

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

Auswirkungen der intrazerebroventrikulären Injektion von all-trans-Retinsäure im
akuten experimentellen Schädel-Hirn-Trauma

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

Vorgelegt von

Alesya Kuryanovych
Aus Magdeburg

Mainz, 2021

Tag der Promotion:

12. Juli 2022

Widmung

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

WIDMUNG	III
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VIII
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	XI
TABELLENVERZEICHNIS	XII
1 EINLEITUNG.....	1
2 LITERATURDISKUSSION	3
2.1 Definition und Einteilung des Schädel-Hirn-Trauma.....	3
2.2 Zentrales Nervensystem	4
2.2.1 Makroskopische Anatomie.....	4
2.2.2 Mikroanatomie	6
2.2.2.1 Neuroglia	7
2.2.2.2 Blut-Hirn-Schranke	8
2.3 Pathophysiologie des SHT	8
2.3.1 Blut-Hirn-Schranken-Störung.....	10
2.3.2 Neuroinflammation.....	11
2.3.3 Apoptose.....	13
2.3.4 weitere Biomarker	18
2.4 Schädel-Hirn-Trauma-Modell	20
2.5 Dimethylsulfoxid (DMSO).....	21
2.6 All-trans-Retinsäure	21
3 MATERIALIEN	25
3.1 Verbrauchsmaterial	25
3.2 Chemikalien	26
3.3 Kits.....	27
3.4 Antikörper.....	28
3.5 Pharmaka.....	28
3.6 Geräte.....	28

3.7 Lösungen	30
3.8 Primer.....	31
3.9 Software	32
4 METHODEN.....	33
4.1 Tierversuche	33
4.1.1 Tiere.....	33
4.1.2 Haltung.....	33
4.1.3 Studiendesign	34
4.1.4 Operationsdurchführung	35
4.1.4.1 Anästhesie	35
4.1.4.2 Controlled Cortical Impact	35
4.1.4.3 Sham	37
4.1.5 Euthanasie und Gewebeentnahme	37
4.2. Auswertung des Schädel-Hirn-Traumas.....	38
4.2.1 neurologische Verhaltensuntersuchung.....	38
4.2.1.1 Rotarod.....	38
4.2.1.2 Neuroscore	39
4.2.2 Histologie	41
4.2.2.1 Kryosektion.....	41
4.2.2.2 Nissl-Färbung	42
4.2.2.3 IgG-Färbung	42
4.2.2.4 Volumetrie	44
4.2.3 Molekularbiologische Untersuchung	45
4.2.3.1 Ribonukleinsäure-Extraktion.....	45
4.2.3.2 cDNA-Synthese	46
4.2.3.3 Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion.....	46
4.2.4 Proteinanalyse	48
4.2.4.1 Proteinextraktion.....	48
4.2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration	48
4.2.4.3 IgG-Dot Blot.....	49
4.2.4.4 Gelelektrophorese	49
4.2.4.5 Westernblot	51
4.3 Statistische Auswertung.....	52

5	ERGEBNISSE	53
5.1	Gewichtsverlust und neurologische Verhaltensuntersuchung	53
5.1.1	Gewichtsentwicklung	53
5.1.2	Rotarod	54
5.1.3	Neuroscore	55
5.2	Histologische Untersuchungen	56
5.2.1	Volumetrie	56
5.2.2	IgG-Färbung.....	57
5.3	PCR	58
5.3.1	TNF- α	58
5.3.2	IL-1 β	59
5.3.3	GFAP	59
5.3.4	Iba1	60
5.3.5	Caspase-3.....	61
5.3.6	Bax.....	62
5.3.7	BAG1	62
5.3.8	BAG3	63
5.3.9	Hsp- β 1	64
5.4	Proteinanalyse	65
5.4.1	Dot Bot – Immunglobulin G	65
5.4.2	Spektrin Westernblot.....	66
6	DISKUSSION	68
6.1	Gewicht.....	68
6.2	Neurobiologisches Verhalten	69
6.3	Experimentelles SHT-Modell und Übertragbarkeit in die Klinik	70
6.4	Einfluss von ATRA auf die Neuroinflammation.....	72
6.5	Einfluss von ATRA auf die Apoptose	75
6.6	Limitationen der Studie und Aussicht	79
7	ZUSAMMENFASSUNG.....	83
8	LITERATURVERZEICHNIS	85

DANKSAGUNG	101
LEBENS LAUF	102

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
%	Prozent
°C	Grad
μ-	Mikro-
A	Gesamtfläche
Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
ATRA	<i>All-trans-Retinsäure</i>
Bad	<i>Bcl-associated death protein</i>
BAG	<i>Bcl-2-associated-athano-gene</i>
Bax	<i>Bcl-2-associated-X-Protein</i>
Bcl2	<i>B-Cell-Lymphoma-2</i>
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BSA	Bovines Serumalbumin
bspw.	beispielsweise
c-	Zenti-
ca.	circa
CCI	<i>Controlled-Cortical-Impact</i>
cDNA	komplementäre DNA
CRABP	<i>Cellular retinoic acid binding protein</i>
CRBP	<i>Cellular retinol binding protein</i>
d	Tag
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
Fas	<i>First-apoptosis-signal</i>
g	Gramm
<i>g</i>	Ortsfaktor (9,81 m/s ²)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
gDNA	genomische DNA

GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
h	Stunde
Hsp	Hitzeschockprotein
Hz	Hertz
i.c.v.	intrazerebroventrikulär
Iba1	ionisierte Calcium-bindende Adaptermolekül 1
Ig	Immunglobulin
IL-1 β	Interleukin-1 β
k-	Kilo-
l	Liter
m	Meter
m-	Milli-
min	Minute
mind.	mindestens
M	Mol
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
n-	Nano-
PARP-1	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PPIA	Peptidylprolylisomerase A
qRT-PCR	<i>Quantitative Real-Time</i> Polymerasekettenreaktion
RA	<i>Retinoic Acid</i>
RAR	<i>Retinoic acid receptor</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
rpm	<i>Rounds per minute</i>
RXR	<i>Retinoid X receptor</i>
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler
Sham	<i>Sham operated</i>
SHT	Schädel-Hirn-Trauma
sog.	sogenannt

Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBST	TBS + Tween 20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
u. a.	unter anderem
V	Kontusionsvolumen
Vol.-%	Volumenprozent
vs.	<i>versus</i>
z. B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1 Zeitlicher Verlauf der Pathophysiologie im Rahmen des Sekundärschadens.....	9
Abb. 4.1 Timeline des Studiendesigns	34
Abb. 4.2 Controlled Cortical Impact.....	37
Abb. 4.3 Rotarod-Versuchsaufbau	39
Abb. 4.4 Nissl-Färbung, Maushirn in coronarer Schnittführung.....	44
Abb. 5.1 Gewichtsverlust in Prozent 24 h nach dem CCI-/Shameingriff.....	53
Abb. 5.2 Zeit bis zum Sturz, Vergleich der Mittelwerte prä- und postoperativ	54
Abb. 5.3 Zeit bis zum Sturz, Differenz der Mittelwerte prä- und postoperativ	55
Abb. 5.4 Neuroscore zum Zeitpunkt 24 h nach dem Eingriff	56
Abb. 5.5 Kontusionsvolumen in mm ³	56
Abb. 5.6 IgG-positiver Bereich beider Hemisphären 24 h nach dem CCI.....	57
Abb. 5.7 repräsentative Auswahl immunhistochemisch gefärbter Schnitte	57
Abb. 5.8 TNF- α -Expression.....	58
Abb. 5.9 IL-1 β -Expression.....	59
Abb. 5.10 GFAP-Expression	60
Abb. 5.11 Iba1-Expression	61
Abb. 5.12 Caspase-3-Expression.....	61
Abb. 5.13 Bax-Expression	62
Abb. 5.14 BAG1-Expression.....	63
Abb. 5.15 BAG3-Expression.....	64
Abb. 5.16 Hsp- β 1-Expression	65
Abb. 5.17 IgG-Dot blot.....	66
Abb. 5.18 Auswertung des Westernblots von α -II-Spektrin	67
Abb. 5.19 Westernblot mit Spektrinspaltprodukten und GAPDH	67

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1 Glasgow Coma Scale	3
Tab. 3.1 Materialliste Verbrauchsmaterialien	25
Tab. 3.2 Materialliste Chemikalien	26
Tab. 3.3 Materialliste Kits	27
Tab. 3.4 Materialliste Antikörper	28
Tab. 3.5 Materialliste Pharmaka	28
Tab. 3.6 Materialliste Geräte	28
Tab. 3.7 Materialliste Lösungen	30
Tab. 3.8 Materialliste Primer	31
Tab. 3.9 Materialliste Software	32
Tab. 4.1 Versuchsgruppen	34
Tab. 4.2 Neuroscore Punktebewertung	40
Tab. 4.3 Pipettierschema für qRT-PCR	48
Tab. 4.4 Rezeptur zur Herstellung der Acrylamidgele	50

1 Einleitung

Das Schädel-Hirn-Trauma (SHT) zählt zu den häufigsten Todesursachen in Europa und Deutschland (Sundstrøm et al., 2007; Statistisches Bundesamt 2019). Weltweit stellt es vor allem in der Altersgruppe von 29 bis 45 Jahren eine der Hauptgründe für Tod und erworbene Behinderung dar. Aufgrund des demographischen Wandels hat sich das Durchschnittsalter von Patienten mit SHT in den letzten Dekaden kontinuierlich erhöht und liegt aktuell in Deutschland bei 60 Jahren (Maegele et al., 2019). Insgesamt sind Stürze aus niedriger Höhe < 3 m die häufigste Ursache für ein SHT, was vor allem im Rahmen von häuslichen Sturzereignissen die ältere Patientengruppe betrifft. In dieser Gruppe liegt das Durchschnittsalter bei 75 Jahren (Maegele et al., 2019). Bei den jüngeren Patienten bleiben die Verkehrsunfälle und Stürze aus Höhen > 3 m führend. Damit hat das SHT medizinisch und sozioökonomisch eine hohe Relevanz im aktuellen Zeitgeschehen sowohl in Europa als auch weltweit (Karthigeyan et al., 2021; Peeters et al., 2015).

Die Pathophysiologie des Traumas ist komplex und multifaktoriell. Sie variiert je nach Ort, Schwere und Art des Schadens. Interindividuell können sich dabei bei vergleichbarem Schädigungsmuster unterschiedliche Verletzungsfolgen zeigen (Yue et al., 2013). Die Pathologie setzt sich aus dem Primär- und Sekundärschaden zusammen. Der Primärschaden entsteht durch direkte mechanische Zerstörung des Gewebes und ist pathophysiologisch vor allem durch die Nekrose gekennzeichnet (Newcomb et al., 1997). Der Sekundärschaden entwickelt sich innerhalb von Stunden, Tagen, Wochen oder gar Monaten als komplexe Reaktion des Organismus auf die Primärverletzung und besteht aus einer Reihe pathologischer Prozesse, die letzten Endes zu weiterem Zell- und Funktionsverlust im umliegenden Gewebe führen (Nikolian et al., 2018). Während man auf das Ausmaß des Primärschadens nur durch präventive Maßnahmen Einfluss nehmen kann, bieten die nachgeschalteten biochemischen und molekularen Prozesse Angriffspunkte für mögliche Interventionen. Die Ausdehnung des Sekundärschadens hängt nicht zuletzt von der Vulnerabilität der verschiedenen Zellarten ab.

Patienten mit zunächst vermeintlich gutem Outcome haben Jahrzehnte später mit den Langzeitfolgen wie Schlafstörungen, psychischen Erkrankungen und chronischen Schmerzen zu kämpfen. Das SHT gilt ebenfalls als ein Risikofaktor für neurodegenerative Erkrankungen wie Parkinson und Alzheimer. Es kann also chronisch

und fortschreitend verlaufen. Dieser Umstand verdeutlicht den mehrphasigen Verlauf des Sekundärschadens und die große soziökonomische Bedeutung des SHT (Johnson et al., 2013). Deshalb werden in der Therapie des SHTs, der Komplexität des Sekundärschadens geschuldet, multifunktionale Ansätze benötigt.

All-trans-Retinsäure (ATRA, auch Tretinoin genannt) ist ein Abkömmling des fettlöslichen Vitamins A (Retinol). Retinol wird im Körper zu *Retinoic Acid* (RA, deutsch: Retinsäure) verstoffwechselt und existiert in mehreren Stereoisomeren, von denen das ATRA als biologisch aktive Form des Vitamin A gilt (Sato et al., 2008). ATRA ist ein pleiotropes Molekül, das an zahlreichen physiologischen und pathologischen Prozessen im Organismus beteiligt ist. Sie nimmt regulatorischen Einfluss auf Zelldifferenzierung, -proliferation und Apoptose und ist an der Physiologie des Sehens, des Immunsystems und der Spermatogenese beteiligt (Chu et al., 2015; Kampmann et al., 2008; Sakamoto et al., 2010). RA-gesteuerte Signalwege spielen eine essenzielle Rolle in der Embryonalentwicklung des ZNS und der Neurogenese. Mit der Fähigkeit die Neurogenese zu induzieren kann ATRA einen positiven Effekt auf die nach einem Schaden nachgeschalteten Reparaturvorgänge haben (Jung et al., 2007). Als Immunmodulator hat ATRA Einfluss auf die Integrität der Blut-Hirn-Schranke (BHS) und reduziert die reaktive Mikrogliaaktivierung. Beides sind Vorgänge, die im Rahmen des Sekundärschadens auftreten und zur letztendlichen Schadensgröße beitragen (Hummel et al., 2020; Kong et al., 2015; Schrage et al., 2006).

Die vorliegende Studie untersucht einen möglichen neuroprotektiven Effekt von *all-trans*-Retinsäure im tierexperimentellen Mausmodell eines SHT. Dazu erfolgte eine intrazerebroventrikuläre und prätraumatische Applikation von ATRA. Die Auswirkung auf den Sekundärschaden wird 24 Stunden (h) nach dem Trauma untersucht. Dazu werden prä mortal zunächst verhaltens-biologische Tests an den Tieren durchgeführt, um im Anschluss Gewebe für die histologischen, biochemischen und molekularbiologischen Verfahren zu gewinnen. Die durchgeführten Analysen sollen Erkenntnisse zum möglichen Therapieansatz mit ATRA im Rahmen eines SHT liefern.

2 Literaturdiskussion

2.1 Definition und Einteilung des SHT

Das SHT ist definiert als ein vielschichtiger pathophysiologischer Vorgang, der als Folge einer externen mechanischen Krafteinwirkung auftritt und eine Funktionsstörung des Zerebrums hervorruft (Menon et al., 2010). Die Einteilung erfolgt nach offenem und geschlossenem SHT. Das offene SHT ist gekennzeichnet durch die simultane Eröffnung des Schädelknochens und der *Dura mater* (Firsching et al., 2015). Diese Verletzungen sind in der Regel durch eine besondere Schwere der Symptomatik und einem schlechten Outcome vergesellschaftet (Pavlovic et al., 2019).

Im klinischen Alltag erfolgt die Bewertung der Schwere des SHT meist nach der *Glasgow Coma Scale*. Dabei werden die Kriterien „Augen öffnen“, „verbale Kommunikation“ und „motorische Reaktion“ entsprechend der aufgetretenen Defizite einzeln mit einem absteigenden Punktesystem von 6 bis 1 bewertet und anschließend zusammenaddiert. Ein gesunder Patient erreicht 15 Punkte (siehe Tab. 2.1). Je schwerer die Vigilanzminderung, desto geringer die Punktesumme. Die Einteilung erfolgt anhand der Punktzahl in ein leichtes, mittelschweres und schweres SHT (Teasdale und Jennett, 1974).

Tab. 2.1: Glasgow Coma Scale

Punkte	Augen öffnen	Verbale Kommunikation	Motorische Reaktion
6			befolgt Aufforderung
5		voll orientiert	gezielte Schmerzabwehr
4	spontan	desorientiert	ungezielte Schmerzabwehr
3	auf Ansprache	unzusammenhängende Worte	Beugesynergismen
2	auf Schmerz	unzusammenhängende Laute	Streckesynergismen
1	keine Reaktion	keine Reaktion	keine Reaktion

2.2 Zentrales Nervensystem

2.2.1 Makroskopische Anatomie

Das Nervensystem lässt sich topographisch unabhängig von der Funktion in ein zentrales Nervensystem (ZNS) und ein peripheres Nervensystem einteilen. Das Gehirn und das Rückenmark, die das ZNS bilden, liegen in knöchernen Hüllen, der Schädelhöhle und dem Wirbelkanal, und sind von Meningen (Hirnhäuten) vollständig umhüllt. Die Hirn- und Rückenmarkshäute sind dreigeschichtet und wie folgt von innen nach außen aufgebaut: Die *Pia mater* (weiche Hirnhaut), die *Arachnoidea mater* (Spinnwebhaut) und die *Dura mater* (harte Hirnhaut). Die *Pia mater* liegt dem ZNS direkt auf. Sie wird durch den Subarachnoidalraum, von der *Arachnoidea mater* getrennt. Der Subarachnoidalraum ist mit *Liquor cerebrospinalis* gefüllt und bildet den sog. äußeren Liquorraum. Die *Dura mater* liegt dem Schädelknochen direkt an und bildet gleichzeitig das innere Periost der Schädelknochen. Im Wirbelkanal liegt zusätzlich zwischen der Dura und dem Periost der Epiduralraum. Strukturell und makroskopisch lässt sich das Nervensystem in weiße und graue Substanz gliedern. Dabei stellt die Graue Substanz eine Ansammlung von Nervenzellkörpern (Perikaryon) dar und die weiße Substanz wird hauptsächlich aus den myelinisierten Axonen gebildet (Schünke, 2006).

Das *Encephalon* (Gehirn) umfasst drei große Teile. Das Rhombencephalon bestehend aus *Medulla oblongata* (verlängertes Mark), *Pons* (Brücke) und *Cerebellum* (Kleinhirn). Das *Mesencephalon* (Mittelhirn), bildet zusammen mit dem *Rhombencephalon* den *Truncus encephali* (Hirnstamm). Das *Prosencephalon* (Vorderhirn) besteht aus *Telencephalon* (Endhirn) sowie dem *Diencephalon* (Zwischenhirn). *Medulla oblongata* ist Ort der Kontrolle von Kreislauf und Atmung. Der *Pons* enthält viele Hirnnervenkerne und ist eine Art Durchgangsstation für die Pyramidenbahn, die absteigende Neurone des Motokortex in die Peripherie führt. Das Kleinhirn ist bedeutend für die Feinabstimmung der Motorik und das Gleichgewicht. Die Hauptbestandteile des *Diencephalon* sind der *Thalamus* und der *Hypothalamus*. Der *Thalamus* ist die wichtigste Schaltstation von Sinnesbahnen, bevor sie durch kortikale Verarbeitung im *Telencephalon* bewusst wahrgenommen werden. Der *Hypothalamus* ist ein Kerngebiet, das ein übergeordnetes Zentrum für alle vegetativen Funktionen im Körper darstellt (Aumüller, 2010).

Das *Telencephalon* hat als komplexester Teil des ZNS multiple Funktionen, darunter

alle höheren kognitiven Fähigkeiten wie Bewusstsein, Emotionen, Kommunikationsfähigkeit, Gedächtnis und Durchführung von komplexen Bewegungen. Morphologisch unterteilt sich das Großhirn in zwei Hemisphären, die durch die *Fissura longitudinalis cerebri* (Längsfurche) unvollständig getrennt sind. Beim Menschen richtet sich die weitere grobe Gliederung nach den tiefen *Sulci* (Furchen), die die einzelnen *Lobi* (Lappen) voneinander trennen. Der menschliche Kortex lässt sich in sechs Lappen unterteilen, von denen vier sichtbar liegen und zwei, die *Lobi insularis* (Insellappen) und *limbicus* (Randlappen), erst zum Vorschein kommen, wenn man die umliegenden Hirnteile verdrängt. Der *Lobus frontalis* (Frontallappen) ist das kognitive und motorische Zentrum. Hier werden das Bewusstsein gebildet und Emotionen kontrolliert und hier befindet sich auch der primäre und sekundäre motorische Kortex, der der neuronale Programmgeber für komplexe Bewegungsabfolgen inklusive der Sprachbildung ist. Der *Lobus parietalis* (Scheitellappen) dient der somatosensorischen Informationsverarbeitung. Im primären und sekundären visuellen Kortex werden visuelle Reize abgebildet und verarbeitet. Diese befinden sich im *Lobus occipitalis* (Hinterhauptslappen). Im *Lobus temporalis* (Schläfenlappen) befindet sich der primäre und sekundäre auditorische Kortex, der auch das sensorische Sprachzentrum beinhaltet. So wie das ganze ZNS baut sich das Großhirn aus grauer und weißer Substanz auf. Der *Cortex* (Rinde) bestehend aus grauer Substanz bildet die gesamte äußere Oberfläche. Darunter liegt die weiße Substanz *Medulla* (Mark), in die die Basalkerne, eine isolierte innen liegende Ansammlung von Nervenzellkörpern, eingebettet sind (Aumüller, 2010; Schünke, 2006).

Die Neuroanatomie der Maus ist wie bei allen Säugetieren identisch mit dem oben beschriebenen Grundaufbau des ZNS. Wie auch bei anderen Nagern ist das Maushirn lissenzephal. Das bedeutet, dass im Gegensatz zu Primaten die Gehirnoberfläche weder *Sulci* noch *Gyri* aufweist. Wie beim Menschen kann man den Kortex in Rindfelder (*Areae*) unterteilen, die bestimmten Funktionen zugeordnet werden können. Die Einteilung der Areale basiert auf der histologischen Zytoarchitektur des Kortex und wurde bereits 1909 von Brodmann für das menschliche Gehirn erstellt (Brodmann, 1909). Im Rahmen dieser Arbeit wurde den Tieren der Schaden im Bereich des motorischen Systems gesetzt. Dieses besteht aus absteigenden Bahnen, die Befehle von den motorischen Kortexarealen zu den Motoneuronen im Hirnstamm und Rückenmark leiten, die wiederum die Signale an die Muskulatur in der Peripherie weitergeben. Dabei sind eine Reihe Rückkopplungskreise, das Kleinhirn und die Basalganglien modulierend beteiligt. Bevor die Informa-

tion am Muskel ankommt kreuzen die motorischen Bahnen zu 80 % auf Höhe der *Medulla oblongata* und die restlichen 20 % auf Höhe des Rückenmarks auf die kontralaterale Seite, sodass der bei den Versuchstieren erwartete neurologische Ausfall auf der kontralateralen Seite zu finden ist (Schröder et al., 2020).

2.2.2 Mikroanatomie

Das Neuron (Nervenzelle) ist die kleinste funktionelle Einheit im Nervensystem und dient der Erregungsbildung, Informationsweiterleitung und -verarbeitung. Der polare Aufbau des Neurons lässt sich in folgende Segmente gliedern: lange Zellfortsätze sog. Dendriten dienen der Signalaufnahme. Die Informationen aus den Dendriten werden dann weiter an das Perikaryon, das ebenfalls zur Reizaufnahme fähig ist, weitergeleitet und dort verarbeitet. Über das Axon, einem singulären Zellfortsatz, der als Überleitungssegment dient und an seinem Ende meist verzweigt ist, wird die Erregung an die nächste Nervenzelle bzw. das Effektororgan über den sog. *Bouton* (Endkolben) weitergeleitet. Die Synapse ist eine weitere wichtige Baueinheit im Nervensystem, über die die Kommunikation zwischen zwei Neuronen möglich ist. Dabei bildet der Kolben des ersten Neurons die präsynaptische Membran, die durch den synaptischen Spalt von der postsynaptischen Membran, die von der nachgeschalteten zweiten Nervenzelle gebildet wird, getrennt (Batoool et al., 2019; Schmidt et al., 2007).

Kommt eine Erregung an der postsynaptischen Membran an, werden dort transmittergesteuerte Ionenkanäle geöffnet und der Ioneneinstrom bewirkt eine Membranpotentialänderung. An einem Neuron kommen gleichzeitig sowohl exzitatorische als auch inhibitorische Neurotransmitter an. Die exzitatorischen binden an Rezeptoren, die daraufhin das Membranpotential heben. Die inhibitorischen Transmitter dagegen senken es. Am Axonhügel werden die ankommenden Potentiale gegeneinander verrechnet und bei einem ausreichend hohen Membranpotential wird ein Aktionspotential generiert, das nach dem Alles-oder-nichts-Gesetz über spannungsgesteuerte Ionenkanäle bis zum Endkolben weitergeleitet wird. An der präsynaptischen Membran erfolgt dann spannungsabhängig die Transmitterfreisetzung in den synaptischen Spalt. Die Neurotransmitter diffundieren durch den Spalt und docken an den Rezeptoren der postsynaptischen Membran an (Lüllmann-Rauch und Paulsen, 2012; Raghavan et al., 2019).

2.2.2.1 Neuroglia

Als Informationsübertragungsspezialisten sind Neurone auf die Unterstützung anderer Zellen angewiesen. Deshalb sind Neurone in ein dichtes Netz aus Gliazellen eingebettet, sodass sich im ZNS fast keine extrazelluläre Matrix befindet. Konstanthaltung des Mikromilieus, Immunabwehr, Bildung der Myelinscheide und Produktion u. a. von Wachstumsfaktoren werden von der Neuroglia übernommen, zu der die Oligodendrozyten, Astrozyten und die Mikroglia gehören. Dabei teilen sie die verschiedenen Aufgaben untereinander auf.

Oligodendrozyten bilden Plasmamembranausläufer, die sich in mehreren Schichten um ein Axon wickeln und so die elektrisch isolierende Myelinscheide des Axons bilden. Im peripheren Nervensystem bilden die Schwann-Zellen das Korrelat zu den Oligodendrozyten. Überall, wo eine schnelle Informationsweiterleitung notwendig ist, besitzt das Axon eine Myelinscheide (Kuhn et al., 2019).

Astrozyten, auch Makroglia genannt, haben multiple Funktionen. Sie besitzen ein für Astrozyten spezifisches Protein, das *Glial fibrillary acidic protein* (GFAP, deutsch: saures Gliafaserprotein), aus dem Intermediärfilamente im Zytoplasma gebildet werden, womit die Astrozyten dem Nervengewebe mechanische Stabilität verleihen (siehe auch Abschnitt 2.3.4). Darüber hinaus kontrollieren die Astrozyten die ionische und chemische Zusammensetzung des Extrazellulärraums. Sie produzieren eine Reihe neurotropher Faktoren, die für die Differenzierung und das Überleben von Neuronen essenziell sind. Astrozyten beugen Exzitotoxizität vor, indem sie überschüssige Neurotransmitter aus dem synaptischen Spalt inaktivieren und entsorgen. Vor allem die Neurotransmitter Glutamat und die γ -Aminobuttersäure wirken in hohen Dosen neurotoxisch (reviewed in Karve et al., 2016). Wenn Reparaturvorgänge im ZNS nicht mehr möglich sind, wird dann im betroffenen Gebiet eine astrogliale Narbe gebildet. Weiter sind Astrozyten in der Lage alte, nicht mehr benötigte Synapsen abzubauen und sind somit auch indirekt am Lernprozess beteiligt (reviewed in Yang und Wang, 2015).

Mikrogliazellen werden ebenfalls in die Reihe der Neuroglia gezählt und sind die Makrophagen des Gehirns. Als solche sind sie ein Teil des mononukleären Phagozytensystems. Sie sind auf Phagozytose und Antigenpräsentation spezialisiert und können so wie die peripheren Immunzellen Zytokine und Wachstumsfaktoren sezernieren (siehe auch Abschnitt 2.3.2) (Gehrmann et al., 1995; Ohsawa et al., 2004).

2.2.2.2 Blut-Hirn-Schranke

Damit das Gehirn optimal arbeiten kann, muss das neuronale Milieu in einem engen Rahmen konstant gehalten werden. Das erfordert einen streng selektierten Austausch von Zellen, Molekülen und Ionen zwischen dem ZNS und dem Blut, dessen Stoffkonzentrationen natürlichen Schwankungen unterliegen. Eine physiologische Besonderheit stellt die BHS dar, die als Barriere das Gehirn vom Rest des Organismus trennt. Die BHS ist eine funktionelle Grenzschicht bestehend aus kontinuierlichem Endothel, Perizyten, Basallamina und dem perikapillär lückenlos angeordneten Besatz von Astrozyten. Anders als jenes Endothel, das je nach Vorkommen im Organismus fenestriert und durchlässig für verschiedene Substanzen ist, ist das Hirnendothel nicht fenestriert und nahezu dicht für Antikörper, Toxine sowie eine Vielzahl von Medikamenten und Blutbestandteilen. Interzellulär sind die Endothelien über apikal angeordnete *Tight Junctions* abgedichtet, sodass ein parazellulärer Stofftransport nicht möglich ist (reviewed in Prakash und Carmichael, 2015). Freien Durchtritt durch die BHS haben nur O₂, CO₂ und andere kleine Gasmoleküle wie Helium, Xenon, N₂ und einige Inhalationsanästhetika. Alle anderen Stoffe können die BHS nur durch aktiven, passiven oder vesikulären Transport passieren, der für alle Substanzen streng reglementiert ist. Lipophile Substanzen können zwar zunächst durch die Lipiddoppelmembran in die Endothelzelle diffundieren, werden aber durch Transporter wieder aus der Zelle entfernt (Wolburg et al., 2009). Perizyten sind perikapillär angeordnete kontraktile Zellen, die u. a. über den Einfluss auf den Kapillarendurchmesser den Blutfluss im Gehirn steuern. Sie bilden um die Endothelzellen lange Ausläufer und fungieren als Stützzellen für die Kapillaren. Darüber hinaus spielen Perizyten eine wichtige Rolle bei der Angiogenese und der embryonalen Entwicklung der BHS (Armulik et al., 2010; Daneman et al., 2010). Die Barrierefunktion der BHS ist dynamisch und ihre selektive Permeabilität kann je nach regulatorischen Einflüssen und den Erfordernissen des Gehirns variieren (reviewed in Serlin et al., 2015).

2.3 Pathophysiologie des SHT

Der Primärschaden kann fokal durch direkte externe Krafteinwirkung oder als Folge eines Beschleunigungstraumas, bei dem die weiche Gehirnmasse gegen die Innenseite der Schädelkalotte prallt, entstehen. Die Kontusion führt zur Zerstörung

von Zellen, der BHS und dadurch zur Freisetzung von intrazellulären Bestandteilen. Der so entstandene Schaden lässt sich nicht beeinflussen und ist auch den Reparaturmechanismen nicht zugänglich (reviewed in Dixon, 2017). Die freigesetzten Botenstoffe lösen eine Kaskade an zellulären und biochemischen Reaktionen im umliegenden Gewebe aus. Diese Vorgänge führen im zeitlichen Verlauf letzten Endes zum weiteren Zelluntergang und damit zum Sekundärschaden (siehe Abb. 2.1). Das Ausmaß der Gesamtschadensgröße wird maßgeblich durch diese nachgeschalteten Vorgänge beeinflusst und gleichzeitig bieten sie auch die Möglichkeit zum therapeutischen Ansatz (reviewed in Bramlett und Dietrich, 2004).

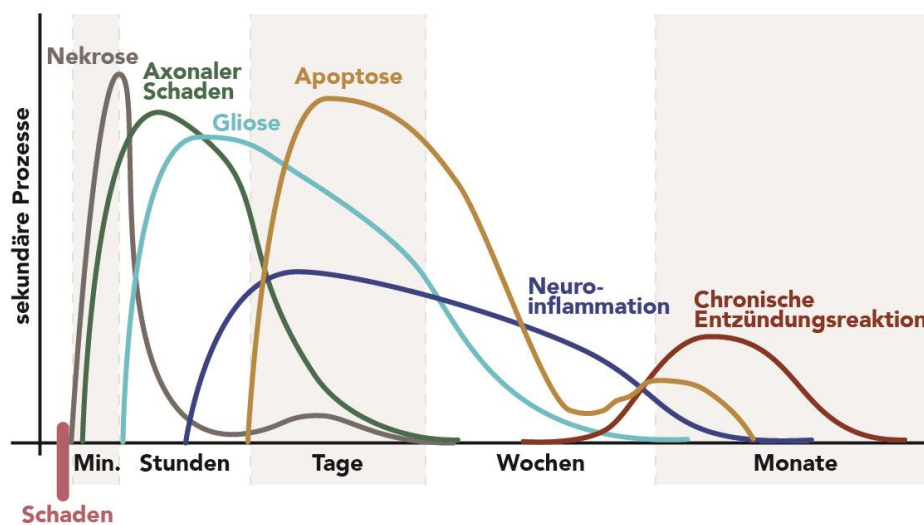


Abb. 2.1: Zeitlicher Verlauf der Pathophysiologie im Rahmen des Sekundärschadens

Bild modifiziert nach (Bramlett und Dietrich, 2015). Graphisch dargestellt ein Überblick über den zeitlichen Ablauf der pathologischen Prozesse nach einem SHT.

Zu den frühesten detektierbaren Veränderungen im Rahmen des multifaktoriellen Sekundärschadens gehören u. a. axonale Schäden, Exzitotoxizität, Veränderungen in den Neurotransmitterkonzentrationen und Permeabilitätsstörung der BHS. Bei den meisten hier genannten Pathologien führen die initiierten Signalwege innerhalb von Stunden und Tagen zur reaktiven Gliose, Neuroinflammation und Apoptose (reviewed in Dash et al., 2010). Darüber hinaus führen die Signalkaskaden zu generalisierten Reaktionen im Organismus wie Hypotension, erhöhter intrakranieller Druck, der mit erniedrigter zerebraler Perfusion einhergeht, Gewebshypoxie, Ischämie, Ödembildung und als Langzeitfolgen nach Jahrzehnten unter anderem zur chronisch traumatischen Enzephalopathie oder zu neurodegenerativen Erkrankungen, womit der mehrphasige Verlauf des Sekundärschadens deutlich wird. (reviewed in Dash et al., 2010; Johnson et al., 2013; Maas et al., 2017). Die im

Nachfolgenden aufgeführten Pathologien, darunter Apoptose, Neuroinflammation und BHS-Störung, wurden ausgewählt und detailliert besprochen, um im Rahmen dieser Arbeit das Ausmaß und die Auswirkungen eines SHT zu untersuchen, wohingegen die anderen Sekundärschädigungsmechanismen nicht weiter ausgeführt werden, da diese nicht untersucht wurden.

2.3.1 Blut-Hirn-Schranken-Störung

Im Rahmen des Primärschadens eines SHT kommt es neben dem mechanischen Schaden am Nervengewebe auch zur Destruktion von vaskulären Strukturen und der BHS. Die einwirkenden Scherkräfte zerstören *Tight Junctions* und es kommt zur Erweiterung der Interzellularräume. Diese Mechanismen führen zur Hämorrhagie, gestörtem Blutfluss und Ödembildung im betroffenen Hirngewebe (Nag et al., 2009). Das ins Hirnparenchym austretende Blut enthält vasoaktive Substanzen und verschiebt u. a. die extrazelluläre Ionenzusammensetzung. Dies führt zum metabolischen Ungleichgewicht in den Zellen, Störung im Energiehaushalt und als weitere Folge zur Gewebshypoxie. Es kommt zur Dysfunktion des Endothels und zum gesteigerten para- und transzellulären Transport (Schwarzmaier et al., 2015). Eine Ödembildung entsteht aufgrund verschiedener Prozesse. Die erhöhte Permeabilität führt zum gesteigerten Wassertransport durch die Barriere. Durch die Protein- und Ionenverschiebung kommt es zum erhöhten onkotischen Druck im Gewebe, das zur weiteren Flüssigkeitsverschiebung führt. Die Ödembildung kann zur intrakraniellen Drucksteigerung führen, die zu Veränderungen im zerebralen Blutfluss führt. Nicht selten kann die Ödembildung vor allem beim geschlossenen SHT zur Kompression und Herniation von intrakraniellen Strukturen führen (Winkler et al., 2016).

Im Rahmen des Sekundärschadens führen Prozesse wie Mikrogliaaktivierung, Astrogliose und Neuroinflammation durch freigesetzte Signalmoleküle und Metabolite im umliegenden Gewebe zur Verstärkung und Ausweitung der Hyperpermeabilität der BHS oder gar zum kompletten Verlust der Barrierefunktion (reviewed in Sulhan et al., 2020). Der Barriereverlust führt zur Extravasation von Immunzellen und anderen großen Blutbestandteilen wie Immunglobulin (Ig) G, die ihrerseits zusätzlich neurotoxisch wirken (Johnson et al., 2018). Die einwandernden Immunzellen forcieren weiter die Neuroinflammation, das wiederum im Sinne eines *Circulus vitiosus* die sekundären Prozesse weiter antreibt.

Der Zusammenbruch der BHS ist ein biphasischer Vorgang. Innerhalb der ersten Stunden entsteht die erste Phase, die mehr mit dem Primärschaden im Zusammenhang steht. Die zweite Phase tritt verspätet drei bis sieben Tage nach dem Trauma auf und ist die Folge der oben genannten Sekundärprozessen (Başkaya et al., 1997). Es gibt Untersuchungen, die zeigen, dass Patienten Jahre nach einem SHT veränderte BHS-Permeabilität aufweisen, was wiederum zur chronischen Neuroinflammation führen kann, die als Ursache für neurodegenerative Prozesse gilt (reviewed in Sweeney et al., 2018; Zenaro et al., 2017).

2.3.2 Neuroinflammation

Neuroinflammation ist eine komplexe zelluläre und molekulare Antwort auf Stress, Verletzung oder Infektion im ZNS. Innerhalb von Minuten nach dem Schaden wird eine Kaskade ausgelöst, an deren Ende eine generalisierte Entzündungsreaktion entsteht. Es findet eine Aktivierung der im ZNS ansässigen Mikroglia, Astrozyten und aus der Peripherie angelockten Leukozyten statt, die alle zusammen eine Vielzahl von anti- und pro-inflammatorischen Zytokinen, Chemokinen, Neurotransmitter und reaktive Sauerstoffspezies freilassen (reviewed in Whitney et al., 2009). Auf diese Weise entsteht ein komplexes Kommunikationsnetzwerk aus Botenstoffen, durch das eine gegenseitige Aktivierung der Zellen stattfindet, indem die sezernierten Entzündungsmediatoren weitere ruhende Zellen aktivieren, die wiederum weitere Mediatoren freisetzen (reviewed in Mele et al., 2021; Sulhan et al., 2020; Tuttolomondo et al., 2014). Die Hochregulation der Gene für die proinflammatorischen Zytokine wie z. B. Interleukin-1 β (IL-1 β), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) oder das von den aktivierten Mikroglia sezernierte, ionisierte Calcium-bindende Adaptermolekül 1 (Iba1) wird in den ersten Minuten nach dem Schaden initiiert (Frugier et al., 2010; Ito Daisuke et al., 2001). Diese und andere Zytokine bewirken unterschiedlichen Effekte: Zum einen werden Reparaturvorgänge wie Angiogenese, Narbenbildung und Neurogenese initiiert. Zum anderen trägt die Hochregulation dieser Gene zum Sekundärschaden bei, indem u. a. die Permeabilitätsstörung der BHS, Hirnödeme sowie neuronale Schäden durch Apoptose und Zytotoxizität forciert werden (Addington et al., 2015; Giulian und Lachman, 1985). Suppression von proinflammatorischen Mediatoren bietet eine therapeutische Möglichkeit zur Intervention, um den Sekundärschaden abzumildern oder ganz zu verhindern und das Outcome zu verbessern (Lloyd et al., 2008). Es wurde die Korrelation zwischen den Konzentrationsänderungen der an der Entzündungsreaktion beteiligten Media-

toren und der Schwere des SHT gezeigt. Zu diesen Mediatoren gehören auch die an der Akutphase beteiligten proinflammatorischen Zytokine IL-1 und TNF- α . Entzündungsmarker besitzen jedoch eine eingeschränkte Aussagekraft bezüglich der Schwere des SHT oder des Outcome, wenn im Organismus gleichzeitig andere Organschäden oder Erkrankungen vorliegen (Chiaretti et al., 2005; Di Battista et al., 2016).

Das proinflammatorische Zytokin IL-1 β gehört zur Interleukin-1-Familie und ist einer der zentralen Mediatoren im Rahmen einer Entzündungsreaktion. Fast alle Zelltypen im neuronalen Gewebe sind in der Lage Zytokine der IL-1-Familie zu synthetisieren (Andersson et al., 2005; Zhang et al., 2000). Zu seinen Wirkungen gehören u. a. Leukozytenadhäsion an Endothelzellen, Apoptose, Permeabilitätserhöhung der BHS und Ödembildung, womit es maßgeblich zum Sekundärschaden beiträgt (reviewed in Fogal und Hewett, 2008). In Studien wurde gezeigt, dass die Expression der *messenger ribonucleic acid* (mRNA, deutsch: Boten-Ribonukleinsäure) und der Proteine von IL-1 β innerhalb von Stunden nach dem Trauma ansteigt und mit der Schwere des SHT sowohl im Tiermodell als auch beim Menschen korreliert (Frugier et al., 2010; Lagraoui et al., 2012; Lloyd et al., 2008).

TNF- α ist ein pleiotropher Entzündungsmediator, der an einer Vielzahl von pathologischen Prozessen beteiligt ist, darunter Entzündungen, Autoimmunerkrankungen und Kanzerosen. Im ZNS wird TNF- α sowohl als pro- wie auch als antiinflammatorisches Zytokin hauptsächlich von den aktivierten Mikroglia sezerniert und im kleineren Umfang auch von Astrozyten und Neuronen (reviewed in Tuttolomondo et al., 2014). Nach einem SHT besteht seine Hauptwirkung darin weitere Mikroglia und Astrozyten zu aktivieren, periphere Immunzellen wie die neutrophilen Granulozyten und Monozyten anzulocken und deren Infiltration ins Hirngewebe zu erleichtern, indem es die Bildung von Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche von Leukozyten und Endothelzellen forciert (Eissner et al., 2000; Sébire et al., 1993). Die angelockten Immunzellen haben dann u. a. die Aufgabe die entstandenen Zelltrümmer zu phagozytieren. Weiter beeinflusst TNF- α die Permeabilität der BHS und hat über verschiedene Signalwege direkte neurotoxische Effekte (Chen et al., 2019; Gelbard et al., 1993). Sowohl im Tiermodell als auch bei Patienten mit SHT lassen sich posttraumatisch bereits nach wenigen Minuten eine Induktion der mRNA und erhöhte Proteinkonzentrationen von TNF- α in verschiedenen Proben wie Gewebe, Serum oder Liquor finden. Insgesamt scheint es

so, dass beim schweren SHT korreliert die TNF- α -Konzentration mit dem Ausmaß des Schadens, während bei milden Traumen keine Korrelation gezeigt werden konnte (reviewed in Dash et al., 2010; Woodcock und Morganti-Kossmann, 2013).

Iba1 ist ein makrophagen- und mikroglia-spezifisches Protein. Iba1 bindet an die Aktinfilamente der Zellmembran und ist so an den morphologischen Veränderungen der aktivierten Mikroglia und ihrer phagozytotischen Aktivität beteiligt (Ohsawa et al., 2004). Ihre Aktivierung entsteht im Rahmen der schnellen Immunantwort im ZNS nach einer Reihe pathologischer Stimuli, darunter Axotomie, Trauma, Inflammation, Degeneration und Ischämie (Li et al., 2018; Shapiro et al., 2008; Wang et al., 2013). Die Transformation von der inaktiven in die aktive Form geht neben der morphologischen Veränderung auch mit vermehrter Expression von Iba1 einher. Aktivierte Mikroglia ist in der Lage ähnlich wie Makrophagen in der Peripherie Antigene zu erkennen und zu präsentieren, Phagozytose zu betreiben und zytotoxisch auf zu stark geschädigte Zellen zu wirken, indem es reaktive Sauerstoffspezies und eine Reihe von inflammatorischen Zytokinen sezerniert. Weiter trägt es zur Neuroprotektion bei, indem es neurotrophe Faktoren sezerniert (Ito et al., 2001).

2.3.3 Apoptose

Als Apoptose wird der programmierte Zelltod bezeichnet, der sowohl im Rahmen von physiologischen als auch pathologischen Prozessen stattfinden kann. Apoptose ist ein sich nach einem festgelegten Ablauf ereignender energieabhängiger aktiver biochemischer Prozess, der in vitalen Zellen stattfindet, und im Verlauf typische lichtmikroskopisch morphologische Kennzeichen aufweist wie Zellschrumpfung, Kernpyknose, Karyorhexis und am Ende die Apoptosekörperchen, die von Makrophagen phagozytiert werden (reviewed in Häcker, 2000). Ein wichtiger Unterschied zur Nekrose, die im Rahmen des Primärschadens auftritt, ist, dass bei der Apoptose keine Entzündungsreaktion in der Umgebung ausgelöst wird. Bei der Regulation der Apoptose gibt es eine große Bandbreite an Schlüsselproteinen, deren Aktivierung oder Inaktivierung den Vorgang initiieren. So haben manche Zellen TNF- α -Rezeptoren auf der Oberfläche, die bei Ligandenbindung die Apoptose auslösen. In anderen Zellen muss der Vorgang der Apoptose permanent aktiv geblockt werden z. B. durch Wachstumsfaktoren, bei deren Wegfall der programmierte Zelltod eingeleitet wird (reviewed in Elmore, 2007). Die vielfältigen Stimuli, die den Zelltod triggern können, lösen entweder die Apoptose oder in höheren Dosen die Nekrose aus. Der

Übergang zwischen diesen beiden Prozessen ist oft fließend (reviewed in Zeiss, 2003).

Es gibt drei Signalwege, über die eine Apoptose ausgelöst werden kann, deren terminale Signalstrecke identisch abläuft. Diese Endstrecke wird durch die Aktivierung der ubiquitär vorhandenen inaktiven Proenzyme der proteinspaltenden Caspasen initiiert und mündet in *Deoxyribonucleic acid* (DNA, deutsch: Desoxyribonukleinsäure)-Fragmentation, Zytoskelettdegeneration, Proteinabbau, Bildung von Apoptosekörperchen und Ligandenexpression auf der Zelloberfläche, um phagozytische Zellen anzulocken und zu aktivieren, die die anfallenden Zelltrümmer am Ende beseitigen (reviewed in Elmore, 2007).

Auf jeder Zelloberfläche befinden sich Todes-Rezeptoren aus der Familie der TNF-Rezeptoren, die nach Ligandenbindung den extrinsischen Weg einleiten. Zu den meist untersuchten Liganden dieser Rezeptoren gehören das TNF- α und der *First-apoptosis-signal* (Fas)-Ligand (Ashkenazi und Dixit, 1998; Locksley et al., 2001). Nach der Ligandenbindung werden zytoplasmatische Adapterproteine rekrutiert, die an den zytoplasmatischen Teil der Todesrezeptoren binden. Nach dieser Bindung entsteht die sog. Todeseffektordomäne, die die inaktive Procaspase-8 in das aktive Enzym überführt. Über Autokatalyse aktiviert Caspase-8 weitere inaktive Procaspasen-8 (Suliman et al., 2001).

Der intrinsische Weg der Apoptose unterscheidet sich vor allem dadurch, dass er nicht rezeptorvermittelt ist. Unterschiedliche Stimuli initiieren diverse Signale, die die Membranintegrität von Mitochondrien beeinflussen und damit die Apoptose intrinsisch einleiten. Es gibt negative Signale wie z. B. Wachstumsfaktoren, Hormone oder bestimmte Zytokine, deren Anwesenheit die Apoptose aktiv unterdrücken. Stimuli wie Strahlung, Toxine, Hypoxie, Hyperthermie und andere werden als positiv bezeichnet, da ihre Anwesenheit die Apoptose initiiert. Durch die erhöhte Membranpermeabilität verliert das Mitochondrium sein Membranpotential und es treten aus dem Intermembranraum proapoptotische Proteine ins Zytosol aus (reviewed in Saelens et al., 2004). Ein Teil dieser Proteine aktiviert den caspaseabhängigen mitochondrialen Weg, an dessen Ende die aktivierte Form von Caspase-9 steht (Hill et al., 2004). Die anderen aktivieren die Enolase G, die zum Nukleolus wandert und dort die DNA-Fragmentation initiiert (Susin et al., 2000).

Neben den oben genannten Apoptosewegen gibt es noch den sog. stressinduzierten

Weg. Zytotoxische T-Lymphozyten der Familie CD8⁺ sezernieren Granula mit dem porenbildenden Perforin und den Serinproteasen Granzym A und B. Perforin ist ein Transmembranprotein, das in der Targetzelle Poren auf der Zelloberfläche bildet, über die die Granzyme in die Zelle eindringen können (Law et al., 2010). Granzym A aktiviert einen caspaseunabhängigen Weg an deren Ende der DNA-Abbau steht (Fan et al., 2003). Granzym B aktiviert Caspase-10, die genauso wie die bisher beschriebenen Caspasen zu den Initiatorcaspasen zählt und die die gemeinsame Endstrecke einleitet. Alternativ kann Granzym B auf direktem Weg Caspase-3 aktivieren, die zu den Effektorcaspasen gehört (Pardo et al., 2004).

Die exekutive Phase ist die gemeinsame Endstrecke aller Apoptosewege, in der der finale Abbau der verschiedenen Zellbestandteile wie DNA, Proteine und weiterer Moleküle stattfindet. Die verschiedenen Initiatorcaspasen aktivieren die Effektorcaspasen Caspase-3, -6 und -7, die wiederum zytoplasmatische Endonukleasen und Proteasen aktivieren (reviewed in Slee et al., 2001).

Bevor der Vorgang der Apoptose in einer Zelle initiiert wird, lässt er sich auf vielfältige Weise regulieren. Zu den wichtigsten regulatorischen Proteinen des intrinsischen Wegs gehört das *Bcl-2-associated-X-Protein* (Bax) aus der *B-Cell-Lymphoma-2-Familie* (Bcl2) zu denen insgesamt etwa 20 weitere Proteine gezählt werden. Die Proteine der Bcl-2-Familie werden in zwei funktionelle Gruppen eingeteilt, pro- und antiapoptotisch. Die meisten Zellen exprimieren eine Vielzahl dieser Proteine und das Gleichgewicht zwischen ihnen entscheidet über das Überleben oder den Tod der Zelle (reviewed in Renault et al., 2013). Bax ist ein im Zytosol ubiquitär vorhandenes Protein, das nach Einwirkung bestimmter Stimuli aktiviert wird und an der äußeren mitochondrialen Membran eine Permeabilitätsänderung durch Porenbildung und damit Freisetzung von mitochondrialen Proteinen aus dem Intermembranraum ins Zytosol bewirkt, womit der intrinsische Weg eingeleitet wird (Hetz et al., 2005).

Die *Bcl-2-associated-athano-gene*-(BAG)-Proteine bilden eine weitere Gruppe regulatorischer Proteine aus bisher sechs bekannten Mitgliedern, die alle durch die BAG-Domäne charakterisiert sind. Die BAG-Proteine sind antiapoptotisch und an einer Vielzahl von zellulären Prozessen beteiligt, darunter Stressantwort, Zellzyklus, neuronale Differenzierung, Onkogenese, Proliferation und Apoptose (reviewed in Doong et al., 2002). Ursprünglich wurden die BAG-Proteine durch ihre synergistische Wirkung auf antiapoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie und ihre Fähigkeit an diese

zu binden entdeckt (Takayama et al., 1995). Darüber hinaus ermöglicht die BAG-Domäne eine Interaktion mit der ATPase-Domäne des Hitzeschockproteins (Hsp) und damit die Funktion als Co-Chaperon. Je nach Unterform des BAG können diese sowohl hemmend als auch aktivierend auf die unterschiedlichen Hsp wirken (reviewed in Behl, 2011).

Das BAG1 besitzt vier Isoformen, die alle neben der BAG-Domäne auch durch eine *Ubiquitin-like*-Domäne charakterisiert sind. Diese stellt eine Bindungsstelle für das Proteasom dar. Ubiquitin selbst ist ein kleines, in eukaryotischen Zellen ubiquitär vorhandenes zytoplasmatisches Protein, das u. a. als Abbausignal für andere Proteine genutzt wird. Polyubiquitinierte Proteine werden von dem Proteasom erkannt und abgebaut. Das Ubiquitin-Proteasom-System ist ein wichtiger Adenosintriphosphat-abhängiger Vorgang im Rahmen der Proteinhomöostase und dient der Beseitigung von kleinen Proteinen (Lüders et al., 2000). Zusammen mit dem Hsp70, dem Proteasom und weiteren Proteinen bildet das BAG1 einen Komplex, in dem ubiquitinierte Proteine abgebaut werden (reviewed in Alberti et al., 2003).

Das BAG3 enthält eine zusätzliche Domäne, die ihm eine größere Bandbreite an möglichen Reaktionspartnern bietet. Während das BAG1 den proteasomalen Abbau forciert, initiiert das BAG3 den autophagozytotischen Abbau, bei dem große Proteine oder Organellen eliminiert werden. Bei zellulären Schäden werden zunächst sowohl BAG1 als auch BAG3 hochreguliert. Sind die Zellschäden größer z. B. im Rahmen einer Ischämie oder eines SHT entsteht eine Adenosintriphosphat-Depletion, die einen Wechsel zu BAG3 und der Autophagie bewirkt. Die Überexpression von BAG3 hemmt dann wiederum den proteasomalen Abbau (Gentilella und Khalili, 2011; Liu et al., 2020). In alternden Zellen verschiebt sich das Verhältnis von BAG3 und BAG1 ebenfalls zugunsten des BAG3. Dadurch entsteht eine Dysregulation der Autophagie, die mit neurodegenerativen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht wird (Gamerding et al., 2009). Veränderte Expression von BAG-Proteinen lässt sich auch in einigen Tumorarten wie z. B. Glioblastomen und Melanomen nachweisen. Durch ihre pleiotrope Funktion nehmen BAG-Proteine Einfluss auf Funktion, Bildung und Abbau von anderen apoptoseregulierenden Proteinen, womit sie auch indirekt die Apoptose beeinflussen. Mit ihrer Fähigkeit in die Proteinhomöostase eingreifen zu können erklärt sich auch ihre antiapoptotische Wirkung. Unter physiologischen Bedingungen lässt sich eine erhöhte Expression von BAG als Stressantwort in Gliazellen auf Zellschaden oder Ischämie finden (Liu et al., 2020).

Chaperone, zu denen die Mitglieder der Hsp-Familie zählen, sind wichtige Kontrollinstanzen einer Zelle bei der Proteinhomöostase, die sowohl bei der Bildung wie auch dem Abbau von Proteinen beteiligt sind, indem sie die korrekte Faltung eines Proteins gewährleisten, fehlerhafte Proteine detektieren und bei Bedarf dem Abbau zuführen können (reviewed in Sharp et al., 2013). Als Co-Chaperone nehmen die BAG-Proteine regulatorischen Einfluss auf das Hsp70 und damit den proteasomalen und autophagozytotischen Abbau einer Zelle. Sie beeinflussen u. a. welche Proteine dem Proteasom zugeführt werden und welche nicht. Ursprünglich wurde die Chaperone-Funktion der Hsp in Zellen nach Wärmeeinwirkung entdeckt (Ritossa, 1962). Inzwischen kennt man weitere wichtige Funktionen von Hsp, darunter ihre antiapoptotische Aktivität, Regulation der Stressantwort und Zelldifferenzierung (Doepfner et al., 2009; Kwon et al., 2019; Ying et al., 2016). Die Hsp werden meist in fünf Gruppen entsprechend ihrer molekularen Größe eingeteilt von 110 kDa bis zu den kleinen Hsp mit 15 – 30 kDa. Das konstitutionelle Vorkommen der unterschiedlichen Hsp-Mitglieder variiert stark je nach Zelltyp und Hsp-Typ. Während die einen konstant in Zellen produziert werden, sind die anderen Teil der zellulären Antwort auf diverse Stimuli (reviewed in Franklin et al., 2005).

Aus den bekannten Gruppen der Hsp-Familie, sind das Hsp70 mit einem Molekulargewicht von 71 kDa bei Nagern und 72 kDa beim Menschen und das Hsp27, auch Hsp- β 1 genannt, von besonderem Interesse für die neuronale Forschung. Beide Mitglieder sind Teil der schnellen Zellantwort im Gehirn auf toxische Stimuli, darunter Ischämie, Hyperthermie, Hämorrhagie und mechanischer Schaden (reviewed in Kim et al., 2020). Deren erhöhte Expression lässt sich bereits wenige Stunden nach Schadensereignis nachweisen und erstreckt vom Primärschaden bis hin zur Penumbra und findet vor allem in den Astrozyten statt. Beide Proteine sind unter physiologischen Bedingungen nur in geringen Mengen in den neuronalen und glialen Zellen des Kortex vorhanden, womit sie sich gut als Marker für zerebralen Schaden eignen (reviewed in Shao et al., 2019; Sharp et al., 2013). Wie alle Mitglieder der Hsp-Familie verfügen sie über eine antiapoptotische Wirkung. Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* kann deren neuroprotektiver Effekt gezeigt werden (Akbar et al., 2003; Doepfner et al., 2009). Dieser antiapoptotische Effekt entsteht vor allem über den Einfluss auf den mitochondrialen Signalweg und die Caspase-Aktivität der Zellen. So kann z. B. Hsp27 direkt mit Caspase-3 interagieren und deren Aktivierung verhindern (Pandey et al., 2000). Zudem können sowohl das Hsp27 als auch das Hsp70 die

stressinduzierte Bax-Bildung und dessen Transport zum Mitochondrium unterdrücken (Havasi et al., 2008; Stankiewicz et al., 2005). Als Chaperon hat das Hsp27 eine Sonderstellung, da es im Gegensatz zu den anderen Chaperonen Adenosintriphosphat-unabhängig arbeitet. Es verhindert die Aggregation von fehlgefalteten Proteinen, indem es diese bindet, ohne diese jedoch wieder reparieren zu können (Pivovarova et al., 2005).

Im Rahmen dieser Studie wurde Bax, BAG1, BAG3, Hsp- β 1 und Caspase-3 als mögliche Apoptosemarker verwendet und mittels PCR untersucht.

2.3.4 Weitere Biomarker

Als Biomarker gilt ein Indikator der spezifisch im Rahmen eines biologischen Vorgangs aus Gewebs- und Flüssigkeitsproben detektiert werden kann. Dabei können bspw. veränderte Enzymaktivität, eine Vielzahl von Proteinen, Lipide und Änderungen in der Genexpression oder die Kombination aus diesen als Indikator dienen (reviewed in Carpenter et al., 2015; Dash et al., 2010; Kulbe und Geddes, 2016). Neue Substanzklassen wie Metabolite und microRNA bilden aktuell den Gegenstand der Forschung und bieten ein neues Feld von Biomarkern (reviewed in Bhalala, 2015). Idealerweise müssen Biomarker eine Reihe an Eigenschaften besitzen um als Marker eine Verwendung zu finden: Die Konzentrationserhöhung sollte zeitlich bestimmten Phasen zugeordnet werden können und mit der Schadensgröße korrelieren. Weiter sollte ihr Basallevel in der Kontrollgruppe niedrig sein (Wang et al., 2018). Der zeitliche Verlauf und die Kinetik der Marker sind sehr heterogen. Die meisten Marker zeigen geringe Spezifität und Sensibilität, wenn diese solitär betrachtet werden, sodass zukünftig eine Kombination aus mehreren Markern ein sinnvolles Tool im klinischen Alltag soll (reviewed in Reis et al., 2015). So könnten z. B. früh detektierbare Biomarker wie GFAP und α -II-Spektrin-Abbauprodukte bei der Entscheidung helfen, ob teure und mit Strahlenbelastung verbundene Bildgebung bei Patienten mit mildem SHT gemacht werden sollen oder nicht (Ringger et al., 2004; Takala et al., 2016). Marker, die erst nach Tagen oder Wochen ermittelt werden können hätten potentiellen Einsatz beim Genesungsmonitoring oder um Spätkomplikationen/Folgen rechtzeitig zu erkennen (reviewed in Werhane et al., 2017).

Das GFAP ist ein 50 kDa großes und für neuronales Gewebe spezifisches Intermediärfilamentstrukturprotein, das im ZNS im Zytoskelett der reifen, ausdif-

ferenzierten Astrozyten exprimiert wird. Beim neuronalen Schaden kommt es zur Aktivierung von Astrozyten, dieser Vorgang wird als reaktive Astroglieose bezeichnet. Morphologisch ist er durch eine Hypertrophie der Astrozyten gekennzeichnet. Gleichzeitig findet eine rasche Hochregulation der Genaktivität von GFAP statt und lässt sich somit als Marker in der Akutphase für ZNS-Schäden verwenden (reviewed in Brenner, 2014; Kulbe und Geddes, 2016; Yang und Wang, 2015). Bereits wenige Stunden nach einem milden SHT lassen sich erhöhte Konzentrationen des GFAP nicht nur im Gewebe, sondern auch im Plasma nachweisen. Die Konzentrationshöhe von GFAP korreliert mit dem Schweregrad des Traumas und ist ein negativer prädiktiver Wert für das Outcome (Lee et al., 2015).

Der proteolytische Abbau von Zellbestandteilen im Rahmen der nach dem SHT sowohl auftretenden Nekrose, die vor allem den Primärschaden kennzeichnet, als auch der Apoptose stellt eine der zentralen Pathologien dar. Entstehende Abbauprodukte können als Marker für das Ausmaß der Zellschäden verwendet werden. Unter den Proteasen sind Calpain-1, -2 und Caspase-3 aus der Familie der Cysteinproteasen wichtige Akteure beim neurologischen Zellschaden (Pineda et al., 2007). Die kalziumabhängige Spaltung von Spektrin durch Calpain und Caspase-3 ist unter physiologischen Bedingungen ein wichtiges Werkzeug bei der embryonalen Entwicklung des ZNS und der Neuroplastizität (reviewed in Nguyen et al., 2021). Die Familie der Spektrin-Proteine sind Proteinkomplexe im Zytoskelett, die sich u. a. in der Membran von Neuronen finden lassen und gehäuft in Axonen und präsynaptischen Endigungen vorkommen. Das Hauptsubstrat für Calpain-1 und Caspase-3 ist die Untereinheit α -II-Spektrin mit einer Molekülgröße von 280 kDa (Glantz et al., 2007; Wang et al., 1998). Calpain, das sowohl an der Nekrose wie auch an der Apoptose beteiligt ist, spaltet α -II-Spektrin in ein 150 kDa- und 145 kDa-Fragment, während Caspase-3 an der Apoptose beteiligt ist, im Rahmen dieser ein N-terminales Fragment von 150 und ein C-terminales Fragment von 120 kDa Größe bildet (Liu et al., 2006) und eher in der Spätphase nach einem SHT nachweisbar ist (Mondello et al., 2010). Die erhöhte Serummenge der Spaltprodukte korreliert mit der Schwere und dem negativen Outcome des SHT und ist sowohl im Tiermodell bei Nagern und wie auch beim Menschen nachweisbar ist (Mondello et al., 2010; Ringger et al., 2004).

2.4 Schädel-Hirn-Trauma-Modell

Bei einem SHT werden eine Reihe pathologischer Prozesse initiiert, die sich auf unterschiedlichen Ebenen abspielen und sich gegenseitig auf vielfältige Weise beeinflussen, sodass ein *In-vivo*-Modell für die neuronale Forschung unerlässlich ist. Trotz der Heterogenität des humanen SHT, bei dem u. a. Traumaart, Geschlecht, Alter, Vorerkrankungen und genetische Prädisposition (reviewed in Maas et al., 2017) eine multifaktorielle Pathologie daraus machen, ermöglichen Tiermodelle eine experimentelle Reproduzierbarkeit, um primäre und sekundäre Traumafolgen zu untersuchen. Durch den Einsatz vergleichbarer Versuchstiere mit definiertem Geschlecht, Alter und Genetik lassen sich interindividuelle Schwankungen auf ein Minimum reduzieren. Die Wahl des Traumamodells hängt von der Fragestellung der Studie ab. Mäuse als Versuchstiere sind die am häufigsten eingesetzte Spezies. Ihre geringe Größe, ihr schnelles Wachstum und die im Vergleich zu anderen Versuchstieren geringen Kosten machen die Mäuse in der Summe zum idealen Tiermodell (reviewed in Cernak, 2005).

Das *Controlled-Cortical-Impact*-Modell (CCI, deutsch: kontrollierter kortikaler Aufschlag) wurde Ende der 80er Jahre entwickelt und ist seitdem eines der am meist verwendeten SHT-Modelle (Lighthall, 1988). Das Prinzip entspricht einem geschlossenem SHT und basiert auf einer mechanischen Kraftübertragung auf den Kortex bei geschlossener *Dura mater*, nachdem eine Kraniotomie unter Anästhesie durchgeführt wurde. Die Kraftübertragung erfolgt mithilfe eines Bolzens, der je nach Gerätetyp pneumatisch oder elektromagnetisch betrieben wird (reviewed in Osier und Dixon, 2016). Der genaue Aufbau wird in Kapitel 4.1.4.2 beschrieben. Ein Vorteil des Modells ist die Kontrollierbarkeit der Faktoren wie Eindringtiefe, Aufpralldauer und -fläche, Geschwindigkeit und Lokalisation, mit denen sich experimentell unterschiedlich schwere SHT erzeugen lassen und der Einsatz in unterschiedlichen Spezies wie z. B. Ratten (Edward Dixon et al., 1991), Schweinen (Baker et al., 2018) und Mäusen möglich ist (Schwulst und Islam, 2019). Durch das CCI entstandene Schäden wie histologische Veränderungen, Störung der BHS, Hämorrhagie, Ödeme, Neuroinflammation und Störungen im zerebralen Blutfluss entsprechen den Veränderungen, die man auch bei SHT-Patienten findet. Je nach Lokalisation der Läsion lassen sich auch die funktionalen Defizite mit dem humanen SHT vergleichen (Albert-Weissenberger und Sirén, 2010; Chiu et al., 2016).

2.5 Dimethylsulfoxid

Für eine sichere Distribution im Körper benötigen viele Pharmaka ein Vehikel. In der vorliegenden Studie wurde dafür das Dimethylsulfoxid (DMSO) gewählt. DMSO, ursprünglich ein Nebenprodukt der Holzindustrie, gehört zur chemischen Klasse der Sulfoxide. Es besteht aus einer polaren Sulfinylgruppe und zwei unpolaren Methyl-Gruppen. Als ein amphipathisches Molekül wird es seit den 1960 Jahren als Lösungsmittel für hydrophobe Substanzen in der Forschung und im klinischen Alltag verwendet (Brobyn, 1975). Einer der wichtigsten pharmakologischen Eigenschaften des DMSO ist die BHS-Gängigkeit (Broadwell et al., 1982). Oft als Vehikel für andere Pharmaka verwendet, kann DMSO selbst auch erfolgreich bei der Therapie zahlreicher Erkrankungen eingesetzt werden, u. a. bei gastrointestinalen Erkrankungen, Amyloidose, Adenokarzinom der Lunge, rheumatischen und dermatologischen Erkrankungen (reviewed in Santos et al., 2003).

2.6 All-trans-Retinsäure

ATRA ist ein Abkömmling des fettlöslichen Vitamins A (Retinol). Bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurde seine Bedeutung für den Organismus entdeckt. In den ersten Versuchen erhielten Tiere eine Vitamin-A-freie Ernährung, die zu typischen Folgeerscheinungen wie einem reduzierten Immunsystem, Anämie, Xerophthalmie oder Blindheit führte (Wolbach und Howe, 1925). Organismen, die nicht in der Lage sind Retinol selbst zu bilden, können Retinol als Vorstufe aus pflanzlicher Nahrung in Form von Betacarotin oder in Form von Vitamin-A-Ester aus der Nahrung tierischen Ursprungs aufnehmen. Von der Leber, dem Hauptspeicherort des Retinols, wird mithilfe der Retinol-bindenden-Proteine das hydrophobe Molekül über den Blutkreislauf im Körper verteilt (reviewed in Doldo et al., 2015). Auf Zielzellen regulieren Oberflächenrezeptoren je nach Bedarf die Aufnahme des Retinols ins Zytosol. Die intrazelluläre Bioverfügbarkeit und Zellantwort wird durch die zytoplasmatischen *Cellular retinol binding protein* (CRBP, deutsch: zelluläres Retinol-bindendes Protein) und *Cellular retinoic acid binding protein* (CRABP, deutsch: zelluläres Retinsäure-bindendes Protein) reguliert. Im Zytoplasma wird das Retinol unter Beteiligung verschiedener Enzyme zu Retinsäure metabolisiert (reviewed in Janesick et al., 2015).

RA existiert in mehreren Stereoisomeren, die alle ineinander umwandelbar sind. Zu

ihnen gehören 9-*cis* Retinsäure, 11-*cis* Retinsäure, 13-*cis* Retinsäure und die dominante *all-trans*-Retinsäure, die als biologische aktive Form des Vitamin A gilt. ATRA ist ein lipophiles Molekül, das wie die anderen Isomere die Genexpression einer Zelle verändern kann. Dazu gelangt die ATRA mithilfe des CRABP in den Nukleus. Dort befinden sich zwei spezifische, ligandengesteuerte Rezeptoren, *Retinoic acid receptor* (RAR, deutsch: RA-Rezeptor) und der *Retinoid X receptor* (RXR, deutsch: Retinol-X-Rezeptor), von denen jeweils drei Subtypen existieren: RAR α , β , γ und RXR α , β , γ (reviewed in Lee et al., 2009). Die RA-Metabolite haben eine unterschiedliche Affinität zu den Rezeptorarten, bspw. bindet ATRA bevorzugt an den RAR und kaum bis gar nicht an den RXR (Allenby et al., 1994). Aktivierte Rezeptoren bilden Heterodimere, die an eines der bisher bekannten 500 Targetgene binden und so deren Transkription induzieren oder hemmen (Balmer und Blomhoff, 2002). Nach der Rezeptoraktivierung verlässt ATRA den Zellkern und wird anschließend im Zytosol wieder verstoffwechselt (reviewed in Maden, 2007).

Es gibt zahlreiche Funktionen, an denen RA und ihre Abkömmlinge beteiligt sind. So fungiert z. B. das 11-*cis*-Retinal als Chromophore in den Stäbchen der Netzhaut und ist damit wesentlich für den Sehvorgang (Babino et al., 2015). Weiterhin hat RA regulatorischen Einfluss auf Zelldifferenzierung, -proliferation und Apoptose (Carazo et al., 2021; Zhang et al., 2014). Auch in der Physiologie des Immunsystems und der Spermatogenese ist sie essenziell (Gewiss et al., 2020; Nolting et al., 2009).

Bereits die ersten Studien zeigten, dass ein Vitamin-A-Mangel während der Embryonalentwicklung zu typischen kongenitalen Malformationen im ZNS führt. Zu beobachten ist, dass Hydrozephalus, Spina bifida, Anophthalmie oder Mikroophthalmie als Folge des Vitaminmangels in Hamstern entstehen (Shenefelt, 1972). Inzwischen ist die Bedeutung der RA für die embryonale Entwicklung des ZNS und der Neurogenese bekannt. Physiologisch ist die RA während der Entwicklung des ZNS an der dorsoventralen Musterbildung und an der neuronalen Differenzierung beteiligt. Studien, die die RA-Verteilung während der Embryogenese untersuchten, zeigen, dass RA und RAR/RXR vor allem in der Neuralplatte und ihren späteren Strukturen in hohen Konzentrationen zu finden sind (Horton und Maden, 1995). Indem eine RAR-Aktivierung den Zellzyklus inhibieren kann, agiert RA u. a. als Gegenspieler zu den unterschiedlichen Wachstumsfaktoren womit sie den Wechsel zwischen der initialen Proliferation und der späteren neuronalen Zelldifferenzierung initiiert (reviewed in Janesick et al., 2015). Die Neurogenese, ein

Vorgang, der die Entwicklung des Nervensystems von Organismen beschreibt, bei dem Neurone aus neuronalen Stammzellen gebildet werden und vorrangig in der Embryonalentwicklung zu finden ist, ist im adulten Gehirn unter physiologischen Bedingungen nur kleinen Gebieten vorbehalten: Der subventrikulären Zone der lateralen Ventrikel, dem *Hippocampus* im Bereich der subgranulären Zone des *Gyrus dentatus* und dem *Bulbus olfactorius* (Molotkova et al., 2007; O'Kusky et al., 2000; Toresson et al., 1999). Sie bietet dem Organismus auch postnatal im gewissen Umfang die Fähigkeit zur neuronalen Regeneration und Plastizität. Auch die Verteilung von RAR, RXR und der RBP macht deutlich, dass RA an der neuronalen Plastizität beteiligt ist (reviewed in Jung et al., 2007; Maden, 2007). Die Regulation dieser Vorgänge wird durch vielfältige Faktoren beeinflusst, z. B. durch Wachstumsfaktoren, Glucocorticoide, Sexualhormone, Stress, diverse Pathologien, Lernvorgänge oder verschiedene Pharmaka, darunter auch ATRA. Ausgelöst durch Schaden z. B. durch Ischämie oder Trauma ist die reaktive Neurogenese Teil der Reparaturvorgänge bei einem SHT (reviewed in Crandall et al., 2011; Hummel et al., 2020; Jung et al., 2007).

Mit der zunehmenden Erkenntnis über die Bedeutung der RA in der Embryonalentwicklung und ihre Aufgaben im adulten Organismus liegt es nahe, dass ATRA mit ihrem pluripotenten Wirkmechanismus auch neuroprotektive Eigenschaften besitzen muss. Einer der möglichen Mechanismen, über den sie protektiv wirken kann, ist ihre antioxidative Wirkung. Die Folgen des oxidativen Stresses in Neuronen sind u. a. DNA-Doppelstrang-Brüche und mitochondriale Schäden. Beides sind Pathologien die auch in neurodegenerativen Erkrankungen zu finden sind. ATRA ist in der Lage DNA-Reparaturvorgänge zu induzieren (Colas et al., 2020; Gruz-Gibelli et al., 2016). Im breiten Feld der neurodegenerativen Erkrankungen spielt die RA eine wichtige Rolle, womit sie auch hier einen potentiellen Therapieansatz bietet (Gruz-Gibelli et al., 2016; Wang et al., 2015). Dopaminerge Neurone des Striatum haben eine hohe RA-Aktivität. Studien zeigten sowohl im Zell- wie auch Tiermodell der Parkinson-Erkrankung einen protektiven Effekt von ATRA auf Neurone des dopaminergen Systems (Esteves et al., 2015; Yin et al., 2012). Störungen im RA-Signalweg sind auch bei der amyotrophen Lateralsklerose zu finden. Charakteristisch für sie sind die Neurodegeneration der Motoneuronen des Kortex, des Hirnstamms und des Rückenmarks (Corcoran et al., 2002). Morbus Alzheimer ist eine weitere Erkrankung dieser Art, bei der es durch Ablagerungen von Amyloid- β zu Plaquebildung kommt, die letztendlich in der Ausbildung einer Demenz resultiert. Auch hier bietet ATRA

einen möglichen Therapieansatz (Kawahara et al., 2014).

ATRA gilt als ein starker Immunmodulator und besitzt antiinflammatorische Eigenschaften (Wang et al., 2015). Studien zeigten den Einfluss von ATRA auf T-Zellen, natürlichen Killerzellen, Makrophagen und eine Reihe von Zytokinen, die u. a. an der Pathophysiologie von Autoimmunerkrankungen und der Neuroinflammation beteiligt sind (Liu et al., 2015; Lu et al., 2014). Da ATRA zur Integrität der BHS beiträgt und die Mikrogliaaktivierung reduziert, konnte ihr positiver Effekt auf die Schadensgröße und das Outcome in einem *In-vivo*-Modell des Schlaganfalls gezeigt werden (Cai et al., 2019; Lee et al., 2009).

Eine weitere wichtige Funktion der RA ist die Kontrolle des Zellzyklus. RA induziert die Zelldifferenzierung, wirkt antiproliferativ und ist in der Lage einen Zellzyklus-Arrest auszulösen und damit die Apoptose einzuleiten (reviewed in Janesick et al., 2015; Lee et al., 2009). Im klinischen Alltag ist ATRA seit Ende der 80er Jahre ein fester Bestandteil des Therapieschemas der akuten Promyelozytenleukämie, die sich durch unkontrolliertes Wachstum unreifer funktionsloser Blasten auszeichnet. Hier wirkt ATRA indem sie in den Zellzyklus eingreift und die Ausdifferenzierung der Blasten induziert (Menger et al., 1988; Patatianian und Thompson, 2008). Nach dem erfolgreichen Einsatz in der Therapie der akuten Promyelozyten-Leukämie wurden Versuche gestartet, ATRA auch in der Therapie von soliden Tumoren zu etablieren. Eines der Targetgene des RAR α ist das RAR β 2-Gen, ein Tumorsuppressor, der in Menge oder Funktion in vielen soliden Tumoren darunter Melanome, Mamma-, Lungen-, Pankreas- und Prostata-Karzinome, verändert ist. Der aktuelle Fokus in der Karzinom-Forschung sind klinische Studien in denen untersucht wird ob ATRA solitär oder in Kombination mit anderen Chemotherapeutika erfolgreich in der Therapie solider Tumore eingesetzt werden kann (Giuli et al., 2020; Ni et al., 2019).

Es wird deutlich, dass ATRA und ihre Signalwege an zahlreichen zellulären Vorgängen beteiligt sind, die bei einem SHT im Rahmen des Sekundärschadens zu finden sind. ATRA bietet somit einen vielversprechenden Ansatz in der Therapie neuronaler Schäden, wie vorherige Studien gezeigt haben.

3 Materialien

3.1 Verbrauchsmaterial

Tab. 3.1: Materialliste Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
96-well Platte	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Deckgläser 24 x 60 mm	Diagonal GmbH & Co. KG, Münster, DE
Einbettmedium NEG 50™	Richard Allan Scientific, Thermo Scientific, Dreieich, DE
Einwegpipetten	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg, DE
Einwegspritzen	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Falcon®-Röhrchen 15 ml, 50 ml	VWR international, Radnor, USA
Filterpapier	Whatmann, Maidstone, UK
Futterpellets Maus	Ssniff, Soest, DE
Holzeinstreu	J.Rettenmaier & Söhne GmbH + Co. KG, Rosenberg, DE
Holzwattestäbe 15 cm	Centramed Medizintechnik, Koblenz, DE
Klingen Feather® Microtome Blade C35	Feather Safety Razor Co., Osaka, J
Mikropipettenspitzen 1000 µl, 200 µl, 10 µl	Starlab International GmbH, Hamburg, DE
Nahtmaterial Prolene® 6-0	Ethicon Inc., Somerville, USA
Nitrocellulosemembran	Thermo Fisher Scientific, Walldorf, DE
Objektträger SuperFrost® Plus	Menzel-Gläser, Menzel GmbH, Braunschweig, DE
Papierhandtücher	Schuch Laborhandel, Langgöns, DE
Reaktionsgefäße versch. Größen	Eppendorf, Hamburg, DE
Skalpell No.23	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE

3.2 Chemikalien

Tab. 3.2: Materialliste Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid Rotiphorese Gel 30	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Aqua destillata	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Bovines Serumalbum (BSA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Chameleon™ Duo Prestained Protein Ladder	Li-Cor, Lincoln, USA
Chloroform	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Diaminobenzidin	Dako, Glostrup, DNK
DMSO (Dimethyl Sulfoxid)	Sigma Aldrich, Steinheim, DE
Ethanol absolut	Honeywell, Riedel-de Haen AG, Lohnde
Ethylendiaminotetraacetat (EDTA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Glycin	Applichem, Darmstadt, DE
Histoacryl, Gewebekleber	Braun, Melsungen, DE
Isopropanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kresylviolet	Merck, Darmstadt, DE
LightCycler® 480 Probes Master	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, CH
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Methanol	Applichem, Darmstadt, DE
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Natriumdodecylsulfat (SDS)	BioRad, Hercules, USA
Nonidet P-40 (NP-40)	Applichem, Darmstadt, DE
PagerRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Paraformaldehyde	Merck, Darmstadt, DE
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Merck, Darmstadt, DE
Proteaseinhibitor	Roche Molecular Biochemicals;

	Mannheim, DE
Ribonuklease (RNase) freies Wasser	Fermentas, St. Leon Rot, DE
Roti®Histokitt	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Roti®-Histol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
RPE Puffer	Qiagen N.V., Venlo, NL
RWT Puffer	Qiagen N.V., Venlo, NL
Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Stickstoff, flüssig	Air Liquide, Düsseldorf, DE
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Triton X-100	Sigma, Steinheim, DE
Tween-20	GE Healthcare, Buckinghamshire, GB
Wasserstoffperoxid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE

3.3 Kits

Tab. 3.3: Materialliste Kits

Kit	Hersteller
ABC Kit	Vector Laboratories, Burlingame CA, USA
Absolute Blue qPCR SybrgreenMix	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Lowry DC Protein assay	BioRad, Hercules, USA
QIAzol Lysis Reagent	Qiagen, Hilden, DE
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen N.V., Venlo, NL
RNeasy Plus Universal	Qiagen N.V., Venlo, NL

3.4 Antikörper

Tab. 3.4: Materialliste Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Biotinyliert Anti-Maus IgG BA-9200	Ziege	1:500	Vector Laboratories, Burlingame CA, USA
GAPDH ACR001PS	Maus	1:1000	Acris Antibody Inc., San Diego, USA
IRDye 680RD Anti-Maus	Ziege	1:15000	Li-Cor Bioscience GmbH, Bad Homburg, DE
IRDye 800CW Anti-Maus	Ziege	1:15000	Li-Cor Bioscience GmbH, Bad Homburg, DE
α -Fodrin, mAB (AA6)	Maus	1:1000	Enzo Life Sciences, Farmingdale, USA

3.5 Pharmaka

Tab. 3.5: Materialliste Pharmaka

Pharmaka	Hersteller
all-trans-Retinsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bepanthen® Augensalbe	Bayer Vital; Leverkusen, DE
Forene®, Wirkstoff: Isofluran	Baxter; Unterschleißheim, DE
Heparin-Natrium 25000 I.E.	Ratiopharm, Ulm, DE

3.6 Geräte

Tab. 3.6: Materialliste Geräte

Geräte	Typ	Hersteller
Blotkammer	Mini Trans Blot System	BioRad, Hercules, USA
CCI-Impactor	Typ SHTM3	Kopacz, Mainz, DE
Detektionssystem	GloMax®-Multi+ Detection System	Promega, Mannheim, DE
Elektrophoresekammer	Mini Protean Elektrophoresis	BioRad, Hercules, USA

Fluoreszenz-Detektionssystem	Odyssey®	Li-Cor Biosciences, Bad Homburg, DE
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, DE
Homogenisator	Mastermill MM 300	Retsch Technology GmbH, Haan, DE
Inkubator	IC 8000	Dräger; Lübeck, DE
Kryotom	Microm HM 560 Cryo-Star	Thermo Fisher Scientific, Walldorf, DE
Lichtmikroskop	Stemi 305	Zeiss, Jena, DE
Magnetrührer	Ikamag® Ret	Janke und Kunkel, Staufen, DE
Mikrobohrer	Uni-Drive N Komplettgerät	Paggen, Starnberg, DE
Mikroskopkamera	Axiocam 105 color	Zeiss, Göttingen, DE
Operations-Mikroskop	Technoskop OPMI 1-FC 459909	Zeiss Meditec, Jena, DE
Photometer	NanoVue™	GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK
Pipetten	10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf; Hamburg, DE
Präzisionswaage	L2200P	Sartorius Lab Instruments GmbH & Co.KG
quantitative RT-PCR	LightCycler® 480	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
Rota-Rod	RS232/LE8200	Hugo Sachs; March-Hugstetten, DE
Schüttler	Rotamax 120	Heidolph, Schwabach, DE
Stereotakt	Stereotaxierahmen	Kopf Instruments, Tujunga, USA
Temperatursonde	TCAT-2DF Controller	Physitemp, New Jersey, USA
Tierkäfig	Filtertopkäftig Typ-II lang	Bioscape GmbH, Castrop-Rauxel, DE
Tierschrank	UniProtect THF 3378-VO2	Bioscape, Castrop-Rauxel, DE
Tierwaage	CS200	Ohaus, Greifensee, CHE

Vapor	Vapor 19.3. Isofluran	Dräger, Lübeck, DE
Vortex	VF2, IKA-Labortechnik	Janke und Kunkel, Staufen, DE
Wärmematte	TCAT-2DF Controller	Physitemp, New Jersey, USA
Zentrifuge	Eppendorf 5804 R	Eppendorf, Hamburg, DE
Zentrifuge	Micro Star 17 R	VWR, Radnor, PA, USA

3.7 Lösungen

Tab. 3.7: Materialliste Lösungen

Name	Rezept
5% BSA Lösung	5 g Gewicht/Volumen (w/v) in 100 ml TBST
AK-Lösung	2,5 % (w/v) Magermilch in TBST
Blocking-Lösung	2,5 % (w/v) Magermilch in TBS
Blotting-Puffer	25 mM Tris-HCl (pH 8,3), 192 mM Glycin, 20 % Volumen/Volumen (v/v) Methanol
Kresylviolett Lösung	5g Kresylviolett in 100 ml Ethanol für 30 min bei 50°C, add 500 ml Aqua dest., Filterlösung
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	9,55 g auf 1l Aqua dest.
Radioimmunoprecipitation assay (RIPA)-Puffer	1 M Tris (pH 7,4), 1 M NaCl, 0,5 M EDTA, 10 % (v/v) NP40, 15% (v/v) Proteaseinhibitor
SDS-Ladepuffer	0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 10 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Glycerin, 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS
TBST	TBS + 0,05 % (v/v) Tween-20
Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS)	15 mM NaCl, 5 mM Tris, 0,2 mM HCl, pH 7,4

3.8 Primer

Tab. 3.8: Materialliste Primer

Target	Primer/Sonde	Basenabfolge 5' -> 3'
BAG1	BAG1 A	AATTCTTGCAGGTGGTTAGCTATC
	BAG1 F	CACCCACAGCAATGAGAGGTAT
	BAG1 FL	GGGAAAATCTCTGAAAGAAATGGAAACACC
	BAG1-Cy5	TTGTCAGCACTTGGAAATGCAAATGGT
BAG3	BAG3 A	GGGACCTCTGCGGAGTG
	BAG3 S	CACCACGACGTGGAACG
	BAG3-CY5	CCCCGTCCTCCATGAAGGCTCCG
	BAG3-FL	GCTCCGACCAGGCTACATTCCCA
Bax	Bax-F	AGACAGGGGCCTTTTTGCTAC
	Bax-R	AATTCGCCGGAGACACTCG
Casp3	Casp3-F	TGGTGATGAAGGGGTCATTTATG
	Casp3-R	TTCGGCTTTCCAGTCAGACTC
GFAP	GFAP-F	CGGAGACGCATCACCTCTG
	GFAP-R	TGGAGGAGTCATTGAGACAA
Hspb1	Hspb1-F	GACGAACATGGCTACATCTC
	Hspb1-R	CTGATGGCTTCTACTTGGCT
Iba1	Iba1-F	ATCAACAAGCAATTCCTCGATGA
	Iba1-R	CAGCATTGCTTCAAGGACATA
IL-1 β	mu IL-1 β 610	CAGCTGGAGAGTGTGGATCCCAAGC
	mu IL-1 β FL	TAATGAAAGACGGCACACCCACCC
	mu IL-1 β A	CAGGAAGACAGGCTTGTGCTC
	mu IL-1 β S	GTGCTGTGCGACCCATATGAG
PPIA	PPIA F	GCGTCTSCTTCGAGCTGTT
	PPIA R	AAGTCACCACCCTGGCA
TNF- α	TNF- α S	TCTCATCAGTTCTATGGCCC

	TNF- α R	GGGAGTAGACAAGGTACAAC
--	-----------------	----------------------

3.9 Software

Tab. 3.9: Materialliste Software

Software	Hersteller
GraphPad Prism 8.3.0	GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA
Image Studio, Version 3.1	Li-Cor Biosciences, Bad Homburg, DE
ImageJ, Version 1.47v	National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA
Word 2016	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Zen 2 (blue edition)	Zeiss, Jena, DE
Zen 2008, Version 5.0	Zeiss, Jena, DE
Zotero 5.0.89	Corporation for Digital Scholarship, USA

4 Methoden

4.1 Tierversuche

4.1.1 Tiere

Die nachfolgenden Tierversuche wurden gemäß §8 des deutschen Tierschutzgesetzes in der Fassung vom 18. Mai 2006 durch das Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz genehmigt. Die Genehmigung liegt unter dem Aktenzeichen 23 177-07/G16-1-22 vor.

Für die experimentellen Vorhaben wurden 40 männliche Mäuse des genetischen Wildtyps C57BL/6N (JANVIER LABS, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) mit einem Gewicht von 20 – 25 g verwendet.

4.1.2 Haltung

Während des Experiments sind die Tiere ab 24 h vor dem Versuchsbeginn in Einzelhaltung untergebracht. In der sonst obligatorischen Gruppenhaltung ist sonst damit zu rechnen, dass sich die Mäuse gegenseitig die Operationsnähte anfressen und es zu unerwünschten Komplikationen kommt. Gemäß der geltenden EU-Richtlinie 2010/63/EU und der institutionellen Richtlinie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz muss die Versuchstierhaltung die natürlichen Bedürfnisse durch nachfolgende Maßnahmen erfüllen. Die Haltung erfolgt in transparenten Kunststoffkäfigen vom Typ II. Die Käfige haben eine Mindesthöhe von 12 cm und eine Grundfläche von etwa 330 cm². Zur Käfigausstattung gehören entkeimtes Holzeinstreu, Papiertücher für den Nestbau, ein Kunststoffröhrchen und Zugang zu Futter und Wasser ad libitum. Die wassergefüllte Trinkflasche und das pelletierte Alleinfuttermittel werden in einem Gitter über dem Käfig angeboten. Davon abweichend werden postoperativ einzelne Futterpellets im Wasser aufgeweicht um die Nahrungsaufnahme zu erleichtern.

Die Käfige sind stets in einem Tierschrank untergebracht, der konstante Umgebungsparameter gewährleistet. Gemäß den Empfehlungen der Gesellschaft für Versuchstierkunde (Society for Laboratory Animal) (Böhme et al. 2007) beträgt die Raumtemperatur im Schrank 22 °C und eine Luftfeuchtigkeit von ca. 55 %. Für den natürlichen Tag-Nacht-Rhythmus der Versuchstiere sorgt ein künstliches 12 h Hell-Dunkel-Regime.

4.1.3 Studiendesign

Die $n = 40$ Tiere sind insgesamt in vier Gruppen eingeteilt. Zunächst werden sie in zwei Kohorten randomisiert, von denen eine Kohorte $n = 16$ eine Scheinoperation (Sham, siehe Abschnitt 4.1.4.3) und die andere $n = 24$ ein kontrolliertes SHT das sog. CCI (siehe Abschnitt 4.1.4.2) rechtsseitig erhält. Allen Mäusen werden während des Eingriffs $4 \mu\text{l}$ einer Lösung intrazerebroventrikulär (i.c.v.) injiziert. Dabei erfolgt die Injektion in der CCI-Gruppe unmittelbar vor dem SHT. Innerhalb der Kohorten erhält jeweils die eine Hälfte der Tiere, die als Kontrollgruppe fungieren, eine 100 % DMSO-Lösung (Gruppe: CCI Vehikel, Sham Vehikel) während die andere Hälfte ATRA $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ in 100 % DMSO (Gruppe: CCI ATRA, Sham ATRA) gelöst bekommt (siehe Tab. 4.1). Durch die Kontrollgruppen sollen mögliche Wirkungen des DMSO, das als Trägerlösung (sog. Vehikel) für die ATRA verwendet wird, ausgeschlossen werden. 24 h nach der Operation erfolgt die Euthanasie und die anschließende Probenentnahme.

Tab. 4.1: Versuchsgruppen

$n = 40$	Controlled Cortical Impact (CCI)	Scheinoperation (Sham)
ATRA	$n = 12$	$n = 8$
DMSO (Vehikel)	$n = 12$	$n = 8$

Um die zerebralen Läsionen auch neuropathologisch erfassen zu können, müssen alle Tiere vor der Operation und prä mortal ein neurologisches Scoring durchlaufen. Die in dieser Studie dazu verwendeten Testverfahren werden im Absatz 4.2.1 erläutert.

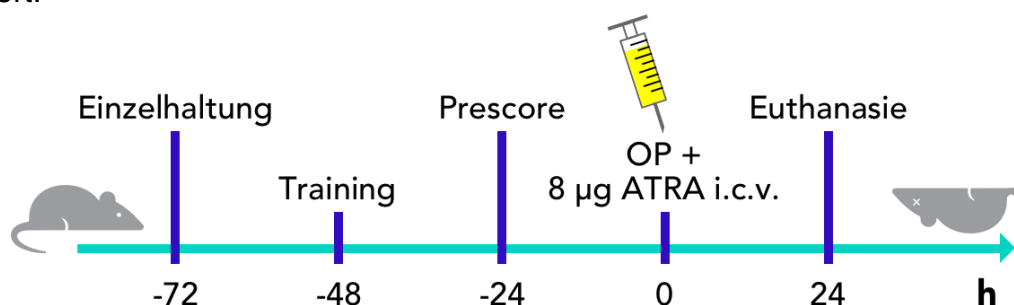


Abb. 4.1: Timeline des Studiendesigns

Die Versuchsdurchführung beginnt mit dem Separieren in Einzelhaltung. Danach erfolgen in 24-stündigen Abständen die unterschiedlichen Phasen der Versuchsdurchführung.

Die Tiere erhalten zwei Tage vor dem operativen Eingriff ein Training, bei dem sie die Testverfahren kennen lernen. So sollen Verfälschungen der Ergebnisse durch Stress oder Angstreaktion der Tiere in der für sie ungewohnten Situation minimiert werden. Etwa 24 h vor der Operation wird der für spätere Vergleiche herangezogene Pre-Score erfasst. Der prämortale Score wird unmittelbar vor der Euthanasie ermittelt (siehe Abb. 4.1).

4.1.4 Operationsdurchführung

4.1.4.1 Anästhesie

Vor Beginn der Narkotisierung wird eine Gewichtserhebung durchgeführt und der Gesundheitszustand der Tiere im Hinblick auf eine OP-Eignung kontrolliert. Zur Einleitung der Inhalationsnarkose werden die Tiere unter einen Trichter gesetzt, der über einen Schlauch mit einem Vapor verbunden ist. Der Vapor leitet mit einem konstanten Flow von 0,5 l/min ein regulierbares Sauerstoff-Gas-Gemisch bestehend aus Frischluft, 1,0 l/min Sauerstoff und 4 Volumenprozent (Vol.-%) Isofluran in den Trichter. Die Einleitung der Narkose erfolgt nach etwa 45 – 60 s.

Für den Eingriff werden die Mäuse in einen stereotaktischen Rahmen gespannt. Dazu werden die Incisivi in einer speziell an die Tiere angepasste Gasmasken eingehängt (siehe Abb. 4.2.). Über die Maske wird das Tier weiter mit konstantem Sauerstoff-Gas-Gemisch versorgt. Für die Aufrechterhaltung der Anästhesie wird die Isoflurankonzentration auf ca. 2,1 Vol.-% reduziert.

Um den neuroprotektiven Effekt der Hypothermie auszuschließen, liegt die Maus während der gesamten Operation auf einer Wärmeplatte, mithilfe derer eine konstante Körpertemperatur von 36,5 °C sichergestellt ist. Über eine Rektaltemperatursonde wird die Körperkerntemperatur perioperativ überwacht. Über den erloschenen Zwischenzehenreflex wird die ausreichende Narkosetiefe überprüft. Nach den operativen Eingriffen verbleiben die Tiere während der Aufwachphase für eine Stunde in einem 33 °C temperierten Inkubator der eine Luftfeuchtigkeit von ca. 35 % hat.

4.1.4.2 Controlled Cortical Impact

Zur Reduktion interindividueller Schwankungen während des operativen Eingriffs wird der Kopf der Maus zusätzlich mit Schrauben des Stereotakts fixiert. Während der gesamten Durchführung ist der Operateur verblindet. Auf diese Weise wird

maximale Reproduzierbarkeit gewährleistet.

Zunächst erfolgt die Präparation des Operationssitus. Im ersten Schritt erfolgt mit einer Schere die Hautinzision entlang der *Sutura sagittalis*. Mit dem etwa 1,5 cm langen Hautschnitt zwischen der *Sutura lamboidea* und der *Sutura coronalis* wird das Periost des knöchernen Schädeldachs auf der rechten Seite freigelegt. Mit einem Wattetupfer wird die Knochenhaut auf der freipräparierten Fläche entfernt.

Vor der Ausführung des SHT werden 4 µl der Wirkstofflösung bzw. der wirkstofffreien Trägersubstanz entsprechend der Randomisierung intrazerebroventrikulär appliziert. Dazu wird zunächst mit einem Mikrobohrer ein kleiner Zugang 1 mm rechts lateral und 0,5 mm okzipital vom *Bregma* durch das knöcherne Schädeldach geschaffen. Um die Verblindung zu gewährleisten, erfolgt in einem separaten Raum und damit nicht einsehbar für den Operateur die Vorbereitung der Spritzen. Die aufgezogene Spritze wird in den Mikromanipulator eingehängt. Dieser stellt sicher, dass die genau definierte Eindringtiefe von 1,6 mm ab der Dura und der konstante Winkel der Nadel bei allen Eingriffen identisch sind. Die Applikationsnadel verbleibt mindestens drei Minuten lang im Ventrikel, um mögliches Austreten der Lösung aus dem Injektionskanal zu vermeiden. Im Anschluss wird die Bohröffnung mit dem Histoacryl Gewebekleber verschlossen.

Die Kraniotomie wird im Anschluss mithilfe des Mikrobohrers über der rechten Hemisphäre durchgeführt. Dabei nimmt man die oben genannten Schädelnähte und den rechten Jochbogen (*Arcus zygomaticus*) als Begrenzung für das rechteckige Knochenfenster. Die mediane Seite des Rechtecks bleibt intakt, damit die Sagittalnaht als Scharnier für das ausgefräste Knochenfragment fungiert. Die intrakraniellen Strukturen werden nicht weiter präpariert.

Für die Durchführung des SHT wird der Bolzen mit einem Durchmesser von 3 mm des druckluftbetriebenen CCI-Impactors mithilfe des Mikromanipulators so auf der Hirnoberfläche positioniert, dass die Kontaktfläche plan und senkrecht auf dem Kortex aufliegt, ohne das Parenchym dabei einzudrücken (siehe Abb. 4.2). Die Kontusion erfolgt automatisch mit einer Geschwindigkeit von 6 m/s, einer Eindringtiefe von 1,5 mm und einer Aufpralldauer von 200 ms. Bei allen Schritten des CCI ist darauf zu achten, dass die *Dura mater* intakt bleibt. Anschließend wird das Knochenfragment wieder repositioniert und mit einem Histoacryl Gewebekleber fixiert. Die Kopfhaut wird mit zwei bis drei Einzelkopfnähten vernäht.

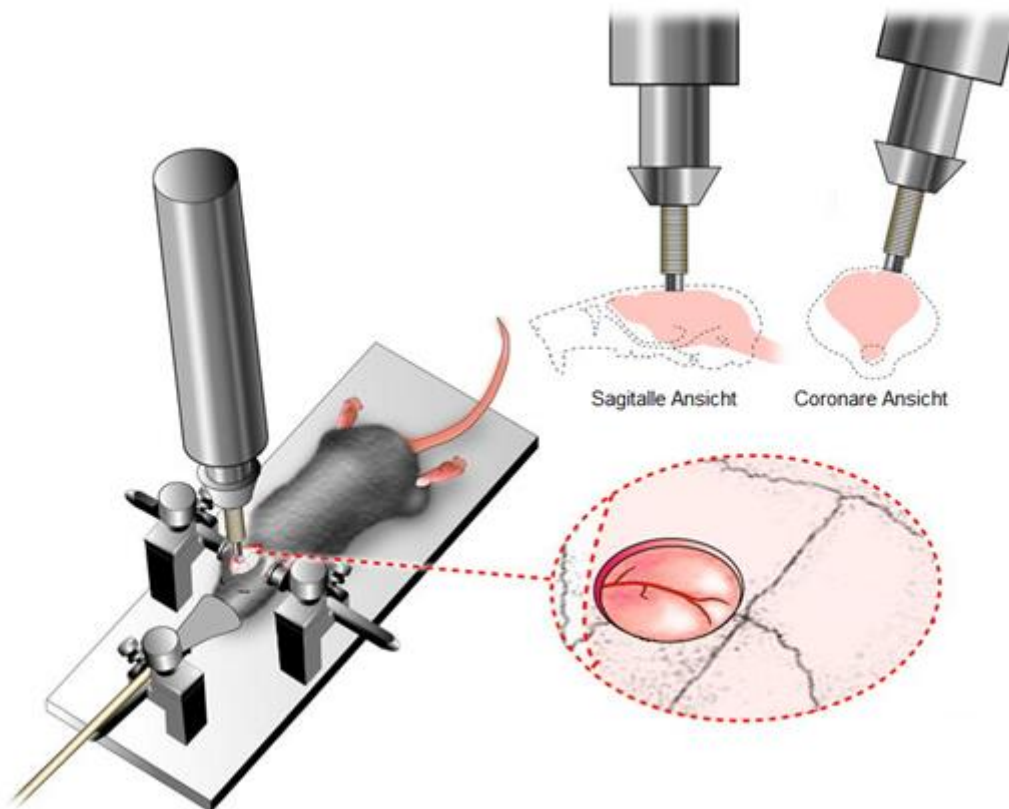


Abb. 4.2: Controlled Cortical Impact

Bild modifiziert nach Onyszchuk et al., 2007. Graphische Darstellung des intraoperativen Aufbaus eines CCI-Eingriffs.

4.1.4.3 Sham

Die Kontrollgruppe erhält einen Scheineingriff (*Sham operated*, deutsch: scheinoperiert, kurz Sham). Dieser umfasst alle in Abschnitt 4.1.4.2 beschriebenen Schritte ausgenommen der Kraniotomie und des Einsatzes des CCI-Impactors. Stattdessen verbleiben die Tiere in einer etwa 15-minütigen Narkose zur besseren Vergleichbarkeit der Gruppen in der nur eine leichte Manipulation an der Oberfläche des verschlossenen Kraniums mittels einer Pinzette erfolgt.

4.1.5 Euthanasie und Gewebeentnahme

24 Stunden nach den operativen Eingriffen erfolgt die Tötung mittels Dekapitation. Dazu werden die Tiere mit 4 Vol.-% Isofluran wie in Abschnitt 4.1.4.1. beschrieben in tiefe Narkose versetzt. Unmittelbar vor der Anästhesie finden die neurologischen Verhaltensuntersuchungen (siehe Abschnitt 4.2.1) statt.

Für die Entnahme des Gehirns werden zunächst die Kopfhaut und Muskulatur des

Craniums mittels einer Schere entfernt. Der Schädel wird entlang der Sagittalnaht beginnend am *Foramen magnum* von okzipital nach rostral eröffnet und die beiden Schädelkalottenhälften nach lateral aufgeklappt. Anschließend wird das Gehirn vorsichtig von der *Dura mater*, den Hirnnerven und dem Rückenmark freipräpariert und mit einem Spatel herausgelöst. Das Gewebe wird dann sofort auf pulverisiertes Trockeneis überführt und nach dem Schockgefrieren bei -20 °C gelagert.

Die Plasmagewinnung erfolgt parallel zur Gehirnentnahme. Der dekapitierte Körper wird über ein 50-ml-Falkonröhrchen gehalten, um das auslaufende Blut aufzufangen. Dem Falconröhrchen ist 30 µl Heparin zugesetzt, damit die Hämostase unterbunden wird. Die Zentrifugation der gewonnenen Probe erfolgt anschließend bei 4 °C und 3800 rpm 8 min lang. Der entstandene zellfreie Überstand (je nach Probe 160 – 250 µl) muss sofort nach dem Zentrifugieren vorsichtig in ein Eppendorfgefäß überführt werden. Vor der endgültigen Lagerung des Plasmas bei -80 °C wird die Probe auf Trockeneis tiefgefroren.

4.2 Auswertung des Schädel-Hirn-Traumas

Im Nachfolgenden werden die im Rahmen dieser Dissertation angewandten Verfahren erläutert, die dazu dienen, das Ausmaß des SHT qualitativ und quantitativ auf verhaltensneurologischer und zellulärer Ebene zu erfassen.

4.2.1 neurologische Verhaltensuntersuchung

Die folgenden Scoring-Systeme dienen der Ermittlung motorischer und neurologischer Defizite nach induziertem SHT. Für jede Maus wird ein individueller Pre-Score 24 h vor der Operation und unmittelbar vor der Euthanasie der zum späteren Vergleich herangezogene prämortale Score erhoben (siehe Tab. 4.2).

4.2.1.1 Rotarod

Bei diesem Testverfahren wird die motorische Koordination und Kondition der Versuchstiere geprüft (Jones und Roberts, 1968). Dazu wird die Maus auf eine rotierende Walze mit einem Durchmesser von 3 cm gesetzt. Diese ist in einer Höhe von 15 cm angebracht und an den Seiten durch Blenden begrenzt, sodass das Tier nur in eine Richtung laufen kann. Die Walze beschleunigt gleichmäßig innerhalb von fünf Minuten von 4 Umdrehungen/min auf 40 Umdrehungen/min. Die automatische Zeiterfassung stoppt, sobald das Tier herabfällt (siehe Abb. 4.3). Jedes Scoring

durchlaufen die Tiere zweimal im Abstand von mindestens 20 min. Bei der Auswertung werden dann der Mittelwert und die beste Zeit genommen.



Abb. 4.3: Rotarod-Versuchsaufbau

4.2.1.2 Neurological Severity Score

Der Neurological Severity Score (kurz Neuroscore), erfasst neben den motorischen vor allem die neurologischen Defizite, womit er das Rotarod um diesen Bereich ergänzt (Chen et al., 1996). Er besteht aus sechs Stationen, in denen je nach Leistung und gezeigtem Verhalten 0 bis maximal 3 Punkte vergeben werden (siehe Tab. 4.2). Null Punkte erhält ein Tier, wenn es keine Auffälligkeiten zeigt. Je mehr Defizite eine Maus zeigt, desto höher ist ihr Score. In der Summe aller Kategorien kann ein Tier maximal 15 Punkte erreichen. Jedes Tier durchläuft die Stationen, in der nachfolgend genannten Reihenfolge.

„Exit from circle“: Die Maus wird in die Mitte eines Kreises mit einem Durchmesser von 24 cm gesetzt. Dem natürlichen Verhalten entsprechend soll die Maus Erkundungs- und Suchverhalten zeigen und den Kreis verlassen. Gleichzeitig wird das Gangbild mit bewertet.

„Reflexe“: Während sich die Maus noch im Kreis befindet, wird unmittelbar hinter dem Tier laut in die Hände geklatscht. Erschrecken ist die erwartete physiologische Reaktion und wird mit null Punkten bewertet.

Tab. 4.2: Neuroscore Punktebewertung

Station	Kriterien	Punkte	Pre OP	Prämortal
Exit from circle				
	< 30 sec	0		
	30-60 sec	1		
	61-119 sec	2		
	> 2 min	3		
Reflexe				
Schreck-Reflex	vorhanden	0		
	fehlt	1		
General behavioral deficit				
Suchverhalten	vorhanden	0		
	fehlt	1		
Geradeaus laufen	vorhanden	0		
	fehlt	1		
Koordination				
Balkenlauf 3 cm	Score	0-2		
Balkenlauf 2 cm	Score	0-2		
Balkenlauf 1 cm	Score	0-2		
Beurteilung: 0 Punkte: normale Bewegung / keine Beeinträchtigung 1 Punkt: Fehlritte / unsichere Bewegungen 2 Punkte: Setzt sich hin / keine Vorwärtsbewegung / fällt runter				
Gleichgewicht				
Quadratischer Stab	Score	0-1		
Runder Stab	Score	0-1		
Beurteilung: 0 Punkte: Kann den Stab mit vier Pfoten für 10 s greifen 1 Punkt: mind. eine Pfote hängt runter				
Motorisches Defizit				
Parese	fehlt	0		
	eine Gliedmaße	1		
	Hemiparese	2		

„*General behavioral deficit*“: Während der ersten Untersuchung wird auch der allgemeine Eindruck, den das Tier vermittelt, beurteilt. Insgesamt sollte ein gesundes Tier in der Lage sein gerade aus zu laufen und Erkundungsverhalten zeigen.

„Koordination“: Das Versuchstier läuft zur Beurteilung in drei Schwierigkeitsstufen über einen 50 cm langen Holzbalken. Um die möglichen motorischen Ausfälle, die linksseitig zu erwarten sind, besser beurteilen zu können, muss die Maus bei dieser Aufgabe von rechts nach links laufen. Ein gesundes Tier schafft es den 3 cm, 2 cm und 1 cm breiten Balken ohne Stehenbleiben, Fehltritte oder gar Herunterfallen zu überwinden.

„Gleichgewicht“: Dieser Test erfolgt, indem sich die Maus zunächst an einem quadratischen Stab mit allen vier Gliedmaßen für mind. 10 s halten soll. Der Schwierigkeitsgrad wird im zweiten Schritt durch die Nutzung eines runden Stabs erhöht. Diese Aufgabe fällt den Tieren ohne die Kanten des quadratischen Stabs schwerer.

„Motorisches Defizit“: Dabei wird das Vorhandensein von Paresen bewertet, die man während des gesamten Testdurchlaufs beobachten kann.

4.2.2 Histologie

4.2.2.1 Kryosektion

Mithilfe der Kryosektion bereitet man das entnommene Hirngewebe für die histologische Untersuchung auf. Gleichzeitig werden Proben für molekularbiologische und proteinanalytische Verfahren gewonnen.

Im ersten Schritt muss dafür das Gehirn mit dem *Cerebellum* voran senkrecht auf dem Objektisch mit Tissue Tec Gewebekleber fixiert werden. Nachdem das Gehirn in der Haltefläche des Kryostats in der Koronarebene parallel zur Klinge ausgerichtet wurde, wird es komplett mit dem Einbettmedium ummantelt. Bei -20 °C wird das Gehirn ab *Bregma* +3,14 mm in 16 Schnittebenen im Abstand von 500 µm unterteilt. Zu Beginn jeder Ebene werden sechs 12 µm dicke Koronarschnitte angefertigt, sodass am Ende pro Tier sechs Serien mit je sechs Objektträgern mit den Ebenen 1 – 10 und 11 – 16 vorliegen. Bis zur weiteren Verarbeitung werden die Objektträger bei -20 °C gelagert.

Parallel dazu werden zwischen den Ebenen, die das Schadensareal enthalten, sechs

(*Bregma* + 0,64 mm) und dreizehn (*Bregma* - 3,36 mm) Quadrantentrimmschnitte gewonnen. Dazu werden im Anschluss an die 12- μ m-Schnitte in diesen Ebenen sechs sog. Trimmschnitte mit je 40 μ m Dicke angefertigt. Die entnommenen Schnitte werden deckungsgleich übereinandergelegt und zusammengesammelt. Bei allen Trimmschnitten wird das ventrale Drittel des Schnitts verworfen, da zum späteren Zeitpunkt nur der Schadensbereich analysiert werden soll. Pro Gehirn wird das Material getrennt nach der ipsi- und kontralateralen Seite bei -80 °C in Kryoröhrchen aufbewahrt.

4.2.2.2 Nissl-Färbung

Die Kresylviolett-Färbung (sog. Nissl-Färbung) ist eine klassische Färbemethode, um neuronales Gewebe darzustellen und mit deren Hilfe man das Kontusionsvolumen quantitativ erfassen kann. Der Hauptfarbstoff Kresylviolett färbt in vitalen Zellen anionische Strukturen wie die DNA oder RNA, die sich vor allem im Zellkern oder der Nissl-Substanz (entspricht dem ribosomenbesetzten endoplasmatischen Retikulum) befinden, kräftig blau-violett an. Das Soma, die Dendriten und die Axone selbst werden schwach blau angefärbt. Apoptotische oder nekrotische Areale lassen sich demgegenüber leicht abgrenzen, da sie kaum bis keine basophile Strukturen mehr enthalten und sich somit nur wenig Farbstoff in diesem Gebiet anlagert.

Die Gefrierschnitte trocknen zuerst bei Raumtemperatur für 60 min. Nach der Reinigung von überflüssigem Einbettmedium für 2 min in 70%igem Ethanol werden sie im Anschluss für 10 min in die Kresylviolett-Färbelösung getaucht. Durch das mehrmalige Spülen der Objektträger in destilliertem Wasser lässt sich die überschüssige Färbelösung entfernen. Die Dauerkonservierung der Schnitte erfolgt durch eine Entwässerung, dazu ist das Zuführen der Objektträger in eine aufsteigende Alkoholreihe erforderlich. Die Objektträger werden jeweils zwei Mal für kurze Zeit in 70%-, 96%- und 100%-Ethanollösung getaucht. Anschließend wird das Gewebe zuerst für 5 min und dann für 2 min in Roti-Histol fixiert. Als letzter Schritt erfolgt die Versiegelung mit Roti®-Histokitt und einem Deckglas.

4.2.2.3 IgG-Färbung

Die IgG-Färbung ist eine immunhistologische Färbung. Dabei macht man sich die Eigenschaft von Antikörpern (Ak) zu Nutze, gezielt an die für sie spezifischen Strukturen, den Antigenen (Ag) zu binden. Diese Ag-Ak-Reaktion lässt sich mithilfe verschiedener Methoden entweder direkt oder indirekt sichtbar machen. Bei dem

direkten Nachweis verwendet man markierte Primär-Ak. Diese Markierungen können zum einen Enzyme sein, die in einer späteren Reaktion ein Farbsubstrat umwandeln und so die Ag-Ak-Reaktion sichtbar machen, oder zum anderen Fluorophore, die mit einem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden können. Bei der indirekten Methode verwendet man im ersten Schritt unmarkierte Primär-Ak. Im zweiten Schritt setzt man Sekundär-Ak ein, die wiederum markiert sind und gegen die Spezies des Primär-Ak gerichtet sind. Die indirekte Methode hat den Vorteil der Signalverstärkung, da an einen Primär-Ak mehrere Sekundär-Ak binden können. Mit der IgG-Färbung weist man IgG-Ak im Gewebe nach. Unter physiologischen Bedingungen sorgt eine intakte Blut-Hirn-Schranke dafür, dass die im Blut zirkulierenden IgG-Ak nicht ins Hirnparenchym übertreten können. Eine Permeabilitätssteigerung der Blut-Hirn-Schranke ist eine der zahlreichen Pathologien eines SHT, die man mit diesem immunhistochemischen Verfahren nachweisen kann.

Vorab müssen die Objektträger nach dem Auftauen für 30 min luftgetrocknet werden. Bei dieser Färbung erfolgt für jedes Tier nur die Untersuchung der Schnittebenen 11 und 12. Im ersten Schritt wird das Gewebe vor der eigentlichen Färbung auf dem Objektträger für 10 min in 4%igem PFA fixiert werden, das im Anschluss dreimalig im 5-minütigen Waschvorgang in phosphatgepufferter Salzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS) wieder entfernt wird. Um die späte enzymatische Farbreaktion durch die im Gewebe ubiquitär vorhandene endogene Peroxidase durch eine falsch positive Reaktion nicht zu verfälschen, muss diese mit 3%igem Wasserstoffperoxid für 3 min lang blockiert werden. Die Blockierlösung wird wieder mit PBS im 5-minütigen Waschvorgang herausgewaschen. Anschließend erfolgt die Inkubation mit dem biotinylierten Primär-Ak für 90 min bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer. Anschließend wird der Objektträger wieder drei Mal für jeweils 5 min in PBS gewaschen. Um die Ag-Ak-Bindung sichtbar zu machen, werden nun die Schnitte für 30 min mit dem Avidin-Biotin-Komplex (ABC Kit) behandelt. Das verwendete Kit besteht aus Reagenz A, dem Avidin, und Reagenz B, der biotinylierten Meerrettichperoxidase. Avidin ist ein tetrameres Glykoprotein, das eine hohe Affinität zu Biotin aufweist, wodurch es eine Bindung zwischen dem an Biotin gekoppelten Ak und der Meerrettichperoxidase ermöglicht. Der AB-Komplex muss im Anschluss zweimalig für 5 min in PBS ausgewaschen werden. Im letzten Schritt erfolgt die Farbreaktion, bei der ein sichtbares unlösliches braunes Präzipitat entsteht. Diese entsteht durch das Zusetzen vom Diaminobenzidin, dem Substrat der Meerrettichperoxidase, auf den Objektträger für 75 s. Die Reaktion wird anschließend durch

Auswaschen in PBS unterbrochen.

Um die Schnitte dauerhaft haltbar zu machen, werden sie in einer aufsteigenden Isopropanolreihe für je 2 min in 70%-, 80%- und 100%-Lösung entwässert bevor sie zweimalig für 5 min im Roti-Histol fixiert werden. Das Eindecken erfolgt mithilfe des Roti-Histokitts® und Deckgläsern.

4.2.2.4 Volumetrie

Die Ausmessung des Kontusionsvolumens (V) erfolgt sowohl bei den Kresylviolett-Schnitten wie auch bei den IgG-Schnitten. Mithilfe der ZEN 2.3 lite Software werden alle 16 Ebenen der Nissl-Färbung bzw. nur die Ebenen 11 und 12 der immunhistologischen Färbung vermessen. Zuvor werden die Gewebeschnitte mithilfe eines Lichtmikroskops und einer Kamera digitalisiert. Für die spätere Auswertung der Nissl-Färbung wird zunächst die Gesamtfläche (A) jeder Ebene der ipsiläsionalen und contraläsionalen Hemisphäre getrennt voneinander bestimmt. Danach wird für jede Seite einzeln nur das vitale Areal vermessen. Die Kontusionsfläche für eine Ebene berechnet sich aus der Differenz der Gesamtfläche und des vitalen Bereichs (siehe Abb. 4.4). Bei der späteren Auswertung der IgG-Schnitte verwendet man den Mittelwert der Flächen der beiden Ebenen für die beiden Hemisphären getrennt. Bei den Kresylviolett-Schnitten berechnet man das Kontusionsvolumen für das gesamte Gehirn anhand folgender Formel:

$$V = \sum_1^{16} A_x * 500 \mu m$$

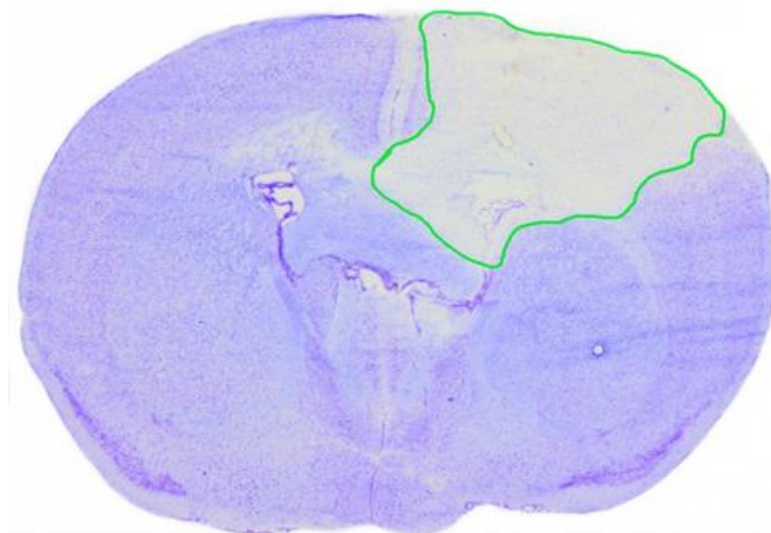


Abb. 4.4: Nissl-Färbung, Maushirn in coronarer Schnittführung

Auf dem Hirnschnitt ist die entfärbte Kontusionsfläche (grün umrandet) deutlich zu erkennen

4.2.3 Molekularbiologische Untersuchung

4.2.3.1 Ribonukleinsäure-Extraktion

Mithilfe der RNA-Analyse lässt sich die Genexpression eines Gewebes untersuchen. Anhand der vorhandenen Menge an mRNA lassen sich Rückschlüsse auf die Aktivität der dazugehörigen Gene ziehen. Die Extraktion aus den ipsilateralen Trimm-schnitten erfolgt mit dem *Qiagen RNeasy Plus Universal Kit*.

Jeder Probe werden 0,9 ml Qiazol-Reagenz und eine Edelstahlkugel für die mechanische Zerkleinerung beigelegt, um anschließend die Gewebelyse im Mastermill zweimalig für 1 min bei 20 Hz durchzuführen. Das Qiazol-Reagenz enthält zusätzlich RNase-Inhibitoren, um eine RNA-Zersetzung durch die gewebeeigenen RNasen zu verhindern. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur werden zunächst 100 µl gDNA-Eliminator hinzugegeben, um die genomische DNA zu eliminieren, und anschließend 180 µl Chloroform. Nach einer Inkubationszeit von 2 bis 3 min entsteht mithilfe des Chloroforms nach einer 15-minütigen Zentrifugation bei 4 °C und 12000 g eine Phasentrennung im Homogenisat. Die obere wässrige Phase enthält die RNA und wird vorsichtig abpipettiert und mit 600 µl 70%igem Ethanol vermischt. Die übrigen Phasen werden verworfen. Das RNA-Ethanol-Gemisch wird anschließend auf eine sog. RNeasy-Mini-Spin-Säule gegeben, deren Silikatmembran beim Durchlaufen der Lösung die RNA selektiv rausfiltert. Dabei begünstigt das Ethanol das Anheften der RNA an der Membran. Das geschieht bei einer kurzen Zentrifugation der Säulen für 15 s bei 8000 g. Um mögliche Kontaminationen der Membran zu entfernen, wird die Membran zunächst mit 700 µl RWT- und anschließend zwei Mal mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen, indem die Pufferlösungen auf die Säulen pipettiert und anschließend erneut für 15 s abzentrifugiert wird. Vor der sog. Eluierung, dem Herauswaschen der RNA aus der Membran, wird die Säule für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit in der Zentrifuge getrocknet. Der Durchlauf wird bei allen bisherigen Schritten verworfen. Im letzten Schritt wird durch Zugabe von 40 µl RNase-freiem Wasser direkt auf die Membran die RNA aus der Säule in ein frisches Auffangröhrchen durch einmaliges Zentrifugieren für 1 min bei 8000 g eluiert. Bis zur weiteren Untersuchung wird die RNA bei -80 °C gelagert.

Vor der weiteren Analyse der RNA muss zunächst deren Konzentration und Reinheitsgrad im Eluat photometrisch bestimmt werden. Die optische Dichte wird bei 260 nm, 280 nm und 230 nm Wellenlänge gemessen. Nukleinsäuren haben ein

Absorptionsmaximum bei 260 nm und Proteine ihr Absorptionsmaximum bei 280 nm. Deren Quotient ist ein Maß für den Reinheitsgrad der Probe und sollte zwischen 1,8 – 2,0 liegen. Die in den verwendeten Reagenzien enthaltenen Salze und Lösungsmittel haben ein Absorptionsmaximum bei 230 nm und der mit der RNA gebildete Quotient sollte über 1,8 liegen. Beim kleineren Quotienten wäre sonst zu erwarten, dass es zu Interferenzen im Verlauf weiterer Untersuchungen zwischen den eingesetzten Reagenzien kommt.

4.2.3.2 cDNA-Synthese

Für die nachfolgende Polymerasekettenreaktion (PCR, siehe Abschnitt 4.2.3.3) muss zunächst die RNA, die in diesem Verfahren als Matrize dient, in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden (sog. reverse Transkription). Die Synthese der cDNA erfolgt mithilfe des *QuantiTect reverse Transcription Kit*. Da die RNA ein sehr fragiles Molekül ist, muss grundsätzlich während aller Arbeitsschritte auf Eis gearbeitet werden, um einen RNA-Abbau zu verhindern. Vor der eigentlichen reversen Transkription muss zunächst die genomische DNA (gDNA) aus den Proben eliminiert werden. Dazu werden zu 0,5 µg RNA jeder Probe 2 µl gDNA-Eliminationspuffer aus dem Kit zugesetzt und anschließend auf 14 µl Gesamtvolumen mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt. Nach achtminütiger Inkubation bei 42 °C kann das Gemisch ohne weitere Bearbeitung für die reverse Transkription weiterverwendet werden. Jeder Probe werden dann 6 µl Mastermix, bestehend aus 1/6 RTranskriptase, 1/6 RT-Puffer und 4/6 RT-Primermix zugesetzt, bevor man sie anschließend bei 42 °C für 30 min inkubieren lässt. Im letzten Schritt muss die reverse Transkriptase bei 95 °C für 3 min inaktiviert werden. Danach sind die Proben für die PCR verwendbar bzw. können bei -80 °C gelagert werden.

4.2.3.3 Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion

Um Rückschlüsse über die Genexpression zum Zeitpunkt der Probenentnahme ziehen zu können, ist die quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) die Methode der Wahl. Die PCR, die als Basis für die qRT-PCR dient, ist ein Verfahren, bei dem kleinste DNA-Mengen vervielfältigt werden können (Mullis et al., 1986). Das Prinzip besteht aus drei Schritten. Im ersten Schritt wird der DNA-Strang bei 95 °C denaturiert, wodurch zwei Einzelstränge entstehen. Die in der ersten Phase gelösten Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Einzelsträngen würden bei einem zu starken Abkühlen der Probe wieder Bindungen miteinander eingehen. Um dies zu

verhindern, wird die Probe im weiteren Verfahren je nach Arbeitstemperatur der verwendeten Ingredienzien nicht unter 55 – 72 °C heruntergekühlt. Im zweiten Schritt, der Annealingphase, werden spezifische Primer eingesetzt, die entsprechend ihrer komplementären Struktur nur an bestimmte Targets der DNA binden, womit sie den Startpunkt des zu vervielfältigenden DNA-Abschnitts für die Polymerase festlegen. Während der dritten Phase, der Elongationsphase, verbindet die DNA-Polymerase die sich komplementär an die Basen des Einzelstrangs anlagernden DNA-Nukleotide miteinander, wodurch wieder ein DNA-Doppelstrang entsteht. Bei dem Verfahren werden der Probe spezifische Primer, hitzestabile DNA-Polymerase und desoxygenierte Nukleotide zugesetzt. Thermocycler führen diese Schritte automatisch in 20 – 40 Zyklen durch.

Mit der qRT-PCR lässt sich eine quantitative Aussage zu der in der Probe vorhandenen DNA-Menge treffen. Dabei macht man sich die Möglichkeit zur Detektion von Fluoreszenzmission zu Nutze, indem man beim PCR-Verfahren Fluoreszenzfarbstoffe verwendet, die unspezifisch an DNA-Doppelstränge anlagern können. Alternativ verwendet man fluoreszenzfarbstoffmarkierte Hybridisierungssonden, die an gewünschte Targets binden. Die dabei gemessene Signalemission korreliert mit der in der Probe vorhandenen DNA-Menge. Dem PCR-Verfahren liegt ein exponentielles Wachstum der DNA-Menge zugrunde, dass sich in einer Kurve gegen die Anzahl der Zyklen auftragen lässt. Die Anfangsphase und die späte Plateauphase der Kurve werden nicht zur Analyse verwendet, sondern nur die exponentielle Phase. Die verwendete Software berechnet die in der Probe vorhandene DNA-Menge mithilfe der parallel ermittelten Standardkurve aus einer Lösung mit bekannter DNA-Menge. Neben den zu untersuchenden Genen wird immer auch ein sog. Housekeeping-Gen ermittelt, um die vorhandenen Proben darauf zu normalisieren. Dieses Gen zeichnet sich dadurch aus, dass es unabhängig von externen Einflüssen in konstanten Mengen in einer Zelle produziert wird. In dieser Studie wurde das Peptidylprolyl Isomerase A (PPIA) als Haushaltsgen verwendet.

Die Targets inklusive des Housekeeping-Gens werden im Doppelansatz auf eine 96-Well-Platte zusammen mit den Standardproben und jeweils vier Negativkontrollen, bestehend aus H₂O. Anschließend wird für jede Probe ein arithmetischer Mittelwert ermittelt.

In der vorliegenden Studie wurde das *ABsolute Blue qPCR SYBR Green Mix Kit* für

die folgenden Targets verwendet: Iba1, Casp3, GFAP, Bax, Hspb1 und TNF α . Bei den übrigen Targets wurden Hybridisierungssonden aus dem *LightCycler 480 Probes Master Kit* verwendet: BAG1, BAG3 und IL1 β . Entsprechend der Herstellerangaben wurde das in der Tabelle 4.3. aufgeführte Pipettierschema verwendet.

Tab. 4.3: Pipettierschema für qRT-PCR

SYBR-Green	Hybridisierungssonde
5 μ l SYBR-Green	5 μ l Kit-spezifischer Mastermix
0,25 μ l Primer F bzw. S	0,25 μ l Primer F bzw. S
0,25 μ l Primer R bzw. A	0,25 μ l Primer R bzw. A
3,5 μ l H ₂ O	0,5 μ l FL-Sonde
1 μ l Target-DNA	0,5 μ l Cy5-Sonde
	2,5 μ l H ₂ O
	1 μ l Target-DNA

4.2.4 Proteinanalyse

4.2.4.1 Proteinextraktion

Für die Extraktion werden die ipsilateralen Quadrantentrimmschnitte verwendet. Das Gewebe wird mit 150 μ l RIPA versetzt, der die Proben für 30 min auf Eis lysiert. Dem Puffer wird zuvor ein Protease-Inhibitor zugesetzt, um die enzymatische Zersetzung der Proteine zu verhindern. Während dieser Inkubationszeit muss alle 10 min jedes Eppendorfgefäß zwei bis drei Mal kräftig über eine Oberfläche mit Querrillen gezogen werden, damit die Proben homogenisieren. Im letzten Schritt müssen die zellulären Bestandteile von den Proteinen getrennt werden. Dazu wird das Lysat für 20 min bei 4 °C und 13000 rpm zentrifugiert. Der proteinreiche Überstand wird abpipettiert und bei -80 °C gelagert.

4.2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Mit Hilfe des *Lowry DC Protein Assays* von BioRad wird die exakte Proteinkonzentration jeder einzelnen Probe ermittelt. Für die Untersuchung müssen die Proben zunächst 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt werden, da sonst sehr kleine Volumina pipettiert werden müssten, was zu Ungenauigkeit in der Messung führen kann. Auf eine 96-Well Platte wird mit je 5 μ l eine Standardreihe mit defi-

nierten Proteinkonzentrationen von 0 µg/µl bis 3 µg/µl in 0,5 µg-Schritten aufsteigend im Doppelansatz aufgetragen. Danach werden ebenfalls im Doppelansatz je 5 µl der verdünnten Proben auf die Wellplatte pipettiert. In jedes Well kommen 25 µl einer Lösung dazu, die zu einem Teil aus Reagenz S und zu 49 Teilen aus Reagenz A besteht. Bevor die Proben lichtgeschützt für 12 min inkubieren, werden noch 200 µl Reagenz B zu jedem Ansatz hinzugefügt. Die enzymatische Reaktion führt zur Farbstoffbildung, deren Intensität von der Proteinkonzentration abhängig ist und die photometrisch bei 750 nm mittels *Glomax multidetection system* von Promega gemessen wird. Die genaue Proteinkonzentration der Proben wird in Excel über die gemessene Standardkurve berechnet.

4.2.4.3 IgG-Dot Blot

Die Methode des Dot Blots basiert auf der in Abschnitt 4.2.2.4 beschriebenen Ag-Ak-Reaktion und deren indirektem Nachweis. Damit bei diesem Verfahren der quantitative IgG-Anteil an den Proteinen in der Probe ermittelt werden kann, werden zunächst von jeder Probe 50 µg Protein auf 10 µl Gesamtvolumen mit RIPA-Puffer aufgefüllt. Danach werden von jeder Probe 2 µl der Puffer-Lysat-Lösung mit insgesamt 10 µg Protein auf eine Nitrocellulosemembran aufgetragen. Anschließend lässt man die Membran bei Raumtemperatur für 2 h trocknen. Um unspezifische Bindungsstellen für Ak zu blockieren, inkubiert man die Membran für 1 h auf der Schüttelplatte in TBST gelöster 5%iger Magermilch. Nach dem Schritt erfolgt die Inkubation des fluoreszenzmarkierten Sekundär-Ak in 2,5%iger Magermilch in TBST gelöst für eine Stunde lichtgeschützt bei Raumtemperatur. Als Primär-Ak dienen bei dieser Methode die endogenen IgG-Ak. Im letzten Schritt wird die Ak-Lösung zweimalig für 10 min in TBST auf der Schüttelplatte ausgewaschen. Die Signalstärke des fluoreszenzmarkierten Ak wird mit dem *Odyssey Detection System* von Li-Cor ermittelt.

4.2.4.4 Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese trennt man die Proteine ihrer Masse nach elektrophoretisch auf. Das Prinzip basiert darauf, dass ein elektrisches Feld über einem diskontinuierlichen Acrylamid-Gel, das als Trennmedium für die Proteine dient, geschaffen wird. Das im Ladepuffer enthaltene SDS spaltet die Proteine in ihre Untereinheiten auf und bildet mit den Proteinen negativ geladene Komplexe, sodass bei der Elektrophorese die Eigenladung der Proteine überdeckt wird und eine Auf-

trennung der Moleküle nur nach Masse erfolgt. In dem elektrischen Feld wandern die Proteine danach entsprechend ihrer Ladung zum Plus-pol. Das Acrylamid-Gel bildet eine Netzstruktur, die einen Siebeffekt auf die wandernden Proteine hat. Je größer ein Protein ist, desto länger braucht es, um das Gel zu durchwandern (Tiselius, 1957). Die Dichte des Netzes lässt sich über die Acrylamid-Konzentration steuern. Das SDS-Gel ist zusammengesetzt aus einem 7%igem Acrylamid-Sammelgel, das mit seiner grobporigen Struktur und dem neutralen pH-Wert von 6,8 dafür sorgt, dass sich die Proteine an der Grenze zum Trenngel sammeln und dem 10%igem Acrylamid-Trenngel, das einen pH-Wert von 8,8 hat und der eigentlichen Auftrennung dient. Die Gele werden entsprechend der in Tabelle 4.4 dargestellten Rezeptur hergestellt.

Tab. 4.4: Rezeptur zur Herstellung der Acrylamidgele

Ingredienzien	Sammelgel 10 %	Trenngel 10 %
Wasser	2,25 ml	4 ml
Sammel-/Trenngel	1,25 ml	2,5 ml
30%-Acrylamid	1,25 ml	3,25 ml
10%-APS	75 µl	150 µl
TEMED	3 µl	5 µl

Zwischen zwei Glasplatten wird zunächst das Gemisch für das Trenngel gegossen und dieses mit Isopropanol überschichtet, damit eine glatte horizontale Grenzfläche entsteht. Nach etwa 30 min ist das Gel ausgehärtet und das Isopropanol kann entfernt werden bevor das Sammelgel darüber gegossen wird. Um das spätere Beladen der Gele zu erleichtern, werden Kämmen in das noch flüssige Sammelgel gehängt, um sog. Taschen zu bilden. Bevor man die Geltaschen später belädt, müssen die Proben vorbereitet werden. Jeweils 25 µg Protein werden in einem Volumenverhältnis 3:1 (Probenvolumen:Ladungspuffer) mit einem 4-fach-Ladegspuffer versehen. Zur Denaturierung der Proteine, werden die Proben bei 95 °C für 5 min im Thermoblock inkubiert. Nach dem Abkühlen können die Taschen der Gele beladen werden. Dazu werden die Gele in die Elektrophoresekammer eingehängt und die Kammer vollständig mit Laufpuffer aufgefüllt. Zusätzlich zu den Proben wird auch ein Prestained-Protein-Marker in das Gel geladen, um später die

aufgetrennten Banden einer Größe zuordnen zu können. Die Elektrophorese läuft unter einer Stromstärke von 0,04 Ampere für 30 min, bis sich die Proteine vollständig an der Grenze zum Trenngel gesammelt haben und anschließend für weitere 55 min bei 0,05 Ampere.

4.2.4.5 Westernblot

Der Westernblot findet direkt im Anschluss an die Gelelektrophorese statt und wird dazu verwendet, die nach Masse aufgetrennten Proteine spezifisch mithilfe der Ag-Ak-Reaktion zu identifizieren. Dazu muss zunächst ein Transfer der Proteine aus dem Gel mithilfe einer erneuten Elektrophorese auf eine Trägermembran erfolgen. In dem elektrischen Feld wandern die negativgeladenen Proteine aus dem Gel Richtung Anode, auf deren Seite sich die Nitrozellulosemembran befindet (Burnette, 1981). Man verwendet für dieses Verfahren ein sog. Tank-Blot-System, bestehend aus einer Blotkammer, die vollständig mit Blotpuffer gefüllt wird, jeweils einer Kathoden- und Anodenplatte und einer dazwischenliegenden Kassette, in die ein sog. Sandwich eingelegt wird. Das Sandwich wird wie folgt luftblasenfrei in einem Blotpufferbad zusammengesetzt:

Schwamm – zwei Filterpapiere – Acrylamidgel (mit zuvor abgetrenntem Sammelgel)
– Nitrozellulosemembran – zwei Filterpapiere – Schwamm

Der Transfer ist bei einer konstanten Stromstärke von 380 mAmpere nach etwa 90 min beendet. Während des Verfahrens muss die Kammer mit Eis gekühlt werden. Anschließend wird die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur in 5%igem BSA in TBS gelöst inkubiert, damit die freien Proteinbindungsstellen blockiert werden. Um die zu detektierenden Proteine nachzuweisen wird anschließend der Primär-Ak auf die Membran gegeben, der über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wird die Membran zunächst zweimalig für jeweils 10 min in TBST gewaschen, bevor der Sekundär-Ak für eine Stunde bei Raumtemperatur auf die Membran gegeben wird. Bevor das Fluoreszenzsignal gemessen werden kann, muss im letzten Schritt der Sekundär-Ak erneut zweimalig für 10 min in TBST gewaschen werden. Die Detektion des fluoreszierenden Sekundär-Ak wird mithilfe des *Odyssey Detection Systems* von Li-Cor durchgeführt.

In dieser Studie wurden neben dem α -II-Spektrin auch das Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) Protein untersucht, das als Haushaltsgen zur Normalisierung bei der statistischen Auswertung Verwendung fand.

4.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und Anfertigung der Graphen erfolgte mit Hilfe der GraphPad Prism 8.3.0-Software. Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm SEM (*Standard error of the mean*) angegeben. Jeder Datensatz wurde auf Normalverteilung überprüft mithilfe des Shapiro-Wilks-Tests. Durch einfaktorielle bzw. zweifaktorielle Varianzanalyse, die sog. *One Way* oder *Two Way analysis of variance (ANOVA)*, wurde die Signifikanz ermittelt. Bei den normalverteilten Datensätzen wurde der Holm-Šídák-Post-hoc-Test für den multiplen Vergleich angewandt, während die nicht-normalverteilten Datensätze nach Kruskal-Wallis getestet und durch Dunn-Test beim multiplen Testen korrigiert wurden. $p < 0,05$ wurde als signifikant gewertet. Beim Vergleich von nur zwei Gruppen wurde in dem Fall einer Normalverteilung der Daten der t-Test zu einem Signifikanzniveau von $\alpha = 5\%$ angewandt. Die Kennzeichnung für die Graphen erfolgte wie folgt: $p < 0,05$ mit *, $p < 0,01$ mit ** und $p < 0,001$ mit ***. Werte zwischen 0,05 – 0,1 wurden als Trend gewertet.

5 Ergebnisse

Die Darstellung der Ergebnisse der in Abschnitt 4 beschriebenen Untersuchungen erfolgt im Folgenden graphisch unter Angabe des Mittelwerts \pm Standardfehler (SEM) und der individuellen Werte.

5.1 Gewichtsverlust und neurologische Verhaltensuntersuchung

5.1.1 Gewichtsentwicklung

Das Fressverhalten der Tiere kann als indirekter Marker für das Wohlergehen genutzt werden. Reduziertes Wohlbefinden z. B. unter Stress, Schmerzen oder Erkrankung spiegelt sich direkt in einer verminderten Nahrungsaufnahme wider, die man anhand des Körpergewichts beobachten kann.

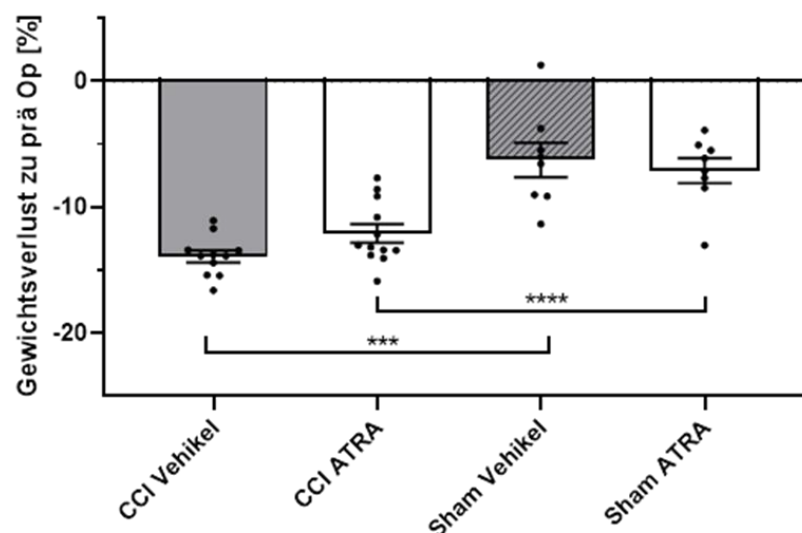


Abb. 5.1: Gewichtsverlust in Prozent 24 h nach dem CCI-/Shameingriff

CCI Vehikel n=12, CCI ATRA n=12, Sham Vehikel n=8, Sham ATRA n=8, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, one-way ANOVA mit Korrektur nach Holm-Šidák.

Dargestellt in Abb. 5.1 ist der Gewichtsverlust der Tiere 24 h nach dem jeweiligen Sham- oder CCI-Eingriff. Dieser wird prozentual zum präoperativen Ausgangswert angegeben. Präoperativ unterscheidet sich das Körpergewicht zwischen den vier Gruppen nicht signifikant voneinander (CCI Vehikel $23,93 \pm 0,3048$ g; CCI ATRA $23,75 \pm 0,2251$ g; Sham Vehikel $24,36 \pm 0,5809$ g; Sham ATRA $23,48 \pm 0,3644$ g). In allen Gruppen ist 24 h postoperativ eine deutliche Gewichtsreduktion erkennbar (CCI Vehikel $-13,9 \pm 0,4808\%$; CCI ATRA $-12,09 \pm 0,7206\%$; Sham Vehikel $-6,256 \pm$

1,371%; Sham ATRA $-7,114 \pm 0,9929\%$). Ein signifikanter Unterschied zwischen den ATRA-Gruppen und den Vehikel-Gruppen besteht nicht. Es lässt sich jedoch erkennen, dass die Sham-Tiere einen signifikant geringeren Gewichtsverlust im Vergleich zu den CCI-Tieren erlitten haben (CCI Vehikel $23,93 \pm 0,3048$ g vs. Sham Vehikel $24,36 \pm 0,5809$ g, $p < 0,0001$; CCI ATRA $23,75 \pm 0,2251$ g vs. Sham ATRA $23,48 \pm 0,3644$ g, $p = 0,0008$).

5.1.2 Rotarod

Die Grafiken in Abb. 5.2 und 5.3 veranschaulichen die motorischen Fähigkeiten und Kondition der Tiere vor und 24 h nach dem Eingriff. Die Tiere hatten sowohl präoperativ wie auch prä mortal mehrere Durchläufe auf dem Rotarod. Für die Auswertung wurde der jeweilige Mittelwert aus diesen Durchläufen herangezogen. In Abb. 5.2 ist der direkte Vergleich der prä- und postoperativen Werte dargestellt. Die beiden CCI-Gruppen hatten postoperativ signifikant schlechtere Leistungen auf dem Rotarod im Vergleich zum Vortag, wohingegen die Sham-Tiere keine Leistungsbeeinträchtigungen aufwiesen (CCI Vehikel $p = 0,0437$, CCI ATRA $p = 0,0008$, Sham Vehikel $p = 0,9634$, Sham ATRA $p = 0,9634$). Im Vergleich der Leistungsdifferenz zeigen die Tiere in den beiden CCI-Gruppen eine tendenziell schlechtere Leistung auf dem Rotarod als die Sham-Tiere, die keinen Leistungsabfall hatten (CCI Vehikel $-15,54 \pm 5,601$ s; CCI ATRA $-25,21 \pm 6,479$ s; Sham Vehikel $-0,7292 \pm 8,610$ s; Sham ATRA $-1,813 \pm 6,097$ s, siehe Abb. 5.3). Ein signifikanter Unterschied zwischen den Interventionsgruppen Vehikel- und ATRA-Gabe besteht postoperativ nicht.

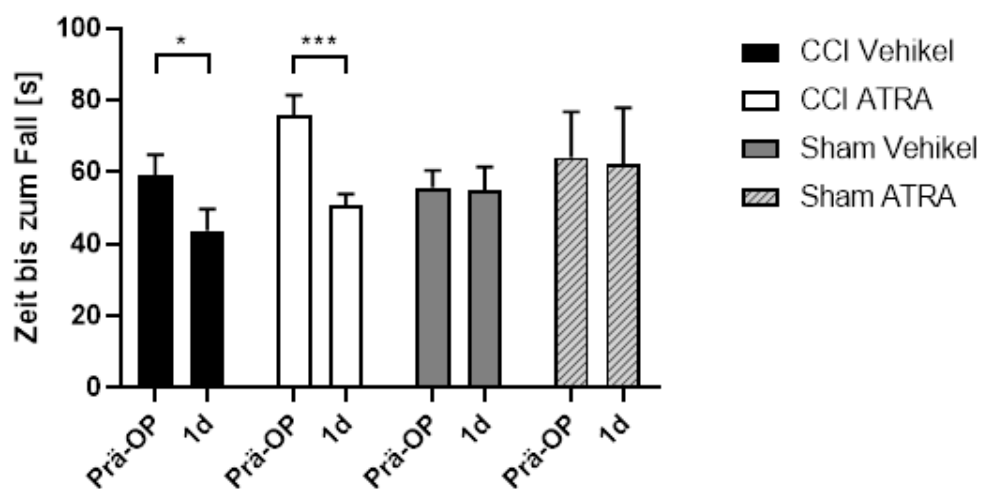


Abb. 5.2: Zeit bis zum Sturz, Vergleich der Mittelwerte prä- und postoperativ

CCI Vehikel $n = 12$, CCI ATRA $n = 12$, Sham Vehikel $n = 8$, Sham ATRA $n = 8$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, two-way ANOVA mit Korrektur nach Holm-Šídák.

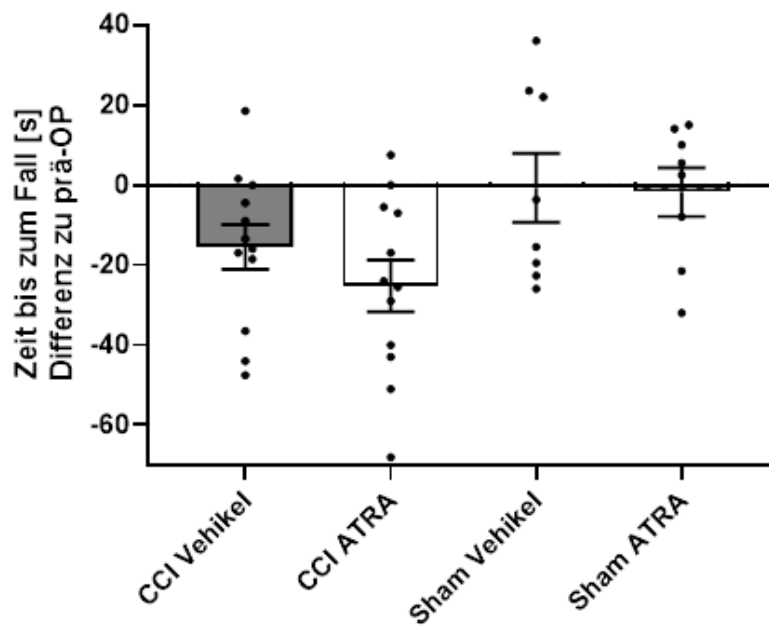


Abb. 5.3: Zeit bis zum Sturz, Differenz der Mittelwerte prä- und postoperativ

CCI Vehikel n=12, CCI ATRA n=12, Sham Vehikel n=8, Sham ATRA n=8, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, one-way ANOVA mit Korrektur nach Holm-Šídák.

5.1.3 Neuroscore

Beim CCI wird die Läsion im Bereich des primär und sekundär motorischen Kortex gesetzt. Die dabei zu erwartenden Defizite, wurden mithilfe des Neuroscores erfasst. Je höher die Punktzahl, desto höher die neurologischen Defizite. Präoperativ weisen alle Tiere einen Neuroscore von 0 auf. Abb. 5.4 zeigt, dass 24 h nach der Intervention in beiden CCI-Gruppen ein deutliches neurologisches Defizit erkennbar ist (CCI Vehikel $5,5 \pm 0,3989$; CCI ATRA $4,917 \pm 0,468$; Sham Vehikel $0,25 \pm 0,1637$; Sham ATRA $0,125 \pm 0,125$). Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den jeweiligen Sham- und CCI-Gruppen (CCI Vehikel vs. Sham Vehikel, $p < 0,0001$; CCI ATRA vs. Sham ATRA $p < 0,0001$) jedoch kann kein Einfluss von ATRA innerhalb der Interventionsgruppen gezeigt werden.

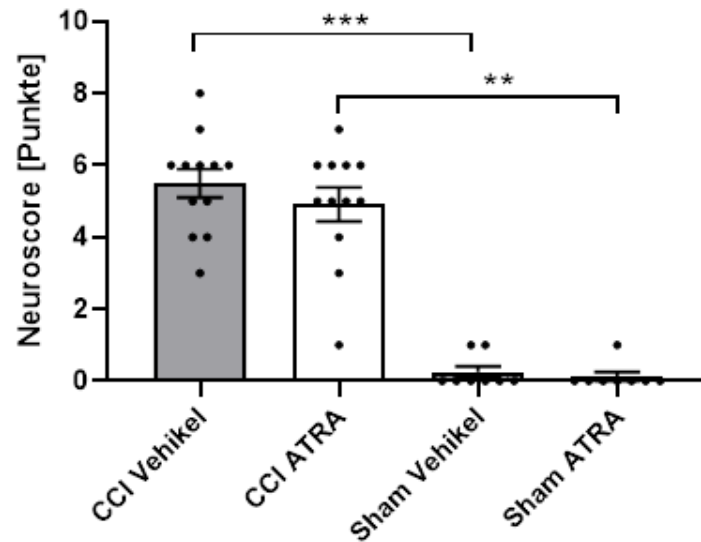


Abb. 5.4: Neuroscore zum Zeitpunkt 24 h nach dem Eingriff

CCI Vehikel n=12, CCI ATRA n=12, Sham Vehikel n=8, Sham ATRA n=8, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, Kruskal-Wallis-Test mit Korrektur nach Dunn.

5.2 Histologische Untersuchungen

5.2.1 Volumetrie

Mithilfe der Nissl-Färbung konnte das Schadensvolumen 24 h nach dem CCI beider CCI-Gruppen mikroskopisch bestimmt werden. Abb.5.5 zeigt das absolute Schadensvolumen in mm³ der ipsilateralen Seite. Im direkten Vergleich der beiden CCI-Gruppen zeigt sich kein signifikanter Unterschied (CCI Vehikel 35,28 ± 2,337 mm³; CCI ATRA 35,47 ± 1,516 mm³).

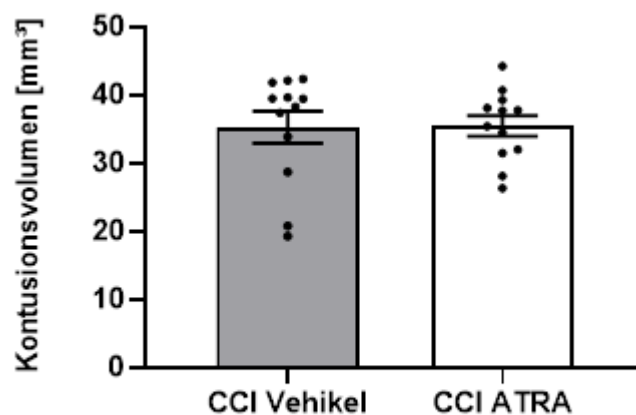


Abb. 5.5: Kontusionsvolumen in mm³

CCI Vehikel n=12, CCI ATRA n=12, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, Ungepaarter-t-Test.

5.2.2 IgG-Färbung

Mithilfe einer immunhistochemischen Färbung lassen sich gezielt Antigene visualisieren. Die bei dieser Untersuchung bestimmten IgG im Gewebe dienen als Maß für das Kontusionsvolumen bzw. für die BHS-Störung und wurden hier für beide CCI-Gruppen durch Ausmessung der Ebenen 11. und 12. in mm² bestimmt (siehe Abb. 5.7). Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen der CCI-Vehikel- (13,99 ± 0,7258 mm²) und der CCI-ATRA-Gruppe (13,92 ± 0, 0,5918 mm², siehe Abb. 5.6).

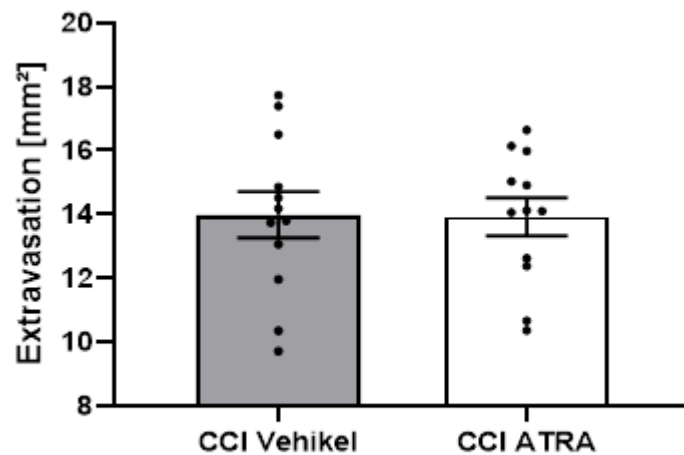


Abb. 5.6: IgG-positiver Bereich beider Hemisphären 24 h nach dem CCI
CCI Vehikel n=12, CCI ATRA n=12, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, t-Test.

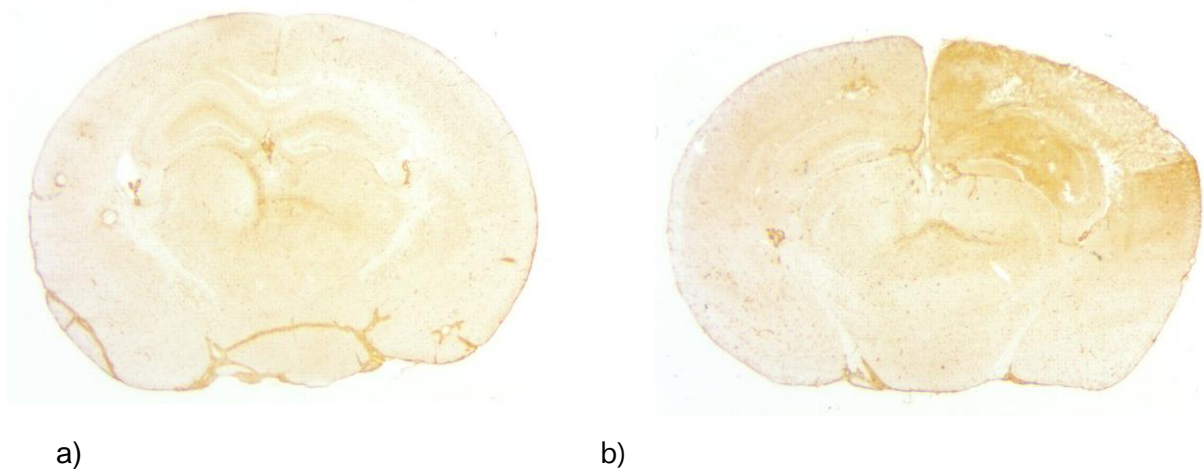


Abb. 5.7: repräsentative Auswahl immunhistochemisch gefärbter Schnitte

- a) Schadensfreie Schnittfläche eines Gehirns von einem Shamtier
- b) Dunkel verfärbt sieht man die IgG-reichen Areale bei einem CCI-Tier

5.3 PCR

Die quantitative Echtzeit-PCR erlaubt Rückschlüsse über die mengenmäßige mRNA-Expression und damit die Genaktivität zum Zeitpunkt der Probenentnahme. Um eine Vergleichbarkeit der einzelnen Proben zu erreichen, wurde die Anzahl der jeweiligen DNA-Kopien für alle nachfolgenden Untersuchungen auf das Haushaltsgen PPIA normalisiert.

5.3.1 TNF- α

Der Tumornekrosefaktor α (TNF- α) ist ein pleiotropher Entzündungsmediator, der als proinflammatorisches Zytokin von aktivierter Mikroglia sezerniert wird und an einer Reihe pathologischen Prozesse beteiligt ist, die letztendlich alle zum Sekundär-schaden beitragen (Chen et al., 2019). Im Rahmen dieser Arbeit wurde es als Neuroinflammationsmarker verwendet. Die Untersuchungen haben signifikante Unterschiede in der TNF- α mRNA-Expression zwischen den CCI- und Sham-Gruppen aufgezeigt ($p = <0,0001$, CCI-Vehikel vs. Sham-Vehikel; $p = 0,0004$, CCI ATRA vs. Sham ATRA), allerdings konnte kein Einfluss von ATRA gezeigt werden (CCI Vehikel $3,351e-006 \pm 3,075e-007$; CCI ATRA $2,929e-006 \pm 2,879e-007$; Sham-Vehikel $1,248e-006 \pm 1,229e-007$; Sham-ATRA $1,262e-006 \pm 1,461e-007$, siehe Abb. 5.8).

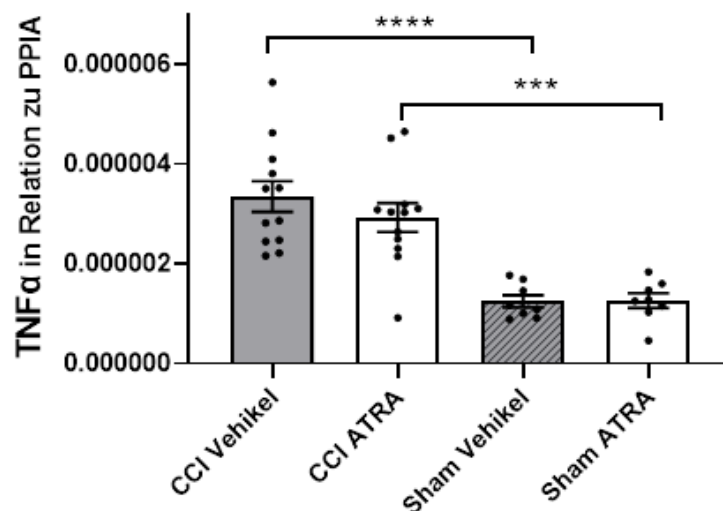


Abb. 5.8: TNF- α -Expression

CCI Vehikel $n=12$, CCI ATRA $n=12$, Sham Vehikel $n=8$, Sham ATRA $n=8$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, one-way ANOVA mit Korrektur nach Holm-Šídák.

5.3.2 IL-1 β

Das proinflammatorische Zytokin Interleukin-1 β ist ein zentraler Inflammediator im Rahmen des Sekundärschadens, der von aktivierten Mikroglia und Astrozyten sezerniert wird (reviewed in Fogal und Hewett, 2008). Es wurde als Neuroinflammationsmarker verwendet. Vergleicht man die mRNA-Expression zwischen den einzelnen Gruppen, lässt sich nur ein Unterschied zwischen den jeweiligen CCI- und Sham-Gruppen finden und kein Einfluss von ATRA ($p = 0,0001$, CCI-Vehikel vs. Sham-Vehikel; $p = 0,0070$, CCI ATRA vs. Sham ATRA; CCI Vehikel $0,004182 \pm 0,0003390$; CCI ATRA $0,003413 \pm 0,0003404$; Sham-Vehikel $0,0006606 \pm 3,761e-005$; Sham-ATRA $0,0007006 \pm 5,489e-005$, siehe Abb. 5.9).

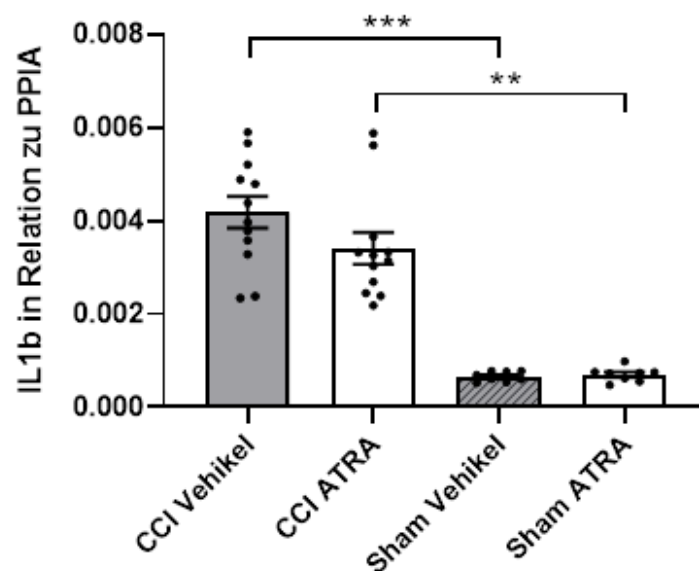


Abb. 5.9: IL-1 β -Expression

CCI Vehikel $n=12$, CCI ATRA $n=12$, Sham Vehikel $n=8$, Sham ATRA $n=8$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, Kruskal-Wallis-Test mit Korrektur nach Dunn.

5.3.3 GFAP

Im Kontext des Sekundärschadens kommt es zur erhöhten Astrozytenaktivität und zur Hochregulation der GFAP-Expression, die sich damit als spezifischer Marker für Astrogliose eignet (Hummel et al., 2020; Yang und Wang, 2015). Die Expression von GFAP wird in beiden Interventionsgruppe nicht signifikant durch die Applikation von ATRA beeinflusst (CCI Vehikel $0,002843 \pm 0,0002424$; CCI ATRA $0,002750 \pm 0,0002772$; Sham-Vehikel $0,001873 \pm 0,0002091$; Sham-ATRA $0,001444 \pm$

0,0001885). Beim Vergleich der CCI-Gruppen mit den Sham-Gruppen lässt sich ein signifikanter Unterschied feststellen ($p = 0,0414$, CCI-Vehikel vs. Sham-Vehikel; $p = 0,0043$, CCI ATRA vs. Sham ATRA, siehe Abb. 5.10.).

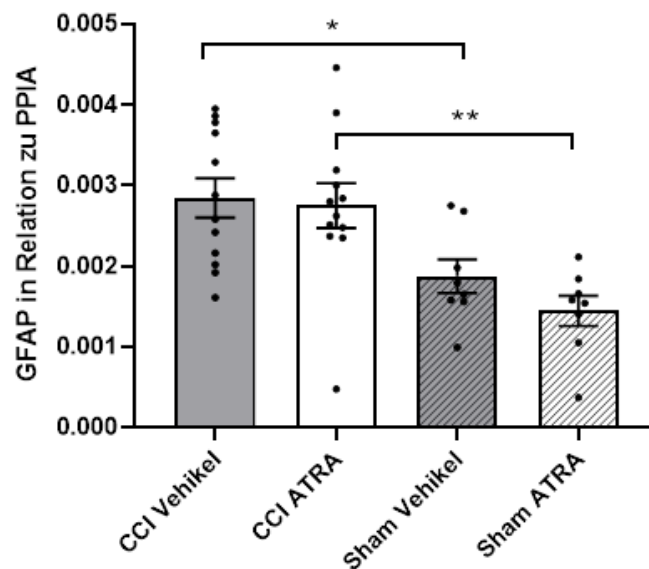


Abb. 5.10: GFAP-Expression

CCI Vehikel $n=12$, CCI ATRA $n=12$, Sham Vehikel $n=8$, Sham ATRA $n=8$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, one-way ANOVA mit Korrektur nach Holm-Šídák.

5.3.4 Iba1

Die Aktivierung von ortsansässigen und peripheren Immunzellen, wie der Mikroglia und den Makrophagen, ist eine weitere Komponente des Sekundärgeschehens. Im Rahmen dieser Aktivierung findet sich eine erhöhte Iba1-Expression (Ito et al., 2001). In dieser Arbeit dient es als Marker für Neuroinflammation und Mikrogliaktivität. Innerhalb der CCI-Gruppen (CCI Vehikel $0,1913 \pm 0,00466$; CCI ATRA $0,1901 \pm 0,004869$) und der Sham-Gruppen (Sham-Vehikel $0,1689 \pm 0,006209$; Sham-ATRA $0,1745 \pm 0,005$) gibt es keine signifikanten Unterschiede innerhalb von 24 h. Lediglich der Vergleich der Vehikel-Gruppen untereinander zeigt einen signifikanten Unterschied ($p= 0,0283$, siehe Abb. 5.11).

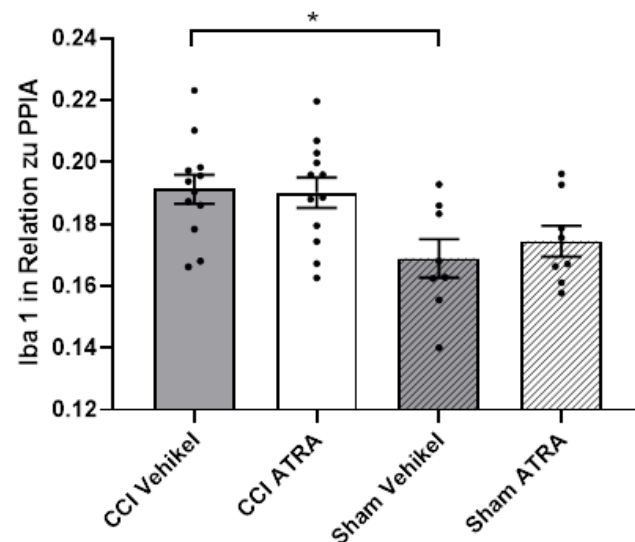


Abb. 5.11: Iba1-Expression

CCI Vehikel n=12, CCI ATRA n=12, Sham Vehikel n=8, Sham ATRA n=8, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, one-way ANOVA mit Korrektur nach Holm-Šídák.

5.3.5 Caspase-3

Im Rahmen des programmierten Zelltods kommt es zum erhöhten proteolytischen Abbau von Zellbestandteilen. Eine an diesem Abbau beteiligte Cysteinprotease ist die Caspase-3, die als Apoptosemarker in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde (Cregan et al., 1999?). In der posttraumatischen Expression von Caspase-3 gibt es zwischen keiner der Gruppen (CCI Vehikel $0,0003663 \pm 1,801e-005$; CCI ATRA $0,0003392 \pm 1,813e-005$; Sham-Vehikel $0,0003311 \pm 1,291e-005$; Sham-ATRA $0,0003176 \pm 2,334e-005$) einen signifikanten Unterschied (siehe Abb. 5.12).

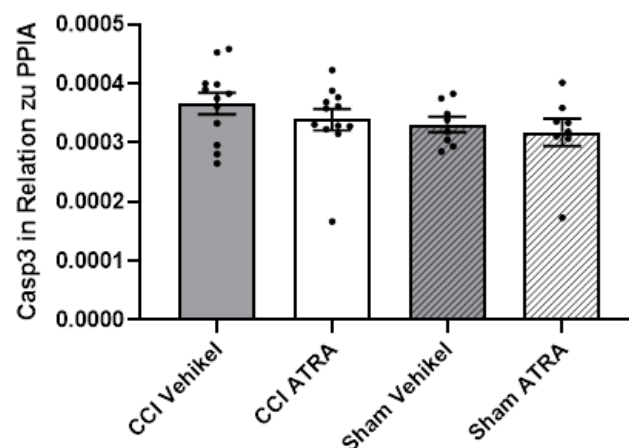


Abb. 5.12: Caspase-3-Expression

CCI Vehikel n=12, CCI ATRA n=12, Sham Vehikel n=8, Sham ATRA n=8, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, Kruskal-Wallis-Test mit Korrektur nach Dunn.

5.3.6 Bax

Bax ist ein weiterer Apoptosemarker, der in der vorliegenden Studie verwendet wurde. Es gehört zu den regulatorischen Proteinen der Apoptose und wirkt bei Einwirkung schädlicher Stimuli auf die Zelle proapoptotisch (Hetz et al., 2005). Ein signifikanter Einfluss auf die Bax mRNA-Expression von ATRA konnte nicht gezeigt werden (CCI Vehikel $0,0006061 \pm 1,653e-005$; CCI ATRA $0,0005998 \pm 2,019e-005$; Sham-Vehikel $0,0005381 \pm 1,732e-005$; Sham-ATRA $0,0005170 \pm 2,099e-005$). Es besteht eine signifikante Erhöhung der Expression in den beiden CCI-Gruppen im Vergleich zu der Sham-ATRA-Gruppe ($p = 0,0311$, $p = 0,0113$, siehe Abb. 5.13).

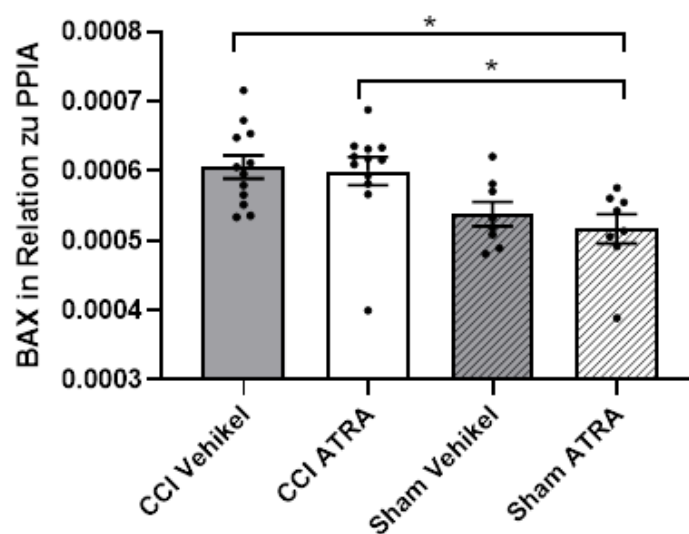


Abb. 5.13: Bax-Expression

CCI Vehikel $n=12$, CCI ATRA $n=12$, Sham Vehikel $n=8$, Sham ATRA $n=8$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, Kruskal-Wallis-Test mit Korrektur nach Dunn.

5.3.7 BAG1

Im Rahmen der Apoptose gibt es eine Reihe regulatorischer Proteine, die diese initiieren oder hemmen können. BAG1 ist ein solches Protein, das antiapoptotisch wirkt und u. a. am proteosomalen Abbau beteiligt ist. Seine erhöhte Expression lässt sich als Stressantwort der Zelle im Rahmen des Sekundärschadens finden (Liu et al., 2020). In der vorliegenden Untersuchung dient es als Marker für Apoptose. Zwischen keiner der untersuchten Gruppen gab es einen signifikanten Unterschied (CCI Vehikel $0,003978 \pm 0,0001035$; CCI ATRA $0,003948 \pm 0,0001083$; Sham-Vehikel $0,003986 \pm 7,912e-005$; Sham-ATRA $0,003750 \pm 9,407e-005$, siehe Abb. 5.14).

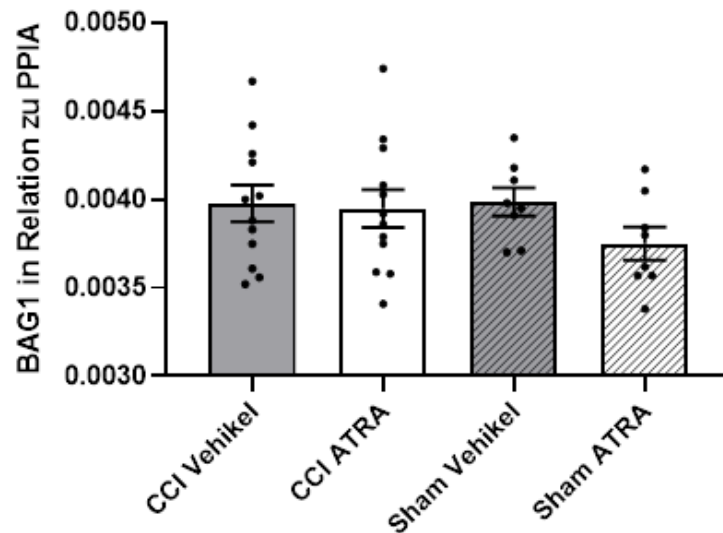


Abb. 5.14: BAG1-Expression

CCI Vehikel n=12, CCI ATRA n=12, Sham Vehikel n=8, Sham ATRA n=8, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, one-way ANOVA mit Korrektur nach Holm-Šidák.

5.3.8 BAG3

Genauso wie das BAG1 lässt sich das BAG3 als antiapoptotisches Protein im Rahmen der Zellantwort auf den Zellschaden finden und wurde im Nachfolgenden als Apoptosemarker verwendet (Gamerding et al., 2009). Ein signifikanter Unterschied in der Expression von BAG3 lässt sich zwischen den Interventionsgruppen nicht feststellen (CCI Vehikel $0,0003753 \pm 2,930e-005$; CCI ATRA $0,0003523 \pm 2,373e-005$; Sham-Vehikel $0,0002203 \pm 1,038e-005$; Sham-ATRA $0,0002099 \pm 2,215e-005$). Es besteht eine signifikante Erhöhung der BAG3-Expression im Rahmen des CCI im Vergleich zu den beiden Shamgruppen ($p = 0,0087$, CCI-Vehikel vs. Sham-Vehikel; $p = 0,0102$, CCI ATRA vs. Sham ATRA), aber es lässt sich kein Einfluss von ATRA zeigen (siehe Abb. 5.15).

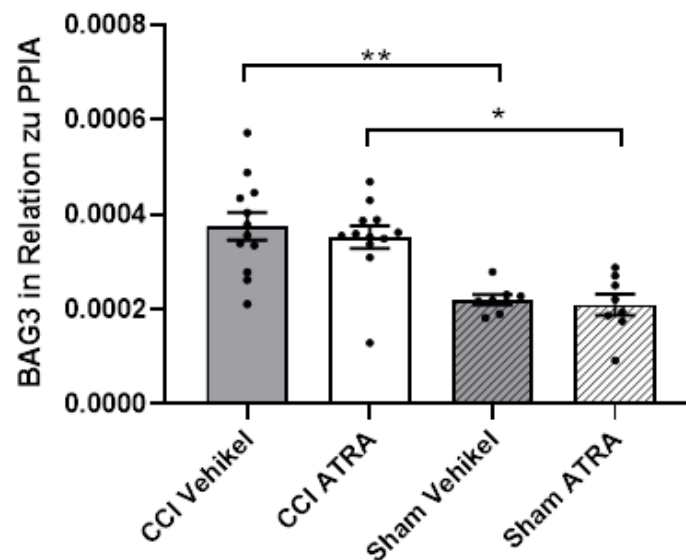


Abb. 5.15: BAG3-Expression

CCI Vehikel n=12, CCI ATRA n=12, Sham Vehikel n=8, Sham ATRA n=8, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, Kruskal-Wallis-Test mit Korrektur nach Dunn.

5.3.9 Hsp-β1

Das Hsp-β1 gehört zu den Chaperonen, die die Proteinhomöostase einer Zelle regulieren, und hat wie alle Mitglieder der Hsp-Familie eine antiapoptotische Wirkung. Bei neuronalem Schaden findet eine Hochregulation der mRNA-Expression des Hsp-β1 statt (reviewed in Stetler et al., 2009). Im vorliegenden Experiment wurde Hsp-β1 als Marker für neuronalen Schaden verwendet. Signifikante Unterschiede bestehen zwischen den jeweiligen CCI- und Sham-Gruppen (p = <0,0001, CCI-Vehikel vs. Sham-Vehikel; p = <0,0001, CCI ATRA vs. Sham ATRA). Ein Einfluss von ATRA auf die Genexpression von Hsp-β1 konnte innerhalb der CCI- und der Sham-Gruppe nicht gezeigt werden (CCI Vehikel 0,0002836 ± 2,984e-005; CCI ATRA 0,0002764 ± 1,884e-005; Sham-Vehikel 5,525e-005 ± 1,807e-006; Sham-ATRA 5,799e-005 ± 3,124e-006, siehe Abb 5.16).

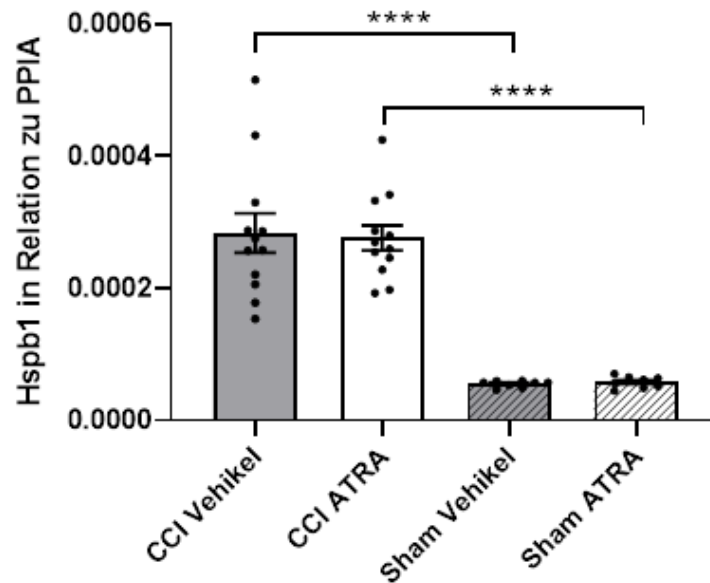


Abb. 5.16: Hsp-β1-Expression

CCI Vehikel n=12, CCI ATRA n=12, Sham Vehikel n=8, Sham ATRA n=8, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, one-way ANOVA mit Korrektur nach Holm-Šídák.

5.4 Proteinanalyse

5.4.1 Dot-Blot – Immunglobulin G

Die BHS-Störung ist eine der zentralen Pathomechanismen, die zum endgültigen Ausmaß des Sekundärschadens beitragen. Durch die gestörte Integrität kommt es zur Extravasation von Serumproteinen ins Hirnparenchym, darunter IgG, das in vorherigen Studien und der vorliegenden Arbeit als Marker für die BHS-Störung verwendet wurde (Cucullo et al., 2003; Hummel et al., 2020). Der IgG-Dotblot dient der Quantifizierung der IgG-Mengen (siehe Abb 5.17). In der densitometrischen Bestimmung von IgG konnte kein Einfluss von ATRA in den Vergleichsgruppen gezeigt werden (CCI Vehikel 403309 ± 22853 ; CCI ATRA 381332 ± 12465 ; Sham-Vehikel 255173 ± 9407 ; Sham-ATRA 226521 ± 5711). Die IgG-Mengen unterscheiden sich jedoch signifikant im Vergleich der CCI-Gruppen mit den Sham-Gruppen (p < 0,0001, CCI-Vehikel vs. Sham-Vehikel; p < 0,0001, CCI ATRA vs. Sham ATRA, siehe Abb. 5.17)

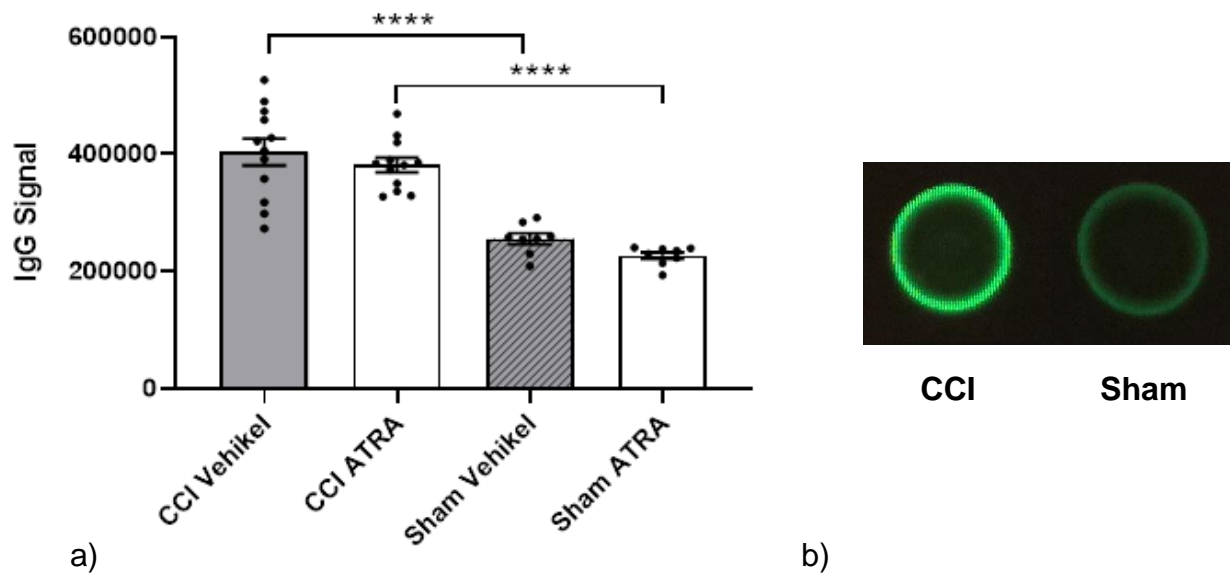


Abb. 5.17: IgG-Dotblot

- a) Proteinlevel. CCI Vehikel n=12, CCI ATRA n=12, Sham Vehikel n=8, Sham ATRA n=8, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, one-way ANOVA mit Korrektur nach Holm-Šidák
- b) Signalstärke CCI- im Vergleich zum Sham-Tier

5.4.2 Spektrin Westernblot

Bei gesteigertem Zelluntergang kommt es zur Aktivierung von Caspasen und Calpain, die im Rahmen ihrer proteolytischen Aktivität α -II-Spektrin, ein Bestandteil des neuronalen Zytoskeletts, in unterschiedlich große Fragmente abbauen (Ringger et al., 2004). Im Rahmen der Nekrose entstehen dabei überwiegend 150/145 kDa-große Fragmente des Spektrins. Bei der Apoptose werden hingegen mehr 120 kDa-große Spaltprodukte gebildet. In der vorliegenden Studie dienen die Fragmente als Marker für Zelluntergang. GAPDH ist ein ubiquitär vorhandenes Protein, das als Referenz für die Proteinmenge verwendet wurde. In Abb. 5.19 ist exemplarisch der Westernblot jeweils für ein CCI- und ein Sham-Tier gezeigt.

Vergleicht man die Proteinmenge bei den 150/145 kDa großen-Fragmenten, gibt es lediglich zwischen den CCI- und den Sham-Gruppen signifikante Unterschiede. Eine Wirkung von ATRA ist nicht zu erkennen (p = 0,0065, CCI-Vehikel vs. Sham-Vehikel; p = 0,0042, CCI ATRA vs. Sham ATRA; CCI Vehikel $0,2652 \pm 0,05774$; CCI ATRA $0,2936 \pm 0,02264$; Sham-Vehikel $0,03284 \pm 0,00663$; Sham-ATRA $0,04309 \pm 0,009105$, siehe Abb. 5.18). Bei dem in Abb. 5.18. dargestellten Vergleich der 120 kDa-Fragmente gab es zwischen keiner der Gruppen signifikante Unterschiede (CCI Vehikel $0,03042 \pm 0,005678$; CCI ATRA $0,02909 \pm 0,002614$; Sham-Vehikel

0,02242 ± 0,004716; Sham-ATRA 0,02032 ± 0,004439).

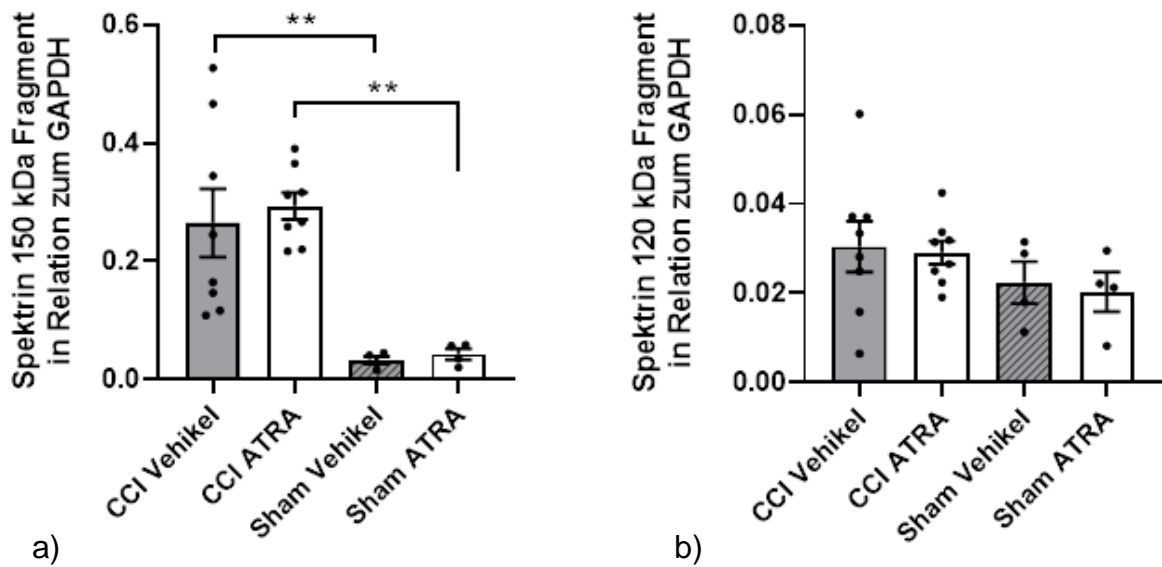


Abb. 5.18: Auswertung des Westernblots von α -II-Spektrin

- a) 150/145 kDa-Fragmente normalisiert zu GAPDH. CCI Vehikel n=12, CCI ATRA n=12, Sham Vehikel n=8, Sham ATRA n=8, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, one-way ANOVA mit Korrektur nach Holm-Šídák.
- b) 120 kDa-Fragmente normalisiert zu GAPDH. CCI Vehikel n=12, CCI ATRA n=12, Sham Vehikel n=8, Sham ATRA n=8, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, one-way ANOVA mit Korrektur nach Holm-Šídák.

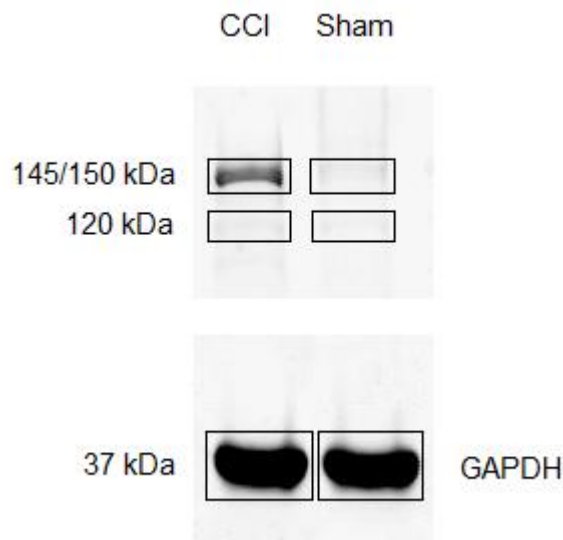


Abb. 5.19: Westernblot mit Spektainspaltprodukten und GAPDH

Dargestellt ist ein repräsentativer Westernblot von Hirnlysaten eines CCI- und eines Sham-Tiers. Lysate wurden von verletzten Hemisphären nach einem CCI sowie unverletzten Hemisphären nach der Sham-Prozedur untersucht. Die unterschiedliche Signalstärke für das 145 kDa-große Calpainspaltprodukt ist deutlich erkennbar. Im Gegensatz dazu waren die 120 kDa-große Caspasespaltprodukte bei allen Gruppen nur in geringen Mengen vorhanden.

6 Diskussion

6.1 Gewicht

Die Entwicklung des Körpergewichts ist ein etablierter Parameter für das Wohlergehen der Tiere. Das präoperativ erhobene Ausgangsgewicht hatte in allen vier Gruppen die gleiche Verteilung, was für eine Vergleichbarkeit der Tiere spricht. 24 h nach dem jeweiligen Eingriff hatten alle Gruppen einen signifikanten Gewichtsverlust verzeichnet, wobei die beiden CCI-Gruppen im Vergleich zu den Sham-Gruppen, die eine Gewichtsreduktion von bis zu 7 % hatten, höhere Gewichtsverluste von bis zu 14 % hatten. Diese Beobachtung deckt sich mit früheren Studien, die ebenfalls einen Gewichtsverlust 24 h nach dem CCI von bis zu 10 % zeigten (Luh et al., 2011). Ein Einfluss von ATRA konnte in dieser Studie nicht gezeigt werden. Das erwartete Ergebnis wurde bestätigt, da anzunehmen ist, dass das initial reduzierte Wohlbefinden vor allem dem Primärschaden und den Auswirkungen des jeweiligen operativen Eingriffs zuzuschreiben ist und nach 24 h nur bedingt durch den Sekundärschaden weiter beeinflusst wird. Weiter muss man beachten, dass aus Langzeitbeobachtungen mit einem Follow-up von drei bis sieben Monaten bekannt ist, dass CCI-Tiere trotz guter Spontanregeneration bei der erneuten Gewichtszunahme nicht das Niveau der Sham-Tiere erreichen, obwohl bei anderen initial detektierten Defiziten wie z. B. den motorischen Leistungen eine vollständige Rekonvaleszenz innerhalb von wenigen Tagen erreicht werden kann (Pöttker et al., 2017; Vogel et al., 2020). Vogel und Kollegen untersuchten im Maus-Modell die Langzeitfolgen eines CCI während eines Beobachtungszeitraums von drei bis sechs Monaten. Sie konnten zeigen, dass CCI-Tiere im Vergleich zu Sham-Tieren bei gleichartiger Nahrungsaufnahme u. a. eine nächtliche Hyperaktivität und reduzierte Endocannabinoidsynthese aufweisen, die u. a. die Nozizeption und die Appetitregulation beeinflussen. Trotzdem konnten sie keinen direkten Zusammenhang zwischen der geringeren Gewichtszunahme und den festgestellten Veränderungen finden. Daraus schlussfolgerten sie, dass die reduzierte Gewichtszunahme mit einer erhöhten Stoffwechselaktivität im Rahmen des Sekundärschadens im Zusammenhang stehen könnte (Vogel et al., 2020). Damit wird deutlich, dass ein denkbarer Benefit durch die Wirkung von ATRA auf die erneute Gewichtszunahme durch das gewählte Studiendesign des vorliegenden Experiments, das primär den Fokus auf der lokalen Akuttherapie von ATRA legt, nicht erfasst werden kann.

6.2 Neurobiologisches Verhalten

In der vorliegenden Studie wurde zur Erfassung des neurologischen Verhaltens der Rotarod und der Neuroscore verwendet. Beide Verfahren sind geeignet, um die durch die Läsion im Bereich des motorischen Kortex entstandenen Defizite zu erfassen. Präoperativ hatten alle Gruppen nach dem Training im Rotarod erwartungsgemäß die gleiche Leistung. 24 h nach dem jeweiligen Eingriff gab es unter den Sham-Tieren keinen Leistungsabfall. Die beiden CCI-Gruppen hatten postoperativ einen signifikanten Leistungsabfall zum Vortag, der jedoch von der ATRA-Therapie unbeeinflusst blieb.

Der Rotarod ist seit dem Einführen des Versuchsaufbaus in den 1950er Jahren und der bis heute verwendeten Modifikation durch Jones und Roberts eine etablierte Methode zur Bewertung der motorischen Koordination und Kondition der Versuchstiere (Jones und Roberts, 1968). Ursprünglich für die Ratte konzipiert wurde er inzwischen durch die Veränderung des Walzendurchmessers und der Geschwindigkeit an die Maus angepasst. Bei der Durchführung wurde darauf geachtet, dass für die Tiere konstante Bedingungen wie Tageszeit, Testdauer, Testraum, Reihenfolge der Testung und Gewöhnung an das Handling vorlagen, da sie Einflussgrößen für das Verhalten und die Motivation der Tiere sind. Abweichungen von den konstanten Bedingungen wirken als Störfaktoren und beeinflussen die Bewertbarkeit der Ergebnisse (Shiotsuki et al., 2010). Beim vorliegenden Studiendesign ist die Aussagekraft dieses Tests limitiert. Der Rotarod ist bei Fragestellungen mit kurzer Überlebensdauer und entsprechend wenigen Durchläufen nicht sensitiv genug, um auch minimale Veränderungen in der Leistung zu detektieren. In Studien mit längerer Beobachtungsphase kann der Rotarod bei wiederholter Evaluierung dagegen deutlich besser die Dynamik in der Leistungsänderung aufdecken (Carter et al., 2001).

Eine genauere Differenzierung der neurologischen Defizite erfolgte mithilfe des Neuroscore, der neben der Koordination und Kondition auch Reflexe, allgemeines Verhalten und die Fähigkeit Gleichgewicht halten zu können beurteilt. 24 h nach dem Trauma erzielten die CCI-Tiere im Neuroscore sowohl in der ATRA-Gruppe als auch in der Vehikel-Gruppe eine signifikant schlechtere Leistung als die jeweiligen Sham-Tiere. Ein möglicher Einfluss von ATRA konnte in keiner Gruppe gezeigt werden. Insgesamt ist der Neuroscore als eine valide und etablierte Methode anzusehen, die anfangs für das Ratten-Modell entwickelt wurde und aus einem binären Bewer-

tungssystem bestand (Shohami et al., 1995). Im Verlauf erfuhr der Versuchsaufbau schnell eine Modifikation und Anpassung für die Maus als Versuchstier (Chen et al., 1996). Die Limitationen sind ähnlich wie beim Rotarod bei den Einflussgrößen vorhanden. Das Verhalten der Tiere wird stark durch die umgebenden Parameter, die Testreihenfolge und die Tageszeit beeinflusst. Bspw. macht es einen Unterschied, ob der Neuroscore vor oder nach dem Rotarod durchgeführt wird oder mögliche Medikamentengaben vor der Testdurchführung erfolgen (Yarnell et al., 2016). Dieser Umstand erschwert die Übertragung von Ergebnissen zwischen verschiedenen Arbeitsgruppen. Es bedarf einheitlicher Durchführungsprotokolle, um die Vergleichbarkeit zwischen den Arbeitsgruppen zu steigern, da eine große Heterogenität in der Durchführung besteht.

6.3 Experimentelles SHT-Modell und Übertragbarkeit in die Klinik

Das CCI-Modell hat seit der Erstbeschreibung Ende der 1980er Jahre (Lighthall, 1988) zahlreiche Anpassungen an unterschiedliche Spezies wie Maus, Ratte, Schwein und Primat erfahren und ist inzwischen ein etabliertes Modell eines experimentellen SHT. Die Wahl auf die Maus als Versuchstier fällt oft, weil es ein kostengünstiges und relativ einfach zu haltendes Versuchstier ist. Zudem bietet es die Möglichkeit sog. *Knockout*-Tiere zu verwenden, um gezielt eine bestimmte Genaktivität zu untersuchen. Die Pathomechanismen, die bei einem CCI-Maus-Modell entstehen, lassen sich mit dem Primär- und Sekundärschaden eines humanen SHT vergleichen (reviewed in Cernak, 2005). Eine gute Schulung des Operateurs vorausgesetzt bietet es mit den frei wählbaren Parametern wie der Eindringtiefe, Geschwindigkeit und Größe des Bolzens eine relativ hohe experimentelle Reproduzierbarkeit.

Trotz der zahlreichen Vorteile hat das Modell auch einige Einschränkungen und lässt sich – obgleich identische zelluläre Prozesse wie beim humanen SHT vorhanden sind – nur bedingt auf den Menschen übertragen. Die Unfallmechanismen beim Primärschaden sind in der Realität sehr heterogen. Oft sind es Kombinationen aus Akzelerations-Dezelerations-Trauma, direktem Aufpralltrauma, Explosionstrauma und Rotationstrauma oder das SHT findet sich im Rahmen eines den ganzen Körper betreffenden Polytraumas. Im experimentellen Setting ist man trotz diverser SHT-Modelle (reviewed in Albert-Weissenberger und Sirén, 2010) immer nur in der Lage

bestimmte Teilaspekte eines SHT zu reproduzieren. Weiter kommt hinzu, dass das Patientenkollektiv heterogen ist. Faktoren wie Alter, Geschlecht und Komorbiditäten haben entscheidenden Einfluss auf den Outcome und die Sekundärprozesse. Auch genetische Faktoren müssen beachtet werden. So wurde z. B. von Lawrence und Kollegen gezeigt, dass der Genotyp für das Apolipoprotein E, der im Zusammenhang mit erhöhtem Risiko für Morbus Alzheimer steht, Einfluss auf das Langzeitoutcome von Patienten mit SHT hat (Lawrence et al., 2015).

Weitere Limitation in der Übertragbarkeit findet sich in der Durchführung der Kraniotomie, die so in der Realität bei Patienten in der Regel nicht erfolgt. Die Kraniotomie an sich kann bereits sekundäre Prozesse einleiten (Cole et al., 2011). Im klinischen Alltag erfolgt die Einteilung der Schwere des SHT nach den neurologischen Defiziten und der radiologischen Bildgebung. Laborchemische Marker, wie sie z. B. bei dem Myokardinfarkt mit dem Troponin etabliert sind, fehlen zur Zeit noch (reviewed in Adrian et al., 2016). Es herrscht Uneinigkeit bezüglich der Einteilung der Schwere des SHT im Tiermodell. In vielen Studien erfolgt die Einteilung nach dem Gewebeschaden, der erst *post mortem* erfasst wird. Darin liegt eine Einschränkung der Übertragbarkeit auf das humane SHT begründet. Ohne klare Definition eines milden, moderaten oder schweren SHT im Tiermodell lässt sich kein uneingeschränkter Transfer möglicher Erkenntnisse zu schweregradspezifischen Therapien oder Biomarkern auf den Menschen übertragen (Saatman et al., 2006).

In dieser Arbeit erfolgte die ATRA-Gabe noch intraoperativ unmittelbar vor dem CCI. Für eine bessere Abbildung der Realität müsste der Interventionszeitpunkt deutlich später gewählt werden, z. B. innerhalb eines Zeitfensters von 15 bis 60 min. Damit lässt sich die Ereigniskette nach einem SHT bestehend aus Erstversorgung vor Ort, Transport zur Klinik und den ersten gezielten Therapiemaßnahmen, die der Diagnostik nachgeschaltet sind, besser abbilden zu können (Maegele et al., 2019). Auch von Bedeutung für die Auswertung und Übertragbarkeit des CCI-Modells bei der Maus ist die relativ hohe spontane Regenerationsfähigkeit der Tiere in Langzeitbeobachtungen. Auch ohne Interventionsmaßnahmen zeigen die Tiere eine Remission im Verlauf (Onyszchuk et al., 2007). So bedarf es sensitiver Parameter bei den Untersuchungen, um besser zwischen dem therapeutischen Effekt und dieser Fähigkeit differenzieren zu können. Der Einfluss der Anästhesie bei der Versuchsdurchführung muss ebenfalls beachtet werden, auch hier besteht eine Limitation in der Übertragbarkeit. Bei milden bis moderaten SHT ist der Einsatz von Anästhetika

im post-traumatischen Verlauf oft nicht nötig und bei schweren Traumata kommt in Deutschland oft das Standardhypnotikum Propofol zum Einsatz. Die Arbeitsgruppe, innerhalb derer diese Studie durchgeführt wurde, konnte einen möglichen neuroprotektiven Effekt des für die Experimente verwendeten Inhalationsanästhetika Isofluran bestätigen, auf den es in anderen Studien bereits Hinweise gab (Meyer, 2018; Statler et al., 2006).

6.4 Einfluss von ATRA auf die Neuroinflammation

Die neuronale Immunantwort spielt eine tragende Rolle im Rahmen des Sekundärschadens eines SHT. An diesem komplexen Vorgang sind sowohl ortsständige als auch periphere Zellen beteiligt. Es ist darüber hinaus ein Zusammenspiel aus Zellen und unterschiedlicher pro- und antiinflammatorischer Mediatoren beteiligt, die zum Teil eine gegensätzliche Wirkung zeigen. Deren Wirkung kann z. B. sowohl zum weiteren Schaden als auch zur Regeneration im ZNS beitragen. Die Zellantwort auf den Primärschaden erfolgt sofort: Innerhalb von Minuten nach dem Trauma lassen sich gesteigerte Mengen von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen sowie eine Mikrogliaaktivierung nachweisen (Woodcock und Morganti-Kossmann, 2013). Die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF- α gehören zu den Hauptmediatoren einer Entzündungsreaktion sowohl in der Peripherie als auch dem ZNS. Es lässt sich innerhalb von Stunden schweregradabhängig erhöhte mRNA-Expression dieser Zytokine im CCI-Modell der Maus finden (Lagraoui et al., 2012). Da damit eine Vergleichbarkeit mit dem humanen SHT hergestellt werden kann (Frugier et al., 2010), eignen sich diese Zytokine als valide Marker für das Ausmaß des Sekundärschadens. Insgesamt werden diese Beobachtungen mit der vorliegenden Studie bestätigt. 24 h nach dem Eingriff zeigt der Vergleich zwischen den Sham- und CCI-Gruppen einen signifikanten Unterschied in der mRNA-Expression von TNF- α und IL-1 β . Neuroinflammation und ihre Mediatoren tragen entscheidend zum Ausmaß des Sekundärschadens bei, sodass sich an dieser Stelle ein guter therapeutischer Ansatz für das SHT bietet. Direkte oder indirekt Inhibition der Zytokine haben in diversen Studien einen neuroprotektiven Effekt in verschiedenen Schlaganfall- und SHT-Modellen gezeigt (Chio et al., 2010; Hailer et al., 2005; Wang et al., 2013). In einer Studie von Cai und Kollegen konnte im Schlaganfall-Modell der Maus bei einer prophylaktischen und posttraumatischen intraperitonealen Applikation von ATRA ein neuroprotektiver Effekt u. a. durch Senkung der Entzündungsmedia-

toren TNF- α und IL-1 β gezeigt werden (Cai et al., 2019). Obwohl bei einem Schlaganfall an vielen Stellen ähnliche Pathomechanismen greifen wie bei einem SHT und sich Ergebnisse oft übertragen lassen, konnte in dieser Studie im 24-h-Versuch kein signifikanter Einfluss von ATRA auf die mRNA-Expression der Zytokine gezeigt werden. Weder in der CCI- noch in der Sham-Gruppe gab es einen Unterschied durch ATRA.

Einer der vielen Effekte der pleiotropen Zytokine ist die Aktivierung der ortsansässigen Immunzellen: der Astrozyten und der Mikroglia. Durch neuronalen Schaden kommt es zur Hochregulation des astrozytenspezifischen GFAP im Rahmen der Astrogliose, die wiederum die Freisetzung weiterer Zytokine forciert. Klinische und experimentelle Studien zeigen eine GFAP-Erhöhung in unterschiedlich schweren Traumata sowohl beim Menschen als auch im Tiermodell (Israelsson et al., 2008; Lagraoui et al., 2012; Perez-Polo et al., 2013; Takala et al., 2016). Aktuell steht das GFAP als ein für das ZNS spezifisches Protein in der Diskussion im klinischen Alltag zur Diagnostik eines SHT als ein möglicher Blutparameter und Biomarker zum Einsatz zu kommen (Yang und Wang, 2015). Die im Rahmen dieser Arbeit getätigten Beobachtungen konnten diese Erkenntnisse ebenfalls stützen. Die CCI-Tiere hatten eine signifikant höhere mRNA-Expression des GFAP als die Sham-Tiere. Ein therapeutischer Effekt von ATRA auf die mRNA-Expression nach 24 h konnte allerdings nicht beobachtet werden. In einer Untersuchung zum neuroprotektiven Effekt von ATRA im CCI-Modell der Maus beim Langzeitüberleben – sieben und 30 Tage – konnte die Arbeitsgruppe bei einer wiederholten intraperitonealen Applikation von ATRA einen Einfluss auf das GFAP sowohl im sieben- als auch im 30-Tage-Überleben aufzeigen. Dabei erfolgte die intraperitoneale Gabe unmittelbar nach dem CCI und jeweils 24 h, 48 h und 72 h nach dem Schaden (Hummel et al., 2020). Damit wurden Hinweise geliefert, dass ATRA bei Langzeitwirkung einen potentiell protektiven Effekt besitzt.

Um die Mikrogliaaktivität zu erfassen, wurde Iba1 als Marker ausgewählt. Erhöhte Iba1-Expression findet sich in aktivierter Mikroglia. Im experimentellen SHT-Modell lässt sich eine erhöhte mRNA-Expression bereits nach wenigen Stunden im Gewebe finden; ihren Peak erreicht sie an Tag 3 (Ito et al., 2001; Sandhir et al., 2008). In der vorliegenden Studie konnte diese Beobachtung nur in Teilen bestätigt werden. In der Vehikel-Gruppe gab es einen signifikanten Unterschied zwischen CCI- und Sham-Tieren. In der ATRA-Gruppe war lediglich ein Trend zu erkennen, dass die CCI-Tiere

tendenziell eine höhere Iba1-Expression aufzeigten. Denkbar ist, dass über einen längeren Beobachtungszeitraum die Unterschiede zwischen den CCI- und Sham-Tiere in allen Gruppen deutlich größer gewesen wären, da andere Studien zeigten, dass obwohl eine erhöhte Expression bereits nach wenigen Stunden detektierbar ist, die größten Unterschiede erst nach Tagen sichtbar werden (Perez-Polo et al., 2013). Ein Einfluss von ATRA auf die Iba1-Expression konnte in unserer Studie nicht beobachtet werden.

Die Permeabilitätsstörung der BHS ist eine weitere Komponente der Neuroinflammation. Wenn es nicht bereits durch den Primärschaden verursacht ist, ist sie eine weitere Folge der komplexen Signalkaskade und stark forciert durch die Zytokine IL-1 β und TNF- α . Einerseits wird so die Rekrutierung von peripheren Zellen wie Neutrophilen, Makrophagen und Leukozyten erleichtert, andererseits durch Mechanismen wie Ödembildung, Erhöhung des intrakraniellen Drucks, Hypotension und Ischämie zum weiteren Schaden des Gewebes beitragen (Pop et al., 2013). In dieser Studie wurde die IgG-Menge im Schadensareal, als Marker für das Ausmaß einer BHS-Störung nach dem Trauma, untersucht. Genauso wie bei Patienten mit SHT lassen sich im Tiermodell bereits nach wenigen Stunden erhöhte Immunglobulin-Mengen im Gewebe nachweisen (Cucullo et al., 2003; Perez-Polo et al., 2013). In dem in dieser Studie durchgeführten IgG-Dotblot konnte ein deutlicher Unterschied in den IgG-Mengen zwischen den Sham- und CCI-Tieren gezeigt werden. Es ist bekannt, dass RA an der Bildung der BHS beteiligt ist (Mizee et al., 2013). Damit ist denkbar, dass RA und ATRA die Permeabilitätsänderung durch neuronalen Schaden positiv beeinflussen können. Kong und Kollegen konnten im Schlaganfall-Modell der Ratte zeigen, dass eine viertägige Vorbehandlung mit RA zu einer signifikanten Reduktion des Infarkt Volumens durch Beeinflussung der am Bau der *Tight Junctions* beteiligten Proteine führt (Kong et al., 2015). Im IgG-Dotblot und in der Immunhistochemie konnte in dieser Studie kein signifikanter Unterschied zwischen der ATRA- und der Vehikel-Gruppe festgestellt werden.

Aus Studien ist bekannt, dass RA und ATRA auf unterschiedlichen Ebenen eine immunmodulierende Wirkung erzielen. ATRA erhöht z. B. die Konversionsrate von naiven CD4+Zellen zu regulatorischen T-Zellen, die autoreaktive Immunzellen hemmen können und so auch im breiten Feld der Autoimmunerkrankungen einen möglichen Therapieansatz bieten (Lu et al., 2014; Nolting et al., 2009). Andere Studien zeigen, dass ATRA *in vitro* die Prostaglandinsynthese in Astrozyten hemmen

kann (Kampmann et al., 2008). Cai und Kollegen untersuchten im Schlaganfall-Modell der Maus u. a. den Einfluss von ATRA auf die Neutrophilenaktivität innerhalb der ZNS-Läsion. Sie konnten zeigen, dass eine Vorbehandlung in Kombination mit einer täglichen Applikation von ATRA über drei aufeinander folgende Tage im Rahmen des Sekundärschadens zu einer Reduktion des Schadenvolumens durch verminderte Akkumulation von Neutrophilen führt (Cai et al., 2019). In einer anderen Studie untersuchten Kim und Kollegen den Einfluss von ATRA im Schlaganfall-Modell des Gerbils und *in vitro* auf proinflammatorische Zytokine TNF- α und IL-6. Auch hier erfolgte eine Vorbehandlung über fünf Tage mit anschließenden wiederholten intraperitonealen Gaben von ATRA über drei Tage. Sowohl in der neurologischen Verhaltenstestung als auch in der anschließenden molekularbiologischen Untersuchung konnte ein positiver Effekt einer therapeutischen Dosierung von 10 mg/kg bzw. 5 mg/kg auf die Neuroinflammation gezeigt werden (Kim et al., 2013). In einer anderen Studie wurde die Bedeutung von RA für die Astrogliose untersucht und gezeigt, dass eine RA-Mangelernährung zur erhöhten Astrozytenaktivität und damit zum erhöhten neuronalen Verlust beim hypoxischen Hirnschaden führt (Corcoran et al., 2002). Insgesamt liefern viele Studien Hinweise darauf, dass ATRA einen regulatorischen und vor allem auch antiinflammatorischen Effekt auf zahlreiche Komponenten der Entzündungsreaktion hat. Trotz der vielversprechenden Ansätze konnte in dieser Studie kein Einfluss von ATRA auf die Neuroinflammation gezeigt werden. Im direkten Vergleich der vorliegenden Ergebnisse mit den anderen wird vor allem deutlich, dass die größten Unterschiede in der Vorbehandlung und der Therapiedauer liegen. In den Studien unserer Arbeitsgruppe erfolgte eine intraperitoneale Applikation von ATRA über einen Gesamtzeitraum von vier Tagen; bei einem Gesamtüberleben von einmal sieben und einmal 30 Tagen konnte eine antiinflammatorische und damit neuroprotektive Wirkung von ATRA gezeigt werden (Hummel et al., 2020). In der Synopse der Ergebnisse wird die Notwendigkeit einer längeren Therapiedauer deutlich. Zudem müsste die Bedeutung der Vorbehandlung isoliert betrachtet werden. Im klinischen Setting wäre diese Behandlungsoption nämlich nicht gegeben. Auch könnte man daraus schließen, dass ATRA über Mechanismen wirkt, die erst über einen längeren Zeitraum ihre Wirkung zeigen.

6.5 Einfluss von ATRA auf die Apoptose

Apoptose ist ein weiterer Bestandteil der pathologischen Prozesse im Rahmen des

Sekundärschadens. Im Akutgeschehen zeitlich der Neuroinflammation nachgeschaltet, bedingt sie im Schadensareal weiteren Zelluntergang. Die freigesetzten Entzündungsmediatoren bewirken die Aktivierung von gleichzeitig proapoptotischen sowie antiapoptotischen Mediatoren innerhalb der Zelle. Je nachdem, welche Mediatoren in diesem komplexen Zusammenspiel überwiegen, wird die Zelle in den programmierten Zelltod geschickt oder überlebt den Schaden. Diese Pathomechanismen finden sich im Rahmen unterschiedlicher neuronaler Schäden wie Schlaganfall, neurodegenerativer Erkrankungen oder SHT sowohl im Tiermodell wie auch beim Menschen (reviewed Cernak, 2005; Lozano et al., 2015).

Bax ist ein proapoptotisches Protein, bei dessen Überexpression in der Zelle die Apoptose ausgelöst wird. Bax ist ein Teil des intrinsischen Wegs der Apoptose und geht der Caspase-3-Aktivierung zeitlich voraus (Cregan et al., 1999). Im CCI-Modell der Maus findet sich eine schnelle Hochregulierung der Bax mRNA-Expression nach dem CCI (Israelsson et al., 2008). In einem *in vitro* Versuch, in dem PC12-Zellen einer Sauerstoff-Glucose-Deprivation ausgesetzt waren, wurde der Einfluss von ATRA auf die Apoptoserate und die Bax-Expression in der Zellkultur untersucht. Eine ATRA-Behandlung führte zu einer signifikanten Reduktion sowohl von Bax als auch apoptotischer Zellen (Zhang et al., 2014). Cernak *et al.* zeigten in einem *In-vivo*-Versuch im Ratten-Modell eines schweren diffusen axonalen Schadens, dass bereits nach 24 h eine signifikanter Bax-Anstieg detektierbar ist, der seinen höchsten Peak nach 48 h erreicht. Eine Caspase-3-Erhöhung war in ihrer Studie in den ersten 24 h nicht feststellbar. Darüber hinaus zeigten sie, dass der Caspase-3-Anstieg zeitlich versetzt auf die Bax-Erhöhung folgt und erst nach 48 h einen signifikanten Konzentrationsunterschied zu den Sham-Tieren aufweist. Die höchsten Konzentrationen von Caspase-3 sind zwischen dem dritten und dem fünften Tag zu finden, während die Mengen von Bax bereits zurückgehen (Cernak et al., 2002). Diese Untersuchung deckt sich auch mit den Ergebnissen dieser Studie. Es ließ sich ein signifikanter Bax-Anstieg im Vergleich der beiden ATRA-Gruppen feststellen, jedoch nicht in der Vehikel-Gruppe, bei der lediglich ein Trend zu erkennen war. Die fehlende Signifikanz in der Vehikel-Gruppe könnte allerdings den sehr geringen gemessenen Mengen geschuldet sein. Ein Einfluss von ATRA konnte weder in der CCI-Gruppe noch in der Sham-Gruppe festgestellt werden. Bei der Messung der mRNA-Expression von Caspase-3 konnte man hier zwischen keinen der vier Gruppen einen Unterschied feststellen. Zum einem waren die detektierbaren Mengen sehr gering und zum anderen deckt sich das Ergebnis auch mit den anderen Studien und der

Erwartung, dass Caspase-3 als Apoptosemarker im Rahmen des Sekundärschadens anderen Prozessen zeitlich nachgeschaltet ist. Eine andere Untersuchung unserer Arbeitsgruppe stützt diese Erkenntnisse mit dem Nachweis einer signifikanten Caspase-3-Erhöhung nach sieben Tagen im CCI-Modell (Hummel et al., 2020).

Als ein antiapoptotisches Protein fördert das BAG1 neben dem Zellüberleben auch die Proteinhomeostase und ist am Abbau fehlerhafter Proteine beteiligt. So erhöht es z. B. in Tumorzellen die Widerstandsfähigkeit gegenüber Apoptose und fördert obendrein die Zellproliferation (Kilbas et al., 2019). In einem *In-vitro*-Versuch an den Neuroblastomzellen SH-SY5Y wurde gezeigt, dass eine Ausschaltung des BAG1-Gens zu einem reduzierten Zellüberleben unter hypoxischem Stress führt (Song et al., 2020). Xu und Kollegen untersuchten das zeitliche Profil der BAG1-Expression im CCI-Modell der Ratte. Eine signifikante BAG1-Erhöhung war erst am Tag 5 nach dem SHT feststellbar (Xu et al., 2012). Diese Ergebnisse stimmen auch mit denen dieser Arbeitsgruppe überein. In der vorliegenden Arbeit konnte im 24-h-Versuch keinen signifikanten Unterschied in der BAG1 mRNA-Expression zwischen allen vier Gruppen gezeigt werden. Auch konnte nicht gezeigt werden, dass ATRA zu einer erhöhten Expression des BAG1 führt und damit zur Neuroprotektion beiträgt. Das BAG3 und seine Funktionen lassen sich mit dem BAG1 vergleichen: Es gilt ebenfalls als antiapoptotisch und ist am Abbau von Proteinen beteiligt. Allerdings wurde gezeigt, dass das BAG3 mehr im Rahmen der Autophagie agiert, also wenn größere Zellschäden vorliegen und nicht genügend Adenosintriphosphat für den aktiven proteosomalen Abbau vorhanden ist. Liu und Kollegen untersuchten im Schlaganfall-Modell der Maus den schweregradabhängigen Wechsel zwischen dem ubiquitinierten proteosomalen Abbau und der Autophagie. Sie zeigten, dass es zunächst unabhängig vom Schweregrad der Ischämie in den ersten 24 h zu einem Abfall des BAG1 kommt, was für eine Beeinträchtigung des Adenosintriphosphat-abhängigen proteosomalen Abbaus spricht. Gleichzeitig konnten sie zeigen, dass es bereits nach einer zehnminütigen Unterbrechung der zerebralen Perfusion zu einem signifikanten BAG3-Anstieg kommt, der umso größer ausgeprägt war, je länger die Ischämie andauerte. Daraus schlussfolgerten die Autoren, dass die ischämiebedingte Adenosintriphosphat-Depletion und Aggregation fehlerhafter Proteine zu einer Aktivierung der Autophagie, aber nicht zu dem proteosomalen Abbau führt (Liu et al., 2020). Die Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe der BAG3 mRNA-Expression stimmen mit den Ergebnissen von Liu *et al.* überein und zeigen einen signifikanten Unterschied zwischen den Sham- und CCI-Tieren in beiden Gruppen, allerdings

ohne einen erkennbaren Einfluss von ATRA.

Spektrinabbauprodukte stehen aktuell in der Diskussion als mögliche Biomarker für neuronalen Schaden im klinischen Alltag zum Einsatz zu kommen. Das calpainabhängige 150- und 145-kDa-große Spaltprodukt des α -II-Spektrins, das mit der Nekrose assoziiert ist, und das 120-kDa große Spaltprodukt der Caspase-3, das im Rahmen der Apoptose auftritt, lassen sich beim humanen SHT im Plasma und Liquor nachweisen (Siman et al., 2013). Während sich erhöhte Mengen der Calpain-spaltprodukte innerhalb von Stunden im Gewebe, Serum und Liquor nachweisen lassen, scheint das Caspasespaltprodukt in den ersten Stunden und Tagen keinen Anstieg zu haben (Pineda et al., 2007). Ringger und Kollegen untersuchten im CCI-Modell der Ratte die zeitliche Konzentrationsänderung der Spektrinspaltprodukte nach 2, 6 und 24 h nach dem SHT. Dabei konnten sie zum einen zeigen, dass die Konzentrationsänderungen für die Calpainspaltprodukte schweregradabhängig sind und zum anderen, dass selbst nach einem schweren SHT innerhalb von 24 h keine nachweisbaren Mengen des 120-kDa-Spaltprodukts nachweisbar waren (Ringger et al., 2004). Diese Ergebnisse konnten auch von uns bestätigt werden. Die CCI-Gruppen zeigten eine signifikante Erhöhung der 150/145-kDa-Fragmente im Vergleich zu den Sham-Tieren, ohne einen detektierbaren Einfluss von ATRA. Der fehlende Anstieg von Caspase-3 in dieser Studie führte erwartungsgemäß dazu, dass auch ihre Spaltprodukte nicht nachgewiesen werden konnten. In der Synopse der Ergebnisse scheinen sowohl Caspase-3 als auch ihre Spaltprodukte keine geeigneten Akutmarker für neuronalen Schaden zu sein.

Bei der Therapie solider Tumore steht ATRA schon lange im Fokus der Forschung. Eine der zentralen Wirkmechanismen im Therapieansatz mit ATRA ist seine apoptoseinduzierende Wirkung in Tumorzellen (reviewed in Giuli et al., 2020; Ni et al., 2019). Studien der neurobiologischen Forschung zeigen, dass ihr neuroprotektiver Effekt u. a. durch seine antiapoptotische Wirkung in neuronalen Zellen im Rahmen des Sekundärschadens entsteht. Kim und Kollegen untersuchten in ihrer Studie ebenfalls den Einfluss von ATRA auf die Apoptose. Dazu wurde die Aktivität von Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1 (PARP-1) gemessen, die durch Caspase-3-Aktivierung ausgeschaltet wird und ebenfalls als Marker für Apoptose verwendet werden kann (Kim et al., 2013; Van Wijk und Hageman, 2005). Sie konnten zeigen, dass eine ATRA-Therapie beim neuronalen Schaden neben der Inhibition der Neuroinflammation eine Reduktion der Apoptose bewirkt (Kim et al., 2013). Andere Unter-

suchungen zeigen in *In-vitro*-Experimenten, dass ATRA über verschiedene regulatorische Einflüsse die Apoptose in neuronalen Zellen inhibieren kann, z. B. reduziert es gesteuert durch den RAR α -Rezeptor die Bax-Expression (Dong und Zhang, 2018). Auch im Modell des neonatalen hypoxischen Hirnschadens kann der neuroprotektive Effekt von ATRA anhand seiner apoptoseinhibierenden Wirkung deutlich gezeigt werden. Eine postpartale RA-Reduktion in der Nahrung führt z. B. zu erhöhten Aktivierung des intrinsischen Signalwegs der Apoptose und zur erhöhten Vulnerabilität beim hypoxischen Hirnschaden (Jiang et al., 2018). Obwohl zahlreiche Studien die antiapoptotische Wirkung von ATRA in neuronalen Zellen belegen, konnte dieser Effekt in der vorliegenden Studie nicht nachgewiesen werden. Auch für das Hsp- β 1, das regulatorischen Einfluss auf die Apoptose hat und hemmend auf diese wirkt, konnte in dieser Analyse kein Einfluss von ATRA gezeigt werden. Stetler und Kollegen konnten sowohl im Schlaganfall-Modell der Maus als auch in einem Ischämie-in-vitro-Modell zeigen, dass ischämiebedingt eine schnelle Hochregulation des Hsp- β 1 erfolgt und dass dessen Überexpression einen neuroprotektiven Effekt hat (Stetler et al., 2012). Trotzdem stehen die vorliegenden Ergebnisse nicht im direkten Widerspruch zum aktuellen Stand der Forschung. Die hier gewählten Marker für Apoptose erlauben im Kontext eines 24-h-Überlebens relativ wenig Aufschluss über das Ausmaß der Apoptose, da diese zeitlich versetzt auf die Neuroinflammation folgt und ihre Folgen erst in den ersten Tagen nach dem Trauma zu beobachten sind. Für ein so frühes Zeitfenster scheinen apoptoseregulierende Proteine besseren Aufschluss über apoptotische Vorgänge zu geben als Marker, die erst als Folge der Apoptose entstehen. So wären in einem so kurzen Studiendesign z. B. die Untersuchungen des proapoptotischen Bad (*Bcl-associated death protein*), das den intrinsischen Weg der Apoptose induziert, oder des antiapoptotischen Bcl-2 aufschlussreicher gewesen (Noy, 2010; Zhang et al., 2014). Dennoch konnte für die Marker Bax und BAG3, die einen signifikanten Unterschied zwischen den Sham- und CCI-Tieren gezeigt haben, kein Einfluss von ATRA gezeigt werden.

6.6 Limitationen der Studie und Aussicht

Trotz der vielversprechenden Ansätze in diversen Studien zum neuroprotektiven Effekt von ATRA, war in dieser Studie kein Hinweis darauf zu finden. Die Volumetrie konnte in diesem Experiment auch keine signifikante Reduktion des Schadensvolumens in der ATRA-Therapie zeigen, was allerdings in anderen Studien gezeigt

werden konnte. Eine ATRA-Behandlung führte z. B. im Schlaganfallmodell sowohl in Maus-Variante als auch in der Ratten-Variante zu vermindertem Schadensvolumen (Cai et al., 2019; Kong et al., 2015). Viele Untersuchungen zum neuroprotektiven Effekt von ATRA bei neuronalem Schaden wurden in Schlaganfallmodellen durchgeführt. Da beim SHT und dem Schlaganfall ähnliche pathologischen Prozesse stattfinden, lassen sich die Ergebnisse aus solchen Studien sowohl beim Menschen als auch beim Versuchstier gegenseitig übertragen (reviewed in Tuttolomondo et al., 2014; Zhang et al., 2011). Auch diese Arbeitsgruppe konnte eine Reduktion des Schadensvolumens im CCI-Modell unter einer längeren ATRA-Therapie im Langzeiüberleben zeigen (Hummel et al., 2020).

Im direkten Vergleich dieser Studie mit den anderen wird in der Synopse des Studiendesigns und der Ergebnisse deutlich, dass vor allem die Therapiedauer als einer der größten Unterschiede imponiert. Die Versuchstiere erhielten in anderen Experimenten eine Vorbehandlung und/oder wiederholte Gaben über mehrere Tage bzw. Wochen. Auch Langzeittherapien standen im Fokus der Untersuchungen bei den neurodegenerativen Erkrankungen. Sodhi und Singh untersuchten in einem Alzheimer-Modell an der Maus die Auswirkungen einer täglichen ATRA-Applikation (10 mg/kg bzw. 20 mg/kg) *per os* in dem Zeitraum von 19 Tagen und konnten zeigen, dass die Therapie zu reduzierten verhaltensbiologischen und kognitiven Defiziten führt (Sodhi und Singh, 2013). In einem Tiermodell der amyotrophen Lateralsklerose führte eine tägliche ATRA-Gabe von 3mg/kg *per os* über fünf Wochen zu einem verbesserten Outcome der Tiere u. a. durch verminderte Astrozytenaktivität und Reduktion des oxidativen Stresses (Zhu et al., 2020). Untersuchungen zur Pharmakokinetik von ATRA zeigen, die schnelle Elimination aus dem Blutplasma, sodass auch diese Ergebnisse Hinweise darauf liefern, dass eine wiederholte Gabe für einen therapeutischen Effekt von Vorteil wären (Saadeddin et al., 2015). Die Notwendigkeit einer längeren Therapiedauer führt zur Annahme, dass ATRA durch ihren regulatorischen Einfluss auf die Genaktivität vor allem die langfristigen Prozesse wie Apoptose, Neurogenese und andere Reparaturvorgänge steuert. Dennoch gibt es auch Untersuchungen, die einen schnellen therapeutischen Effekt bei einer Bolusgabe von ATRA zeigen. Sato und Kollegen untersuchten in einer Dosisfindungsstudie den Effekt von ATRA im Schlaganfallmodell der Maus sowohl bei einer zweimaligen Gabe als auch einer Bolusapplikation intraperitoneal. Dabei konnten sie zeigen, dass es bereits ab einer Dosis von 1,5 mg/kg zur signifikanten Reduktion des Schadensareals kommt und der stärkste therapeutische Effekt bei

einer Konzentration von 10 mg/kg zu sehen war (Sato et al., 2008). Bereits eine Einmalgabe weist somit einen neuroprotektiven Effekt auf. In allen bisher aufgeführten Studien, einschließlich dieser Arbeitsgruppe, lag die gewählte Dosis von ATRA in den *In-vivo*-Versuchen bei der Maus in diesem Intervall, unabhängig davon, ob eine Applikationsform *per os* oder intraperitoneal gewählt wurde. Satos Untersuchung stützt die Erwartung dieser Arbeitsgruppe, dass in dem hier gewählten Studiendesign ebenfalls ein Effekt von ATRA zu erwarten war. Man nimmt an, dass eine zentrale, intrazerebroventrikuläre Applikation eine bessere Distribution des Wirkstoffs im ZNS gewährleistet. Diese Applikationsart ermöglicht gleichzeitig das Umgehen einer eingeschränkten BHS-Gängigkeit und verzögert gleichzeitig die periphere Elimination des Wirkstoffs. Aufgrund interner Untersuchungen wurde in dieser Studie eine Dosis von 2 µg/µl für eine intrazerebroventrikuläre-Applikation gewählt, da höhere Dosierungen von 10 µg/µl einen toxischen Effekt mit letalem Ausgang für die Versuchstiere hatten. In der Synopse der Ergebnisse scheint dies jedoch keine ausreichend hohe Dosis für einen therapeutischen Effekt zu sein. Weiterhin limitierend für die Aussagekraft dieser Studie ist die Tatsache, dass die Ergebnisse lediglich den Zeitpunkt 24 h nach dem CCI widerspiegeln. Denkbar wären auch Analysen mit einem längeren Überlebenszeitraum und wiederholten intrazerebroventrikulären-Gaben von ATRA. Es stellt sich aber auch die Frage, ob eine intrazerebroventrikuläre-Gabe aus pharmakokinetischen Gründen und der Notwendigkeit einer Dosisreduktion eine geeignete Applikationsform für das ATRA darstellt. Eine Dosisfindungsstudie für die intrazerebroventrikuläre-Applikation könnte bei dieser Fragestellung aufschlussreich sein. Harvey und Kollegen konnten z. B. beim Schlaganfall der Ratte keinen Einfluss von ATRA bei einer intrazerebroventrikulären Applikation feststellen (Harvey et al., 2004). Darüber hinaus sollte Beachtung finden, dass ATRA als pleiotropes Pharmazeutikum eine systemische Wirkung auf den Organismus hat, die ebenfalls zum Therapieerfolg beitragen kann. Dabei ist ihre Wirkung auf die Immunzellen der Peripherie von besonderer Bedeutung, da sie im Rahmen der Neuroinflammation zum letztendlichen Ausmaß des Sekundärschadens beitragen (Liu et al., 2015; Lu et al., 2014). Bei Mäusen als Versuchstier wird aus praktischen Gründen die intraperitoneale Applikation als Alternative zur intravenösen-Gabe gewählt. Grundsätzlich ist aber auch eine orale Gabe möglich. In der Zusammenschau der Ergebnisse sollte bei zukünftigen Studiendesigns eine systemische Applikationsform gewählt werden. Weiter kann man aus der Summe der bisherigen Untersuchungen schließen, dass eine ATRA-

Therapie zumindest unmittelbar nach dem Trauma stattfinden muss, um einen protektiven Effekt zu zeigen.

Auch wenn die vorliegende Studie keinen Benefit einer ATRA-Therapie im CCI-Modell der Maus zeigen konnte, stehen die erarbeiteten Ergebnisse nicht im Widerspruch zu den vorherigen Studien. ATRA bleibt weiterhin ein vielversprechendes Therapeutikum im Bereich der neuronalen Forschung. Es wurde deutlich, dass eine Bolustherapie Mehrfachgaben in ihrer Wirkung unterlegen ist. Zudem sollte in künftigen Studien auf eine intrazerebroventrikuläre-Gabe verzichtet werden. Im Ausblick auf die Übertragung ins klinische Setting ist diese Erkenntnis als Vorteil zu werten. Eine systemische Gabe ist im Vergleich zu einer lokalen Therapie, wie der intrathekalen Applikation bei einem SHT, deutlich einfacher in der Umsetzung. Weiter wird damit eine periphere Wirkung induziert, die das oft heterogene Verletzungs- oder Erkrankungsmuster positiv beeinflussen kann. In künftigen Fragestellungen sollte der Fokus auf die Langzeitwirkung von ATRA gelegt werden und das Studiendesign dahingehend angepasst werden, da aus den Experimenten anderer Arbeitsgruppen bekannt ist, dass ATRA vor allem Auswirkungen auf Langzeitvorgänge wie Apoptose, Neurogenese und chronische Neuroinflammation im Körper hat. Denkbar sind auch weitere Ansätze einer Kombinationstherapie mit ATRA, um den neuroprotektiven Effekt zu erhöhen (Chu et al., 2015).

7 Zusammenfassung

Das große Feld des SHT umfasst ein breites Patientenkollektiv. Dazu gehören junge Erwachsenen, bei denen das SHT zu den häufigsten Ursachen für Tod und erworbene körperliche oder geistige Behinderung zählt und auch ältere Patienten, die im Rahmen eines Sturzes ein SHT erleiden. Erweitert wird dieses Kollektiv z. B. von Sportlern, die rezidivierenden Stößen gegen den Kopf ausgesetzt sind und die als Folge Jahre später zu chronischentzündlichen Vorgängen im ZNS und neurodegenerativen Erkrankungen führen. Den größten Erfolg kann man bisher nur durch präventive Maßnahmen erreichen, um einen Primärschaden des ZNS zu verhindern. Der für den Gesamtschaden genauso entscheidende Sekundärschaden bleibt bisher erfolgreichen therapeutischen Ansätzen unzugänglich, womit das SHT weiterhin seine hohe sozioökonomische Bedeutung behält.

Der Sekundärschaden besteht aus einer Vielzahl einzelner Pathomechanismen, die alle ineinandergreifen und sich auch gegenseitig beeinflussen. Der initial verursachte Zellschaden, führt u. a. zu einer Permeabilitätssteigerung der BHS, zur Aktivierung von Immunzellen und zur Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen. Dies führt zu Gewebshypoxie, Infiltration von peripheren Immunzellen, Steigerung des intrakraniellen Drucks und nicht zuletzt zur Neuroinflammation, die ihrerseits wiederum die initialen Vorgänge forciert und letztendlich in Apoptose mündet, die weiteren Zelluntergang zur Folge hat. Insgesamt sind das SHT und seine sekundären Prozesse eine mit der Zeit sich dynamisch veränderliche Kondition, in der die Pathomechanismen sich zeitlich teilweise überschneiden, teilweise erst aufeinander folgen und ihren Peak zu verschiedenen Zeitpunkten erreichen. Während z. B. die Nekrose und die akute Neuroinflammation innerhalb von Minuten bis Stunden auftreten, folgt die Apoptose erst Tage später. Sogar Jahre nach einem SHT lassen sich pathologische Prozesse wie chronische Neuroinflammation im ZNS nachweisen. Als pleiotrope Substanz greift ATRA in eine Vielzahl zellulärer Prozesse ein, die auch im Rahmen des komplexen Sekundärschadens zum neuronalen Schaden beitragen, woraus sich ein vielversprechender Therapieansatz eines SHT ergibt. Forschungsergebnisse belegen protektive Effekte von ATRA in unterschiedlichen *In-vitro*- und *In-vivo*-Untersuchungen.

Die Frage ist, unter welchen Bedingungen und auf welche Weise genau ATRA zur Neuroprotektion beim SHT beitragen kann. Für diese Fragestellung erfolgte eine

Untersuchung des Effekts einer einmaligen ATRA-Bolusgabe auf den Sekundärschaden in der Akutphase eines SHT innerhalb der ersten 24 Stunden. Dazu wurde eine einmalige intrazerebroventrikuläre ATRA-Gabe unmittelbar vor dem Trauma im CCI-Modell der Maus appliziert. 24 h nach dem CCI wurden die Tiere euthanasiert und das Gewebe histologisch und molekularbiologisch analysiert. In den verhaltensbiologischen Untersuchungen konnte kein Benefit von ATRA festgestellt werden. Weiter wurde der Einfluss auf die initiale Neuroinflammation erforscht, indem die mRNA-Expression der Zytokine IL-1 β und TNF- α , dem Mikrogliaaktivitätsmarker Iba1 und dem Astrogliosemarker GFAP detektiert wurde. Auch die nachgewiesene antiapoptotische Wirkung von ATRA stand im Fokus der Fragestellung. Dazu erfolgte die Messung der mRNA-Expression von Caspase-3, des proapoptotischen Bax, der antiapoptotischen BAG1, BAG3 und des Hsp- β 1. Zusätzlich wurde für diese Fragestellung die Proteinanalyse der Spektrin-Spaltprodukte durchgeführt. Die histologischen Untersuchungen sollten allgemeine Erkenntnisse über ATRAs Einfluss auf die Integrität der BHS und das Schadensvolumen liefern. Trotz der erfolgversprechenden Therapieansätze mit ATRA und des bekannten neuroprotektiven Effekts sowohl in der Initialphase eines neuronalen Schadens als auch bei Langzeitbeobachtungen konnte in keiner der aufgezählten Analysen ein Einfluss von ATRA auf die Akutphase von 24 Stunden und auf die initialen Prozessen im Rahmen des Sekundärschadens aufgezeigt werden.

Unsere Erwartungen waren gestützt auf die unterschiedlichen Studien, die in diversen *In-vivo*-Modellen verschiedener neuronaler Schäden wie Ischämie, SHT oder neurodegenerative Erkrankungen den neuroprotektiven Effekt von ATRA zu unterschiedlichen Interventionszeitpunkten gezeigt hatten. In der Zusammenschau aller Ergebnisse und dem Vergleich mit anderen Arbeitsgruppen konnte in unserer Studie gezeigt werden, dass eine intrazerebroventrikuläre-Bolusgabe von ATRA in der initialen Akutphase keine geeignete Therapieform für das SHT ist. Es scheint, dass die gewählte Applikationsart mit Einbußen in der fehlenden peripheren Wirkung und die für diese Applikationsform notwendige Dosisreduktion mit Verlust der Wirksamkeit einhergeht. Perspektivisch bleibt ATRA ein aussichtsreiches Therapeutikum, dessen Vorteile mehr im Rahmen einer systemischen Langzeittherapie zum Tragen kommen.

8 Literaturverzeichnis

- Addington C.P., Roussas A., Dutta D., Stabenfeldt S.E., 2015. Endogenous Repair Signaling after Brain Injury and Complementary Bioengineering Approaches to Enhance Neural Regeneration. *Biomark Insights* 10, 43–60. <https://doi.org/10.4137/BMI.S20062>
- Adrian H., Mårten K., Salla N., Lasse V., 2016. Biomarkers of Traumatic Brain Injury: Temporal Changes in Body Fluids. *eNeuro* 3. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0294-16.2016>
- Akbar M.T., Lundberg A.M.C., Liu K., Vidyadaran S., Wells K.E., Dolatshad H., Wynn S., Wells D.J., Latchman D.S., Bellerocche J., 2003. The Neuroprotective Effects of Heat Shock Protein 27 Overexpression in Transgenic Animals against Kainate-induced Seizures and Hippocampal Cell Death *. *Journal of Biological Chemistry* 278, 19956–19965. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207073200>
- Alberti S., Esser C., Höhfeld J., 2003. BAG-1—a nucleotide exchange factor of Hsc70 with multiple cellular functions. *Cell Stress Chaperones* 8, 225–231.
- Albert-Weissenberger C., Sirén A.-L., 2010. Experimental traumatic brain injury. *Experimental & Translational Stroke Medicine* 2, 16. <https://doi.org/10.1186/2040-7378-2-16>
- Allenby G., Janocha R., Kazmer S., Speck J., Grippo J.F., Levin A.A., 1994. Binding of 9-cis-retinoic acid and all-trans-retinoic acid to retinoic acid receptors alpha, beta, and gamma. Retinoic acid receptor gamma binds all-trans-retinoic acid preferentially over 9-cis-retinoic acid. *Journal of Biological Chemistry* 269, 16689–16695. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)89445-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)89445-0)
- Andersson A.K., Rönnbäck L., Hansson E., 2005. Lactate induces tumour necrosis factor- α , interleukin-6 and interleukin-1 β release in microglial- and astroglial-enriched primary cultures. *Journal of Neurochemistry* 93, 1327–1333. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03132.x>
- Armulik A., Genové G., Mäe M., Nisancioglu M.H., Wallgard E., Niaudet C., He, L., Norlin J., Lindblom P., Strittmatter K., Johansson B.R., Betsholtz C., 2010. Pericytes regulate the blood–brain barrier. *Nature* 468, 557–561. <https://doi.org/10.1038/nature09522>
- Ashkenazi A., Dixit V.M., 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305–1308. <https://doi.org/10.1126/science.281.5381.1305>
- Aumüller G., 2010. *Duale Reihe Anatomie*. 2. Auflage. Thieme, Stuttgart.
- Babino D., Perkins B.D., Kindermann A., Oberhauser V., von Lintig J., 2015. The role of 11-cis-retinyl esters in vertebrate cone vision. *FASEB J* 29, 216–226. <https://doi.org/10.1096/fj.14-261693>
- Baker E.W., Henderson W.M., Kinder H.A., Hutcheson J.M., Platt S.R., West F.D., 2018. Scaled traumatic brain injury results in unique metabolomic signatures between gray matter, white matter, and serum in a piglet model. *PLoS One* 13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206481>
- Balmer J.E., Blomhoff R., 2002. Gene expression regulation by retinoic acid. *Journal of Lipid Research* 43, 1773–1808. <https://doi.org/10.1194/jlr.R100015-JLR200>
- Başkaya M.K., Muralikrishna Rao A., Doğan A., Donaldson D., Dempsey R.J., 1997. The biphasic opening of the blood–brain barrier in the cortex and hippocampus after traumatic brain injury in rats. *Neuroscience Letters* 226, 33–36. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(97\)00239-5](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(97)00239-5)
- Batool S., Raza H., Zaidi J., Riaz S., Hasan S., Syed N.I., 2019. Synapse formation: from cellular and molecular mechanisms to neurodevelopmental and neurodegenerative disorders. *Journal of Neurophysiology* 121, 1381–1397.

- <https://doi.org/10.1152/jn.00833.2018>
- Behl C., 2011. BAG3 and friends: Co-chaperones in selective autophagy during aging and disease. *Autophagy* 7, 795–798. <https://doi.org/10.4161/auto.7.7.15844>
- Bhalala O.G., 2015. The Emerging Impact of microRNAs in Neurotrauma Pathophysiology and Therapy, in: Kobeissy, F.H. (Ed.), *Brain Neurotrauma: Molecular, Neuropsychological, and Rehabilitation Aspects*, *Frontiers in Neuroengineering*. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton (FL).
- Böhme H., Dimigen J., Gerold S., Haemisch A., Lübke R., Ott S., Scheer M., Tsai P.P., Clausing P.. Tiergerechte Haltung: Labormäuse www.gv-solas.de: GV-SOLAS
- Bramlett H.M., Dietrich W.D., 2015. Long-Term Consequences of Traumatic Brain Injury: Current Status of Potential Mechanisms of Injury and Neurological Outcomes. *J Neurotrauma* 32, 1834–1848. <https://doi.org/10.1089/neu.2014.3352>
- Bramlett H.M., Dietrich W.D., 2004. Pathophysiology of Cerebral Ischemia and Brain Trauma: Similarities and Differences. *J Cereb Blood Flow Metab* 24, 133–150. <https://doi.org/10.1097/01.WCB.0000111614.19196.04>
- Brenner M., 2014. Role of GFAP in CNS injuries. *Neurosci Lett* 565, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.01.055>
- Broadwell R., Salzman M., Kaplan R., 1982. Morphologic effect of dimethyl sulfoxide on the blood-brain barrier. *Science* 217, 164–166. <https://doi.org/10.1126/science.7089551>
- Brobyn R.D., 1975. THE HUMAN TOXICOLOGY OF DIMETHYL SULFOXIDE. *Annals of the New York Academy of Sciences* 243, 497–506. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1975.tb25394.x>
- Brodmann K., 1909. Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnrinde in ihren Prinzipien dargestellt auf Grund des Zellenbaues. Barth, Leipzig.
- Burnette W.N., 1981. “Western blotting”: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112, 195–203. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90281-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90281-5)
- Cai W., Wang J., Hu M., Chen X., Lu Z., Bellanti J.A., Zheng S.G., 2019. All trans-retinoic acid protects against acute ischemic stroke by modulating neutrophil functions through STAT1 signaling. *Journal of Neuroinflammation* 16, 175. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1557-6>
- Carazo A., Macáková K., Matoušová K., Krčmová L.K., Protti M., Mladěnka P., 2021. Vitamin A Update: Forms, Sources, Kinetics, Detection, Function, Deficiency, Therapeutic Use and Toxicity. *Nutrients* 13, 1703. <https://doi.org/10.3390/nu13051703>
- Carpenter K.L.H., Czosnyka M., Jalloh I., Newcombe V.F.J., Helmy A., Shannon R.J., Budohoski K.P., Koliás A.G., Kirkpatrick P.J., Carpenter T.A., Menon D.K., Hutchinson P.J., 2015. Systemic, Local, and Imaging Biomarkers of Brain Injury: More Needed, and Better Use of Those Already Established? *Front Neurol* 6. <https://doi.org/10.3389/fneur.2015.00026>
- Carter R.J., Morton J., Dunnett S.B., 2001. Motor Coordination and Balance in Rodents. *Current Protocols in Neuroscience* 15. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0812s15>
- Cernak I., 2005. Animal Models of Head Trauma. *NeuroRx* 2, 410–422. doi:10.1602/neurorx.2.3.410
- Cernak I., Chapman S.M., Hamlin G.P., Vink R., 2002. Temporal characterisation of pro- and anti-apoptotic mechanisms following diffuse traumatic brain injury in

- rats. *Journal of Clinical Neuroscience* 9, 565–572.
<https://doi.org/10.1054/jocn.2002.1132>
- Chen A.-Q., Fang Z., Chen X.-L., Yang S., Zhou Y.-F., Mao L., Xia Y.-P., Jin H.-J., Li Y.-N., You M.-F., Wang X.-X., Lei H., He Q.-W., Hu B., 2019. Microglia-derived TNF- α mediates endothelial necroptosis aggravating blood brain–barrier disruption after ischemic stroke. *Cell Death Dis* 10, 487.
<https://doi.org/10.1038/s41419-019-1716-9>
- Chen Y., Constantini S., Trembovler V., Weinstock M., Shohami E., 1996. An Experimental Model of Closed Head Injury in Mice: Pathophysiology, Histopathology, and Cognitive Deficits. *Journal of Neurotrauma* 13, 557–568.
<https://doi.org/10.1089/neu.1996.13.557>
- Chiaretti A., Genovese O., Aloe L., Antonelli A., Piastra M., Polidori G., Di Rocco C., 2005. Interleukin 1beta and interleukin 6 relationship with paediatric head trauma severity and outcome. *Childs Nerv Syst* 21, 185–193; discussion 194.
<https://doi.org/10.1007/s00381-004-1032-1>
- Chio C.-C., Lin J.-W., Chang M.-W., Wang C.-C., Kuo J.-R., Yang C.-Z., Chang C.-P., 2010. Therapeutic evaluation of etanercept in a model of traumatic brain injury. *Journal of Neurochemistry* 115, 921–929.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06969.x>
- Chiu C.-C., Liao Y.-E., Yang L.-Y., Wang Jing-Ya, Tweedie D., Karnati, H.K., Greig N.H., Wang Jia-Yi, 2016. Neuroinflammation in animal models of traumatic brain injury. *J Neurosci Methods* 272, 38–49.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2016.06.018>
- Chu T., Zhou H., Wang T., Lu L., Li F., Liu B., Kong X., Feng S., 2015. In vitro characteristics of Valproic acid and all-trans-retinoic acid and their combined use in promoting neuronal differentiation while suppressing astrocytic differentiation in neural stem cells. *Brain Research* 1596, 31–47.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.11.029>
- Colas J., Chessel N., Ouared A., Gruz-Gibelli E., Marin P., Herrmann F.R., Savioz A., 2020. Neuroprotection against Amyloid- β -Induced DNA Double-Strand Breaks Is Mediated by Multiple Retinoic Acid-Dependent Pathways. *Neural Plast* 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/9369815>
- Cole J.T., Yarnell A., Kean W.S., Gold E., Lewis B., Ren M., McMullen D.C., Jacobowitz D.M., Pollard H.B., O'Neill J.T., Grunberg N.E., Dalgard C.L., Frank J.A., Watson W.D., 2011. Craniotomy: True Sham for Traumatic Brain Injury, or a Sham of a Sham? *J Neurotrauma* 28, 359–369.
<https://doi.org/10.1089/neu.2010.1427>
- Corcoran J., So P.L., Maden M., 2002. Absence of retinoids can induce motoneuron disease in the adult rat and a retinoid defect is present in motoneuron disease patients. *Journal of Cell Science* 115, 4735–4741.
<https://doi.org/10.1242/jcs.00169>
- Crandall J.E., Goodman T., McCarthy D.M., Duester G., Bhide P.G., Dräger U.C., McCaffery P., 2011. Retinoic acid influences neuronal migration from the ganglionic eminence to the cerebral cortex: Retinoic acid in cortical interneuron migration. *Journal of Neurochemistry* 119, 723–735.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07471.x>
- Cregan S.P., MacLaurin J.G., Craig C.G., Robertson G.S., Nicholson D.W., Park D.S., Slack R.S., 1999. Bax-Dependent Caspase-3 Activation Is a Key Determinant in p53-Induced Apoptosis in Neurons. *J Neurosci* 19, 7860–7869.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-18-07860.1999>
- Cucullo L., Marchi N., Marroni M., Fazio V., Namura S., Janigro D., 2003. Blood-brain barrier damage induces release of alpha2-macroglobulin. *Mol Cell Proteomics*

- 2, 234–241. <https://doi.org/10.1074/mcp.M200077-MCP200>
- Daneman R., Zhou L., Kebede A.A., Barres B.A., 2010. Pericytes are required for blood–brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature* 468, 562–566. <https://doi.org/10.1038/nature09513>
- Dash P.K., Zhao J., Hergenroeder G., Moore A.N., 2010. Biomarkers for the diagnosis, prognosis, and evaluation of treatment efficacy for traumatic brain injury. *Neurotherapeutics* 7, 100–114. <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2009.10.019>
- Di Battista A.P., Rhind S.G., Hutchison M.G., Hassan S., Shiu M.Y., Inaba K., Topolovec-Vranic J., Neto A.C., Rizoli S.B., Baker A.J., 2016. Inflammatory cytokine and chemokine profiles are associated with patient outcome and the hyperadrenergic state following acute brain injury. *J Neuroinflammation* 13, 40. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0500-3>
- Dixon K.J., 2017. Pathophysiology of Traumatic Brain Injury. *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America* 28, 215–225. <https://doi.org/10.1016/j.pmr.2016.12.001>
- Doepfner T.R., Nagel F., Dietz G.P., Weise J., Tönges L., Schwarting S., Bähr M., 2009. TAT-Hsp70-Mediated Neuroprotection and Increased Survival of Neuronal Precursor Cells after Focal Cerebral Ischemia in Mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 29, 1187–1196. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2009.44>
- Doldo E., Costanza G., Agostinelli S., Tarquini C., Ferlosio A., Arcuri G., Passeri D., Scioli M.G., Orlandi A., 2015. Vitamin A, Cancer Treatment and Prevention: The New Role of Cellular Retinol Binding Proteins. *Biomed Res Int* 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/624627>
- Dong W., Zhang Y., 2018. Retinoic acid receptor α expression exerts an anti-apoptosis effect on PC12 cells following oxygen-glucose deprivation. *Exp Ther Med* 16, 3525–3533. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6639>
- Doong H., Vrailas A., Kohn E.C., 2002. What's in the 'BAG'? – a functional domain analysis of the BAG-family proteins. *Cancer Letters* 188, 25–32. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(02\)00456-1](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(02)00456-1)
- Dixon E., Clifton C., Lighthall G.L., Yaghamai J.W., Hayes A.A., R.L., 1991. A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat. *Journal of Neuroscience Methods* 39, 253–262. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(91\)90104-8](https://doi.org/10.1016/0165-0270(91)90104-8)
- Eissner L., Kreutz K., Holler A., 2000. Naive Monocytes Can Trigger Transendothelial Migration of Peripheral Blood Cells Through the Induction of Endothelial Tumour Necrosis Factor- α . *Scandinavian Journal of Immunology* 51, 251–261. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.2000.00677.x>
- Elmore S., 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* 35, 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Esteves M., Cristóvão A.C., Saraiva T., Rocha S.M., Baltazar G., Ferreira L., Bernardino L., 2015. Retinoid acid-loaded polymeric nanoparticles induce neuroprotection in a mouse model for Parkinson's disease. *Front. Aging Neurosci.* 7. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2015.00020>
- Fan Z., Beresford P.J., Oh D.Y., Zhang D., Lieberman J., 2003. Tumor Suppressor NM23-H1 Is a Granzyme A-Activated DNase during CTL-Mediated Apoptosis, and the Nucleosome Assembly Protein SET Is Its Inhibitor. *Cell* 112, 659–672. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00150-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00150-8)
- Fogal B., Hewett S.J., 2008. Interleukin-1 β : a bridge between inflammation and excitotoxicity? *Journal of Neurochemistry* 106, 1–23. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05315.x>
- Firsching R., Rickels E., Mauer U.M., Sakowitz O.W., Messing-Jünger M., Engelhard

- K. für DGAI, Schwenkreis P. für DGN, Linn J. für DGNR und Schwerdtfeger K., 2015. Leitlinie Schädel-Hirn-Trauma im Erwachsenenalter. <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/008-001.html>
- Franklin T.B., Krueger-Naug A.M., Clarke D.B., Arrigo A.-P., Currie R.W., 2005. The role of heat shock proteins Hsp70 and Hsp27 in cellular protection of the central nervous system. *International Journal of Hyperthermia* 21, 379–392. <https://doi.org/10.1080/02656730500069955>
- Frugier T., Morganti-Kossmann M.C., O'Reilly D., McLea C.A., 2010. *In Situ* Detection of Inflammatory Mediators in *Post Mortem* Human Brain Tissue after Traumatic Injury. *Journal of Neurotrauma* 27, 497–507. <https://doi.org/10.1089/neu.2009.1120>
- Gamerding M., Hajieva P., Kaya A.M., Wolfrum U., Hartl F.U., Behl C., 2009. Protein quality control during aging involves recruitment of the macroautophagy pathway by BAG3. *EMBO J* 28, 889–901. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.29>
- Gehrmann J., Matsumoto Y., Kreutzberg G.W., 1995. Microglia: Intrinsic immune effector cell of the brain. *Brain Research Reviews* 20, 269–287. [https://doi.org/10.1016/0165-0173\(94\)00015-H](https://doi.org/10.1016/0165-0173(94)00015-H)
- Gelbard H.A., Dzenko K.A., DiLoreto D., del Cerro C., del Cerro M., Epstein L.G., 1993. Neurotoxic effects of tumor necrosis factor alpha in primary human neuronal cultures are mediated by activation of the glutamate AMPA receptor subtype: implications for AIDS neuropathogenesis. *Dev Neurosci* 15, 417–422. <https://doi.org/10.1159/000111367>
- Gentilella A., Khalili K., 2011. BAG3 Expression in Glioblastoma Cells Promotes Accumulation of Ubiquitinated Clients in an Hsp70-dependent Manner. *J Biol Chem* 286, 9205–9215. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.175836>
- Gesundheitsberichterstattung des Bundes: Sterbefälle, Sterbeziffern (je 100.000 Einwohner, altersstandardisiert) für das Jahr 2019; ICD 10 S00–S09: Verletzungen des Kopfes. <https://www.gbe-bund.de/gbe>
- Gewiss R., Topping T., Griswold M.D., 2020. Cycles, waves, and pulses: Retinoic acid and the organization of spermatogenesis. *Andrology* 8, 892–897. <https://doi.org/10.1111/andr.12722>
- Giuli M.V., Hanieh P.N., Giuliani E., Rinaldi F., Marianecchi C., Screpanti I., Checquolo S., Carafa M., 2020. Current Trends in ATRA Delivery for Cancer Therapy. *Pharmaceutics* 12, 707. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12080707>
- Giulian D, Lachman LB. Interleukin-1 stimulation of astroglial proliferation after brain injury. *Science*. 1985 Apr 26;228(4698):497-9. doi: 10.1126/science.3872478. PMID: 3872478.
- Glantz S.B., Cianci C.D., Iyer R., Pradhan D., Wang K.K.W., Morrow J.S., 2007. Sequential Degradation of α II and β II Spectrin by Calpain in Glutamate or Maitotoxin-Stimulated Cells. *Biochemistry* 46, 502–513. <https://doi.org/10.1021/bi061504y>
- Gruz-Gibelli E., Chessel N., Allieux C., Marin P., Piotton F., Leuba G., Herrmann F.R., Savioz A., 2016. The Vitamin A Derivative All-Trans Retinoic Acid Repairs Amyloid- β -Induced Double-Strand Breaks in Neural Cells and in the Murine Neocortex. *Neural Plast* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/3707406>
- Häcker G., 2000. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res* 301, 5–17. <https://doi.org/10.1007/s004410000193>
- Hailer N.P., Vogt C., Korf H.-W., Dehghani F., 2005. Interleukin-1 β exacerbates and interleukin-1 receptor antagonist attenuates neuronal injury and microglial activation after excitotoxic damage in organotypic hippocampal slice cultures.

- European Journal of Neuroscience 21, 2347–2360.
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04067.x>
- Harvey B.K., Shen H., Chen G.-J., Yoshida Y., Wang Y., 2004. Midkine and retinoic acid reduce cerebral infarction induced by middle cerebral artery ligation in rats. *Neuroscience Letters* 369, 138–141.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.07.086>
- Havasi A., Li Z., Wang Z., Martin J.L., Botla V., Ruchalski K., Schwartz J.H., Borkan S.C., 2008. Hsp27 Inhibits Bax Activation and Apoptosis via a Phosphatidylinositol 3-Kinase-dependent Mechanism. *J Biol Chem* 283, 12305–12313. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801291200>
- Hay J., Johnson V.E., Smith D.H., Stewart W., 2016. Chronic Traumatic Encephalopathy: The Neuropathological Legacy of Traumatic Brain Injury. *Annu Rev Pathol* 11, 21–45. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012615-044116>
- Hetz C., Vitte P.-A., Bombrun A., Rostovtseva T.K., Montessuit S., Hiver A., Schwarz, M.K., Church D.J., Korsmeyer S.J., Martinou J.-C., Antonsson B., 2005. Bax Channel Inhibitors Prevent Mitochondrion-mediated Apoptosis and Protect Neurons in a Model of Global Brain Ischemia. *J. Biol. Chem.* 280, 42960–42970. <https://doi.org/10.1074/jbc.M505843200>
- Hill M.M., Adrain C., Duriez P.J., Creagh E.M., Martin S.J., 2004. Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *EMBO J* 23, 2134–2145. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600210>
- Horton C., Maden M., 1995. Endogenous distribution of retinoids during normal development and teratogenesis in the mouse embryo. *Developmental Dynamics* 202, 312–323. <https://doi.org/10.1002/aja.1002020310>
- Hummel R., Ulbrich S., Appel D., Li S., Hirnet T., Zander S., Bobkiewicz W., Götz C., Schäfer M.K.E., 2020. Administration of all-trans retinoic acid after experimental traumatic brain injury is brain protective. *British Journal of Pharmacology* 177, 5208–5223. <https://doi.org/10.1111/bph.15259>
- Israelsson C., Bengtsson H., Kylberg A., Kullander K., Lewén A., Hillered L., Ebendal T., 2008. Distinct Cellular Patterns of Upregulated Chemokine Expression Supporting a Prominent Inflammatory Role in Traumatic Brain Injury. *Journal of Neurotrauma* 25, 959–974. <https://doi.org/10.1089/neu.2008.0562>
- Ito D., Tanaka K., Suzuki S., Dembo T., Fukuuchi Y., 2001. Enhanced Expression of Iba1, Ionized Calcium-Binding Adapter Molecule 1, After Transient Focal Cerebral Ischemia In Rat Brain. *Stroke* 32, 1208–1215. <https://doi.org/10.1161/01.STR.32.5.1208>
- Janesick A., Wu S.C., Blumberg B., 2015. Retinoic acid signaling and neuronal differentiation. *Cellular and Molecular Life Sciences* 72, 1559–1576. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1815-9>
- Jiang W., Guo M., Gong M., Chen L., Bi Y., Zhang Y., Shi Y., Qu P., Liu Y., Chen J., Li T., 2018. Vitamin A bio-modulates apoptosis via the mitochondrial pathway after hypoxic-ischemic brain damage. *Mol Brain* 11, 14. <https://doi.org/10.1186/s13041-018-0360-0>
- Johnson, V.E., Stewart, J.E., Begbie, F.D., Trojanowski, J.Q., Smith, D.H., Stewart, W., 2013. Inflammation and white matter degeneration persist for years after a single traumatic brain injury. *Brain* 136, 28–42. <https://doi.org/10.1093/brain/aws322>
- Johnson, V.E., Weber, M.T., Xiao, R., Cullen, D.K., Meaney, D.F., Stewart, W., Smith, D.H., 2018. Mechanical disruption of the blood–brain barrier following experimental concussion. *Acta Neuropathol* 135, 711–726. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1824-0>

- Jones B.J., Roberts D.J., 1968. The quantitative measurement of motor incoordination in naive mice using an accelerating rotarod. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 20, 302–304. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1968.tb09743.x>
- Jung D.-S., Baek S.-Y., Park K.-H., Chung Y.-I., Kim H.-J., Kim C.-D., Cho M.-K., Han M.-E., Park K.-P., Kim B.-S., Kim J.-B., Oh S.-O., 2007. Effects of retinoic acid on ischemic brain injury-induced neurogenesis. *Experimental & Molecular Medicine* 39, 304–315. <https://doi.org/10.1038/emm.2007.34>
- Kampmann E., Johann S., van Neerven S., Beyer C., Mey J., 2008. Anti-inflammatory effect of retinoic acid on prostaglandin synthesis in cultured cortical astrocytes. *J Neurochem* 106, 320–332. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05395.x>
- Karthigeyan M., Gupta S.K., Salunke P., Dhandapani S., Wankhede L.S., Kumar A., Singh A., Sahoo S.K., Tripathi M., Gendle C., Singla R., Aggarwal A., Singla N., Mohanty M., Mohindra S., Chhabra R., Tewari M.K., Jain K., 2021. Head injury care in a low- and middle-income country tertiary trauma center: epidemiology, systemic lacunae, and possible leads. *Acta Neurochir.* <https://doi.org/10.1007/s00701-021-04908-x>
- Karve I.P., Taylor J.M., Crack P.J., 2016. The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury: Neuroinflammation and TBI. *British Journal of Pharmacology* 173, 692–702. <https://doi.org/10.1111/bph.13125>
- Kawahara K., Suenobu M., Ohtsuka H., Kuniyasu A., Sugimoto Y., Nakagomi M., Fukasawa H., Shudo K., Nakayama H., 2014. Cooperative Therapeutic Action of Retinoic Acid Receptor and Retinoid X Receptor Agonists in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *JAD* 42, 587–605. <https://doi.org/10.3233/JAD-132720>
- Kilbas PO, Akcay IM, Doganay GD, Arisan ED. Bag-1 silencing enhanced chemotherapeutic drug-induced apoptosis in MCF-7 breast cancer cells affecting PI3K/Akt/mTOR and MAPK signaling pathways. *Mol Biol Rep.* 2019 Feb;46(1):847-860. doi: 10.1007/s11033-018-4540-x. Epub 2019 Jan 19. PMID: 30661182.
- Kim J.H., Yu K.S., Jeong J.H., Lee N.S., Lee J., Jeong Y.G., Yoo Y.C., Han S.Y., 2013. All-Trans-Retinoic Acid Rescues Neurons After Global Ischemia by Attenuating Neuroinflammatory Reactions. *Neurochem Res* 38, 2604–2615. <https://doi.org/10.1007/s11064-013-1178-x>
- Kim J.Y., Barua S., Huang M.Y., Park J., Yenari M.A., Lee J.E., 2020. Heat Shock Protein 70 (HSP70) Induction: Chaperonotherapy for Neuroprotection after Brain Injury. *Cells* 9, 2020. <https://doi.org/10.3390/cells9092020>
- Kong, L., Wang, Y., Wang, X.-J., Wang, X.-T., Zhao, Y., Wang, L.-M., Chen, Z.-Y., 2015. Retinoic acid ameliorates blood–brain barrier disruption following ischemic stroke in rats. *Pharmacological Research* 99, 125–136. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.05.014>
- Kuhn S., Gritti L., Crooks D., Dombrowski Y., 2019. Oligodendrocytes in Development, Myelin Generation and Beyond. *Cells* 8, 1424. <https://doi.org/10.3390/cells8111424>
- Kulbe J.R., Geddes J.W., 2016. Current status of fluid biomarkers in mild traumatic brain injury. *Exp Neurol* 275, 334–352. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.05.004>
- Kwon H.J., Kim W., Jung H.Y., Kang M.S., Kim J.W., Hahn K.R., Yoo D.Y., Yoon Y.S., Hwang I.K., Kim D.W., 2019. Heat shock protein 70 increases cell proliferation, neuroblast differentiation, and the phosphorylation of CREB in

- the hippocampus. *Lab Anim Res* 35, 21. <https://doi.org/10.1186/s42826-019-0020-2>
- Lagraoui M., Latoche J.R., Cartwright N.G., Sukumar G., Dalgard C.L., Schaefer B.C., 2012. Controlled Cortical Impact and Craniotomy Induce Strikingly Similar Profiles of Inflammatory Gene Expression, but with Distinct Kinetics. *Front Neurol* 3, 155. <https://doi.org/10.3389/fneur.2012.00155>
- Law R.H.P., Lukoyanova N., Voskoboinik I., Caradoc-Davies T.T., Baran K., Dunstone M.A., D'Angelo M.E., Orlova E.V., Coulibaly F., Verschoor S., Browne K.A., Ciccone A., Kuiper M.J., Bird P.I., Trapani J.A., Saibil H.R., Whisstock J.C., 2010. The structural basis for membrane binding and pore formation by lymphocyte perforin. *Nature* 468, 447–451. <https://doi.org/10.1038/nature09518>
- Lawrence D.W., Comper P., Hutchison M.G., Sharma B., 2015. The role of apolipoprotein E epsilon (ϵ)-4 allele on outcome following traumatic brain injury: A systematic review. *Brain Injury* 29, 1018–1031. <https://doi.org/10.3109/02699052.2015.1005131>
- Lee H.-P., Casadesus G., Zhu X., Lee H., Perry G., Smith M.A., Gustaw-Rothenberg K., Lerner A., 2009. All-Trans-Retinoic Acid as a Novel Therapeutic Strategy for Alzheimer's Disease. *Expert Rev Neurother* 9, 1615–1621. <https://doi.org/10.1586/ern.09.86>
- Lee J.Y., Lee C.Y., Kim H.R., Lee C.-H., Kim H.W., Kim J.H., 2015. A Role of Serum-Based Neuronal and Glial Markers as Potential Predictors for Distinguishing Severity and Related Outcomes in Traumatic Brain Injury. *J Korean Neurosurg Soc* 58, 93–100. <https://doi.org/10.3340/jkns.2015.58.2.93>
- Li D., Lang W., Zhou C., Wu C., Zhang F., Liu Q., Yang S., Hao J., 2018. Upregulation of Microglial ZEB1 Ameliorates Brain Damage after Acute Ischemic Stroke. *Cell Reports* 22, 3574–3586. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.011>
- Lighthall J.W., 1988. Controlled Cortical Impact: A New Experimental Brain Injury Model. *Journal of Neurotrauma* 5, 1–15. <https://doi.org/10.1089/neu.1988.5.1>
- Liu M.C., Akle V., Zheng W., Dave J.R., Tortella F.C., Hayes R.L., Wang K.K.W., 2006. Comparing calpain- and caspase-3-mediated degradation patterns in traumatic brain injury by differential proteome analysis. *Biochem J* 394, 715–725. <https://doi.org/10.1042/BJ20050905>
- Liu X., Yamashita T., Shang J., Shi X., Morihara R., Huang Y., Sato K., Takemoto M., Hishikawa N., Ohta Y., Abe K., 2020. Molecular switching from ubiquitin-proteasome to autophagy pathways in mice stroke model. *J Cereb Blood Flow Metab* 40, 214–224. <https://doi.org/10.1177/0271678X18810617>
- Liu Z.-M., Wang K.-P., Ma J., Guo Zheng S., 2015. The role of all-trans retinoic acid in the biology of Foxp3+ regulatory T cells. *Cell Mol Immunol* 12, 553–557. <https://doi.org/10.1038/cmi.2014.133>
- Lloyd E., Somera-Molina K., Van Eldik L.J., Watterson D.M., Wainwright M.S., 2008. Suppression of acute proinflammatory cytokine and chemokine upregulation by post-injury administration of a novel small molecule improves long-term neurologic outcome in a mouse model of traumatic brain injury. *J Neuroinflammation* 5, 28. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-5-28>
- Locksley R.M., Killeen N., Lenardo M.J., 2001. The TNF and TNF Receptor Superfamilies: Integrating Mammalian Biology. *Cell* 104, 487–501. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00237-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00237-9)
- Lozano D., Gonzales-Portillo G.S., Acosta S., de la Pena I., Tajiri N., Kaneko Y., Borlongan C.V., 2015. Neuroinflammatory responses to traumatic brain injury: etiology, clinical consequences, and therapeutic opportunities. *Neuropsychiatr*

- Dis Treat 11, 97–106. <https://doi.org/10.2147/NDT.S65815>
- Lu L., Lan Q., Li Z., Zhou X., Gu J., Li Q., Wang J., Chen M., Liu Y., Shen Y., Brand D.D., Ryffel B., Horwitz D.A., Quismorio F.P., Liu Z., Li B., Olsen N.J., Zheng S.G., 2014. Critical role of all-trans retinoic acid in stabilizing human natural regulatory T cells under inflammatory conditions. *PNAS* 111, E3432–E3440. <https://doi.org/10.1073/pnas.1408780111>
- Luh C, Gierth K, Timaru-Kast R, Engelhard K, Werner C, Thal SC. Influence of a brief episode of anesthesia during the induction of experimental brain trauma on secondary brain damage and inflammation. *PLoS One*. 2011;6(5):e19948. doi: 10.1371/journal.pone.0019948. Epub 2011 May 19. PMID: 21625505; PMCID: PMC3098268
- Lüders J., Demand J., Höhfeld J., 2000. The Ubiquitin-related BAG-1 Provides a Link between the Molecular Chaperones Hsc70/Hsp70 and the Proteasome *. *Journal of Biological Chemistry* 275, 4613–4617. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.7.4613>
- Lüllmann-Rauch, R., Paulsen, F., 2019. Taschenlehrbuch Histologie. 6. Auflage. Thieme, Stuttgart.
- Maas A.I.R., Menon D.K., Adelson P.D., Andelic N., Bell M.J., Belli A., Bragge P., Brazinova A., Büki A., Chesnut R.M., Citerio G., Coburn M., Cooper D.J., Crowder A.T., Czeiter E., Czosnyka M., Diaz-Arrastia R., Dreier J.P., Duhaime A.C., Ercole A., van Essen T.A., Feigin V.L., Gao G., Giacino J., Gonzalez-Lara L.E., Gruen R.L., Gupta D., Hartings J.A., Hill S., Jiang J.Y., Ketharanathan N., Kompanje E.J.O., Lanyon L., Laureys S., Lecky F., Levin H., Lingsma H.F., Maegele M., Majdan M., Manley G., Marsteller J., Mascia L., McFadyen C., Mondello S., Newcombe V., Palotie A., Parizel P.M., Peul W., Piercy J., Polinder S., Puybasset L., Rasmussen T.E., Rossaint R., Smielewski P., Söderberg J., Stanworth S.J., Stein M.B., von Steinbüchel N., Stewart W., Steyerberg E.W., Stocchetti N., Synnot A., Te Ao B., Tenovuo O., Theadom A., Tibboel D., Videtta W., Wang K.K.W., Williams W.H., Wilson L., Yaffe K.; InTBIR Participants and Investigators. Traumatic brain injury: integrated approaches to improve prevention, clinical care, and research. *Lancet Neurol*. 2017 Dec;16(12):987-1048. doi: 10.1016/S1474-4422(17)30371-X. Epub 2017 Nov 6. PMID: 29122524.
- Maden M., 2007. Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 8, 755–765. <https://doi.org/10.1038/nrn2212>
- Maegele M., Lefering R., Sakowitz O., Kopp M.A., Schwab J.M., Steudel W.-I., Unterberg A., Hoffmann R., Uhl E., Marzi I., 2019. The incidence and management of moderate to severe head injury. *Deutsches Aerzteblatt Online*. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2019.0167>
- Mele C, Pingue V, Caputo M, Zavattaro M, Pagano L, Prodam F, Nardone A, Aimaretti G, Marzullo P. Neuroinflammation and Hypothalamo-Pituitary Dysfunction: Focus of Traumatic Brain Injury. *Int J Mol Sci*. 2021 Mar 7;22(5):2686. doi: 10.3390/ijms22052686. PMID: 33799967; PMCID: PMC7961958
- Menger H., Yuchen Y., Shurong C., Jinren C., JiaXiang L., Lin Z., Longjun G., Zhenyi W., 1988. Use of All-Trans Retinoic Acid in the Treatment of Acute Promyelocytic Leukemia. *Blood* 72, 567–572. <https://doi.org/10.1182/blood.V72.2.567.567>
- Menon DK, Schwab K, Wright DW, Maas AI; Demographics and Clinical Assessment Working Group of the International and Interagency Initiative toward Common Data Elements for Research on Traumatic Brain Injury and Psychological

- Health. Position statement: definition of traumatic brain injury. *Arch Phys Med Rehabil.* 2010 Nov;91(11):1637-40. doi: 10.1016/j.apmr.2010.05.017. PMID: 21044706.
- Meyer Simon, 2018. Einfluss einer verzögerten Gabe von volatilen Anästhetika auf den neuronalen Zelluntergang im Schädel-Hirn-Trauma-Modell. Dissertation Humanmedizin. Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 2018
- Mizee M.R., Wooldrik D., Lakeman K.A.M., van het Hof B., Drexhage J.A.R., Geerts D., Bugiani M., Aronica E., Mebius R.E., Prat A., de Vries H.E., Reijerkerk A., 2013. Retinoic Acid Induces Blood–Brain Barrier Development. *J Neurosci* 33, 1660–1671. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1338-12.2013>
- Molotkova N., Molotkov A., Duester G., 2007. Role of retinoic acid during forebrain development begins late when Raldh3 generates retinoic acid in the ventral subventricular zone. *Dev Biol* 303, 601–610. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.11.035>
- Mondello S., Robicsek S.A., Gabrielli A., Brophy G.M., Papa L., Tepas J., Robertson C., Buki A., Scharf D., Jixiang M., Akinyi L., Muller U., Wang K.K.W., Hayes R.L., 2010. α I-Spectrin Breakdown Products (SBDPs): Diagnosis and Outcome in Severe Traumatic Brain Injury Patients. *J Neurotrauma* 27, 1203–1213. <https://doi.org/10.1089/neu.2010.1278>
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H., 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1, 263–273. <https://doi.org/10.1101/sqb.1986.051.01.032>
- Nag S., Manias J.L., Stewart D.J., 2009. Expression of endothelial phosphorylated caveolin-1 is increased in brain injury. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 35, 417–426. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2008.01009.x>
- Newcomb J.K., Kampfl A., Posmantur R.M., Zhao X., Pike B.R., Liu S.J., Clifton G.L., Hayes R.L., 1997. Immunohistochemical study of calpain-mediated breakdown products to alpha-spectrin following controlled cortical impact injury in the rat. *J Neurotrauma* 14, 369–383. <https://doi.org/10.1089/neu.1997.14.369>
- Nguyen T.T.M., Gillet G., Popgeorgiev N., 2021. Caspases in the Developing Central Nervous System: Apoptosis and Beyond. *Front Cell Dev Biol* 9, 702404. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.702404>
- Ni X., Hu G., Cai X., 2019. The success and the challenge of all-trans retinoic acid in the treatment of cancer. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 59, S71–S80. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1509201>
- Nikolian V.C., Dekker S.E., Bambakidis T., Higgins G.A., Dennahy I.S., Georgoff P.E., Williams A.M., Andjelkovic A.V., Alam H.B., 2018. Improvement of Blood-Brain Barrier Integrity in Traumatic Brain Injury and Hemorrhagic Shock Following Treatment With Valproic Acid and Fresh Frozen Plasma: *Critical Care Medicine* 46, e59–e66. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000002800>
- Nolting J., Daniel C., Reuter S., Stuelten C., Li P., Sucov H., Kim B.-G., Letterio J.J., Kretschmer K., Kim H.-J., von Boehmer H., 2009. Retinoic acid can enhance conversion of naive into regulatory T cells independently of secreted cytokines. *J Exp Med* 206, 2131–2139. <https://doi.org/10.1084/jem.20090639>
- Noy N. Between death and survival: retinoic acid in regulation of apoptosis. *Annu Rev Nutr.* 2010 Aug 21;30:201-17. doi: 10.1146/annurev.nutr.28.061807.155509. PMID: 20415582.
- Ohsawa K., Imai Y., Sasaki Y., Kohsaka S., 2004. Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. *Journal of Neurochemistry* 88, 844–856. <https://doi.org/10.1046/j.1471->

- 4159.2003.02213.x
- O'Kusky J.R., Ye P., D'Ercole A.J., 2000. Insulin-Like Growth Factor-I Promotes Neurogenesis and Synaptogenesis in the Hippocampal Dentate Gyrus during Postnatal Development. *J Neurosci* 20, 8435–8442. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-22-08435.2000>
- Onyszchuk G., Al-Hafez B., He Y.-Y., Bilgen M., Berman N.E.J., Brooks W.M., 2007. A Mouse Model of Sensorimotor Controlled Cortical Impact: Characterization Using Longitudinal Magnetic Resonance Imaging, Behavioral Assessments and Histology. *J Neurosci Methods* 160, 187–196. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2006.09.007>
- Osier N.D., Dixon C.E., 2016. The Controlled Cortical Impact Model: Applications, Considerations for Researchers, and Future Directions. *Front Neurol* 7. <https://doi.org/10.3389/fneur.2016.00134>
- Pandey P., Farber R., Nakazawa A., Kumar S., Bharti A., Nalin C., Weichselbaum R., Kufe D., Kharbanda S., 2000. Hsp27 functions as a negative regulator of cytochrome c-dependent activation of procaspase-3. *Oncogene* 19, 1975–1981. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203531>
- Pardo J., Bosque A., Brehm R., Wallich R., Naval J., Müllbacher A., Anel A., Simon M.M., 2004. Apoptotic pathways are selectively activated by granzyme A and/or granzyme B in CTL-mediated target cell lysis. *J Cell Biol* 167, 457–468. <https://doi.org/10.1083/jcb.200406115>
- Patatanian E., Thompson D.F., 2008. Retinoic acid syndrome: a review. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* 33, 331–338. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2710.2008.00935.x>
- Pavlovic D., Pekic S., Stojanovic M., Popovic V., 2019. Traumatic brain injury: neuropathological, neurocognitive and neurobehavioral sequelae. *Pituitary* 22, 270–282. <https://doi.org/10.1007/s11102-019-00957-9>
- Peeters W., van den Brande R., Polinder S., Brazinov A., Steyerberg, E.W., Lingsma, H.F., Maas A.I.R., 2015. Epidemiology of traumatic brain injury in Europe. *Acta Neurochir (Wien)* 157, 1683–1696. <https://doi.org/10.1007/s00701-015-2512-7>
- Perez-Polo J.R., Rea H.C., Johnson K.M., Parsley M.A., Unabia G.C., Xu G., Infante S.K., DeWitt D.S., Hulsebosch C.E., 2013. Inflammatory Consequences in a Rodent Model of Mild Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma* 30, 727–740. <https://doi.org/10.1089/neu.2012.2650>
- Pineda J.A., Lewis S.B., Valadka A.B., Papa L., Hannay H.J., Heaton S.C., Demery J.A., Liu M.C., Aikman J.M., Akle V., Brophy G.M., Tepas J.J., Wang K.K.W., Robertson C.S., Hayes R.L., 2007. Clinical Significance of α II-Spectrin Breakdown Products in Cerebrospinal Fluid after Severe Traumatic Brain Injury. *Journal of Neurotrauma* 24, 354–366. <https://doi.org/10.1089/neu.2006.003789>
- Pivovarova A.V., Mikhailova V.V., Chernik I.S., Chebotareva N.A., Levitsky D.I., Gusev N.B., 2005. Effects of small heat shock proteins on the thermal denaturation and aggregation of F-actin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 331, 1548–1553. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.04.077>
- Pop V., Sorensen D.W., Kamper J.E., Ajao D.O., Paul Murphy M., Head E., Hartman R.E., Badaut J., 2013. Early brain injury alters the blood–brain barrier phenotype in parallel with β -amyloid and cognitive changes in adulthood. *J Cereb Blood Flow Metab* 33, 205–214. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2012.154>
- Pöttker B., Stöber F., Hummel R., Angenstein F, Radyushkin K, Goldschmidt J, Schäfer MKE. Traumatic brain injury causes long-term behavioral changes related to region-specific increases of cerebral blood flow. *Brain Struct Funct.*

- 2017 Dec;222(9):4005-4021. doi: 10.1007/s00429-017-1452-9. Epub 2017 Jun 6. PMID: 28589257
- Prakash R., Carmichael S.T., 2015. Blood–brain barrier breakdown and neovascularization processes after stroke and traumatic brain injury. *Curr Opin Neurol* 28, 556–564. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000248>
- Raghavan M., Fee D., Barkhaus P.E., 2019. Chapter 1 - Generation and propagation of the action potential, in: Levin, K.H., Chauvel, P. (Eds.), *Handbook of Clinical Neurology, Clinical Neurophysiology: Basis and Technical Aspects*. Elsevier, pp. 3–22. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64032-1.00001-1>
- Reis C., Wang Y., Akyol O., Ho W.M., Applegate II R., Stier G., Martin R., Zhang J.H., 2015. What's New in Traumatic Brain Injury: Update on Tracking, Monitoring and Treatment. *Int J Mol Sci* 16, 11903–11965. <https://doi.org/10.3390/ijms160611903>
- Renault T.T., Floros K.V., Chipuk J.E., 2013. BAK/BAX activation and cytochrome c release assays using isolated mitochondria. *Methods* 61, 146–155. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.03.030>
- Ringger N.C., O'steen B.E., Brabham J.G., Silver X., Pineda J., Wang K.K.W., Hayes R.L., Papa L., 2004. A Novel Marker for Traumatic Brain Injury: CSF α -Spectrin Breakdown Product Levels. *Journal of Neurotrauma* 21, 1443–1456. <https://doi.org/10.1089/neu.2004.21.1443>
- Ritossa F., 1962. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. *Experientia* 18, 571–573. <https://doi.org/10.1007/BF02172188>
- Saadeddin A., Torres-Molina F., Cárcel-Trullols J., Araico A., Peris J.-E., 2015. Pharmacokinetics of the time-dependent elimination of all-trans-retinoic acid in rats. *AAPS PharmSci* 6, 1–9. <https://doi.org/10.1208/ps060101>
- Saatman K.E., Feeko K.J. Pape R.L., Raghupathi R., 2006. Differential Behavioral and Histopathological Responses to Graded Cortical Impact Injury in Mice. *Journal of Neurotrauma* 23, 1241–1253. <https://doi.org/10.1089/neu.2006.23.1241>
- Saelens X., Festjens N., Walle L.V., van Gurp M., Loo G., Vandenabeele P., 2004. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 23, 2861–2874. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207523>
- Sakamoto K., Hiraiwa M., Saito M., Nakahara T., Sato Y., Nagao T., Ishii K., 2010. Protective effect of all-trans retinoic acid on NMDA-induced neuronal cell death in rat retina. *European Journal of Pharmacology* 635, 56–61. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.03.001>
- Sandhir R., Onyszchuk G., Berman N.E.J., 2008. Exacerbated Glial Response in the Aged Mouse Hippocampus Following Controlled Cortical Impact Injury. *Exp Neurol* 213, 372–380. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2008.06.013>
- Santos N.C., Figueira-Coelho J., Martins-Silva J., Saldanha C., 2003. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochemical Pharmacology* 65, 1035–1041. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(03\)00002-9](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(03)00002-9)
- Sato Y., Meller R., Yang T., Taki W., Simon R.P., 2008. Stereo-selective neuroprotection against stroke with vitamin A derivatives. *Brain Res* 1241, 10.1016/j.brainres.2008.09.020. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.09.020>
- Schmidt R.F., Lang F., Heckmann M., 2010. *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie*. 31. Auflage. Springer, Berlin.
- Schrage K., Koopmans G., Joosten E.A.J., Mey J., 2006. Macrophages and neurons are targets of retinoic acid signaling after spinal cord contusion injury: Retinoid receptors after spinal cord injury. *European Journal of Neuroscience* 23, 285–295. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04534.x>

- Schröder H., Mose N., Huggenberger S., 2020. Neuroanatomy of the Mouse: An Introduction. 1.Auflage. Springer Nature, Berlin.
- Schünke M., 2006. Prometheus - Lernasatlas der Anatomie: Kopf und Neuroanatomie. 1.Auflage. Thieme, Stuttgart.
- Schwarzmaier S.M., Gallozzi M., Plesnila N., 2015. Identification of the Vascular Source of Vasogenic Brain Edema following Traumatic Brain Injury Using In Vivo 2-Photon Microscopy in Mice. *Journal of Neurotrauma* 32, 990–1000. <https://doi.org/10.1089/neu.2014.3775>
- Schwulst S.J., Islam M.B.A.R., 2019. Murine Model of Controlled Cortical Impact for the Induction of Traumatic Brain Injury. *J Vis Exp.* <https://doi.org/10.3791/60027>
- Sébire G., Héry C., Peudenier S., Tardieu M., 1993. Adhesion proteins on human microglial cells and modulation of their expression by IL1 alpha and TNF alpha. *Res Virol* 144, 47–52. [https://doi.org/10.1016/s0923-2516\(06\)80011-7](https://doi.org/10.1016/s0923-2516(06)80011-7)
- Serlin Y., Shelef I., Knyazer B., Friedman A., 2015. Anatomy and Physiology of the Blood-Brain Barrier. *Semin Cell Dev Biol* 38, 2–6. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.01.002>
- Shao A., Zhou Y., Yao Y., Zhang W., Zhang J., Deng Y., 2019. The role and therapeutic potential of heat shock proteins in haemorrhagic stroke. *J Cell Mol Med* 23, 5846–5858. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14479>
- Shapiro L.A., Wang L., Ribak C.E., 2008. Rapid astrocyte and microglial activation following pilocarpine-induced seizures in rats. *Epilepsia* 49, 33–41. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2008.01491.x>
- Sharp F.R., Zhan X., Liu D., 2013. Heat Shock Proteins in Brain: Role of Hsp70, Hsp 27 and HO-1 (Hsp32) and Their Therapeutic Potential. *Transl Stroke Res* 4. <https://doi.org/10.1007/s12975-013-0271-4>
- Shenefelt R.E., 1972. Morphogenesis of malformations in hamsters caused by retinoic acid: Relation to dose and stage at treatment. *Teratology* 5, 103–118. <https://doi.org/10.1002/tera.1420050115>
- Shiotsuki H., Yoshimi K., Shimo Y., Funayama M., Takamatsu Y., Ikeda K., Takahashi R., Kitazawa S., Hattori N., 2010. A rotarod test for evaluation of motor skill learning. *Journal of Neuroscience Methods* 189, 180–185. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2010.03.026>
- Shohami E., Novikov M., Bass R., 1995. Long-term effect of HU-211, a novel non-competitive NMDA antagonist, on motor and memory functions after closed head injury in the rat. *Brain Research* 674, 55–62. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)01433-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)01433-1)
- Siman R., Giovannone N., Hanten G., Wilde E.A., McCauley S.R., Hunter J.V., Li X., Levin H.S., Smith D.H., 2013. Evidence That the Blood Biomarker SNTF Predicts Brain Imaging Changes and Persistent Cognitive Dysfunction in Mild TBI Patients. *Front Neurol* 4, 190. <https://doi.org/10.3389/fneur.2013.00190>
- Slee E.A., Adrain C., Martin S.J., 2001. Executioner Caspase-3, -6, and -7 Perform Distinct, Non-redundant Roles during the Demolition Phase of Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 276, 7320–7326. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008363200>
- Sodhi R.K., Singh N., 2013. All-trans retinoic acid rescues memory deficits and neuropathological changes in mouse model of streptozotocin-induced dementia of Alzheimer's type. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 40, 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2012.09.012>
- Song Y., Li Z., Wang Y., Qu Y., Li Q., Man X., Wang F., Hu D., 2020. Inhibition of BAG-1 induced SH-SY5Y cell apoptosis without affecting Hsp70 expression. *J Cell Biochem* 121, 1728–1735. <https://doi.org/10.1002/jcb.29408>
- Stankiewicz A.R., Lachapelle G., Foo C.P.Z., Radicioni S.M., Mosser D.D., 2005.

- Hsp70 Inhibits Heat-induced Apoptosis Upstream of Mitochondria by Preventing Bax Translocation *. *Journal of Biological Chemistry* 280, 38729–38739. <https://doi.org/10.1074/jbc.M509497200>
- Statler K.D., Alexander H., Vagni V., Holubkov R., Dixon C.E., Clark R.S.B., Jenkins L., Kochanek P.M., 2006. Isoflurane exerts neuroprotective actions at or near the time of severe traumatic brain injury. *Brain Research* 1076, 216–224. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.12.106>
- Stetler RA, Gao Y, Signore AP, Cao G, Chen J. HSP27: mechanisms of cellular protection against neuronal injury. *Curr Mol Med.* 2009 Sep;9(7):863-72. doi: 10.2174/156652409789105561. PMID: 19860665; PMCID: PMC2775412
- Stetler R.A., Gao Y., Zhang L., Weng Z., Zhang F., Hu X., Wang S., Vosler P., Cao G., Sun D., Graham S.H., Chen J., 2012. Phosphorylation of HSP27 by Protein Kinase D Is Essential for Mediating Neuroprotection against Ischemic Neuronal Injury. *J. Neurosci.* 32, 2667–2682. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5169-11.2012>
- Sulhan S., Lyon K.A., Shapiro L.A., Huang J.H., 2020. Neuroinflammation and Blood-Brain Barrier Disruption Following Traumatic Brain Injury: Pathophysiology and Potential Therapeutic Targets. *J Neurosci Res* 98, 19–28. <https://doi.org/10.1002/jnr.24331>
- Suliman A., Lam A., Datta R., Srivastava R.K., 2001. Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways. *Oncogene* 20, 2122–2133. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204282>
- Sundstrøm T., Sollid S., Wentzel-Larsen T., Wester K., 2007. Head Injury Mortality in the Nordic Countries. *Journal of Neurotrauma* 24, 147–153. <https://doi.org/10.1089/neu.2006.0099>
- Susin S.A., Daugas E., Ravagnan L., Samejima K., Zamzami N., Loeffler M., Costantini P., Ferri K.F., Irinopoulou T., Prévost M.-C., Brothers G., Mak T.W., Penninger J., Earnshaw W.C., Kroemer G., 2000. Two Distinct Pathways Leading to Nuclear Apoptosis. *J Exp Med* 192, 571–580.
- Sweeney M.D., Sagare A.P., Zlokovic B.V., 2018. Blood–brain barrier breakdown in Alzheimer’s disease and other neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurol* 14, 133–150. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.188>
- Takala R.S.K., Posti J.P., Runtti H., Newcombe V.F., Outtrim J., Katila A.J., Frantzén J., Ala-Seppälä H., Kyllönen A., Maanpää H.-R., Tallus J., Hossain Md.I., Coles J.P., Hutchinson P., van Gils M., Menon D.K., Tenovuo O., 2016. Glial Fibrillary Acidic Protein and Ubiquitin C-Terminal Hydrolase-L1 as Outcome Predictors in Traumatic Brain Injury. *World Neurosurgery* 87, 8–20. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2015.10.066>
- Teasdale G, Jennett B. Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. *Lancet.* 1974 Jul 13;2(7872):81-4. doi: 10.1016/s0140-6736(74)91639-0. PMID: 4136544.
- Tiselius A., 1957. Electrophoresis, in: *Methods in Enzymology*. Academic Press, pp. 3–20. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(57\)04048-3](https://doi.org/10.1016/0076-6879(57)04048-3)
- Toresson H., Mata de Urquiza A., Fagerström C., Perlmann T., Campbell K., 1999. Retinoids are produced by glia in the lateral ganglionic eminence and regulate striatal neuron differentiation. *Development* 126, 1317–1326.
- Tuttolomondo A., Pecoraro R., Pinto A., 2014. Studies of selective TNF inhibitors in the treatment of brain injury from stroke and trauma: a review of the evidence to date. *Drug Des Devel Ther* 8, 2221–2239. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S67655>
- Van Wijk und Hageman, 2005. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 mediated caspase-independent cell death after ischemia/reperfusion. *Free Radical Biology and*

- Medicine 39, 81–90. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.03.021>
- Vogel A, Wilken-Schmitz A, Hummel R, Lang M, Gurke R, Schreiber Y, Schäfer MKE, Tegeder I. Low brain endocannabinoids associated with persistent non-goal directed nighttime hyperactivity after traumatic brain injury in mice. *Sci Rep*. 2020 Sep 10;10(1):14929. doi: 10.1038/s41598-020-71879-x. PMID: 32913220; PMCID: PMC7483739
- Wang G., Zhang J., Hu X., Zhang L., Mao L., Jiang X., Liou A.K.-F., Leak R.K., Gao Y., Chen J., 2013. Microglia/macrophage polarization dynamics in white matter after traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 33, 1864–1874. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2013.146>
- Wang K.K., Yang Z., Zhu T., Shi Y., Rubenstein R., Tyndall J.A., Manley G.T., 2018. An update on diagnostic and prognostic biomarkers for traumatic brain injury. *Expert Rev Mol Diagn* 18, 165–180. <https://doi.org/10.1080/14737159.2018.1428089>
- Wang K.K.W., Posmantur R., Nath R., McGinnis K., Whitton M., Talanian R.V., Glantz S.B., Morrow J.S., 1998. Simultaneous Degradation of α II- and β II-Spectrin by Caspase 3 (CPP32) in Apoptotic Cells. *J. Biol. Chem.* 273, 22490–22497. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.35.22490>
- Wang R., Chen S., Liu Y., Diao S., Xue Y., You X., Park E.A., Liao F.-F., 2015. All-trans-retinoic Acid Reduces BACE1 Expression under Inflammatory Conditions via Modulation of Nuclear Factor κ B (NF κ B) Signaling. *J Biol Chem* 290, 22532–22542. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.662908>
- Wang Y.X., You Q., Su W.L., Li Q., Hu Z.Q., Wang Z.G., Sun Y.P., Zhu W.X., Ruan C.P., 2013. A study on inhibition of inflammation via p75TNFR signaling pathway activation in mice with traumatic brain injury. *Journal of Surgical Research* 182, 127–133. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2012.07.071>
- Werhane M.L., Evangelista N.D., Clark A.L., Sorg S.F., Bangen K.J., Tran M., Schiehser D.M., Delano-Wood L., 2017. Pathological vascular and inflammatory biomarkers of acute- and chronic-phase traumatic brain injury. *Concussion* 2, CNC30. <https://doi.org/10.2217/cnc-2016-0022>
- Whitney N.P., Eidem T.M., Peng H., Huang Y., Zheng J.C., 2009. Inflammation mediates varying effects in neurogenesis: Relevance to the pathogenesis of brain injury and neurodegenerative disorders. *J Neurochem* 108, 1343–1359. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.05886.x>
- Winkler E.A., Minter D., Yue J.K., Manley G.T., 2016. Cerebral Edema in Traumatic Brain Injury: Pathophysiology and Prospective Therapeutic Targets. *Neurosurgery Clinics of North America, Traumatic Brain Injury* 27, 473–488. <https://doi.org/10.1016/j.nec.2016.05.008>
- Wolbach S.B., Howe P.R., 1925. TISSUE CHANGES FOLLOWING DEPRIVATION OF FAT-SOLUBLE A VITAMIN. *J Exp Med* 42, 753–777.
- Wolburg H., Noell S., Mack A., Wolburg-Buchholz K., Fallier-Becker P., 2009. Brain endothelial cells and the glio-vascular complex. *Cell Tissue Res* 335, 75–96. <https://doi.org/10.1007/s00441-008-0658-9>
- Woodcock T., Morganti-Kossmann M.C., 2013. The Role of Markers of Inflammation in Traumatic Brain Injury. *Front Neurol* 4. <https://doi.org/10.3389/fneur.2013.00018>
- Xu T., Wang X., Cao M., Wu X., Yan Y., Fu H., Zhao W., Gong P., Ke K., Gu X., 2012. Increased expression of BAG-1 in rat brain cortex after traumatic brain injury. *J Mol Hist* 43, 335–342. <https://doi.org/10.1007/s10735-012-9408-0>
- Yang Z., Wang K.K.W., 2015. Glial Fibrillary acidic protein: From intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. *Trends Neurosci* 38, 364–374. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2015.04.003>

- Yarnell A.M., Barry E.S., Mountney A., Shear D., Tortella F., Grunberg N.E., 2016. The Revised Neurobehavioral Severity Scale (NSS-R) for Rodents. *Current Protocols in Neuroscience* 75, 9.52.1-9.52.16. <https://doi.org/10.1002/cpns.10>
- Yin L.-H., Shen H., Diaz-Ruiz O., Bäckman C.M., Bae E., Yu S.-J., Wang Y., 2012. Early post-treatment with 9-cis retinoic acid reduces neurodegeneration of dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *BMC Neurosci* 13, 120. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-13-120>
- Ying G., Jing C., Li J., Wu C., Yan F., Chen J., Wang L., Dixon B.J., Chen G., 2016. Neuroprotective Effects of Valproic Acid on Blood-Brain Barrier Disruption and Apoptosis-Related Early Brain Injury in Rats Subjected to Subarachnoid Hemorrhage Are Modulated by Heat Shock Protein 70/Matrix Metalloproteinases and Heat Shock Protein 70/AKT Pathways. *Neurosurgery* 79, 286–295. <https://doi.org/10.1227/NEU.0000000000001264>
- Yue, J.K., Vassar, M.J., Lingsma, H.F., Cooper, S.R., Okonkwo, D.O., Valadka, A.B., Gordon, W.A., Maas, A.I.R., Mukherjee, P., Yuh, E.L., Puccio, A.M., Schnyer, D.M., Manley, G.T., Casey, S.S., Cheong, M., Dams-O'Connor, K., Hricik, A.J., Knight, E.E., Kulubya, E.S., Menon, D.K., Morabito, D.J., Pacheco, J.L., Sinha, T.K., 2013. Transforming Research and Clinical Knowledge in Traumatic Brain Injury Pilot: Multicenter Implementation of the Common Data Elements for Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma* 30, 1831–1844. <https://doi.org/10.1089/neu.2013.2970>
- Zeiss C.J., 2003. The Apoptosis-Necrosis Continuum: Insights from Genetically Altered Mice. *Vet Pathol* 40, 481–495. <https://doi.org/10.1354/vp.40-5-481>
- Zenaro, E., Piacentino, G., Constantin, G., 2017. The blood-brain barrier in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 107, 41–56. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.07.007>
- Zhang, W., Smith, C., Howlett, C., Stanimirovic, D., 2000. Inflammatory activation of human brain endothelial cells by hypoxic astrocytes in vitro is mediated by IL-1beta. *J Cereb Blood Flow Metab* 20, 967–978. <https://doi.org/10.1097/00004647-200006000-00009>
- Zhang X., Yu Q., Jiang W., Bi Y., Zhang Y., Gong M., Wei X., Li T., Chen J., 2014. All-trans retinoic acid suppresses apoptosis in PC12 cells injured by oxygen and glucose deprivation via the retinoic acid receptor α signaling pathway. *Molecular Medicine Reports* 10, 2549–2555. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2568>
- Zhang Z., Mondello S., Kobeissy F., Rubenstein R., Streeter J., Hayes R.L., Wang K.K.W., 2011. Protein Biomarkers for Traumatic and Ischemic Brain Injury: From Bench to Bedside. *Transl. Stroke Res.* 2, 455–462. <https://doi.org/10.1007/s12975-011-0137-6>
- Zhu Y., Liu Y., Yang F., Chen W., Jiang J., He P., Jiang S., Li M., Xu R., 2020. All-Trans Retinoic Acid Exerts Neuroprotective Effects in Amyotrophic Lateral Sclerosis-Like Tg (SOD1*G93A)1Gur Mice. *Mol Neurobiol* 57, 3603–3615. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-01973-8>

Lebenslauf

Persönliches Alesya Kuryanovych
Geboren am 04.09.1987 in Magdeburg

Schulische, berufliche und universitäre Ausbildung

04/2013 – 12/2019 Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Studium der Humanmedizin, Abschluss: Staatsexamen (3,0)

10/2016 – heute Klinik für Anästhesiologie – Universitätsmedizin Mainz
Arbeitsgruppe Neuroprotektion –
Promotion Medizin (Dr. med.)

10/2009 – 09/2012 Ausbildung veterinärmedizinisch-technischen Assistentin
Tierärztlichen Hochschule Hannover

08/2004 – 06/2008 Helmholtz-Gymnasium in Bielefeld
Allgemeine Hochschulreife

Berufserfahrung

12/2020 – heute Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe,
St. Bernward Krankenhaus, Hildesheim
Assistenzärztin in Weiterbildung

02/2020 – 08/2020 Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe,
Klinikum Wilhelmshaven,
Assistenzärztin in Weiterbildung

08/2016 – 10/2018 Klinik für HNO, Römerwallklinik, Mainz
Studentische Hilfskraft

01/2013 – 04/2013 Medizinische Hochschule Hannover,
Institut für Toxiko- und Pharmakogenomikforschung,
Veterinärmedizinisch-technische Assistentin

Praktisches Jahr und Famulaturen

06/2019 – 10/2019 3.Tertial: Chirurgie im Klinikum Memmingen

03/2019 – 06/2019 2.Tertial: Gynäkologie im Klinikum Wilhelmshaven

11/2018 – 03/2019 1.Tertial: Innere Medizin im Klinikum Wilhelmshaven