoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; **106**: 11370–75.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0904835106>.
- 161 Goeke CM, Hashimoto JG, Guizzetti M, Vitalone A. Effects of ethanol-and choline-treated astrocytes on hippocampal neuron neurite outgrowth in vitro. *Sci Prog* 2021; **104**: 368504211018943. <https://doi.org/10.1177/00368504211018943>.

- 162 Latour A, Grintal B, Champeil-Potokar G, et al. Omega-3 fatty acids deficiency aggravates glutamatergic synapse and astroglial aging in the rat hippocampal CA1. *Aging Cell* 2013; **12**: 76–84. <https://doi.org/10.1111/accel.12026>.
- 163 Wu W, Li Y, Wu Y, Zhang Y, Wang Z, Liu X. Lutein suppresses inflammatory responses through Nrf2 activation and NF-κB inactivation in lipopolysaccharide-stimulated BV-2 microglia. *Mol Nutr Food Res* 2015; **59**: 1663–73. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500109>.
- 164 Terracina S, Petrella C, Francati S, et al. Antioxidant Intervention to Improve Cognition in the Aging Brain: The Example of Hydroxytyrosol and Resveratrol. *Int J Mol Sci* 2022; **23**. <https://doi.org/10.3390/ijms232415674>.
- 165 Mun JG, Legette LL, Ikonte CJ, Mitmesser SH. Choline and DHA in Maternal and Infant Nutrition: Synergistic Implications in Brain and Eye Health. *Nutrients* 2019; **11**. <https://doi.org/10.3390/nu11051125>.
- 166 Delgado-Noguera MF, Calvache JA, Bonfill Cosp X, Kotanidou EP, Galli-Tsinopoulou A. Supplementation with long chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) to breastfeeding mothers for improving child growth and development. *Cochrane Database Syst Rev* 2015; **2015**: CD007901. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007901.pub3>.
- 167 Jasani B, Simmer K, Patole SK, Rao SC. Long chain polyunsaturated fatty acid supplementation in infants born at term. *Cochrane Database Syst Rev* 2017; **3**: CD000376. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD000376.pub4>.
- 168 Weisz J, Ward IL. Plasma testosterone and progesterone titers of pregnant rats, their male and female fetuses, and neonatal offspring. *Endocrinology* 1980; **106**: 306–16. <https://doi.org/10.1210/endo-106-1-306>.
- 169 Carruth LL, Reisert I, Arnold AP. Sex chromosome genes directly affect brain sexual differentiation. *Nat Neurosci* 2002; **5**: 933–34. <https://doi.org/10.1038/nn922>.
- 170 Reisert I, Pilgrim C. Sexual differentiation of monoaminergic neurons--genetic or epigenetic? *Trends Neurosci* 1991; **14**: 468–73. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(91\)90047-x](https://doi.org/10.1016/0166-2236(91)90047-x).
- 171 Stockman SL, Kight KE, Bowers JM, McCarthy MM. Neurogenesis in the neonatal rat hippocampus is regulated by sexually dimorphic epigenetic modifiers. *Biol Sex Differ* 2022; **13**: 9. <https://doi.org/10.1186/s13293-022-00418-2>.
- 172 Schwarz JM, Sholar PW, Bilbo SD. Sex differences in microglial colonization of the developing rat brain. *J Neurochem* 2012; **120**: 948–63. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07630.x>.
- 173 Johnson RT, Breedlove SM, Jordan CL. Sex differences and laterality in astrocyte number and complexity in the adult rat medial amygdala. *J Comp Neurol* 2008; **511**: 599–609. <https://doi.org/10.1002/cne.21859>.

- 174 Bilbo SD, Smith SH, Schwarz JM. A lifespan approach to neuroinflammatory and cognitive disorders: a critical role for glia. *J Neuroimmune Pharmacol* 2012; **7**: 24–41. <https://doi.org/10.1007/s11481-011-9299-y>.
- 175 Hilton GD, Nuñez JL, McCarthy MM. Sex differences in response to kainic acid and estradiol in the hippocampus of newborn rats. *Neuroscience* 2003; **116**: 383–91. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(02\)00716-9](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(02)00716-9).
- 176 Hodgson DM, Knott B. Potentiation of tumor metastasis in adulthood by neonatal endotoxin exposure: sex differences. *Psychoneuroendocrinology* 2002; **27**: 791–804. [https://doi.org/10.1016/s0306-4530\(01\)00080-4](https://doi.org/10.1016/s0306-4530(01)00080-4).
- 177 Santos-Galindo M, Acaz-Fonseca E, Bellini MJ, Garcia-Segura LM. Sex differences in the inflammatory response of primary astrocytes to lipopolysaccharide. *Biol Sex Differ* 2011; **2**: 7. <https://doi.org/10.1186/2042-6410-2-7>.
- 178 Lohner S, Fekete K, Marosvölgyi T, Decsi T. Gender differences in the long-chain polyunsaturated fatty acid status: systematic review of 51 publications. *Ann Nutr Metab* 2013; **62**: 98–112. <https://doi.org/10.1159/000345599>.
- 179 Lauritzen L, Jørgensen MH, Olsen SF, Straarup EM, Michaelsen KF. Maternal fish oil supplementation in lactation: effect on developmental outcome in breast-fed infants. *Reprod Nutr Dev* 2005; **45**: 535–47. <https://doi.org/10.1051/rnd:2005044>.
- 180 Outcome of a public consultation on the Draft Scientific Opinion of the EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA) on Dietary Reference Values for choline. *EFSA Supporting Publications* 2016; **13**: 1036E. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2016.EN-1036>.
- 181 Omega-3 Kapseln|hoher Gehalt an Omega-3. <https://www.liebervorsorgen.de/omega-3> (accessed Dec 14, 2023).
- 182 Kersting M, Hockamp N, Burak C et al. Studie zur Erhebung von Daten zum Stillen und zur Säuglingsernährung in Deutschland – SuSe II. <http://www.dge.de/14-dge-eb/vvoe/kap3> (accessed Dec 13, 2023).
- 183 Turck D, Bohn T, Castenmiller J, et al. Choline and contribution to normal liver function of the foetus and exclusively breastfed infants: evaluation of a health claim pursuant to Article 14 of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA J* 2023; **21**: e08115. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.8115>.
- 184 European Food Safety Authority. Dietary Reference Values for choline. *EFSA J* 2016; **14**. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4484>.
- 185 Hibbeln JR, Salem N. Dietary polyunsaturated fatty acids and depression: when cholesterol does not satisfy. *Am J Clin Nutr* 1995; **62**: 1–9. <https://doi.org/10.1093/ajcn/62.1.1>.

- 186 Maes M, Smith R, Christophe A, Cosyns P, Desnyder R, Meltzer H. Fatty acid composition in major depression: decreased omega 3 fractions in cholesteryl esters and increased C20: 4 omega 6/C20:5 omega 3 ratio in cholesteryl esters and phospholipids. *J Affect Disord* 1996; **38**: 35–46. [https://doi.org/10.1016/0165-0327\(95\)00092-5](https://doi.org/10.1016/0165-0327(95)00092-5).
- 187 Kiecolt-Glaser JK, Belury MA, Porter K, Beversdorf DQ, Lemeshow S, Glaser R. Depressive symptoms, omega-6:omega-3 fatty acids, and inflammation in older adults. *Psychosom Med* 2007; **69**: 217–24. <https://doi.org/10.1097/PSY.0b013e3180313a45>.
- 188 Simopoulos AP. Evolutionary aspects of diet: the omega-6/omega-3 ratio and the brain. *Mol Neurobiol* 2011; **44**: 203–15. <https://doi.org/10.1007/s12035-010-8162-0>.
- 189 Goustard-Langelier B, Guesnet P, Durand G, Antoine JM, Alessandri JM. n-3 and n-6 fatty acid enrichment by dietary fish oil and phospholipid sources in brain cortical areas and nonneural tissues of formula-fed piglets. *Lipids* 1999; **34**: 5–16. <https://doi.org/10.1007/s11745-999-331-6>.
- 190 Alessandri JM, Goustard B, Guesnet P, Durand G. Polyunsaturated fatty acids status in blood, heart, liver, intestine, retina and brain of newborn piglets fed either sow milk or a milk replacer diet. *Reprod Nutr Dev* 1996; **36**: 95–109. <https://doi.org/10.1051/rnd:19960109>.
- 191 Guesnet P, Antoine JM, Rochette de Lempdes JB, Galent A, Durand G. Polyunsaturated fatty acid composition of human milk in France: changes during the course of lactation and regional differences. *Eur J Clin Nutr* 1993; **47**: 700–10.
- 192 Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol. *EFS2* 2010; **8**. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1461>.
- 193 Scientific Opinion on nutrient requirements and dietary intakes of infants and young children in the European Union. *EFS2* 2013; **11**. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3408>.
- 194 Scientific Opinion on the essential composition of infant and follow-on formulae. *EFSA Journal* 2014; **12**: 3760. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3760>.

6. Anhang

Tab. 12: Chemikalien

Artikel	Hersteller	Methode
Tissue-Tek® Einbettmedium, O.C.T. Compund, Ref 4583	Sakura Finetek Europe B.V., Niederlande	Einbettung und Schnittanfertigung
Isobutanol 2-Methyl-1-propanol ≥99%	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland	Einbettung und Schnittanfertigung
Paraformaldehyd 4%(PFA) ROTI®Histofix	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland	Einbettung und Schnittanfertigung
Essigsäure ROTIPURAN® 100%, p.a	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland	HE-Färbung
Hämalaunlösung Sauer nach Mayer	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland	HE-Färbung
Eosin G-Lösung 0,5% wässrig	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland	HE-Färbung
Neo-Mount® Wasserfreies Eindeckmittel	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	HE-Färbung
Neo-Clear® Xylol-Ersatz	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	HE-Färbung
Ethanol vergällt ≥99,8%, mit ca. 1% MEK	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland	HE-Färbung
Tween® 20 Polysorbat 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	IF-Färbung
Antibody Diluent	Dako North America, Kalifornien, USA	IF-Färbung
Sea Block Solution Blocking Reagenz	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA	IF-Färbung
DAPI Diamidin-2-phenylindol- Farbstoff	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	IF-Färbung
Fluoromount Wasserbasiertes Aufbringmedium	Diagnostic BioSystems, Kalifornien, USA	IF-Färbung

Tab. 13: Geräte

Artikel	Hersteller	Methode
Feather Microtome Blade C35, Carbon Steel	FEATHER® Safety Razor Co. Ltd., Osaka, Japan	Einbettung und Schnitthanfertigung
Cryostat Leica CM3050 S	Leica Biosystems Inc., Illinois, USA	Einbettung und Schnitthanfertigung
Mikroskop BX43	Olympus GmbH, Hamburg, Deutschland	Einscannen der Schnitte
Fluoreszenz Lampe U-HGLGPS	Olympus GmbH, Hamburg, Deutschland	Einscannen der Schnitte
TANGO Desktop Schrittmotorsteuerung	Märzhäuser Wetzlar, GmbH & Co. KG, Wetzlar, Deutschland	Einscannen der Schnitte
Pipetten	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland	IF-Färbungen
Vortexer z.B. IKA Vortex 3 Schüttler	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland	IF-Färbungen

Tab. 14: Puffer

Artikel	Hersteller	Zusammensetzung
Artificial cerebrospinal fluid (ACSF)	Eigene Herstellung	2L Ca ²⁺ -freies ACSF · 124 mM NaCl (14,5g) · 2 mM KCl (0,30g) · 10 mM Dextrose (3,60g) · 26 mM NaHCO ₃ (4,37g) · 2 mM MgSO ₄ *H ₂ O (0,553g) · 1.25 mM KH ₂ PO ₄ (0,34g) + 2L MilliQ Ziel-pH-Wert 7,4
Sucrose 30%	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland	30g Sucrose in 100ml MilliQ Wasser gelöst
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland	9,55g PBS-Pulver in 1L MilliQ Wasser gelöst

Tab. 15: Verbrauchsmaterialien

Artikel	Hersteller	Methode
Objektträger Menzel-Gläser, Superfrost® Plus	Thermo Scientific, Gerhard Menzel B.V. \& Co.KG, Braunschweig, Deutschland	Schnittanfertigung HE-Färbung IF-Färbung
Deckgläser 24mm x 50mm	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland	HE-Färbung IF-Färbung
Rasierklingen	Apollo-Herkenrath, Solingen, Deutschland	Gehirnentnahme, Schnittanfertigung
Acryl-Matrix für Rattenhirn	Science Services Beratungs- und Vertriebsgesellschaft für wissenschaftliche Laboreinrichtungen mbH, München, Deutschland	Gehirnentnahme
Mikroreaktionsgefäß 1,5ml und 2ml	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland	IF-Färbung
Stabpipetten	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland	IF-Färbung
Glasware	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland	IF-Färbung

Tab. 16: Software

Artikel	Version	Hersteller
ImageJ	Version 1.54b	
GraphPad Prism	Version 9.5.1	

6.1 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1** Histologisches Schnittbild Hippocampus im koronaren Schnitt.
- Abb. 2** Cross-fostering.
- Abb. 3** Versuchsaufbau.
- Abb. 4** Region of interest der Olig2-Färbung im Corpus callosum.
- Abb. 5** Region of interest für die NeuN-Färbung im Stratum pyramidale von CA1-3.
- Abb. 6** Region of interest für die NeuN-Färbung und die DCX-Färbung im Stratum granulosum des Gyrus dentatus.
- Abb. 7** Region of interest der GFAP-Färbung im Corpus callosum.
- Abb. 8** Regions of interest für die Iba1-Färbung.
- Abb. 9** Auswertung der Olig2-Färbung.
- Abb. 10** Auswertung der NeuN-Färbung in der Region CA1-3.
- Abb. 11** Auswertung der NeuN-Färbung im Gyrus dentatus.
- Abb. 12** Auswertung der GFAP-Färbung.
- Abb. 13** Auswertung der Iba1-Färbung.

6.2 Tabellenverzeichnis

- Tab. 1** Zusammensetzung des Futters
- Tab. 2** Antikörperkombinationen
- Tab. 3** Verwendete Primär- und Sekundär-Antikörper (AK)
- Tab. 4** Dunn's Test für die Auswertung der Olig2-Färbung
- Tab. 5** Dunn's Test für die Auswertung der NeuN-Färbung in der Region CA1-3
- Tab. 6** Dunn's Test für die Auswertung der NeuN-Färbung im Gyrus dentatus
- Tab. 7** Dunn's Test für die Auswertung der DCX-Färbung im Gyrus dentatus
- Tab. 8** Dunn's Test für die Auswertung der GFAP-Färbung
- Tab. 9** Dunn's Test für die Auswertung der Iba1-Färbung in der CA1-Region
- Tab. 10** Dunn's Test für die Auswertung der Iba1-Färbung in der CA3-Region
- Tab. 11** Dunn's Test für die Auswertung der Iba1-Färbung im Bereich des Corpus callosum
- Tab. 12** Chemikalien
- Tab. 13** Geräte
- Tab. 14** Puffer
- Tab. 15** Verbrauchsmaterialien
- Tab. 16** Software