

Aus dem  
Institut für Neurochirurgische Pathophysiologie  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Posthämorrhagischer Hydrozephalus bei Frühgeborenen:  
Einfluss der Inflammationsreaktion über die Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten  
und der Expression von High-mobility group box 1 und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  auf die  
Entwicklung eines PHH im Rattenmodell.

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Medizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Dominik Wocheslander  
aus Mallersdorf

Mainz, 2020

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachterin:

Tag der Promotion:

08. Dezember 2020

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>4</b>
<b>2. ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>6</b>
2.1 Abbildungsverzeichnis .....	6
2.2 Tabellenverzeichnis .....	7
<b>3. EINFÜHRUNG</b> .....	<b>8</b>
<b>4. STAND DER WISSENSCHAFT</b> .....	<b>10</b>
4.1 Definition und Einteilung von IVH und PHH.....	10
4.2 Epidemiologie.....	11
4.3 Klinik und Diagnostik.....	12
4.4 Aktuelle Behandlung.....	13
4.5 Pathophysiologie des PHH nach IVH.....	15
4.6 Entzündung und PHH.....	17
4.7 Tiermodelle .....	20
<b>5. STUDIENAUFBAU UND ZIELE</b> .....	<b>24</b>
<b>6. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>26</b>
6.1 Versuchstiere.....	26
6.2 Experimentelles Vorgehen und Gruppenzuteilung .....	27
6.3 Operation .....	28
6.3.1 Vorbereitung.....	28
6.3.2 Donorratten .....	29
6.3.3 Gewinnung des Donorblutes .....	30
6.3.4 Präparation der intraventrikulären Injektionsstelle.....	30
6.3.5 Injektion.....	31
6.4 Postoperative Behandlung .....	34
6.5 Gehirnentnahme und Perfusionsfixierung.....	35
6.6 Histologische Aufarbeitung.....	37
6.6.1 Herstellung der Gefrierschnitte.....	37
6.6.2 Färbungen.....	38

<b>6.7 Auswertung</b> .....	<b>40</b>
6.7.1 Bestimmung der Ventrikelgröße und der immunreaktiven Fläche (IRF).....	40
6.7.2 Statistische Analyse und Auswertung .....	42
<b>7. ERGEBNISSE</b> .....	<b>46</b>
<b>7.1 Entwicklung der Ratten</b> .....	<b>46</b>
<b>7.2 Bestimmung der Ventrikelgröße</b> .....	<b>48</b>
<b>7.3 Vergleich der immunreaktiven Fläche</b> .....	<b>50</b>
7.3.1 Immunreaktive Fläche von GFAP .....	50
7.3.2 Immunreaktive Fläche von IBA1 .....	55
7.3.3 Immunreaktive Fläche von TNF- $\alpha$ .....	59
7.3.4 Immunreaktive Fläche von HMGB1 .....	61
<b>7.4 Korrelation zwischen immunreaktiver Fläche und Ventrikelgröße</b> .....	<b>63</b>
<b>8. DISKUSSION</b> .....	<b>67</b>
<b>8.1 Gegenstände der Diskussion</b> .....	<b>67</b>
<b>8.2 Methodenkritik</b> .....	<b>67</b>
8.2.1 Das Tiermodell.....	67
8.2.2 Immunreaktive Fläche der Entzündungsmarker.....	72
<b>8.3 Diskussion der aufgestellten Hypothesen</b> .....	<b>74</b>
8.3.1 Auftreten eines PHH in unserem Modell .....	74
8.3.2 Entzündungsreaktion nach IVH und Beteiligung der Marker GFAP, IBA1, TNF- $\alpha$ und HMGB1 an der Entwicklung des PHH.....	76
<b>9. ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNG</b> .....	<b>88</b>
<b>9.1 Zusammenfassung</b> .....	<b>88</b>
<b>9.2 Schlussfolgerung</b> .....	<b>91</b>
<b>10. QUELLEN</b> .....	<b>92</b>
<b>11. ANHANG</b> .....	<b>96</b>
<b>11.1 Färbeprotokolle</b> .....	<b>96</b>
11.1.1 Färbeprotokoll für IBA1, TNF $\alpha$ und HMGB1.....	96
11.1.2 Färbeprotokoll für GFAP .....	97
11.1.3 Färbeprotokoll für Hämatoxilin und Eosin .....	98
11.1.4 Ansätze .....	99
11.1.5 Substanzen .....	100
<b>11.2 Ergebnistabellen der statistischen Analyse</b> .....	<b>101</b>
11.2.1 Vergleich der IRF der Interventionsgruppen mittels one-way ANOVA .....	101
11.2.2 Spearman-Korrelation zwischen der IRF und der Ventrikelgröße in der Blut- Gruppe.....	105

11.2.3 Vergleich der IRF der Hydrozephalus- und Nicht-Hydrozephalus-Tiere  
mittels t-Test..... 109

## 1. Abkürzungsverzeichnis

ABC: Avidin-Biotin-Komplex  
ANS: Atemnotsyndrom  
ANOVA: Analysis of variance  
CD40: Cluster of differentiation 40  
CD68: Cluster of differentiation 68  
ERK: Extracellular-signal regulated kinase  
ET-1: Endothelin-1  
F4/80: Glykoprotein F4/80  
GFAP: Glial fibrillary acidic protein  
GMH: Germinal matrix hemorrhage  
HMGB1: High-mobility group box 1  
H-Tx-Ratten: Hydrocephalic-Texas-Ratten  
IBA1: Ionisiertes Calcium-bindendes Adaptermolekül 1  
IFN- $\gamma$ : Interferon- $\gamma$   
IL-1 $\alpha$ : Interleukin-1 $\alpha$   
IL-1 $\beta$ : Interleukin-1 $\beta$   
IL-6: Interleukin-6  
IL-8: Interleukin-8  
IL-10: Interleukin-10  
IL-18: Interleukin-18  
IRF: Immunreaktive Fläche  
IVH: Intraventrikuläre Hämorrhagie  
MHC I: Major histocompatibility complex I  
MHC II: Major histocompatibility complex II  
Myd88: Myeloid differentiation primary response protein 88  
NF- $\kappa$ B: Nukleärer Faktor  $\kappa$ B  
PBS: Phosphat-buffered saline  
PBS+T: Phosphat-buffered saline + Triton  
PHH: Posthämorrhagischer Hydrozephalus  
PHVD: Posthämorrhagische Ventrikeldilatation  
p38 MAPK: p38-mitogenaktivierte Proteinkinase  
RAGE: Receptor for advanced glycation endproducts  
ROI: Region of interest

SAB: Subarachnoidalblutung  
SEM: Standard error of means  
SSW: Schwangerschaftswoche  
TH1 Zellen: Typ1-T-Helferzellen  
TLR2: Toll-like-rezeptor 2  
TLR4: Toll-like-rezeptor 4  
TNF- $\alpha$ : Tumornekrosefaktor-alpha  
TNFR1: Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1  
TNFR2: Tumornekrosefaktor-Rezeptor 2  
ZNS: Zentrales Nervensystem

## 2. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### 2.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Einteilung der IVH in 4 Grade nach Papile. ....	10
Abbildung 2. Frühgeburtslichkeit in verschiedenen Regionen der Welt. ....	12
Abbildung 3. Die gängigsten permanenten chirurgischen Ventrikeldrainagewege. ...	14
Abbildung 4. Zwei Ratten im Alter von 21 Tagen. ....	22
Abbildung 5. Zeitlicher Ablauf des Experiments. ....	28
Abbildung 6. Ansetzen des Bohrers an der Einstichstelle des Rattenschädels. ....	31
Abbildung 7. Neugeborene Ratte bei der Operation. ....	32
Abbildung 8. Mikroinfusionspumpe mit zwei eingespannten 1 ml Spritzen. ....	34
Abbildung 9. Gehirn eines Blut-Tieres mit Färbung von IBA1. ....	40
Abbildung 10. Platzierung der ROIs (Regions Of Interest) im Rattenhirn. ....	42
Abbildung 11. Die Gewichtsentwicklung der Ratten. ....	47
Abbildung 12. Relative Ventrikelfläche der drei Interventions-Gruppen. ....	49
Abbildung 13. IRF in Prozent der ROI-Fläche bei Färbung von GFAP. ....	51
Abbildung 14. Balkendiagramm der IRF bei Färbung von GFAP. ....	54
Abbildung 15. Gefrierschnitte von Tieren der Blut-Gruppe mit Färbung von IBA1. ...	57
Abbildung 16. Gefrierschnitte von Tieren der NaCl-Gruppe mit Färbung von IBA1. ...	58
Abbildung 17. Gefrierschnitte von Tieren der Sham-Gruppe mit Färbung von IBA1. ...	58
Abbildung 18. Korrelation von Ventrikelgröße und IRF von IBA1 in der Blut-Gruppe. ....	64
Abbildung 19. Korrelation von Ventrikelgröße und IRF von HMGB1 in der Blut-Gruppe. ....	66
Abbildung 20. Vergleich der IRF von HMGB1 zwischen Tieren mit und ohne Hydrozephalus. ....	83
Abbildung 21. Mikroskopisches Bild des Kortex eines Tieres der Blut-Gruppe mit Färbung von HMGB1 und ausgeprägtem Hydrozephalus. ....	85

Abbildung 22. Mikroskopisches Bild des gesamten Gehirnschnitts desselben Tieres der Blut-Gruppe aus Abbildung 21. ....85

Abbildung 23. Mikroskopisches Bild des Kortex eines Tieres der Blut-Gruppe mit Färbung von HMGB1 ohne Hydrozephalus.....86

Abbildung 24. Mikroskopisches Bild des gesamten Gehirnschnitts desselben Tieres der Blut-Gruppe aus Abbildung 23. ....86

## **2.2 Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1. Anzahl und Verteilung der Versuchstiere auf die Interventions- und Überlebenszeit-Gruppen .....46

Tabelle 2. Mittelwerte der IRF bei der Färbung von GFAP.....52

Tabelle 3. Mittelwerte der IRF bei der Färbung von IBA1 .....56

Tabelle 4. Mittelwerte der IRF bei der Färbung von TNF- $\alpha$  .....60

Tabelle 5. Mittelwerte der IRF bei der Färbung von HMGB1 .....62

### 3. Einführung

Laut WHO ist eine Frühgeburt die Geburt eines Kindes vor Vollendung der 37. Schwangerschaftswoche (SSW) (WHO 2018: 69). Frühgeborene Kinder und Neugeborene, welche verhältnismäßig klein für ihr Alter sind, haben eine deutlich höhere Sterberate als Termingeborene mit einem normalen Geburtsgewicht (Ray et al. 2017). Es besteht zudem ein erhöhtes Risiko für perinatale Komplikationen wie dem Atemnotsyndrom des Frühgeborenen (ANS), dem persistierenden Ductus arteriosus Botalli, der periventrikulären Leukomalazie sowie der intraventrikulären Hämorrhagie (IVH) (Radic et al. 2015). IVHs treten dabei fast ausschließlich bei vor der 30. SSW geborenen Kindern auf (Ray et al. 2017; Radic et al. 2015). 90 % der Blutungen ereignen sich dabei innerhalb der ersten 4 Lebenstage, alleine 50 % innerhalb der ersten 24 Stunden nach Geburt (Bassan 2009).

Mehrere Risikofaktoren zugleich begünstigen die Entstehung einer IVH bei Frühgeborenen. Aus einer erschwerten Atmung mit der noch unreifen Lunge resultieren hohe intrathorakale Drücke. Die daraus resultierende Hyperkapnie und Hypoxie nach der Geburt führen trotz eingeschränkter Autoregulation der unreifen arteriellen Gefäße zu einer Vasodilatation im Gehirn. Hinzu kommt eine initial erhöhte Fragilität der Blutgefäße der an den Seitenventrikel gelegenen germinalen Matrix (Robinson 2012). Eine schwere IVH, insbesondere Grad III und IV, kann zur Entstehung eines Posthämorrhagischen Hydrozephalus (PHH) führen (Radic et al. 2015). Als Hauptgründe für die Bildung des Hydrozephalus gelten eine Abflussbehinderung sowie eine Resorptionsstörung des Liquor cerebrospinalis. Die freigesetzten Blutbestandteile und der steigende intrazerebrale Druck resultieren in der Entwicklung einer Ischämie und Entzündungsreaktion mit reaktiver Gliose im Ventrikel und dem angrenzenden Gehirnparenchym (Schmitz et al. 2007; Deren et al. 2010). Diese Entzündungsreaktion selbst kann dann wiederum einen Grund für die weitere Verschlimmerung des PHH darstellen. Die derzeitige Behandlung des PHH basiert darauf, die Schäden am Gehirn durch mechanische Entlastung möglichst gering zu halten. Eine kausale Therapie existiert zum jetzigen Zeitpunkt nicht (Del Bigio and Di Curzio 2016). Die Erforschung der zellulären Inflammationsreaktion nach stattgehabter IVH stellt in diesem Zusammenhang einen wichtigen Teil der Arbeit zur Entwicklung neuer Behandlungsmethoden dar.

Ziel dieser Studie war es, den PHH infolge einer IVH in einem geeigneten Rattenmodell nachzubilden und die dadurch ausgelöste Inflammationsreaktion

anhand der Entzündungsmarker IBA1 (Ionisiertes Calcium-bindendes Adaptermolekül 1 (Mikro-glia)), GFAP (glial fibrillary acidic protein (aktivierte Astrozyten)), HMGB1 (High-mobility group box 1) und TNF- $\alpha$  (Tumor Nekrosefaktor- $\alpha$ ) immunhistochemisch zu untersuchen. Es sollte ein Zusammenhang zwischen der Stärke der Immunantwort und der Entwicklung eines PHH nach IVH aufgezeigt werden.

Folgende Hypothesen wurden in diesem Zusammenhang aufgestellt:

- (1) Eine intraventrikuläre Blutung innerhalb der ersten beiden postnatalen Tage löst die Entwicklung eines Hydrozephalus aus.
- (2) Eine intraventrikuläre Blutung innerhalb der ersten beiden postnatalen Tage führt zu einer langandauernden Entzündungsreaktion.
- (3) Die Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten und die damit verbundene Entzündungsreaktion, gemessen an den Markern IBA1, GFAP, HMGB1 und TNF- $\alpha$ , sind an der Entwicklung des Hydrozephalus maßgeblich beteiligt.

Zum besseren Verständnis der Thematik soll im Folgenden der aktuelle Stand der Wissenschaft zu Epidemiologie, Klinik und Pathophysiologie von IVH und PHH näher erläutert werden.

## 4. Stand der Wissenschaft

### 4.1 Definition und Einteilung von IVH und PHH

Die germinale Matrix ist eine Region am lateralen Rand der Seitenventrikel des Gehirns. Sie besteht aus neuronalen und glialen Vorläuferzellen und ist stark vaskularisiert. 90 % aller intraventrikulären Blutungen bei Frühgeborenen haben in diesem Bereich ihren Ursprung (Leech and Kohlen 1974). Intraventrikuläre Blutungen können bei Neugeborenen per Ultraschalluntersuchung erfasst und nach Papile in vier Schweregrade eingeteilt werden (Papile et al. 1978) (s. Abbildung 1).

"Grade I - subependymal hemorrhage", eine Einblutung in die subependymal gelegene germinale Matrix (Papile et al. 1978).

"Grade II - intraventricular hemorrhage without ventricular dilatation", eine Blutung mit Durchbruch des Ependyms und Einblutung in einen oder beide Seitenventrikel (Papile et al. 1978).

"Grade III - intraventricular hemorrhage with ventricular dilatation", eine Einblutung in die Seitenventrikel mit Dilatation (Papile et al. 1978).

"Grade IV - intraventricular hemorrhage with parenchymal hemorrhage", eine Einblutung in die Ventrikel und das angrenzende Gehirnparenchym (Papile et al. 1978).

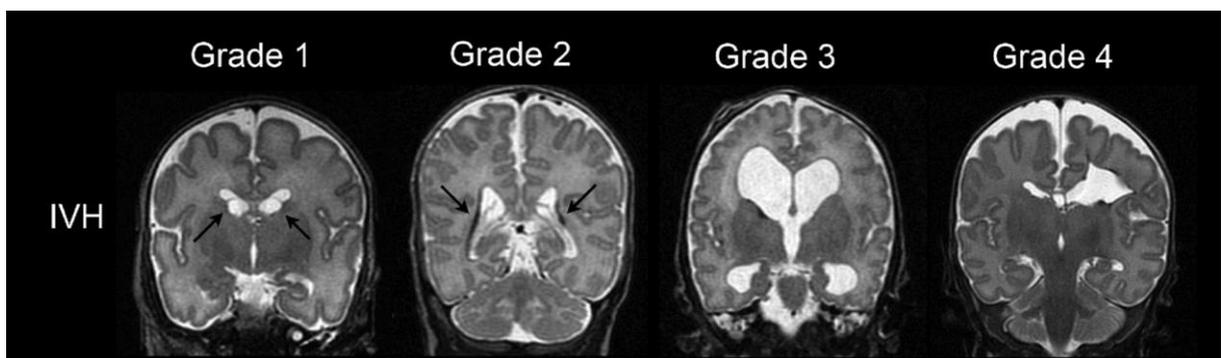


Abbildung 1. Einteilung der IVH in 4 Grade nach Papile (Papile et al. 1978). Die Blutung erscheint in der T2 gewichteten MRT-Aufnahme dunkel (Kidokoro et al. 2014).

Die Einteilung nach Papile stammt aus dem Jahr 1978. In vielen klinischen Studien und Tierversuchen findet sie sich immer noch. In modifizierter Version wird sie zum

Teil auch in der Klinik angewandt. Ein allgemein etabliertes Grading-System existiert jedoch nicht (Strahle et al. 2012).

Eine IVH kann Auslöser eines PHH sein. Dabei handelt es sich um eine pathologische Erweiterung der mit Liquor gefüllten Ventrikel des Gehirns. Ein PHH entwickelt sich zumeist in den ersten Wochen nach einer schwerwiegenden IVH (Grad III oder IV) (Radic et al. 2015).

## **4.2 Epidemiologie**

Frühgeburten sind häufig. Eine epidemiologische Studie aus dem Jahr 2010 ermittelte eine jährliche Anzahl von rund 15 Millionen Frühgeburten in den 184 eingeschlossenen Ländern (s. Abbildung 2). Das entspricht weltweit einer Häufigkeit der Frühgeburten an allen Geburten von mehr als 10 %. Davon wiederum wurden etwa 1,6 Millionen Kinder vor der 32. Schwangerschaftswoche geboren (Blencowe et al. 2012). Je früher die Geburt, desto stärker sind die betroffenen Kinder gefährdet, Komplikationen wie eine IVH zu erleiden. IVHs treten zumeist bei vor der 30. SSW geborenen Säuglingen auf, zu einem späteren Zeitpunkt sind sie selten. (Ray et al. 2017; Radic et al. 2015).

Es wird davon ausgegangen, dass der Anteil von Frühgeburten weltweit stabil bleibt (Blencowe et al. 2012). Eine exakte Einschätzung des Trends gestaltet sich jedoch schwierig, da in vielen Ländern Frühgeburten kaum dokumentiert werden. Zugleich steigt insbesondere in reichen Nationen aufgrund der guten medizinischen Versorgung die Zahl der Kinder, welche trotz Frühgeburtlichkeit überleben (Vogel et al. 2018).

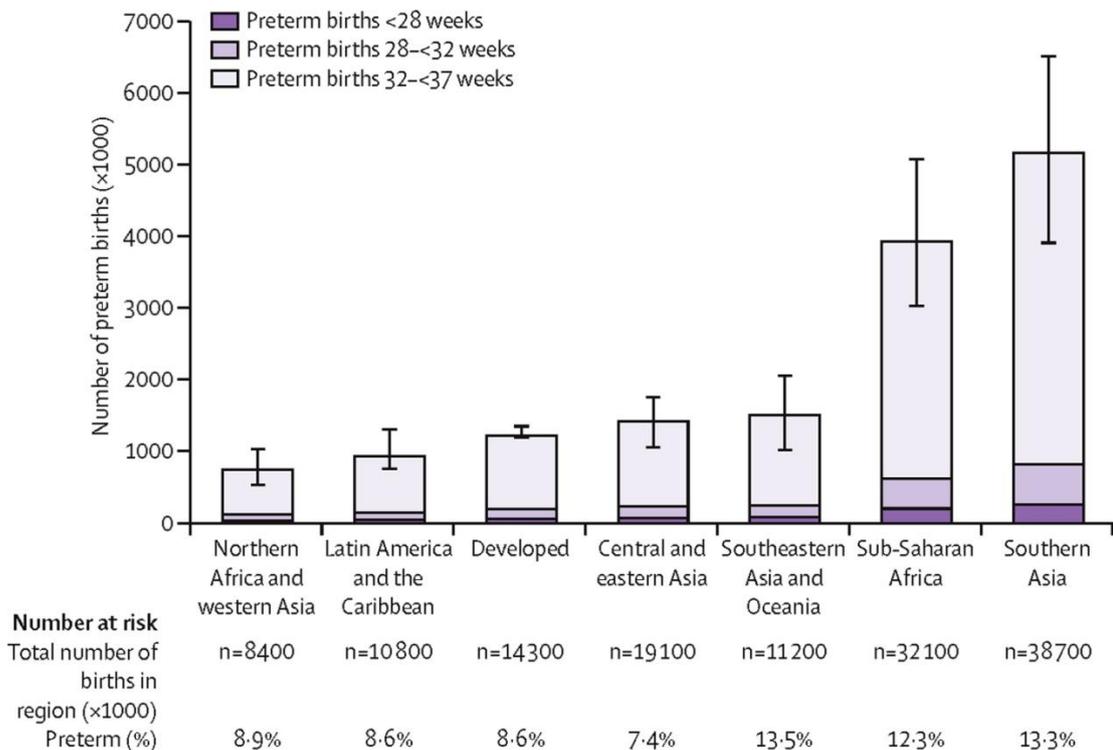


Abbildung 2. Hochrechnung der Frühgeburten in verschiedenen Regionen der Welt im Jahr 2010 (Blencowe et al. 2012).

Bei Kindern unter 5 Jahren ist Frühgeburtslichkeit weltweit nach Pneumonie die zweithäufigste Todesursache, in Europa sogar die Häufigste (Liu et al. 2012). Bei einer kanadischen Studie mit 1200 sehr früh geborenen Kindern (zwischen der 20. und 30. SSW), entwickelten 370 (31 %) eine IVH. 133 (36 %) davon eine IVH Grad III oder IV. Insgesamt waren fast 5 % (58 Kinder) aller Frühgeborenen und somit 44 % mit IVH Grad II - IV von einem symptomatischen Posthämorrhagischen Hydrozephalus (PHH) betroffen (Radic et al. 2015).

### 4.3 Klinik und Diagnostik

Intraventrikuläre Blutungen bei Frühgeborenen treten meist innerhalb der ersten Lebenswoche auf. Eine IVH mit anschließendem PHH steigert dabei die Sterblichkeit, ebenso wie die Inzidenz schwerwiegender neurologischer Probleme wie zerebraler Paresen, Gehörschädigungen, Epilepsie und geistiger Beeinträchtigungen (Bolisetty et al. 2014). Bei weniger stark ausgeprägten Blutungen (IVH Grad I-II) kann das klinische Bild stark variieren. Die Beeinträchtigung der Betroffenen ist jedoch meist gering (Bolisetty et al. 2014; Radic et al. 2015). Bei einer IVH vom Grad III und IV zeigt sich eine deutliche höhere Morbidität und Mortalität. Je

schwerer die IVH, desto höher ist das Risiko für bleibende Behinderungen und desto mehr Kinder sterben im weiteren Verlauf (Radic et al. 2015; Bolisetty et al. 2014). Zur Identifikation einer posthämorrhagischen Ventrikeldilatation (PHVD) nach IVH dienen wiederholte Ultraschall-Untersuchungen der Ventrikel gefährdeter Frühgeborener innerhalb der ersten Tage bis Wochen nach Geburt (Bächli H. 2018). Die Entscheidung, ob eine chirurgische Intervention notwendig wird, weil die PHVD in einen symptomatischen Hydrozephalus übergegangen ist, wird auf Grundlage des klinischen Verlaufes, körperlicher Symptome und der Bildgebung getroffen. Klinische Anzeichen dafür sind Apnoe, Erbrechen, Hypo- oder Hypertonie und Bewusstseins Einschränkungen. Diese Anzeichen dienen auch zur Abgrenzung des PHH von einem Hydrozephalus ex vacuo (Robinson 2012).

#### **4.4 Aktuelle Behandlung**

Derzeit existiert keine einheitliche Behandlungsstrategie des PHH. Alle Behandlungsoptionen haben ihre Nachteile (Horinek et al. 2003).

In den meisten Fällen beruht die Behandlung des Hydrozephalus auf einer mechanischen Entlastung. Die Erforschung nicht-chirurgischer Verfahren zur Senkung des Ventrikeldrucks konzentriert sich hingegen vor allem auf drei mögliche Mechanismen: den Schutz des Gehirngewebes vor dem bereits bestehenden Überdruck, die Reduktion der Liquorproduktion sowie die Eindämmung von Immunantwort und Fibrose (Del Bigio and Di Curzio 2016).

Um bei PHVD nach IVH die Entstehung eines Hydrozephalus zu verhindern, können angestauter Liquor und Blut mittels Lumbalpunktion oder ventrikulärer Punktion abgeführt werden. Diese Verfahren können einerseits der Überbrückung dienen bis ein permanenter Shunt zur Ableitung des Liquors angelegt werden kann, andererseits womöglich die chirurgische Shunteinlage sogar verhindern.

Derartige Punktionen stellen in der Klinik die häufigste primäre Behandlungsweise einer PHVD oder eines PHH dar (Horinek et al. 2003). Dabei ist ihr Nutzen jedoch nicht eindeutig belegt. Eine Metaanalyse vierer klinischer Studien aus den Jahren 1980 bis 1990 zeigte keine Vorteile für gefährdete Neugeborene ohne PHH durch wiederholte Lumbalpunktionen oder ventrikuläre Punktionen (Whitelaw and Lee-Kelland 2017).

Hinzu kommen das Risiko einer Infektion und die Gefahr einer bleibenden Schädigung des Gehirnparenchyms durch wiederholte Ventrikelpunktionen (Whitelaw and Lee-Kelland 2017).

Eine weitere Behandlungsmöglichkeit ist die Anlage einer externen Ventrikeldrainage (EVD). Dabei wird ein Katheter im dilatierten Vorderhorn eines Seitenventrikels platziert und mit einem externen Drainagesystem verbunden. Über dieses kann daraufhin kontinuierlich Liquor abgeführt werden. Auch bei diesem Verfahren besteht ein erhöhtes Infektionsrisiko. Hinzu kommt die Gefahr einer Überdrainage. Vorteil dieses Verfahrens ist andererseits, dass über den Katheter auch Medikamente appliziert werden können (Horinek et al. 2003).

Als permanente chirurgische Behandlung kann der Liquor durch einen Shunt in eine andere Körperhöhle abgeleitet werden. Mittels ventrikulo-peritonealem Shunt (VPS) erfolgt eine Ableitung in den Bauchraum, durch einen ventrikulo-atrialen Shunt (VAS) in den rechten Vorhof (s. Abbildung 3). Die Shunt-Anlage stellt die gängigste Langzeitbehandlung des PHH dar (Horinek et al. 2003).

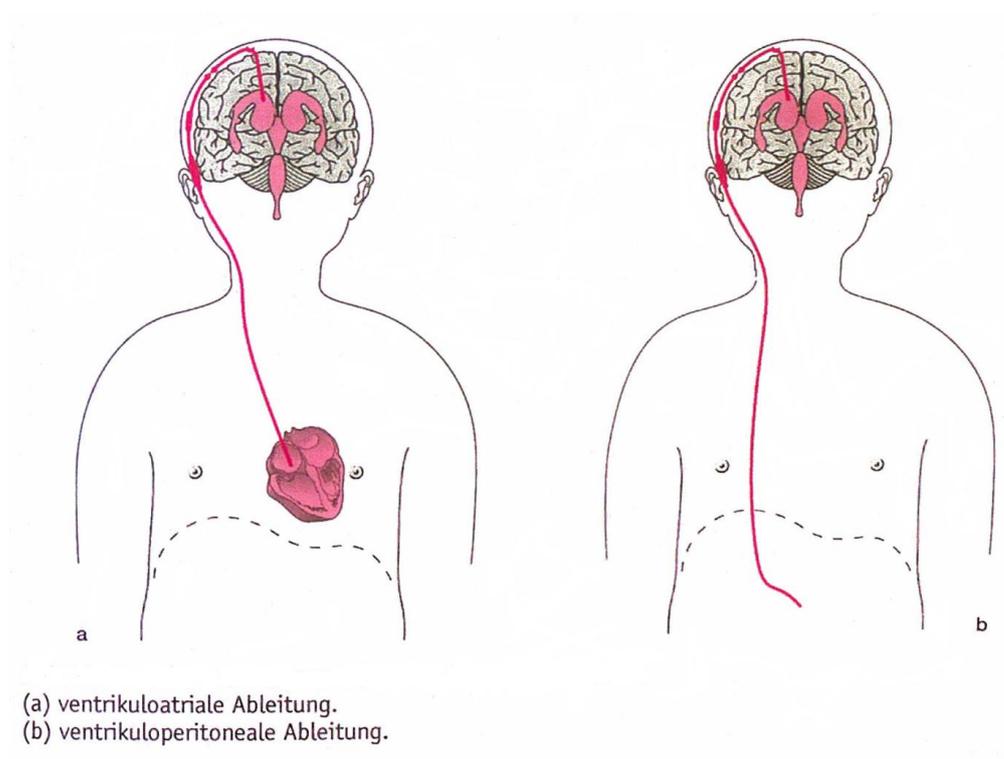


Abbildung 3. Die beiden gängigsten permanenten chirurgischen Drainagewege in den rechten Vorhof und das Peritoneum (Schirmer 1998).

Nach der Shuntanlage können Probleme wie Infektionen, Überdrainage und Shuntverschlüsse auftreten, was eine erneute Operation nach sich ziehen kann (Whitelaw and Lee-Kelland 2017). Aufgrund dieser offensichtlichen Nachteile der mechanischen Ableitungsverfahren scheint eine pharmakologische Herangehensweise sehr attraktiv.

Ein Therapieansatz ist beispielsweise die Behandlung mit Acetazolamid, welches schon zur Behandlung der idiopathischen intrakraniellen Hypertension eingesetzt wird (Whitelaw and Aquilina 2012). Eine randomisierte kontrollierte Studie mit 177 Neugeborenen zur Wirksamkeit von Furosemid und Acetazolamid bei PHH zeigte jedoch keine Verminderung der Rate an Shunt-bedürftigen PHHs und ergab ein schlechteres neurologisches Ergebnis in der Interventionsgruppe (Kennedy et al. 2001).

Eine aktuelle Studie zeigte hingegen, dass eine Therapie mit den Zytokinen Erythropoetin (EPO) und Melatonin (MLT) in einem Rattenmodell mit PHH nach ventrikulärer Injektion mit lysierten roten Blutzellen und induzierter Chorioamnionitis die Entstehung einer Makrozephalie verhindern konnte (Robinson et al. 2018). Dabei zeigte sich auch ein besseres Ergebnis behandelter Tiere beim "cliff aversion-Test". Die Ergebnisse der Therapie werden auf die antiinflammatorische und antioxidative Wirkung der Zytokine zurückgeführt. Dies könnte zumindest für eine Untergruppe PHH-gefährdeter Neugeborener zu einer konservativen Therapie führen (Robinson et al. 2018).

Durch den Einsatz des entzündungshemmenden Medikaments Minocyclin konnte in einem Maus-Modell mit intrakranieller Hämorrhagie die überdies Aktivität von Mikroglia gesenkt und die Zerstörung des Gehirngewebes verringert werden (Xue et al. 2010). Das semisynthetische Tetracyclin Minocyclin wirkt dabei antiinflammatorisch, antioxidativ und antiapoptotisch und wird derzeit auch als mögliche Behandlung bei Schlaganfall, Rückenmarksverletzungen und neurodegenerativen Erkrankungen untersucht (Xue et al. 2010).

#### **4.5 Pathophysiologie des PHH nach IVH**

Die Ursachen des PHH und die damit einhergehenden pathologischen Veränderungen auf Zellebene sind vielschichtig.

Zwischen der 24. und der 32. Schwangerschaftswoche proliferieren die Zellen der germinalen Matrix am Rande der Seitenventrikel des Gehirns stark. Eine gute

Durchblutung ist notwendig, die Blutgefäße sind zu diesem Zeitpunkt jedoch weder vollständig ausgereift noch durch Adventitia und Astrozytenausläufer verstärkt (Cherian et al. 2004). Zudem ist die intrazerebrale Autoregulation des Blutdrucks durch die zerebralen Blutgefäße noch nicht voll funktionsfähig (Volpe 2001).

Bei etwa der Hälfte der vor der 32. Schwangerschaftswoche geborenen Kinder tritt ein durch Surfactantmangel bedingtes Atemnotsyndrom auf. Es kommt dabei zu starken intrathorakalen Druckschwankungen und Hypoxien. In Kombination mit den unreifen subependymalen Blutgefäßen begünstigt dies die Entstehung einer Blutung im Bereich der germinalen Matrix mit anschließender Einblutung in die Ventrikel (Cherian et al. 2004).

Die darauffolgende Bildung eines Hydrozephalus wird hauptsächlich auf eine Abfluss- und Resorptionsstörung des Liquor cerebrospinalis zurückgeführt. Eine Abflussstörung des Liquors durch subependymale Gliose und die Bildung von Thromben im Aquädukt oder in den Foramina des 4. Ventrikels könnte dabei zur Entstehung eines obstruktiven Hydrozephalus führen (Strahle et al. 2012).

Im Gegensatz zum obstruktiven Hydrozephalus kommt es beim kommunizierenden Hydrozephalus zu einer Erweiterung aller intrakraniellen Liquorräume. Als Ursache für dessen Entstehung werden wiederum eine Resorptionsstörung des Liquors durch Bildung von Mikrothromben in den Kanälen der Arachnoidalzotten sowie eine Entzündung mit anschließender Fibrosierung der Zotten vermutet (Cherian et al. 2004; Strahle et al. 2012).

Die Arachnoidalzotten sind bei unreifen Neugeborenen jedoch noch nicht vollständig ausgebildet und es besteht Grund zur Annahme, dass der Liquor nicht nur darüber resorbiert wird. Vielmehr wird angenommen, dass der Liquor auch in subependymale Venen, über die Leptomenix in kortikale Venen oder durch das Perineurium der Gehirnnerven in die Lymphbahnen abfließen kann (Strahle et al. 2012). Weitere Mechanismen, die womöglich zu einer Resorptionsstörung des Liquors führen, sind eine meningeale Fibrose und eine alterierte Expression von Aquaporinen (Strahle et al. 2012; Mao et al. 2006; Guo et al. 2018).

Bei Frühgeborenen mit PHH spielt das Alter zum Zeitpunkt der Schädigung eine ebenso wichtige Rolle wie die Ausdehnung und Dauer der Ventrikelerweiterung. Geschädigt werden insbesondere Mikrogefäße und Axone der periventrikulären weißen Substanz (McAllister 2012). Da bei Neugeborenen der Schädel noch weich

und dehnbar ist, kann sich der Kopf bei PHVD ausdehnen und den Anstieg des intrakraniellen Drucks temporär kompensieren.

Gleichzeitig wird jedoch auch das Gehirngewebe stärker gedehnt. Je ausgeprägter die Ventrikelerweiterung ist und je länger sie anhält, desto schwerer sind in der Regel die Folgen. In den ersten Stunden bis Tagen nach Einsetzen der Ventrikeldilatation kommt es dadurch gleichzeitig zur Quetschung und Dehnung des periventrikulären Gewebes. Dies resultiert wiederum in einer Ischämie, Hypoxie und Liquorabflussbehinderung (McAllister 2012). Die Ischämie wird dadurch verschlimmert, dass die langen penetrierenden Arterien der periventrikulären weißen Substanz ein Endgebiet der arteriellen Versorgung darstellen. Fällt der zerebrale Perfusionsdruck, ist dieses Gebiet in besonderer Weise betroffen. Zusätzlich verfügen unreife Frühgeborene nur über eine sehr begrenzte Autoregulation des Blutflusses der zerebralen Arterien (Volpe 2001). Auf Zellebene kommt es dabei zuerst zur Demyelinisierung und Schädigung von Axonen mit Stagnation des axonalen Transports in der periventrikulären weißen Substanz. Darauf folgen die Proliferation von Gliazellen, Ödembildung, Neuroinflammation und Zelltod (McAllister 2012). Die graduelle Schädigung der periventrikulären weißen Substanz kann trotz chirurgischer Interventionen zu zerebralen Paresen, Gehörschäden und geistigen Beeinträchtigungen führen (Bolisetty et al. 2014).

#### **4.6 Entzündung und PHH**

Neuroinflammation spielt eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie des Hydrozephalus (Deren et al. 2010). Ein Zusammenhang zwischen der Entstehung eines Hydrozephalus und dem Ablauf von Entzündungsreaktionen lässt sich in der Zytologie und der Genexpression nachweisen (McAllister 2012; Ahn et al. 2013; Miller and McAllister 2007; Deren et al. 2010).

Das zentrale Nervensystem (ZNS) genießt einen immunologischen Sonderstatus, da die Blut-Hirn-Schranke den Übertritt von Lymphozyten ins Gehirngewebe beschränkt. Unter pathologischen Bedingungen kann diese Schranke jedoch durchlässiger werden und Lymphozyten können einwandern (Dumont et al. 2003). Primär sind jedoch vor allem die Gliazellen des Gehirns an der Entzündungsreaktion beteiligt.

Die erste und wichtigste Instanz der aktiven Immunabwehr im Gehirn sind die Mikroglia als lokale Makrophagen des ZNS. Bei einer Schädigung des Gehirns

haben reaktive Mikroglia die Möglichkeit zu proliferieren, weitere Immunzellen zu rekrutieren und zytotoxische oder entzündungsfördernde Zytokine zu sezernieren.

Mikroglia kommen in unterschiedlichen Formen vor. Eine neue Klassifikation der Mikroglia führt 9 Unterarten mit unterschiedlichem Verhalten auf (Hammond et al. 2019). Hammond et al. bestimmten dazu das RNA-Expressionsmuster von über 76.000 Mikrogliazellen aus Maus-Embryonen, jungen Mäusen, alten Mäusen sowie Mäusen mit Gehirnschaden nach einer Injektion mit Lysolecithin (Hammond et al. 2019).

Als ramifizierte Mikroglia mit zahlreichen Ausläufern, die das Gehirnparenchym durchziehen, können sie das umliegende Milieu überwachen (Wolf et al. 2017). Stimuliert durch Muster-Erkennungs-Rezeptoren (engl. pattern-recognition-receptors), Komplement- und Zytokin-Rezeptoren, können sie in die Form reaktiver Mikroglia wechseln (Aloisi 2001). Sie verändern ihre Zellform, indem sie die langen dünnen Ausläufer zu kurzen dicken Fortsätzen zurückbilden. Sie exprimieren in der Folge vermehrt MHCII-Proteine und sezernieren entzündungsfördernde Zytokine (Wolf et al. 2017; Miller and McAllister 2007). Durch Ausschüttung von Superoxid-Ionen und TNF- $\alpha$  können sie die Apoptose von Neuronen einleiten (Salter and Stevens 2017).

Reaktive Mikroglia können wiederum in die Ausprägungsform der amöboiden Mikroglia wechseln, welche sich frei im Gehirnparenchym bewegen und vor allem phagozytotisch aktiv sind (Xue et al. 2010).

Mikroglia werden bei jeder Art der Schädigung des Gehirns aktiviert und können je nach Typ und Zytokin-Muster sowohl eine proinflammatorische, als auch entzündungshemmende Rolle einnehmen (Wolf et al. 2017; Huang et al. 2017).

Die Aktivierung von Mikroglia kann durch immunhistochemische Bestimmung von Zell-Proteinen dargestellt werden. Als für die Detektion von Mikroglia geeignete Immunmarker gelten im Speziellen die Proteine F4/80, CD68 und IBA1 (Lan et al. 2017). Ionisiertes Calcium-bindendes Adapter Molekül 1 (IBA1) ist ein zytoplasmatisches Protein, welches in Makrophagen und Mikroglia vorkommt. Reaktive Mikroglia zeigen eine gesteigerte Expression von IBA1 (Lan et al. 2017). IBA1 wurde deshalb in unserer Studie zur Detektion reaktiver Mikrogliazellen im Gehirn nach IVH verwendet.

Astrozyten stellen die Mehrheit der Gliazellen des ZNS dar und erfüllen zahlreiche Aufgaben. Sie bilden einen Teil der Blut-Hirn-Schranke, regulieren

Elektrolytkonzentrationen des Gehirns, versorgen Neuronen mit Nährstoffen und spielen eine entscheidende Rolle im Fall einer Schädigung des Gehirns. Als reaktive Astrozyten reagieren sie auf pathologische Vorgänge im Gehirn wie Ischämie, Trauma oder Entzündung.

Die Antwort der Astrozyten, die als "reaktive Gliose" bezeichnet wird, kann je nach Art der Schädigung und Verhalten der Astrozyten unterschiedliche Auswirkungen haben (Pekny and Nilsson 2005; Little and O'Callagha 2001). Astrozyten haben gewöhnlich einen kleinen Zellkörper mit einem weiten Netz feiner Ausläufer. Reaktive Astrozyten dagegen besitzen einen deutlich größeren Zellkörper mit dicken Ausläufern und exprimieren vermehrt saures Gliafaserprotein (engl. glial fibrillary acidic protein, GFAP), ein Intermediärfilament, welches immunhistochemisch angefärbt werden kann (Deren et al. 2010). Wegen der starken Expression von GFAP in reaktiven Astrozyten, wurde es auch in unserer Studie als Marker reaktiver Astrozyten verwendet. Auch unter den reaktiven Astrozyten scheint es Untergruppen zu geben. Bei einer Studie mit Mäusen, bei welchen zum einen eine Ischämie, zum anderen eine Entzündung im ZNS initiiert wurden, zeigten sich in den beiden Gruppen reaktive Astrozyten mit deutlich unterschiedlicher Genexpression und unterschiedlichem Phänotyp (Zamanian et al. 2012).

Dies legt nahe, dass ähnlich wie bei den Mikroglia unterschiedliche Formen aktiver Astrozyten existieren, die unterschiedlichen Funktionen haben. Dies könnte die Frage klären, warum reaktive Astrozyten bei neuronalen Läsionen sowohl protektiv, als auch destruktiv wirken können. So können Astrozyten womöglich einerseits neurotrophe Botenstoffe und Zytokine ausschütten und dadurch neuronale Regeneration fördern, in einer anderen Funktionsform jedoch sogar deren Zerstörung bewirken (Zamanian et al. 2012). Mikroglia sind in der Lage durch die Ausschüttung von Zytokinen wie TNF- $\alpha$  bei einer Schädigung des ZNS diese destruktive Form der reaktiven Astrozyten zu initiieren. Die Astrozyten verlieren dadurch ihre Fähigkeit, Neuronen zu Wachstum und Synapsenbildung zu stimulieren und schütten stattdessen Toxine aus, welche zum Untergang von Neuronen und Oligodendrozyten führen (Liddel et al. 2017).

Um deren Beteiligung an der Entzündungsreaktion im Zuge des Hydrozephalus zu untersuchen, wurden in unserer Studie zudem HMGB1 und das TNF- $\alpha$  als Immunmarker bestimmt.

HMGB1 ist als DNA-Bindungsprotein in allen kernhaltigen Zellen vorhanden (Watanabe et al. 2012). Es stabilisiert die Nukleosomen und reguliert die Expression von Genen (Lotze and Tracey 2005; Kim et al. 2006). Zudem ist HMGB1 ein wichtiger proinflammatorischer Botenstoff, welcher bei Infektionen und Verletzungen in den Extrazellulärraum freigesetzt wird und als Zytokin dient. HMGB1 wird von aktivierten Makrophagen, dendritischen Zellen und natürlichen Killerzellen ausgeschüttet (Wang et al. 2017; Lotze and Tracey 2005).

Extrazelluläres HMGB1 aktiviert wiederum Entzündungsreaktionen in Immun- und Endothelzellen (Lotze and Tracey 2005). Die Aktivierung erfolgt dabei über den receptor for advanced glycation end-products (sog. RAGEs) sowie die Toll-like-receptors 2 and 4 (TLR2 und TLR4) (Lotze and Tracey 2005).

Die Signalübertragung durch RAGEs aktiviert den Nukleären Faktor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) - Signalweg sowie ERKs und p38, welche die Produktion weiterer proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-6 und IFN- $\gamma$  anstoßen (Lotze and Tracey 2005).

Die Aktivierung von TLR2 und TLR4 führt ebenfalls zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B, jedoch über das Myeloid differentiation primary response protein 88 (Myd88) (Lotze and Tracey 2005).

Der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ist nach seiner Fähigkeit benannt, in Tumoren Nekrosen auszulösen. Eine viel entscheidendere Rolle spielt das Zytokin jedoch in der Vermittlung der Entzündungsreaktion (Bradley 2008).

TNF- $\alpha$  ist ein sogenanntes Akut-Phase-Protein. Es kann Makrophagen aktivieren und Mikroglia zur Phagozytose und zur Bildung weiterer proinflammatorischer Zytokine anregen. Es wird überwiegend an der Zellmembran von Makrophagen und T-Lymphozyten produziert und freigesetzt (Aloisi 2001).

Seine Wirkung entfaltet es über die beiden Rezeptoren Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1 und 2 (TNFR1 und TNFR2). Dabei wird die proinflammatorische Wirkung des TNF- $\alpha$  überwiegend über TNFR1 vermittelt, welches wiederum den bereits erwähnten NF- $\kappa$ B-Signalweg aktiviert. Über den TNFR2 Rezeptor vermittelt TNF- $\alpha$  Gewebeheilung sowie Angiogenese (Bradley 2008).

#### **4.7 Tiermodelle**

Es gibt eine Reihe von Tiermodellen zur Erforschung der neonatalen Fen-Matrix-Hämorrhagie (GMH). Diese beinhalten Ratten-, Maus-, Hasen-, Schweine-, Schaf- und Primatenmodelle (Balasubramaniam and Del Bigio 2006).

Die Haltung von Ratten im Labor ist dabei vergleichsweise unkompliziert. Zudem ist der Entwicklungsstand des Rattengehirns zum Zeitpunkt der Geburt einschließlich Myelinisierung und Neurogenese dem eines menschlichen Frühgeborenen der 24. - 26. SSW sehr ähnlich (Balasubramaniam and Del Bigio 2006; Semple et al. 2013). Der Unterschied liegt in der Geschwindigkeit der Gehirnentwicklung. Allerdings laufen die wichtigsten Entwicklungsschritte bei Ratte und Mensch in einer vergleichbaren Reihenfolge und Form ab. Das Gehirn einer Ratte im Alter von 10 Tagen kann dabei mit dem eines menschlichen Neugeborenen bei Termingeburt verglichen werden (Semple et al. 2013).

Bisher wurden nur wenige Rattenmodelle zur Erforschung des PHH entwickelt. Ein von Cherian S. et al. verwendetes Modell verursachte einen PHH durch Injektion von 80µl Zitratblut oder künstlichem Liquor in einen oder beide Seitenventrikel von 7 Tage alten Wistar Ratten (Cherian et al. 2003). Nach Angabe der Autoren imitiert das Modell die "meisten pathologischen Merkmale des posthämorrhagischen Hydrozephalus im menschlichen Neugeborenen" (Cherian et al. 2003). 65 % der Ratten mit Blut-Injektion und 50 % derer mit Injektion von künstlichem Liquor entwickelten eine PHVD (Cherian et al. 2003) (s. Abbildung 4). 7 Tage alte Ratten entsprechen vom Stand der Gehirnentwicklung einem menschlichen Fetus der 32. SSW (Balasubramaniam and Del Bigio 2006).



Abbildung 4. Zwei Ratten im Alter von 21 Tagen. Links eine Ratte mit Hydrozephalus 14 Tage nach bilateraler Injektion von Blut, im Vergleich zu einer normal entwickelten Ratte rechts (Cherian et al. 2003).

Ahn et al. führten in ihrer Studie eine Injektion von jeweils 100 µl Vollblut einer Donorratte in beide Seitenventrikel von Sprague Dawley Rattenjungen am 4. postnatalen Tag durch. Die Gehirnentnahme wurde am 32. Tag nach Geburt durchgeführt. Ziel der Studie war es, den Effekt einer Behandlung mit mesenchymalen Stammzellen nach einer IVH zu untersuchen. Sie erreichten damit bei Rattenjungen mit Blutinjektion eine Hydrozephalus-Rate von 85% (Ahn et al. 2013).

Andere Modelle konzentrieren sich auf die Folgen des Hydrozephalus ohne eine IVH zu imitieren. Der Stamm der Hydrocephalic-Texas-Ratten (H-Tx-Ratten) zeichnet sich durch einen erblichen Hydrozephalus aus, welcher zur Erforschung des Hydrozephalus bei Neugeborenen verwendet wird (Miller and McAllister 2007). Dabei ist die Art der Vererbung komplex und nicht vollständig geklärt (Jones et al. 2004; Miller and McAllister 2007). Der Hydrozephalus entsteht in ihrem Fall 4 Tage vor bis 5 Tage nach der Geburt durch Verschluss des zerebralen Aquädukts. 33 % der H-Tx-Ratten entwickeln einen Hydrozephalus und sterben 4 - 6 Wochen nach der Geburt an den Folgen. H-Tx-Ratten wurden in diesem Zusammenhang bereits auf

die Reaktion von Gliazellen nach einer Shunt-Behandlung untersucht (Miller and McAllister 2007).

Bei einem weiteren Modell zur Erforschung der Gliazell-Antwort auf einen Hydrozephalus wurde einen Tag alten Sprague-Dawley-Ratten Kaolin, ein feines Gesteinspulver, in die Zisterna Magna injiziert. Von den 70 behandelten Tieren entwickelten 36 einen PHH (Khan et al. 2006).

Alle Tiermodelle zur Nachbildung einer intraventrikulären Blutung und des daraus resultierenden Hydrozephalus haben dabei ihre Limitationen (Balasubramaniam and Del Bigio 2006). Je näher das Modell jedoch an der Realität liegt, desto besser lassen sich die Ergebnisse auf den Menschen übertragen. Da die meisten IVHs bei Frühgeborenen vor der 30. SSW auftreten, sollte analog dazu auch die Blutinjektion im Tiermodell zu einem frühen Zeitpunkt stattfinden. Durch die Injektion von Kaolin konnte bei Ratten zwar zuverlässig ein Hydrozephalus erzeugt werden, allerdings könnte das körperfremde Material unvorhergesehene und unphysiologische Wirkungen ausgelöst haben. Die Verwendung von Blut liegt deutlich näher an der Realität und wurde daher in der vorliegenden Studie zur Injektion verwendet.

## 5. Studienaufbau und Ziele

Bisher existiert kein klinisch relevantes Modell zur Erforschung des PHH nach IVH in der Neonatalperiode. Ziel dieser Studie war daher die Entwicklung eines solchen Modells. Durch die Injektion von Blut in die Seitenventrikel neugeborener Ratten 24 bis 48 Stunden nach deren Geburt sollten eine IVH simuliert und im Verlauf ein post-hämorrhagischer Hydrozephalus erzeugt werden. Anschließend sollte zudem ein Zusammenhang zwischen der Stärke der Immunantwort und der Entwicklung eines PHH nach IVH aufgezeigt werden.

Als Interventionsgruppe diente in unserer Studie die Blut-Gruppe. Die Tiere dieser Gruppe erhielten eine Injektion eines vorab festgelegten Volumens Vollblut eines erwachsenen Donortieres, um realistisch eine intraventrikuläre Blutung nachzuahmen. Um festzustellen, ob die Entstehung und das Ausmaß eines PHH wie angenommen aus einer IVH und der daraufhin ablaufenden unterschiedlich starken Entzündungsreaktion resultierte, wurden parallel zur Interventionsgruppe (Blut-Gruppe) zwei Kontrollgruppen (NaCl-Gruppe und Sham-Gruppe) untersucht.

Versuchstiere der NaCl-Gruppe erhielten anstelle einer Injektion von Vollblut eine Injektion von Natriumchlorid(NaCl)-Lösung. Anhand des Vergleichs der Interventionsgruppe mit der ersten Kontrollgruppe wollten wir feststellen, ob durch Injektion desselben Volumens einer Flüssigkeit ohne Blut-Bestandteile in gleichem Maße eine Entzündungsreaktion sowie ein PHH ausgelöst werden können.

Die zweite Kontrollgruppe war die sogenannte Sham-Gruppe. Tiere dieser Gruppe erhielten lediglich eine Scheinoperation in Form eines Hautschnittes unter Narkose. Der Vergleich mit der zweiten Kontrollgruppe sollte uns zum einen ermöglichen, den Effekt der Narkose als Störfaktor auszuschließen, zum anderen dienten die Sham-Tiere als gesunde Vergleichsgruppe ohne IVH und Ventrikeldehnung, welche äußerlich nicht von Tieren der beiden ersten Gruppen zu unterscheiden waren.

Als Endpunkte wurden jeweils die Ventrikelgröße als Maß für einen Hydrozephalus sowie die immunreaktive Fläche (IRF) der Entzündungsmarker IBA1, GFAP, HMGB1 und TNF- $\alpha$  als Maß für die Inflammationsreaktion und Expression proinflammatorischer Zytokine erfasst.

Durch die Entnahme der Gehirne zu vier verschiedenen Zeitpunkten sollten der Ablauf der Entzündungsreaktion und die Entstehung des Hydrozephalus im längeren

zeitlichen Verlauf abgebildet werden. Die Gehirnentnahmen erfolgten dabei am Tag 1, 3, 7 und 21 nach der induzierten IVH.

Folgende Hypothesen sollten im Rahmen der Studie getestet werden:

Hypothese 1: Eine intraventrikuläre Blutung innerhalb der ersten beiden postnatalen Tage löst die Entwicklung eines Hydrozephalus aus.

Hypothese 2: Eine intraventrikuläre Blutung innerhalb der ersten beiden postnatalen Tage führt zu einer langanhaltenden Entzündungsreaktion.

Hypothese 3: Die Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten und die damit verbundene Entzündungsreaktion, gemessen an den Markern IBA1, GFAP, TNF- $\alpha$  und HMGB1, sind an der Entwicklung des PHH maßgeblich beteiligt.

Ziel war es, anhand der aus dieser Studie gewonnenen Erkenntnisse ein besseres Verständnis der Erkrankung und weiterer möglicher Therapiemaßnahmen zu erreichen.

## 6. Material und Methoden

Ziel unserer Arbeitsgruppe bestehend aus , , und war die Einführung eines klinisch relevanten PHH-Modells. Die Operationen an den Versuchstieren sowie die Fixierung und histologische Aufarbeitung wurden dabei gemeinsam durchgeführt. Aus diesem Grund werden in den Arbeiten der beiden anderen Doktoranden Tim Külzer und Corinna Leistner Material und Methoden in ähnlicher Weise beschrieben (Leistner 2020; Külzer 2020).

In dieser Arbeit wird das Augenmerk speziell auf die Entzündungsreaktion in Folge einer IVH gerichtet und mithilfe immunhistochemischer Färbungen genauer untersucht.

### 6.1 Versuchstiere

<b>Material und Tiere</b>	
Muttertiere, Donortiere, Jungtiere	Sprague Dawley Ratten; Charles River Laboratories, Sulzfeld
Isofluran	Forene®; Abott, Wiesbaden
Tierfutter	Altromin Standard Diät; Altromin Gesellschaft für Tierernährung mbH, Lage

Der Tierversuch wurde nach Genehmigung durch das Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz und unter Einhaltung des Tierschutzgesetzes und der Tierschutz-Versuchstierverordnung an der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz durchgeführt.

Es wurden neun trächtige Sprague Dawley Mutterratten bestellt und bis zum Geburtstermin in Einzelkäfigen mit Nistmaterial und Versteckmöglichkeiten (Plastikröhren) gehalten. Die Ratten wurden in einem Licht-Dunkel-Umfeld bei einem 12-Stunden Hell-, 12-Stunden Dunkel-Rhythmus gehalten und erhielten freien Zugang zu Wasser und Futter. Die Käfige befanden sich in einem Tierstall mit einer konstanten Temperatur von 22 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 50 %. Sie wurden mindestens einmal pro Woche gereinigt. Täglich wurde morgens und abends geprüft,

ob die trächtigen Weibchen geworfen hatten, um möglichst genau den Tag der Geburt, das heißt den postnatalen Tag 0 bestimmen zu können. Die Jungtiere wurden danach täglich gewogen. Jungtiere eines relativ großen Wurfes, welche nicht als Versuchstiere in einer der drei Versuchsgruppen verwendet wurden, wurden am Tag der Geburt mittels Isofluran-Überdosis euthanasiert, um den Unterschied in der Anzahl der Jungtiere zwischen den einzelnen Würfen gering zu halten.

## **6.2 Experimentelles Vorgehen und Gruppenzuteilung**

Neugeborene Rattenjunge wurden jeweils am ersten Lebenstag einer der drei Versuchsgruppen zugeteilt.

- 1) Die Tiere der Blut-Gruppe erhielten 24 bis 48 Stunden nach der Geburt unter Narkose eine bilaterale Injektion von je 100 µl Blut einer Donorratte in die Seitenventrikel des Gehirns.
- 2) Die Tiere der NaCl-Gruppe erhielten analog eine bilaterale Injektion von jeweils 100 µl 0,9-prozentiger steriler Kochsalzlösung in die Seitenventrikel.
- 3) Die Tiere der Sham-Gruppe erhielten keine Injektion, sondern eine Scheinoperation in Form eines Hautschnittes; ebenfalls unter Narkose.

Aus 9 Würfen wurden insgesamt 108 Jungtiere beider Geschlechter für die Versuche verwendet. 40 Tiere erhielten eine Injektion mit Blut (Blut-Gruppe), 34 Tiere eine Injektion mit Kochsalzlösung (NaCl-Gruppe) und 34 Tiere wurden der Scheinoperation unterzogen (Sham-Gruppe).

Es erfolgte bewusst keine Randomisierung jedes einzelnen Tieres (siehe Diskussion). Nach der Intervention erhielten alle Tiere eine Kennziffer, um die Verblindung während aller weiterer Arbeitsschritte zu garantieren.

Die Verblindung wurde erst zur statistischen Analyse der Ergebnisse wieder aufgehoben.

Um den zeitlichen Verlauf der Entzündungsreaktion und der Ventrikeldilatation histologisch darstellen zu können, wurden die operierten Jungratten in vier

Überlebenszeit-Gruppen eingeteilt und 1, 3, 7 oder 21 Tage nach der Injektion oder der Scheinoperation euthanasiert, um die Gehirne zu entnehmen. Die dadurch entstandenen vier Überlebenszeit-Gruppen werden im Folgenden als PT1, PT3, PT7 und PT21 bezeichnet (s. Abbildung 5).

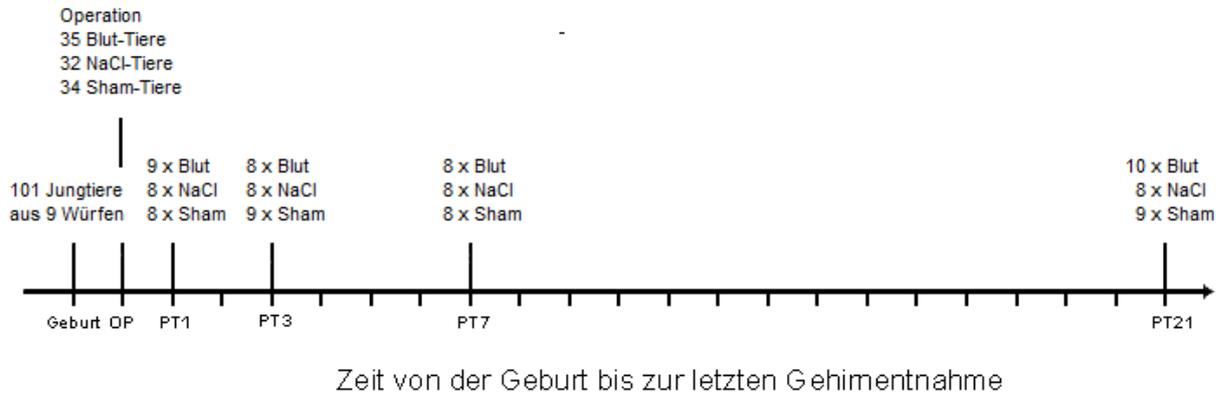


Abbildung 5. Zeitlicher Ablauf des Experiments von der Geburt der Tiere bis zum jeweiligen Zeitpunkt der Gehirnentnahme 1, 3, 7, oder 21 Tage nach Intervention. Die von der Auswertung ausgeschlossenen Tiere sind nicht abgebildet (s. Abschnitt 8.2.1).

### 6.3 Operation

Im Folgenden werden die Interventionen an den Versuchstieren im Rahmen der Studie beschrieben. Alle Operationen an den Versuchstieren wurden vom Facharzt für Neurochirurgie durchgeführt.

#### 6.3.1 Vorbereitung

Material	
Meditomedinhydrochlorid	Dorbene vet; Zoetis Deutschland GmbH, Berlin
Midazolam	Hameln pharma plus HmbH, Hameln
Xylocainspray	Aspen Germany GmbH, Bad Oldesloe
Kanüle	Sterican® G20; B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Spritze	Injekt-F®, 1ml; B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Skalpells	Cutfix®; B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Mikropinzette	Aesculap AG, Tuttlingen
Elektorasierer	Favorita II, GT104/GH204; Aesculap AG, Tuttlingen
Stereotaktischer Rahmen	430005-GR-GP-K; TSE-Systems, Bad Homburg

Narkosegasmonitor	Artema MM206C; Heyer, Bad Ems
Wärmepad	Homeothermic Blanket Control Unit; Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten
Bohrer	Aesculpa Microtron 60; Aesculap AG, Tuttlingen
Bohrerhandstück	GD604; Aesculap AG, Tuttlingen

Die Neugeborenen wurden am ersten Tag nach ihrer Geburt einzeln aus dem Käfig der Mutter entfernt und gewogen. Sie erhielten daraufhin eine Nummer und wurden einer der drei Versuchsgruppen zugeteilt.

Zur Operation wurden die Tiere unabhängig von der Zuteilung zu einer der Gruppen mit Isofluran narkotisiert und zum Schutz vor Auskühlung auf einem Stück Gaze über einem Wärmepad platziert. Die Gasnarkose wurde während der Operation aufrechterhalten. Die Verabreichung des Narkosegases erfolgte mithilfe einer aus Paraffinwachs geformten Maske, welche Mund und Nase der Tiere bedeckte. Die ausreichende Tiefe der Narkose und die Schmerzfreiheit wurden anhand des Fehlens von Reaktionen auf Kniffe in den Schwanz überprüft. Die Neugeborenen atmeten während des Eingriffs spontan.

Der Kopf der Tiere wurde durch zwei Haltestäbe in einer stereotaktischen Kopfhaltung fixiert. Die Haltestäbe wurden zu beiden Seiten am äußeren Gehörgang platziert, wobei darauf geachtet wurde, möglichst wenig Druck auf den Schädel auszuüben (s. Abbildung 7). Ein am Stereotax befestigter schwenkbarer Arm wurde über dem Kopf der Ratte platziert. An dem beweglichen Arm waren in einem Abstand von 2 mm zwei Kanülen (G26) zur Injektion von Blut und Kochsalzlösung befestigt, welche dadurch zielgenau auf die Koordinaten AP= -1 mm, ML= 1 mm vom Bregma aus auf den Schädel der Ratte abgesenkt werden konnten.

### **6.3.2 Donorratten**

Die als Donortiere verwendeten Sprague Dawley Ratten waren von Charles River Laboratories gelieferte Muttertiere, deren Würfe nicht für das PHH-Projekt verwendet wurden. Vor den Operationen der Neugeborenen wurden die Donorratten aus ihrem Stall genommen und ebenfalls mit Isofluran betäubt. Dazu wurde eine Gaze-kompresse mit 1 ml Isofluran beträufelt und zusammen mit der Ratte in einen Glasbehälter gelegt bis die Ratte einschlieft. Anschließend wurden die Donortiere mittels subkutaner Gabe von Meditomedinhydrochlorid (0,25 µg/g Körpergewicht)

und Midazolam (2,5 µg/g Körpergewicht) anästhesiert. Die ausreichende Tiefe der Narkose und die Schmerzfreiheit wurden anhand des Verschwindens des Kornealreflexes und Fehlen einer Reaktion auf das Kneifen in den Schwanz überprüft. Bei Bedarf wurden im Laufe der Operation obenstehende Medikamente weiter verabreicht, um die Narkose und Schmerzfreiheit aufrechtzuerhalten. Auch die Donortiere atmeten stets spontan.

### **6.3.3 Gewinnung des Donorblutes**

Es wurde Blut von Donortieren verwendet, da die für unser Modell erforderliche Blutmenge von 200 µl pro Versuchstier nicht von den neugeborenen Versuchstieren selbst hätte entnommen werden können. Dazu wären eine Antikoagulation oder erhebliche Verletzung der Tiere notwendig gewesen (s. Diskussion).

Die narkotisierten Donortiere wurden in Rückenlage platziert. Mit einem Elektrorasierer wurden die Haare am Abdomen der Ratten entfernt. Das rasierte Abdomen der Tiere wurde mit Desinfektionsmittel gereinigt und zur lokalen Betäubung mit Xylocainspray besprüht. Anschließend wurde der Herzspitzenstoß kaudal des Xyphoids palpiert. Es erfolgte die Insertion einer Kanüle unterhalb des Sternums. Unter leichter Aspiration wurde die Hohnadel mit einem Winkel von 20 - 30 Grad zur Einstichsebene nach kranial vorgeschoben. Bei Punktion der Herzkammer wurden etwa 300 µl Blut langsam per Hand in eine 1 ml Spritze abgesaugt. Da an jedem Operations-termin mehrere Injektionen mit Blut durchgeführt wurden, beließen wir die Donortiere in Anästhesie unter einer Wärmelampe und punktierten sie vor jeder Blutentnahme erneut. Am Ende jeder Operationsserie wurden die Donortiere mit einer Isofluran-Überdosis euthanasiert.

### **6.3.4 Präparation der intraventrikulären Injektionsstelle**

Die Kopfhaut der anästhesierten Neugeborenen wurde mit Desinfektionsmittel gereinigt und zur lokalen Betäubung mit Xylocainspray besprüht. Mit dem Skalpell erfolgte eine 5 - 10 mm lange Inzision entlang der Mittellinie des Schädels. Im Anschluss wurde der Schädelknochen freigelegt. Die Koronar- und Saggitalnaht dienten dabei der Orientierung. Anhand der stereotaktischen Koordinaten AP= -1 mm, ML= +1 mm vom Bregma aus wurden die Einstichstellen über den beiden

Seitenventrikeln mit einem Stift markiert. Mit einem Bohrer wurde im nächsten Schritt der Schädelknochen an den markierten Stellen eröffnet (s. Abbildung 6).

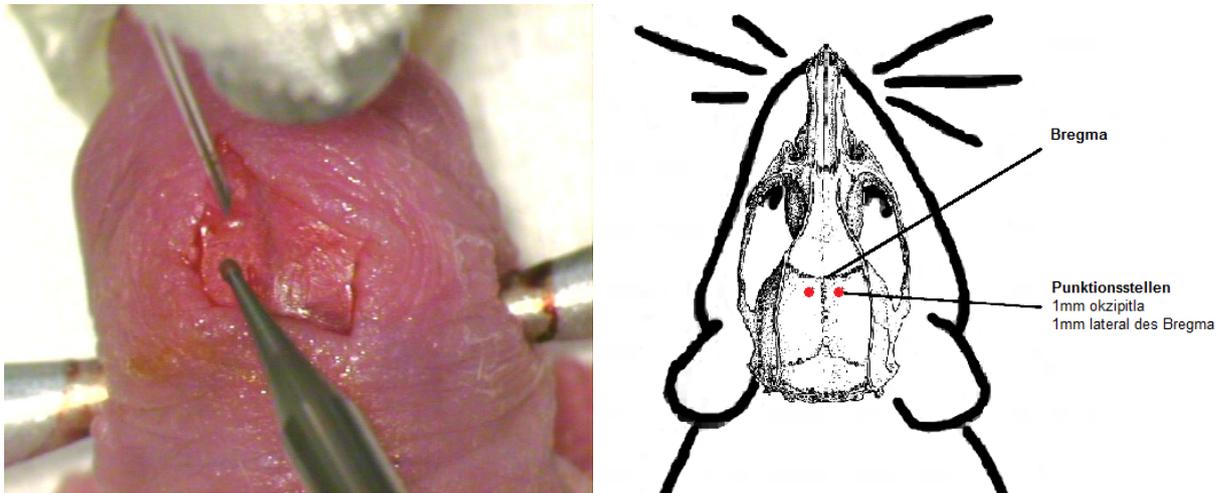


Abbildung 6. Ansetzen des Bohrers an der geplanten Einstichstelle (linkes Bild). Schematische Darstellung des Rattenschädels mit Markierung der beiden Einstichstellen 1 mm posterior sowie 1 mm lateral des Bregma (rechtes Bild).

### 6.3.5 Injektion

<b>Material</b>	
Natriumchloridinfusionslösung	0,9 %; B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Kanülen	Sterican® G26; B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Polyethylenschläuche	Smiths Medical Deutschland GmbH, Grasbrunn
Spritze	1 ml; B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Histoacrykleber	Histoacryl Gewebekleber; B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Mikroinfusionspumpe	Syringe pump; TSE systems GmbH, Bad Homburg
Operationsmikroskop	OPMI 1-FC; Carl Zeiss, Jena



Abbildung 7. Neugeborene Ratte (Postnatal-Tag 1) bei der Operation kurz vor der intraventrikulären Injektion.

#### 6.3.5.1 Blut-Tiere

Direkt nach Gewinnung des Blutes eines Donortieres wurden mit diesem jeweils zwei Polyethylenschläuche mit 0,4 mm Innendurchmesser luftblasenfrei befüllt. Die beiden Schläuche hatten eine Länge von 120 cm und ein Fassungsvermögen von 150  $\mu$ l. Die mit Donorblut befüllten Schläuche wurden jeweils an einem Ende mit einer 1 ml Spritze mit steriler Natriumchloridlösung verbunden. Die beiden Spritzen waren in eine Mikroinfusionspumpe eingelegt (s. Abbildung 8).

Das jeweils noch freie Ende der Schläuche wurde mit der zugehörigen Injektionskanüle verbundenen, welche im Abstand von 2 mm am beweglichen Arm des Stereotax befestigt war. Um die Kanülen zu entlüften, wurde die Mikroinfusionspumpe gestartet, bis Blut aus beiden Kanülen tropfte. Das Blut wurde sogleich mit einem Tupfer aufgefangen. Anschließend wurden die beiden Kanülen am Stereotax zeitgleich durch die Bohrlöcher in der Schädelkalotte und das Gehirngewebe hindurch in beide Seitenventrikel der Ratte abgesenkt. Die Spitzen der Hohladeln kamen dabei 3 mm ventral unterhalb der Schädelkalotte zum Liegen. Das Blut im Schlauch wurde sodann mit einer Flussrate von 50  $\mu$ l/min durch die Mikroinfusionspumpe in die Ventrikel injiziert. Das intraventrikuläre Injektionsvolumen

betrug beidseits je 100 µl Blut, insgesamt erhielt jedes Tier der Blut-Gruppe folglich 200 µl Blut. Nach der Injektion wurden die Kanülen für eine Minute an Ort und Stelle belassen und danach innerhalb einer Minute langsam zurückgezogen, um dem Wiederaustritt der injizierten Flüssigkeit vorzubeugen.

Die Zeit von Beginn der Narkose bis zum Ende der Intervention wurde mit einer Stoppuhr ermittelt. Die durchschnittliche Interventionszeit betrug 15 Minuten.

Zwischen den Operationen an unterschiedlichen Tieren wurde das komplette Injektionssystem mehrfach mit steriler Natriumchloridinfusionslösung gespült.

#### **6.3.5.2 NaCl-Tiere**

Bei den NaCl-Tieren wurde zur Infusion sterile, isotonische Natriumchloridinfusionslösung verwendet. Anstelle von Blut wurden zwei weitere Polyethylenschläuche mit den gleichen Abmessungen mit der Infusionslösung befüllt und wie oben beschrieben angeschlossen.

Die Tiere erhielten bilaterale Injektionen mit jeweils 100 µl Natriumchloridinfusionslösung. Das weitere Vorgehen entsprach dem der Blutgruppe. Die durchschnittliche Interventionszeit in dieser zweiten Gruppe betrug 8 Minuten.

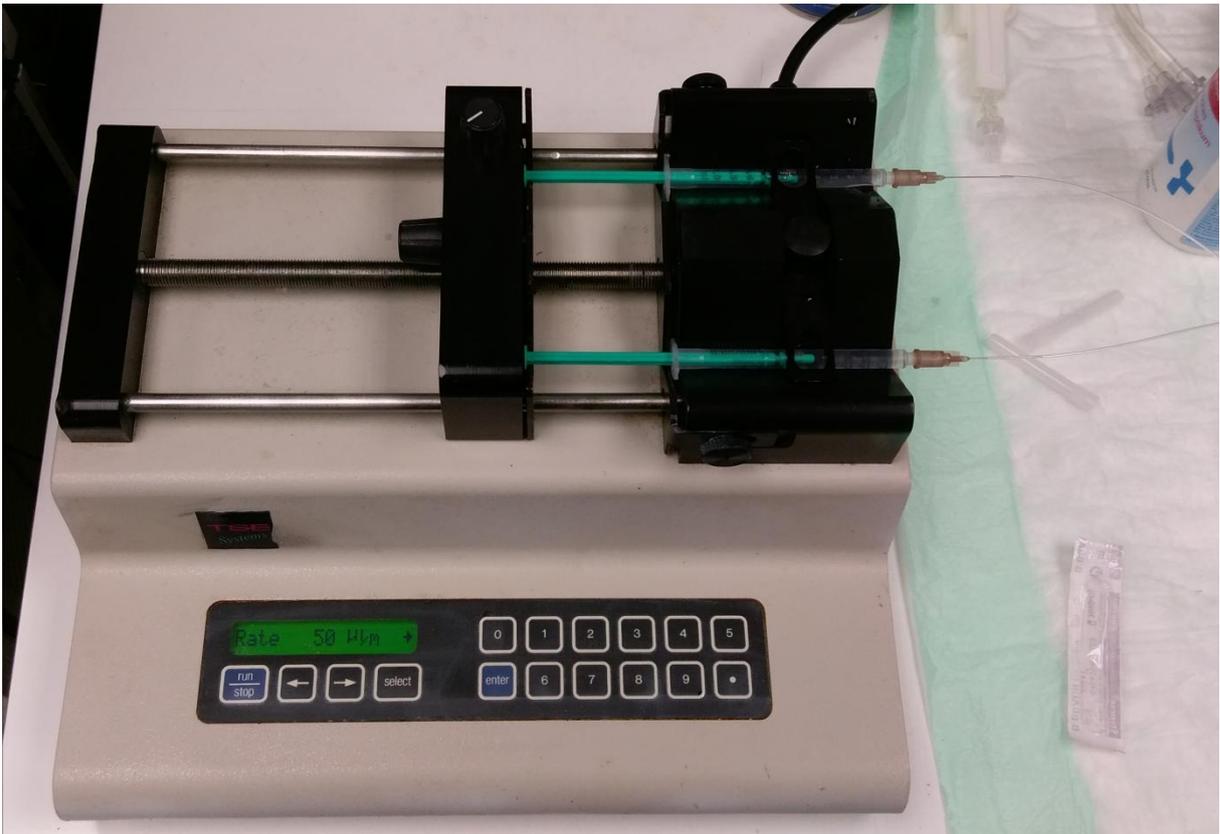


Abbildung 8. Mikroinfusionspumpe mit zwei eingespannten 1 ml Spritzen zur simultanen Injektion von Natriumchloridlösung oder Blut in die Ventrikel. Hier mit Natriumchloridlösung in den beiden angeschlossenen Schläuchen.

### 6.3.5.3 Sham-Tiere

Die Sham-Tiere erhielten wie die Blut- und NaCl-Tiere eine Narkose mit Isofluran. Bei ihnen wurde keine Injektion durchgeführt, sondern lediglich ein 5 - 10 mm langer Hautschnitt am Kopf gesetzt und die Schädelkalotte freigelegt.

Die durchschnittliche Interventionszeit betrug wie in der zweiten Gruppe 8 Minuten.

### 6.4 Postoperative Behandlung

Der Hautschnitt wurde bei allen Behandlungsgruppen mit Histoacrylkleber oder, falls dies instabil war, mit Einzelknopfnähten verschlossen. Die Jungtiere wurden bis zum Abklingen der Betäubung unter einer Wärmelampe platziert. Atmung und Vigilanz der Tiere wurden kontinuierlich überprüft.

Jedes Versuchstier erhielt eine spezifische Markierung mit schwarzem Filzstift auf dem Rücken und an einer der fünf Extremitäten. Auf einem Jungtierprotokoll wurden

für jedes Tier die Art dieser Markierung, die Tiernummer, die Art der Intervention, der Name des Muttertieres und das Datum der jeweiligen Intervention dokumentiert.

Die darauffolgenden Versuchsschritte wurden von verblindeten Mitarbeitern durchgeführt, welche die Ratten nur anhand der Markierungen unterscheiden konnten. Sie hatten keine Kenntnis der Art der Intervention. Diese Verblindung bezüglich der Gruppenzugehörigkeit wurde erst vor der statistischen Analyse mithilfe des Jungtierprotokolls wieder aufgehoben.

Sobald sich die Jungtiere nach Abklingen der Narkose wieder gezielt bewegen konnten, wurden sie in den Käfig des Muttertieres zurückgebracht. Die Jungtiere verblieben bis zum Zeitpunkt der Gehirnentnahme bei der Mutter. Täglich erfolgten die Erfassung ihres Gewichts sowie die Kontrolle der Markierungen, welche bei Bedarf erneuert wurden.

### 6.5 Gehirnentnahme und Perfusionsfixierung

<b>Material</b>	
Meditomedinhydrochlorid	Dorbene vet; Zoetis Deutschland GmbH, Berlin
Midazolam	Hameln pharma plus HmbH, Hameln
Fixierlösung	40g/L Paraformaldehyd Nr. 0335.3 Carl Roth GmbH, Karlsruhe 15,7g/L di-Natriumhydrogenphosphat Nr.6586; Merck KGaA, Darmstadt 3,8g/L Natriumdihydrogenphosphat Nr.6346; Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchloridinfusionslösung	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Saccharose Lösung 20%	D+Sacchrose, Art.-Nr. 9286.2; Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Isopentan	2-Methylbutan, Art.-Nr. 3927.1; Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kanüle	Sterican® G23; B. Braun, Melsungen
Infusionsbesteck	Intrafix® SafeSet; B. Braun, Melsungen
Dreiwegehahn	Discofix-3; B.Braun, Melsungen
Präparationsschere	Aesculap, Tuttlingen

Skalpell	Cutfix®, B.Braun, Melsungen
Pinzette, chirurgisch	Aesculap AG, Tuttlingen
Pinzette, anatomisch	Aesculap AG, Tuttlingen
Mikropinzette	Aesculap AG, Tuttlingen
Dissektor	Aesculap AG, Tuttlingen

Um den zeitlichen Verlauf der Immunantwort und der Schädigung auf Zellebene darzustellen, erfolgte die Gehirnentnahme der Tiere zu unterschiedlichen Zeitpunkten: 1, 3, 7 und 21 Tage nach der Intervention.

Die Tiere wurden am Tag der geplanten Gehirnentnahme durch die subkutane Gabe von Meditomedinhydrochlorid (0,5 µg/g Körpergewicht) und Midazolam (5 µg/g Körpergewicht) anästhesiert. Die ausreichende Tiefe der Narkose und die Schmerzfreiheit wurden anhand des Verschwindens des Kornealreflexes und ausbleibender Reaktion auf Kneifen in den Schwanz überprüft.

PT7- und PT21-Tiere wurden perfusionsfixiert. Um die Perfusionsfixierung durchzuführen, wurden mit einem Skalpell Haut und Muskulatur unterhalb des Rippenbogens mit einem Querschnitt durchtrennt und das Peritoneum eröffnet. Das Zwerchfell wurde anschließend vom Rippenbogen abpräpariert und die Pleura eröffnet. Mit einer Präparierschere wurde der knöcherne Thorax beidseits entlang der Medioklavikularlinien eröffnet. Die dabei abgelöste Brustplatte wurde nach kranial aufgeklappt und mit einer Klemme fixiert. Anschließend wurden Leber und Mediastinum dargestellt. Als Perfusionskanüle diente eine G23-Kanüle mit abgestumpfter Spitze. Damit wurde der linke Ventrikel des Herzens punktiert. Die Perfusionskanüle wurde in die Aorta vorgeschoben und mit einer Klemme fixiert. Ebendiese war über einen Schlauch und einen Dreiwegehahn mit einem Behälter mit steriler Natriumchloridlösung und einem Behälter mit Fixierlösung verbunden.

Um eine komplette Perfusion des zerebralen Gefäßsystems zu garantieren, wurde die Leber aufgeschnitten. Mit einem Perfusionsdruck von 100 cm Wassersäule wurde zuerst ca. drei Minuten mit Natriumchloridlösung perfundiert bis die Skleren der Tiere klar waren und aus der Leber klare Flüssigkeit trat. Anschließend wurden die Tiere mit der Paraformaldehydlösung infundiert bis ihre Körper steif wurden.

Die Flüssigkeit wurde bei der Perfusion über die Aorta in den großen Blutkreislauf geleitet und konnte durch den Schnitt in der Leber wieder entweichen.

Die Perfusionslösung wurde zu jeder Entnahme neu angesetzt. Direkt nach der Perfusion erfolgte die Gehirnentnahme.

Die PT1- und PT3-Tiere wurden nicht perfusionsfixiert, sondern nach Betäubung mit einer Präparierschere dekapitiert.

Die Gehirnentnahme der perfusionsfixierten und nicht perfusionsfixierten Tiere verlief ab diesem Punkt in gleicher Weise. Mit dem Skalpell wurden durch einen sagittalen Schnitt die Kopfhaut und Muskulatur gespalten und der Schädelknochen freigelegt. Mit Skalpell und Mikropinzette wurden das Schädeldach entlang der Schädelnähte abpräpariert und die Dura Mater entfernt. Myelencephalon und Gehirnnerven wurden mit einem Dissektor abgetrennt und das Gehirn so schonend wie möglich in einen Behälter mit Paraformaldehydlösung gegeben. Die Gehirne aller Gruppen wurden für 48 Stunden bei 4 °C in der Paraformaldehydlösung nachfixiert. Um das Gewebe zu entwässern und danach einfrieren zu können, wurden die Gehirne darauf in ein weiteres Gefäß mit 20 % Saccharose-Lösung überführt und erneut über 48 Stunden bei 4 °C gelagert. Erst danach wurden die Gehirne aus der Saccharose-Lösung genommen, vorsichtig abgetrocknet und mit trockeneisgekühltem Isopentan schockgefroren. Zum Schutz wurden sie in Aluminiumfolie gehüllt und bei -80 °C aufbewahrt.

## 6.6 Histologische Aufarbeitung

### 6.6.1 Herstellung der Gefrierschnitte

<b>Material</b>	
Objektträger	SuperFrost®; Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim v. d. Rhön
Kryo-Gel	Cryo-Gel, Surgipath®; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Cover-Slips	ApopTag® Coverslips; Millipore, Merck KGaA, Darmstadt
Deckgläser	La Fontaine International GmbH, Waghäusel
Einschlussmittel	EUKITT®; O. Kindler GmbH, Freiburg
Kryostat	Leica CM1850 Kryostat; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar

Lichtmikroskop	Axioskop 2 Plus; Zeiss, Oberkochen
----------------	------------------------------------

Die gefrorenen Gehirne wurden von -80 °C auf -20 °C erwärmt und zum Schneiden mit Kryo-Gel auf Objekthaltern befestigt. Im Kryostat wurden zur histologischen Aufarbeitung anschließend bei -20 °C Gefrierschnitte hergestellt. Die Gehirne wurden dabei von frontal nach okzipital aufgeschnitten. Sobald die Seitenventrikel erreicht waren, wurden Gefrierschnitte von 5 µm Dicke angefertigt.

Jeweils drei dieser Schnitte wurden auf einen Objektträger aufgebracht. Die Objektträger wurden bis zum Färben bei -20 °C gelagert.

### 6.6.2 Färbungen

<b>Material</b>	
Aqua Dest	Aqua Dest; B. Braun, Melsungen
Citric Acid	C-7254; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri (USA)
PBS	Dulbecco´s phosphate-buffered saline; Thermo Fisher, Scientific Waltham, Massachusetts (USA)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid 35%; Merck KGaA, Darmstadt
Triton	Triton X 100 1%; Merck KGaA, Darmstadt
Vectastain ABC Kit	Vectastain ABC Kit PK-6101, Rabbit IgG; Vector Laboratories INC, Burlingame CA. (USA)
Vectastain ABC Kit	Vectastain ABC Kit PK-6102, Mouse IgG; Vector Laboratories, INC. Burlingame CA. (USA)
DAB	DAB Peroxidase Substrate Kit, SK-4100; Vector Laboratories, INC. Burlingame CA. (USA)
Primär-Antikörper	IBA1, monoclonal antibody, 50µg; FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH, Neuss
Primär-Antikörper	TNF-α (52B83) monoclonal antibody; Santa Cruz Biotechnology, Dallas Texas (USA)
Primär-Antikörper	Anti-HMGB1 polyclonal antibody, ChiP Grade ab18256 Rabbit; abcam, Cambridge (UK)
Primär-Antikörper	Purified Mouse Anti-GFAP Cocktail, MaterialNumber: 556330; 0,5mg; 0,5mg/ml; BD Pharmingen, Becton, Dickinson and Company,

	Franklin Lakes (USA)
Goat Serum	Normal Goat Serum, Cat# S-1000, 20 ml; Vector Laboratories, INC. Burlingame CA. (USA)
Horse Serum	Donor Horse Serum, Cat# S9133, Lot# 0803x, 100ml; Biochrom GmbH, Berlin
CoverSlips	Apoptag Plastic Coverslips, Millipore; Merck KGaA, Darmstadt

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden die Gefrierschnitte der Versuchstiere aus der Region 0,1 mm anterior bis 0,2 mm posterior des Bregmas in der Frontalebene gewählt. Anhand der neuroanatomischen Lage von Fornix, vorderer Kommissur und der Ventrikel, wurden unter dem Mikroskop die Objektträger identifiziert, deren Schnitte in der gleichen koronaren Ebene lagen. Der Abgleich erfolgte mithilfe eines Atlas der Neuroanatomie der Ratte (Watson 1986). Die immunhistochemischen Marker IBA1, GFAP, HMGB1 und TNF- $\alpha$  wurden jeweils nach Färbeprotokoll bestimmt (siehe Anhang 9.1). Auf jedem Objektträger befand sich eine Negativkontrolle ohne Aufbringung von Primär-Antikörper.

Zur Färbung wurden die 5  $\mu$ m dicken Gefrierschnitte zunächst aufgetaut und mit dem Zitratpuffer im Dampfgerar demaskiert. Nach anschließendem Abkühlen wurden sie kurz in phosphat-buffered saline (PBS) gespült, um dann zum Blocken der endogenen Peroxidase in Methanol-PBS-Lösung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gelegt zu werden. Es folgte erneutes Waschen in PBS sowie phosphat-buffered saline mit Triton (PBS+T).

Im Anschluss wurden die Schnitte zur Bestimmung von IBA1 und HMGB1 zunächst mit 5 % Normal Goat Serum und dann über Nacht mit Normal Goat Serum und dem Primär-Antikörper inkubiert.

Zur Bestimmung von GFAP und TNF- $\alpha$  wurden die Gehirnschnitte zuerst mit 5 % Normal Horse Serum und anschließend über Nacht mit Normal Horse Serum und dem Primär-Antikörper inkubiert. Am Folgetag wurden alle Schnitte erneut in PBS+T gewaschen und anschließend mit dem Sekundär-Antikörper inkubiert.

Die Inkubation erfolgte bei IBA1 und HMGB1 erneut mit Normal Goat Serum, bei GFAP und TNF- $\alpha$  mit Normal Horse Serum.

Danach wurden die Schnitte wiederum in PBS+T gewaschen, dann mit dem ABC-Komplex inkubiert. Nach erneutem Waschen in PBS+T und PBS folgte das Färben mit Diaminobenzidin (DAB). In einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Schnitte

anschließend entwässert und anschließend eingedeckelt (s. Abbildung 9; s. Anhang 9.1).

Für die Bestimmung der Hemisphären- und Ventrikelgrößen wurde ein Schnitt jedes Tieres aus der gleichen koronaren Ebene nach Färbeprotokoll mit Hämatoxin und Eosin (HE) gefärbt (s. Anhang 9.1). Die Promotionsarbeit von Corinna Leistner aus derselben Forschungsgruppe beschäftigt sich näher mit der Bestimmung und dem Vergleich der Ventrikelgrößen. Aus diesem Grund wird für eine ausführliche Beschreibung an dieser Stelle auf ihre Arbeit verwiesen (Leistner 2020).

Nach dem Färben wurden die Objektträger wiederum mit einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert, in Xylol gewaschen und mit Deckgläsern und Einschlussmittel eingedeckt.

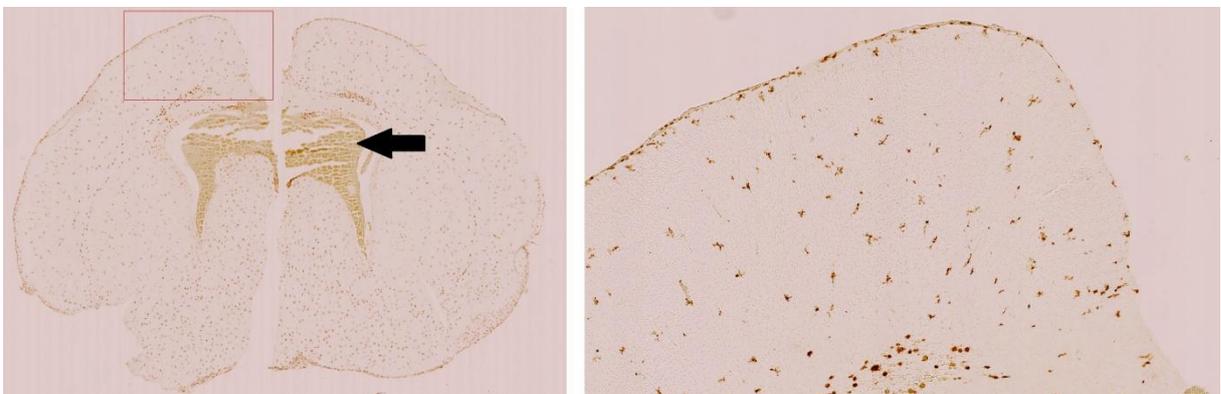


Abbildung 9. Beispielhaft zu sehen ist das Gehirn eines Blut-Tieres zum Zeitpunkt PT1 mit immunhistochemischer Färbung von IBA1. Links im Bild ein Querschnitt des Gehirns in dem das injizierte Blut in den Ventrikeln noch gut erkennbar ist (Pfeil). Rechts ein vergrößerter Ausschnitt mit angefärbten IBA1-positiven Mikroglia.

## 6.7 Auswertung

### 6.7.1 Bestimmung der Ventrikelgröße und der immunreaktiven Fläche (IRF)

Material	
Bildanalyseprogramm	Optimas 6.51; VSG; Adept Turnkey, Perth (Australien)
Kamera	CCD Super Color CV 950; JAI, Kopenhagen (Dänemark)
Mikroskop	Axioskop 2 Plus; Zeiss, Oberkochen
Bildbearbeitungssoftware	NDPView 2.5.19; Hamamatsu Photonics K.K.,

	Hamamatsu City (Japan)
Bildanalysesoftware	Image J 1.51k; National Institute of Health, Bethesda, Maryland (USA)
Objektträgerscanner	NanoZoomer 2.0HT; Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu City (Japan)

Die Größenbestimmung der Ventrikel und Hemisphären an den HE-gefärbten Schnitten erfolgte am Computer mithilfe des Bildanalyseprogramms Optimas 6.51. Dazu wurden bei allen Tieren Schnitte aus der gleichen koronaren Ebene 0,2 mm posterior des Bregmas verwendet. Die Schnitte wurden mit einer Kamera durch ein Lichtmikroskop ab fotografiert. Die auf diesem Wege gewonnenen Daten wurden in einer Excel-Tabelle notiert.

Zur Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von IBA1, GFAP, HMGB1 und TNF- $\alpha$  wurde die immunreaktive Fläche bestimmt. Dazu wurden die gefärbten Gehirnschnitte durch das Institut für Pathologie und die Gewebe-Biobank der Universitätsmedizin Mainz mit einem Objektträgerscanner in 20-facher Vergrößerung eingescannt und unserer Arbeitsgruppe als .ndpi-Datei zur Verfügung gestellt.

Die Bilder wurden mit einem Bildbearbeitungsprogramm in Dateien mit Tagged Image File Format (TIFF) umgewandelt. Die abschließende Bestimmung der immunreaktiven Fläche (IRF) erfolgte mithilfe des Bildauswertungsprogramms Image J nach einem vorab festgelegten Schema (s. Abbildung 10).

Die IRF wurde pro Schnitt in insgesamt 56 Regionen, den sogenannten Regions Of Interest (ROIs) bestimmt. Die ROIs, in Form quadratischer Flächen, wurden auf 5 Bereiche des Gehirns verteilt.

Aufgrund des Größenunterschieds der Gehirne zwischen den vier verschiedenen Überlebenszeit-Gruppen PT1, PT3, PT7 und PT21 wurden ROIs in vier verschiedenen Größen verwendet: für die PT1 Tiere betrug die Kantenlänge eines ROI 275  $\mu\text{m}$ , bei PT3 300  $\mu\text{m}$ , bei PT7 370  $\mu\text{m}$  und bei PT21 455  $\mu\text{m}$ .

Es lagen pro Hemisphäre 5 ROIs im Bereich des motorischen Kortex, 5 ROIs im Gyrus cinguli und dem angrenzenden Gyrus frontalis superior, 5 ROIs im Bereich des somatosensorischen Kortex, 9 ROIs im Bereich des Striatum und 3 ROIs im lateralen Septum pellucidum (s. Abbildung 10).

Die gewonnenen Daten in Form der IRF in Prozent der ROI Fläche wurden in Excel-Tabellen übertragen.

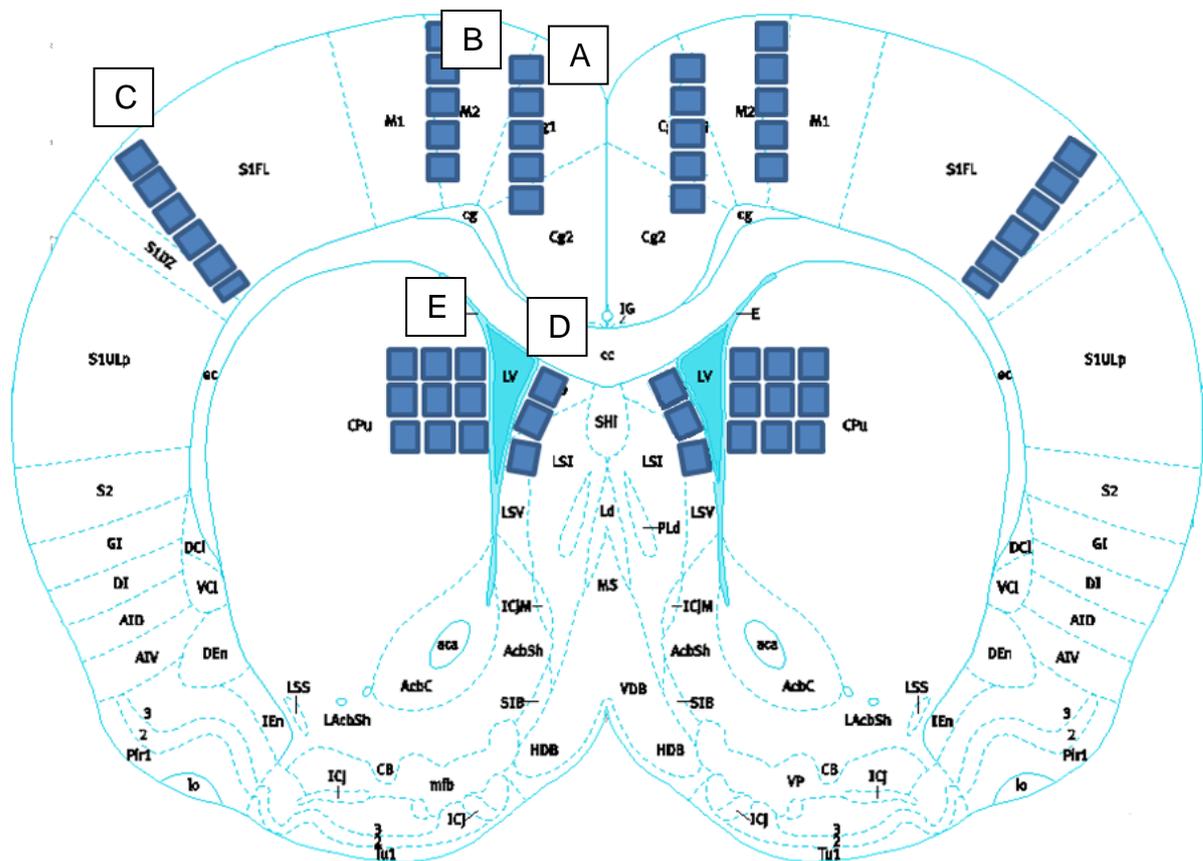


Abbildung 10. Platzierung der ROIs (Regions Of Interest) in verschiedenen anatomischen Regionen des Rattenhirns: Cingulärer Kortex (A), motorischer Kortex (B), somatosensorischer Kortex (C), Striatum (D), laterales Septum pellucidum (E).

### 6.7.2 Statistische Analyse und Auswertung

Material	
Datenaufbereitung	Microsoft Office Excel 2007; Microsoft Corporation, Redmond, Washington, (USA)
Statistische Auswertung/ Graphische Darstellungen	SigmaPlot 11.0 2009 für Windows; Systat Software Inc., Erkrath

Um festzustellen, bei welchen Tieren in Folge der Injektion ein Hydrozephalus auftrat, wurde die Fläche der Seitenventrikel 0,2 mm posterior des Bregma am koronaren Gehirnschnitt bestimmt und mit der Querschnittsfläche des gesamten Gehirns verglichen, um mögliche Fehler durch Stauchung oder Schrumpfung des Gewebes auszugleichen. Die Querschnittsflächen der beiden Hemisphären und Ventrikel wurden jeweils addiert und die relative Ventrikelgröße als Prozentsatz der

Ventrikelfläche am Querschnitt des Gehirns berechnet. Anschließend erfolgte der Vergleich der relativen Ventrikelgrößen zwischen den drei Interventionsgruppen.

Die Messdaten wurden in Tabellen mittels Microsoft Office Excel 2007 verwaltet. Die anschließende statistische Analyse erfolgte mit dem Programm SigmaPlot 11.0 2009 für Windows. Bei der statistischen Analyse der Prozentwerte der IRF wurden Ergebnisse mit einem p-Wert  $\leq 0,05$  als signifikant betrachtet. Es fand keine Korrektur für multiples Testen statt.

Um die zahlreichen Messwerte vor dem Vergleich der drei Interventionsgruppen zusammenzufassen, wurde zuerst der Mittelwert der IRF der rechten und linken Gehirnhemisphäre in den korrespondierenden Gehirnregionen gebildet. Um zu bestimmen, ob die Werte der IRF zwischen rechter und linker Hemisphäre vergleichbar waren, wurde zunächst die in den ROIs gemessene IRF der rechten und linken Hemisphäre innerhalb jeder Färbung mittels t-Test verglichen.

Bei den Färbungen von GFAP und IBA1 konnte zwischen den immunreaktiven Flächen der linken und der rechten Hemisphäre in den einzelnen Gehirnregionen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Innerhalb der HMGB1-Färbung bestand beim Vergleich der Hemisphären in allen Gehirnregionen und in allen Überlebenszeit-Gruppen zusammen bei 1,7 % der t-Tests ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ). Bei der TNF- $\alpha$ -Färbung bestand bei 3,3 % ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ).

Insgesamt konnte die IRF der Marker in der linken und rechten Gehirnhemisphäre also als vergleichbar angesehen werden.

Daraufhin wurden die immunreaktiven Flächen von rechter und linker Hemisphäre innerhalb jeder Gehirnregion bei allen 4 Markern jeweils addiert und durch 2 geteilt. Auf diesem Wege wurde der Mittelwert aus den immunreaktiven Flächen von linker und rechter Hemisphäre innerhalb jeder Gehirnregion für alle 4 Färbungen gebildet.

Im Anschluss sollte festgestellt werden, ob innerhalb der Gehirnregionen die Position der ROIs - ventrikelnah oder ventrikelfern bzw. oberflächlich oder tief im Kortex (s. Abbildung 4.6) - einen Einfluss auf die IRF hatte und ob sich dieser Effekt möglicherweise zwischen den drei Interventionsgruppen unterschied. Zu diesem Zweck wurde für jede Gehirnregion in jeder Färbung eine Two-Way Repeated Measures ANOVA mit den beiden unabhängigen Variablen ROI-Lokalisation und Interventionsgruppe durchgeführt. Um die Gruppen vergleichen zu können, wurde

die Verblindung dabei aufgehoben und die Daten aller Tiere wurden ihrer jeweiligen Interventionsgruppen zugeordnet.

In den Färbungen von GFAP und TNF- $\alpha$  zeigte sich in 75 % der Fälle ein signifikanter Zusammenhang zwischen ROI-Position und IRF ( $p < 0,05$ ). In der Färbung von HMGB1 waren es 70 %, bei IBA1 60%.

In den Gehirnregionen cingulärer Kortex, motorischer Kortex und somatosensorischer Kortex waren die IRF der an der Gehirnoberfläche gelegenen ROIs am größten. In den Regionen Striatum und laterales Septum pellucidum waren die IRF in den ventrikelnahen ROIs signifikant größer als in den ventrikelfernen. Dieser Effekt trat jedoch in gleichem Maße in allen drei Interventionsgruppen auf.

Der durch die Two-Way Repeated Measures ANOVA errechnete Effekt der unterschiedlichen IRF-Verteilung zwischen den ROIs auf den Vergleich der drei Interventionsgruppen war äußerst gering.

Für die Färbungen von GFAP und HMGB1 ergab sich in den verschiedenen Gehirnregionen und den unterschiedlichen Überlebenszeit-Gruppen kein signifikantes Ergebnis für diesen Effekt.

Bei TNF- $\alpha$  ergab sich in 5 % der Fälle, bei IBA1 bei 10 % ein Ergebnis mit  $p < 0,05$ . Es bestand demnach kein bedeutender Einfluss der genauen ROI-Position auf den Unterschied der IRF zwischen den drei Interventionsgruppen.

Der Effekt der Graduierung der IRF von Gehirnoberfläche zu Tiefe und von ventrikelnahen zu ventrikelfernen ROIs bestand in der Blut-, NaCl- und Sham-Gruppe in vergleichbarem Maße.

Daraufhin wurden die jeweiligen ROIs der gleichen Gehirnregion durch Addition der IRF und Division durch die Anzahl an ROIs in der jeweiligen Region zu Mittelwerten zusammengefasst. Zum anschließenden Vergleich der IRF zwischen den drei Interventionsgruppen wurden diese Mittelwerte verwendet.

Es folgte der Vergleich der IRF der drei Interventionsgruppen mit dem Ziel, einen Unterschied in der Expression der Immunmarker zwischen der Blut-, NaCl- und Sham-Gruppe festzustellen. Die IRF in den drei Interventionsgruppen wurde in jeder Gehirnregion und jeder Überlebenszeit-Gruppe getrennt untersucht. Bei einer Normalverteilung und Varianzgleichheit der Daten wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (one-way ANOVA) durchgeführt. Bei nicht normalverteilten Daten und solch unterschiedlicher Varianz wurde ein Rangsummentest nach Kruskal-Wallis verwendet. Wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt,

erfolgte anschließend ein Post-hoc-Test, um zu bestimmen, welche der drei Gruppen sich voneinander unterschieden. Als Post-hoc-Test wurden nach one-way ANOVA der Student-Newman-Keuls-Test und nach Rangsummentest der Dunn-Test verwendet (s. Anhang Tabelle 6).

Die Werte sind in allen Grafiken als Mittelwert + Standardfehler (engl. standard error of means, SEM) angegeben.

Um die Beteiligung der Entzündungsmarker am Entstehungsprozess des Hydrozephalus zu untersuchen, wurde nach einem Zusammenhang zwischen der Expression der Entzündungsmarker IBA1, GFAP, HMGB1 und TNF- $\alpha$  sowie der gemessenen Ventrikelgröße gesucht. Mithilfe der Spearman Korrelation wurde ein Korrelationskoeffizient zwischen der IRF in Prozent der ROI Fläche und der Ventrikelgröße in Prozent der Hemisphärengröße berechnet. Die Analyse erfolgte separat für jede Gehirnregion und jede Überlebenszeit-Gruppe (s. Anhang Tabelle 9.2).

Wir danken dem Institut für Pathologie und der Gewebe-Biobank der Universitätsmedizin Mainz für die Zusammenarbeit sowie für das Scannen der gefärbten Gehirnschnitte und die Bereitstellung der Dateien.

## 7. Ergebnisse

Insgesamt wurden 108 Jungtiere beider Geschlechter für die Versuche verwendet. 40 Tiere erhielten eine Injektion mit Blut (Blut-Gruppe), 34 Tiere eine Injektion mit Kochsalzlösung (NaCl-Gruppe) und 34 Tiere wurden der Scheinoperation unterzogen (Sham-Gruppe).

Vor der geplanten Gehirnentnahme starben 5 der mit Blut und 2 der mit Kochsalzlösung injizierten Tiere. Sie wurden folglich von der Auswertung ausgeschlossen.

Bei PT1 waren 9 Tiere in der Blut-Gruppe, 8 in der NaCl-Gruppe und 8 in der Sham-Gruppe. Bei PT3 waren es 8 Blut-Tiere, 8 NaCl-Tiere und 9 Sham-Tiere. Bei PT7 waren in jeder der drei Gruppen 8 Tiere. Bei PT21 waren es 10 Blut-Tiere, 8 NaCl-Tiere und 9 Sham-Tiere (s. Tabelle 1).

Tabelle 1. Anzahl und Verteilung der Versuchstiere auf die Interventions- und Überlebenszeit-Gruppen

	Blut-Gruppe	NaCl-Gruppe	Sham-Gruppe
PT 1	9	8	8
PT 3	8	8	9
PT 7	8	8	8
PT 21	10	8	9

### 7.1 Entwicklung der Ratten

Die Neugeborenen wogen einen Tag nach Geburt im Durchschnitt 7,4 g (SEM=1,0). Zwischen den Gruppen zeigten sich jedoch Unterschiede im Gewicht. Zum statistischen Vergleich des Gewichts zwischen den drei Interventions-Gruppen wurden die Gewichtsdaten aller in die Auswertung eingeschlossenen Versuchstiere in den drei Interventions-Gruppen an jedem Tag mittels one-way ANOVA verglichen.

Schon einen Tag nach Geburt waren die Blut-Tiere mit durchschnittlich 6,8 g (SEM=0,7) signifikant leichter als die NaCl-Tiere mit 7,4 Gramm (SEM=0,8) und Sham-Tiere mit 8,1 g (SEM=1,1) ( $p < 0,05$ ).

Drei Tage nach Geburt wogen die Bluttiere durchschnittlich 8,9 g (SEM=0,9), die NaCl-Tiere 10,0 g (SEM=0,9) und die Sham-Tiere 11,1 g (SEM=1,5). Die Blut-Tiere waren damit immer noch signifikant leichter als die Tiere der beiden anderen Gruppen ( $p < 0,05$ ). Erst sieben Tage nach Geburt war der Unterschied nicht mehr signifikant.

Im Zeitraum von 10 bis 15 Tagen nach Geburt entwickelten sich die verbliebenen Blut-Tiere sukzessive sogar zur schwersten Gruppe, wurden am Ende jedoch wieder von der NaCl-Gruppe überholt.

Am zwanzigsten postnatalen Tag waren die 8 übriggebliebenen Tiere der NaCl-Gruppe mit durchschnittlich 62,0 g (SEM=2,7) signifikant schwerer als die 9 Tiere der Sham-Gruppe mit 54,0 g (SEM=4,9). Die 10 Blut-Tiere lagen mit durchschnittlich 57,2 g (SEM=9,0) dazwischen, wobei zwischen NaCl- und Blut- oder zwischen Blut- und Sham-Gruppe kein signifikanter Unterschied bestand (s. Abbildung 11).

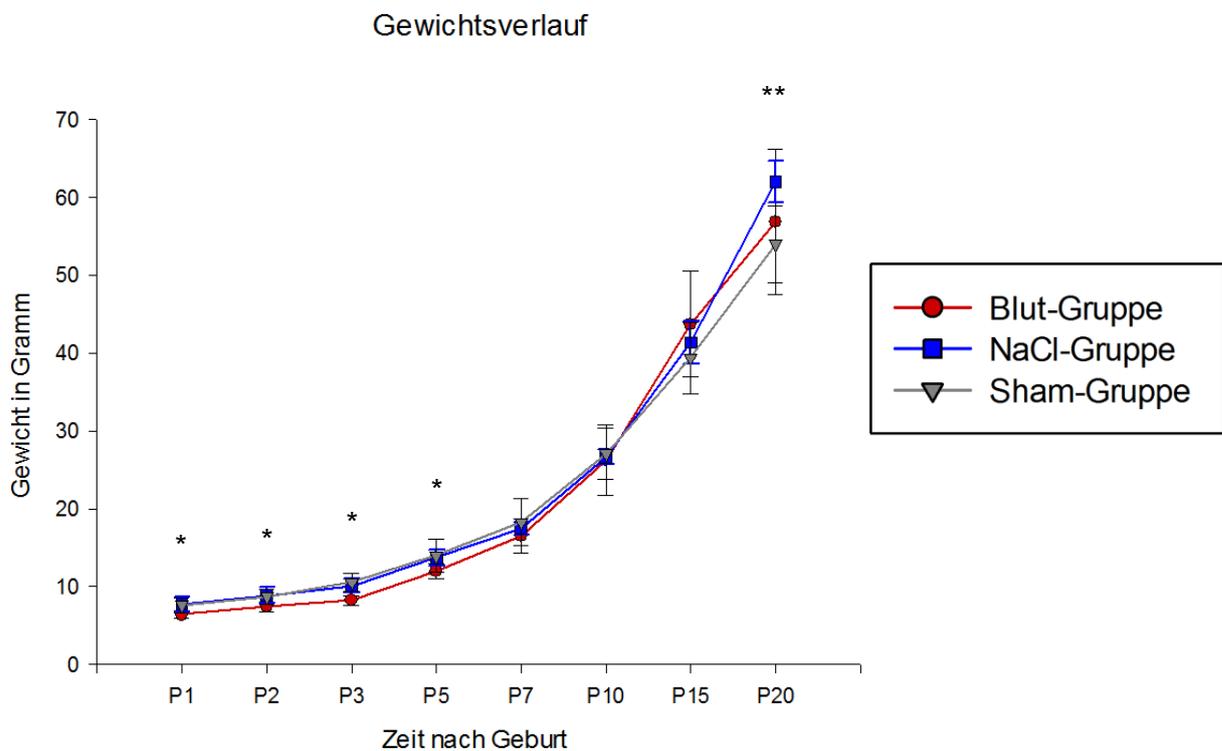


Abbildung 11. Die Gewichtsentwicklung der Ratten im zeitlichen Verlauf. Die Punkte stellen jeweils das durchschnittliche Gewicht aller Tiere einer Interventionsgruppe zu den Zeitpunkten 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15 und 20 Tage nach Geburt dar. Die error-bars zeigen die Standardabweichung der errechneten Mittelwerte.

Zu den mit einem Stern (\*) gekennzeichneten Zeitpunkten waren die Blut-Tiere signifikant leichter als die NaCl- und Sham-Tiere ( $p < 0,05$ ). Zu dem mit zwei Sternen (\*\*) gekennzeichneten Zeitpunkt waren die NaCl-Tiere signifikant schwerer als die Sham-Tiere ( $p < 0,05$ ). Die Vergleiche erfolgten mittels one-way ANOVA.

## 7.2 Bestimmung der Ventrikelgröße

Die Bestimmung der Ventrikelgröße aller Tiere wurde von Corinna Leistner an HE-gefärbten Gehirnschnitten durchgeführt. Für eine genaue Beschreibung des Vorgehens wird aus diesem Grund auf ihre Arbeit verwiesen (Leistner 2020).

Es erfolgte eine Messung der Querschnittsfläche der Seitenventrikel sowie des gesamten Gehirns. Anschließend wurde der Quotient aus Ventrikelfläche und Gehirnquerschnittsfläche gebildet. Die dadurch errechnete relative Ventrikelfläche wurde zum Vergleich der Ventrikelgrößen der Versuchstiere verwendet (Leistner 2020).

Es fiel dabei eine deutliche Variation der Ventrikelgrößen innerhalb der Blut-Gruppe an PT1 und PT21 auf. Die Ergebnisse aus der NaCl- und Sham-Gruppe waren gleichförmiger verteilt (Leistner 2020). Zudem zeigten zwei Tiere der PT21-Blut-Gruppe mit Ventrikelflächen von 19,4 % und 30,3 % des Gehirnquerschnitts eine sehr starke Erweiterung der Seitenventrikel. Ein weiteres Blut-Tier hatte am PT21 einen Hydrozephalus mit einer Ventrikelfläche von 5,1 % des Gehirnquerschnitts.

Die gemessene Ventrikelweite der mit Blut und Natriumchloridlösung injizierten Tiere zu den Zeitpunkten PT1 und PT3 variierte stärker als erwartet. Am PT1 waren die Ventrikel in der Blut- und NaCl-Gruppe signifikant größer als die der Sham-Gruppe ( $p < 0,05$ ). Zu den Zeitpunkten PT3, PT7 und PT21 bestanden keine signifikanten Unterschiede (Leistner 2020) (s. Abbildung 12).

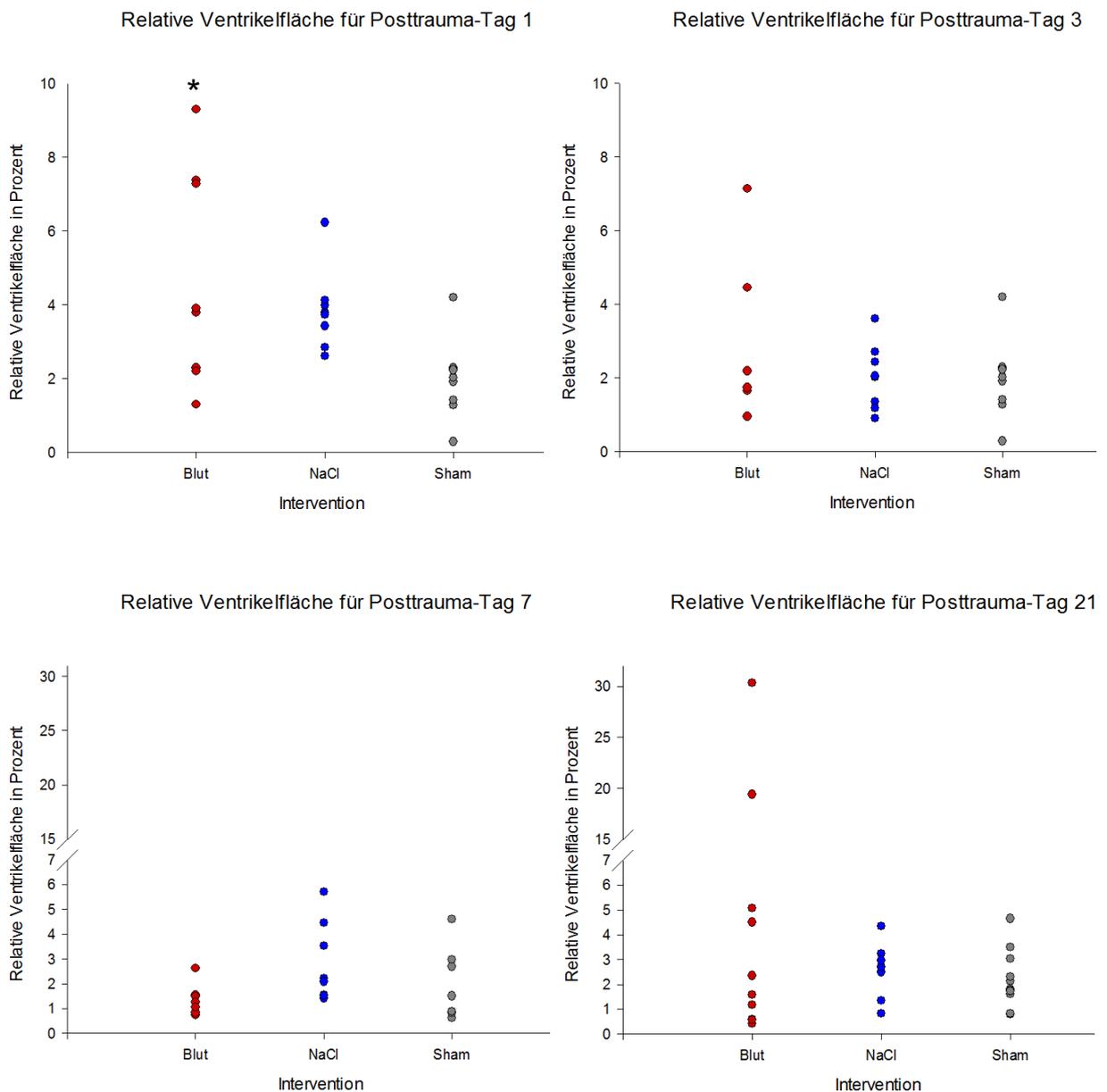


Abbildung 12. Relative Ventrikelfläche der drei Interventions-Gruppen für die Post-Traumatage PT1, PT3, PT7 und PT21 (Leistner 2020). Für jeden Überlebenszeitpunkt wurde eine one-way ANOVA zum Vergleich der Ventrikelfläche der drei Interventions-Gruppen durchgeführt. Bei PT1 wurde dabei ein signifikanter Unterschied zwischen Blut- und Sham-Gruppe festgestellt. (\*) = durchschnittliche Ventrikelgröße der Blut-Gruppe ist signifikant größer als die der Sham-Gruppe ( $p < 0,05$ ).

## 7.3 Vergleich der immunreaktiven Fläche

### 7.3.1 Immunreaktive Fläche von GFAP

Am PT1 bestand in der Expression von GFAP gemessen an der IRF im Bereich des cingulären Kortex beim Vergleich der drei Interventionsgruppen mittels ANOVA ein signifikanter Unterschied zwischen der Blut- und der Sham-Gruppe ( $p < 0,05$ ) (s. Abbildung 13 A).

Die immunreaktive Fläche von GFAP bei den Blut-Tieren im cingulären Kortex am PT1 betrug im Mittel 2,6 % (SEM=1,6) der Gesamtfläche, bei den Sham-Tieren waren es hingegen nur 0,4 % (SEM=0,4). In den weiteren Gehirnregionen war eine ähnliche Tendenz erkennbar, jedoch fehlten signifikante Unterschiede (s. Abbildung 13 B-E). Zum Zeitpunkt PT3 war dieser Effekt nicht zu beobachten.

Im cingulären Kortex unterschied sich die mittlere IRF am PT3 Zwischen den drei Gruppen kaum. In der Blut-Gruppe lag sie bei 1,1 % (SEM=0,7), in der NaCl-Gruppe bei 1,0 % (SEM=0,7) und in der Sham-Gruppe ebenfalls bei 1,0 % (SEM=0,9). In den weiteren Gehirnregionen gab es stärkere Abweichungen zwischen den Gruppen jedoch handelte es sich nicht um signifikante Unterschiede.

Am PT7 ergab sich ein ähnliches Bild ohne signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

Am PT21 war die gemessene IRF von GFAP in allen Gruppen und allen Gehirnregionen am höchsten. Sie lag zwischen 1,4 % im somatosensorischen Kortex der NaCl-Gruppe (SEM=0,8) und 3,8 % im lateralen Septum pellucidum der NaCl-Gruppe (SEM=1,9). Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (s. Tabelle 2; s. Anhang Tabelle 6).

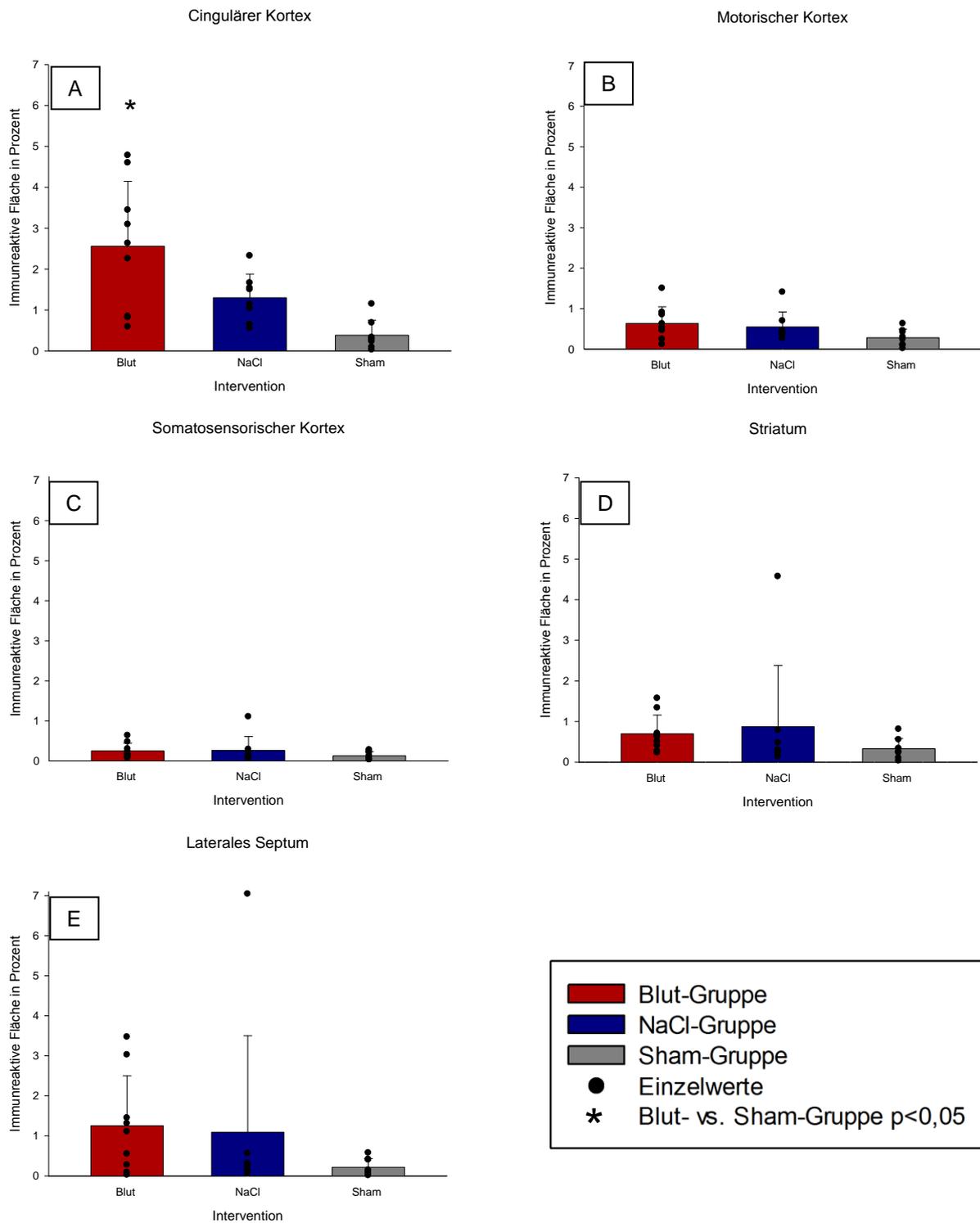


Abbildung 13. IRF in Prozent der ROI-Fläche bei Färbung des Immunmarkers GFAP für die drei Interventionsgruppen am PT1. Die Werte sind als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben. Die verschiedenen Gehirnregionen sind einzeln dargestellt. Cingulärer Kortex (A) , motorischer Kortex (B), somatosensorischer Kortex (C), Striatum (D), laterales Septum pellucidum (E). Es wurde stets eine one-way ANOVA zum Vergleich der drei Gruppen durchgeführt. Im cingulären Kortex wurde ein signifikanter Unterschied zwischen Blut- und Sham- Gruppe festgestellt ( $p < 0,05$ ).

Tabelle 2. Mittelwerte der IRF bei der Färbung von GFAP am PT1, 3, 7, sowie 21 in den drei Interventions-Gruppen und den fünf untersuchten Gehirnregionen. Gegenübergestellt ist die jeweilige Standardabweichung der Mittelwerte (SEM).

GFAP-Färbung PT1						
Gehirnregion	Blut-Gruppe		NaCl-Gruppe		Sham-Gruppe	
	IRF in %	SEM	IRF in %	SEM	IRF in %	SEM
Cingulärer Kortex	<b>2,562</b>	1,586	<b>1,301</b>	0,579	<b>0,385</b>	0,366
Motorischer Kortex	<b>0,634</b>	0,413	<b>0,548</b>	0,369	<b>0,281</b>	0,210
Somatosensorischer Kortex	<b>0,251</b>	0,190	<b>0,262</b>	0,348	<b>0,130</b>	0,102
Striatum	<b>0,699</b>	0,461	<b>0,875</b>	1,508	<b>0,332</b>	0,250
Laterales Septum	<b>1,255</b>	1,247	<b>1,092</b>	2,409	<b>0,218</b>	0,214

GFAP-Färbung PT3						
Gehirnregion	Blut-Gruppe		NaCl-Gruppe		Sham-Gruppe	
	IRF in %	SEM	IRF in %	SEM	IRF in %	SEM
Cingulärer Kortex	<b>1,116</b>	0,723	<b>1,032</b>	0,742	<b>1,027</b>	0,886
Motorischer Kortex	<b>0,481</b>	0,305	<b>0,629</b>	0,503	<b>0,644</b>	0,693
Somatosensorischer Kortex	<b>0,225</b>	0,244	<b>0,251</b>	0,202	<b>0,410</b>	0,327
Striatum	<b>0,215</b>	0,198	<b>0,254</b>	0,185	<b>0,552</b>	0,410
Laterales Septum	<b>0,254</b>	0,400	<b>0,209</b>	0,211	<b>1,015</b>	0,942

GFAP-Färbung PT7						
Gehirnregion	Blut-Gruppe		NaCl-Gruppe		Sham-Gruppe	
	IRF in %	SEM	IRF in %	SEM	IRF in %	SEM
Cingulärer Kortex	<b>0,941</b>	0,774	<b>1,070</b>	1,152	<b>1,256</b>	1,987
Motorischer Kortex	<b>0,478</b>	0,391	<b>0,339</b>	0,244	<b>0,938</b>	1,364
Somatosensorischer Kortex	<b>0,263</b>	0,341	<b>0,119</b>	0,118	<b>0,311</b>	0,427
Striatum	<b>0,472</b>	0,764	<b>0,337</b>	0,423	<b>0,101</b>	0,090
Laterales Septum	<b>1,313</b>	1,997	<b>0,580</b>	0,532	<b>0,610</b>	0,910

GFAP-Färbung PT21						
Gehirnregion	Blut-Gruppe		NaCl-Gruppe		Sham-Gruppe	
	IRF in %	SEM	IRF in %	SEM	IRF in %	SEM
Cingulärer Kortex	<b>1,827</b>	0,850	<b>2,410</b>	1,298	<b>1,756</b>	0,840
Motorischer Kortex	<b>2,683</b>	0,756	<b>2,247</b>	0,840	<b>2,470</b>	1,126
Somatosensorischer Kortex	<b>1,585</b>	0,572	<b>1,390</b>	0,769	<b>1,627</b>	0,997
Striatum	<b>2,712</b>	4,518	<b>1,520</b>	0,837	<b>1,664</b>	0,804
Laterales Septum	<b>2,756</b>	1,938	<b>3,793</b>	1,938	<b>3,413</b>	1,726

Um den zeitlichen Verlauf der Entzündungsreaktion beschreibend darzustellen, wurden die Mittelwerte aus der immunreaktiven Fläche der ROIs in jeder Gehirnregion ermittelt und im Verlauf der 4 Überlebenszeitpunkte PT1, PT3, PT7 und PT21 abgebildet. Gleichzeitig werden die drei Interventionsgruppen einander gegenübergestellt (s Abbildung 14).

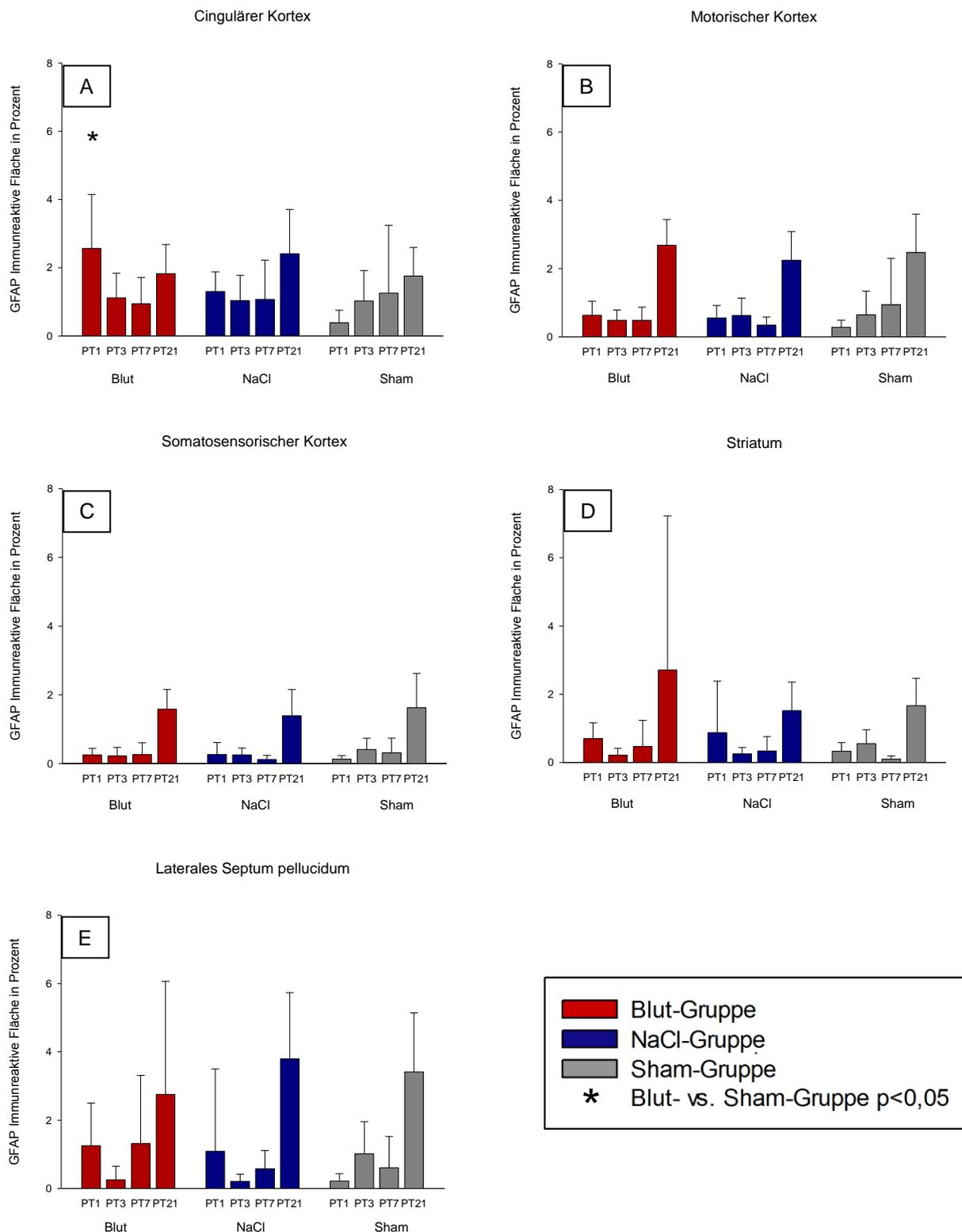


Abbildung 14. Balkendiagramm der immunreaktiven Fläche bei Färbung des Immunmarkers GFAP für die drei Interventionsgruppen im zeitlichen Verlauf von PT1 bis PT21. Die Werte sind als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben. Die verschiedenen Gehirnregionen sind einzeln dargestellt. Cingulärer Kortex (A), motorischer Kortex (B), somatosensorischer Kortex (C), Striatum (D), laterales Septum pellucidum (E). Für jeden Überlebenszeitpunkt wurde eine one-way ANOVA der drei Gruppen durchgeführt. Im cingulären Cortex bei PT1 wurde dabei ein signifikanter Unterschied zwischen Blut- und Sham-Gruppe festgestellt ( $p < 0,05$ ). Zu keinem Zeitpunkt und in keiner untersuchten Gehirnregion gab es einen signifikanten Unterschied zwischen Blut- und NaCl-Gruppe.

### 7.3.2 Immunreaktive Fläche von IBA1

Beim Vergleich der immunreaktiven Fläche der drei Interventionsgruppen zeigten sich für IBA1 in den fünf betrachteten ROIs zu keinem der vier Untersuchungszeitpunkte signifikante Unterschiede.

Zum Zeitpunkt PT1 lag die durchschnittliche IRF in allen Gruppen und allen Gehirnregionen zwischen 0,8 % im somatosensorischen Kortex der Sham-Gruppe (SEM=0,5) und 2 % im lateralen Septum pellucidum der NaCl-Gruppe (SEM=1,2).

Es zeigten sich also keine signifikanten Unterschiede.

Am PT3 war die mittlere IRF in allen Gruppen und allen Gehirnregionen größer als zum Zeitpunkt PT1 und lag zwischen 1,3 % im Striatum der Sham-Gruppe und 2,4 % im cingulären Kortex der Blut-Gruppe (SEM=1,1).

Am PT7 war die mittlere IRF in allen Gruppen und allen Gehirnregionen wiederum größer als bei PT3 und lag zwischen 2,1 % im Striatum der NaCl-Gruppe (SEM=1,2) und 5,8 % im somatosensorischen Kortex der Sham-Gruppe (SEM=4,9).

Am PT21 zeigten sich in der Blut- und Sham-Gruppe in allen Gehirnregionen kleinere IRFs als bei PT7. Die Werte lagen in diesem Fall zwischen 3,9 % im cingulären Kortex der Blut-Gruppe (SEM=4,3) und 1,9 % im lateralen Septum pellucidum der Sham-Gruppe (SEM=0,6). In der NaCl-Gruppe stieg die IRF bei PT21 im Vergleich zu PT7 in den Regionen cingulärer Kortex, motorischer Kortex, Striatum und laterales Septum pellucidum im Vergleich weiter an. Der höchste Wert lag bei 4,5 % im cingulären Kortex (SEM=1,4). Es gab zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen (s. Tabelle 3; s. Anhang Tabelle 7)

Tabelle 3. Mittelwerte der IRF bei der Färbung von IBA1 am PT1, 3, 7, sowie 21 in den drei Interventions-Gruppen und den fünf untersuchten Gehirnregionen. Gegenübergestellt ist die jeweilige Standardabweichung der Mittelwerte (SEM).

Gehirnregion	Blut-Gruppe		NaCl-Gruppe		Sham-Gruppe	
	IRF in %	SEM	IRF in %	SEM	IRF in %	SEM
Cingulärer Kortex	<b>1,593</b>	0,777	<b>1,431</b>	0,582	<b>1,209</b>	0,542
Motorischer Kortex	<b>1,089</b>	0,378	<b>1,025</b>	0,635	<b>0,979</b>	0,474
Somatosensorischer Kortex	<b>1,013</b>	0,504	<b>0,955</b>	0,579	<b>0,827</b>	0,534
Striatum	<b>1,399</b>	0,537	<b>1,332</b>	0,558	<b>1,216</b>	0,733
Laterales Septum	<b>1,762</b>	0,772	<b>2,063</b>	1,167	<b>1,842</b>	0,929

IBA1-Färbung PT3						
Gehirnregion	Blut-Gruppe		NaCl-Gruppe		Sham-Gruppe	
	IRF in %	SEM	IRF in %	SEM	IRF in %	SEM
Cingulärer Kortex	<b>2,371</b>	1,066	<b>1,885</b>	1,160	<b>1,592</b>	0,476
Motorischer Kortex	<b>1,960</b>	1,117	<b>1,518</b>	0,651	<b>1,454</b>	0,407
Somatosensorischer Kortex	<b>1,795</b>	0,884	<b>1,453</b>	0,678	<b>1,721</b>	0,726
Striatum	<b>1,451</b>	0,802	<b>1,439</b>	0,683	<b>1,250</b>	0,384
Laterales Septum	<b>2,204</b>	1,027	<b>2,351</b>	1,438	<b>2,156</b>	0,768

IBA1-Färbung PT7						
Gehirnregion	Blut-Gruppe		NaCl-Gruppe		Sham-Gruppe	
	IRF in %	SEM	IRF in %	SEM	IRF in %	SEM
Cingulärer Kortex	<b>4,681</b>	1,804	<b>3,388</b>	2,557	<b>4,826</b>	3,366
Motorischer Kortex	<b>5,390</b>	2,473	<b>3,291</b>	2,354	<b>5,829</b>	3,694
Somatosensorischer Kortex	<b>5,156</b>	2,495	<b>3,042</b>	2,394	<b>5,836</b>	4,885
Striatum	<b>3,248</b>	0,856	<b>2,051</b>	1,230	<b>3,402</b>	1,550
Laterales Septum	<b>3,178</b>	1,228	<b>2,317</b>	1,414	<b>3,344</b>	1,632

IBA1-Färbung PT21						
Gehirnregion	Blut-Gruppe		NaCl-Gruppe		Sham-Gruppe	
	IRF in %	SEM	IRF in %	SEM	IRF in %	SEM
Cingulärer Kortex	<b>3,946</b>	4,273	<b>4,453</b>	1,369	<b>3,093</b>	1,188
Motorischer Kortex	<b>3,685</b>	3,551	<b>3,945</b>	1,209	<b>2,924</b>	1,018
Somatosensorischer Kortex	<b>2,506</b>	2,097	<b>2,056</b>	0,491	<b>2,124</b>	0,894
Striatum	<b>2,095</b>	2,159	<b>2,583</b>	0,961	<b>1,877</b>	0,723
Laterales Septum	<b>2,731</b>	1,214	<b>3,239</b>	1,214	<b>1,869</b>	0,637

Im Folgenden findet sich exemplarisch eine Auswahl der Gefrierschnitte mit Färbung von IBA1 (s. Abbildung 15,16 und 17).

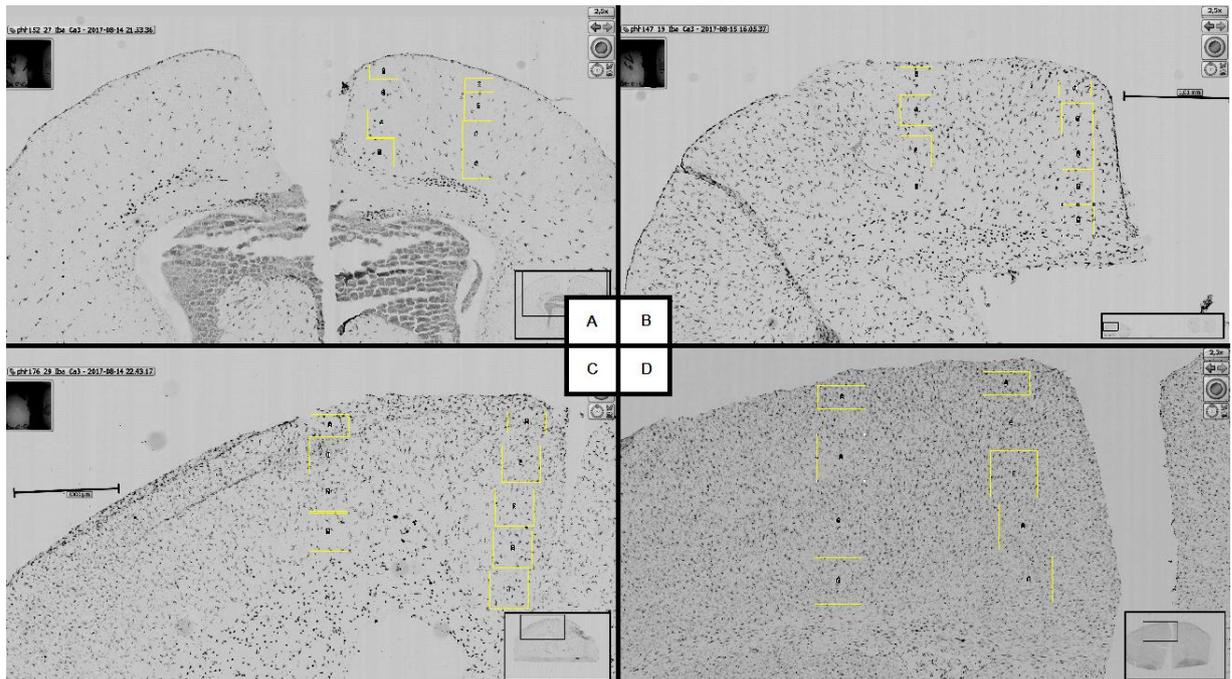


Abbildung 15. Gefrierschnitte von Tieren der Blut-Gruppe mit Färbung von IBA1. Abgebildet sind Schnitte von Tieren der vier verschiedenen Überlebenszeit-Gruppen. Bildabschnitt A: Schnitt eines PT1-Tieres. Bildabschnitt B: Schnitt eines PT3-Tieres. Bildabschnitt C: Schnitt eines PT7-Tieres. Bildabschnitt D: Schnitt eines PT21-Tieres.

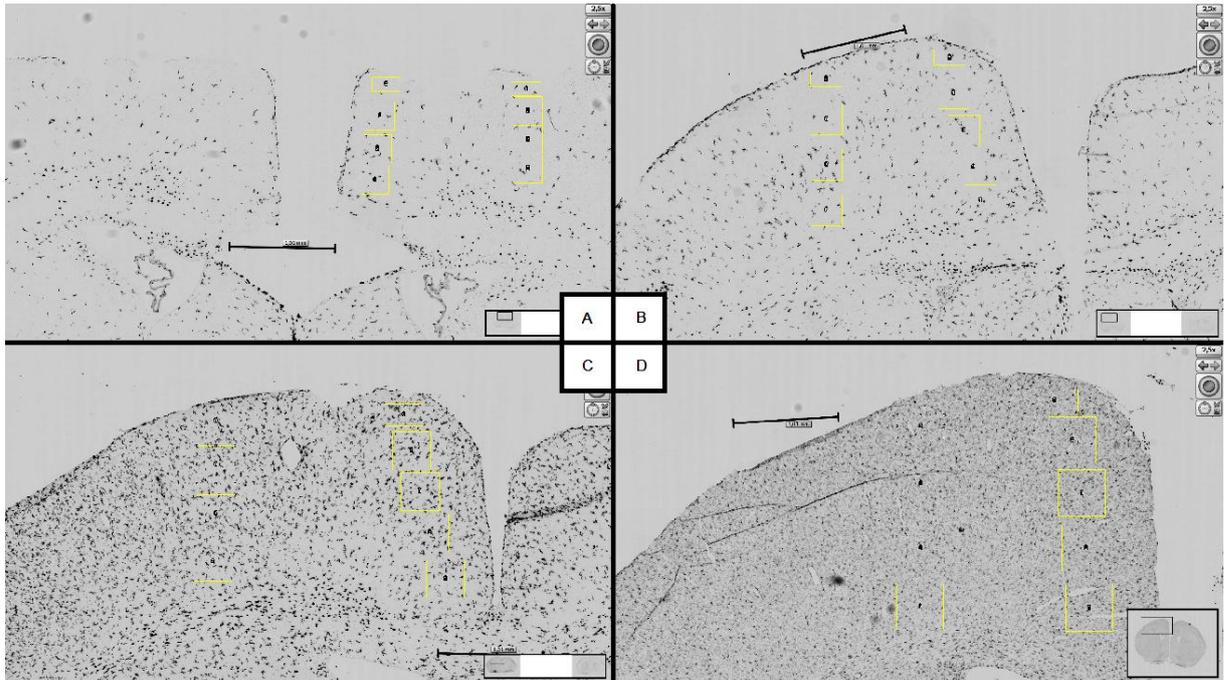


Abbildung 16. Gefrierschnitte von Tieren der NaCl-Gruppe mit Färbung von IBA1. Abgebildet sind Schnitte von Tieren der vier verschiedenen Überlebenszeit-Gruppen. Bildabschnitt A: Schnitt eines PT1-Tieres. Bildabschnitt B: Schnitt eines PT3-Tieres. Bildabschnitt C: Schnitt eines PT7-Tieres. Bildabschnitt D: Schnitt eines PT21-Tieres.

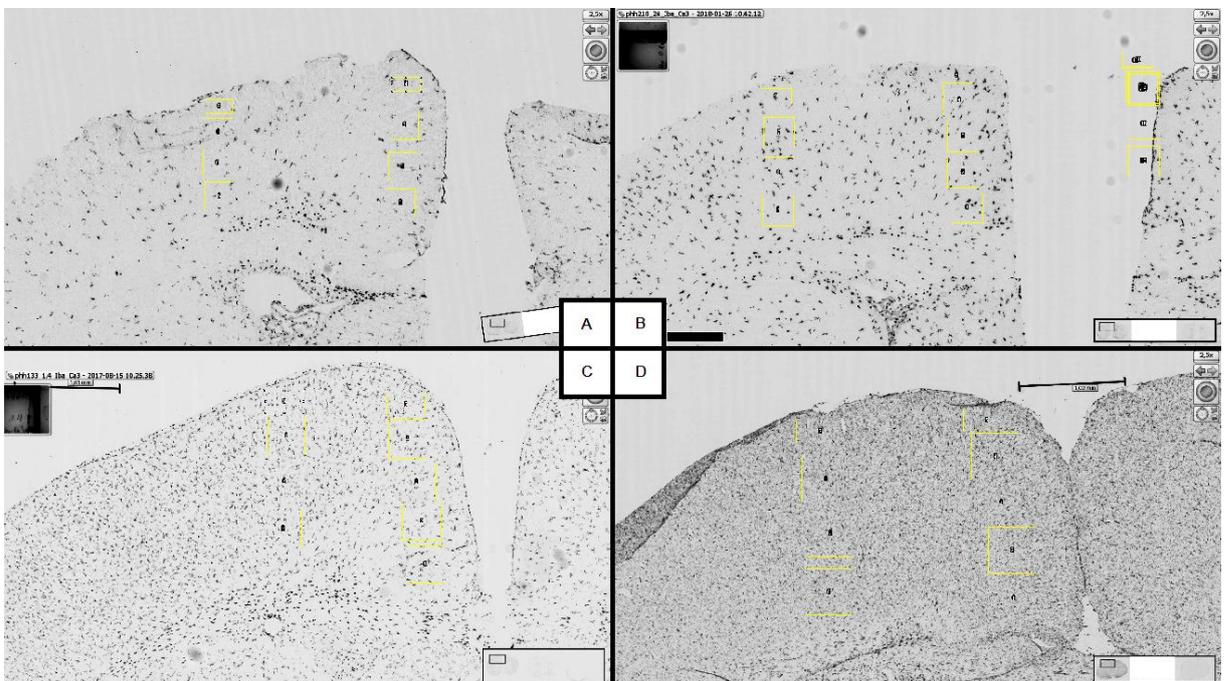


Abbildung 17. Gefrierschnitte von Tieren der Sham-Gruppe mit Färbung von IBA1. Abgebildet sind Schnitte von Tieren der vier verschiedenen Überlebenszeit-Gruppen. Bildabschnitt A: Schnitt eines PT1-Tieres. Bildabschnitt B: Schnitt eines PT3-Tieres. Bildabschnitt C: Schnitt eines PT7-Tieres. Bildabschnitt D: Schnitt eines PT21-Tieres.

### 7.3.3 Immunreaktive Fläche von TNF- $\alpha$

In der TNF- $\alpha$ -Färbung wurde bei der Blut-Gruppe für PT1 in allen Gehirnregionen eine geringere IRF bestimmt als bei der NaCl- und Sham-Gruppe. Der höchste Wert von 6,2 % wurde im cingulären Kortex der Sham-Gruppe bestimmt (SEM=2,1). Der niedrigste Wert lag bei 0,5 % im lateralen Septum pellucidum der Blut-Gruppe (SEM=0,6). Die IRF in der Blut-Gruppe war im cingulären Kortex mit 2,7 % (SEM=2,0) signifikant kleiner als die in der NaCl- mit 6,1 % (SEM=2,7) und Sham-Gruppe mit 6,2 % (SEM=2,1) ( $p < 0,05$ ).

Am PT3 war die gemessene IRF in allen Gehirnregionen und allen Interventionsgruppen geringer als am PT1 und lag zwischen 4,1 % im cingulären Kortex der NaCl-Gruppe (SEM=1,7) und 0,3 % im Striatum der Blut-Gruppe (SEM=0,4). Erneut war die IRF in der Blut-Gruppe in allen Regionen geringer als in den beiden anderen Gruppen. Es zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede.

Bei PT7 lag die IRF zwischen 4,2 % im cingulären Kortex der NaCl-Gruppe (SEM=1,5) und 0,3 % im somatosensorischen Kortex der Blut-Gruppe (SEM=0,3). Die IRF der Blut-Gruppe war erneut in allen Regionen mit Ausnahme des lateralen Septums geringer als in den beiden anderen Gruppen. Im cingulären Kortex der Blut-Gruppe war die IRF von TNF- $\alpha$  mit 1,8% (SEM=2,0) signifikant kleiner als in der NaCl-Gruppe mit 4,2% (SEM=1,5) ( $p < 0,05$ ).

Am PT21 wurden die niedrigsten Werten der IRF von TNF- $\alpha$  gemessen. Die Werte lagen dabei zwischen 2,4 % im cingulären Kortex der Sham-Gruppe (SEM=2,3) und 0,2 % im Striatum der Blut-Gruppe (SEM=0,3). In den Gehirnregionen cingulärer, motorischer und somatosensorischer Kortex war die IRF am PT21 kleiner als zu allen anderen Zeitpunkten.

Es gab zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen (s. Tabelle 4; s. Anhang Tabelle 8).

Tabelle 4. Mittelwerte der IRF bei der Färbung von TNF- $\alpha$  am PT1, 3, 7, sowie 21 in den drei Interventions-Gruppen und den fünf untersuchten Gehirnregionen. Gegenübergestellt ist die jeweilige Standardabweichung der Mittelwerte (SEM).

TNF- $\alpha$ -Färbung PT1						
Gehirnregion	Blut-Gruppe		NaCl-Gruppe		Sham-Gruppe	
	IRF in %	SEM	IRF in %	SEM	IRF in %	SEM
Cingulärer Kortex	<b>2,677</b>	2,020	<b>6,103</b>	2,704	<b>6,193</b>	2,136
Motorischer Kortex	<b>2,526</b>	2,631	<b>3,212</b>	2,857	<b>4,231</b>	1,274
Somatosensorischer Kortex	<b>0,992</b>	1,762	<b>1,565</b>	2,588	<b>0,925</b>	0,784
Striatum	<b>0,543</b>	0,461	<b>2,100</b>	2,842	<b>1,590</b>	1,247
Laterales Septum	<b>0,495</b>	0,594	<b>2,522</b>	3,015	<b>1,470</b>	1,012

TNF- $\alpha$ -Färbung PT3						
Gehirnregion	Blut-Gruppe		NaCl-Gruppe		Sham-Gruppe	
	IRF in %	SEM	IRF in %	SEM	IRF in %	SEM
Cingulärer Kortex	<b>2,190</b>	1,763	<b>4,134</b>	1,661	<b>3,626</b>	2,821
Motorischer Kortex	<b>1,555</b>	1,391	<b>2,335</b>	1,103	<b>2,155</b>	1,602
Somatosensorischer Kortex	<b>0,461</b>	0,311	<b>0,481</b>	0,435	<b>0,826</b>	0,981
Striatum	<b>0,321</b>	0,400	<b>0,772</b>	0,404	<b>0,862</b>	1,404
Laterales Septum	<b>0,425</b>	0,462	<b>0,569</b>	0,502	<b>0,871</b>	1,214

TNF- $\alpha$ -Färbung PT7						
Gehirnregion	Blut-Gruppe		NaCl-Gruppe		Sham-Gruppe	
	IRF in %	SEM	IRF in %	SEM	IRF in %	SEM
Cingulärer Kortex	<b>1,830</b>	2,000	<b>4,231</b>	1,451	<b>3,359</b>	2,011
Motorischer Kortex	<b>1,640</b>	1,397	<b>3,169</b>	0,990	<b>2,326</b>	1,542
Somatosensorischer Kortex	<b>0,286</b>	0,323	<b>0,576</b>	0,346	<b>0,668</b>	0,619
Striatum	<b>0,595</b>	0,799	<b>1,583</b>	1,276	<b>0,887</b>	0,887
Laterales Septum	<b>0,944</b>	1,332	<b>2,456</b>	3,184	<b>0,910</b>	1,079

TNF- $\alpha$ -Färbung PT21						
Gehirnregion	Blut-Gruppe		NaCl-Gruppe		Sham-Gruppe	
	IRF in %	SEM	IRF in %	SEM	IRF in %	SEM
Cingulärer Kortex	<b>1,111</b>	1,591	<b>1,628</b>	0,869	<b>2,410</b>	2,312
Motorischer Kortex	<b>0,855</b>	1,023	<b>0,822</b>	0,706	<b>1,039</b>	0,889
Somatosensorischer Kortex	<b>0,143</b>	0,171	<b>0,250</b>	0,383	<b>0,493</b>	0,550
Striatum	<b>0,190</b>	0,331	<b>0,213</b>	0,284	<b>0,883</b>	1,052
Laterales Septum	<b>0,590</b>	1,193	<b>0,920</b>	1,193	<b>1,951</b>	2,080

### 7.3.4 Immunreaktive Fläche von HMGB1

Die IRF von HMGB1 am PT1 war in den drei Interventionsgruppen in nahezu allen Gehirnregionen größer als zu den späteren Zeitpunkten. Insbesondere im cingulären Kortex, motorischen Kortex und somatosensorischen Kortex ergab sich eine starke Färbung. Im cingulären Kortex der Sham-Gruppe lag die IRF bei 11,2 % (SEM=3,7). Die Werte in den anderen Gruppen waren vergleichbar hoch. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen.

Am PT3 waren die IRF mit Werten zwischen 8,7 % im cingulären Kortex der Blut-Gruppe (SEM=3,2) und 1,1 % im lateralen Septum der Blut-Gruppe (SEM=1,5) zu meist kleiner als am PT1. Im somatosensorischen Kortex ergab sich ein signifikanter Unterschied der Sham-Gruppe gegenüber der NaCl-Gruppe mit einem Mittelwert von 4,3% bei der Sham- (SEM=2,1) und 1,6% bei der NaCl-Gruppe (SEM=1,3) ( $p < 0,05$ ).

Zum Zeitpunkt PT7 ergaben sich Werte zwischen 6,2 % im cingulären Kortex der Sham-Gruppe (SEM=1,3) und 1,0 % im lateralen Septum der Blut-Gruppe (SEM=0,8). Es gab folglich keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen.

Am PT21 wurde erneut ein leichter Anstieg der IRF im Vergleich zu PT7 gemessen. Die Mittelwerte der Gruppen lagen in diesem Fall zwischen 6,8 % im cingulären Kortex der NaCl-Gruppe (SEM=2,5) und 2,0 % im Striatum der Blut-Gruppe (SEM=2,7). Einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen gab es nicht (s. Tabelle 5; s. Anhang Tabelle 9)

Tabelle 5. Mittelwerte der IRF bei der Färbung von HMGB1 am PT1, 3, 7, sowie 21 in den drei Interventions-Gruppen und den fünf untersuchten Gehirnregionen. Gegenübergestellt ist die jeweilige Standardabweichung der Mittelwerte (SEM).

HMGB1-Färbung PT1						
Gehirnregion	Blut-Gruppe		NaCl-Gruppe		Sham-Gruppe	
	IRF in %	SEM	IRF in %	SEM	IRF in %	SEM
Cingulärer Kortex	<b>9,054</b>	3,594	<b>9,472</b>	2,497	<b>11,136</b>	3,702
Motorischer Kortex	<b>8,403</b>	2,495	<b>7,940</b>	2,903	<b>10,302</b>	5,064
Somatosensorischer Kortex	<b>4,960</b>	2,673	<b>3,834</b>	1,745	<b>5,808</b>	5,054
Striatum	<b>2,949</b>	2,920	<b>4,489</b>	2,479	<b>4,685</b>	2,906
Laterales Septum	<b>2,762</b>	3,195	<b>4,553</b>	2,535	<b>3,115</b>	1,872

HMGB1-Färbung PT3						
Gehirnregion	Blut-Gruppe		NaCl-Gruppe		Sham-Gruppe	
	IRF in %	SEM	IRF in %	SEM	IRF in %	SEM
Cingulärer Kortex	<b>8,694</b>	3,245	<b>5,656</b>	2,899	<b>8,415</b>	1,795
Motorischer Kortex	<b>6,609</b>	3,625	<b>4,470</b>	2,430	<b>7,670</b>	2,031
Somatosensorischer Kortex	<b>3,638</b>	2,653	<b>1,622</b>	1,328	<b>4,318</b>	2,102
Striatum	<b>1,465</b>	1,357	<b>2,321</b>	2,839	<b>4,006</b>	1,803
Laterales Septum	<b>1,142</b>	1,488	<b>2,022</b>	2,667	<b>3,411</b>	1,779

HMGB1-Färbung PT7						
Gehirnregion	Blut-Gruppe		NaCl-Gruppe		Sham-Gruppe	
	IRF in %	SEM	IRF in %	SEM	IRF in %	SEM
Cingulärer Kortex	<b>3,472</b>	3,082	<b>4,395</b>	2,633	<b>6,226</b>	1,309
Motorischer Kortex	<b>2,935</b>	2,417	<b>2,935</b>	2,417	<b>3,548</b>	2,197
Somatosensorischer Kortex	<b>2,248</b>	1,450	<b>1,444</b>	1,104	<b>3,411</b>	2,725
Striatum	<b>1,542</b>	1,343	<b>1,719</b>	1,528	<b>1,962</b>	1,591
Laterales Septum	<b>1,079</b>	0,837	<b>1,480</b>	1,273	<b>1,859</b>	1,260

HMGB1-Färbung PT21						
Gehirnregion	Blut-Gruppe		NaCl-Gruppe		Sham-Gruppe	
	IRF in %	SEM	IRF in %	SEM	IRF in %	SEM
Cingulärer Kortex	<b>6,744</b>	2,370	<b>6,756</b>	2,502	<b>6,156</b>	1,099
Motorischer Kortex	<b>5,945</b>	2,960	<b>5,209</b>	2,067	<b>4,939</b>	0,674
Somatosensorischer Kortex	<b>3,666</b>	2,740	<b>3,076</b>	1,701	<b>2,689</b>	1,008
Striatum	<b>2,055</b>	2,685	<b>3,084</b>	2,943	<b>2,836</b>	1,272
Laterales Septum	<b>2,448</b>	2,266	<b>3,639</b>	2,266	<b>3,446</b>	1,737

#### 7.4 Korrelation zwischen immunreaktiver Fläche und Ventrikelfläche

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Entzündungsreaktion und der Ventrikelausdehnung in der Blut-Gruppe zu untersuchen, wurden die Ergebnisse der IRF und der Ventrikelfläche mithilfe einer Spearman Korrelation verglichen. Die Korrelation wurde dabei in der Blut-Gruppe für alle Überlebenszeitpunkte und bei allen Entzündungsmarkern bestimmt.

Die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen gemessener immunreaktiver Fläche von GFAP in den verschiedenen Gehirnregionen und der Ventrikelgröße in der Sagittalebene ergab in keiner der Überlebenszeit-Gruppen eine signifikante Korrelation (s. Anhang Tabelle 10).

Bei IBA1 zeigte sich bei den PT1-Tieren eine starke negative Korrelation zwischen gemessener immunreaktiver Fläche und Ventrikelgröße (s. Abbildung 18). Signifikante Zusammenhänge ergaben sich im cingulären Kortex (Korrelationskoeffizient:  $-0,750$ ;  $p < 0,05$ ), im motorischen Kortex (Korrelationskoeffizient:  $-0,817$ ;  $p < 0,01$ ), im periventrikulären Striatum (Korrelationskoeffizient:  $-0,850$ ;  $p < 0,001$ ) und im lateralen Septum pellucidum (Korrelationskoeffizient:  $-0,883$ ;  $p < 0,000001$ ) (s. Abbildung 18). Bei den PT3-Tieren war der Korrelationskoeffizient der Spearman-Korrelation ebenfalls in allen untersuchten Gehirnregionen negativ. Ein signifikanter Zusammenhang ergab sich jedoch nur im somatosensorischen Kortex (Korrelationskoeffizient:  $-0,786$ ;  $p < 0,05$ ). Am PT7 und PT21 traten keine signifikanten Zusammenhänge auf (s. Anhang Tabelle 11).

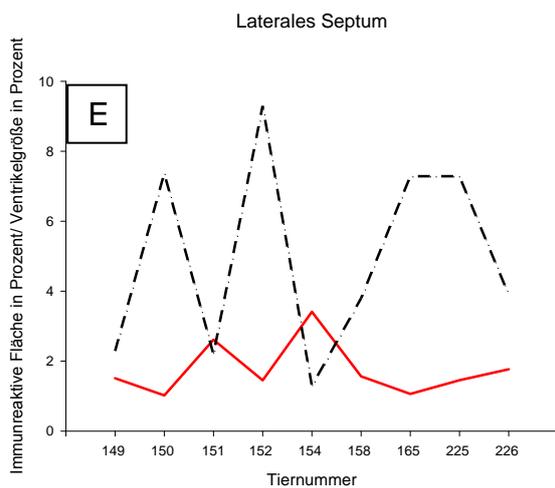
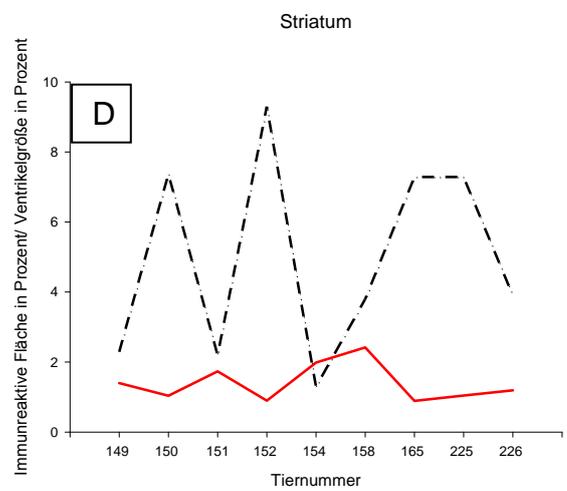
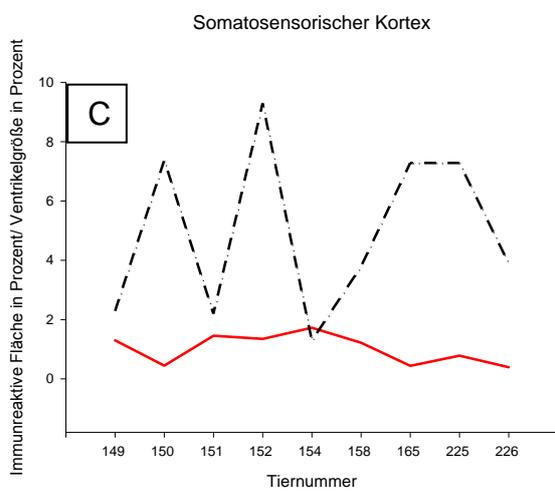
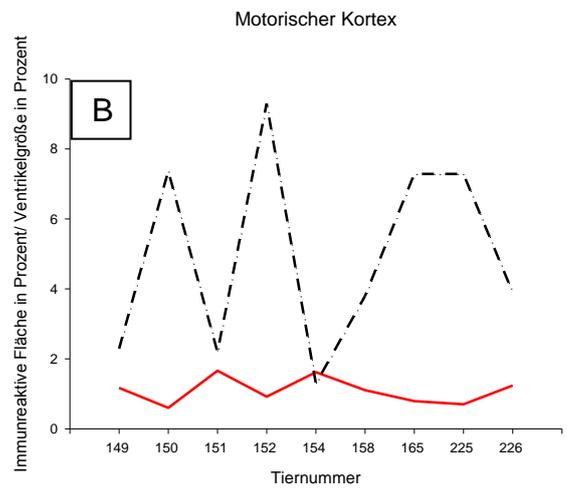
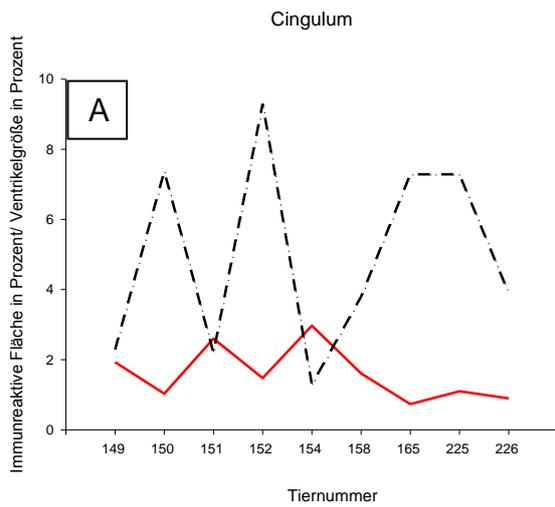


Abbildung 18. Liniendiagramm zur Visualisierung der Korrelation von Ventrikelgröße und IRF von IBA1 in der Blut-Gruppe an PT1. Zur Veranschaulichung der Korrelation von immunreaktiver Fläche und Ventrikelgröße der Gehirne sind beide Größen für jedes der 9 Blut-Tiere an PT1 dargestellt und zu einer Linie verbunden. Die rote Linie stellt die IRF von IBA1 in Prozent der Fläche der ROIs dar. Die schwarze Linie stellt die Ventrikelgröße in Prozent der Gesamtquerschnittsfläche des jeweiligen Gehirns dar. Cingulärer Kortex (A), motorischer Kortex (B), somatosensorischer Kortex (C), Striatum (D), laterales Septum pellucidum (E).

Bei der Färbung von TNF- $\alpha$  bestand zum Zeitpunkt PT3 eine signifikante Korrelation in den periventrikulären Bereichen des Striatums (Korrelationskoeffizient: 0,786;  $p < 0,05$ ) und des lateralen Septum pellucidum (Korrelationskoeffizient: 0,881;  $p < 0,000001$ ). Im Falle der PT21-Tiere ergab sich als einziges signifikantes Ergebnis ein negativer Korrelationskoeffizient der Spearman Korrelation von -0,721 ( $p < 0,05$ ) zwischen der IRF der Blut-Gruppe und der Ventrikelgröße im somatosensorischen Kortex (s. Anhang Tabelle 12).

Die IRF von HMGB1 und Ventrikelgröße zeigten eine signifikant starke Korrelation zum Zeitpunkt PT21 im cingulären Kortex (Korrelationskoeffizient: 0,624,  $p < 0,05$ ) und in den periventrikulären Bereichen des Striatum (Korrelationskoeffizient: 0,855,  $p < 0,000001$ ) und des lateralen Septum pellucidum (Korrelationskoeffizient: 0,891  $p < 0,000001$ ) (s. Abbildung 19).

In den anderen Überlebenszeit-Gruppen gab es bei HMGB1 keine signifikante Korrelation mit der Ventrikelfläche (s. Anhang Tabelle 13).

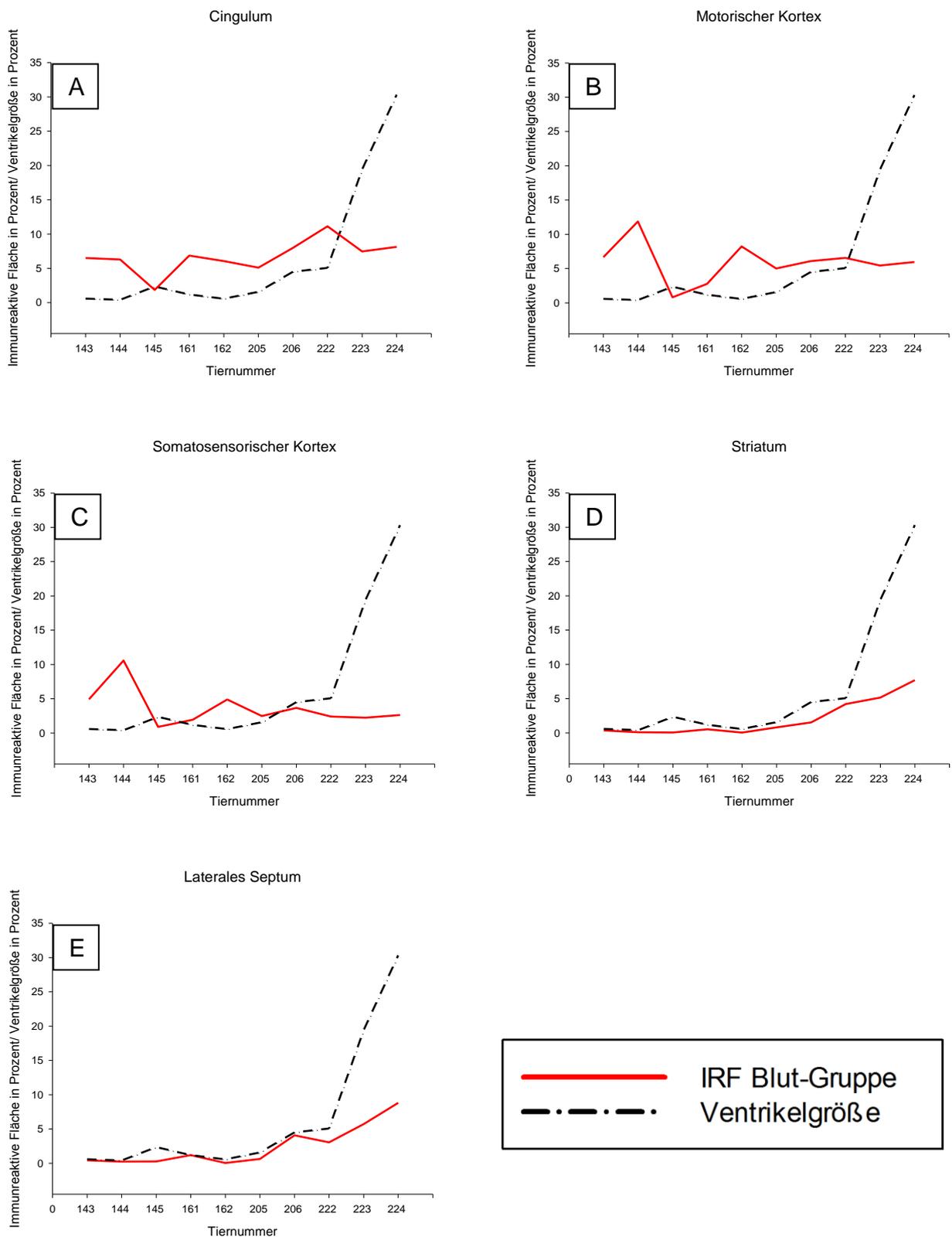


Abbildung 19. Liniendiagramm zur Visualisierung der Korrelation von Ventrikelgröße und IRF von HMGB1 in der Blut-Gruppe am PT21. Zur Veranschaulichung der Korrelation von immunreaktiver Fläche und Ventrikelgröße der Gehirne sind beide Größen für jedes der 10 Blut-Tiere am PT21 dargestellt und zu einer Linie verbunden. Die rote Linie stellt die IRF von HMGB1 in Prozent der Fläche der ROIs dar. Die schwarze Linie stellt die Ventrikelgröße in Prozent der Gesamtquerschnittsfläche des jeweiligen Gehirns dar. Cingulärer Kortex (A), motorischer Kortex (B), somatosensorischer Kortex (C), Striatum (D), laterales Septum pellucidum (E).

## **8. Diskussion**

### **8.1 Gegenstände der Diskussion**

Das durch unsere Arbeitsgruppe durchgeführte und in dieser Arbeit beschriebene Experiment diente der Erforschung der Pathophysiologie des PHH nach IVH bei Frühgeborenen.

Durch Corinna Leistner wurden die Veränderung der Größe der Seitenventrikel, der entstandene neuronale und axonale Schaden sowie die Aktivierung apoptotischer Prozesse untersucht (Leistner 2020).

Die Arbeit von Tim Külzer befasst sich mit der Beeinträchtigung des zerebralen Wasserhaushaltes und der Blut-Hirn-Schranke infolge der IVH (Külzer 2020).

In der vorliegenden Arbeit soll vor allem auf die Rolle der Entzündung in der Pathophysiologie des PHH eingegangen werden.

Im Folgenden sollen das Studiendesign und die angewandten Methoden kritisch beleuchtet werden. Schwerpunkt der Methodenkritik wird das Tiermodell darstellen.

Im Anschluss werden die drei aufgestellten Hypothesen diskutiert. Die Diskussion beschäftigt sich insbesondere mit der Rolle der Entzündungsreaktion in der Entwicklung des PHH. Die Resultate sollen im Kontext anderer Studien interpretiert und eine mögliche Erklärung der Ergebnisse gefunden werden.

### **8.2 Methodenkritik**

#### **8.2.1 Das Tiermodell**

Aus 9 Würfen wurden insgesamt 108 Jungtiere beider Geschlechter für die Versuche verwendet. 7 Tiere, darunter 2 aus der NaCl und 5 aus der Blut-Gruppe, wurden aufgrund ihres Todes vor der geplanten Gehirnentnahme von der Auswertung ausgeschlossen. Bei einem weiteren Tier erfolgte die Bestimmung der Ventrikelgröße und der Immunmarker nur an der linken Hemisphäre, weil die rechte bei der Gehirnentnahme beschädigt wurde.

### 8.2.1.1 Intraventrikuläre Blutinjektion

Durch eine intraventrikuläre Blutung am ersten postnatalen Tag sollte die Entwicklung eines Hydrozephalus ausgelöst werden. Um die intraventrikuläre Blutung und den daraus resultierenden Hydrozephalus nachzustellen, gibt es bereits mehrere Tiermodelle. Alle haben dabei ihre Limitationen. Keines davon ist geeignet, alle Teilaspekte der Pathophysiologie des PHH sowie der folgenden zerebralen Schädigung zu untersuchen (Balasubramaniam and Del Bigio 2006).

Es existieren Modelle zur Erforschung des Hydrozephalus, welche ohne eine intraventrikuläre Blutung auskommen. Bei H-Tx-Ratten tritt durch eine genetisch bedingte Liquor-Abflussstörung 4 Tage vor bis 5 Tage nach der Geburt bei 33 % der Tiere ein Hydrozephalus auf (Jones et al. 2004; Miller and McAllister 2007). Das genetische Modell eignet sich dadurch jedoch nur zur Erforschung der Folgen eines Hydrozephalus und nicht für eine Untersuchung der Pathophysiologie des PHH.

Um die hohen Blutdrücke zu simulieren, welche bei Geburt eine IVH begünstigen, wird in einem anderen Modell versucht, bei neugeborenen Ratten durch medikamentös erzeugte hohe intrazerebrale Blutdrücke eine Hämorrhagie der germinalen Matrix (GMH) zu provozieren (Strahle et al. 2012). Dadurch wird die Pathophysiologie des PHH nach IVH zwar realistischer imitiert, der Blutungszeitpunkt sowie die Blutmenge können jedoch stark variieren (Strahle et al. 2012).

Um den Zeitpunkt und das Ausmaß der Blutung genau zu kontrollieren und zugleich die Pathophysiologie des PHH zu untersuchen, kann eine IVH bei Rattenjungen durch eine Blutinjektion herbeigeführt werden (Gao et al. 2014; Robinson et al. 2018; Cherian et al. 2003; Ahn et al. 2013). Der Zeitpunkt der Blutung kann dabei so gewählt werden, dass er mit der realen Situation bei menschlichen Frühgeborenen korreliert. Das Blutvolumen, welches injiziert wird, kann ebenfalls sehr genau festgelegt und vergleichbar gemacht werden. Folglich wurde in diesem Experiment versucht, ein PHH durch eine intraventrikuläre Injektion von Blut in die Seitenventrikel von ein oder zwei Tage alten Ratten zu erzeugen.

Unter den einzelnen Tiermodellen, welche eine Blutinjektion zur Erzeugung eines PHH verwenden, variiert die Art des zur Injektion verwendeten Bluts.

In einigen Studien werden lysierte Erythrozyten verwendet (Gao et al. 2014), in anderen wiederum Vollblut (Balasubramaniam et al. 2006) (Chen et al. 2010) oder zentrifugiertes Zitratblut (Cherian et al. 2003). In dieser Studie wurde Vollblut injiziert, da in der Entstehung des PHH bei frühgeborenen Menschen mit IVH ebenfalls Vollblut ins Liquorsystem austritt. Nur im Vollblut sind dementsprechend alle möglicherweise ursächlichen Blutbestandteile vorhanden. Sollte die Entstehung des PHH kausal mit der Blutgerinnung zusammenhängen, so könnte der Zusatz von Zitrat die Ergebnisse verfälschen. Die Verwendung von lysierten Erythrozyten hat zur Folge, dass Zellinhalte wie Hämoglobin und Eisen, welche im Pathomechanismus des PHH ebenfalls eine Rolle spielen, schon früh zusätzlich den zerebralen Blutfluss und die Blut-Hirn-Schranke stören (Gao et al. 2014).

In der Konsequenz wählten wir zur möglichst realistischen Simulation einer IVH Vollblut als für unser Vorhaben am besten geeignete Injektionsflüssigkeit aus.

#### **8.2.1.2 Verwendung von Donorratten**

In unserem Versuch wurde das Blut wie auch von Cherian SS et al. und Ahn S.Y. et al. beschrieben von einer erwachsenen Donorratte des gleichen Rattenstammes gewonnen (Cherian et al. 2003; Ahn et al. 2013). Alternative Möglichkeiten wären die Gewinnung des Donorblutes aus Geschwistertieren oder die Verwendung autologen Blutes gewesen (Robinson et al. 2018; Gao et al. 2014; Balasubramaniam et al. 2006). Das Blut der Geschwistertiere oder autologes Blut wären aufgrund der niedrigeren Immunogenität zur Untersuchung der Pathophysiologie des PHH besser geeignet. Die Blutgewinnung bei ein bis zwei Tage alten Rattenjungern gestaltet sich jedoch sehr schwierig. Zudem können an neugeborenen Ratten nur geringe Mengen Blut entnommen werden (Balasubramaniam et al. 2006). Die verhältnismäßig hohe Menge von 200 µl Blut pro Interventionstier hätte von einem einzelnen Jungtier kaum entnommen werden können. Aus diesen Gründen wurde für die Studie Donorblut einer erwachsenen Donorratte verwendet.

Überdies muss das Vollblut nach Gewinnung direkt appliziert werden, ehe es gerinnt. Die Injektion des Blutes erfolgte in anderen Tiermodellen direkt per Hand durch eine Spritze mit Injektionsnadel oder mithilfe einer Mikroinfusionspumpe (Balasubramaniam et al. 2006; Gao et al. 2014). Um das Blut mit einer konstanten Flussrate applizieren zu können, wurde in unserem Experiment ebenfalls eine

Mikroinfusionspumpe verwendet. Die konstante Infusionsrate betrug 50 µl/Minute. Der Einsatz der Pumpe bedingte eine schnelle und zuverlässige Methode der Donorblut-Gewinnung, da sonst das Vollblut während der Entnahme oder Applikation geronnen wäre. Auch dies sprach für die Verwendung von erwachsenen Donorratten, da bei diesen die Blutentnahme deutlich schneller durchgeführt werden kann.

In der klinischen Realität kommt es bei Frühgeborenen mit großer IVH zu erheblichen Blutverlusten (Cherian et al. 2003). Dieser Blutverlust, der damit einhergehende Abfall des Hämoglobinspiegels sowie der Volumenmangel wird durch unser Tiermodell mit der Injektion von Donorblut nicht imitiert. Eine Injektion der neugeborenen Ratten mit autologem Blut hätte auch den Hämoglobin- und Volumenmangel abgebildet.

Um die Effekte der Verletzung des Kortex bei der Injektion sowie die Auswirkungen von Volumenbelastung und Anstieg des intrakraniellen Drucks zu kontrollieren, wurden in dieser Studie Ratten der NaCl-Kontrollgruppe mit Natriumchloridlösung injiziert. In anderen Rattenmodellen zur IVH wurden zu diesem Zweck ebenfalls eine Natriumchloridlösung (Balasubramaniam et al. 2006; Gao et al. 2014;) oder künstlicher Liquor verwendet (Cherian et al. 2003).

### **8.2.1.3 Gruppeneinteilung und Gewichtsentwicklung**

Um die für die Studie nötige Anzahl an Blut-Injektionen durchführen zu können ohne die Donorratten unnötig lange in Narkose zu halten oder ihren Tod vor Beendigung des Operationstages zu riskieren, entschieden wir uns, stets eine Reihe von Blut-Tieren in Folge zu operieren. So konnten an einem Tag und unter Verwendung eines Donortieres bis zu 13 Blut-Tiere operiert werden. Die Versuchstiere wurden dadurch nicht vor jeder Intervention einer der drei Gruppen randomisiert zugeordnet und die Interventions- und Kontroll-Tiere waren in den 9 Würfen folglich nicht zufällig verteilt. Die dadurch entstandene Stichprobenverzerrung könnte somit zur Beeinträchtigung unserer Ergebnisse geführt haben. Die anschließende Zuordnung zu den 4 Überlebenszeit-Gruppen erfolgte jedoch zufällig. Somit wurden die Ergebnisse zum zeitlichen Verlauf der Entzündungsreaktion innerhalb einer Gruppe nicht beeinträchtigt.

Die Anzahl der Jungtiere pro Wurf schwankte nach der Geburt zwischen 11 und 18. Die fehlende Randomisierung zu Beginn des Versuchs und die gleiche Intervention an mehreren Jungtieren in Folge führten dazu, dass die Blut-Gruppe zu einem Großteil aus Jungtieren großer Würfe bestand. Die Blut-Tiere hatten im Durchschnitt 13,8 Geschwister (SEM=2,6). Die NaCl-Tiere hingegen 11,9 (SEM=1,8) und die Sham-Tiere 13,0 (SEM=1,7). Die Spearman-Rank-Order-Korrelation zeigte dabei einen schwachen, jedoch signifikanten negativen Zusammenhang zwischen dem Geburtsgewicht der Jungtiere und der Anzahl an Tieren pro Wurf. Der Korrelationskoeffizient der Spearman-Korrelation lag bei -0,281 ( $p < 0,01$ ). Dadurch kann erklärt werden, warum die Blut-Tiere zu Beginn des Experiments signifikant leichter waren als die Tiere der anderen Gruppen. Erst als zu den Zeitpunkten PT1 und PT3 die Hälfte der Ratten durch Euthanasie aus dem jeweiligen Wurf entfernt wurden, begann sich der Unterschied auszugleichen. Nach PT7 änderte sich die Anzahl der Jungtiere im Käfig erneut und war zum Teil wieder unausgeglichen. Die Anzahl an Jungtieren pro Käfig zwischen PT7 und PT21 schwankte dabei zwischen 2 und 8. Bei den Blut-Tieren waren im Durchschnitt 4,2 (SEM=1,9), bei den NaCl-Tieren 5,75 (SEM=0,5) und bei den Sham-Tieren 7,7 Jungtiere (SEM=0,5) im Käfig. Die Gewichtszunahme während dieser Zeit weist einen deutlichen negativen Zusammenhang mit der Anzahl von Jungtieren pro Käfig auf. Der Korrelationskoeffizient der Spearman-Korrelation lag in diesem Fall bei -0,588 ( $p < 0,001$ ). Je weniger Jungtiere in einem Käfig lebten, desto mehr legten sie an Gewicht zu. Wir konnten daher das signifikant höhere Gewicht der NaCl-Tiere zum Ende des Versuchs mit einer besseren Versorgung mit Muttermilch und Futter durch geringere Konkurrenz erklären.

#### **8.2.1.4 Injektionsvolumen**

Das Blutvolumen erwachsener Ratten liegt bei ca. 6,2 bis 6,8 ml/100g Körpergewicht, wobei das Blutvolumen bei kleineren Tieren im Verhältnis höher ist als bei großen (Lee and Blaufox 1985). Die 200  $\mu$ l an injizierter Flüssigkeit entsprechen demnach etwa 37 % des Blutvolumens unserer Versuchstiere zum Zeitpunkt der Operation. Die Menge wurde bewusst so hoch gewählt, da in vorausgegangenen Versuchsreihen durch kleinere Injektionsvolumina kein Hydrozephalus hervorgerufen werden konnte. Bei frühgeborenen Menschen treten

ebenfalls große intraventrikuläre Blutungen auf. Das Blutvolumen ist dabei mit dem in unserer Studie eingesetzten vergleichbar. Es kommt dabei zu Abfällen des Hämoglobinwertes von bis zu 50 % (Cherian et al. 2003).

Die Injektionsmenge von 200 µl wurde auch von Ahn S.Y. et al. verwendet. Die Autoren begründen dies damit, dass sie mit einem höheren Injektionsvolumen in ihrem Tiermodell häufiger einen PHH verursachen konnten als mit einem kleineren (Ahn et al. 2013). Bei deren erster Versuchsreihe mit biventrikulärer Injektion von weniger als 100 µl entwickelten von 35 Tieren lediglich 2 (6 %) einen Hydrozephalus. Bei der zweiten Versuchsreihe mit biventrikulärer Injektion von je 100 µl zeigten 11 der 13 Tiere (85 %) einen Hydrozephalus. Die Injektionen fanden jeweils am 4. Tag nach Geburt, die Gehirnentnahmen nach 32 Tagen statt (Ahn et al. 2013).

#### **8.2.1.5 Zeitpunkt der IVH**

Der Zeitpunkt der intraventrikulären Injektion am ersten und zweiten postnatalen Tag wurde gewählt, da der Entwicklungsstand des Rattengehirns zum Zeitpunkt der Geburt einschließlich Myelinisierung und Neurogenese dem eines menschlichen Kindes der 24.-26 SSW sehr ähnlich ist (Balasubramaniam and Del Bigio 2006; Semple et al. 2013). Die Intervention zu diesem Zeitpunkt imitiert folglich die IVH bei sehr unreifen menschlichen Frühgeborenen am besten. Eine Reihe weiterer Rattenmodelle verwenden denselben Interventionszeitpunkt (Khan et al. 2006; Robinson et al. 2018; Balasubramaniam et al. 2006).

#### **8.2.2 Immunreaktive Fläche der Entzündungsmarker**

Immunhistochemische Methoden zur Ergründung der Pathophysiologie verschiedenster Schädigungen des Gehirns finden breite Anwendung (Ward and Rehg 2014). Um durch Immunhistochemie ein bestimmtes Protein bestimmen zu können, muss die Methode zugleich sensibel, spezifisch, reproduzierbar und robust sein (Torlakovic et al. 2017).

In unserer Studie wurde durch eine Reihe von Probefärbungen mit unterschiedlichen Konzentrationen des Primär-Antikörpers versucht, die optimale Färbeintensität mit möglichst geringer unspezifischer Färbung zu finden. Es erfolgte dabei jedoch keine standardisierte Überprüfung der Sensibilität und Spezifität der verwendeten Immunmarker. Auf jedem gefärbten Objektträger befanden sich 3 Gehirnschnitte von

denen einer als Negativkontrolle diente. Auf diesem wurde dementsprechend kein Primär-Antikörper aufgebracht. Dadurch wurde zwar die Spezifität der Färbung des Chromo-gens, nicht jedoch die des Primär-Antikörpers überprüft.

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurde bei den Probefärbungen durch den Vergleich der beiden gefärbten Schnitte pro Objektträger überprüft. Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden die Arbeitsschritte möglichst einheitlich gehalten. Von der Entnahme der Gehirne bis zur Färbung wurde auf eine exakte Einhaltung des Protokolls und der vorgesehenen Fixier-, Wasch- und Färbzeiten geachtet. Dennoch können präanalytische Variationen beispielsweise in der Qualität der Perfusionsfixierung aufgetreten sein.

Ob unsere immunhistochemische Färbemethode die Robustheit besitzt, trotz solcher Variationen vergleichbare Ergebnisse zu garantieren, wurde nicht überprüft. Dies sollte bei Reproduktion der Studie oder Durchführung von Anschlussstudien getan werden.

Es muss außerdem bedacht werden, dass die Immunhistochemie kein gutes Maß für die Konzentration eines Proteins innerhalb einer Zelle darstellt (Deren et al. 2010). Die Immunhistochemie ist eine deskriptive, qualitative Analyseverfahren. Eine genaue Quantifizierung eines Antigens ist nicht möglich (Torlakovic et al. 2017).

### **8.3 Diskussion der aufgestellten Hypothesen**

Die Hypothesen der im Rahmen dieser Arbeit behandelten Studie waren die Folgenden:

Hypothese 1: Eine intraventrikuläre Blutung innerhalb der ersten beiden postnatalen Tage löst die Entwicklung eines Hydrozephalus aus.

Hypothese 2: Eine intraventrikuläre Blutung innerhalb der ersten beiden postnatalen Tage führt zu einer langandauernden Entzündungsreaktion.

Hypothese 3: Die Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten und die damit verbundene Entzündungsreaktion, gemessen an den Markern IBA1, GFAP, TNF- $\alpha$  und HMGB1, sind an der Entwicklung des PHH maßgeblich beteiligt.

#### **8.3.1 Auftreten eines PHH in unserem Modell**

Um Hypothese 1 zu testen, wurde die Größe der Seitenventrikel unserer Versuchstiere zu den jeweiligen Überlebenszeitpunkten PT1, PT3, PT7 und PT21 bestimmt (Leistner 2020).

Corinna Leistner zeigte in ihrer Doktorarbeit, dass die induzierte intraventrikuläre Blutung innerhalb der ersten beiden postnatalen Tage bei einzelnen Tieren die Entwicklung eines Hydrozephalus auslöste (Leistner 2020). Die intraventrikuläre Blutung führte dabei ähnlich wie beim Menschen nicht in allen Fällen zur Entstehung eines PHH. Unser Tiermodell erzeugte, wie aus der Doktorarbeit von Corinna Leistner ersichtlich wird, trotz eines hohen Injektionsvolumens von beidseits jeweils 100  $\mu$ l einen deutlich niedrigeren Anteil an Hydrozephalien als in andere Rattenmodellen (Leistner 2020). Keines der 8 Blut-Tiere entwickelte am PT7 einen messbaren Hydrozephalus. Von den 10 Blut-Tieren am PT21 zeigten insgesamt 3 eine Ventrikelgröße von mehr als 4,74 %, was als Schwellenwert für den Hydrozephalus am PT21 definiert wurde (Leistner 2020). Bei zwei Tieren war der Hydrozephalus mit einer Ventrikelgröße von 19,4 % beziehungsweise 30,3 % der Gehirnquerschnittsfläche sehr stark ausgeprägt. Zum Zeitpunkt PT21 hatte keines

und am PT7 nur eines der 8 mit Natriumchloridlösung behandelten Tiere einen Hydrozephalus (Leistner 2020).

Es bleibt die Frage, warum die Rate an Hydrozephalien in unserem Experiment deutlich geringer ausgefallen ist, als dies in anderen Tiermodellen der Fall ist.

Ahn S.Y. et al. beispielsweise injizierten genau wie unsere Arbeitsgruppe beidseits 100 µl Blut und verursachen damit in 85 % der Fälle einen PHH (Ahn et al. 2013). Die Injektion wurde 4 Tage nach Geburt durchgeführt und die Ventrikel wurden 32 Tage nach Geburt gemessen. Unser Tiermodell erzeugte trotz eines hohen Injektionsvolumens im Vergleich einen deutlich niedrigeren Anteil an Hydrozephalien.

In wieder anderen Studien wurden jedoch vergleichbar niedrige Raten an Hydrozephalien provoziert wie in unserem Fall. In einem Mausmodell konnte bei periventrikulärer Injektion von 15 µl autologen Bluts trotz deutlich messbarer Schädigung des periventrikulären Gewebes nur eine leichte Ventrikelerweiterung festgestellt werden (Xue et al. 2003). Die Injektion fand dabei einen Tag nach der Geburt statt. Die Ventrikelgröße wurde zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen 4 Stunden und 28 Tagen nach der Intervention gemessen. In dem Rattenmodell von Balasubramaniam et al. wurde durch Injektion von 15 µl autologen Bluts in die periventrikuläre Region von einem Tag alten Ratten trotz deutlicher Auswirkungen auf das Verhalten der Tiere bei nur 3 von 21 Ratten ein Hydrozephalus erzeugt (Balasubramaniam et al. 2006).

Die komplexe Pathophysiologie des PHH erschwert es, eine Erklärung für die geringere Rate an Tieren mit Hydrozephalus in unserem Experiment im Vergleich zu der bei Ahn et al. zu finden (Ahn et al. 2013). Als möglichen Grund betrachten wir die große Toleranz des noch gering entwickelten Rattengehirns gegenüber Schädigungen sowie die noch sehr große Dehnbarkeit der Schädelkalotte am ersten und zweiten Tag nach Geburt. Einen weiteren Grund könnte die Vielzahl an möglichen Liquor-Resorptionswegen darstellen, welche zu diesem frühen Entwicklungszeitpunkt eine wichtige Rolle spielen (Strahle et al. 2012).

Aus der Doktorarbeit von Corinna Leistner wird dennoch deutlich, dass die Injektion von jeweils 100 µl Blut in beide Ventrikel von 1 oder 2 Tage alten Ratten bei 3 von 10 Blut-Tieren am PT21 zur Bildung eines Hydrozephalus führte (Leistner 2020). Dies beweist, dass durch eine intraventrikuläre Blutung in Form einer Injektion am ersten oder zweiten postnatalen Tag die Entwicklung eines Hydrozephalus ausgelöst werden kann. Die Häufigkeit des PHH nach IVH Grad III und IV beim menschlichen

Frühgeborenen liegt ebenfalls bei ca. 30 % und entspricht damit dem von uns beobachteten Verhältnis zum Zeitpunkt PT21 (Radic et al. 2015).

### **8.3.2 Entzündungsreaktion nach IVH und Beteiligung der Marker GFAP, IBA1, TNF- $\alpha$ und HMGB1 an der Entwicklung des PHH**

Um Hypothese 2 und 3 zu testen, wurde die Entzündungsreaktion anhand der verwendeten Immunmarker zu vier verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion untersucht. Es wurde die immunreaktive Fläche der Proteine GFAP, IBA1, HMGB1 und TNF- $\alpha$  in den Bereichen des cingulären, motorischen und somatosensorische-Kortex sowie periventrikulär im Bereich des Striatum und lateralen Septum pellucidum bestimmt. Die Messung der IRF in verschiedenen Regionen des Gehirns sollte Aufschluss darüber geben, ob die Entzündungsreaktion sich auf das periventrikuläre Gewebe beschränkt oder im gesamten Gehirn nachweisbar ist. Die Bestimmung der Immunmarker zu vier verschiedenen Zeitpunkten sollte zudem den Beginn und den Verlauf der reaktiven Gliose und der Entzündungsreaktion abbilden.

#### **8.3.2.1 GFAP und IBA1**

Mikroglia sind die lokalen Makrophagen des ZNS. Sie kommen in unterschiedlichen Formen vor. Die Klassifikation von Hammond et al. weist anhand spezifischer RNA-Expressionsmuster 9 Unterarten von Mikroglia mit unterschiedlichem Verhalten auf (Hammond et al. 2019). Mikroglia werden bei jeder Schädigung des Gehirns aktiviert und nehmen je nach Typ und Zytokin-Muster eine proinflammatorische oder entzündungshemmende Rolle ein (Wolf et al. 2017; Huang et al. 2017). Bei einer Schädigung des ZNS proliferieren sie in Form reaktiver Mikroglia. Sie rekrutieren in der Folge weitere Immunzellen und sezernieren zytotoxische oder entzündungsfördernde Zytokine. Sie wirken zudem als antigenpräsentierende Zellen und können beschädigte oder apoptotische Zellen phagozytieren (Gehrmann et al. 1995). In unserer Studie wurde zur Detektion reaktiver Mikrogliazellen im Gehirn nach IVH Ionisiertes Calcium-bindendes Adapter Molekül 1 (IBA1) verwendet.

Astrozyten sind die häufigste Zellpopulation des Gehirns und erfüllen ebenfalls zahlreiche unterschiedliche Aufgaben. Sie besitzen im Ruhezustand einen kleinen Zellkörper mit einem Netz feiner Ausläufer. Reaktive Astrozyten dagegen haben

einen großen gedrunghenen Zellkörper mit dicken Ausläufern und exprimieren vermehrt das glial fibrillary acidic protein (GFAP), welches immunhistochemisch angefärbt werden kann (Deren et al. 2010). Als reaktive Astrozyten reagieren sie auf pathologische Vorgänge im Gehirn wie Ischämie, Trauma oder Entzündung.

Die Reaktion der Gliazellen auf IVH sowie einen Hydrozephalus ist durch zahlreiche vorhergegangene Studien belegt. Beispielsweise konnten Miller J.M. et al. bei 21 und 36 Tage alten H-Tx-Ratten mit angeborenem Hydrozephalus eine Vermehrung aktivierter Astrozyten im parietalen Kortex nachweisen (Miller and McAllister 2007). Die H-Tx-Hydrozephalus-Tiere zeigten auch eine Aktivierung der Mikroglia mit großen Zellkörpern und dicken Ausläufern. In der periventrikulären und periaquäduktalen Gegend wurde in diesem Modell eine Vermehrung der Astrozyten und Mikroglia festgestellt (Miller and McAllister 2007).

Die Behandlung der H-Tx-Ratten mit Hydrozephalus durch einen Shunt führte in der zitierten Studie zu einer Normalisierung der Astrozyten- und Mikrogliaaktivität. Einhergehend mit einer geringeren Ventrikelerweiterung wurde bei den Ratten nach Shunt-Behandlung eine Reduktion der Astrozytenaktivität im parietalen und okzipitalen Kortex festgestellt. Die Mikroglia der Tiere mit Shunt zeigten anders als die Hydrozephalus Tiere ohne Shunt eine Rückkehr zur ihrer ramifizierten Form ähnlich dem Ruhezustand von Mikroglia bei Tieren ohne Hydrozephalus (Miller and McAllister 2007).

Mangano F.T. et al. konnten im motorischen Kortex bei 12 und 21 Tage alten H-Tx-Ratten mit Hydrozephalus die Formation von Clustern aus Mikroglia mit großem Zellkörper und dicken kurzen Ausläufern beobachten. Die Zellen waren größer und stärker anfärbbar als bei Tieren ohne Hydrozephalus (Mangano et al. 1998).

In einem Rattenmodell mit Hydrozephalus nach Kaolin-Injektion am ersten Lebens- tag konnten nach 21 Tagen histologisch hypertrophe, aktivierte Astrozyten in der periventrikulären weißen Substanz nachgewiesen werden (Khan et al. 2006). Deren, KE et al. fanden an 22 Tage alten Sprague-Dawley-Ratten mit durch Kaolin induziertem schweren Hydrozephalus sowohl immunhistochemisch, als auch im Western Blot eine erhöhte GFAP- und IBA1-Aktivität in der weißen und grauen Substanz des parietalen Kortex (Deren et al. 2010). In dieser Studie zeigten auch Tiere mit gering ausgeprägtem Hydrozephalus eine signifikant erhöhte Expression von IBA1.

Es wurde daraus gefolgert, dass die Schwelle für eine Reaktion der Gliazellen auf eine Schädigung durch einen Hydrozephalus recht gering sein muss (Deren et al. 2010). Auch im Rattenmodell mit Sprague-Dawley-Ratten, welchen am 4. postnatalen Tag jeweils 100 µl Blut in die Seitenventrikel injiziert wurde, konnte die reaktive Gliose 28 Tage nach IVH nachgewiesen werden (Ahn et al. 2013).

Wir hatten aufgrund der Erkenntnisse der zahlreichen vorhergegangenen Studien mit einer deutlichen Reaktion der Gliazellen in der Blut-Gruppe, sowie mit einem messbaren Unterschied zwischen Hydrozephalus- und Nicht-Hydrozephalus-Tieren gerechnet. Unsere Ergebnisse zeigten jedoch mit Ausnahme des signifikanten Unterschieds zwischen der IRF von GFAP der Blut-Gruppe und der Sham-Gruppe im cingulären Kortex zum Zeitpunkt PT1 keine Auffälligkeiten in der Expression von IBA1 oder GFAP. Die Expression der Marker unterschied sich nicht wesentlich zwischen der Blut-, NaCl- und Sham-Gruppe. Aufgrund des hohen Injektionsvolumens hatten wir vor allem in den periventrikulären Regionen zu den Zeitpunkten PT1 und PT3 mit einer starken Reaktion der Gliazellen gerechnet. Stattdessen unterschied sich die Expression von GFAP und IBA1 zwischen Blut-, NaCl- und Sham-Gruppe in den periventrikulären Bereichen zu keinem Zeitpunkt in signifikantem Ausmaß.

Nachdem bei der Auswertung der Ventrikelgrößen ein Schwellenwert für den Hydrozephalus bestimmt worden war, wurden die PT21-Blut-Tiere in Hydrozephalus- und Nicht-Hydrozephalus-Tiere aufgeteilt (Leistner 2020). Anschließend erfolgte ein Vergleich der IRF zwischen PT21-Blut-Tieren mit Hydrozephalus und ohne Hydrozephalus mittels t-Test. Es ergab sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied in der Expression von GFAP und IBA1 zwischen Hydrozephalus- und Nicht-Hydrozephalus-Tieren (s. Anhang Tabellen 14 und 15)

Auch die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der IRF von GFAP und Ventrikelgröße innerhalb der Blut-Gruppe mittels Spearman-Korrelation erbrachte in keiner Überlebenszeit-Gruppe ein signifikantes Ergebnis. Bei der Färbung von IBA1 zeigte sich jedoch innerhalb der Blut-Gruppe an PT1 und PT3 eine starke negative Korrelation zwischen gemessener immunreaktiver Fläche und Ventrikelgröße. Signifikant war der Zusammenhang am PT1 im cingulären und motorischen Kortex sowie im periventrikulären Striatum und lateralen Septum pellucidum. Am PT3 zeigte

sich im somatosensorischen Kortex ebenfalls ein signifikanter negativer Zusammenhang.

Diese scheinbare Abnahme der Anzahl der Mikroglia mit zunehmender Ventrikelgröße wurde schon zuvor von Mangano FT et al. sowie von Zhang et al. beobachtet (Mangano et al. 1998; Zhang et al. 1997). Mangano et al. berichteten über eine Abnahme der Zelldichte von Mikroglia bei 12 und 21 Tage alten H-Tx-Ratten mit starkem Hydrozephalus. Dieser Effekt trat sowohl in der grauen als auch in der weißen Substanz auf (Mangano et al. 1998). Neben einer Abnahme der Zelldichte wurden auch eine Verkleinerung der Zellkörper und eine Verkürzung der Zellausläufer beschrieben (Mangano et al. 1998). Beide Effekte führten auch zur Abnahme der IRF. Die Mikroglia bildeten zudem Zellcluster. In einigen Regionen des Kortex erschien die Zellzahl deshalb höher, in den meisten jedoch geringer als im gesunden Gehirn (Mangano et al. 1998).

Auch in unserem Modell könnten Änderungen der Zellmorphologie sowie eine veränderte Verteilung der Mikroglia im Gewebe Gründe für die Abnahme der IRF von IBA1 im frisch geschädigten Gehirn sein.

Zhang et al. erzeugten in ihrem Rattenmodell an erwachsenen Wistar-Ratten einen ischämischen Hirnschaden durch Verschluss der rechten Arteria cerebri media. War die so erzeugte Schädigung schwerwiegend, so beobachteten sie in den ersten Stunden nach der Ischämie histologisch geringere Zahlen an Mikroglia als bei einer leichten Schädigung (Zhang et al. 1997). Einen möglichen Grund für die geringere Dichte an Mikroglia bei zunehmender Ventrikeldehnung könnte folglich die schlechtere Zugänglichkeit des nicht mehr durchbluteten Gewebes bei steigendem intrakraniellm Druck darstellen. Durch den Untergang des Gehirngewebes einschließlich der Mikrogefäße in der periventrikulären weißen Substanz sind Mikroglia möglicherweise nicht mehr in der Lage, zum Ort der Schädigung zu gelangen (McAllister 2012).

Bei den PT7- sowie PT21-Blut-Tieren war in unserer Studie kein Zusammenhang zwischen reaktiven Mikroglia und Ventrikelgröße mehr festzustellen. In der Zeitspanne vom PT3 zu PT7 konnten die Mikroglia möglicherweise wieder in die geschädigten Gehirnregionen einwandern, woraufhin sich dort eine im Vergleich zum gesunden Gehirn der Sham-Tiere gleich hohe Anzahl an Mikroglia finden ließ.

Abschließend lässt sich festhalten, dass in unserem Modell trotz der Injektion von insgesamt 200 µl Blut keine ausgeprägte und langanhaltende Reaktion der

Astrozyten und Mikroglia festgestellt werden konnte. Entgegen unseren Erwartungen konnten wir keinen Anstieg der Marker GFAP und IBA1 über die Zeit in den unterschiedlichen Gehirnregionen verzeichnen. Es kam lediglich vereinzelt zu signifikanten Ergebnissen, welche jedoch keine klaren Rückschlüsse auf die Pathophysiologie der Entzündungsreaktion nach einer IVH zuließen.

### **8.3.2.2 HMGB1 und TNF- $\alpha$**

HMGB1 ist ein high-mobility Protein, welches als DNA-Bindungsprotein in allen kernhaltigen Zellen vorkommt (Watanabe et al. 2012). Es interagiert mit Nukleosomen, Histonen und Transkriptionsfaktoren (Kim et al. 2006). Zudem ist HMGB1 ein wichtiger Botenstoff des Immunsystems welcher bei Infektionen und Verletzungen sowohl selbst als proinflammatorisches Zytokin dient, als auch die Produktion weiterer proinflammatorischer Zytokine fördert (Wang et al. 2017; Lotze and Tracey 2005). Bei einer Blutung im Liquorraum kann HMGB1 durch Makrophagen, welche ins ZNS einwandern, sowie von aktivierten Mikroglia ausgeschüttet werden (Nakahara et al. 2009). HMGB1 wiederum bewirkt die Synthese weiterer Zytokine wie IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 und TNF- $\alpha$  durch Monozyten (Andersson et al. 2000). Dabei wird die Freisetzung von HMGB1 aus Makrophagen wiederum durch TNF- $\alpha$  stimuliert (Wang et al. 1999; Rendon-Mitchell et al. 2003).

TNF- $\alpha$  dient als proinflammatorisches Zytokin ebenfalls der Regulierung und Fortleitung einer Entzündungsreaktion. Es ist ein Akut-Phase-Protein, aktiviert Makrophagen und Mikroglia und regt diese zur Phagozytose und Bildung weiterer proinflammatorischer Zytokine an. TNF- $\alpha$  hat eine kurze Halbwertszeit und ist schon Minuten nach einer Schädigung des Gewebes in hohen Konzentrationen nachweisbar. Eine erhöhte Konzentration von HMGB1 hingegen tritt verzögert erst Stunden später auf (Lotze and Tracey 2005).

HMGB1 und TNF- $\alpha$  dienen zusammen mit weiteren proinflammatorischen Zytokinen der Fortleitung und gegenseitigen Verstärkung bei der Initiation und Aufrechterhaltung einer Entzündungskaskade (Andersson et al. 2000; Nakahara et al. 2009). Die Rolle von HMGB1 und TNF- $\alpha$  als proinflammatorische Mediatoren bei Schädigungen des Gehirns durch Subarachnoidalblutungen (SAB) und PHH wurde bereits in anderen Studien belegt.

In einer Studie zur Immunreaktion bei einer Subarachnoidalblutung wurden im Liquor von Patienten mit einer solchen Blutung sowie in vitro nach 5 Tagen Blut-Exposition eine signifikant erhöhte Genexpression und Liquorspiegel der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  und ET-1 festgestellt (Fassbender et al. 2000). Die Erhöhung der Zytokin-spiegel in vitro zeigt, dass Blutbestandteile alleine ausreichen, um eine Inflammationsreaktion im Liquor hervorzurufen.

Ahn S.Y. et al. wiesen in ihrem Rattenmodell mit Sprague-Dawley Ratten, welchen am 4. postnatalen Tag jeweils 100  $\mu$ l Blut in die Seitenventrikel injiziert wurde, mittels Multiplex-Assay am 32. postnatalen Tag signifikant erhöhte Konzentrationen von TNF- $\alpha$  im Liquor nach (Ahn et al. 2013).

Bei einer klinischen Studie mit 45 menschlichen Frühgeborenen konnten im Liquor der 14 Kinder, welche einen PHH entwickelten, durch Multiplex-Assay ebenfalls erhöhte Konzentrationen von TNF- $\alpha$  nachgewiesen werden (Habiyaemye et al. 2017). In einer weiteren klinischen Studie mit 27 Frühgeborenen mit PHH konnten in deren Liquor erhöhte Werte der Entzündungsmediatoren IL-1 $\beta$  und IL-18 ermittelt werden. IL-18 wiederum kann die Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  bewirken (Schmitz et al. 2007).

Bei einer klinischen Studie mit 39 erwachsenen Patienten mit SAB wurden 3, 7 und 14 Tage nach der Blutung ebenfalls erhöhte Spiegel von HMGB1 und TNF- $\alpha$  im Liquor festgestellt. Patienten, die zum Zeitpunkt der SAB stark ausgeprägte Symptome zeigten, hatten signifikant höhere Spiegel der Zytokine HMGB1, IL-6, IL-8, und TNF- $\alpha$  als Patienten in einem besseren klinischen Zustand (Nakahara et al. 2009).

In unserer Studie zeigten sich zu keinem Zeitpunkt und in keiner Gehirnregion signifikante Unterschiede in der Expression des Entzündungsmediators HMGB1 zwischen der Blut- und der Sham-Gruppe. Es zeigte sich ebenfalls keine erhöhte Expression von TNF- $\alpha$  im Vergleich der Blut- zur Sham-Gruppe. Zu den Zeitpunkten PT1 und PT7 fand sich im cingulären Kortex sogar eine signifikant niedrigere Anfärbbarkeit von TNF- $\alpha$  im Gehirn der Blut-Tiere. Dieses Ergebnis könnte durch die hohe Anzahl an Tests beim Vergleich der Interventionsgruppen durch Zufall entstanden sein. Durch die Pathophysiologie der IVH lässt es sich nicht schlüssig erklären.

Bei HMGB1 und TNF- $\alpha$  wurden die Blut-Tiere am PT21 ebenfalls in Hydrozephalus-Tiere und Nicht-Hydrozephalus-Tiere aufgeteilt und die IRF mittels t-Test oder Mann-

Whitney-U-Test verglichen. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Expression von TNF- $\alpha$  zwischen Hydrozephalus- und Nicht-Hydrozephalus-Tieren (s. Anhang Tabelle 16). Im Hinblick auf HMGB1 zeigte sich jedoch bei den Hydrozephalus-Tieren eine signifikant höhere Expression in den periventrikulären Bereichen des Striatum und des lateralen Septum pellucidum ( $P < 0,05$ ) (s. Abbildung 20; s. Anhang Tabelle 17).

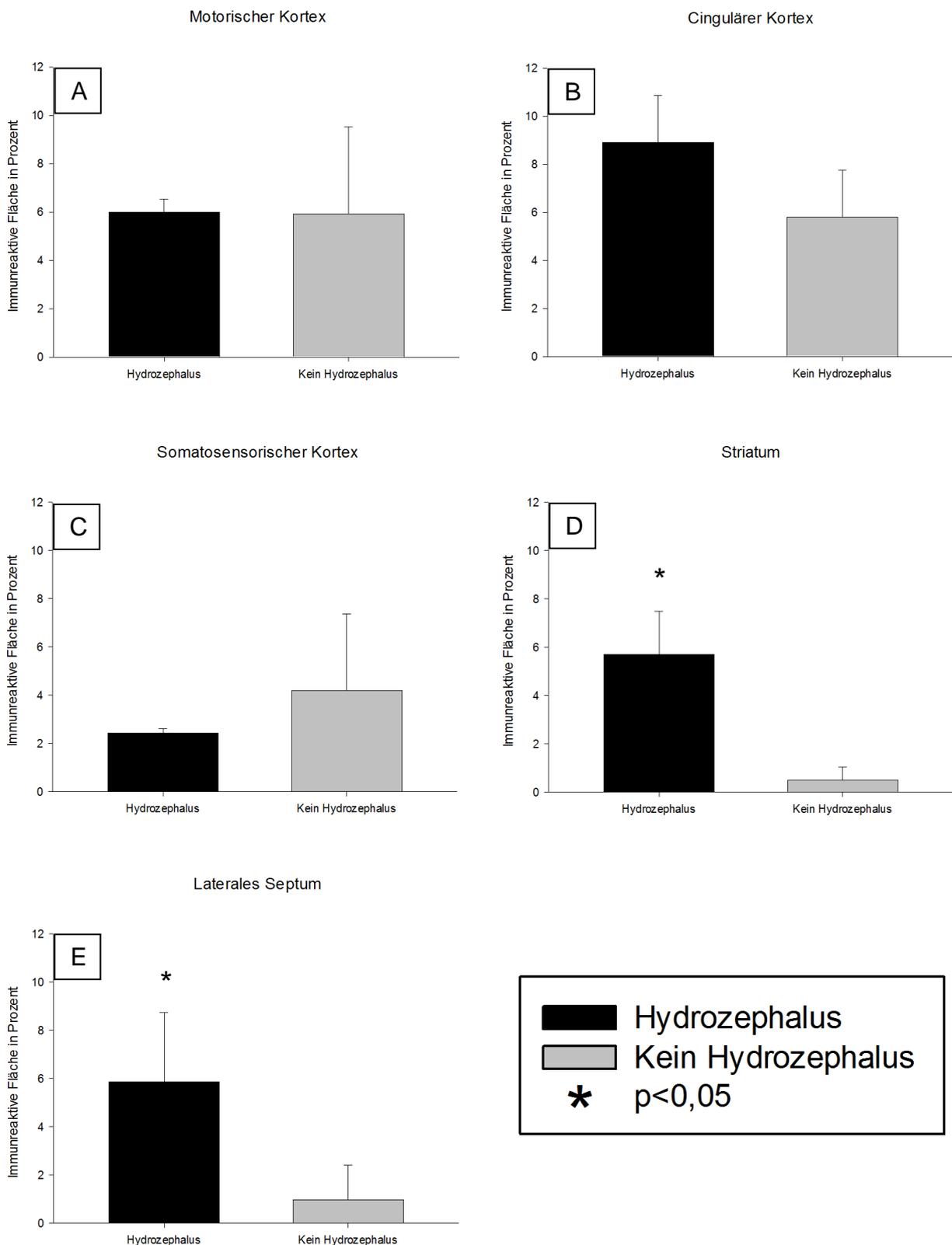


Abbildung 20. Vergleich der immunreaktiven Fläche von HMGB1 zwischen PT21-Tieren mit und ohne Hydrozephalus. Der berechnete Schwellenwert für einen Hydrozephalus lag bei 4,74 % Ventrikelgröße (Leistner 2020). Die Säulen stellen Mittelwerte dar. Die verschiedenen Gehirnregionen sind einzeln dargestellt. Cingulärer Kortex (A), motorischer Kortex (B), somatosensorischer Kortex (C), Striatum (D), laterales Septum pellucidum (E). Die error-bars zeigen jeweils die Standardabweichung der einbezogenen Werte an. Der Stern kennzeichnet einen p-Wert < 0,05 beim Vergleich der IRF der beiden Gruppen mittels t-Test.

Auch bei Betrachtung einzelner Gehirnschnitte mit Färbung von HMGB1 fällt die stärkere Färbung bei den Tieren der Blut-Gruppe mit Hydrozephalus im Vergleich zu Nicht-Hydrozephalus-Tieren auf (s Abbildung 21, 22, 23 und 24).

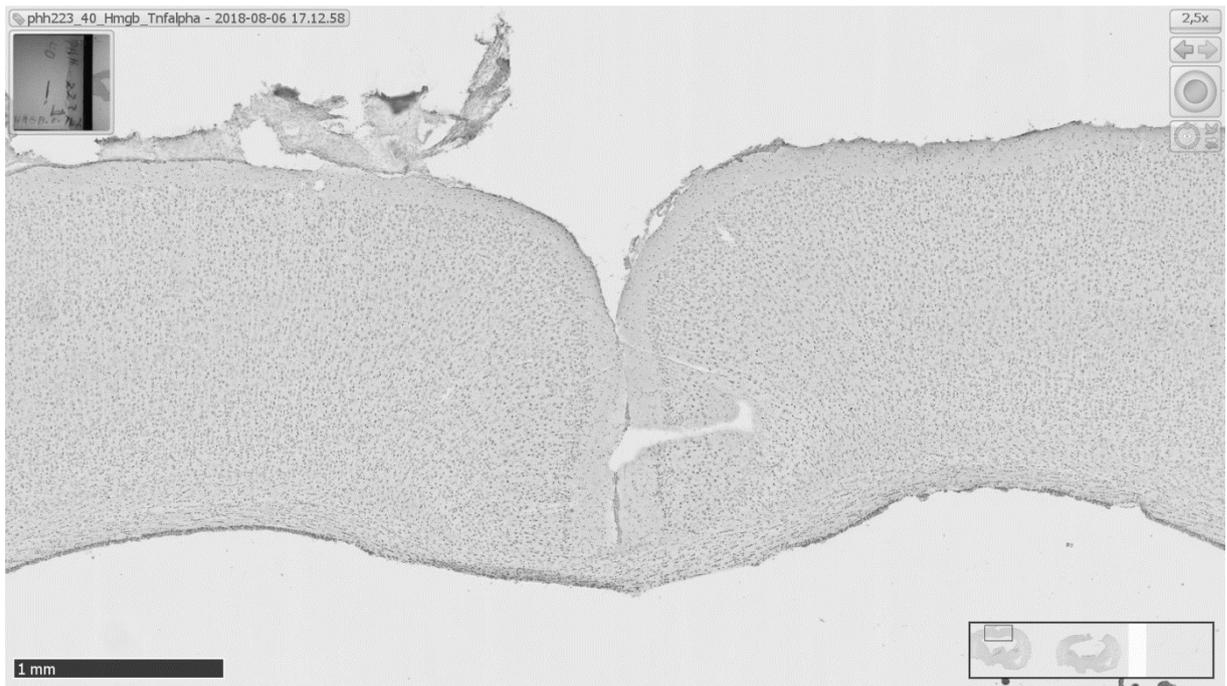


Abbildung 21. Mikroskopisches Bild des Kortex eines Tieres der Blut-Gruppe am PT21 mit Färbung von HMGB1 und ausgeprägtem Hydrozephalus.

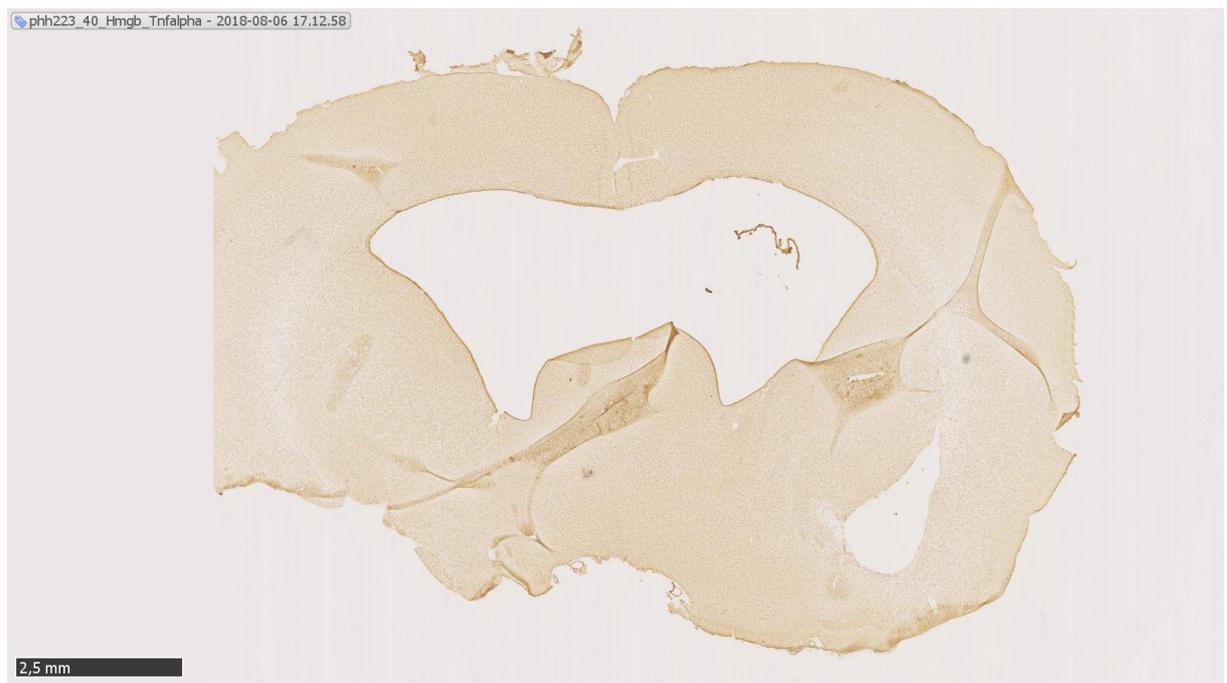


Abbildung 22. Mikroskopisches Bild des gesamten Gehirnschnitts desselben Tieres der Blut-Gruppe am PT21 aus Abbildung 21.

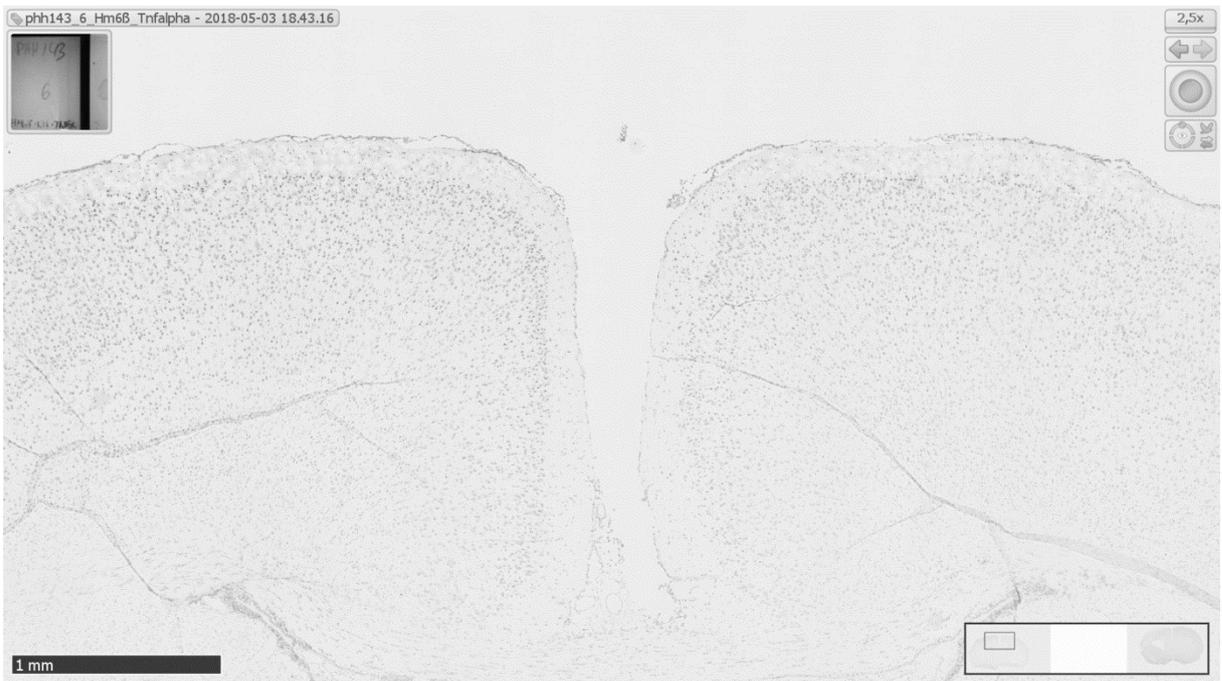


Abbildung 23. Mikroskopisches Bild des Kortex eines Tieres der Blut-Gruppe am PT21 mit Färbung von HMGB1 ohne Hydrozephalus.



Abbildung 24. Mikroskopisches Bild des gesamten Gehirnschnitts desselben Tieres der Blut-Gruppe am PT21 aus Abbildung 23.

Bei PT21 bestand in der Blut-Gruppe zudem eine starke Korrelation zwischen immunreaktiver Fläche des HMGB1 und Ventrikelgröße. Signifikant war der Zusammenhang ebenfalls in den periventrikulären Bereichen des Striatum (Korrelationskoeffizient: 0,855;  $p < 0,000001$ ) und des lateralen Septum (Korrelationskoeffizient: 0,891;  $p < 0,000001$ ) sowie im cingulären Kortex (Korrelationskoeffizient: 0,624;  $p < 0,05$ ). Dies zeigt einen eindeutigen Zusammenhang zwischen der Ausprägung des Hydrozephalus und der Expression von HMGB1 in den periventrikulären Bereichen des Gehirns.

Der fehlende Unterschied in der Expression von HMGB1 zwischen der Blut-, NaCl- und Sham-Gruppe könnte an der vergleichsweise geringen Zahl an Hydrozephalus-Tieren in unserem Versuch liegen. Die IRF von HMGB1 war in der Blut-Gruppe alleine bei den Tieren mit Hydrozephalus erhöht.

Da HMGB1 in allen Zellkernen vorkommt, kann es im Gehirn beim Absterben von Gewebe nicht nur aktiv, sondern auch passiv freigesetzt werden. Zu den Zeitpunkten PT1 und PT3 wurden jedoch weder eine Erhöhung von HMGB1 in der Blut-Gruppe, noch ein Zusammenhang zwischen Ventrikelgröße und IRF von HMGB1 festgestellt. Dies spricht dafür, dass die erhöhte Expression von HMGB1 bei PT21-Blut-Tieren nicht alleine durch den Zelluntergang oder Reaktionen auf Blutbestandteile zurückzuführen ist, sondern dass sie in spezifischem Zusammenhang mit der Entwicklung eines Hydrozephalus steht. Die Tatsache, dass die IRF von HMGB1 in der Gruppe der Blut-Tiere am PT21 im Vergleich zu ebendieser in der NaCl- und Sham-Gruppe nicht erhöht war, spricht ebenfalls dafür, dass der Effekt alleine mit dem PHH zusammenhängt und nicht auf die Blutinjektion zurückzuführen ist.

In Anbetracht der zahlreichen vorausgehenden Studien ist davon auszugehen, dass die Entzündungsreaktion einen bedeutenden Faktor in der Pathophysiologie des PHH infolge einer IVH darstellt. Die deutliche Erhöhung der HMGB1-Expression in PT21-Hydrozephalus-Tieren unterstreicht dieses Erkenntnis.

Die erwartete Erhöhung der Konzentration von TNF- $\alpha$  zum selben Zeitpunkt trat jedoch nicht auf. Da der Zusammenhang von TNF- $\alpha$  Expression und PHH bereits in einer Reihe von klinischen Studien und Tiermodellen belegt wurde, müssen wir in Betracht ziehen, dass durch die vergleichsweise geringe Zahl an Hydrozephalus-Tieren in unserem Modell der mögliche Einfluss von TNF- $\alpha$  in der Pathophysiologie des PHH nicht detektiert werden konnte.

## 9. Zusammenfassung und Schlussfolgerung

### 9.1 Zusammenfassung

Bei frühgeborenen Kindern mit niedrigem Geburtsgewicht besteht ein erhöhtes Risiko, eine intraventrikuläre Blutung im Bereich der germinalen Matrix zu erleiden. Eine schwere IVH (Grad III-IV) kann dabei zur Entwicklung eines posthämorrhagischen Hydrozephalus führen. Als Hauptgründe für die Bildung des PHH gelten eine Abflussbehinderung und Resorptionsstörung des Liquor cerebrospinalis. Als Ursache der Resorptionsstörung gilt wiederum ein Verschluss der Arachnoidalzotten durch Mikrothromben mit anschließender Inflammation und Fibrose (Strahle et al. 2012).

In dieser Studie sollte untersucht werden, ob eine artifizielle intraventrikuläre Blutung am ersten oder zweiten postnatalen Tag ein geeignetes experimentelles Modell ist, um eine dadurch ausgelöste Inflammationsreaktion anhand der Entzündungsmarker IBA1, GFAP, HMGB1 und TNF- $\alpha$  immunhistochemisch zu untersuchen. Es sollte dabei ein Zusammenhang zwischen der Stärke der Immunantwort und der Entwicklung eines PHH nach IVH aufgezeigt werden. Dazu erhielten 40 Rattenjungen zwischen 24 und 48 Stunden nach der Geburt eine intraventrikuläre Injektion mit Vollblut eines Donortieres. 34 Kontrolltiere erhielten hingegen eine Injektion mit Natriumchloridlösung. Weitere 34 Ratten einer zweiten Kontrollgruppe erhielten eine Scheinoperation. Die Gehirnentnahmen erfolgten jeweils an den Tagen 1, 3, 7 und 21 nach dem Trauma (PT1, PT3, PT7, PT21).

Die folgenden drei bereits eingeführten Hypothesen wurden experimentell überprüft:

Hypothese 1: Eine intraventrikuläre Blutung innerhalb der ersten beiden postnatalen Tage löst die Entwicklung eines Hydrozephalus aus.

Hypothese 2: Eine intraventrikuläre Blutung innerhalb der ersten beiden postnatalen Tage führt zu einer langandauernden Entzündungsreaktion.

Hypothese 3: Die Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten und die damit verbundene Entzündungsreaktion, gemessen an den Markern GFAP, IBA1, TNF- $\alpha$  und HMGB1 sind an der Entwicklung des Hydrozephalus maßgeblich beteiligt.

Die in unserem Versuch erhobenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass das verwendete Modell klinisch relevante PHHs induziert, auch wenn es nicht in der gleichen Häufigkeit zur Entwicklung eines PPH kam wie in vergleichbaren anderen Tiermodellen (Leistner 2020). Die Ergebnisse geben jedoch keinen Anhalt dafür, dass sich bei den mit Blut behandelten Tieren als Folge der IVH eine ausgedehnte und langandauernde Entzündungsreaktion abgespielt hat. Die Expression der Entzündungsmarker im zeitlichen Verlauf unterschied sich nicht wesentlich zwischen den Interventionsgruppen.

Des Weiteren sollte die Hypothese, dass einer oder mehrere der Entzündungsmarker IBA1, GFAP, HMGB1 und TNF- $\alpha$  maßgeblich an der Entwicklung des Hydrozephalus beteiligt sind, getestet werden. Zu diesem Zweck wurde die immunreaktive Fläche der Marker in fünf verschiedenen Gehirnregionen gemessen und zwischen den drei Interventions-Gruppen verglichen. Zusätzlich wurde die Korrelation zwischen der Expression der einzelnen Entzündungsmarker und der Ventrikelgröße ermittelt und ein Vergleich der IRF von mit Blut behandelten Tieren mit und ohne Hydrozephalus angestellt. Die gefundene negative Korrelation zwischen Ventrikelerweiterung und Mikroglia-Aktivität in der Blut-Gruppe zu den Zeitpunkten PT1 und PT3 liefert keine Erkenntnisse darüber, ob die Reaktion der Mikroglia zur Entstehung des PHHs beiträgt. Der fehlende Unterschied in der Expression der Immunmarker IBA1 und GFAP zwischen Blut-Tieren mit und ohne Hydrozephalus am PT21 spricht nicht dafür, dass die Gliazellreaktion kausal mit der Entstehung eines PHH zusammenhängt. Wäre die Gliose für die Entwicklung eines Hydrozephalus mitverantwortlich, hätte es zu einer verstärkten Expression der untersuchten Immunmarker bei Hydrozephalus-Tieren kommen müssen.

Anders verhält es sich mit dem Ergebnis der erhöhten Expression von HMGB1 in Hydrozephalus-Tieren zum Zeitpunkt PT21. Wir konnten in der Expression des Entzündungsmarkers einen signifikanten Unterschied zwischen Blut-Tieren mit und ohne Hydrozephalus feststellen. Dies weist auf einen Zusammenhang zwischen der Expression von HMGB1 und der Entstehung eines Hydrozephalus hin. Da die IRF von HMGB1 im Vergleich der Interventions- mit der NaCl- und Sham-Gruppe nicht erhöht war, können wir darauf schließen, dass der Effekt alleine mit dem PHH

zusammenhängt und nicht auf die Blutinjektion zurückzuführen ist. Dass die gesteigerte Expression von HMGB1 Grund für den Hydrozephalus ist und nicht umgekehrt, können wir mit unserem Experiment jedoch nicht belegen. Dazu wäre eine Bestimmung des Markers schon vor und während des Eintretens des Hydrozephalus nötig gewesen. Zu den Zeitpunkten PT3 und PT7 konnten wir noch keine Tendenz zur PHH-Entwicklung in der Blut-Gruppe feststellen (Leistner 2020).

Wie oben beschrieben imitiert unser Tiermodell nicht alle Aspekte des PHH beim Menschen. Die ausgewählten Entzündungsmarker sind zwar geeignet, die nach einer IVH ablaufende Entzündungsreaktion zu untersuchen, jedoch ist die alleinige Bestimmung der immunreaktiven Fläche kein optimales Maß für die Reaktion der Gliazellen und die Aktivität der Zytokine. Beispielsweise könnte eine genauere Untersuchung der Morphologie der Gliazellen wie bei Miller JM et al. 2007 oder Mangano FT et al. 1998 noch mehr Erkenntnisse über die Reaktion der Zellen liefern (Miller and McAllister 2007; Mangano et al. 1998).

Zusammenfassend stellten wir nach der Auswertung unserer Ergebnisse folglich fest:

1. Von unseren 10 ventrikulär mit Blut behandelten Tieren in der Überlebenszeit-Gruppe PT21 entwickelten drei einen Hydrozephalus. Dies beweist, dass durch eine intraventrikuläre Blutung in Form einer derartigen Intervention am ersten oder zweiten postnatalen Tag die Entwicklung eines Hydrozephalus ausgelöst werden kann.
2. Wir konnten nicht nachweisen, dass sich bei den mit Blut injizierten Tieren als Folge der IVH eine ausgedehnte Entzündungsreaktion abgespielt hat. Die Expression der Entzündungsmarker unterschied sich im zeitlichen Verlauf nicht wesentlich zwischen der Interventionsgruppe und den beiden Kontrollgruppen.
3. Unsere Ergebnisse deuten nicht darauf hin, dass aktivierte Astrozyten, Mikroglia sowie der Entzündungsmarker TNF- $\alpha$  in direktem Zusammenhang mit der Entwicklung des Hydrozephalus stehen. Wir stellten jedoch einen signifikanten Unterschied in der Expression von HMGB1 zwischen Blut-Tieren mit und ohne Hydrozephalus fest. Dies weist auf einen Einfluss von HMGB1 auf die Entstehung eines PHH hin. Gestützt wird diese Annahme noch durch eine starke Korrelation zwischen der IRF von HMGB1 und der Ventrikelgröße in der Blut-Gruppe am PT21,

die bei den anderen Gruppen nicht vorhanden war. Dass die gesteigerte Expression von HMGB1 Grund für den Hydrozephalus ist und nicht umgekehrt, können wir im Rahmen dieser Studie allerdings nicht belegen. Sie deutet jedoch auf spät beginnende und langandauernde entzündliche Prozesse hin und bietet sich als Gegenstand zukünftiger Untersuchungen an.

## **9.2 Schlussfolgerung**

Wie in Hypothese 1 postuliert, eignet sich das von uns gewählte Tiermodell zur Erforschung des PHH. Die Hydrozephalus-Rate in unserem Modell entspricht der klinischen Situation bei menschlichen Frühgeborenen. Eine höhere Rate an induzierten Hydrozephalien wäre jedoch wünschenswert. Für eine Untersuchung der Pathophysiologie bedarf es jedoch einer deutlich höheren Zahl an Tieren.

Obwohl wir mit Hypothese 2 annahmen, dass die experimentelle IVH an den postnatalen Tagen 1 und 2 eine langandauernde Entzündungsreaktion auslösen würde, konnten wir mit den gewählten Markern keine massive und langandauernde Inflammation nachweisen. Die Vermutung, dass ein Zusammenhang zwischen der Entwicklung eines PHH und der Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia, wie auch der Expression von HMGB1 und TNF- $\alpha$  besteht, konnten wir nicht bestätigen. Einzig HMGB1 scheint nach stattgehabter IVH die Entstehung eines PHH kausal zu beeinflussen.

Eine eingehendere Betrachtung der Entstehung des Hydrozephalus ist daher notwendig. Zudem sind andere Entzündungsmarker möglicherweise in entscheidendem Maße an der Entzündungsreaktion nach einer IVH und der Entstehung eines PHH beteiligt. Die erwähnten, durch unsere Studie aufgeworfenen Fragestellungen könnten und sollten dementsprechend Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

## 10. Quellen

- Ahn, S. Y., Y. S. Chang, D. K. Sung, S. I. Sung, H. S. Yoo, J. H. Lee, W. I. Oh, and W. S. Park. 2013. 'Mesenchymal stem cells prevent hydrocephalus after severe intraventricular hemorrhage', *Stroke*, 44: 497-504.
- Aloisi, F. 2001. 'Immune function of microglia', *Glia*, 36: 165-79.
- Andersson, U., H. Wang, K. Palmblad, A. C. Aveberger, O. Bloom, H. Erlandsson-Harris, A. Janson, R. Kokkola, M. Zhang, H. Yang, and K. J. Tracey. 2000. 'High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes', *J Exp Med*, 192: 565-70.
- Bächli H., Pöschl J. . 2018. 'Posthämorrhagischer Hydrozephalus bei Frühgeborenen.' in, *Pädiatrische Neurochirurgie* (Springer, Berlin, Heidelberg).
- Balasubramaniam, J., and M. R. Del Bigio. 2006. 'Animal models of germinal matrix hemorrhage', *J Child Neurol*, 21: 365-71.
- Balasubramaniam, J., M. Xue, R. J. Buist, T. L. Ivanco, S. Natuik, and M. R. Del Bigio. 2006. 'Persistent motor deficit following infusion of autologous blood into the periventricular region of neonatal rats', *Exp Neurol*, 197: 122-32.
- Bassan, H. 2009. 'Intracranial hemorrhage in the preterm infant: understanding it, preventing it', *Clin Perinatol*, 36: 737-62, v.
- Blencowe, H., S. Cousens, M. Z. Oestergaard, D. Chou, A. B. Moller, R. Narwal, A. Adler, C. Vera Garcia, S. Rohde, L. Say, and J. E. Lawn. 2012. 'National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications', *Lancet*, 379: 2162-72.
- Bolisetty, S., A. Dhawan, M. Abdel-Latif, B. Bajuk, J. Stack, K. Lui, Wales New South, and Collection Australian Capital Territory Neonatal Intensive Care Units' Data. 2014. 'Intraventricular hemorrhage and neurodevelopmental outcomes in extreme preterm infants', *Pediatrics*, 133: 55-62.
- Bradley, J. R. 2008. 'TNF-mediated inflammatory disease', *J Pathol*, 214: 149-60.
- Chen, X., X. Huang, B. Li, Z. Zhao, L. Jiang, C. Huang, and Y. Lu. 2010. 'Changes in neural dendrites and synapses in rat somatosensory cortex following neonatal post-hemorrhagic hydrocephalus', *Brain Res Bull*, 83: 44-8.
- Cherian, S. S., S. Love, I. A. Silver, H. J. Porter, A. G. Whitelaw, and M. Thoresen. 2003. 'Posthemorrhagic ventricular dilation in the neonate: development and characterization of a rat model', *J Neuropathol Exp Neurol*, 62: 292-303.
- Cherian, S., A. Whitelaw, M. Thoresen, and S. Love. 2004. 'The pathogenesis of neonatal post-hemorrhagic hydrocephalus', *Brain Pathol*, 14: 305-11.
- Del Bigio, M. R., and D. L. Di Curzio. 2016. 'Nonsurgical therapy for hydrocephalus: a comprehensive and critical review', *Fluids Barriers CNS*, 13: 3.
- Deren, K. E., M. Packer, J. Forsyth, B. Milash, O. M. Abdullah, E. W. Hsu, and J. P. McAllister, 2nd. 2010. 'Reactive astrocytosis, microgliosis and inflammation in rats with neonatal hydrocephalus', *Exp Neurol*, 226: 110-9.
- Dumont, A. S., R. J. Dumont, M. M. Chow, C. L. Lin, T. Calisaneller, K. F. Ley, N. F. Kassell, and K. S. Lee. 2003. 'Cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage: putative role of inflammation', *Neurosurgery*, 53: 123-33; discussion 33-5.
- Fassbender, K., B. Hodapp, S. Rossol, T. Bertsch, J. Schmeck, S. Schutt, M. Fritzing, P. Horn, P. Vajkoczy, M. Wendel-Wellner, A. Ragoschke, S. Kuehl, J. Brunner, L. Schurer, P. Schmiedeck, and M. Hennerici. 2000. 'Endothelin-1 in subarachnoid hemorrhage: An acute-phase reactant produced by cerebrospinal fluid leukocytes', *Stroke*, 31: 2971-5.
- Gao, C., H. Du, Y. Hua, R. F. Keep, J. Strahle, and G. Xi. 2014. 'Role of red blood cell lysis and iron in hydrocephalus after intraventricular hemorrhage', *J Cereb Blood Flow Metab*, 34: 1070-5.
- Gehrmann, J., Y. Matsumoto, and G. W. Kreutzberg. 1995. 'Microglia: intrinsic immune effector cell of the brain', *Brain Res Brain Res Rev*, 20: 269-87.
- Guo, J., X. Mi, R. Zhan, M. Li, L. Wei, and J. Sun. 2018. 'Aquaporin 4 Silencing Aggravates Hydrocephalus Induced by Injection of Autologous Blood in Rats', *Med Sci Monit*, 24: 4204-12.
- Habiyaremye, G., D. M. Morales, C. D. Morgan, J. P. McAllister, T. S. CreveCoer, R. H. Han, M. Gabir, B. Baksh, D. Mercer, and D. D. Limbrick, Jr. 2017. 'Chemokine and cytokine levels in the lumbar cerebrospinal fluid of preterm infants with post-hemorrhagic hydrocephalus', *Fluids Barriers CNS*, 14: 35.
- Hammond, T. R., C. Dufort, L. Dissing-Olesen, S. Giera, A. Young, A. Wysoker, A. J. Walker, F. Gergits, M. Segel, J. Nemes, S. E. Marsh, A. Saunders, E. Macosko, F. Ginhoux, J. Chen, R. J. M. Franklin, X. Piao, S. A. McCarroll, and B. Stevens. 2019. 'Single-Cell RNA Sequencing

- of Microglia throughout the Mouse Lifespan and in the Injured Brain Reveals Complex Cell-State Changes', *Immunity*, 50: 253-71 e6.
- Horinek, D., M. Cihar, and M. Tichy. 2003. 'Current methods in the treatment of posthemorrhagic hydrocephalus in infants', *Bratisl Lek Listy*, 104: 347-51.
- Huang, M., Y. Wan, L. Mao, Q. W. He, Y. P. Xia, M. Li, Y. N. Li, H. J. Jin, and B. Hu. 2017. 'Inhibiting the Migration of M1 Microglia at Hyperacute Period Could Improve Outcome of tMCAO Rats', *CNS Neurosci Ther*, 23: 222-32.
- Jones, H. C., B. Yehia, G. F. Chen, and B. J. Carter. 2004. 'Genetic analysis of inherited hydrocephalus in a rat model', *Exp Neurol*, 190: 79-90.
- Kennedy, C. R., S. Ayers, M. J. Campbell, D. Elbourne, P. Hope, and A. Johnson. 2001. 'Randomized, controlled trial of acetazolamide and furosemide in posthemorrhagic ventricular dilation in infancy: follow-up at 1 year', *Pediatrics*, 108: 597-607.
- Khan, O. H., T. L. Enno, and M. R. Del Bigio. 2006. 'Brain damage in neonatal rats following kaolin induction of hydrocephalus', *Exp Neurol*, 200: 311-20.
- Kidokoro, H., P. J. Anderson, L. W. Doyle, L. J. Woodward, J. J. Neil, and T. E. Inder. 2014. 'Brain injury and altered brain growth in preterm infants: predictors and prognosis', *Pediatrics*, 134: e444-53.
- Kim, J. B., J. Sig Choi, Y. M. Yu, K. Nam, C. S. Piao, S. W. Kim, M. H. Lee, P. L. Han, J. S. Park, and J. K. Lee. 2006. 'HMGB1, a novel cytokine-like mediator linking acute neuronal death and delayed neuroinflammation in the postischemic brain', *J Neurosci*, 26: 6413-21.
- Külzer, Tim. 2020. "Post-hämorrhagischer Hydrozephalus bei Frühgeborenen: Einfluss der Blut-Hirnschranke und des Wasserhaushalts anhand Veränderungen des „tight junction“ Proteins Claudin-5 der astrozytären Aquaporin-4 Wasserkanäle und des Übertritts von IgG ins Hirnparenchym auf die Entwicklung eines PHH im Rattenmodell." In, edited by Institut für Neurochirurgische Pathophysiologie der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz. Mainz.
- Lan, X., X. Han, Q. Li, Q. W. Yang, and J. Wang. 2017. 'Modulators of microglial activation and polarization after intracerebral haemorrhage', *Nat Rev Neurol*, 13: 420-33.
- Lee, H. B., and M. D. Blafox. 1985. 'Blood volume in the rat', *J Nucl Med*, 26: 72-6.
- Leech, R. W., and P. Kohlen. 1974. 'Subependymal and intraventricular hemorrhages in the newborn', *Am J Pathol*, 77: 465-75.
- Leistner. 2020. "Posthämorrhagischer Hydrozephalus bei Frühgeborenen: Aufbau eines experimentellen Tiermodells und zeitliche Entwicklung des neuronalen und axonalen Schadens und Hydrocephalus nach intraventrikulärer Injektion von Blut bei neugeborenen Ratten." In, edited by Institut für Neurochirurgische Pathophysiologie der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz. Mainz.
- Liddelw, S. A., K. A. Guttenplan, L. E. Clarke, F. C. Bennett, C. J. Bohlen, L. Schirmer, M. L. Bennett, A. E. Munch, W. S. Chung, T. C. Peterson, D. K. Wilton, A. Frouin, B. A. Napier, N. Panicker, M. Kumar, M. S. Buckwalter, D. H. Rowitch, V. L. Dawson, T. M. Dawson, B. Stevens, and B. A. Barres. 2017. 'Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia', *Nature*, 541: 481-87.
- Little, A. R., and J. P. O'Callaghan. 2001. 'Astrogliosis in the adult and developing CNS: is there a role for proinflammatory cytokines?', *Neurotoxicology*, 22: 607-18.
- Liu, L., H. L. Johnson, S. Cousens, J. Perin, S. Scott, J. E. Lawn, I. Rudan, H. Campbell, R. Cibulskis, M. Li, C. Mathers, R. E. Black, W. H. O. Child Health Epidemiology Reference Group of, and Unicef. 2012. 'Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000', *Lancet*, 379: 2151-61.
- Lotze, M. T., and K. J. Tracey. 2005. 'High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal', *Nat Rev Immunol*, 5: 331-42.
- Mangano, F. T., J. P. McAllister, 2nd, H. C. Jones, M. J. Johnson, and R. M. Kriebel. 1998. 'The microglial response to progressive hydrocephalus in a model of inherited aqueductal stenosis', *Neurol Res*, 20: 697-704.
- Mao, X., T. L. Enno, and M. R. Del Bigio. 2006. 'Aquaporin 4 changes in rat brain with severe hydrocephalus', *Eur J Neurosci*, 23: 2929-36.
- McAllister, J. P., 2nd. 2012. 'Pathophysiology of congenital and neonatal hydrocephalus', *Semin Fetal Neonatal Med*, 17: 285-94.
- Miller, J. M., and J. P. McAllister, 2nd. 2007. 'Reduction of astrogliosis and microgliosis by cerebrospinal fluid shunting in experimental hydrocephalus', *Cerebrospinal Fluid Res*, 4: 5.
- Nakahara, T., R. Tsuruta, T. Kaneko, S. Yamashita, M. Fujita, S. Kasaoka, T. Hashiguchi, M. Suzuki, I. Maruyama, and T. Maekawa. 2009. 'High-mobility group box 1 protein in CSF of patients with subarachnoid hemorrhage', *Neurocrit Care*, 11: 362-8.

- Papile, L. A., J. Burstein, R. Burstein, and H. Koffler. 1978. 'Incidence and evolution of subependymal and intraventricular hemorrhage: a study of infants with birth weights less than 1,500 gm', *J Pediatr*, 92: 529-34.
- Pekny, M., and M. Nilsson. 2005. 'Astrocyte activation and reactive gliosis', *Glia*, 50: 427-34.
- Radic, J. A., M. Vincer, and P. D. McNeely. 2015. 'Outcomes of intraventricular hemorrhage and posthemorrhagic hydrocephalus in a population-based cohort of very preterm infants born to residents of Nova Scotia from 1993 to 2010', *J Neurosurg Pediatr*, 15: 580-8.
- Ray, J. G., A. L. Park, and D. B. Fell. 2017. 'Mortality in Infants Affected by Preterm Birth and Severe Small-for-Gestational Age Birth Weight', *Pediatrics*, 140.
- Rendon-Mitchell, B., M. Ochani, J. Li, J. Han, H. Wang, H. Yang, S. Susarla, C. Czura, R. A. Mitchell, G. Chen, A. E. Sama, K. J. Tracey, and H. Wang. 2003. 'IFN-gamma induces high mobility group box 1 protein release partly through a TNF-dependent mechanism', *J Immunol*, 170: 3890-7.
- Robinson, S. 2012. 'Neonatal posthemorrhagic hydrocephalus from prematurity: pathophysiology and current treatment concepts', *J Neurosurg Pediatr*, 9: 242-58.
- Robinson, S., F. S. Conteh, A. Y. Oppong, T. R. Yellowhair, J. C. Newville, N. E. Demerdash, C. L. Shrock, J. R. Maxwell, S. Jett, F. J. Northington, and L. L. Jantzie. 2018. 'Extended Combined Neonatal Treatment With Erythropoietin Plus Melatonin Prevents Posthemorrhagic Hydrocephalus of Prematurity in Rats', *Front Cell Neurosci*, 12: 322.
- Salter, M. W., and B. Stevens. 2017. 'Microglia emerge as central players in brain disease', *Nat Med*, 23: 1018-27.
- Schirmer, Michael. 1998. *Neurochirurgie : eine Einführung* (München).
- Schmitz, T., A. Heep, F. Groenendaal, D. Huseman, S. Kie, P. Bartmann, M. Obladen, and U. Felderhoff-Muser. 2007. 'Interleukin-1beta, interleukin-18, and interferon-gamma expression in the cerebrospinal fluid of premature infants with posthemorrhagic hydrocephalus--markers of white matter damage?', *Pediatr Res*, 61: 722-6.
- Semple, B. D., K. Blomgren, K. Gimlin, D. M. Ferriero, and L. J. Noble-Haeusslein. 2013. 'Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species', *Prog Neurobiol*, 106-107: 1-16.
- Strahle, J., H. J. Garton, C. O. Maher, K. M. Muraszko, R. F. Keep, and G. Xi. 2012. 'Mechanisms of hydrocephalus after neonatal and adult intraventricular hemorrhage', *Transl Stroke Res*, 3: 25-38.
- Torlakovic, E. E., C. C. Cheung, C. D'Arrigo, M. Dietel, G. D. Francis, C. B. Gilks, J. A. Hall, J. L. Hornick, M. Ibrahim, A. Marchetti, K. Miller, J. H. van Krieken, S. Nielsen, P. E. Swanson, M. Vyberg, X. Zhou, C. R. Taylor, Immunohistochemistry From the International Society for, Morphology Molecular, and Pathology International Quality Network for. 2017. 'Evolution of Quality Assurance for Clinical Immunohistochemistry in the Era of Precision Medicine - Part 2: Immunohistochemistry Test Performance Characteristics', *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 25: 79-85.
- Vogel, J. P., S. Chawanpaiboon, A. B. Moller, K. Watananirun, M. Bonet, and P. Lumbiganon. 2018. 'The global epidemiology of preterm birth', *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 52: 3-12.
- Volpe, J. J. 2001. 'Neurobiology of periventricular leukomalacia in the premature infant', *Pediatr Res*, 50: 553-62.
- Wang, H., O. Bloom, M. Zhang, J. M. Vishnubhakat, M. Ombrellino, J. Che, A. Frazier, H. Yang, S. Ivanova, L. Borovikova, K. R. Manogue, E. Faist, E. Abraham, J. Andersson, U. Andersson, P. E. Molina, N. N. Abumrad, A. Sama, and K. J. Tracey. 1999. 'HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice', *Science*, 285: 248-51.
- Wang, K. C., S. C. Tang, J. E. Lee, Y. I. Li, Y. S. Huang, W. S. Yang, J. S. Jeng, T. V. Arumugam, and Y. K. Tu. 2017. 'Cerebrospinal fluid high mobility group box 1 is associated with neuronal death in subarachnoid hemorrhage', *J Cereb Blood Flow Metab*, 37: 435-43.
- Ward, J. M., and J. E. Rehg. 2014. 'Rodent immunohistochemistry: pitfalls and troubleshooting', *Vet Pathol*, 51: 88-101.
- Watanabe, M., M. Miyajima, M. Nakajima, H. Arai, I. Ogino, S. Nakamura, and M. Kunichika. 2012. 'Expression analysis of high mobility group box-1 protein (HMGB-1) in the cerebral cortex, hippocampus, and cerebellum of the congenital hydrocephalus (H-Tx) rat', *Acta Neurochir Suppl*, 113: 91-6.
- Watson, George Paxinos; Charles. 1986. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*
- Whitelaw, A., and K. Aquilina. 2012. 'Management of posthaemorrhagic ventricular dilatation', *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 97: F229-3.
- Whitelaw, A., and R. Lee-Kelland. 2017. 'Repeated lumbar or ventricular punctures in newborns with intraventricular haemorrhage', *Cochrane Database Syst Rev*, 4: CD000216.
- WHO. 2018. 'Preterm birth', Accessed 27.05.2019.

- Wolf, S. A., H. W. Boddeke, and H. Kettenmann. 2017. 'Microglia in Physiology and Disease', *Annu Rev Physiol*, 79: 619-43.
- Xue, M., J. Balasubramaniam, R. J. Buist, J. Peeling, and M. R. Del Bigio. 2003. 'Periventricular/intraventricular hemorrhage in neonatal mouse cerebrum', *J Neuropathol Exp Neurol*, 62: 1154-65.
- Xue, M., E. I. Mikliaeva, S. Casha, D. Zygun, A. Demchuk, and V. W. Yong. 2010. 'Improving outcomes of neuroprotection by minocycline: guides from cell culture and intracerebral hemorrhage in mice', *Am J Pathol*, 176: 1193-202.
- Zamanian, J. L., L. Xu, L. C. Foo, N. Nouri, L. Zhou, R. G. Giffard, and B. A. Barres. 2012. 'Genomic analysis of reactive astrogliosis', *J Neurosci*, 32: 6391-410.
- Zhang, Z., M. Chopp, and C. Powers. 1997. 'Temporal profile of microglial response following transient (2 h) middle cerebral artery occlusion', *Brain Res*, 744: 189-98.

## 11. Anhang

### 11.1 Färbeprotokolle

#### 11.1.1 Färbeprotokoll für IBA1, TNF $\alpha$ und HMGB1

Ausgangsmaterial waren 5 $\mu$ m dicke Kryoschnitte. Sie wurden auf einer Streckplatte bei 30-35 °C aufgetaut und mind. 10 min getrocknet.

1. In Citratpuffer im Dampfgerar demaskieren 20 Min.
2. Abkühlen lassen 30 Min.
3. Kurz in PBS spülen max.1 Min.
4. Blocken der endogenen Peroxidase mit 100ml Methanol + PBS 1+1 + 1ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 min
5. Waschen in PBS 5 Min.
6. Waschen in PBS+T 5 Min.
7. Inkubieren mit 5% Normal Goat Serum 30 Min.
8. Inkubieren des Primär-Antikörpers bei 4°C über Nacht  
in einer feuchten Kammer mit CoverSlips bedeckt
  
9. Waschen in PBS+T 2 x 5 Min.
10. Inkubieren des Sekundär-Antikörper 30 Min.  
Aktueller Ansatz: 3 Tropfen Normal Goat Serum  
+ 1 Tropfen Sekundär-AK + 10ml PBS
11. Waschen in PBS+T 2 x 5 Min.
12. Inkubieren des ABC-Komplex 30 Min.  
Aktueller Ansatz: 1 Tropfen A + 1 Tropfen B + 2,5ml PBS  
(mindestens 30 min vor Gebrauch ansetzen)
13. Waschen in PBS+T 5 Min.
14. Waschen in PBS 5 Min.
15. Färben mit DAB 2 Min.
16. Waschen in PBS 5 Min.
17. Aufsteigende Alkoholreihe
18. Eindecken

### 11.1.2 Färbeprotokoll für GFAP

Ausgangsmaterial waren 5µm dicke Kryoschnitte. Sie wurden auf einer Streckplatte bei 30-35 °C aufgetaut und mind. 10 min getrocknet.

1. In Citratpuffer im Dampfgerar demaskieren 20 Min.
2. Abkühlen lassen 30 Min.
3. Kurz in PBS spülen max.1 Min.
4. Blocken der endogenen Peroxidase mit 100ml Methanol + PBS 1+1 + 1ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 Min.
5. Waschen in PBS 5 Min.
6. Waschen in PBS+T 5 Min.
7. Inkubieren mit 5% Normal Horse Serum 30 Min.
8. Inkubieren des Primär-Antikörpers bei 4°C über Nacht  
in einer feuchten Kammer mit CoverSlips bedeckt
  
9. Waschen in PBS+T 2 x 5 Min.
10. Inkubieren des Sekundär-Antikörpers 30 Min.  
Aktueller Ansatz: 3 Tropfen Normal Horse Serum  
+ 1 Tropfen Sekundär-AK + 10ml PBS
11. Waschen in PBS+T 2 x 5 Min.
12. Inkubieren des ABC-Komplex 30 Min.  
Aktueller Ansatz: 1 Tropfen A + 1 Tropfen B + 2,5ml PBS  
(mindestens 30 min vor Gebrauch ansetzen)
13. Waschen in PBS+T 5 Min.
14. Waschen in PBS 5 Min.
15. Färben mit DAB 2 Min.
16. Waschen in PBS 5 Min.
17. Aufsteigende Alkoholreihe
18. Eindecken

### 11.1.3 Färbeprotokoll für Hämatoxin und Eosin

Ausgangsmaterial waren 5µm dicke Kryoschnitte. Sie wurden auf einer Streckplatte bei 30-35 °C aufgetaut und mind. 10 min getrocknet.

- |                                     |         |
|-------------------------------------|---------|
| 1. Wässern in Ethanol 96%           | 5 Min.  |
| 2. Wässern in Ethanol 80%           | 5 Min.  |
| 3. Wässern in Ethanol 70%           | 2 Min.  |
| 4. Wässern in Ethanol 60%           | 2 Min.  |
| 5. Wässern in Aqua dest.            | 2 Min.  |
| 6. Färben der Kerne in Hämatoxin    | 2 Min.  |
| 7. Bläuen in Aqua nondest.          | 10 Min. |
| 8. Färben des Gewebes in Eosin 1%ig | 30 Sek. |
| 9. Spülen in Aquanon dest.          | 5 Min.  |
| 10. Entwässern in Ethanol 80%       | 1 Min.  |
| 11. Entwässern in Ethanol 96%       | 2 Min.  |
| 12. Entwässern in Ethanol 96%       | 2 Min.  |
| 13. Entwässern in Isopropanol 100%  | 2 Min.  |
| 14. Entwässern in Xylol             | 5 Min.  |
| 15. Entwässern in Xylol             | 5 Min.  |
| 16. Eindeckeln                      |         |

#### 11.1.4 Ansätze

DAB: 5ml Aqua Dest vorlegen  
2 Tropfen Buffer Stock Solution  
4 Tropfen DAB Stock Solution  
2 Tropfen Hydrogen Peroxide Solution  
(nach jeder Zugabe immer gut mischen)

Citratpuffer: Citric Acid 2,94g  
1l Aqua Dest  
pH 6,0, eingestellt mit HCl

PBST: 2ml Triton 2%  
1l Phosphate-buffered saline

### 11.1.5 Substanzen

Aqua Dest	Aqua Dest; B. Braun, Melsungen
Citric Acid	C-7254; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, (USA)
PBS	Dulbecco´s phosphate-buffered saline; Thermo Fisher Scientific Waltham, Massachusetts (USA)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid 35%; Merck, KGaA, Darmstadt
Triton	Triton X 100; Merck, KGaA, Darmstadt
Vectastain ABC Kit	Vectastain ABC Kit PK-6101, Rabbit IgG; Vector Laboratories INC. Burlingame CA. (USA)
Vectastain ABC Kit	Vectastain ABC Kit PK-6102, Mouse IgG; Vector Laboratories INC. Burlingame CA. (USA)
DAB	DAB Peroxidase Substrate Kit, SK-4100; Vector Laboratories INC. Burlingame CA. (USA)
Primär-Antikörper	IBA1, Monoclonal Antibody, 50µg; FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH, Neuss
Primär-Antikörper	TNF α(52B83) monoclonal; Santa Cruz Biotechnology, Dallas Texas (USA)
Primär-Antikörper	Anti-HMGB1 antibody, ChiP Grade ab18256 Rabbit polyclonal; abcam, Cambridge (UK)
Primär-Antikörper	GFAP: Purified Mouse Anti-GFAP Cocktail, Material-Number: 556330; 0,5mg; 0,5mg/ml; BD Pharmingen, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes (USA)
Goat Serum	Normal Goat Serum, Cat# S-1000, 20 ml; Vector Laboratories, INC. Burlingame CA. (USA)
Horse Serum	Donor Horse Serum, Cat# S9133, Lot# 0803x, 100ml; Biochrom GmbH, Berlin
CoverSlips	Apoptag Plastic Coverslips, Millipore; Merck KGaA, Darmstadt

Negativkontrolle: Es wurde der Primär-Antikörper weggelassen und stattdessen PBS auf den Schnitt pipettiert.

## 11.2 Ergebnistabellen der statistischen Analyse

### 11.2.1 Vergleich der IRF der Interventionsgruppen mittels one-way ANOVA

#### GFAP

Überleben	Gehirnregion	p - Wert
PT1	Cingulärer Kortex	0,002
	Motorischer Kortex	0,060
	Somatosensorischer Kortex	0,299
	Striatum	0,167
	Laterales Septum	0,149
PT3	Cingulärer Kortex	0,781
	Motorischer Kortex	0,899
	Somatosensorischer Kortex	0,356
	Striatum	0,060
	Laterales Septum	0,064
PT7	Cingulärer Kortex	0,706
	Motorischer Kortex	0,581
	Somatosensorischer Kortex	0,362
	Striatum	0,213
	Laterales Septum	0,608
PT21	Cingulärer Kortex	0,353
	Motorischer Kortex	0,611
	Somatosensorischer Kortex	0,808
	Striatum	0,506
	Laterales Septum	0,205

Tabelle 6: Vergleich der IRF von GFAP zwischen den drei Interventionsgruppen mittels one-way ANOVA

## IBA1

Überleben	Gehirnregion	p - Wert
PT1	Cingulärer Kortex	0,486
	Motorischer Kortex	0,902
	Somatosensorischer Kortex	0,773
	Striatum	0,826
	Laterales Septum	0,805
PT3	Cingulärer Kortex	0,301
	Motorischer Kortex	0,424
	Somatosensorischer Kortex	0,681
	Striatum	0,928
	Laterales Septum	0,943
PT7	Cingulärer Kortex	0,547
	Motorischer Kortex	0,199
	Somatosensorischer Kortex	0,264
	Striatum	0,082
	Laterales Septum	0,326
PT21	Cingulärer Kortex	0,140
	Motorischer Kortex	0,273
	Somatosensorischer Kortex	0,916
	Striatum	0,176
	Laterales Septum	0,072

Tabelle 7: Vergleich der IRF von IBA1 zwischen den drei Interventionsgruppen mittels one-way ANOVA

## TNF- $\alpha$

Überleben	Gehirnregion	p - Wert
PT1	Cingulärer Kortex	0,003
	Motorischer Kortex	0,067
	Somatosensorischer Kortex	0,650
	Striatum	0,123
	Laterales Septum	0,044
PT3	Cingulärer Kortex	0,186
	Motorischer Kortex	0,385
	Somatosensorischer Kortex	0,975
	Striatum	0,155
	Laterales Septum	0,830
PT7	Cingulärer Kortex	0,035
	Motorischer Kortex	0,101
	Somatosensorischer Kortex	0,270
	Striatum	0,113
	Laterales Septum	0,352
PT21	Cingulärer Kortex	0,162
	Motorischer Kortex	0,553
	Somatosensorischer Kortex	0,197
	Striatum	0,202
	Laterales Septum	0,203

Tabelle 8: Vergleich der IRF von TNF- $\alpha$  zwischen den drei Interventionsgruppen mittels one-way ANOVA

## HMGB1

Überleben	Gehirnregion	p - Wert
PT1	Cingulärer Kortex	0,417
	Motorischer Kortex	0,397
	Somatosensorischer Kortex	0,882
	Striatum	0,381
	Laterales Septum	0,356
PT3	Cingulärer Kortex	0,061
	Motorischer Kortex	0,074
	Somatosensorischer Kortex	0,041
	Striatum	0,056
	Laterales Septum	0,088
PT7	Cingulärer Kortex	0,216
	Motorischer Kortex	0,180
	Somatosensorischer Kortex	0,137
	Striatum	0,811
	Laterales Septum	0,330
PT21	Cingulärer Kortex	0,806
	Motorischer Kortex	0,607
	Somatosensorischer Kortex	0,856
	Striatum	0,414
	Laterales Septum	0,241

Tabelle 9: Vergleich der IRF von HMGB1 zwischen den drei Interventionsgruppen mittels one-way ANOVA

## 11.2.2 Spearman-Korrelation zwischen der IRF und der Ventrikelgröße in der Blut-Gruppe

### GFAP

Überleben	Gehirnregion	Korrelations-Koeffizient	p - Wert
PT1	Cingulärer Kortex	-0,083	0,809
	Motorischer Kortex	0,016	0,948
	Somatosensorischer Kortex	0,333	0,356
	Striatum	-0,333	0,356
	Laterales Septum	-0,267	0,462
PT3	Cingulärer Kortex	-0,143	0,705
	Motorischer Kortex	-0,238	0,537
	Somatosensorischer Kortex	-0,500	0,182
	Striatum	0,381	0,321
	Laterales Septum	0,143	0,705
PT7	Cingulärer Kortex	-0,095	0,794
	Motorischer Kortex	0,071	0,839
	Somatosensorischer Kortex	-0,571	0,120
	Striatum	-0,214	0,578
	Laterales Septum	-0,476	0,207
PT21	Cingulärer Kortex	0,224	0,512
	Motorischer Kortex	-0,115	0,733
	Somatosensorischer Kortex	0,224	0,512
	Striatum	0,503	0,126
	Laterales Septum	0,297	0,384

Tabelle 10: Spearman Korrelation zwischen der IRF von GFAP und der Ventrikelgröße in der Blut-Gruppe

## IBA1

Überleben	Gehirnregion	Korrelations-Koeffizient	p - Wert
PT1	Cingulärer Kortex	-0,750	0,016
	Motorischer Kortex	-0,817	0,004
	Somatosensorischer Kortex	-0,533	0,124
	Striatum	-0,850	0,0004
	Laterales Septum	-0,883	0,0000002
PT3	Cingulärer Kortex	-0,452	0,233
	Motorischer Kortex	-0,476	0,207
	Somatosensorischer Kortex	-0,786	0,015
	Striatum	-0,452	0,233
	Laterales Septum	0,310	0,423
PT7	Cingulärer Kortex	0,429	0,260
	Motorischer Kortex	0,071	0,839
	Somatosensorischer Kortex	0,333	0,387
	Striatum	0,429	0,260
	Laterales Septum	0,357	0,353
PT21	Cingulärer Kortex	0,394	0,243
	Motorischer Kortex	0,358	0,292
	Somatosensorischer Kortex	-0,067	0,838
	Striatum	0,394	0,243
	Laterales Septum	0,406	0,227

Tabelle 11: Spearman Korrelation zwischen der IRF von IBA1 und der Ventrikelgröße in der Blut-Gruppe

## TNF- $\alpha$

Überleben	Gehirnregion	Korrelations-Koeffizient	p - Wert
PT1	Cingulärer Kortex	-0,100	0,775
	Motorischer Kortex	-0,133	0,709
	Somatosensorischer Kortex	0,133	0,709
	Striatum	-0,233	0,520
	Laterales Septum	-0,217	0,550
PT3	Cingulärer Kortex	0,595	0,102
	Motorischer Kortex	0,452	0,233
	Somatosensorischer Kortex	-0,095	0,794
	Striatum	0,786	0,015
	Laterales Septum	0,881	0,0000002
PT7	Cingulärer Kortex	0,452	0,233
	Motorischer Kortex	0,452	0,233
	Somatosensorischer Kortex	0,429	0,260
	Striatum	0,476	0,207
	Laterales Septum	0,548	0,139
PT21	Cingulärer Kortex	-0,612	0,054
	Motorischer Kortex	-0,539	0,098
	Somatosensorischer Kortex	-0,721	0,016
	Striatum	0,018	0,946
	Laterales Septum	0,188	0,583

Tabelle 12: Spearman Korrelation zwischen der IRF von TNF- $\alpha$  und der Ventrikelgröße in der Blut-Gruppe

## HMGB1

Überleben	Gehirnregion	Korrelations-Koeffizient	p - Wert
PT1	Cingulärer Kortex	-0,033	0,913
	Motorischer Kortex	-0,233	0,520
	Somatosensorischer Kortex	-0,05	0,878
	Striatum	0,133	0,709
	Laterales Septum	-0,233	0,520
PT3	Cingulärer Kortex	-0,071	0,839
	Motorischer Kortex	-0,500	0,182
	Somatosensorischer Kortex	-0,500	0,182
	Striatum	0,381	0,321
	Laterales Septum	0,238	0,537
PT7	Cingulärer Kortex	-0,381	0,321
	Motorischer Kortex	-0,405	0,290
	Somatosensorischer Kortex	-0,167	0,662
	Striatum	0,047	0,885
	Laterales Septum	0,19	0,619
PT21	Cingulärer Kortex	0,624	0,048
	Motorischer Kortex	-0,455	0,172
	Somatosensorischer Kortex	-0,515	0,116
	Striatum	0,855	0,000002
	Laterales Septum	0,891	0,000002

Tabelle 13: Spearman Korrelation zwischen der IRF von HMGB1 und der Ventrikelgröße in der Blut-Gruppe

### 11.2.3 Vergleich der IRF der Hydrozephalus- und Nicht-Hydrozephalus-Tiere mittels t-Test

#### GFAP

Überleben	Gehirnregion	p - Wert
PT21	Cingulärer Kortex	0,867
	Motorischer Kortex	0,667
	Somatosensorischer Kortex	0,410
	Striatum	0,267
	Laterales Septum	0,517

Tabelle 14: Vergleich der IRF von GFAP zwischen Hydrozephalus- und Nicht-Hydrozephalus-Tieren mittels t-Test

#### IBA1

Überleben	Gehirnregion	p - Wert
PT21	Cingulärer Kortex	0,065
	Motorischer Kortex	0,091
	Somatosensorischer Kortex	0,435
	Striatum	0,067
	Laterales Septum	0,267

Tabelle 15: Vergleich der IRF von IBA1 zwischen Hydrozephalus- und Nicht-Hydrozephalus-Tieren mittels t-Test

#### TNF- $\alpha$

Überleben	Gehirnregion	P - Wert
PT21	Cingulärer Kortex	0,183
	Motorischer Kortex	0,267
	Somatosensorischer Kortex	0,287
	Striatum	0,244
	Laterales Septum	0,304

Tabelle 16: Vergleich der IRF von TNF- $\alpha$  zwischen Hydrozephalus- und Nicht-Hydrozephalus-Tieren mittels t-Test

#### HMGB1

Überleben	Gehirnregion	P - Wert
PT21	Cingulärer Kortex	0,05
	Motorischer Kortex	0,976
	Somatosensorischer Kortex	0,517
	Striatum	0,017
	Laterales Septum	0,006

Tabelle 17: Vergleich der IRF von HMGB1 zwischen Hydrozephalus- und Nicht-Hydrozephalus-Tieren mittels t-Test

## Danksagung

Zum Schluss möchte ich den Menschen danken, die mich bei den Experimenten, beim Schreiben dieser Arbeit und ganz besonders beim Endlich-Fertig-Werden unterstützt haben.

Vielen Dank an und für die Betreuung meiner Arbeit. Vielen herzlichen Dank für die Anleitung und Unterstützung bei den Tierversuchen, für die wertvollen Tipps zum Verfassen der Dissertations-schrift, die Korrektur, die erneute Korrektur und schließlich die Begutachtung.

Vielen Dank an meine Kollegen und ehemaligen Kommilitonen und für die produktive Zusammenarbeit an den langen Tagen im OP mit den Rattenjungen und während der kurzen Nächte im MRT mit Mettbrötchen und Kaffee.

Vielen Dank an für die praktischen Unterweisungen im Labor, die netten Gespräche und die vielen Hörbücher für die Arbeit am Gefrierschneider.

Vielen Dank an die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Instituts für Pathologie und der Gewebe-Biobank der Universitätsmedizin Mainz für die gute Zusammenarbeit, das Einscannen unserer gefärbten Schnitte und die Bereitstellung eines Gefrierschneiders als unserer in Wartung war.

Vielen Dank an meine Familie, die ihr alle Hochs und Tiefs meiner Arbeit mitverfolgt und mich die ganze Zeit über unterstützt und motiviert habt. Ich bin euch sehr dankbar für diesen Rückhalt.

Vielen Dank an meine Freunde und Mitbewohnerinnen, die ihr immer ein offenes Ohr für mich hattet, wenn ich resigniert oder unmotiviert war, und dass ihr euch mit mir über jeden Meilenstein gefreut habt.

, ohne dich wäre ich nie fertig geworden. Vielen Dank für die Unterstützung, vielen Dank für die Motivation, vielen Dank für alles andere.

