

Aus der Klinik für Anästhesiologie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Untersuchung neuroprotektiver Effekte repetitiver Gaben von
all-trans-Retinsäure nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma

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

Vorgelegt von

Sebastian Matthias Ulbrich
aus Siegburg

Mainz, 2021

Wissenschaftlicher Vorstand:

1.Gutachter:

2.Gutachter:

Tag der Promotion:

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis.....	VIII
1. Einleitung	1
2. Literaturdiskussion	3
2.1 Epidemiologie des Schädel-Hirn-Traumas	3
2.2 Definition und Klassifikation des Schädel-Hirn-Traumas	4
2.3 Pathophysiologie des Schädel-Hirn-Traumas	7
2.3.1 Blutung/Durchblutung	8
2.3.2 Exzitotoxizität	9
2.3.3 Neuroinflammation.....	11
2.3.4 Astrozyten	12
2.3.5 Hirnödem.....	13
2.3.6 Blut-Hirn-Schranke.....	14
2.4 ATRA (<i>all trans retinoic acid</i>) all-trans Retinsäure.....	16
3. Material und Methoden.....	20
3.1 Material	20
3.1.1 Geräte	20
3.1.2 Medikamente.....	21
3.1.3 Kits.....	21
3.1.4 Primer	22
3.1.5 Antikörper	23
3.1.6 Chemikalien	24
3.1.7 Verbrauchsmaterial.....	24
3.1.8 Software	25
3.2 Methoden	26
3.2.1 Tiere	26
3.2.2 Rotarod.....	26

3.2.3 Neuroscore.....	27
3.2.4 Experimentelles Schädel-Hirn-Trauma	28
3.2.5 Medikamentenapplikation.....	29
3.2.6 Euthanasie und Hirnentnahme.....	30
3.2.7 Hirnschnitte	30
3.3 Histologie und Molekularbiologie	31
3.3.1 Kresylviolett-Färbung nach Nissl.....	31
3.3.2 Auswertung des Läsionsvolumens.....	32
3.3.4 RNA (Ribonukleinsäure)- Extraktion	33
3.3.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung	34
3.3.6 cDNA- Synthese	34
3.3.7 Quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR).....	35
3.3.8 Proteinextraktion	37
3.3.9 DotBlot.....	37
3.3.10 Immunhistochemie	38
3.3.11 Immunfluoreszenz-Färbung.....	38
3.3.12 Quantifizierung der Immunfluoreszenzfärbung.....	39
3.4 Statistik.....	40
4. Ergebnisse.....	41
4.1 Gewicht	42
4.2 Rotarod	43
4.3 Neuroscore	44
4.4 Neuroscore ohne „Exit from Circle“	45
4.5 Kontusionsvolumen	46
4.6 Kresylviolettfärbung der Hirnschnitte	47
4.7 Molekularbiologische Analyse.....	48
4.7.1 GFAP.....	48
4.7.2 IL-1 β	49
4.7.3 Iba-1	50
4.7.4 TNF α	51
4.8 IgG-Dot Blot	52

4.8.1 Fluoreszenzdarstellung IgG-DotBlot	53
4.9 Immunhistochemie.....	54
5. Diskussion	59
6. Zusammenfassung.....	65
7. Literaturverzeichnis:	67
8. Anhang.....	75
9. Danksagung.....	76
10. Lebenslauf	77

Abkürzungsverzeichnis

	°	Grad (Winkel)
	°C	Grad Celsius
	%	Prozent
A	ABC	<i>ATP- binding- cassette- (ABC)- transporters</i>
	AJ	<i>adherens junctions</i>
	AMPA	α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionsäure
	AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
	AQP	Aquaporine
	ATP	Adenosintriphosphat
	ATRA	<i>all-trans-retinoic-acid</i> (all-trans-Retinsäure)
	AU	<i>arbitrary units</i>
B	BHS	Blut-Hirn-Schranke
C	Ca ²⁺	Kalzium
	CBF	<i>cerebral blood flow</i> (zerebraler Blutfluss)
	CCI	<i>controlled cortical impact</i> (kontrollierter kortikaler Aufprall; Modell des Schädel-Hirn-Traumas)
	cDNA	(komplementäre) Desoxyribonukleinsäure
	Cl ⁻	Chlorid
	CPP	<i>cerebral perfusion pressure</i> (zerebraler Perfusionsdruck)
D	DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
	DGNC	Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie
	DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
E	EAAT	<i>excitatory amino acid transporter</i>
	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
G	GCS	<i>Glasgow Coma Scale</i>
	GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i> (Säures Gliafaserprotein)
	GP	<i>gap junctions</i>
H	H ₂ O	Wasser

	i. p.	Intraperitoneal
	Iba	Ionisiertes Kalzium-bindendes Adaptermolekül
	ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
	ICP	<i>intracranial pressure</i> (intrakranieller Druck)
	IgG	Immunglobulin G
	IL	Interleukin
J	JAMs	<i>junctional adhesion molecules</i>
K	K ⁺	Kalium
M	m/s	Meter pro Sekunde
	MAP	Mittlerer arterieller Perfusionsdruck
	MCAO	<i>middle cerebral artery occlusion</i> (Verschluss der A.cerebri media)
	mg	Milligramm
	Min.	Minute
	mmol	Millimol
	mRNA	<i>Messenger Ribonukleinsäure</i>
	MRP	<i>multidrug resistance protein</i>
	ms	Millisekunde
N	Na ⁺	Natrium
	nm	Nanometer
	NMDA	N-Methyl- D-Aspartat
O	OD	optische Dichte
P	PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
	PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase- Kettenreaktion)
	PFA	Paraformaldehyd
	PPIA	Peptidylprolyl isomerase A
	PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
Q	qRT-PCR	<i>quantitative real –time</i> Polymerase- Kettenreaktion
R	RA	<i>retinoic acid</i> (Retinsäure)
	RARs	<i>retinoic acid receptors</i>
	RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay buffer</i>

	RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
	ROCs	<i>receptor operated channels</i>
	ROS	<i>reactive oxygen species</i>
	rpm	<i>rotation per minute</i>
	RT	Raumtemperatur
	RXRS	<i>retinoid x receptors</i>
S	Sek.	Sekunde
	SEM	<i>standard error of mean</i>
	SHT	Schädel-Hirn-Trauma
T	TBST	<i>tris-buffered saline</i>
	TJ	<i>tight junctions</i>
	TNF	Tumornekrosefaktor
	tPA	<i>tissue plasminogen activator</i>
V	Veh	Vehikel
W	WHO	<i>World Health Organisation</i> (Weltgesundheitsorganisation)
Z	ZNS	Zentrales Nervensystem
	ZO	Zonulae occludentes

Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1: Pathophysiologische Prozesse nach SHT	7
Abbildung 2: Pathophysiologie der Zelle	10
Abbildung 3: Molekularer Aufbau der endothelialen Verbindungen der BHS	15
Abbildung 4: Wirkungsmechanismus Retinsäure	17
Abbildung 5: Schädel-Hirn-Trauma Versuchsaufbau CCI	28
Abbildung 6: Kontusionsvolumen.....	32
Abbildung 7: Körpergewicht im Versuchsverlauf.....	42
Abbildung 8: Rotarod.....	43
Abbildung 9: Neurocore.....	44
Abbildung 10: Neuroscore: Zeitlicher Verlauf.....	45
Abbildung 11: Kontusionsvolumen.....	46
Abbildung 12: Kontusionsvolumen (mit ATRA)	46
Abbildung 13: Kontusionsvolumen (mit Vehikel)	47
Abbildung 14: qRT-PCR, GFAP-Expression	48
Abbildung 15: qRT-PCR, IL-1 β -Expression.....	49
Abbildung 16: qRT-PCR Iba-1-Expression.....	50
Abbildung 17: qRT-PCR TNF α -Expression.....	51
Abbildung 18: IgG-DotBlot	52
Abbildung 19: IgG-Messung.....	53
Abbildung 20: Immunhistochemische Färbung des GFAP	54
Abbildung 21: Größe GFAP-Elemente ipsiläsional.	55
Abbildung 22: Anzahl GFAP-Elemente ipsiläsional.	56
Abbildung 23: Größe GFAP-Elemente kontraläsional.....	57
Abbildung 24: Anzahl GFAP-Elemente kontraläsional.....	58

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1: Glasgow Coma Scale.....	5
Tabelle 2: Material: Geräteliste	20
Tabelle 3: Material: Medikamente.....	21
Tabelle 4: Material: Kits.....	21
Tabelle 5: Material: Primer	22
Tabelle 6: Material: Antikörper	23
Tabelle 7: Material: Chemikalien.....	24
Tabelle 8: Material: Verbrauchsmaterialien	24
Tabelle 9: Material: Software	25
Tabelle 10: SHT erweitert nach DIMDI	75

1. Einleitung

Das Schädel-Hirn-Trauma (SHT) ist in seiner akuten Form und deren Folgen eine der führenden Ursachen für Morbidität und Mortalität weltweit (1).

Studien aus Amerika (1) sowie Europa (2) belegen mit eindrucksvollen Zahlen die Auswirkung des SHT sowohl auf das Individuum als auch im sozioökonomischen Sektor. Hiernach sind 2012 in der Europäischen Union bei einer Gesamtbevölkerung von 737 Millionen Einwohnern 82.000 Todesopfer und 2,1 Millionen Krankenhausentlassungen nach SHT beschrieben (2). Besonders betroffen ist das männliche Geschlecht. Spezielle Altersgruppen wie Kleinkinder, Jugendliche und ältere Menschen über 75 Jahre weisen ebenso ein erhöhtes Aufkommen an SHT auf. So ist nach Zahlen der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC) die häufigste Todesursache bis zum 45. Lebensjahr das SHT. Im Gegensatz zu fast allen anderen Ländern steht in Deutschland nicht mehr der Verkehrsunfall (26 %) an der Spitze der Ursachen, sondern Stürze im Alltag (52,5 %) (3).

Die Pathologie des SHT ist durch einen irreversiblen primären und einen multifaktoriell beeinflussten sekundären Schaden charakterisiert. Da sich durch den irreversiblen primären Schaden keine Behandlungsmöglichkeit ergibt, rückt die Therapie des sekundären Schadens in den Fokus. Zur einheitlichen Behandlung des SHT wurde im Jahr 2015 eine überarbeitete Leitlinie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) präsentiert, um Morbidität und Mortalität dieses schweren Krankheitsbildes zu reduzieren (4).

Pathomechanismen wie oxidativer Stress, Ödeme, Inflammation, Nekrose und Apoptose (5) spielen eine entscheidende Rolle, die wiederum Ansätze für Therapie und Forschung bieten. Retinoide, zu denen auch All-trans-Retinsäure (ATRA) gehört, spielen im menschlichen Körper eine essentielle Rolle. Sie entfalten ihre Wirkung über nukleäre Rezeptoren auf genetischer Ebene und beeinflussen Wachstum, Zellproliferation und Differenzierungsprozesse. Besonders in der Embryogenese übernehmen sie eine wichtige Funktion der Entwicklung (6). Ihr therapeutischer Einsatz umfasst bereits verschiedene Gebiete der Medizin und ist auch in Kombination mit anderen Medikamenten wie z.B. Chemotherapeutika anwendbar (7).

Die folgende Arbeit befasst sich mit der Wirkung von ATRA auf das SHT. Hierbei wird in einem siebentägigen Versuchszeitraum die Auswirkung der posttraumatischen intraperitonealen (i. p.) Applikation von ATRA im Mausmodell untersucht. Dazu folgen nach einem künstlich gesetzten SHT verschiedene Versuche mit den Tieren, um ihren gesundheitlichen Zustand zu überprüfen und die neuromotorischen Fähigkeiten in verschiedenen Interventionsgruppen zu vergleichen. Mit weiteren postmortalen Untersuchungen wird die Auswirkung der Medikamentenapplikation auf Kontusionsvolumen, inflammatorische und regenerative Prozesse erforscht. Hierbei steht der Vergleich zwischen den beiden Interventionsgruppen im Fokus (ATRA *controlled cortical impact* (CCI) versus Vehikel (Veh) CCI). Dabei werden Tiere mit SHT und ATRA-Applikation mit Tieren, die ausschließlich Vehikel appliziert bekommen, verglichen. In diesem Rahmen soll erforscht werden, welche Auswirkung ATRA auf den sekundären Schaden entwickelt und welche potentielle Rolle es im Rahmen der Grundlagenforschung für die Therapie des SHT einnimmt.

2. Literaturdiskussion

2.1 Epidemiologie des Schädel-Hirn-Traumas

Das SHT ist ein globales Gesundheitsproblem. Mit weltweit ca. 10 Millionen Fällen, die entweder im Krankenhaus behandelt werden oder sogar letal verlaufen, wird die Relevanz dieses Krankheitsbildes belegt. Hinzu kommt eine relevante, unbekannte Zahl nicht erkannter SHT (1). Das SHT hat mit 37 % aller unfallbedingten Todesfolgen (2) einen erheblichen Anteil in dieser Statistik. Bezieht man sich auf Daten der DGNC sind in Deutschland jährlich ca. 400 von 100.000 Einwohnern von Schädelhirnverletzungen betroffen. Das entspricht einer Gesamtzahl von weit über 300.000 Fällen. Hiervon werden ca. 300 von 100.000 stationär behandelt. Bei ca. 180 von 100.000 Fällen ist das Trauma so schwer, dass Langzeitschäden zu erwarten sind. Hinzu kommen jährlich ca. 40 Todesfälle pro 100.000 Einwohner. Besonders auffällig ist, dass das SHT für die unter 45-Jährigen die häufigste Todesursache ist. Die Konsequenzen einer entstandenen Behinderung sind in diesem Alter besonders weitreichend, nicht nur im persönlichen Umfeld, sondern auch für das Sozialsystem aufgrund einer eingeschränkten Erwerbsfähigkeit oder sogar kompletten Erwerbsunfähigkeit.

2.2 Definition und Klassifikation des Schädel-Hirn-Traumas

Das SHT ist Folge einer äußeren Gewalteinwirkung auf den Schädel *und/oder* das Gehirn. Man unterscheidet zwischen einem primären und einem sekundären Schaden. Unter dem primären Schaden versteht man die durch akute Gewalteinwirkung entstehende Zerstörung von Gewebe im Schädel, insbesondere des Gehirns. Hierbei ist der primäre Schaden als definitiver Schaden keiner Therapie mehr zugänglich. Des Weiteren ist die primäre Schädigung Ausgangspunkt für sekundäre Verletzungsfolgen. Durch die Verletzung wird eine Kaskade an Reaktionen in Gang gesetzt, welche den primären Schaden verstärkt. Die auf den primären Schaden folgenden pathophysiologischen Abläufe werden als sekundärer Schaden bezeichnet (8). Dieser kann durch eine schnelle und wirksame Therapie behandelt und eingeschränkt werden. Die sekundäre Verletzungsfolge ist damit das eigentliche Ziel der medizinischen Therapie bei Schädelhirnverletzungen.

Die primären Folgen eines SHT lassen sich in Weichteilverletzungen, knöcherne Verletzungen, Verletzungen von Gefäßen (Arterien, Venen), Verletzungen der Hirnhäute und Schädigung der Hirnsubstanz unterscheiden, treten meist aber nicht unabhängig voneinander auf (8).

Die sekundäre Schädigung umfasst eine Unterversorgung des Gehirns mit Sauerstoff, eine Erhöhung des intrakraniellen Druckes (ICP: *intracranial pressure*), Stoffwechselstörungen, Ödeme und entzündliche Prozesse.

Um international und einheitlich diesem Krankheitsbild zu begegnen, wurden Klassifikationssysteme entwickelt, die eine schweregradabhängige Therapie nach sich ziehen. Zum einen wird in der Akutsituation die Glasgow Coma Scale (GCS) angewendet, um schon präklinisch einzuschätzen, wie schwer das Trauma ist. Die 1974 entwickelte Skala ermittelt mit Hilfe eines Punktesystems die Bewusstseinslage als Korrelat der Funktion des zentralen Nervensystems (9).

Eine Einteilung erfolgt aufgrund der Punktevergabe aus drei Bewertungsbereichen, die eine Orientierung für den weiteren Ablauf bieten können (Tabelle 1).

Des Weiteren hat die AWMF in ihrer überarbeiteten Leitlinie von 2015 Algorithmen für die Behandlung am Unfallort, in der Klinik und für den erhöhten ICP herausgebracht. Diese beschreibt spezielle Therapieschritte basierend auf der GCS- Einschätzung (4).

Glasgow Coma Scale

Tabelle 1: Glasgow Coma Scale

Öffnen der Augen	spontan	4 Punkte
	bei Ansprache	3 Punkte
	bei Schmerzreiz	2 Punkte
	kein Öffnen der Augen	1 Punkt
Beste Verbale Antwort	konversationsfähig, orientiert	5 Punkte
	konversationsfähig, desorientiert	4 Punkte
	Einzelworte (" <i>Wortsalat</i> ")	3 Punkte
	sinnlose Laute	2 Punkte
	keine verbale Antwort	1 Punkt
Beste motorische Antwort	bei Aufforderung	6 Punkte
	gezielte Bewegung bei Schmerzreiz	5 Punkte
	ungezielte Bewegung auf Schmerzreiz	4 Punkte
	Beugesynergismen	3 Punkte
	Streckesynergismen	2 Punkte
	keine motorische Reaktion	1 Punkt
Gesamtpunktzahl		3 bis 15 Punkte

Anhand der vergebenen Punkte lässt sich die Schwere des SHT wie folgt interpretieren:

15-13 Punkte: leichtes SHT

12-9 Punkte: mittelschweres SHT

8-3 Punkte: schweres SHT

Trotz der globalen Anwendung der GCS im klinischen und präklinischen Alltag weist sie qualitative Schwächen in ihrer Interpretation auf (10). Aufgrund der Variabilität der Verletzungsmuster ist es schwierig ein praktikables Diagnosesystem zu etablieren, welches alle Verletzungskomponenten effektiv einbezieht. Zudem fließt eine subjektive,

untersucherabhängige Komponente in die Beurteilung ein, die das Ergebnis und eine daraus folgende Therapie beeinflusst (11).

Weiter lässt sich das SHT in ein offenes SHT (Perforation von Kopfhaut, Schädelknochen und Zerreißung der Dura Mater) und ein geschlossenes SHT unterteilen.

Eine detaillierte Beschreibung erfasst der ICD 11 Katalog, der durch die WHO (*World Health Organisation*) herausgegeben wird. Dieser dient nicht der akuten Erkennung und Behandlung, sondern verdeutlicht nach abgeschlossenen diagnostischen Maßnahmen die Vielseitigkeit des Krankheitsbildes und wird für statistische Zwecke und Abrechnung genutzt (siehe Tabelle 10 im Anhang) (12).

2.3 Pathophysiologie des Schädel-Hirn-Traumas

Die pathophysiologischen Veränderungen nach SHT sind vielseitig und benötigen eine detaillierte Beschreibung, um die Interventionsmöglichkeiten zu konkretisieren. Da dem primären Schaden nur präventiv entgegengewirkt werden kann, soll hier vor allem die Pathophysiologie des sekundären Schadens betrachtet werden, um therapeutische Ansätze finden zu können. Dieser umfasst die nachfolgend erläuterten Bereiche wie Hirnblutung und Durchblutungsstörungen, Exzitotoxizität, Inflammation, Ödembildung, Störung der Blut-Hirn-Schranke (BHS) und die Funktion der Astrozyten (5).

Abbildung 1 zeigt den schematischen Verlauf der pathophysiologischen Prozesse, die bei Rotationsverletzungen ablaufen. Die bei dieser Verletzungsform entstehenden Kräfte und posttraumatischen Prozesse lassen sich auch auf das Verletzungsschema des SHT übertragen.

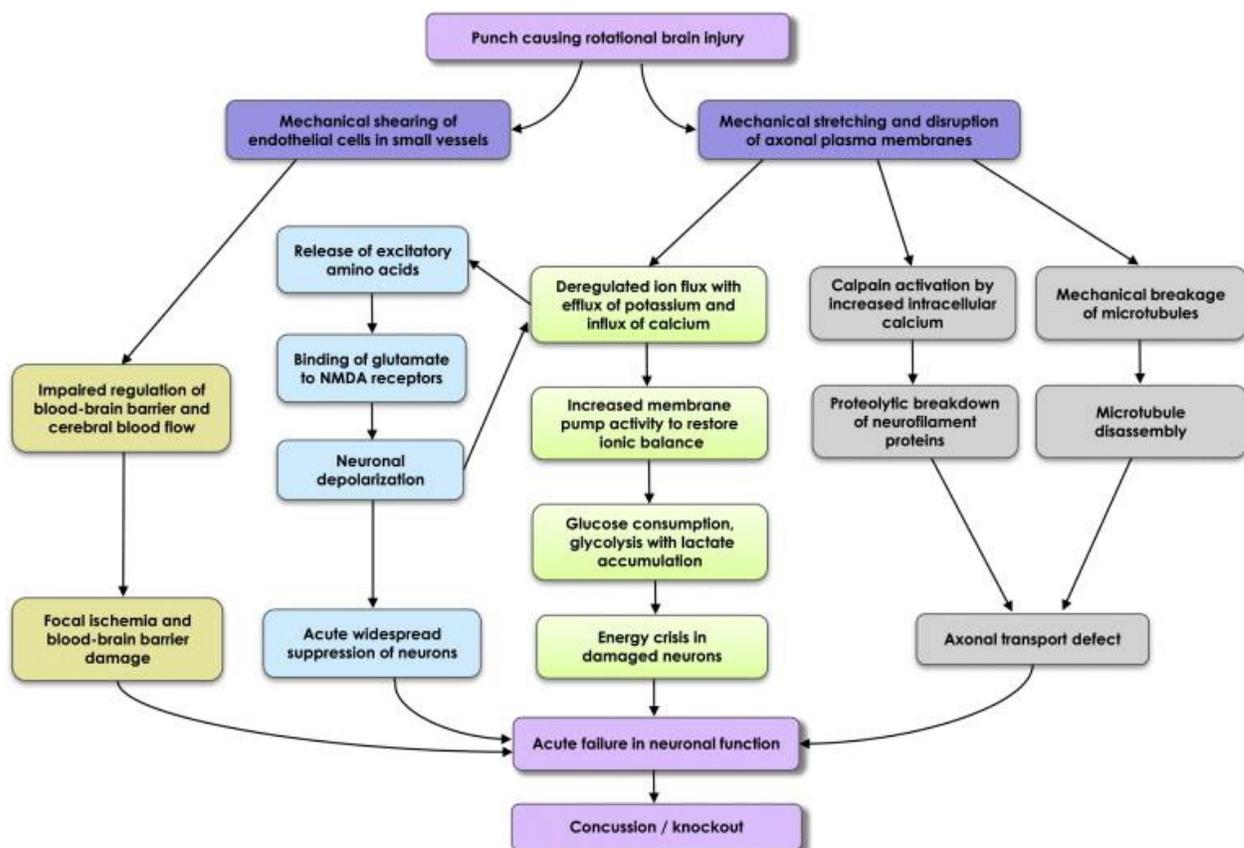


Abbildung 1: Pathophysiologische Prozesse nach SHT (bei Rotationsverletzung)

Schematische Beschreibung der verschiedenen pathophysiologischen Abläufe nach SHT aus Blennow K, Hardy J, Zetterberg H (13)

2.3.1 Blutung/Durchblutung

Durch die Gewalteinwirkung auf den Schädel und das Hirngewebe kommt es zur Verletzung der versorgenden Blutgefäße. Hieraus entstehen verschiedene Pathologien, die zur weiteren Schädigung des Gewebes führen. Zum einen wird die Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff, aber auch Nährstoffen unterbrochen oder verringert. Ebenso wird der Abtransport schädlicher Metabolite beeinflusst (14). Zusätzlich kann durch das entstehende Hämatom Hirngewebe verdrängt werden. Durch die natürliche Begrenzung des Schädels resultiert somit eine Kompression von Hirngewebe. Hieraus entsteht ebenfalls eine Minderversorgung des Gewebes, sowie die Gefahr der Einklemmung lebenswichtiger Hirnregionen wie Atem- und Kreislaufzentrum. Bei den Hirnblutungen lässt sich zwischen drei verschiedenen, die Lokalisation betreffenden Blutungen unterscheiden. Diese können durch ein traumatisches Entstehungsbild durchaus kombiniert auftreten. Die epidurale Blutung entsteht durch die Laceration eines epiduralen Gefäßes im Rahmen einer Schädelfraktur oder eines SHT. Hierdurch kommt es zur linsenförmigen Hämatombildung zwischen Dura mater und Schädelkalotte (15). Aufgrund einer langsamen Entstehung kann nach einer traumabedingten Symptomatik ein symptomfreies Intervall folgen, welches die Gefahr des Nichterkennens oder der Fehldiagnose birgt. Das subdurale Hämatom entsteht zwischen Dura mater und der Hirnoberfläche. Unterschieden werden ein akutes und ein chronisches subdurales Hämatom. Das weitaus gefährlichere akute Hämatom sorgt für eine Verdrängung des Hirngewebes und der daraus folgenden Einklemmung lebensnotwendiger Hirnareale. Die Subarachnoidalblutung ist eine arterielle, teilweise auch venöse Blutung in den Subarachnoidalraum zwischen Arachnoidea und Pia mater. Dieser Raum stellt den äußeren Liquorraum dar. Einblutungen führen auch nach Sistieren der Blutung zu einer Systemreaktion mit einer hohen Mortalität in den ersten zwei Wochen (16).

2.3.2 Exzitotoxizität

Der Prozess der Exzitotoxizität beschreibt den Untergang von Nervengewebe aufgrund einer überschießenden Stimulation von Zellen durch vermehrte Ausschüttung von exzitotoxischen Neurotransmittern. Als Hauptparameter gilt eine erhöhte Glutamatkonzentration. Glutamat wird aus Vesikeln der Präsynapse freigesetzt, kann aber auch durch geschädigte Zellmembranen direkt austreten. Die Wiederaufnahme des Glutamats erfolgt durch Astrozyten. Dieser Prozess wird über einen Adenosintriphosphat (ATP)-abhängigen Na^+ -Kotransport aufrechterhalten. Durch die Störung des Energiehaushaltes und eine verminderte ATP-Konzentration wird die Homöostase gestört und die Glutamat-Konzentration bleibt erhöht (17).

Glutamat beeinflusst die Ionentransporter N-Methyl- D-Aspartat (NMDA) und α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionsäure (AMPA), welche unter dem Überbegriff *Receptor-operated-channels* (ROCs) zusammengefasst werden. Die extrazelluläre Glutamaterhöhung führt so zu einem massiven Kalzium (Ca^{2+}) - und Natrium (Na^+) - Einwärtstrom in Neuronen und Gliazellen (18). Ca^{2+} ist ein ubiquitär vorkommender Mineralstoff im Körper, welcher unter anderem als *Second Messenger* in nahezu allen Körperzellen lebenswichtige Prozesse steuert (19). In Neuronen ist der Kalziumgehalt so entscheidend, dass er durch diverse Prozesse (siehe Abbildung 2) der Zelle eigenständig reguliert wird. Diese umfassen sowohl Ein- und Auswärtsstrom wie auch die Speicherung von Ca^{2+} in Zellorganellen (20). Durch ein Missverhältnis werden physiologische Prozesse beeinflusst, die die Homöostase der Zelle regulieren (21). Die Aktivierung Ca^{2+} - abhängiger Enzyme, sowie die Störung der Mitochondrien zählen zu den Hauptfaktoren, die einen Zelluntergang nach sich ziehen (22), (23). Proteasen wie Calpain spalten Bestandteile des Zytoskeletts und stören damit einen geregelten Ablauf der Zellphysiologie (24). Die Schädigung der Mitochondrien verhindert eine aerobe Energieherstellung in Form von ATP.

Oxidativer Stress durch pathophysiologische Erhöhung von *reactive oxygen species* (ROS) wie Superoxid ($\text{O}_2^{\cdot-}$), Hydroxyl ($\text{OH}\cdot$) – Radikalen und Peroxynitrit (ONOO^-) schädigt Proteine, DNA (Desoxyribonukleinsäure) und Lipidmembrane und leitet den Untergang und den Funktionsverlust der Zellen ein (25).

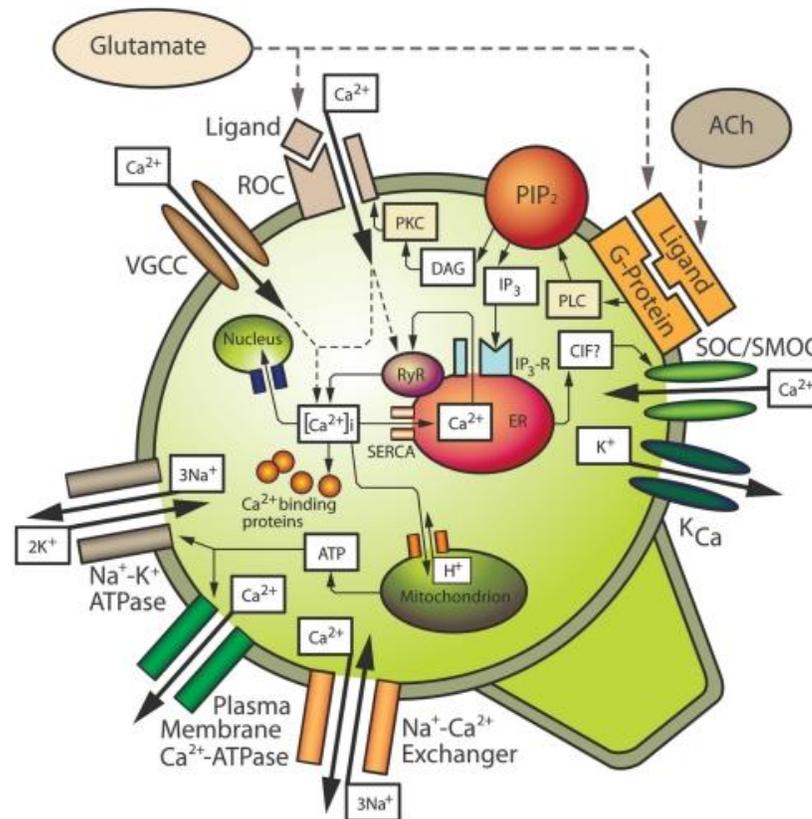


Abbildung 2: Pathophysiologie der Zelle

Die Abbildung zeigt Mechanismen, die zur intrazellulären Ca²⁺- Homöostase und Signalübertragung in Neuronen beitragen (nach John T. Weber (26)).

Durch die Zerstörung der Mitochondrien und dem daraus resultierenden Mangel an ATP tritt ein Ungleichgewicht zwischen energieunabhängiger Nekrose und energieabhängiger Apoptose zugunsten der Nekrose auf (27). Die Apoptose beschreibt einen Prozess des regulierten Zelluntergangs ohne eine Entzündungsreaktion des umliegenden Gewebes. Aufgrund der vermehrten Nekrose wird auch das anliegende Gewebe durch freigesetzte Zellorganellen, Enzyme und Entzündungsmediatoren negativ beeinflusst. Studien zeigen, dass sich das Volumen einer lokalen Nekrose innerhalb der ersten 24 Stunden nach Trauma um 400 % erhöhen kann (28).

2.3.3 Neuroinflammation

Neuroinflammation beschreibt einen entzündlichen Prozess des zentralen Nervengewebes (ZNS), der sowohl akut als auch chronisch verlaufen kann (29). Dieser Prozess beinhaltet die biochemische sowie die zelluläre Antwort auf eine schädliche Ursache (30). Zunächst soll somit der Schaden eingeschränkt werden. Auf Dauer können die ablaufenden Prozesse das Gewebe allerdings auch schädigen. Pro- und antiinflammatorische Abläufe sollten für eine optimale Regeneration in einem ausgewogenen Verhältnis stehen. Ursächlich für die Neuroinflammation können Infektionen, neurodegenerative Erkrankungen sowie traumatische Verletzungen sein. Zunächst werden die hirneigenen Zellen (Gliazellen), die der Abwehr dienen, aktiviert. Hierzu zählen Mikroglia und Makroglia. Diese können mithilfe von Mediatorsubstanzen, sogenannten Zytokinen, weitere Abwehrzellen anlocken. Somit gelangen auch Leukozyten aus dem peripheren Immunsystem ins Gehirn (31). Alle Zelltypen des Hirngewebes (Neuronen, Astrozyten, Mikroglia, Oligodendrozyten und Endothelzellen) sind letztendlich in der Lage diese Zytokine auszuschütten, jedoch nehmen Mikroglia einen entscheidenden Faktor bei der Abwehr ein. Sie gehören zum ZNS-spezifischen Immunsystem, da das Gehirn durch die BHS vom sonstigen Immunsystem überwiegend getrennt ist (32). Mikroglia sind multifunktionelle Zellen, welche 10-15 % aller Gliazellen ausmachen (33). Im gesunden Gehirn tasten die Zellen kontinuierlich ihr Umfeld auf Schäden ab und kommunizieren mit den angrenzenden Astrozyten (34), Neuronen und Blutgefäßen. In diesem Zustand werden sie als „*resting microglia*“ beschrieben. Entsteht ein Schaden, so sind die Zellen nach einem komplexen Aktivierungsprozess in der Lage sich aktiv zum Schaden zu bewegen. Folgend werden sie als „*activated microglial cells*“ beschrieben. Wenn sie den Schadensort erreicht haben, phagozytieren sie Zellbestandteile sowie geschädigte Zellen und helfen die funktionelle Integrität und Homöostase wiederherzustellen (35). Die Freisetzung von pro-inflammatorischen Mediatoren wie Interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-17, Tumornekrosefaktor (TNF)- α und Interferon- γ wird häufig phänotypisch als M1-Reaktion beschrieben. Ihr gegenüber wird als tendenziell schützende die M2-Reaktion mit der Freisetzung antiinflammatorischer Mediatoren, wie IL-4, IL-10, IL-13 und *growth factor- β 1* (TGF- β 1) gestellt (36). Eine klare

Unterscheidung dieser Prozesse ist aufgrund der überschneidenden Reaktionen pro- und antiinflammatorischer Mediatoren schwierig. Jedoch ist das Zusammenspiel dieser Prozesse für die neuroregenerativen Prozesse entscheidend (36). Dies belegen Studien, in denen eine initiale Therapie mit Unterdrückung der inflammatorischen Prozesse nicht von Vorteil ist (37). Zu welchem Zeitpunkt welche Prozesse der Neuroinflammation beeinflusst werden, hat demnach einen hohen Stellenwert in der Behandlung des sekundären Schadens.

2.3.4 Astrozyten

Die Makroglia bilden neben der Mikroglia den größeren Teil des Gliagewebes und bestehen hauptsächlich aus Astrozyten und Oligodendrozyten. Mit ihren vielseitigen Funktionen sind sie ein essentieller Bestandteil des ZNS und für dessen Homöostase mitverantwortlich (38). Astrozyten bilden eine Verbindung zwischen den versorgenden Gefäßen und den Nervenzellen. Sie umgeben Gefäße und Nervenzellen, wobei die Synapsen ausgespart werden. Astrozyten werden mit ihrer engen Ummantelung von Gefäßen häufig als Teil der BHS gesehen und bilden somit einerseits eine schützende Barriere für die Neuronen, sind aber ebenso für deren Stoffwechsel verantwortlich (39). Sie sind in der Lage Glykogen zu speichern, um für kurze Zeit, z.B. beim SHT, ausreichend Energie für die Neuronen zur Verfügung zu stellen und den eigenen Stoffwechsel aufrecht zu erhalten (40).

Astrozyten spielen im Rahmen des SHT eine wichtige Rolle. In ihrer heterogenen Funktion können sie einen Schaden einerseits eindämmen, andererseits auch verstärken. Ebenso wie bei der Mikroglia werden diese zwei Aktivitätsunterschiede in A1 (tendenziell neurodegenerativ) und A2 (tendenziell neuroprotektiv) unterteilt (34). So schütten Astrozyten z.B. Zytokine wie IL-6 aus, welche die BHS durchlässig für periphere Immunzellen machen und so eine proinflammatorische Reaktion nach sich ziehen (41). Diese soll zunächst den Schaden reduzieren, kann aber im Verlauf den sekundären inflammatorischen Prozess wie oben beschrieben negativ beeinflussen. Reaktive Astrozyten hypertrophieren nach SHT und sind in der Lage sich in Richtung des Schadens

zu bewegen, um diesen einzudämmen. Dazu bilden sie um das geschädigte Gewebe eine Glianarbe, welche das umliegende Hirnparenchym vor weiterem Untergang schützt. Im weiteren Verlauf stellen Astrozyten eine wichtige Komponente bei der Entstehung einer neuen *Glia limitans* dar. Dieser Prozess ist ein Teil der als Astrogliose beschriebenen Abläufe, denen zunächst ein protektiver Effekt eingeräumt wird. Dieser kann aber dauerhaft das Aussprossen neuer Nervenverbindungen einschränken (42). Astrozyten sind zudem in der Lage exzitotoxische Substanzen wie Glutamat aufzunehmen und somit der Neurodegeneration vorzubeugen (43). Dazu besitzen sie spezielle Transportproteine (*excitatory amino acid transporters*: EAAT1 und EAAT 2), über die die extrazelluläre Konzentration von Glutamat in nicht-toxische Bereiche reguliert wird (44). Zudem sind sie in der Lage ROS abzapfen. Dazu wird als Antioxidans Glutathion in den Astrozyten gespeichert. Diese sind so widerstandsfähiger als Neuronen und können deren Überleben unterstützen (45). Auch Ca^{2+} , Kalium (K^+), Chlorid (Cl^-) und Wasser (H_2O) werden durch Astrozyten beeinflusst. Durch die vermehrte Aufnahme von H_2O können sie anschwellen und zum Hirnödem beitragen. Dafür sind spezielle Wassertransportproteine verantwortlich: Aquaporine (AQP), in diesem Fall AQP4 (46). Als Marker für die reaktiven Astrozyten dient das in ihnen vorkommende Intermediärfilament saures Gliafaserprotein (GFAP, *glial fibrillary acidic protein*), welches in Gewebe und Blut gemessen werden kann. GFAP scheint in Zusammenhang mit Schaden und Outcome nach SHT zu stehen (47). Auch hier scheint eine sehr differenzierte Ansicht der heterogenen Vorgänge von Nöten, um Nutzen und Schaden der Astrogliose sowie die reaktiven Vorgänge zu beeinflussen.

2.3.5 Hirnödeme

Das Hirnödem ist ein weiterer Faktor für den Untergang von Hirngewebe. Wie schon in der Monro-Kellie-Doktrin beschrieben (48), setzt sich der Hirndruck aus verschiedenen Komponenten zusammen, nämlich dem Hirngewebe, Blut und Liquor. Nimmt eine Komponente mehr Volumen ein als physiologisch vorgesehen, können die anderen Komponenten dies bis zu einem gewissen Volumen kompensieren.

Unterschieden werden drei Formen des Hirnödems, die aufgrund ihrer Entstehungsmuster zu differenzieren sind. Das vasogene Hirnödem entsteht z. B. nach SHT durch eine Störung der Kapillarpermeabilität und Hämodynamik. Hierbei entsteht das

Ödem extrazellulär. Das zytotoxische Hirnödem beschreibt eine intrazelluläre Volumenzunahme aufgrund einer Störung der Na^+/K^+ -ATPase. Zudem gibt es das interstitielle Hirnödem, welches durch eine Zunahme des Liquors entsteht (49).

Bei allen Formen des Ödems steigt der intrakranielle Druck (ICP). Sind die Kompensationsmechanismen erschöpft, folgt der Untergang von Hirngewebe. Der zunehmende ICP führt zur Kompression aller Komponenten, da durch den starren Schädel keine Ausdehnung möglich ist. Steigt der ICP, der normalerweise zwischen 5 - 15 mmHg in der Horizontalen liegt (50), über den zerebralen Perfusionsdruck (CPP), kann die Durchblutung des Gewebes (CBF= zerebraler Blutfluss) nicht mehr gewährleistet werden. Der CCP ergibt sich wie folgt (50):

$$\text{CPP} = \text{mittlerer arterieller Perfusionsdruck (MAP)} - \text{ICP}$$

2.3.6 Blut-Hirn-Schranke

Die BHS stellt eine selektive Barriere zwischen Blut und Hirnparenchym dar. Sie verhindert einen unkontrollierten Übertritt verschiedener Substanzen, welche das Hirnparenchym schädigen könnten. Dazu gehören Blutbestandteile (Albumin, Prothrombin, Plasminogen) (51), sowie im Blut gelöste Substanzen wie Hormone, Medikamente, Noxen, aber auch Ionen, welche die neuronale Aktivität beeinflussen können. Na^+ , K^+ , Ca^{2+} werden deshalb streng reguliert (52).

Andererseits ermöglicht die BHS einen Austausch bestimmter Moleküle wie z. B. die Diffusion von Wasser und lipophilen Substanzen, die einem Konzentrationsgradienten folgen (14). Gebildet wird sie maßgeblich von Endothelzellen, welche die Gefäße von innen auskleiden. Um eine unkontrollierte Diffusion durch die Zellzwischenräume der Zellen zu verhindern, sind diese mit festen Zell-Zell-Kontakten verbunden. Für einen kontrollierten Austausch stehen spezielle Transportproteine zur Verfügung, wie z.B. der Glukose (GLUT) 1-Transporter, der für die Energieversorgung des Gehirns Glukose transportiert (53). Die Migration von T-Zellen wird durch die Bindung von Leukozyten an *intercellular adhesion molecule* (ICAM)-1 und ICAM-2-Rezeptoren ermöglicht, die auf den Endothelzellen präsentiert werden (54). Die gesamte Austauschfläche aller Gefäße im erwachsenen Gehirn umfasst hierfür 12 bis 18 m^2 (55). Weitere Transportproteine wie die

multidrug resistance proteins (MRP) ermöglichen ein gezieltes Ausschleusen bestimmter Stoffe (56). Diese Transportproteine gehören zu der Gruppe der *ATP-binding-cassette*- (ABC)-*transporters*. Um die notwendige Energie für all diese Prozesse zu liefern, ist das Gewebe besonders reich an Mitochondrien (57).

Die Verbindungsproteine nehmen eine entscheidende Rolle der Schrankenfunktion ein. Diese Gruppe umfasst *tight junctions* (TJ), (lat.: Zonulae occludentes), welche zusammen mit den *adherens junctions* (AJ) die Durchlässigkeit regeln. Die *gap junctions* (GJ) dienen der interzellulären Kommunikation (58). Diese Proteine sorgen für eine feste Verbindung der Endothelzellen.

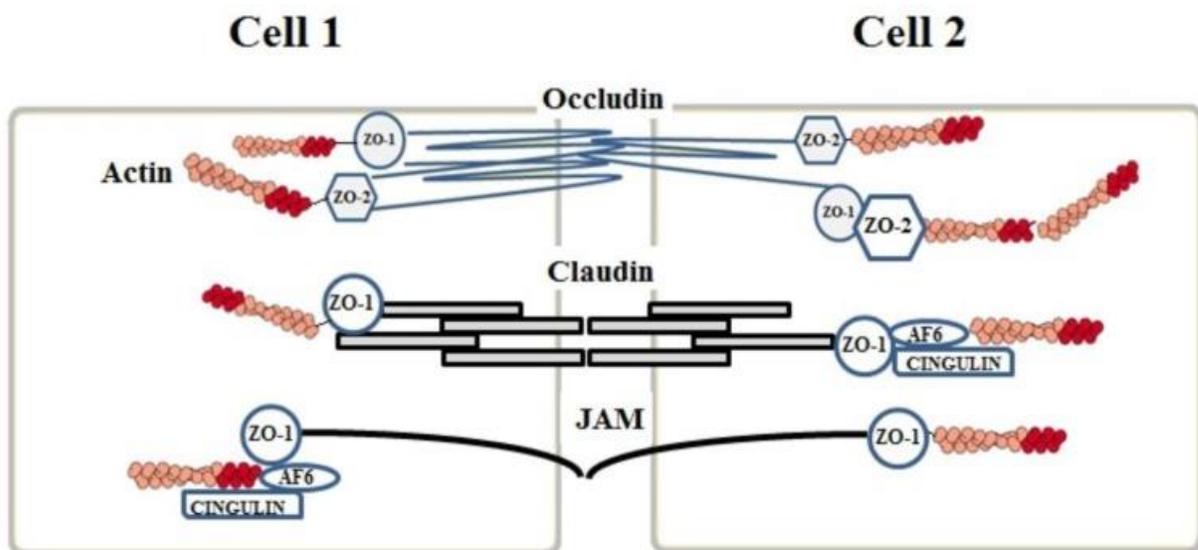


Abbildung 3: Molekularer Aufbau der endothelialen Verbindungen der BHS

Die Abbildung zeigt die einzelnen Membranproteine, die eine Diffusionsbarriere bilden (nach Maiuolo J et al.(59)).

Der Verbindungskomplex der TJ besteht aus drei integrierten Transmembranproteinen (Abbildung 2): Claudine, Occludine und *junctional adhesion molecules* (JAMs), welche über die ZO-Proteine 1-3 im Zellskelett über Aktinfasern verankert sind (52). Die AJ dienen der Verbindung der Endothelzellen, unterstützen das Gefäßwachstum und sorgen mit für die Steuerung der elektrischen Ladung der Zellen (58). Durch die Barriere für Ionen

bildet sich ein elektrischer Widerstand von ca. $1800 \Omega \text{ cm}^2$. Diese elektrische Barriere hindert geladene Makromoleküle am Durchtritt der BHS (60). Die JAMs gehören zu einer Untergruppe der Immunglobulin-Superfamilie. Sie sind mit ihrem extrazellulären Anteil in die Interaktion zwischen Leukozyten und Endothelzellen involviert (61). Claudine und Occludine bilden mit ihren Untergruppen die festen Zell-Zell-Verbindungen. Mutationen und Störungen dieser Strukturen führen zu einer erhöhten Permeabilität der BHS und sind mit diversen Erkrankungen wie z. B. Alzheimer assoziiert (62).

2.4 all-trans-Retinsäure

All-trans-Retinsäure ist ein aktiver Metabolit des Vitamin A. Es ist ein lipophiles Molekül, welches durch Lipidmembranen ins Zellinnere gelangt und Gentranskription bewirkt. Da ATRA hydrophob ist, bedarf es intrazellulärer Transportproteine, um den Zellkern und die entsprechenden Rezeptoren zu erreichen. Eines dieser Transportproteine ist das zelluläre *retinoic acid* (RA)-bindende Protein II (CRABP II) (63). Gebildet werden die aktiven Metabolite in der Leber. Aus Vitamin A wird hier ATRA sowie 9-cis Retinsäure synthetisiert. Seine Wirkung entwickelt es als Ligand fungierend über verschiedene Rezeptoren (64). Diese gehören zu den nukleären Rezeptoren. Zwei Rezeptortypen stehen hier mit ihren Untergruppen im Vordergrund. Die *retinoic acid receptors* (RARs) und *retinoid x receptors* (RXRs), welche jeweils drei Untergruppen besitzen: α , β , und γ . ATRA bindet an die RAR- Rezeptorgruppe, die RXR- Rezeptorgruppe wird durch 9-cis Retinsäure aktiviert, die zudem auch die RAR- Rezeptorgruppe aktivieren kann (65)-(66). Retinoide spielen eine essentielle Rolle für lebenslange Prozesse im ZNS. Neurogenese, neuronale Plastizität, kognitive Funktionen und motorische Kontrolle werden durch RA beeinflusst. Nicht zuletzt die schnelle Antwort auf schädigende Einflüsse und deren Regeneration werden durch RA unterstützt (67). Bekannt ist, dass die embryologische Neurogenese eng durch RA reguliert wird. Ein Fehlen von RA führt signifikant zu verminderter Neurogenese (68). Auch wenn die detaillierten Abläufe und Wirkungsprozesse des Vitamin A und seiner Derivate noch nicht genau verstanden werden, spricht die Entdeckung der Retinoid-Rezeptoren im ZNS dafür, dass sie eine wichtige Rolle spielen. Dies belegen Studien, in denen Ratten Vitamin A vorenthalten wurde. Diese entwickelten deutliche Defizite im räumlichen Denken und der Erinnerungsfähigkeit. Die Defizite waren bei erneuter Verabreichung von Vitamin A völlig

reversibel (69). Des Weiteren scheint eine Funktionsstörung oder ein Funktionsverlust der RA-Rezeptoren zu neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer (70), Parkinson (71) und Schizophrenie (72) beizutragen.

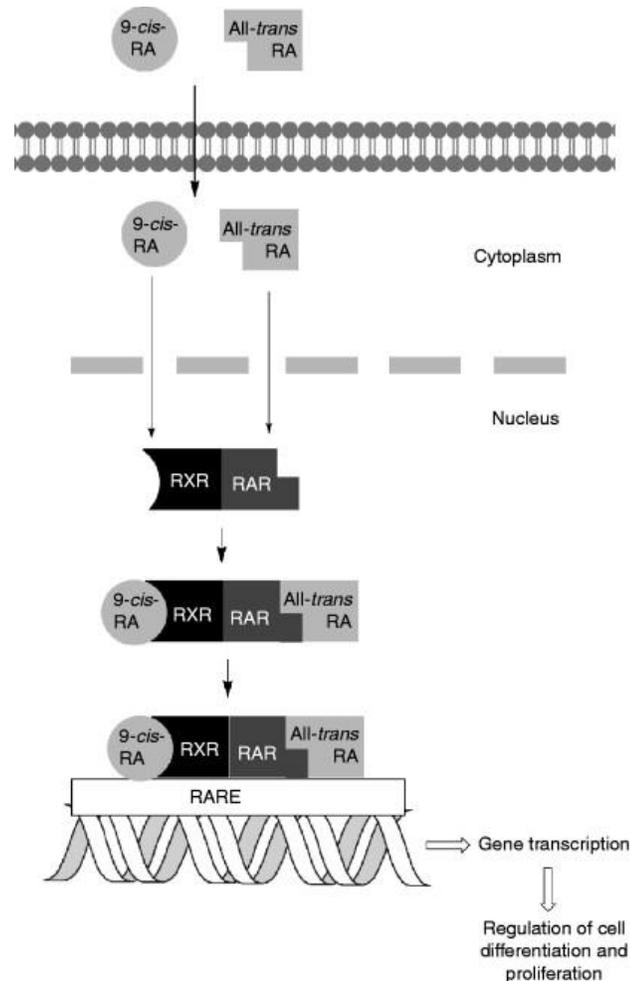


Abbildung 4: Wirkungsmechanismus Retinsäure

Die Grafik zeigt schematisch den Wirkungsprozess der Metabolite, welcher zur Transkription und zur Regulation der Zelldifferenzierung und Proliferation führt, nach Carmen Avendaño, J. Carlos Menéndez (73)

Bezugnehmend auf die beschriebenen pathophysiologischen Vorgänge werden im Folgenden verschiedene Studien mit ihren Erkenntnissen geschildert, um einen Überblick der Funktionen von RA zu geben und einen Ausblick auf Therapiemöglichkeiten und die Ansatzpunkte der durchgeführten Versuche/Ergebnisse in dieser Arbeit zu ermöglichen. Die intraperitoneale Gabe von RA zeigt im Vergleich mit einem Vehikel bei einem

experimentellen Verschluss der mittleren Hirnarterie (MCAO, *middle cerebral artery occlusion*) eine signifikante Verbesserung der RA-behandelten Gruppe bezüglich funktioneller Defizite und ein vermindertes Infarktvolumen (74). RA vermittelt über Regulation des Zystin-Glutamat-Austausch-Systems die Produktion von Glutathion. Glutathion verringert als Antioxidans die exzitotoxische Wirkung des Glutamats und entfaltet so seine neuroprotektive Wirkung (Zellstudie mit Stammzellen) (75). Auch auf regenerative Prozesse scheint RA Einfluss zu nehmen. RA scheint als Leitsubstanz für das Wachstum von Axonen zu wirken. Der Effekt wurde allerdings anhand von endogen produziertem RA beschrieben. Ob eine intraperitoneale Applikation Ähnliches bewirkt, bleibt zu vermuten (76)-(77). Über die Beeinflussung des RAR β -Rezeptoren scheint es möglich zu sein, die Ausbildung einer narbigen Struktur durch Astrozyten einzuschränken. Die Aktivierung des Rezeptors im Neuron inaktiviert die Phosphatase PTEN (*phosphatase and tensin-homolog*) und induziert ihren Transfer in Vesikeln in die Astrozyten. Diese werden dadurch an der Narbenbildung gehindert (78). Diese Studie befasst sich allerdings mit der Pathophysiologie von Rückenmarksverletzungen. RA scheint ebenfalls die BHS zu beeinflussen. Studien beschreiben eine vermehrte Expression von ZO-1 und vaskulärem Cadherin nach RA-Gabe in vier aufeinander folgenden Tagen. Hierdurch wird eine Stärkung der BHS vermutet, die den Schaden eindämmt. Hier soll vor allem der RAR α -Rezeptor aktiviert werden. Zusätzlich wird beschrieben, dass die RA-Gabe nach MCAO den *tissue plasminogen activator* (tPA) reduziert und somit eine verringerte intrazerebrale Blutung nach sich zieht. Dies resultiert in einem geringeren neurologischen Defizit 24 Stunden nach Intervention (79). In dieser Studie wurden jedoch die pathophysiologischen Vorgänge im Versuchsmodell einer zerebralen Ischämie untersucht und nicht durch einen traumabedingten Schaden.

In vitro-Versuche mit ATRA-Behandlung nach *oxygen-glucose-deprivation-tests* (OGD-Tests) beschreiben eine Auswirkung auf das Anschwellen von Gliazellen. Vermutlich resultiert ein geringeres Anschwellen durch die Regulierung von Ca²⁺ durch ATRA. Ein verringertes Hirnödem spricht für eine bessere Regeneration und ein besseres Outcome nach hirnschädigenden Einflüssen. Zusätzlich verringert ATRA eine Zunahme von ROS in Mitochondrien, welche somit vor einem Untergang geschützt werden können (80).

Therapeutisch findet ATRA bereits Anwendung in verschiedenen Bereichen der Medizin. So werden Retinoide schon seit 1962 in der Behandlung von Akne eingesetzt (81).

Auch in der Behandlung der promyeloischen Leukämie wird ATRA genutzt, um die Ausdifferenzierung der Granulozyten zu fördern. Hier führt eine Kombination mit einer Chemotherapie zu Remissionsraten von über 90 % und über 75 % können geheilt werden (7). ATRA scheint bei verschiedenen Erkrankungen wichtige Prozesse wie Zellproliferation, Differenzierung, Apoptose und Regeneration zu beeinflussen und ist daher auch in Hinsicht auf den therapeutischen Einsatz nach SHT von Interesse (6).

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Tabelle 2: Material: Geräteliste

Gerät	Spezifikation	Hersteller
Bohrer	Handbohrer	Dremel
Near-Infrared-Detektor (Dot Blot)	ODDYSEY	LI-COR
Flüssigstickstoff-Behälter		Air Liquide; Düsseldorf, DE
Gefrierschränke	-20°C	Liebherr; Ochsenhausen, DE
Gefrierschränke	-80° C	Heraeus Sepatech; Osterode, DE
Heizplatte	TCAT-2DF Controller	Physitemp; New Jersey, USA
Impact	Benchmark Stereotaxic Impactor	Leica Biosystems; Richmond, USA
Inkubator	Babytherm 8000	Dräger; Lübeck, DE
Kryostat	Microm NX 70 Cryo-Star	Thermo Fisher Scientific; Walldorf, DE
Kühlschränke	4° C	Liebherr; Ochsenhausen, DE
Magnetrührer	Ikamag RH	Janke und Kunkel; Staufen, DE
Mikroskop	Stemi 305	Carl Zeiss
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 200	Zeiss; Göttingen, DE
Proteinauswertung	Promega Glomex	
qRT-PCR	LightCycler LC 480	Roche, Mannheim, DE
Rotarod	Rota RoD/RS	Panlab Harvard

Stoppuhr	Digi-Lock Timer	Roth
Taumler, Schüttler	Taumler, Schüttler	Taumler, Schüttler
Taumler, Schüttler	Rotamax 120	Heidolph; Schwabach, DE
Tierschrank	Uni Protect	Bioscape; Castrop-Rauxel, DE
Vortex	VWR	International
Waage	Sartorius research	Sartorius; Göttingen, DE
Zentrifuge	Centrifuge 5804 R	Eppendorf; Hamburg, DE
Zentrifuge	Micro Star 17 R	VWR; Darmstadt, DE

3.1.2 Medikamente

Tabelle 3: Material: Medikamente

Augensalbe	Bepanthen
Isofluran	Abbott GmbH, Wiesbaden, DE
ATRA	Sigma CAS: 302-79-4

3.1.3 Kits

Tabelle 4: Material: Kits

Rneasy plus universal Kit	Qiagen; Hilden, DE
RNase-free DNase Kit	Qiagen; Hilden, DE
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen; Hilden, DE
QIAzol Lysis Reage	Qiagen; Hilden, DE
Absolute Blue qPCR SybrgreenMix AB-4166	Thermo Scientific
Light Cycler 480 Probes Master 04887301001	Roche

3.1.4 Primer

Tabelle 5: Material: Primer

Zielprotein	Basenfolge 5'→3'
GFAP f (<i>forward</i>)	CGG AGA CGC ATC ACC TCT G
r (<i>reverse</i>)	TGG AGG AGT CAT TCG AGA CAA
IL-1 β f	CAG GAA GAC AGG CTT GTG CTC
r	GTG CTG TCG GAC CCA TAT GAG
IL-1 β Cy5 (Sonde)	Cy5-CAG CTG GAG AGT GTG GAT CCC AAG C--PH
IL-1 β FL (Sonde)	TAA TGA AAG ACG GCA CAC CCA CCC-FL
TNF α f	TCT CAT CAG TTC TAT GGC CC
r	GGG AGT AGA CAA GGT ACA AC
Iba-1 f	ATC AAC AAG CAA TTC CTC GAT GA
Iba-1 r	CAG CAT TCG CTT CAA GGA CAT A
PPIA f	GCG TCT SCT TCG AGC TGT T
r	RAA GTC ACC ACC CTG GCA

3.1.5 Antikörper

Tabelle 6: Material: Antikörper

Primärer Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Anti GFAP	Kaninchen	1:500	Dako, Hamburg, DE
Sekundärer Antikörper			
Anti-Kaninchen Alexa Fluor 568	Ziege	1:500	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	Ziege	1:500	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
irDye 800 (anti Maus)	Ziege	1:15000	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

3.1.6 Chemikalien

Tabelle 7: Material: Chemikalien

Aqua	Fresenius Kabi
Ethanol	AppliChem, Darmstadt, DE
Immu-Mount Shandon	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kresylviolett	Merck, Darmstadt, DE
Paraformaldehyd (PFA)	gemischt
PBS (<i>phosphate buffered saline</i>)	Dulbecco, Biochrom, Berlin, DE
Roti – Histol	Roth, Karlsruhe, DE
RPE Buffer	gemischt
RWT Buffer	gemischt
Stickstoff, flüssig	Air Liquide, Düsseldorf, DE
TBST Buffer (Tris-buffered saline with Tween20)	gemischt
Triton-X	Sigma, Steinheim, DE

3.1.7 Verbrauchsmaterial

Tabelle 8: Material: Verbrauchsmaterialien

Pipettenaufsätze	Starlab, Ahrensburg, DE
Deckgläser	Diagonal GmbH, Knittel Braunschweig DE
Futter	Ssniff, Soest, DE
Dako-Pen	Dako, Glostrup, DK

3.1.8 Software

Table 9. Material: Software

Endnote	Version X7	Thomson Reuters Corporation, New York, USA
ImageJ	Version 1.47v	National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA
LightCycler®	Version:LCS480 1.5.1.62	Roche
Prism 8 for OS X	Version 8.0.1	GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA
Word 2016 für Mac	Version 15.20	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Zen 2.3 lite (blue edition)		Zeiss, Jena, DE

3.2 Methoden

3.2.1 Tiere

Die Versuche werden an vierzig männlichen Mäusen (wt-Mäuse B16 Janvier) mit einem Gewicht von 20-30 g im anästhesiologischen Labor der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt. Die Genehmigung wurde durch das Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz erteilt (Aktenzeichen: 23177-07, G16-1-22). Die Tiere werden über den Versuchszeitraum in Einzelkäfigen mit Zugang zu Nahrung und Wasser *ad libitum* gehalten. Hierbei wird ein 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus durch künstliche Beleuchtung eingehalten. Zu Beginn der Versuche sind alle Tiere unversehrt und zeigen auch im Verlauf bis auf die Folgen des SHT keine gesundheitliche Beeinträchtigung. Durch eine konsequente Gewichtsmessung wird der allgemeine Zustand der Tiere überprüft.

3.2.2 Rotarod

Der Rotarod ist ein bewährtes Testverfahren bei Tierversuchen zur Überprüfung der motorischen Koordination und Ausdauer der Tiere (82),(83). Hierbei laufen die Tiere auf einer sich drehenden Rolle, die ihre Rotationsgeschwindigkeit in definierten Zeitabständen erhöht. Gemessen wird die Zeit, die die Maus bis zum Herunterfallen auf der Rolle bleibt. Dieses Vorgehen wird vor Versuchsbeginn an zwei Tagen trainiert. Vor dem Operationstag wird eine erneute Messung durchgeführt, die dann am Tag nach der Intervention und anschließend im Zwei-Tage-Rhythmus wiederholt wird.

Der Rotarodtest wird, wie alle anderen Tests, immer vor einer Medikamentenapplikation durchgeführt.

3.2.3 Neuroscore

Der Neuroscore ist ein Testverfahren zur Bestimmung neurologischer Defizite. Er besteht aus verschiedenen Aufgaben, um die neurologischen Fähigkeiten/Veränderungen der Tiere zu beurteilen. Diese werden durch Vergabe von Punkten (0-2 Punkte pro Aufgabe) beurteilt, um die funktionelle Beeinträchtigung einzuschätzen. Hierbei bedeutet ein niedriger Punktwert geringen bzw. keinen Schaden und höhere Punktwerte (max. 16 Punkte) einen deutlichen Schaden.

Gliederung des Neuroscores:

- 1.) Exit from the circle:
Zeitmessung, bis die Maus mit beiden Vorderpfoten einen eingezeichneten Kreis auf einer Plexiglasplatte verlassen hat (30 cm Durchmesser).
- 2.) Reflexes:
Der Reflex wird durch ein Klatschen hinter dem Tier provoziert.
- 3.) General behavior deficit:
Überprüfung der Orientierungsfunktion durch beobachten des „Schnüffeln“ (Bewegung der Schnurrhaare). Des Weiteren wird der Gang (geradeaus) beurteilt.
- 4.) Coordination:
Die Maus läuft hierbei, von rechts nach links, über drei unterschiedlich breite (1,8 cm, 1,5 cm, 1 cm) Holzplatten, die im Abstand von ca. 70 cm und in einer Höhe von 20 cm auf zwei Käfigen liegen. Beurteilt werden Flüssigkeit der Vorwärtsbewegung, Fehltritte (V. a. durch Paresen) und ein Herunterfallen.
- 5.) Balance:
Die Maus soll sich jeweils an einem 0,5 cm durchmessenden eckigen sowie runden Stock, der in ca. 70 cm Höhe über dem Tisch gehalten wird, 10 Sekunden mit allen vier Pfoten festhalten. Beurteilt werden der Griff aller Pfoten sowie ein Herunterfallen.
- 6.) Motor deficit:
Das motorische Defizit wird in Hinsicht auf Paresen beurteilt.

3.2.4 Experimentelles Schädel-Hirn-Trauma

Bevor das Trauma gesetzt wird, werden alle Tiere gewogen und erhalten anschließend eine Gasnarkose mit Isoflurane: 4 Vol % Einleitung; 2,1 Vol % OP. Bepanthencreme schützt die Augen. Es erfolgt die Überprüfung der Narkosetiefe durch Testung des Zwischenzehenreflexes am Hinterfuß. Narkotisiert wird der Schädel der Tiere in einem stereotaktischen Rahmen (siehe Abbildung 4) fixiert. Zusätzlich wird eine rektale Temperatursonde gelegt, um die Temperatur der Tiere während der Narkose zu messen und mit Hilfe einer gekoppelten Wärmematte konstant auf 37°C zu halten. Die Narkose wird während des Eingriffs über eine Maske aufrechterhalten. Für das experimentelle SHT wird das CCI- Modell gewählt, welches für Versuche an Mäusen bereits beschrieben ist und weltweit angewendet wird (84),(85). Nun wird der Schädel der Maus durch einen Hautschnitt in Mediansagittallinie (ca. 1 cm) freigelegt. Mit einem Mikrobohrer wird entlang der Schädelnähte (Bregma: vordere Koronarnaht bis Lambda: hintere Koronarnaht) ein Knochenfenster auf der rechten Schädelseite gefräst, welches nach der Induktion der Verletzung mit Histoacryl-Gewebekleber wieder verschlossen wird. Auf das nun freiliegende Hirngewebe wird mit der Leica Traumamaschine, wie in Abbildung 4 gezeigt, jeweils ein Trauma mit folgenden konstanten Einstellungen auf die rechte Hirnhemisphäre ausgeübt:

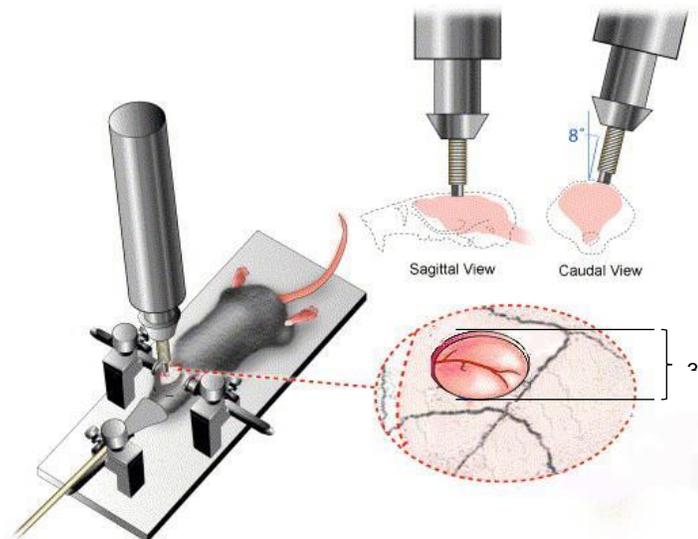


Abbildung 5: Schädel-Hirn-Trauma Versuchsaufbau CCI nach Onyszchuk G (86)

Einstellungen Traumamaschine:

Bolzendurchmesser:	3 mm
Bolzensgeschwindigkeit:	6 m/s
Eindringtiefe:	1,5 mm
Eindringdauer:	200 ms
Auftreffwinkel:	90°

Nach Verschluss der Kalotte wird die Kopfhaut mit einer Einzelknopfnahnt verschlossen. Die Tiere werden zur Narkoseausleitung in Einzelkäfigen in einem Inkubator bei 37°C untergebracht.

3.2.5 Medikamentenapplikation

Was:	ATRA, Sigma CAS: 302-79-4
Applikationsart:	i. p. 250 µl entspricht 10 mg/ kg KG=0,25 mg pro Maus
Lösungsvehikel:	10 % DMSO plus PBS/ Na ₂ CO ₃ 0,1M

Die durch einen randomisierten Ablauf ausgewählten Tiere bilden folgende Gruppen:

CCI + Vehikel:	Wildtyp, n = 12, ♂
CCI + ATRA:	Wildtyp, n = 12, ♂
Sham + Vehikel:	Wildtyp, n = 8, ♂
Sham + ATRA:	Wildtyp, n = 8, ♂

Den Tieren wird nach der Intervention nach folgendem Schema ihre Medikation i. p. appliziert: Tag 0 direkt nach der Läsion, Tag 1, 2 und 3 postoperativ.

3.2.6 Euthanasie und Hirnentnahme

Die Euthanasie erfolgt in Narkose mit 4 % Isoflurane für ca. 1,5 Minuten durch Dekapitation. Darauf folgt die Präparation des Gehirns aus dem Schädel, welches in Trockeneis schockgefroren und anschließend bei -30°C gelagert wird.

3.2.7 Hirnschnitte

Mit Hilfe eines Kryotoms werden die Gehirne nun nach folgendem Schema geschnitten, um histologische Präparate sowie Gewebeproben zu gewinnen. Dazu werden die Hirne mit einem Einbettmedium auf der Kleinhirnseite fixiert und mit einer dünnen Schicht um das gesamte Gehirn zusätzlich stabilisiert.

Die Schnitte werden im Bereich zwischen 2500 µm und 6000 µm alle 500 µm mit einer Schnittdicke von 12 µm in koronarer Schnittrichtung gewonnen und anschließend auf Objektträger aufgebracht.

Gewebeproben für molekularbiologische Untersuchungen werden alle 500 µm gewonnen, bei den CCI-Tieren 6 x 40 µm Schnitte und bei den Sham-Tieren 4 x 60 µm. Diese werden übereinandergelegt, in ipsilaterale und kontralaterale Hirnhemisphäre zerschnitten und bei – 80° C für molekularbiologische Analysen gelagert.

Kryotomeinstellungen: Temperatur: -20°C
 Temperatur Klinge: -20°C
 Schnittdicke: 12 µm
 Schnittabstand: alle 500 µm

3.3 Histologie und Molekularbiologie

3.3.1 Kresylviolett-Färbung nach Nissl

Mittels Nissl-Färbung wird das Schadensvolumen des Gehirns sichtbar gemacht und kann im Anschluss über ein Messprogramm ermittelt werden.

Färbung:

Der Kresylviolett-Farbstoff bindet an basophile Strukturen wie DNA und RNA (Ribonukleinsäure) der vitalen Nervenzellen und lässt diese blauviolett erscheinen. Hierdurch kann eindeutig zwischen geschädigtem und vitalem Gewebe unterschieden werden.

Hierzu wird folgendes Färbeprotokoll verwendet:

Die Objektträger mit den Hirnschnitten werden zuerst eine Stunde getrocknet, dann für zwei Minuten in 70 %iger Ethanol-Lösung gewaschen und im Anschluss für zehn Minuten in Kresylviolett getaucht. Nun werden die Schnitte jeweils zwei Mal kurz in Aqua dest., in 70 %ige Ethanol-Lösung und in 96 %ige Ethanol-Lösung getaucht. Anschließend werden die Objektträger erst für fünf, dann noch einmal für zwei Minuten in Roti-Histol eingelegt. Zum Abschluss werden die Objektträger mit Roti-Histol-Kit als Trägermedium eingedeckelt.

3.3.2 Auswertung des Läsionsvolumens

Die gefärbten Hirnschnitte werden mit Hilfe des ZEISS Stemi 305 Mikroskops fotografiert und im ZEISS Zen 2 lite Programm vermessen. Hier wird entlang der Kontusionsränder zunächst die geschädigte Fläche (Fläche = A (grün markierter Bereich)) jeder Schnittebene erfasst und anschließend das geschädigte Gesamtvolumen berechnet. Um das Volumen zu erfassen, werden die jeweiligen Zwischenebenen von 500 µm in die Rechnung einbezogen.

Volumenformel:

$$\text{Volumen} = (A1+A2+A3\dots+A16) \times 0,5 \text{ mm}^3$$

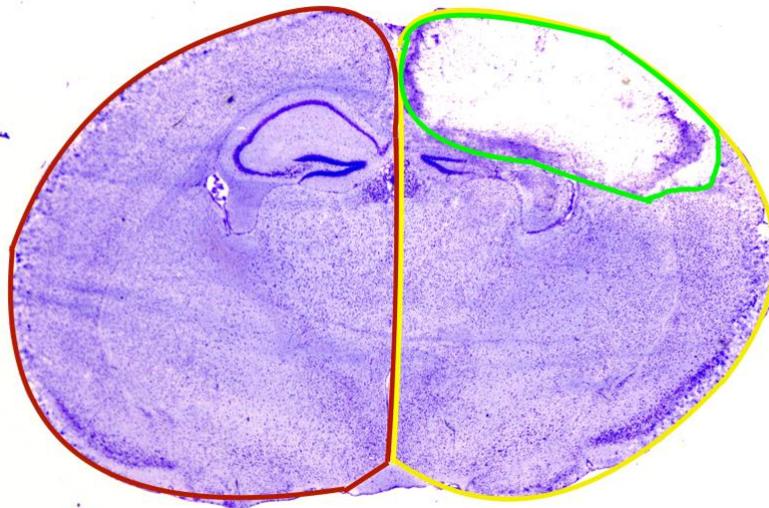


Abbildung 6: Kontusionsvolumen

3.3.4 RNA (Ribonukleinsäure) - Extraktion

Mithilfe der RNA-Extraktion soll in der Folge die Genexpression pathophysiologisch relevanter Zielgene ermittelt werden. Dazu wird RNA mittels Qiagen Rneasy plus universal Kit nach Herstellerangaben aus den Gewebeproben gewonnen:

Zur Untersuchung werden 2 ml Tubes vorbereitet:

0,9 ml Qiazol Reagenz + Edelstahlkugel + RWT und RPE Puffer mit 100 % Ethanol verdünnt.

Das durch die Trimmschnitte gewonnene Hirngewebe wird zugefügt und im Mastermill homogenisiert (2 x 1 min bei 20/s). Es folgt eine Inkubationszeit von fünf Minuten. Nach dieser werden 100 µl genomische DNA (gDNA) hinzugegeben und das Lysat für 15 Sekunden mit dem Vortex gemischt. Dann werden 180 µl Chloroform hinzugegeben und wieder 15 Sekunden mit dem Vortex gemischt. Nach weiteren 2-3 Minuten Inkubationszeit wird die Probe für 15 Minuten bei 12.000 rpm (*rotation per minute*) bei 4 °C zentrifugiert. Es entstehen drei Phasen: 1: farblose, wässrige Phase = RNA, 2: weiße Interphase, 3: rote, organische Phase. Ca. 600 µl der oberen Phase werden in vorbereitete Gefäße mit 70 %- iger Ethanollösung pipettiert und kurz vermischt. 700 µl dieser Lösung werden daraufhin in ein Filtergefäß mit RNA-selektiver Silikatmembran gegeben. Die RNA wird durch zweimaliges Zentrifugieren mit 10.000 rpm über 15 Sekunden durch die Membran gefiltert. Mit 700 µl RWT-Puffer wird erneut 15 Sekunden zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Weitere Waschschrte folgen mit 500 µl RPE-Puffer (einmal Zentrifugieren für 15 Sekunden und dann für 2 Minuten). Es folgt ein einminütiges Nachtrocknen mit maximaler Geschwindigkeit der Zentrifuge. Die gewonnene RNA wird anschließend mit RNase freiem Wasser eluiert und spektralphotometrisch die Konzentration bestimmt.

3.3.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Das gewonnene RNA-Eluat wird nun spektralphotometrisch auf RNA-Konzentration und Reinheit geprüft. Die Konzentration wird mittels der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von $\lambda=260$ nm (OD_{260}), welche dem Absorptionsmaximum von RNA entspricht, ermittelt. Die Konzentration der RNA wird anschließend mit folgender Formel errechnet:

Konzentration RNA ($\mu\text{g/ml}$) = $OD_{260} \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$.

Maßgebend ist hier, dass eine OD_{260} von 1, $40 \mu\text{g/ml}$ RNA entspricht.

Die Reinheit wird durch einen Quotienten aus zwei OD bestimmt. Bei einer OD_{280} liegt das Absorptionsmaximum von Proteinen. Ist das Verhältnis von OD_{260}/OD_{280} zu hoch, ist die Probe verunreinigt und sollte erneut gewaschen werden, um für die anschließende komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA)-Synthese geeignet zu sein.

3.3.6 cDNA- Synthese

Um die genetischen Informationen zu erhalten und mittels Polymerase - Kettenreaktion (PCR) vermehren und auswerten zu können, muss die *messenger* RNA in cDNA umgeschrieben werden. Die DNA liefert dann Rückschlüsse über z. B. die verstärkte Expression von Zielgenen wie z. B. Entzündungsparameter nach CCI. Um diese Informationen zu erlangen, wird aus der gewonnenen RNA zunächst eine cDNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase hergestellt. Dieser Vorgang wird mittels QuantiTect Reverse Transkription Kit nach Herstellerangaben durchgeführt. Die RNA wird in diesem Verfahren als Matrize genommen, an die sich ein komplementärer DNA - Strang anlegt. Zu Beginn wird zu $1 \mu\text{g}$ der extrahierten RNA RNase-freies Wasser gegeben. Bei einem Gesamtvolumen von $14 \mu\text{l}$ wird das Gemisch bei 42°C inkubiert. Im zweiten Schritt folgt die reverse Transkription. Dazu wird jeweils zur Probe ein Mastermix, bestehend aus $1 \mu\text{l}$ Quantiscript Reverse Transkriptase, $1 \mu\text{l}$ RT Primer Mix und $4 \mu\text{l}$ Quantiscript RT Puffer, hinzugegeben. Nach erneuter Inkubation bei 42°C wird der Vorgang durch Inaktivierung der reversen Transkriptase mittels Erhitzen auf 95°C gestoppt. Die cDNA wird mit RNase-freiem Wasser verdünnt und eingefroren.

3.3.7 Quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Für die weitere Ermittlung der Genexpression wird die DNA mittels PCR vervielfältigt. Die Amplifikation (Vervielfältigung) wird mit der cDNA als Matrize und einer temperaturstabilen DNA-Polymerase erreicht. Durch genspezifische Primer werden die zu amplifizierenden Genabschnitte markiert. Die Amplifikation läuft in Zyklen ab, bei der jede Matrize erneut abgelesen wird. Dies führt im optimalen Fall zu einer Verdoppelung der ursprünglichen Genabschnitte in jedem Zyklus. Jeder Zyklus umfasst die Schritte Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation. Bei der Denaturierung wird die doppelsträngige cDNA auf 95°C erhitzt. Hierdurch werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Doppelsträngen gelöst und diese voneinander getrennt. Für den ersten Zyklus kann das Erhitzen etwas länger dauern, da zunächst das thermisch regulierte Enzym aktiviert werden muss. Um ein Wiederaneinanderlagern zu verhindern, wird die Probe auf 65°C heruntergekühlt. Bei der Primerhybridisierung (sogenanntes *Annealing*) wird die Temperatur primerspezifisch für ein kurzes Zeitfenster konstant gehalten. In dieser Zeit lagern sich die Primer an die DNA an. Die Elongation beschreibt nun den Prozess der Amplifikation. Die DNA-Polymerase füllt die freiliegenden DNA-Sequenzen zwischen den Primern mit freien, zur Verfügung gestellten Nukleotiden auf. Sie beginnt am 3'-Ende der Primers und folgt in Richtung des 5'-Endes entlang des DNA-Stranges. Da sich bei häufigen Wiederholungen Paarungsfehler einschleichen, umfasst die PCR meistens zwischen 30 und 50 Zyklen, um die Fehlerquote gering zu halten.

Die qRT-PCR ist eine Weiterentwicklung des Prozesses und ermöglicht eine Beurteilung der Amplifikation in Echtzeit (*real-time*). Um dies darzustellen, wird ein Fluoreszenzfarbstoff (SYBR-Green) hinzugegeben, der an die DNA bindet. Nach Anregen durch eine Lichtquelle lässt sich der Farbstoff detektieren und korreliert mit dem erhöhten DNA-Gehalt pro Zyklus. Der Messvorgang wird graphisch dargestellt und ergibt eine typische Amplifikationskurve. An dieser lassen sich eine Anfangsphase, eine Log-Phase und eine Plateau-Phase unterscheiden. In der Log-Phase lässt sich ein sogenannter Crossingpoint (CP) ermitteln, der die Berechnung der cDNA-Konzentration ermöglicht. Er ist definiert als der Zeitpunkt, zu dem das Fluoreszenzsignal zum ersten Mal signifikant

über das Hintergrundrauschen ansteigt. Die Messung erfolgt mit der Light-Cycler-Software. Durch eine Standardlösung mit bekanntem DNA-Gehalt wird eine Standardkurve erstellt. Diese ermöglicht eine Errechnung der DNA-Menge und indirekt einen Rückschluss auf die ursprüngliche cDNA-Konzentration. Um die Spezifität der DNA zu überprüfen und zu verhindern, dass fehlermarkierte DNA-Sequenzen die Detektion der Fluoreszenz beeinflussen, wird eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Hier können die spezifischen Fragmente durch einen bestimmten Schmelzpunkt ermittelt werden. Die DNA wird dazu kontinuierlich (von 50°C auf 95°C) erhitzt. Bei einer bestimmten Temperatur trennen sich die komplementären DNA-Stränge und setzen den Farbstoff SYBR-Green frei. Dieses Signal wird detektiert und ist spezifisch für das gesuchte Fragment. Unspezifische Primerdimere haben aufgrund ihrer geringeren Länge niedrigere Schmelztemperaturen und können somit erkannt werden. Eine weitere Methode der Quantifizierung der Fragmente gelingt durch den Einsatz sogenannter Hybridisierungssonden. Die Sonden bestehen aus Oligonukleotiden, welche sich nebeneinander an die gesuchten Fragmente anlagern und am Ende der Annealingphase mittels Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) gemessen werden. Diese Methode wurde für die Untersuchung von IL1 β genutzt.

Die untersuchte cDNA wird für jedes Zielprotein gegen das Referenzgen Peptidylprolylisomerase A (PPIA) normalisiert. Dieses wird unabhängig vom CCI exprimiert. Folgende Zielstrukturen wurden mit der qRT-PCR untersucht: GFAP, TNF α , IL-1 β , Iba-1 (Ionisiertes Kalzium-bindendes Adaptermolekül) und PPIA.

3.3.8 Proteinextraktion

Zur Proteinextraktion werden die ipsiläsionalen Trimmschnitte verwendet. Nach folgendem Protokoll werden die Proben vorbereitet und anschließend mit dem Promega Glomax ausgewertet.

Die Proben werden zunächst in Caps umgefüllt und in Eis gelagert. Nach Hinzufügen von 150 µl *radioimmunoprecipitation assay buffer* (RIPA) und Proteininhibitor werden die Proben weitere 30 Minuten im Eis belassen und alle 10 Minuten für eine Minute mit dem Vortex gemischt. Es folgt das 20-minütige Zentrifugieren bei 13.000 rpm. Der Überstand wird mit der Pipette abgezogen und in frische Gefäße gegeben. Bevor die Proben gelagert werden, wird die Proteinkonzentration mit dem Lowry Protein Assay von Promega bestimmt. Für die Untersuchung der Proben werden je 2 µl mit 18 µl H₂O (Verhältnis 1:10) verdünnt in kleine Eppendorf-Gefäße gegeben. Die Proben werden in doppelter Ausführung auf eine 96-Wellplatte pipettiert und anschließend mit Hilfe einer Standardproteinkonzentration ausgewertet.

Der RIPA-Buffer wird folgendermaßen gemischt:

50 mmol Tris-HCL 7,5 + 150 mmol EDTA + 1 % NP 40 + 0,1 % SDS + Proteasen und Phosphataseinhibitor von Roche.

3.3.9 DotBlot

Mit der DotBlot-Methode gelingt der quantitative Nachweis von Antikörper-gebundenen Proteinen. Die Antikörper sind mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert und werden anschließend detektiert. In diesem Versuch soll der Gehalt des Immunglobulins G nachgewiesen werden.

Nach vorheriger Berechnung wird ein Gemisch aus RIPA-Puffer und wenigen µg/µl Protein von insgesamt 30 µl hergestellt. 2 µl jeder Probe werden auf vormarkierte Stellen (Spots) einer Membran (Nitrocellulose) gegeben. Mit 5 %-Magermilch werden unspezifische Bindungsstellen der Proteine geblockt. Dazu werden die Proben auf der Membran mit der Magermilch in einer Reaktionskammer für eine Stunde auf einer Rüttelplatte inkubiert. Anschließend wird die Magermilch verworfen. Es folgt eine

einstündige Inkubation bei Raumtemperatur (RT) im Dunkeln mit folgendem Antikörper: Goat anti Mouse IRDye 800, 1:15000, in 2,5 % -Magermilch.

Der anschließende Waschvorgang wird zweimal für 10 Minuten mit 15 ml TBST durchgeführt. Die photometrische Messung erfolgt mittels Nah-Infrarot Laserdetektion.

3.3.10 Immunhistochemie

Die immunhistochemische Färbung ermöglicht ein Anfärben von Proteinen, um diese in histologischen Schnitten sichtbar zu machen. Dazu werden in einem schrittweisen Verfahren die Zielstrukturen zunächst mit einem primären Antigen-spezifischem Antikörper markiert und diese in einem zweiten Schritt mit Hilfe eines fluoreszierenden Antikörpers visualisiert.

Die hier durchgeführten Färbungen ermöglichen die Markierung des GFAP. GFAP dient als Marker für reaktive Astrozyten.

3.3.11 Immunfluoreszenz-Färbung

Die Färbung wird an zwei Tagen durchgeführt. Dabei werden die Hirnschnitte der Ebenen 9 und 10 gefärbt.

Die Schnitte werden zunächst 30 Minuten bei RT getrocknet. Mit einem speziellen Fettstift (Daco-Pen) werden die zu färbenden Hirnschnitte umrandet, um ein Verlaufen der Pufferlösung zu vermeiden. Es folgt eine Fixierung mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) für 10 Minuten bei RT. Zwei fünfminütige Waschgänge mit PBS auf dem Taumler bei 50 rpm bis 100 rpm schließen sich an. Nach dem Waschvorgang werden die Objektträger kurz auf Zellstoff abgeklopft, um Überstände zu entfernen. Ein erneutes Umranden mit dem Daco-Pen folgt. Anschließend wird der Schnitt mit Blockierlösung (für 5 ml: 4,5 ml PBST + 250 µl normal goat Serum (100 %ig) + 250 µl BSA (bovines Serumalbumin) (20 %ig) für eine Stunde blockiert. Der erste Antikörper (verdünnt in Blockierlösung) wird nun hinzugefügt und über Nacht bei 4°C in einer sogenannten *wet chamber* (Nassraum) gelagert. Am zweiten Tag folgen drei Waschgänge mit PBS für jeweils 15 Minuten. Nach Zugabe des zweiten Antikörpers (ebenfalls mit Blockierlösung verdünnt 1:500) wird für eine Stunde bei RT lichtgeschützt inkubiert. Drei weitere Waschgänge mit PBS für 15 Minuten folgen. Die Schnitte werden daraufhin mit 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) gefärbt. Nach

Zugabe von 80 µl DAPI-Lösung wird 5 Minuten inkubiert. Erneut wird zweimal für fünf Minuten mit PBS gewaschen. Nun trocknen die Schnitte. Zum Abschluss werden die Schnitte mit Immu-Mount benetzt und eingedeckelt. Nachdem sie mit Nagellack versiegelt sind, werden sie bei 4°C gelagert.

3.3.12 Quantifizierung der Immunfluoreszenzfärbung

Untersucht und ausgewertet wurde in dieser Arbeit die GFAP-Färbung. Mittels eines Konfokalmikroskopes werden Bilder der Hirnschnitte in 20-facher Vergrößerung aufgenommen. Um die Färbung zu detektieren, wurde folgende Wellenlänge gewählt: 488 nm (Nanometer). Das zu untersuchende Hirnareal wird zuvor festgelegt, um einen Vergleich aller Schnitte zu ermöglichen. Die Region liegt ipsiläsional und subkortikal. Um den Bereich im kontralateralen Gewebe zu finden, wird entlang der Hemisphärengrenze die ipsiläsionale Region gespiegelt. Die Auswertung der entstandenen Bilder erfolgt mit ImageJ. Hierzu werden im Programm Partikelgrößen für die Messung nach Einstellung eines Intensitäts-Schwellenwertes festgelegt. Für die GFAP-Färbung liegt die Einstellung bei 20 µm² bis 1000 µm². Die Treffer werden gezählt und verglichen.

3.4 Statistik

Die statistischen Analysen und graphischen Darstellungen werden mit der Software Prism 8 für Mac OS X berechnet und erstellt. Das Signifikanzniveau wird für alle Berechnungen einheitlich festgelegt, so dass p-Werte $< 0,05$ als signifikant gelten. Verschiedene Signifikanzniveaus werden in der graphischen Darstellung wie folgt mit Sternen markiert: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$. Die Normalverteilung wird mittels Shapiro-Wilk-Tests bestimmt und die grafische Darstellung erfolgt als Säulendiagramm \pm dem Standardfehler (SEM). Um parametrische Daten paarweise zu vergleichen wurde der Student's t-Test angewendet. Nicht parametrische Daten wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test analysiert. Zur Betrachtung einer Entwicklung über mehrere Zeitpunkte werden die Gruppen mittels Two-way ANOVA-Test auf signifikante Unterschiede geprüft. Bei multiplen Gruppen erfolgt eine Auswertung mit dem one-way Anova, um gepaarte, normalverteilte Mittelwerte zu vergleichen (post-hoc Test Holm-Šídák). Bei nicht normalverteilten Daten wird ein Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's post-hoc Test durchgeführt.

4. Ergebnisse

Die Ergebnisse fundieren auf den durchgeführten Experimenten im Zeitraum von sieben Tagen. Bei der Auswertung mussten zwei Tiere der ATRA-CCI-Gruppe aufgrund technischer Probleme des CCI aus der Statistik entfernt werden. Die folgenden statistischen Auswertungen vergleichen die vier Gruppen, wobei der Fokus auf den beiden Interventionsgruppen (CCI Veh und CCI ATRA) liegt. Ein Unterschied zu den Sham-Versuchstieren ist bei diesem Testverfahren häufig und bestätigt die vermuteten Unterschiede der Testgruppen durch das gewählte Untersuchungsmodell. Alle Versuche wurden verblindet durchgeführt, so dass eine Unabhängigkeit der durchführenden Person gewährleistet ist.

4.1 Gewicht

Das Körpergewicht dient während der Versuche der Überwachung des Gesundheitszustandes der Tiere. Das folgende Diagramm zeigt Unterschiede des Körpergewichts vom ersten/ siebten postoperativen Tag zur Messung vor der Intervention (präoperativ: Pre-OP). Ebenso wird das Verhältnis von Tag 7 postoperativ zu Tag 1 postoperativ dargestellt. Am ersten Tag nach CCI sinkt das Gewicht in allen Gruppen, deutlicher jedoch in den Interventionsgruppen (CCI Veh/ATRA). Ein signifikanter Unterschied besteht hier nicht. Am siebten postoperativen Tag ist nur in den beiden Interventionsgruppen noch ein verringertes Körpergewicht vorhanden. Vergleicht man den 7. postoperativen Tag mit dem ersten postoperativen Tag ist eine Gewichtszunahme aller Gruppen vorhanden.

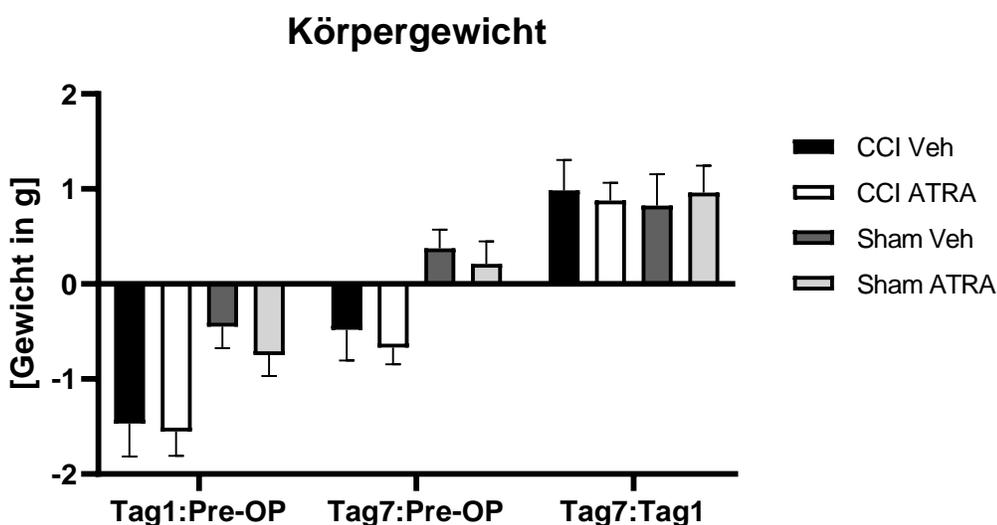


Abbildung 7: Körpergewicht im Versuchsverlauf.

Kein signifikanter Unterschied in den Interventionsgruppen. Die ATRA-Applikation wirkt sich nicht auf das Körpergewicht der CCI oder Sham Tiere aus.

Die folgenden Werte vergleichen die Interventionsgruppen CCI Veh und CCI ATRA. Mittelwerte und SEM werden in Gramm angegeben: Tag 1:Pre-OP: $0,08 \pm 0,43$; Tag 7: Pre-OP: $0,18 \pm 0,36$; Tag 7:Tag 1: $0,10 \pm 0,37$. Der erste Wert gibt den Hauptunterschied an, der zweite den Standardfehler der Differenz. Die CCI ATRA-Gruppe mit n=10, CCI Veh-Gruppe n=12, Sham Veh-Gruppe n=8, Sham ATRA-Gruppe n=8. * p< 0,05, ** p< 0,01. ***p< 0,001. TwoWay Anova.

4.2 Rotarod

Im Vergleich der beiden Interventionsgruppen in Hinsicht auf ihre motorischen Leistungen/Defizite kann im Rotarod-Verfahren kein signifikanter Unterschied erkannt werden ($p = 0,5442$, CCI ATRA vs. CCI Veh). Die hier gezeigten Daten stellen die Mittelwerte bezogen auf den zeitlichen Verbleib auf dem Rotarod am 7. Tag dar.

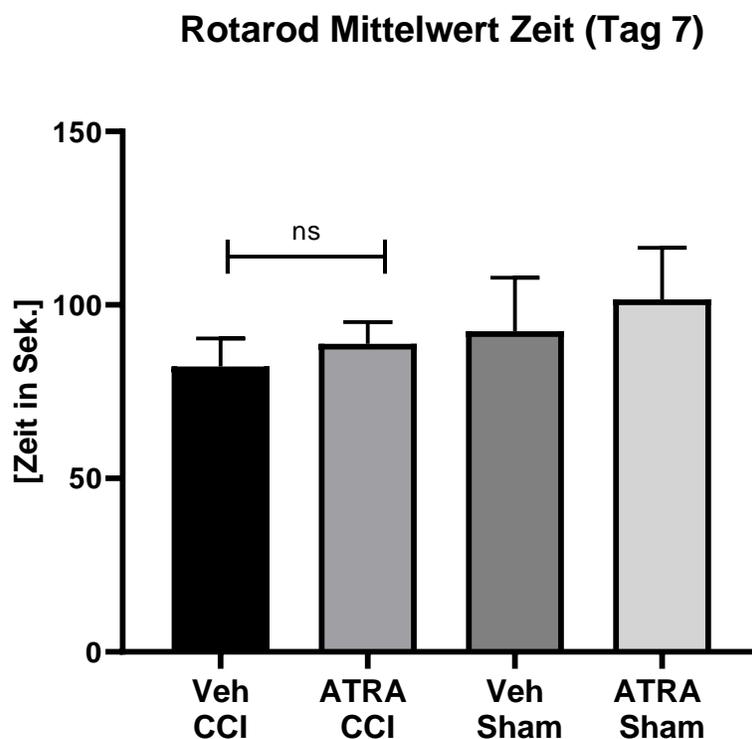


Abbildung 8: Rotarod.

Kein signifikanter Unterschied im Rotarod-Testverfahren.

Das Diagramm zeigt die Mittelwerte in Sekunden, die die verschiedenen Gruppen am 7. Tag postoperativ erlangt haben. Mittelwerte und SEM werden in Sekunden angegeben: ATRA-Gruppe: $n=10$; $88,75 \pm 6,27$. Vehikel-Gruppe: $n=12$; $82,25 \pm 8,05$. Sham Veh-Gruppe $n=8$, Sham ATRA-Gruppe $n=8$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$. TwoWay Anova.

4.3 Neuroscore (Exit from Circle inbegriffen)

Die Auswertung der neuromotorischen Defizite mittels Neuroscore wird hier in zwei Diagrammen dargestellt. Zunächst zeigt ein Vergleich alle beteiligten Gruppen, um einen Überblick der vorhandenen Defizite zu den Zeitpunkten präoperativ und am siebten Tag postoperativ zu verschaffen. Der Unterschied zwischen den CCI-Tieren und den Sham-Tieren ist signifikant ($p = 0,0012$, Sham Veh vs. CCI Veh). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Interventionsgruppen ($p = 0,0511$, CCI ATRA vs. CCI Veh). Der niedrige P-Wert lässt jedoch einen Trend zu einem reduzierten neurologischen Defizit der ATRA-behandelten Tiere erkennen. Zudem ist in diesem Verfahren der Exit from Circle- Test mit in die Auswertung eingeflossen. Da dieser die Statistik vermutlich aufgrund eines Gewöhnungseffektes der Mäuse stark beeinflusst, zeigt das nächste Diagramm die Auswertung ohne diesen.

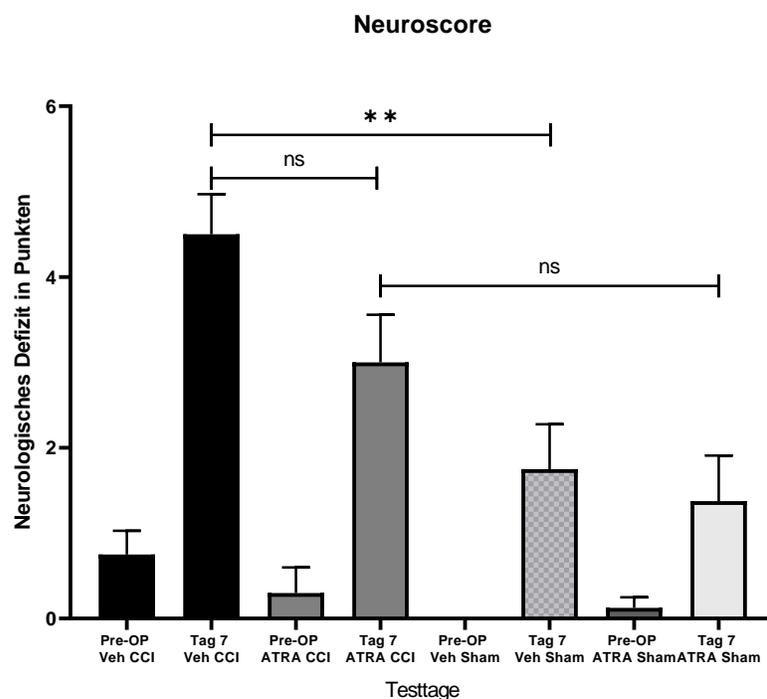


Abbildung 9: Neurocore:

ATRA zeigt im Rahmen eines Trends eine Auswirkung auf den Neuroscore

Im Diagramm werden die Punktwerte des erreichten Neuroscores an Tag 7 mit dem Tag vor der OP (Pre-OP) verglichen. Mittelwerte und SEM werden in Punkten angegeben. Veh CCI $n=12$: Tag 7: $4,50 \pm 0,46$, Pre-OP: $0,75 \pm 0,27$; ATRA CCI $n=10$: Tag 7: $3,00 \pm 0,55$; Pre-OP: $0,30 \pm 0,30$; Veh Sham $n=8$: Tag 7: $1,75 \pm 0,52$, Pre-OP: $0,00 \pm 0,00$; ATRA Sham $n=8$: Tag 7: $1,37 \pm 0,53$; Pre-OP: $0,12 \pm 0,12$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. TwoWay Anova.

4.4 Neuroscore ohne „Exit from Circle“

Die neuromotorischen Veränderungen der beiden Interventionsgruppen werden hier im zeitlichen Verlauf dargestellt. Präoperativ, sowie an den Folgetagen 1, 3, 5 und 7. Es zeigt sich in beiden Gruppen eine deutliche Verschlechterung am ersten postoperativen Tag. Am dritten postoperativen Tag ist das neurologische Defizit annähernd gleich. In den postoperativen Tagen 5 und 7 verringert sich das Defizit nur in der ATRA-Gruppe. Hier liegt am siebten Tag ein signifikanter Unterschied vor ($p = 0,0427$). Dieses Ergebnis unterstreicht die Beeinflussung der Statistik durch einen möglichen Gewöhnungseffekt der Tiere im Exit from Circle- Test.

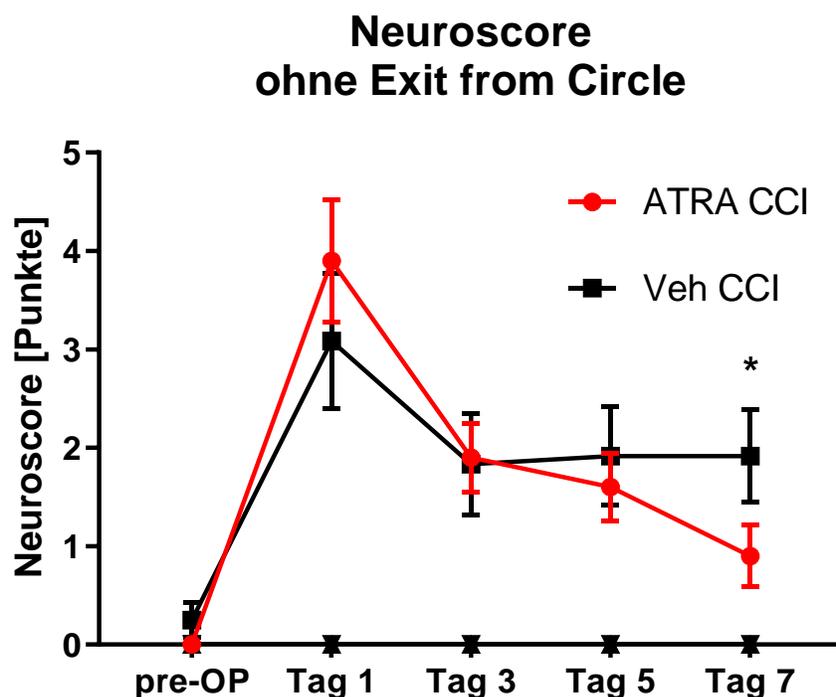


Abbildung 10: Neuroscore: Zeitlicher Verlauf

Gruppe ATRA CCI vs. Vehikel CCI. Signifikanter Unterschied an Tag 7 im untersuchten Zeitraum.

Im Verlauf ergibt sich ein signifikanter Unterschied in der ATRA-Gruppe am 7. Tag. Mittelwerte und SEM werden in Punkten angegeben. Pre-Op: $0,25 \pm 0,64$, Tag 1: $-0,81 \pm 0,64$; Tag 3: $-0,06 \pm 0,64$; Tag 5: $0,31 \pm 0,64$; Tag 7: $1,01 \pm 0,64$. Veh Gruppe $n=12$, ATRA-Gruppe $n=10$. Der erste Wert gibt den Hauptunterschied an, der zweite den Standardfehler der Differenz. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$ TwoWay Anova.

4.5 Kontusionsvolumen

Zur Erfassung des Hirnschadens wurden die Hirnschnitte mit Kresylviolett gefärbt und der histologische Schaden vermessen.

Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Interventionsgruppen. Das Schadensvolumen der ATRA-Gruppe ist im Durchschnitt um 13,4 % reduziert ($p = 0,0443$, CCI ATRA vs. CCI Veh). Hier scheint sich die i. p.-Applikation von ATRA in einem Überlebenszeitraum von sieben Tagen positiv auf das Schadensvolumen auszuwirken.

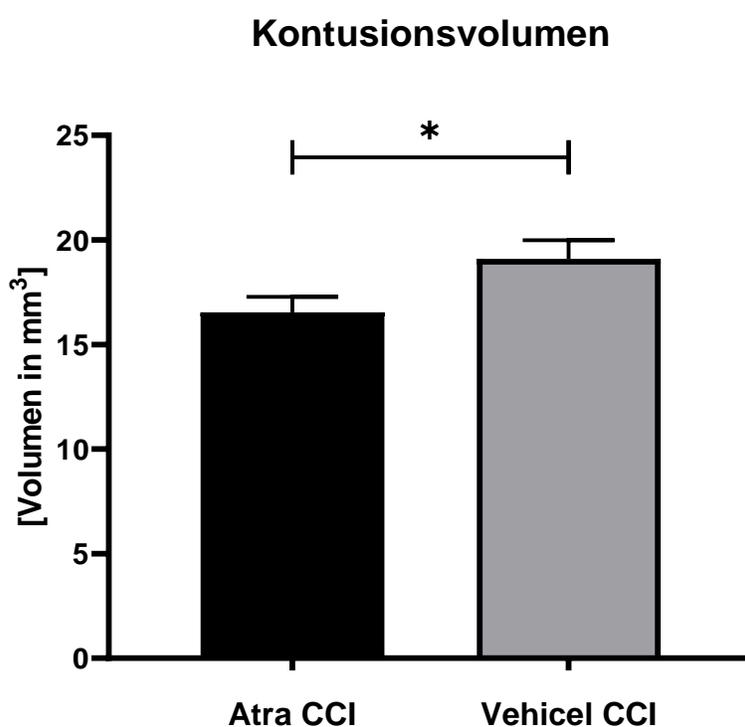


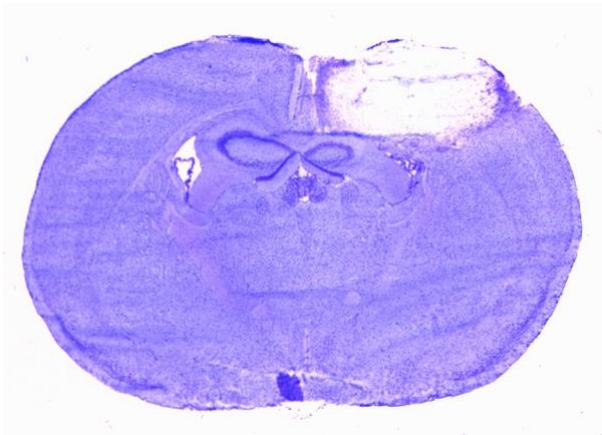
Abbildung 11: Kontusionsvolumen.

Signifikanter Unterschied zwischen den CCI-Gruppen.

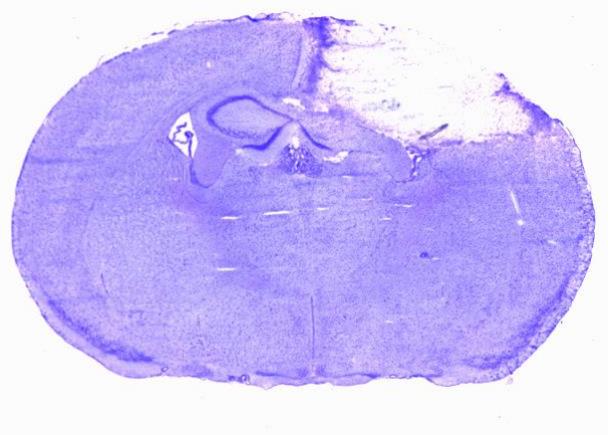
Das Diagramm zeigt die unterschiedlichen Kontusionsvolumina der CCI-Gruppen in mm³ nach ATRA-Gabe. Dies bezieht sich auch auf die Angaben der Mittelwerte und SEM. ATRA-Gruppe: $n=10$; $16,54 \pm 0,74$. Vehikel-Gruppe: $n=12$; $19,10 \pm 0,89$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$. Ungepaarter t-Test.

4.6 Kresylviolett-färbung der Hirnschnitte

Die histologischen Präparate zeigen repräsentative Schnittbilder, jeweils in Schnittebene 10 (Bregma), der jeweiligen Interventionsgruppe. Hier lässt sich auch makroskopisch ein Unterschied der Schadensfläche erkennen.



**Abbildung 12: Kontusionsvolumen
bei Behandlung mit ATRA**



**Abbildung 13: Kontusionsvolumen
bei Behandlung mit Vehikel**

4.7 Molekularbiologische Analyse

Die mRNA-Expression der Zielproteine GFAP, IL-1 β , Iba-1 und TNF α wurde mittels qRT-PCR ermittelt und gegen das Referenz-Gen PPIA normalisiert.

4.7.1 GFAP

GFAP dient als Marker für Astrozyten, anhand dessen in dieser Arbeit die Reaktivität der Astrozyten nach SHT analysiert wird. Die i. p.- Applikation von ATRA hat im Vergleich zur Veh-Gruppe im untersuchten Zeitraum eine signifikante Auswirkung auf die GFAP-Expression ($p < 0,0002$, one-way Anova mit post-hoc Korrektur Holm-Šídák-Test).

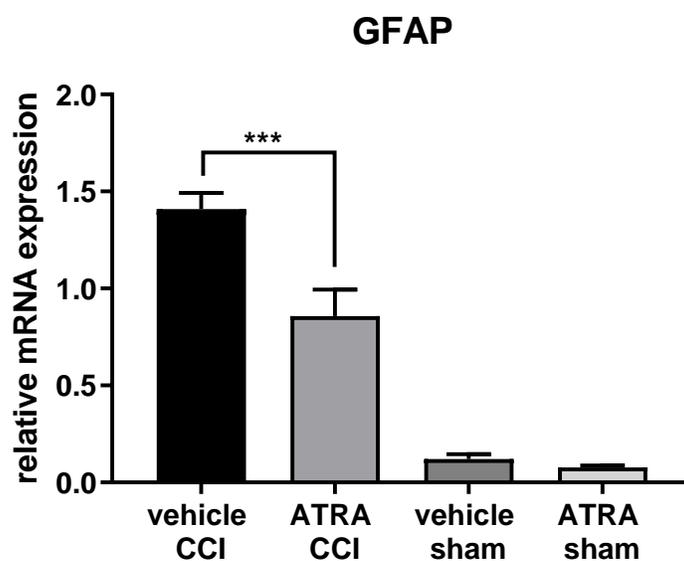


Abbildung 14: qRT-PCR, GFAP-Expression:

Signifikanter Unterschied zwischen ATRA-CCI-Gruppe und Veh-CCI-Gruppe.

Das Diagramm zeigt die mRNA-Kopien aus der qRT-PCR für GFAP der vier Untersuchungsgruppen nach ATRA-Gabe. Mittelwerte und SEM werden als Kopienanzahl von GFAP pro Kopienanzahl PPIA angegeben. Veh CCI: $1,40 \pm 0,11$, $n=12$; ATRA CCI: $0,85 \pm 0,11$, $n=10$; Veh Sham: $0,12 \pm 0,12$, $n=8$; ATRA Sham $0,07 \pm 0,13$, $n=8$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. One-way Anova.

4.7.2 IL-1 β

Interleukin 1 β ist ein Inflammationsmediator der in dieser Arbeit als proinflammatorischer Marker nach SHT untersucht wird. Die i. p.-ATRA-Applikation hat im untersuchten Zeitraum keine Auswirkung auf die IL-1 β -Expression ($p = 0,3422$).

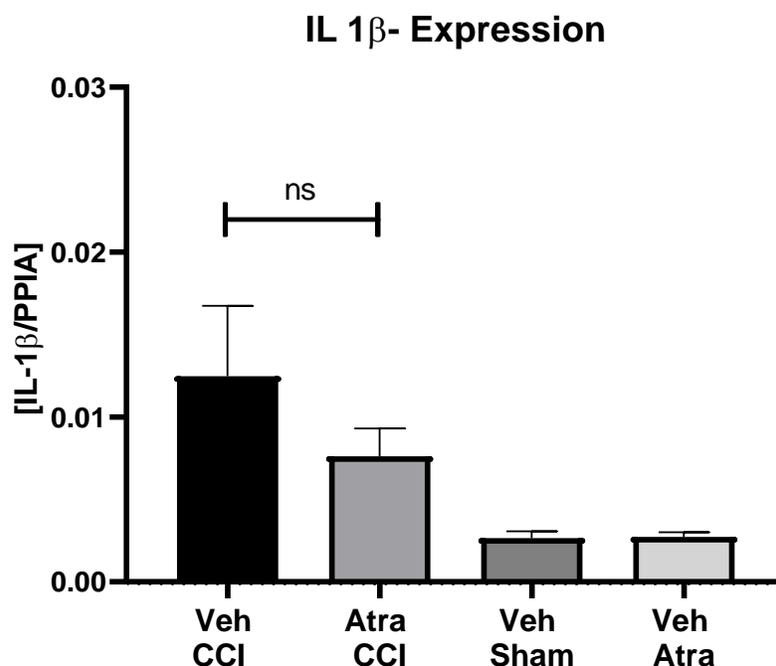


Abbildung 15: qRT-PCR, IL-1 β -Expression:

Kein Signifikanter Unterschied zwischen den Interventionsgruppen.

Das Diagramm zeigt die mRNA-Kopien aus der qRT-PCR für IL-1 β der vier Untersuchungsgruppen nach ATRA-Gabe. Verglichen werden hier nur die beiden Interventionsgruppen. Mittelwerte und SEM werden als Kopienanzahl von IL-1 β pro Kopienanzahl PPIA angegeben. Veh CCI: $0,01 \pm 0,00$, $n=12$; ATRA CCI: $0,007 \pm 0,00$, $n=10$. Veh Sham $n=8$, Veh ATRA $n=8$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. One-way Anova.

4.7.3 Iba-1

Die Expression von Iba-1 (ionisiertes Kalzium-bindendes Adaptermolekül) wird in dieser Arbeit als Inflammationsmarker im Rahmen des SHT untersucht. Es wird durch erhöhte Mikrogliaaktivität verändert und lässt Rückschlüsse auf diese zu. Die i. p.-ATRA-Applikation hat im untersuchten Zeitraum keine Auswirkung auf die Iba-1-Expression ($p=0,7671$).

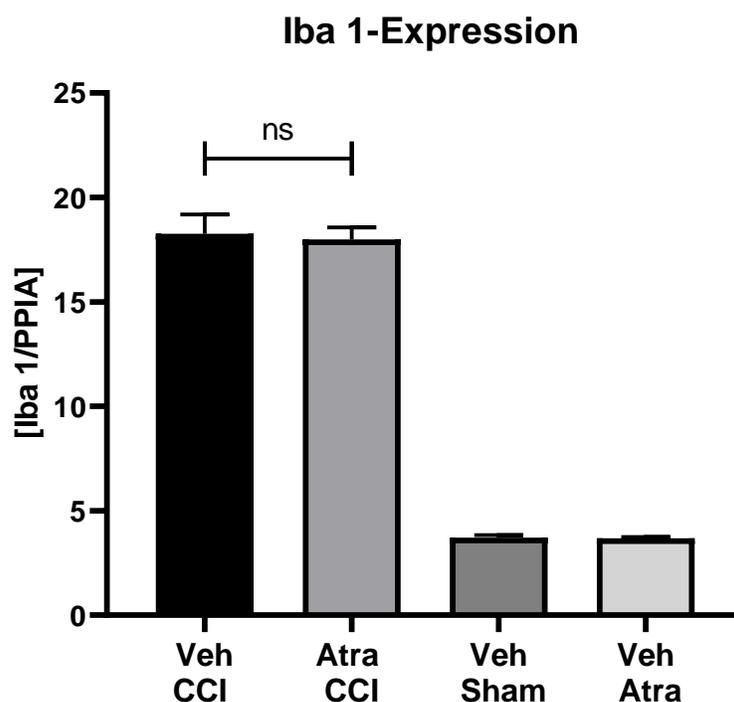


Abbildung 16: qRT-PCR Iba-1-Expression:

Kein signifikanter Unterschied zwischen den Interventionsgruppen.

Das Diagramm zeigt die mRNA-Kopien aus der qRT-PCR für Iba-1 der vier Untersuchungsgruppen nach ATRA-Gabe. Verglichen werden hier nur die beiden Interventionsgruppen. Mittelwerte und SEM werden als Kopienanzahl von Iba-1 pro Kopienanzahl PPIA angegeben. Veh CCI: $18,26 \pm 0,92$ $n=12$; ATRA CCI: $18,00 \pm 0,56$, $n=10$. Veh Sham $n=8$, Veh ATRA $n=8$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. One-way Anova.

4.7.4 TNF α

Tumornekrosefaktor α ist ein weiterer Inflammationsmarker, der hier für die Reaktion nach SHT in den Interventionsgruppen verglichen wird. Die i. p.-ATRA-Applikation hat im untersuchten Zeitraum keine signifikante Auswirkung auf die TNF α -Expression ($p=0,1163$).

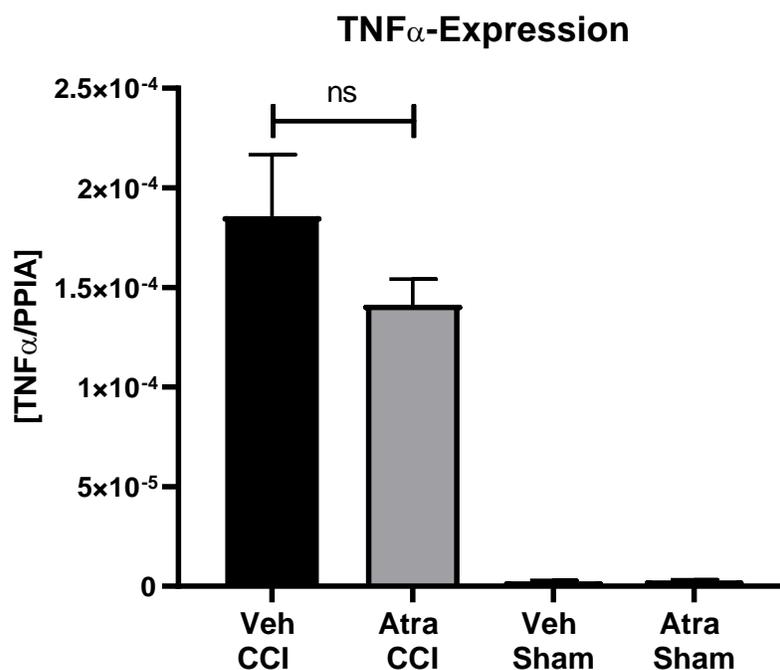


Abbildung 17: PCR TNF α -Expression:

Kein signifikanter Unterschied zwischen den Interventionsgruppen.

Das Diagramm zeigt die mRNA-Kopien aus der qRT-PCR für TNF α der vier Untersuchungsgruppen nach ATRA-Gabe. Verglichen werden hier nur die beiden Interventionsgruppen. Mittelwerte und SEM werden als Kopienanzahl von TNF α pro Kopienanzahl PPIA angegeben. Veh CCI: $0,00018 \pm 0,00$, $n=12$; ATRA CCI: $0,00014 \pm 0,00$, $n=10$. Veh Sham $n=8$, Veh ATRA $n=8$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. One-way Anova.

4.8 IgG-Dot Blot

Immunglobulin G wird in dieser Arbeit als Marker für die Schädigung der BHS untersucht. IgG ist ein Bestandteil des Blutes und kann nur im Rahmen einer Störung der BHS in der Schadensregion im ZNS gemessen werden (42),(87).

Die i. p.-ATRA-Applikation ergibt im untersuchten Zeitraum keinen Unterschied in der IgG-Messung ($p=0,4441$).

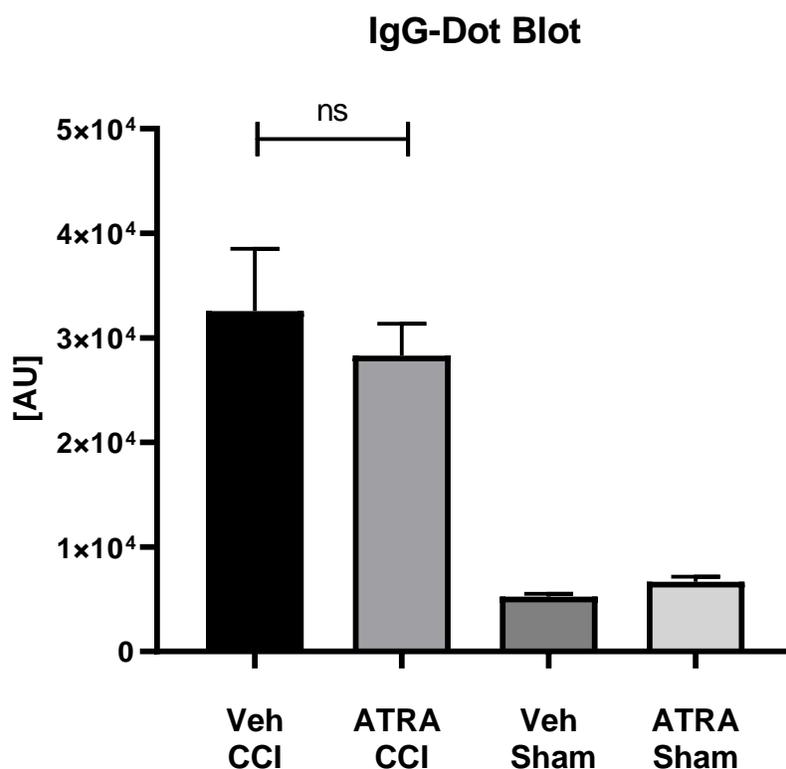


Abbildung 18: IgG-DotBlot:

Kein signifikanter Unterschied zwischen den Interventionsgruppen.

Das Diagramm zeigt die Unterschiede des gemessenen Fluoreszenzsignals in den vier Untersuchungsgruppen nach i. p.-ATRA- Applikation. Mittelwerte und SEM werden als AU (*Arbitrary Units*) angegeben. Veh CCI: 32550 ± 5969 , $n=12$; ATRA CCI: 28310 ± 3057 , $n=10$; Veh Sham: $5256 \pm 265,3$, $n=8$; ATRA Sham: $6678 \pm 490,4$, $n=8$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. One-way Anova.

4.8.1 Fluoreszenzdarstellung IgG-DotBlot

Das im Rahmen des SHT gemessene IgG wird hier durch Fluoreszenzmessung dargestellt und vergleicht die Untersuchungsgruppen bezüglich einer Schädigung der BHS.

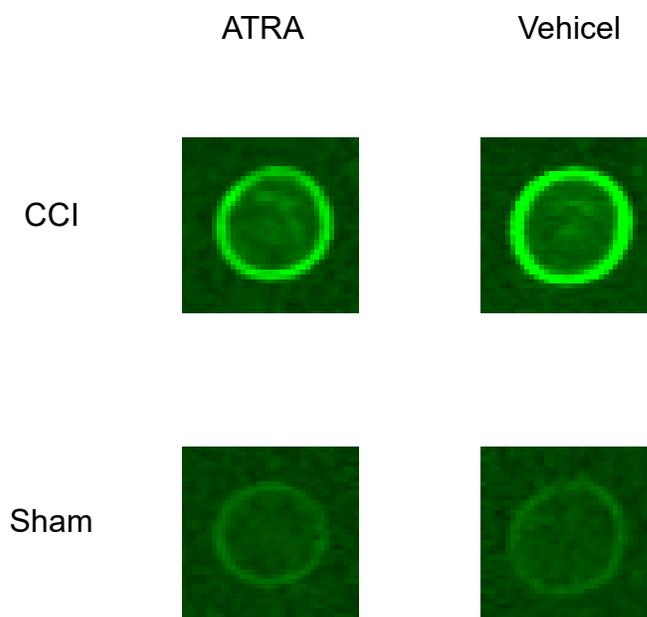


Abbildung 19: IgG-Messung:

Keine Signalunterschiede nach ATRA-Gabe in der Fluoreszenzmessung.

In der Abbildung werden die Signalmessungen der beiden Interventionsgruppen dargestellt. Ein Unterschied in der Signalstärke ist nach ATRA-Gabe nicht erkennbar.

4.9 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie dient dazu, bestimmte Zellen sichtbar zu machen und auf Größe und Anzahl zu untersuchen. In dieser Arbeit werden dazu Astrozyten sichtbar gemacht, indem das GFAP-Intermediärfilament fluoreszenzmarkiert wird. Es werden die ipsiläsionalen Regionen sowie die kontraläsionalen Regionen verglichen. Vergleicht man die Anzahl der detektierten GFAP-immunreaktiven Strukturen in der ipsiläsionalen Region, zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Interventionsgruppen ($p=0,0079$). Die i. p.-ATRA-Applikation führt zu einer verminderten Anzahl an reaktiven Astrozyten im Schadensbereich. In den weiteren Untersuchungen zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Interventionsgruppen.

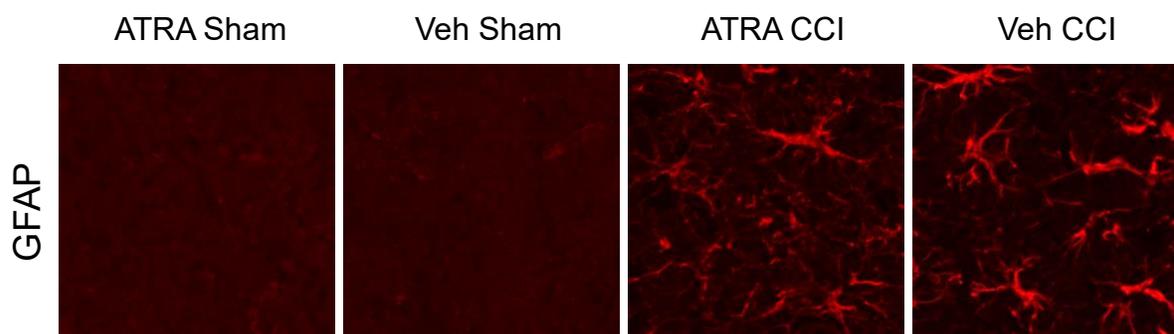


Abbildung 20: Immunhistochemische Färbung des GFAP

Die Abbildung zeigt repräsentative Ausschnitte der immunhistochemischen Färbung von GFAP aller Gruppen im ipsiläsionalen Segment. Hier lässt sich eine vermehrte Anzahl an GFAP-gefärbten Elementen in der Veh CCI-Gruppe im Vergleich zur ATRA CCI-Gruppe erkennen.

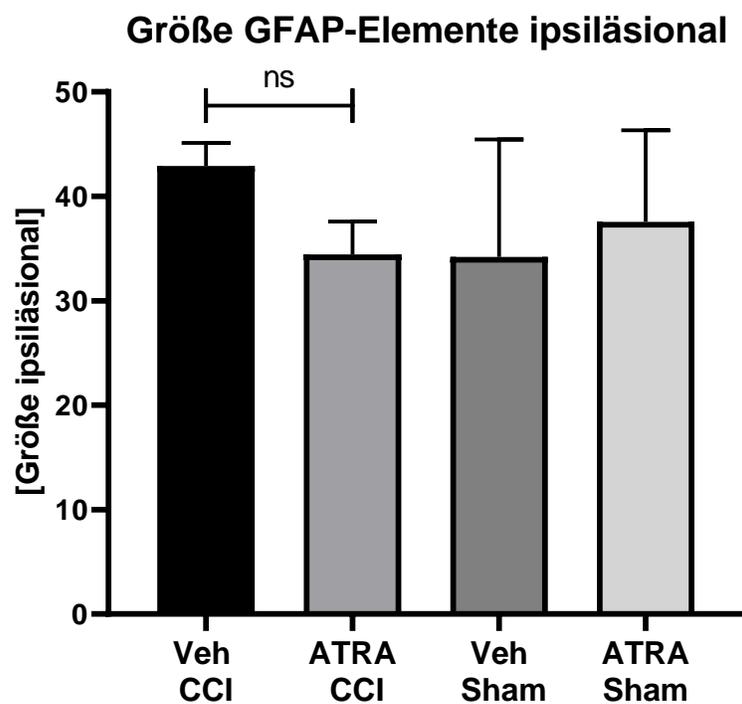


Abbildung 21: Größe GFAP-Elemente ipsiläsional.

Kein signifikanter Unterschied zwischen den Interventionsgruppen.

Die Größe der GFAP-Elemente wird in μm^2 angegeben. Mittelwerte und SEM. Statistisch wird der one-way Anova angewendet. Der Holm-Šídák-Test wird als post-hoc Test im Anschluss angewendet. Die Veh-CCI-Gruppe vs. ATRA-CCI-Gruppe ergibt keinen signifikanten Unterschied. Mittelwerte: Veh CCI: 42,90+/- SEM; ATRA CCI: 34,44+/- SEM; Veh-Gruppe n= 12, ATRA-Gruppe n=10. Veh Sham-Gruppe n=8, ATRA Sham-Gruppe n=8.

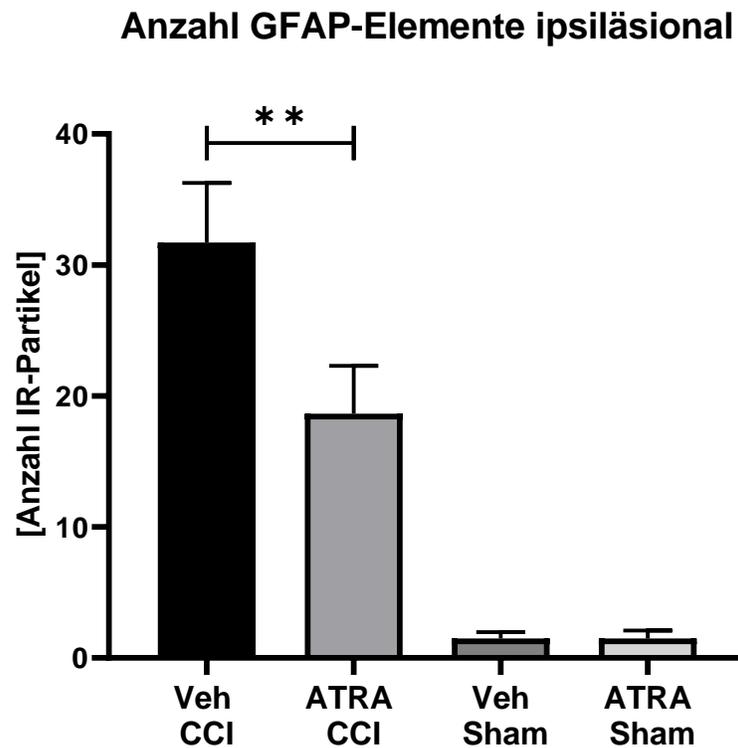


Abbildung 22: Anzahl GFAP-Elemente ipsiläsional.

Signifikanter Unterschied zwischen den Interventionsgruppen.

Die Anzahl der GFAP-Elemente wird als Zahl der IR-Partikel angegeben. Ebenso Mittelwerte und SEM. Statistisch wird der one-way Anova angewendet. Der Holm-Šídák-Test wird als post-hoc Test im Anschluss angewendet. Die Veh-CCI-Gruppe vs. ATRA-CCI-Gruppe ergibt einen signifikanten Unterschied ($p=0,0079$). Mittelwerte: Veh CCI: 31,71+/- SEM; ATRA CCI: 18,65+/- SEM; Veh-Gruppe n= 12, ATRA-Gruppe n=10. Veh Sham-Gruppe n=8, ATRA Sham-Gruppe n=8.

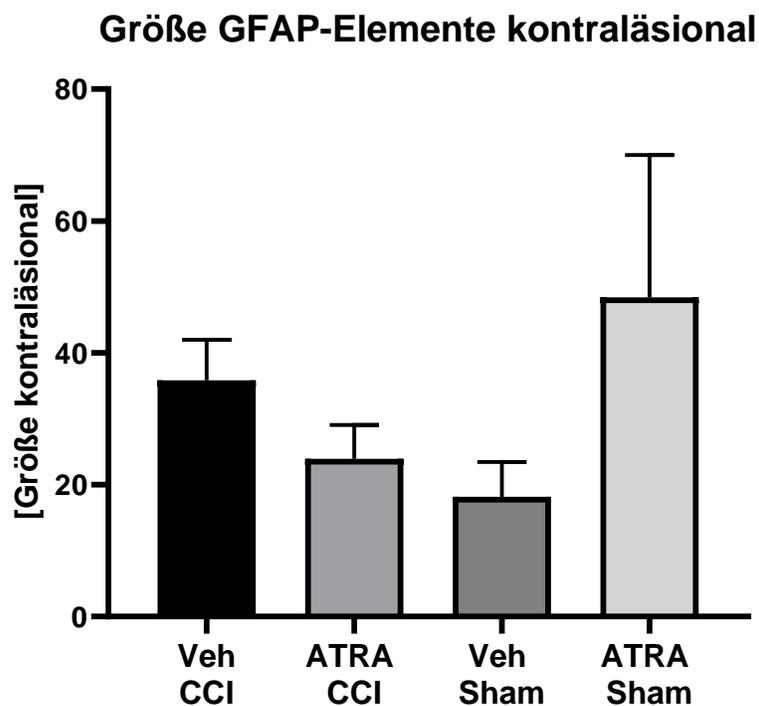


Abbildung 23: Größe GFAP-Elemente kontraläsional.

Kein signifikanter Unterschied zwischen den Interventionsgruppen.

Die Größe der GFAP-Elemente wird μm^2 angegeben. Ebenso Mittelwerte und SEM. Statistisch wird der one-way Anova angewendet. Der Holm-Šidák-Test wird als post-hoc Test im Anschluss angewendet. Die Veh-CCI-Gruppe vs. ATRA-CCI- Gruppe ergibt keinen signifikanten Unterschied. Mittelwerte: Veh CCI: 35,82 \pm SEM; ATRA CCI: 23,93 \pm SEM. Veh-Gruppe n= 12, ATRA-Gruppe n=10. Veh Sham-Gruppe n=8, ATRA Sham-Gruppe n=8.

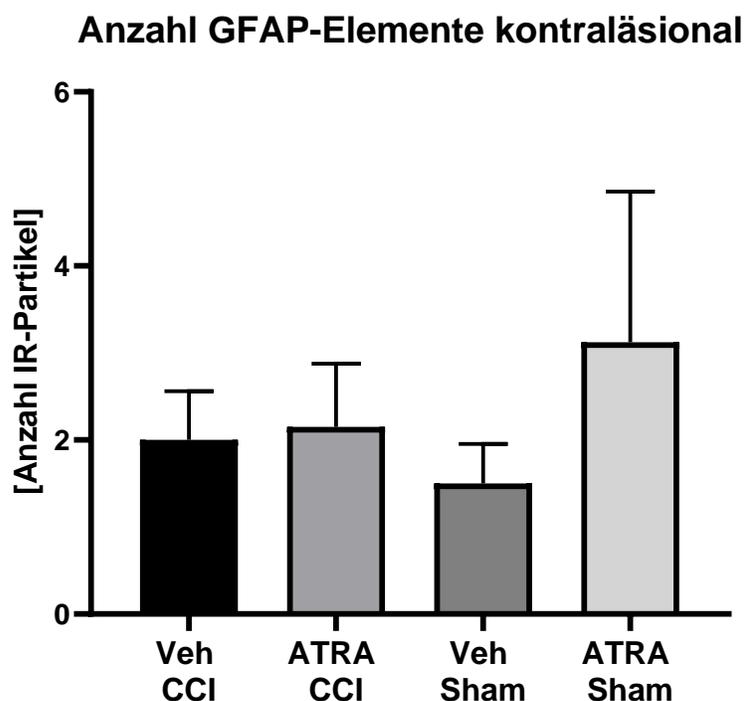


Abbildung 24: Anzahl GFAP-Elemente kontraläsional.

Kein Signifikanter Unterschied zwischen den Interventionsgruppen.

Die Anzahl der GFAP-Elemente wird als Zahl der IR- Partikel angegeben. Ebenso Mittelwerte und SEM. Statistisch wird der one-way Anova angewendet. Der Holm-Šídák-Test wird als post-hoc Test im Anschluss angewendet. Die Veh-CCI-Gruppe vs. ATRA-CCI- Gruppe ergibt keinen signifikanten Unterschied. Mittelwerte: Veh CCI: 2,00+/- SEM; ATRA CCI: 2,15+/- SEM; Veh-Gruppe n= 12, ATRA-Gruppe n=10. Veh Sham-Gruppe n=8, ATRA Sham-Gruppe n=8.

5. Diskussion

Das SHT ist in seiner akuten Form und deren Folgen eine der führenden Ursachen für Morbidität und Mortalität weltweit (1). Der Pathomechanismus des SHT lässt sich in einen primären und einen sekundären Schaden unterteilen. Hierbei spielen Mechanismen wie oxidativer Stress, Ödeme, Entzündung, Nekrose und Apoptose (5) eine entscheidende Rolle, die wiederum Ansätze für Therapie und Forschung bieten. Da sich durch den irreversiblen primären Schaden keine Behandlungsmöglichkeit ergibt, rückt die Therapie des sekundären Schadens in den Fokus. Als ein möglicher Wirkungsansatz wird die Beeinflussung durch die Gabe von ATRA gesehen. Daher wird in der vorliegenden Arbeit die Wirkung am Mausmodell untersucht.

Hierbei ergeben sich mehrere wichtige Ergebnisse. Bezüglich des Körpergewichtes zeigen sich keine relevanten Änderungen zwischen den Interventionsgruppen (ATRA CCI vs. Veh CCI) im untersuchten Zeitraum von sieben Tagen. Hierbei kann das Körpergewicht als Surrogatparameter für den Gesundheitszustand der Tiere verwendet werden. Interessanterweise kann auch bei den Tieren der Sham-Gruppe eine Gewichtsabnahme am ersten postoperativen Tag beobachtet werden. Dies könnte am ehesten mit der erstmaligen i. p. Applikation, sowie der Sham- Operation erklärt werden. Insgesamt weist das Körpergewicht innerhalb des untersuchten Zeitraums keinen Anhalt für einen reduzierten Gesundheitszustand auf.

Beim Rotarod-Test wird kein signifikanter Unterschied zwischen den Interventionsgruppen (ATRA CCI vs. Veh CCI) beobachtet. Die Aussagekraft dieses Testverfahrens muss jedoch im Kontext der Durchführung bewertet werden, da eine gewisse Subjektivität der Versuchsabläufe nicht vermieden werden kann. So ist trotz Übungsdurchläufen ein regelrechter Versuchsablauf nicht immer auf Anhieb gewährleistet. Um repräsentative Werte zu erreichen, muss während der Testdurchläufe eine subjektive Einschätzung der Tiere durch den Untersucher erfolgen. Hier müssen Abläufe wie z.B. sofortiges Herunterfallen der Tiere von der Rotarodrolle oder Rückwärtslaufen, durch die subjektive Einschätzung des Untersuchers in einen sinnvollen und auswertbaren Testablauf integriert werden, gegebenenfalls wiederholt werden um vergleichbare Werte zur erlangen. Die Durchführung durch dieselbe Person ist somit eine wichtige Voraussetzung. Trotz dieser Limitation gilt der Rotarod-Test als valide, sensitive

und effiziente Methode zur Bewertung motorischer (Lern-) Fähigkeiten und wird regelmäßig verwendet. (82),(88),(89).

Die im Rahmen der Untersuchungen erzielten Ergebnisse zeigen keinen signifikanten Unterschied der Testgruppen. Wie in vorherigen Studien beschrieben, gab es eine Korrelation zwischen Größe des Motorkortex und der besseren Performance auf dem Rotarod. In dieser Studie ist durch die Schädigung des Kortex von einer Abnahme des Motorkortex der CCI-Gruppe auszugehen. Eine deutliche Verschlechterung zeigt sich nicht, auch wenn der Schaden des Motorkortex nicht explizit untersucht wurde. (89).

Der Neuroscore-Test zeigt zunächst keinen signifikanten Unterschied zwischen den Interventionsgruppen (ATRA CCI vs. Veh CCI). Auffällig ist, dass auch in den Sham-Gruppen ein Anstieg des Neuroscores am siebten Tag im Vergleich zum präoperativen Tag zu beobachten ist. Hierfür wird häufig ein schlechter Wert im „Exit from Circle“ verantwortlich gemacht, da die Tiere aufgrund eines Gewöhnungseffektes im Verlauf weniger sensibel auf den Test reagieren. In der Auswertung ohne den „Exit from Circle“ ist am siebten postoperativen Tag allerdings ein signifikanter Unterschied (ATRA CCI vs. Veh CCI) zu verzeichnen. Es zeigt sich im Verlauf der einzelnen Tage eine Abnahme des neurologischen Defizits in beiden Gruppen. Diese stagniert in der Veh-Gruppe ab dem 3. Tag, während in der ATRA-Gruppe ein weiterer Abfall sichtbar ist. Zwar ist aufgrund des kurzen Untersuchungszeitraumes und der geringen Fallzahl nur knapp ein signifikanter Unterschied erkennbar ($p= 0,042$), dieser könnte jedoch im Rahmen eines längeren Untersuchungszeitraumes aufgrund der vorliegenden Entwicklungen deutlicher ausfallen. Dies lässt vermuten, dass eine positive Wirkung von ATRA erst nach mehreren Tagen erkennbar wird.

Das Kontusionsvolumen zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den Interventionsgruppen (ATRA CCI vs. Veh CCI) mit einem geringeren Kontusionsvolumen nach ATRA-Applikation. Hier wirkt sich die i. p. Applikation von ATRA in dem Untersuchungszeitraum von sieben Tagen positiv aus. Im Rahmen einer Studie, welche die RA-Wirkung in Hinsicht auf Neurogranin (Protein der neuronalen Plastizität) bei Ratten anhand des dMCAO-Modells (*distal middle cerebral artery occlusion*) untersucht, zeigt sich in einem Untersuchungszeitraum von 28 Tagen eine Reduktion des Infarktolumens bei den mit ATRA behandelten Tieren. Interessanterweise ist eine Verringerung des Infarktolumens der RA-behandelten Tiere nur in den ersten 14 Tagen messbar. So wird

vermutet, dass über diesen Zeitraum hinaus eine Regeneration auch auf natürliche Weise möglich ist (74). Eine Auswirkung des Neurogranin auf die intrazelluläre Ca^{2+} - Ansammlung wird hier für die geringere Infarktgröße vermutet. Wenn auch als Grundlage ein anderes Untersuchungsmodell diene, zeigt sich ebenfalls eine temporär positive Wirkung des ATRA. In Anbetracht der Untersuchungszeiträume ist es möglich, dass die Behandlung mit ATRA in einem bestimmten Zeitfenster postinterventionell entscheidende Vorteile in der Ausbreitung des Schadenvolumens mit sich bringt. Dieser Effekt kann aufgrund der zeitlichen Ausrichtung dieser Studie nur vermutet werden.

Mithilfe von molekularbiologischen Analysen wird die mRNA-Expression von vier Zielproteinen (GFAP, IL-1 β , Iba-1 und TNF α) als Parameter der sekundären Schadensauswirkungen getestet. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Interventionsgruppen (ATRA CCI vs. Veh CCI) kann nur für die Expression von GFAP als Astrozytenmarker mit geringerer GFAP-Expression in der ATRA-Gruppe beobachtet werden. Dies könnte für die konkrete Beeinflussung der Astrozyten durch ATRA gewertet werden. Die indirekte Aktivierung der Astrozyten durch Mikroglia und deren oben genannte Mediatoren (34) scheinen durch die hier vorliegenden Ergebnisse nicht relevant verändert zu werden. Nützlich könnte eventuell eine zusätzliche Regulierung dieser Mediatoren sein, um die Wirkung von ATRA zu unterstützen. Eine verringerte Aktivität der Astrozyten scheint sich hier positiv auf das Kontusionsvolumen und die neurologische Beeinträchtigung auszuwirken. Dies steht nach den durchgeführten Versuchen als Kernaussage im Raum. Inwieweit diese zunächst positive Entwicklung sich auf eine schnellere und langfristige Genesung auswirkt bleibt unklar. Da das diffizile Zusammenspiel von A1 und A2-Reaktion in ihren therapeutischen Zügen noch nicht gänzlich verstanden ist, scheint eine definitive Aussage über den Nutzen der ATRA-Applikation nur schwer möglich. Die verminderte Astrozytenaktivität könnte ebenso in einer nicht ausreichenden Isolation des Schades und somit dem proinflammatorischen und potenziell schädigenden Effekt für umliegende Gewebe enden. Auch hier sollte eine Beobachtung über einen längeren Zeitraum folgen.

Für die drei weiteren Proteine (IL-1 β , Iba-1 und TNF α) wird kein signifikanter Unterschied zwischen den Interventionsgruppen (ATRA CCI vs. Veh CCI) in der Genexpression beobachtet, so dass ein Einfluss von ATRA auf deren Expression sieben Tage nach SHT in dieser Arbeit nicht zu belegen ist. Jedoch könnten die Ergebnisse Ansatz für weitere

Untersuchungen im Rahmen des hier genutzten Untersuchungsmodells liefern, da bereits eine Abnahme der Expression sichtbar ist (ohne Signifikanz), welche eine Einflussnahme durch ATRA vermuten lassen kann. Dies bestätigt sich in bereits durchgeführten Studien mit Zellkulturen, welche die Auswirkung auf die Proteinbiosynthese mit Fokus auf $\text{TNF}\alpha$ und induzierbarer Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) nach ATRA-Applikation im Rahmen einer aktivierten Mikroglia untersuchen. Hier zeigte sich nach Gabe von RA eine verminderte mRNA-Expression der beiden Entzündungsmarker und daraus resultierend eine verminderte Proteinbiosynthese. Daraus wird geschlossen, dass RA den neurotoxischen Effekt der aktivierten Mikroglia durch Unterdrückung der inflammatorischen Zytokine und zytotoxischen Moleküle verringert (92).

Stellvertretend für den Funktionsverlust der BHS wird mittels DotBlot-Verfahren die Immunglobulin G-Aktivität durch Fluoreszenzmarkierung in den Interventionsgruppen (ATRA CCI vs. Veh CCI) verglichen. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied. Somit lässt sich schlussfolgern, dass ATRA keine entscheidende Auswirkung auf die Beständigkeit oder Regenerationseigenschaft der BHS hat. Die dennoch geringere Messung des Fluoreszenzsignals könnte Grundlage für weitere Untersuchungen bieten, um nicht nur den in dieser Arbeit untersuchten Zeitraum zu beobachten. Ergebnisse anderer Untersuchungen suggerieren einen Einfluss von RA, der sich positiv auf ischämische Schädigungen auswirken soll, indem die BHS durch Einflussnahme auf das ZO-1-Protein und das Endothel strukturell beeinflusst wird (79).

In den immunhistochemischen Untersuchungen werden Größe und Anzahl der reaktiven Astrozyten nach SHT sichtbar gemacht. Hier kann ein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Astrozyten in der ipsiläsionalen Region beobachtet werden, allerdings nicht in der Größe der Astrozyten. Dies unterstützt die bereits durch die molekularbiologischen Analysen vermutete Theorie der Einflussnahme von ATRA auf die Astrozyten.

Bezüglich der Größe der Astrozyten wird eine Einflussnahme von ATRA durch die Regulierung von Ca^{2+} bereits in Zellkulturen beschrieben. Diese scheint zu einem geringeren Ödem zu führen (80). Die Ergebnisse dieser Arbeit würden diesen Einfluss bestätigen, wenn auch nicht speziell die Auswirkung des Ca^{2+} untersucht wurde. Zudem wird beobachtet, dass in den kontraläsionalen Regionen keine Unterschiede zu sehen sind. Dies spricht für eine verminderte Astroglieose kontraläsional, die sich aufgrund des SHT-Vorgangs vermuten ließe.

Limitationen:

Die vorliegenden Ergebnisse dieser Studie belegen die Wirkung des i. p. applizierten Medikamentes ATRA in verschiedenen Untersuchungen. So wirkt sich ATRA im untersuchten Zeitraum von sieben Tagen positiv auf das Kontusionsvolumen, die Astrozytenaktivität und das neurologische Defizit aus. Pathophysiologische Abläufe nach SHT können jedoch Jahre anhalten (*reviewed in* (90)), so dass der kurze Untersuchungszeitraum kritisch diskutiert werden muss. Die heterogenen und sehr komplexen reaktiven Prozesse von Makro- und Mikroglia und deren Wechselwirkungen beanspruchen detaillierte Untersuchungen, um die Ansatzpunkte der Therapie nachhaltig zu gestalten. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen ausschließlich die Beurteilung des Zustandes bis zum siebten postinterventionellen Tag zu. Die Entwicklung des neurologischen Defizits zeigt in diesem Zeitraum einen knappen signifikanten Unterschied zwischen den Interventionsgruppen. Aufgrund des Verlaufes könnte in einem längeren Beobachtungszeitraum eine aussagekräftigere Relevanz vermutet werden. Des Weiteren bleibt eine andauernde regenerative Wirkung rein spekulativ zu bewerten, kann aber aufgrund der gezeigten Ergebnisse Basis für weitere Forschungsprojekte liefern. Im Rahmen der kleinen Fallzahl kann die Auswertung der Medikamentenapplikation nur zu einem Zeitpunkt erfolgen. Größere Fallzahlen könnten die Wirkweise engmaschiger analysieren. Hier könnten Vergleiche an mehreren Tagen und über einen längeren Zeitraum von Interesse sein. Ebenso wäre eine unterschiedliche Dosierung des Medikamentes zu erwägen, um dessen Wirkspektrum zu optimieren. Die i. p. Applikationsart wird schon in anderen Studien erfolgreich angewendet, so dass eine Wirkung im Gehirn trotz peripherer Gabe vermutet werden konnte (74). Dies bestätigt sich im Rahmen dieser Arbeit. Die Versuchstiere haben die i. p. Gabe über den Untersuchungszeitraum gut toleriert ohne sichtbare gesundheitliche Beeinträchtigungen aufzuweisen. Die signifikanten Unterschiede in den Ergebnissen lassen darauf schließen, dass ATRA die BHS in effektiven Dosen überwinden kann und seine Wirkung in der Schadensregion entfalten kann. Dennoch wäre ein Vergleich mit einer intravenösen oder auch zentralen/intraventrikulären Applikation interessant, um einen möglichen Benefit zu sehen. Untersuchungen auf die Auswirkung der i. p. Applikation im restlichen Körper wurden ebenfalls nicht durchgeführt. Hier müssten Studien zu allgemeiner Wirkweise folgen, um mögliche Schädigungen anderer Organsysteme auszuschließen.

Ein gewichtiger limitierender Faktor bleibt im Allgemeinen der Tierversuch als Studienmodell im Vergleich mit dem menschlichen Organismus. Im Rahmen des hier angewendeten Traumamodells CCI werden zwar genau definierte Schadensereignisse ausgeübt, die den Vergleich zwischen den einzelnen Gruppen in Bezug auf die ATRA-Wirkung und die lokalen pathophysiologischen Vorgänge zulassen, jedoch nur ansatzweise mit dem äußerst variablen SHT beim Menschen verglichen werden können. Hier müssen neben den vielseitigen Formen des SHT auch die häufigen Begleitverletzungen bei schweren Unfallvorgängen mit betrachtet werden, um das Outcome möglichst realistisch zu werten. Es ist schwierig Tierversuche in dieser Komplexität zu gestalten, da die Auswertung der Resultate nur sehr unspezifisch möglich wäre und somit der Vergleich der Untersuchungsgruppen nicht gewährleistet wäre (91). Insofern kann die Erforschung pathophysiologischer Vorgänge im Tiermodell wichtige Ansätze zum Verständnis des Krankheitsbildes SHT liefern, eine Übertragung der Ergebnisse und etwaiger Therapieansätze auf das menschliche Individuum ist jedoch nur sehr eingeschränkt möglich.

6. Zusammenfassung

Das Schädel-Hirn-Trauma gehört auch im 21. Jahrhundert zu den häufigsten Todesursachen. Trotz vieler präventiver Maßnahmen und technischer Fortschritte, z. B. in der Autoindustrie, sind die Traumata wie einleitend beschrieben mit schweren, beeinträchtigenden Folgen verbunden. Besonders jüngere Patientengruppen sind auf Grund des langen Regenerationsprozesses und der nicht immer wieder vollständig herstellbaren neurologischen Funktionalität schwer betroffen. Sowohl im sozialen Umfeld, aber auch im sozioökonomischen Bereich ist eine Einschränkung im jungen Alter besonders schwerwiegend. Daraus resultiert ein großes Interesse an einer nachhaltigen und effektiven Therapie. Da durch die komplexen pathophysiologischen Vorgänge noch viele offene Fragen bezüglich einer optimalen Behandlung dieses Krankheitsbildes bestehen, ist eine detaillierte Erforschung dieser Prozesse erforderlich.

Im Rahmen der Grundlagenforschung beschäftigt sich diese Arbeit deshalb mit dem Effekt des Vitamin A- Derivats All-trans-Retinsäure (ATRA) in Bezug auf das SHT. Dazu wird anhand tierexperimenteller Versuche die Wirkung des Medikamentes in vier randomisierten Tiergruppen untersucht. Die Tiere werden in zwei Gruppen unterteilt, eine Interventionsgruppe (experimentelles Setzen eines SHT) und eine Vergleichsgruppe ohne SHT. In jeder Gruppe erhält ein Teil ATRA, der andere Teil nur den Trägerstoff (Vehikel) von ATRA. In einem Zeitraum von sieben Tagen wird an drei Tagen der Wirkstoff intraperitoneal appliziert. Nachdem am ersten Tag das Trauma erfolgt, wird in den folgenden Tagen mittels Neuroscore, Rotarod-Test und Gewichtsmessung das Verhalten und der Gesundheitszustand der Tiere verglichen und überprüft. Anschließend erfolgt die Euthanasie. Die gewonnenen Gewebeproben werden histologisch aufgearbeitet und das Kontusionsvolumen verglichen. Ebenso folgt eine immunhistochemische Markierung von Astrozyten. Des Weiteren werden molekularbiologisch Plastizitätsmarker und pro-inflammatorische Mediatoren durch qRT-PCR auf genexpressorische Veränderungen untersucht. Die Ergebnisse der verschiedenen Untersuchungen zeigen teilweise signifikante Unterschiede zwischen den Interventionsgruppen. So wirkt sich die ATRA-Applikation verringernd auf das Kontusionsvolumen und die Astrozytenaktivität aus. Es lässt sich ebenfalls ein geringeres neurologisches Defizit in der ATRA-Gruppe beobachten. Aus den Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass die Beeinflussung der

Astrozyten durch ATRA am ausgeprägtesten ist. Anhand der immunhistochemischen und molekularbiologischen Untersuchungen lässt eine Reduktion der Astrozytenaktivität einen neuroprotektiven Effekt vermuten. Somit sind Astrozyten ein potenzielles Ziel im Rahmen der Therapie des SHT. Die heterogene Funktion der Astrozyten sollte in weiteren Studien genauer analysiert werden, um gezielt in die komplexen Wirkmechanismen einzugreifen. Hierbei werden auch die Langzeitwirkung sowie das Beobachten etwaiger Nebenwirkungen der ATRA-Applikation von Interesse sein, die im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden konnten.

7. Literaturverzeichnis:

1. Langlois JA, Rutland-Brown W, Wald MM. The epidemiology and impact of traumatic brain injury: a brief overview. *The Journal of head trauma rehabilitation*. 2006;21(5):375-8.
2. Majdan M, Plancikova D, Brazinova A, Rusnak M, Nieboer D, Feigin V, et al. Epidemiology of traumatic brain injuries in Europe: a cross-sectional analysis. *The Lancet Public health*. 2016;1(2):e76-e83.
3. Rickels E vWK, Wenzlaff P,. Schädel-Hirn-Verletzung, Epidemiologie und Versorgung: Zuckerschwerdt Verlag; 2006.
4. R. Firsching ER, U.M. Mauer, O.W. Sakowitz, M. Messing-Jünger, K. Engelhard für DGAI, P. Schwenkreis für DGN, J. Linn für DGNR,P. Biberthaler für DGUund K.Schwerdtfeger. KURZVERSIONLEITLINIE SCHÄDEL-HIRN-TRAUMA IM ERWACHSENENALTER. 2015.
5. Werner C, Engelhard K. Pathophysiology of traumatic brain injury. *British journal of anaesthesia*. 2007;99(1):4-9.
6. Maden M. The role of retinoic acid in embryonic and post-embryonic development. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 2000;59(1):65-73.
7. Fenaux P, Chomienne C, Degos L. All-trans retinoic acid and chemotherapy in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Seminars in hematology*. 2001;38(1):13-25.
8. Pushkarna A, Bhatoe HS, Sudambrekar SM. Head Injuries. *Medical journal, Armed Forces India*. 2010;66(4):321-4.
9. Sternbach GL. The Glasgow coma scale. *The Journal of emergency medicine*. 2000;19(1):67-71.
10. Becker A, Peleg K, Olsha O, Givon A, Kessel B. Analysis of incidence of traumatic brain injury in blunt trauma patients with Glasgow Coma Scale of 12 or less. *Chinese journal of traumatology = Zhonghua chuang shang za zhi*. 2018;21(3):152-5.
11. Bledsoe BE, Casey MJ, Feldman J, Johnson L, Diel S, Forred W, et al. Glasgow Coma Scale Scoring is Often Inaccurate. *Prehospital and disaster medicine*. 2015;30(1):46-53.

12. Information DfMDu. ICD-10-GM Version 2019 [05.06.2019]. Kapitel XIX S06-S.9]. Available from: <https://www.dimdi.de/static/de/klassifikationen/icd/icd-10-gm/kode-suche/htmlgm2019/block-s00-s09.htm>.
13. Blennow K, Hardy J, Zetterberg H. The neuropathology and neurobiology of traumatic brain injury. *Neuron*. 2012;76(5):886-99.
14. Bernacki J, Dobrowolska A, Nierwinska K, Malecki A. Physiology and pharmacological role of the blood-brain barrier. *Pharmacological reports : PR*. 2008;60(5):600-22.
15. Mattle H. MM. *Neurologie*. Stuttgart: Thieme; 2013. S.44.
16. Litmathe J. *Neurologische Notfälle*: Springer; 2016. S.51-53.
17. Andriessen TM, Jacobs B, Vos PE. Clinical characteristics and pathophysiological mechanisms of focal and diffuse traumatic brain injury. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2010;14(10):2381-92.
18. Choi DW. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1987;7(2):369-79.
19. Petersen OH, Michalak M, Verkhratsky A. Calcium signalling: past, present and future. *Cell calcium*. 2005;38(3-4):161-9.
20. Wojda U, Salinska E, Kuznicki J. Calcium ions in neuronal degeneration. *IUBMB life*. 2008;60(9):575-90.
21. Weber JT. Calcium homeostasis following traumatic neuronal injury. *Current neurovascular research*. 2004;1(2):151-71.
22. Trump BF, Berezsky IK. The mechanisms of calcium-mediated cell injury and cell death [corrected]. *New horizons (Baltimore, Md)*. 1996;4(1):139-50.
23. Schinder AF, Olson EC, Spitzer NC, Montal M. Mitochondrial dysfunction is a primary event in glutamate neurotoxicity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1996;16(19):6125-33.
24. Bartus RT. The Calpain Hypothesis of Neurodegeneration: Evidence for a Common Cytotoxic Pathway 1997:NEUROSCIENTIST 3:314–27.
25. Slemmer JE, Shacka JJ, Sweeney MI, Weber JT. Antioxidants and free radical scavengers for the treatment of stroke, traumatic brain injury and aging. *Current medicinal chemistry*. 2008;15(4):404-14.

26. Weber JT. Altered calcium signaling following traumatic brain injury. *Frontiers in pharmacology*. 2012;3:60.
27. Ankarcona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, et al. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron*. 1995;15(4):961-73.
28. Stoffel M, Rinecker M, Graf R, Baethmann A, Plesnila N. Nitric oxide in the penumbra of a focal cortical necrosis in rats. *Neuroscience letters*. 2002;324(3):201-4.
29. Ramlackhansingh AF, Brooks DJ, Greenwood RJ, Bose SK, Turkheimer FE, Kinnunen KM, et al. Inflammation after trauma: microglial activation and traumatic brain injury. *Annals of neurology*. 2011;70(3):374-83.
30. Ludmila Belayev YL, Nicolas G. Bazan. Brain Ischemia and Reperfusion: Cellular and Molecular Mechanisms in Stroke Injury. 2012:629-31.
31. Lozano D, Gonzales-Portillo GS, Acosta S, de la Pena I, Tajiri N, Kaneko Y, et al. Neuroinflammatory responses to traumatic brain injury: etiology, clinical consequences, and therapeutic opportunities. *Neuropsychiatric disease and treatment*. 2015;11:97-106.
32. Hanrahan F CM. Neuroinflammation. *Translational Research in Traumatic Brain Injury*. CRC Press/Taylor and Francis Group; 2016.:Chapter 6.
33. Nayak D, Roth TL, McGavern DB. Microglia development and function. *Annual review of immunology*. 2014;32:367-402.
34. Liddelow SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*. 2017;541(7638):481-7.
35. Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiological reviews*. 2011;91(2):461-553.
36. Morganti JM, Riparip LK, Rosi S. Call Off the Dog(ma): M1/M2 Polarization Is Concurrent following Traumatic Brain Injury. *PloS one*. 2016;11(1):e0148001.
37. Bergold PJ. Treatment of traumatic brain injury with anti-inflammatory drugs. *Experimental neurology*. 2016;275 Pt 3:367-80.

38. Elorza-Vidal X, Gaitan-Penas H, Estevez R. Chloride Channels in Astrocytes: Structure, Roles in Brain Homeostasis and Implications in Disease. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(5).
39. Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature reviews Neuroscience*. 2006;7(1):41-53.
40. Pfeiffer-Guglielmi B, Fleckenstein B, Jung G, Hamprecht B. Immunocytochemical localization of glycogen phosphorylase isozymes in rat nervous tissues by using isozyme-specific antibodies. *Journal of neurochemistry*. 2003;85(1):73-81.
41. Jin X, Ishii H, Bai Z, Itokazu T, Yamashita T. Temporal changes in cell marker expression and cellular infiltration in a controlled cortical impact model in adult male C57BL/6 mice. *PloS one*. 2012;7(7):e41892.
42. Karve IP, Taylor JM, Crack PJ. The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury. *British journal of pharmacology*. 2016;173(4):692-702.
43. Chen Y, Swanson RA. Astrocytes and brain injury. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2003;23(2):137-49.
44. Rosenberg PA, Aizenman E. Hundred-fold increase in neuronal vulnerability to glutamate toxicity in astrocyte-poor cultures of rat cerebral cortex. *Neuroscience letters*. 1989;103(2):162-8.
45. Sheng WS, Hu S, Feng A, Rock RB. Reactive oxygen species from human astrocytes induced functional impairment and oxidative damage. *Neurochemical research*. 2013;38(10):2148-59.
46. Rash JE, Yasumura T, Hudson CS, Agre P, Nielsen S. Direct immunogold labeling of aquaporin-4 in square arrays of astrocyte and ependymocyte plasma membranes in rat brain and spinal cord. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(20):11981-6.
47. Li L, Lundkvist A, Andersson D, Wilhelmsson U, Nagai N, Pardo AC, et al. Protective role of reactive astrocytes in brain ischemia. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2008;28(3):468-81.

48. Kim DJ, Czosnyka Z, Kaspruwicz M, Smielewski P, Baledent O, Guerguerian AM, et al. Continuous monitoring of the Monro-Kellie doctrine: is it possible? *Journal of neurotrauma*. 2012;29(7):1354-63.
49. K. J. Bühling JL, K. Witt. *Intensivkurs Allgemeine und spezielle Pathologie*: Urban & Fischer; 2008. S.343-344.
50. Schirmer M. *Neurochirurgie*: Elsevier Urban & Fischer; 2005. S.364-365
51. Nadal A, Fuentes E, Pastor J, McNaughton PA. Plasma albumin is a potent trigger of calcium signals and DNA synthesis in astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(5):1426-30.
52. Hawkins BT, Davis TP. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacological reviews*. 2005;57(2):173-85.
53. Pardridge WM, Oldendorf WH. Kinetics of blood-brain transport of hexoses. *Biochimica et biophysica acta*. 1975;382(3):377-92.
54. Steiner O, Coisne C, Cecchelli R, Boscacci R, Deutsch U, Engelhardt B, et al. Differential roles for endothelial ICAM-1, ICAM-2, and VCAM-1 in shear-resistant T cell arrest, polarization, and directed crawling on blood-brain barrier endothelium. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2010;185(8):4846-55.
55. Pandey PK, Sharma AK, Gupta U. Blood brain barrier: An overview on strategies in drug delivery, realistic in vitro modeling and in vivo live tracking. *Tissue barriers*. 2016;4(1):e1129476.
56. Keppler D. Multidrug resistance proteins (MRPs, ABCs): importance for pathophysiology and drug therapy. *Handbook of experimental pharmacology*. 2011(201):299-323.
57. Oldendorf WH, Cornford ME, Brown WJ. The large apparent work capability of the blood-brain barrier: a study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat. *Annals of neurology*. 1977;1(5):409-17.
58. Bazzoni G, Dejana E. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiological reviews*. 2004;84(3):869-901.

59. Maiuolo J, Gliozzi M, Musolino V, Scicchitano M, Carresi C, Scarano F, et al. The "Frail" Brain Blood Barrier in Neurodegenerative Diseases: Role of Early Disruption of Endothelial Cell-to-Cell Connections. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(9).
60. Butt AM, Jones HC, Abbott NJ. Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study. *The Journal of physiology*. 1990;429:47-62.
61. Ebnet K, Suzuki A, Ohno S, Vestweber D. Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions? *Journal of cell science*. 2004;117(Pt 1):19-29.
62. Calderon-Garciduenas L, Vojdani A, Blaurock-Busch E, Busch Y, Friedle A, Franco-Lira M, et al. Air pollution and children: neural and tight junction antibodies and combustion metals, the role of barrier breakdown and brain immunity in neurodegeneration. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2015;43(3):1039-58.
63. Noy N. Between death and survival: retinoic acid in regulation of apoptosis. *Annual review of nutrition*. 2010;30:201-17.
64. Petkovich M, Brand NJ, Krust A, Chambon P. A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature*. 1987;330(6147):444-50.
65. Giguere V, Ong ES, Segui P, Evans RM. Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature*. 1987;330(6149):624-9.
66. N.T. Zaveri BJM. Strategy and Drug Research,2.25.6.8 Retinoid Receptor (RAR and RXR) Ligands. *Comprehensive Medicinal Chemistry II*. N.T. Zaveri, B.J. Murphy.
67. Das BC, Thapa P, Karki R, Das S, Mahapatra S, Liu TC, et al. Retinoic acid signaling pathways in development and diseases. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2014;22(2):673-83.
68. Jacobs S, Lie DC, DeCicco KL, Shi Y, DeLuca LM, Gage FH, et al. Retinoic acid is required early during adult neurogenesis in the dentate gyrus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(10):3902-7.
69. Cocco S, Diaz G, Stancampiano R, Diana A, Carta M, Curreli R, et al. Vitamin A deficiency produces spatial learning and memory impairment in rats. *Neuroscience*. 2002;115(2):475-82.
70. Goodman AB, Pardee AB. Evidence for defective retinoid transport and function in late onset Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(5):2901-5.

71. Eichele G. Retinoids: from hindbrain patterning to Parkinson disease. *Trends in genetics : TIG*. 1997;13(9):343-5.
72. Goodman AB. Retinoid dysregulation as a cause of schizophrenia. *The American journal of psychiatry*. 1994;151(3):452-3.
73. Carmen Avendaño JCM. Anticancer Drugs That Inhibit Hormone Action. *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*. 2008:Pages 53-91.
74. Li L, Li Y, Ji X, Zhang B, Wei H, Luo Y. The effects of retinoic acid on the expression of neurogranin after experimental cerebral ischemia. *Brain research*. 2008;1226:234-40.
75. Crockett S, Clarke M, Reeves S, Sims B. Cystine glutamate exchanger upregulation by retinoic acid induces neuroprotection in neural stem cells. *Neuroreport*. 2011;22(12):598-602.
76. Goncalves MB, Wu Y, Trigo D, Clarke E, Malmqvist T, Grist J, et al. Retinoic acid synthesis by NG2 expressing cells promotes a permissive environment for axonal outgrowth. *Neurobiology of disease*. 2018;111:70-9.
77. Dmetrichuk JM, Carlone RL, Spencer GE. Retinoic acid induces neurite outgrowth and growth cone turning in invertebrate neurons. *Developmental biology*. 2006;294(1):39-49.
78. Goncalves MB, Malmqvist T, Clarke E, Hubens CJ, Grist J, Hobbs C, et al. Neuronal RARbeta Signaling Modulates PTEN Activity Directly in Neurons and via Exosome Transfer in Astrocytes to Prevent Glial Scar Formation and Induce Spinal Cord Regeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2015;35(47):15731-45.
79. Kong L, Wang Y, Wang XJ, Wang XT, Zhao Y, Wang LM, et al. Retinoic acid ameliorates blood-brain barrier disruption following ischemic stroke in rats. *Pharmacological research*. 2015;99:125-36.
80. Kiran S. Panickar HDD. Acute effects of All-trans-retinoic Acid in ischemic injury *Translational Neuroscience*. 2012.
81. Gollnick HP, Krautheim A. Topical treatment in acne: current status and future aspects. *Dermatology (Basel, Switzerland)*. 2003;206(1):29-36.

82. Hamm RJ, Pike BR, O'Dell DM, Lyeth BG, Jenkins LW. The rotarod test: an evaluation of its effectiveness in assessing motor deficits following traumatic brain injury. *Journal of neurotrauma*. 1994;11(2):187-96.
83. Shiotsuki H, Yoshimi K, Shimo Y, Funayama M, Takamatsu Y, Ikeda K, et al. A rotarod test for evaluation of motor skill learning. *Journal of neuroscience methods*. 2010;189(2):180-5.
84. Osier N, Dixon CE. The Controlled Cortical Impact Model of Experimental Brain Trauma: Overview, Research Applications, and Protocol. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2016;1462:177-92.
85. Marklund N. Rodent Models of Traumatic Brain Injury: Methods and Challenges. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2016;1462:29-46.
86. Onyszchuk G, Al-Hafez B, He YY, Bilgen M, Berman NE, Brooks WM. A mouse model of sensorimotor controlled cortical impact: characterization using longitudinal magnetic resonance imaging, behavioral assessments and histology. *Journal of neuroscience methods*. 2007;160(2):187-96.
87. Shapira Y, Setton D, Artru AA, Shohami E. Blood-brain barrier permeability, cerebral edema, and neurologic function after closed head injury in rats. *Anesthesia and analgesia*. 1993;77(1):141-8.
88. Brooks SP, Dunnett SB. Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. *Nature reviews Neuroscience*. 2009;10(7):519-29.
89. Scholz J, Niibori Y, P WF, J PL. Rotarod training in mice is associated with changes in brain structure observable with multimodal MRI. *NeuroImage*. 2015;107:182-9.
90. Bigler ED. Neuroinflammation and the dynamic lesion in traumatic brain injury. *Brain : a journal of neurology*. 2013;136(Pt 1):9-11.
91. Zhang YP, Cai J, Shields LB, Liu N, Xu XM, Shields CB. Traumatic brain injury using mouse models. *Translational stroke research*. 2014;5(4):454-71.
92. Dheen ST, Jun Y, Yan Z, Tay SS, Ling EA. Retinoic acid inhibits expression of TNF-alpha and iNOS in activated rat microglia. *Glia*. 2005;50(1):21-31.

8. Anhang

Tabelle 10: SHT erweitert nach DIMDI (12)

S06	Intrakranielle Verletzung
S06.0	Gehirnerschütterung
S06.00	Gehirnerschütterung
S06.01	Bewusstlosigkeit, Dauer nicht näher bezeichnet
S06.02	Kurze Bewusstlosigkeit [weniger als 30 Minuten]
S06.03	Mittellange Bewusstlosigkeit [30 Minuten bis 24 Stunden]
S06.04	Lange Bewusstlosigkeit [mehr als 24 Stunden] mit Rückkehr zum vorher bestehenden Bewusstseinsgrad
S06.05	Lange Bewusstlosigkeit [mehr als 24 Stunden] ohne Rückkehr zum vorher bestehenden Bewusstseinsgrad
S06.1	Traumatisches Hirnödem
S06.2	Diffuse Hirnverletzung
S06.20	Diffuse Hirn- und Kleinhirnverletzung, nicht näher bezeichnet
S06.21	Diffuse Hirnkontusionen
S06.22	Diffuse Kleinhirnkontusionen
S06.23	Multiple intrazerebrale und zerebellare Hämatome
S06.28	Sonstige diffuse Hirn- und Kleinhirnverletzungen
S06.3	Umschriebene Hirnverletzung
S06.30	Umschriebene Hirn- und Kleinhirnverletzung, nicht näher bezeichnet
S06.31	Umschriebene Hirnkontusion
S06.32	Umschriebene Kleinhirnkontusion
S06.33	Umschriebenes zerebrales Hämatom
S06.34	Umschriebenes zerebellares Hämatom
S06.38	Sonstige umschriebene Hirn- und Kleinhirnverletzungen
S06.4	Epidurale Blutung
S06.5	Traumatische subdurale Blutung
S06.6	Traumatische subarachnoidale Blutung
S06.8	Sonstige intrakranielle Verletzungen
S06.9	Intrakranielle Verletzung, nicht näher bezeichnet

9. Danksagung

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater für die Überlassung des Themas und die Unterstützung meiner Promotion in seiner Arbeitsgruppe danken. Er stand während jeder Phase für alle Fragen mit seinem Fachwissen zur Verfügung. Herzlichen Dank für die unkomplizierte und angenehme Art der Anleitung in einem für mich neuen Gebiet.

Besonders danken möchte ich auch meiner Betreuerin für ihren Rat, die Anleitung bei den Versuchen und die Unterstützung während der kompletten Entstehungsphase dieser Dissertation.

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Schule

Auslandsaufenthalt

Ausbildung

Berufliche Tätigkeit

Studium

Famulaturen

Praktisches Jahr

Ärztliche Tätigkeit

Dissertation

Seit 2016

Klinik für Anästhesiologie

Thema: „Untersuchung neuroprotektiver

Effekte repetitiver Gaben von all-trans-Retinsäure nach

experimentellem Schädel-Hirn-Trauma“