

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

Posthämorrhagischer Hydrozephalus bei Frühgeborenen: Aufbau eines  
experimentellen Tiermodells und zeitliche Entwicklung des Zellschadens und  
axonaler Schäden nach intraventrikulärer Injektion von Blut bei neugeborenen  
Ratten.

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

Corinna Ingrid Leistner  
aus Leverkusen

Mainz, 2021

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

12. Juli 2022

# Inhalt

<b>INHALT</b> .....	<b>I</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>III</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>IV</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>VI</b>
<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>2. STAND DER WISSENSCHAFT</b> .....	<b>4</b>
2.1 PATIENTENGRUPPE .....	4
2.2 THERAPIEANSÄTZE .....	4
2.2.1 <i>Interventionen zur Risikoreduktion</i> .....	5
2.2.2 <i>Interventionen zur Vermeidung einer Progression von IVH zu PHH</i> .....	5
2.3 VENTRIKULOPERITONEALER SHUNT .....	6
2.4 DEFINITION EINER GEMINALEN MATRIX INTRAVENTRIKULÄREN HÄMORRHAGIE .....	7
2.5 PATHOPHYSIOLOGIE DES IVH.....	9
2.6 ZELLUNTERGANG .....	10
2.6.1 <i>NeuN</i> .....	11
2.6.2 <i>Caspase 3</i> .....	12
2.7 AXONALER SCHADEN.....	13
2.7.1 <i>SMI-32</i> .....	14
2.8 TIERMODELLE DES POST-HÄMORRHAGISCHEN HYDROZEPHALUS.....	14
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>18</b>
3.1 VERSUCHSAUFBAU.....	18
3.2 UNTERBRINGUNG DER VERSUCHSTIERE .....	19
3.3 OPERATION .....	20
3.3.1 <i>Vorbereitung Donortier</i> .....	20
3.3.2 <i>Kardiale Punktion zur Donorblutgewinnung</i> .....	20
3.3.3 <i>Vorbereitung der Versuchstiere</i> .....	21
3.3.4 <i>Präparation der Punktionsstelle</i> .....	22
3.3.5 <i>Injektionen</i> .....	23
3.3.6 <i>Schein-Operation</i> .....	24
3.3.7 <i>Post-Operative Versorgung</i> .....	25
3.4 HIRNENTNAHME UND PERFUSIONSFIXIERUNG .....	25
3.4.1 <i>Narkose</i> .....	25
3.4.2 <i>Präparationsschritte</i> .....	25
3.4.3 <i>Nachfixierung und Einfrieren</i> .....	26
3.5 HISTOLOGISCHE AUFARBEITUNG UND FÄRBUNG .....	27
3.5.1 <i>Hämatoxylin-Eosin-Färbung</i> .....	27
3.5.2 <i>Immunhistochemische Färbungen</i> .....	28
3.6 HISTOLOGISCHE AUSWERTUNG .....	29
3.6.1 <i>Hämatoxylin-Eosin-Färbung</i> .....	29
3.6.2 <i>Immunhistochemische Färbungen</i> .....	30

3.6.3 Bestimmung der ROI-Größen .....	31
3.7 STATISTISCHE AUSWERTUNG .....	32
<b>4. ERGEBNISSE.....</b>	<b>35</b>
4.1 VENTRIKEL-/ HEMISPHÄRENGRÖßE .....	35
4.1.1 Relative Ventrikelfläche.....	35
4.1.2 Schwellenwert der posthämorrhagischen ventrikulären Dilatation .....	36
4.1.3 Postinterventionelle ventrikuläre Dilatation und Kortexdicke .....	40
4.2 IMMUNHISTOCHEMISCHE AUSWERTUNGEN .....	42
4.2.1 NeuN.....	43
4.2.2 Zellzählung cingulärer und motorischer Kortex der PT21 Tiere .....	49
4.2.3 Aktivierte Caspase 3 .....	51
4.2.4 SMI-32 .....	56
<b>5. DISKUSSION.....</b>	<b>65</b>
5.1 TIERMODELL.....	65
5.1.1 Hydrozephalus-Rate .....	65
5.1.2 Vergleich Rattenjunge zu Frühgeborenen/Zeitpunkt der Intervention .....	66
5.1.3 Applikation von allogenen Vollblut .....	67
5.1.4 Hydrozephalus und Kortexdicke .....	69
5.1.5 Stichprobenzahl.....	70
5.2 METHODENKRITIK .....	70
5.2.1 Operationstechnik .....	70
5.2.2 Immunhistochemische Färbungen .....	72
5.3 ERGEBNISDISKUSSION.....	73
5.3.1 Ventrikelgröße und Kortexdicke .....	73
5.3.2 NeuN.....	73
5.3.3 SMI-32 .....	76
5.3.4 Caspase 3.....	78
5.4 FAZIT .....	80
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>82</b>
<b>7. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>84</b>
<b>8. ANHANG .....</b>	<b>89</b>
8.1 VERBRAUCHSMATERIALIEN .....	89
8.2 HEMISPHÄRENFLÄCHEN ZUR ROI-GRÖßEN BESTIMMUNG .....	92
8.3 SCHWELLENWERT-BERECHNUNG .....	94
8.4 ERGEBNISTABELLEN VENTRIKELAUSWERTUNG .....	95
8.5 ERGEBNISSE NEUN .....	96
8.6 ZELLZÄHLUNG PT21 .....	99
8.7 ERGEBNISSE CASPASE 3 .....	100
8.8 ERGEBNISSE SMI-32 .....	102
8.9 FÄRBEPROTOKOLLE .....	108
<b>9. DANKSAGUNG.....</b>	<b>113</b>

## **Abkürzungsverzeichnis**

GMH: Germinale Matrix Hämorrhagie (Blutung)

ICH: Intrazerebrale Hämorrhagie

IRF: Immunreaktive Fläche

IVH: Intraventrikuläre Hämorrhagie

PHVD: Posthämorrhagische Ventrikel Dilatation

PHH: Posthämorrhagischer Hydrozephalus

PND: postnatal day (Postnataler Tag)

PT: Posttrauma Tag

ROS: reactive oxygen species (Reaktive Sauerstoffspezies)

rt-PA: recombinant tissue-type plasminogen activator (Rekombinanter Plasminogenaktivator)

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 zeigt die Mittelwerte der Ventrikelflächen in mm <sup>2</sup> der Versuchsgruppen nach Überlebenszeitpunkt. ....	35
Tabelle 2 zeigt die Mittelwerte der Hemisphärenflächen in mm <sup>2</sup> der Versuchsgruppen nach Überlebenszeitpunkt. ....	35
Tabelle 3 Linke und Rechte Hemisphärenfläche der PT21-Sham-Tiere. ....	92
Tabelle 4 Linke und Rechte Hemisphärenfläche der PT7-Sham-Tiere. ....	92
Tabelle 5 Linke und Rechte Hemisphärenfläche der PT3-Sham-Tiere. ....	92
Tabelle 6 Linke und Rechte Hemisphärenfläche der PT1-Sham-Tiere. ....	93
Tabelle 7 gibt die relativen Ventrikelflächen der Sham-Gruppe an. Der Mittelwert + zwei Standardabweichungen ergibt den Schwellenwert der PHVD bzw. PHH von 4,7409 %. ....	94
Tabelle 8 gibt die Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Ventrikelfläche der Blut-, NaCl- und Sham-Gruppen an. ....	95
Tabelle 9 gibt die einzelnen relativen Ventrikelflächen und Kortexdicken (in mm) der PHVD-/PHH-Tiere der Blut-Gruppe an. ....	95
Tabelle 10 gibt die einzelnen relativen Ventrikelflächen und Kortexdicken (in mm) der PHVD-/PHH-Tiere der NaCl-Gruppe an. ....	95
Tabelle 11 Mittelwerte und Standardabweichung (SD) der immunreaktiven Fläche von NeuN (in %) an PT1, PT3, PT7, PT21 nach Interventionsgruppe. ....	96
Tabelle 12 Vergleich der immunreaktiven Fläche von NeuN zwischen den Interventionsgruppen mittels One-Way ANOVA/Kruskal-Wallis Rangsummentest. ...	97
Tabelle 13 Vergleich der immunreaktiven Fläche von NeuN der PHVD-/PHH-Tiere vs. Nicht-PHVD-/PHH-Tiere an den Überlebenszeitpunkten PT1 und PT21. ....	97
Tabelle 14 zeigt die Mittelwerte der Zellzählung der ROI 2-R und ROI 2-L anhand der NeuN Färbungen der PT21 Tiere der Blut- und Sham-Gruppe. ....	99
Tabelle 15 Mittelwerte und Standardabweichung (SD) der immunreaktiven Fläche von Caspase 3 (in %) an PT1, PT3, PT7, PT21 nach Interventionsgruppe. ....	100
Tabelle 16 Vergleich der immunreaktiven Fläche von Caspase 3 zwischen den Interventionsgruppen mittels One-Way ANOVA/Kruskal-Wallis Rangsummentest. ....	101
Tabelle 17 Vergleich der immunreaktiven Fläche von Caspase 3 der PHVD-/PHH-Tiere vs. Nicht-PHVD-/PHH-Tiere an den Überlebenszeitpunkten PT1 und PT21. ....	101

Tabelle 18 Mittelwerte und Standardabweichung (SD) der immunreaktiven Fläche von SMI-32 (in %) an PT1, PT3, PT7, PT21 nach Interventionsgruppe. ....	102
Tabelle 19 Vergleich der immunreaktiven Fläche von SMI-32 zwischen den Interventionsgruppen mittels One-Way ANOVA/Kruskal-Wallis Rangsummentest. ....	103
Tabelle 20 Vergleich der immunreaktiven Fläche von SMI-32 der PHVD-/PHH-Tiere vs. Nicht-PHVD-/PHH-Tiere an den Überlebenszeitpunkten PT1 und PT21.....	103

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 zeigt den Aufbau eines ventrikuloperitonealen Shunt.....	6
Abbildung 2 zeigt die sonographische Darstellung von germinalen Matrix intraventrikulären Hämorrhagien bei Frühgeborenen. ....	8
Abbildung 3 zeigt die verschiedenen Pathomechanismen, welche zu einer Hydrozephalus-Entwicklung beitragen. ....	10
Abbildung 4 a.) Schicht V pyramidale Zelle der Rattenhirne der Kontrollgruppe 21 Tage nach Geburt; b.) Schicht V pyramidale Zelle der Rattenhirne der Hydrozephalus-Gruppe 21 Tage nach Geburt.....	13
Abbildung 5 zeigt den zeitlichen Ablauf des Versuchsaufbaus, sowie die Euthanasiezeitpunkte und Gruppenzugehörigkeit nach Intervention der Versuchstiere. ....	19
Abbildung 6 zeigt schematisch die Punktionsstellen; 1 mm lateral und 1 mm okzipital des Bregma.....	22
Abbildung 7 zeigt ein Rattenjunges im stereotaktischen Rahmen kurz vor Injektion in die Seitenventrikel. ....	23
Abbildung 8 zeigt schematisch die Lokalisation und Anzahl der Regions of Interest	31
Abbildung 9 zeigt den Algorithmus der statistischen Auswertung. ....	34
Abbildung 10 Relative Ventrikelfläche in %; Vergleich der jeweils vier größten relativen Ventrikelflächen vs. die restlichen relativen Ventrikelflächen.....	37
Abbildung 11 Schwellenwert der relativen Ventrikelflächen (4,74%) der jeweiligen Posttrauma-Gruppen.....	39
Abbildung 12 zeigt die signifikanten Spearman Korrelationen zwischen der relativen Ventrikelfläche und Kortexdicke. ....	41
Abbildung 13 Immunreaktive Fläche NeuN der Blut-Gruppe PT21; Nicht-PHH-Tiere gegen PHH-Tiere. ....	44
Abbildung 14 Korrelation zwischen der immunreaktiven Fläche von NeuN und der relativen Ventrikelfläche für die Blut-Gruppe – PT21.....	46
Abbildung 15 Korrelation der immunreaktiven Fläche NeuN und Kortexdicke; Blut- Gruppe - PT21.....	48
Abbildung 16 Vergleich der Zellzählung anhand der NeuN Färbungen der Blut- Gruppe PT21, Nicht-PHH-Tiere gegen PHH-Tiere.....	50



Abbildung 17 Korrelation der immunreaktiven Fläche aktivierte Caspase 3 und der relativen Ventrikelfläche; Blut-Gruppe - PT1. ....	53
Abbildung 18 Korrelation der immunreaktiven Fläche aktivierte Caspase 3 und der relativen Ventrikelfläche; Blut-Gruppe - PT 21. ....	54
Abbildung 19 Korrelation der immunreaktiven Fläche aktivierte Caspase 3 und Kortexdicke; Blut-Gruppe - PT21.....	55
Abbildung 20 Immunreaktive Fläche SMI-32 der Blut-Gruppe - PT 21; Nicht-PHH-Tiere gegen PHH-Tiere. ....	57
Abbildung 21 Korrelation der immunreaktiven Fläche SMI-32 und relativen Ventrikelfläche; Blut-Gruppe - PT21.....	59
Abbildung 22 Korrelation der immunreaktiven Fläche SMI-32 und relativen Ventrikelfläche; NaCl-Gruppe - PT21. ....	60
Abbildung 23 Korrelation der immunreaktiven Fläche SMI-32 und Kortexdicke; Blut-Gruppe - PT3.....	63
Abbildung 24 Korrelation der immunreaktiven Fläche SMI-32 und Kortexdicke; Blut-Gruppe - PT21.....	64
Abbildung 25 Der Wachstumsschub des Gehirns von 7 Säugetier-Spezies .....	67
Abbildung 26 Blut-gefüllte Seitenventrikel des Tiers PHH 152 - PT1 – NeuN der Blut-Gruppe .....	71
Abbildung 27 Die schematische Darstellung zeigt den Ursprung und den Migrationsweg glutamaterger (rot) und GABAerger (blau) Neurone.....	74
Abbildung 28 Korrelation der immunreaktiven Fläche und Kortexdicke; NaCl-Gruppe - NeuN - PT 21 - Cingulärer Kortex .....	98
Abbildung 29 Korrelation der immunreaktiven Fläche und relativen Ventrikelfläche; Sham-Gruppe - SMI 32 - PT 1.....	104
Abbildung 30 Korrelation der immunreaktiven Fläche und relativen Ventrikelfläche; Blut-Gruppe - SMI 32 - PT 3.....	105
Abbildung 31 Korrelation der immunreaktiven Fläche und relativen Ventrikelfläche; NaCl-Gruppe - SMI 32 - PT 3.....	106
Abbildung 32 Korrelation der immunreaktiven Fläche und relativen Ventrikelfläche; Blut-Gruppe - SMI 32 - PT 7.....	106
Abbildung 33 Korrelation der immunreaktiven Fläche und Kortexdicke; NaCl-Gruppe - SMI 32 - PT 1 .....	107

# 1. Einleitung

Durch den medizinischen Fortschritt ist die Grenze der Lebensfähigkeit eines frühgeborenen Kindes immer weiter gesunken und befindet sich heutzutage bei der 24. Schwangerschaftswoche (Stoll et al., 2015). 25 % der Frühgeborenen entwickeln (insbesondere innerhalb der ersten 48 Lebensstunden) eine intraventrikuläre Blutung (IVH) (Strahle et al., 2012). In der Gruppe der very-low-birth-weight Frühgeborenen, definiert als Geburtsgewicht zwischen 500-750 g, liegt die IVH-Rate sogar bei 40-50 % (Ballabh, 2010). Die Einteilung einer IVH erfolgt nach der Papile Skala in Grad I-IV (Papile et al., 1978). 25 % aller Frühgeborenen mit einer IVH Grad III/IV entwickeln durch multiple Pathomechanismen einen posthämorrhagischen Hydrozephalus. Dieses Krankheitsbild ist verantwortlich für verminderte kognitive Fähigkeiten, motorische Einschränkungen und eine reduzierte Lebensqualität der Patienten (Whitelaw, 2002).

Ursprung der Blutungen ist bei sehr unreifen Frühgeborenen (< 30. Schwangerschaftswoche) die germinale Matrix (Leech and Kohlen, 1974). Diese unterläuft in frühen Entwicklungsphasen (bis zur 24. Gestationswoche) eine rapide Zellproliferation und die hierfür notwendige Vaskularisierung. Bis zur 37. Gestationswoche baut sich die germinale Matrix fast vollständig ab (Ballabh, 2014). Wenn das Blutungsvolumen das Auffassungsvermögen der germinalen Matrix übersteigt, durchbricht die Blutung die ependymale Zellschicht und tritt in das ventrikuläre System ein (Ballabh, 2010).

Das genaue Zusammenspiel der Vorgänge, welche zu einer germinalen Matrix intraventrikulären Hämorrhagie (GM-IVH) führen ist nicht final geklärt, jedoch spielen Komplikationen einer Frühgeburt, wie ein fetales Atemnotsyndrom, ausgelöst durch Surfactant-Mangel, und hypotensive Kreislaufdysregulationen aufgrund des geringen kardialen Auswurfs eine Rolle (Robinson, 2012).

Durch die Koagulation des intraventrikulären Blutes kommt es zu einem akuten Hydrozephalus occlusus. Im weiteren Verlauf beginnt eine Kaskade an Umbaumechanismen, ausgelöst durch die Blutung, welche in einer dauerhaften Abfluss- und Resorptionsstörung des Liquors resultiert (Chen et al., 2017).

Bisherige Therapien zielen auf eine Entlastung des intrazerebralen Drucks durch künstlich angelegte Liquordrainagen (z.B. Ventrikuloperitonealer Shunt) ab. Diese Methoden sind jedoch zum einen anfällig für Verstopfungen, zum anderen ist so ein direkter Infektionsweg gebahnt (Koschnitzky et al., 2018).

Thema dieser Arbeit soll der Aufbau und die Evaluation eines Tiermodells und die Erforschung der Pathomechanismen hinter der Entwicklung eines posthämorrhagischen Hydrozephalus, sowie der einhergehenden intrazerebralen Veränderungen infolge einer intraventrikulären Blutung sein.

Mit den hieraus gewonnenen Ergebnissen soll ein besseres Verständnis der Erkrankung und weiterer möglicher Therapiemaßnahmen erreicht werden. Folgende Hypothesen wurden formuliert:

1. Mit einer IVH am ersten postnatalen Tag lässt sich bereits früh nach der Blutung die Entwicklung von posthämorrhagischen Hydrozephalen (PHH) induzieren und erkennen.
2. Die intraventrikuläre Blutung an PND1 schädigt in den ersten Tagen Zellen der grauen und weißen Substanz, immunhistochemisch nachgewiesen mit Antikörpern gegen Neuronale Nuclei (NeuN) und Neurofilamente (SMI-32), was zur Entwicklung des PHH beiträgt.
3. Verzögerter Zelltod (Apoptose), immunhistochemisch nachgewiesen mit einem Antikörper gegen aktivierte Caspase 3, trägt wesentlich zur Ausbildung des PHH bei.

In der bisherigen Literatur zeigte sich, dass neugeborene Rattenjungen (postnataler Tag 0-1) in Hinsicht auf die Gehirnentwicklung und -vaskularisierung mit frühgeborenen Kindern vergleichbar sind (Balasubramaniam et al., 2006).

Zum Aufbau des Tiermodells wird am ersten Lebenstag der Rattenjungen eine bilaterale intraventrikuläre Injektion mit Donorblut oder Kochsalzlösung durchgeführt. Zur Kontrolle der Narkose- und Operationseffekte wird einer Schein-operierten Gruppe (Sham) ein Hautschnitt unter Narkose zugefügt.

Im Folgenden werden die Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten (1, 3, 7 und 21 Tage Post-Trauma) euthanasiert, um den zeitlichen Verlauf der Veränderungen im Gehirn zu verfolgen.

Anschließend werden die Hemisphären- und Ventrikelgrößen der Versuchstiere ermittelt und die immunhistochemischen Färbungen für den neuronalen (NeuN) und axonalen Schaden (SMI-32) angelegt. Die Beteiligung apoptotischer Prozesse bei der Entwicklung des Hydrozephalus und der Schadensausdehnung wird mittels aktivierter Caspase 3 immunhistochemisch evaluiert.

## **2. Stand der Wissenschaft**

### **2.1 Patientengruppe**

Das Krankheitsbild des posthämorrhagischen Hydrozephalus (PHH) ist Folge einer intraventrikulären Blutung (IVH). Die am häufigsten betroffene Patientengruppe sind sehr früh geborene Neonaten, hier sind 25 % von einer IVH betroffen (Kazan et al., 2005; Strahle et al., 2012). Etwa 90 % der intraventrikulären Blutungen haben ihren Ursprung in der germinalen Matrix (Leech and Kohlen, 1974). Auch reif geborene Kinder und Erwachsene können das Krankheitsbild nach einer intrazerebralen Blutung (ICH), z.B. nach einem Schädel-Hirn-Trauma, entwickeln (Hanley, 2009). Hervorzuheben sind Frühgeborene mit einem besonders geringen Geburtsgewicht von 500-750 g. Hier beträgt die IVH Rate etwa 40-50 % (Ballabh, 2010). Aufgrund des medizinischen Fortschritts ist die Überlebensrate dieser very-low-birth-weight Frühgeborenen in den letzten Jahren deutlich angestiegen (Stoll et al., 2015).

Bei der Entwicklung eines Hydrozephalus kommt es zu einer Akkumulation von Liquor, dies kann bedingt sein durch einen verhinderten Abfluss oder Resorption oder eine vermehrte Produktion. Hiernach wird unterschieden in einen Hydrozephalus occlusus, malresorptivus oder hypersecretorius (Chen et al., 2017).

Langzeitfolgen eines posthämorrhagischen Hydrozephalus sind eine verzögerte Entwicklung, bleibende neurologische Defizite sowie eine erhöhte Mortalität und Morbidität der Patienten (Whitelaw, 2002).

### **2.2 Therapieansätze**

Im Juli 2016 traf sich die Hydrocephalus Association, um in einem interdisziplinären Workshop die weiteren Forschungsfelder für das Krankheitsbild des PHH festzulegen. Hierbei rückte unter anderem die Dringlichkeit einer besseren Früherkennung der gefährdeten Patientengruppen in den Vordergrund. Bisher gibt es keine genormten Evaluationsmethoden für eine Risikoabschätzung. Verschiedene Forschungsgruppen testen die prädiktiven Werte verschiedener Biomarker im Liquor (Cherian et al., 2004; Galbreath et al., 1995; Morales et al., 2012), wohingegen andere sich mit Präventionsmethoden nach einer Frühgeburt befassen (Koschnitzky et al., 2018).

### **2.2.1 Interventionen zur Risikoreduktion**

Bisherige Ansätze sind die antenatale Gabe von Kortikosteroiden oder Vitamin K, die Wahl des Geburtsmodus (Vaginal vs. Kaiserschnitt) und der Zeitpunkt der postnatalen Nabelschnurabklemmung.

Eine pränatale Kortikosteroidgabe senkt das Risiko einer IVH und eines fetalen Atemnotsyndroms (Deshmukh and Patole, 2017). Eine pränatale Vitamin K Gabe scheint das Risiko einer IVH für die ersten 7 Lebenstage zu senken, jedoch ohne ein besseres Langzeitergebnis (El-Ganzoury et al., 2014).

Bei sehr frühen Geburten zeigte eine Studie, dass ein geplanter Kaiserschnitt mit einem geringeren Risiko einer IVH einhergeht im Vergleich zu einem Notkaiserschnitt oder einer vaginalen Geburt (Humberg et al., 2017).

Eine frühe Nabelschnurabklemmung ermöglicht eine schnellstmögliche Versorgung des Frühgeborenen durch einen Neonatologen, dagegen scheint ein späteres Abklemmen das Risiko einer IVH und die spätere Transfusionsrate zu senken (Rabe et al., 2012). Die Transfusionsrate niedrig zu halten ist wichtig, um dem schnellen Anstieg des intravasalen Volumens und dem folgenden Anstieg des zerebralen Blutdrucks zu entgehen (Baer et al., 2011).

### **2.2.2 Interventionen zur Vermeidung einer Progression von IVH zu PHH**

Eine vermehrte Liquorproduktion und eine Abflussstörung spielen meist gepaart eine Rolle in der Entwicklung eines Hydrozephalus. Die Studie von Karimy et al. zeigte, dass nach einer IVH der Plexus choroideus vermehrt Liquor produziert (Karimy et al., 2017). Um eine Drosselung der Liquorproduktion zu erreichen, wurden in der Vergangenheit häufiger Diuretika wie Acetazolamid und Furosemid eingesetzt, bisher leider ohne signifikante Erfolge (Whitelaw, 2001).

DRIFT (drainage, irrigation and fibrinolytic therapy) beschreibt eine Intervention, in der humanes rt-PA in das Ventrikelsystem injiziert wird, dort 8 Stunden verbleibt und anschließend mit künstlichem Liquor über eine zu- und eine abführende Drainage hinausgespült wird. Die Spülung dauert regelhaft 72 Stunden, kann aber bis auf eine Woche verlängert werden, wenn der abfließende Liquor nicht ausreichend aufklart („white wine“- colour). Auch diese Technik konnte keine Reduktion der Mortalität oder der Implantationsrate eines ventrikuloperitonealen Shunts nach 6 Monaten

vorweisen. Tatsächlich mussten die Versuche abgebrochen werden, da es zu häufigeren Zweitblutungen kam (Cherian et al., 2004).

Eine Koagulation des Plexus choroideus und eine Ventrikulostomie des dritten Ventrikels sind endoskopische Verfahren, um langsam progrediente Hydrozephalen zu entlasten. Etwa zwei Drittel der Patienten, die einer Plexus-Koagulation unterzogen wurden, zeigten keine weitere Progression. Nur 3 von 10 Patienten, bei denen eine Ventrikulostomie durchgeführt wurde, zeigten eine dauerhafte Entlastung des Hydrozephalus (Whitelaw, 2002).

### 2.3 Ventrikuloperitonealer Shunt

Wenn die posthämorrhagische ventrikuläre Dilatation (PHVD) nicht zu stoppen ist, wird als Ultima Ratio ein ventrikuloperitonealer Shunt angelegt.

Eine Shunt Anlage ist jedoch bei frühgeborenen Kindern selten möglich, da diese noch zu klein und hämodynamisch sowie respiratorisch zu instabil sind, um eine solche Operation durchzustehen (Whitelaw, 2002). Lee et al. zeigte auf, dass Frühgeborene mit PHVD, die einen Shunt implantiert bekamen, deutlich häufiger schlechte neurologische Fähigkeiten und eine höhere Sterberate aufweisen.

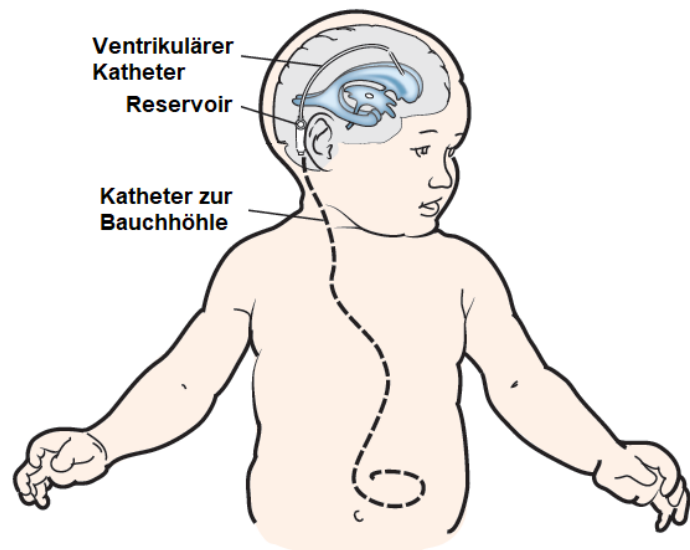


Abbildung 1 zeigt den Aufbau eines ventrikuloperitonealen Shunt.  
(Quelle: 'About Your Ventriculoperitoneal (VP) Shunt Surgery for Pediatric Patients' n.d.)

Diese Beobachtung könnte mehrere Gründe haben. Zum einen, dass Frühgeborene, die einen Shunt implantiert bekommen, einen höheren Schweregrad der PHVD haben, oder zum anderen, dass ein Shunt zu vermehrten Komplikationen führt. Eine Shunt-Implantation sollte daher gut überlegt sein, da nicht jede PHVD mit einem Hirnschaden einhergeht und eine Korrelation zwischen PHVD und einer schlechteren neurologischen Entwicklung nicht sicher nachgewiesen ist (Lee et al., 2009).

## **2.4 Definition einer germinalen Matrix intraventrikulären Hämorrhagie**

Eine intraventrikuläre Blutung entsteht typischerweise in der germinalen Matrix (Leech and Kohlen, 1974). Diese ist am Kopf des Nucleus caudatus und unterhalb der ventrikulären Ependymalschicht lokalisiert (Ballabh, 2010). Sie ist eine hoch vaskularisierte Ansammlung von Gliazellen und neuronalen Vorläuferzellen und gerade bei Frühgeborenen sehr vulnerebel für Blutungen (Strahle et al., 2012). Dem zugrunde liegt die Instabilität des Gefäßsystems aufgrund der rapiden Angiogenese. Die Gefäße weisen eine unreife Basalmembran auf und sind nicht ausreichend von stabilisierenden Astrozyten umgeben (Ballabh, 2010).

Die Einteilung des Schweregrades erfolgt anhand der Papile Skala in vier Untergruppen. Die Blutungen werden bei Frühgeborenen sonographisch dargestellt.

Grad I – subependymale Hämorrhagie

Grad II – intraventrikuläre Hämorrhagie ohne ventrikuläre Dilatation

Grad III – intraventrikuläre Hämorrhagie mit ventrikulärer Dilatation

Grad IV – intraventrikuläre Hämorrhagie mit parenchymaler Blutung  
(Papile et al., 1978)



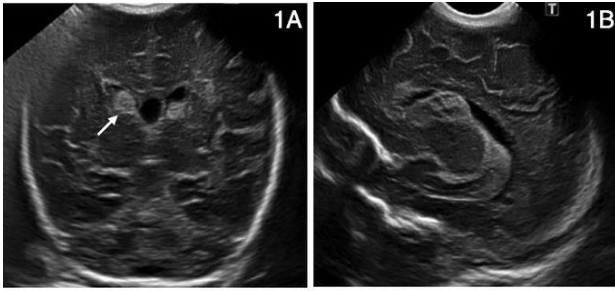
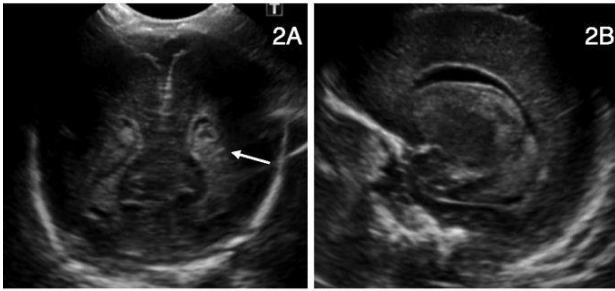


Abbildung 2 zeigt die sonographische Darstellung von germinalen Matrix intraventrikulären Hämorrhagien bei Frühgeborenen.

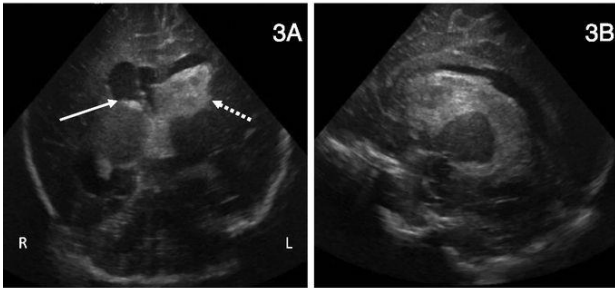
1A Koronare Bildgebung einer bilateralen Grad 1 GM-IVH (weißer Pfeil deutet auf die germinale Matrix Hämorrhagie).

1B Sagittale Bildgebung einer Grad 1 GM-IVH.

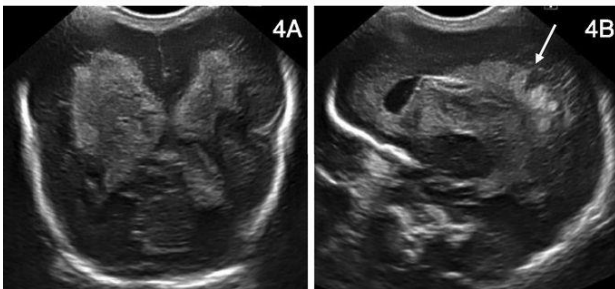


2A Koronare Bildgebung einer bilateralen Grad 2 GM-IVH mit intraventrikulärer Blutung ohne ventrikuläre Dilatation (weißer Pfeil deutet auf die germinale Matrix Hämorrhagie).

2B Sagittale Bildgebung einer Grad 2 GM-IVH.



3A Koronare Bildgebung einer linksseitigen Grad 3 GM-IVH und einer rechtsseitigen Grad 2 GM-IVH (unterbrochener Pfeil: germinale Matrix Hämorrhagie mit ventrikulärer Dilatation, solider Pfeil: germinale Matrix Hämorrhagie ohne ventrikuläre Dilatation). 3B Sagittale Bildgebung einer Grad 3 GM-IVH.



4A Koronare Bildgebung einer bilateralen Grad 4 GM-IVH mit ventrikulärer Dilatation und Parenchymblutung.

4B Sagittale Bildgebung einer Grad 4 GM-IVH.

Übernommen von (Lim and Hagen, 2019)

## 2.5 Pathophysiologie des IVH

Bei Frühgeborenen kommt es besonders häufig zu Blutungsereignissen aufgrund unreifer Blutgefäße und Dysregulationen des zerebralen Blutflusses, welche durch eine respiratorische und hämodynamische Instabilität auftreten (Ballabh, 2014; Strahle et al., 2012). Insbesondere die Media der arteriellen Gefäße ist im frühen Gestationsalter noch nicht vollständig ausgebildet. Sie ist für die Widerstandsfähigkeit gegenüber Schwankungen im Blutdruck und die Flussgeschwindigkeiten verantwortlich (Ballabh, 2014).

So kommt es bei einem fetalen Atemnotsyndrom oder Atelektasen zum Anstieg des intrathorakalen Drucks und subsequent zu Blutungen der germinalen Matrix (Cherian et al., 2004).

Kurz nach dem Blutungsereignis kommt es durch die Koagulation des Blutes zu einer Verstopfung der Engstellen des Liquorsystems (z.B. Aquädukt, Foramen Monroi) und dadurch zu einer Abflussstörung (Chen et al., 2017).

Jedoch wird durch diesen Mechanismus nicht die gesamte, lang-anhaltende Pathophysiologie erklärt.

Es konnte nachgewiesen werden, dass die fibrinolytische Aktivität im Liquor deutlich schwächer ist als im Blut. Daher können geformte Koagel nicht suffizient abtransportiert werden bzw. benötigen eine lange Zeit um sich vollständig aufzulösen (Whitelaw et al., 1995). Zusätzlich zeigte sich nach stattgehabter Blutung eine Erhöhung von TGF- $\beta$ 1, welches zur Wundheilung und vermehrter Narbenformation beiträgt (Whitelaw, 2002). Es kommt zu einer dauerhaften Verlegung der Liquorabflusswege und einem Hydrozephalus occlusus durch eine Fibrose des Subarachnoidalraums (Crews et al., 2004).

Bei Lyse der Erythrozyten kommt es zur Freisetzung von Hämoglobin. Das anwesende Eisen reagiert mit Wasserstoffperoxid um reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zu produzieren (Strahle et al., 2014).

ROS führen zu Zelltod im umliegenden Gewebe und induzieren die Degeneration von Lipiden. Die ependymalen Zilien, welche eine wichtige Rolle in der Regulation des Liquorflusses haben, werden durch die ROS zunächst an ihrer Bewegung gehindert und anschließend zerstört (Hirst et al., 2009).

Thrombin wird bei einer IVH in großen Mengen freigesetzt, um die Blutung zu stoppen. Nachweislich führen hohe Konzentrationen von Thrombin zum Zelltod der umliegenden Neurone und Astrozyten. Zudem aktiviert es das Komplementsystem, welches die Lyse der Erythrozyten über den Membranangriffskomplex induziert und über C3a einen chemotaktischen Impuls für Leukozyten setzt, welche wiederum eine inflammatorische Reaktion vorantreiben (Hua et al., 2007).

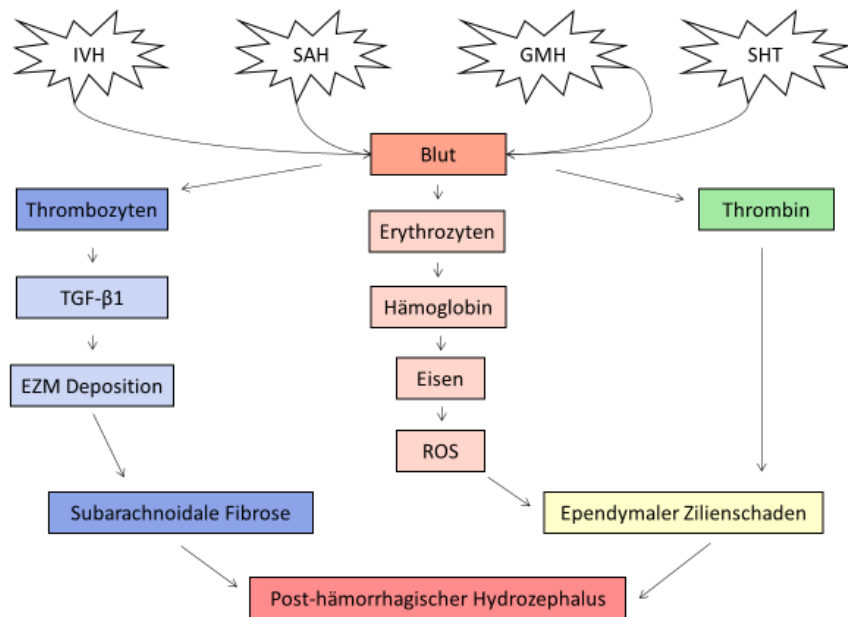


Abbildung 3 zeigt die verschiedenen Pathomechanismen, welche zu einer Hydrozephalus-Entwicklung beitragen. (Quelle: Adaptiert von Chen et al. 2017); Abkürzungen: subarachnoidale Hämorrhagie (SAH), germinale Matrix Hämorrhagie (GMH), Schädel-Hirn-Trauma (SHT), extrazelluläre Matrix (EZM), reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

## 2.6 Zelluntergang

Es gibt multiple, wichtige Mechanismen des Zelluntergangs, z.B. Nekrose und Apoptose. Diese unterscheiden sich sowohl durch die auslösenden Umstände als auch durch die Konsequenzen für das umliegende Gewebe.

Bei Nekrosen kommt es zu einem irreversiblen Schaden an der Zelle, welche ihre Hämostase nicht weiter aufrechterhalten kann. Als Folge schwillt die Zelle an, bis sie zerplatzt und lytische sowie proinflammatorische Komponenten freigesetzt werden (Gong et al., 2001).

Apoptose wird auch der programmierte Zelltod genannt. In zwei aufeinander folgenden Phasen schrumpft zunächst die Zelle, das Chromatin verdichtet sich und die DNA wird fragmentiert. Schließlich teilt sich die Zelle in viele kleine Vesikel und

wird von Phagozyten aufgenommen. Während des gesamten Prozesses bleibt die Zellmembran intakt und es werden keine intrazellulären Bestandteile freigesetzt (Gong et al., 2001).

Hirnzellen können nach IVH über diese beiden Mechanismen zerstört werden. Ein Teil der Zellen wird aufgrund des plötzlichen Druckanstiegs, der verminderten Durchblutung sowie des Sauerstoff- und Energiemangels durch Nekrose zerstört. Der andere Teil durch die noxischen Substanzen zerstörter Zellen und des abbauenden Blutes (Gong et al., 2001).

### **2.6.1 NeuN**

NeuN steht für neuronal nuclei und wurde 1992 entdeckt, als ein Forschungsteam einen monoklonalen Antikörper entwarf, welcher sich an dieses bisher unbekannte neuronale Antigen band. Die genaue Funktion von NeuN ist nicht geklärt; jedoch zeigen immunhistochemische Färbungen für diesen Marker eine positive Reaktion in den Nucleoli und Zellkörpern von differenzierten, ausgereiften Neuronen. Die Antigenität findet sich vorwiegend in den Nucleoli; zudem konnte eine höhere Intensität in Arealen der geringen Chromatindichte beobachtet werden, sodass die Vermutung besteht, dass NeuN an freiliegende DNA-Stränge bindet und möglicherweise eine regulatorische Funktion in der neuronalen Proteinsynthese übernimmt (Mullen et al., 1992).

Davoli et al. zeigte, dass eine Reduktion in der NeuN-Immunreaktivität nach einem Hirntrauma als Verlust von neuronalen Zellen bzw. als prädiktiver Faktor für deren Untergang gewertet werden kann. In der Studie wurde eine transiente fokale Ischämie induziert, entweder unilateral durch Okklusion der Arteria cerebri media oder bilateral durch Okklusion der Arteria carotis communis. Als Versuchstiere wurden männliche Wistar Ratten mit einem Körpergewicht zwischen 250 und 300 g verwendet, die Okklusion dauerte 90 Minuten. Im Anschluss wurden die Tiere 3, 6 und 24 Stunden nach der Ischämie euthanasiert (Davoli et al., 2002).

Es erfolgte eine doppelte Immunfärbung mit NeuN und TUNEL (terminal dUTP nick-end labeling), welches bei der DNA-Fragmentierung und somit beim irreversiblen Zelluntergang auftritt. Es zeigte sich, dass mit abnehmender Lebensfähigkeit der Neurone die NeuN-Immunreaktivität abnahm, während die TUNEL-Immunreaktivität

zunahm. Hieraus schlussfolgerte sich, dass NeuN in gesunden, lebensfähigen Neuronen exprimiert wird und mit dem Zelluntergang abnimmt. Somit eignet sich NeuN als Marker funktional intakter Neurone, bzw. die Abwesenheit einer NeuN-Immunreaktivität als Marker für irreversibel geschädigte Neurone und den Zelluntergang derselben (Davoli et al., 2002).

Anzumerken ist jedoch, dass nicht alle Neurone NeuN produzieren. So zeigen beispielsweise Photorezeptoren der Retina, die Neurone des Riechkolbens und zerebelläre Purkinjefasern keinerlei NeuN-Immunreaktivität (Ünal-Çevik et al., 2004).

### **2.6.2 Caspase 3**

Die finale Phase der Apoptose wird durch die Caspase-Kaskade signalisiert. Caspasen sind Proteasen, die das Zellskelett abbauen. Zudem unterdrücken sie DNA-Reparatur-Mechanismen und erlauben so den geregelten Zellabbau. Caspase 3 zählt zu den Effektor-Caspasen und liegt in Neuronen, Leukozyten und endothelialen Zellen in hoher Konzentration vor, wenn sich diese in der Apoptose befinden (Gong et al., 2001).

Die Studie um Davoli et al. führte zudem eine doppelte immunhistochemische Färbung mit aktivierter Caspase 3 und TUNEL durch. Hier konnte nachgewiesen werden, dass nur eine geringe Anzahl von Zellen eine zeitgleiche Immunreaktivität für aktivierte Caspase 3 und TUNEL aufwies. In der Gruppe 3 Stunden nach Reperfusion zeigte sich lediglich die Immunreaktivität für aktivierte Caspase 3 positiv, eine Co-Lokalisation mit TUNEL konnte nicht nachgewiesen werden. Nach 6 Stunden zeigte sich eine partielle Co-Lokalisation; nach 24 Stunden konnten nur noch TUNEL positive Zellen nachgewiesen werden (Davoli et al., 2002). Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, dass die Aktivierung der Caspase-Kaskade dem Zelltod vorausgeht und den Weg für die DNA-Fragmentierung ebnet (Davoli et al., 2002).

Somit eignet sich aktivierte Caspase 3 als Marker für den Prozess der Apoptose und als Prädiktor für den Zelluntergang.

## 2.7 Axonaler Schaden

Wie bereits erwähnt, zählen eine verzögerte Entwicklung und bleibende neurologische Defizite zu den Langzeitfolgen eines posthämorrhagischen Hydrozephalus (Whitelaw, 2002).

Neben dem Zelluntergang scheint auch ein axonaler Schaden bzw. morphologische Veränderungen der Axone in der periventrikulären weißen Hirnsubstanz eine wichtige Rolle zu spielen (Del Bigio and Zhang, 1998).

Axone sind nicht nur die elektrische Leitung des Gehirns, sondern liefern über antero- und retrograden axonalen Transport Mitochondrien, synaptische Neurotransmitter und verschiedene Peptide entlang ihrer Mikrotubuli zu deren Einsatzort (Gudi et al., 2017). Schon 1996 konnte Harris et al. belegen, dass die Axone in hydrozephalen Rattengehirnen sich von denen in der Kontrollgruppe unterscheiden. Sie zeigten eine signifikant reduzierte Länge der apikalen (61 %) und auch basalen (77 %) Dendriten (Harris et al., 1996).

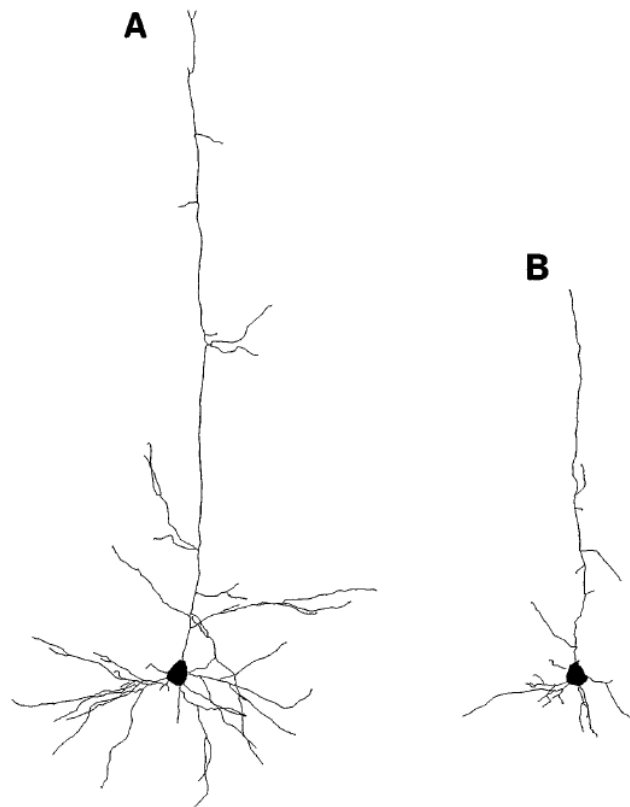


Abbildung 4

a.) Schicht V pyramidale Zelle der Rattenhirne der Kontrollgruppe 21 Tage nach Geburt;  
b.) Schicht V pyramidale Zelle der Rattenhirne der Hydrozephalus-Gruppe 21 Tage nach Geburt (Harris et al., 1996).

Der vermutete Mechanismus für diese Veränderung der Axone steht in Zusammenhang mit dem konstanten Dehnungsstress und der druckassoziierten Hypoperfusion des periventrikulären Gewebes (Harris et al., 1996). Dies führt zum Abbau der ependymalen Zellen, welche eine schmale Schicht zwischen dem Liquor und der dahinterliegenden weißen Hirnsubstanz bilden (McAllister, 2012).

Ohne diese Schicht werden die Neurone und Axone direkt von dem alterierten Liquor der hydrozephalen Ventrikuli umflossen. Dieser enthält eine höhere Konzentration an freien Calcium-Ionen ( $\text{Ca}^{++}$ ), welche wiederum zur Aktivierung proteolytischer Enzyme der Caplain-Familie führen. So kommt es zum Abbau des axonalen Skeletts und subsequent auch der Transportmechanismen (Del Bigio, 2000).

### **2.7.1 SMI-32**

SMI-32 ist ein Antikörper, der sich an nicht-phosphorylierte Neurofilamente bindet, welche in ihrer phosphorylierten Form ein Hauptbestandteil des neuronalen Zytoskeletts darstellen und am axonalen Transport und der Myelinisierung beteiligt sind. In ihrer dephosphorylierten Form gelten sie als Marker für axonale Schäden. SMI-32 bindet insbesondere an das Neurofilament H in seiner dephosphorylierten Form (Gudi et al., 2017).

Die Studie um Wang et al. induzierte eine traumatische Hirnschädigung in 10-12 Wochen alten Rattenjungens mittels eines kontrollierten, kortikalen Impakts. Eine immunhistochemische Reaktivität von SMI-32 konnte bei mikroskopisch morphologisch intakt aussehenden Axonen nicht nachgewiesen werden, sodass sich hier eine Selektivität für geschädigte Axone ergibt (Wang et al., 2013).

## **2.8 Tiermodelle des Post-Hämorrhagischen Hydrozephalus**

Bisherige Forschungsgruppen entwickelten verschiedene Tiermodelle, um eine intraventrikuläre Hämorrhagie und einen anschließenden posthämorrhagischen Hydrozephalus zu erforschen. Die verwendeten Tierspezies beinhalten Hunde, Schweine, Ratten und Kaninchen und es erfolgten intraventrikuläre Injektionen von Blut oder Blutprodukten wie z.B. Erythrozyten, Eisen oder Hämoglobin (Chen et al., 2017).

Im Sinne der Praktikabilität der Haltung der Versuchstiere erweisen sich Ratten und Kaninchen anhand ihrer Größe als leichter gegenüber den größeren Säugetieren. Zudem konnte die Studie von Dobbing and Sands 1979 nachweisen, dass Ratten etwa 10 Tage nach Geburt einen vergleichbaren Wachstumsschub des Gehirns durchmachen wie er bei Menschen perinatal stattfindet, (siehe Abbildung 25) und sich somit sowie durch eine vergleichbare weitere Entwicklung der Gehirne als gutes Modell heranziehen lassen.

Eine der ersten Forschungsgruppen, welche ein Rattenmodell eines posthämorrhagischen Hydrozephalus entwickelten, war Cherian et al. im Jahr 2003. In der Studie wurden 80 µl Citratblut oder künstlicher Liquor am postnatalen Tag 7 in den linken Ventrikel von Wistar Rattenjungen injiziert. Eine Untergruppe erhielt zusätzlich am postnatalen Tag 8 eine zweite intraventrikuläre Blut- oder Liquorinjektion (ebenfalls mit 80 µl) in den rechten Ventrikel, um eine zweite Episode einer IVH zu imitieren. Während der Injektion stieg der intrakranielle Druck kurzzeitig auf das bis zu Achtfache an. Eine ventrikuläre Dilatation wurde als  $> 1 \text{ mm}^2$  Ventrikelfläche festgesetzt. 65,1 % der Tiere mit einer bilateralen Blutinjektion und 50 % der Tiere mit einer bilateralen Liquorinjektion entwickelten eine solche ventrikuläre Dilatation (Cherian et al., 2003).

Balasubramaniam et al. testete den Effekt einer periventrikulären Hämorrhagie auf die folgenden motorischen Defizite. Hierfür wurden 15 µl autologes Blut in die rechte periventrikuläre Region von einem Tag alten Rattenjungen injiziert. 24 Stunden nach der Injektion erfolgte eine MR-Bildgebung, welche ein periventrikuläres Hämatom nachweisen konnte. Zum Teil zeigte sich auch eine Einblutung in den lateralen Ventrikel mit ventrikulärer Dilatation, einer drittgradigen IVH entsprechend. Ein Schwellenwert für eine ventrikuläre Dilatation im Sinne eines posthämorrhagischen Hydrozephalus und eine resultierende Hydrozephalus-Rate wurde in diesem Experiment nicht ermittelt (Balasubramaniam et al., 2006).

Um den Effekt einer humanen mesenchymalen Stammzelltransplantation auf die Entwicklung eines posthämorrhagischen Hydrozephalus nach intraventrikulärer Hämorrhagie zu testen, injizierte die Gruppe um Ahn et al. 100 µl maternalen Vollbluts in jeden Seitenventrikel von vier Tage alten Sprague-Dawley Rattenjungen. 85 % der Tiere zeigten eine progressive, stark ausgeprägte ventrikuläre Dilatation (Ventrikel-/Hirnvolumen Verhältnis 10 – 52 %). Zudem zeigte die Studie, dass die



Applikation mesenchymaler Stammzellen die Entwicklung eines PHH signifikant reduziert ( $p < 0,05$ ) (Ahn et al., 2013).

Im Gegensatz zu den anderen Forschungsgruppen verwendete Lodhia et al. erwachsene, ausschließlich männliche Sprague-Dawley Ratten und injizierte 200  $\mu$ l autologes Blut oder Liquor über 15 Minuten in den rechten Seitenventrikel. Zwei Tage nach der artifiziellen Blutung zeigte sich die ventrikuläre Dilatation am stärksten ( $p < 0,01$ ); auch nach 8 Wochen zeigte sich noch eine ventrikuläre Dilatation, jedoch weniger stark ausgeprägt ( $p < 0,05$ ) (Lodhia et al., 2006).

Auch die Verwendung von Tieren mit kongenitalem Hydrozephalus fand den Weg in die Erforschung der Hydrozephalusentstehung, siehe z.B. die Studie von Jones et al. Hier wurden H-Tx Ratten verwendet, welche ab dem vierten postnatalen Tag einen progressiven Hydrozephalus entwickelten (Jones et al., 2000). Hier ist jedoch, genau wie bei Tieren mit Kaolin-induziertem Hydrozephalus (z.B. Feng et al., 2017), zu beachten, dass die Effekte der germinalen Matrix intraventrikulären Hämorrhagie nicht mit einbezogen werden.

Es konnte nachgewiesen werden, dass die Faktoren der Gerinnungskaskade, welche in Vollblut enthalten sind, eine Rolle in der Entwicklung eines Hydrozephalus zu spielen scheinen. Allen voran Thrombin, welches durch die Aktivierung von PAR-1 zur Schädigung der ventrikulären Wand und zur Disruption der Blut-Hirn-Schranke führt (Gao et al., 2014).

Hierdurch ergeben sich Einschränkungen bezüglich der Übertragbarkeit solcher Tiermodelle ohne intraventrikuläre Hämorrhagie auf die pathophysiologischen Mechanismen einer fetalen germinalen Matrix intraventrikulären Hämorrhagie und einem resultierenden posthämorrhagischen Hydrozephalus.

In Zusammenschau der bisher durchgeführten Experimente erstellen wir für diese experimentelle Arbeit und das Tiermodell folgende Hypothesen:

1. Mit einer IVH am ersten postnatalen Tag lässt sich bereits früh nach der Blutung die Entwicklung von posthämorrhagischen Hydrozephalen (PHH) induzieren und erkennen.

2. Die intraventrikuläre Blutung an PND1 schädigt in den ersten Tagen Zellen der grauen und weißen Substanz, immunhistochemisch nachgewiesen mit Antikörpern gegen Neuronale Nuclei (NeuN) und Neurofilamente (SMI-32), was zur Entwicklung des PHH beiträgt.
3. Verzögerter Zelltod (Apoptose), immunhistochemisch nachgewiesen mit einem Antikörper gegen aktivierte Caspase 3, trägt wesentlich zur Ausbildung des PHH bei.

## 3. Material und Methoden

### 3.1 Versuchsaufbau

Der im Folgenden beschriebene Versuchsaufbau umfasst drei Dissertationen (zusätzlich: Külzer, 2021 und Wocheslander, 2020). Alle intraventrikulären Injektionen von Blut und NaCl wurden durch einen Facharzt für Neurochirurgie durchgeführt. Alle weiteren hier beschriebenen experimentellen Tätigkeiten wurden von allen beteiligten Doktorandinnen/Doktoranden als Team erledigt. Ein Großteil des experimentellen Vorgehens wird daher in allen Dissertationen dargestellt.

Insgesamt wurden 102 Sprague-Dawley Ratten (Charles River Laboratories, Sulzfeld) in das Experiment eingeschlossen. Die Jungtiere wurden nicht nach Geschlecht getrennt. Die Muttertiere erhielten wir von Charles River Laboratories etwa 5-12 Tage prepartum.

Die Jungtiere wurden, aufgeteilt nach Überlebenszeitpunkt, in vier Versuchsreihen aufgeteilt, um den zeitlichen Verlauf der Hydrozephalusentwicklung darstellen zu können.

Jede Versuchsreihe enthielt drei Interventionsgruppen: Die Blut-Gruppe erhielt bilaterale ventrikuläre Injektionen mit Donorblut (100 µl beidseits). Die NaCl-Gruppe erhielt dieselbe Menge sterile, isotonische Kochsalzlösung (0,9 % NaCl; 100 µl beidseits) als bilaterale ventrikuläre Injektion. Die Sham-Gruppe wurde narkotisiert und wie die anderen Gruppen auch mit einem Hautschnitt und nachfolgender Naht oder Verklebung des Schnitts versehen, um den Effekt, den der operative Ablauf auf die Pathologie hat, abschätzen zu können.

Die Jungtiere wurden 24 Stunden postpartum operiert, wobei insgesamt 36 Tiere Donorblut (Blut) erhielten, 32 Tiere isotonische Kochsalzlösung (NaCl) und 34 Tiere Schein-operiert (Sham) wurden.

Die Tiere wurden anschließend entsprechend der Versuchsreihen 1, 3, 7 oder 21 Tage nach dem Trauma (PT1, 3, 7, 21) euthanasiert.

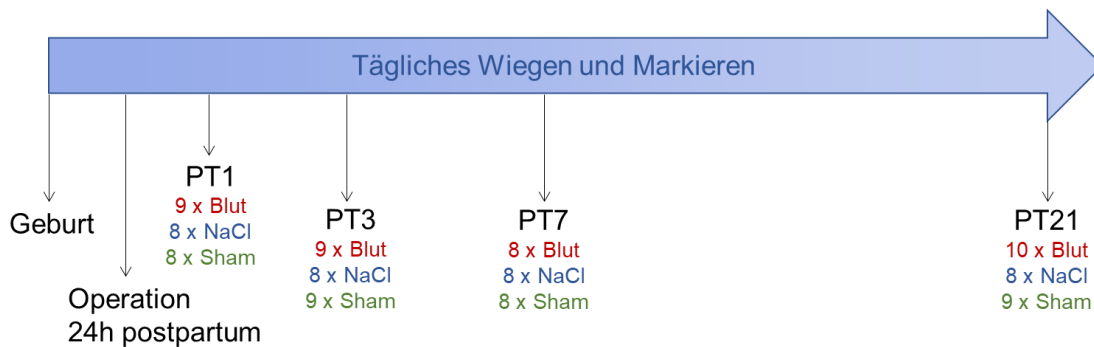


Abbildung 5 zeigt den zeitlichen Ablauf des Versuchsaufbaus, sowie die Euthanasiezeitpunkte und Gruppenzugehörigkeit nach Intervention der Versuchstiere.

Alle Tiere wurden täglich gewogen, bis am vorgesehenen Überlebenszeitpunkt die Gehirne zur Fixierung und immunhistochemischen Färbung entnommen wurden.

Alle beschriebenen Versuche wurden innerhalb der Auflagen des Tierschutzgesetzes und der Tierschutz-Versuchstierverordnung der Universitätsmedizin der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz durchgeführt. Zudem lag eine Genehmigung durch das Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz vor.

### 3.2 Unterbringung der Versuchstiere

Versuchstiere	102 Sprague-Drawley Rattenjunge, Charles River Laboratories, Sulzfeld
Muttertiere	9 Sprague-Drawley Ratten, Charles River Laboratories, Sulzfeld
Waage	Scaltec SPO61; Labotec, Wiesbaden

Die Jungtiere, die für den Versuch verwendet wurden, stammten aus insgesamt 9 verschiedenen Würfen. Während des Versuchszeitraums wurden sie im Käfig des Muttertiers untergebracht, um eine physiologische Ernährung mittels Muttermilch zu gewährleisten. Die Käfige befanden sich in einem Tierstall mit konstanter Raumtemperatur ( $22 \pm 2$  °C), Luftfeuchtigkeit ( $> 50$  %) und einem 12-Stunden-Tag/12-Stunden-Nacht Rhythmus. Die Muttertiere erhielten zu jedem Zeitpunkt Futter und Wasser ad libitum. Die Jungtiere hatten ebenfalls Zugang zu dem Futter. Jedoch konnte nicht beobachtet werden, ob sie, ihrem Alter entsprechend, schon darauf zugriffen. Jungtiere besonders großer Würfe wurden ebenfalls bei ihren Muttertieren

belassen und als mögliche spätere Donortiere für diese oder andere Versuchsreihen aufgezogen.

### **3.3 Operation**

#### **3.3.1 Vorbereitung Donortier**

Rasierer	Favorita II, GT104/GH204, Aesculap, Tuttlingen
----------	--

Zunächst wurde das Donortier mittels einer Mischung aus Medetomidinhydrochlorid (0,25 µg/g Körpergewicht) und Midazolam (2,5 µg/g Körpergewicht) gewichtsadaptiert in Narkose versetzt. Die Medikamente wurden subkutan injiziert. Eine suffiziente Tiefe der Narkose wurde sowohl durch einen ausgefallenen Kornealreflex als auch durch einen Schmerzreiz an dem Schwanz der Ratte geprüft. Das Tier wurde während der gesamten Narkose spontanatmend und ohne Sauerstoffvorlage belassen. Die geöffneten Augen des Tiers wurden mittels Bepanthen® Augencreme vor dem Austrocknen geschützt. Anschließend wurde das Donortier an Brust und Bauch rasiert, um eine bessere Übersicht der kardialen Punktionsstelle und ein reduziertes Infektionsrisiko derselben zu erreichen. Die Narkose wurde mithilfe weiterer subkutaner Applikationen von Medetomidinhydrochlorid und Midazolam aufrechterhalten. Nach den erfolgten Operationen der neugeborenen Ratten wurden die Donortiere mittels einer Überdosis Isofluran euthanasiert.

#### **3.3.2 Kardiale Punktion zur Donorblutgewinnung**

Das Donortier wurde in Rückenlage platziert mit leichter dorsaler Überstreckung der Brustwirbelsäule. Die Brust der narkotisierten Ratte wurde mit Desinfektionsmittel gereinigt und anschließend mit Xylocain Spray nochmals betäubt. Der Herzspitzenstoß der Ratte wurde palpiert und die Punktionsstelle mit einem Stift markiert. Anschließend wurde die Punktion unter Aspiration in einem Winkel von 20-30° zur Einstichebene durchgeführt. Sobald Blut in der Spritze zu sehen war, wurde die Nadel nicht weiter vorgeschoben. Die Nadel verblieb kardial platziert, bis ausreichend viel Blut für eine Operation gewonnen war (0,3 ml). Bei mehrfacher

Punktion während eines Operationstermins wurde das Donortier zur Aufrechterhaltung der Homöostase unter einer Rotlicht-Wärmelampe belassen.

### 3.3.3 Vorbereitung der Versuchstiere

Stereotaktischer Rahmen	430005-GR-GP-K; TSE-Systems, Bad Homburg
Wärmekissen	Homeothermic Blanket Control Unit; Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten (USA)
Narkosegasmonitor	Artema MM206C; Heyer, Bad Ems

Jedes Versuchstier wurde unmittelbar vor Operationsbeginn gewogen. Anschließend wurden die Tiere mit Isofluran, welches über eine eigens dafür gebaute Mund-und-Nasen-Maske zugeführt wurde, in Narkose versetzt. Auch hier erfolgte die Testung der Sedierungstiefe mittels Schmerzreiz an dem Schwanz des Tiers.

Der Operateur fixierte den Schädel des Versuchstieres mithilfe eines stereotaktischen Rahmens. Der äußere Gehörgang diente als Orientierungspunkt zur Anlage der lateralen Halterungstifte. Die Versuchstiere waren während der gesamten Operationsdauer auf einem Wärmekissen gelagert, um eine Hypothermie zu vermeiden.

### 3.3.4 Präparation der Punktionsstelle

Bohrer	Microtron 60; Aesculap AG, Tuttlingen
Bohrerhandstück	GD604; Aesculap AG, Tuttlingen
Operationsmikroskop	OPMI 1-FC; Carl Zeiss, Jena

Zunächst erfolgte ein kleiner Hautschnitt entlang der Mittellinie des Schädels, danach die stumpfe Präparation der Schädelkalotte und Darstellung der Schädelnähte und des Bregma. Der Operateur suchte die Punktionsstellen der lateralen Ventrikel auf. Diese waren für diese Studie festgelegt als 1 mm lateral (links und rechts) und 1 mm okzipital des Bregma, mit einer Punktionstiefe von 3 mm ventral ( $x = \pm 1$  mm;  $y = + 1$  mm;  $z = + 3$  mm relativ zum Bregma).

Die Punktionsnadeln waren in einem Abstand von 2 mm an dem Stereotaktischen Mikromanipulator befestigt. Sie wurden zur Markierung der Punktionsstellen vorerst

auf die Schädelkalotte abgesenkt, um die Lokalisation der nötigen Bohrlöcher zu markieren. Diese wurden mit einem Stift markiert. Anschließend wurde der Schädelknochen mit einem Bohrer eröffnet. Die korrekte Applikation von Blut oder Kochsalzlösung in die lateralen Ventrikel wurde bei einigen Tieren 24 Stunden nach der Operation mittels magnetresonanztomografischer Bildgebung überprüft.

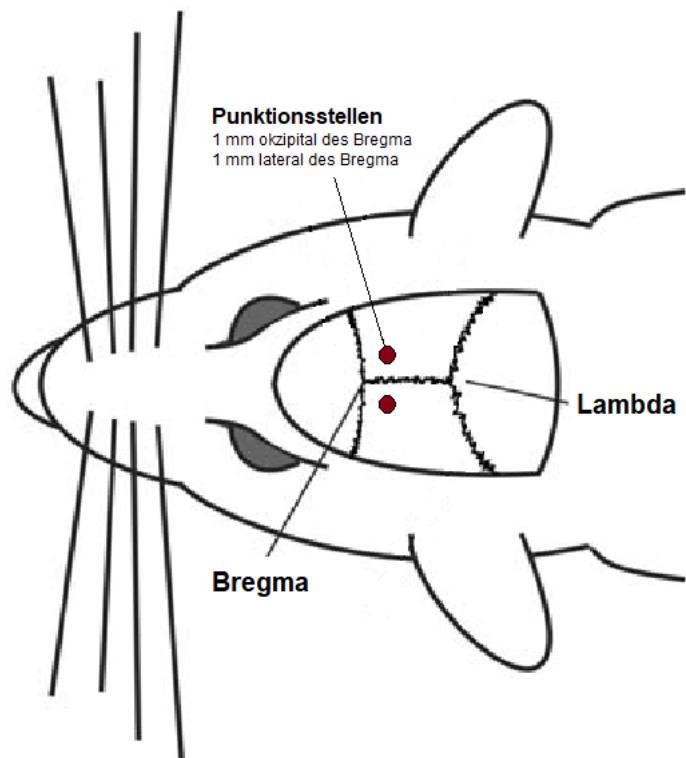


Abbildung 6 zeigt schematisch die Punktionsstellen; 1 mm lateral und 1 mm okzipital des Bregma



Abbildung 7 zeigt ein Rattenjunges im stereotaktischen Rahmen kurz vor Injektion in die Seitenventrikel.

### 3.3.5 Injektionen

Mikroinfusionspumpe	Syringe Pump; TSE Systems GmbH, Bad Homburg
Operationsmikroskop	OPMI 1-FC; Carl Zeiss, Jena

#### Blut

Wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben, wurde für die intraventrikulären Injektionen mittels kardialer Herzpunktion den Donortieren Blut entnommen. Das gewonnene Blut wurde anschließend zügig, um eine Koagulation zu vermeiden, in zwei Polyethylenschläuche mit 0,4 mm Innendurchmesser gefüllt. Dabei wurde darauf geachtet, dass keine Luftblasen in den Schläuchen verblieben. Die Schläuche waren zuvor mit steriler Kochsalzlösung gespült worden, welche vor der Insertion der Nadeln abgelassen wurde. Anschließend wurden die Schläuche jeweils mit einer 1 ml Spritze, welche sich in einer Mikroinfusionspumpe befand und mit steriler Kochsalzlösung befüllt war, verbunden. Das andere Ende der Polyethylenschläuche



war mit den Injektionsnadeln am stereotaktischen Rahmen verbunden. Nun wurden die beiden Injektionsnadeln (26G) vorsichtig und zeitgleich um 3 mm ab der Schädelkalotte in die Ventrikel abgesenkt. Die Injektion des Blutes erfolgte bei einer Flussgeschwindigkeit von 50  $\mu$ l/min bilateral und dauerte insgesamt zwei Minuten. Die Blut-Gruppe unserer Studie erhielten demnach ein Injektionsvolumen von 100  $\mu$ l bilateral, einmalig, 24 Stunden postnatal.

### **Kochsalzlösung**

Auch hier verwendeten wir Polyethylenschläuche mit 0,4 mm Innendurchmesser. Diese wurden mit steriler isotonischer Kochsalzlösung (0,9 %) befüllt und mit den Injektionsnadeln verbunden. Es wurde darauf geachtet, dass keine Luft in den Schläuchen verblieb. Das andere Ende wurde mit 1 ml Spritzen verbunden, welche ebenfalls mit Kochsalzlösung befüllt waren und sich in einer Mikroinfusionspumpe befanden. Nun wurden die Injektionsnadeln (26G) langsam um 3 mm ab der Schädelkalotte in die Ventrikel abgesenkt. Die Applikation der Kochsalzlösung erfolgte mit einer Flussgeschwindigkeit von 50  $\mu$ l/min und dauerte zwei Minuten. Die NaCl-Gruppe unserer Studie erhielt demnach ein gesamtes Injektionsvolumen von 100  $\mu$ l bilateral, einmalig, 24 Stunden postnatal.

### **Verfahren am Ende der Injektionen**

Sowohl bei den Tieren der Blut-Gruppe als auch bei der NaCl-Gruppe wurden die Injektionsnadeln nach der Applikation noch für eine Minute belassen, um einen Rücktritt der Injektionsflüssigkeiten durch den Stichkanal zu vermeiden. Anschließend wurden die Nadeln langsam über eine Minute zurückgezogen. Die Tiere wurden aus dem stereotaktischen Rahmen ausgespannt und zum Aufwachen unter eine Rotlicht-Wärmelampe gelegt. Vor Beginn der nächsten Operation wurde das Injektionssystem mit steriler Kochsalzlösung gespült.

### **3.3.6 Schein-Operation**

Die Sham-Gruppe unserer Studie erhielt, wie die Blut- und NaCl-Gruppen auch, eine Narkose mit Isofluran, einen Hautschnitt und eine stumpfe Präparation bis zur Schädelkalotte. Es wurden keine Nadeln in den Ventrikeln platziert. Die Sham-Tiere wurden nicht in den stereotaktischen Rahmen eingespannt.

### 3.3.7 Post-Operative Versorgung

Rotlicht-Wärmelampe	
---------------------	--

Der Verschluss der Kopfwunde erfolgte entweder mit zwei Stichen nach Einzelknopfnah-Technik oder mittels Gewebekleber, während die Tiere unter der Rotlicht-Wärmelampe lagen. Um eine Unterscheidung der Tiere pro Wurf zu gewährleisten, wurden sie mit einem Permanent-Marker markiert. Jedes Tier erhielt eine Zahl von 1-9 oder einen Buchstaben (z.B. X, Y, etc.) und eine Markierung einer oder mehrerer Extremitäten (z.B. rechte Vorderpfote + linke Hinterpfote). Die jeweilige Markierung, die durchgeführte Intervention, die Interventionsdauer und die Projektnummer der Tiere (z.B. PHH 206) wurden in den Protokollen festgehalten. Sobald die Tiere adäquat auf Schmerzreize reagierten und sich spontan bewegten, wurden sie zu den Muttertieren in den Käfig zurückgelegt. Alle Neugeborenen wurden von den Muttertieren problemlos wieder akzeptiert und zum restlichen Wurf zurückgetragen.

## 3.4 Hirnentnahme und Perfusionsfixierung

### 3.4.1 Narkose

Am vorgesehenen Euthanasietag (PT1, PT3, PT7 oder PT21) wurden die Tiere mit einer Mischung aus Medetomidinhydrochlorid (0,5 µg/g Körpergewicht) und Midazolam (5,0 µg/g Körpergewicht) in eine tiefe Narkose versetzt. Die Mischung wurde subkutan appliziert. Die suffiziente Tiefe der Sedierung wurde abermals mittels dem ausgefallenen Kornealreflex und einem Schmerzreiz an dem Schwanz der Tiere sichergestellt.

### 3.4.2 Präparationsschritte

Mit einer Präparationsschere wurde eine Inzision in die Bauchwand vorgenommen. Von hier aus wurde nach kranial präpariert, bis der Brustkorb frei lag. Der Operateur eröffnete mithilfe einer Thorakotomie den Brustkorb und stellte das Herz des Tieres dar. Eine abgestumpfte 23G-Nadel (Perfusionskanüle) wurde in den Apex des linken Ventrikels eingebracht. Die Perfusionskanüle wurde an einem Infusionsschlauch

befestigt, der über einen Dreiwegehahn an eine isotone Kochsalzlösung und an einen Infusionsbehälter mit der paraformaldehydhaltigen Fixierlösung verbunden war. Zunächst wurde mit isotonischer Kochsalzlösung das intravasale Blutvolumen ersetzt. Um einen Abfluss des Blutes zu ermöglichen, wurde eine Inzision in die frei präparierte Leber vorgenommen. Etwa 3 Minuten wurde das Tier mit 0,9 % NaCl-Lösung perfundiert (Perfusionsdruck ~ 100 cm Wassersäule), bis kein Blut mehr aus der Leber austrat und die Skleren aufklärten. Im Anschluss wurde der Dreiwegehahn des Perfusionssystems auf die Fixierlösung umgestellt und das Tier für weitere drei Minuten mit dieser perfundiert, bis die Gliedmaßen versteiften. Die Fixierlösung wurde abgedreht und die Perfusionskanüle entfernt.

Aufgrund der geringen Körpergröße der PT1 und PT3 Versuchstiere erfolgte hier keine Perfusion. Stattdessen wurden die Tiere nach tiefer Sedierung mit einer Präparationsschere dekapitiert. Hiernach erfolgten die weiteren Schritte analog.

Es folgte ein Schnitt entlang der Mittellinie des Schädels und eine stumpfe Präparation bis auf den Schädelknochen. Mithilfe eines Skalpells und einer gebogenen Mikropinzette wurde der Schädelknochen entlang der Schädelnähte eröffnet und gemeinsam mit der Dura mater entfernt. Mit einem Raspatorium wurde das Gehirn vorsichtig aus dem Cranium herausgehoben, wobei die Hirnnerven und das Myelencephalon abgetrennt wurden und anschließend in ein 50 ml Eppendorfgefäß, welches mit Paraformaldehyd befüllt war, gelegt.

### **3.4.3 Nachfixierung und Einfrieren**

Im Eppendorfgefäß wurden die Gehirne für 48 Stunden bei 4 °C nachfixiert und im Anschluss in einer 20 % Saccharose-Lösung bei 4 °C für weitere 48 Stunden dehydriert, um beim Einfrieren Gefrierartefakten vorzubeugen. Daraufhin wurden die Gehirne in trockeneisgekühltem Isopentan schockgefroren, in Aluminiumfolie gewickelt und in einem Gefrierschrank, der auf -80 °C eingestellt war, aufbewahrt.

### 3.5 Histologische Aufarbeitung und Färbung

Kryostat	Leica CM1850 Kryostat; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
----------	---

Die gefrorenen Rattenhirne wurden zur Schnitthanfertigung aus dem -80 °C Gefrierschrank entnommen und in einem, auf -20 °C eingestelltes, Kryostat platziert. Die Gehirne wurden an der Basis (Hirnstamm und Cerebellum) in Kryo-Gel eingebettet, um auf den Schnittscheiben des Kryostats zu halten. Anschließend wurden die Hirne von frontal nach okzipital abgetragen bis unter dem Lichtmikroskop beide lateralen Ventrikel zu sehen waren.

Es wurden 5 µm Schnitte angefertigt. Jeweils drei Schnitte wurden nebeneinander auf einen Objektträger platziert und in Objektträgerkästen mit entsprechender Beschriftung (PHH-Nummer und Objektträgeranzahl) in einem -20 °C Gefrierschrank bis zur Färbung aufbewahrt. Die Reste der Gehirne wurden wieder in Aluminiumfolie gewickelt und zurück in den -80 °C Gefrierschrank gelegt.

#### 3.5.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Mikroskop	Axioskop 2 Plus, Zeiss, Oberkochen
-----------	------------------------------------

Um die Ventrikel- und Hemisphärengrößen der Versuchstiere zu bestimmen, wurde von jedem Tier ein Objektträger mittel Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbt. Um eine Vergleichbarkeit der Größenbestimmung zu gewährleisten, wurde vorab mit einem Lichtmikroskop eine gemeinsame Schnittebene bestimmt, die von jedem Tier vorhanden war und in welcher die Ventrikel gut zu erkennen waren. Für unsere Studie wurde diese Ebene als -0,2 mm Bregma festgelegt. Zur Bestimmung der Ebene wurde der Atlas „The Rat Brain in Stereotactic Coordinates“ von Paxinos und Watson, 2. Ausgabe, 1986, verwendet.

Die Objektträger wurden für 5 Minuten auf einer Heizplatte erwärmt und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Es folgte eine zwei-minütige Färbung mit Hämalaun (Mayer's Hämalaun; Fluka, Heidelberg) und eine 10-minütige Spülung mit Leitungswasser. Für 30 Sekunden wurden die Objektträger mit Eosin (1 %; Merck AG, Darmstadt) gefärbt, danach erfolgte die zweimalige Spülung

in 70 %-Propanol-Lösung. In einer HE-Färbung werden die sauren/basophilen Zellstrukturen, wie beispielsweise der Zellkern von Hämatoxylin blau-violett angefärbt, das Eosin färbt die basischen/azidophilen Strukturen rot-pink (z.B. Zytoplasma). Nachdem die gefärbten Schnitte durch eine aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 90 %, 100 %) entwässert wurden und zweimal 5 Minuten in Xylol (E. Merck, Darmstadt) gespült wurden, folgte die Eindeckung mit einem acrylhaltigen Mittel (EUKITT®; O. Kindler GmbH Freiburg) und einem Deckglas.

### 3.5.2 Immunhistochemische Färbungen

Primärantikörper	NeuN, Anti-NeuN Antibody (MAB377), EMD Millipore Corporation, Temecula (USA)
Primärantikörper	aCa3 - cleaved Caspase-3 (Asp175) Antibody, Cell Signaling Technology, Inc., Danvers (USA)
Primärantikörper	SMI-32, Anti-Neurofilament H Non-Phosphorylated mAb (SMI-32), Merck KGaA, 64271 Darmstadt
Normal Horse Serum	Donor Horse Serum, Cat. S9133; Biochrom GmbH, Berlin
Normal Goat Serum	Normal Goat Serum, Cat. S-1000; Vector Laboratories, INC. Burlingame CA. (USA)
Vectastain ABC Kit	Vectastain ABC Kit PK-6102, Mouse IgG; Vector Laboratories, INC. Burlingame CA. (USA)

Für diese Arbeit wurden immunhistochemische Färbungen gegen das Antigen der neuronalen Nuclei (NeuN), aktivierte Caspase 3 und gegen nicht-phosphorylierte Neurofilamente (SMI-32) angefertigt.

Hierfür wurden gefrorene 5 µm Schnitte der Rattenhirne verwendet und zunächst für 20 Minuten mit einem Dampfgerar demaskiert. Nachdem die Schnitte vollständig abgekühlt waren wurde die endogene Peroxidase mittels Methanol-PBS-Lösung (Methanol, AppliChem GmbH + Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline, Thermo Fisher Scientific Waltham) und Wasserstoffperoxid geblockt (100 ml Methanol + PBS 1:1 + 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35 %; Merck AG, Darmstadt). Die Schnitte wurden danach jeweils 5 Minuten mit PBS und PBST (Phosphate-Buffered Saline + Triton X-100; Merck AG, Darmstadt) gespült. Es folgte die Vorinkubation mit 5 % Normal Horse für NeuN und SMI-

32, bzw. 5 % Normal Goat Serum für aktivierte Caspase 3 und die anschließende Inkubation mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4 °C.

Nun wurden die Schnitte zweimal für jeweils 5 Minuten mit PBST gespült und im Anschluss mit dem Sekundärantikörper (3 Tropfen NHS + 1 Tropfen Sekundär-AK + 10 ml PBS) für 30 Minuten inkubiert. Danach folgte die Spülung mit PBST (2 x 5 Minuten) und anschließende 30-minütige Inkubation mit dem AB-Komplex (1 Tropfen A + 1 Tropfen B + 2,5 ml PBS). Es folgte eine erneute Spülung für jeweils 5 Minuten mit PBS und PBST.

Für 2-3 Minuten wurden die Schnitte mit DAB (Diaminobenzidin; DAB Peroxidase Substrate Kit, SK-4100; Vector Laboratories) gefärbt, anschließend nochmals mit PBS gewaschen und nach einer Dehydrierung durch eine aufsteigende Alkoholreihe analog zu den HE-gefärbten Schnitten eingedeckt. Die exakten Färbeprotokolle sind im Anhang dieser Arbeit zu finden.

## 3.6 Histologische Auswertung

### 3.6.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Kamera	CCD Super Color CV 950; JAI, Kopenhagen (Denmark)
Mikroskop	Axioskop 2 Plus, Zeiss, Oberkochen
Bildbeanalysesoftware	Optimas 6.51; VSG; Adept Turnkey, Perth (Australien)
Objektmikrometer	2 mm mit 0,01mm Intervallen, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar

Mithilfe eines Lichtmikroskops, welches über eine Kamera die Bildübertragung auf einen Computer erlaubte, wurden die HE-gefärbten Schnitte abfotografiert und anschließend mit der kalibrierten Bildanalysesoftware Optimas 6.51 ausgewertet. Die Ventrikel- und Hemisphärengrößen wurden in einer Excel-Tabelle notiert.

### 3.6.2 Immunhistochemische Färbungen

Objektträgerscanner	NanoZoomer 2.0HT, Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu City (Japan)
Bildbearbeitungs- software	NDP.View 2.5.19, Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu City (Japan)
Bildanalysesoftware	Image J 1.51k, National Institute of Health, Bethesda (USA)

Die Hirnschnitte wurden der Gewebe - Biobank der Universitätsmedizin Mainz (Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Mainz) zur Bearbeitung zur Verfügung gestellt. Die Scans des gesamten Objektträgers erfolgten in 20-facher Vergrößerung und wurden als ndpi-Dateien (NanoZoomer Digital Pathology Image) erstellt. Der NDP-Viewer wurde verwendet um aus den Scans TIFF-Dateien (Tagged Image File Format) anzufertigen.

Die immunreaktive Fläche (IRF) wurde mit der Bildanalysesoftware Image J bestimmt. Jeder Schnitt erhielt ein Maximum von 56 Regions Of Interest (ROI), 28 pro Hirnhälfte. Die Verteilung der ROI ergibt sich wie folgt: 5 ROI im Gyrus cinguli und angrenzenden Gyrus frontalis superior (nachfolgenden cingulärer Kortex), 5 ROI im motorischen Kortex, 5 ROI im somatosensorischen Kortex, 9 ROI im periventrikulären Striatum und 3 ROI im lateralen Septum pellucidum. Die Werte der statistischen Auswertung der immunhistochemischen Färbungen wurden in % angegeben im Sinne der immunreaktiven Fläche der einzelnen ROI.

Die Daten wurden in Excel-Tabellen (Microsoft Excel 2016; Microsoft Corporation, Redmond) notiert.

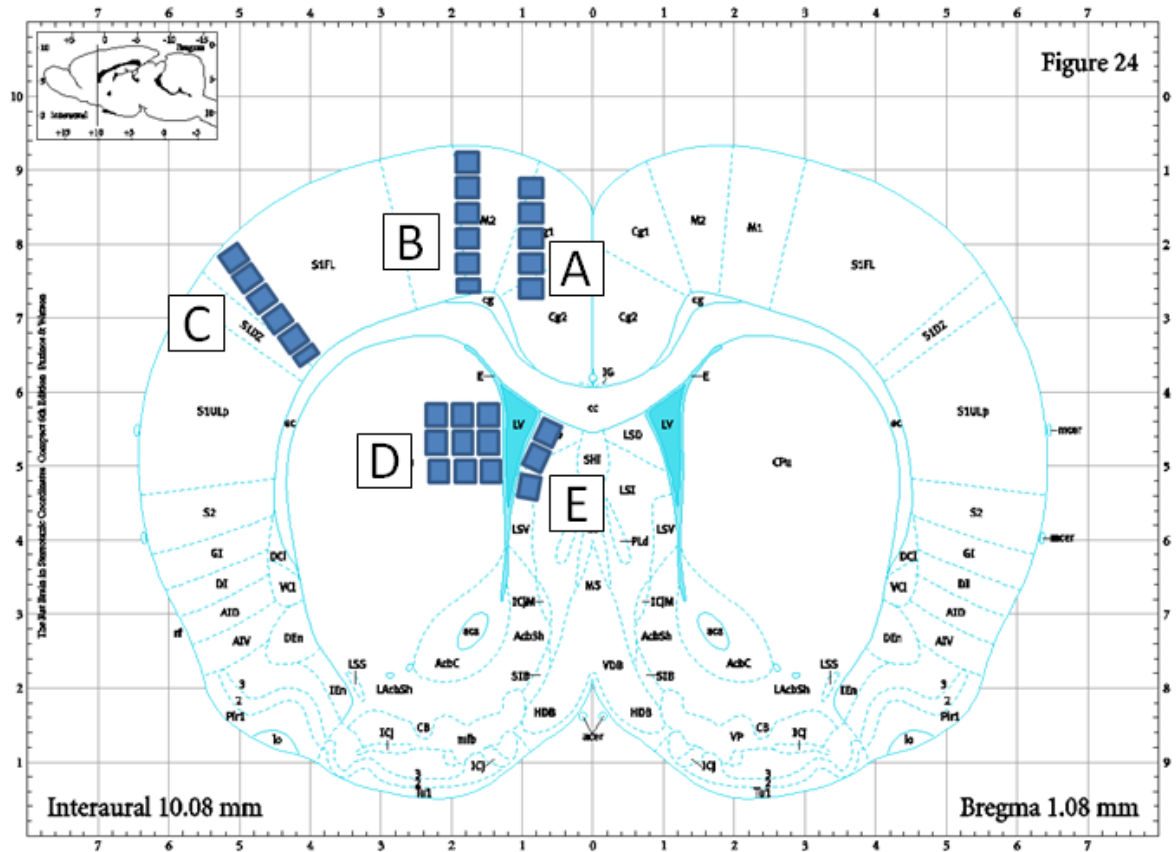


Abbildung 8 zeigt schematisch die Lokalisation und Anzahl der Regions of Interest; A: Cingulärer Kortex; B: Motorischer Kortex; C: Somatosensorischer Kortex; D: Periventriculäres Striatum; E: Laterales Septum

### 3.6.3 Bestimmung der ROI-Größen

Für die Tiere der PT21-Gruppen wurde die ROI-Größe als  $450 \mu\text{m} \times 450 \mu\text{m}$  festgelegt. Um eine Vergleichbarkeit der verschiedenen Altersgruppen untereinander herzustellen, wurde mithilfe der Mittelwerte der Hemisphärenflächen der Sham-Tiere die ROI-Größe angepasst. Der Mittelwert der Hemisphärenfläche der PT21-Sham-Tiere betrug  $42,61 \pm 9,38 \mu\text{m}^2$  ( $M \pm SD$ ), der Mittelwert der Hemisphärenfläche der PT7-Sham-Tiere ergab sich bei  $34,89 \pm 4,40 \mu\text{m}^2$  ( $M \pm SD$ ). Somit betrug die durchschnittliche Hemisphärenfläche eines PT7-Tiers 82 % ( $34,89/42,61 \mu\text{m}^2 \times 100$ ) eines PT21-Tiers. Folglich wurden die ROIs der PT7-Tiere mit einer Größe von  $370 \times 370 \mu\text{m}$  ( $450 \times 0,82 = 369$ ) festgelegt.



Analog erfolgte die Anpassung der PT3 ROIs; der Mittelwert der Hemisphärenfläche der PT3-Sham-Tiere ergab sich bei  $28,11 \pm 7,72 \mu\text{m}^2$  ( $M \pm SD$ ). Somit betrug die durchschnittliche Hemisphärenfläche eines PT3-Tiers 66 % ( $28,11/42,61 \mu\text{m}^2 \times 100$ ) eines PT21-Tiers. Folglich wurden die ROIs der PT3-Tiere mit einer Größe von  $300 \times 300 \mu\text{m}$  ( $450 \times 0,66 = 297$ ) festgelegt.

Der Mittelwert der Hemisphärenfläche der PT1-Sham-Tiere ergab sich bei  $26,09 \pm 14,79 \mu\text{m}^2$  ( $M \pm SD$ ). Somit betrug die durchschnittliche Hemisphärenfläche eines PT1-Tiers ~ 61 % ( $26,09/42,61 \mu\text{m}^2 \times 100 = 61,23\%$ ) eines PT21-Tiers. Folglich wurden die ROIs der PT1-Tiere mit einer Größe von  $275 \times 275 \mu\text{m}$  ( $450 \times 0,61 = 274,5$ ) festgelegt. (Für die einzelnen Hemisphärenflächen siehe Tabellen 3-6 im Anhang)

### 3.7 Statistische Auswertung

Datenaufbereitung	Microsoft Excel 2016; Microsoft Corporation, Redmond, Washington, (USA)
Statistische Auswertung/ Graphische Darstellungen	SigmaPlot 11.0 2009 für Windows; Systat Software Inc., Erkrath

Zur Evaluation, ob ein Hydrozephalus vorliegt, wurde von jedem Tier ein HE-gefärbter Schnitt mittels Mikroskop und Kamera abfotografiert und die Ventrikel- und Hemisphärenflächen in  $\text{mm}^2$  gemessen. Für unsere Studie wurde die Ebene -0,2 mm Bregma festgelegt. Die so bestimmten rechten und linken Ventrikelflächen wurden addiert und als Prozentsatz der Summe der rechten und linken Hemisphärenflächen angegeben, im Folgenden bezeichneten wir diesen Wert als relative Ventrikelfläche.

Hiermit konnten störende Faktoren, wie Altersunterschiede zwischen den Tieren und folglich unterschiedliche Hirngrößen oder Stauchungen des Gewebes beim Schneiden, für die Auswertung minimiert werden. Für die statistische Auswertung wurde zunächst die immunreaktive Fläche (IRF) der entsprechenden ROI der rechten und linken Hemisphäre (ROI-R und ROI-L) jeden Tiers miteinander verglichen (z.B. ROI-R 1 Blut-Gruppe PT21 Motorkortex vs. ROI-L 1 Blut-Gruppe PT21 Motorkortex).

Aufgrund des Versuchsaufbaus und der zeit- und volumenidentischen bilateralen Injektionen war hier kein Unterschied zu erwarten.

Die weitere Analyse erfolgte nach Abbildung 9, hieraus ergibt sich bei Normalverteilung der Vergleich zweier Gruppen mittels T-Test nach Student, bei nicht-parametrischen Daten mittels Mann-Whitney-U-Test. Ergebnisse mit einem p-Wert  $\leq 0,05$  wurden als lokal signifikant angesehen.

Bei fehlenden Signifikanzen über vereinzelte lokale Werte hinaus, wurden Mittelwerte (ROI-X) der ROI-R und ROI-L für die weitere Analyse ermittelt

$$\text{(z. B. } \frac{ROI-R \text{ 1 Motorkortex PHH 245} + ROI-L \text{ 1 Motorkortex PHH 245}}{2} = ROI -$$

*X 1 Motorkortex PHH 245*). Es folgte der Vergleich der ROI-X, aufgeteilt nach Intervention und Posttrauma-Tag untereinander (z.B. ROI-X 1 Motorkortex Blut-Gruppe PT21 vs. ROI-X 2 Motorkortex Blut-Gruppe PT21 vs. ROI-X 3 Motorkortex Blut-Gruppe PT21 etc.). Dies geschah, um einen Zusammenhang zwischen dem Zell- bzw. Axonschaden und der Entfernung des ROI zum Ventrikel zu quantifizieren. Zeigte sich hier erneut kein signifikanter Unterschied wurde ein Mittelwert für die Region (ROI-XR) gebildet und für die weitere Statistik verwendet.

Analog zu Abbildung 9 erfolgte bei Normalverteilung und Varianzenhomogenität der Vergleich mehrerer Gruppen mit einer einfaktoriellem Varianzanalyse (One-Way ANOVA). Bei Fehlen dieser Eingangskriterien erfolgte ein Rangsummentest nach Kruskal-Wallis. Bei einer Diskrepanz wurde mittels Post-hoc-Test geprüft, welche der eingegebenen Gruppen sich voneinander unterschieden. Dabei wurden die Gruppenwerte entweder mit einer Kontrolle (Dunn's Test) oder, bei gleicher Anzahl der eingebenden Werte, paarweise (Student-Newman-Keuls Test) miteinander verglichen.

In Folge dessen erfolgte der Gruppenvergleich (Blut-, NaCl- und Sham-Gruppe) aufgeteilt nach ROI und Posttrauma-Tag, um Abweichungen in der Stärke der Expression der immunhistochemischen Marker festzustellen. Dies erfolgte analog zum oben beschriebenen Vorgehen mittels One-Way ANOVA oder Kruskal-Wallis Rangsummentest.

Anhand der relativen Ventrikelflächen erfolgte die Aufteilung der Tiere der Blut-, NaCl- und Sham-Gruppen in Tiere mit posthämorrhagischer ventrikulärer Dilatation (PHVD) und Nicht-PHVD-Tiere. Bei Tieren der Altersgruppen PT1 und PT3 bezeichneten wir eine ventrikuläre Vergrößerung als posthämorrhagische

ventrikuläre Dilatation (PHVD) im Sinne einer akuten Volumenbelastung, da zu diesem frühen Zeitpunkt noch nicht von einer dauerhaften Schädigung ausgegangen werden konnte. Bei den Altersgruppen PT7 und PT21 wurde eine ventrikuläre Dilatation als posthämorrhagischer Hydrozephalus (PHH) gewertet.

Die Untergruppen PHVD/PHH vs. Nicht-PHVD/-PHH wurden mittels T-Test bzw. Mann-Whitney-U-Test verglichen.

Um einen Zusammenhang zwischen der Ventrikelgröße und der Intensität der Expression der immunhistochemischen Marker festzustellen, erhoben wir für jede immunhistochemische Färbung und Untergruppe, aufgeteilt nach Intervention (Blut, NaCl, Sham) und Posttrauma-Tag (PT1, PT3, PT7, PT21), den Spearman-Korrelations-Koeffizienten.

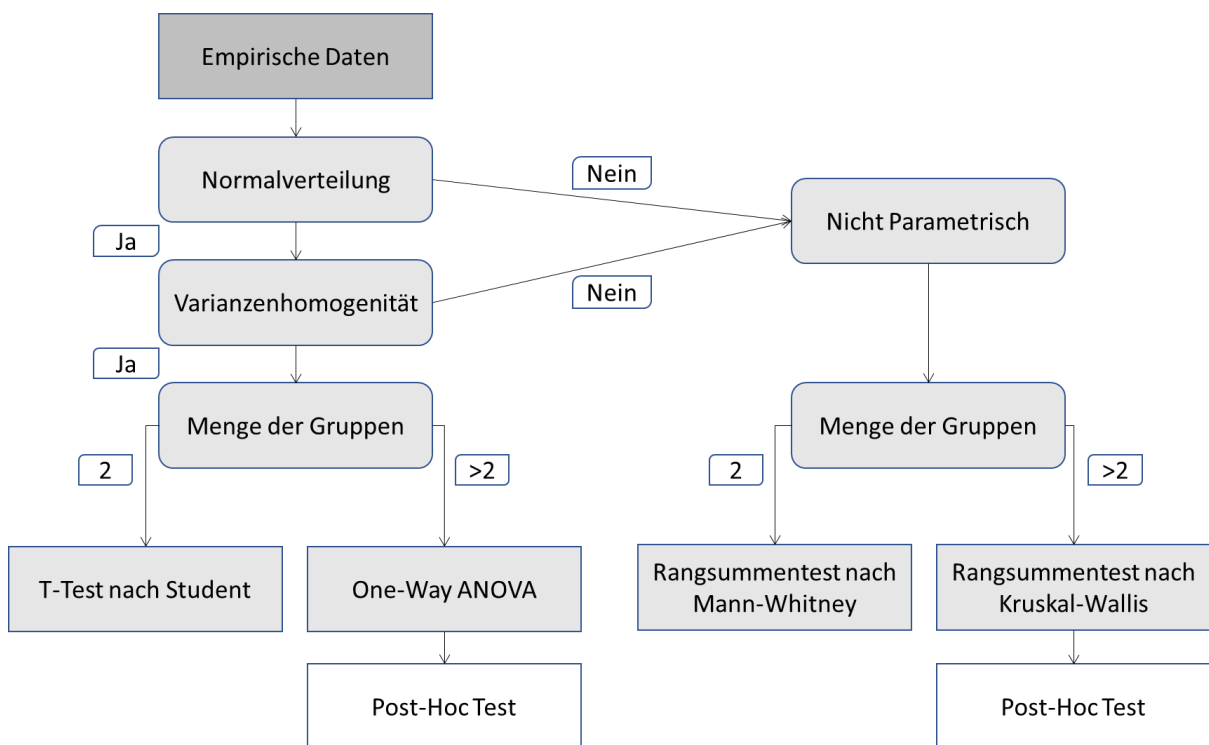


Abbildung 9 zeigt den Algorithmus der statistischen Auswertung. Adaptiert von Sachs, 1993

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Ventrikel-/ Hemisphärengröße

#### 4.1.1 Relative Ventrikelfläche

Die Tiere in dieser Studie erhielten bilaterale ventrikuläre Injektionen mit Blut oder Kochsalzlösung. Hirnschnitte der Ebene -0,2 mm Bregma (okzipital) lagen von allen Tieren vor und wurden so, zur Vergleichbarkeit der Ergebnisse, zum Ausmessen der Ventrikel- und Hemisphärenflächen verwendet.

Anschließend wurde geprüft, ob die Flächen der lateralen Ventrikel sowie die Hemisphärenflächen der beiden Seiten sich in ihrer Größe unterscheiden. Ein Wert von  $p < 0,05$  wurde als signifikant gewertet.

	Blut		NaCl		Sham	
	Rechts	Links	Rechts	Links	Rechts	Links
<b>PT1</b>	1,10	0,99	1,04	0,92	0,92	0,64
<b>PT3</b>	0,82	0,86	0,64	0,72	0,68	0,53
<b>PT7</b>	0,51	0,56	1,14	1,16	0,76	0,58
<b>PT21</b>	3,49	3,99	1,18	1,04	1,06	1,12

*Tabelle 1 zeigt die Mittelwerte der Ventrikelflächen in mm<sup>2</sup> der Versuchsgruppen nach Überlebenszeitpunkt. Ein Wert von  $p < 0,05$  wurde als signifikant gewertet, es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der rechten und linken Hirnhälfte.*

	Blut		NaCl		Sham	
	Rechts	Links	Rechts	Links	Rechts	Links
<b>PT1</b>	20,55	21,24	26,10	25,90	25,93	26,26
<b>PT3</b>	28,68	28,50	31,23	32,06	27,51	27,02
<b>PT7</b>	38,41	37,18	40,73	41,92	35,55	34,12
<b>PT21</b>	42,46	43,61	43,12	43,28	44,81	44,86

*Tabelle 2 zeigt die Mittelwerte der Hemisphärenflächen in mm<sup>2</sup> der Versuchsgruppen nach Überlebenszeitpunkt. Ein Wert von  $p < 0,05$  wurde als signifikant gewertet, es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der rechten und linken Hirnhälfte.*

In keiner Versuchsgruppe ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Hemisphären und den beiden Ventrikeln (Rechter vs. Linker Ventrikel: Blut (n = 36)  $p = 0,897$ , NaCl (n = 32)  $p = 0,707$ , Sham (n = 32)  $p = 0,667$ ; Rechte vs. Linke

Hemisphäre: Blut (n = 36) p = 0,977, NaCl (n = 32) p = 0,667, Sham (n = 34) p = 0,928). Daher wurde für die weiteren Analysen eine Summe der rechten und linken Ventrikelflächen (mm<sup>2</sup>) als Prozentsatz der Summe beider Hemisphärenflächen (mm<sup>2</sup>) für jedes Studientier gebildet. Dieser Wert wurde im Weiteren als relative Ventrikelfläche bezeichnet und in % angegeben.

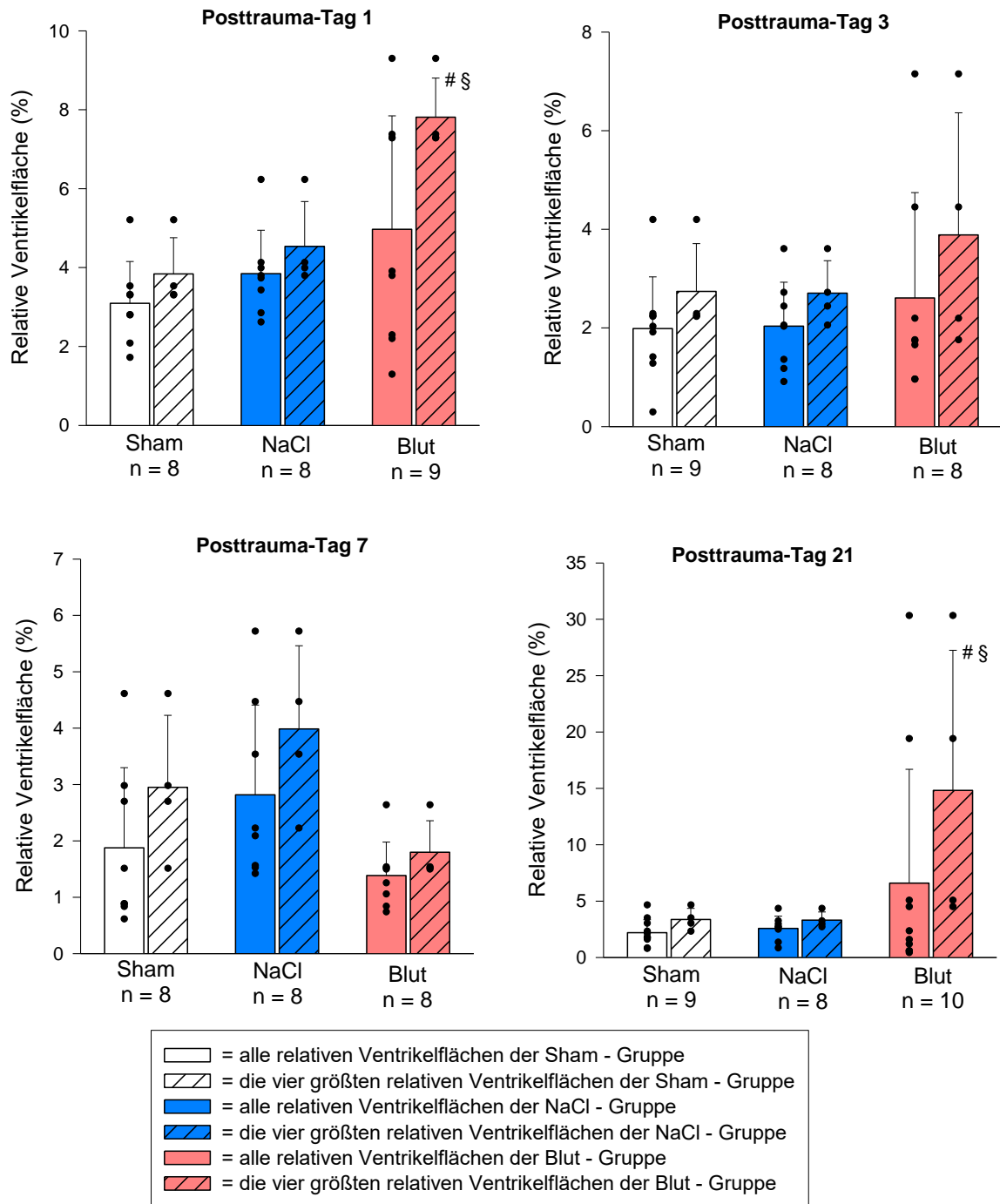
Aufgrund eines Gefrierschadens an der linken Hemisphäre des Sham-Tier PHH 209 konnten die Werte nicht verwendet werden, sodass wir stellvertretend für dieses Tier nur die Werte der rechten Hemisphäre verwendeten.

#### **4.1.2 Schwellenwert der posthämorrhagischen ventrikulären Dilatation**

Bei der Analyse der relativen Ventrikelflächen zeigten sich bei den Posttrauma-Tagen 1 und 21, aber nicht PT3 und PT7, zum Teil stark dilatierte Seitenventrikel. Der statistische Gruppenvergleich der relativen Ventrikelflächen innerhalb der einzelnen Überlebenszeitpunkte zeigte keine signifikanten Unterschiede (PT1: p = 0,209; PT3: p = 0,991; PT7: p = 0,069; PT21: p = 0,913). Die Anzahl der Tiere mit deutlich vergrößerten Ventrikeln war gering. Um eine dichotomische Einteilung in Subgruppen mit oder ohne vergrößerten Ventrikel zu erhalten, verglichen wir statistisch die jeweils vier größten relativen Ventrikelflächen jeder Behandlungsgruppe innerhalb der Überlebenszeiten miteinander.

Diese statistische Auswertung ergab bei PT1 und PT21 signifikante Unterschiede zwischen der Blut-Gruppe gegenüber der NaCl- und Sham-Gruppe (PT1: p = 0,002; PT21: p = 0,026). An den beiden anderen Posttrauma-Tagen (PT3 und PT7) zeigte der Vergleich der vier größten relativen Ventrikelflächen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen.

## Relative Ventrikelfläche<sup>1</sup> pro Hirnschnitt



Statistische Analyse mittels Kruskal-Wallis Test mit intraindividuellen Vergleichen durch den Student-Newman-Keuls Test.

\* =  $P < 0,05$  zwischen allen relativen Ventrikelflächen und den vier größten relativen Ventrikelflächen innerhalb einer Interventionsgruppe

# =  $P < 0,05$  zwischen der Sham-Gruppe und den IVH-Gruppen (NaCl und Blut)

§ =  $P < 0,05$  zwischen den IVH-Gruppen (NaCl und Blut)

<sup>1</sup>Relative Ventrikelfläche = Gesamte Ventrikelfläche in  $\text{mm}^2$  / gesamte Hirnfläche in  $\text{mm}^2$

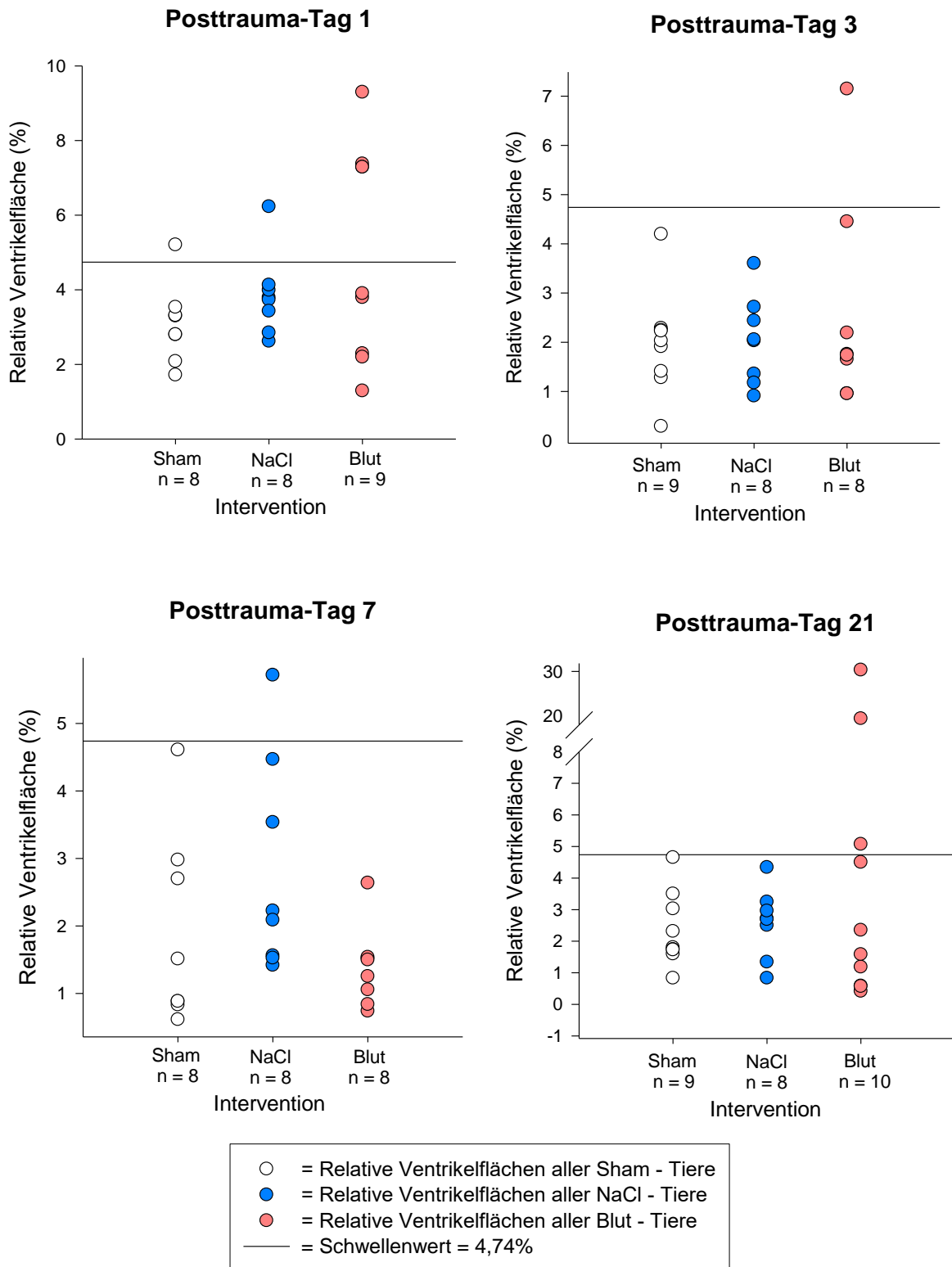
Abbildung 10 Relative Ventrikelfläche in %; Vergleich der jeweils vier größten relativen Ventrikelflächen vs. die restlichen relativen Ventrikelflächen. Signifikanzen ergaben sich an PT1 und PT21 im Vergleich der vier größten relativen Ventrikelflächen jeder Behandlungsgruppe (PT1:  $p = 0,002$ ; PT21:  $p = 0,026$ )

Die Ergebnisse veranschaulichen, dass nicht jedes Blut-Tier und NaCl-Tier nach Injektion einen Hydrozephalus entwickelt hat. Die Darstellung der relativen Ventrikelflächen als vertikale Punktwolke in Abbildung 11 deutet auf einen möglichen Schwellenwert bei 4,74 % relativer Ventrikelfläche bzgl. PHVD oder PHH hin.

Wir versuchten einen Schwellenwert statistisch festzulegen, oberhalb welchem die Ventrikelgrößen als PVHD und PHH gewertet werden konnten. Der Schwellenwert wurde definiert als der Mittelwert aller relativen Ventrikelflächen der Sham-Tiere plus zwei Standardabweichungen. Bei einer durchschnittlichen relativen Ventrikelfläche von 2,29 % und einer Standardabweichung von 1,223 % ergab sich ein Schwellenwert von 4,74 % ( $2,29 \% + 2 \times 1,223 \% = 4,7409 \%$ ) (Tabelle 7 im Anhang).

Aufgrund dieses Schwellenwerts definierten wir drei Tiere der PT1, ein Tier der PT3 und drei Tiere der PT21 Blut-Gruppe mit PVHD oder PHH. In der NaCl-Gruppe befanden sich jeweils ein Tier der PT1 und PT7 mit den relativen Ventrikelflächen oberhalb des definierten Schwellenwertes. Ferner lag ein Sham-Tier von PT1 mit seiner relativen Ventrikelfläche oberhalb des Schwellenwerts.

# Schwellenwert der relativen Ventrikelflächen<sup>1</sup>



<sup>1</sup>Relative Ventrikelfläche = Gesamte Ventrikelfläche in mm<sup>2</sup>/ gesamte Hirnfläche in mm<sup>2</sup>

Abbildung 11 Schwellenwert der relativen Ventrikelflächen (4,74%) der jeweiligen Posttrauma-Gruppen.



#### **4.1.3 Postinterventionelle ventrikuläre Dilatation und Kortexdicke**

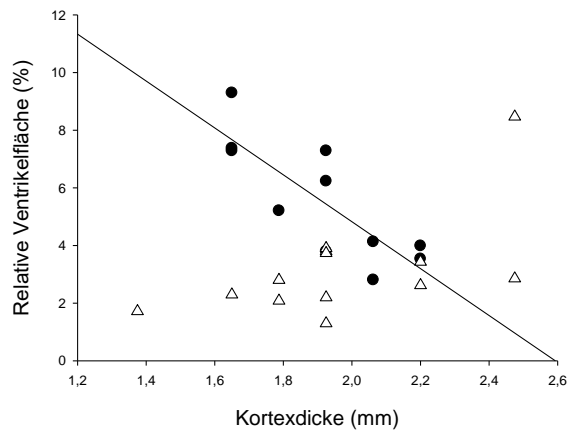
Durch den erhöhten intrazerebralen Druck kommt es aufgrund des noch flexiblen Hirnschädels zur Vergrößerung des Kopfes bei Frühgeborenen, sodass es von Interesse ist zu evaluieren, ob es zu einer Reduktion der Kortexdicke z.T. durch Zelluntergang kommt. Dies ist bei menschlichen Gehirnen mit Hydrozephalus, welche post mortem untersucht wurden, der Fall. Es scheinen vornehmlich die periventrikuläre weiße Hirnsubstanz und Axone Schaden zu nehmen (Del Bigio and Zhang, 1998).

Für alle Interventionsgruppen kollektiv (Blut, NaCl und Sham) und separat auch für die vier größten relativen Ventrikelflächen der Interventionsgruppen berechneten wir deshalb den Korrelationskoeffizienten zwischen der relativen Ventrikelfläche und der Kortexdicke.

Unsere Ergebnisse zeigten eine signifikante, negative Korrelation zwischen ansteigender relativer Ventrikelfläche und abnehmender Kortexdicke im somatosensorischen Kortex der PT1 Tiere, sowie im cingulären und motorischen Kortex der PT21 Tiere, wenn die vier größten relativen Ventrikelflächen jeder Gruppe (Blut, NaCl und Sham) gewertet wurden.

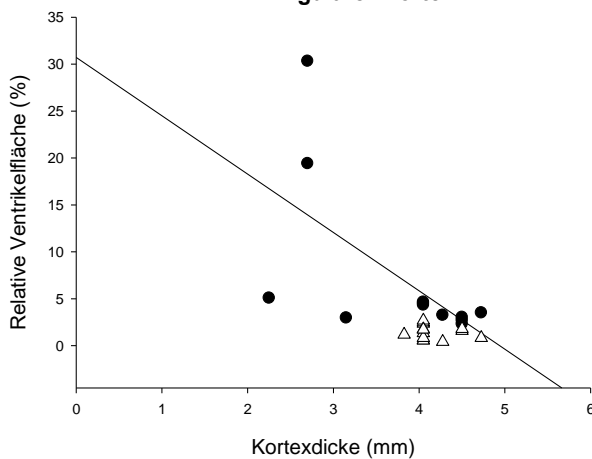
## Korrelation der relativen Ventrikelfläche<sup>1</sup> und Kortexdicke<sup>2</sup>

### PT1 - Somatosensorischer Kortex



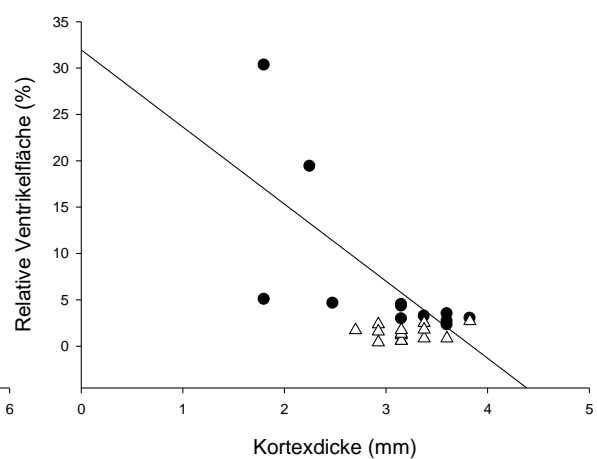
Rsqr = 0,664      Spearman Korrelationskoeffizient = -0,837  
 P = 0,002        P = 0,000000200

### PT21 - Cingulärer Kortex



Rsqr = 0,377      Spearman Korrelationskoeffizient = -0,721  
 P = 0,034        P = 0,00707

### PT21 - Motorischer Kortex



Rsqr = 0,480      Spearman Korrelationskoeffizient = -0,846  
 P = 0,013        P = 0,000000200

- = die jeweils 4 größten relativen Ventrikelflächen Blut, NaCl und Sham (n = 12)
- = Regressionskurve der 4 größten Ventrikelflächen
- △ = die restlichen relativen Ventrikelflächen Blut, NaCl und Sham

<sup>1</sup>Relative Ventrikelfläche = Gesamte Ventrikelfläche in mm<sup>2</sup>/ gesamte Hirnfläche in mm<sup>2</sup>

<sup>2</sup>Kortexdicke: errechnet als Summe der beidseitigen ROI Anzahl.

Abbildung 12 zeigt die signifikanten Spearman Korrelationen zwischen der relativen Ventrikelfläche und Kortexdicke. (PT1 - somatosensorischer Kortex: Korrelationskoeffizient = -0,837, p = 0,000000200; PT21 - cingulärer Kortex: Korrelationskoeffizient = -0,721, p = 0,00707; PT21 - motorischer Kortex: Korrelationskoeffizient = -0,846, p = 0,000000200)

## 4.2 Immunhistochemische Auswertungen

Als ersten Schritt führten wir einen Vergleich der immunreaktiven Fläche (IRF) zwischen den Regions of Interest (ROI) der rechten und linken Hemisphären (ROI-R und ROI-L) durch, um festzustellen, ob die bilaterale, intraventrikuläre Blut- oder NaCl-Injektion beidseitig denselben Effekt ausgelöst hat. In den Auswertungen von NeuN und Caspase 3 zeigten sich keinerlei Unterschiede, sodass im weiteren Verlauf der Mittelwert (ROI-M) der IRF beider Hemisphären gebildet wurde. Im Anschluss erfolgte der Vergleich der ROI je Region untereinander, um einen möglichen Einfluss der Distanz vom Ventrikel auf die verschiedenen Färbungen herauszuarbeiten. Dann wurde ein Mittelwert für jede Region gebildet (z.B. ROI-XR motorischer Kortex PHH 245) und für die weitere Statistik verwendet.

Im Seitenvergleich von SMI-32 zeigte sich an PT1 die rechte Hemisphäre des periventrikulären Striatum in ROI 4 und ROI-Mean der Sham-Gruppe stärker gefärbt als die linksseitige (PT1 – periventrikuläres Striatum - Sham: ROI 4  $p = 0,004$ ; ROI-Mean  $p = 0,008$ ), zudem zeigte sich an PT3 in der NaCl- und Sham-Gruppe der rechte motorische Kortex in ROI 2 und ROI-Mean signifikant stärker gefärbt als der linksseitige (PT3 – motorischer Kortex - NaCl: ROI 2  $p = 0,002$ ; ROI-Mean  $p = 0,007$ ; PT3 – motorischer Kortex - Sham: ROI 2  $p = 0,001$ ; ROI-Mean  $p = 0,007$ ). In den immunhistochemisch gefärbten Hirnschnitten dieser Auswertungen zeigten sich häufig Einfrierungsartefakte (Risse) und eine ungleiche Verteilung der Färbung über den gesamten Schnitt. Es wurde daher, ebenso aufgrund der geringen Anzahl der Signifikanzen (PT1 - periventrikuläres Striatum - Sham: 2/33; PT3 – motorischer Kortex – NaCl: 2/33; PT3 – motorischer Kortex – Sham: 2/33), nicht von einem Unterschied in der Expression von SMI-32 ausgegangen, sondern von einem methodischen Fehler. Auch hier wurden die Mittelwerte der ROI, analog zu oben beschriebenem Vorgehen, gebildet.

#### **4.2.1 NeuN**

Im Vergleich der einzelnen ROI der jeweiligen Region untereinander (getrennt nach Posttrauma-Tagen) zeigte sich bei PT1 und PT3 eine signifikant geringere IRF der Ventrikel-nahen ROI (insbesondere ROI 1 und ROI 2) des motorischen und somatosensorischen Kortex. Dies zeigte sich über alle Versuchsgruppen gleichermaßen.

Bei PT7 zeigte sich diese Verteilung in der NaCl-Gruppe und im somatosensorischen Kortex der Blut-Gruppe. Die PT21 Statistik zeigte diese Verteilung lediglich in der Sham-Gruppe im cingulären, motorischen und somatosensorischen Kortex.

Im separaten Vergleich der Versuchsgruppen nach ROI ergab sich eine signifikant stärkere IRF von ROI 2 des motorischen Kortex der PT1 Sham-Gruppe und ROI 5 der PT21 Sham-Gruppe gegenüber der jeweiligen Blut- und NaCl-Gruppen. Zudem eine signifikant schwächere IRF von ROI 6 des cingulären Kortex der PT21 NaCl-Gruppe gegenüber der Sham- und Blut-Gruppe.

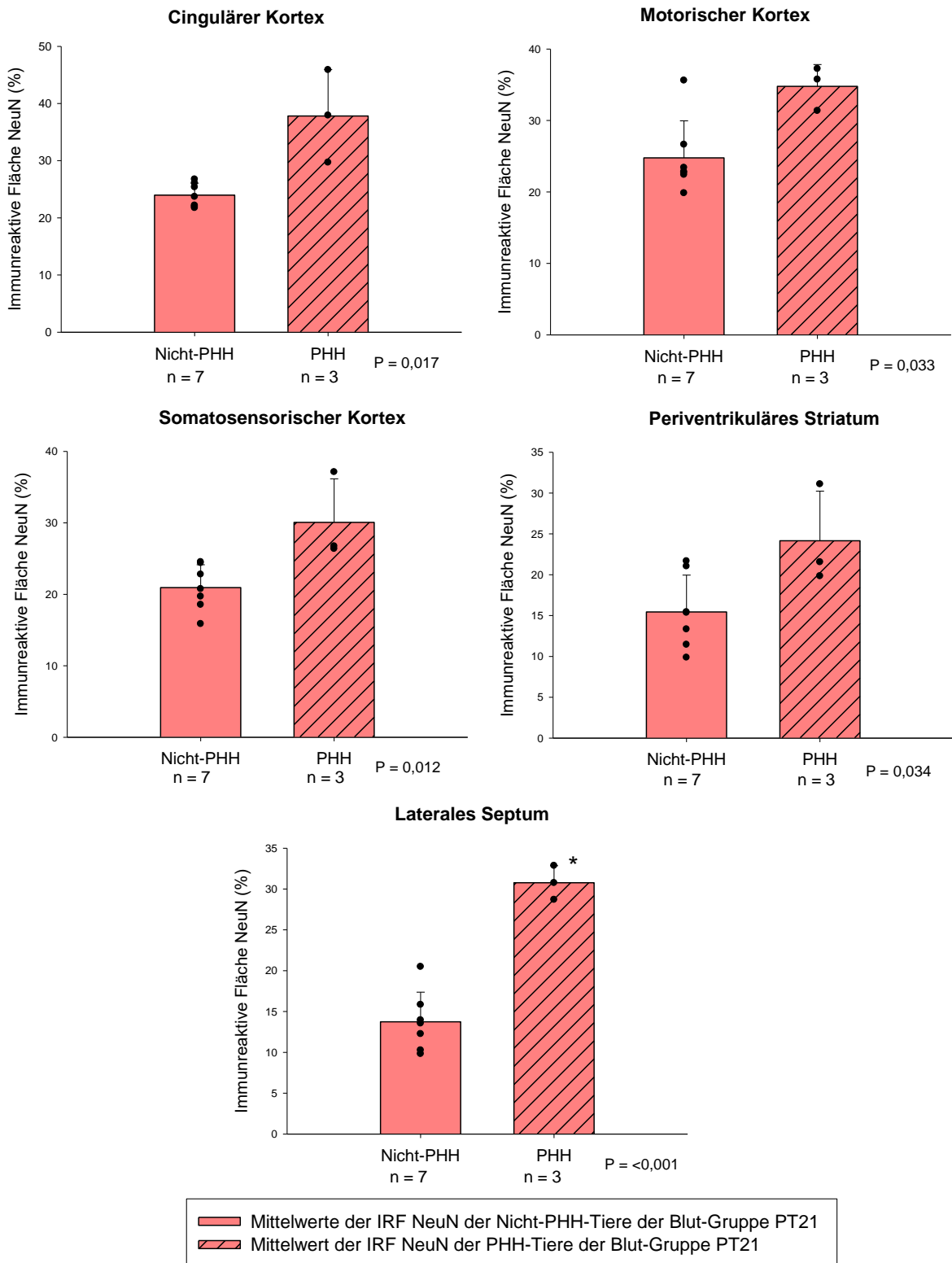
#### **Vergleich der IRF der PHVD/PHH- und Nicht-PHVD/-PHH-Tiere**

Der Schwellenwert bei 4,74% relativer Ventrikelfläche, der eine pathologische Vergrößerung der Ventrikelräume darstellt, legte bei PT1 und PT21 jeweils drei Tiere mit einer posthämorrhagischen ventrikulären Dilatation bzw. einem posthämorrhagischen Hydrozephalus fest. An den PT-Tagen 3 und 7 hatte keines der Tiere pathologisch vergrößerte Ventrikel. Wir betrachteten im nächsten Schritt der statistischen Analyse diese drei PHVD/PHH-Tiere gegenüber den Nicht-PHVD/-PHH-Tieren (PT1 n = 6; PT21 n = 7) der Blut-Gruppen PT1 und PT21.

An PT1 zeigten sich keinerlei Signifikanzen oder Tendenzen.

Bei PT21 zeigte sich die Tendenz einer zunehmenden IRF für NeuN der PHH-Tiere (cingulärer Kortex  $p = 0,017$ ; motorischer Kortex  $p = 0,033$ ; somatosensorischer Kortex  $p = 0,012$ ; periventrikuläres Striatum  $p = 0,034$ ; laterales Septum  $p < 0,001$ ). In der Region des lateralen Septums ergab sich eine signifikant stärkere IRF (PHH:  $M = 30,77$ ,  $SD = 1,7$ ; Nicht-PHH:  $M = 13,74$ ,  $SD = 3,37$ ).

Immunreaktive Fläche NeuN der Blut-Gruppe PT21  
Nicht-PHH-Tiere gegen PHH-Tiere



\* = P < 0,05; Signifikanz zwischen den Mittelwerten der PHH- und Nicht-PHH-Tieren

Abbildung 13 Immunreaktive Fläche NeuN der Blut-Gruppe PT21; Nicht-PHH-Tiere gegen PHH-Tiere. (cingulärer Kortex  $p = 0,017$ ; motorischer Kortex  $p = 0,033$ ; somatosensorischer Kortex  $p = 0,012$ ; periventriculäres Striatum  $p = 0,034$ ; laterales Septum  $p < 0,001$ ), die Darstellungen zeigten die Mittelwerte  $M$  und die Standardabweichung  $SD$ . In der Region des lateralen Septums ergab sich eine signifikant stärkere IRF der PHH-Tiere (PHH:  $M = 30,77$ ,  $SD = 1,7$ ; Nicht-PHH:  $M = 13,74$ ,  $SD = 3,37$ ).

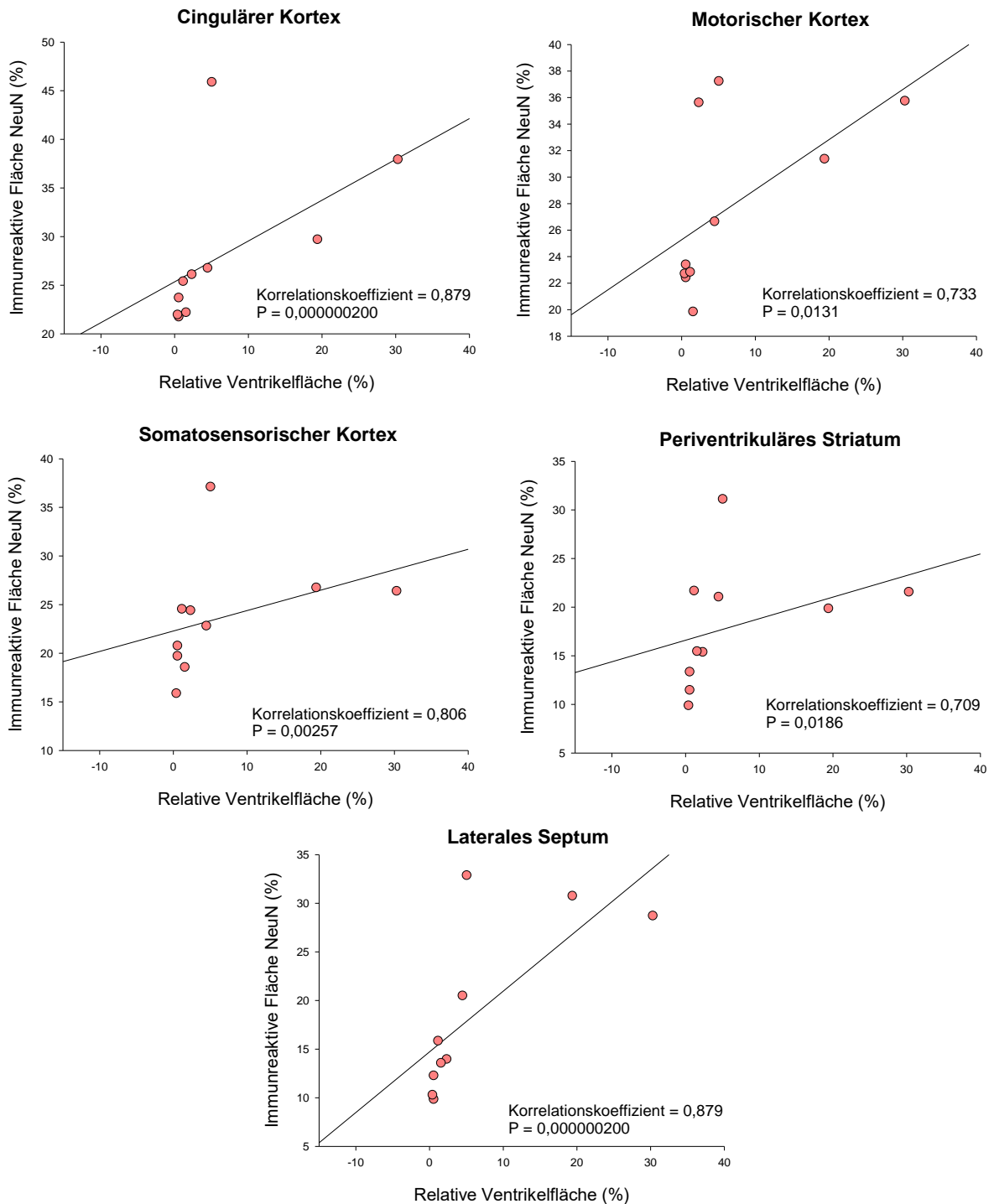
## **Korrelation zwischen der IRF und der relativen Ventrikelfläche**

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der relativen Ventrikelfläche und der NeuN-IRF festzustellen, erhoben wir für jede Versuchsgruppe und Posttrauma-Tage den Spearman-Korrelations-Koeffizienten.

Vereinzelt ergaben sich Tendenzen einer negativen Korrelation zwischen NeuN-IRF und relativer Ventrikelfläche bei den NaCl- und Sham-Gruppen (PT1 - somatosensorischer Kortex – Sham: Korrelationskoeffizient: -0,786,  $p = 0,0149$ ; PT1 – laterales Septum – NaCl: Korrelationskoeffizient: -0,714,  $p = 0,0374$ ; PT3 – motorischer Kortex – NaCl: Korrelationskoeffizient: -0,714,  $p = 0,0374$ ; PT3 – laterales Septum – NaCl: Korrelationskoeffizient: -0,714,  $p = 0,0374$ ; PT7 – periventrikuläres Striatum – NaCl: Korrelationskoeffizient: -0,69,  $p = 0,0474$ ).

Zum Zeitpunkt PT21 zeigte sich durchweg eine Tendenz für eine positive Korrelation zwischen NeuN-IRF und relativer Ventrikelfläche über alle ROI Regionen der Blut-Gruppe. Die Spearman-Korrelations-Koeffizienten des cingulären und somatosensorischen Kortex sowie des lateralen Septums waren signifikant ( $p < 0,01$ ). An den anderen Posttrauma-Zeitpunkten zeigte sich dies nicht.

## Korrelation der immunreaktiven Fläche und relativen Ventrikelgröße<sup>1</sup> Blut-Gruppe - NeuN - PT21



● Immunreaktive Fläche vs. relative Ventrikelgröße - Blut-Gruppe - NeuN - PT21 (n = 10)  
— Regressionsgeraden der immunreaktiven Fläche vs. relativen Ventrikelgröße PT21

<sup>1</sup> Relative Ventrikelgröße = Gesamte Ventrikelgröße in mm<sup>2</sup> / gesamte Hirnfläche in mm<sup>2</sup>

Abbildung 14 Korrelation zwischen der immunreaktiven Fläche von NeuN und der relativen Ventrikelgröße für die Blut-Gruppe – PT21. (cingulärer Kortex Korrelationskoeffizient (KK) = 0,879, p = 0,0000002; motorischer Kortex KK = 0,733, p = 0,0131; somatosensorischer Kortex KK = 0,806, p = 0,00257; periventriculäres Striatum KK = 0,709, p = 0,0186; laterales Septum KK = 0,879, p = 0,0000002)

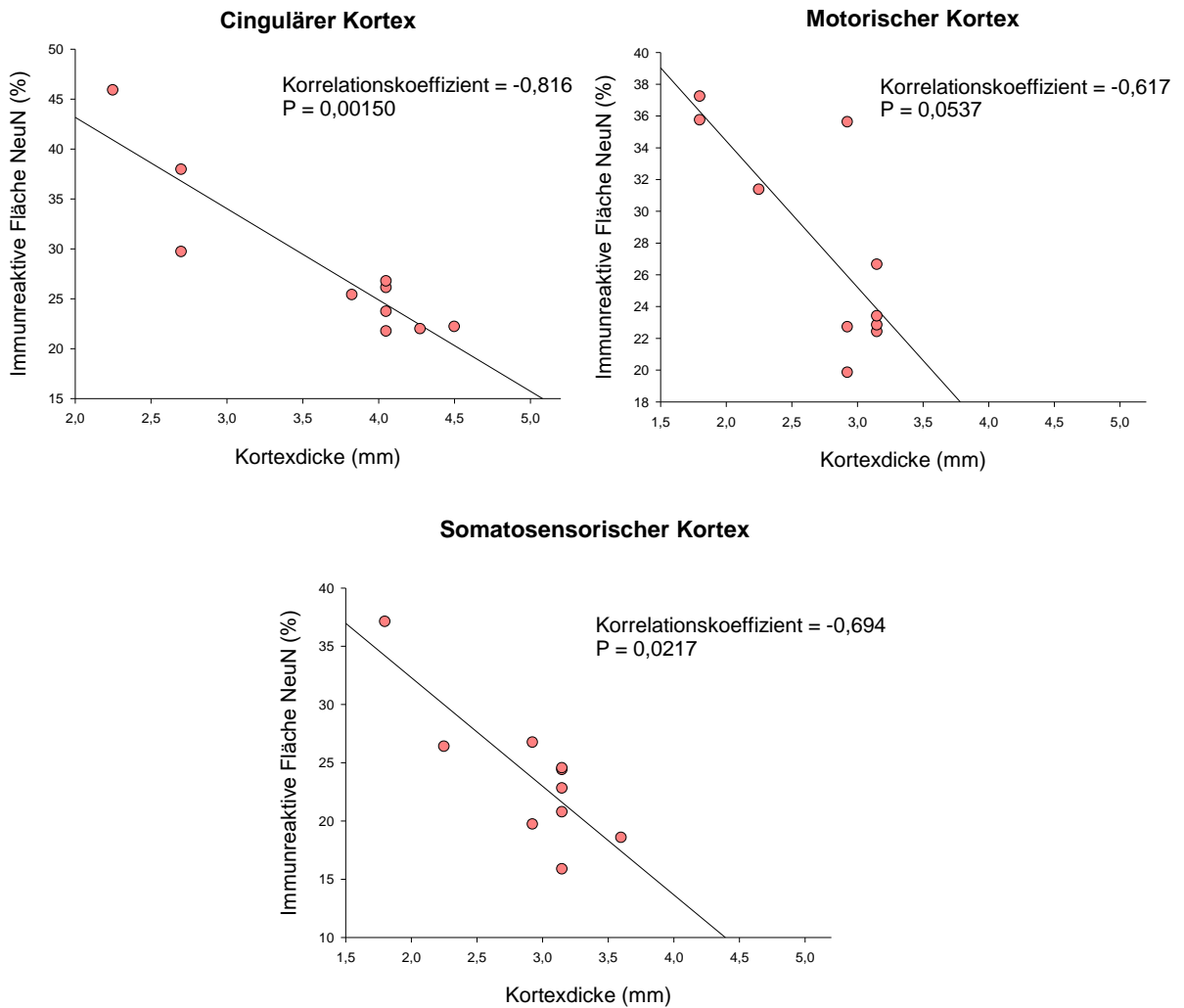
### **Korrelation zwischen der IRF und der Kortexdicke**

Bei der Blut-Gruppe PT21 zeigte sich eine Tendenz für eine negative Korrelation zwischen der Kortexdicke und der NeuN-IRF. Diese Tendenz präsentierte sich im cingulären, motorischen und somatosensorische Kortex. Der Korrelationskoeffizient des cingulären Kortex zeigte sich signifikant. (PT21 – cingulärer Kortex – Blut: Korrelationskoeffizient = -0,816,  $p = 0,0015$ ; PT21 – motorischer Kortex – Blut: Korrelationskoeffizient = -0,617,  $p = 0,0537$ ; PT21 – somatosensorischer Kortex – Blut: Korrelationskoeffizient = -0,694,  $p = 0,0217$ ).

Zudem zeichnete sich dieselbe Tendenz in der PT21 NaCl-Gruppe ab, hier jedoch lediglich in der Auswertung des cingulären Kortex (PT21 - cingulärer Kortex – NaCl: Korrelationskoeffizient: -0,736,  $p = 0,0287$ ) (siehe Abbildung 28 im Anhang).



## Korrelation der immunreaktiven Fläche und Kortexdicke<sup>1</sup> Blut-Gruppe - NeuN - PT21



<sup>1</sup>Kortexdicke = errechnet als Summe der beidseitigen ROI Anzahl.

Abbildung 15 Korrelation der immunreaktiven Fläche NeuN und Kortexdicke; Blut-Gruppe - PT21. (cingulärer Kortex – Blut: Korrelationskoeffizient (KK) = -0,816, p = 0,0015; motorischer Kortex – Blut: KK = -0,617, p = 0,0537; somatosensorischer Kortex – Blut: KK = -0,694, p = 0,0217)

#### 4.2.2 Zellzählung cingulärer und motorischer Kortex der PT21 Tiere

Um die Verdichtungstheorie der neuronalen Somata weiter zu evaluieren, erfolgte eine Zellzählung anhand der NeuN-Färbungen der PT21 Tiere der Blut-, NaCl- und der Sham-Gruppe. Aufgrund des Vorhandenseins des cingulären und motorischen Kortex ROI 2 (ROI 2-R und ROI 2-L) bei jedem Tier, wurden diese ausgewählt, um die Zellzählung durchzuführen. Wie zuvor bereits beschrieben erfolgte zunächst der Vergleich der rechten und linken ROI 2 gegeneinander, hier ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in den beiden Hemisphären (ROI 2-R vs. ROI 2-L cingulärer Kortex PT21 Blut  $p = 0,870$ ; ROI 2-R vs. ROI 2-L motorischer Kortex PT21 Blut  $p = 1,000$ ; ROI 2-R vs. ROI 2-L cingulärer Kortex PT21 NaCl  $p = 0,285$ ; ROI 2-R vs. ROI 2-L motorischer Kortex PT21 NaCl  $p = 0,878$ ; ROI 2-R vs. ROI 2-L cingulärer Kortex PT21 Sham  $p = 0,990$ ; ROI 2-R vs. ROI 2-L motorischer Kortex PT21 Sham  $p = 0,800$ ), sodass ein Mittelwert der beiden Hemisphären gebildet wurde (ROI 2-M) (siehe Tabelle 8 im Anhang).

Im Vergleich der PT21 Blut-, NaCl- und Sham-Gruppe ergab die Zellzählung zudem keine signifikanten Unterschiede (Blut vs. NaCl vs. Sham ROI 2-M cingulärer Kortex PT21  $p = 0,378$ ; Blut vs. NaCl vs. Sham ROI 2-M motorischer Kortex PT21  $p = 0,224$ ).

In der Analyse der PHH- vs. der Nicht-PHH-Tiere zeigte sich ein nicht-signifikanter Trend zu einer höheren Zellzahl in den Gehirnen mit PHH (PHH vs. Nicht-PHH ROI 2-M cingulärer Kortex PT21 Blut  $p = 0,037$ ; PHH vs. Nicht-PHH ROI 2-M motorischer Kortex PT21 Blut  $p = 0,011$ ).

Zellzahlen der Blut-Gruppe PT21  
Nicht-PHH-Tiere gegen PHH-Tiere

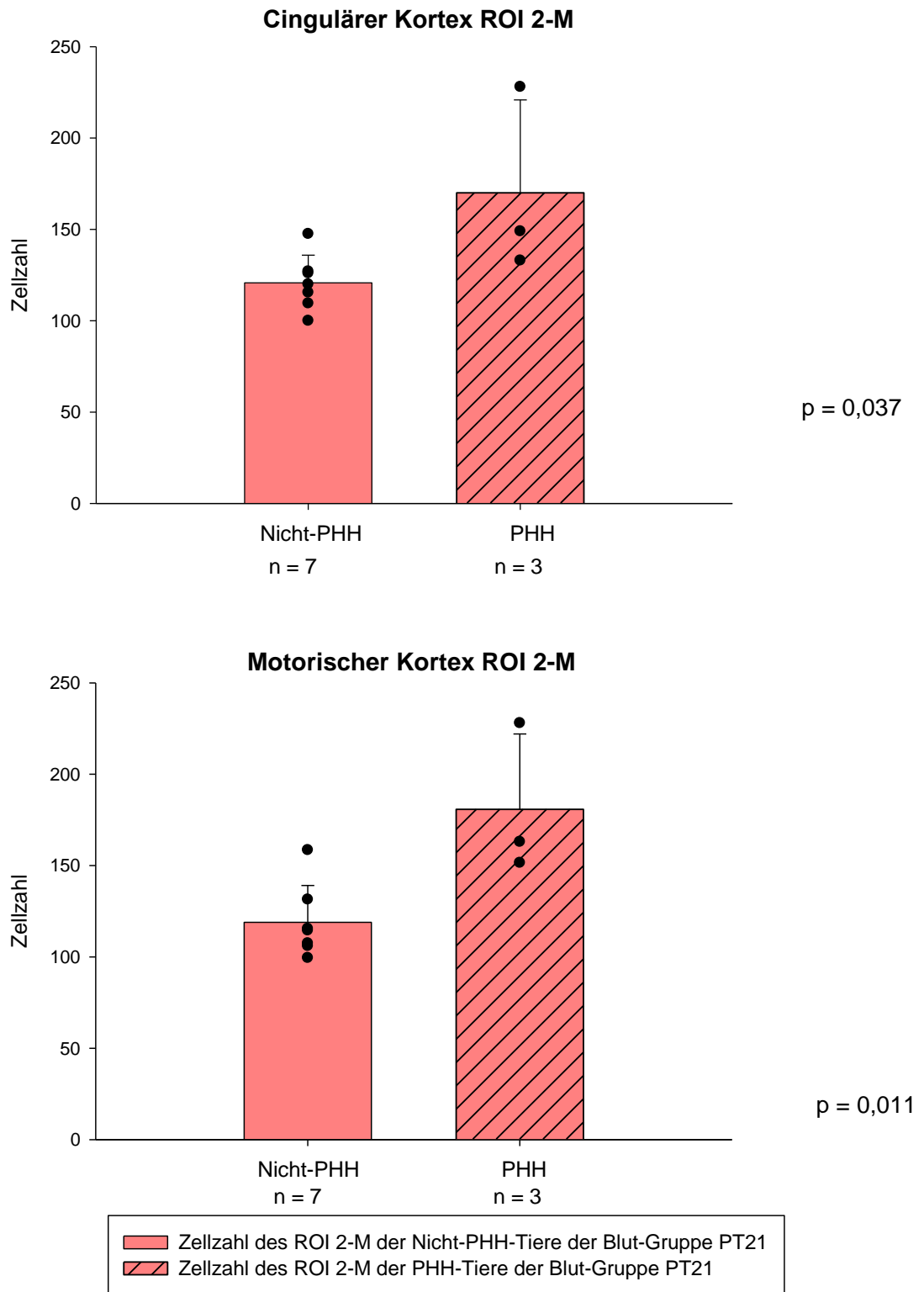


Abbildung 16 Vergleich der Zellzählung anhand der NeuN Färbungen der Blut-Gruppe PT21, Nicht-PHH-Tiere gegen PHH-Tiere. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (PHH vs. Nicht-PHH ROI 2-M cingulärer Kortex PT21 Blut  $p = 0,037$ ; PHH vs. Nicht-PHH ROI 2-M motorischer Kortex PT21 Blut  $p = 0,011$ ).

### **4.2.3 Aktivierte Caspase 3**

Im Vergleich der einzelnen ROI der jeweiligen Region untereinander (getrennt nach Posttrauma-Tagen) zeigten sich keinerlei signifikante Unterschiede in der immunreaktiven Fläche von Caspase 3. Die Vergleiche erfolgten analog zur Auswertung der NeuN-IRF.

Im separaten Vergleich der Versuchsgruppen nach ROI ergaben sich an PT3 eine signifikant stärker ausgeprägte Caspase 3 - IRF der Sham-Gruppe im Vergleich zur Blut- und NaCl-Gruppe im periventriculären Striatum ROI 8 ( $p = 0,006$ ).

### **Vergleich der IRF der PHVD/PHH- und Nicht-PHVD/-PHH-Tiere**

Im Gegensatz zur NeuN-IRF zeigte sich in dem Vergleich der PT1 und PT21 PHVD/PHH-Tiere gegen die Nicht-PHVD/-PHH-Tiere keine richtungsweisende Signifikanz. ROI 6 des periventriculären Striatum der PT1-PHVD-Tiere zeigte eine signifikant geringere Caspase 3-IRF ( $p = 0,008$ ); dies ließ sich in den umliegenden ROI nicht reproduzieren.

Im cingulären Kortex der PT21-PHH-Tiere zeigte ROI 2 eine signifikant stärker aktivierte Caspase 3-IRF ( $p = 0,005$ ) gegenüber den Nicht-PHH-Tieren; hier zeigte sich in den umliegenden ROI ebenfalls eine Tendenz zur stärkeren Caspase 3-Immunreaktivität, jedoch ohne weitere Signifikanz.

## **Korrelation zwischen der IRF und der relativen Ventrikelfläche**

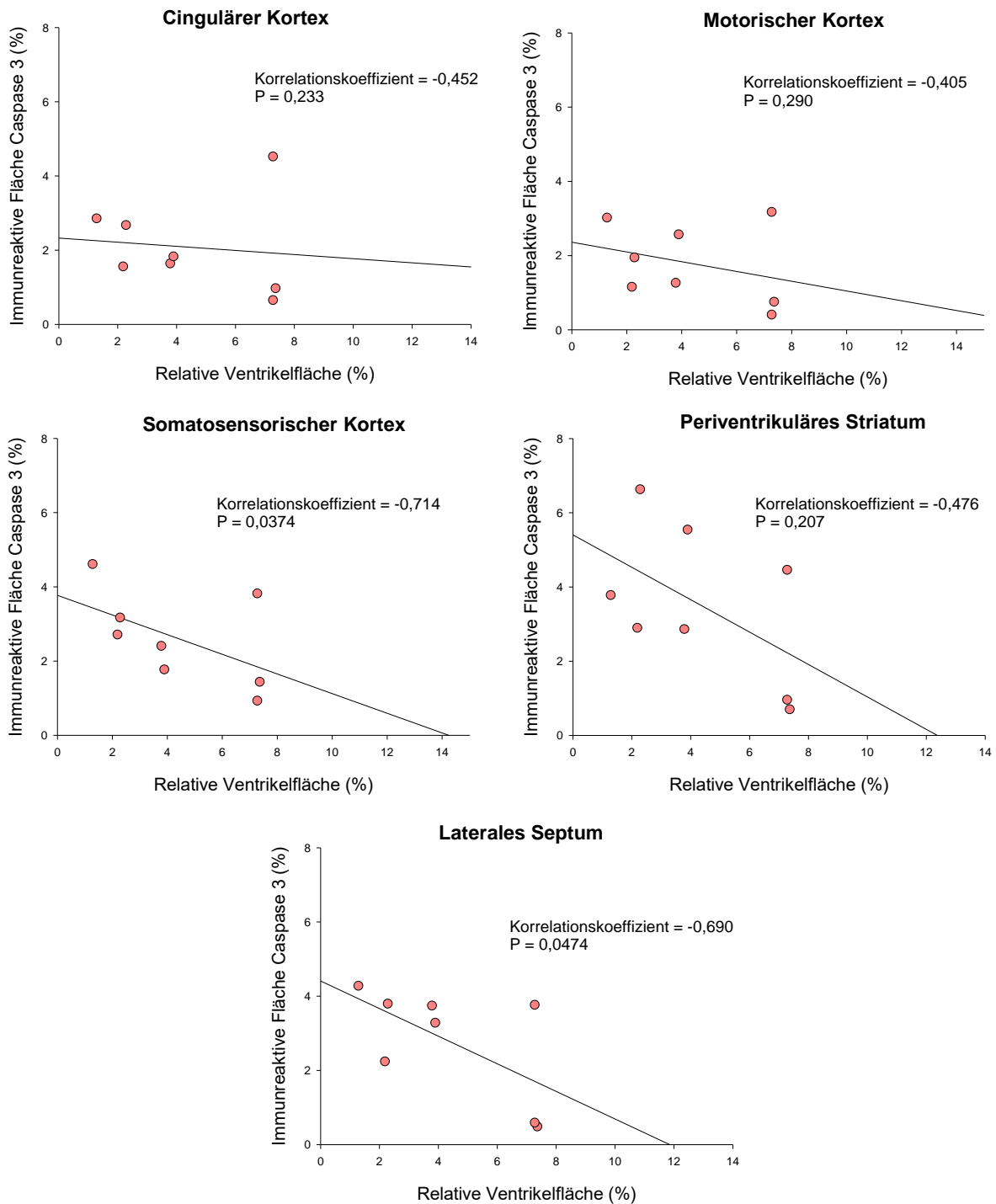
Um den Zusammenhang zwischen der relativen Ventrikelfläche und der Caspase 3-IRF festzustellen, erhoben wir analog zur NeuN-Auswertung für jede Versuchsgruppe und Posttrauma-Tag den Spearman-Korrelations-Koeffizienten.

Es ergab sich ein nicht-signifikanter Trend einer negativen Korrelation zwischen Caspase 3-IRF und relativer Ventrikelfläche der Blut-Gruppe PT1 (PT1 – cingulärer Kortex – Blut: Korrelationskoeffizient = -0,452,  $p = 0,233$ ; PT1– motorischer Kortex – Blut: Korrelationskoeffizient = -0,405,  $p = 0,290$ ; PT1– somatosensorischer Kortex – Blut: Korrelationskoeffizient = -0,714,  $p = 0,037$ ; PT1– periventrikuläres Striatum – Blut: Korrelationskoeffizient = -0,476,  $p = 0,207$ ; PT1– laterales Septum – Blut: Korrelationskoeffizient = -0,690,  $p = 0,047$ ).

Es zeigte sich eine Tendenz für eine positive Korrelation zwischen Caspase 3-IRF und relativer Ventrikelfläche zum Zeitpunkt PT21 der Blut-Gruppe. Der Spearman-Korrelations-Koeffizient des cingulären Kortex zeigte sich signifikant (PT21 – cingulärer Kortex – Blut: Korrelationskoeffizient = 0,905,  $p = 0,0000002$ ; PT21 – motorischer Kortex – Blut: Korrelationskoeffizient = 0,643,  $p = 0,0716$ ; PT21 – somatosensorischer Kortex – Blut: Korrelationskoeffizient = 0,595,  $p = 0,102$ ; PT21 – periventrikuläres Striatum – Blut: Korrelationskoeffizient = 0,786,  $p = 0,0149$ ; PT21 – laterales Septum – Blut: Korrelationskoeffizient = 0,714,  $p = 0,0374$ ).

Vereinzelte weitere Trends waren nicht aussagekräftig (PT 3 – laterales Septum – Vehikel: Korrelationskoeffizient: -0,786,  $p = 0,0251$ ; PT 7 – periventrikuläres Striatum – Sham: Korrelationskoeffizient: -0,886,  $p = 0,0333$ ).

Korrelation der immunreaktiven Fläche und relativen Ventrikelfläche<sup>1</sup>  
Blut-Gruppe - aktivierte Caspase 3 - PT1

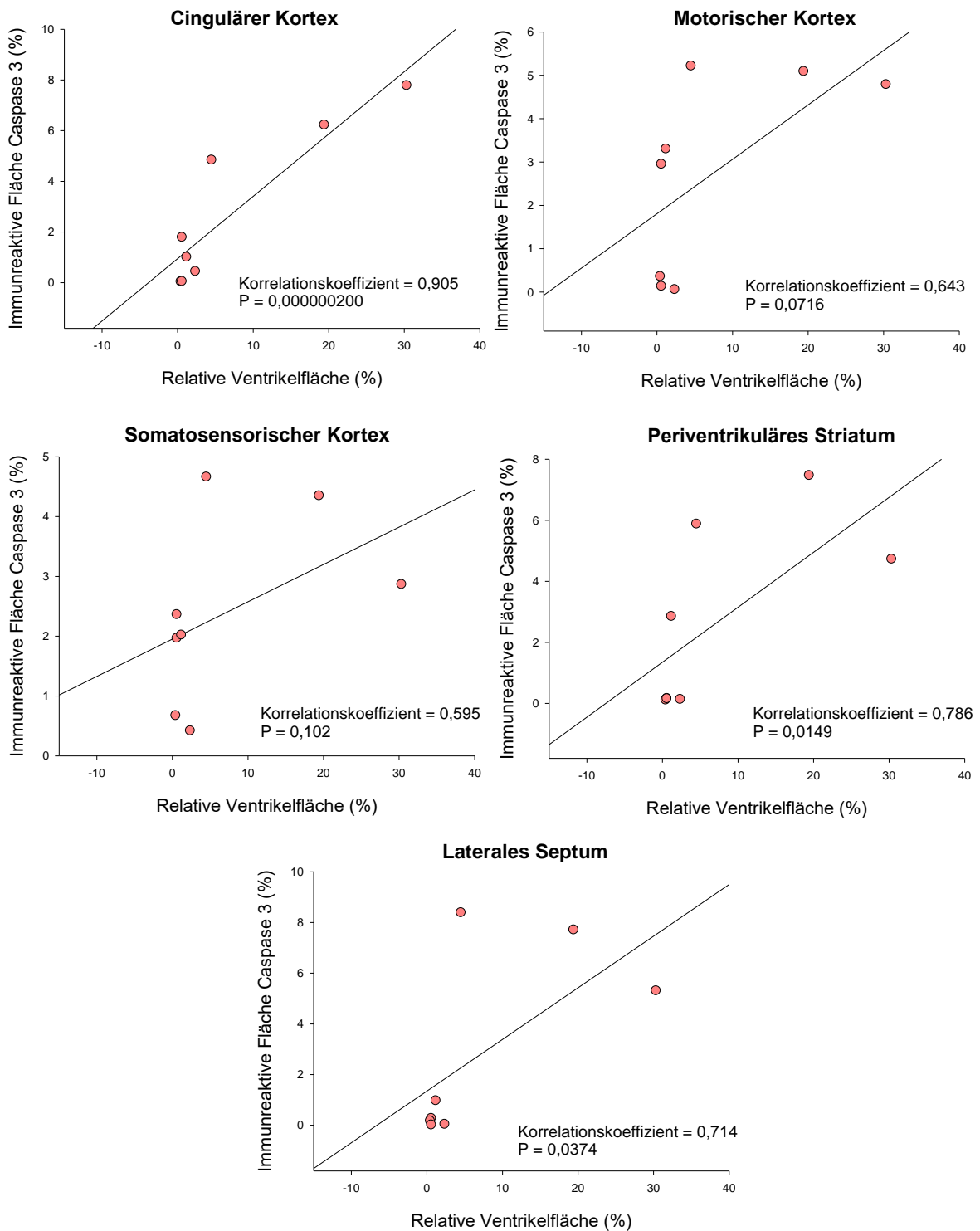


● Immunreaktive Fläche vs. relative Ventrikelfläche - Blut-Gruppe - aktivierte Caspase 3 - PT1 (n = 9)  
— Regressionsgeraden der immunreaktiven Fläche vs. relativen Ventrikelfläche PT1

<sup>1</sup> Relative Ventrikelfläche = Gesamte Ventrikelfläche in mm<sup>2</sup> / gesamte Hirnfläche in mm<sup>2</sup>

Abbildung 17 Korrelation der immunreaktiven Fläche aktivierte Caspase 3 und der relativen Ventrikelfläche; Blut-Gruppe - PT1. (cingulärer Kortex – Blut: Korrelationskoeffizient (KK) = -0,452, p = 0,233; motorischer Kortex – Blut: KK = -0,405, p = 0,290; somatosensorischer Kortex – Blut: KK = -0,714, p = 0,037; periventrikuläres Striatum – Blut: KK = -0,476, p = 0,207; laterales Septum – Blut: KK = -0,690, p = 0,047)

Korrelation der immunreaktiven Fläche und relativen Ventrikelfläche<sup>1</sup>  
Blut-Gruppe - aktivierte Caspase 3 - PT21



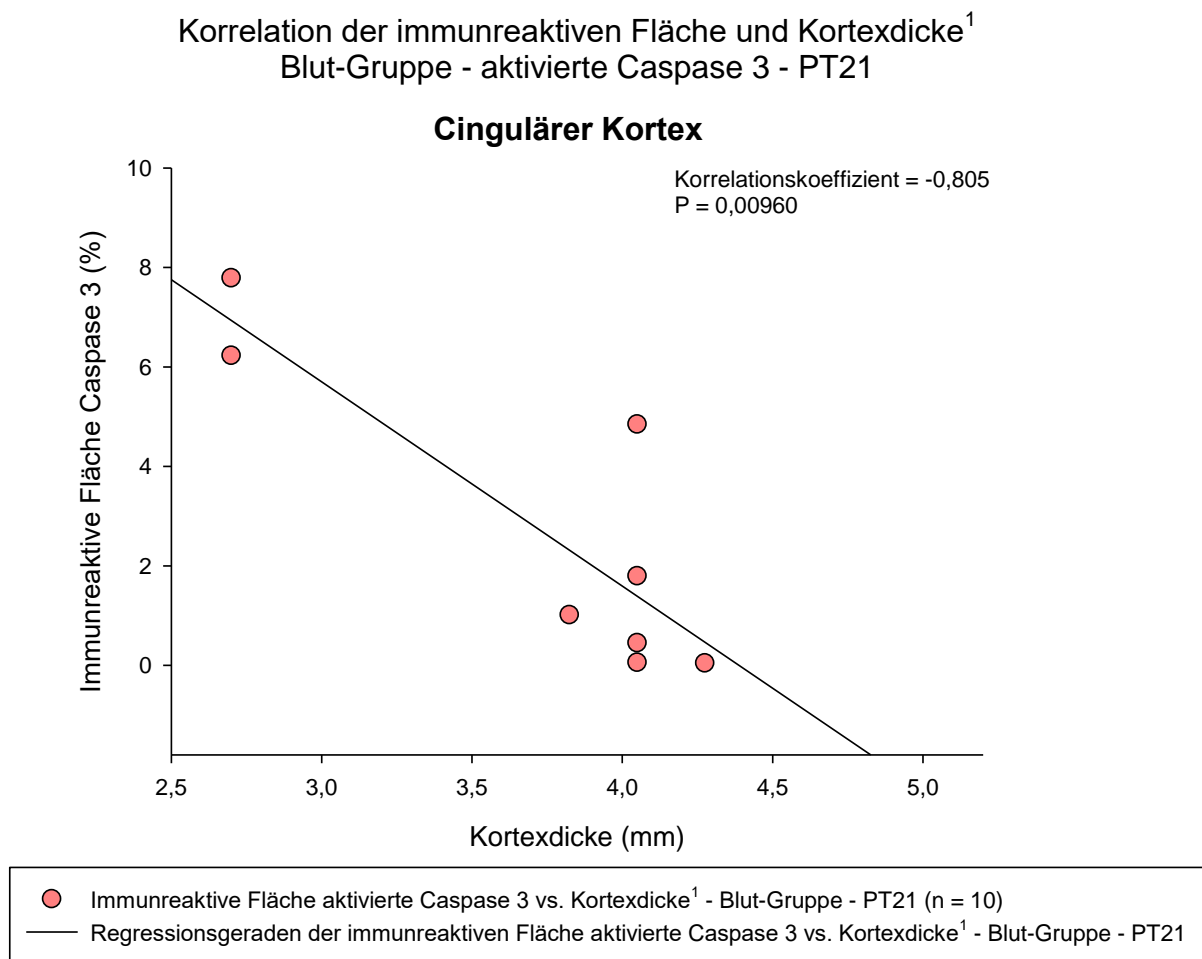
● Immunreaktive Fläche vs. relative Ventrikelfläche - Blut-Gruppe - aktivierte Caspase 3 - PT21 (n = 10)  
— Regressionsgeraden der immunreaktiven Fläche vs. relativen Ventrikelfläche PT21

<sup>1</sup> Relative Ventrikelfläche = Gesamte Ventrikelfläche in mm<sup>2</sup> / gesamte Hirnfläche in mm<sup>2</sup>

Abbildung 18 Korrelation der immunreaktiven Fläche aktivierte Caspase 3 und der relativen Ventrikelfläche; Blut-Gruppe - PT 21. (cingulärer Kortex – Blut: Korrelationskoeffizient (KK) = 0,905, p = 0,0000002; motorischer Kortex – Blut: KK = 0,643, p = 0,0716; somatosensorischer Kortex – Blut: KK = 0,595, p = 0,102; periventriculäres Striatum – Blut: KK = 0,786, p = 0,0149; laterales Septum – Blut: KK = 0,714, p = 0,0374)

## Korrelation zwischen der IRF und der Kortexdicke

In der Blut-Gruppe PT21 zeigte sich eine signifikante, negative Korrelation zwischen der Kortexdicke und der immunreaktiven Fläche aktivierte Caspase 3 des cingulären Kortex (PT21 – cingulärer Kortex – Blut: Korrelationskoeffizient = -0,805,  $p = 0,00960$ ). Im motorischen und somatosensorischen Kortex blieb dieser Trend aus (PT21 – motorischer Kortex – Blut: Korrelationskoeffizient = -0,115,  $p = 0,749$ ; PT21 – somatosensorischer Kortex – Blut: Korrelationskoeffizient = -0,495,  $p = 0,182$ ). Zu keinem anderen Posttrauma-Tag zeigte sich eine Tendenz.



<sup>1</sup>Kortexdicke = errechnet als Summe der beidseitigen ROI Anzahl.

Abbildung 19 Korrelation der immunreaktiven Fläche aktivierte Caspase 3 und Kortexdicke; Blut-Gruppe - PT21. (cingulärer Kortex – Blut: Korrelationskoeffizient = -0,805,  $p = 0,00960$ )



#### **4.2.4 SMI-32**

Im Vergleich der einzelnen ROI der jeweiligen Regionen untereinander (getrennt nach Posttrauma-Tagen) zeigte sich in der PT1 Sham-Gruppe eine signifikant geringere IRF von ROI 3 und 6 im periventrikulären Striatum ( $p = 0,004$ ). Zudem ergab die Analyse in der PT7 NaCl-Gruppe eine signifikant geringere Färbung der Ventrikel-nahen ROI des periventrikulären Striatum (ROI 1, 2 und 3) ( $p = 0,004$ ). Diese Werte traten jeweils einzeln auf, sodass sich keine klare Tendenz erkennen ließ.

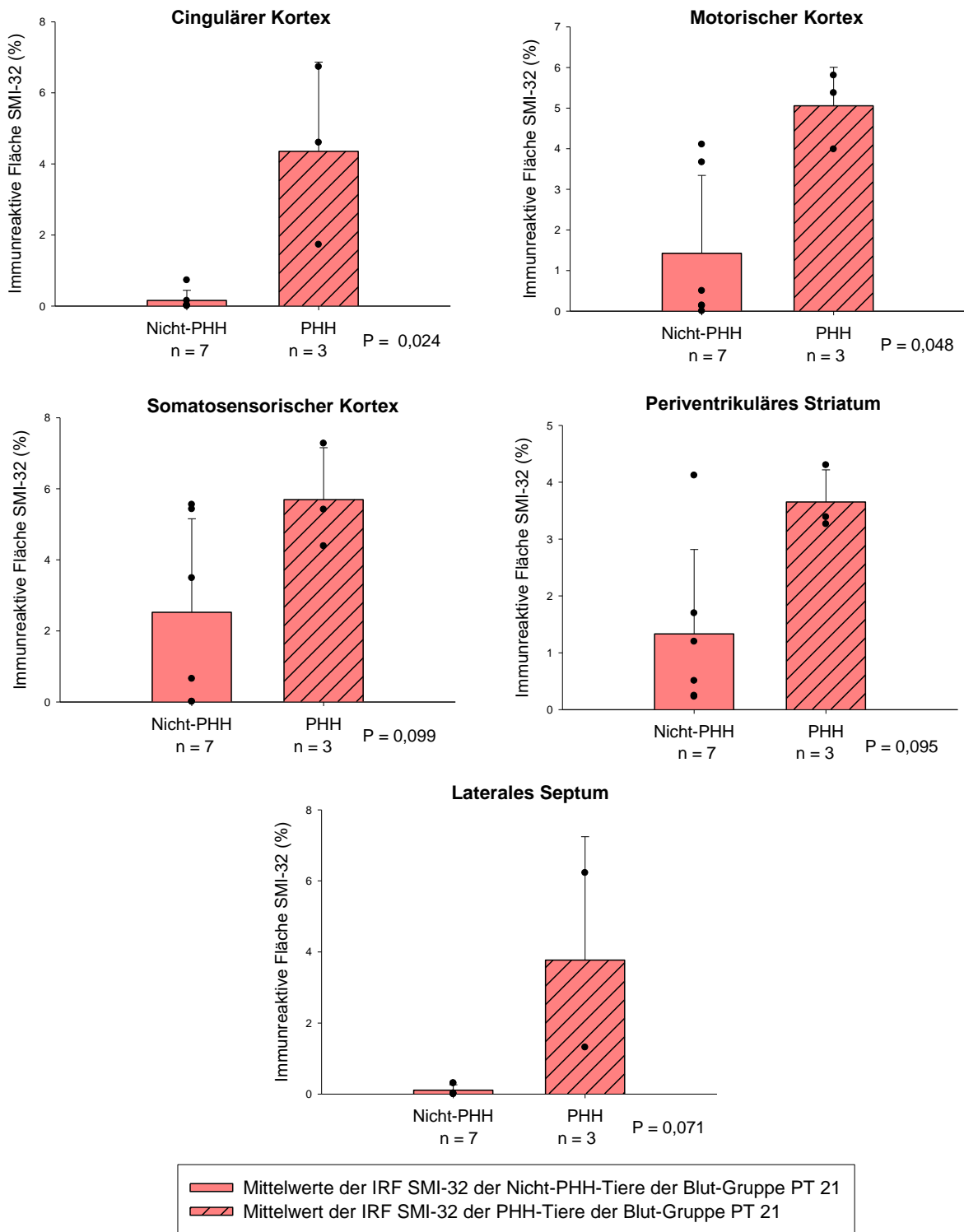
Im separaten Vergleich der Versuchsgruppen nach ROI ergaben sich keinerlei Signifikanzen. In den PT1- und PT7-Gruppen zeigte sich eine tendenziell stärkere IRF der NaCl-Gruppe gegenüber der Blut- und Sham-Gruppen im lateralen Septum. In PT3 und PT21 zeigte sich dieser Trend nicht.

#### **Vergleich der IRF der PHVD/PHH- und Nicht-PHVD/-PHH-Tiere**

In der PT1-Gruppe zeigte sich keine Signifikanz.

In der PT21-Gruppe zeigte sich die Tendenz einer zunehmenden IRF der PHH-Tiere ( $n = 3$ ) im Vergleich zu den Nicht-PHH-Tieren ( $n = 7$ ) (cingulärer Kortex  $p = 0,024$ ; motorischer Kortex  $p = 0,048$ ; somatosensorischer Kortex  $p = 0,099$ ; periventrikuläres Striatum  $p = 0,095$ ; laterales Septum  $p < 0,071$ ). Einzelne ROI zeigten eine Signifikanz (PT21 – motorischer Kortex – ROI 1:  $p = < 0,001$ ; PT21 – somatosensorischer Kortex – ROI 1:  $p = < 0,001$ ).

Immunreaktive Fläche SMI-32 der Blut-Gruppe PT21  
Nicht-PHH-Tiere gegen PHH-Tiere



\* = P < 0,05; Signifikanz zwischen den Mittelwerten der PHH- und Nicht-PHH-Tieren

Abbildung 20 Immunreaktive Fläche SMI-32 der Blut-Gruppe - PT 21; Nicht-PHH-Tiere gegen PHH-Tiere. (cingulärer Kortex  $p = 0,024$ ; motorischer Kortex  $p = 0,048$ ; somatosensorischer Kortex  $p = 0,099$ ; periventrikuläres Striatum  $p = 0,095$ ; laterales Septum  $p < 0,071$ ), die Darstellungen zeigen die Mittelwerte M und die Standardabweichung SD.

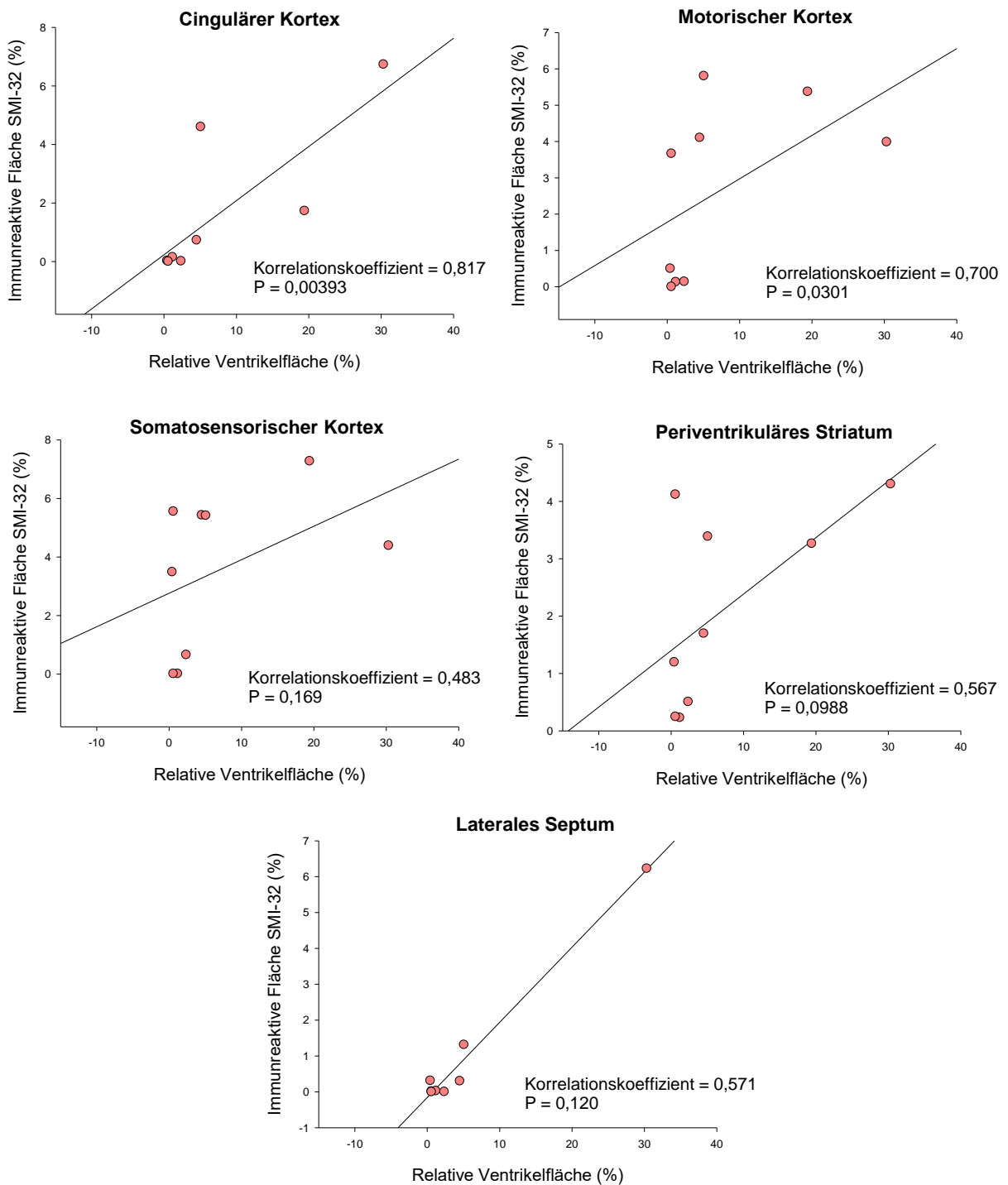
## **Korrelation zwischen der IRF von SMI-32 und der relativen Ventrikelfläche**

Um einen Zusammenhang zwischen der relativen Ventrikelfläche und der immunreaktiven Fläche von SMI-32 festzustellen, erhoben wir analog zu den NeuN- und aktivierte Caspase 3-Auswertungen für jede Versuchsgruppe und Posttraumatage den Spearman-Korrelations-Koeffizienten.

In der PT21-Gruppe zeigte sich eine Tendenz für eine positive Korrelation zwischen SMI-32-IRF und relativer Ventrikelfläche über alle ROI Regionen der Blut-Gruppe. Lediglich die Korrelation im cingulären Kortex zeigte sich als signifikant (PT21 – cingulärer Kortex – Blut: Korrelationskoeffizient = 0,817,  $p = 0,00393$ ; PT21 – motorischer Kortex – Blut: Korrelationskoeffizient = 0,700,  $p = 0,0301$ ; PT21 – somatosensorischer Kortex – Blut: Korrelationskoeffizient = 0,483,  $p = 0,169$ ; PT21 – periventrikuläres Striatum – Blut: Korrelationskoeffizient = 0,567,  $p = 0,0988$ ; PT21 – laterales Septum – Blut: Korrelationskoeffizient = 0,571,  $p = 0,120$ ).

Die NaCl-Gruppe an PT21 zeigte über alle ROI-Regionen eine nicht-signifikante negative Korrelation zwischen SMI-32-IRF und relativer Ventrikelfläche (PT21 – cingulärer Kortex – NaCl: Korrelationskoeffizient = -0,600,  $p = 0,350$ ; PT21 – motorischer Kortex – NaCl: Korrelationskoeffizient = -1,000,  $p = 0,0167$ ; PT21 – somatosensorischer Kortex – NaCl: Korrelationskoeffizient = -0,800,  $p = 0,133$ ; PT21 – periventrikuläres Striatum – NaCl: Korrelationskoeffizient = -0,900,  $p = 0,0833$ ; PT21 – laterales Septum – NaCl: Korrelationskoeffizient = -0,700,  $p = 0,233$ ).

Korrelation der immunreaktiven Fläche und relativen Ventrikelfläche<sup>1</sup>  
Blut-Gruppe- SMI-32 - PT21

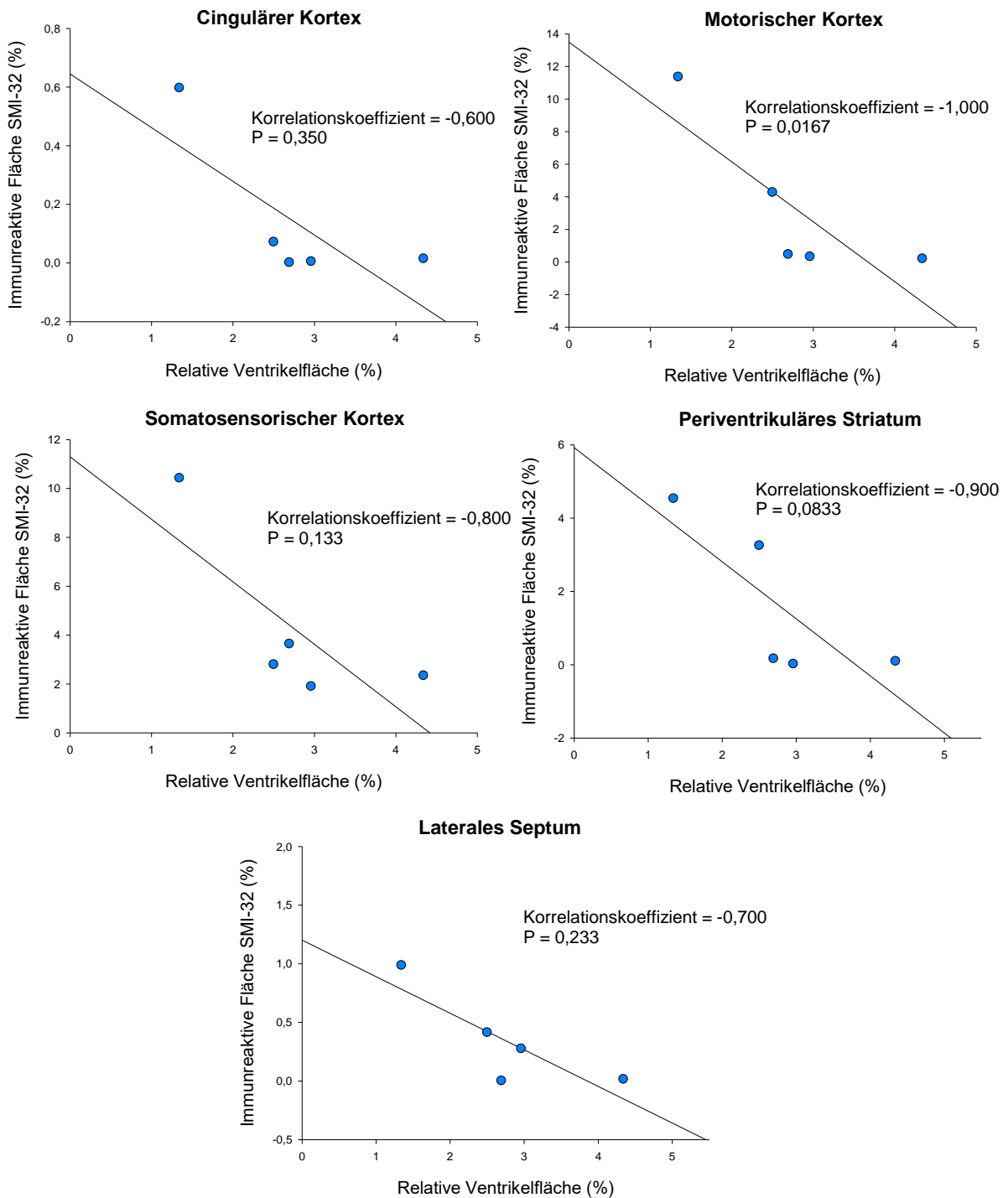


● Immunreaktive Fläche vs. relative Ventrikelfläche - Blut-Gruppe - SMI-32 - PT21 (n = 10)  
— Regressionsgeraden der immunreaktiven Fläche vs. relativen Ventrikelfläche PT21

<sup>1</sup> Relative Ventrikelfläche = Gesamte Ventrikelfläche in mm<sup>2</sup> / gesamte Hirnfläche in mm<sup>2</sup>

Abbildung 21 Korrelation der immunreaktiven Fläche SMI-32 und relativen Ventrikelfläche; Blut-Gruppe - PT21. (cingulärer Kortex – Blut: Korrelationskoeffizient (KK) = 0,817, p = 0,00393; motorischer Kortex – Blut: KK = 0,700, p = 0,0301; somatosensorischer Kortex – Blut: KK = 0,483, p = 0,169; periventriculäres Striatum – Blut: KK = 0,567, p = 0,0988; laterales Septum – Blut: KK = 0,571, p = 0,120)

Korrelation der immunreaktiven Fläche und relativen Ventrikelgröße<sup>1</sup>  
NaCl-Gruppe - SMI-32 - PT21



● Immunreaktive Fläche vs. relative Ventrikelgröße - NaCl-Gruppe - SMI-32 - PT21 (n = 8)  
— Regressionsgeraden der immunreaktiven Fläche vs. relativen Ventrikelgröße PT21

<sup>1</sup> Relative Ventrikelgröße = Gesamtventrikelgröße in mm<sup>2</sup> / Gesamt-Hirnfläche in mm<sup>2</sup>

Abbildung 22 Korrelation der immunreaktiven Fläche SMI-32 und relativen Ventrikelgröße; NaCl-Gruppe - PT21. (cingulärer Kortex – NaCl: Korrelationskoeffizient (KK) = -0,600, p = 0,350; motorischer Kortex – NaCl: KK = -1,000, p = 0,0167; somatosensorischer Kortex – NaCl: KK = -0,800, p = 0,133; periventriculäres Striatum – NaCl: KK = -0,900, p = 0,0833; laterales Septum – NaCl: KK = -0,700, p = 0,233)

Zum Zeitpunkt PT1 ergab sich im cingulären Kortex der Sham-Gruppe eine signifikant-positive Korrelation zwischen IRF und relativer Ventrikelfläche (PT1 – cingulärer Kortex – Sham: Korrelationskoeffizient: 0,833,  $p = 0,00526$ ) (siehe Abbildung 29 im Anhang).

Ebenfalls wies die PT3 Blut-Gruppe im periventrikulären Striatum einen signifikant-positiven Korrelationskoeffizienten auf (PT3 – periventrikuläres Striatum – Blut: Korrelationskoeffizient: 0,857,  $p = 0,00609$ ). Ferner zeigte der motorische Kortex eine Tendenz zur positiven Korrelation (PT3 – motorischer Kortex – Blut: Korrelationskoeffizient: 0,821,  $p = 0,0145$ ) (siehe Abbildung 30 im Anhang).

Die PT3 NaCl-Gruppe bot signifikant-positive Korrelationen im periventrikulären Striatum (PT3 – periventrikuläres Striatum – NaCl: Korrelationskoeffizient: 0,857,  $p = 0,00178$ ) und im lateralen Septum (PT3 – laterales Septum – NaCl: Korrelationskoeffizient: 0,81,  $p = 0,0096$ ) (siehe Abbildung 31 im Anhang).

Die Blut-Gruppe zeigte an PT7 denselben Trend wie an PT21 (positive Korrelation zwischen IRF und relativer Ventrikelfläche) im cingulären Kortex (PT7 – cingulärer Kortex – Blut: Korrelationskoeffizient: 0,762,  $p = 0,0212$ ), zudem ergab sich ein signifikant-positiver Korrelationskoeffizient für das laterale Septum (PT7 – laterales Septum – Blut: Korrelationskoeffizient: 0,952,  $p = 0,0000002$ ) (siehe Abbildung 32 im Anhang).

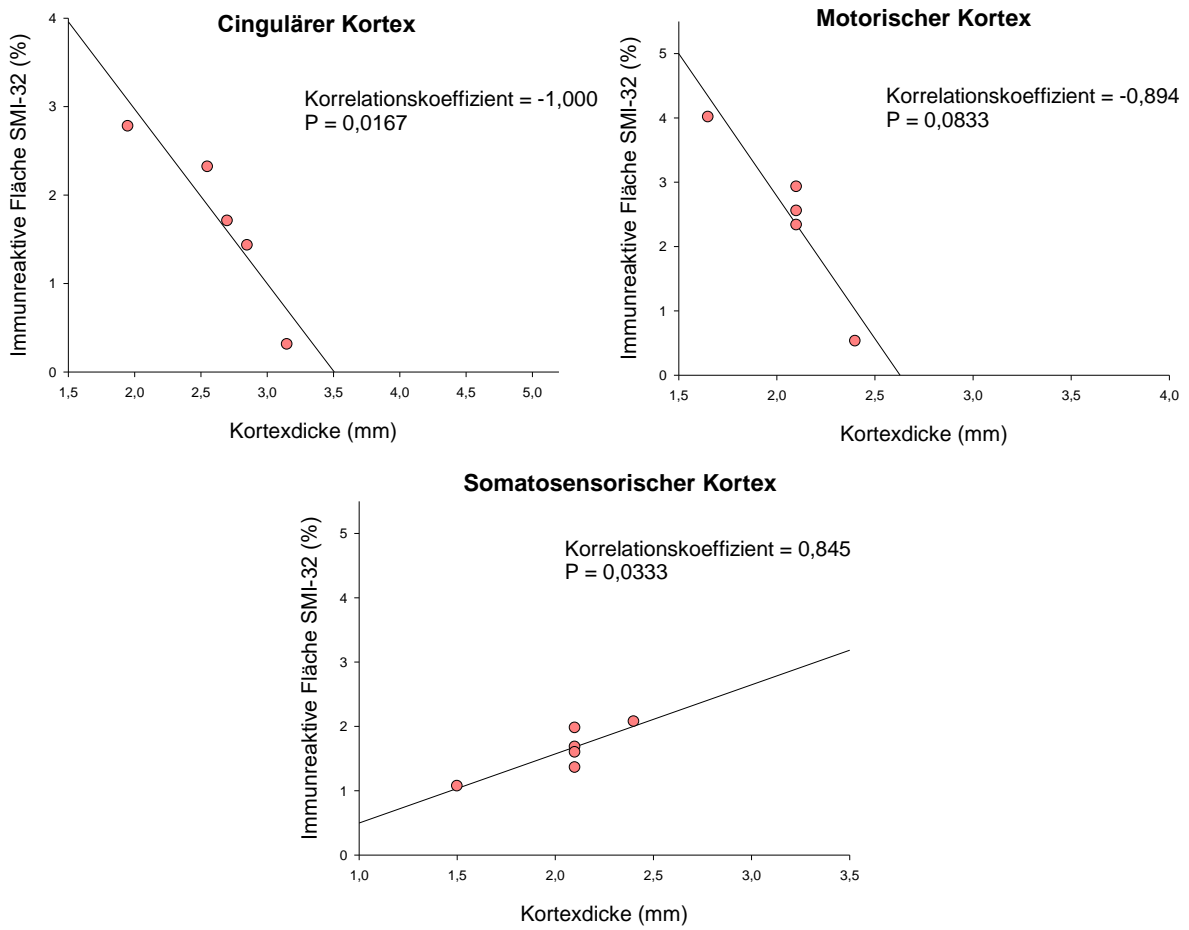
Die hier berichteten Werte der PT1, PT3 und PT7 Gruppen traten vereinzelt auf; die umliegenden ROI-Regionen teilten die Trends.

### **Korrelation zwischen der IRF und der Kortexdicke**

Zum Zeitpunkt PT1 ergab die Analyse im cingulären Kortex der NaCl-Gruppe eine signifikant-negative Korrelation zwischen Kortexdicke und IRF (PT1 – cingulärer Kortex – NaCl: Korrelationskoeffizient: -0,84,  $p = 0,00526$ ). Dieser Wert steht einzeln, die umliegenden Kortexregionen zeigten keinen bzw. einen widersprüchlichen negativen Korrelationstrend (PT1 – somatosensorischer Kortex – NaCl: Korrelationskoeffizient: 0,701,  $p = 0,0474$ ) (siehe Abbildung 33 im Anhang).

Zudem zeigte der cinguläre und motorische Kortex der PT3 Blut-Gruppe den Trend einer negativen Korrelation zwischen Kortexdicke und IRF SMI-32 (PT3 – cingulärer Kortex – SMI-32 – Blut: Korrelationskoeffizient = -1,000,  $p = 0,0167$ ; PT3 – motorischer Kortex – SMI-32 – Blut: Korrelationskoeffizient = -0,894,  $p = 0,0833$ ), mit Ausnahme des somatosensorischen Kortex. Dieser wies eine Tendenz zu einer positiven Korrelation zwischen Kortexdicke und IRF auf (PT3 – somatosensorischer Kortex – SMI-32 – Blut: Korrelationskoeffizient = 0,845,  $p = 0,0333$ ).

Korrelation der immunreaktiven Fläche und Kortexdicke<sup>1</sup>  
Blut-Gruppe - SMI-32 - PT3



- Immunreaktive Fläche SMI-32 vs. Kortexdicke - Blut-Gruppe - PT3 (n = 8)
- Regressionsgeraden der immunreaktiven Fläche SMI-32 vs. Kortexdicke - Blut-Gruppe - PT 3

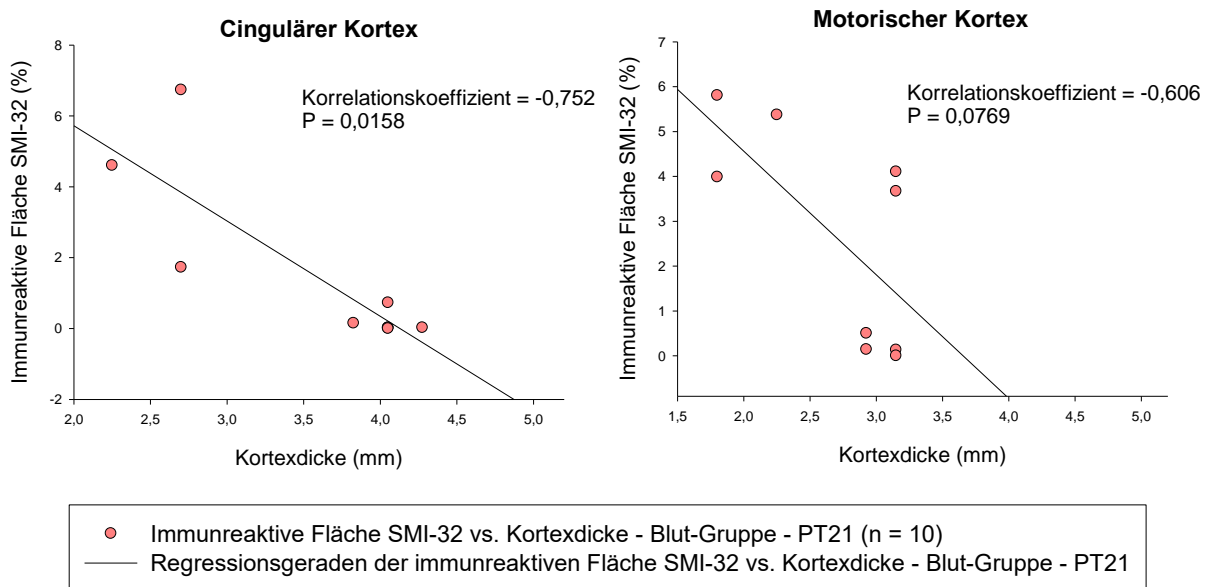
<sup>1</sup>Kortexdicke = errechnet als Summe der beidseitigen ROI Anzahl.

Abbildung 23 Korrelation der immunreaktiven Fläche SMI-32 und Kortexdicke; Blut-Gruppe - PT3. (cingulärer Kortex – SMI-32 – Blut: Korrelationskoeffizient = -1,000, p = 0,0167; motorischer Kortex – SMI-32 – Blut: Korrelationskoeffizient = -0,894, p = 0,0833; somatosensorischer Kortex – SMI-32 – Blut: Korrelationskoeffizient = 0,845, p = 0,0333)



In der PT21-Blut-Gruppe ergab sich der Trend zu einer negativen Korrelation zwischen der Kortexdicke und der immunreaktiven Fläche des cingulären Kortex und des motorischen Kortex (PT21 – cingulärer Kortex – SMI-32 – Blut: Korrelationskoeffizient = -0,752,  $p = 0,0158$ ; PT21 – motorischer Kortex – SMI-32 – Blut: Korrelationskoeffizient = -0,606,  $p = 0,0769$ ); der somatosensorische Kortex wies diesen Trend nicht auf (PT21 – somatosensorischer Kortex – SMI-32 – Blut: Korrelationskoeffizient = -0,110,  $p = 0,742$ ).

Korrelation der immunreaktiven Fläche und Kortexdicke<sup>1</sup>  
Blut-Gruppe - SMI-32 - PT21



<sup>1</sup>Kortexdicke = errechnet als Summe der beidseitigen ROI Anzahl.

Abbildung 24 Korrelation der immunreaktiven Fläche SMI-32 und Kortexdicke; Blut-Gruppe - PT21. (cingulärer Kortex – SMI-32 – Blut: Korrelationskoeffizient = -0,752,  $p = 0,0158$ ; motorischer Kortex – SMI-32 – Blut: Korrelationskoeffizient = -0,606,  $p = 0,0769$ )

## 5. Diskussion

### 5.1 Tiermodell

#### 5.1.1 Hydrozephalus-Rate

Zum Festlegen einer stattgefundenen posthämorrhagischen ventrikulären Dilatation oder eines posthämorrhagischen Hydrozephalus schien es sinnvoll analog zu Cherian et al. einen Schwellenwert festzulegen, oberhalb dessen eine PHVD bzw. ein PHH besteht (Cherian et al., 2003). Nach Analyse der relativen Ventrikelflächen aller Interventionsgruppen legten wir den Schwellenwert als Mittelwert aller Sham-Tiere plus zweifache Standardabweichung (4,74 %) fest. So ergaben sich in den Blut-Gruppen 3/9 PHVD an PT1, 1/8 PHVD an PT3, 0/8 PHH an PT7 und 3/10 PHH an PT21. In den NaCl-Gruppen: 1/8 PHVD an PT1 und 1/8 PHH an PT7. Ein Sham-Tier an PT1 lag ebenfalls über dem Schwellenwert.

Somit entwickelte sich, im von uns verwendeten Tiermodell, eine ventrikuläre Dilatation in 9,9 % (10/102) der Tiere über alle Interventionsgruppen. An PT21 zeigte sich eine Hydrozephalus-Rate von 30,3 % (3/10) in der Blut-Gruppe. Dieser Rate gegenüber standen 0% in der NaCl- und Sham-Gruppe PT21. Unser Modell ist also geeignet, um einen Hydrozephalus zu induzieren, jedoch bleibt die Rate der Hydrozephalusentwicklung weit hinter denen anderer Studien zurück.

Unserem Experiment gingen Vorversuche voraus, um eine Einschätzung zu gewinnen, welches Blutvolumen für die IVH verwendet werden sollte. Frühgeborene mit sehr niedrigem Geburtsgewicht (very low birth weight) und geringem Gestationsalter sind mit 22 % der Fälle besonders häufig von einer Blutung der germinalen Matrix (GMH) und bei stärkerer Ausprägung einer IVH betroffen (Strahle et al., 2012). Ein niedriges Geburtsgewicht geht mit einem geringeren Gestationsalter einher. Daher richteten wir uns initial nach der Studie von Balasubramaniam et al., welche neugeborenen Sprague-Dawley Ratten (24-36 h postpartum) unilateral 15 µl autologes Blut in die rechte periventrikuläre Region injizierten. Die Studie erhob keine Daten bezüglich der Entwicklung eines Hydrozephalus, jedoch zeigte sich die rechte Hemisphäre der Blut-Gruppe signifikant kleiner als die linke Hemisphäre und auch als die der Kontrollgruppe zum Euthanasie-Zeitpunkt 10 Wochen Posttrauma. Als Grund hierfür berichtete die Studie über eine Atrophie des Striatums in den Tieren der Interventionsgruppe (Balasubramaniam et al., 2006).

Andere Forschungsgruppen benutzten deutlich größere Injektionsvolumina. So verwendete Cherian et al., 2004, 80 µl Citratblut univentrikulär und erreichte eine Hydrozephalus-Rate von 58,7 % in der Blut-Gruppe, bzw. von 65% bei biventrikulärer Injektion (Cherian et al., 2003). Der Versuchsaufbau der Gruppe von Ahn et al. injizierte 100 µl bilateral (200 µl gesamt) maternales Vollblut mit einer resultierenden Hydrozephalus-Rate von 85 % (Ahn et al., 2013). Beide Gruppen wählten jedoch einen deutlich späteren Interventionszeitpunkt; P4 und P7 (Postnatal-Tag 4 und 7). Zudem benutzte Cherian et al. Wistar Rattenjunge. Im Vergleich zu unseren Sprague-Dawley Ratten ist der Wistar-Stamm möglicherweise vulnerabler für eine IVH und subsequenten Hydrozephalus.

Ferner liegt das von uns gewählte Injektionsvolumen von 100 µl biventrikulär appliziert in 2 Minuten weit über der normalen physiologischen Liquorproduktionsrate von etwa 2,5 µl/min in Sprague-Dawley Rattenjungen (Johanson et al., 1999).

Die Wahl der biventrikulären Injektion sowie das Injektionsvolumen scheinen in Zusammenschau der Ergebnisse der anderen Forschungsgruppen daher tauglich und sollte beibehalten werden, allerdings wäre in weiterführenden Experimenten ein vergleichbarer, späterer Interventionszeitpunkt ggf. sinnvoll.

### **5.1.2 Vergleich Rattenjunge zu Frühgeborenen/Zeitpunkt der Intervention**

Der von uns gewählte Interventionszeitpunkt an PND1 (Postnatal-Tag 1) wurde in vorangegangenen Studien mit dem Entwicklungsstand eines Fetus in der 24 – 26. Gestationswoche verglichen, was sehr frühgeborenen Neonaten entspricht (Balasubramaniam et al., 2006; Dobbing and Sands, 1979). Im Gegensatz hierzu entspricht der Interventionszeitpunkt von Cherian et al. an P7 eher einem reifgeborenen Kind (Cherian et al., 2003). Eine Studie um frühgeborene Kinder in Israel konnte belegen, dass die Entwicklung eines PHH auch mit dem Gestationsalter zum Zeitpunkt der IVH korreliert, indes 13 % der Frühgeborenen der 24. Gestationswoche nach einer IVH Grad 2 oder schwerwiegender einen PHH entwickelten, jedoch 28,3 % der Frühgeborenen der 28. Gestationswoche (Klinger et al., 2016).

Möglicherweise besteht hier ein Zusammenhang zwischen der IVH und dem Wachstumsschub des Gehirns um den Zeitpunkt der Geburt. Im Menschen findet dieser Schub perinatal statt, in anderen Spezies (z.B. der Ratte) jedoch erst

postnatal (Dobbing and Sands, 1979). Es ist zu vermuten, dass das Hirngewebe vor diesem Wachstumsschub eine IVH besser kompensieren kann und daher die Hydrozephalus-Rate bei sehr frühgeborenen Neonaten oder Rattenjungen niedriger bleibt.

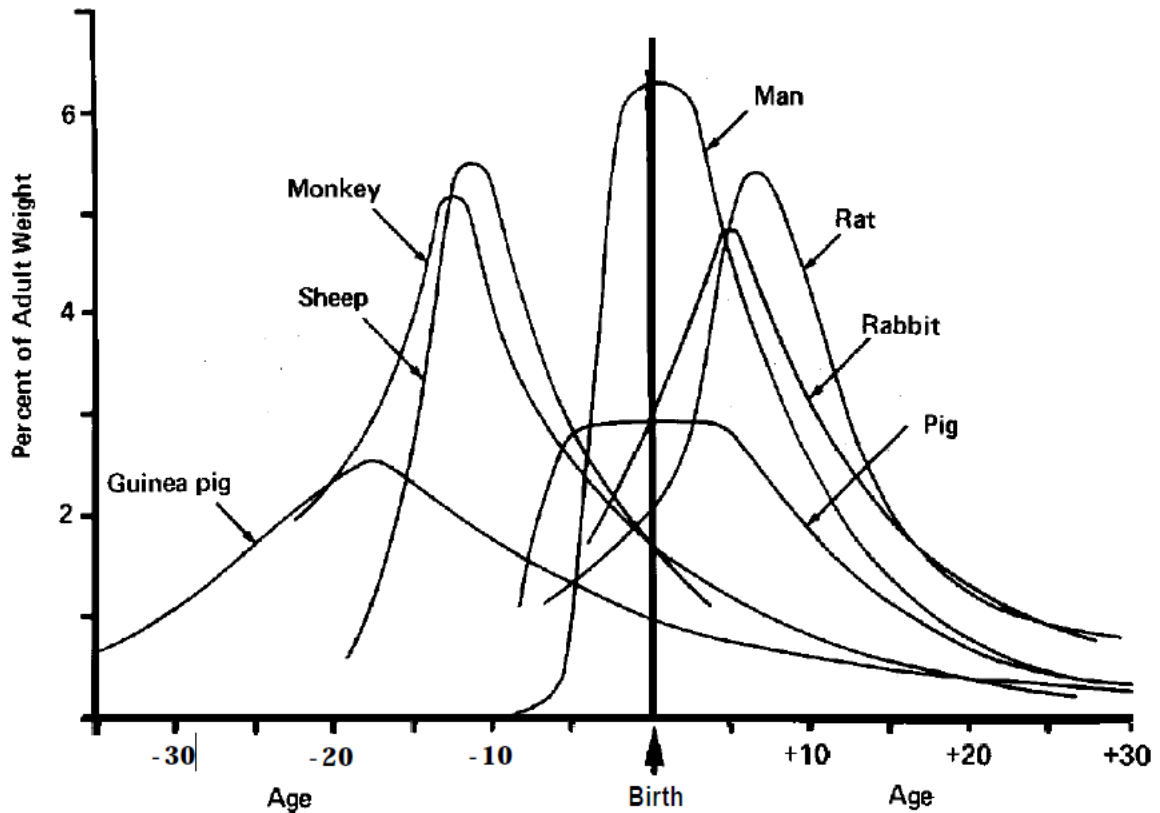


Abbildung 25 Der Wachstumsschub des Gehirns von 7 Säugetier-Spezies. Zeitangaben variieren wie folgt: Guinea pig = Tage; Rhesus Monkey = 4 Tage; Sheep = 5 Tage; Pig = Wochen; Man = Monate; Rabbit = 2 Tage; Rat = Tage  
übernommen von Dobbing and Sands, 1979

Diese Hypothese unterstützt die Ergebnisse der Forschungsgruppen Cherian et al. und Ahn et al., sodass für weiterführende Experimente mit höheren PHH-Raten ein späterer Interventionszeitpunkt zu empfehlen ist.

### 5.1.3 Applikation von allogenem Vollblut

In unserem Experiment verwendeten wir Vollblut von Donortieren, welches im Sinne einer Blutkoagel-Formation zu einem Hydrozephalus occlusus führen kann. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Faktoren der Gerinnungskaskade eine Rolle in der Entwicklung eines Hydrozephalus zu spielen scheinen. Allen voran Thrombin,

welches durch die Aktivierung von PAR-1 zur Schädigung der ventrikulären Wand und zur Disruption der Blut-Hirn-Schranke führt (Gao et al., 2014).

Im Weiteren wurde von Cherian et al. zum Erreichen der 65 % Hydrozephalus-Rate zentrifugiertes Citratblut (136 ml 0,105 M gepuffertes Natriumcitrat per ml Blut, pH 5,5) verwendet. 80 % des überschüssigen Plasma wurden verworfen und die gepackten Zellen im verbleibenden Plasma erneut suspendiert, hierdurch konnte ein Hämatokrit für die bilateralen Injektionen von  $22,4 \pm 1,9$  g/100 ml (17,5–25,1 %) an P7, bzw. von  $22,3 \pm 2,1$  g/100 ml (17,0–24,9 %) an P8 erzielt werden. Durch diesen erhöhten Hämatokrit sollten die physiologischen Eigenschaften von fetalem Blut nachgebildet werden, welches einen Hämatokrit von 39-57 % hat (Cherian et al., 2003).

Es konnte bewiesen werden, dass die Anwesenheit von hohen Konzentrationen von Hämoglobin einen Hydrozephalus induzieren kann, bzw. Eisen-Chelatoren den Effekt des Hämoglobins reduzieren können (Strahle et al., 2014). Strahle et al. verwendete 20 µl Hämoglobin (50 mg/ml, 100 mg/ml und 150 mg/ml) für die Injektionen in P7 Rattenjungen, als Kontrollgruppe dienten Injektionen mit 20 µl artifiziellen Liquor oder ohne jegliche Injektion. 24 Stunden nach der Injektion zeigte sich ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,0001$ ; ANOVA mit Dunnett post-hoc Test) in der Ventrikelgröße zwischen den Kontrollgruppen und der Hämoglobingruppe 150 mg/ml. Ebenfalls nach 24 Stunden zeigte sich ein signifikanter Anstieg ( $p < 0,0001$ ) in der Ventrikelgröße von Versuchstieren, welche eine Injektion mit Eisen(III)-chlorid 4mM erhielten (Strahle et al., 2014).

Demnach führt kondensiertes Blut mit konsequent erhöhten Hämoglobin- und Eisen-Konzentrationen zu einer erhöhten Hydrozephalus-Rate.

Zudem besteht bei Citratblut der bereits vorab erwähnte Vorteil, dass auf eine mehrfache Punktion des Donortiers verzichtet und eine einheitlichere Operations- und Narkosedauer sichergestellt werden kann. Jedoch kommt hier negativ zum Tragen, dass durch die Zusetzung von Citrat die Gerinnungskaskade blockiert wird. In der Studie von Garton et al. konnte nachgewiesen werden, dass Thrombin allen voran eine wichtige Rolle in der Entwicklung eines Hydrozephalus nach Blutung spielt (Garton et al., 2016). Dieser Effekt würde durch Verwendung von Citratblut verloren gehen.

#### 5.1.4 Hydrozephalus und Kortexdicke

Die Ergebnisse der Korrelation der relativen Ventrikelfläche und der Kortexdicke ergaben mit steigender relativer Ventrikelfläche eine Abnahme der Kortexdicke im cingulären und motorischen Kortex der PT21 Tiere, sowie im somatosensorischen Kortex der PT1 Tiere (hier wurden die vier größten relativen Ventrikelflächen gewertet); dies ist bei Entwicklung eines Hydrozephalus zu erwarten.

Zudem konnte beobachtet werden, dass die immunreaktive Fläche von NeuN in den Gehirnen mit PHH an PT21 besonders stark ausgeprägt ist.

Studien mit H-Tx Ratten (welche einen kongenitalen Hydrozephalus durch eine Stenose im Aquädukt entwickeln) zeigten, dass die Ventrikulomegalie einen zunehmenden linearen Verlauf bis zu 10 Tage postpartum hat, erst nach dieser Zeit steigt durch die Abflussbehinderung des Liquors der intrazerebrale Druck (Jones et al., 2000). Es ist daher zu vermuten, dass es bei der Entwicklung eines Hydrozephalus zunächst nicht zu einem ausgeprägten Zelluntergang, sondern zu einer Kondensierung der neuronalen Somata im gedehnten Kortex kommt.

Diese Vermutung wird gestützt von unseren Ergebnissen der Zellzählung in der Blut-Gruppe PT21. Ein Vergleich der Nicht-PHH-Tiere ( $n = 7$ ) gegen die PHH-Tiere ( $n = 3$ ) zeigte einen signifikanten Trend zu einer höheren Zelldichte im Kortex der PHH-Tiere (PHH vs. Nicht-PHH ROI 2-M cingulärer Kortex PT21 Blut  $p = 0,037$ ; PHH vs. Nicht-PHH ROI 2-M motorischer Kortex PT21 Blut  $p = 0,011$ ). Möglicherweise ist an der zunehmenden Zelldichte und Ventrikelgröße eine Störung der Blut-Hirnschranke beteiligt, welche in der Dissertation von Tim Külzer behandelt wird. Der Effekt von Blut auf die BHS-Permeabilität wurde durch das Messen der immunreaktiven Fläche des Tight-Junktion Proteins Claudin-5 quantifiziert. Es zeigte sich eine signifikant verminderte Expression von Claudin-5 in der Blut-Gruppe PT1 ( $p < 0,05$ ) und PT3 ( $p < 0,03$ ) im Vergleich zu der Sham-Gruppe, sowie in der PT3 NaCl- Gruppe. Die Ergebnisse geben einen Hinweis darauf, dass die Injektion von Blut mit all seinen Bestandteilen zu einer rasanteren Störung der Blut-Hirn-Schranke führt als die Injektion von NaCl, welche lediglich die intraventrikuläre Druckerhöhung nach IVH nachbilden kann (Külzer, 2021).

### 5.1.5 Stichprobenzahl

Als Ziel waren Gruppengrößen von 10 Tieren pro Gruppe und Zeitpunkt geplant. Gesamthaft verstorben sind im Verlauf der Versuchsreihe 5 Tiere der Blut-Gruppe und 2 Tiere der NaCl-Gruppe. Die verbliebene Anzahl von Tieren der Altersgruppen PT1 und PT21 mit den durchschnittlichen Standardabweichungen von PT1:  $26,09 \pm 14,79 \mu\text{m}^2$  ( $M \pm SD$ ) und PT21:  $42,61 \pm 9,38 \mu\text{m}^2$  ( $M \pm SD$ ) der Ventrikelflächen waren noch groß genug, um statistisch aussagekräftige Resultate zu liefern. Im Gegensatz zu der in der Literatur beschriebenen Rate an entwickelten Hydrozephalen (> 50 %, s.o.) erreichte unser Versuchsaufbau einen PHH bei ungefähr jedem 3. Tier. Das entspricht zwar dem klinischen Bild bei Frühgeborenen, die PHH-Rate ist aber für eine gesicherte statistische Aussage im Vergleich zur z.B. NaCl-Gruppe schlecht verteilt.

## 5.2 Methodenkritik

### 5.2.1 Operationstechnik

Die Punktionsstelle zur Injektion des allogenen Blutes war für unser Experiment festgelegt als 1 mm lateral (links und rechts) und 1 mm okzipital des Bregma, mit einer Punktionstiefe von 3 mm ventral ( $x = \pm 1 \text{ mm}$ ;  $y = + 1 \text{ mm}$ ;  $z = + 3 \text{ mm}$  relativ zum Bregma).

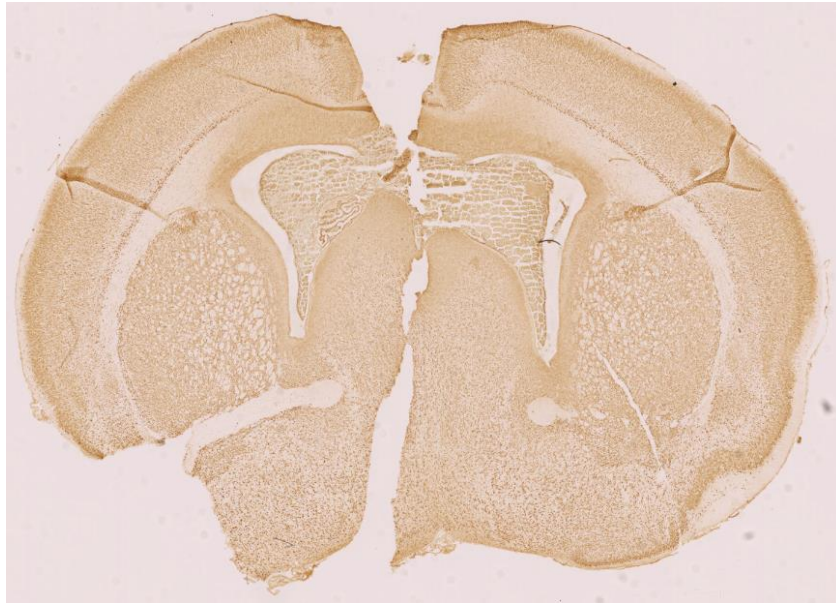
Die Punktionsnadeln waren in einem Abstand von 2 mm (1 mm rechts des Bregma, 1 mm links des Bregma) an dem stereotaktischen Rahmen befestigt.

In Vorversuchen wurde bei einigen Tieren 24 Stunden nach der OP eine MRT-Aufnahme angefertigt, um die artifiziell gesetzte Blutung zu dokumentieren (genaues Prozedere siehe (Külzer, 2021)).

Zudem ließ sich an den euthanasierten Tieren PT1 und PT3 eindrucksvoll erkennen, dass die Ventrikel blutgefüllt waren. Tatsächlich zeigte sich hier eine 100 %-ige Trefferquote, sodass unsere Injektionsmethode als zielsicher gewertet werden kann. Weiterhin ist zu erwähnen, dass sich kein retrograder Fluss aus dem Stichkanal nach Injektion der Blut- oder NaCl-Tiere zeigte.

Kritisch zu bemerken ist, dass das Trauma durch die Insertion der Nadel Auswirkungen auf das umliegende Gewebe haben kann, welche wir nicht weiter

quantifiziert haben. Idealerweise wäre eine atraumatische Auslösung einer Blutung der germinalen Matrix und folgende IVH.



*Abbildung 26 Blut-gefüllte Seitenventrikel des Tiers PHH 152 - PT1 – NeuN der Blut-Gruppe*

Wir entschlossen uns für die Verwendung von Vollblut eines Donortiers derselben Inzuchtlinie, z.T. handelte es sich hierbei um Muttertiere der vorangegangenen Würfe. So reduzierten wir eine mögliche immunologische Reaktion auf das injizierte Blut und die Koagulationsfähigkeit des Blutes blieb erhalten.

Nachteilig ist zu erwähnen, dass das Blut innerhalb weniger Minuten in das Rattenjunge injiziert werden musste, da es sonst geronnen wäre. Daher musste das Donortier für jede Intervention erneut punktiert werden. Je nach Lagerungstechnik und Stichkanal konnte eine Punktion und ausreichende Blutgewinnung zwischen einer bis mehrerer Minuten dauern, was wiederum die Narkosedauer des entsprechenden Jungtiers der Blut-Gruppe verlängerte. Um diese Variationen im Operationsprotokoll auszumerzen wäre ggf. die Injektion mit Citratblut vorzuziehen, selbst wenn man so auf die pathophysiologischen Effekte des koagulierenden Blutes verzichtet.



### **5.2.2 Immunhistochemische Färbungen**

Trotz aller Mühen, die Operations-, Fixierungs- und Färbeprozesse vergleichbar zu halten, muss davon ausgegangen werden, dass es zu einer Akkumulation kleinerer Abweichungen gekommen ist, welche sich in den Ergebnissen der immunhistochemischen Färbung widerspiegeln (z.B. durch unspezifische Färbungen und Farbintensitäten). Diese systematischen Abweichungen sind jedoch für alle Gruppen gleich aufgetreten, da keine standardisierte Überprüfung der Sensibilität und Spezifität der verwendeten immunhistochemischen Marker durchgeführt wurde. Auf jedem immunhistochemisch gefärbten Objektträger wurde mittig eine Negativkontrolle platziert, welche nicht mit dem Primär-Antikörper inkubiert wurde. Hierdurch konnte die Spezifität der Färbung des Chromogens sichergestellt werden, jedoch nicht die des Primär-Antikörpers.

Zudem ist es wichtig festzuhalten, dass die immunhistochemischen Färbungen ein semi-quantitatives Ergebnis liefern, daher ist ein Vergleich der Ausprägung einer Immunreaktivität kein adäquates Mittel, um die tatsächlich vermehrte oder -minderte Expression eines bestimmten Markers zu vergleichen. Hierfür wären andere Methoden, z.B. eine Massenspektrometrie oder eine direkte Immunfluoreszenz angebracht, da diese das tatsächliche Proteinvorkommen quantifizieren können (Torlakovic et al., 2017).

## **5.3 Ergebnisdiskussion**

### **5.3.1 Ventrikelgröße und Kortexdicke**

Die Ergebnisse der Spearman Korrelationskoeffizienten suggerieren, dass auch wenn der Hirnschädel im frühen Lebensalter noch nachgeben kann, eine stark ausgeprägte posthämorrhagische ventrikuläre Dilatation zur Dehnung bzw. zum Abbau des periventrikulären Kortex führt.

### **5.3.2 NeuN**

Besonders an PT1 und PT3 zeigten sich die Ventrikel-nahen ROI (ROI 1 und 2) des motorischen und somatosensorischen Kortex schwächer immunreaktiv als die oberflächlicheren Kortexschichten. Dieses Gefälle ließ sich bei allen Versuchsgruppen finden, sodass von einem natürlichen Reifungsprozess des zerebralen Kortex im Sinne einer neuronalen Migration, anstelle einer frühen Schädigung des Ventrikel-nahen Kortex ausgegangen werden muss. Etwa 80-90 % der neuronalen Zellen entstehen in der proliferativen Zone des dorsalen Telencephalon und migrieren von dort zu den Kortexschichten (Ayala et al., 2007).

Es gibt multiple Wege der neuronalen Migration. Hierzu gehört die radiale Migration, wenn unreife neokortikale Neurone anhand vertikaler Fasern von Gliazellen ihren Weg zum Kortex finden. Außerdem die somale Translokation, welche unabhängig von Gliazellen stattfindet und in welcher die Neurone selbst Leitprozesse an der Basalmembran verankern und durch Verkürzung derselben die eigenen Somata bewegen (Luhmann et al., 2015).

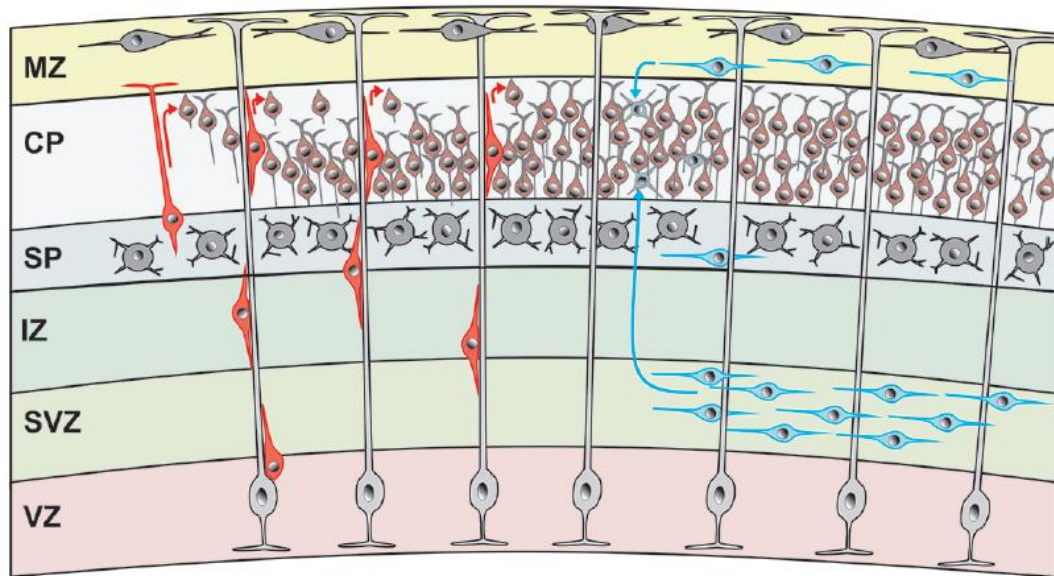


Abbildung 27 Die schematische Darstellung zeigt den Ursprung und den Migrationsweg glutamaterger (rot) und GABAerger (blau) Neurone. VZ = ventrikuläre Zone; SVZ = subventrikuläre Zone; IZ = intermediäre Zone; SP = Subplatte; CP = Kortikale Platte; MZ = Marginal Zone; übernommen aus Luhmann et al., 2015

An PT7 und PT21 zeigte sich das Phänomen der schwächeren Ventrikel-nahen IRF nur noch vereinzelt, womöglich, da zu diesen Zeitpunkten der Wachstumsschub des Gehirns und damit die Migration der Neurone in die Kortexschichten zum größten Teil beendet ist (Dobbing and Sands, 1979).

Nach Aufteilung der Blut-Gruppen PT1 und PT21 in PHVD/PHH- und Nicht-PHVD/-PHH-Tiere zeigte sich eine klare Tendenz zur stärkeren NeuN-IRF in den Tieren mit PHH 21 Tage nach Intervention.

Die weiterführende Analyse der Korrelation (Spearman-Korrelations-Koeffizient) zwischen NeuN-IRF und relativer Ventrikelfläche ergab einen signifikant-positiven Zusammenhang ( $p < 0,01$ ) im cingulären und somatosensorischen Kortex sowie im lateralen Septum. Dies bedeutet, dass mit steigender relativer Ventrikelfläche die Immunreaktivität für NeuN zunimmt. Kongruent hierzu zeigte sich eine signifikant-negative Korrelation ( $p < 0,01$ ) zwischen der NeuN-IRF und der Kortexdicke im cingulären Kortex der Blut-Gruppe PT21.

Wie schon beschrieben, ist dies möglicherweise einer Kondensation der neuronalen Somata im verschmälerten, gedehnten Kortex zuzuschreiben. Womöglich ist dieses Zusammenrücken der Somata durch einen Untergang der Gliazellen, welche das Stützgerüst des Gehirns bilden („glia“ griechisch für Leim), zu erklären (Jessen, 2004). Mit dieser Fragestellung beschäftigt sich die Dissertation von Dominik

Wocheslander: Es wurde mittels immunhistochemischer Färbung die Expression des Markers GFAP gemessen, um reaktive Astrozyten zu quantifizieren. Hier ergab sich zwischen den PT21 PHH- und Nicht-PHH-Tieren kein signifikanter Unterschied. Die Auswertungen der IBA1-Färbungen (für reaktive Mikrogliazellen) ergab eine signifikant-negative Korrelation zwischen der IRF und der Ventrikelgröße in einigen Regionen der PT1- und PT3-Blut-Gruppe (Wocheslander, 2020).

Die Ergebnisse stützen jedoch nicht die Theorie, dass ein Untergang der Gliazellen die Verdichtung der Somata verursacht.

An PT1 ergab sich kein Hinweis auf eine höhere Zelldichte in den PHVD-Tieren, sodass sicher auch der zeitliche Faktor einer ventrikulären Dilatation eine Rolle in der Umverteilung der Neurone spielt.

Die NaCl- und Sham-Gruppen zeigten keine vergleichbaren Trends.

In diesem Experiment wurde der neuronale Marker NeuN verwendet, um den Zelluntergang der Neuronen nach IVH zu quantifizieren.

NeuN ist ein sehr spezifischer Marker, welcher vorwiegend in den Nucleoli von ausdifferenzierten Neuronen vorkommt. Nur wenige Neuronen-Arten produzieren kein NeuN; so zeigen beispielsweise Photorezeptoren der Retina, die Neurone des Riechkolbens und zerebelläre Purkinjefasern keinerlei NeuN-Immunreaktivität (Ünal-Çevik et al., 2004).

Die doppelte immunhistochemische Färbung von NeuN und TUNEL (terminal dUTP nick-end labeling), welches bei der DNA-Fragmentierung und somit beim irreversiblen Zelluntergang auftritt, konnte nachweisen, dass nach einem Zellschaden (z.B. nach einer zerebralen Ischämie) die NeuN-Immunreaktivität abnimmt, während die TUNEL-Immunreaktivität zunimmt (Davoli et al., 2002). NeuN ist somit ein Marker für die Vitalität und Lebensfähigkeit von Neuronen nach einem Insult (chemisch-toxisch, ischämisch, etc.).

Die Studie von Ünal-Cevik et al. zeigte 2004 auf, dass ein Verlust der Expression von NeuN jedoch nicht zwangsläufig mit dem irreversiblen Untergang der Neurone einhergeht. Mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurden Neurone identifiziert, welche ihre NeuN-Immunreaktivität verloren hatten; diese zeigten geschrumpfte Zellen und pyknotische Nucleoli, jedoch intakte Zell- und Nucleus-Membranen. Bei einem eher milden ischämischen Insult sistiert in Zellen zunächst die Proteinsynthese, jedoch

noch nicht zwangsläufig die Hämostase zur Aufrechterhaltung der Zellintegrität (Ünal-Çevik et al., 2004).

Gegebenenfalls lässt sich dieses Ergebnis mit der mutmaßlichen Funktion von NeuN erklären: NeuN findet sich vorwiegend in Regionen mit geringer Chromatin-Densität innerhalb der Nucleoli (Lind et al., 2005). Zudem konnte die Forschungsgruppe um Mullen et al. nachweisen, dass NeuN an DNA-Stränge binden kann. Dies legt nahe, dass NeuN eine regulatorische Rolle in der Proteinsynthese übernimmt und könnte Aufschluss darüber geben, weshalb die NeuN-Immunreaktivität sinkt wenn die Proteinsynthese zugunsten der Aufrechterhaltung der Zellhämostase eingestellt wird (Mullen et al., 1992).

Zusammenfassend ist daher die Verwendung von NeuN als Marker des neuronalen Zelluntergangs gegebenenfalls nicht angebracht, da direkt nach der IVH (24 h = PT1) ein falsch-hohes Ausmaß des Zelluntergangs gemessen werden könnte. Zudem scheinen sich einige Neurone nach Verlust der NeuN-Immunreaktivität wieder zu erholen, sodass zu einem späteren Zeitpunkt in der Studie, der durch die NeuN-Färbung angenommene Zellverlust von PT1 nicht mehr reproduzierbar ist. Als Marker für einen irreversiblen Zellschaden und somit Zellverlust scheint hingegen die TUNEL-Färbung angebrachter, wie auch von Ahn et al. verwendet. Nach IVH-Induktion durch bilaterale intraventrikuläre Injektion 100 µl maternalen Vollbluts in jeden Ventrikel von 4 Tage-alten Sprague-Dawley Rattenjungen, konnte ein signifikanter Anstieg in TUNEL-positiven Zellen gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe bewiesen werden ( $p < 0,05$ ) (Ahn et al., 2013).

### **5.3.3 SMI-32**

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung gegen SMI-32 ergaben eine zunehmende IRF der PHH-Tiere im Vergleich zu den Nicht-PHH-Tieren der Blut-Gruppe PT21. Zu den anderen Zeitpunkten zeigte sich diese Tendenz nicht.

Möglicherweise lässt sich dies, zumindest im Kortextbereich, dadurch erklären, dass eine Schädigung der kortikalen Axone erst nach prolongiertem Hydrozephalus bzw. zunehmender Ventrikulomegalie eintritt. Die Forschungsgruppe um Jones et al. konnte nachweisen, dass bis zu etwa 10 Tagen postnatal bei H-Tx Rattenjungen die Ventrikulomegalie linear zunimmt und erst danach ein Anstieg des intrakraniellen Drucks zu verzeichnen ist (Jones et al., 2000). Vermutlich gilt ähnliches für einen

posthämorrhagischen Hydrozephalus bzw. eine posthämorrhagische ventrikuläre Dilatation, sodass in den Gruppen PT1, PT3 und PT7 zumindest im kortikalen Bereich keine Axonschäden zu erwarten sind.

Dazu passend ergab sich in der PT21-Gruppe eine Tendenz für eine positive Korrelation ( $p > 0,01$ ) zwischen SMI-32-IRF und relativer Ventrikelfläche über alle ROI Regionen der Blut-Gruppe; lediglich die Korrelation im cingulären Kortex zeigte sich als signifikant ( $p < 0,01$ ). Zudem zeigte sich der kongruente negative Korrelations-Trend zwischen der Kortexdicke und der immunreaktiven Fläche des cingulären Kortex und des motorischen Kortex 21 Tage nach intraventrikulärer Blutinjektion.

Diese Ergebnisse der Blut-Gruppen deuten darauf hin, dass für den axonalen Schaden der cinguläre Kortex besonders sensibel ist. Dies hängt vermutlich mit der unmittelbaren Nähe zum Corpus Callosum und der dadurch erhöhten Anzahl großer, den cingulären Kortex durchziehender, Axone zusammen (DeFelipe et al., 2002). Durch die Inkonstanz der Ergebnisse über den zeitlichen Verlauf hinweg (keine Korrelationen an PT1 oder PT7) ist der Zusammenhang zwischen axonalen Schaden und Posttrauma-Zeit jedoch nicht klar zu eruieren.

In der PT21-NaCl-Gruppe zeigte sich eine entgegengesetzte negative Korrelation ( $p < 0,5$ ) zwischen relativer Ventrikelfläche und SMI-32-IRF, d.h. je größer der Ventrikel in dieser Gruppe ist, desto geringer erscheint der axonale Schaden. Hier lässt sich womöglich eine der Ursachen der axonalen Schädigung ableiten und zurückführen auf die Blutabbauprodukte nach IVH.

Vorangegangene Studien zeigten einen Zusammenhang zwischen axonaler Schädigung und dem  $Ca^{++}$ -Gehalt des umliegenden Gewebes und Liquors. Zudem konnte eine  $Ca^{++}$ -induzierte Aktivierung von Caplain Proteasen nachgewiesen werden, welche den axonalen Abbau über Auflösung des Zytoskelett vorantreiben. In diesem Experiment wurden Ratten mit Kaolin-induziertem Hydrozephalus verwendet und die axonale Schädigung mit mouse monoclonal anti-neurofilament 68 kDa nachgewiesen (Del Bigio, 2000).

Dieselbe Studiengruppe konnte schon zuvor nachweisen, dass der axonale Schaden erst mit ausgeprägter Ventrikulomegalie auftritt (Del Bigio and Zhang, 1998).

Möglicherweise liegt die Erklärung unserer Ergebnisse daher in der Tatsache, dass die NaCl-Gruppe PT21 keine posthämorrhagischen Hydrozephalen entwickelt hat, im

Gegensatz zur Blut-Gruppe PT21, sodass eher die vorliegende ventrikuläre Dilatation der auslösende Faktor einer axonalen Schädigung ist anstelle des Induktionsmechanismus.

Diese Annahme wird gestützt von der Forschungsgruppe um McAllister, welche nachweisen konnte, dass der konstante Dehnungsstress eines Hydrozephalus durch eine druckassoziierte Hypoperfusion des periventrikulären Gewebes zu einem Abbau der ependymalen Zellen führt, welche den Liquor von der dahinterliegenden weißen Hirnsubstanz schützen (McAllister, 2012).

In der Sham-Gruppe PT21 zeigte sich keine klare Richtung zwischen axonalem Schaden und Ventrikelgröße, sodass sich die Frage stellt, weshalb die NaCl-Gruppe einen nachweisbar geringeren axonalen Schaden vorweist als die nicht operierte Sham-Gruppe. Im Gegensatz zum Blut kann die Injektion von NaCl rasch abgebaut werden, da sich hier kein Blutkoagel und ein resultierender Hydrozephalus occlusus bildet. Gegebenenfalls handelt es sich durch die nur kurz stattgefundenen Dehnung der Ventrikel und den raschen Druckverlust bei der NaCl-Gruppe um eine überschießende Reparatur der Axone.

An den Zeitpunkten PT7 und PT3 zeigten sich Trends und Signifikanzen, welche die Theorie unterstützen, dass der auslösende Faktor der ventrikulären Dilatation nicht ausschlaggebend ist für die axonale Schädigung. Ferner zeigt sich, dass das periventrikuläre Striatum und das laterale Septum vulnerabler zu sein scheinen als die kortikalen Bereiche. Dies wiederum passt zu den Studien von Del Bigio, welche nachwiesen, dass primär die periventrikuläre weiße Hirnsubstanz aufgrund einer ventrikulären Dilatation geschädigt wird (Del Bigio, 2010).

#### **5.3.4 Caspase 3**

Für die aktivierte Caspase 3 Immunreaktivität weisen die Kortexregionen eine gleichstarke Ausprägung vor wie die periventrikulären Regionen. Dies ist durch die zelluläre Unspezifität von aktivierter Caspase 3 zu erklären, da es nicht nur in Neuronen, sondern auch in Oligodendrozyten, Endothelzellen und Leukozyten bei aktivierter Apoptose exprimiert wird (Gong et al., 2001).

In unserem Experiment zeigte sich 21 Tage nach Intervention mit Blut eine positive Korrelation zwischen der aktivierten Caspase 3-IRF und der relativen Ventrikelfläche

im cingulären Kortex ( $p < 0,01$ ). In Einklang hiermit ergab sich auch eine signifikant-negative Korrelation zwischen der aktivierten Caspase 3-IRF und der Kortexdicke des cingulären Kortex ( $p < 0,01$ ).

Im Gegensatz hierzu zeigte sich eine signifikant-negative Korrelation zwischen der aktivierten Caspase 3-IRF und der relativen Ventrikelfläche im somatosensorischen Kortex ( $p < 0,05$ ) und lateralen Septum ( $p < 0,05$ ) in der Blut-Gruppe PT1. Es lässt sich vermuten, dass eine kurze Zeitspanne nach IVH zu keiner signifikant vermehrten Aktivierung von Caspase 3 führt. Bei vorliegenden apoptotischen Zellen müsste aktivierte Caspase 3 bereits nach 4 Stunden nachweisbar sein (Sharangpani et al., 2008). In der Studie von Sharangpani et al. erfolgte die zervikale Injektion trächtiger Ratten mit Lipopolysacchariden zu einem kritischen Zeitpunkt der embryonalen Hirnentwicklung. Resultierend entwickelte sich ein perinataler Hirnschaden, sowie eine inflammatorische Reaktion. Die immunreaktive Färbung der intrauterin gewonnenen Hirne der Rattenjungen zeigten einen Anstieg der aktivierten Caspase 3 vier Stunden nach Lipopolysaccharid-Injektion (Sharangpani et al., 2008).

In einem Tiermodell mit Wistar Rattenjungen, welche an P7 durch eine intrazisternale Injektion von 20% Kaolin einen Hydrozephalus entwickelten, konnte durch parallele immunhistochemische Färbung mit NeuN und aktivierter Caspase 3 an P21 der Nachweis neuronaler Apoptose in Tieren mit einem PHH 14 Tage post-Induktion erbracht werden (Garcia et al., 2017).

In einem weiteren Tiermodell mit Kaninchenjungen und intraperitonealer Glycerol-Injektion drei Stunden postpartum (Kontrollgruppe mit Kochsalzlösung injiziert) zeigte sich insbesondere 24 Stunden nach IVH-Induktion ein Anstieg der Caspase 3 Aktivität in der periventrikulären Region, diese nahm im weiteren Verlauf (48 und 72 Stunden) ab (Georgiadis et al., 2008).

Dieselbe Gruppe untersuchte postmortale humane Hirne auf Caspase 3 Aktivität und konnte feststellen, dass diese in Hirnen mit nachgewiesener IVH erhöht war im Vergleich zu Hirnen ohne IVH. Dies bezieht sich jedoch vor allem auf die periventrikuläre Region, der Kortex scheint nicht affektiert zu sein. Ein möglicher Grund hierfür ist die proportional dickere Schicht an weißer Hirnsubstanz im Menschen, welche die graue Hirnsubstanz (mit den neuronalen Somata) vor den Einflüssen der intraventrikulären Blutung schützt (Georgiadis et al., 2008).

Ein ähnlicher schützender Effekt ist vermutlich durch die weiße Hirnsubstanz in den Rattenhirnen gegeben.



Zudem konnte gezeigt werden, dass in der weißen Hirnsubstanz vornehmlich Axone und Oligodendrozyten geschädigt werden. Durch den Druck- und Dehnungsstress kommt zu einer Minderdurchblutung der weißen Substanz; Oligodendrozyten sind besonders sensibel gegenüber einer Ischämie (Del Bigio and Zhang, 1998). Ferner ist es möglich, dass Oligodendrozyten in den apoptotischen Vorgang eintreten, wenn sie axonale Kontakte verlieren und daher axonale Schäden den Untergang der Oligodendrozyten nach sich ziehen (Barres et al., 1993).

Unsere Ergebnisse bezüglich des zeitlichen Verlaufs sind daher kongruent mit vorherigen Studien, welche berichten, dass der apoptotische Zelluntergang im kortikalen Bereich erst 3-4 Wochen nach Hydrozephalus-Induktion stattfindet (McAllister, 2012). Was jedoch weiterhin fraglich bleibt, ist, dass eine erhöhte Rate an apoptotischen Zelluntergängen im periventrikulären Striatum und lateralen Septum zu erwarten gewesen wäre.

## **5.4 Fazit**

In der Analyse unseres Tiermodells wurden einige Schwächen aufgetan, zum einen die vergleichsweise geringe Hydrozephalus-Rate von 30 % (welche wiederum der PHH-Rate von humanen Frühgeborenen nicht fern ist) und deren möglicher Zusammenhang mit dem Alter bei Intervention. Zudem die Verwendung von allogenen Vollblut, welches eine einheitliche Narkose- und Operationsdauer schwierig macht. Ferner die geringe Stichprobenzahl, welche die Erhebung von Signifikanzen schwierig gestaltet.

Für weiterführende Studien sollte daher ein vergleichbarer Interventionszeitpunkt (P4 oder P7) verwendet werden, zudem würde sich bezüglich der besseren Vergleichbarkeit der Operations- und Narkosedauer die Verwendung von zentrifugiertem Citratblut anbieten, auch weil es durch den höheren Hämatokrit eher den physiologischen Verhältnissen von Frühgeborenen entspricht.

Bezüglich der immunhistochemischen Färbungen mit der Frage nach zellulärem Untergang lässt sich aussagen, dass es in Tieren mit PHVD/PHH zu einem Anstieg der neuronalen Zellkörperdichte kommt, bei zunehmender Ventrikelfläche bzw. abnehmender Kortexdicke. Ein tatsächlicher neuronaler Untergang ließ sich nicht quantifizieren. Die Aktivierung des apoptotischen Zelluntergangs zeigte sich erst 3

Wochen post-Trauma, ggf. weil vorher noch kein Anstieg des intrazerebralen Drucks zu verzeichnen war. Jedoch zeigten sich die periventrikulären Regionen schon zu früheren Zeitpunkten vulnerabler. In der Literatur ist beschrieben, dass vornehmlich Oligodendrozyten durch ihre hohe Sensibilität auf Ischämie und den Verlust axonaler Kontakte in die Apoptose eintreten (Barres et al., 1993; Del Bigio and Zhang, 1998).

Hier wäre eine ergänzende Zellzählung und ggf. Beurteilung der Zellmorphologie sinnvoll, um Neurone von Oligodendrozyten zu unterscheiden. Alternativ könnte eine simultane Färbung mit NeuN und Caspase 3 durchgeführt werden.

Der Marker für axonale Schäden zeigte sich ubiquitär am stärksten exprimiert in der PT21 Blut-Gruppe, jedoch wiesen die Ergebnisse der vorherigen Posttrauma-Zeitpunkte PT3 und PT7 darauf hin, dass schon früh vor allem das periventrikuläre Gewebe axonale Schäden aufweist. Hierbei machte es keinen Unterschied, ob es sich um die Blut- oder NaCl-Tiere handelte, sodass vermutlich die ventrikuläre Dilatation der auslösende Faktor ist, jedoch nicht der auslösende Mechanismus dieser.

## 6. Zusammenfassung

Sehr früh geborene Kinder (< 30. Schwangerschaftswoche) erleiden häufig (mit bis zu 25 %) eine Blutung der germinalen Matrix, welche sich in starker Ausprägung zu einer intraventrikulären Hämorrhagie ausweiten kann. Eine Folge dieser Blutung ist ein durch verschiedene Pathomechanismen auftretendes Ungleichgewicht zwischen Liquorproduktion und -abfluss und eine subsequente Aufweitung der Ventrikel; es bildet sich ein posthämorrhagischer Hydrozephalus.

Zur Erforschung der Pathomechanismen und intrazerebralen Folgen eines PHH entwickelten wir ein Tiermodell. Es wurden 102 Sprague-Dawley Rattenjunge eingeschlossen. Von diesen erhielten 36 am ersten postnatalen Tag (24-48 h postpartum) eine biventrikuläre Injektion mit 100 µl allogenen Donorblut, 32 Tiere erhielten eine biventrikuläre Injektion mit isotoner Kochsalzlösung und 34 Tiere wurden Schein-operiert. Zu den Posttrauma-Zeitpunkten PT1 (1 Tag), PT3 (3 Tage), PT7 (7 Tage) und PT21 (21 Tage) wurden die Tiere euthanasiert und die Hirne entnommen.

Die erste Hypothese dieser Arbeit lautete:

1. Mit einer IVH am ersten postnatalen Tag lässt sich bereits früh nach der Blutung die Entwicklung von posthämorrhagischen Hydrozephalen (PHH) induzieren und erkennen.

Unser Tiermodell zeigte eine Hydrozephalus-Rate von 30 % in der Blut-Gruppe PT21. Es ist daher zur Erforschung eines posthämorrhagischen Hydrozephalus geeignet und entspricht sogar der realen klinischen Inzidenz bei frühgeborenen Menschen. Jedoch zeigten andere Studien eine deutlich höhere Hydrozephalus-Rate, sodass eine Anpassung des Tiermodells sinnvoll scheint um eine höhere Anzahl von Tieren zur Testung der pathophysiologischen Vorgänge zu erhalten. Um dies zu erreichen, ergeben sich vornehmlich die Gruppengröße, der Interventionszeitpunkt und die Verwendung von allogenen Vollblut als mögliche Ansatzpunkte.

Die zweite Hypothese besagt:

2. Die intraventrikuläre Blutung an PND1 schädigt in den ersten Tagen Zellen der grauen und weißen Substanz, immunhistochemisch nachgewiesen mit Antikörpern

gegen Neuronale Nuclei (NeuN) und Neurofilamente (SMI-32), was zur Entwicklung des PHH beiträgt.

In dieser Arbeit stand somit der Zusammenhang zwischen PHH und neuronalem Zelluntergang bzw. axonalem Schaden im Vordergrund, sodass wir immunhistochemische Färbungen für neuronale Zellkörper (NeuN) und zur Bestimmung axonaler Schäden (SMI-32) verwendeten.

Unsere Ergebnisse zeigten eine zunehmende Immunreaktivität der Kortexschichten auf NeuN am spätesten Posttrauma-Zeitpunkt (PT21), vermutlich zeigt sich hier eine vermehrte Migration und Verdichtung der Zellkörper in den ausgedünnten Kortex, ein definitiver Zelluntergang konnte hier, auch anhand der Zellzählung, nicht belegt werden. Die Resultate der SMI-32-Färbung deuten darauf hin, dass es durch die Entwicklung eines Hydrozephalus und den damit einhergehenden prolongierten Dehnungsstress des Gehirns zu axonalen Schäden kommt. Ob Blut als auslösende Substanz eine Rolle spielt, lässt sich anhand unserer Daten nicht klar festlegen, da die Kontrollgruppe (NaCl) keine Hydrozephalen entwickelte.

Die dritte Hypothese lautete:

3. Verzögerter Zelltod (Apoptose), immunhistochemisch nachgewiesen mit einem Antikörper gegen aktivierte Caspase 3, trägt wesentlich zur Ausbildung des PHH bei.

Unsere Ergebnisse der aktivierten Caspase 3-Immunreaktivität suggerieren, dass es erst spät im Verlauf der Entwicklung des Hydrozephalus zu einer Zunahme der Apoptose im Kortex kommt. Sodass fraglich ist, ob die Apoptose neuronaler Zellen einen Hydrozephalus auslöst oder ob ein Hydrozephalus den neuronalen Zelltod bedingt. Letzteres könnte durch den stetig ansteigenden intrazerebralen Druck und die hiermit einhergehende Hypoperfusion und Ischämie erklärt werden.

In Zusammenschau dieser Ergebnisse sollten weitere Studien zum einen ein überarbeitetes Tiermodell mit höherer Stichprobenzahl und einen späteren Interventionszeitpunkt verwenden, zum anderen sollte zur Spezifizierung des stattfindenden Zelluntergangs über eine genaue Differenzierung der Zellen (ggf. mit Doppel-Färbung oder direkter Immunfluoreszenz) nachgedacht werden, da die Erhebung der immunreaktiven Fläche keine quantitative Darstellung der Proteinexpression darstellt.

## 7. Literaturverzeichnis

Ahn, S.Y., Chang, Y.S., Sung, D.K., Sung, S.I., Yoo, H.S., Lee, J.H., Oh, W.I., and Park, W.S. (2013). Mesenchymal Stem Cells Prevent Hydrocephalus After Severe Intraventricular Hemorrhage. *Stroke* 44, 497–504.

Ayala, R., Shu, T., and Tsai, L.-H. (2007). Trekking across the Brain: The Journey of Neuronal Migration. *Cell* 128, 29–43.

Baer, V.L., Lambert, D.K., Henry, E., Snow, G.L., Butler, A., and Christensen, R.D. (2011). Among very-low-birth-weight neonates is red blood cell transfusion an independent risk factor for subsequently developing a severe intraventricular hemorrhage? *Transfusion (Paris)* 51, 1170–1178.

Balasubramaniam, J., Xue, M., Buist, R.J., Ivanko, T.L., Natuik, S., and Del Bigio, M.R. (2006). Persistent motor deficit following infusion of autologous blood into the periventricular region of neonatal rats. *Exp. Neurol.* 197, 122–132.

Ballabh, P. (2010). Intraventricular Hemorrhage in Premature Infants: Mechanism of Disease. *Pediatr. Res.* 67, 1–8.

Ballabh, P. (2014). Pathogenesis and Prevention of Intraventricular hemorrhage. *Clin. Perinatol.* 41, 47–67.

Barres, B.A., Schmid, R., Sendtner, M., and Raff, M.C. (1993). Multiple extracellular signals are required for long-term oligodendrocyte survival. 13.

Chen, Q., Feng, Z., Tan, Q., Guo, J., Tang, J., Tan, L., Feng, H., and Chen, Z. (2017). Post-hemorrhagic hydrocephalus: Recent advances and new therapeutic insights. *J. Neurol. Sci.* 375, 220–230.

Cherian, S., Thoresen, M., Silver, I.A., Whitelaw, A., and Love, S. (2004). Transforming growth factor-betas in a rat model of neonatal posthaemorrhagic hydrocephalus. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 30, 585–600.

Cherian, S.S., Love, S., Silver, I.A., Porter, H.J., Whitelaw, A.G.L., and Thoresen, M. (2003). Posthemorrhagic Ventricular Dilation in the Neonate: Development and Characterization of a Rat Model. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 62, 292–303.

Crews, L., Wyss-Coray, T., and Masliah, E. (2004). Insights into the Pathogenesis of Hydrocephalus from Transgenic and Experimental Animal Models. *Brain Pathol.* 14, 312–316.

Davoli, M.A., Fourtounis, J., Tam, J., Xanthoudakis, S., Nicholson, D., Robertson, G.S., Ng, G.Y.K., and Xu, D. (2002). Immunohistochemical and biochemical assessment of caspase-3 activation and DNA fragmentation following transient focal ischemia in the rat. *Neuroscience* 115, 125–136.

DeFelipe, J., Alonso-Nanclares, and Arellano, J.I. (2002). Microstructure of the neocortex: Comparative aspects. *J. Neurocytol.* 18.

- Del Bigio, M.R. (2000). Calcium-Mediated Proteolytic Damage in White Matter of Hydrocephalic Rats? *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 59, 946–954.
- Del Bigio, M.R. (2010). Neuropathology and structural changes in hydrocephalus. *Dev. Disabil. Res. Rev.* 16, 16–22.
- Del Bigio, M.R., and Zhang, Y.W. (1998). Cell Death, Axonal Damage, and Cell Birth in the Immature Rat Brain Following Induction of Hydrocephalus. *Exp. Neurol.* 154, 157–169.
- Deshmukh, M., and Patole, S. (2017). Antenatal corticosteroids for neonates born before 25 Weeks—A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* 12.
- Dobbing, J., and Sands, J. (1979). Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum. Dev.* 3, 79–83.
- El-Ganzoury, M.M., El-Farrash, R.A., Saad, A.A., Ali, M.S., El-Bhbiti, A.R., and Selem, A.M. (2014). Antenatal administration of vitamin K1: relationship to vitamin K-dependent coagulation factors and incidence rate of periventricular-intraventricular hemorrhage in preterm infants; Egyptian randomized controlled trial. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* 27, 816–820.
- Feng, Z., Tan, Q., Tang, J., Li, L., Tao, Y., Chen, Y., Yang, Y., Luo, C., Feng, H., Zhu, G., et al. (2017). Intraventricular administration of urokinase as a novel therapeutic approach for communicating hydrocephalus. *Transl. Res.* 180, 77-90.e2.
- Galbreath, E., Kim, S.J., Park, K., Brenner, M., and Messing, A. (1995). Overexpression of TGF-beta 1 in the central nervous system of transgenic mice results in hydrocephalus. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 54, 339–349.
- Gao, F., Liu, F., Chen, Z., Hua, Y., Keep, R.F., and Xi, G. (2014). Hydrocephalus after Intraventricular Hemorrhage: The Role of Thrombin. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 34, 489–494.
- Garcia, C.A.B., Catalão, C.H.R., Machado, H.R., Júnior, I.M., Romeiro, T.H., Peixoto-Santos, J.E., Santos, M.V., and da Silva Lopes, L. (2017). Edaravone reduces astrogliosis and apoptosis in young rats with kaolin-induced hydrocephalus. *Childs Nerv. Syst.* 33, 419–428.
- Garton, T., Keep, R.F., Wilkinson, D.A., Strahle, J.M., Hua, Y., Garton, H.J.L., and Xi, G. (2016). Intraventricular Hemorrhage: the Role of Blood Components in Secondary Injury and Hydrocephalus. *Transl. Stroke Res.* 7, 447–451.
- Georgiadis, P., Xu, H., Chua, C., Hu, F., Collins, L., Huynh, C., LaGamma, E.F., and Ballabh, P. (2008). Characterization of Acute Brain Injuries and Neurobehavioral Profiles in a Rabbit Model of Germinal Matrix Hemorrhage. *Stroke* 39, 3378–3388.
- Gong, C., Qian, J., and Hoff, J.T. (2001). Intracerebral Hemorrhage-induced Neuronal Death. 48, 9.
- Gudi, V., Gai, L., Herder, V., Tejedor, L.S., Kipp, M., Amor, S., Sühs, K.-W., Hansmann, F., Beineke, A., Baumgärtner, W., et al. (2017). Synaptophysin Is a Reliable Marker for Axonal Damage. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 76, 109–125.

Hanley, D.F. (2009). Intraventricular Hemorrhage: Severity Factor and Treatment Target in Spontaneous Intracerebral Hemorrhage. *Stroke* 40, 1533–1538.

Harris, N.G., McAllister II, J.P., Conaughty, J.M., and Jones, H.C. (1996). The Effect of Inherited Hydrocephalus and Shunt Treatment on Cortical Pyramidal Cell Dendrites in the Infant H-Tx Rat. *Exp. Neurol.* 141, 269–279.

Hirst, R.A., Rutman, A., and O'Callaghan, C. (2009). Hydrogen peroxide at a concentration used during neurosurgery disrupts ciliary function and causes extensive damage to the ciliated ependyma of the brain. *Childs Nerv. Syst. ChNS Off. J. Int. Soc. Pediatr. Neurosurg.* 25, 559–561.

Hua, Y., Keep, R.F., Hoff, J.T., and Xi, G. (2007). Brain Injury After Intracerebral Hemorrhage: The Role of Thrombin and Iron. *Stroke* 38, 759–762.

Humberg, A., Härtel, C., Paul, P., Hanke, K., Bossung, V., Hartz, A., Fasel, L., Rausch, T.K., Rody, A., Herting, E., et al. (2017). Delivery mode and intraventricular hemorrhage risk in very-low-birth-weight infants: Observational data of the German Neonatal Network. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 212, 144–149.

Jessen, K.R. (2004). Glial cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 1861–1867.

Johanson, C.E., Szmydynger-Chodobska, J., Chodobski, A., Baird, A., McMillan, P., and Stopa, E.G. (1999). Altered formation and bulk absorption of cerebrospinal fluid in FGF-2-induced hydrocephalus. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* 277, R263–R271.

Jones, H.C., Harris, N.G., Rocca, J.R., and Andersohn, R.W. (2000). Progressive tissue injury in infantile hydrocephalus and prevention/reversal with shunt treatment. *Neurol. Res.* 22, 89–96.

Karimy, J.K., Zhang, J., Kurland, D.B., Theriault, B.C., Duran, D., Stokum, J.A., Furey, C.G., Zhou, X., Mansuri, M.S., Montejo, J., et al. (2017). Inflammation-dependent cerebrospinal fluid hypersecretion by the choroid plexus epithelium in posthemorrhagic hydrocephalus. *Nat. Med.* 23, 997–1003.

Kazan, S., Gura, A., Uçar, T., Korkmaz, E., Ongun, H., and Akyuz, M. (2005). Hydrocephalus after intraventricular hemorrhage in preterm and low-birth weight infants: analysis of associated risk factors for ventriculoperitoneal shunting. *Surg. Neurol.* 64, S77–S81.

Klinger, G., Osovsky, M., Boyko, V., Sokolover, N., Sirota, L., Lerner-Geva, L., and Reichman, B. (2016). Risk factors associated with post-hemorrhagic hydrocephalus among very low birth weight infants of 24–28 weeks gestation. *J. Perinatol.* 36, 557–563.

Koschnitzky, J.E., Keep, R.F., Limbrick, D.D., McAllister, J.P., Morris, J.A., Strahle, J., and Yung, Y.C. (2018). Opportunities in posthemorrhagic hydrocephalus research: outcomes of the Hydrocephalus Association Posthemorrhagic Hydrocephalus Workshop. *Fluids Barriers CNS* 15.

Külzer, T.N. (2021). Post-hämorrhagischer Hydrozephalus bei Frühgeborenen: Einfluss der Blut-Hirnschranke und des Wasserhaushalts anhand Veränderungen des „tight junction“ Proteins Claudin-5 der astrozytären Aquaporin-4 Wasserkanäle und des Übertritts von IgG ins Hirnparenchym auf die Entwicklung eines PHH im Rattenmodell.

Lee, I.-C., Lee, H.-S., Su, P.-H., Liao, W.-J., Hu, J.-M., and Chen, J.-Y. (2009). Posthemorrhagic Hydrocephalus in Newborns: Clinical Characteristics and Role of Ventriculoperitoneal Shunts. *Pediatr. Neonatol.* 50, 26–32.

Leech, R.W., and Kohlen, P. (1974). Subependymal and Intraventricular Hemorrhages in the Newborn. *Am. J. Pathol.* 77, 465–476.

Lim, J., and Hagen, E. (2019). Reducing Germinal Matrix-Intraventricular Hemorrhage: Perinatal and Delivery Room Factors. *NeoReviews* 20, e452–e463.

Lind, D., Franken, S., Kappler, J., Jankowski, J., and Schilling, K. (2005). Characterization of the neuronal marker NeuN as a multiply phosphorylated antigen with discrete subcellular localization. *J. Neurosci. Res.* 79, 295–302.

Lodhia, K.R., Shakui, P., and Keep, R.F. (2006). Hydrocephalus in a rat model of intraventricular hemorrhage. In *Brain Edema XIII*, J.T. Hoff, R.F. Keep, G. Xi, and Y. Hua, eds. (Vienna: Springer-Verlag), pp. 207–211.

Luhmann, H.J., Fukuda, A., and Kilb, W. (2015). Control of cortical neuronal migration by glutamate and GABA. *Front. Cell. Neurosci.* 9.

McAllister, J.P. (2012). Pathophysiology of congenital and neonatal hydrocephalus. *Semin. Fetal. Neonatal Med.* 17, 285–294.

Morales, D.M., Townsend, R.R., Malone, J.P., Ewersmann, C.A., Macy, E.M., Inder, T.E., and Limbrick, D.D. (2012). Alterations in Protein Regulators of Neurodevelopment in the Cerebrospinal Fluid of Infants with Posthemorrhagic Hydrocephalus of Prematurity. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 11.

Mullen, R.J., Buck, C.R., and Smith, A.M. (1992). NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. 11.

Papile, L.-A., Burstein, J., Burstein, R., and Koffler, H. (1978). Incidence and evolution of subependymal and intraventricular hemorrhage: A study of infants with birth weights less than 1,500 gm. *J. Pediatr.* 92, 529–534.

Rabe, H., Diaz-Rossello, J.L., Duley, L., and Dowswell, T. (2012). Effect of timing of umbilical cord clamping and other strategies to influence placental transfusion at preterm birth on maternal and infant outcomes. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD003248.

Robinson, S. (2012). Neonatal posthemorrhagic hydrocephalus from prematurity: pathophysiology and current treatment concepts. *J. Neurosurg. Pediatr.* 9, 242–258.

Sachs, L. (1993). *Statistische Methoden - Planung und Auswertung* (Berlin: Heidelberg: Springer).



Sharangpani, A., Takanohashi, A., and Bell, M.J. (2008). Caspase activation in fetal rat brain following experimental intrauterine inflammation. *Brain Res.* 1200, 138–145.

Stoll, B.J., Hansen, N.I., Bell, E.F., Walsh, M.C., Carlo, W.A., Shankaran, S., Laptook, A.R., Sánchez, P.J., Van Meurs, K.P., Wyckoff, M., et al. (2015). Trends in Care Practices, Morbidity, and Mortality of Extremely Preterm Neonates, 1993–2012. *JAMA* 314, 1039–1051.

Strahle, J., Garton, H.J.L., Maher, C.O., Muraszko, K.M., Keep, R.F., and Xi, G. (2012). Mechanisms of Hydrocephalus After Neonatal and Adult Intraventricular Hemorrhage. *Transl. Stroke Res.* 3, 25–38.

Strahle, J.M., Garton, T., Bazzi, A.A., Kilaru, H., Garton, H.J.L., Maher, C.O., Muraszko, K.M., Keep, R.F., and Xi, G. (2014). Role of Hemoglobin and Iron in Hydrocephalus After Neonatal Intraventricular Hemorrhage: *Neurosurgery* 75, 696–706.

Torlakovic, E.E., D'Arrigo, C., Francis, G.D., Hall, J.A., Marchetti, A., Nielsen, S., Zhou, X., and Taylor, C.R. (2017). Evolution of Quality Assurance for Clinical Immunohistochemistry in the Era of Precision Medicine – Part 2: Immunohistochemistry Test Performance Characteristics. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 25, 7.

Ünal-Çevik, I., Kılınç, M., Gürsoy-Özdemir, Y., Gurer, G., and Dalkara, T. (2004). Loss of NeuN immunoreactivity after cerebral ischemia does not indicate neuronal cell loss: a cautionary note. *Brain Res.* 1015, 169–174.

Wang, G., Zhang, J., Hu, X., Zhang, L., Mao, L., Jiang, X., Liou, A.K.-F., Leak, R.K., Gao, Y., and Chen, J. (2013). Microglia/Macrophage Polarization Dynamics in White Matter after Traumatic Brain Injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 33, 1864–1874.

Whitelaw, A. (2001). Intraventricular haemorrhage and posthaemorrhagic hydrocephalus: pathogenesis, prevention and future interventions. *Semin. Neonatol.* 6, 135–146.

Whitelaw, A. (2002). Posthaemorrhagic ventricular dilatation. *Arch. Dis. Child. - Fetal Neonatal Ed.* 86, 72F – 74.

Whitelaw, A., Mowinckel, M.-C., and Abildgaard, U. (1995). Low levels of plasminogen in cerebrospinal fluid after intraventricular haemorrhage: a limiting factor for clot lysis? *Acta Paediatr.* 84, 933–936.

Wocheslander, D. (2020). Experimentelle intraventrikuläre Hämorrhagie bei neugeborenen Ratten: Einfluss der Inflamationsreaktion über die Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten sowie der Expression von High Mobility Group Box-1 und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  auf die Entwicklung eines post-hämorrhagischen Hydrozephalus.

## 8. Anhang

### 8.1 Verbrauchsmaterialien

#### Narkose/Analgesie

Medetomidinhydrochlorid	Dorbene vet; Zoetis Deutschland GmbH, Berlin
Midazolam	Hameln Pharma Plus GmbH, Hameln
Isofluran	Forene®, Abbott, Wiesbaden
Xylocainspray	Aspen Germany GmbH, Bad Oldesloe

#### Operation

Nadel	Sterican® G20; B. Braun Melsungen AG
Nadel	Sterican® G23; B. Braun Melsungen AG
Nadel	Sterican® G26; B. Braun Melsungen AG
Spritze	Injekt®-Solo, 5 ml, B. Braun Melsungen AG
Spritze	Injekt®-Solo, 2 ml, B. Braun Melsungen AG
Spritze	Injekt®-F, 1ml, B. Braun Melsungen AG
Skalpell	Cutfix®, B. Braun Melsungen AG
Präparationsschere	Aesculap AG, Tuttlingen
Pinzette chirurgisch	Aesculap AG, Tuttlingen
Pinzette anatomisch	Aesculap AG, Tuttlingen
Mikropinzette gebogen	Aesculap AG, Tuttlingen
Polyethylenschläuche	0,4 mm Innendurchmesser; Smiths Medical Deutschland GmbH, Grasbrunn
NaCl-Infusionslösung	0,9%; B. Braun Melsungen AG
Histoacrylkleber	Histoacryl Gewebekleber; B. Braun Melsungen AG
Hautfaden	3,0 Prolene, Ethicon GmbH, Norderstedt

#### Perfusion/Nachfixierung

Infusionsbesteck	Intrafix® SafeSet; B. Braun Melsungen AG
Dreiwegehahn	Discofix-3; B. Braun, Melsungen AG
Fixierlösung	40g/L Paraformaldehyd Nr. 0335.3 Carl Roth GmbH, Karlsruhe 15,7g/L di-Natriumhydrogenphosphat Nr.6586; Merck

	KGaA, Darmstadt 3,8g/L Natriumdihydrogenphosphat Nr.6346; Merck KGaA, Darmstadt
Eppendorfgefäß	50 ml Zentrifugenröhrchen, Falcon®
Raspartorium	Aesculap, Tuttlingen
Trockeneis	
Saccharose-Lösung 20%	D+Sacchrose, Art.-Nr. 9286.2; Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Isopentan	2-Methylbutan, Art.-Nr. 3927.1; Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Objektträger	SuperFrost®; Karl Hecht GmbH & Co KG Sondheim v. d. Rhön
Kryo-Gel	Cryo-Gel, Surgipath®; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Präparationsschere	Aesculap AG, Tuttlingen
Pinzette chirurgisch	Aesculap AG, Tuttlingen
Pinzette anatomisch	Aesculap AG, Tuttlingen
Skalpell	Cutfix®, B. Braun Melsungen AG

## Färbungen

Hämalaun	Mayer's Hämalaun, Fluka, Heidelberg
Eosin	1%, Merck AG, Darmstadt
Alkoholreihe	70%, 90%, 95%, 100% Propanol
Xylol	E. Merck, Darmstadt
Deckgläser	La fontaine International GmbH, Waghäusel
Eindeckmittel	EUKITT®; O. Kindler GmbH Freiburg
Diaminobenzidin	DAB Peroxidase Substrate Kit, SK-4100; Vector Laboratories, INC. Burlingame CA. (USA)
Wasserstoffperoxid	35%; Merck AG, Darmstadt
Methanol	Methanol zur Analyse, AppliChem GmbH, Darmstadt
PBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline; Thermo Fisher Scientific Waltham, Massachusetts (USA)
PBST	2 ml Triton + 1 L Phosphate Buffered Saline

Triton	X-100; Merck AG, Darmstadt
Deckgläser	Apoptag Plastic Coverslips, Millipore; Merck, KGaA Darmstadt
Zitronensäure	C-7254; Sigma-Aldrich, Missouri (USA)
Destilliertes Wasser	Aqua Dest; B. Braun Melsungen AG

### **Sonstige**

Tierfutter	Altromin Standard Diätfutter, Altromin Gesellschaft für Tierernährung mbH, Lage
Augencreme	Bepanthen® Augencreme, Bayer, Leverkusen

## 8.2 Hemisphärenflächen zur ROI-Größen Bestimmung

PHH Tiernummer	Linke Hemisphärenfläche ( $\mu\text{m}^2$ )	Rechte Hemisphärenfläche ( $\mu\text{m}^2$ )	Intervention	Alter
PHH 138	39,33	36,38	Sham	PT21
PHH 139	19,93	19,26	Sham	PT21
PHH 236	45,34	42,83	Sham	PT21
PHH 237	45,65	37,70	Sham	PT21
PHH 238	47,36	46,59	Sham	PT21
PHH 239	37,62	41,58	Sham	PT21
PHH 240	49,42	50,17	Sham	PT21
PHH 241	43,87	44,03	Sham	PT21
PHH 243	50,24	61,14	Sham	PT21
PHH 245	47,46	46,37	Sham	PT21

Tabelle 3 Linke und Rechte Hemisphärenfläche der PT21-Sham-Tiere. Hieraus ergibt sich ein Mittelwert ( $M \pm SD$ ) der Hemisphärenfläche von  $42,61 \pm 9,38 \mu\text{m}^2$ . ( $SEM = 4,271722113$ )

PHH Tiernummer	Linke Hemisphärenfläche ( $\mu\text{m}^2$ )	Rechte Hemisphärenfläche ( $\mu\text{m}^2$ )	Intervention	Alter
PHH 133	36,90	32,00	Sham	PT7
PHH 134	30,33	30,52	Sham	PT7
PHH 135	33,56	29,80	Sham	PT7
PHH 156	33,00	35,48	Sham	PT7
PHH 212	43,87	41,18	Sham	PT7
PHH 213	32,63	31,02	Sham	PT7
PHH 214	33,56	33,24	Sham	PT7
PHH 215	40,54	39,71	Sham	PT7

Tabelle 4 Linke und Rechte Hemisphärenfläche der PT7-Sham-Tiere. Hieraus ergibt sich ein Mittelwert ( $M \pm SD$ ) der Hemisphärenfläche von  $34,89 \pm 4,40 \mu\text{m}^2$ . ( $SEM = 2,226264806$ )

PHH Tiernummer	Linke Hemisphärenfläche ( $\mu\text{m}^2$ )	Rechte Hemisphärenfläche ( $\mu\text{m}^2$ )	Intervention	Alter
PHH 128	20,90	20,10	Sham	PT3
PHH 129	23,77	21,51	Sham	PT3
PHH 130	20,01	19,18	Sham	PT3
PHH 131	24,47	22,34	Sham	PT3
PHH 207	34,51	31,03	Sham	PT3
PHH 208	30,92	35,88	Sham	PT3
PHH 210	25,48	23,78	Sham	PT3
PHH 211	24,98	23,44	Sham	PT3
PHH 242	42,52	45,89	Sham	PT3

Tabelle 5 Linke und Rechte Hemisphärenfläche der PT3-Sham-Tiere. Hieraus ergibt sich ein Mittelwert ( $M \pm SD$ ) der Hemisphärenfläche von  $28,11 \pm 7,72 \mu\text{m}^2$ . ( $SEM = 2,233838763$ )

<b>PHH Tiernummer</b>	<b>Linke Hemisphärenfläche (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	<b>Rechte Hemisphärenfläche (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	<b>Intervention</b>	<b>Alter</b>
PHH 123	17,11	16,67	Sham	PT1
PHH 124	19,16	21,24	Sham	PT1
PHH 125	19,03	20,92	Sham	PT1
PHH 127	18,99	19,20	Sham	PT1
PHH 209	31,72	35,62	Sham	PT1
PHH 216	33,84	32,42	Sham	PT1
PHH 217	29,60	28,11	Sham	PT1
PHH 218	37,97	35,88	Sham	PT1

*Tabelle 6 Linke und Rechte Hemisphärenfläche der PT1-Sham-Tiere. Hieraus ergibt sich ein Mittelwert ( $M \pm SD$ ) der Hemisphärenfläche von  $26,09 \pm 14,79 \mu\text{m}^2$ . ( $SEM = 2,26129845$ )*

### 8.3 Schwellenwert-Berechnung

PHH Tiernummer	Relative Ventrikelfläche (%)	Intervention	Alter
PHH 123	1,72	Sham	PT1
PHH 124	2,80	Sham	PT1
PHH 125	5,21	Sham	PT1
PHH 127	3,30	Sham	PT1
PHH 209	3,31	Sham	PT1
PHH 216	3,53	Sham	PT1
PHH 217	2,08	Sham	PT1
PHH 218	2,80	Sham	PT1
PHH 128	0,29	Sham	PT3
PHH 129	1,28	Sham	PT3
PHH 130	1,91	Sham	PT3
PHH 131	1,41	Sham	PT3
PHH 207	2,29	Sham	PT3
PHH 208	2,25	Sham	PT3
PHH 210	2,03	Sham	PT3
PHH 211	2,23	Sham	PT3
PHH 242	4,20	Sham	PT3
PHH 133	0,61	Sham	PT7
PHH 134	1,51	Sham	PT7
PHH 135	2,70	Sham	PT7
PHH 156	2,98	Sham	PT7
PHH 212	0,88	Sham	PT7
PHH 213	0,83	Sham	PT7
PHH 214	0,88	Sham	PT7
PHH 215	4,61	Sham	PT7
PHH 142	1,60	Sham	PT21
PHH 236	2,31	Sham	PT21
PHH 237	1,80	Sham	PT21
PHH 238	0,83	Sham	PT21
PHH 239	1,74	Sham	PT21
PHH 240	4,63	Sham	PT21
PHH 241	1,73	Sham	PT21
PHH 243	3,50	Sham	PT21
PHH 245	3,03	Sham	PT21

*Tabelle 7 gibt die relativen Ventrikelflächen der Sham-Gruppe an. Hieraus ergibt sich ein Mittelwert der relativen Ventrikelfläche von 2,29 %; die Standardabweichung beträgt 1,223 %. Der Mittelwert + zwei Standardabweichungen ergibt den Schwellenwert der PHVD bzw. PHH von 4,7409 %.*

## 8.4 Ergebnistabellen Ventrikelauswertung

	Mittelwert der relativen Ventrikelfläche (%)	Standardabweichung
<b>Blut-Gruppe</b>	2,021	1,484
<b>NaCl-Gruppe</b>	2,660	1,062
<b>Sham-Gruppe</b>	2,294	1,223

Tabelle 8 gibt die Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Ventrikelfläche der Blut-, NaCl- und Sham-Gruppen an.

<b>PHVD – Blut PT1</b>				
Tiernr.	Relative Ventrikelfläche (%)	Kortexdicke – Cingulum	Kortexdicke – Motorisch.	Kortexdicke – Somatosens.
PHH 150	7,373	2,063	1,650	1,650
PHH 152	9,297	1,513	1,375	1,650
PHH 165	7,285	2,338	1,788	1,650
<b>PHVD – Blut PT3</b>				
Tiernr.	Relative Ventrikelfläche (%)	Kortexdicke – Cingulum	Kortexdicke – Motorisch.	Kortexdicke – Somatosens.
PHH 220	7,149	1,950	1,650	2,400
<b>PHH – Blut PT21</b>				
Tiernr.	Relative Ventrikelfläche (%)	Kortexdicke – Cingulum	Kortexdicke – Motorisch.	Kortexdicke – Somatosens.
PHH 222	5,071	2,250	1,800	1,800
PHH 223	19,408	2,700	2,250	2,925
PHH 224	30,328	2,700	1,800	2,250

Tabelle 9 gibt die einzelnen relativen Ventrikelflächen und Kortexdicken (in mm) der PHVD-/PHH-Tiere der Blut-Gruppe an.

<b>PHVD – NaCl PT1</b>				
Tiernr.	Relative Ventrikelfläche (%)	Kortexdicke – Cingulum	Kortexdicke – Motorisch.	Kortexdicke – Somatosens.
PHH 180	6,230	2,200	1,650	1,925
<b>PHH – NaCl PT7</b>				
Tiernr.	Relative Ventrikelfläche (%)	Kortexdicke – Cingulum	Kortexdicke – Motorisch.	Kortexdicke – Somatosens.
PHH 194	5,718	3,885	2,590	3,145

Tabelle 10 gibt die einzelnen relativen Ventrikelflächen und Kortexdicken (in mm) der PHVD-/PHH-Tiere der NaCl-Gruppe an.



## 8.5 Ergebnisse NeuN

NeuN - PT1						
Gehirnregion	Blut-Gruppe		NaCl-Gruppe		Sham-Gruppe	
	IRF in %	SD	IRF in %	SD	IRF in %	SD
Cingulärer Kortex	25,684	8,574	26,667	6,755	33,032	4,115
Motorischer Kortex	18,838	5,248	20,149	4,714	25,190	2,976
Somatosensorischer Kortex	18,431	4,830	18,258	5,272	24,000	6,892
Periventriculäres Striatum	16,002	5,708	15,658	4,849	17,691	3,842
Laterales Septum	14,970	6,789	14,225	5,411	17,280	5,228
NeuN – PT3						
Gehirnregion	Blut-Gruppe		NaCl-Gruppe		Sham-Gruppe	
	IRF in %	SD	IRF in %	SD	IRF in %	SD
Cingulärer Kortex	36,125	6,125	31,647	7,556	31,757	4,413
Motorischer Kortex	28,033	5,500	23,269	5,891	23,212	3,542
Somatosensorischer Kortex	16,319	3,533	14,580	3,744	18,689	3,088
Periventriculäres Striatum	13,087	3,783	13,396	2,547	16,660	4,362
Laterales Septum	12,859	2,715	11,190	3,599	13,706	7,126
NeuN – PT7						
Gehirnregion	Blut-Gruppe		NaCl-Gruppe		Sham-Gruppe	
	IRF in %	SD	IRF in %	SD	IRF in %	SD
Cingulärer Kortex	33,044	5,662	27,606	4,740	29,181	4,776
Motorischer Kortex	27,292	7,322	22,411	3,896	23,953	6,288
Somatosensorischer Kortex	24,548	4,872	22,304	4,658	22,477	5,094
Periventriculäres Striatum	16,712	3,664	16,201	3,131	20,057	3,962
Laterales Septum	15,529	3,169	15,081	4,872	19,221	4,839
NeuN – PT21						
Gehirnregion	Blut-Gruppe		NaCl-Gruppe		Sham-Gruppe	
	IRF in %	SD	IRF in %	SD	IRF in %	SD
Cingulärer Kortex	28,125	7,490	24,953	5,720	27,361	3,525
Motorischer Kortex	27,775	6,241	21,944	4,099	26,990	3,379
Somatosensorischer Kortex	23,680	5,575	19,814	3,334	23,705	3,582
Periventriculäres Striatum	18,063	5,956	18,552	3,084	16,586	5,041
Laterales Septum	18,847	8,352	20,393	4,076	15,041	6,582

Tabelle 11 Mittelwerte und Standardabweichung (SD) der immunreaktiven Fläche von NeuN (in %) an PT1, PT3, PT7, PT21 nach Interventionsgruppe.

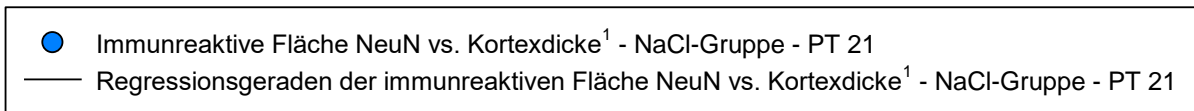
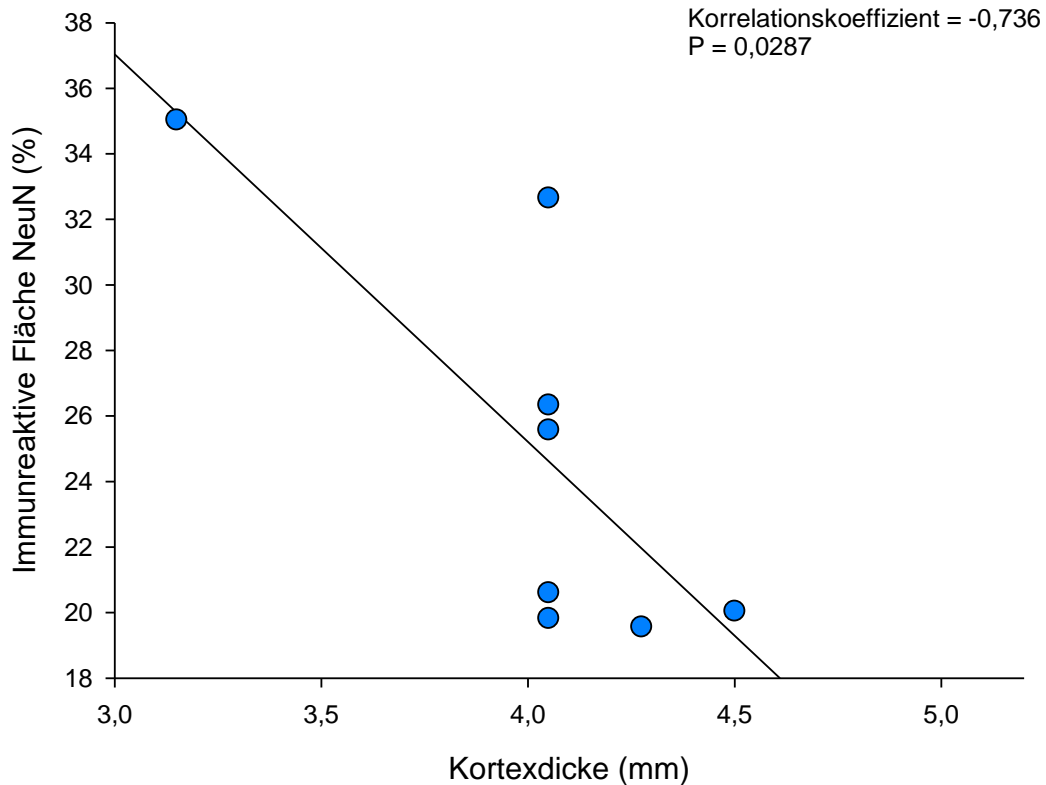
Überlebenszeitpunkt	Gehirnregion	p-Wert
PT1	Cingulärer Kortex	0,107
	Motorischer Kortex	0,012
	Somatosensorischer Kortex	0,085
	Periventrikuläres Striatum	0,541
	Laterales Septum	0,460
PT3	Cingulärer Kortex	0,418
	Motorischer Kortex	0,226
	Somatosensorischer Kortex	0,132
	Periventrikuläres Striatum	0,183
	Laterales Septum	0,637
PT7	Cingulärer Kortex	0,144
	Motorischer Kortex	0,319
	Somatosensorischer Kortex	0,638
	Periventrikuläres Striatum	0,118
	Laterales Septum	0,175
PT21	Cingulärer Kortex	0,340
	Motorischer Kortex	0,053
	Somatosensorischer Kortex	0,161
	Periventrikuläres Striatum	0,720
	Laterales Septum	0,292

Tabelle 12 Vergleich der immunreaktiven Fläche von NeuN zwischen den Interventionsgruppen mittels One-Way ANOVA/Kruskal-Wallis Rangsummentest.

Überlebenszeitpunkt	Gehirnregion	p-Wert
PT1	Cingulärer Kortex	0,225
	Motorischer Kortex	0,662
	Somatosensorischer Kortex	0,203
	Periventrikuläres Striatum	0,413
	Laterales Septum	0,296
PT21	Cingulärer Kortex	0,017
	Motorischer Kortex	0,033
	Somatosensorischer Kortex	0,012
	Periventrikuläres Striatum	0,034
	Laterales Septum	<0,001

Tabelle 13 Vergleich der immunreaktiven Fläche von NeuN der PHVD-/PHH-Tiere vs. Nicht-PHVD-/PHH-Tiere an den Überlebenszeitpunkten PT1 und PT21.

Korrelation der immunreaktiven Fläche und Kortexdicke<sup>1</sup>  
NaCl-Gruppe - NeuN - PT 21  
Cingulärer Kortex



<sup>1</sup>Kortexdicke = errechnet als Summe der beidseitigen ROI Anzahl.

Abbildung 28 Korrelation der immunreaktiven Fläche und Kortexdicke; NaCl-Gruppe - NeuN - PT 21 - Cingulärer Kortex

## 8.6 Zellzählung PT21

PHH Tiernummer	Zellzahl ROI 2-M cingulärer Kortex	Zellzahl ROI 2-M motorischer Kortex	Alter	Intervention
PHH143	100	100	PT21	Blut
PHH144	110	108	PT21	Blut
PHH145	127	115	PT21	Blut
PHH161	120	106	PT21	Blut
PHH162	126	132	PT21	Blut
PHH205	116	116	PT21	Blut
PHH206	148	159	PT21	Blut
PHH222	228	228	PT21	Blut
PHH223	133	163	PT21	Blut
PHH224	149	152	PT21	Blut
PHH195	139	127	PT21	NaCl
PHH198	141	139	PT21	NaCl
PHH199	114	116	PT21	NaCl
PHH200	137	123	PT21	NaCl
PHH201	136	124	PT21	NaCl
PHH202	148	123	PT21	NaCl
PHH227	131	130	PT21	NaCl
PHH228	136	130	PT21	NaCl
PHH142	133	153	PT21	Sham
PHH236	141	130	PT21	Sham
PHH237	122	137	PT21	Sham
PHH238	140	122	PT21	Sham
PHH239	150	131	PT21	Sham
PHH240	104	142	PT21	Sham
PHH241	159	144	PT21	Sham
PHH243	150	152	PT21	Sham
PHH245	137	138	PT21	Sham

*Tabelle 14 zeigt die Mittelwerte der Zellzählung der ROI 2-R und ROI 2-L anhand der NeuN Färbungen der PT21 Tiere der Blut- und Sham-Gruppe.*

## 8.7 Ergebnisse Caspase 3

Caspase 3 - PT1						
Gehirnregion	Blut-Gruppe		NaCl-Gruppe		Sham-Gruppe	
	IRF in %	SD	IRF in %	SD	IRF in %	SD
Cingulärer Kortex	2,080	1,158	2,299	0,918	2,972	1,329
Motorischer Kortex	1,778	0,984	1,948	0,798	2,308	0,743
Somatosensorischer Kortex	2,600	1,159	2,076	0,524	3,101	0,710
Periventriculäres Striatum	3,470	1,938	4,029	2,119	5,420	2,263
Laterales Septum	2,765	1,404	2,916	1,315	2,769	0,842
Caspase 3 – PT3						
Gehirnregion	Blut-Gruppe		NaCl-Gruppe		Sham-Gruppe	
	IRF in %	SD	IRF in %	SD	IRF in %	SD
Cingulärer Kortex	2,862	0,987	3,151	0,638	3,704	1,775
Motorischer Kortex	2,032	0,755	2,460	0,786	3,160	1,354
Somatosensorischer Kortex	2,104	1,230	2,382	0,762	3,272	1,677
Periventriculäres Striatum	2,055	1,342	4,301	1,556	5,496	2,630
Laterales Septum	2,067	1,410	2,869	1,022	3,133	1,096
Caspase 3 – PT7						
Gehirnregion	Blut-Gruppe		NaCl-Gruppe		Sham-Gruppe	
	IRF in %	SD	IRF in %	SD	IRF in %	SD
Cingulärer Kortex	2,363	0,812	3,715	1,648	1,694	0,780
Motorischer Kortex	2,521	0,753	3,154	1,555	1,835	0,997
Somatosensorischer Kortex	2,285	0,704	2,551	1,118	2,528	0,908
Periventriculäres Striatum	4,581	2,824	5,841	2,765	2,861	3,983
Laterales Septum	3,294	1,949	4,897	2,042	1,920	2,503
Caspase 3 – PT21						
Gehirnregion	Blut-Gruppe		NaCl-Gruppe		Sham-Gruppe	
	IRF in %	SD	IRF in %	SD	IRF in %	SD
Cingulärer Kortex	2,774	2,865	2,709	0,985	4,042	1,262
Motorischer Kortex	2,739	2,117	2,992	1,127	3,893	1,988
Somatosensorischer Kortex	2,415	1,431	2,624	0,702	4,120	2,117
Periventriculäres Striatum	2,686	2,810	2,819	1,236	3,288	1,861
Laterales Septum	2,862	3,421	3,842	0,842	4,244	1,677

Tabelle 15 Mittelwerte und Standardabweichung (SD) der immunreaktiven Fläche von Caspase 3 (in %) an PT1, PT3, PT7, PT21 nach Interventionsgruppe.

Überlebenszeitpunkt	Gehirnregion	p-Wert
PT1	Cingulärer Kortex	0,336
	Motorischer Kortex	0,501
	Somatosensorischer Kortex	0,098
	Periventriculäres Striatum	0,279
	Laterales Septum	0,965
PT3	Cingulärer Kortex	0,762
	Motorischer Kortex	0,264
	Somatosensorischer Kortex	0,206
	Periventriculäres Striatum	0,010
	Laterales Septum	0,231
PT7	Cingulärer Kortex	0,039
	Motorischer Kortex	0,188
	Somatosensorischer Kortex	0,839
	Periventriculäres Striatum	0,108
	Laterales Septum	0,035
PT21	Cingulärer Kortex	0,399
	Motorischer Kortex	0,494
	Somatosensorischer Kortex	0,143
	Periventriculäres Striatum	0,868
	Laterales Septum	0,560

Tabelle 16 Vergleich der immunreaktiven Fläche von Caspase 3 zwischen den Interventionsgruppen mittels One-Way ANOVA/Kruskal-Wallis Rangsummentest.

Überlebenszeitpunkt	Gehirnregion	p-Wert
PT1	Cingulärer Kortex	0,951
	Motorischer Kortex	0,518
	Somatosensorischer Kortex	0,375
	Periventriculäres Striatum	0,250
	Laterales Septum	0,088
PT21	Cingulärer Kortex	0,071
	Motorischer Kortex	0,286
	Somatosensorischer Kortex	0,227
	Periventriculäres Striatum	0,143
	Laterales Septum	0,286

Tabelle 17 Vergleich der immunreaktiven Fläche von Caspase 3 der PHVD-/PHH-Tiere vs. Nicht-PHVD-/PHH-Tiere an den Überlebenszeitpunkten PT1 und PT21.

## 8.8 Ergebnisse SMI-32

SMI-32 - PT1						
Gehirnregion	Blut-Gruppe		NaCl-Gruppe		Sham-Gruppe	
	IRF in %	SD	IRF in %	SD	IRF in %	SD
Cingulärer Kortex	1,094	1,252	1,785	1,505	1,330	0,487
Motorischer Kortex	1,485	1,021	1,297	0,483	1,712	0,618
Somatosensorischer Kortex	1,155	0,521	1,199	0,186	1,425	0,773
Periventriculäres Striatum	0,370	0,272	1,969	3,452	0,307	0,169
Laterales Septum	0,260	0,285	0,866	0,456	0,178	0,174
SMI-32 – PT3						
Gehirnregion	Blut-Gruppe		NaCl-Gruppe		Sham-Gruppe	
	IRF in %	SD	IRF in %	SD	IRF in %	SD
Cingulärer Kortex	1,854	0,767	1,400	0,349	1,955	0,508
Motorischer Kortex	2,491	0,991	2,403	0,557	1,984	0,474
Somatosensorischer Kortex	1,511	0,427	1,549	0,517	1,733	0,473
Periventriculäres Striatum	0,130	0,199	0,320	0,286	0,754	1,073
Laterales Septum	0,242	0,421	0,322	0,412	0,351	0,277
SMI-32 – PT7						
Gehirnregion	Blut-Gruppe		NaCl-Gruppe		Sham-Gruppe	
	IRF in %	SD	IRF in %	SD	IRF in %	SD
Cingulärer Kortex	1,526	2,329	1,951	1,415	0,869	1,296
Motorischer Kortex	3,259	1,888	2,685	0,778	2,396	1,938
Somatosensorischer Kortex	1,287	0,768	1,869	0,667	1,338	1,101
Periventriculäres Striatum	0,731	0,875	2,663	2,162	1,616	1,989
Laterales Septum	0,225	0,273	0,492	0,312	1,148	2,929
SMI-32 – PT21						
Gehirnregion	Blut-Gruppe		NaCl-Gruppe		Sham-Gruppe	
	IRF in %	SD	IRF in %	SD	IRF in %	SD
Cingulärer Kortex	1,557	2,316	0,138	0,231	0,533	0,775
Motorischer Kortex	2,634	2,275	3,325	4,298	4,195	3,711
Somatosensorischer Kortex	3,581	2,561	4,220	3,155	5,629	4,357
Periventriculäres Striatum	2,106	1,578	1,615	1,906	1,900	1,391
Laterales Septum	1,024	2,010	0,338	0,360	0,019	0,023

Tabelle 18 Mittelwerte und Standardabweichung (SD) der immunreaktiven Fläche von SMI-32 (in %) an PT1, PT3, PT7, PT21 nach Interventionsgruppe.

Überlebenszeitpunkt	Gehirnregion	p-Wert
PT1	Cingulärer Kortex	0,258
	Motorischer Kortex	0,346
	Somatosensorischer Kortex	0,729
	Periventrikuläres Striatum	0,094
	Laterales Septum	0,010
PT3	Cingulärer Kortex	0,186
	Motorischer Kortex	0,423
	Somatosensorischer Kortex	0,687
	Periventrikuläres Striatum	0,153
	Laterales Septum	0,208
PT7	Cingulärer Kortex	0,129
	Motorischer Kortex	0,607
	Somatosensorischer Kortex	0,395
	Periventrikuläres Striatum	0,110
	Laterales Septum	0,034
PT21	Cingulärer Kortex	0,227
	Motorischer Kortex	0,522
	Somatosensorischer Kortex	0,510
	Periventrikuläres Striatum	0,581
	Laterales Septum	0,271

Tabelle 19 Vergleich der immunreaktiven Fläche von SMI-32 zwischen den Interventionsgruppen mittels One-Way ANOVA/Kruskal-Wallis Rangsummentest.

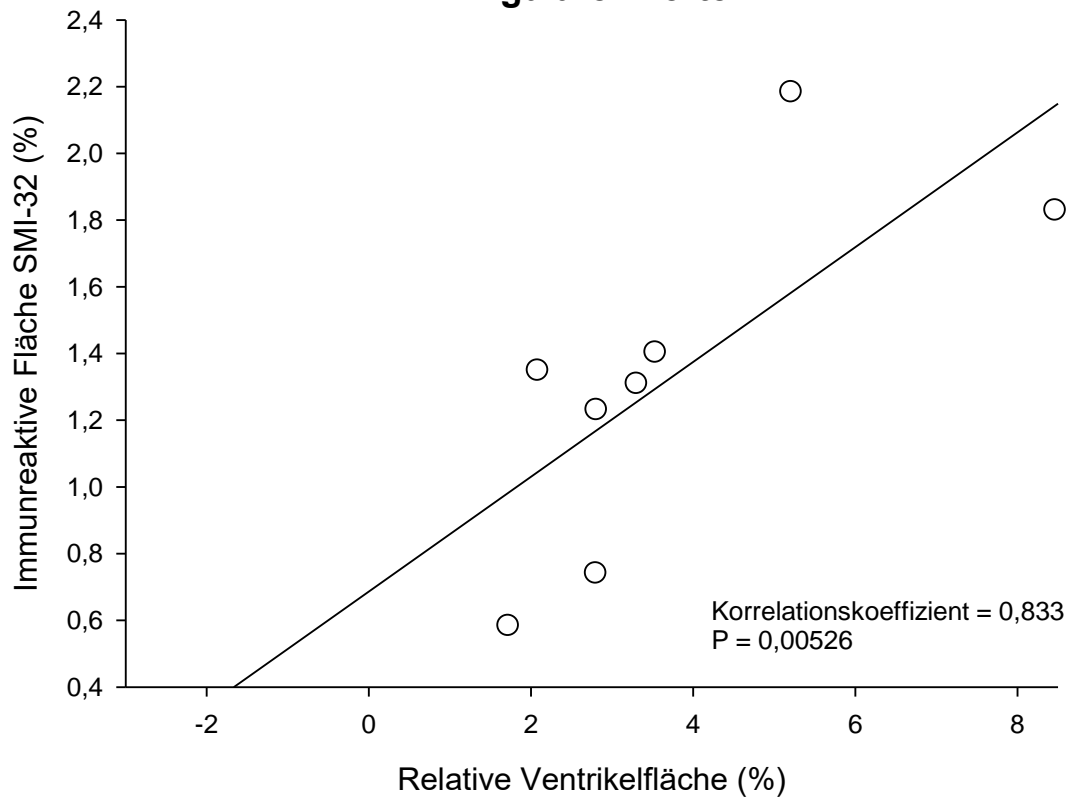
Überlebenszeitpunkt	Gehirnregion	p-Wert
PT1	Cingulärer Kortex	0,556
	Motorischer Kortex	0,730
	Somatosensorischer Kortex	0,817
	Periventrikuläres Striatum	0,221
	Laterales Septum	0,361
PT21	Cingulärer Kortex	0,024
	Motorischer Kortex	0,048
	Somatosensorischer Kortex	0,099
	Periventrikuläres Striatum	0,095
	Laterales Septum	0,071

Tabelle 20 Vergleich der immunreaktiven Fläche von SMI-32 der PHVD-/PHH-Tiere vs. Nicht-PHVD-/PHH-Tiere an den Überlebenszeitpunkten PT1 und PT21.



Korrelation der immunreaktiven Fläche und relativen Ventrikelfläche<sup>1</sup>  
Sham-Gruppe - SMI-32 - PT 1

**Cingulärer Kortex**

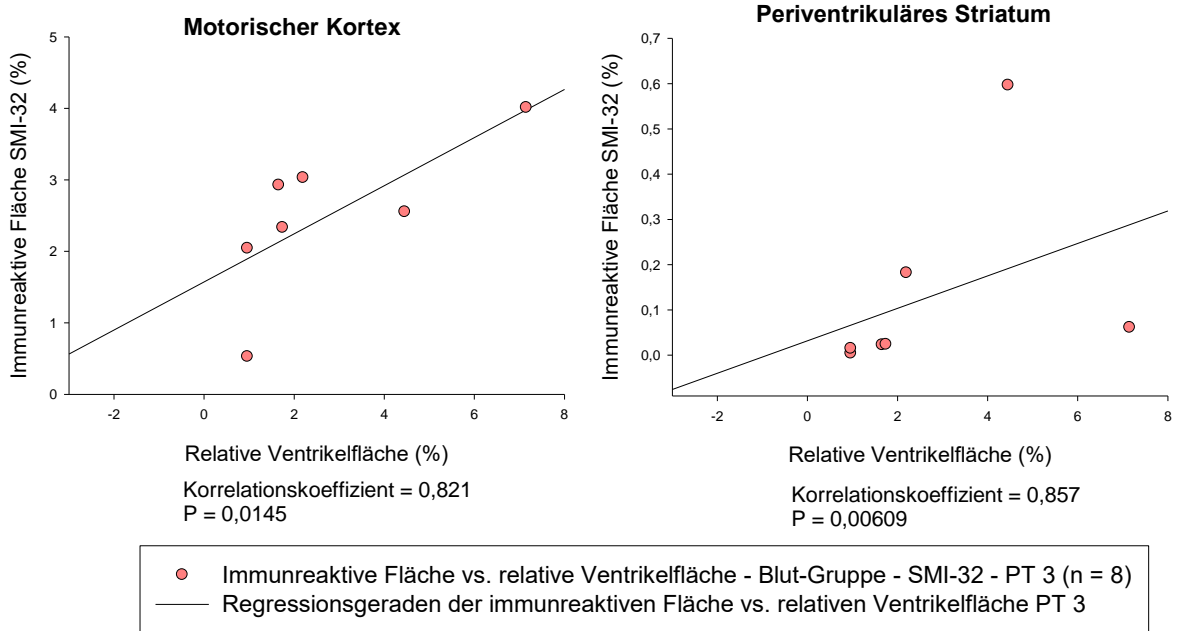


- Immunreaktive Fläche vs. relative Ventrikelfläche - Sham-Gruppe - SMI-32 - PT 1 (n = 8)
- Regressionsgeraden der immunreaktiven Fläche vs. relativen Ventrikelfläche PT 1

<sup>1</sup> Relative Ventrikelfläche = Gesamte Ventrikelfläche in mm<sup>2</sup> / gesamte Hirnfläche in mm<sup>2</sup>

Abbildung 29 Korrelation der immunreaktiven Fläche und relativen Ventrikelfläche; Sham-Gruppe - SMI 32 - PT 1

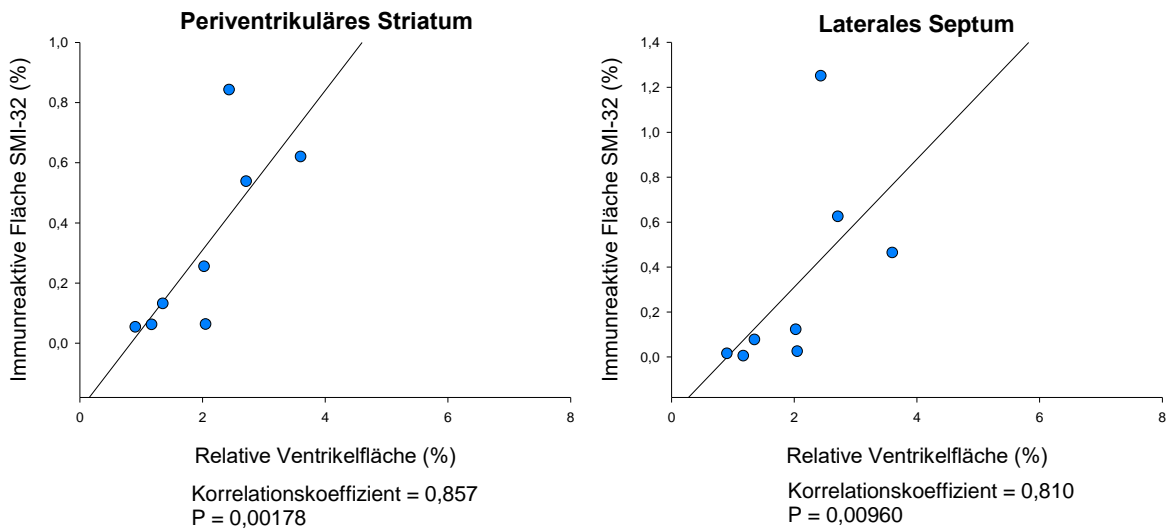
Korrelation der immunreaktiven Fläche und relativen Ventrikelfläche<sup>1</sup>  
Blut-Gruppe - SMI-32 - PT 3



<sup>1</sup> Relative Ventrikelfläche = Gesamte Ventrikelfläche in mm<sup>2</sup> / gesamte Hirnfläche in mm<sup>2</sup>

Abbildung 30 Korrelation der immunreaktiven Fläche und relativen Ventrikelfläche; Blut-Gruppe - SMI 32 - PT 3

### Korrelation der immunreaktiven Fläche und relativen Ventrikelfläche<sup>1</sup> NaCl-Gruppe - SMI-32 - PT 3

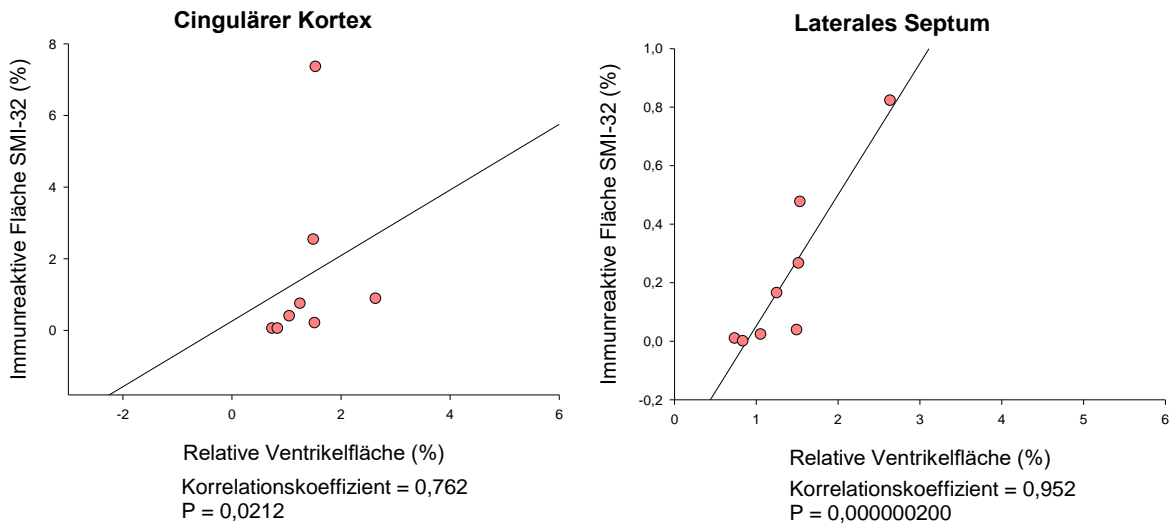


● Immunreaktive Fläche vs. relative Ventrikelfläche - NaCl-Gruppe - SMI-32 - PT 3 (n = 8)  
— Regressionsgeraden der immunreaktiven Fläche vs. relativen Ventrikelfläche PT 3

<sup>1</sup> Relative Ventrikelfläche = Gesamte Ventrikelfläche in mm<sup>2</sup> / gesamte Hirnfläche in mm<sup>2</sup>

Abbildung 31 Korrelation der immunreaktiven Fläche und relativen Ventrikelfläche; NaCl-Gruppe - SMI 32 - PT 3

### Korrelation der immunreaktiven Fläche und relativen Ventrikelfläche<sup>1</sup> Blut-Gruppe - SMI-32 - PT 7

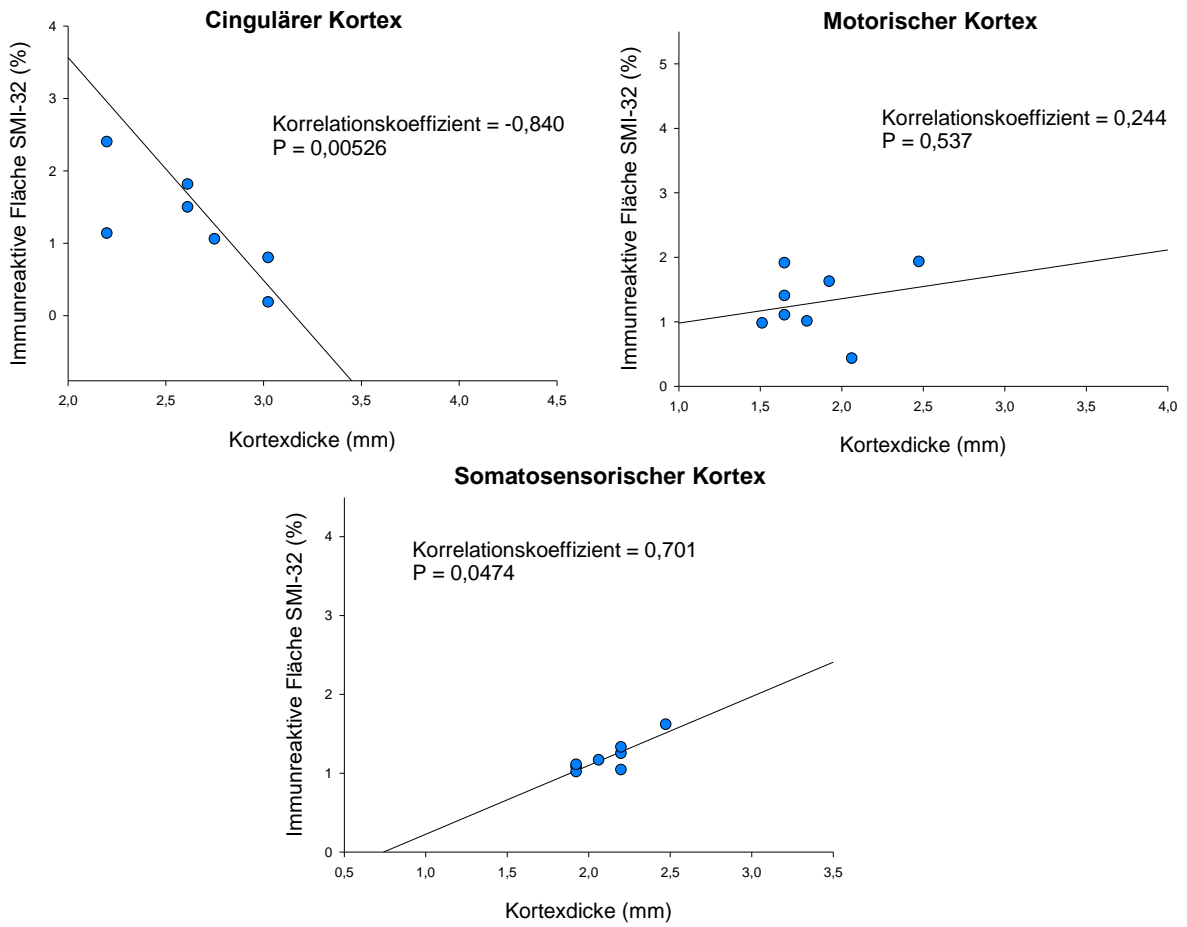


● Immunreaktive Fläche vs. relative Ventrikelfläche - Blut-Gruppe - SMI-32 - PT 7 (n = 8)  
— Regressionsgeraden der immunreaktiven Fläche vs. relativen Ventrikelfläche PT 7

<sup>1</sup> Relative Ventrikelfläche = Gesamte Ventrikelfläche in mm<sup>2</sup> / gesamte Hirnfläche in mm<sup>2</sup>

Abbildung 32 Korrelation der immunreaktiven Fläche und relativen Ventrikelfläche; Blut-Gruppe - SMI 32 - PT 7

# Korrelation der immunreaktiven Fläche und Kortexdicke<sup>1</sup> NaCl-Gruppe - SMI-32 - PT 1



● Immunreaktive Fläche SMI-32 vs. Kortexdicke - NaCl-Gruppe - PT 1 (n = 8)  
 — Regressionsgeraden der immunreaktiven Fläche SMI-32 vs. Kortexdicke - NaCl-Gruppe - PT 1

<sup>1</sup>Kortexdicke = errechnet als Summe der beidseitigen ROI Anzahl.

Abbildung 33 Korrelation der immunreaktiven Fläche und Kortexdicke; NaCl-Gruppe - SMI 32 - PT 1

## 8.9 Färbeprotokolle

### Färbeprotokoll für Hämatoxilin und Eosin (H&E)

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

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

## Färbeprotokoll für NeuN

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

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

## Färbeprotokoll für aktivierte Caspase-3

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

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

## Färbeprotokoll für SMI-32

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

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



## **Ansätze**

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

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

PBST: 2ml Triton  
1l Phosphate Buffered Saline

## 9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich den Menschen danken, die mich bei den Experimenten und beim Schreiben dieser Doktorarbeit unterstützt haben.

Vielen Dank an meinen Doktorvater für die Betreuung, Korrektur und Begutachtung dieser Arbeit.

Besonderes Dank an den Betreuer des PHH-Projektes für die Beaufsichtigung, die vielen Ratschläge und Tipps zur Durchführung der Tierversuche und beim Erstellen der gesamten Arbeit.

Danke an meine Mitdoktoranden im PHH-Projekt. Ihr habt die Stunden im Labor, am Kryostat und im MRT-Raum zu einem Treffen unter Freunden gemacht.

Bei meiner Schwester bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Datensortierung. Deine Excel-Kenntnisse grenzen an Zauberei.

Vielen Dank an meine Eltern und Geschwister, die bei unzähligen Abendessen das Auf und Ab einer wissenschaftlichen Arbeit verfolgt haben. Ihr habt mich immer wieder motiviert weiterzumachen.