

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

Auswirkungen eines Thrombozyten-spezifischen SGLT-2 Knockouts auf den
sekundären Hirnschaden sowie die Gerinnung nach experimentellem
Schädelhirntrauma in der Maus

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

Vorgelegt von

Lucas Wiesmann
aus Darmstadt

Mainz, 2022

Tag der Promotion:

06. Dezember 2022

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	vi
1 Einleitung	1
2 Literaturdiskussion	2
2.1 Exzitotoxizität.....	3
2.2 Funktionsstörung der Mitochondrien	4
2.3 Oxidativer Stress	5
2.4 Neuroinflammation	6
2.5 Zelltod.....	7
2.6 Gerinnungsstörungen	9
3 Material und Methoden	11
3.1 Material.....	11
3.1.1 Chemikalien	11
3.1.2 Lösungen	12
3.1.3 Pharmakotherapeutika	12
3.1.4 Verbrauchsmaterialien	13
3.1.5 Geräte	15
3.1.6 Antikörper (AK)	17
3.1.7 Primer	17
3.2 Methoden	18
3.2.1 Beschreibung der Versuchsabläufe der einzelnen Studien.....	18
3.2.2 Genehmigung der Tierversuche.....	21
3.2.3 Versuchstiere	21
3.2.4 CCI-Modell zur Induktion eines SHTs	23
3.2.5 Motorfunktionsanalysen	25
3.2.6 Retrobulbäre Blutentnahme und Euthanasie	29
3.2.7 Hirnentnahme	30
3.2.8 Analyse des retrobulbären Blutes	31

3.2.9	Anfertigung und Färbung der Hirnschnitte	35
3.2.10	RNA-Analysen	42
3.2.11	Proteinanalyse.....	45
3.2.12	Statistische Auswertung	46
4	Ergebnisse	48
4.1	Vorstudie von Mäusen mit undifferenziertem Knockout des SGLT-2-Transporters.....	48
4.2	Studie von nativen Weibchen und Männchen	49
4.2.1	Körpergewicht.....	49
4.2.2	Blutbild/Sysmex Cellcounter	51
4.2.3	Thrombozytenaggregationsfähigkeit/Multiplate® Analyser	62
4.2.4	RNA-Analysen	64
4.2.5	Protein-Analyse.....	66
4.3	Studie von Weibchen und Männchen mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT.....	68
4.3.1	Körpergewicht.....	68
4.3.2	Blutzucker	71
4.3.3	Blutbild/Sysmex Cellcounter	73
4.3.4	Thrombozytenaggregationsfähigkeit/Multiplate® Analyser	78
4.3.5	Schadensvolumenanalyse	83
4.3.6	Auswertung der immunhistochemischen Färbung von IgG.....	88
4.3.7	RNA-Analysen	94
4.3.8	Protein-Analysen.....	100
4.4	Studie von Weibchen und Männchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT	104
4.4.1	Körpergewicht.....	105
4.4.2	Blutzucker	109
4.4.3	Blutbild/Sysmex Cellcounter	112

4.4.4	Motorfunktionsanalysen	122
4.4.5	Schadensvolumenanalyse	130
4.4.6	RNA-Analysen	133
5	Diskussion.....	137
5.1	Einfluss der Thrombozyten und des Knockouts auf den sekundären Hirnschaden	137
5.1.1	Kohlenhydrat-Metabolismus der Thrombozyten.....	138
5.1.2	SGLT-2-Transporter auf Thrombozyten.....	139
5.1.3	Aktivierung der Thrombozyten im Rahmen des SHT	141
5.1.4	Messung der Thrombozytenfunktion.....	142
5.1.5	Neuroprotektion durch eine verminderte Aktivität von Thrombozyten.	144
5.2	Erhöhte Thrombozytenaggregationsfähigkeit der nativen männlichen Knockouttiere	145
5.3	Veränderte Neuroinflammation der männlichen Knockouttiere 5 Tage nach induziertem SHT.....	147
5.4	Unterschiede der Geschlechter in der Wirkung des Knockouts.....	148
6	Zusammenfassung und Ausblick	152
7	Literaturverzeichnis.....	156
8	Anhang.....	166
8.1	Abbildungsverzeichnis.....	166
8.2	Tabellenverzeichnis.....	170
9	Danksagung.....	173
10	Tabellarischer Lebenslauf.....	174

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung deutsch	Bedeutung englisch
°C	Grad Celsius	
µg	Mikrogramm	
µl	Mikroliter	
µm	Mikrometer	
ADP	Adenosindiphosphat	
AIF	Apoptose-induzierender Faktor	
AK	Antikörper	
AMPA	α-Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionsäure	
ATP	Adenosintriphosphat	
AUC	Fläche unter der Kurve	<i>Area under the curve</i>
BHS	Blut-Hirn-Schranke	
BZ	Blutzucker	
CaMK2	Kalzium-Calmodulin-abhängige Protein Kinase	<i>Calcium /calmodulin-dependent protein kinase 2</i>
CBF	Zerebraler Blutfluss	<i>Cerebral blood flow</i>
CCI	Kontrollierter kortikaler Einschlag	<i>Controlled cortical impact</i>
cDNA	komplementäre DNA	<i>Complementary DNA</i>
cm ²	Quadratcentimeter	
CO ₂	Kohlenstoffdioxid	
COX-2	Cyclooxygenase-2	
DNA	Desoxyribonukleinsäure	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
g	Gramm	
GLUT	Glucose-Transporter	
HCT	Hämatokrit	<i>Haematocrit</i>
HGB	Hämoglobin-Konzentration	
Hz	Hertz	
i.p.	intraperitoneal	
Iba-1		<i>Ionized calcium-binding adapter molecule</i>
IgG	Immunglobulin G	
IHC	Immunhistochemie	

IL	Interleukin	
KG	Körpergewicht	
l/min	Liter pro Minute	
LW	Luftwechsel	
LYM	Lymphozyten	
m/s	Meter pro Sekunde	
m ³ /h	Kubikmeter pro Stunde	
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase	
MCH	Mittleres korpuskuläres Hämoglobin	<i>Mean corpuscular haemoglobin</i>
MCHC	Mittlere korpuskuläre Hämoglobin- Konzentration	<i>Mean corpuscular haemoglobin concentration</i>
MCV	Mittleres korpuskuläres Volumen	<i>Mean corpuscular volume</i>
mg	Milligramm	
min	Minute	
ml	Milliliter	
mm	Millimeter	
mPT	Mitochondriale Membranpermeabilitäts Transition	<i>Mitochondrial permeability transition</i>
mPTP	Mitochondriale Permeabilität- Transitions-Pore	<i>Mitochondrial permeability transition pore</i>
MPV	Mittleres Thrombozytenvolumen	<i>Mean platelet volume</i>
mRNA		<i>messenger RNA</i>
ms	Millisekunde	
NaCl	Natriumchlorid	
NHE	Natrium-Protonen-Austauscher	<i>Sodium-hydrogen exchanger</i>
nm	Nanometer	
NMDA	N-Methyl-d-Asparaginsäure	
NOX	NADPH Oxidase	
NSS		<i>Neuological Severity Score</i>
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor	
PAPP	Poly(ADP-ribose)-Polymerase	
PAR	Protease-aktivierter Rezeptor	<i>Protease-Activated Receptor</i>
PAR	Poly(ADP-ribose)	

PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung	
PBST	PBS mit Triton-X	
PCR	Ploymeras-Kettenreaktion	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDW	Thrombozytenverteilungsbreite	<i>Platelet distribution width</i>
P-LCR	Anteil großer Thrombozyten	<i>Platelet large cell ratio</i>
PLT	Thrombozytenanzahl	<i>Platelet</i>
PPIA	Peptidylprolyl Isomerase A	
RBC	Erythrozyten	<i>Red blood cell</i>
RDW_CV	Erythrozytenverteilungsbreite Variationskoeffizient	<i>Red blood cell distribution width coefficient of variation</i>
RDW_SD	Erythrozytenverteilungsbreite Standardabweichung	<i>Red blood cell distribution width standard deviation</i>
RIPA	Radioimmunoprecipitationassay	
RNA	Ribonukleinsäure	<i>Ribonucleic acid</i>
ROS	Reaktiven Sauerstoff Spezies	<i>Reactive oxygen species</i>
rpm	Runden pro Minute	<i>Round per minute</i>
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR	<i>Reverse transcription-PCR</i>
s.	siehe	
SGLT	Natriumabhängiger Glukosetransporter	<i>Sodium dependent glucose co- transporter</i>
SHT	Schädel-Hirn-Trauma	
TBI	Traumatische Gehirnverletzung	<i>Traumatic brain injury</i>
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung	
TBST	TBS mit Tween	
TF	Gewebefaktor	<i>Tissue factor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor	<i>Tumor necrosis factor</i>
WBC	Leukozyten	<i>White blood cell</i>

1 Einleitung

Das Schädel-Hirn-Trauma (SHT) ist eine schwerwiegende Erkrankung, die für das Gesundheitssystem eine besondere Herausforderung darstellt. So befanden sich 2017 in Deutschland 423.436 Patienten mit der Diagnose „ICD S00-S09: Verletzungen des Kopfes“ jedes Schweregrades in stationärer Behandlung (1). Die Krankheitskosten dieser Diagnose beliefen sich im Jahr 2015 auf 1,958 Milliarden Euro (2). Das mittelschwere bis schwere SHT hat dabei nach den neusten Analysen der Daten des TraumaRegisters der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie (TR-DGU) aus den Jahren 2013-2017 eine Inzidenz von 10,1 Fällen auf 100 000 Einwohner pro Jahr in Deutschland. Dabei lag das Geschlechterverhältnis männlich zu weiblich bei etwa 2 zu 1 und das Durchschnittsalter bei 60 Jahren (3). Das SHT ist weltweit eine der führenden Todesursachen von jungen Menschen, aber auch Ursache für Tod und Langzeitbehinderung von Menschen aller Altersstufen und ist daher von großem wissenschaftlichem Interesse (4).

Der Auslöser dieses Krankheitsbildes ist eine äußere mechanische Krafteinwirkung auf den Schädel. Dadurch entsteht ein primärer Schaden, welcher eine Reihe von pathophysiologischen Mechanismen hervorruft, die zum sekundären Schaden führen. Dadurch kommt es zu einer Vergrößerung des primären Schadensgebietes und zu einer Verschlechterung des klinischen Outcomes. Diese sekundären Mechanismen stellen Angriffspunkte für therapeutische Interventionen dar, da der primäre Schaden im Gegensatz zum sekundären Schaden irreversibel ist (5).

Versuche der Arbeitsgruppe an einem SHT-Modell an Mäusen mit einer genetischen Defizienz des natriumabhängigen Glukosetransporters (SGLT)-2 auf allen Zellen zeigten neuroprotektive Effekte. Da bei diesen Tieren auch die Thrombozytenaggregationsfähigkeit vermindert war und das veränderte Gerinnungssystem ein wichtiger Bestandteil der sekundären pathophysiologischen Mechanismen ist (6), postulierte man als Erklärung für den beobachteten neuroprotektiven Effekt die Störung der Thrombozytenfunktion. Daher wurde in dieser Arbeit die Wirkung eines Thrombozyten-spezifischen Knockouts des SGLT-2-Transporters auf den sekundären Schaden und die Gerinnungsfunktion bei SHT untersucht.

2 Literaturdiskussion

Ein SHT entsteht durch eine äußere Gewalteinwirkung, also einem Schlag oder einer anderen Krafteinwirkung auf den Schädel und/oder das Gehirn. Man unterscheidet ein offenes von einem geschlossenen SHT. Beim offenen SHT liegt das Gehirn frei, was bedeutet, dass die Kopfhaut, der Knochen und die Dura mater verletzt sind. In dieser Arbeit wird das Modell eines geschlossenen SHT angewendet.

Durch die äußere Gewalteinwirkung entsteht ein primärer Schaden am Hirngewebe. Im Bereich dieses Primärschadens gehen die Zellen, die Blutgefäße und das gesamte neuronale Gewebe zu Grunde. Der Schaden ist irreversibel und kann nicht mehr regenerieren. Um diesen Bereich liegt jedoch Gewebe, welches kurz nach der Gewalteinwirkung noch intakt ist. In dieser Zone, die auch die Penumbra genannt wird, entwickelt sich der Sekundärschaden. Auslöser für diesen Sekundärschaden sind viele komplexe Mechanismen, die im primären Läsionskern beginnen. Da diese im Gegensatz zum Primärschaden beeinflussbar sind, stellen sie Angriffspunkte für therapeutische Interventionen dar, mit dem Ziel eine weitere Vergrößerung des primären Schadens zu verhindern. Diese sekundär ablaufenden pathophysiologischen Mechanismen sind komplex, laufen teilweise parallel ab und verstärken bzw. hemmen sich gegenseitig.

Im primären Läsionskern kommt es zu einer Zerstörung von Zellen, Blutgefäßen und der Blut-Hirn-Schranke (BHS). Dadurch können Moleküle und Zellen aus dem Blutkreislauf in den Interzellularraum und Extrazellularraum übertreten und im Bereich des primären Schadens verschiedene Kaskaden auslösen. Außerdem treten dabei auch Bestandteile von zerstörten neuronalen Zellen in den Kreislauf über und aktivieren wiederum verschiedene Mechanismen in weiter entfernten Arealen. Dadurch kommt es zu Blutungen, Ödem und zur Schwellung des Gehirns. Wenn es sich um ein geschlossenes SHT handelt, kann sich das Hirngewebe nur gering ausbreiten und es kommt entsprechend der „Monro-Kellie-Doktrin“ zur Erhöhung des intrakraniellen Drucks und damit zu einer verminderten zerebralen Perfusion. Dieses führt zu Hypoxie im gesunden Gewebe und setzt weitere Mechanismen in Gang.

Die Mechanismen der Exzitotoxizität, der Neuroinflammation und die Bedeutungen der Störung der zellulären Kalzium Homöostase, der mitochondrialen Dysfunktion, der reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS), der BHS, der Astrozyten und der Mikrogliazellen sollen im Folgenden beleuchtet werden. Am Ende werden die Veränderungen der

Gerinnung diskutiert, auf denen in Abschnitt 5.2 mit der Ergebnisdiskussion aufgebaut werden soll.

2.1 Exzitotoxizität

Die primäre mechanische Zerstörung der neuronalen Zellen und der BHS sorgt für eine verstärkte Freisetzung von exzitatorischen Transmittern wie Glutamat und Aspartat in den extrazellulären Raum. Dieses und die Hochregulation der N-Methyl-d-Asparaginsäure- (NMDA) und der α -Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionsäure- (AMPA) Rezeptoren auf Neuronen führt durch die Überstimulierung zur Beschädigung und Zerstörung der Nervenzellen (7-9). Gleichzeitig zeigt sich nach einer traumatischen Gehirnverletzung (TBI) eine Herunterregulation der Glutamat Transporter auf den Astrozyten, was für eine weitere Erhöhung des Transmitters Glutamats an den neuronalen Rezeptoren sorgt (10, 11). Diese Rezeptoren führen zu einem Einstrom von Kalzium- und Natrium-Ionen und dadurch zu einer Membrandepolarisation (12-15). Die hohe intrazelluläre Kalzium-Ionen Konzentration führt zu verschiedenen Effekten. Sie aktiviert katabolische Enzyme, wie Phospholipasen, die Zellen und Mitochondrienmembranen schädigen, Proteasen, die das Zytoskelett schädigen und Endonukleasen, die die DNA fragmentieren (16). Außerdem kommt es zur Aktivierung der Kalzium-Calmodulin-abhängigen Protein Kinsae 2 (CaMK2) (17), den Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) (18) und der Proteinphosphatase (19). Dieses führt zu Nekrose und Apoptose von Nervenzellen.

Des Weiteren bewirkt der durch Glutamat aktivierte NMDA-Rezeptor die Bildung von ROS und Stickstoffmonoxid (NO). NO dient dabei als Transmitter zwischen der NMDA-Rezeptor Aktivierung und der NADPH Oxidase (NOX)-2 abhängigen Bildung von ROS (20, 21). ROS führen zu weiteren Zellschädigungen und zur Beeinträchtigung der Mitochondrien, welche eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Kalzium-Ionen Homöostase der Zelle haben. Durch diesen Mechanismus und durch die Glutamat abhängige Aktivierung der Phospholipase C kommt es zu einer weiteren Freisetzung von Kalzium-Ionen in das Zytosol (5). Dadurch entsteht ein sich selbst verstärkender Mechanismus.

2.2 Funktionsstörung der Mitochondrien

Normalerweise fungieren die Mitochondrien neben der Energieproduktion als zellulärer Speicher für Kalzium-Ionen, um die intrazelluläre Kalzium-Homöostase aufrecht zu erhalten. Durch die extreme intrazelluläre Erhöhung der Konzentration von Kalzium-Ionen nach der Aktivierung der NMDA- und AMPA-Rezeptoren im Rahmen der exzessiven neuronalen Aktivierung kommt es zur Öffnung der mitochondrialen Permeabilität-Transitions-Pore (mPTP) und damit zur mitochondrialen Membranpermeabilitäts Transition (mPT), welche mit einer erhöhten Membranpermeabilität der Mitochondrien einhergeht (22, 23). Die Öffnung des mPTP scheint ein Cyclophilin D abhängiger Prozess zu sein (23, 24). Mit verantwortlich für diese Cyclophilin D abhängige Öffnung der mPTP sind die Akkumulation von Kalzium-Ionen, der Ioneneinstrom in die Mitochondrien und die dadurch hervorgerufene Depolarisation der Mitochondrienmembran und Bildung von ROS (5, 25). Durch die hohe Konzentration an Kalzium-Ionen kommt es zur Verringerung des Membranpotenzials, wodurch die Aktivität der ATP-Synthase verringert wird oder die Reaktion sogar in entgegengesetzter Richtung abläuft. In diesem Fall werden die Mitochondrien zu einem Verbraucher von ATP und es kommt zu einer vermehrten Produktion von ROS (26). ROS führen zu oxidativen Schäden der mitochondrialen Proteine, Lipide und der Nukleinsäuren (27-31) und zur Oxidation des Adenosin-Nukleotid-Transporters (ANT) (32). Dies ermöglicht Cyclophilin D und einigen weiteren Proteinen an diesen zu binden und damit die Bildung des mPTP Komplex, der eine mPT bewirkt (26, 33, 34). mPT bedeutet eine plötzliche Permeabilitätszunahme der Mitochondrien und eine Extrusion von Kalzium-Ionen und anderen Komponenten mit niedrigem und hohem Molekulargewicht. Dies führt zum weiteren Zusammenbruch des durch die Elektronentransportkette entstandenen Membranpotentials und damit zur weiteren Störung der ATP-Synthese (23). Außerdem kommt es zum Schwellen der Mitochondrien und zur Ruptur der äußeren Membran (31, 35). Das Zytosol der Zelle und die Mitochondrienmatrix sowie deren Intermembranraum werden zu einem gemeinsamen Raum (26).

Insgesamt führt dieses wegen der beeinträchtigten oxidativen Phosphorylierung zu einer verminderten Energieversorgung der Zelle. Zusätzlich kommt es durch die aus den Mitochondrien freiwerdenden Proteine, wie Cytochrom C und Apoptose-induzierender Faktor (AIF), auch zur Aktivierung von katabolischen Proteasen und Nukleasen und damit zur Induktion der Apoptose (31, 36, 37) und Nekrose (26, 35).

2.3 Oxidativer Stress

ROS und freie Radikale entstehen nach einem SHT aus verschiedenen Quellen wie den schon beschriebenen Wegen der Exzitotoxizität und der gestörten Mitochondrienfunktion, aber auch durch aktivierte neutrophile Granulozyten und verschiedene enzymatische Prozesse.

Während der oxidativen Phosphorylierung können Elektronen durch die Komplexe der Elektronentransportkette in die Mitochondrien gelangen und mit molekularem Sauerstoff zu Superoxid reagieren. So entstehen physiologisch ROS. Unter normalen Bedingungen wird aus dem Superoxid durch die mitochondriale Superoxid-Dismutase das relativ stabile Wasserstoffperoxid. Um dieses weiter zu neutralisieren, reagiert es mit der Glutathion Peroxidase und Katalase zu Wasser und molekularem Sauerstoff. Durch das SHT kommt es zu einem ATP Mangel und energieverbrauchende Prozesse kommen zum Erliegen. Daher entstehen vermehrt ROS, die nicht mehr neutralisiert werden können (26).

Der größte Teil der ROS entsteht jedoch, wie bereits in Abschnitt 2.1 Exzitotoxizität beschrieben, durch eine Hochregulation der NOX (38). Vor allem die NOX-2, welche in Phagozyten vorkommt, sorgt beim oxidativen Burst während der Phagozytose für die ROS Bildung. Dies spielt nach einem SHT eine bedeutende Rolle, da es durch inflammatorische Prozesse schnell zu einer starken Aktivierung der phagozytotisch aktiven Mikroglia Zellen kommt (39, 40). ROS reagieren mit DNA, Proteinen und den Fettsäuren aus den Phospholipiden der Membranen. Dies führt wie bereits dargestellt zu erhöhter Membranpermeabilität und Apoptose, Nekrose und Autophagie. Die Lipidperoxidation spielt dabei eine wichtige Rolle, da sie zur Bildung von 4-Hydroxynonenal führt. Dieses hemmt die Glutamat-Transporter der Astrozyten und steigert damit die Exzitotoxizität. Außerdem wird die Kalzium-ATPase beschädigt, was wiederum zu einer vermehrten Freisetzung von Kalzium-Ionen in den Intrazellularraum führt (40-42). Damit verstärken sich die Mechanismen wiederum gegenseitig.

Neben der NOX abhängigen Produktion der ROS kommt es durch Kalzium-Ionen auch zur verstärkten Aktivierung der Stickstoffmonoxid-Synthase. Stickstoffmonoxid und Superoxide können zu Peroxynitrit reagieren, welches ebenfalls für oxidativen Schaden an den Lipiden und Proteinen sorgt (5, 31, 41, 43).

2.4 Neuroinflammation

Innerhalb kurzer Zeit nach einem SHT beginnen neuroinflammatorische Mechanismen abzulaufen. Der physiologische Sinn dieser Mechanismen besteht im Schutz vor möglicherweise durch die Verletzung eintretender pathologischer Erreger und in der Regenerierung von verletztem Gewebe (44). Dabei kommt es zu einer Aktivierung des Komplementsystems. Dieses wiederum führt durch den Membranangriffskomplex zur Zerstörung von Nervenzellen, Akkumulation von neutrophilen Granulozyten und Mikroglia Zellen und zur Steigerung der Neuroinflammation (45, 46).

Die Neuroinflammation beginnt innerhalb weniger Minuten nach dem SHT mit dem Hindurchtreten von kleinen und großen Molekülen, sowie auch Leukozyten durch die geschädigte BHS. Dabei kommt es nicht nur im Bereich der primären Schädigung zur Akkumulation dieser Moleküle und Zellen, sondern auch im Bereich des sekundären Schadens (47-49). Daraufhin kommt es zur vermehrten Expression und Bildung von Chemokinen, proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin (IL)-6, IL-8, Tumornekrosefaktor (TNF)- α und IL-1 β , und auch antiinflammatorischen Zytokinen (50-52). Diese werden nicht nur von transmigrierenden Leukozyten produziert, sondern auch von aktivierten endogenen Zellen des ZNS wie den Mikroglia Zellen (53, 54). Beteiligt an der Rekrutierung dieser Immunzellen in Richtung des Schadens ist der CC-Chemokin-Ligand-2 (CCL2) (55).

Eine wichtige Rolle in den neuroinflammatorischen Mechanismen spielen die bereits erwähnten Mikroglia Zellen (48). Bei diesen ließen sich zwei verschiedene Phänotypen feststellen, die als M1 und M2 bezeichnet wurden. M1 stellt mit der vermehrten Bildung der Zytokine IL-6, IL-1 β und TNF- α einen proinflammatorischen Phänotyp dar. Bei M2 handelt es sich durch die vermehrte Bildung von IL-4, IL-10 und IL-13 um einen antiinflammatorischen Phänotyp. Je nach Phase des Verlaufs nach dem TBI sind diese beiden Phänotypen unterschiedlich stark aktiv. Man geht jedoch davon aus, dass es nicht entweder nur den M1 oder nur den M2 Phänotyp gibt, sondern regelhaft eine Mischform der beiden vorliegt. In der Regel dominiert hierbei jedoch der proinflammatorische M1 Phänotyp insbesondere in der frühen Phase nach dem TBI (49, 52, 56). Der M1 Phänotyp geht außerdem mit einer gesteigerten NOX-2 Expression einher und damit mit einer vermehrten ROS Produktion wie bereits in Abschnitt 2.3 dargestellt (56). Dies zeigt wiederum, dass Neuroinflammation nicht nur zu Ödembildung, weiterem Zusammenbruch der BHS und neuronalem Zelltod führt,

sondern auch neuroprotektive, neuroreparative und regenerative Wirkung haben kann (44, 49, 54, 55).

2.5 Zelltod

Alle diese Mechanismen und Vorgänge wie die Exzitotoxizität, Funktionsstörung der Mitochondrien, ROS und Neuroinflammation bedingen sich gegenseitig, verstärken und aktivieren sich und können schlussendlich zum neuronalen Zelltod führen und den sekundären Schaden im Bereich der Penumbra auslösen. Zum letztendlichen Zelltod führen verschiedene Mechanismen wie die Nekrose, Apoptose und die Autophagie. Diese Mechanismen laufen nach einem SHT vermehrt und zum Teil parallel ab. Außerdem können sich teilweise Mischformen dieser Mechanismen zeigen (37, 57-60).

Die Nekrose ist ein pathologischer Prozess, der durch Sauerstoff- und Nährstoffmangel entsteht, welcher wiederum durch das Zusammenbrechen von Ionengradienten und der Stoffwechselprozesse der Zellen verursacht wird. Dies führt zum Anschwellen der Zelle und deren Organellen, bis es schließlich zur Ruptur und Zerstörung der Zelle kommt (40). Sie findet vor allem im Bereich des primären Schadens statt, ist aber auch bei der Ausbildung des sekundären Schadens beteiligt (37, 60).

Bei der Apoptose spricht man vom programmierten Zelltod, der durch verschiedene Mechanismen reguliert wird, welche ebenfalls parallel ablaufen und sehr komplex sind. Auf einige von diesen soll nun eingegangen werden. Ein Mechanismus, der nach einem SHT zum Zelltod durch Apoptose führt, ist der MAPK-Pathway. Glutamat führt vor allem über den NMDA Rezeptor und Kalzium-Ionen zur Aktivierung von MAPK wie p38 (61). Neben p38 kommt es auch zu einer vermehrten Phosphorylierung der extrazellulären signalregulierten Kinase (ERK) (62). Durch die Aktivierung dieser MAPK ist der MAPK-Pathway nach einem TBI verstärkt aktiviert. Verantwortlich dafür sind neben der Exzitotoxizität und den Kalzium Ionen auch die durch Neuroinflammation vermehrt freigesetzten Zytokine. Auch der Janus-Kinase/Signalwandler und Transkriptionsaktivator (JAK/STAT) -Pathway ist vermehrt aktiviert. Dieser stellt einen der wichtigsten Mechanismen zur Übertragung der Signale von Zytokinen auf der Zelloberfläche zum Zellkern dar (63). Am Ende dieser

Mechanismen steht die Induktion der Apoptose und des Zelltodes. Die Apoptose kann unterteilt werden in einen Caspase-abhängigen und -unabhängigen Mechanismus. Wie bereits in Abschnitt 2.2 beschrieben kommt es durch die mitochondriale Funktionsstörung zu einer Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien. Dies führt zur Aktivierung von Caspasen, welche den Caspasen-abhängigen Zelltod induzieren. Neben diesem intrinsischen mitochondrialen Weg zur Aktivierung der Caspasen gibt es noch einen extrinsisch vermittelten Weg. Nach Bindung der an der Zelloberfläche gelegenen Fas-Rezeptoren mit einem Fas-Liganden, wie zum Beispiel TNF- α , kommt es zur Aktivierung der Caspasen (64). Caspasen müssen für ihre Aktivierung proteolytisch gespalten werden. Nach einem TBI sind vor allem die Caspase 1, 3 und 8 vermehrt exprimiert, was zur Spaltung von DNA-Reparatur-Proteinen, Zytoskelett-Proteinen und zu einer vermehrten Aktivität der Desoxyribonuclease führt (37, 58, 64, 65). Dies bewirkt schließlich den Zelltod und einen weiteren Gewebeuntergang.

Beim Caspase-unabhängigen Weg spielt die vermehrte Aktivität der Poly(Adenosindiphosphat(ADP)-ribose)-Polymerase-1 (PARP-1) eine wichtige Rolle. Nach beispielsweise durch ROS verursachten DNA-Schäden (Abschnitt 2.3) bildet die PARP-1 lange verzweigte Poly(ADP-ribose) (PAR) Polymere zur DNA-Reparatur. Bei einer Überaktivität der PARP-1 bei Akkumulation von vielen Schäden kommt es zu einer gesteigerten Bildung von PAR Polymeren, welche ein Zelltod-Signal auslösen, indem sie die Freisetzung von AIF aus den Mitochondrien induzieren. Der AIF gelangt zum Nukleus und führt dort zu einer peripheren Chromatinkondensation, DNA-Fragmentierung und wirkt so zytotoxisch (57, 60, 66, 67). Neben AIF und Cytochrom C gelangen noch weitere Proteine aus den geschädigten Mitochondrien und führen über einen Caspase-unabhängigen Weg ebenfalls zum Zelltod oder modifizieren diesen. Dies sind unter anderem Smac/DIABLO, Endonuclease G und Omi/HtrA2 (68). Ein weiterer Caspase-unabhängiger Weg zum Zelltod ist die Aktivierung von Calpain durch Peroxynitrit, welches ebenfalls im Rahmen der Bildung von ROS entsteht. Calpain sorgt für eine Proteolyse des Zytoskeletts und induziert somit ebenfalls den Zelltod (43).

Neben der vermehrten Aktivierung dieser Mechanismen der Apoptose kommt es nach einem SHT auch zu einem veränderten Verhältnis pro- und anti-apoptotischer Proteine. Es zeigt sich eine vermehrte Expression des pro-apoptotischen Protein Bax, aber nicht des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 (60, 69, 70).

Die Autophagie ist ein intrazelluläres Abbausystem für das Recyclen von Proteinen und Zellorganellen. Dabei führt es den Lysosomen zytoplasmatische Bestandteile zu. Die Schritte, die bei der Autophagie nacheinander ablaufen sind die Sequestrierung, der Transport zu den Lysosomen, Abbau und die Wiederverwendung der Abbauprodukte (71, 72). Dabei kann die Autophagie teilweise Zellstress kompensieren und den Zelltod durch Apoptose verhindern oder auch bei anderen zellulären Gegebenheiten einen alternativen Zelltod-Pathway darstellen. Somit können Autophagie und Apoptose teilweise gemeinsam mit den gleichen auslösenden Signalen und molekularen Mechanismen ablaufen, teilweise aber auch getrennt voneinander auf sich einander ausschließenden Wegen (73). Nach einem SHT kommt es zu einer Hochregulation von Markern der Autophagie (74-76). Die Autophagie kann dabei als eine Art Schutz der Zellen vor der Induktion der Apoptose fungieren (77). Die Autophagie kann verhindern, dass ein Zellschaden der zum Beispiel durch oxidativen Stress entsteht, direkt zum Zelltod führt, da dieser recycelt werden kann. So führt eine vermehrte Autophagie zu einer verminderten Translokation des pro-apoptotischen Proteins Bax in die Mitochondrien und zu einer verminderten Freisetzung von Cytochrom C (78, 79). So zeigt sich, dass die verminderte Autophagie nach SHT wegen einer gestörten Lysosomen Funktion mit vermehrtem neuronalem Zelltod assoziiert ist (80).

Neben dem Untergang von Gewebe durch den mechanischen Stress des Traumas und die verschiedenen anderen Mechanismen, die zum Zelluntergang führen, kommt es mit der Zeit auch zum Umbau des Gewebes. Dafür verantwortlich sind vor allem die Astrozyten, da es zu einer reaktiven Astroglieose kommt. Die Astrozyten hypertrophieren, proliferieren und verändern ihre Genexpression. Dadurch bildet sich eine Narbe, die den beschädigten Teil des Gehirns vom Rest abtrennt. Außerdem sind die Astrozyten beteiligt an der Modulation der Inflammation und der Neurone (81, 82).

2.6 Gerinnungsstörungen

Nach einem SHT kann es zu hyper- und hypokoaguablen Zuständen kommen, wobei der Übergang zwischen diesen Zuständen meist fließend ist. Diese Gerinnungsstörungen sind mit einer erhöhten Mortalität und schlechterem Outcome assoziiert (83, 84).

Zunächst kommt es durch die mechanisch zerstörten Mikrogefäße und BHS zu einer verstärkten Interaktion zwischen den Thrombozyten und dem gestörten Endothel oder der freigelegten subendothelialen Matrix. Dies führt zu einer direkten oder über den von Willebrand Faktor vermittelten Adhäsion und Aktivierung der Thrombozyten (85, 86). Dadurch kommt es zur Bildung von Mikrothromben und zur Hypoxie im nachfolgenden Stromgebiet (87, 88). Hieraus folgt eine weitere Beschädigung der BHS und die Freisetzung von weiteren prokoagulativen Molekülen wie dem Plättchen-aktivierenden Faktor (PAF) und dem Gewebefaktor (TF). Der freigesetzte PAF verursacht ebenfalls eine weitere Störung der BHS (89). Die Hyperaktivität der Thrombozyten führt zu einem vermehrten Verbrauch von Blutplättchen, der bis zu einer endgültigen Erschöpfung dieser reichen kann und dadurch wiederum das Risiko für Blutungen erhöht (90). Zusätzlich kann sich durch eine verminderte thrombozytäre Reaktionsfähigkeit auf die Agonisten ADP und Arachidonsäure eine Thrombozytendysfunktion zeigen, die ebenfalls das Blutungsrisiko erhöht (91-94). Der aus dem Hirnparenchym in die Blutbahn gelangende TF bindet im Blut an den Gerinnungsfaktor VII und sorgt über den extrinsischen Weg für eine Aktivierung der Gerinnungskaskade (95, 96). Dies trägt ebenfalls durch Mikrothromben Bildung zu einer disseminierten intravaskulären Koagulation bei und führt zum weiteren Verbrauch von Gerinnungsfaktoren und Thrombozyten (97-101). Außerdem werden aus den verletzten Gehirn-Zellen Mikrovesikeln in die Blutbahn freigesetzt. Diese sind reich an TF und anionischen Phospholipiden wie Phosphatidylserin und binden an Gerinnungsfaktoren. Dadurch entsteht ein prokoagulativer Komplex der Thrombozyten und Thrombin aktiviert und zusätzlich Endothelzellen zur Bildung von weiteren prokoagulativen Mikrovesikeln aktiviert (102, 103).

Neben den Veränderungen in der primären und sekundären Hämostase kommt es teilweise auch zu einer Hyperfibrinolyse durch eine vermehrte Freisetzung der endogenen Plasminogenaktivatoren (104, 105). Zusätzlich wird vermehrt die Protein C Kaskade aktiviert, die zu einer Hemmung der Gerinnungsfaktoren Va und VIIIa führt und somit ebenfalls eine Hyperfibrinolyse bewirkt (97, 106). Dies wiederum hemmt die Bildung von Gerinnseln oder führt zum Auflösen der Gerinnsel und zu einer erhöhten Blutungsneigung.

Zwischen dem Gerinnungssystem und der Neuroinflammation gibt es vor allem über die Mechanismen des Komplementsystems Interaktionen, die dazu führen, dass sich die Systeme gegenseitig verstärken und aktivieren (107-111).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Absolute Blue qPCR SYBR Green Mixe	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Aqua destillata	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Chloroform	Merck, Darmstadt, DE
DAB Chromogen Removal System	Dako Omnis Agilent, Santa Clara, USA
DC TM Protein Assay Reagent (A,B,S)	BioRad, Hercules, USA
Ethanol absolut	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Ethylendiaminotetraacetat (EDTA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Fast SYBR™ Green Mastermix	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Flüssigstickstoff	Air Liquide, Düsseldorf, DE
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Kresylviolett	Merck, Darmstadt, DE
LightCycler® 480 Probes Master	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, CH
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt, DE
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Merck, Darmstadt, DE
Proteaseinhibitor	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, DE
Protease-Activated Receptor-4 (PAR-4)	AnaSpec, Fremont, USA
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen N.V., Venlo, NL
RNeasy Plus Universal Mini Kit	Qiagen N.V., Venlo, NL
Roti®-Histokitt	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Roti®-Histol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE

Triton™ X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tween-20	GE Healthcare, Buckinghamshire, GB
VECTASTAIN® Avidin-Biotin Complex Staining Kit (ABC-Komplex)	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien

3.1.2 Lösungen

Lösung	Rezeptur
Kresylviolett färbelösung	0,031 mM Kresylviolett , 20 % (v/v) Ethanol
Radioimmunoprecipitationassay- (RIPA) Puffer	1 M Tris pH 7,4, 1 M NaCl, 0,5 M EDTA, 10 % (v/v) NP-40, 15 % (v/v) Protease-Inhibitor
Tris-gepufferte Salzlösung (TBS)	15 mM NaCl, 5 mM Tris, 0,2 mM HCl, pH 7,4 / + 0,05 % (v/v)
TBST	TBS + 0,05 % (v/v) Tween-20

Tabelle 2: Verwendete Lösungen

3.1.3 Pharmakotherapieutika

Handelsname	Wirkstoffname	Hersteller
Bepanthen® Augensalbe	Dexpanthenol	Bayer, Leverkusen, DE
Dorbene vet®	Medetomidin	Zoetis Deutschland GmbH, Berlin, DE
Fentanyl-Janssen	Fentanyl	Janssen-Cilag GmbH, Neuss, DE
Forene®	Isofluran	AbbVie Deutschland, Wiesbaden, DE
Histoacryl®	n-Butyl-2-Cyanoacrylat	B. Braun Surgical, Rubí, ES
Midazolam-hameln	Midazolam	hameln pharma plus GmbH, Hameln, DE
NaCl 0,9 %	Isotone Kochsalzlösung	B. Braun Melsungen GmbH, Melsungen, DE

Tabelle 3: Verwendete Pharmakotherapieutika

3.1.4 Verbrauchsmaterialien

Material	Nähere Bezeichnung	Hersteller
96-Well Platte	Dana	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, DE
Blutzucker Teststreifen	Accu-Check® Aviva	Roche Diabetes Care GmbH, Mannheim, DE
Chirurgisches Nahtmaterial	Prolene 6-0	Ethicon, San Lorenzo, USA
Deckgläser	24 x 60 mm (Milimeter)	Waldemar Knittel Glasbearbeitungs GmbH, Braunschweig, DE
Dreiwegehahn	BD Connecta™	Becton Dickinson Infusion Therapy AB, Helsingborg, S
Einbettmedium	NEG 50™	Richard Allan Scientific, Thermo Scientific, Dreieich, DE
Einstreu	Lignocel® FS 14	J.Rettenmaier & Söhne GmbH&Co. KG, Rosenberg, DE
Einwegkanüle	Sterican® 19G, 26 G	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Einwegpipetten	Cellstar® 25 ml (Mili- /Liter), 10 ml, 5ml	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, DE
Einwegspritze	BD Discardit™ II	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Einwegspritze	Injekt®-F	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Faltenfilter		Macherey-Nagel, Düren, DE
Filterpapier		Schleicher & Schuell Bioscience GmbH, Dassel, DE

Klingen	Apollo	Herkenrath GmbH & Co. KG, Solingen, DE
Kryo-Boxen		Ratiolab GmbH, Dreieich, DE
Mikropipettenspitzen	1000 μ (Mikro-), 200 μ l, 10 μ l	Sarstedt, Nürnbrecht, DE
Mikropipettenspitzen	Tip One 1000 μ l, 200 μ l, 10 μ l	Starlab International GmbH, Hamburg, DE
Mikropipettenspitzen	Safe Seal SurPhop 1000 μ l, 300 μ l, 10 μ l	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, DE
Nitrozellulosemembran		Thermo Fisher Scientific, Walldorf, DE
Objektträger	Superfrost [®] plus	Thermo Scientific, Braunschweig, DE
Objektträgerkasten		VWR, Darmstadt, DE
Papierhandtücher	grün, 1-lagig	Schuch Laborhandel und Klinikbedarf, Langgöns, DE
Reaktionsgefäße	Falcon [®] 50 ml; 15 ml	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, DE
Reaktionsgefäße	Safe-Lock (2,0 ml; 1,5 ml; 0,5 ml)	Eppendorf, Hamburg, DE
Saugtupfer	Sugi [®] Sponge Points	Kettenbach, Eschenburg, DE
Schmalbandklinge	Feather [®] Microtome Blade C35	Feather Safety Razor Co., Osaka, J
Schnittstreckerplättchen	Microm	Thermo Fisher Scientific, Walldorf, DE
Tierfutter	Maus Zucht Extrudat	ssniff Spezialdiät GmbH, Soest, DE

Tabelle 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien

3.1.5 Geräte

Funktion	Gerät	Hersteller
Blutzucker Messgerät	Accu-Check® Aviva	Roche Diabetes Care GmbH, Mannheim, DE
Detektionssystem	GloMax®-Multi+ Detection System	Promega, Mannheim, DE
Fluoreszenz-Detektionssystem	Odyssey®	Li-Cor Biosciences, Bad Homburg, DE
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, DE
Homogenisator	Mastermill MM 300	Retsch Technology GmbH, Haan, DE
Hämatologie Analysator	Sysmex Cellcounter XP-300	Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, DE
Käfige	Filtertopkäfig Typ-II lang	Bioscape GmbH, Castrop- Rauxel, DE
Kryotom	CryoStar Microm NX 70	Thermo Scientific, Walldorf, DE
Magnetrührer	Ikamag® Ret	Janke und Kunkel, Staufen, DE
Mikrobohrer	Uni-Drive N Komplettgerät	Paggen, Starnberg, DE
Mikropipetten	Research, Research Plus, Reference	Eppendorf, Hamburg, DE
Mikroskopkamera	Axiocam 105 color	Karl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, DE
Mikroskopsoftware	Zen 2.6 blue edition	Karl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, DE
Narkosegasvapor	Vapor 19.3	Drägermedizintechnik GmbH, Lübeck, DE
Operationsmikroskop	Technoskop OPMI 11	Karl Zeiss Meditec AG, Jena, DE

Photometer	NanoVueTM	GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK
quantitative RT-PCR (real-time-Polymerasekettenreaktion)	LightCycler® 480	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
Rotarod	RS232/LE8200	Hugo Sachs, March Hugstetten, DE
Schüttler	Rotamax 120	Heidolph, Schwabach, DE
Stereomikroskop	Stemi 305	Karl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, DE
Stereotaxierahmen	Stereotaxierahmen	Kopf Instruments, Tujunga, USA
Taumler	Unimax 2010	Heidolph, Schwabach, DE
Tiefkühlschrank -20 Grad Celsius (°C)	Liebherr GG 5210 ProfiLine	Liebherr, Ochsenhausen, DE
Tiefkühlschrank -20 °C	UPUL 540	Liebherr, Ochsenhausen, DE
Tiefkühlschrank -80 °C	MDF-U74V	Sanyo Electric Co., Osaka, J
Tierhaltungsschrank	UniProtect THF 3378- VO2	Bioscape, Castrop- Rauxel, DE
Traumamaschine	Controlled Cortical Impactor	Kopacz, Mainz, DE
Thrombozytenfunktionsdiagnostik	Multiplate® Analyzer	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
Videotracking Software	EthoVision XT	Noldus, Wageningen, NL
Vortex	Reax control	Heidolph, Schwabach, DE
Waagen	Sartorius research	Sartorius, Göttingen, DE
Waagen	Sartorius labratory	Sartorius, Göttingen, DE

Wärmeplatte	TCAT-2DF Controller	Physitemp, New Jersey, USA
Zentrifuge	Centrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg, DE
Zentrifuge	Micro Star 17 R	VWR, Darmstadt, DE
Zentrifuge	Heraeus Pico 17	Thermo Scientific, Walldorf, DE
Zentrifuge	Megafuge 1.0	Thermo Scientific, Walldorf, DE

Tabelle 5: Verwendete Geräte und Software

3.1.6 Antikörper (AK)

Target	Spezies	Verdünnung	AK	Hersteller
Maus Fc-Fragment	Ziege	1:500	BA-9200	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Maus Fc-Fragment	Ziege	1:15000	IRDye 800CW (Anti-Maus)	Li-Cor Bioscience GmbH, Bad Homburg, DE

Tabelle 6: Verwendete Antikörper

3.1.7 Primer

Target	Sequenz	Richtung
Peptidylprolyl Isomerase A (PPIA)	5'-GCGTCTSC TTCGAGCTGTT-3'	Sense
	3'-RAAGTCACCACCCTGGCA-5'	Anti-Sense
TNF- α	5'-TCTCATCAGTTCTATGGCCC-3'	Sense
	3'-GGGAGTAGACAAGGTACAAC-5'	Anti-Sense
IL-1 β	5'-GTGCTGTCGGACCCATATGAG-3'	Sense
	3'-CAGGAAGACAGGCTTGTGCTC-5'	Anti-Sense
Ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1)	5'-ATCAACAAGCAATTCCTCGATGA-3'	Sense
	3'-CAGCATTCGCTTCAAGGACATA-5'	Anti-Sense

Tabelle 7: Verwendete Primer

3.2 Methoden

3.2.1 Beschreibung der Versuchsabläufe der einzelnen Studien

Die Versuche dieser Arbeit lassen sich in drei Abschnitte unterteilen. Zu Beginn erfolgten die Untersuchungen an nativen Tieren, getrennt nach männlichem und weiblichem Geschlecht, welche noch keinem SHT ausgesetzt waren. Hierbei sollten die Unterschiede zwischen Tieren mit einem Thrombozyten-spezifischen Knockout des SGLT-2 Transporters und Wildtyptieren im nativen Zustand auffindig gemacht werden. Dies bildete die Grundlage, um die unterschiedlichen Auswirkungen des SHTs auf die Knockouttiere bzw. Wildtypiere beurteilen zu können.

Dazu ließ man im nächsten Studienabschnitt die Tiere insgesamt 6 Stunden nach einem induzierten SHT überleben. Diese Untersuchungen wurden an geschlechtergemischten Gruppen durchgeführt.

Aufgrund der Ergebnisse aus diesem Studienabschnitt wurden die anschließenden Versuche des letzten Abschnitts, in denen man die Tiere 5 Tage nach induziertem SHT überleben ließ, in geschlechtergetrennten Gruppen durchgeführt.

3.2.1.1 Studie von nativen Männchen und Weibchen

Die hier beschriebenen Versuche dienten der Überprüfung, von Unterschieden der Knockoutmäuse und der Wildtypmäuse im nativen Zustand, also noch ohne ein, in der Operation durch einen kontrollierten kortikalen Einschlag (CCI) ausgelöstes, SHT.

Dazu wurden jeweils 6 männliche Knockoutmäuse mit 6 männlichen Wildtypmäusen und 6 weibliche Knockoutmäuse mit 6 weiblichen Wildtypmäusen anhand verschiedener für diese Arbeit relevanten Aspekte verglichen. Die Untersuchungsaspekte waren bei allen Mäusen das Gewicht, das Blutbild, die Thrombozytenaggregationsfähigkeit und die mRNA-Expression. Lediglich bei den männlichen nativen Tieren wurden zusätzlich Untersuchungen an Proteinen durchgeführt.

Im ersten Schritt wurden alle Mäuse zunächst gewogen, bevor ihnen im zweiten Schritt retrobulbär Blut entnommen und sie daraufhin euthanisiert wurden (s. Abschnitt 3.2.6). Anhand des entnommenen Blutes wurde das Blutbild mit Hilfe des „Sysmex

Cellcounter“ (s. Abschnitt 3.2.8.1) und die Thrombozytenaggregationsfähigkeit durch den „Multiplate® Analyser“ (s. Abschnitt 3.2.8.2) bestimmt.

Anschließend konnte den Tieren entsprechend des Abschnitts 3.2.7 das Gehirn entnommen werden und daraus Hirnschnitte angefertigt werden (s. Abschnitt 3.2.9.1). Außerdem generierte man bei diesem Prozess Proben für die späteren RNA- und Protein-Analysen (s. Abschnitte 3.2.10 und 3.2.11).

3.2.1.2 Studie von Männchen und Weibchen mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT

In dieser Studie wurden die Wildtyp- und Knockouttiere 6 Stunden nach dem induzierten SHT miteinander verglichen. Zu dieser Analyse wurden geschlechtergemischte Gruppe von 14 Wildtyptieren und 13 Knockouttieren untersucht.

Genotyp/ Geschlecht	Wildtyp (Gruppe A)	Knockout (Gruppe B)
Weiblich	7	7
Männlich	7	6

Tabelle 8: Anzahl der Versuchstiere in der Studie von Männchen und Weibchen mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT

Bei diesen Tieren wurden das Gewicht und der Blutzucker (BZ) jeweils präoperativ und prä-mortem bestimmt. Außerdem wurde das Blutbild, die Thrombozytenaggregationsfähigkeit, die mit Kresyviolett und einer Immunhistochemie (IHC) für Immunglobulin G (IgG) angefärbten Hirnschnitte, die mRNA-Expression und die Proteine analysiert.

Zunächst wurden die Tiere gewogen und anschließend, wie in Abschnitt 3.2.4 beschrieben, in Sedierung der BZ gemessen und daraufhin das SHT mittels CCI zugefügt.

6 Stunden nach dem SHT wurden die Tiere erneut gewogen und kurz vor der Euthanasie in Sedierung ebenfalls der BZ gemessen (s. Abschnitt 3.2.6). Außerdem wurde Blut für den „Sysmex Cellcounter“ und den „Multiplate® Analyser“ entnommen (s. Abschnitt 3.2.6 und 3.2.8). Nach der Euthanasie wurde das Gehirn entfernt und eingefroren (s. Abschnitt 3.2.7).

Die angefertigten Hirnschnitte wurden mit Kresylviolett gefärbt, wodurch das Schadensvolumen ausgemessen und analysiert werden konnte. Außerdem konnte durch eine immunhistochemische Färbung von IgG die Extravasation von IgG bestimmt werden (s. Abschnitt 3.2.9).

Zuletzt wurden verschiedene RNA- und Proteinanalysen aus den bei der Herstellung der Hirnschnitte entstandenen Proben durchgeführt (s. Abschnitt 3.2.10 und 3.2.11).

3.2.1.3 Studie von Weibchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT

In dieser Studie wurden die Tiere über einen Zeitraum von 5 Tagen nach dem SHT am Leben gelassen. Aufgrund der Ergebnisse der Studie mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT, wurden die Gruppen für diese Studie nach Geschlechtern aufgeteilt.

Somit wurden zunächst 14 weibliche Wildtypiere mit 14 weiblichen Knockouttieren verglichen. Dazu wurden ebenfalls das Gewicht und der BZ, jeweils präoperativ und prä-mortem, sowie das Blutbild, die Hirnschnitte in der Kresylviolett-Färbung und die mRNA-Expression analysiert. Zusätzlich kamen Motorfunktionsanalysen hinzu, welche den „Neurological Severity Score (NSS)“ und den „Rotarod-Leistungstest“ umfassten (s. Abschnitt 3.2.5).

Für die Motorfunktionsanalysen mussten die Tiere zunächst jeweils einmal pro Tag an den beiden Tagen vor der Operation am „Rotarod“ trainiert werden. Am Tag der Operation wurden der „Rotarod-Leistungstest“ und zum ersten Mal der „NSS“ durchgeführt, um einen Ausgangswert für die weitere Studie zu erhalten.

Daraufhin wurden die Tiere gewogen, der BZ gemessen und das SHT durch den CCI während einer Operation induziert (s. Abschnitt 3.2.4). Diesmal wurden die Tiere jedoch nicht nach 6 Stunden, sondern erst nach 5 Tagen euthanisiert.

In diesem Zeitraum fanden an Tag 1, Tag 3 und Tag 5 postoperativ im Sinne einer Verlaufsbeobachtung die Motorfunktionsanalysen (s. Abschnitt 3.2.5) statt und die Tiere wurden jeden Tag gewogen.

Nach dem letzten Wiegen und der letzten Motorfunktionsanalyse an Tag 5 postoperativ wurde den Tieren noch einmal in Sedierung der BZ gemessen, Blut für

den „Sysmex Cellcounter“ entnommen und sie wurden anschließend euthanisiert (s. Abschnitte 3.2.6 und 3.2.8.1). Daraufhin wurde das Gehirn entfernt (s. Abschnitt 3.2.7), Hirnschnitte angefertigt und diese mit der Kresylviolett-Färbung ausgewertet (s. Abschnitt 3.2.9). Außerdem analysierte man die mRNA-Expression (s. Abschnitt 3.2.10) auf verschiedene Marker für Neuroinflammation und Mikroglia.

3.2.1.4 Studie von Männchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT

Die Gruppe der männlichen Tiere bestand aus 12 Wildtyptieren und 12 Knockouttieren.

Das Vorgehen und die zeitliche Abfolge dieser Untersuchungen war identisch mit dem der weiblichen Tiere mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT. Der genaue Ablauf ist daher dem Abschnitt 3.2.1.3 zu entnehmen. Der einzige Unterschied bestand in der Verwendung der „EthoVison XT Software“ von Noldus, welche dem Labor erst ab dem Zeitpunkt dieser Versuche zur Verfügung stand. Diese Software wurde bei der Erhebung des „NSS“ eingesetzt und lieferte weitere Daten, wie die zurückgelegte Gesamtstrecke während einer Aufzeichnungsdauer der Mäuse von 2 Minuten (min). Damit kam die Software, wie der „NSS“, ebenfalls erstmals kurz vor der Operation zum Einsatz, um einen Ausgangswert zu generieren, sowie an Tag 1, Tag 3 und Tag 5 postoperativ (s. Abschnitt 3.2.5.1).

3.2.2 Genehmigung der Tierversuche

Alle Versuche wurden gemäß des Tierschutzgesetzes und der Tierschutz-Versuchstierordnung nach Genehmigung durch das Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz durchgeführt (Aktenzeichen G 16-1-079).

3.2.3 Versuchstiere

Das Durchschnittsalter der operierten Tiere lag zwischen 13 und 23 Wochen.

3.2.3.1 Tierstamm und Knockout

Ein SGLT-2tm1c Stamm vom European Conditional Mouse Mutagenesis Program (EUCOMM) wurde mit Pf4Cre Mäusen verpackt. Pf4Cre ist spezifisch für

Thrombozyten, wodurch der Thrombozyten-spezifische SGLT-2 Knockout entsteht. Die Mäuse mit dem Genotyp Pf4Cre +/- und SGLT2 tm1c/tm1c, also „Cre +“, werden als Experimentalgruppe untersucht und als Knockouttiere bezeichnet und mit „KO“ abgekürzt. Die Mäuse mit dem Genotyp Pf4Cre -/- und SGLT2 tm1c/tm1c, also „Cre -“ sind die Kontrollgruppe und werden als Wildtypiere bezeichnet und mit „WT“ abgekürzt. Bei allen Tieren wurde der Genotyp mit einer spezifischen PCR überprüft.

3.2.3.2 Haltung und Pflege

Die Haltung der Tiere fand in Standardkäfigen des Typs 2 statt. Diese besitzen eine Grundfläche von 350 Quadratcentimetern (cm²) und enthalten Streu aus Holzspänen, Zellstoff zum Nestbau und eine Plastikröhre. Das Streu und der Zellstoff wurden in regelmäßigen Abständen und je nach Verschmutzungsgrad gewechselt. Während des Aufenthalts der Tiere im Labor befanden sich die Käfige in einem Tierhaltungsschrank. Bei diesem waren folgende Werte eingestellt und wurden automatisch kontrolliert: 55% Luftfeuchte, 22 °C (Grad Celsius) Lufttemperatur, einen 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus, einen Luftstrom von 43 Kubikmeter/Stunde (m³/h) und damit eine Luftwechsel (LW)-Rate von 25 LW/h.

Während der Versuche wurden die Tiere jeweils allein in einem Käfig gehalten, um Wundinfektionen vorzubeugen, welche durch das Anfressen von anderen Tieren hätten entstehen können.

Oberhalb eines jeden Käfigs befand sich in einem Gittereinsatz ein standardisiertes Alleinfuttermittel und eine Flasche mit Trinkwasser, sodass die Tiere jederzeit essen und trinken konnten. Die Aufbewahrung im Gitter verhinderte zum einen eine Verunreinigung des Futters und diente zum anderen auch als Klettermöglichkeit für die Tiere.

Zum Schutz der Tiere wurde während der Experimente jeden Tag das Gewicht, die Schmerzsymptomatik und das Essverhalten kontrolliert. Bei einem Gewichtsverlust von mehr als 15% zusammen mit verschiedenen Schmerzsymptomen wären die Tiere veterinärmedizinisch begutachtet worden.

3.2.4 CCI-Modell zur Induktion eines SHTs

Beim CCI-Modell handelt es sich um ein bei vielen Tierarten etabliertes Modell zur Induktion eines lokalen SHTs (112, 113). Es entspricht dabei der Pathophysiologie eines geschlossenen SHT, denn es zeigt neben dem direkten Zelluntergang, intraparenchymalen Blutungen und diffusen Axonschädigungen auch intrakranielle Blutungen und eine Erhöhung des intrakraniellen Drucks, der zu einer verminderten Perfusion führt (114). Dies erklärt sich dadurch, dass nach dem Impakt auf das freigelegte Gehirn die Schädelkalotte wieder verschlossen wird, damit keine Druckentlastung wie im Sinne einer Kraniektomie möglich ist. Die genaue Beschreibung der Operation ist aus Abschnitt 3.2.4.2 zu entnehmen.

3.2.4.1 Präoperatives Vorgehen

Bevor mit der Narkose und der Operation begonnen werden konnte, wurden die Tiere zunächst gewogen. Um die Narkose einzuleiten wurde jedes Tier für ca. eine Minute unter eine Kuppel gesetzt, in welche 4 Volumen-% Isofluran geleitet wurde. Dies diente der schonenden Narkotisierung der Tiere, damit sie zur genauen Positionierung des SHT in einen stereotaktischen Rahmen eingespannt werden konnten. Gleichzeitig befand sich die Maus auf einer Wärmeplatte, um ihre Körpertemperatur von etwa 36 °C auch während der Operation konstant halten zu können. Kontrolliert wurde die Körpertemperatur durch eine rektal eingeführte Temperatursonde, welche mit der Wärmeplatte rückgekoppelt war. Zunächst wurde bei der Maus der BZ gemessen. Dazu wurde ihr mit einer kleinen Kanüle in eine Vene im Schwanz gestochen und ein Blutropfen herausgedrückt. Diesen trug man auf den Teststreifen des Blutzucker-Messgerätes auf und das Gerät startete mit der automatischen Messung.

Um die Narkose während der Operation aufrecht zu erhalten, wurde den Mäusen über einen gewöhnlichen Latexhandschuh, welcher zu einer Atemmaske umfunktioniert wurde, 2 bis 2,5 Volumen-% Isofluran bei einem Fluss von 0,5 Liter/min (l/min) Frischluft und 1,0 l/min Sauerstoff verabreicht. Während der gesamten Narkose wurde in regelmäßigen Abständen die Atmung und Narkosetiefe visuell kontrolliert. Die Atemfrequenz sollte perioperativ bei 60 bis 220 Atemzügen/min liegen und die Narkosetiefe wurde durch den Zwischenzehenreflex kontrolliert.

Um optimale Bedingungen für die Operation zu schaffen, wurde auf die Schädelkalotte Bepanthensalbe aufgetragen, um mit einem Wattetupfer das Fell aus dem

Operationsgebiet streichen zu können. Auch auf die Augen wurde großzügig Bepanthenalbe aufgetragen, um einer Austrocknung vorzubeugen.

3.2.4.2 Operation

Die Operation begann mit einem *mediansagittalen* Scherenschnitt entlang der *Sutura sagittalis* von der *Sutura coronaria* bis zur *Sutura lamdoidea*. Damit konnten Haut und subkutanes Fettgewebe nach lateral gelegt werden und man erhielt direkte Sicht auf die Schädelkalotte. Auch das Periost wurde mit einem Wattetupfer stumpf nach lateral gelegt, um mit einer Knochenfräße von der *Sutura sagittalis* ausgehend nach rechts lateral, dann nach kaudal und wieder nach *medial* zur *Sutura sagittalis* zurück fräßen zu können. Dabei sollte eine dünne Knochenlamelle stehen gelassen werden, um das darunter liegende Gehirn nicht mit der Fräße zu schädigen. Damit entstand ein Knochenfenster von etwa 4 x 4 Millimeter (mm), welches mit Hilfe einer Pinzette nach medial aufgeklappt werden konnte. Nun lag das Gehirn frei und der „CCI-Impaktor“ konnte aufgelegt werden. Dieser sollte so eingestellt sein, dass er direkten Kontakt zur Hirnrinde hat, jedoch ohne diese dabei einzudrücken. Mit einem Durchmesser von 3 mm berührte der Stempel des „Impaktors“ fast die komplette vom Knochenfenster freigelegte Fläche des Gehirns. Am „CCI-Impaktor“ können verschiedene Parameter verändert werden. Über alle Versuche dieser Arbeit hinweg wurden dieselben Parameter beibehalten. Bei den Parametern handelte es sich um die Verweildauer des Stempels auf dem Gehirn für 150 Millisekunden (ms), die Eindringtiefe von 1,5 mm und eine Aufprallgeschwindigkeit von 6 Meter/Sekunde (m/s). Um relative Bewegungen von der Maus zum Stempel des „CCI-Impaktors“ zu verhindern wurde darauf geachtet, dass die Maus sicher im Stereotaxierahmen fixiert lag und die Feststellschraube des „Impaktors“ angezogen war. Anschließend konnte das SHT ausgelöst werden. Die entstehende Blutung wurde schnell mit einem Wattetupfer gestillt, das Knochenfenster wieder zugeklappt und mit einem Histoacrylkleber versiegelt. Dies war von großer Bedeutung und hatte möglichst schnell zu erfolgen, um dem Gehirn, wie bei einem realen SHT, nicht die Möglichkeit zu gewähren sich durch den Knochendeckel, wie nach einer durchgeführten Kraniektomie, ausbreiten zu können. Zuletzt wurde die Haut des *mediansagittalen* Schnitts mit Einzelknopfnähten wieder verschlossen.

Anschließend konnte das Tier aus dem Stereotaxierahmen entnommen werden und zum Aufwachen zurück in den Käfig gelegt werden, welcher sich in einem auf 36 °C aufgeheizten Inkubator befand. Dort wurde das Tier für die nächsten 4 Stunden regelmäßig überwacht, bis der Käfig zurück in den Tierhaltungsschrank gestellt werden konnte.

3.2.5 Motorfunktionsanalysen

Der Schaden dieses SHT-Modells ist vorwiegend auf den Bereich des rechten Parietal- und Temporallappens begrenzt. Da sich in diesem Bereich der primäre und sekundäre Motorkortex, sowie das somatosensorische System befinden, benötigte es etablierte Tests, welche vor allem die motorischen und vestibulomotorischen Funktionen testen können. Daher wurden der „NSS“ (115, 116) und der „Rotarod-Leistungstest“ (117-120) verwendet, um die Auswirkungen des SHTs auf diese Systeme zu bewerten.

Die Werte des „NSS“ und des „Rotarod-Leistungstestes“ am Tag der Operation dienten als Ausgangswerte. Durch die Testungen an Tag 1, Tag 3 und Tag 5 postoperativ wurde eine Verlaufsbeobachtung ermöglicht.

3.2.5.1 Neurological Severity Score (NSS)

Der Test besteht aus 6 Teilaufgaben, bei denen jeweils eine unterschiedliche Anzahl an Punkten vergeben werden kann und sich so eine Maximalpunktzahl von 16 Punkten ergibt. Je schlechter die Maus abschneidet, desto mehr Punkte erhält sie bei den einzelnen Aufgaben. Vergaben wurden die Punkte von einem verblindeten Untersucher.

Die 6 Aufgaben umfassen die Bereiche Verhalten, Koordination, vestibulomotorisches und motorisches System. Ein Protokoll zur Erhebung des „NSS“ ist in Abbildung 1 zu finden.

1. Verlassen des Kreises

Im Rahmen der ersten Aufgabe wurde die Maus in die Mitte eines Kreises mit einem Durchmesser von 24 cm gesetzt. Anschließend wurde manuell die Zeit gemessen, welche die Maus benötigte, bis sie den Kreis verlassen hat. Um das Kriterium des

„Verlassens des Kreises“ zu erfüllen, musste die Maus mit beiden Vorderbeinen den Kreis verlassen haben.

Bei der letzten Studie der männlichen Tiere mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT wurde zur Erfassung der Zeit bis zum Verlassen des Kreises die Software „EthoVision XT“ von Noldus eingesetzt. Dabei wurde die Maus in die Mitte einer Arena gesetzt, welche von oben mit einer Kamera aufgezeichnet wurde. Anhand der Software konnten nun verschiedene Modi zur Datenerfassung ausgewählt werden. In diesem Fall bildete die Software virtuell einen Kreis mit einem Durchmesser von 24 cm auf der Fläche der Arena ab. Wenn nun die Maus in die Arena gesetzt wurde, erkannte die Kamera den zentralen Punkt der Maus, die Nase und den Schwanz. Damit konnte die Videoaufzeichnung gestartet werden und die Software hat die Zeit gemessen, bis die Maus mit beiden Vorderbeinen die Linie des virtuell abgebildeten Kreises überschritten hatte. Daraufhin wurde die Bewegung der Maus noch weitere zwei Minuten aufgezeichnet, wodurch weitere Daten, wie die währenddessen zurückgelegte Gesamtstrecke, generiert wurden.

Für die Vergabe der Punkte ist es entscheidend, wie schnell die Maus den Kreis verlassen hat. Bei einem Wert unter 30 Sekunden wurden null Punkte, bei 30 bis 60 Sekunden ein Punkt, bei 61 bis 120 Sekunden zwei Punkte und bei allem über 120 Sekunden wurden drei Punkte vergeben.

Sowohl bei der manuellen als auch bei der softwareunterstützten Erfassung der Zeit bis zum Verlassen des Kreises wurden die vergebenen Punkte nicht für den Gesamtwert des „NSS“ berücksichtigt. Der Hintergrund dazu war, dass einige Mäuse häufig Punkte erhielten, obwohl sie völlig frei von Einschränkungen waren.

2. Schreckreaktion

Bei dieser Aufgabe erhielt das Tier einen Punkt, wenn es keine Schreckreaktion zeigte, während die Hände über der Maus zusammengeklatscht wurden. Keinen Punkt gab es, wenn die Maus eine Schreckreaktion zeigte.

3. Allgemeines Verhalten

Bei diesem Kriterium wurde für fehlendes Erkundungsverhalten und die fehlende Fähigkeit geradeaus zu laufen jeweils ein Punkt vergeben.

4. Koordination

Ziel dieser Aufgabe war es, dass die Maus eine Strecke von 50 cm auf jeweils drei verschiedenen Balken mit der Breite 30 mm, 20 mm und 10 mm zurücklegt. Dabei konnten pro Balken bis zu zwei Punkte vergeben werden. Keinen Punkt gab es, wenn die Maus den Balken ohne Probleme überqueren konnte. Einen Punkt gab es bei mehr als einem Fehltritt und zwei Punkte, wenn die Maus längere Zeit ohne Bewegung auf dem Balken sitzen blieb oder von diesem hinunterfiel.

5. Gleichgewicht

Beim Kriterium Gleichgewicht wurde beurteilt, ob sich das Tier mit allen 4 Pfoten an einem Stab für 10 Sekunden festhalten konnte. Dazu setzte man es entweder auf einen runden oder einen viereckigen Stab mit jeweils 5 mm Durchmesser. Ein Punkt pro Stab wurde vergeben, wenn ein Fuß paretisch war oder die Maus sich nicht am Stab festhalten konnte.

6. Motorische Defizite

Darüber hinaus wurden die Mäuse auch auf motorische Defizite getestet. Bei fehlenden motorischen Defiziten wurden keine Punkte vergeben. Einen Punkt gab es für die Parese einer Pfote und zwei Punkte für eine Hemiparese.

Da das Verlassen des Kreises nicht berücksichtigt wurde ergab sich eine maximal zu erreichende Punktzahl von 13 anstatt 16 Punkten.

Neurological Severity Score (NSS)

Versuchsname:

Untersucher:

Tier-Nummer:

OP-Datum:

	Prä OP	Tag 1 post OP	Tag 3 post OP	Tag 5 post OP
Datum				
Uhrzeit				
1. Verlassen des Kreises				
< 30 s (0 Punkte)				
30 - 60 s (1 Punkt)				
61 - 120 s (2 Punkte)				
>120 s (3 Punkte)				
2. Schreckreaktion				
Vorhanden (0 Punkte)				
Keine Reaktion (1 Punkt)				
3. Allgemeines Verhalten				
Erkundungsverhalten vorhanden (0 Punkte)				
Erkundungsverhalten nicht vorhanden (1 Punkt)				
Geradeauslaufen möglich (0 Punkte)				
Geradeauslaufen nicht möglich (1 Punkt)				
4. Koordination				
3 cm Balken (0-2 Punkte)				
2 cm Balken (0-2 Punkte)				
1 cm Balken (0-2 Punkte)				
Kriterien: 0 Punkte = Ohne Einschränkung, 1 Punkt = mehr als ein Fehltritt, 2 Punkte = Stehen bleiben oder runterfallen				
5. Gleichgewicht				
Runder Stab (0-1 Punkt)				
Viereckiger Stab (0-1 Punkt)				
Kriterien: 0 Punkte = Festhalten mit allen vier Pfoten, 1 Punkt = Parese einer Pfote oder fehlendes Festhalten				
6. Motorische Defizite				
Parese nicht vorhanden (0 Punkte)				
Parese vorhanden (1 Punkt)				
Hemiparese (2 Punkte)				
Gesamtpunktzahl				

Abbildung 1: „Neurological Severity Score“ Protokoll

3.2.5.2 „Rotarod-Leistungstest“

Diese Untersuchung zielt auf die Testung der vestibulomotorischen Koordination ab. Das dazu benötigte Gerät besteht aus einem langen Zylinder, welcher mit geriffeltem Kunststoff ummantelt ist. Dieser Zylinder wird durch Plastikplatten in mehrere wenige cm breite Testbereiche aufgeteilt, in welche die Maus zur Testung gesetzt wurde. Der Zylinder hat einen Durchmesser von etwa 3 cm und dient als Lauffläche, auf der sich die Maus fortbewegen soll. Da sich der Zylinder dreht, muss die Maus immer wieder

einen Schritt nach vorne machen, um nicht vom Zylinder hinunter zu fallen. Unterhalb des in einer Höhe von 16 cm befindlichen Zylinders, befindet sich je Testbereich jeweils eine Plastikklappe, welche in einer schräg nach hinten oben verlaufender Position fixiert wird. Sollte sich die Maus nicht mehr auf dem Zylinder halten können, fällt sie nach unten auf die jeweilige Plastikklappe in ihrem jeweiligen Testbereich. Dadurch löst sich die Plastikklappe aus der Verankerung und fällt nach unten. Mit diesem Mechanismus kann die Zeit gemessen werden, in der sich die Maus auf dem Zylinder halten kann. Bereits beim Setzen der Maus auf den Zylinder dreht sich dieser mit einer Anfangsgeschwindigkeit von 4 Umdrehungen pro min (rpm). Mit Beginn der Zeitmessung dreht sich der Zylinder immer schneller und erreicht durch eine lineare Beschleunigung nach 5 min die Maximalgeschwindigkeit von 40 rpm. Mit diesem Prinzip kann die vestibulomotorische Koordination in Form von Dauer und Geschwindigkeit auf dem Zylinder gemessen werden.

Diese Testmethodik benötigt jedoch einen gewissen Lernprozess Seitens der Maus. Daher wurden die Mäuse jeweils zwei Tage vor dem ersten gewerteten Test einmal täglich für zwei Wiederholungen auf dem „Rotarod“ trainiert. An den entscheidenden Testtagen ergab sich das zu berücksichtigende Ergebnis, bestehend aus der Gesamtzeit auf dem Zylinder und der erreichten Geschwindigkeit, durch eine zweimalige Messung, aus der der Mittelwert berechnet wurde.

3.2.6 Retrobulbäre Blutentnahme und Euthanasie

Bei der Tötung der Tiere wurde entsprechend des geltenden Tierschutzgesetzes und der Tierschutzversuchstierordnung vorgegangen. Da allen Tieren vor der Tötung Blut entnommen werden musste, wurden die Tiere mit einer intraperitoneal (i.p.) verabreichten Dreifachkombination in Narkose gelegt. Diese bestand aus 5 Milligramm (mg) Midazolam, 500 Mikrogramm (μg) Medetomidin und 5 μg Fentanyl. Die hier beschriebene Mischung wurde mit 0,9 % NaCl-Lösung auf ein Gesamtvolumen von 10 Milliliter (ml) verdünnt. Jedem Tier wurden anschließend pro 10 Gramm (g) Körpergewicht (KG) 0,1 ml dieser Lösung appliziert.

Da bei den Versuchstieren, die ein SHT erhalten haben, vor ihrem Tod noch eine BZ-Messung notwendig war, wurde hierzu zunächst wieder eine Schwanzvene mit einer kleinen Kanüle angestochen und der Blutropfen auf den Teststreifen des Messgerätes aufgetragen.

Nun konnte noch vor der Euthanasie bei den narkotisierten Versuchstieren mit der retrobulbären Blutentnahme begonnen werden. Dazu wurde dem Tier mit einer heparinisierten Kapillare hinter das Auge gestochen und das dabei herausfließende Blut, je nach Erfordernis, in einem 0,5 ml großen EDTA- oder Citrat-Röhrchen aufgefangen. Das mit etwa 100 Mikroliter (μl) Blut befüllte EDTA-Röhrchen wurde für den „Sysmex Cellcounter“ (s. Abschnitt 3.2.8.1) zur Analyse des Blutbildes benötigt und das ebenfalls mit etwa 100 μl Blut befüllte Citrat-Röhrchen für den „Multiplate® Analyzer“ (s. Abschnitt 3.2.8.2) zur Analyse der Thrombozytenaggregationsfähigkeit.

Nach der retrobulbären Blutentnahme konnten die Tiere nun euthanisiert werden. Dazu wurde das Versuchstier kurz hinter dem Hinterhaupt fixiert und durch eine zervikale Dislokation getötet.

3.2.7 Hirnentnahme

Nach der Euthanasie wurden die Tiere dekapitiert. Um das Gehirn freizulegen erfolgte ein *mediansagittaler* Schnitt von *occipital* nach *frontal*, um die Haut und das Unterhautgewebe nach lateral zu verschieben. Dadurch erhielt man einen freien Blick auf die Schädelkalotte. Nun wurde mit einer Schere vom *Foramen magnum* ausgehend die Schädelkalotte etwa 3 mm in Richtung *rostral* eröffnet. Dies erfolgte gerade soweit, dass mit einer Klinge der Schere die Kalotte zu entfernen war. Wichtig war es hierbei das darunterliegende Hirngewebe nicht zu verletzen und auch die komplette Dura mater zu entfernen, da Reste von dieser bei der Entfernung des Gehirns dieses verletzen könnten. Besonders zu beachten war die Entfernung der beiden Duraduplikaturen *Falx cerebri* und *Tentorium cerebelli*, da auch diese das Gehirn bei der Entnahme verletzen könnten. Nach dem Entfernen der Schädelkalotte und der *Dura mater* konnte das Gehirn letztendlich mit einem stumpfen Spatel von *dorsal* aus kommend, aus der *Fossa cranii* entfernt werden. Zum schnellen Gefrieren wurde das Gehirn in zerkleinertes Trockeneis gelegt, dann in einem Plastikbeutel verpackt und bis zur weiteren Verarbeitung in einem Tiefkühlschrank bei einer Temperatur von $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ zwischengelagert.

Für eine eventuell benötigte Nachgenotypisierung der Versuchstiere wurden bei diesem Prozess die Schwanzspitzen der Tiere abgeschnitten und in einem Mikroreaktionsgefäß ebenfalls bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einem Tiefkühlschrank gelagert.

3.2.8 Analyse des retrobulbären Blutes

Das durch die retrobulbäre Blutentnahme gewonnene Blut wurde für den „Sysmex Cellcounter“ zur Analyse des Blutbildes und für den „Multiplate® Analyser“ zur Bestimmung der Thrombozytenaggregationsfähigkeit benötigt.

3.2.8.1 „Sysmex Cellcounter“

Das Blut aus den EDTA-Röhrchen wurde zur Analyse des Blutbildes durch den „Sysmex Cellcounter“ benötigt. Das Sysmex Hämatologie-System XP-300 bedarf mindestens 20 µl Blut zur automatischen Analyse des roten und weißen Blutbildes, sowie der Blutplättchen (121).

Rotes Blutbild/Erythrozytenindizes:

- **RBC [n/µl]**: red blood cells = Anzahl der roten Blutkörperchen (Erythrozyten); Messprinzip: Elektrisches Widerstandsmessprinzip
- **HCT [%]**: Hämatokrit; Messprinzip: Kumulative Impulshöhensummierung
- **HGB [g/dl]**: Hämoglobin-Konzentration; Messprinzip: Methode mit quaternären Ammoniumsalzen
- **MCV [fl]**: Mittleres korpuskuläres Volumen; Messprinzip: Elektrisches Widerstandsmessprinzip, kumulative Impulshöhensummierung, Berechnung aus RBC und HCT
- **MCH [pg]**: Mittleres korpuskuläres Hämoglobin; Messprinzip: Elektrisches Widerstandsmessprinzip, SLS-Hämoglobin-Methode, Berechnung aus RBC und HGB
- **MCHC [g/dl]**: Mittlere korpuskuläre Hämoglobin Konzentration; Messprinzip: Elektrisches Widerstandsmessprinzip, kumulative Impulshöhensummierung, SLS-Hämoglobin-Methode, Berechnung aus HB und HCT
- **RDW_SD [fl]**: red cell distribution width = rechnerische Erythrozytenverteilungsbreite Standardabweichung; Messprinzip: Elektrisches Widerstandsmessprinzip, Ableitung aus Volumenverteilungskurve der RBC
- **RDW_CV [%]**: red cell distribution width = rechnerische Erythrozytenverteilungsbreite Variationskoeffizient; Messprinzip: Elektrisches Widerstandsmessprinzip, Ableitung aus Volumenverteilungskurve der RBC

Weißes Blutbild/Leukozyten:

- **WBC [n/µl]**: white blood cells = Anzahl aller weißen Blutkörperchen (Leukozyten); Messprinzip: Elektrisches Widerstandsmessprinzip
- **LYM [%]**: Lymphozyten prozentual; Messprinzip: Elektrisches Widerstandsmessprinzip

- **LYM [n/μl]**: Lymphozyten absolut; Messprinzip: Elektrisches Widerstandsmessprinzip

Blutplättchen/Thrombozyten:

- **PLT [n/μl]**: platelets = Anzahl aller Blutplättchen (Thrombozyten); Messprinzip: Elektrisches Widerstandsmessprinzip
- **PDW [fl]**: Rechnerische Verteilungsbreite der Thrombozyten; Messprinzip: Elektrisches Widerstandsmessprinzip, Verteilungsbreite der Thrombozytenverteilungskurve
- **MPV [fl]**: Mittleres Thrombozytenvolumen; Messprinzip: Elektrisches Widerstandsmessprinzip, Berechnung aus Impulshöhensummierung (PCT%) und PLT
- **P_LCR [%]**: Anteil großer Thrombozyten (Volumen größer als 12 fl) an der Gesamtzahl der Thrombozyten; Messprinzip: Widerstandsmessprinzip mit hydrodynamischer Fokussierung, Anteil der PLT mit einem MPV > 12 fl (Thrombozytenverteilungskurve)

3.2.8.2 Multiplate® Analyzer

Mit Hilfe des „Multiplate® Analyzer“ von Roche wurde die Thrombozytenaggregationsfähigkeit auf der Basis der Impedanzaggregometrie bestimmt. Dazu wurde ein Substrat als Agonist benötigt, welches die Thrombozyten aktiviert. Thrombin ist einer der wichtigsten Agonisten von Thrombozyten und interagiert mit zwei Protease-aktivierten Rezeptoren (PAR) auf der Oberfläche von Thrombozyten, „PAR-1“ und „PAR-4“. Die Interaktion von Thrombin und „PARs“ führt durch verschiedene intrazelluläre Signalwege unter anderem zu einer Zellaktivierung der Thrombozyten.

Bei diesem „Multiplate® PAR-4-Test“ kam als Reagenz ein „PAR-4“-Agonist zum Einsatz, denn anders als beim Menschen spielt „PAR4“ bei Mäusen eine größere Rolle als „PAR1“. Das „PAR-4 Test Reagenz Kit“ von Verum Diagnostica GmbH (München - Germany), das bei den früheren Versuchen mit den Mäusen, die eine komplette Defizienz des SGLT-2 Transporters auf allen Zellen besaßen, verwendet wurde, ist nicht mehr vertrieben worden. Daher entschied man sich dazu die Versuche weiterhin entsprechend des Protokolls des „PAR-4 Test Reagenz Kit“ durchzuführen. Anstatt des Agonisten des Kits wurde jedoch der PAR-4 Agonist der Firma „AnaSpec“ verwendet. Dieser musste dazu auf eine Konzentration von 20 Millimol (mM) verdünnt werden.

Dann wurde entsprechend des Protokolls vorgegangen. Dazu wurden mit einer Pipette 175 μl des Blutes aus dem Citrat-Röhrchen und dieselbe Menge an auf 37 °C erwärmter NaCl-Lösung in die Messzelle pipettiert. Die Messzelle steckte im „Multiplate® Analyzer“ und war mit einem Kabel an das Gerät angeschlossen. Außerdem befand sich in dieser ein Rührfisch, um das Blut mit der NaCl-Lösung zu vermischen. Nach 3 min Inkubationszeit, wurden 12 μl des Agonisten ebenfalls in die Testküvette pipettiert, wodurch die Thrombozyten aktiviert wurden und die Messung mit einer Dauer von jeweils 6 min begann. Die Messzellen enthielten zwei unabhängige Sensoreinheiten bestehend aus leitfähigen Metalldrähten, die in die Blutprobe getaucht wurden. In Abbildung 2 ist eine solche Messzelle und dem darin befindlichen Sensorendrahtpaar dargestellt. Die nun aktivierten Thrombozyten setzten sich an diese mit Silber beschichteten Sensorendrähte, aggregierten und veränderten dadurch den elektrischen Widerstand, bzw. die Impedanz der Metalldrähte. Das Funktionsprinzip an den Sensorendrähten ist in Abbildung 3 dargestellt. Während der Analyse wurde diese Impedanzänderung kontinuierlich bestimmt und mit einer Kurve aufgezeichnet. Da es pro Messzelle jedoch zwei Sensoreinheiten gab, wurden zwei Kurven aufgezeichnet und daraus der Mittelwert gebildet. Eine beispielhafte Messkurve ist in Abbildung 4 gezeigt. Für jede Blutprobe pro Versuchstier fanden parallel zwei Messungen in zwei verschiedenen Messkanälen gleichzeitig statt.

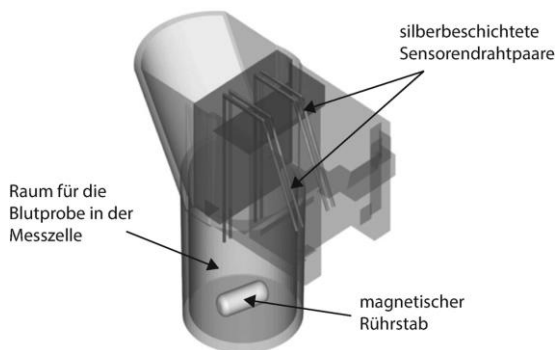


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Messzelle des Multiplate® (122)

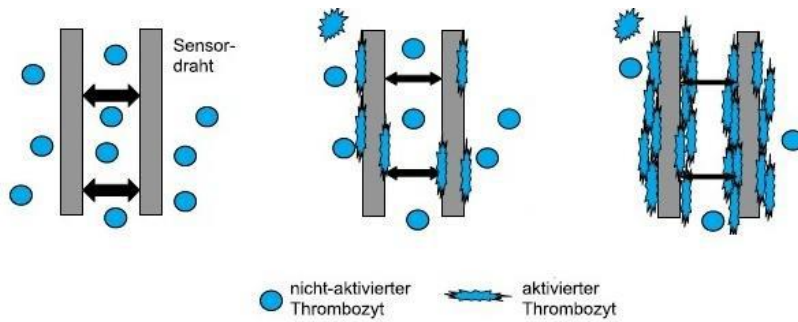


Abbildung 3: Funktionsprinzip der Sensordrähte in der Messzelle (123)

Aus der Kurve konnte nun die „Area under the Curve“ (AUC) abgelesen werden, die sich aus der Aggregation und der Velocity (engl. für Geschwindigkeit) zusammensetzt. Die Aggregation wurde in [AU] angegeben und die Velocity in [AU/min]. Der wichtigste Wert für die Beurteilung der Thrombozytenaggregationsfähigkeit war jedoch die AUC, welche in [U] oder [AU x min] angegeben wurde. Je höher also der Wert der AUC war, desto stärker bzw. schneller war die Aggregation der Thrombozyten und desto stärker war die Impedanzänderung an den Sensoreinheiten in den Messzellen.

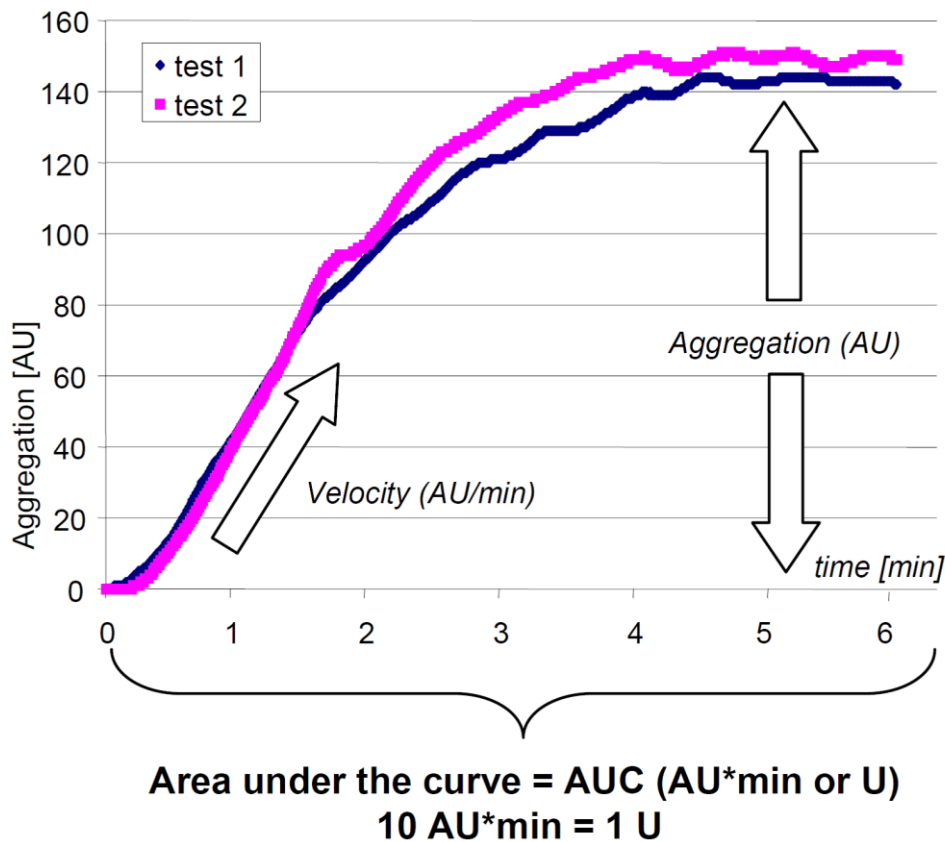


Abbildung 4: Beispielhafte Darstellung eines Messergebnisses (124)

3.2.9 Anfertigung und Färbung der Hirnschnitte

Nachdem die Hirnschnitte angefertigt wurden, färbte man sie entweder mit Kresylviolett oder mit einer immunhistochemischen Färbung von IgG. Die gefärbten Schnitte wurden dann eingescannt und ausgewertet.

3.2.9.1 Anfertigung der Hirnschnitte

Zur Anfertigung der Hirnschnitte wurde ein in der Arbeitsgruppe etabliertes Protokoll befolgt (s. Abbildung 6). Dabei wurden die tiefgefrorenen Gehirne mit dem *Cerebellum*, also dem *okzipitalen* Teil des Gehirns, mit Hilfe eines Einbettmediums auf die Einspannplatte fixiert. Diese Platte wiederum wurde im Kryotom befestigt und so ausgerichtet, dass die Klinge senkrecht zur Horizontalen des Gehirns stand und parallel zur Frontalebene durch das Gehirn schneiden konnte.

Zunächst wurde bis zur *Bregma* vorgeschritten, welche makroskopisch dem Aussehen eines Schmetterlings ähnelt. War dieser zu erkennen, wurde das Kryotom auf „null“ gestellt und damit startete die erste Schnittebene. Von dieser Schnittebene aus wurden nun 5 Schnitte mit einer Schnittdicke von 12 Mikrometer (μm) angefertigt und jeweils auf einen anderen Objektträger aufgetragen. Von jeder Ebene wurden dabei jeweils 5 Schnitte angefertigt. Bei der Zuteilung der ersten 10 Ebenen zu den jeweiligen Objektträgern wurde der erste Schnitt der Ebene auf Objektträger 1A, der zweite Schnitt auf Objektträger 2A usw. aufgetragen. Alle weiteren Schnitte erfolgten analog dieser Vorgehensweise, sodass beispielsweise auf Objektträger 1A am Ende alle ersten Schnitte von Ebene 1-10 zu finden sind usw. Auf diese ersten 5 Objektträger mit der Kennzeichnung „A“ wurden so die ersten 10 Ebenen mit jeweils 5 Schnitten aufgetragen. Die nächsten 6 Ebenen wurden dann jeweils nach dem gleichen Prinzip auf die Objektträger 1B, 2B etc. aufgetragen. Wurden von einer Ebene 5 Schnitte angefertigt, konnten die nächsten Schnitte verworfen werden, bis man 500 μm vom Beginn der vorherigen Ebene entfernt war. Der Abstand zwischen den einzelnen Ebenen betrug somit jeweils 500 μm . Insgesamt gab es 16 Ebenen. Es wurde also von 0 μm bis einschließlich der 16. Ebene geschnitten, welche bei 7500 μm begann.

Ab Ebene 6, welche demnach bei 2500 μm begann, bis einschließlich Ebene 13 (Beginn bei 6000 μm) wurden nicht nur 5 Schnitte angefertigt, sondern auch die so genannten Trimmquadranten angefertigt. Der Hintergrund hierzu war, dass dieser Bereich zum größten Teil der Ausdehnung des Schadensgebiets entsprach. Zur

Anfertigung dieser Trimmquadranten wurden nach dem fünften 12 µm dicken Schnitt insgesamt 6 Schnitte mit einer Schnittdicke von 40 µm angefertigt und mit identischer Orientierung übereinandergelegt. Somit ergab sich ein Stapel von insgesamt 240 µm Hirnschnitten. Von diesem Stapel wurde das untere, der Horizontalebene entsprechende Drittel mit einem Skalpell abgetrennt und der Rest in der Mitte vertikal zerteilt. Somit erhielt man einen Stapel von der linken und einen von der rechten Hemisphäre des Gehirns. Das Hirnmaterial der rechten Hemisphäre kam in ein Kryoröhrchen mit einem roten Deckel (beschriftet mit „rA“) und das Material der linken Hemisphäre in ein Röhrchen mit gelbem Deckel (beschriftet mit „lA“). Bei den Trimmquadranten der nächsten Ebenen wurde entsprechend vorgegangen, jedoch wanderte diesmal das Material der rechten Hemisphäre in ein anderes Kryoröhrchen mit rotem Deckel (beschriftet mit „rB“) und das der linken Hemisphäre ebenfalls in ein anderes Kryoröhrchen mit gelbem Deckel (beschriftet mit „lB“). Somit wurden die Kryoröhrchen „A“ und „B“ jeweils von Ebene zu Ebene abwechselnd befüllt, bis in jedem Röhrchen insgesamt das Material von 4 Ebenen enthalten war. Das Material der mit „A“ beschrifteten Röhrchen („rA“ und „lA“) wurde später für die RNA-Analysen genutzt und das Material aus den mit „B“ beschrifteten Röhrchen („rB“ und „lB“) für die Protein-Analysen. Bis dahin wurden die Röhrchen in einem Tiefkühlschrank bei – 80 °C gelagert.

In den Ebenen 11, 12 und 13, welche das Hauptschadensgebiet darstellten, wurden zusätzlich pro Ebene zwei weitere 20 µm dicke Schnitte angefertigt und auf einen separaten Objektträger aufgetragen. Diese etwas dickeren Schnitte konnten, wenn sie hierzu benötigt wurden, gut für IHC-Färbungen verwendet werden.

Alle Objektträger wurden bis zu ihrer Färbung in einem Tiefkühlschrank bei – 20 °C gelagert. In Abbildung 5 sind beispielhaft zwei Hirnschnitte aus der Ebene 11 desselben Tieres 6 Stunden nach induziertem SHT dargestellt.

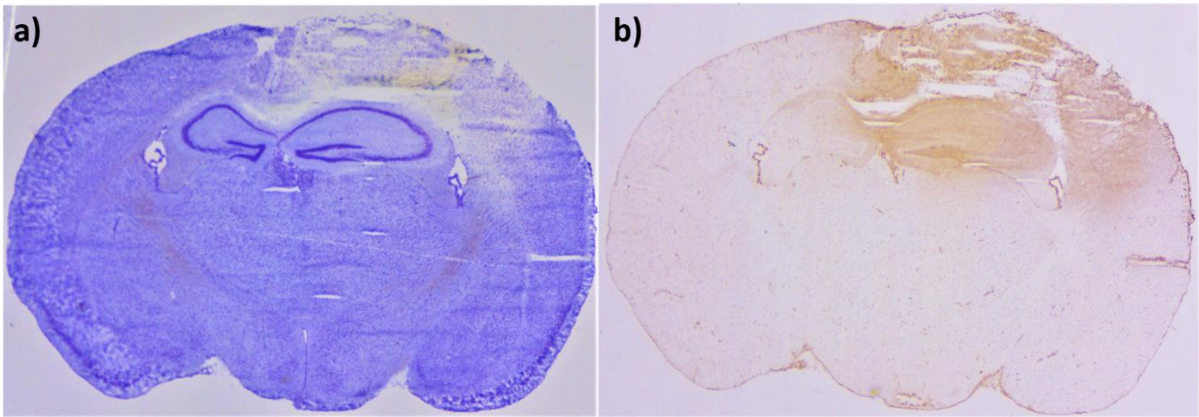


Abbildung 5: Beispielhafte Darstellung zweier Hirnschnitte einer Maus 6 Stunden nach induziertem SHT
Beispielhafte Bilder aus Ebene 11 **a)** mit Kresylviolett-Färbung (s. Abschnitt 3.2.9.2) und **b)** mit immunhistochemischer Färbung von IgG (s. Abschnitt 3.2.9.3). Jeweils rechts Oben im Bild ist der durch den CCI hervorgerufene Schaden zu erkennen.

Schneideprotokoll

1.) 12 µm Schnitte

--> 2x 5 Objektträger (OT)

--> A-Reihe je 10 Schnitte(Ebenen)/OT

--> B-Reihe je 6 Schnitte(Ebenen)/OT

Projektname Tiernummer	
1A	Kürzel
1	0
	2 500
3	1000
	4 1500
5	2000
	6 2500
7	3000
	8 3500
9	4000
	10 4500

Projektname Tiernummer	
1B	Kürzel
11	5000
	12 5500
13	6000
	14 6500
15	7000
	16 7500

Ebene = Schnitt	ab ... µm
Ebene 1	0
Ebene 2	500
Ebene 3	1000
Ebene 4	1500
Ebene 5	2000
Ebene 6	2500
Ebene 7	3000
Ebene 8	3500
Ebene 9	4000
Ebene 10	4500
Ebene 11	5000
Ebene 12	5500
Ebene 13	6000
Ebene 14	6500
Ebene 15	7000
Ebene 16	7500

=> wenn man "Schmetterling" sieht

la + ra
lb + rb
la + ra
lb + rb
la + ra
lb + rb

Beschriftung KR:

Tiernummer er ra/rb/la/lb	Tiernummer	ra/rb/la/lb
	Projektname	
	Kürzel	Datum

rot = rechts
gelb = links

2. Trimschnitte

- ab Ebene 2500
- zuerst 12µm Schnitten
- dann 6x40 µm Schnitte direkt hintereinander schneiden
- in gleicher Ausrichtung aufeinander stapeln
- unteres 1/3 abtrennen und verwerfen
- Rest in links und rechts teilen (auf die Hirnorientierung achten)
- je 1 "Stapel" in re u. li Kryoröhrchen (KR) packen (insges. 4 "Stapel"/KR)
- 1.KR = 2500, 3500, 4500, 5500
- 2.KR = 3000, 4000, 5000, 6000

3. Schnitte für IHC Färbungen

- Ebene 11, 12 und 13 je zwei 20 µm Schnitte auf den unteren Bereich eines OT

4. Lagerung

- Objektträger bis zur Färbung im Tiefkühlschrank bei -20 °C
- Kryoröhrchen: Lagerung bei -80 °C

Abbildung 6: Schneideprotokoll

3.2.9.2 Kresylviolett-Färbung

Zur Anfertigung der Färbelösung für die Nissl-Färbung wurden in 100 ml von 100%igem Ethanol 5 g Kresylviolett gegeben. Dieses wurde nun bei 50 °C für 30 min

mit einem Magnetrührer vermischt. Dann wurde die Lösung mit destilliertem Wasser auf insgesamt 500 ml aufgefüllt und einmal durch einen Faltenfilter laufen gelassen, um grobe Partikel hinaus zu filtern. Mit dieser Lösung war es somit möglich die DNA und die RNA auf den Hirnschnitten anzufärben.

Zunächst wurden die Schnitte eine Stunde an der Luft trocknen gelassen, um anschließend eine Reihe von verschiedenen Tauchbädern zu durchlaufen, die der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen sind. Am Ende dieser Bäder wurden die Schnitte mit Roti®-Histokitt eingebettet und mit einem Deckglas verschlossen. Die einzelnen Schritte der Kresylviolett-Färbung sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Reihenfolge	Dauer	Chemikalie
1	2 min	70 % Ethanol
2	10 min	Kresylviolett-Lösung
3	Kurz	Destilliertes Wasser
4	kurz	Destilliertes Wasser
5	kurz	70 % Ethanol
6	kurz	70 % Ethanol
7	kurz	96 % Ethanol
8	kurz	96 % Ethanol
9	kurz	100 % Ethanol
10	kurz	100 % Ethanol
11	5 min	Roti®-Histol
12	2 min	Roti®-Histol

Tabelle 9: Schritte der Kresylviolett-Färbung

3.2.9.3 Schadensvolumenanalyse der Kresylviolett-Färbung

Zur Analyse des Schadens durch das mit dem CCI induzierten SHT wurden die mit Kresylviolett gefärbten Schnitte mit der ZEN® Software eingescannt und ausgemessen. Dazu wurden von jeder Ebene zunächst die Flächen der gesamten rechten und linken Hemisphären separat ausgemessen. Dann wurde die gesunde Fläche von der rechten Hemisphäre ausgemessen und von der Gesamtfläche der

rechten Hemisphäre subtrahiert. Dies ergab die Kontusionsfläche (F), also die Fläche des Schadens je Ebene auf der rechten Hemisphäre, wo auch das SHT induziert wurde. Um von der Kontusionsfläche zum Kontusionsvolumen zu gelangen, wurden die 16 Kontusionsflächen der einzelnen Ebenen addiert und die Summe mit 0,5 multipliziert, denn der Abstand zwischen den Ebenen betrug jeweils 500 µm.

$$V_{ges} = (F1 + \dots + F16) \times 0,5$$

Die absolute Größe des Kontusionsvolumens in Kubikmillimetern wurde dann im Verhältnis zum Volumen der gesamten rechten Hemisphäre analysiert und damit erhielt man das Kontusionsvolumen prozentual zur ipsilateralen Hemisphäre.

Um bei der Schadensanalyse das mit dem Schaden einhergehende Ödem herauszurechnen, wurde der Wert der Ödemkorrektur verwendet. Dazu wurde vom Gesamtvolumen der linken Hemisphäre das Volumen der gesunden rechten Hemisphäre subtrahiert und das Ergebnis wiederum durch das Gesamtvolumen der linken Hemisphäre dividiert. Abschließend wurde das Ergebnis mit 100 multipliziert, da es sich bei dem Wert der Ödemkorrektur um einen Prozentwert handelt.

$$\text{Ödemkorrektur} = (\text{Gesamtvolumen Links} - \text{Gesundes Volumen rechts}) / \text{Gesamtvolumen Links} \times 100$$

3.2.9.4 Immunhistochemische Färbung von IgG zur Darstellung der Extravasation von IgG

Die immunhistochemische Färbung von IgG dient der Darstellung der IgG-Extravasation und spiegelt damit die Funktion der BHS wider.

Zur Färbung wurden die Schnitte der Ebenen 11 und 12 genutzt, da dort die größte Schadensfläche lag. Gefärbt wurden jedoch nur die Schnitte der Studie mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT.

Zunächst mussten die ausgewählten Schnitte an der Luft getrocknet werden. Dann wurden sie mit einem Fettstift, dem Dako Pen, umrandet, um eine Barriere für Flüssigkeiten zu bilden, damit diese sich nur über den Schnitten verteilen. Dann wurden die Schnitte für 10 min in ein 4%iges PFA-Bad in einem Färbetrog auf einen Schüttler gestellt. Dadurch wurden die Schnitte fixiert und konnten dreimal für jeweils 5 min in einem Färbetrog mit PBS auf einem Schüttler gewaschen werden.

Zum Blockieren unspezifischer Bindungen auf den Schnitten wurde auf die vom Fettstift umrandeten Stellen 3 %ige H₂O₂ Lösung pipettiert. Dabei wurden etwa 100 µl für zwei Schnitte benötigt und für 3 min darauf belassen. Während dieser Zeit befanden sich die Schnitte in einer Feuchtkammer. Dann wurden die Schnitte wiederum für 5 min in PBS in einem Färbetrog auf einem Schüttler gewaschen.

Nun kam der erste AK zur Anwendung und wurde in einer 1:500 Verdünnung in PBS mit Triton-X 0,1% (PBST) auf den mit dem Fettstift umrandeten Bereich pipettiert. Diese Zusammensetzung wurde nun für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer inkubiert. Bei dem hier verwendeten AK handelte es sich um einen biotinylierten Ziegen Anti-Maus IgG AK. Nach den 1,5 Stunden wurden die Schnitte erneut dreimal für jeweils 5 min in PBS auf einem Schüttler gewaschen.

Zum Sichtbarmachen des AK wurde der ABC-Komplex genutzt, mit dem das Enzym Meerrettich-Peroxidase am ersten AK fixiert wurde. Dazu wurde der ABC-Komplex auf die mit dem Fettstift umrandeten Schnitte pipettiert und für 30 min inkubiert. Dies fand wiederum in einer Feuchtkammer statt und wurde von einem zweimaligem Waschvorgang in PBS für jeweils 5 min gefolgt.

Um den AK schließlich sichtbar zu machen, wurde als Substrat für die Meerrettich-Peroxidase das 3,3'-Diaminobenzidin für 75 Sekunden auf die Schnitte pipettiert. So entstand an den Stellen, an denen der AK gebunden hat, eine bräunliche Farbe.

Nachdem die Schnitte zum letzten Mal dreimal für jeweils 5 min in PBS gewaschen wurden, durchliefen sie eine aufsteigende Alkoholreihe und zwei Bäder mit Roti[®]-Histol (s. Tabelle 10), um dann mit Roti[®]-Histokitt eingebettet und einem Deckglas verschlossen zu werden.

Dauer	Chemikalie
2 min	70 % Isopropanol
2 min	80 % Isopropanol
2 min	100 % Isopropanol
5 min	Roti [®] -Histol
3 min	Roti [®] -Histol

Tabelle 10: Schritte der immunhistochemischen Färbung von IgG

Nach dem Färbevorgang wurden die Schnitte mit der ZEN[®] Software eingescannt und jeweils die Größe der gesamten rechten und linken Hemisphäre gemessen. Addiert ergab sich daraus die jeweilige Gesamtfläche des Gehirns in den Ebenen 11 und 12. Zur Auswertung wurde der Mittelwert dieser Gesamtflächen der beiden Ebenen herangezogen.

Die eigentliche Extravasation von IgG kommt dadurch zustande, dass durch die gestörte Funktion der BHS IgG aus den Gefäßen in das Gewebe übertritt. Dies geschieht vor allem in den geschädigten Arealen. In der Anfärbung von IgG stellte sich dieser Bereich als stark gefärbt dar. Um die Größe dessen zu berechnen subtrahierte man von der Gesamtfläche der jeweiligen Hemisphäre, die Fläche, welche nur schwach angefärbt wurde. Durch die Addition der daraus resultierenden Flächen der linken und rechten Hemisphäre erhielt man die Gesamtfläche der IgG Extravasation. Für die Auswertung wurde ebenfalls der Mittelwert der beiden Ebenen 11 und 12 angewendet.

3.2.10 RNA-Analysen

Zunächst musste die RNA aus dem gewonnenen Hirngewebe extrahiert werden, um daraus die komplementäre DNA (cDNA) zu synthetisieren. Mit dieser konnte die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis bestimmter RNA-Fragmente durchgeführt werden.

3.2.10.1 RNA-Extraktion

Für die Extraktion von RNA kam das RNeasy Plus Universal Kit zum Einsatz. Dabei handelt es sich um ein Phenol-Chloroform-Extraktionsverfahren mit dem QIAzol

Reagenz. Es wurden die Schritte 1-18 aus dem Abschnitt „Protocol: Purification of Total RNA Using the RNeasy Plus Universal Mini Kit“ des RNeasy® Plus Universal Handbook befolgt (125). Das Gewebe stammte aus den mit „rA“ beschrifteten Kryoröhrchen mit dem roten Deckel, da die RNA-Analysen nur mit dem Gewebe aus der rechten Hemisphäre durchgeführt wurden, wo auch das SHT induziert wurde (s. Abschnitt 3.2.9.1). In unserem Labor kam bei Schritt 3 der Mastermill MM300 Gewebehomogenisator von der Firma Retsch zum Einsatz. Die verwendeten 2 ml Tubes mit der Metallkugel, dem Gewebe und den 0,9 ml QIAzol Reagenz wurden dort zweimal für jeweils eine Minute bei 20 Hertz (Hz) zerkleinert. Am Ende der RNA-Extraktion wurde die gewonnene Gesamt-RNA photometrisch bestimmt. Da RNA ihr Absorptionsmaximum bei 260 Nanometer (nm), DNA bei 280 nm und organische Verunreinigung bei 230 nm besitzt, konnte zusätzlich zur Konzentration auch die Verunreinigung gemessen werden. Dabei sollte der Quotient aus der Absorption von 260nm/280nm zwischen 1,8-2,0 liegen und der Quotient von 260nm/230nm bei größer 1,8 liegen. Die fertige RNA wurde dann bis zur Weiterverarbeitung in einem -80 °C Tiefkühlschrank gelagert.

3.2.10.2 cDNA-Synthese

Zur cDNA-Synthese wurde das QuantiTect® Reverse Transcription Kit genutzt. Dazu wurden die Schritte 1-8 des QuantiTect® Reverse Transcription Handbook befolgt (126). Dabei entstand aus der in Abschnitt 3.2.10.1 hergestellten RNA die cDNA. Für dieses Verfahren wurde das Gefäß mit der RNA auf Trockeneis aufgetaut und pro Probe jeweils eine Menge von 1,0 µg RNA verwendet. Am Ende der 8 Schritte wurde die cDNA in einem Verhältnis von 1:2 mit RNase freiem Wasser verdünnt und bis zur Weiterverarbeitung in einem -80 °C kalten Tiefkühlschrank gelagert.

3.2.10.3 RT-PCR

Das Prinzip der PCR dient der Vervielfältigung eines spezifischen DNA-Segments. Bei der Reverse-Transkriptase-(RT-)PCR wird durch das Umschreiben von RNA in DNA durch eine Reverse Transkriptase spezifische Messenger-RNA (mRNA) nachgewiesen.

Eine quantitative RT-PCR ermöglicht es in Echtzeit die Vervielfältigung des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts zu beobachten. Dazu benötigt es je nach zu untersuchendem Target entweder einen Fluoreszenzfarbstoff oder eine Hybridisierungssonde, um die DNA zu markieren. Durch die Messung der bei der Vervielfältigung entstehenden Fluoreszenz kann eine Fluoreszenzkurve angefertigt werden. Deren Verlauf ist proportional zur amplifizierten DNA-Menge. Computergestützt kann mit Hilfe einer Software (Light Cycler 480® Software) der Umschlagspunkt und durch eine Standardkurve die absolute DNA-Menge ermittelt werden. Jedes Target wird dabei in Relation zu einem Housekeeping-Gen normalisiert. Dabei handelt es sich um ein Gen, dessen Expression unabhängig von äußeren Einflüssen, wie z.B. einem SHT, ist. In dieser Studie kam das „PPIA“ als Housekeeping-Gen zum Einsatz. Zusätzlich wurde auch die Effizienz der Amplifikation computergestützt korrigiert.

Je nach Target wurden in dieser Arbeit entweder Hybridisierungssonden oder die SYBR-Green Methode benutzt, sodass sich das Vervielfältigungsprogramm und das genutzte Assay je nach Target unterschieden (s. Tabelle 11).

Für jeden Lauf der RT-PCR wurde ein Mastermix hergestellt. Beim SYBR-Green-Farbstoff bestand dieser pro Probe aus 5 µl SYBR-Green, je 0,25 µl des Sense- und Antisense Primers und 3,5 µl Reinstwasser. Bei der Methode mit Hybridisierungssonden bestand dieser Mastermix pro Probe aus 5 µl des Assaymix, 0,25 µl des Sense- und 0,25 µl des Antisense-Primers, 0,5 µl der beiden Hybridisierungssonden und 2,5 µl Reinstwasser. In das Reaktionsgefäß wurden dann jeweils 9 µl des Mastermix und 1 µl der cDNA pipettiert. Bei jeder Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt und der Mittelwert wurde zum Mittelwert des ebenfalls doppelbestimmten Housekeeping-Gens „PPIA“ normalisiert.

Target	Assay
PPIA	Fast SYBR™ Green Mastermix
TNF α	ABsolute Blue qPCR SYBR Green Mixe
IL-1β	Light-Cycler®480 Probes Master
Iba-1	Fast SYBR™ Green Mastermix

Tabelle 11: Target mit dazugehörigem Assay der RT-PCR

3.2.11 Proteinanalyse

Zunächst mussten die Proteine aus dem gewonnen Hirngewebe extrahiert werden. Daraufhin konnte deren Konzentration bestimmt werden und der Dot Blot von IgG durchgeführt werden.

3.2.11.1 Proteinextraktion

Die im Abschnitt 3.2.9.1 gewonnen Proben aus den mit „rB“ beschrifteten und mit einem roten Deckel versehenen Gefäße wurden für die Proteinextraktion verwendet, da hier ebenfalls nur das Gewebe der rechten Hemisphäre analysiert wurde. Die Proben wurden in Eppendorfer Reaktionsgefäße überführt und auf Eis aufgetaut. In das Reaktionsgefäß wurde dann im Verhältnis 1:10 10 µl/mg Gewebe RIPA-Puffer und Proteinase-Inhibitor hinzugegeben. Der RIPA-Puffer dient der Lyse von intakten Zellen und der Denaturierung der in der Probe enthaltenen Proteine. Das Gemisch musste für 30 min auf Eis inkubieren und zum Lysieren und Durchmischen alle 10 min über einen Eppendorfgefäßständer gerieben werden. Dann wurden die Reaktionsgefäße für 20 min bei 14000 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand mit den denaturierten Proteinen in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Reaktionsgefäße in einem -80 °C kalten Tiefkühlschrank gelagert.

3.2.11.2 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der Proteine erfolgte photometrisch mit der Proteinbestimmung nach Lowry in einer 96-Well-Platte. Dazu wurden 2 µl der Probe in einem Verhältnis von 1:10 mit RIPA-Puffer verdünnt und in ein Reaktionsgefäß gegeben. In die 96-Well-Platte wurden nun pro Well 5 µl einer Standardreihe mit einem definierten Proteingehalt (0 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,75 mg/ml, 1,0 mg/ml, 1,5 mg/ml, 2,0 mg/ml, 2,5 mg/ml, 3,0 mg/ml), bzw. je 5 µl der verdünnten Probe gegeben. Jede Probe und auch die Standardreihe wurden im Doppelansatz bestimmt. In jedem Well wurden dann 25 µl eines vorher angefertigten Mixes pipettiert, bestehend aus Reagenz S und Reagenz A in einem Verhältnis von 1:50. Zuletzt wurden noch 200 µl des Reagenzes B in jeden Well pipettiert. Dieser Ansatz wurde bei Raumtemperatur für 12 min lichtgeschützt inkubiert. Dabei entstand entsprechend des Proteingehaltes in der Probe Molybdänblau. Diese Blaufärbung sorgt für eine Extinktion von Licht mit einer Wellenlänge von 750 nm und konnte dadurch im GloMax[®]-Multi+ Detection System

automatisiert photometrisch bestimmt werden. Durch Anfertigung einer Standardreihe ergab sich eine Standardkurve, anhand der sich die Extinktionswerte der Proben in Konzentrationen umrechnen ließen. Zur Berechnung wurden jeweils die Mittelwerte der Doppelbestimmung genutzt.

3.2.11.3 Dot Blot von IgG

Für den Dot Blot von IgG wurden in 0,5 ml Eppendorf Gefäße 20 µg Protein des Proteinlysats, welches mit Hilfe des Vortex gut durchmischt werden musste, gegeben und das Ganze mit PBS auf ein Gesamtvolumen von 10 µl verdünnt. Davon wurden 2 µl als Tropfen auf Nitrocellulosepapier aufgebracht und für mindestens 90 min unter dem Abzug trocknen gelassen. Danach wurde die Membran für 60 min mit 4%iger Magermilch in PBS auf dem Schüttler (50 rpm) blockiert. Jetzt wurde die Membran für 60 min bei Raumtemperatur lichtgeschützt mit einem Anti-Maus-IgG-AK in einer Verdünnung von 1:15000 in 2%iger Magermilch in TBST inkubiert. Der AK richtet sich gegen den Fc-Teil der IgG-Antikörper der Maus. Nach zweimaligem Waschen für jeweils 5 min in TBST auf einem abgedunkelt Schüttler konnte die Fluoreszenz der Proben auf der Membran computergestützt mit dem Odyssey® Imaging System bestimmt werden.

3.2.12 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der Software Prism Graphpad 8.0. Die Daten wurden mit dem „Shapiro-Wilk Test“ auf Normalverteilung und mit dem „Rout-Test“ zu einem Q-Wert von 1% auf Outlier getestet. Da immer nur zwei Gruppen (Knockout gegen Wildtyp) miteinander verglichen wurden, kam bei normalverteilten Daten ein „t-Test“ mit einem Signifikanzniveau von $\alpha = 5\%$ zum Einsatz. Bei den nicht normalverteilten Daten kam der „Mann-Whitney U-Test“ zum Einsatz. Bei Daten, die zu mehreren Zeitpunkten miteinander verglichen wurden, wurde eine Testung mit zweifaktorieller ANOVA (two way ANOVA) durchgeführt und mittels „Sidak-Test“ gegen multiples Testen korrigiert.

In den folgenden Abbildungen sind p-Werte < 0,05 mit *, p-Werte < 0,01 mit **, p-Werte < 0,001 mit *** und p-Werte < 0,0001 mit **** dargestellt.

In den Abbildungen werden auf der X-Achse die Wildtyptiere, aufgrund der fehlenden genetischen Veränderung als „Cre-“ und die Knockouttiere, wegen des Thrombozyten-spezifischen Knockouts des SGLT-2-Transporters, als „Cre+“ bezeichnet. Normalverteilte Daten werden als Punktdiagramme mit Linien für Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes dargestellt. Jeder Punkt stellt ein Tier dar. Nicht normalverteilte Daten sind als Box-Plot Diagramme dargestellt. Die Wildtyptiere, also „Cre-“, sind in Weiß bis Schwarz Tönen dargestellt und die Knockouttiere, also „Cre+“, mit Rosa bis Rot Tönen. Bei der Angabe der Mittelwerte samt Standardfehler der Mittelwerte werden die Wildtyptiere mit „WT“ abgekürzt und die Knockouttiere mit „KO“.

4 Ergebnisse

Die Ergebnisse der oben beschriebenen Versuche werden im Folgenden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (MW \pm SEM) angegeben. Die Werte wurden auf zwei Nachkommastellen gerundet.

4.1 Vorstudie von Mäusen mit undifferenziertem Knockout des SGLT-2-Transporters

In bisher unveröffentlichten Studien an Mäusen mit einem undifferenzierten Knockout der SGLT-2-Transporter auf allen Zellen konnte ein neuroprotektiver Effekt im Vergleich zu der Gruppe der Wildtypiere gezeigt werden. 24 Stunden nach induziertem SHT zeigten diese Knockoutmäuse im Vergleich zu den Wildtypmäusen ein signifikant kleineres Kontusionsvolumen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass diese Knockoutmäuse 6 Stunden nach induziertem SHT eine verminderte Thrombozytenaggregationsfähigkeit aufwiesen. Dargestellt sind diese Ergebnisse in Abbildung 7.

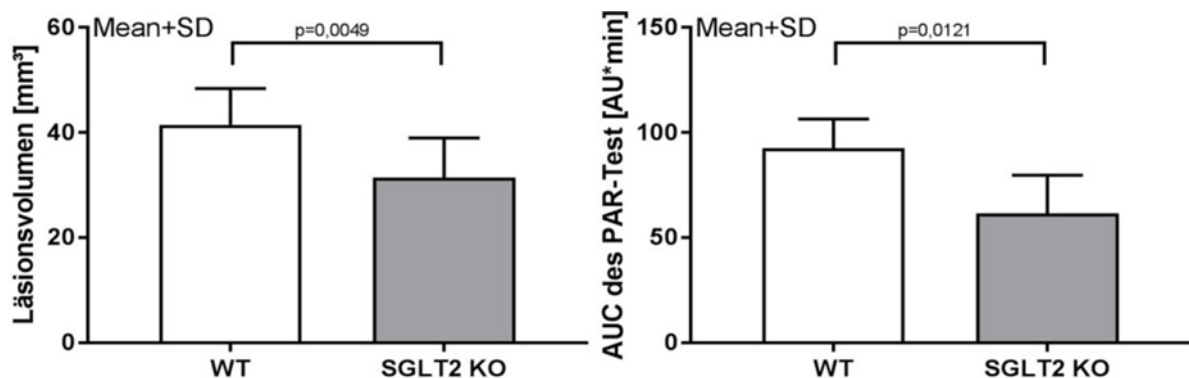


Abbildung 7: Ergebnisse der Studien an Mäusen mit einem kompletten Knockout von SGLT-2-Transportern auf allen Zellen

Das Balkendiagramm links zeigt 24 Stunden nach induziertem SHT bei den SGLT-2 Knockoutmäusen ein signifikant kleineres Kontusionsvolumen als bei Wildtypieren. Dieses Ergebnis stammt aus der Auswertung von Kresylviolett gefärbten Hirnschnitten. Das Balkendiagramm auf der rechten Seite zeigt 6 Stunden nach induziertem SHT bei den SGLT-2 Knockoutmäusen eine im Vergleich zu den Wildtypieren signifikant verminderte Thrombozytenaggregationsfähigkeit (AUC s. Abschnitt 3.2.8.2). Diese Daten stammen aus einem „Multiplate® PAR-4 Test“.

Aufgrund dieser Ergebnisse aus Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe wurden in dieser Arbeit die folgenden Versuche an Mäusen mit einem Thrombozyten-spezifischen Knockout durchgeführt. Damit sollte überprüft werden, ob der Knockout der SGLT-2 Transporter an den Thrombozyten zu einer verminderten

Thrombozytenaggregationsfähigkeit geführt hat und, ob dies einen neuroprotektiven Effekt bewirkt hat.

4.2 Studie von nativen Weibchen und Männchen

Die Studie an den nativen Tieren diente der Überprüfung, ob der Knockout bereits im nativen Zustand ohne induziertes SHT zu einem Unterschied führte. Dies sollte die Möglichkeit geben besser beurteilen zu können, welche Auswirkungen der Knockout im Zustand des induzierten SHT hatte. Dazu verglich man die Wildtyptiere mit den Knockouttieren in folgenden Punkten: KG, Blutbild, Thrombozytenaggregationsfähigkeit und der mRNA-Expression.

Die Versuche wurden an zwei geschlechtergetrennten Gruppen durchgeführt.

4.2.1 Körpergewicht

Zunächst werden in den folgenden Diagrammen aus den Abbildungen 8 und 9 die Ergebnisse des gemessenen KGs, unterschieden zwischen „Cre-“ und „Cre+“, dargestellt.

4.2.1.1 Körpergewicht der nativen Weibchen

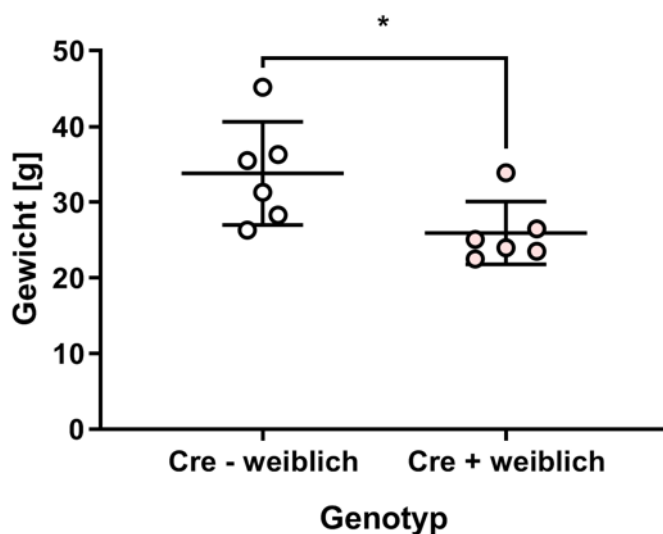


Abbildung 8: Körpergewicht der nativen Weibchen

Verteilung des KGs in [g] der weiblichen Versuchstiere auf der y-Achse innerhalb der beiden Gruppen des Genotyps „Cre- weiblich“ und „Cre+ weiblich“ auf der x-Achse.

Dieses zeigte bei den weiblichen Knockouttieren (KO $25,92 \pm 1,69$ g) ein signifikant niedrigeres Gewicht als bei den Wildtyptieren (WT $33,82 \pm 2,78$ g) ($p = 0,0356$).

Dieser Unterschied war allerdings nur in dieser Studie sichtbar und konnte sich bei den im Folgenden beschriebenen Studien der Weibchen mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden und 5 Tagen nach induziertem SHT nicht bestätigen.

4.2.1.2 Körpergewicht der nativen Männchen

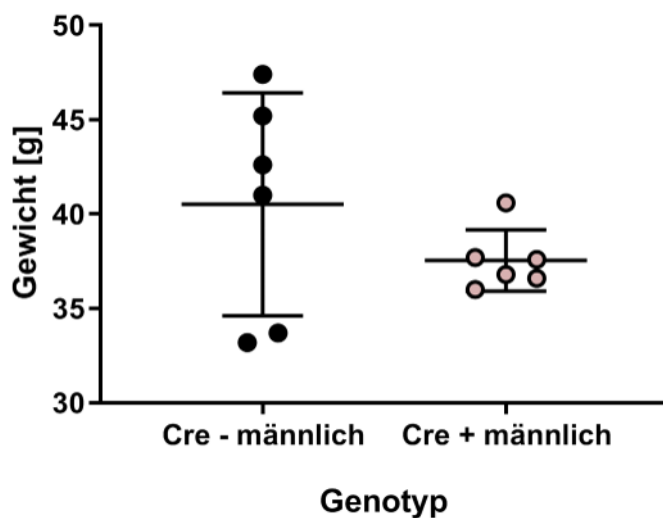


Abbildung 9: Körpergewicht der nativen Männchen

Verteilung des KGs in [g] der männlichen Versuchstiere auf der y-Achse innerhalb der beiden Gruppen des Genotyps „Cre- männlich“ und „Cre+ männlich“ auf der x-Achse.

Diese Messung ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Wildtyptieren (WT $40,52 \pm 2,41$ g) und den Knockouttieren (KO $37,55 \pm 0,66$ g).

4.2.2 Blutbild/Sysmex Cellcounter

Die Untersuchung des Blutbildes verfolgte das Ziel, zu überprüfen, ob es durch die genetische Veränderung der Thrombozyten zu Abweichungen bei den Parametern der Thrombozyten, aber auch bei den Erythrozytenindizes und den Leukozyten kam.

4.2.2.1 Blutbild der nativen Weibchen

Zunächst werden die einzelnen Ergebnisse der verschiedenen Messparameter zu den **Thrombozyten**, unterschieden zwischen den Gruppen „Cre- weiblich“ und „Cre+ weiblich“, in Diagrammform dargestellt.

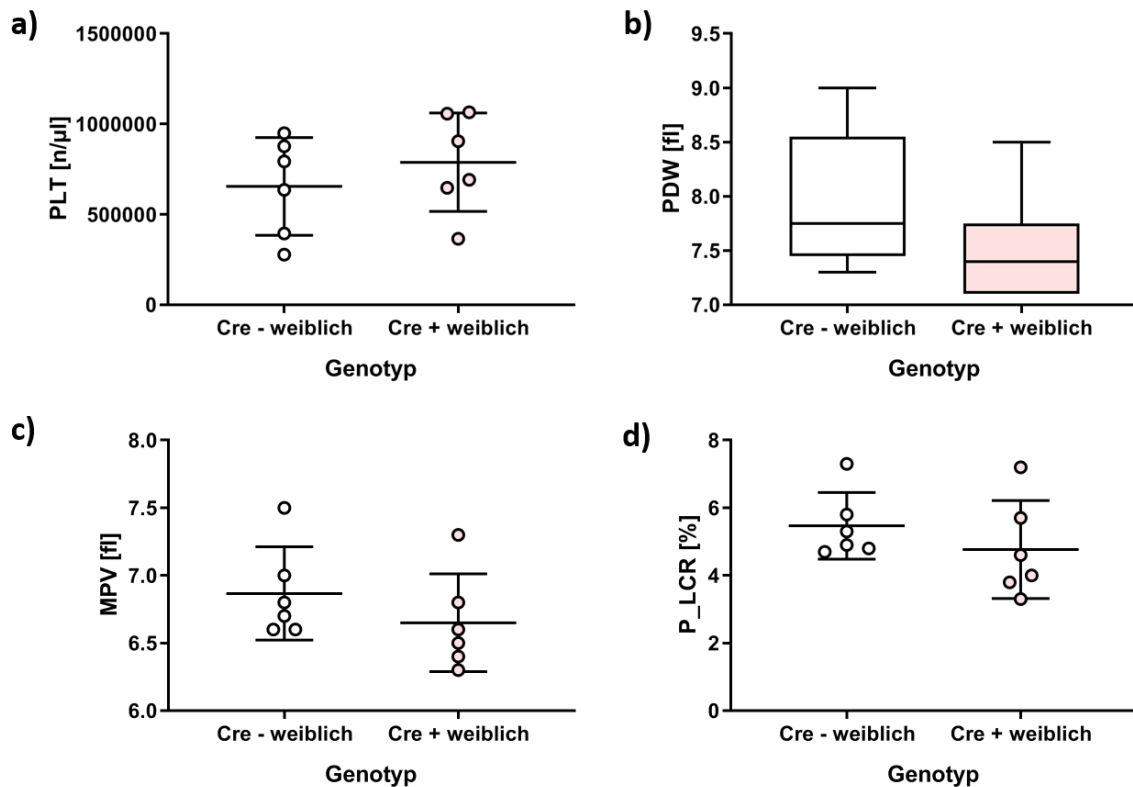


Abbildung 10: Blutbild der nativen Weibchen – Thrombozyten

Verteilung von **a)** Thrombozytenanzahl (PLT) in [n/µl], **b)** Thrombozytenverteilungsbreite (PDW) in [fl], **c)** mittlerem Thrombozytenvolumen (MPV) in [fl] und **d)** Anteil großer Thrombozyten (> 12 fl) (P_LCR) in [%] der weiblichen Versuchstiere auf der y-Achse innerhalb der beiden Gruppen des Genotyps „Cre- weiblich“ und „Cre+ weiblich“ auf der x-Achse.

Bei keinem der erhobenen Werte zu den Thrombozyten (PLT, PDW, MPV und P_LCR) zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den weiblichen Wildtyptieren und Knockouttieren.

Die jeweiligen Mittelwerte mit dazugehörigen Standardfehlern werden in der folgenden Tabelle dargestellt.

Thrombozyten	WT ♀	KO ♀
PLT	654333 ± 110473 n/μl	788500 ± 111286 n/μl
	Nicht signifikant	
PDW	7,95 ± 0,26 fl	7,50 ± 0,21 fl
	Nicht signifikant	
MPV	6,87 ± 0,14 fl	6,65 ± 0,15 fl
	Nicht signifikant	
P_LCR	5,47 ± 0,40 %	4,77 ± 0,59 %
	Nicht signifikant	

Tabelle 12: Blutbild der nativen Weibchen - MW ± SEM der Thrombozyten

In den folgenden Diagrammen werden die in den beiden Gruppen „Cre- weiblich“ und „Cre+ weiblich“ gemessenen **Erythrozytenindizes** gezeigt.

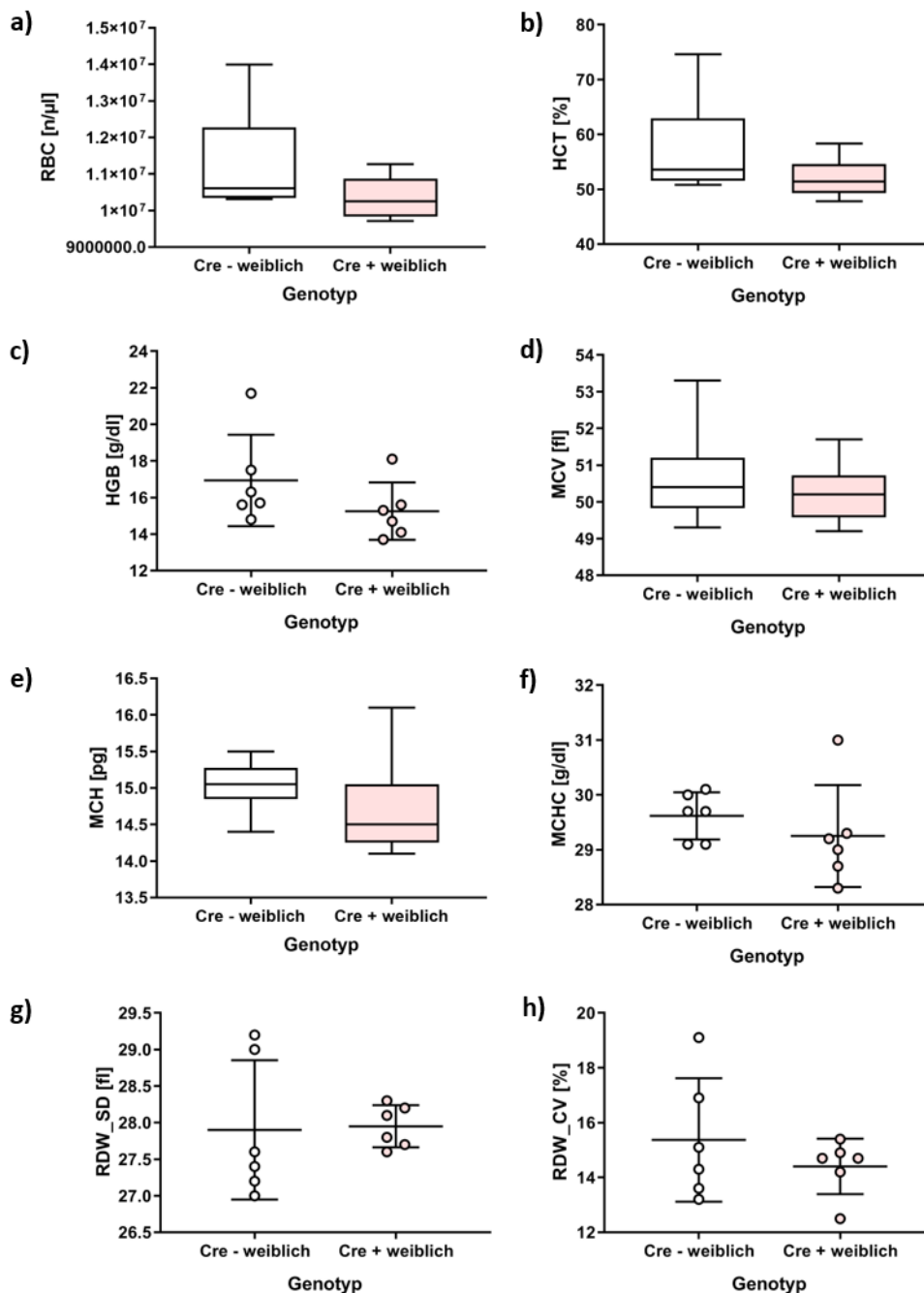


Abbildung 11: Blutbild der nativen Weibchen - Erythrozyten

Verteilung von **a)** Erythrozytenanzahl (RBC) in [n/μl], **b)** Hämatokrit (HCT) in [%], **c)** Hämoglobin (HGB) in [g/dl], **d)** Mittlerem korpuskulären Volumen (MCV) in [fl], **e)** Mittlerem korpuskulären Hämoglobingehalt (MCH) in [pg], der **f)** Mittlerer korpuskulärer Hämoglobin-Konzentration (MCHC) in [g/dl], **g)** Erythrozytenverteilungsbreite als Standardabweichung (RDW_SD) in [fl] und **h)** Variationskoeffizient der Erythrozytengröße (RDW_CV) in [%] der weiblichen Versuchstiere auf der y-Achse innerhalb der beiden Gruppen des Genotyps „Cre- weiblich“ und „Cre+ weiblich“ auf der x-Achse.

Auch bei den Erythrozytenindizes (RBC, HCT, HGB, MCV, MCH, MCHC, RDW_SD und RDW_CV) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Wildtyp- und den Knockouttieren.

Die ermittelten Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte werden in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

Erythrozytenindizes	WT ♀	KO ♀
RBC	11261667 ± 584844 n/µl	10348333 ± n/µl
	Nicht signifikant	
HCT	57,22 ± 3,67 %	52,02 ± 1,51 %
	Nicht signifikant	
HGB	16,93 ± 1,02 g/dl	15,25 ± 0,64 g/dl
	Nicht signifikant	
MCV	50,65 ± 0,56 fl	50,23 ± 0,34 fl
	Nicht signifikant	
MCH	15,03 ± 0,15 pg	14,70 ± 0,29 pg
	Nicht signifikant	
MCHC	29,62 ± 0,18 g/dl	29,25 ± 0,38 g/dl
	Nicht signifikant	
RDW_SD	27,90 ± 0,39 fl	27,95 ± 0,12 fl
	Nicht signifikant	
RDW_CV	15,37 ± 0,92 %	14,40 ± 0,41 %
	Nicht signifikant	

Tabelle 13: Blutbild der nativen Weibchen - MW ± SEM der Erythrozytenindizes

Zuletzt werden die Werte der **Leukozyten** ebenfalls in Diagrammform mit Unterscheidung der beiden Gruppen „Cre- weiblich“ und „Cre+ weiblich“ dargestellt.

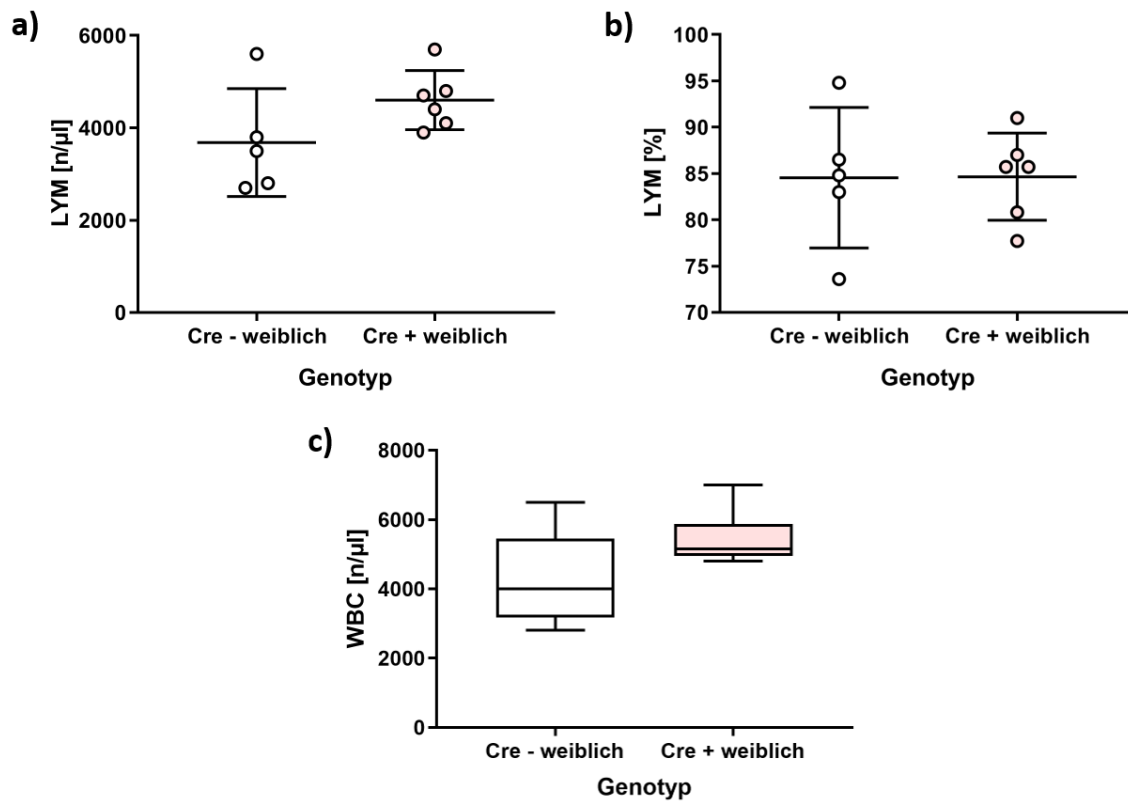


Abbildung 12: Blutbild der nativen Weibchen - Leukozyten

Verteilung von **a)** Lymphozytenanzahl (LYM) in [n/μl], **b)** Lymphozytenanteil (LYM) in [%] und **c)** Leukozytenanzahl (WBC) in [n/μl] der weiblichen Versuchstiere auf der y-Achse innerhalb der beiden Gruppen des Genotyps „Cre- weiblich“ und „Cre+ weiblich“ auf der x-Achse.

Bei den Messwerten der Leukozyten (LYM, LYM [%] und WBC) zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Wildtyp- und Knockoutgruppe.

Die Mittelwerte und dazugehörigen Standardfehler können der nachfolgenden Tabelle entnommen werden.

Leukozyten	WT ♀	KO ♀
LYM	3680 ± 522,9 n/μl	4600 ± 260,8 n/μl
	Nicht signifikant	
LYM [%]	84,54 ± 3,40 %	84,65 ± 1,93 %
	Nicht signifikant	
WBC	4283 ± 547,4 n/μl	5433 ± 329,3 n/μl
	Nicht signifikant	

Tabelle 14: Blutbild der nativen Weibchen - MW ± SEM der Leukozyten

Somit ergaben sich im gesamten Blutbild keine signifikanten Unterschiede zwischen den nativen weiblichen Wildtyp- und Knockouttieren.

4.2.2.2 Blutbild der nativen Männchen

Zunächst werden ebenfalls die Diagramme der Messergebnisse zu den einzelnen Parametern der **Thrombozyten**, mit der Unterscheidung der beiden Gruppen „Cre-männlich“ und „Cre+ männlich“, dargestellt.

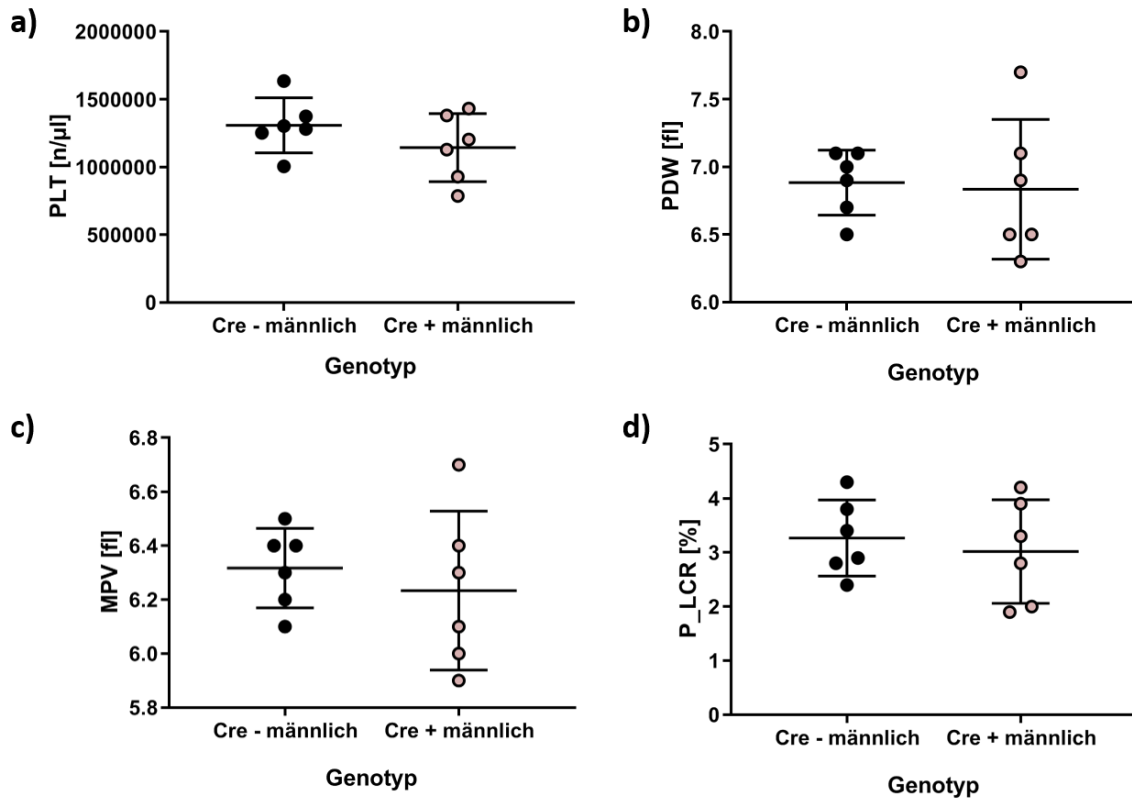


Abbildung 13: Blutbild der nativen Männchen - Thrombozyten

Verteilung von **a)** Thrombozytenanzahl (PLT) in [n/µl], **b)** Thrombozytenverteilungsbreite (PDW) in [fl], **c)** mittlerem Thrombozytenvolumen (MPV) in [fl] und **d)** Anteil großer Thrombozyten (> 12 fl) (P_LCR) in [%] der männlichen Versuchstiere auf der y-Achse innerhalb der beiden Gruppen des Genotyps „Cre- männlich“ und „Cre+ männlich“ auf der x-Achse.

Auch bei den nativen männlichen Tieren ergaben sich bei den hier dargestellten Werten der Thrombozyten (PLT, PDW, MPV, P_LCR) keine signifikanten Unterschiede.

Die jeweiligen Mittelwerte und dazugehörigen Standardfehler werden in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

Thrombozyten	WT ♂	KO ♂
PLT	1308500 ± 83040 n/μl	1143167 ± 102623 n/μl
	Nicht signifikant	
PDW	6,88 ± 0,10 fl	6,83 ± 0,21 fl
	Nicht signifikant	
MPV	6,32 ± 0,06 fl	6,23 ± 0,12 fl
	Nicht signifikant	
P_LCR	3,27 ± 0,29 %	3,02 ± 0,39 %
	Nicht signifikant	

Tabelle 15: Blutbild der nativen Männchen - MW ± SEM der Thrombozyten

Nachfolgend werden die **Erythrozytenindizes** der beiden Gruppen „Cre- männlich“ und „Cre+ männlich“ in weiteren Diagrammen dargestellt.

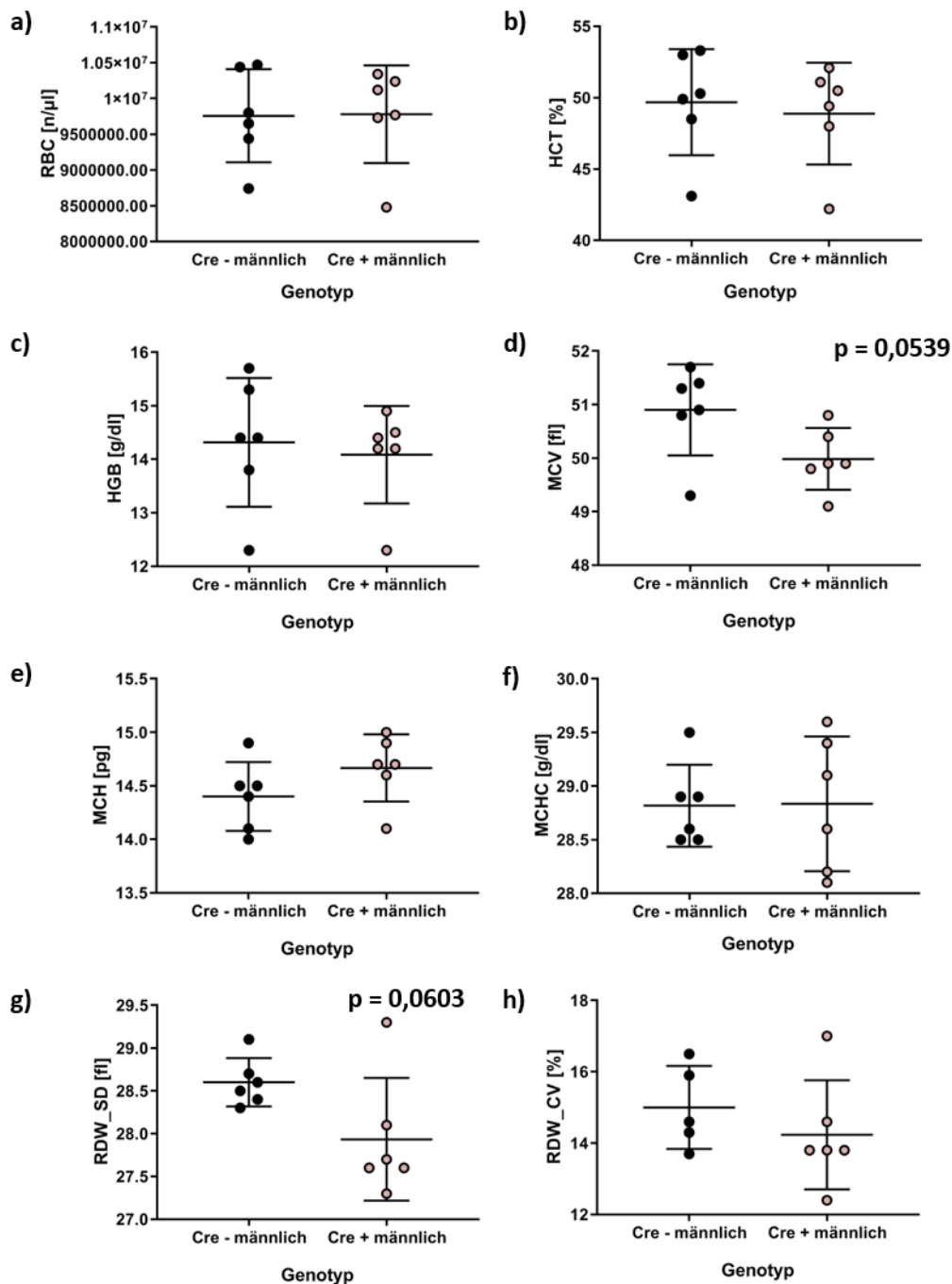


Abbildung 14: Blutbild der nativen Männchen - Erythrozyten

Verteilung von **a)** Erythrozytenanzahl (RBC) in [n/ μ l], **b)** Hämatokrit (HCT) in [%], **c)** Hämoglobin (HGB) in [g/dl], **d)** Mittlerem korpuskulären Volumen (MCV) in [fl], **e)** Mittlerem korpuskulären Hämoglobingehalt (MCH) in [pg], **f)** Mittlerer korpuskulärer Hämoglobin-Konzentration (MCHC) in [g/dl], **g)** Erythrozytenverteilungsbreite als Standardabweichung (RDW_SD) in [fl] und **h)** Variationskoeffizient der Erythrozytengröße (RDW_CV) in [%] der männlichen Versuchstiere auf der y-Achse innerhalb der beiden Gruppen des Genotyps „Cre- männlich“ und „Cre+ männlich“ auf der x-Achse.

Auch hier ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (RBC, HCT, HGB, MCV, MCH, MCHC, RDW_SD und RDW_CV) zwischen den nativen männlichen Wildtyp- und Knockouttieren.

Lediglich beim mittleren korpuskulären Volumen ($p = 0,0539$) und der Erythrozytenverteilungsbreite ($p = 0,0603$) ergaben sich bei den Knockouttieren tendenziell niedrigere Werte.

Die Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte können in der folgenden Tabelle eingesehen werden.

Erythrozytenindizes	WT ♂	KO ♂
RBC	9756667 ± 266016 n/µl	9780000 ± 278891 n/µl
	Nicht signifikant	
HCT	49,68 ± 1,52 %	48,88 ± 1,46 %
	Nicht signifikant	
HGB	14,32 ± 0,49 g/dl	14,08 ± 0,37 g/dl
	Nicht signifikant	
MCV	50,90 ± 0,35 fl	49,98 ± 0,24 fl
	Tendenziell $p = 0,0539$	
MCH	14,40 ± 0,13 pg	14,67 ± 0,13 pg
	Nicht signifikant	
MCHC	28,82 ± 0,16 g/dl	28,83 ± 0,26 g/dl
	Nicht signifikant	
RDW_SD	28,60 ± 0,12 fl	27,93 ± 0,29 fl
	Tendenziell $p = 0,0603$	
RDW_CV	15,00 ± 0,52 %	14,23 ± 0,62 %
	Nicht signifikant	

Tabelle 16: Blutbild der nativen Männchen - MW ± SEM der Erythrozytenindizes

Zuletzt werden die erhobenen Messwerte der **Leukozyten** mit Unterscheidung der beiden Gruppen „Cre- männlich“ und „Cre+ männlich“ in Diagrammen dargestellt.

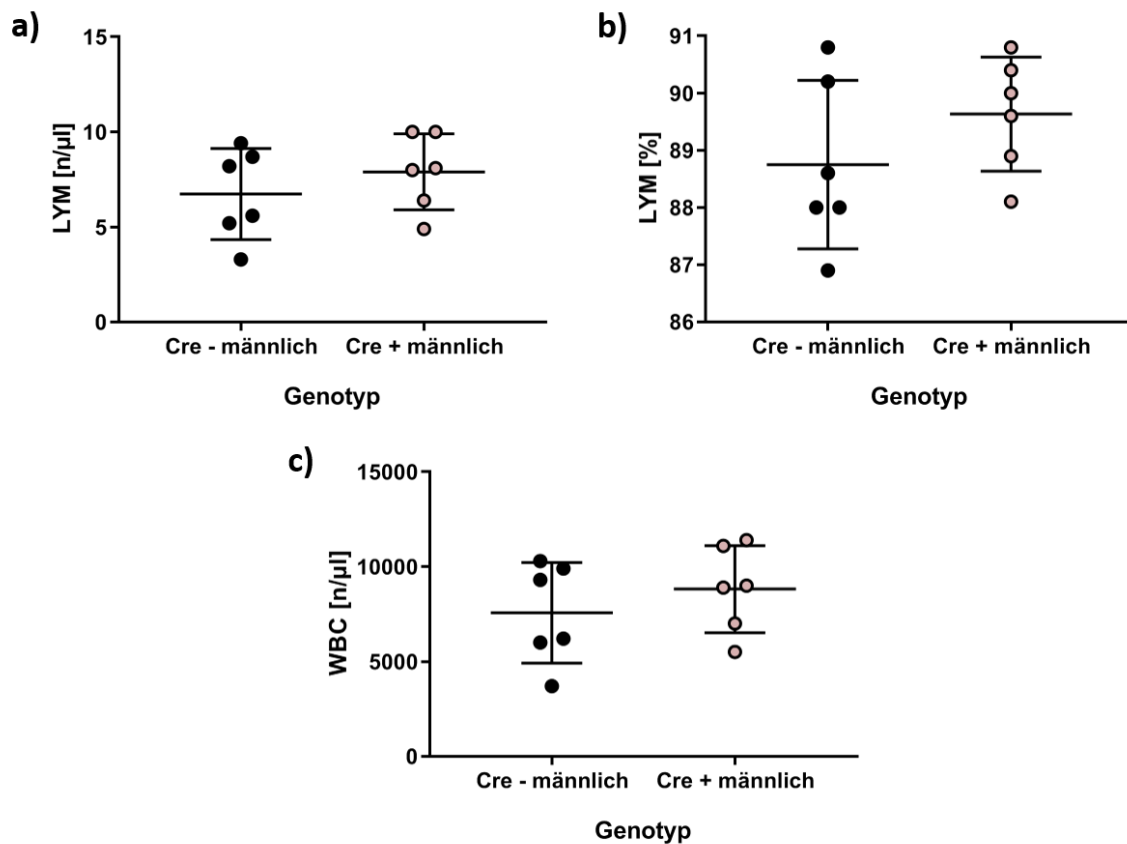


Abbildung 15: Blutbild der nativen Männchen - Leukozyten

Verteilung von **a)** Lymphozytenanzahl (LYM) in [n/µl], **b)** Lymphozytenanteil (LYM) in [%] und **c)** Leukozytenanzahl (WBC) in [n/µl] der männlichen Versuchstiere auf der y-Achse innerhalb der beiden Gruppen des Genotyps „Cre- männlich“ und „Cre+ männlich“ auf der x-Achse.

Die Messwerte der Leukozyten (LYM, LYM [%] und WBC) ergaben ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den männlichen Wildtyp- und Knockouttieren.

Aus der nachfolgenden Tabelle können die jeweiligen Mittelwerte und dazugehörigen Standardfehler entnommen werden.

Leukozyten	WT ♂	KO ♂
LYM	6,73 ± 0,98 n/µl	7,90 ± 0,82 n/µl
	Nicht signifikant	
LYM [%]	88,75 ± 0,60 %	89,63 ± 0,41 %
	Nicht signifikant	
WBC	7567 ± 1083 n/µl	8817 ± 935,0 n/µl
	Nicht signifikant	

Tabelle 17: Blutbild der nativen Männchen - MW ± SEM der Leukozyten

Somit zeigten sich bei den männlichen Tieren wie auch bei den weiblichen nativen Tieren keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp- und Knockoutgruppe im Blutbild.

4.2.3 Thrombozytenaggregationsfähigkeit/Multiplate® Analyser

Der Thrombozyten-spezifische Knockout des Zuckertransporters SGLT-2 verfolgte das Ziel durch eine verminderte Energieversorgung der Thrombozyten deren Aktivität zu verringern. Es wurde eine derartige Verminderung der Thrombozytenaggregationsfähigkeit beabsichtigt, die dazu führen sollte, dass im nativen Zustand ohne induziertes SHT die primäre Hämostase unbeeinflusst bleibt und es zu keiner vermehrten Blutungsneigung kommt. Im Falle eines SHT jedoch sollte eine überschießende Aktivierung der Thrombozyten verhindert werden. Daher wurde überprüft, welche Auswirkung der Knockout auf die nativen Tiere hatte.

Beim Multiplate® Analyser Test ergeben sich drei Werte: die Aggregation, die Velocity und die AUC. Der letztgenannte Wert ist der entscheidend zur Beurteilung der Thrombozytenaggregationsfähigkeit, da sich dieser aus der Aggregation und der Velocity zusammensetzt. Daher wird in den folgenden Ergebnissen nur die AUC aufgeführt.

Der Test fand jeweils in einer Doppelbestimmung in Messkanal 1 und 2 mit Unterscheidung der Gruppen „Cre-“ und „Cre+“ statt und die Ergebnisse werden in den nachfolgenden Abbildungen 16 und 17 in Diagrammen dargestellt.

4.2.3.1 Thrombozytenaggregationsfähigkeit der nativen Weibchen

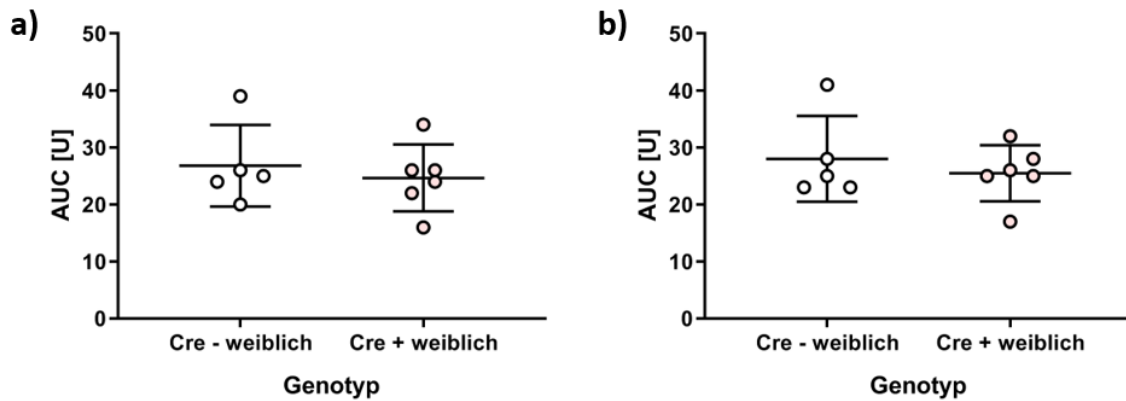


Abbildung 16: Thrombozytenaggregationsfähigkeit der nativen Weibchen

Verteilung in Diagramm **a)** der AUC des Messkanal 1 in [U] und in **b)** der AUC des Messkanal 2 in [U] der weiblichen Versuchstiere auf der y-Achse innerhalb der beiden Gruppen des Genotyps „Cre-weiblich“ und „Cre+ weiblich“ auf der x-Achse.

Insgesamt ergaben sich bei der Thrombozytenaggregationsfähigkeit keine signifikanten Unterschiede zwischen den nativen weiblichen Wildtyp- und Knockouttieren.

Die Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte werden in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

Thrombozytenaggregationsfähigkeit	WT ♀	KO ♀
AUC 1	26,80 ± 3,22 U	24,67 ± 2,40 U
	Nicht signifikant	
AUC 2	28,00 ± 3,38 U	25,50 ± 2,01 U
	Nicht signifikant	

Tabelle 18: Thrombozytenaggregationsfähigkeit der nativen Weibchen (MW ± SEM)

Damit führte der Knockout bei den nativen weiblichen Tieren zu keiner veränderten Thrombozytenaggregationsfähigkeit.

4.2.3.2 Thrombozytenaggregationsfähigkeit der nativen Männchen

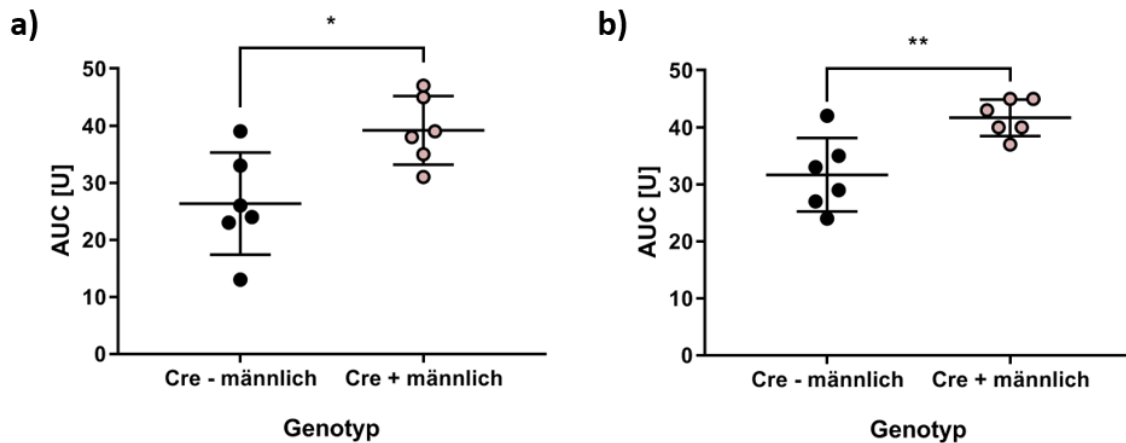


Abbildung 17: Thrombozytenaggregationsfähigkeit der nativen Männchen

Verteilung in Diagramm **a)** der AUC des Messkanal 1 in [U] und in **b)** der AUC des Messkanal 2 in [U] der männlichen Versuchstiere auf der y-Achse innerhalb der beiden Gruppen des Genotyps „Cre-männlich“ und „Cre+ männlich“ auf der x-Achse.

Bei der Thrombozytenaggregationsfähigkeit zeigten sich sowohl im Messkanal 1 ($p = 0,0153$) als auch im Messkanal 2 ($p = 0,0067$) signifikant höhere Werte bei den männlichen Knockouttieren.

Die jeweiligen Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte werden in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

Thrombozyten-aggregationsfähigkeit	WT ♂	KO ♂
AUC 1	26,33 ± 3,65 U	39,17 ± 2,46 U
	Signifikant p = 0,0153	
AUC 2	31,67 ± 2,63 U	41,67 ± 1,31 U
	Signifikant p = 0,0067	

Tabelle 19: Thrombozytenaggregationsfähigkeit der nativen Männchen (MW ± SEM)

Damit ergab sich insgesamt bei den männlichen Knockouttieren eine signifikant stärkere Thrombozytenaggregationsfähigkeit als bei den Wildtypieren.

4.2.4 RNA-Analysen

Die Untersuchungen der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β sollten überprüfen, ob sich diese Marker der Neuroinflammation bei den Versuchstieren bereits im nativen Zustand unterscheiden. Diagramme der mRNA-Expression von

TNF- α und IL-1 β mit Unterscheidung zwischen den Gruppen „Cre-“ und „Cre+“ werden in den Abbildungen 18 und 19 dargestellt.

4.2.4.1 RNA-Analysen der nativen Weibchen

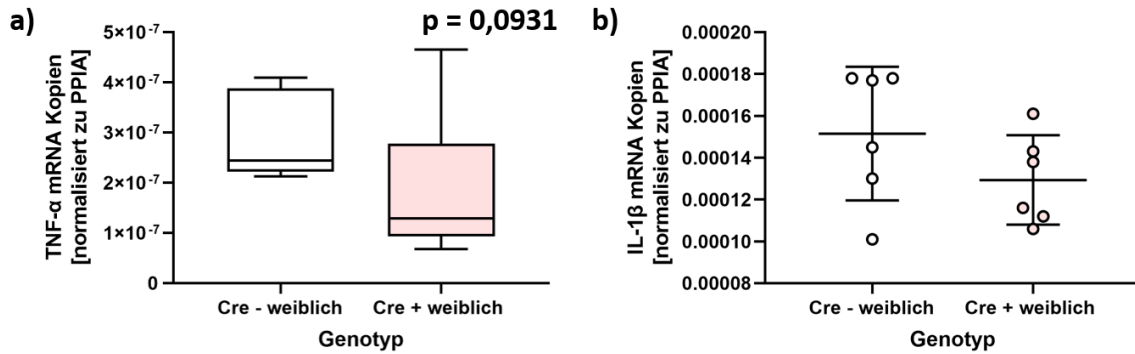


Abbildung 18: PCR der nativen Weibchen - mRNA-Expression von TNF- α und IL-1 β

Verteilung der mRNA-Expression von a) TNF- α und b) IL-1 β der weiblichen Versuchstiere auf der y-Achse innerhalb der beiden Gruppen des Genotyps „Cre- weiblich“ und „Cre+ weiblich“.

Bei beiden Werten (TNF- α und IL-1 β) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Jedoch ergab sich bei TNF- α die Tendenz ($p = 0,0931$), dass die weiblichen Knockouttiere tendenziell niedrigere Werte hatten als die Wildtypieren.

Die entsprechenden Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte können in der folgenden Tabelle eingesehen werden.

RNA-Analysen	WT ♀	KO ♀
mRNA-Expression von TNF- α	$2,86 \times 10^{-7} \pm 3,50 \times 10^{-8}$	$1,85 \times 10^{-7} \pm 5,96 \times 10^{-8}$
	Tendenziell $p = 0,0931$	
mRNA-Expression von IL-1 β	$1,51 \times 10^{-4} \pm 1,30 \times 10^{-5}$	$1,30 \times 10^{-4} \pm 8,73 \times 10^{-6}$
	Nicht signifikant	

Tabelle 20: PCR der nativen Weibchen - MW \pm SEM der mRNA-Expression von TNF- α und IL-1 β

4.2.4.2 RNA-Analysen der nativen Männchen

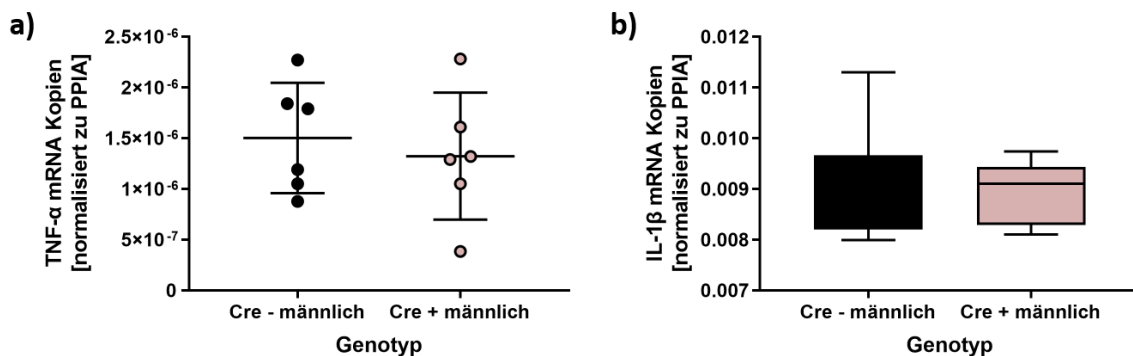


Abbildung 19: PCR der nativen Männchen - mRNA-Expression von TNF-α und IL-1β

Verteilung der mRNA-Expression von **a)** TNF-α und **b)** IL-1β der männlichen Versuchstiere auf der y-Achse innerhalb der beiden Gruppen des Genotyps „Cre- männlich“ und „Cre+ männlich“.

Bei beiden Markern der Neuroinflammation (TNF-α und IL-1β) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Die jeweiligen Mittelwerte und dazugehörigen Standardfehler werden in der untenstehenden Tabelle aufgelistet.

RNA-Analysen	WT ♂	KO ♂
mRNA-Expression von TNF-α	$1,50 \times 10^{-6} \pm 2,22 \times 10^{-7}$	$1,32 \times 10^{-6} \pm 2,55 \times 10^{-7}$
	Nicht signifikant	
mRNA-Expression von IL-1β	$8,91 \times 10^{-3} \pm 5,00 \times 10^{-4}$	$8,91 \times 10^{-3} \pm 2,84 \times 10^{-4}$
	Nicht signifikant	

Tabelle 21: PCR der nativen Männchen - MW ± SEM der mRNA-Expression von TNF-α und IL-1β

4.2.5 Protein-Analyse

Der Dot Blot von IgG diente dem quantitativen Nachweis von IgG im Hirngewebe. Das IgG kann durch BHS-Störungen, z.B. im Rahmen des SHT, aus den Gefäßen in das Hirngewebe übertreten. Damit ermöglichte die Bestimmung der Menge von IgG im Hirngewebe die Untersuchung der Ödemformation.

Diese Untersuchung wurde nur an den männlichen Tieren durchgeführt, da sich bei den folgenden Versuchen die Tendenz ergab, dass der Knockout vor allem bei den männlichen Tieren zu einer Veränderung führte. Daher wurde die Untersuchung nachträglich bei den männlichen nativen Tieren durchgeführt.

Durch die Untersuchung bei den nativen männlichen Tieren sollte überprüft werden, ob sich diese bereits im nativen Zustand voneinander unterscheiden. Dargestellt wird dies im nachfolgenden Diagramm mit der Unterscheidung zwischen den beiden Gruppen „Cre- männlich“ und „Cre+ männlich“.

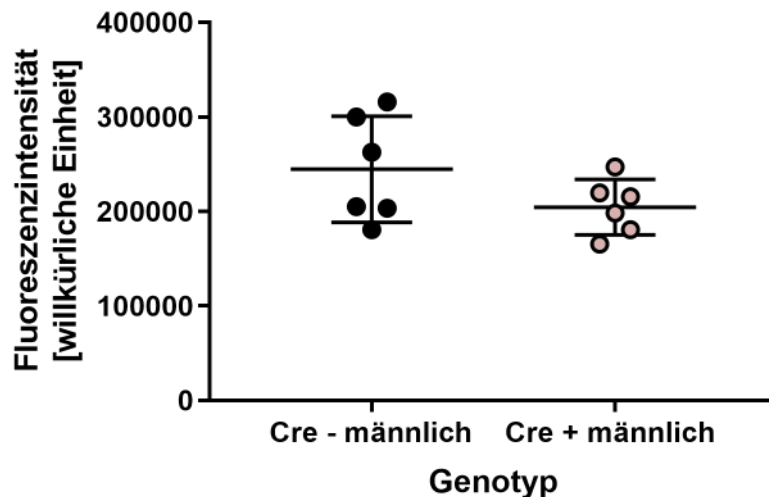


Abbildung 20: Dot Blot von IgG der nativen Männchen

Verteilung der Fluoreszenzintensität des Dot Blots von IgG der männlichen Versuchstiere auf der y-Achse innerhalb der beiden Gruppen des Genotyps „Cre- männlich“ und „Cre+ männlich“ auf der x-Achse.

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den männlichen Wildtyptieren (WT 244546 ± 22940) und Knockouttieren (KO 204515 ± 11960).

Abschließend ergaben sich damit keine signifikanten Unterschiede zwischen den weiblichen Wildtyp- und Knockouttieren, weder beim KG noch beim Blutbild, der Thrombozytenaggregationsfähigkeit oder den RNA-Analysen.

Bei den männlichen nativen Tieren ergaben sich nur bei der Thrombozytenaggregationsfähigkeit Unterschiede zwischen den Knockout- und Wildtyptieren. So zeigte sich, dass der Knockout bei den nativen männlichen Tieren zu einer verstärkten Thrombozytenaggregationsfähigkeit geführt hat. Bei allen anderen Werten zeigten sich wie auch bei den weiblichen nativen Tieren keine signifikanten Unterschiede.

4.3 Studie von Weibchen und Männchen mit einer

Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT

Anhand dieser Studie sollten die unterschiedlichen Auswirkungen des SHTs auf die Knockouttiere und die Wildtyptiere untersucht werden. Damit sollte überprüft werden, ob der Knockout bei den Tieren 6 Stunden nach dem CCI im Vergleich zu den Wildtyptieren eine neuroprotektive Wirkung hatte.

Dazu wurden das KG und der Blutzucker jeweils kurz vor dem CCI und 6 Stunden danach gemessen. Außerdem analysierte man das Blutbild, die Thrombozytenaggregationsfähigkeit, den histologischen Schaden durch eine Kresylviolett Färbung und die IgG-Extravasation durch eine immunhistochemische Färbung von IgG und die mRNA-Expression sowie die Proteine.

Eines der weiblichen Knockouttiere verstarb während der Operation und konnte daher nicht vollständig in der Auswertung berücksichtigt werden.

4.3.1 Körpergewicht

Zunächst wurde die Messung des KG kurz vor dem CCI und 6 Stunden danach, sowie die Differenz dieser beiden Zeitpunkte analysiert. Damit sollte überprüft werden, ob der Knockout durch eine mögliche neuroprotektive Wirkung zu einer verminderten Abnahme des KG führen konnte.

In Abbildung 21 werden die Messungen des KGs, unterschieden zwischen den beiden Gruppen „Cre-“ und Cre+“, in Diagrammform dargestellt.

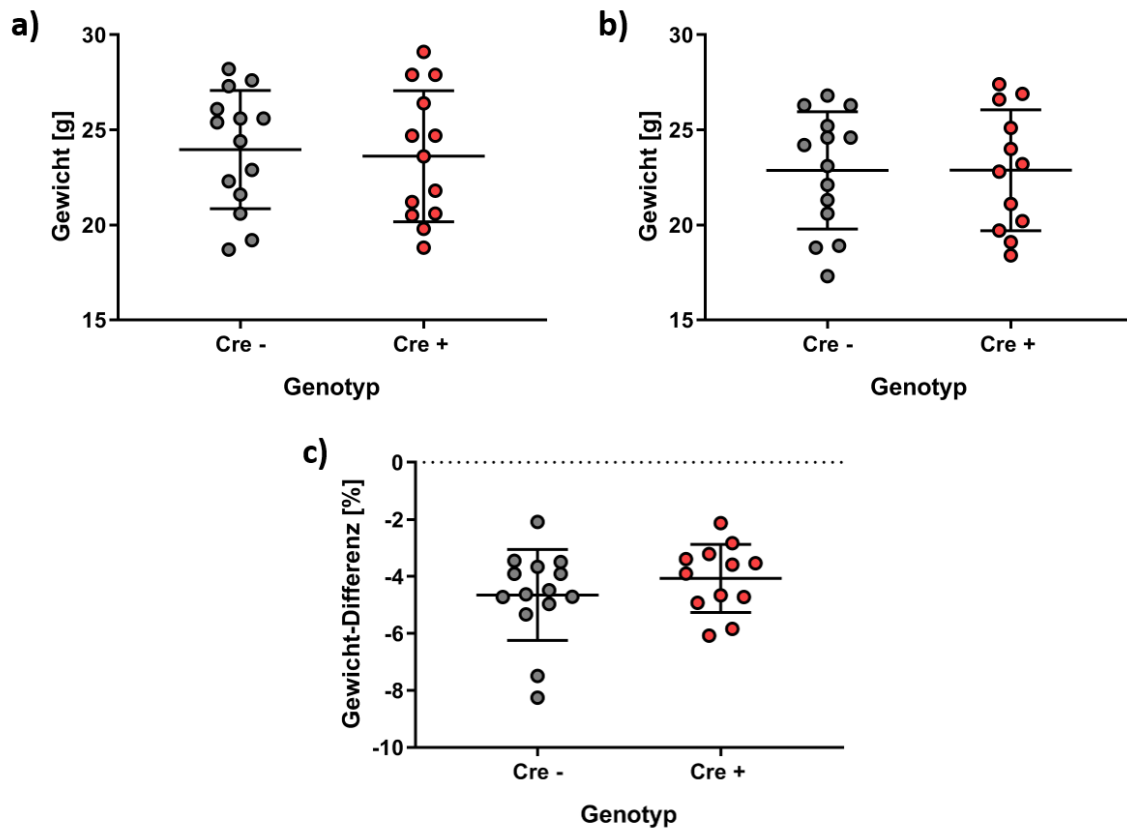


Abbildung 21: Körpergewicht der weiblichen und männlichen Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induzierten SHT

Verteilung des KGs der weiblichen und männlichen Versuchstiere in einer geschlechtergemischten Darstellung auf der y-Achse innerhalb der beiden Gruppen des Genotyps „Cre-“ und „Cre+“ auf der x-Achse. In Diagramm **a)** ist das KG präoperativ in [g] gezeigt, in **b)** 6 Stunden nach dem induzierten SHT in [g] und in **c)** die Differenz der beiden Messzeitpunkte in [%].

Es zeigte sich zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den Wildtyp- und Knockouttieren.

Die jeweiligen Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte werden in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

Körpergewicht	WT ♀/♂	KO ♀/♂
präoperativ	23,96 ± 0,83 g	23,62 ± 0,96 g
	Nicht signifikant	
Prä-mortem	22,86 ± 0,82 g	22,88 ± 0,92 g
	Nicht signifikant	
Differenz	-4,65 ± 0,43 %	-4,07 ± 0,34 %
	Nicht signifikant	

Tabelle 22: Körpergewicht der weiblichen und männlichen Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induzierten SHT (MW ± SEM)

Diesen Ergebnissen zufolge hatte der Knockout 6 Stunden nach dem SHT keinen Einfluss auf das KG.

4.3.2 Blutzucker

Da es sich bei dem SGLT-2-Transporter auf den Thrombozyten um einen Zuckertransporter handelt, wurde der BZ kurz vor dem CCI sowie 6 Stunden danach gemessen. Außerdem wurde die Differenz dieser beiden Zeitpunkte bestimmt. Es sollte überprüft werden, ob der Knockout dadurch Einfluss auf den BZ hatte.

In Abbildung 22 wird die Messung des BZ, unterschieden zwischen den beiden Gruppen „Cre-“ und „Cre+“, in mehreren Diagrammen dargestellt.

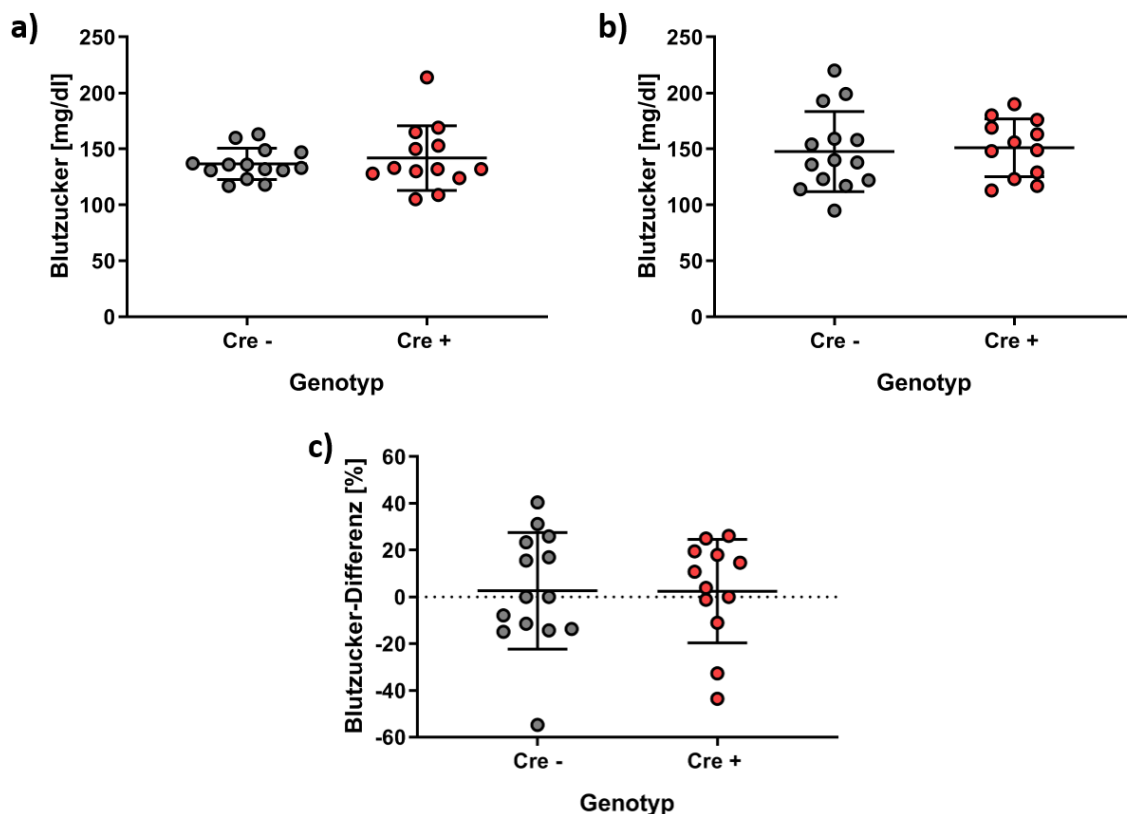


Abbildung 22: Blutzucker-Messwerte der weiblichen und männlichen Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induzierten SHT

Verteilung der BZ-Messwerte der weiblichen und männlichen Versuchstiere in einer geschlechtergemischten Darstellung auf der y-Achse innerhalb der beiden Gruppen des Genotyps „Cre-“ und „Cre+“ auf der x-Achse. In Diagramm **a)** ist der BZ präoperativ in [mg/dl] gezeigt, in **b)** 6 Stunden nach dem induzierten SHT in [mg/dl] und in **c)** die Differenz der beiden Messzeitpunkte in [%].

Zu keinem Messzeitpunkt zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Wildtyptieren und den Knockouttieren.

Die Mittelwerte und deren Standardfehler werden in folgender Tabelle aufgelistet.

Blutzucker	WT ♀/♂	KO ♀/♂
präoperativ	136,6 ± 3,72 mg/dl	141,8 ± 8,01 mg/dl
	Nicht signifikant	
Intra-mortem	147,7 ± 9,55 mg/dl	151,1 ± 7,47 mg/dl
	Nicht signifikant	
Differenz	2,60 ± 6,66 %	2,43 ± 6,39 %
	Nicht signifikant	

Tabelle 23: Blutzucker-Messwerte der weiblichen und männlichen Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induzierten SHT (MW ± SEM)

Der Knockout scheint damit keinen Einfluss auf den BZ zu haben, weder im nativen Zustand, also kurz vor dem CCl, noch 6 Stunden danach.

4.3.3 Blutbild/Sysmex Cellcounter

Nachdem sich im nativen Zustand weder bei den weiblichen Tieren noch bei den männlichen Tieren ein Unterschied im Blutbild zeigte, sollte überprüft werden zu welchen Veränderungen es im Blutbild 6 Stunden nach induziertem SHT kam.

Zunächst werden die einzelnen Ergebnisse der verschiedenen Messparameter der **Thrombozyten**, unterschieden zwischen den Gruppen „Cre-“ und „Cre+“, in Diagrammen dargestellt.

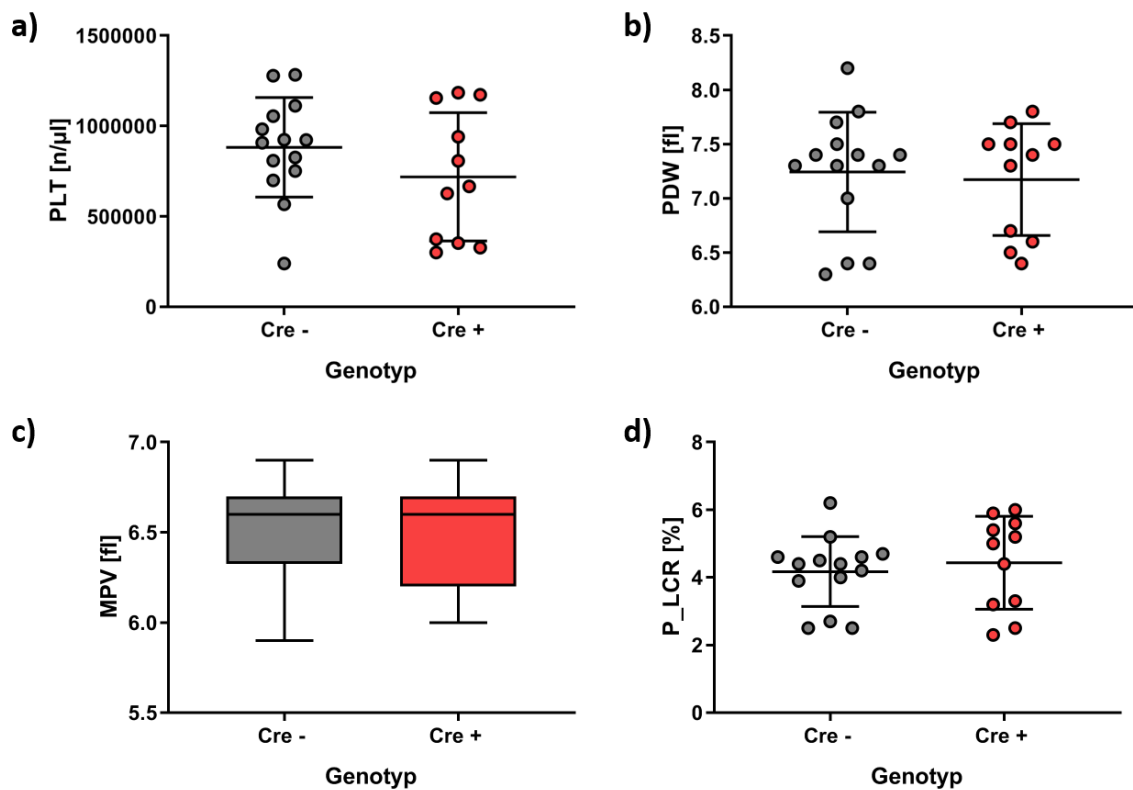


Abbildung 23: Blutbild der weiblichen und männlichen Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT - Thrombozyten

Verteilung von **a)** Thrombozytenanzahl (PLT) in [n/μl], **b)** Thrombozytenverteilungsbreite (PDW) in [fl], **c)** mittlerem Thrombozytenvolumen (MPV) in [fl] und **d)** Anteil großer Thrombozyten (> 12 fl) (P_LCR) in [%] der weiblichen und männlichen Versuchstiere in einer geschlechtergemischten Darstellung auf der y-Achse innerhalb der beiden Gruppen des Genotyps „Cre-“ und „Cre+“ auf der x-Achse.

Hierbei zeigten sich wie zuvor bei den nativen Tieren keine signifikanten Unterschiede (PLT, PDW, MPV und P_LCR) zwischen den Wildtyp- und Knockouttieren.

Die jeweiligen Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte der Thrombozyten können aus der nachfolgenden Tabelle entnommen werden.

Thrombozyten	WT ♀/♂	KO ♀/♂
PLT	882429 ± 73621 n/µl	718818 ± 107146 n/µl
	Nicht signifikant	
PDW	7,24 ± 0,15 fl	7,17 ± 0,16 fl
	Nicht signifikant	
MPV	6,51 ± 0,08 fl	6,46 ± 0,09 fl
	Nicht signifikant	
P_LCR	4,17 ± 0,28 %	4,43 ± 0,41 %
	Nicht signifikant	

Tabelle 24: Blutbild der weiblichen und männlichen Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induzierten SHT - MW ± SEM der Thrombozyten

Nachfolgend sind die **Erythrozytenindizes** der beiden Gruppen „Cre-“ und „Cre+“ in Diagrammen der Abbildung 24 dargestellt.

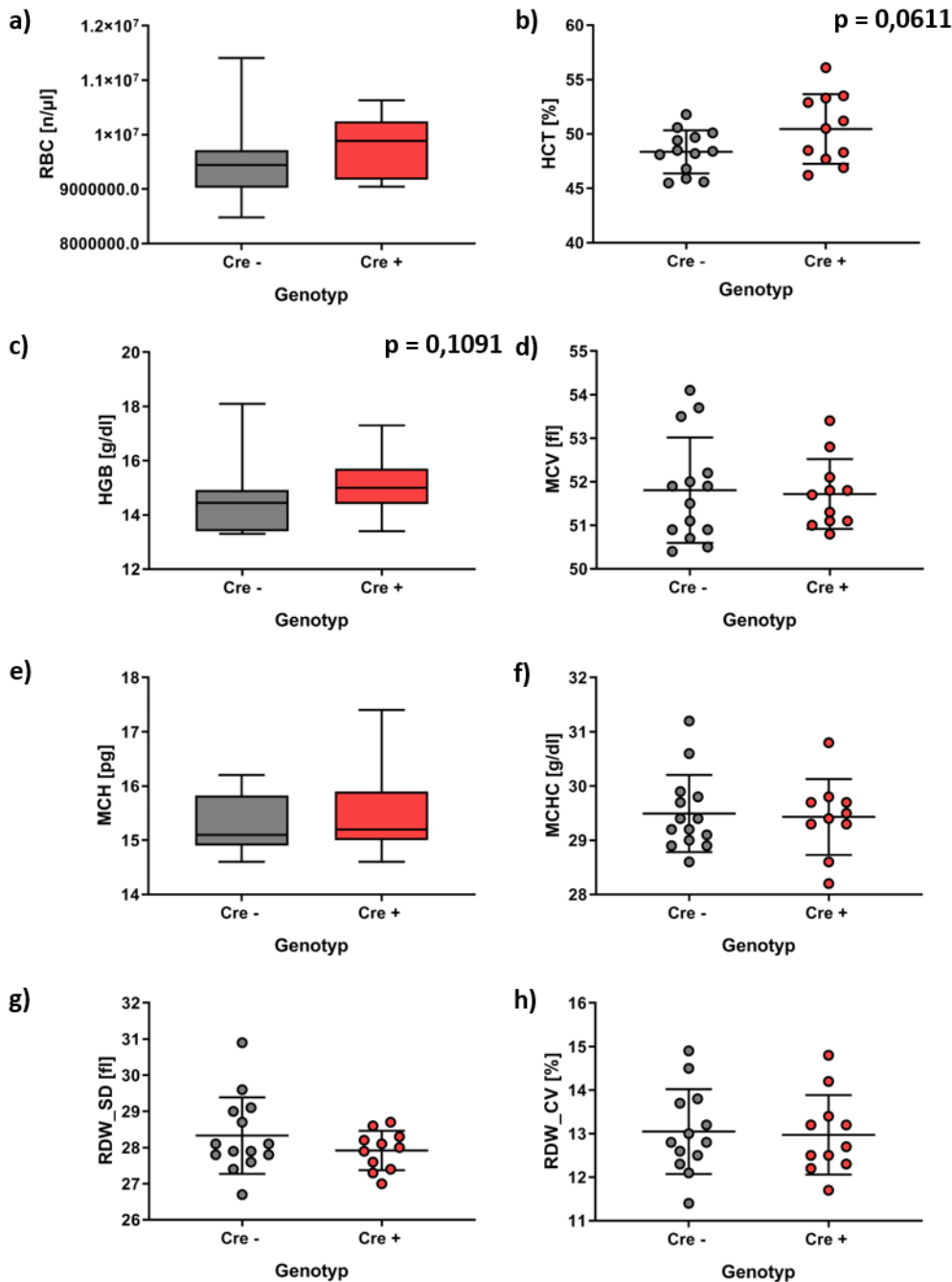


Abbildung 24: Blutbild der weiblichen und männlichen Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induzierten SHT - Erythrozyten

Verteilung von **a)** Erythrozytenanzahl (RBC) in $n/\mu l$, **b)** Hämatokrit (HCT) in [%], **c)** Hämoglobin (HGB) in g/dl , **d)** Mittlerem korpuskulären Volumen (MCV) in fl , **e)** Mittlerem korpuskulären Hämoglobingehalt (MCH) in pg , der **f)** Mittlerer korpuskulärer Hämoglobin-Konzentration (MCHC) in g/dl , **g)** Erythrozytenverteilungsbreite als Standardabweichung (RDW_SD) in fl und **h)** Variationskoeffizient der Erythrozytengröße (RDW_CV) in [%] der weiblichen und männlichen Versuchstiere in einer geschlechtergemischten Darstellung auf der y-Achse innerhalb der beiden Gruppen des Genotyps „Cre-“ und „Cre+“ auf der x-Achse.

Die Messungen der Erythrozytenindizes (RBC, HCT, HGB, MCV, MCH, MCHC, RDW_SD und RDW_CV) zeigten keine signifikanten Unterschiede. Lediglich der Hämatokrit ($p = 0,0611$) und der Hämoglobin Wert ($p = 0,1091$) ergaben bei den Knockouttieren tendenziell höherer Werte als bei den Wildtypieren.

Die einzelnen Messwerte werden in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

Erythrozytenindizes	WT ♀/♂	KO ♀/♂
RBC	9595000 ± 180435 n/µl	9755455 ± 168891 n/µl
	Nicht signifikant	
HCT	48,35 ± 0,55 %	50,46 ± 0,97 %
	Tendenziell p = 0,0611	
HGB	14,53 ± 0,33 g/dl	15,05 ± 0,32 g/dl
	Tendenziell p = 0,1091	
MCV	51,81 ± 0,32 fl	51,72 ± 0,24 fl
	Nicht signifikant	
MCH	15,29 ± 0,14 pg	15,44 ± 0,25 pg
	Nicht signifikant	
MCHC	29,49 ± 0,19 g/dl	29,43 ± 0,22 g/dl
	Nicht signifikant	
RDW_SD	28,33 ± 0,28 fl	27,92 ± 0,16 fl
	Nicht signifikant	
RDW_CV	13,05 ± 0,27 %	12,97 ± 0,28 %
	Nicht signifikant	

Tabelle 25: Blutbild der weiblichen und männlichen Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induzierten SHT - MW ± SEM der Erythrozytenindizes

Zuletzt werden die erhobenen Messwerte der **Leukozyten** mit Unterscheidung der beiden Gruppen „Cre-“ und „Cre+“ in Diagrammen dargestellt.

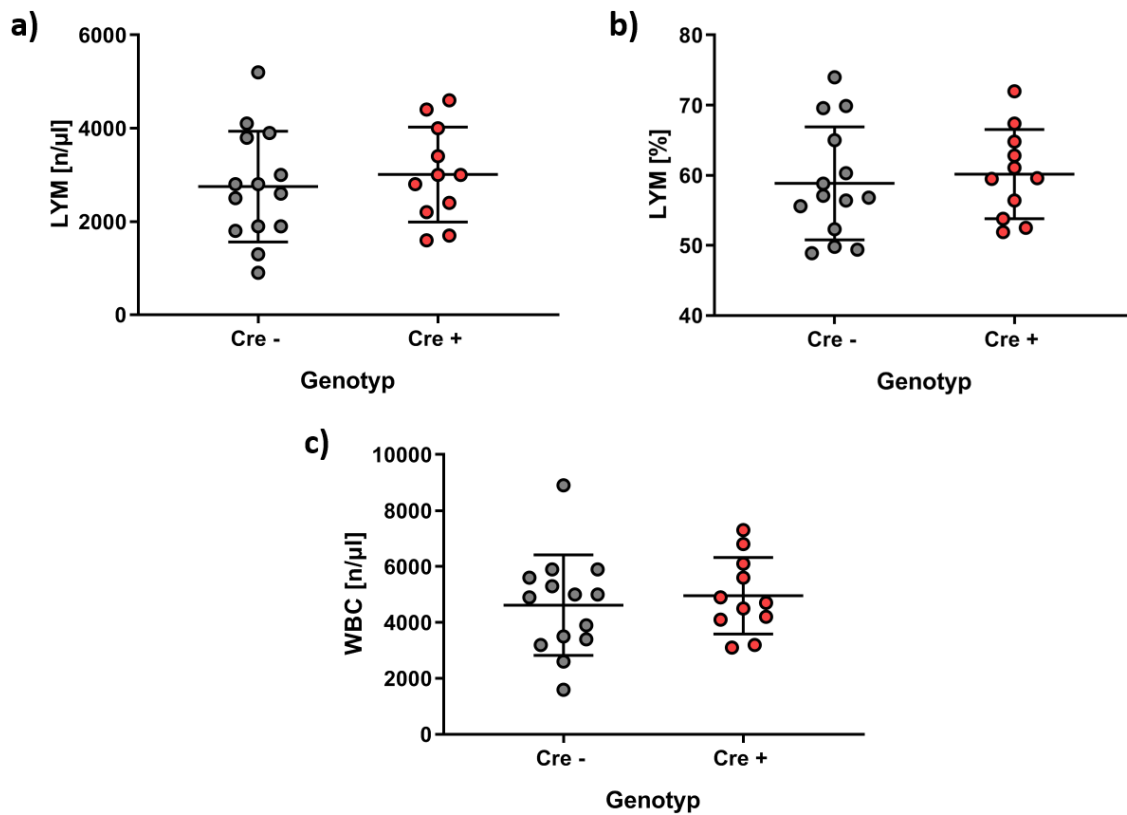


Abbildung 25: Blutbild der weiblichen und männlichen Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induzierten SHT - Leukozyten

Verteilung von **a)** Lymphozytenanzahl (LYM) in [n/µl], **b)** Lymphozytenanteil (LYM) in [%] und **c)** Leukozytenanzahl (WBC) in [n/µl] der weiblichen und männlichen Versuchstiere in einer geschlechtergemischten Darstellung auf der y-Achse innerhalb der beiden Gruppen des Genotyps „Cre-“ und „Cre+“ auf der x-Achse.

Auch hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Wildtyp- und Knockouttieren (LYM, LYM [%] und WBC).

Die Mittelwerte und Standardfehler werden in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

Leukozyten	WT ♀/♂	KO ♀/♂
LYM	2750 ± 316,9 n/µl	3009 ± 307,0 n/µl
	Nicht signifikant	
LYM [%]	58,85 ± 2,15 %	60,16 ± 1,92 %
	Nicht signifikant	
WBC	4621 ± 479,6 n/µl	4955 ± 412,6 n/µl
	Nicht signifikant	

Tabelle 26: Blutbild der weiblichen und männlichen Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induzierten SHT - MW ± SEM der Leukozyten

In Zusammenschau dieser Ergebnisse blieb 6 Stunden nach dem CCI, wie bei den nativen Tieren zuvor, das Blutbild ohne signifikanten Unterschied.

4.3.4 Thrombozytenaggregationsfähigkeit/Multiplate® Analyzer

Es wurde überprüft, wie sich die Thrombozytenaggregationsfähigkeit 6 Stunden nach dem CCI entwickelte. Durch ein SHT werden viele molekulare Mechanismen in Gang gesetzt, welche sich auch auf die primäre Hämostase auswirken und zu einer Hyperkoagulabilität der Thrombozyten führen können (s. Abschnitt 2.6). Dieser Zustand der Hyperkoagulabilität sollte durch den Knockout des Zuckertransporters auf den Thrombozyten verhindert werden, da ihnen damit weniger Energie zur Verfügung stehen sollte. Damit wurde beabsichtigt, dass die im Zustand des SHT verminderte Thrombozytenaggregationsfähigkeit zu einem geringeren sekundären Schaden führt und neuroprotektiv wirkt.

Entscheidend für die Beurteilung der Thrombozytenaggregationsfähigkeit ist der Wert der AUC, da sich dieser aus den beiden anderen Werten Aggregation und Velocity zusammensetzt. Daher wird im Folgenden nur die AUC dargestellt.

Da sich bisher durch den Knockout die Thrombozytenaggregationsfähigkeit nur bei den männlichen nativen Tieren signifikant unterschied, fand die Auswertung in geschlechtergemischten Gruppen und jeweils in geschlechterdifferenzierten Gruppen statt.

Außerdem wurde überprüft, inwieweit sich die Geschlechter innerhalb der Gruppe der Knockouttiere bzw. der Wildtypiere unterscheiden. Damit sollte eine mögliche geschlechterunterschiedliche Wirkung des Knockouts aufgedeckt werden.

Zunächst werden die Ergebnisse der AUC des **Messkanal 1** in einer geschlechtergemischten Darstellung und jeweils differenziert nach den Geschlechtern anhand von Diagrammen gezeigt.

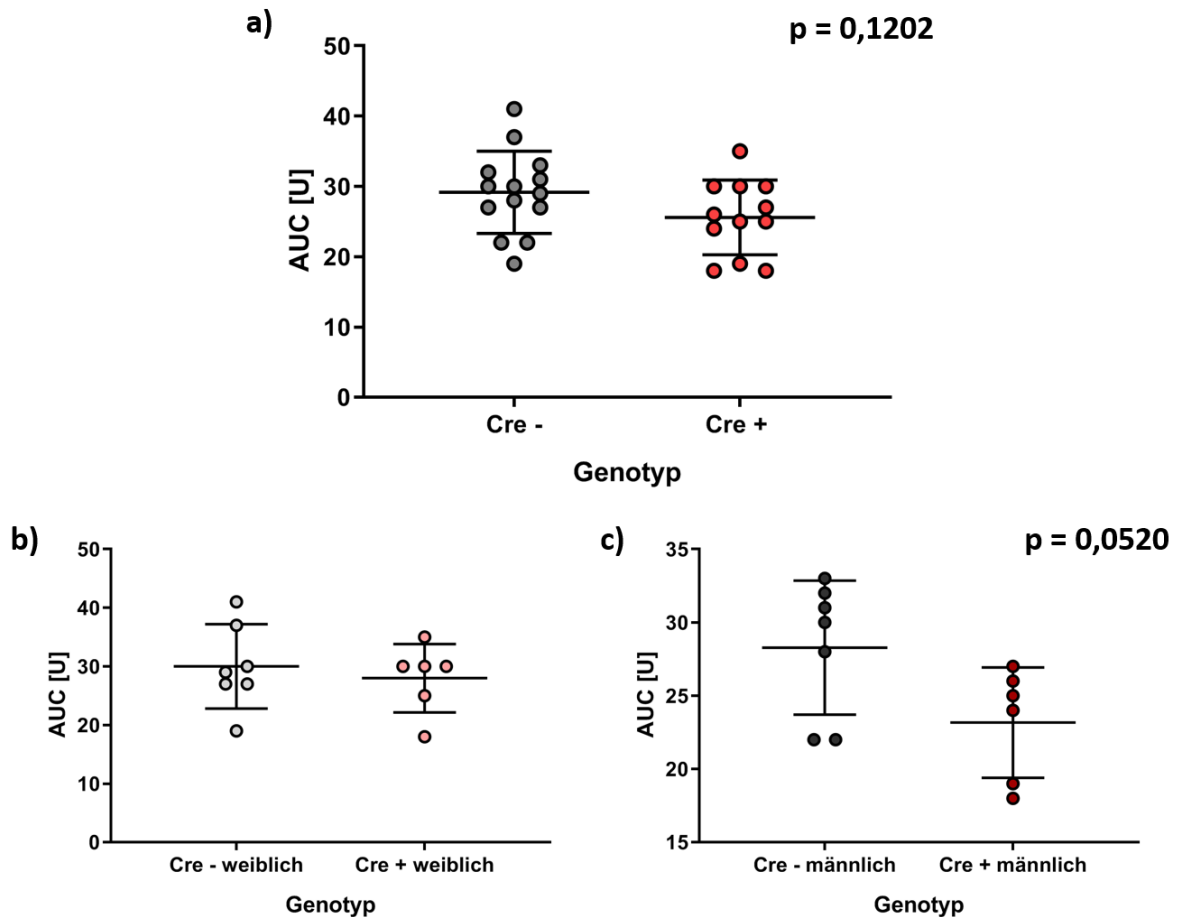


Abbildung 26: Thrombozytenaggregationsfähigkeit der Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT – AUC Messkanal 1

Verteilung der AUC in [U] der Versuchstiere auf der y-Achse innerhalb der beiden Gruppen des Genotyps „Cre-“ und „Cre+“ auf der x-Achse. In Diagramm **a)** ist eine geschlechtergemischte Darstellung gezeigt. In Diagramm **b)** sind nur die Weibchen und in **c)** nur die Männchen dargestellt.

Bei der AUC im Messkanal 1 zeigten sich keine signifikanten Unterschiede, jedoch ergab sich sowohl bei der geschlechtergemischten Gruppe ($p = 0,1202$) als auch bei der geschlechterdifferenzierten Gruppe der Männchen ($p = 0,0520$) die Tendenz, dass die Knockouttiere einen niedrigeren Wert der AUC hatten als die Wildtypiere. Dies spiegelte sich vor allem bei den männlichen Tieren wider.

Nachfolgend werden die Ergebnisse der AUC des **Messkanal 2** in einer geschlechtergemischten Darstellung und jeweils differenziert nach den Geschlechtern in Diagrammform dargestellt.

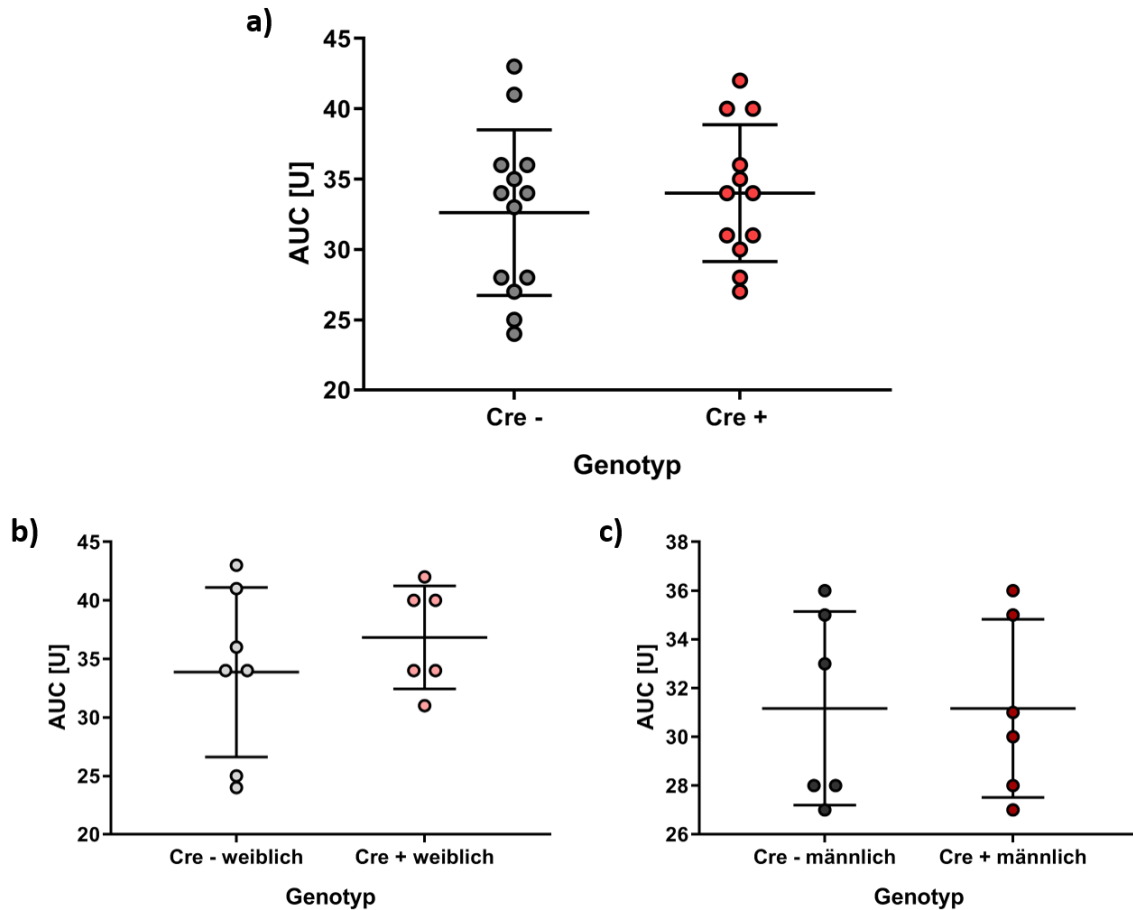


Abbildung 27: Thrombozytenaggregationsfähigkeit der Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT – AUC Messkanal 2

Verteilung der AUC in [U] der Versuchstiere auf der y-Achse innerhalb der beiden Gruppen des Genotyps „Cre-“ und „Cre+“ auf der x-Achse. In Diagramm **a)** ist eine geschlechtergemischte Darstellung gezeigt. In Diagramm **b)** sind nur die Weibchen und in **c)** nur die Männchen dargestellt.

Bei allen Vergleichen der Wildtyp- mit den Knockouttieren zeigten sich bei der AUC im Messkanal 2 keine signifikanten Unterschiede. Damit bestätigte sich das Ergebnis aus dem Messkanal 1 nicht.

Zuletzt werden die Ergebnisse der AUC aus **Messkanal 1** und **2** jeweils geschlechterdifferenziert innerhalb der Gruppe der Knockout- bzw. der Wildtypiere in Diagrammen dargestellt.

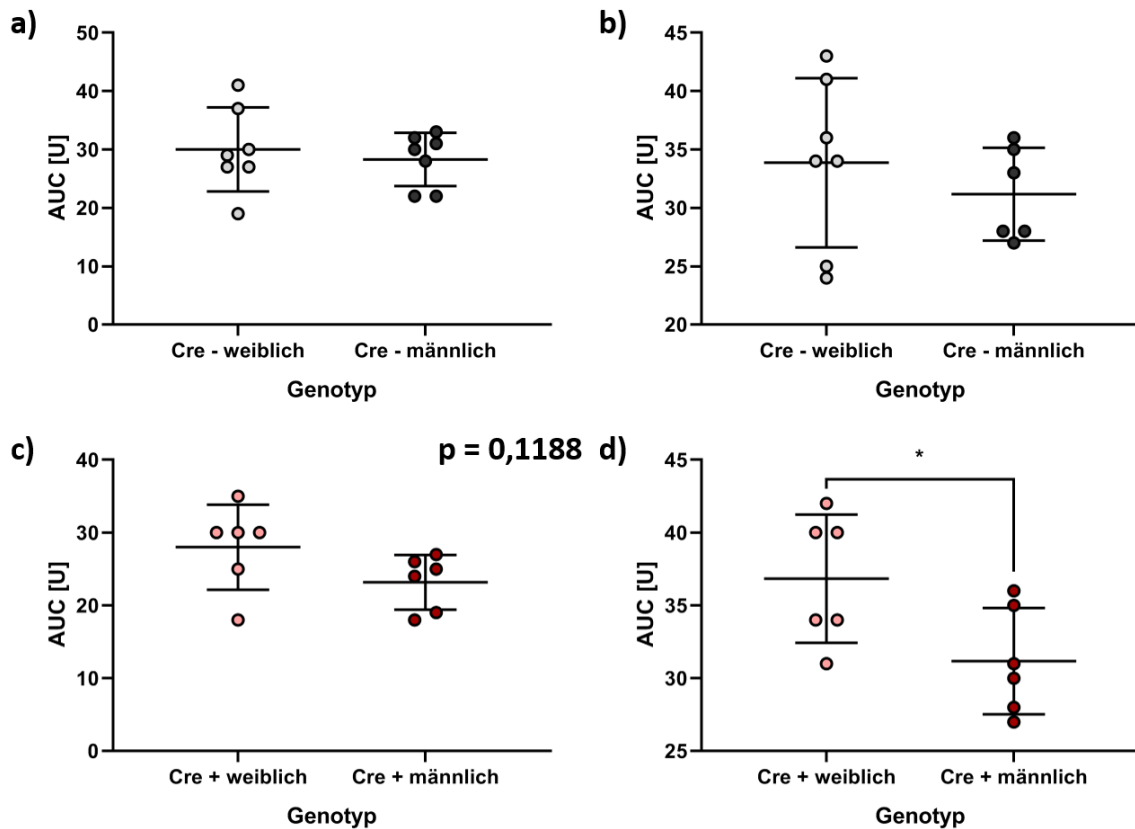


Abbildung 28: Thrombozytenaggregationsfähigkeit der Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT – AUC Messkanal 1 und 2

Gezeigt ist die Verteilung der AUC in [U] der Versuchstiere auf der y-Achse. Oben in den Diagrammen **a)** AUC Messkanal 1 und **b)** AUC Messkanal 2 sind die beiden Gruppen des Genotyps „Cre- weiblich“ und „Cre- männlich“ auf der x-Achse (Vergleich der Geschlechter in der Gruppe der Wildtypiere) und unten in den Diagrammen **c)** AUC Messkanal 1 und **d)** AUC Messkanal 2 sind die beiden Gruppen des Genotyps „Cre+ weiblich“ und „Cre+ männlich“ auf der x-Achse (Vergleich der Geschlechter innerhalb der Gruppe der Knockouttiere) dargestellt.

Die geschlechterdifferenzierte Auswertung innerhalb der Gruppe der Wildtypiere bzw. der Knockouttiere zeigte für die AUC in Messkanal 1 und 2 bei den Wildtypieren keine signifikanten Unterschiede.

Bei den Knockouttieren hingegen zeigten sich im Messkanal 1 tendenziell ($p = 0,1188$) und im Messkanal 2 signifikant ($p = 0,0357$) niedrigere Werte der AUC bei den Männchen im Vergleich zu den Weibchen.

Die Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte können aus der folgenden Tabelle entnommen werden.

		AUC 1		AUC 2	
Geschlechter gemischt	WT ♀/♂	29,14 ± 1,57 U	Tendenziell p = 0,1202	32,62 ± 1,64 U	Nicht signifikant
	KO ♀/♂	25,58 ± 1,54 U		34,00 ± 1,40 U	
Geschlechter getrennt	WT ♀	30,00 ± 2,72 U	Nicht signifikant	33,86 ± 2,74 U	Nicht signifikant
	KO ♀	28,00 ± 2,38 U		36,83 ± 1,80 U	
	WT ♂	28,29 ± 1,73 U	Tendenziell p = 0,0520	31,17 ± 1,62 U	Nicht signifikant
	KO ♂	23,17 ± 1,54 U		31,17 ± 1,49 U	
Genotyp Geschlechter getrennt	WT ♀	30,00 ± 2,72 U	Nicht signifikant	33,86 ± 2,74 U	Nicht signifikant
	WT ♂	28,29 ± 1,73 U		31,17 ± 1,62 U	
	KO ♀	28,00 ± 2,38 U	Tendenziell p = 0,1188	36,83 ± 1,80 U	Signifikant p = 0,0357
	KO ♂	23,17 ± 1,54 U		31,17 ± 1,49 U	

Tabelle 27: Thrombozytenaggregationsfähigkeit der Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT – MW ± SEM der AUC Messkanal 1 und 2

Abschließend ergab sich damit in Messkanal 1 die Tendenz, dass die Knockouttiere niedrigere Werte bei der AUC hatten als die Wildtypiere, vor allem jedoch die männlichen Knockouttiere. Außerdem zeigte sich, dass bei den Knockouttieren ein Unterschied zwischen den Geschlechtern vorlag, während dies bei den Wildtypieren nicht der Fall war.

Zusammengefasst zeigte sich damit für die Thrombozytenaggregationsfähigkeit, dass diese bei den Knockouttieren tendenziell schwächer als bei den Wildtypieren war. Dieser Unterschied zeigte sich jedoch verstärkt bei den männlichen Tieren und weniger bei den weiblichen Tieren. Zusätzlich ergab sich bei den geschlechterdifferenzierten Analysen innerhalb der Wildtyp- bzw. der Knockouttiergruppe, dass es durch den Knockout zu einem Geschlechterunterschied bei der Thrombozytenaggregationsfähigkeit kam.

Die Ergebnisse verhielten sich damit gegensätzlich zum Ergebnis der besseren Thrombozytenaggregationsfähigkeit der nativen männlichen Knockouttiere. Aber auch bei den Versuchen mit den nativen Tieren zeigten sich nur bei den Männchen Unterschiede zwischen den Knockout- und Wildtypieren.

4.3.5 Schadensvolumenanalyse

Die Schadensvolumenanalyse sollte überprüfen, ob der Knockout zu einem kleineren Schadensvolumen im Vergleich zu den Wildtyptieren führen konnte und somit ob auch die tendenziell verminderte Thrombozytenaggregationsfähigkeit neuroprotektive Wirkung hatte.

Aufgrund der bisher gezeigten Unterschiede im Geschlecht wurden auch bei der Schadensvolumenanalyse die Ergebnisse der Wildtyp- und Knockouttiere nicht nur geschlechtergemischt miteinander verglichen, sondern auch nach dem Geschlecht differenziert. Zusätzlich wurden ebenfalls in den Gruppen der Wildtypiere bzw. der Knockouttiere die Männchen mit den Weibchen verglichen.

Zunächst werden in Abbildungen 29 das **Kontusionsvolumen prozentual zur ipsilateralen Hemisphäre** in einer geschlechtergemischten Darstellung und jeweils differenziert nach den Geschlechtern anhand von Diagrammen gezeigt.

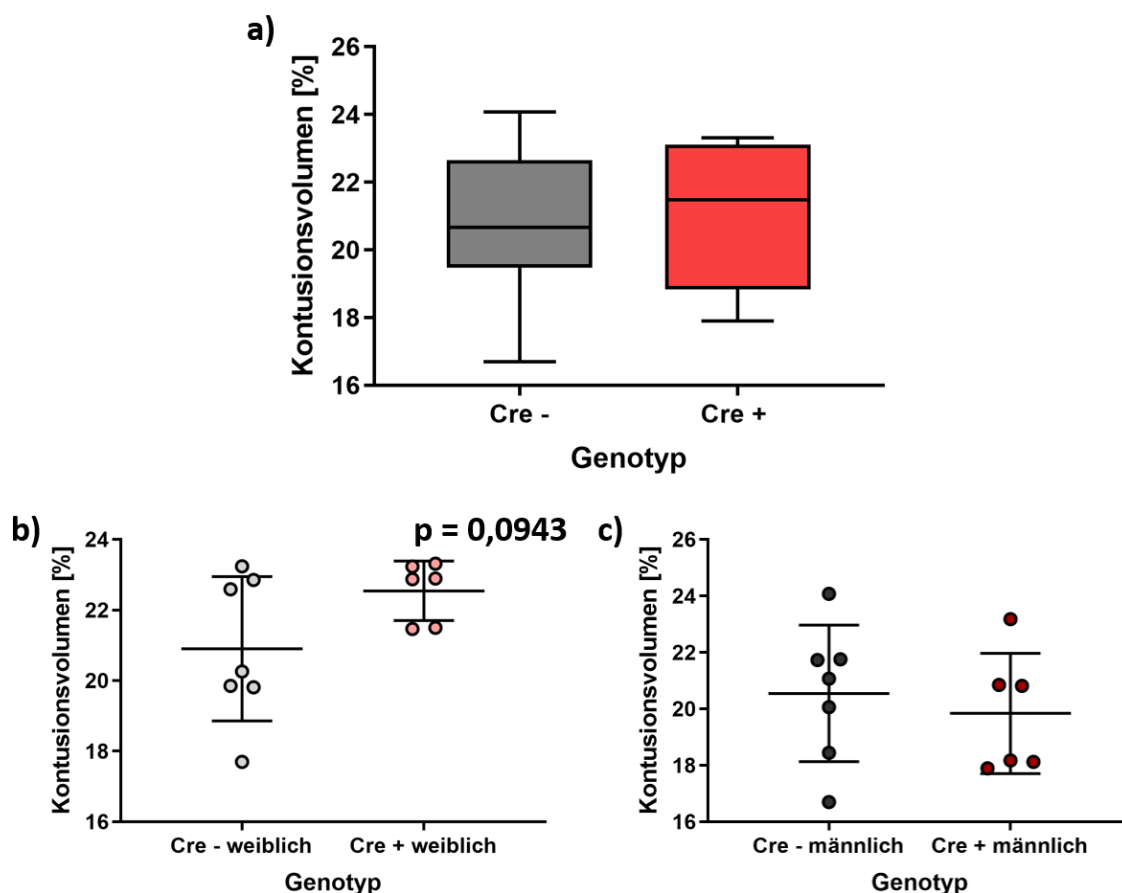


Abbildung 29: Schadensvolumenanalyse der Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT – Kontusionsvolumen prozentual zur ipsilateralen Hemisphäre

Verteilung des Kontusionsvolumens prozentual zur ipsilateralen Hemisphäre in [%] der Versuchstiere auf der y-Achse innerhalb der beiden Gruppen des Genotyps „Cre-“ und „Cre+“ auf der x-Achse. In

Diagramm **a)** ist eine geschlechtergemischte Darstellung gezeigt. In Diagramm **b)** sind nur die Weibchen und in **c)** nur die Männchen dargestellt.

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Wildtyp- und Knockouttieren. Bei den weiblichen Tieren ergab sich jedoch die Tendenz ($p = 0,0943$), dass die Knockouttiere ein größeres Volumen hatten als die Wildtyptiere.

In Abbildung 30 wird das Kontusionsvolumen prozentual zur ipsilateralen Hemisphäre geschlechterdifferenziert innerhalb der Gruppe der Knockouttiere bzw. der Wildtyptiere in Diagrammform dargestellt.

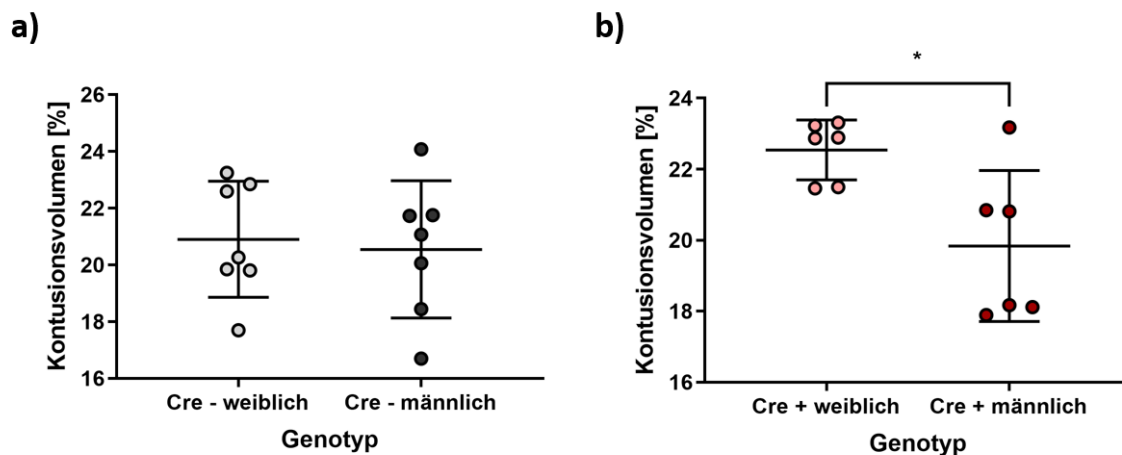


Abbildung 30: Schadensvolumenanalyse der Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT – Kontusionsvolumen prozentual zur ipsilateralen Hemisphäre

Gezeigt ist die Verteilung des Kontusionsvolumens prozentual zur ipsilateralen Hemisphäre in [%] der Versuchstiere auf der y-Achse. In Diagramm **a)** sind die beiden Gruppen des Genotyps „Cre- weiblich“ und „Cre- männlich“ auf der x-Achse (Vergleich der Geschlechter in der Gruppe der Wildtyptiere) und in Diagramm **b)** die beiden Gruppen des Genotyps „Cre+ weiblich“ und „Cre+ männlich“ auf der x-Achse (Vergleich der Geschlechter innerhalb der Gruppe der Knockouttiere) dargestellt.

Nur bei den Knockouttieren zeigte sich ein geschlechterspezifischer Unterschied, welcher bei den Wildtyptieren jedoch nicht zu finden war. Die männlichen Knockouttiere hatten ein signifikant ($p = 0,0160$) kleineres Volumen als die weiblichen Knockouttiere.

Die jeweiligen Mittelwerte und deren Standardfehler werden in der untenstehenden Tabelle aufgelistet.

		Kontusionsvolumen prozentual zur ipsilateralen Hemisphäre	
Geschlechter gemischt	WT ♀/♂	20,72 ± 0,58 %	Nicht signifikant
	KO ♀/♂	21,19 ± 0,60 %	
Geschlechter getrennt	WT ♀	20,90 ± 0,77 %	Tendenziell p = 0,0943
	KO ♀	22,54 ± 0,34 %	
	WT ♂	20,55 ± 0,91 %	Nicht signifikant
	KO ♂	19,84 ± 0,87 %	
Genotyp Geschlechter getrennt	WT ♀	20,90 ± 0,77%	Nicht signifikant
	WT ♂	20,55 ± 0,91 %	
	KO ♀	22,54 ± 0,34 %	Signifikant p = 0,0160
	KO ♂	19,84 ± 0,87 %	

Tabelle 28: Schadensvolumenanalyse der Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT – MW ± SEM des Kontusionsvolumens prozentual zur ipsilateralen Hemisphäre

So zeigte sich beim Kontusionsvolumen prozentual zur ipsilateralen Hemisphäre kein signifikanter Unterschied zwischen den Wildtyp- und Knockouttieren. Nur bei den weiblichen Tieren zeigte sich die Tendenz zu einem größeren prozentualen Kontusionsvolumen. Es stellte sich jedoch erneut dar, dass der Knockout zu einem Unterschied zwischen den Geschlechtern geführt hat.

In der folgenden Abbildungen 31 werden die Werte der **Ödemkorrektur** in einer geschlechtergemischten Darstellung und jeweils differenziert nach den Geschlechtern anhand von Diagrammen dargestellt.

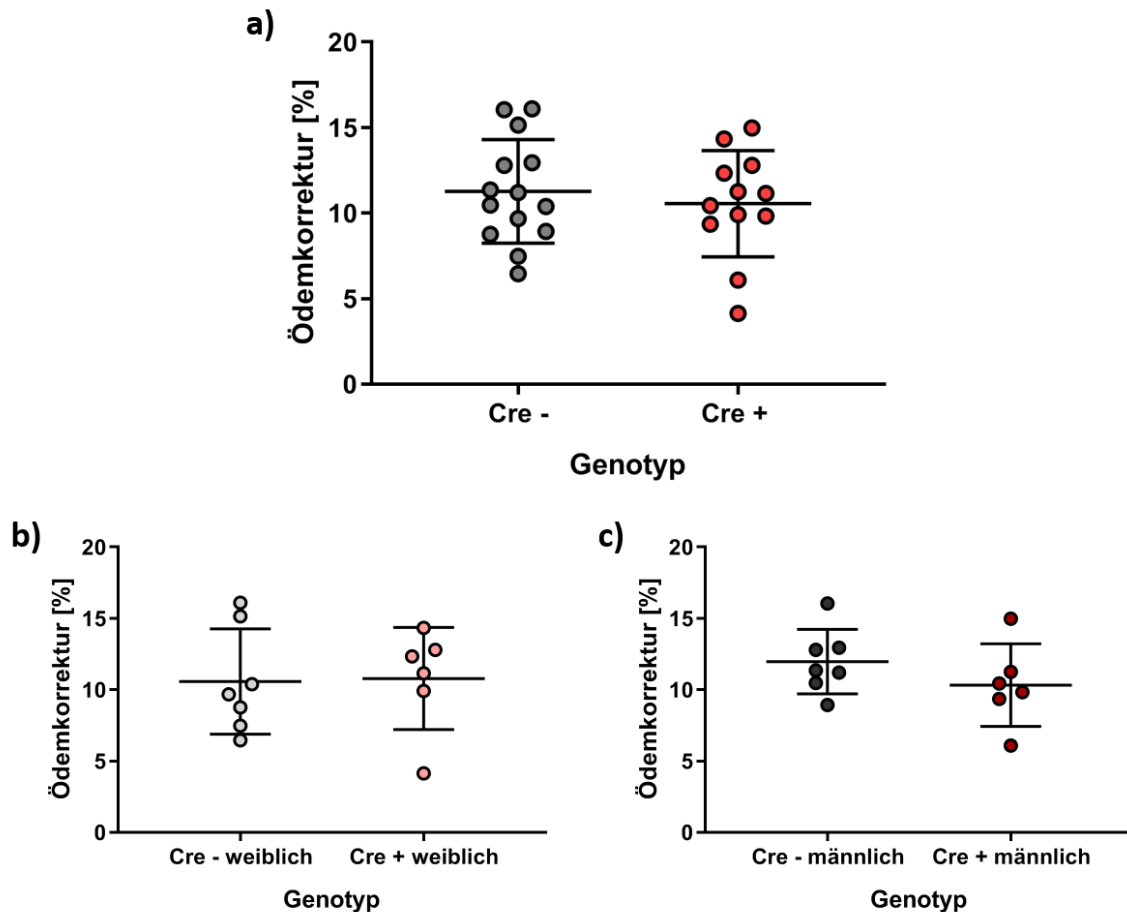


Abbildung 31: Schadensvolumenanalyse der Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT – Ödemkorrektur

Verteilung der Ödemkorrektur in [%] der Versuchstiere auf der y-Achse innerhalb der beiden Gruppen des Genotyps „Cre-“ und „Cre+“ auf der x-Achse. In Diagramm **a)** ist eine geschlechtergemischte Darstellung gezeigt. In Diagramm **b)** sind nur die Weibchen und in **c)** nur die Männchen dargestellt.

Auch bei der Ödemkorrektur zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Wildtyp- und Knockouttieren.

In Abbildung 32 wird die Ödemkorrektur wiederum geschlechterdifferenziert innerhalb der Gruppe der Knockout- bzw. Wildtypiere in Diagrammform dargestellt.

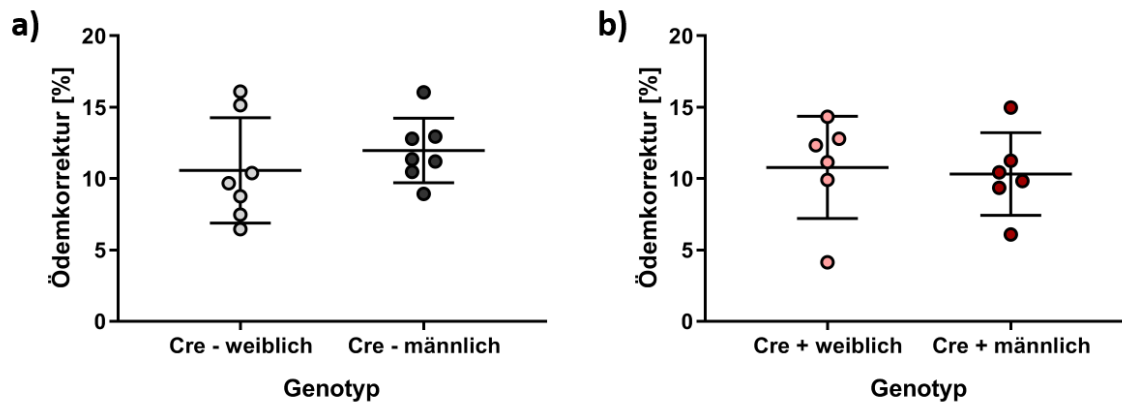


Abbildung 32: Schadensvolumenanalyse der Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT – Ödemkorrektur

Gezeigt ist die Verteilung der Ödemkorrektur in [%] der Versuchstiere auf der y-Achse. In Diagramm **a)** sind die beiden Gruppen des Genotyps „Cre- weiblich“ und „Cre- männlich“ auf der x-Achse (Vergleich der Geschlechter in der Gruppe der Wildtiere) und in Diagramm **b)** die beiden Gruppen des Genotyps „Cre+ weiblich“ und „Cre+ männlich“ auf der x-Achse (Vergleich der Geschlechter innerhalb der Gruppe der Knockouttiere) dargestellt.

Auch bei der geschlechterdifferenzierten Auswertung innerhalb der Gruppe der Knockout- bzw. Wildtypiere zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bei der Ödemkorrektur.

Die jeweiligen Mittelwerte und deren Standardfehler werden in der folgenden Tabelle aufgelistet.

		Ödemkorrektur	
Geschlechter gemischt	WT ♀/♂	11,27 ± 0,81 %	Nicht signifikant
	KO ♀/♂	10,55 ± 0,90 %	
Geschlechter getrennt	WT ♀	10,57 ± 1,40 %	Nicht signifikant
	KO ♀	10,78 ± 1,46 %	
	WT ♂	11,97 ± 0,85 %	Nicht signifikant
	KO ♂	10,32 ± 1,18 %	
Genotyp Geschlechter getrennt	WT ♀	10,57 ± 1,40 %	Nicht signifikant
	WT ♂	11,97 ± 0,85 %	
	KO ♀	10,78 ± 1,46 %	Nicht signifikant
	KO ♂	10,32 ± 1,18 %	

Tabelle 29: Schadensvolumenanalyse der Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT – MW ± SEM der Ödemkorrektur

Zusammengefasst ergab sich damit für die Schadensvolumenanalyse 6 Stunden nach induziertem SHT, dass sich diese bei den Knockouttieren nicht signifikant von den Wildtyptieren unterscheidet. Auch bei den männlichen Tieren stellte sich kein signifikanter Unterschied dar. Die weiblichen Tiere hingegen zeigten teilweise die Tendenz, dass die Knockouttiere größere Kontusionsvolumina hatten als die Wildtyptiere. Somit konnte sich der Unterschied in der tendenziell verminderten Thrombozytenaggregationsfähigkeit bei den Knockouttieren und dabei vor allem bei den männlichen Tieren nicht in der Schadensvolumenanalyse bestätigen.

Andererseits zeigte sich wie auch bei der Analyse der Thrombozytenaggregationsfähigkeit, dass der Knockout eine geschlechterunterschiedliche Wirkung hatte.

4.3.6 Auswertung der immunhistochemischen Färbung von IgG

Mit der immunhistochemischen Färbung von IgG wurde eine weitere Möglichkeit genutzt, um zu überprüfen, welche Auswirkungen der CCI auf die Knockouttiere im Vergleich zu den Wildtyptieren hat.

Die immunhistochemische Färbung von IgG hat eine ähnliche Funktion wie der Dot Blot von IgG, denn auch sie soll die IgG-Extravasation durch die BHS ins geschädigte Hirngewebe darstellen und damit die Ödemformation analysieren. Anders als beim Dot Blot von IgG soll jedoch nicht die quantitative Menge von IgG bestimmt werden, sondern die Fläche der IgG-Extravasation auf den Hirnschnitten und damit indirekt die Größe des Ödems. Somit lässt sich mit der Auswertung der IgG-Extravasation durch die immunhistochemische IgG-Färbung der Knockout neben der Schadensvolumenanalyse mit einer weiteren Untersuchung auf seine neuroprotektive Wirkung untersuchen.

Auch bei der immunhistochemischen Färbung von IgG wurden die Ergebnisse der Wildtyp- und Knockouttiere geschlechtergemischt und nach dem Geschlecht differenziert miteinander verglichen. Zusätzlich wurden ebenfalls in der Gruppe der Wildtyptiere bzw. der Knockouttiere jeweils die Männchen mit den Weibchen verglichen.

Zunächst werden in Abbildungen 33 die Ergebnisse der **absoluten IgG-Extravasation** geschlechtergemischt und jeweils differenziert nach den Geschlechtern anhand von Diagrammen dargestellt.

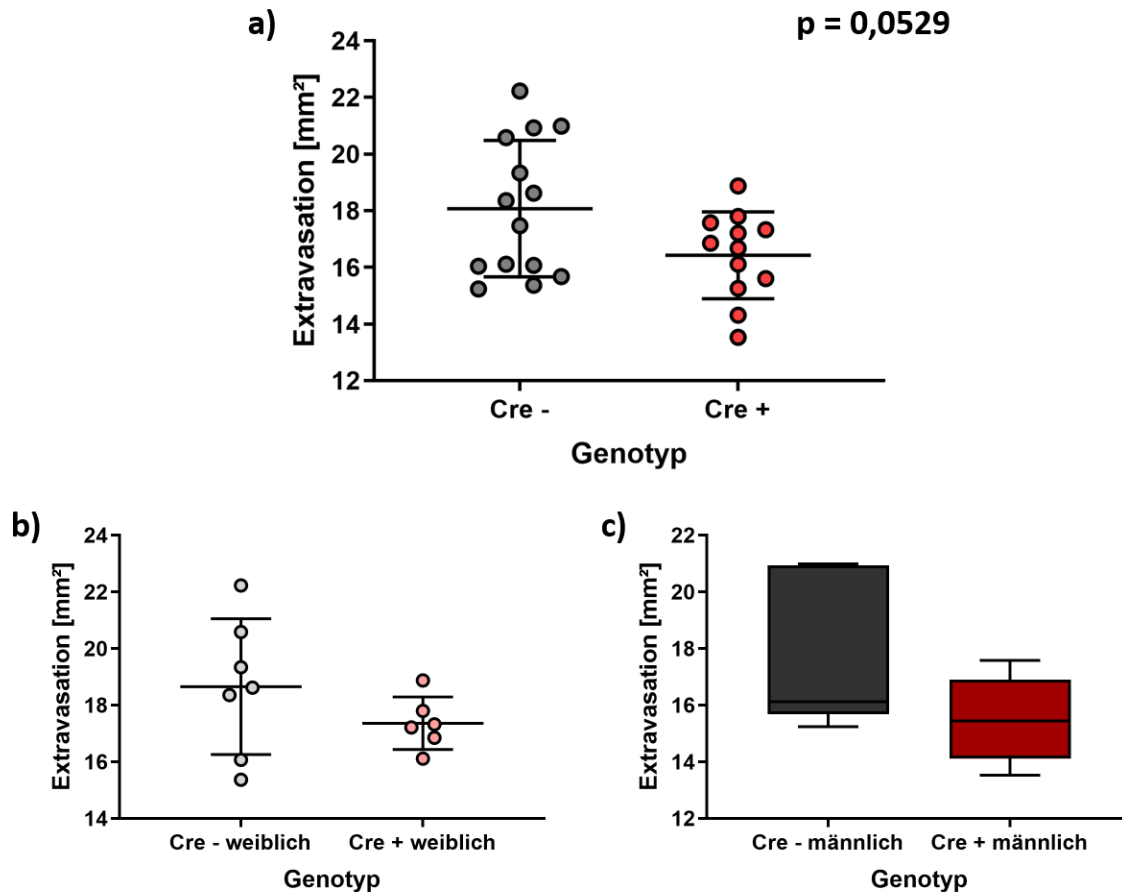


Abbildung 33: Immunhistochemische IgG-Färbung der Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT – absolute IgG-Extravasation

Verteilung der absoluten IgG-Extravasation in [mm²] der Versuchstiere auf der y-Achse innerhalb der beiden Gruppen des Genotyps „Cre-“ und „Cre+“ auf der x-Achse. In Diagramm **a)** ist eine geschlechtergemischte Darstellung gezeigt. In Diagramm **b)** sind nur die Weibchen und in **c)** nur die Männchen dargestellt.

Die IgG-Extravasation zeigte keine signifikanten Unterschiede. Bei der geschlechtergemischten Auswertung ergab sich jedoch die Tendenz ($p = 0,0529$), dass die Knockouttiere eine kleinere Fläche an IgG-Extravasation aufwiesen als die Wildtypiere.

In Abbildung 34 wird die absoluten IgG-Extravasation ebenfalls geschlechterdifferenziert innerhalb der Gruppe der Knockouttiere bzw. der Wildtypiere in Diagrammform dargestellt.

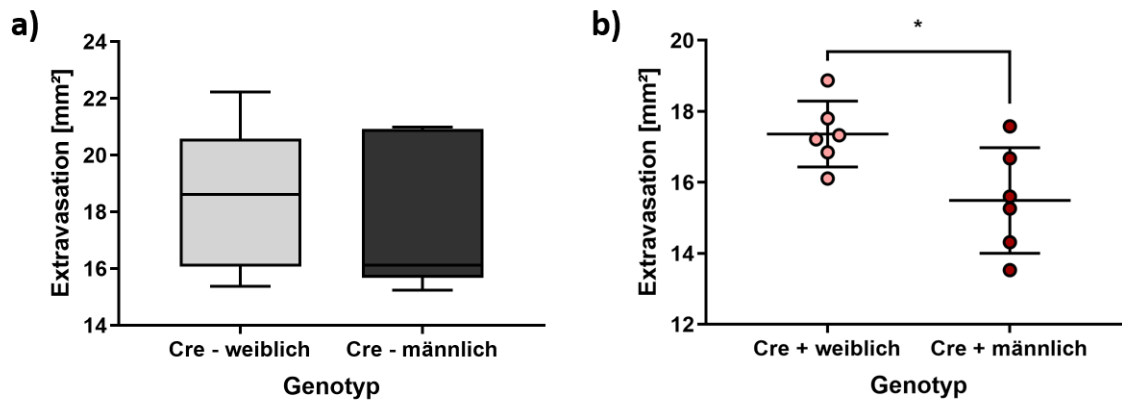


Abbildung 34: Immunhistochemische IgG-Färbung der Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT – absolute IgG-Extravasation

Gezeigt ist die Verteilung der absoluten IgG-Extravasation in [mm²] der Versuchstiere auf der y-Achse. In Diagramm **a)** sind die beiden Gruppen des Genotyps „Cre- weiblich“ und „Cre- männlich“ auf der x-Achse (Vergleich der Geschlechter in der Gruppe der Wildtypiere) und in Diagramm **b)** sind die beiden Gruppen des Genotyps „Cre+ weiblich“ und „Cre+ männlich“ auf der x-Achse (Vergleich der Geschlechter innerhalb der Gruppe der Knockouttiere) dargestellt.

Bei der geschlechterdifferenzierten Auswertung der Gruppe der Knockouttiere bzw. der Wildtypiere zeigte sich wie schon zuvor bei der Thrombozytenaggregationsfähigkeit und der Schadensvolumenanalyse, dass es bei den Knockouttieren einen geschlechterspezifischen Unterschied gibt, welcher sich bei den Wildtypieren jedoch nicht bestätigte. Die männlichen Knockouttiere hatten eine signifikant ($p = 0,0260$) kleinere Fläche an IgG-Extravasation als die weiblichen Knockouttiere.

Die Mittelwerte und deren Standardfehler werden in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

		Absolute IgG-Extravasation	
Geschlechter gemischt	WT ♀/♂	18,07 ± 0,64 mm ²	Tendenziell p = 0,0529
	KO ♀/♂	16,43 ± 0,44 mm ²	
Geschlechter getrennt	WT ♀	18,65 ± 0,90 mm ²	Nicht signifikant
	KO ♀	17,36 ± 0,38 mm ²	
	WT ♂	17,49 ± 0,93 mm ²	Nicht signifikant
	KO ♂	15,49 ± 0,61 mm ²	
Genotyp Geschlechter getrennt	WT ♀	18,65 ± 0,91 mm ²	Nicht signifikant
	WT ♂	17,49 ± 0,93 mm ²	
	KO ♀	17,36 ± 0,38 mm ²	Signifikant P = 0,0260
	KO ♂	15,49 ± 0,61 mm ²	

Tabelle 30: Immunhistochemische IgG-Färbung der Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT – MW ± SEM der absolute IgG-Extravasation

Damit zeigte sich im Gegensatz zur Schadensvolumenanalyse bei den Knockouttieren eine tendenziell kleinere Fläche der IgG-Extravasation als bei den Wildtypieren. Außerdem bestätigte sich zum wiederholten Mal, dass der Knockout geschlechterunterschiedliche Wirkung hatte.

Nachfolgend wird die Größe der angefärbten **Gesamtfläche des Gehirns** in Diagrammen dargestellt.

In Abbildung 35 werden die Diagramme in geschlechtergemischter Form und jeweils differenziert nach den Geschlechtern dargestellt.

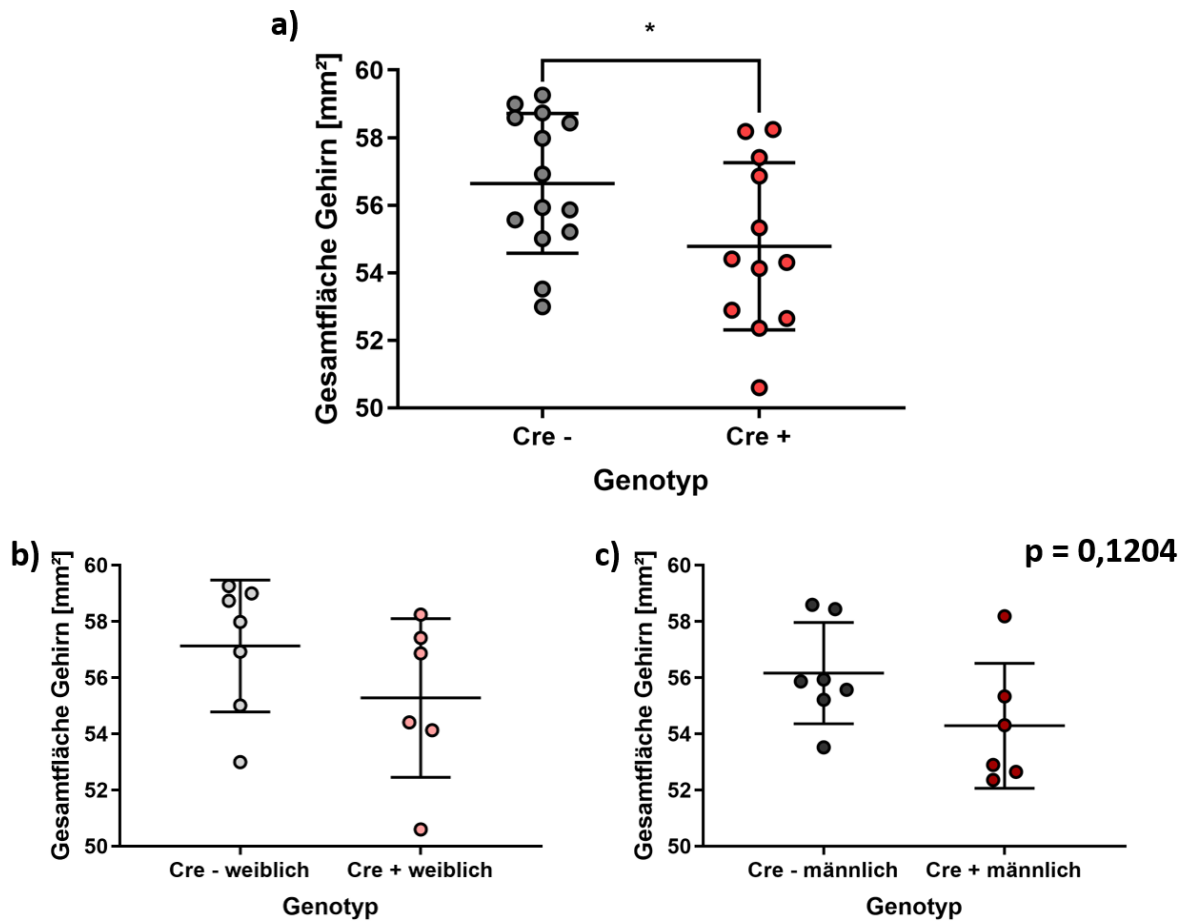


Abbildung 35: Immunhistochemische IgG-Färbung der Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT - Gesamtfläche Gehirn

Verteilung der Gesamtfläche des Gehirns in [mm²] der Versuchstiere auf der y-Achse innerhalb der beiden Gruppen des Genotyps „Cre-“ und „Cre+“ auf der x-Achse. In Diagramm **a)** ist eine geschlechtergemischte Darstellung gezeigt. In Diagramm **b)** sind nur die Weibchen und in **c)** nur die Männchen dargestellt.

Die Knockouttiere zeigten bei der geschlechtergemischten Auswertung einen signifikant ($p = 0,0473$) niedrigeren Wert als die Wildtypiere. Die geschlechterdifferenzierte Auswertung ergab bei den männlichen Knockouttiere tendenziell ($p = 0,1204$) niedrigere Werte als bei den männlichen Wildtypiere. Dieser Unterschied zeigte sich bei den weiblichen Tieren nicht.

In Abbildung 36 wird die angefärbte Gesamtfläche des Gehirns erneut geschlechterdifferenziert innerhalb der Gruppe der Knockouttiere bzw. der Wildtypiere in Diagrammform dargestellt.

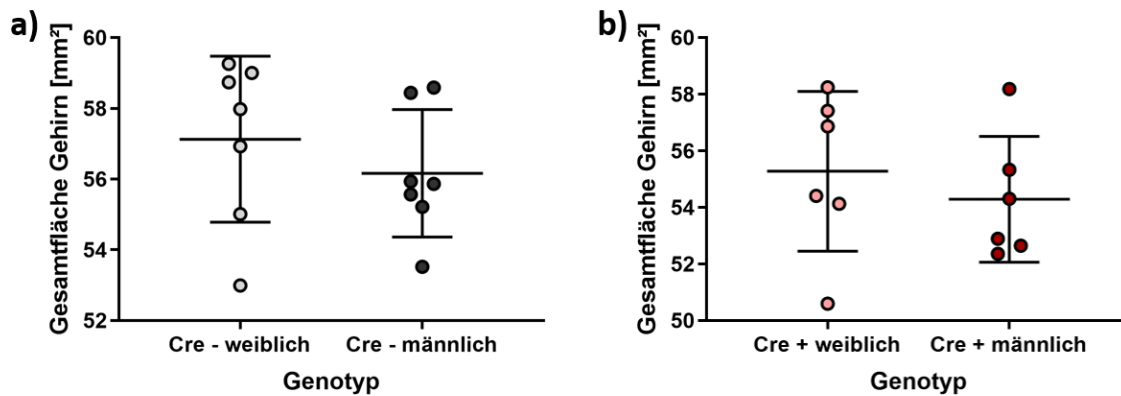


Abbildung 36: Immunhistochemische IgG-Färbung der Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT - Gesamtfläche Gehirn

Gezeigt ist die Verteilung der Gesamtfläche des Gehirns in [%] der Versuchstiere auf der y-Achse. In Diagramm **a)** sind die beiden Gruppen des Genotyps „Cre- weiblich“ und „Cre- männlich“ auf der x-Achse (Vergleich der Geschlechter in der Gruppe der Wildtypiere) und in Diagramm **b)** sind die beiden Gruppen des Genotyps „Cre+ weiblich“ und „Cre+ männlich“ auf der x-Achse (Vergleich der Geschlechter innerhalb der Gruppe der Knockouttiere) dargestellt.

Bei den Werten der geschlechterdifferenzierten Auswertung der Gruppe der Knockout- bzw. Wildtypiere ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

Die jeweiligen Mittelwerte und Standardfehler werden in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

		Gesamtfläche Gehirn	
Geschlechter gemischt	WT ♀/♂	56,64 ± 0,55 mm ²	Signifikant p = 0,0473
	KO ♀/♂	54,78 ± 0,72 mm ²	
Geschlechter getrennt	WT ♀	57,13 ± 0,89 mm ²	Nicht signifikant
	KO ♀	55,28 ± 1,15 mm ²	
	WT ♂	56,16 ± 0,68 mm ²	Tendenziell p = 0,1204
	KO ♂	54,29 ± 0,91 mm ²	
Genotyp Geschlechter getrennt	WT ♀	57,13 ± 0,89 mm ²	Nicht signifikant
	WT ♂	56,16 ± 0,68 mm ²	
	KO ♀	55,28 ± 1,15 mm ²	Nicht signifikant
	KO ♂	54,29 ± 0,91 mm ²	

Tabelle 31: Immunhistochemische IgG-Färbung der Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT - MW ± SEM der Gesamtfläche des Gehirns

Damit konnte für die Gesamtfläche des Gehirns ein signifikant kleinerer Wert bei den Knockouttieren als den Wildtyptieren gezeigt werden, dieser war jedoch stärker auf die männlichen Tiere als auf die weiblichen Tiere zurückzuführen.

Zusammengefasst ergab die immunhistochemische IgG-Färbung anders als die Schadensvolumenanalyse, dass die Knockouttiere eine tendenziell geringere IgG-Extravasation aufwiesen als die Wildtyptiere. Auch hier zeigte sich dies tendenziell stärker bei den männlichen als bei den weiblichen Tieren.

Zusätzlich bestätigte sich teilweise, dass sich der Geschlechterunterschied nur bei den Knockout- und nicht bei den Wildtyptieren darstellte.

Damit stimmten die Ergebnisse teilweise mit denen der Thrombozytenaggregationsfähigkeit überein und weisen damit auf eine gewisse neuroprotektive Wirkung des Knockouts hin.

4.3.7 RNA-Analysen

Nachdem sich die Neuroinflammation zwischen den Knockout- und Wildtyptieren bei den nativen Tieren nicht signifikant unterschied, sollte nun untersucht werden, wie sich dies bei den Knockout- bzw. Wildtyptieren 6 Stunden nach induziertem SHT verhielt. Dazu wurde erneut die mRNA-Expression von TNF- α und IL-1 β bestimmt.

Auch bei den Ergebnissen der RNA-Analysen wurden die Wildtyp- und Knockouttiere zum einen in geschlechtergemischten Gruppen miteinander verglichen und zum anderen auch nach dem Geschlecht differenziert.

Außerdem wurden die männlichen mit den weiblichen Tieren auch innerhalb der Gruppe der Knockouttieren bzw. der Wildtyptiere miteinander verglichen.

Zunächst werden in den Abbildungen 37 und 38 die Ergebnisse der mRNA-Expression von **IL-1 β** in Diagrammform gezeigt.

In Abbildung 37 wird diese in geschlechtergemischter Form und jeweils differenziert nach den Geschlechtern dargestellt.

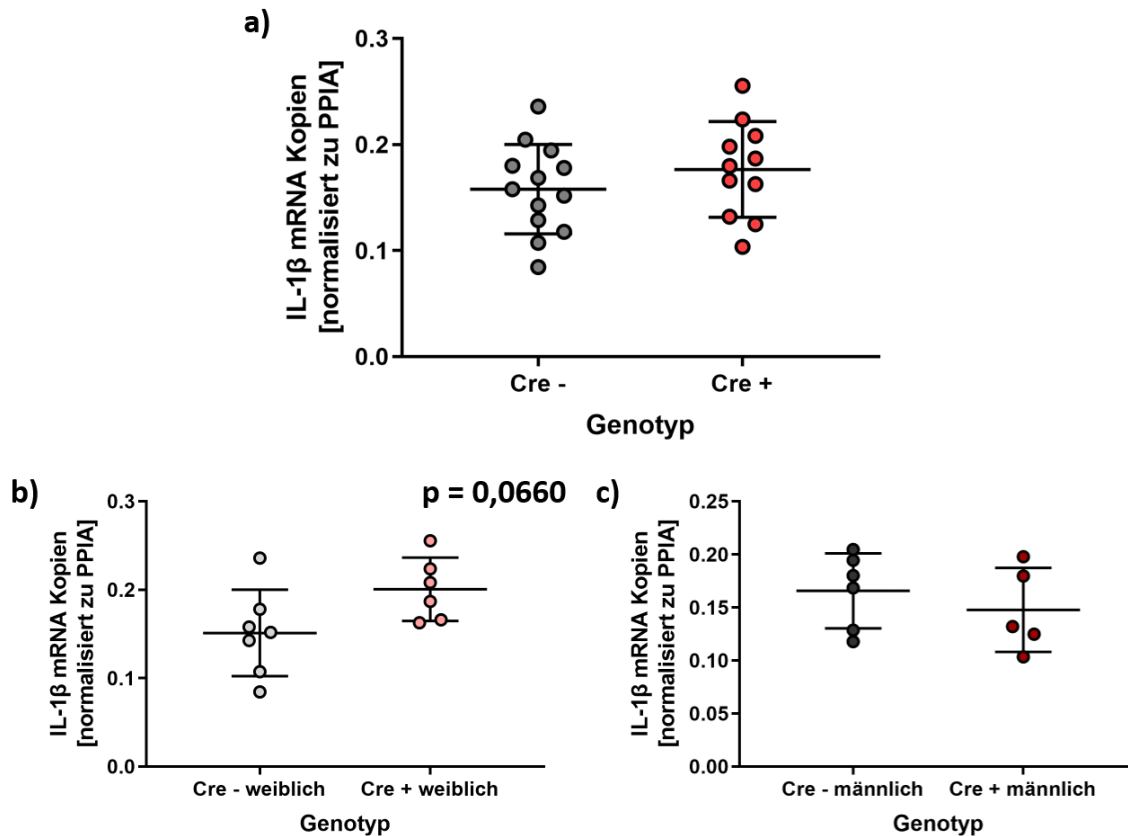


Abbildung 37: PCR der Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT - mRNA-Expression von IL-1 β

Verteilung der mRNA-Expression von IL-1 β der Versuchstiere auf der y-Achse innerhalb der beiden Gruppen des Genotyps „Cre-“ und „Cre+“ auf der x-Achse. In Diagramm **a)** ist eine geschlechtergemischte Darstellung gezeigt. In Diagramm **b)** sind nur die Weibchen und in **c)** nur die Männchen dargestellt.

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Wildtyp- und Knockouttieren. Nur bei der geschlechterdifferenzierten Auswertung ergaben sich bei den weiblichen Knockouttieren tendenziell ($p = 0,0660$) höhere Werte der mRNA-Expression von IL-1 β als bei den weiblichen Wildtyptieren.

In Abbildung 38 wird die mRNA-Expression von IL-1 β wiederum geschlechterdifferenziert innerhalb der Gruppe der Knockouttiere bzw. der Wildtyptiere in Diagrammform dargestellt.

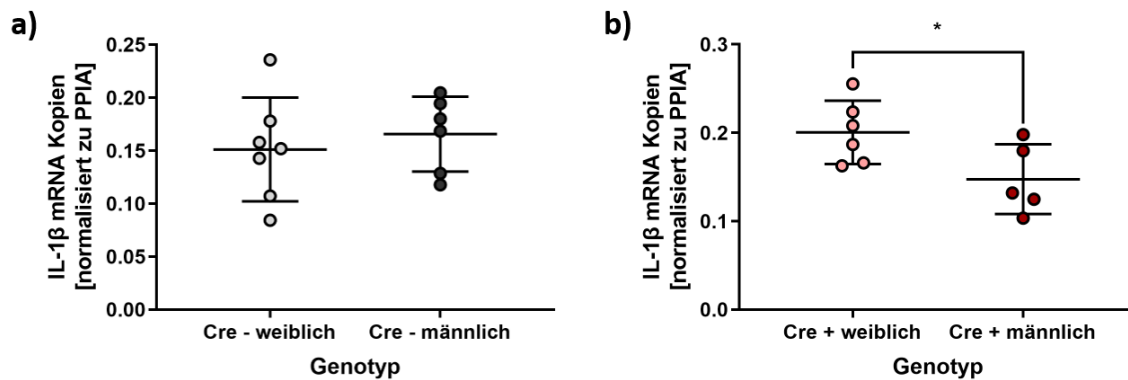


Abbildung 38: PCR der Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT - mRNA-Expression von IL-1β

Gezeigt ist die Verteilung der mRNA-Expression von IL-1β der Versuchstiere auf der y-Achse. In Diagramm a) sind die beiden Gruppen des Genotyps „Cre- weiblich“ und „Cre- männlich“ auf der x-Achse (Vergleich der Geschlechter in der Gruppe der Wildtypiere) und in Diagramm b) sind die beiden Gruppen des Genotyps „Cre+ weiblich“ und „Cre+ männlich“ auf der x-Achse (Vergleich der Geschlechter innerhalb der Gruppe der Knockouttiere) dargestellt.

Die geschlechterdifferenzierte Auswertung innerhalb der Gruppen der Knockouttiere bzw. der Wildtypiere zeigte zum wiederholten Mal, dass die männlichen Knockouttiere signifikant ($p = 0,0448$) niedrigere Werte als die weiblichen Knockouttiere hatten.

Die jeweiligen Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte werden in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

		mRNA-Expression von IL-1β	
Geschlechter gemischt	WT ♀/♂	$15,78 \times 10^{-2} \pm 11,69 \times 10^{-3}$	Nicht signifikant
	KO ♀/♂	$17,64 \times 10^{-2} \pm 13,59 \times 10^{-3}$	
Geschlechter getrennt	WT ♀	$15,11 \times 10^{-2} \pm 18,51 \times 10^{-3}$	Tendenziell $p = 0,0660$
	KO ♀	$20,05 \times 10^{-2} \pm 14,62 \times 10^{-3}$	
	WT ♂	$16,57 \times 10^{-2} \pm 14,41 \times 10^{-3}$	Nicht signifikant
	KO ♂	$14,76 \times 10^{-2} \pm 17,71 \times 10^{-3}$	
Genotyp Geschlechter getrennt	WT ♀	$15,11 \times 10^{-2} \pm 18,51 \times 10^{-3}$	Signifikant $p = 0,0448$
	WT ♂	$16,57 \times 10^{-2} \pm 14,41 \times 10^{-3}$	
	KO ♀	$20,05 \times 10^{-2} \pm 14,62 \times 10^{-3}$	Nicht signifikant
	KO ♂	$14,76 \times 10^{-2} \pm 17,71 \times 10^{-3}$	

Tabelle 32: PCR der Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT - MW \pm SEM der mRNA-Expression von IL-1β

Damit ergab sich für die mRNA-Expression von IL-1 β kein signifikanter Unterschied zwischen den Knockout- und Wildtyptieren. Nur bei den weiblichen Knockouttieren ergaben sich tendenziell höhere Werte. Außerdem wurde gezeigt, dass sich der Geschlechterunterschied nur bei den Knockout- und nicht den Wildtyptieren darstellte.

Abschließend werden die Ergebnisse der mRNA-Expression von **TNF- α** in den Abbildungen 39 und 40 in Diagrammform gezeigt.

In Abbildung 39 wird es in geschlechtergemischter Form und jeweils differenziert nach den Geschlechtern dargestellt.

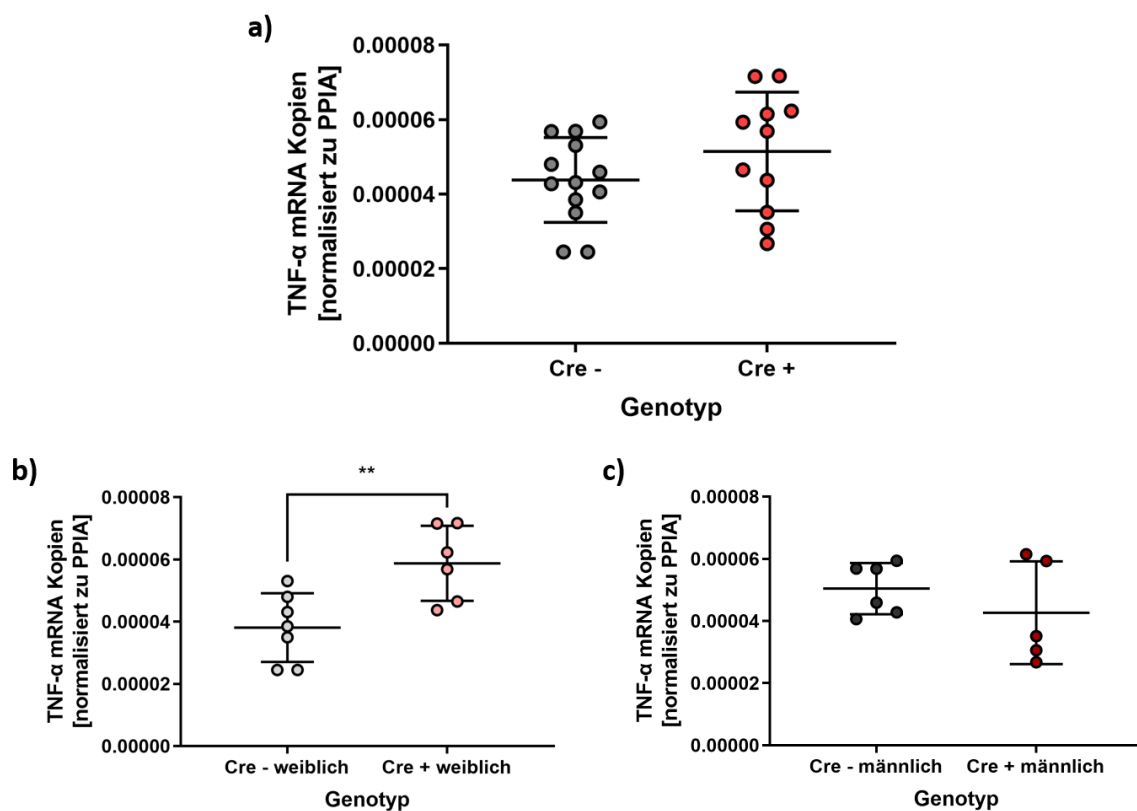


Abbildung 39: PCR der Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT - mRNA-Expression von TNF- α

Verteilung der mRNA-Expression von TNF- α der Versuchstiere auf der y-Achse innerhalb der beiden Gruppen des Genotyps „Cre-“ und „Cre+“ auf der x-Achse. In Diagramm **a)** ist eine geschlechtergemischte Darstellung gezeigt. In Diagramm **b)** sind nur die Weibchen und in **c)** nur die Männchen dargestellt.

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bei der geschlechtergemischten Auswertung. Nur bei den weiblichen Tieren in der geschlechterdifferenzierten Auswertung zeigten die weiblichen Knockouttiere signifikant ($p = 0,0079$) höhere Werte als die weiblichen Wildtyptiere.

In Abbildung 40 werden die Diagramme der mRNA-Expression von TNF- α wiederum geschlechterdifferenziert innerhalb der Gruppe der Knockouttiere bzw. der Wildtypiere dargestellt.

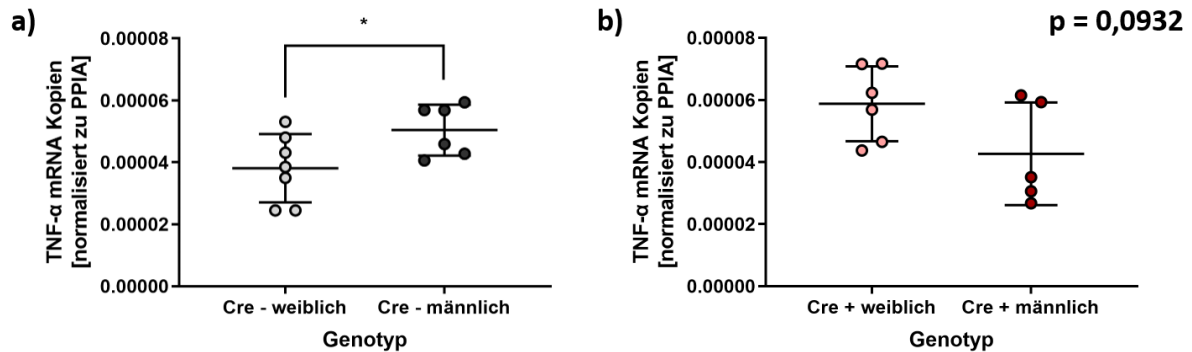


Abbildung 40: PCR der Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT - mRNA-Expression von TNF- α

Gezeigt ist die Verteilung der mRNA-Expression von TNF- α der Versuchstiere auf der y-Achse. In Diagramm **a)** sind die beiden Gruppen des Genotyps „Cre- weiblich“ und „Cre- männlich“ auf der x-Achse (Vergleich der Geschlechter in der Gruppe der Wildtypiere) und in Diagramm **b)** sind die beiden Gruppen des Genotyps „Cre+ weiblich“ und „Cre+ männlich“ auf der x-Achse (Vergleich der Geschlechter innerhalb der Gruppe der Knockouttiere) dargestellt.

Die geschlechterdifferenzierte Auswertung innerhalb der Gruppe der Knockout- bzw. Wildtypiere, ergab sowohl bei den Wildtypieren als auch den Knockouttieren Unterschiede zwischen den Geschlechtern. Bei den Wildtypieren zeigten die Männchen signifikant ($p = 0,0462$) höhere Werte der mRNA-Expression von TNF- α , während sie bei den Knockouttieren tendenziell ($p = 0,0932$) niedrigere Werte zeigten.

Alle Mittelwerte und deren Standardfehler werden in der folgenden Tabelle aufgelistet.

		mRNA-Expression von TNF- α	
Geschlechter gemischt	WT ♀/♂	$4,38 \times 10^{-5} \pm 3,16 \times 10^{-6}$	Nicht signifikant
	KO ♀/♂	$5,15 \times 10^{-5} \pm 4,79 \times 10^{-6}$	
Geschlechter getrennt	WT ♀	$3,81 \times 10^{-5} \pm 4,16 \times 10^{-6}$	Signifikant p = 0,0079
	KO ♀	$5,88 \times 10^{-5} \pm 4,92 \times 10^{-6}$	
	WT ♂	$5,04 \times 10^{-5} \pm 3,36 \times 10^{-6}$	Nicht signifikant
	KO ♂	$4,26 \times 10^{-5} \pm 7,38 \times 10^{-6}$	
Genotyp Geschlechter getrennt	WT ♀	$3,81 \times 10^{-5} \pm 4,16 \times 10^{-6}$	Signifikant p = 0,0462
	WT ♂	$5,04 \times 10^{-5} \pm 3,36 \times 10^{-6}$	
	KO ♀	$5,88 \times 10^{-5} \pm 4,92 \times 10^{-6}$	Tendenziell p = 0,0932
	KO ♂	$4,26 \times 10^{-5} \pm 7,38 \times 10^{-6}$	

Tabelle 33: PCR der Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT - MW \pm SEM der mRNA-Expression von TNF- α

Somit ergaben sich bei mRNA-Expression von TNF- α insgesamt keine signifikanten Unterschiede durch den Knockout. Nur die weiblichen Knockouttiere zeigten signifikant höhere Werte als die weiblichen Wildtyptiere. Diesmal ergab sich auch bei den Wildtyptieren ein Unterschied zwischen den Geschlechtern, jedoch wurde dieser durch den Knockout in die entgegengesetzte Richtung verändert.

Abschließend ergab damit die Auswertung der RNA-Analysen, dass sich auch die Neuroinflammation durch den Knockout bei den Geschlechtern unterschiedlich verhielt. Die weiblichen Knockouttiere hatten eine signifikant höhere Neuroinflammation als die weiblichen Wildtyptiere, während sich bei den Männchen die Knockouttieren nicht von den Wildtyptieren unterschieden.

Andererseits zeigten die männlichen Wildtyptiere tendenziell mehr Neuroinflammation als die weiblichen Wildtyptiere, während die männlichen Knockouttiere tendenziell weniger als die weiblichen Knockouttiere zeigten. Somit zeigte der Unterschied der Geschlechter bei den Wildtyptieren und den Knockouttieren in jeweils unterschiedliche Richtungen.

4.3.8 Protein-Analysen

Nachdem sich bei den nativen männlichen Tieren bei der Analyse der Proteine kein Unterschied ergab, sollte mit einem Dot Blot von IgG untersucht werden, welche Veränderungen sich bei der Analyse der BHS bzw. der Ödemformation 6 Stunden nach induziertem SHT ergaben. Da diese Untersuchung im Gegensatz zur immunhistochemischen IgG-Färbung das ins Hirngewebe übergetretene IgG quantitativ darstellt, ermöglichte sie, wie auch die RNA-Analysen und immunhistochemische IgG-Färbung, neben der Schadensvolumenanalyse eine weitere Beurteilung der Auswirkung des CCI und, ob der Knockout neuroprotektive Wirkung hat.

Auch bei den Ergebnissen des Dot Blots von IgG wurden die Wildtyp- und Knockouttiere zum einen in geschlechtergemischten Gruppen miteinander verglichen und zum anderen auch nach dem Geschlecht differenziert.

Außerdem wurden die männlichen und weiblichen Tiere ebenfalls innerhalb der Gruppe der Knockout- bzw. Wildtypiere miteinander verglichen.

In den Diagrammen der Abbildung 41 werden die geschlechtergemischte Form und die jeweils nach den Geschlechtern differenzierte Form der Auswertung dargestellt.

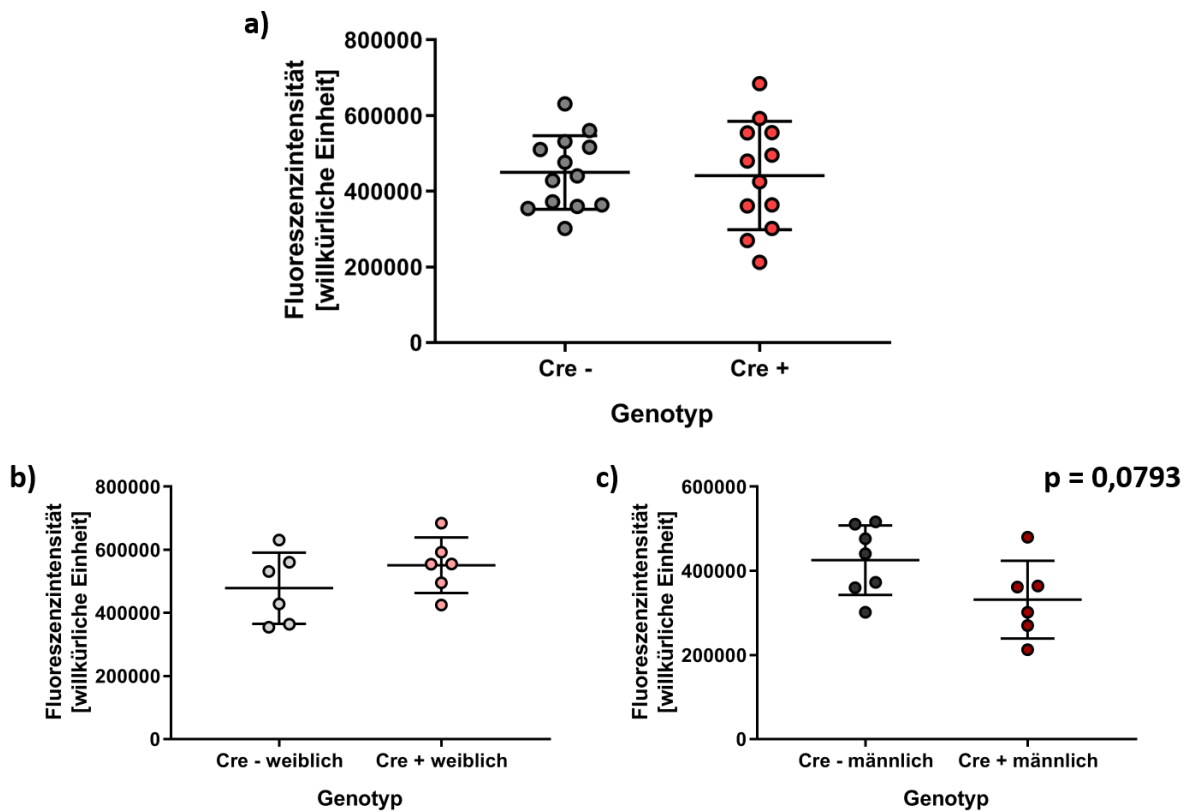


Abbildung 41: Dot Blot von IgG der Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT

Verteilung der Fluoreszenzintensität des Dot Blots von IgG der Versuchstiere auf der y-Achse innerhalb der beiden Gruppen des Genotyps „Cre-“ und „Cre+“ auf der x-Achse. In Diagramm **a)** ist eine geschlechtergemischte Darstellung gezeigt. In Diagramm **b)** sind nur die Weibchen und in **c)** nur die Männchen dargestellt.

Die Auswertungen ergaben keine signifikanten Unterschiede. Einzig die männlichen Knockouttiere zeigten gegenüber den männlichen Wildtypitieren tendenziell ($p = 0,0793$) niedrigere Werte.

In Abbildung 42 wiederum werden die Diagramme geschlechterdifferenziert innerhalb der Gruppe der Knockout- bzw. Wildtypiere dargestellt.

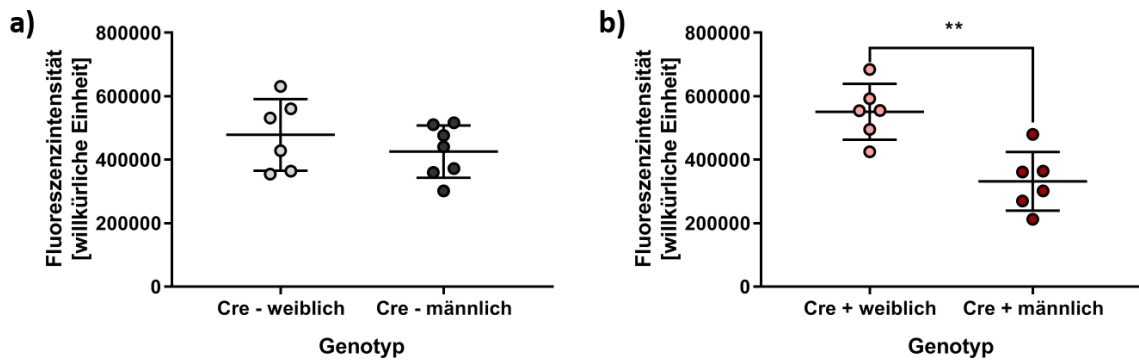


Abbildung 42: Dot Blot von IgG der Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT

Gezeigt ist die Verteilung der Fluoreszenzintensität des Dot Blots von IgG der Versuchstiere auf der y-Achse. In Diagramm **a)** sind die beiden Gruppen des Genotyps „Cre- weiblich“ und „Cre- männlich“ auf der x-Achse (Vergleich der Geschlechter in der Gruppe der Wildtypiere) und in Diagramm **b)** sind die beiden Gruppen des Genotyps „Cre+ weiblich“ und „Cre+ männlich“ auf der x-Achse (Vergleich der Geschlechter innerhalb der Gruppe der Knockouttiere) dargestellt.

Die geschlechterdifferenzierte Auswertung innerhalb der Gruppe der Knockout- bzw. Wildtypiere zeigte wie schon bei vielen Untersuchungen zuvor, dass die männlichen Knockouttiere signifikant ($p = 0,0018$) niedrigere Werte aufwiesen als die weiblichen Knockouttiere. Bei den Wildtypieren gab es diesen Unterschied zwischen Weibchen und Männchen nicht.

Die jeweiligen Mittelwerte und dazugehörigen Standardfehler können in der nachfolgenden Tabelle eingesehen werden.

		Dot Blot von IgG	
Geschlechter gemischt	WT ♀/♂	449894 ± 26977	Nicht signifikant
	KO ♀/♂	441398 ± 41357	
Geschlechter getrennt	WT ♀	478443 ± 46046	Nicht signifikant
	KO ♀	551128 ± 35871	
	WT ♂	425424 ± 31183	Tendenziell p = 0,0793
	KO ♂	331668 ± 37720	
Genotyp Geschlechter getrennt	WT ♀	478443 ± 46046	Nicht signifikant
	WT ♂	425425 ± 31183	
	KO ♀	551128 ± 35871	Signifikant p = 0,0018
	KO ♂	331668 ± 37720	

Tabelle 34: Dot Blot von IgG der Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT (MW ± SEM)

Somit ergab sich bei der Analyse des Dot Blots von IgG, dass der Knockout vor allem bei den männlichen Tieren zu einer verringerten Menge von ins Hirngewebe übergetretenem IgG geführt hatte. Außerdem zeigte sich erneut, dass der schon mehrmals beschriebene Unterschied zwischen den Geschlechtern nur bei den Knockouttieren zu sehen war und nicht bei den Wildtypen.

Somit bestätigten sich auch bei den durchgeführten Dot Blots von IgG die Ergebnisse der vorherigen Untersuchungen.

Zusammengefasst zeigte sich damit bei der Studie mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT, dass der Knockout zu einer tendenziell verminderten Thrombozytenaggregationsfähigkeit führte. Dies spiegelte sich jedoch besonders bei den männlichen Knockouttieren wider und weniger bei den weiblichen. Auch wenn die Schadensvolumenanalyse nicht eindeutig einen neuroprotektiven Effekt des Knockouts zeigen konnte, so ergab sich bei den Knockouttieren eine tendenziell geringere Ödembildung bzw. BHS Störung/IgG-Extravasation. Auch dies zeigte sich,

wie auch die Thrombozytenaggregationsfähigkeit, vor allem bei den männlichen Knockouttieren und weniger bei den weiblichen Knockouttieren.

Außerdem ergab sich bei fast allen Untersuchungen, dass sich erst durch den Knockout ein meist signifikanter Unterschied zwischen den Männchen und Weibchen darstellte. Bei den Wildtyptieren zeigte sich ein solcher Unterschied zwischen den Geschlechtern in der Regel nicht.

4.4 Studie von Weibchen und Männchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT

Aufgrund der Ergebnisse der Studie mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT wurden die Versuche an den Tieren, welche 5 Tage nach dem CCI überleben sollten, an zwei getrennten Gruppen durchgeführt, wovon eine Gruppe nur aus Weibchen und eine nur aus Männchen bestand. Untersucht wurden an dieser Stelle, wie zuvor, das KG, der BZ, das Blutbild, der histologische Schaden in der Kresylviolett Färbung und die mRNA-Expression. Die Untersuchung der Thrombozytenaggregationsfähigkeit sowie der Dot Blot von IgG und die immunhistochemische Färbung von IgG wurden nicht mehr vorgenommen. Dafür wurden an den Tieren Motorfunktionsanalysen durchgeführt, welche neben der Schadensvolumenanalyse eine weitere Möglichkeit darstellten, die Auswirkungen des CCI zu beurteilen.

Eines der weiblichen Wildtyptiere starb vorzeitig und konnte daher nicht berücksichtigt werden.

Bei zwei der Tiere aus der Gruppe der Männchen wurde festgestellt, dass es sich irrtümlicherweise nicht um Männchen, sondern um Weibchen handelte. Außerdem verstarben drei der Versuchstiere vorzeitig. Somit konnten nur 9 männliche Wildtyptiere und 10 männliche Knockouttiere vollständig in der Auswertung berücksichtigt werden.

4.4.1 Körpergewicht

Zunächst wird die Analyse des KGs dargestellt. Dieses wurde jeden Tag erhoben, um den Verlauf analysieren zu können. Verglichen wurden jeweils die Gruppen „Cre-“ mit „Cre+“.

4.4.1.1 Körpergewicht der Weibchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT

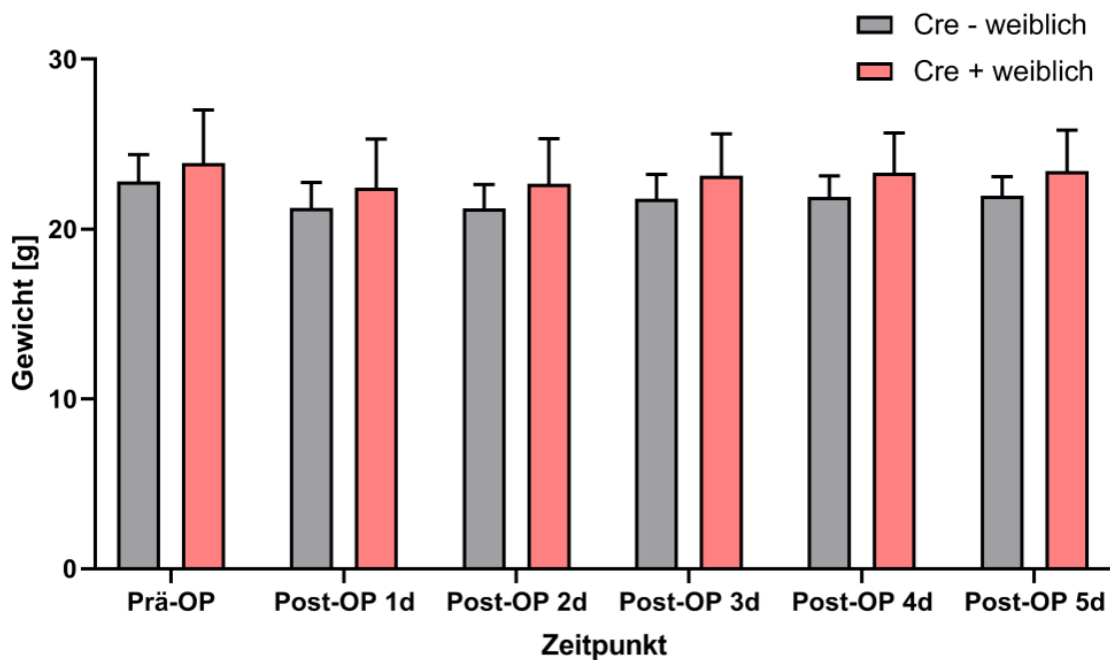


Abbildung 43: Körpergewicht der Weibchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT

Verteilung des KGs in [g] der weiblichen Versuchstiere auf der y-Achse zu den Zeitpunkten kurz vor der OP und postoperativ täglich für 5 Tage auf der x-Achse, unterteilt jeweils mit einem Balken für „Cre- weiblich“ und „Cre+ weiblich“.

An keinem der untersuchten Tage zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Wildtyp- und Knockouttieren. Auch die Entwicklung des KG im Verlauf unterschied sich nicht signifikant.

In der nachfolgenden Tabelle werden alle Mittelwerte und deren Standardfehler dargestellt.

Körpergewicht	WT ♀	KO ♀
Prä-OP	22,78 ± 0,44 g	23,90 ± 0,83 g
	Nicht signifikant	
Post-OP 1d	21,23 ± 0,42 g	22,44 ± 0,76 g
	Nicht signifikant	
Post-OP 2d	21,19 ± 0,39 g	22,68 ± 0,71 g
	Nicht signifikant	
Post-OP 3d	21,77 ± 0,40 g	23,14 ± 0,66 g
	Nicht signifikant	
Post-OP 4d	21,88 ± 0,34 g	23,31 ± 0,62 g
	Nicht signifikant	
Post-OP 5d	21,95 ± 0,31 g	23,42 ± 0,64 g
	Nicht signifikant	

Tabelle 35: Körpergewicht der Weibchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT (MW ± SEM)

Durch diese Messung des KG der weiblichen Tiere kurz vor der Operation und durch die Messungen in der Studie mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT konnte der einmalige signifikante Unterschied des KG in der Studie der nativen weiblichen Tiere (s. Abschnitt 4.1.1.1) widerlegt werden.

So blieb bei den weiblichen Tieren auch 5 Tage nach dem CCI wie bei den vorherigen Versuchen der Knockout ohne Einfluss auf das KG.

4.4.1.2 Körpergewicht der Männchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT

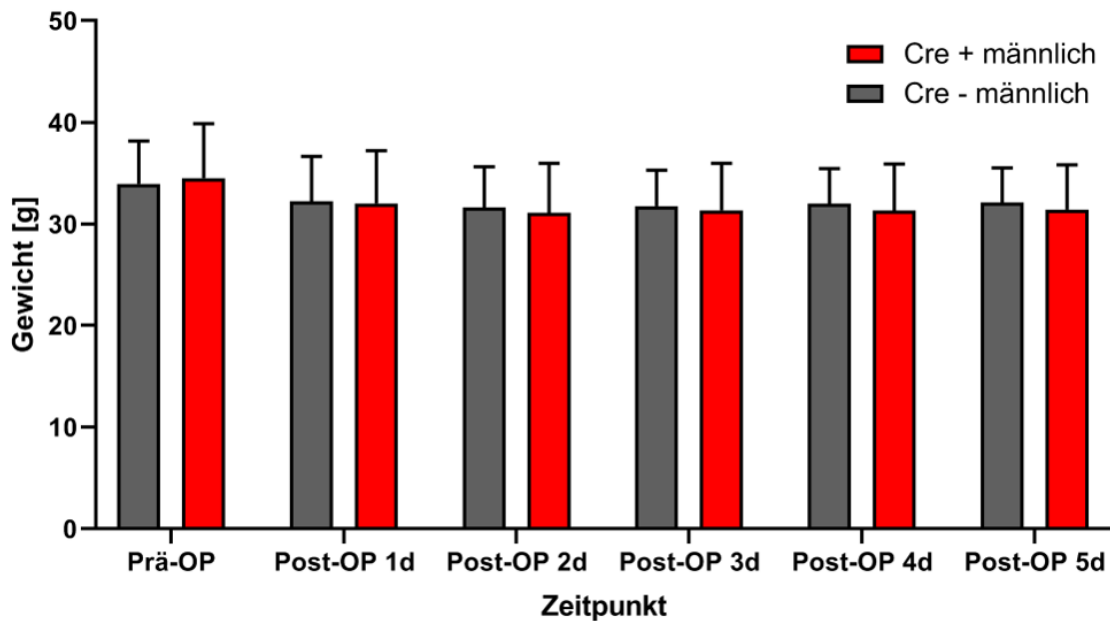


Abbildung 44: Körpergewicht der Männchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT

Verteilung des KGs in [g] der männlichen Versuchstiere auf der y-Achse zu den Zeitpunkten kurz vor der OP und postoperativ täglich für 5 Tage auf der x-Achse, unterteilt jeweils mit einem Balken für „Cre- männlich“ und „Cre+ männlich“.

Es zeigte sich zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied des KGs und auch die Entwicklung des KG im Verlauf unterschied sich bei den Knockouttieren nicht von den Wildtypen.

Die Mittelwerte und dazugehörigen Standardfehler werden in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

Körpergewicht	WT ♂	KO ♂
Prä-OP	33,94 ± 1,27 g	34,52 ± 1,61 g
	Nicht signifikant	
Post-OP 1d	32,23 ± 1,47 g	32,03 ± 1,64 g
	Nicht signifikant	
Post-OP 2d	31,61 ± 1,34 g	31,11 ± 1,53 g
	Nicht signifikant	
Post-OP 3d	31,74 ± 1,18 g	31,36 ± 1,45 g
	Nicht signifikant	
Post-OP 4d	32,01 ± 1,15 g	31,33 ± 1,45 g
	Nicht signifikant	
Post-OP 5d	32,12 ± 1,23 g	31,42 ± 1,39 g
	Nicht signifikant	

Tabelle 36: Körpergewicht der Männchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT (MW ± SEM)

Somit zeigte sich bei den männlichen Tieren, wie bei allen Studien zuvor, dass der Knockout keinen Einfluss auf das KG ausüben konnte. Der Knockout konnte in keiner Studie bei den Tieren zu einer weniger starken Abnahme des KG oder zu einer schnelleren Wiederzunahme des KG führen.

4.4.2 Blutzucker

Der BZ wurde wie in der Studie mit der Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT kurz vor dem CCI gemessen, sowie nach 5 Tagen, kurz vor der Euthanasierung. Außerdem wurde die Differenz dieser beiden Zeitpunkte berechnet. Dabei wurden jeweils die Gruppen „Cre-“ mit „Cre+“ verglichen.

4.4.2.1 Blutzucker-Messwerte der Weibchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT

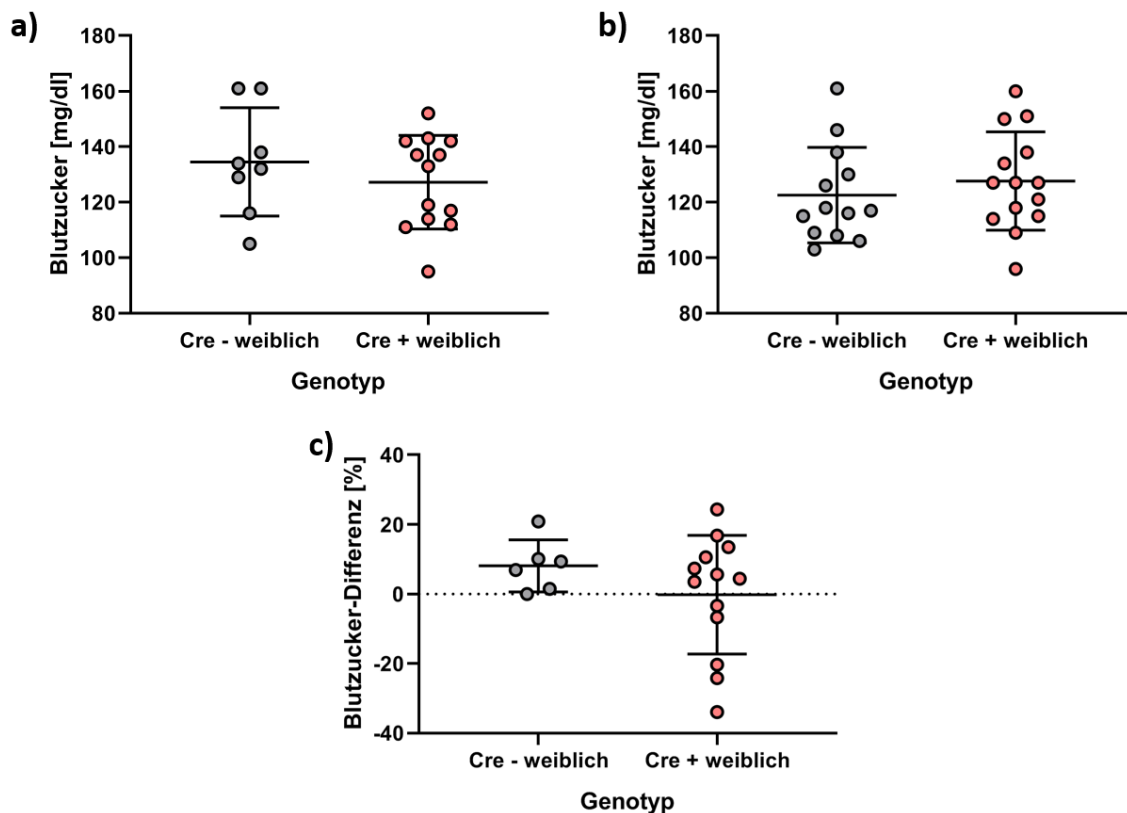


Abbildung 45: Blutzucker-Messwerte der Weibchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT

Verteilung der BZ-Messwerte der weiblichen Versuchstiere auf der y-Achse innerhalb der beiden Gruppen des Genotyps „Cre- weiblich“ und „Cre+ weiblich“ auf der x-Achse. In Diagramm **a)** ist der BZ präoperativ in [mg/dl] gezeigt, in **b)** 5 Tage nach dem induzierten SHT in [mg/dl] und in **c)** die Differenz der beiden Messzeitpunkte in [%].

Auch die BZ-Messwerte zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den Wildtyp- und Knockouttieren.

Die jeweiligen Mittelwerte und deren Standardfehler werden in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Blutzucker	WT ♀	KO ♀
Präoperativ	134,50 ± 6,90 mg/dl	127,20 ± 4,67 mg/dl
	Nicht signifikant	
Intra-mortem	122,50 ± 4,76 mg/dl	127,60 ± 4,73 mg/dl
	Nicht signifikant	
Differenz	8,12 ± 3,05 %	-0,20 ± 4,73 %
	Nicht signifikant	

Tabelle 37: Blutzucker-Messwerte der Weibchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT (MW ± SEM)

Somit blieben auch die BZ-Messwerte in diesem Versuch durch den Knockout unverändert.

4.4.2.2 Blutzucker-Messwerte der Männchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT

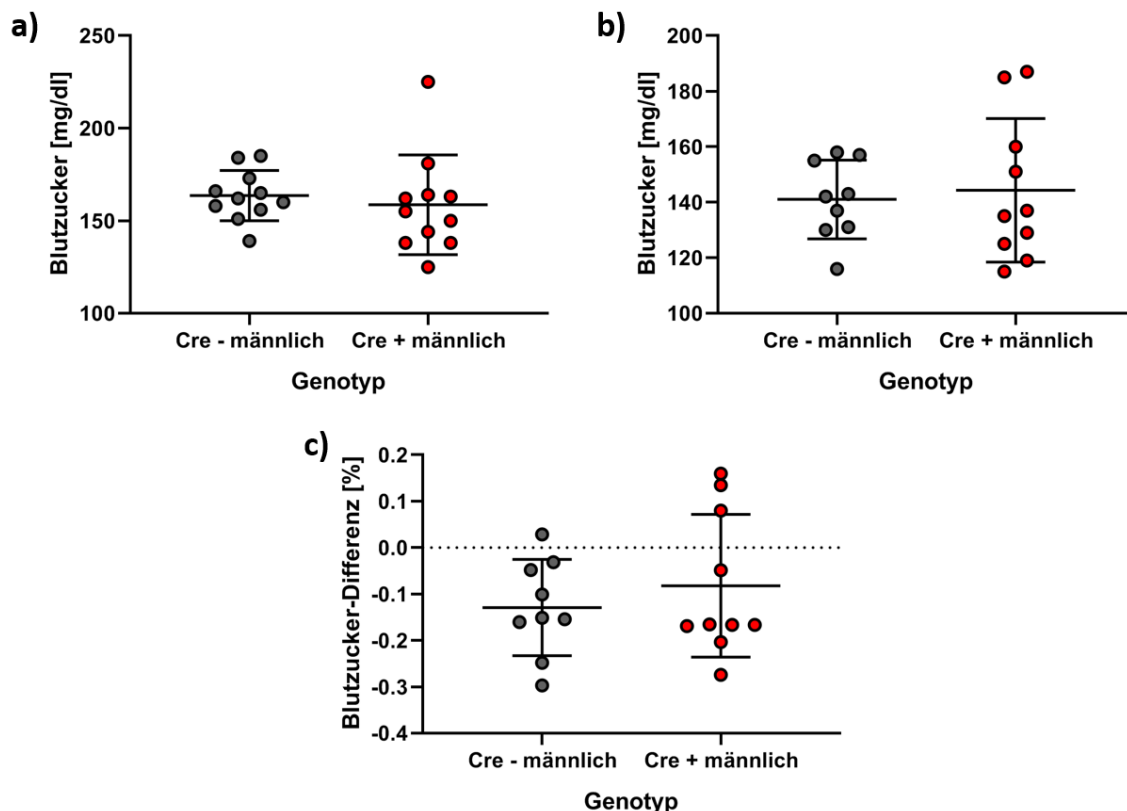


Abbildung 46: Blutzucker-Messwerte der Männchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT

Verteilung der BZ-Messwerte der männlichen Versuchstiere auf der y-Achse innerhalb der beiden Gruppen des Genotyps „Cre- männlich“ und „Cre+ männlich“ auf der x-Achse. In Diagramm a) ist der

BZ präoperativ in [mg/dl] gezeigt, in **b)** 5 Tage nach dem induzierten SHT in [mg/dl] und in **c)** die Differenz der beiden Messzeitpunkte in [%].

Auch hier ergaben sich bei beiden Messzeitpunkten und der Differenz dieser keine signifikanten Unterschiede.

Die Mittelwerte und Standardfehler werden in der folgenden Tabelle dargestellt.

Blutzucker	WT ♂	KO ♂
Präoperativ	163,5 ± 4,09 mg/dl	158,6 ± 8,12 mg/dl
	Nicht signifikant	
Intra mortem	141,0 ± 4,73 mg/dl	144,3 ± 8,18 mg/dl
	Nicht signifikant	
Differenz	-0,13 ± 0,03 %	-0,08 ± 0,05 %
	Nicht signifikant	

Tabelle 38: Blutzucker-Messwerte der Männchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT (MW ± SEM)

Somit hatte der Knockout auch bei den männlichen Tieren keinen Einfluss auf den BZ.

4.4.3 Blutbild/Sysmex Cellcounter

Auch das Blutbild wurde entsprechend der Studie mit der Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT kurz vor der Euthanasie entnommen und analysiert.

4.4.3.1 Blutbild der Weibchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT

Zunächst werden die Ergebnisse aus den Messungen der **Thrombozyten** differenziert nach „Cre- weiblich“ und „Cre+ weiblich“ in Diagrammen dargestellt.

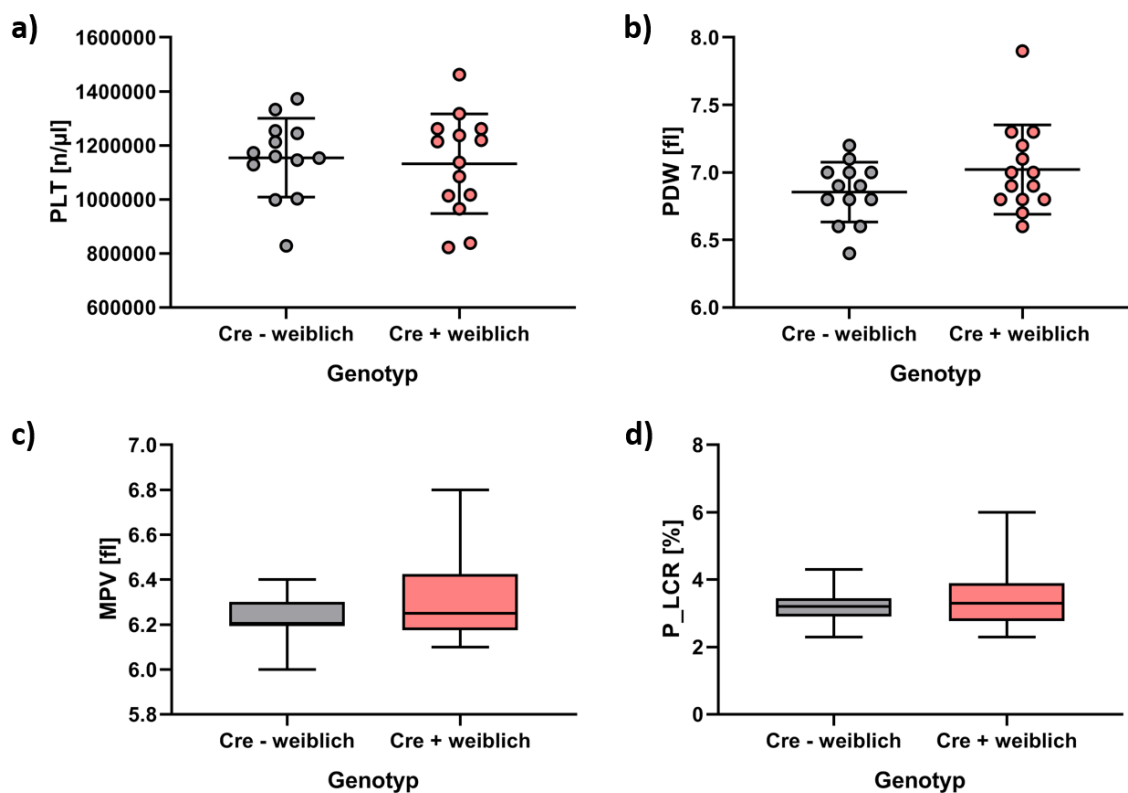


Abbildung 47: Blutbild der Weibchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT - Thrombozyten

Verteilung von **a)** Thrombozytenanzahl (PLT) in [n/μl], **b)** Thrombozytenverteilungsbreite (PDW) in [fl], **c)** mittlerem Thrombozytenvolumen (MPV) in [fl] und **d)** Anteil großer Thrombozyten (> 12 fl) (P_LCR) in [%] der weiblichen Versuchstiere auf der y-Achse innerhalb der beiden Gruppen des Genotyps „Cre- weiblich“ und „Cre+ weiblich“ auf der x-Achse.

Bei keinem der analysierten Werte (PLT, PDW, MPV und P_LCR) ergab sich ein signifikanter Unterschied.

Die Mittelwerte und deren Standardfehler können der nachfolgenden Tabelle entnommen werden.

Thrombozyten	WT ♀	KO ♀
PLT	1154385 ± 40529 n/μl	1132286 ± 49304 n/μl
	Nicht signifikant	
PDW	6,85 ± 0,06 fl	7,02 ± 0,09 fl
	Nicht signifikant	
MPV	6,22 ± 0,03 fl	6,31 ± 0,05 fl
	Nicht signifikant	
P_LCR	3,19 ± 0,16 %	3,41 ± 0,25 %
	Nicht signifikant	

Tabelle 39: Blutbild der Weibchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT - MW ± SEM der Thrombozyten

Nachfolgend werden die **Erythrozytenindizes** in Diagrammform dargestellt, ebenfalls nach „Cre- weiblich“ und „Cre+ weiblich“ differenziert.

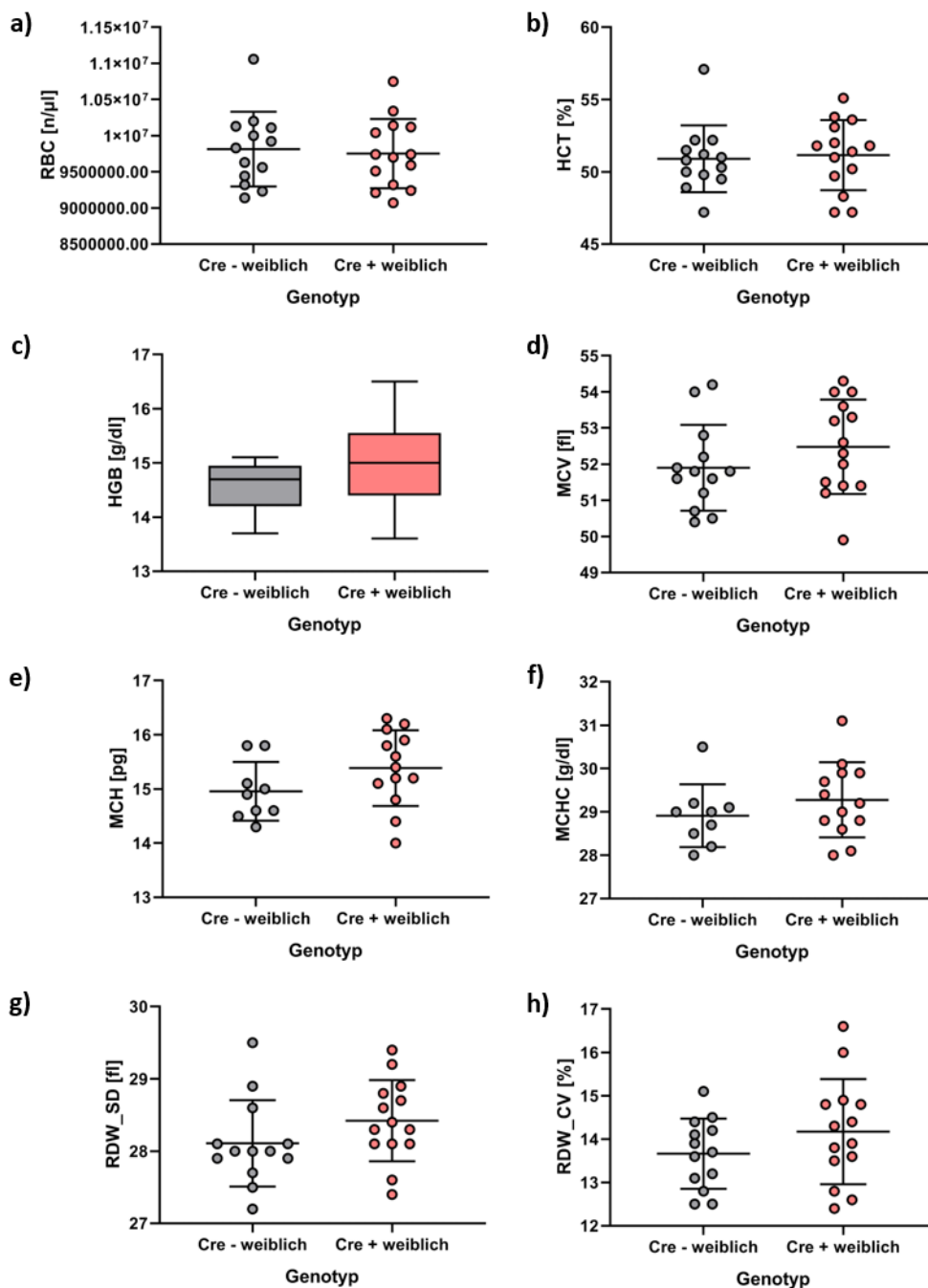


Abbildung 48: Blutbild der Weibchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT - Erythrozyten

Verteilung von **a)** Erythrozytenanzahl (RBC) in [n/µl], **b)** Hämatokrit (HCT) in [%], **c)** Hämoglobin (HGB) in [g/dl], **d)** Mittlerem korpuskulärem Volumen (MCV) in [fl], **e)** Mittlerem korpuskulärem Hämoglobingehalt (MCH) in [pg], der **f)** Mittlerer korpuskulärer Hämoglobin-Konzentration (MCHC) in [g/dl], **g)** Erythrozytenverteilungsbreite als Standardabweichung (RDW_SD) in [fl] und **h)** Variationskoeffizient der Erythrozytengröße (RDW_CV) in [%] der weiblichen Versuchstiere auf der y-Achse innerhalb der beiden Gruppen des Genotyps „Cre- weiblich“ und Cre+ weiblich“ auf der x-Achse.

Bei keinem der analysierten Erythrozytenindizes (RBC, HCT, HGB, MCV, MCH, MCHC, RDW_SD und RDW_CV) ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Wildtyp- und Knockouttieren.

Alle Mittelwerte und dazugehörigen Standardfehler werden in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

Erythrozytenindizes	WT ♀	KO ♀
RBC	9813077 ± 143506 n/µl	9750714 ± 128518 n/µl
	Nicht signifikant	
HCT	50,90 ± 0,64 %	51,16 ± 0,65 %
	Nicht signifikant	
HGB	14,59 ± 0,17 g/dl	14,99 ± 0,23 g/dl
	Nicht signifikant	
MCV	51,90 ± 0,33 fl	52,48 ± 0,35 fl
	Nicht signifikant	
MCH	14,96 ± 0,18 pg	15,38 ± 0,19 pg
	Nicht signifikant	
MCHC	28,91 ± 0,24 g/dl	29,28 ± 0,24 g/dl
	Nicht signifikant	
RDW_SD	28,11 ± 0,17 fl	28,42 ± 0,15 fl
	Nicht signifikant	
RDW_CV	13,66 ± 0,22 %	14,17 ± 0,32 %
	Nicht signifikant	

Tabelle 40: Blutbild der Weibchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT - MW ± SEM der Erythrozytenindizes

Zuletzt werden die Ergebnisse der Messung der **Leukozyten** differenziert nach „Cre- weiblich“ und „Cre+ weiblich“ in Diagrammen dargestellt.

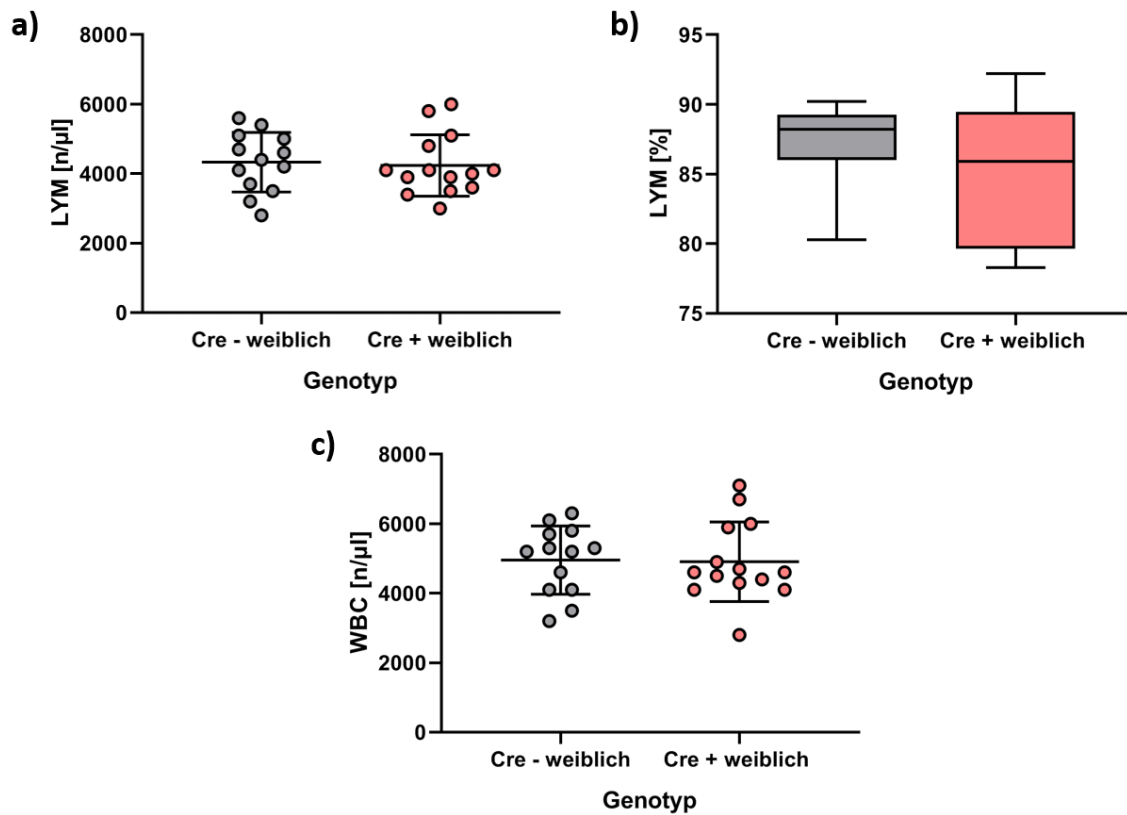


Abbildung 49: Blutbild der Weibchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT - Leukozyten

Verteilung von **a)** Lymphozytenanzahl (LYM) in [n/µl], **b)** Lymphozytenanteil (LYM) in [%] und **c)** Leukozytenanzahl (WBC) in [n/µl] der weiblichen Versuchstiere auf der y-Achse innerhalb der beiden Gruppen des Genotyps „Cre- weiblich“ und „Cre+ weiblich“ auf der x-Achse.

Auch hier ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (LYM, LYM [%] und WBC).

Die Messwerte können in der folgenden Tabelle eingesehen werden.

Leukozyten	WT ♀	KO ♀
LYM	4331 ± 237,3 n/µl	4236 ± 235,9 n/µl
	Nicht signifikant	
LYM [%]	87,41 ± 0,76 %	85,11 ± 1,23 %
	Nicht signifikant	
WBC	4954 ± 271,9 n/µl	4907 ± 305,3 n/µl
	Nicht signifikant	

Tabelle 41: Blutbild der Weibchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT - MW ± SEM der Leukozyten

Somit blieb bei den weiblichen Tieren auch das Blutbild, wie schon zuvor das KG und der BZ, ohne signifikante Beeinflussung durch den Knockout.

4.4.3.2 Blutbild der Männchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT

Zunächst werden aus dem Blutbild die Messergebnisse der **Thrombozyten** in Diagrammform gezeigt, differenziert nach „Cre- männlich“ und „Cre+ männlich“.

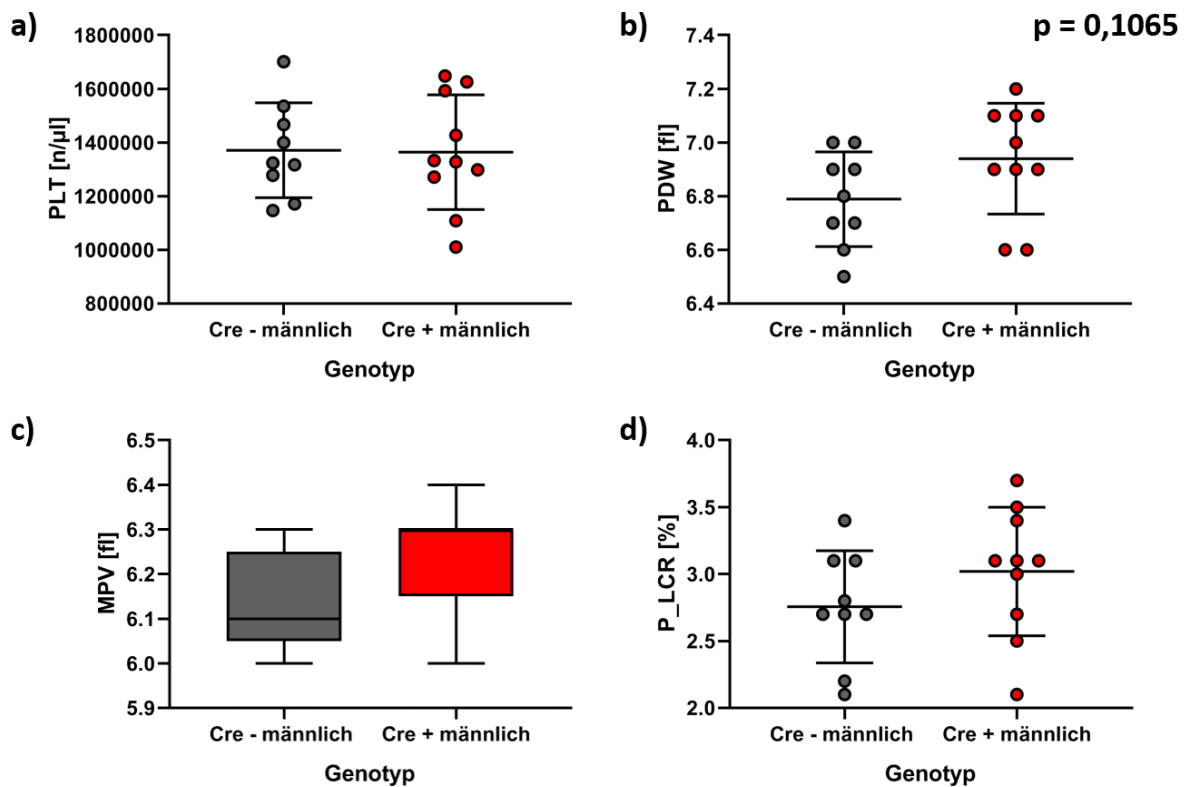


Abbildung 50: Blutbild der Männchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT - Thrombozyten

Verteilung von **a)** Thrombozytenanzahl (PLT) in [n/µl], **b)** Thrombozytenverteilungsbreite (PDW) in [fl], **c)** mittlerem Thrombozytenvolumen (MPV) in [fl] und **d)** Anteil großer Thrombozyten (> 12 fl) (P_LCR) in [%] der männlichen Versuchstiere auf der y-Achse innerhalb der beiden Gruppen des Genotyps „Cre- männlich“ und „Cre+ männlich“ auf der x-Achse.

Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bei den gemessenen Werten der Thrombozyten (PLT, PDW, MPV und P_LCR). Lediglich bei der Thrombozytenverteilungsbreite zeigten die Knockouttiere tendenziell ($p = 0,1065$) höhere Werte als die Wildtypiere.

Alle Mittelwerte und Standardfehler können der nachfolgenden Tabelle entnommen werden.

Thrombozyten	WT ♂	KO ♂
PLT	1371111 ± 58902 n/μl	1364300 ± 67603 n/μl
	Nicht signifikant	
PDW	6,79 ± 0,06 fl	6,94 ± 0,07 fl
	Tendenziell p = 0,1065	
MPV	6,14 ± 0,04 fl	6,23 ± 0,04 fl
	Nicht signifikant	
P_LCR	2,76 ± 0,14 %	3,02 ± 0,16 %
	Nicht signifikant	

Tabelle 42: Blutbild der Männchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT - MW ± SEM der Thrombozyten

In Abbildung 50 werden die **Erythrozytenindizes** in Diagrammen dargestellt, ebenfalls differenziert nach „Cre- männlich“ und „Cre+ männlich“.

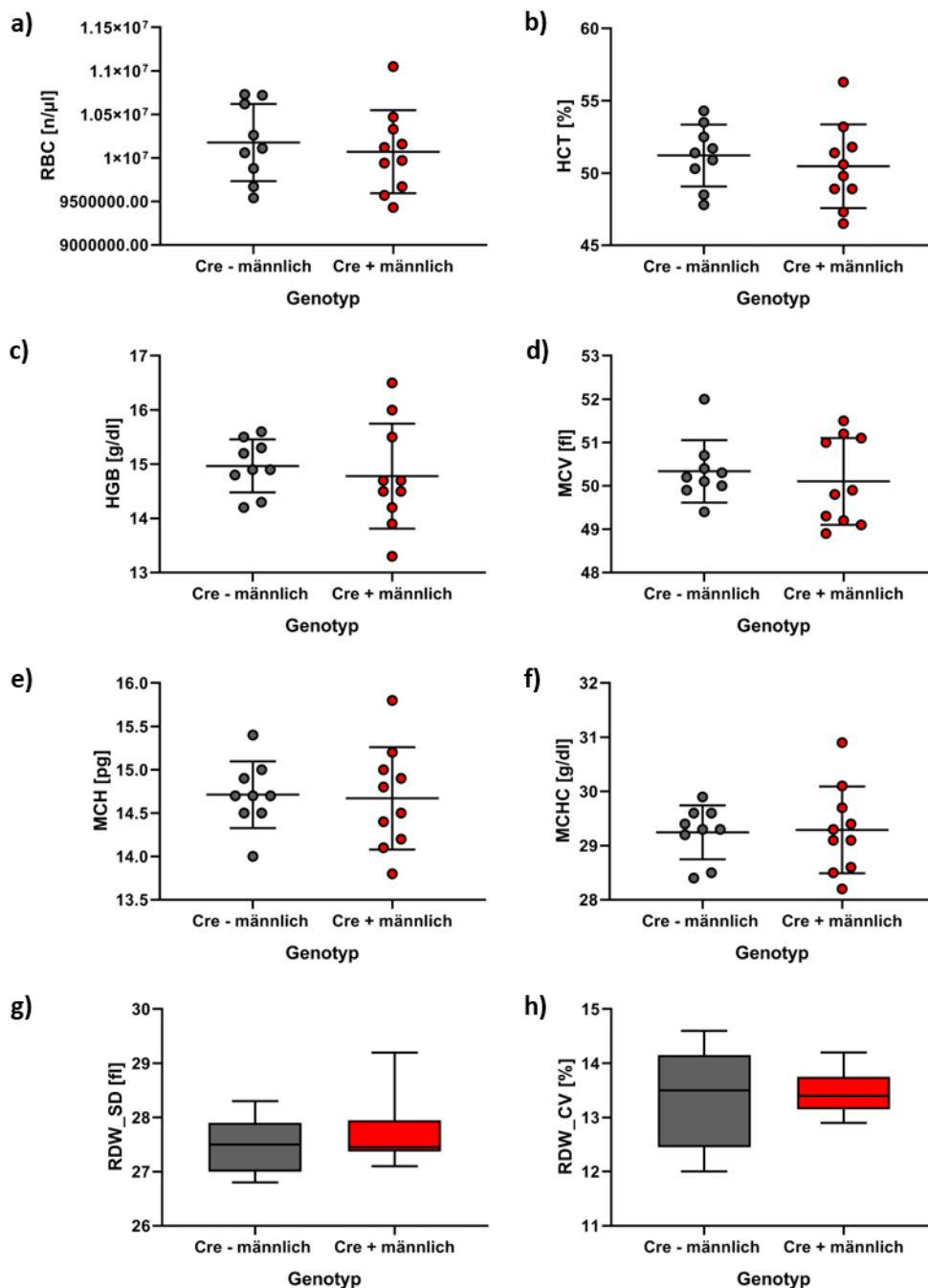


Abbildung 51: Blutbild der Männchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT - Erythrozyten

Verteilung von **a)** Erythrozytenanzahl (RBC) in [n/μl], **b)** Hämatokrit (HCT) in [%], **c)** Hämoglobin (HGB) in [g/dl], **d)** Mittlerem korpuskulärem Volumen (MCV) in [fl], **e)** Mittlerem korpuskulärem Hämoglobingehalt (MCH) in [pg], **f)** Mittlerer korpuskulärer Hämoglobin-Konzentration (MCHC) in [g/dl], **g)** Erythrozytenverteilungsbreite als Standardabweichung (RDW_SD) in [fl] und **h)** Variationskoeffizient der Erythrozytengröße (RDW_CV) in [%] der männlichen Versuchstiere auf der y-Achse innerhalb der beiden Gruppen des Genotyps „Cre- männlich“ und Cre+ männlich“ auf der x-Achse.

Auch hier ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Knockout- und Wildtyptieren (RBC, HCT, HGB, MCV, MCH, MCHC, RDW_SD und RDW_CV).

Die jeweiligen Mittelwerte und dazugehörigen Standardfehler können der folgenden Tabelle entnommen werden.

Erythrozytenindizes	WT ♂	KO ♂
RBC	10176667 ± 147808 n/μl	10071000 ± 150742 n/μl
	Nicht signifikant	
HCT	51,21 ± 0,71 %	50,47 ± 0,91 %
	Nicht signifikant	
HGB	14,97 ± 0,16 g/dl	14,78 ± 0,31 g/dl
	Nicht signifikant	
MCV	50,33 ± 0,24 fl	50,10 ± 0,32 fl
	Nicht signifikant	
MCH	14,71 ± 0,13 pg	14,67 ± 0,19 pg
	Nicht signifikant	
MCHC	29,24 ± 0,16 g/dl	29,29 ± 0,25 g/dl
	Nicht signifikant	
RDW_SD	27,47 ± 0,17 fl	27,73 ± 0,21 fl
	Nicht signifikant	
RDW_CV	13,41 ± 0,31 %	13,47 ± 0,13 %
	Nicht signifikant	

Tabelle 43: Blutbild der Männchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT - MW ± SEM der Erythrozytenindizes

Abschließend werden aus dem Blutbild die Messergebnisse der **Leukozyten** in Form von Diagrammen differenziert nach „Cre- männlich“ und „Cre+ männlich“ gezeigt.

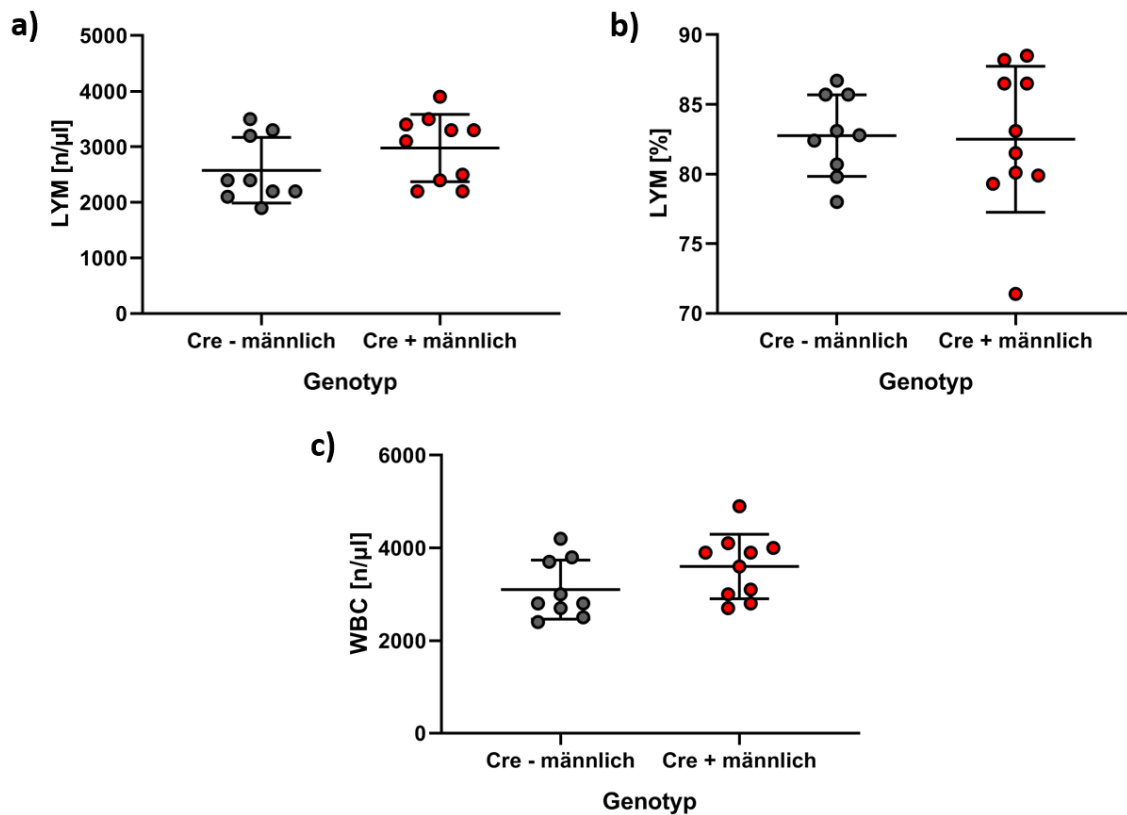


Abbildung 52: Blutbild der Männchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT - Leukozyten

Verteilung von **a)** Lymphozytenanzahl (LYM) in [n/µl], **b)** Lymphozytenanteil (LYM) in [%] und **c)** Leukozytenanzahl (WBC) in [n/µl] der männlichen Versuchstiere auf der y-Achse innerhalb der beiden Gruppen des Genotyps „Cre- männlich“ und „Cre+ männlich“ auf der x-Achse.

Bei der Analyse der Leukozyten zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede (LYM, LYM [%] und WBC).

Die Mittelwerte und Standardfehler werden in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

Leukozyten	WT ♂	KO ♂
LYM	2578 ± 197,0 n/μl	2980 ± 191,4 n/μl
	Nicht signifikant	
LYM [%]	82,77 ± 0,98 %	82,50 ± 1,66 %
	Nicht signifikant	
WBC	3100 ± 212,8 n/μl	3600 ± 219,6 n/μl
	Nicht signifikant	

Tabelle 44: Blutbild der Männchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT - MW ± SEM der Leukozyten

Insgesamt zeigte das Blutbild somit weiterhin bei allen Studien keine signifikanten Unterschiede zwischen den Wildtyp- und Knockouttieren.

4.4.4 Motorfunktionsanalysen

Bei den Versuchen mit einer Überlebenszeit von 5 Tagen nach induziertem SHT kamen zusätzlich Motorfunktionsanalysen zum Einsatz. Da sich der Schaden vor allem im Bereich des primären und sekundären Motorkortex darstellte, waren hierdurch Verschlechterungen der motorischen Funktionen zu erwarten. Somit ließ sich durch eine Verschlechterung der motorischen Funktion auch indirekt auf einen größeren Schaden schließen. Die Motorfunktionsanalysen bestehen aus dem „NSS“ und dem „Rotarod-Leistungstest“. Beide wurden jeweils erstmals am Tag der Operation erhoben, um einen Ausgangswert zu erhalten. Im Verlauf wurden sie dann erneut am 1., 3. und 5. Tag nach dem CCI im Sinne einer Verlaufsbeobachtung erhoben.

Die Motorfunktionsanalysen der männlichen Tiere wurden durch eine Tracking Software von Noldus ergänzt. Dadurch wurden neben dem „NSS“ und dem „Rotarod-Leistungstest“ als weitere Daten die zurückgelegte Strecke innerhalb eines Messzeitraumes von 2 min generiert.

4.4.4.1 Motorfunktionsanalyse der Weibchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT

Zunächst werden die Ergebnisse des „NSS“ zu den jeweiligen Messzeitpunkten in einem Diagramm dargestellt.

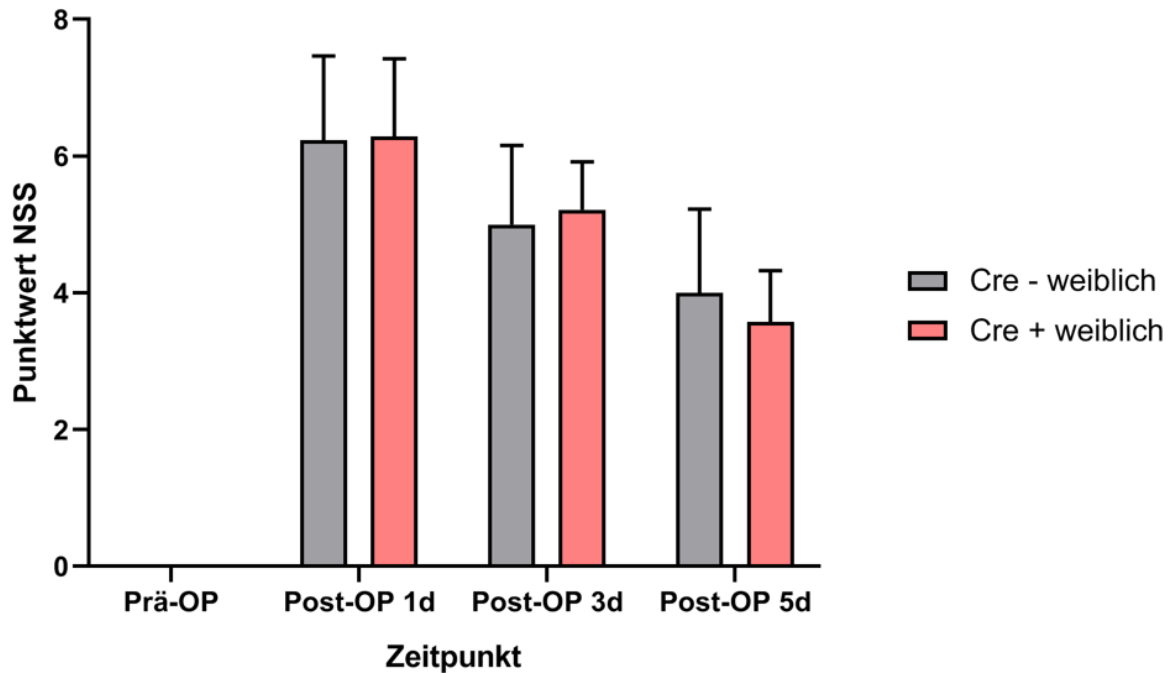


Abbildung 53: Motorfunktionsanalyse der Weibchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT - Punktwerte des NSS

Verteilung der Punktwerte des NSS der weiblichen Versuchstiere auf der y-Achse zu den Zeitpunkten kurz vor der OP und den Tagen 1, 3 und 5 nach der OP auf der x-Achse, unterteilt jeweils mit einem Balken für „Cre- weiblich“ und „Cre+ weiblich“.

Am Tag der OP waren alle Tiere ohne Einschränkung und erreichten damit 0 Punkte. Auch im Verlauf zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Wildtyp- und Knockouttieren.

Die jeweiligen Mittelwerte und Standardfehler werden in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

NSS	WT ♀	KO ♀
Prä-OP	0	0
	Nicht signifikant	
Post-OP 1d	6,23 ± 0,34	6,29 ± 0,30
	Nicht signifikant	
Post-OP 3d	5,0 ± 0,32	5,21 ± 0,19
	Nicht signifikant	
Post-OP 5d	4,0 ± 0,34	3,57 ± 0,20
	Nicht signifikant	

Tabelle 45: Motorfunktionsanalyse der Weibchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT - MW ± SEM der Punktwerte des NSS

Nachfolgend werden die Ergebnisse des „Rotarod-Leistungstests“ zu den verschiedenen Messzeitpunkten in einem Diagramm dargestellt.

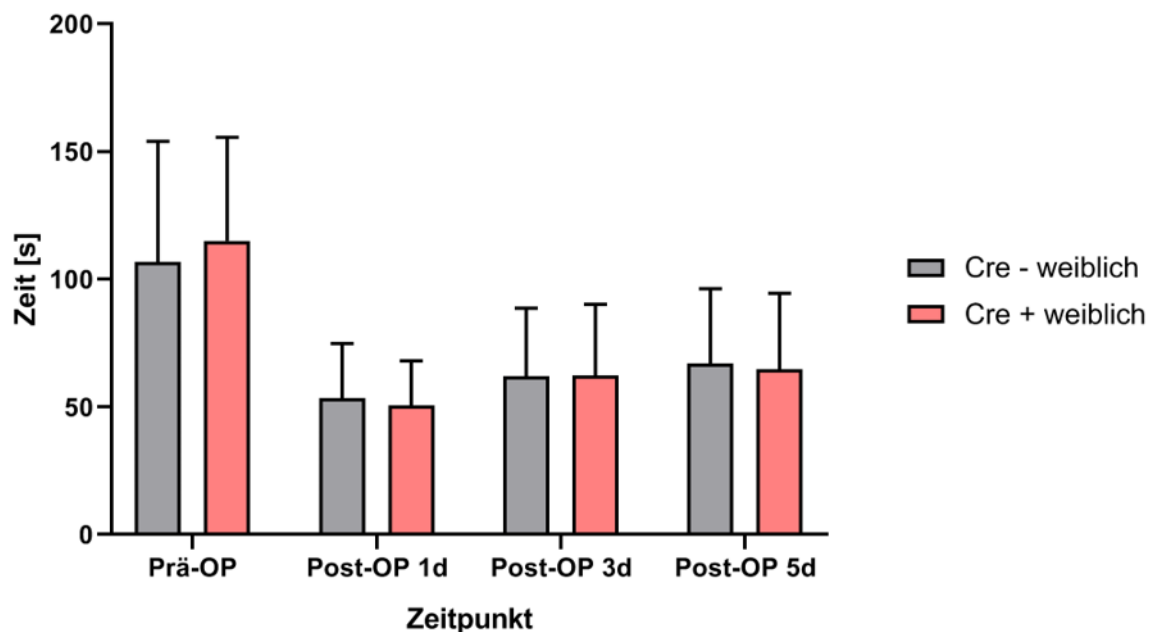


Abbildung 54: Motorfunktionsanalyse der Weibchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT - Rotarod-Leistungstest

Verteilung der Zeiten auf dem Rotarod der weiblichen Versuchstiere auf der y-Achse zu den Zeitpunkten kurz vor der OP und den Tagen 1, 3 und 5 nach der OP auf der x-Achse, unterteilt jeweils mit einem Balken für „Cre- weiblich“ und „Cre+ weiblich“.

Bei der Zeit, die sich die Tiere auf dem Rotarod halten konnten, zeigten die Knockouttiere weder kurz vor der OP noch im Verlauf signifikante Unterschiede zu den Wildtyptieren.

Die einzelnen Mittelwerte deren Standardfehler werden in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Rotarod-Leistungstest	WT ♀	KO ♀
Zeit Prä-OP	106,8 ± 13,09 s	115,1 ± 10,82 s
	Nicht signifikant	
Zeit Post-OP 1d	53,38 ± 5,90 s	50,54 ± 4,65 s
	Nicht signifikant	
Zeit Post-OP 3d	62,00 ± 7,39 s	62,18 ± 7,46 s
	Nicht signifikant	
Zeit Post-OP 5d	67,0 ± 8,12 s	64,71 ± 7,96 s
	Nicht signifikant	

Tabelle 46: Motorfunktionsanalyse der Weibchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT - MW ± SEM des Rotarod-Leistungstest

Damit konnten durch die Motorfunktionsanalysen keine Rückschlüsse auf eine neuroprotektive Wirkung des Knockouts bei den weiblichen Tieren gezogen werden.

4.4.4.2 Motorfunktionsanalyse der Männchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT

Zunächst werden in einem Diagramm die Punktwerte des „NSS“ zu den jeweiligen Messzeitpunkten gezeigt.

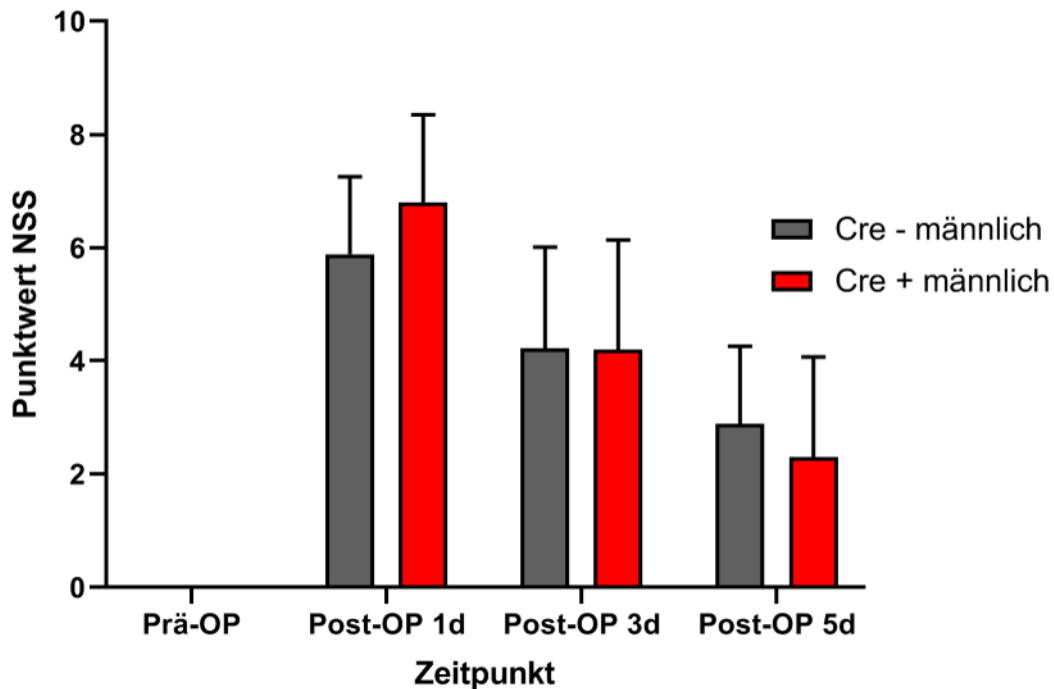


Abbildung 55: Motorfunktionsanalyse der Männchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT - Punktwerte des NSS

Verteilung der Punktwerte des NSS der männlichen Versuchstiere auf der y-Achse zu den Zeitpunkten kurz vor der OP und den Tagen 1, 3 und 5 nach der OP auf der x-Achse, unterteilt jeweils mit einem Balken für „Cre- männlich“ und „Cre+ männlich“.

Kurz vor der Operation erzielten alle Tiere im Test 0 Punkte und zeigten damit keine Einschränkungen. Im weiteren Verlauf unterschieden sich die Knockouttiere zu keinem Zeitpunkt und auch in der Entwicklung des Anstiegs bzw. Abfalls der Punkte nicht von den Wildtypieren.

Alle Mittelwerte und Standardfehler können aus der folgenden Tabelle entnommen werden.

NSS	WT ♂	KO ♂
Prä-OP	0,00	0,00
	Nicht signifikant	
Post-OP 1d	5,89 ± 0,45	6,80 ± 0,49
	Nicht signifikant	
Post-OP 3d	4,22 ± 0,60	4,20 ± 0,61
	Nicht signifikant	
Post-OP 5d	2,89 ± 0,45	2,30 ± 0,56
	Nicht signifikant	

Tabelle 47: Motorfunktionsanalyse der Männchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT - MW ± SEM der Punktwerte des NSS

Nachfolgend werden die Ergebnisse des „Rotarod-Leistungstests“ zu den jeweiligen Messzeitpunkten in einem Diagramm dargestellt.

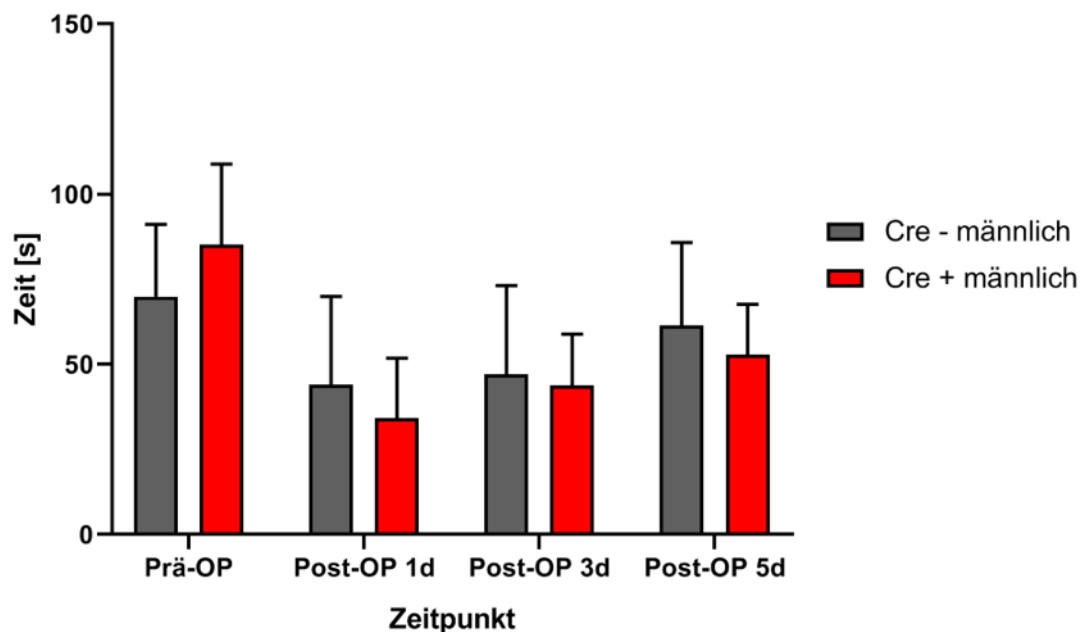


Abbildung 56: Motorfunktionsanalyse der Männchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT - Rotarod-Leistungstest

Verteilung der Zeiten auf dem Rotarod der männlichen Versuchstiere auf der y-Achse zu den Zeitpunkten kurz vor der OP und den Tagen 1, 3 und 5 nach der OP auf der x-Achse, unterteilt jeweils mit einem Balken für „Cre- männlich“ und „Cre+ männlich“.

Die Zeit, die sich die Tiere auf dem Rotarod halten konnten, zeigte zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen und auch die Entwicklung der Werte wies keine Unterschiede auf.

Die Mittelwerte und dazugehörigen Standardfehler können in der nachfolgenden Tabelle eingesehen werden.

Rotarod-Leistungstest	WT ♂	KO ♂
Zeit Prä-OP	69,86 ± 6,41 s	85,14 ± 7,14 s
	Nicht signifikant	
Zeit Post-OP 1d	44,0 ± 8,64 s	34,05 ± 5,62 s
	Nicht signifikant	
Zeit Post-OP 3d	47,0 ± 8,71 s	43,80 ± 4,75 s
	Nicht signifikant	
Zeit Post-OP 5d	61,44 ± 8,10 s	52,70 ± 4,70 s
	Nicht signifikant	

Tabelle 48: Motorfunktionsanalyse der Männchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT - MW ± SEM des Rotarod-Leistungstest

Zuletzt werden in einem Diagramm die Werte der **Videotrackingsoftware von Noldus**, also die zurückgelegte Gesamtstrecke innerhalb eines Messzeitraums von 2 min, dargestellt. Diese Daten wurden zu den gleichen Zeitpunkten wie der „NSS“ erhoben.

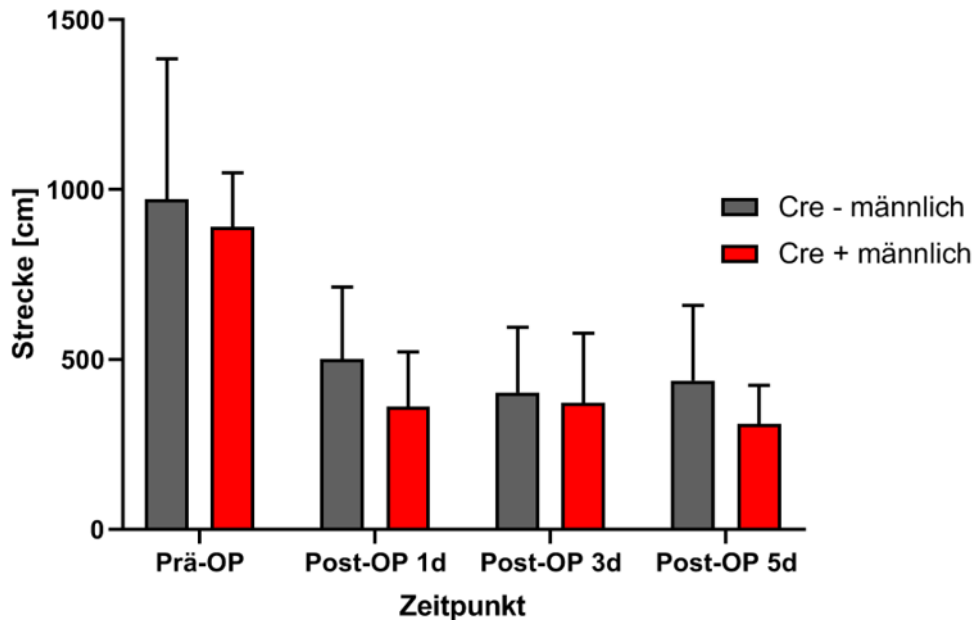


Abbildung 57: Motorfunktionsanalyse der Männchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT - Videotrackingsoftware von Noldus

Verteilung der innerhalb von 2 min zurückgelegten Strecke der männlichen Versuchstiere auf der y-Achse zu den Zeitpunkten kurz vor der OP und den Tagen 1, 3 und 5 nach der OP auf der x-Achse, unterteilt jeweils mit einem Balken für „Cre- männlich“ und „Cre+ männlich“.

Bei der innerhalb von 2 min zurückgelegten Strecke zeigten sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen den dargestellten Gruppen. Auch im Verlauf unterschieden sich die Werte der Wildtyp- und Knockouttiere nicht.

Die jeweiligen Messwerte werden in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

Noldus	WT ♂	KO ♂
Zurückgelegte Strecke Prä-OP	971,3 ± 124,9 cm	890,7 ± 47,86 cm
	Nicht signifikant	
Zurückgelegte Strecke Post-OP 1d	501,9 ± 70,64 cm	361,3 ± 51,0 cm
	Nicht signifikant	
Zurückgelegte Strecke Post-OP 3d	402,4 ± 64,30 cm	372,0 ± 64,99 cm
	Nicht signifikant	
Zurückgelegte Strecke Post-OP 5d	438,4 ± 73,78 cm	309,3 ± 36,32 cm
	Nicht signifikant	

Tabelle 49: Motorfunktionsanalyse der Männchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT - MW ± SEM der Videotrackingsoftware von Noldus

Somit ergaben sich bei den männlichen Tieren, wie auch zuvor bei den weiblichen Tieren, bei den Motorfunktionsanalysen keine Hinweise auf einen neuroprotektiven Effekt durch den Knockout.

4.4.5 Schadensvolumenanalyse

Die Analyse des Schadensvolumen 5 Tage nach induziertem SHT sollte untersuchen, wie sich der Schaden im Verlauf entwickelte und, ob der Knockout zu einer Verkleinerung des Schadens führen konnte, nachdem sich 6 Stunden nach dem CCI bei den männlichen Tieren die Tendenz einer neuroprotektiven Wirkung gezeigt hatte.

4.4.5.1 Schadensvolumenanalyse der Weibchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT

In Abbildung 58 werden die Diagramme für das **Kontusionsvolumen prozentual zur ipsilateralen Hemisphäre** und die **Ödemkorrektur** für die Gruppen „Cre- weiblich“ und „Cre+ weiblich“ dargestellt.

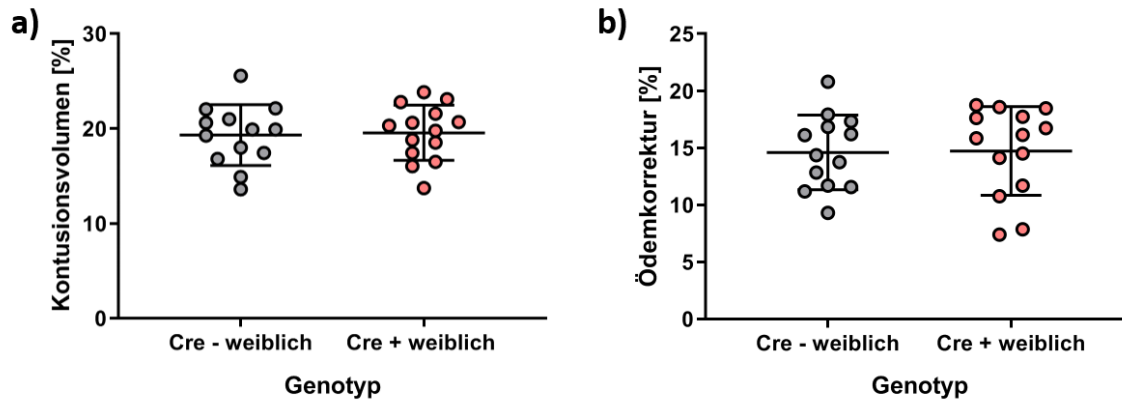


Abbildung 58: Schadensvolumenanalyse der Weibchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach in induziertem SHT - Kontusionsvolumen prozentual zur ipsilateralen Hemisphäre und Ödemkorrektur

Verteilung von in Diagramm **a)** Kontusionsvolumen prozentual zur ipsilateralen Hemisphäre in [%] und **b)** der Ödemkorrektur in [%] der weiblichen Versuchstiere auf der y-Achse innerhalb der beiden Gruppen des Genotyps „Cre- weiblich“ und „Cre+ weiblich“ auf der x-Achse.

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Wildtyp- und Knockouttieren.

Alle Mittelwerte und deren Standardfehler werden in der folgenden Tabelle dargestellt.

Schadensvolumenanalyse	WT ♀	KO ♀
Kontusionsvolumen prozentual zu Ipsilateral	19,32 ± 0,89 %	19,56 ± 0,78 %
	Nicht signifikant	
Ödemkorrektur	14,61 ± 0,91 %	14,73 ± 1,04 %
	Nicht signifikant	

Tabelle 50: Schadensvolumenanalyse der Weibchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach in induziertem SHT (MW ± SEM)

Somit zeigte sich nicht nur bei der Motorfunktionsanalyse, sondern auch bei der Schadensvolumenanalyse, kein signifikanter Unterschied zwischen den weiblichen Wildtyp- und Knockouttieren. Damit schien der Knockout bei den weiblichen Tieren in diesem Zusammenhang keinen neuroprotektiven Effekt gehabt zu haben.

4.4.5.2 Schadensvolumenanalyse der Männchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT

In Abbildung 59 werden die Diagramme des **Kontusionsvolumen prozentual zur ipsilateralen Hemisphäre** und der **Ödemkorrektur** für die Gruppen „Cre- männlich“ und „Cre+ männlich“ dargestellt.

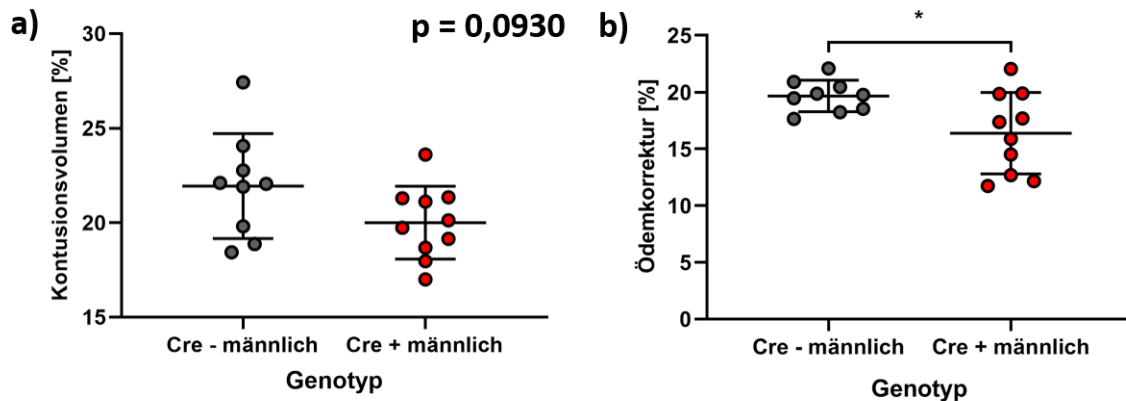


Abbildung 59: Schadensvolumenanalyse der Männchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach in induziertem SHT - Kontusionsvolumen prozentual zur ipsilateralen Hemisphäre und Ödemkorrektur

Verteilung von in Diagramm **a)** Kontusionsvolumen prozentual zur ipsilateralen Hemisphäre in [%] und **b)** der Ödemkorrektur in [%] der männlichen Versuchstiere auf der y-Achse innerhalb der beiden Gruppen des Genotyps „Cre- männlich“ und „Cre+ männlich“ auf der x-Achse.

Es ergab sich die Tendenz ($p = 0,0930$), dass das Kontusionsvolumen prozentual zur ipsilateralen Hemisphäre bei den Knockouttieren kleiner war als bei den Wildtypen. Die Ödemkorrektur zeigte einen signifikant ($p = 0,0199$) kleineren Wert bei den Knockout- als bei den Wildtypen.

Alle Mittelwerte mit dazugehörigem Standardfehler werden nachfolgend in der Tabelle aufgelistet.

Schadensvolumenanalyse	WT ♂	KO ♂
Kontusionsvolumen prozentual zu ipsilateral	21,94 ± 0,93 %)	20,0 ± 0,61 %
	Tendenziell p = 0,0930	
Ödemkorrektur	19,66 ± 0,46 %	16,38 ± 1,14 %)
	Signifikant p = 0,0199	

Tabelle 51: Schadensvolumenanalyse der Männchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach in induziertem SHT (MW ± SEM)

Damit zeigte sich bei der Schadensvolumenanalyse in Bezug auf das Kontusionsvolumen prozentual zur ipsilateralen Hemisphäre und die Ödemkorrektur,

im Gegensatz zu den Ergebnissen der Motorfunktionsanalysen eine neuroprotektive Wirkung durch den Knockout. Das Kontusionsvolumen ist tendenziell, bzw. nach dem Ausgleich des Ödems durch die Ödemkorrektur signifikant kleiner bei den Knockouttieren im Vergleich zu den Wildtypen. Damit konnten sich die Ergebnisse, einer vorwiegend neuroprotektiven Wirkung bei den männlichen Tieren, aus der Studie mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden bestätigen.

4.4.6 RNA-Analysen

Zusätzlich zu den proinflammatorischen Zytokinen TNF- α und IL-1 β für die Beurteilung der Neuroinflammation wurde bei den Studien mit einer Überlebenszeit von 5 Tagen nach dem CCI auch die mRNA-Expression von Iba1 untersucht. Iba1 ist ein Marker für Mikrogliazellen, den Gewebsmakrophagen des ZNS. Dies ermöglichte es zu beurteilen, inwieweit es bereits zu Umbauprozessen in den geschädigten Gehirnarealen gekommen ist. Da diese Umbauprozesse nicht innerhalb weniger Stunden in Kraft treten, wurde diese Analyse erst bei den Studien mit einer Überlebenszeit von 5 Tagen durchgeführt.

4.4.6.1 RNA-Analysen der Weibchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT

In Abbildung 60 werden die Messergebnisse der mRNA-Expression von TNF- α , IL-1 β und Iba1 in den Gruppen „Cre- weiblich“ und „Cre+ weiblich“ dargestellt.

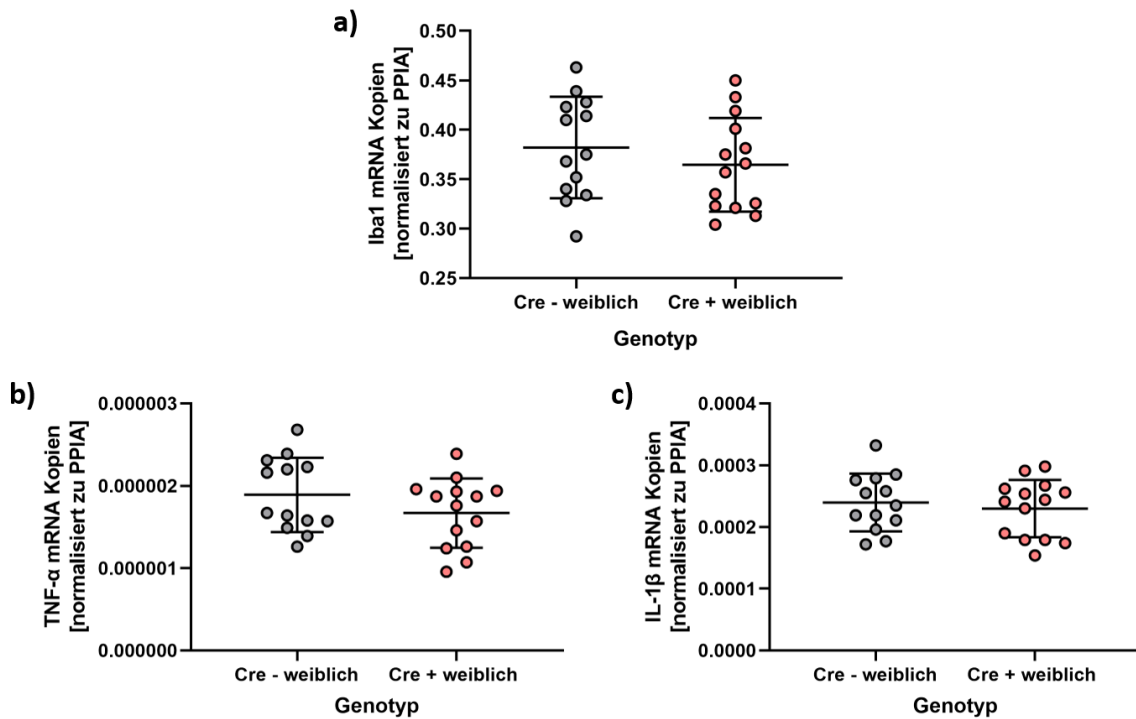


Abbildung 60: PCR der Weibchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT - mRNA-Expression von Iba1, TNF- α und IL-1 β

Verteilung der mRNA-Expression von in Diagramm **a)** Iba1, **b)** TNF- α und **c)** IL-1 β der weiblichen Versuchstiere auf der y-Achse innerhalb der beiden Gruppen des Genotyps „Cre- weiblich“ und „Cre+ weiblich“ auf der x-Achse.

Sowohl die Marker für die Neuroinflammation als auch der Mikroglia Zellen zeigten keine signifikanten Unterschiede der beiden Gruppen.

Die Mittelwerte und Standardfehler werden in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

RNA-Analysen	WT ♀	KO ♀
mRNA-Expression von Iba1	$38,20 \times 10^{-2} \pm 14,23 \times 10^{-3}$	$36,46 \times 10^{-2} \pm 12,64 \times 10^{-3}$
	Nicht signifikant	
mRNA-Expression von TNF- α	$1,89 \times 10^{-6} \pm 1,25 \times 10^{-7}$	$1,67 \times 10^{-6} \pm 1,12 \times 10^{-7}$
	Nicht signifikant	
mRNA-Expression von IL-1 β	$23,95 \times 10^{-5} \pm 1,29 \times 10^{-5}$	$22,99 \times 10^{-5} \pm 1,24 \times 10^{-5}$
	Nicht signifikant	

Tabelle 52: PCR der Weibchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT - MW \pm SEM der mRNA-Expression von Iba1, TNF- α und IL-1 β

Somit passte das Ergebnis der RNA-Analysen zu den Ergebnissen der Motorfunktions- und Schadensvolumenanalysen.

4.4.6.2 RNA-Analysen der Männchen mit einer Überlebenszeit von 5 Tagen nach induziertem SHT

In Abbildung 61 werden die Messergebnisse der mRNA-Expression von TNF- α , IL-1 β und Iba1, differenziert zwischen „Cre- männlich“ und „Cre+ männlich“, dargestellt.

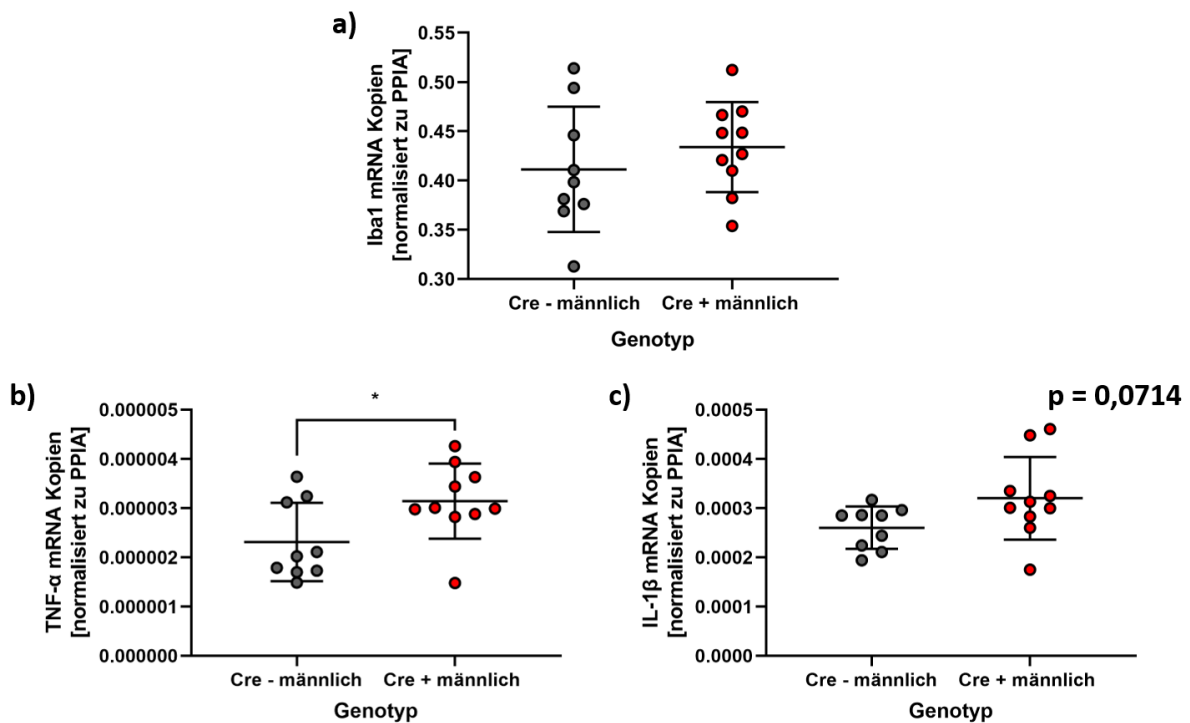


Abbildung 61: PCR der Männchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT - mRNA-Expression von Iba1, TNF- α und IL-1 β

Verteilung der mRNA-Expression von in Diagramm **a)** Iba1, **b)** TNF- α und **c)** IL-1 β der Versuchstiere auf der y-Achse innerhalb der beiden Gruppen des Genotyps „Cre- männlich“ und „Cre+ männlich“ auf der x-Achse.

Bei der Analyse von Iba1, dem Marker für die Mikroglia Zellen, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Die Marker für die Neuroinflammation zeigten jedoch bei der Analyse der mRNA-Expression von TNF- α signifikant ($p = 0,0333$) und bei IL-1 β ($p = 0,0714$) tendenziell höhere Werte bei den Knockout- als den Wildtypen.

Die Mittelwerte und deren Standardfehler werden in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

RNA-Analysen	WT ♂	KO ♂
mRNA-Expression von Iba1	$41,13 \times 10^{-2} \pm 21,21 \times 10^{-3}$	$43,39 \times 10^{-2} \pm 14,46 \times 10^{-3}$
	Nicht signifikant	
mRNA-Expression von TNF- α	$2,32 \times 10^{-6} \pm 2,65 \times 10^{-7}$	$3,14 \times 10^{-6} \pm 2,41 \times 10^{-7}$
	Signifikant p = 0,0333	
mRNA-Expression von IL-1 β	$26,02 \times 10^{-5} \pm 1,43 \times 10^{-5}$	$32,01 \times 10^{-5} \pm 2,65 \times 10^{-5}$
	Tendenziell p = 0,0714	

Tabelle 53: PCR der Männchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT - MW \pm SEM der mRNA-Expression von Iba1, TNF- α und IL-1 β

Damit ergaben sich für die Neuroinflammation bei den Knockouttieren höhere Werte als bei den Wildtypen. Dies widerspricht den vorherigen Ergebnissen der Schadensvolumenanalyse.

Zusammengefasst zeigten die Ergebnisse damit für die weiblichen Tiere, dass der Knockout hier keinen neuroprotektiven Einfluss auf die Tiere hatte und zu keiner signifikanten Veränderung diesbezüglich führte. Damit konnte bei den weiblichen Knockouttieren im Vergleich zu den Wildtypen kein neuroprotektiver Effekt gezeigt werden.

Die Studie der männlichen Tiere mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen konnte die Ergebnisse aus der Studie mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden bestätigen. Der Knockout konnte bei den männlichen Tieren einen gewissen neuroprotektiven Effekt zeigen, der sich durch die Schadensvolumenanalyse äußerte, jedoch nicht durch die Motorfunktionsanalysen.

5 Diskussion

5.1 Einfluss der Thrombozyten und des Knockouts auf den sekundären Hirnschaden

In dieser Arbeit wurde mit einem spezifischen Knockout des SGLT-2-Transporters auf den Thrombozyten von Mäusen gearbeitet. SGLT-2-Transporter sind sekundär aktive Zuckertransporter, welche durch einen Kotransport mit Natrium Glukose entgegen des Konzentrationsgefälles nach intrazellulär transportieren. Hierbei machen sie sich das bestehende Konzentrationsgefälle von Natrium von extra- nach intrazellulär zu Nutze. Ziel des in dieser Arbeit verwendeten Knockouts war es bei dem experimentell induziertem SHT so im Rahmen der pathophysiologischen Mechanismen des sekundären Hirnschadens der übersteigenden Aktivierung von Thrombozyten entgegenzuwirken. Durch die durch den Knockout fehlende Glucose sollte der Energiehaushalt der Thrombozyten reduziert werden und so die Thrombozytenaggregationsfähigkeit vermindert werden. Über diesen Mechanismus sollte ein neuroprotektiver Effekt bewirkt werden und der sekundäre Hirnschaden verringert werden.

Die hierbei relevante Gerinnungskaskade besteht aus der primären und sekundären Hämostase und kann durch ein SHT, wie es in dieser Arbeit experimentell erfolgt ist, gestört ablaufen, sodass es über verschiedene Mechanismen zu einer Hyper- oder Hypokoaguabilität kommen kann. Diese pathologischen Veränderungen haben wiederum negative Auswirkungen auf den sekundären Hirnschaden und das spätere klinische Outcome ist mit einer erhöhten Mortalität und Morbidität assoziiert (127). Dahinter verbergen sich viele komplexe Mechanismen, die bis heute noch nicht vollständig verstanden sind (97). Durch die mit dem SHT einhergehende Zerstörung von Zellen und die konsekutive Freisetzung von Plättchen-aktivierenden und prokoagulatorischen Molekülen werden viele molekulare Mechanismen in Gang gesetzt, welche die Gerinnung aktivieren (128). Da das Hirnparenchym reich an Molekülen und Botenstoffen ist (103, 129, 130), die mit dem Gerinnungssystem interagieren, wurde dieses Phänomen als möglicher Ansatzpunkt einer Therapie zur Verringerung des sekundären Hirnschadens erkannt (131, 132). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass eine Gabe von Enoxaparin (niedermolekulares Heparin) nach einem SHT das Hirnödem, das Kontusionsvolumen und klinisch die allgemeine Neurologie verbesserte (133, 134). Dieser therapeutische Ansatz

interagiert jedoch vor allem mit der sekundären Hämostase, während der Knockout auf Thrombozyten im Rahmen dieser Versuche vor allem auf die primäre Hämostase Einfluss nimmt. Somit lässt sich jedoch der in dieser Arbeit durch eine verminderte Thrombozytenaggregationsfähigkeit gezeigte neuroprotektive Effekt erklären. Denn auch Thrombozyten als Teil der primären Hämostase haben eine wichtige Rolle im Rahmen der pathophysiologischen Prozesse bei der Entstehung des sekundären Hirnschadens und können das Hirnödem, das Kontusionsvolumen und die allgemeine Neurologie durch eine Inhibierung, was in dieser Arbeit durch den Knockout von SGLT-2 erreicht werden sollte, verbessern.

5.1.1 Kohlenhydrat-Metabolismus der Thrombozyten

Kohlenhydrate wie Glukose und Glykogen stellen den wichtigsten Energielieferanten für Thrombozyten dar. Die Mechanismen der Glykolyse und der oxidativen Phosphorylierung der Mitochondrien in den Thrombozyten ermöglichen die Bildung eines Blutgerinnsels, denn das dabei entstehende Adenosintriphosphat (ATP) sorgt für die Aggregation der Blutplättchen (135, 136). So führen auch die Thrombozyten-Aktivatoren wie Thrombin und Epinephrin nicht nur zur Agglutination, sondern steigern gleichzeitig die Glykogenolyse und die Aufnahme von Glukose in die Thrombozyten (137). So zeigte sich auch bei metabolischem Stress, dass Thrombozyten Glukose anstatt Fettsäuren für den oxidativen Metabolismus bevorzugen (138).

Dies erklärt die wichtige Bedeutung, welche Glukose im Stoffwechsel der Thrombozyten hat und die möglichen Auswirkungen einer verminderten Aufnahme. Da der größte Teil der Glukose durch die Glukose-Transporter (GLUT) 1 und 3 passiv in die Thrombozyten aufgenommen wird (139), fehlt den Thrombozyten durch den fehlenden SGLT-2-Transporter nur ein kleiner Anteil der Substrate, die für die Energieversorgung benötigt werden. So zeigte sich auch bei einer Aktivierung der Thrombozyten durch Thrombin eine Translokation von GLUT 3 von den α -Granula in die Plasmamembran und damit eine vermehrte Glukose-Aufnahme (140). Auch konnte bei Mäusen mit einem Knockout von GLUT 1 und 3 auf den Thrombozyten gezeigt werden, dass bei diesen eine fast vollständige Hemmung der Thrombozyten-Aktivierung eintrat (141). Somit decken die Thrombozyten den größten Teil ihres Energiebedarfs über die Aufnahme von Glukose über die GLUT-Transporter ab. Daher sollte der Knockout von SGLT-2 auf den Thrombozyten bewirken, dass die

Thrombozyten unter normalen Bedingungen mit ausreichend Energie versorgt werden und keine Funktionseinschränkungen aufweisen. Denn der Knockout sollte keine vermehrte Blutungsneigung bewirken. Im Zustand von vermehrter Aktivierung, wie es bei einem SHT der Fall ist, sollten die Thrombozyten nicht mehr auf die aktive Glukose-Aufnahme durch den SGLT-2-Transporter zurückgreifen können, sodass sie nicht überaktiviert werden können und es nicht zum Zustand der Hyperkoaguabilität kommen kann.

5.1.2 SGLT-2-Transporter auf Thrombozyten

Die Rolle des SGLT-2-Transporters ist normalerweise der sekundär aktive Transport von Glukose durch eine Membran (142). In der Literatur gibt es seit längerer Zeit voneinander abweichende Ansichten über die Expression von SGLT-2-Transportern. Es gibt unterschiedliche Ergebnisse zu den Geweben und Spezies, bei denen SGLT-2 vorkommen soll. Einige Autoren beschreiben eine hohe und fast ausschließliche Spezifität des SGLT-2-Transporters für die Niere (143, 144). In anderen Arbeiten wurde SGLT-2 zwar in der höchsten Konzentration ebenfalls in der Niere nachgewiesen, aber auch zusätzlich in anderen Geweben, wie der Schilddrüse, dem Herzen, der Leber, dem Gehirn und den Muskeln (145-147).

Transkriptom-Daten aus Thrombozyten zeigen, dass SGLT-2 auf Thrombozyten exprimiert wird (148). Von den 34039 untersuchten Gentranskripten und Transkriptvarianten ergab sich in den Untersuchungen der Thrombozyten bei 7301 ein positives Hybridisierungssignal und damit ein sicherer Nachweis des Transporters auf Thrombozyten. Das Gen SLC5A2, welches für den SGLT-2-Transporter kodiert, war beim Hybridisierungssignal mit einer mittleren Fluoreszenzintensität von 17757,3 und einer Standardabweichung von 2453,6 auf Platz 1756 und damit im oberen Viertel der nachgewiesenen Gene. Vermutlich werden viel mehr mRNA-Spezies in Thrombozyten exprimiert als bisher angenommen (149).

Eine Studie zu den SGLT-2-Inhibitoren Empagliflozin und Dapagliflozin zeigte eine durch diese Wirkstoffe verminderte ADP-abhängige Aktivierung von Thrombozyten (150). ADP wirkt dabei wie der „PAR-4“-Agonist als Agonist von Thrombozyten. Diese Daten sind übereinstimmend mit der ebenfalls tendenziell verminderten Thrombozytenaggregationsfähigkeit bei den männlichen Mäusen mit einem Thrombozyten-spezifischen Knockout des SGLT-2-Transporters bei den

Experimenten dieser Arbeit. Nachfolgend wurden zu dieser Studie Untersuchungen zu der Kausalität dieser Ergebnisse durchgeführt. Anhand von PCR- und Western-Blot-Untersuchungen kam man zu dem Schluss, dass keine SGLT-2-Transporter auf menschlichen Thrombozyten exprimiert werden. Der Effekt der verminderten Thrombozyten-Aktivierung wurde auf eine Hemmung des Natrium-Protonen-Austauscher (NHE) zurückgeführt. Diese Ergebnisse sind jedoch mit Bedacht zu betrachten. Denn für den Western Blot, bei dem kein SGLT-2 auf den Thrombozyten nachgewiesen werden konnte, benötigt man einen AK gegen SGLT-2. Die AK, die auf dem Markt sind, sind hierzu wahrscheinlich nicht ausreichend spezifisch. So zeigte sich in unserem Labor bei Versuchen mit diesen SGLT-2-AK, dass diese sowohl bei Wildtypmäusen, welche überall ganz normal SGLT-2 exprimieren sollten, als auch bei Knockoutmäusen, bei denen SGLT-2 auf allen Zellen ausgeschaltet wurde, trotzdem die identischen Strukturen angefärbt wurden. Auch die PCR Ergebnisse können eine fehlende Expression von SGLT-2 auf Thrombozyten nicht sicher beweisen. Da Thrombozyten keinen Kern haben und durch Abspaltungen aus den Megakaryozyten entstehen, ist es schwierig mRNA aus Thrombozyten zu isolieren, da sie nur in Fragmenten vorliegt. Außerdem wurde in dieser Studie durch die Versuche mit Amilorid und Cariporid, welche den NHE hemmen und dadurch die ADP-abhängige Thrombozyten-Aktivierung vermindern, nur gezeigt, dass die ADP-abhängige Thrombozyten-Aktivierung ein Prozess ist, der von NHE abhängig ist und bei gehemmtem NHE weniger gut ablaufen kann. Es wurde nicht bewiesen, dass die SGLT-2-Inhibitoren ihre Wirkung auf die Thrombozyten über den NHE entfaltet haben. Dazu hätte man einen Versuch mit Amilorid/Cariporid und einem SGLT-2-Inhibitor durchführen müssen, um zu überprüfen, ob weiterhin eine Hemmung der Thrombozyten-Aktivierung stattfinden kann oder nicht. Wenn dies nicht der Fall gewesen wäre, hätte es gezeigt, dass die Wirkung der SGLT-2-Inhibitoren über den NHE vermittelt wurde und nicht über den SGLT-2-Transporter. Eine weitere Studie mit Empagliflozin an diabetischen Ratten ergab durch den SGLT-2-Inhibitor eine Hemmung der Thrombozyten Aktivierung (151). Dabei zeigten die diabetischen Ratten, die mit dem SGLT-2-Inhibitor behandelt wurden, eine signifikant niedrigere Expression von P-Selektin als die diabetischen Ratten ohne Empagliflozin. P-Selektin ist unter anderem ein Marker für die Thrombozytenaktivierung und Aggregation, welche folglich durch einen SGLT-2-Inhibitor gehemmt wurde.

Somit besteht keine eindeutige Sicherheit ob SGLT-2-Transporter tatsächlich auf Thrombozyten vorkommen. In dieser Arbeit wurde jedoch ausschließlich mit einem genetischen Knockout von SGLT-2-Transportern auf Thrombozyten gearbeitet. Außerdem konnten sowohl in den Vorstudien mit einem unspezifischen SGLT-2-Transporter Knockout auf allen Zellen als auch in den Studien dieser Arbeit mit einem Thrombozyten-spezifischen SGLT-2 Knockout ein Phänotyp gezeigt werden. Es ergaben sich jeweils eine veränderte Thrombozytenaggregationsfähigkeit und neuroprotektive Effekte. Da an den Tieren keine sonstigen Veränderungen vorgenommen wurden, können diese Effekte nur auf den Thrombozyten-spezifischen Knockout des SGLT-2-Transporters zurückgeführt werden.

Eine weitere Theorie, die an dieser Stelle ebenfalls in Betracht gezogen werden kann, ist die Möglichkeit, dass auf den Thrombozyten selbst keine SGLT-2-Transporter vorkommen, dafür aber auf den Megakaryozyten, von denen sich die Thrombozyten abschnüren und der Knockout dadurch trotzdem seinen Phänotyp entfaltet. Da Megakaryozyten in dieser Arbeit jedoch nicht untersucht wurden, würde es diesbezüglich noch weitere Untersuchungen benötigen.

5.1.3 Aktivierung der Thrombozyten im Rahmen des SHT

Untersuchungen konnten zeigen, dass es nach einer Hirnverletzung zu einer vorübergehenden verstärkten Aktivierung von Thrombozyten durch eine gesteigerte Thrombozytenaggregation kommt (127, 152, 153). Vor allem 6 Stunden nach einem induzierten SHT zeigte sich ein Anstieg der Thrombozytenaggregation und normalisierte sich erst 24 Stunden nach dem SHT (152, 154). Aufgrund dieser Vorergebnisse fand in dieser Arbeit die Testung der Thrombozytenaggregationsfähigkeit bei den Mäusen mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT statt. In weiteren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass sich in der perikontusionalen Zone Mikrothromben bildeten, in deren Entstehung der PAF involviert war. Diese Mikrothromben-Formationen führten dort zu einem vermindertem zerebralem Blutfluss (CBF) und zu ischämischen Folgeschäden (155). Auch bestätigte sich, dass dabei die Thrombozyten-Aktivierung und nicht eine arterielle Vasokonstriktion für den verminderten CBF verantwortlich war, denn die gebildeten Thromben verhinderten die zerebrale Mikrozirkulation (87). Auch bei der bei einem SHT entstehenden Neuroinflammation, die durch das Einwandern von

Immunzellen durch die BHS aufrechterhalten wird, konnte ein Zusammenhang mit der Aktivierung von Thrombozyten und der Gerinnung gezeigt werden. Die Aktivierung der Gerinnung und die Neuroinflammation laufen nicht unabhängig voneinander ab. So führen die einwandernden Immunzellen auch zu einer Entstehung von Mikrothromben in den Gefäßen des Gehirns (156, 157). Die vermehrte Plättchen-Aktivierung ist jedoch nicht nur die Folge von einer vermehrten Neuroinflammation, denn zusätzlich sind die Thrombozyten auch selber Initiatoren und Verstärker von entzündlichen Prozessen, sodass sich eine beidseitige Wechselwirkung ergibt (158). Aufgrund dieser relativen Abhängigkeit der beiden Mechanismen voneinander wurden in dieser Arbeit die mRNA-Expressionen von TNF- α , IL-1 β und Iba1 als Marker der Neuroinflammation untersucht. Dabei zeigten sich bei den männlichen Knockout-Mäusen im Vergleich zu den männlichen Wildtyp-Mäusen 5 Tage nach induziertem SHT signifikant erhöhte Werte für TNF- α und tendenziell erhöhte Werte von IL-1 β . Dies zeigt die Abhängigkeit von Gerinnung und Neuroinflammation, welche in Abschnitt 5.3 genauer beschrieben wird. Bei der Hyperkoaguabilität, die durch verschiedene bereits oben erwähnte Mechanismen hervorgerufen wird und durch eine vermehrte Aktivität der Thrombozyten entsteht, kommt es nicht zu einer Erhöhung der absoluten Anzahl der Thrombozyten (154). Diese Beobachtungen spiegeln sich ebenfalls bei den Studien dieser Arbeit wider, wo sich bei der Bestimmung der Thrombozytenanzahl keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen vor und nach SHT zeigten.

Dies verdeutlicht die wichtige Rolle, die die Aktivität der Thrombozyten in den pathophysiologischen Mechanismen nach einem SHT spielt, da die daraus resultierende Hyperkoaguabilität zu einem größeren sekundären Hirnschaden führen kann. Daher könnte ein möglicher neuroprotektiver Effekt durch eine Hemmung der Aktivität der Thrombozyten erreicht werden, welcher sich auch in der signifikant erniedrigten Ödemkorrektur der männlichen Knockouttiere 5 Tage nach induziertem SHT widerspiegelt.

5.1.4 Messung der Thrombozytenfunktion

Die veränderte Koagulabilität im Rahmen eines SHT kann besser mit Thrombozyten-spezifischen Verfahren wie der Thromboelastographie als mit Plasma-basierenden Verfahren wie der Prothrombin-Zeit oder der aktivierten partiellen Thromboplastin-Zeit nachgewiesen werden (127, 154, 159). Daher wurden in dieser Arbeit zur

Untersuchung des Gerinnungssystems die Thrombozytenaggregationsfähigkeit getestet und keine plasmabasierten Untersuchungen vorgenommen. Hierzu wurde als Testverfahren der Multiplate® Analyzer Test genutzt. Dazu wurde in eine Messzelle mit zwei SensorendrÄhten eine vordefinierte Menge eines Agonisten zu dem Vollblut der Maus gegeben und dann die Geschwindigkeit und die StÄrke der VerÄnderung des elektrischen Widerstands bzw. der Impedanz zwischen den beiden SensorendrÄhten gemessen. Da der Agonist den Startpunkt der gemessenen Reaktion darstellt und unterschiedliche Agonisten zu unterschiedlichen Reaktionen föhren, spielt er eine wichtige Rolle für die Auswertung und die Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Bei diesen Versuchen arbeitete man mit einem „PAR-4“-Agonisten. Da jedoch das „PAR-4 Test Reagenz Kit“ aus den früheren Versuchen, mit der Defizienz von SGLT-2 auf allen Zellen der MÄuse, nicht mehr vertrieben wurde, musste, entsprechend Abschnitt 3.2.8.2, ein Agonist der Firma „AnaSpec“ verwendet werden. Es wurde weiterhin das Protokoll des alten Kits befolgt, jedoch konnte durch den anderen Agonisten eine vollständige Übereinstimmung der neuen Tests, mit denen der früheren Versuche, nicht garantiert werden. Dementsprechend entstanden im Gegensatz zu den Versuchen der Vorstudie des unspezifischen Knockouts von SGLT-2 UnregelmÄßigkeiten in den Ergebnissen. Dies spiegelte sich darin wider, dass die bei den Versuchen generierten Kurve nicht bis zu einem Plateau anstiegen und dann auf diesem Niveau blieben, sondern gegen Ende der Messungen abfielen. Dies ist beim Vergleich einer Beispielkurve aus Abbildung 62 mit der Musterkurve aus Abbildung 4 zu erkennen. Bei den Versuchen der Vorstudien mit der vollständigen Defizienz von SGLT-2 auf allen Zellen entsprachen die Kurven weitestgehend denen der Musterkurve in Abbildung 4. Darüber hinaus konnten die Versuche zur Bestimmung der Thrombozytenaggregationsfähigkeit nur bei den Studien der nativen Tiere und der Studie mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden durchgeführt werden, da nicht genügend Messzellen zur Verfügung standen und diese Messzellen für Tierversuche nicht mehr hergestellt wurden. Somit konnte die Thrombozytenaggregationsfähigkeit bei den Versuchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nicht mehr untersucht werden. Daher sind die Ergebnisse dieser Versuche nur eingeschränkt zu verwerten. Da jedoch Literaturdaten nahelegen, dass sich die Gerinnung etwa 24 Stunden nach stattgehabtem SHT sich wieder normalisiert (152, 154), kann angenommen werden, dass die Messungen bei den Tieren mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden ausreichend sind. Trotzdem war den Messungen deutlich zu entnehmen, dass es bei

den männlichen Knockouttieren im Vergleich zu den Wildtypen zu einer veränderten Thrombozytenaggregationsfähigkeit gekommen war, während sie bei den weiblichen Tieren völlig unverändert blieb. Diese Veränderung stellte sich bei den Knockouttieren nach dem SHT durch eine Verminderung der Thrombozytenaggregationsfähigkeit dar. Zusätzlich sprechen auch die Ergebnisse der Thrombozytenaggregationsfähigkeit der Mäuse mit einem vollständigen Fehlen von SGLT-2 (s. Abbildung 7), durch einen so induzierten Energiemangel der Thrombozyten (135, 136), für eine verminderte Aktivierbarkeit dieser.

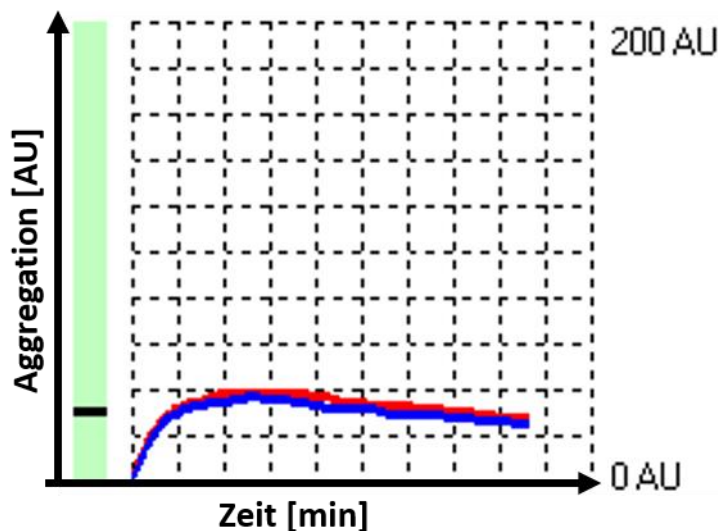


Abbildung 62: Beispielkurve einer Multiplate® Analyzer Messung

Das Diagramm zeigt den Kurvenverlauf einer Multiplate® Analyzer Messung aus dem Blut einer Maus 6 Stunden nach induziertem SHT. Da pro Messzelle zwei Sensorendrahtpaare enthalten sind, findet jeweils eine Doppelbestimmung statt. Dadurch entsteht eine rote und eine blaue Linie. Anders als bei der Musterkurve aus Abbildung 4 steigen die Kurven nicht bis zu einem Plateau an, sondern fallen nach dem Erreichen dessen wieder ab.

5.1.5 Neuroprotektion durch eine verminderte Aktivität von Thrombozyten

In Tiermodellen konnte durch PAF-Rezeptor-Antagonisten ein neuroprotektiver Effekt gezeigt werden (160, 161). PAF spielt eine wichtige Rolle in der primären Hämostase und führt zur Thrombozytenaktivierung und Aggregation. Es scheint aber auch an vielen anderen pathologischen Prozessen beteiligt zu sein (162). So bewirkt es beispielsweise einen verminderten CBF und verändert die Bluthirnschranke. In den Studien zeigte sich durch das Antagonisieren von PAF eine signifikante Erniedrigung

sowohl des Wassergehaltes als auch des Schadensvolumens nach traumatischen Hirnschäden. So führte auch bei den männlichen Knockouttieren mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT die verminderte Thrombozytenaktivität in der Schadensvolumenanalyse zu einem neuroprotektivem Effekt durch eine signifikant verminderte Ödemkorrektur. Bei Menschen mit einer medikamentösen Thrombozyten-Hemmung, beispielsweise durch ASS (Cyclooxygenase-Hemmer) oder Clopidogrel (ADP-Rezeptor-Inhibitor), ergab sich jedoch nach traumatischen Hirnverletzungen eine erhöhte Morbidität und Mortalität (163, 164). Dies kam allerdings vor allem durch eine verstärkte Blutungsneigung zustande. Entscheidend für einen neuroprotektiven Effekt ist daher, dass die veränderte Aktivität der Thrombozyten nicht zu einem erhöhten Blutungsrisiko führt. Eine Inhibition der Thrombozyten in einem frühen Abschnitt des Aktivierungssignalweges zeigte im Gegensatz zu einer Blockade im finalen Teil des Aktivierungssignalweges eine bessere neuroprotektive Wirkung und ein niedrigeres Risiko für intrakranielle Blutungen (165). Die Hemmung des finalen Signalweges der Thrombozyten-Aktivierung durch Anti-GPIIb/IIIa-Antikörper erbrachte keinen positiven Einfluss auf das Schadensvolumen oder das funktionelle Ergebnis. Dafür jedoch erhöhte sich das Risiko für intrazerebrale Blutungen und das Mortalitätsrisiko. Demgegenüber führten Antikörper gegen GPIIb-alpha oder GPVI, welche in einen früheren Abschnitt des Signalweges der Thrombozytenaktivierung eingreifen, zu einem signifikant verringerten Schadensvolumen und besserem neurologischen Status, ohne dabei das Risiko für Blutungen zu erhöhen.

Daher sollte durch den SGLT-2 Knockout bei den Thrombozyten und dem damit einhergehenden Eingriff in ihren Glukose-Metabolismus deren Aktivität bereits am Beginn der Aktivierung reduziert werden, ohne dabei das Blutungsrisiko zu erhöhen.

5.2 Erhöhte Thrombozytenaggregationsfähigkeit der nativen männlichen Knockouttiere

Die männlichen Knockouttiere zeigten im nativen Zustand verglichen zu den männlichen Wildtyptieren eine verstärkte Thrombozytenaggregationsfähigkeit. Die Ursache und der zugrundeliegende Mechanismus konnten in dieser Arbeit nicht vollständig geklärt werden. Es kann jedoch die Vermutung aufgestellt werden, dass die genetisch veränderten Versuchstiere eine Anpassungsreaktion durchlaufen haben.

Da die Knockouttiere ohne SGLT-2-Transporter auf den Thrombozyten geboren wurden und sich deren Aktivität und Funktion dementsprechend verändert darstellte kann die primäre Hämostase nicht vollständig mit ihren gewöhnlichen Mechanismen ablaufen. Dadurch könnten sich Kompensationsmechanismen ausgebildet haben um mögliche Risiken und Komplikationen wie einer erhöhten Blutungsneigung entgegenzuwirken. Teilweise kann es bei solchen Kompensationsmechanismen zu einer Überkompensation kommen, welche die erhöhte Thrombozytenaggregationsfähigkeit bei den nativen männlichen Knockouttieren erklären würde. Solche Phänomene zeigen sich auch in anderen Bereichen: So haben Patienten mit einer Immunthrombozytopenie durch Autoantikörper eine verminderte Anzahl an Thrombozyten. Trotzdem weisen sie in Relation gesehen selten Blutungen auf und haben teilweise sogar ein erhöhtes Risiko für Thrombosen. Dies liegt an prokoagulativen Mechanismen wie einer erhöhten Protein C Resistenz und höheren Spiegel des Plasminogen Aktivators Inhibitor-1. Dabei zeigen diese Patienten auf der einen Seite durch die Autoantikörper eine verlängerte Gerinnelbildungszeit und andererseits gleichzeitig eine erhöhte maximale Gerinnselfestigkeit und durch den vermehrten Plasminogen Aktivator Inhibitor-1 eine erhöhte Resistenz der entstandenen Gerinnel gegenüber der Fibrinolyse. Dadurch wurde die Thrombozytopenie kompensiert und teilweise sogar überkompensiert (166). Bei den nativen Knockouttieren ist die Anzahl der Thrombozyten nicht verändert, dafür jedoch die Funktion und kann damit am ehesten mit einer Thrombozytopathie verglichen werden, welche kompensiert werden muss. Die erhöhte Thrombozytenaggregationsfähigkeit der nativen männlichen Knockouttiere zeigte sich bei der verwendeten Testmethode, dem Multiplate® Analyzer, als eine höhere AUC. Die AUC setzt sich dabei aus der Höhe der Aggregation der Thrombozyten und der Geschwindigkeit der Zunahme der Aggregation zusammen. Diese Geschwindigkeit der Zunahme, auch als Velocity bezeichnet, ist dabei vergleichbar mit der beschriebenen Gerinnelbildungszeit aus der Studie der Immunthrombozytopenie Patienten und die Aggregation mit der Gerinnselfestigkeit. Schaut man sich die Aggregation und die Velocity getrennt an (in dieser Arbeit wurde mit der AUC nur das Integral aus der Kurve der Aggregation über die Zeit dargestellt), so ist auch bei den männlichen nativen Knockouttieren nur die Aggregation erhöht, während die Velocity unverändert blieb. Weitere Beispiele mit anderen Kompensationsmechanismen zeigen sich bei Patienten mit Leberzirrhose, die an einer Thrombozytopenie leiden.

Die dabei eingeschränkte primäre Hämostase aufgrund reduzierter Thrombozytenanzahl und -funktion kann durch eine erhöhte Plasmakonzentration des von Willebrand Faktors teilweise kompensiert werden (167, 168). Außerdem können die verminderte Gerinnselfestigkeit und Blutungsneigung, die durch eine Thrombozytopenie nach kardiochirurgischen Eingriffen auftritt, durch erhöhte Werte von Fibrinogen kompensiert werden (169).

Welcher Mechanismus zu einer verstärkten Thrombozytenaggregationsfähigkeit bei den nativen männlichen Knockouttieren geführt hat, ist nicht bekannt. Dazu müssten weiterführende Untersuchungen wie zum Beispiel zur oben genannten Protein C Resistenz oder den Konzentrationen von Plasminogen-Aktivator Inhibitor-1, von Willebrand Faktor und Fibrinogen durchgeführt werden. Es lässt sich jedoch davon ausgehen, dass es im Rahmen eines SHT zu einer Dekompensation dieser Kompensationsmechanismen kommt. Vergleichbar mit einer kardialen Dekompensation bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz im Rahmen einer akuten Infektion. Die Ausgleichsmechanismen des Körpers sind erschöpft. Dass sich ein solcher Kompensationsmechanismus bei den weiblichen nativen Tieren nicht darstellte, liegt höchstwahrscheinlich an der generell unterschiedlichen Aktivität von Thrombozyten bei Weibchen. Weibliche Tiere zeigen ein stärker ablaufendes Gerinnungssystem und benötigen daher vermutlich keinerlei Kompensation. Auf diese Geschlechterunterschiede bei der Gerinnung im Kontext des SHTs wird in Abschnitt 5.4 näher eingegangen.

5.3 Veränderte Neuroinflammation der männlichen

Knockouttiere 5 Tage nach induziertem SHT

Die männlichen Knockouttiere zeigten 5 Tage nach induziertem SHT eine gegenüber den Wildtyptieren veränderte Expression der gemessenen Neuroinflammations-Marker. Thrombozyten spielen eine wichtige Rolle als Mediatoren und Regulatoren der Neuroinflammation (170-172). In einem komplexen System interagieren die Thrombozyten über Rezeptoren und verschiedene Botenstoffe mit Immunzellen, Endothelzellen und weiteren beteiligten Akteuren der Neuroinflammation. Dabei induzieren die Thrombozyten unter anderem den antiinflammatorischen M2-Phänotyp der Mikroglia Zellen (173). So konnte gezeigt werden, dass aktivierte Thrombozyten zu einer vermehrten Sekretion von IL-10 und einer verminderten Sekretion von TNF- α

fürten (174). IL-10 ist dabei eines der Zytokine, welches vor allem beim antiinflammatorischen M2-Phänotyp gebildet wird, während TNF- α und auch IL-1 β vornehmlich zu den Zytokinen des proinflammatorischen M1-Phänotyp der Mikrogliazellen zugeordnet werden (48). Somit kann davon ausgegangen werden, dass durch den SGLT-2-Transporter Knockout auf den Thrombozyten deren Funktion und Wirkungsweise auch bei der Interaktion mit dem System der Neuroinflammation verändert wurde. So lässt sich erklären, dass durch eine verminderte Aktivität der Thrombozyten bei den Knockoutmäusen diese in geringerem Ausmaß den antiinflammatorischen M2-Phänotyp der Mikroglia Zellen induzieren konnten. Dadurch kam es zu einem Überwiegen des proinflammatorischen M1-Phänotyps der Mikrogliazellen und zu einer signifikant bzw. tendenziell höheren Expression von TNF- α und IL-1 β bei den Knockouttieren im Vergleich zu den Wildtyp-tieren. In welcher Weise dies einen Einfluss auf den sekundären Hirnschaden, das Outcome und den positiven Effekt der verminderten Thrombozytenaggregationsfähigkeit auf den Hirnschaden hat lässt sich nicht sicher differenzieren und würde weitere Untersuchungen benötigen. Dazu müssten in den Untersuchungen intensiver die verschiedenen Marker des M1- und M2-Phänotyps der Mikrogliazellen untersucht werden, um eindeutig zu erkennen, ob der Knockout den M1-Phänotyp steigert und den M2-Phänotyp wiederum verringert und in welcher Weise der Knockout des SGLT-2-Transporters sich auf die Kommunikation der Thrombozyten mit den Akteuren der Neuroinflammation auswirkt.

5.4 Unterschiede der Geschlechter in der Wirkung des Knockouts

In dieser Arbeit zeigte sich ein deutlicher Unterschied der Ergebnisse zwischen den Geschlechtern. Die weiblichen Tiere zeigten in keiner der Studien relevante Unterschiede zwischen den Wildtyp- und Knockouttieren, während sich bei den männlichen Tieren Unterschiede und neuroprotektive Effekte nachweisen ließen.

Diesen Geschlechterunterschieden wurden in der SHT-Forschung lange wenig Beachtung zuteil. Häufig zeigte sich sowohl in klinischen Studien als auch in Tier-Studien ein Gender-Bias. Die Männer oder männlichen Tieren spielten jeweils eine größere Rolle und die Frauen oder Weibchen waren meist unterrepräsentiert. Dies lag unter anderem an dem riskanteren Lebensstil der Männer. Mittlerweile wird die

Bedeutung des Geschlechts als biologische Variable stärker wahrgenommen. Denn diese biologische Variabilität führt zu Unterschieden in der Neuropathologie, den zellulären Mechanismen und dem Genesungsprozess nach SHT (175, 176). So zeigte sich in einem Review zu klinischen und Tiermodell-Studien, dass Frauen in klinischen Studien mit weniger Patienten und eher mildem SHT ein schlechteres Outcome hatten. Bei großen Studien und eher schwereren SHT, sowie auch bei den meisten Tiermodell-Studien, wiesen jedoch Frauen oder weibliche Tiere ein besseres Outcome auf. Aber auch das gewählte Tiermodell ist entscheidend und kann zu variablen Unterschieden zwischen den Geschlechtern führen (176, 177).

Die Ursachen dafür sind unterschiedlich und noch nicht vollständig verstanden. Bei männlichen Ratten nach SHT zeigte sich eine vermehrte Expression der Cyclooxygenase-2 (COX-2), welche mit einem verstärkten apoptotischen Zelluntergang korrelierte. Damit zeigte sich bei den beiden Geschlechtern ein unterschiedlicher Ablauf der sekundären neuroinflammatorischen Antwort nach SHT und eine generell verstärkte Neuroinflammation bei Männchen (178, 179). Auch die Regeneration der zerebralen Gefäße nach SHT verläuft bei den Geschlechtern unterschiedlich (180). Ein wesentliches Unterscheidungsmerkmal der Geschlechter sind die Sexualhormone. So konnte durch Estrogen und Progesteron bei den weiblichen Tieren über multimechanistische Wege ein neuroprotektiver Effekt nachgewiesen werden (181, 182). Dabei vermindert Progesteron die Expression von proinflammatorischen Zytokinen nach SHT (183).

Auch das Gerinnungssystem zeigt durch die verschiedenen Sexualhormone starke Unterschiede zwischen Männern und Frauen. Dies hat auch Auswirkungen auf die Gerinnung nach einem SHT. So zeigte sich vor allem bei weiblichen Patienten in der frühen Phase nach SHT eine vermehrte Hyperkoagulabilität (154). Progesteron und seine Metabolite haben unterschiedliche Wirkungen auf die Proteine des Gerinnungssystems nach einem SHT. Je nach Metaboliten und Situation wirken sie eher förderlich auf pro- oder antikoagulatorische Proteine (184). Auch zeigte sich eine positive Korrelation zwischen dem Estrogen-Progesteron-Verhältnis und den Parametern der Thromboelastographie und der partiellen Thromboplastinzeit, die eine Hyperkoagulabilität begünstigen (185).

Auch die Blutplättchen zeigen geschlechterspezifische Antworten auf Stimuli. So ergab sich bei den weiblichen Thrombozyten eine ausgeprägtere Aktivierung und

Aggregation nach Stimulation als bei den männlichen Thrombozyten. Durch eine Vorbehandlung mit Estrogen können jedoch die männlichen Thrombozyten an dieses Niveau der weiblichen Thrombozyten angenähert werden (186).

Außerdem gibt es Hinweise auf eine geschlechterunterschiedliche Expression von SGLT-2, die nicht durch Unterschiede in der mRNA Expression erklärt werden kann (143). So zeigte sich beispielsweise im proximalen Nierentubulus bei erwachsenen Ratten bei den Weibchen eine höhere Expression des SGLT-2 Proteins, obwohl die mRNA Expression von SGLT-2 in denselben Zellen bei den Weibchen und Männchen identisch war. Durch Kastration bzw. Estradiol konnte die Expression des SGLT-2 Proteins bei den Männchen erhöht werden und durch Testosteron wiederum verringert werden.

Dies zeigt die Komplexität der Mechanismen, die hier zu unterschiedlichen Ergebnissen bei den beiden Geschlechtern führen. Einen Grund für die fehlende Wirkung des Knockouts auf die weiblichen Tiere lässt sich durch die Versuche dieser Arbeit nicht sicher identifizieren. Aber es lässt sich vermuten, dass die weiblichen Tiere unter anderem durch die Sexualhormone in der Lage sind die Veränderungen des Knockouts besser zu kompensieren als die männlichen Tiere. So könnte die Verminderung der Aktivität der Thrombozyten durch den Knockout des SGLT-2-Transporters durch die Wirkung der weiblichen Sexualhormone, welche eher prokoagulatorisch wirken, bei den weiblichen Tieren aufgehoben werden.

Um den genauen Zusammenhang verstehen zu können würde es weitere Nachforschungen benötigen. Beispielsweise ob sich der neuroprotektive Effekt bei den männlichen Knockouttieren durch eine Behandlung mit weiblichen Sexualhormonen wieder umkehren bzw. neutralisieren lässt. Dies würde bestärken, dass die Sexualhormone eine entscheidende Rolle in der Expression von SGLT-2 und der Wirksamkeit des Knockouts haben.

Da von einer solchen geschlechterspezifischen Wirkweise des Knockouts im Vorhinein nicht ausgegangen wurde, fanden die Versuche mit einer Überlebenszeit von 6 Stunden nach induziertem SHT an geschlechtermischten Gruppen statt. Die geschlechtergetrennte Auswertung hatte dann aufgrund der geringeren Anzahl je Untergruppe weniger Power, sodass die neuroprotektiven Effekte vermutlich geringer ausfielen. Daher wurden die Versuche mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach

induziertem SHT an geschlechtergetrennten Gruppen durchgeführt und zeigten deutlichere neuroprotektive Effekte in der Gruppe mit den männlichen Versuchstieren.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Das SHT ist eine schwerwiegende Erkrankung, die mit einer hohen Morbidität und Mortalität einhergeht. Da der primäre Schaden nicht reversibel ist, befasst sich die SHT-Forschung mit dem sekundären Hirnschaden, welcher im Verlauf nach einer primären Verletzung durch verschiedene Mechanismen entsteht und das ursprüngliche Schadensgebiet weiter vergrößert. In bisher unveröffentlichten Studien an einem Mausmodell mit SHT dieser Arbeitsgruppe konnten bei Mäusen mit einem ubiquitären Knockout der SGLT-2-Transporter neuroprotektive Effekte gezeigt werden. SGLT-2-Transporter dienen dem sekundär aktiven Transport von Zucker in die Zellen. Das Kontusionsvolumen zeigte sich bei den Knockoutmäusen nach einem induziertem SHT signifikant kleiner als bei den Wildtypmäusen (s. Abbildung 7). Außerdem führte der Knockout bei den Thrombozyten der Mäuse zu einer signifikant erniedrigten Aggregationsfähigkeit (s. Abbildung 7). Aufgrund dieser Ergebnisse sowie der Rolle der Thrombozyten bei pathophysiologischen Mechanismen, die im Rahmen eines SHT ablaufen und zum sekundären Hirnschaden führen, wurden in dieser Arbeit Mäuse mit einem Thrombozyten-spezifischen Knockout des SGLT-2-Transporters untersucht. Damit sollte überprüft werden, ob der Knockout von SGLT-2 zu einer verminderten Aktivität der Thrombozyten führt und dies wiederum einen neuroprotektiven Effekt hat. Nach einem SHT kommt es zu Gerinnungsstörungen, die mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität einhergehen (83, 84). Thrombozyten zeigen dabei eine vermehrte Aktivität und stärkere Aggregationsfähigkeit (127, 152, 153), was zur Bildung von Mikrothromben mit anschließender Minderperfusion führt (155). Dies und die Interaktion mit weiteren Prozessen führt zu einer verstärkten Ausbildung des sekundären Hirnschadens (158). Da Glucose der hauptsächliche Energielieferant der Thrombozyten ist und diese zum größten Teil durch GLUT 1 und 3 aufgenommen wird (139), sollte durch den SGLT-2 Knockout die Energieversorgung nur so weit vermindert werden, dass es bei einem SHT zu keiner Aktivitätssteigerung kommt, aber gleichzeitig auch keine Blutungsneigung begünstigt wird. Bisherige Studien zeigten positive Effekte durch die Hemmung von Thrombozyten in einem frühen Signalweg der Aktivierung (165), während Thrombozytenaggregationshemmer wie ASS oder Clopidogrel das Blutungsrisiko nach einem SHT erhöhten (163, 164).

Mit dieser Fragestellung wurde die Studie in drei Abschnitte unterteilt. Im ersten Abschnitt untersuchte man die nativen Tiere ohne induziertes SHT. Im zweiten

Abschnitt führte man Versuche an geschlechtergemischten Gruppen von Wildtyp- und Knockouttieren mit einer Überlebenszeit von 6 Stunden nach induziertem SHT durch. Beim letzten Abschnitt wurden Untersuchungen an den Tieren mit einer Überlebenszeit von 5 Tagen nach induziertem SHT durchgeführt. Diesmal jedoch an geschlechtergetrennten Gruppen, da die vorherigen Untersuchungen einen Geschlechterunterschied suggerierten. Das SHT wurde durch einen kontrollierten kortikalen Aufprall entsprechend eines etablierten geschlossenen SHT-Modell erzeugt. In den Studien wurden mehrere Aspekte untersucht wie das Körpergewicht, welches im nativen Zustand, sowie nach dem SHT und vor der Euthanasie bestimmt wurde. Da der SGLT-2-Transporter ein sekundär aktiver Zuckertransporter ist wurde außerdem der Blutzuckerspiegel nativ und kurz vor der Euthanasie bestimmt. Mit Hilfe des Sysmex Zellcounter wurde das Blutbild der Tiere untersucht. Um die Funktion der Thrombozyten zu untersuchen, wurde das Verfahren des Multiplate® PAR-4-Tests genutzt. Dabei wurde zu Vollblut „PAR-4“-Agonist hinzugegeben, was die Thrombozyten aktivierte. Anschließend wurden die Stärke sowie die Geschwindigkeit der Aggregation gemessen. Die AUC als Integral der Aggregation über die Zeit, wurde dann als Maß für die Thrombozytenaggregationsfähigkeit verwendet. Diese Messungen der Thrombozytenfunktion fanden jedoch nur an den nativen Tieren, sowie denen mit einer Überlebenszeit von 6 Stunden nach induziertem SHT statt. Um den neuroprotektiven Effekt darzustellen, wurden verschiedene Verfahren verwendet. Zum einen entfernte man nach der Euthanasie die Gehirne der Mäuse und fertigte mit Hilfe des Kryostat Gefrierschnitte an, um diese mit Kresylviolett zu färben oder immunhistochemisch IgG darzustellen. Mit Hilfe der Kresylviolettfärbung konnte das Schadensvolumen des SHT dargestellt und ausgemessen werden. Die immunhistochemische Färbung von IgG diente der Visualisierung der Ödemformation durch die Darstellung der IgG-Extravasation über die gestörte BHS. Dieses Verfahren wurde jedoch nur bei den Tieren mit einer Überlebenszeit von 6 Stunden nach SHT durchgeführt. Mit Hilfe der Proteinanalysen dem Dot blot von IgG wurde bei diesen Tieren ebenfalls die Möglichkeit der Objektivierung von ausgetretenem IgG über die zerstörte BHS genutzt, um damit die Ödemformation zu analysieren. Neben dem Schadensvolumen und der Ödemformation wurde zusätzlich mit RT-PCR die mRNA-Expression von Markern für die Neuroinflammation wie TNF- α und IL-1 β bestimmt, sowie bei den Tieren mit einer Überlebenszeit von 5 Tagen nach induziertem SHT zusätzlich die mRNA-Expression von Iba1 als Marker für die Aktivierung von Mikroglia,

da diese erst gewisse Zeit nach dem SHT einsetzt. Zuletzt wurde bei den Tieren mit einer Überlebenszeit von 5 Tagen nach SHT Motorfunktionsanalysen mit Hilfe des 6 Teilaufgaben umfassenden NSS sowie dem Rotarod-Leistungstest durchgeführt, um die Funktionalität und die Erholung der Mäuse bewerten zu können.

Die Untersuchungen der nativen Mäuse ergaben lediglich bei den männlichen nativen Tieren in der Thrombozytenaggregationsfähigkeit signifikante Unterschiede zwischen den Knockout- und den Wildtyp-Tieren. Die Knockouttiere wiesen im nativen Zustand eine signifikant stärkere Thrombozytenaggregationsfähigkeit auf als die Wildtyp-Tiere (s. Abbildung 17). Bei den weiblichen nativen Tieren stellte sich dieser Unterschied nicht dar und auch bei den anderen Untersuchungen führte der Knockout zu keinem relevanten Unterschied im nativen Zustand.

Die Ergebnisse der Tiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT zeigten deutlich, dass der Knockout eine geschlechterspezifische Wirkung hatte, die vor allem zu einem Effekt bei den männlichen Tieren führte. Sowohl die Thrombozytenaggregationsfähigkeit (s. Abbildung 26), als auch die Ödemformation/BHS-Störung (s. Abbildung 33, 35 und 41) zeigten sich bei den Knockout-Tieren tendenziell bzw. signifikant niedriger als bei den Wildtyp-Tieren. Diese Effekte ließen sich jedoch vorwiegend auf die männlichen (Knockout-)Tiere zurückführen. So zeigte sich bei den meisten Untersuchungen zwischen den Wildtyp-Weibchen und Wildtyp-Männchen keine signifikanten Unterschiede. Entgegengesetzt dazu zeigten sich zwischen den Knockout-Weibchen und Knockout-Männchen Unterschiede, welche durch den Knockout zu erklären sind, und bei den Männchen zu signifikant besseren Ergebnissen führten (s. Abbildung 28, 30, 34, 38 und 42). Dies führte zu der Annahme, dass der Knockout nur bei den männlichen Tieren zu einem Effekt an den Thrombozyten führte, welcher eine gewisse Neuroprotektion bewirkte.

Aufgrund der geschlechterspezifischen Wirkung wurden die Versuche der dritten Studie mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach SHT an geschlechtergetrennten Gruppen durchgeführt. In der Studie bestätigte sich, dass der Knockout bei den weiblichen Tieren in keiner Untersuchung zu einem relevanten Unterschied geführt hat. Bei den männlichen Tieren hingegen ergab sich in der Schadensvolumenanalyse ein signifikanter neuroprotektiver Effekt. Das Kontusionsvolumen prozentual zur ipsilateralen Hemisphäre und die Ödemkorrektur, eine Schadensauswertung mit herausgerechnetem Effekt des Ödems, zeigten sich signifikant bzw. tendenziell bei

den männlichen Knockouttieren erniedrigt (s. Abbildung 59). Die Motorfunktionsanalysen hingegen konnten diesen Effekt nicht bestätigen. Des Weiteren war bei den männlichen Knockouttieren die mRNA-Expression von TNF- α und IL-1 β signifikant bzw. tendenziell erhöht (s. Abbildung 61). Die restlichen Analysen blieben ohne signifikanten Unterschied.

Damit zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass der Thrombozyten-spezifische Knockout von SGLT-2 eine geschlechterspezifische Wirkung hat, die bei den Männchen zu einer verminderten Thrombozytenaggregationsfähigkeit führt, woraus ein neuroprotektiver Effekt resultiert. Mit der geschlechterspezifischen Wirkung dieses Knockouts zeigt sich erneut, welche große Rolle dem Geschlecht als biologische Variable zukommt und daher bei den diesbezüglichen Untersuchungen besser berücksichtigt werden muss. Welche genauen Mechanismen eine Rolle bei den Geschlechterunterschieden spielen, muss weiter untersucht werden. Genauso benötigt es weitere Untersuchungen der Thrombozytenaggregationsfähigkeit mit einem etablierten Verfahren, um diese als eindeutige kausale Ursache für den neuroprotektiven Effekt des Knockouts benennen zu können. Da die Expression von SGLT-2 in verschiedenen Geweben, unter anderem auch den Thrombozyten, noch nicht eindeutig geklärt ist, verlangt dies weitere Studien um den Mechanismus des SGLT-2-Knockouts, der zu dem hier gezeigten Phänotyp geführt hat, zu verstehen. Auch die Bedeutung der Megakaryozyten sollte hierbei beachtet werden. Interessant ist ebenfalls, inwieweit die SGLT-2-Inhibitoren Einzug in die Forschung der Neuroprotektion finden werden, nachdem sie bereits eine wichtige Rolle in der Therapie von Diabetes Mellitus und Herzinsuffizienz spielen. Die Möglichkeit, dass sie im Rahmen eines SHTs neuroprotektive Effekte zeigen könnten, besteht unter anderem aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit mit einem Thrombozyten-spezifischen Knockout von SGLT-2.

7 Literaturverzeichnis

1. Gesundheitsberichterstattung des Bundes: Diagnosedaten der Krankenhäuser ab 2000/Eckdaten der vollstationären Patienten und Patientinnen für das Jahr 2017; ICD 10 S00–S09: Verletzungen des Kopfes [cited 2020 25.05.2020]. Available from: http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/WS0100/_XWD_FORMPROC?TARGET=&PAGE=_XWD_2&OPINDEX=2&HANDLER=_XWD_CUBE.SETPGS&DATACUBE=_XWD_30&D.001=1000001&D.946=14452&D.011=44302.
2. Statistisches Bundesamt (Destatis). Krankheitskosten: Deutschland, Jahre, Krankheitsdiagnosen (ICD-10) [cited 2020 25.05.]. Available from: <https://www-genesis.destatis.de/genesis/online?operation=ergebnistabelleUmfang&levelindex=2&levelid=1590418268211&downloadname=23631-0001#abreadcrumb>.
3. Maegele M, Lefering R, Sakowitz O, Kopp MA, Schwab JM, Steudel WI, et al. The Incidence and Management of Moderate to Severe Head Injury. *Dtsch Arztebl Int.* 2019;116(10):167-73.
4. Maas AIR, Menon DK, Adelson PD, Andelic N, Bell MJ, Belli A, et al. Traumatic brain injury: integrated approaches to improve prevention, clinical care, and research. *Lancet Neurol.* 2017;16(12):987-1048.
5. Ng SY, Lee AYW. Traumatic Brain Injuries: Pathophysiology and Potential Therapeutic Targets. *Front Cell Neurosci.* 2019;13:528.
6. Maegele M, Schöchl H, Menovsky T, Maréchal H, Marklund N, Buki A, et al. Coagulopathy and haemorrhagic progression in traumatic brain injury: advances in mechanisms, diagnosis, and management. *Lancet Neurol.* 2017;16(8):630-47.
7. Lozano D, Gonzales-Portillo GS, Acosta S, de la Pena I, Tajiri N, Kaneko Y, et al. Neuroinflammatory responses to traumatic brain injury: etiology, clinical consequences, and therapeutic opportunities. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2015;11:97-106.
8. Chamoun R, Suki D, Gopinath SP, Goodman JC, Robertson C. Role of extracellular glutamate measured by cerebral microdialysis in severe traumatic brain injury. *J Neurosurg.* 2010;113(3):564-70.
9. Mehta A, Prabhakar M, Kumar P, Deshmukh R, Sharma PL. Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. *Eur J Pharmacol.* 2013;698(1-3):6-18.
10. Rao VL, Başkaya MK, Doğan A, Rothstein JD, Dempsey RJ. Traumatic brain injury down-regulates glial glutamate transporter (GLT-1 and GLAST) proteins in rat brain. *J Neurochem.* 1998;70(5):2020-7.
11. van Landeghem FK, Weiss T, Oehmichen M, von Deimling A. Decreased expression of glutamate transporters in astrocytes after human traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 2006;23(10):1518-28.
12. Meldrum BS. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr.* 2000;130(4S Suppl):1007s-15s.
13. Sun DA, Deshpande LS, Sombati S, Baranova A, Wilson MS, Hamm RJ, et al. Traumatic brain injury causes a long-lasting calcium (Ca²⁺)-plateau of elevated intracellular Ca levels and altered Ca²⁺ homeostatic mechanisms in hippocampal neurons surviving brain injury. *Eur J Neurosci.* 2008;27(7):1659-72.
14. Brustovetsky T, Bolshakov A, Brustovetsky N. Calpain activation and Na⁺/Ca²⁺ exchanger degradation occur downstream of calcium deregulation in hippocampal neurons exposed to excitotoxic glutamate. *J Neurosci Res.* 2010;88(6):1317-28.

15. Floyd CL, Gorin FA, Lyeth BG. Mechanical strain injury increases intracellular sodium and reverses Na⁺/Ca²⁺ exchange in cortical astrocytes. *Glia*. 2005;51(1):35-46.
16. Faden AI, Demediuk P, Panter SS, Vink R. The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury. *Science*. 1989;244(4906):798-800.
17. Folkerts MM, Parks EA, Dedman JR, Kaetzel MA, Lyeth BG, Berman RF. Phosphorylation of calcium calmodulin-dependent protein kinase II following lateral fluid percussion brain injury in rats. *J Neurotrauma*. 2007;24(4):638-50.
18. Lu KT, Cheng NC, Wu CY, Yang YL. NKCC1-mediated traumatic brain injury-induced brain edema and neuron death via Raf/MEK/MAPK cascade. *Crit Care Med*. 2008;36(3):917-22.
19. Bales JW, Ma X, Yan HQ, Jenkins LW, Dixon CE. Expression of protein phosphatase 2B (calcineurin) subunit A isoforms in rat hippocampus after traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2010;27(1):109-20.
20. Girouard H, Wang G, Gallo EF, Anrather J, Zhou P, Pickel VM, et al. NMDA receptor activation increases free radical production through nitric oxide and NOX2. *J Neurosci*. 2009;29(8):2545-52.
21. Sattler R, Xiong Z, Lu WY, Hafner M, MacDonald JF, Tymianski M. Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein. *Science*. 1999;284(5421):1845-8.
22. Mbye LH, Singh IN, Sullivan PG, Springer JE, Hall ED. Attenuation of acute mitochondrial dysfunction after traumatic brain injury in mice by NIM811, a non-immunosuppressive cyclosporin A analog. *Exp Neurol*. 2008;209(1):243-53.
23. Sullivan PG, Rabchevsky AG, Waldmeier PC, Springer JE. Mitochondrial permeability transition in CNS trauma: cause or effect of neuronal cell death? *J Neurosci Res*. 2005;79(1-2):231-9.
24. Naga KK, Sullivan PG, Geddes JW. High cyclophilin D content of synaptic mitochondria results in increased vulnerability to permeability transition. *J Neurosci*. 2007;27(28):7469-75.
25. Azbill RD, Mu X, Bruce-Keller AJ, Mattson MP, Springer JE. Impaired mitochondrial function, oxidative stress and altered antioxidant enzyme activities following traumatic spinal cord injury. *Brain Res*. 1997;765(2):283-90.
26. Yonutas HM, Vekaria HJ, Sullivan PG. Mitochondrial specific therapeutic targets following brain injury. *Brain Res*. 2016;1640(Pt A):77-93.
27. Floyd RA, Carney JM. Free radical damage to protein and DNA: mechanisms involved and relevant observations on brain undergoing oxidative stress. *Ann Neurol*. 1992;32 Suppl:S22-7.
28. Hall ED, Springer JE. Neuroprotection and acute spinal cord injury: a reappraisal. *NeuroRx*. 2004;1(1):80-100.
29. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr*. 1993;57(5 Suppl):715S-24S; discussion 24S-25S.
30. Kowaltowski AJ, Vercesi AE. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 1999;26(3-4):463-71.
31. Singh IN, Sullivan PG, Deng Y, Mbye LH, Hall ED. Time course of post-traumatic mitochondrial oxidative damage and dysfunction in a mouse model of focal traumatic brain injury: implications for neuroprotective therapy. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2006;26(11):1407-18.
32. Belzacq AS, Vieira HL, Kroemer G, Brenner C. The adenine nucleotide translocator in apoptosis. *Biochimie*. 2002;84(2-3):167-76.
33. Halestrap AP. Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die. *Biochem Soc Trans*. 2006;34(Pt 2):232-7.

34. Varanyuwatana P, Halestrap AP. The roles of phosphate and the phosphate carrier in the mitochondrial permeability transition pore. *Mitochondrion*. 2012;12(1):120-5.
35. Tsujimoto Y, Shimizu S. Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death. *Apoptosis*. 2007;12(5):835-40.
36. Susin SA, Zamzami N, Kroemer G. Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1366(1-2):151-65.
37. Sullivan PG, Keller JN, Bussen WL, Scheff SW. Cytochrome c release and caspase activation after traumatic brain injury. *Brain Res*. 2002;949(1-2):88-96.
38. Angeloni C, Prata C, Dalla Sega FV, Piperno R, Hrelia S. Traumatic brain injury and NADPH oxidase: a deep relationship. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:370312.
39. Lambeth JD, Neish AS. Nox enzymes and new thinking on reactive oxygen: a double-edged sword revisited. *Annu Rev Pathol*. 2014;9:119-45.
40. Ladak AA, Enam SA, Ibrahim MT. A Review of the Molecular Mechanisms of Traumatic Brain Injury. *World Neurosurg*. 2019;131:126-32.
41. Hall ED, Detloff MR, Johnson K, Kupina NC. Peroxynitrite-mediated protein nitration and lipid peroxidation in a mouse model of traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2004;21(1):9-20.
42. Mustafa AG, Singh IN, Wang J, Carrico KM, Hall ED. Mitochondrial protection after traumatic brain injury by scavenging lipid peroxyl radicals. *J Neurochem*. 2010;114(1):271-80.
43. Deng Y, Thompson BM, Gao X, Hall ED. Temporal relationship of peroxynitrite-induced oxidative damage, calpain-mediated cytoskeletal degradation and neurodegeneration after traumatic brain injury. *Exp Neurol*. 2007;205(1):154-65.
44. Schmidt OI, Heyde CE, Ertel W, Stahel PF. Closed head injury--an inflammatory disease? *Brain Res Brain Res Rev*. 2005;48(2):388-99.
45. Flüter K, Opperhuizen AL, Morgan BP, Baas F, Ramaglia V. Inhibition of the membrane attack complex of the complement system reduces secondary neuroaxonal loss and promotes neurologic recovery after traumatic brain injury in mice. *J Immunol*. 2014;192(5):2339-48.
46. Roselli F, Karasu E, Volpe C, Huber-Lang M. Medusa's Head: The Complement System in Traumatic Brain and Spinal Cord Injury. *J Neurotrauma*. 2018;35(2):226-40.
47. Lotocki G, de Rivero Vaccari JP, Perez ER, Sanchez-Molano J, Furones-Alonso O, Bramlett HM, et al. Alterations in blood-brain barrier permeability to large and small molecules and leukocyte accumulation after traumatic brain injury: effects of post-traumatic hypothermia. *J Neurotrauma*. 2009;26(7):1123-34.
48. Hernandez-Ontiveros DG, Tajiri N, Acosta S, Giunta B, Tan J, Borlongan CV. Microglia activation as a biomarker for traumatic brain injury. *Front Neurol*. 2013;4:30.
49. Ansari MA. Temporal profile of M1 and M2 responses in the hippocampus following early 24h of neurotrauma. *J Neurol Sci*. 2015;357(1-2):41-9.
50. Frugier T, Morganti-Kossmann MC, O'Reilly D, McLean CA. In situ detection of inflammatory mediators in post mortem human brain tissue after traumatic injury. *J Neurotrauma*. 2010;27(3):497-507.
51. Goodman JC, Van M, Gopinath SP, Robertson CS. Pro-inflammatory and pro-apoptotic elements of the neuroinflammatory response are activated in traumatic brain injury. *Acta Neurochir Suppl*. 2008;102:437-9.
52. Morganti JM, Riparip LK, Rosi S. Call Off the Dog(ma): M1/M2 Polarization Is Concurrent following Traumatic Brain Injury. *PLoS One*. 2016;11(1):e0148001.
53. Bergold PJ. Treatment of traumatic brain injury with anti-inflammatory drugs. *Exp Neurol*. 2016;275 Pt 3(Pt 3):367-80.

54. Morganti-Kossmann MC, Satgunaseelan L, Bye N, Kossmann T. Modulation of immune response by head injury. *Injury*. 2007;38(12):1392-400.
55. Semple BD, Bye N, Rancan M, Ziebell JM, Morganti-Kossmann MC. Role of CCL2 (MCP-1) in traumatic brain injury (TBI): evidence from severe TBI patients and CCL2^{-/-} mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2010;30(4):769-82.
56. Kumar A, Alvarez-Croda DM, Stoica BA, Faden AI, Loane DJ. Microglial/Macrophage Polarization Dynamics following Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma*. 2016;33(19):1732-50.
57. Raghupathi R. Cell death mechanisms following traumatic brain injury. *Brain Pathol*. 2004;14(2):215-22.
58. Clark RS, Kochanek PM, Chen M, Watkins SC, Marion DW, Chen J, et al. Increases in Bcl-2 and cleavage of caspase-1 and caspase-3 in human brain after head injury. *Faseb j*. 1999;13(8):813-21.
59. Bredesen DE. Programmed cell death mechanisms in neurological disease. *Curr Mol Med*. 2008;8(3):173-86.
60. Stoica BA, Faden AI. Cell death mechanisms and modulation in traumatic brain injury. *Neurotherapeutics*. 2010;7(1):3-12.
61. Kawasaki H, Morooka T, Shimohama S, Kimura J, Hirano T, Gotoh Y, et al. Activation and involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in glutamate-induced apoptosis in rat cerebellar granule cells. *J Biol Chem*. 1997;272(30):18518-21.
62. Mori T, Wang X, Jung JC, Sumii T, Singhal AB, Fini ME, et al. Mitogen-activated protein kinase inhibition in traumatic brain injury: in vitro and in vivo effects. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2002;22(4):444-52.
63. Zhao JB, Zhang Y, Li GZ, Su XF, Hang CH. Activation of JAK2/STAT pathway in cerebral cortex after experimental traumatic brain injury of rats. *Neurosci Lett*. 2011;498(2):147-52.
64. Zhang X, Graham SH, Kochanek PM, Marion DW, Nathaniel PD, Watkins SC, et al. Caspase-8 expression and proteolysis in human brain after severe head injury. *Faseb j*. 2003;17(10):1367-9.
65. Clark RS, Kochanek PM, Watkins SC, Chen M, Dixon CE, Seidberg NA, et al. Caspase-3 mediated neuronal death after traumatic brain injury in rats. *J Neurochem*. 2000;74(2):740-53.
66. Hong SJ, Dawson TM, Dawson VL. Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling. *Trends Pharmacol Sci*. 2004;25(5):259-64.
67. Yu SW, Andrabi SA, Wang H, Kim NS, Poirier GG, Dawson TM, et al. Apoptosis-inducing factor mediates poly(ADP-ribose) (PAR) polymer-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(48):18314-9.
68. van Loo G, Saelens X, van Gurp M, MacFarlane M, Martin SJ, Vandenberghe P. The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death Differ*. 2002;9(10):1031-42.
69. Wennersten A, Holmin S, Mathiesen T. Characterization of Bax and Bcl-2 in apoptosis after experimental traumatic brain injury in the rat. *Acta Neuropathol*. 2003;105(3):281-8.
70. Raghupathi R, Strauss KI, Zhang C, Krajewski S, Reed JC, McIntosh TK. Temporal alterations in cellular Bax:Bcl-2 ratio following traumatic brain injury in the rat. *J Neurotrauma*. 2003;20(5):421-35.
71. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*. 2008;451(7182):1069-75.
72. Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes Dev*. 2007;21(22):2861-73.

73. Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(9):741-52.
74. Au AK, Aneja RK, Bayir H, Bell MJ, Janesko-Feldman K, Kochanek PM, et al. Autophagy Biomarkers Beclin 1 and p62 are Increased in Cerebrospinal Fluid after Traumatic Brain Injury. *Neurocrit Care.* 2017;26(3):348-55.
75. Clark RS, Bayir H, Chu CT, Alber SM, Kochanek PM, Watkins SC. Autophagy is increased in mice after traumatic brain injury and is detectable in human brain after trauma and critical illness. *Autophagy.* 2008;4(1):88-90.
76. Diskin T, Tal-Or P, Erlich S, Mizrachy L, Alexandrovich A, Shohami E, et al. Closed head injury induces upregulation of Beclin 1 at the cortical site of injury. *J Neurotrauma.* 2005;22(7):750-62.
77. Zhang YB, Li SX, Chen XP, Yang L, Zhang YG, Liu R, et al. Autophagy is activated and might protect neurons from degeneration after traumatic brain injury. *Neurosci Bull.* 2008;24(3):143-9.
78. Ding K, Xu J, Wang H, Zhang L, Wu Y, Li T. Melatonin protects the brain from apoptosis by enhancement of autophagy after traumatic brain injury in mice. *Neurochem Int.* 2015;91:46-54.
79. Gao Y, Zhuang Z, Gao S, Li X, Zhang Z, Ye Z, et al. Tetrahydrocurcumin reduces oxidative stress-induced apoptosis via the mitochondrial apoptotic pathway by modulating autophagy in rats after traumatic brain injury. *Am J Transl Res.* 2017;9(3):887-99.
80. Sarkar C, Zhao Z, Aungst S, Sabirzhanov B, Faden AI, Lipinski MM. Impaired autophagy flux is associated with neuronal cell death after traumatic brain injury. *Autophagy.* 2014;10(12):2208-22.
81. Burda JE, Bernstein AM, Sofroniew MV. Astrocyte roles in traumatic brain injury. *Exp Neurol.* 2016;275 Pt 3(0 3):305-15.
82. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 2010;119(1):7-35.
83. Harhangi BS, Kompanje EJ, Leebeek FW, Maas AI. Coagulation disorders after traumatic brain injury. *Acta Neurochir (Wien).* 2008;150(2):165-75; discussion 75.
84. Talving P, Benfield R, Hadjizacharia P, Inaba K, Chan LS, Demetriades D. Coagulopathy in severe traumatic brain injury: a prospective study. *J Trauma.* 2009;66(1):55-61; discussion -2.
85. De Oliveira CO, Reimer AG, Da Rocha AB, Grivicich I, Schneider RF, Roisenberg I, et al. Plasma von Willebrand factor levels correlate with clinical outcome of severe traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 2007;24(8):1331-8.
86. Lu D, Mahmood A, Goussev A, Qu C, Zhang ZG, Chopp M. Delayed thrombosis after traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma.* 2004;21(12):1756-66.
87. Schwarzman SM, Kim SW, Trabold R, Plesnila N. Temporal profile of thrombogenesis in the cerebral microcirculation after traumatic brain injury in mice. *J Neurotrauma.* 2010;27(1):121-30.
88. Schwarzman SM, de Chaumont C, Balbi M, Terpolilli NA, Kleinschnitz C, Gruber A, et al. The Formation of Microthrombi in Parenchymal Microvessels after Traumatic Brain Injury Is Independent of Coagulation Factor XI. *J Neurotrauma.* 2016;33(17):1634-44.
89. Deng Y, Fang W, Li Y, Cen J, Fang F, Lv P, et al. Blood-brain barrier breakdown by PAF and protection by XQ-1H due to antagonism of PAF effects. *Eur J Pharmacol.* 2009;616(1-3):43-7.
90. Schnüriger B, Inaba K, Abdelsayed GA, Lustenberger T, Eberle BM, Barmparas G, et al. The impact of platelets on the progression of traumatic intracranial hemorrhage. *J Trauma.* 2010;68(4):881-5.

91. Castellino FJ, Chapman MP, Donahue DL, Thomas S, Moore EE, Wohlaer MV, et al. Traumatic brain injury causes platelet adenosine diphosphate and arachidonic acid receptor inhibition independent of hemorrhagic shock in humans and rats. *J Trauma Acute Care Surg.* 2014;76(5):1169-76.
92. Davis PK, Musunuru H, Walsh M, Cassady R, Yount R, Losiniecki A, et al. Platelet dysfunction is an early marker for traumatic brain injury-induced coagulopathy. *Neurocrit Care.* 2013;18(2):201-8.
93. Wohlaer MV, Moore EE, Thomas S, Sauaia A, Evans E, Harr J, et al. Early platelet dysfunction: an unrecognized role in the acute coagulopathy of trauma. *J Am Coll Surg.* 2012;214(5):739-46.
94. Nekludov M, Bellander BM, Blombäck M, Wallen HN. Platelet dysfunction in patients with severe traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 2007;24(11):1699-706.
95. Hoffman M, Monroe DM. Tissue factor in brain is not saturated with factor VIIa: implications for factor VIIa dosing in intracerebral hemorrhage. *Stroke.* 2009;40(8):2882-4.
96. Mackman N. The role of tissue factor and factor VIIa in hemostasis. *Anesth Analg.* 2009;108(5):1447-52.
97. Laroche M, Kutcher ME, Huang MC, Cohen MJ, Manley GT. Coagulopathy after traumatic brain injury. *Neurosurgery.* 2012;70(6):1334-45.
98. Chen H, Xue LX, Guo Y, Chen SW, Wang G, Cao HL, et al. The influence of hemocoagulation disorders on the development of posttraumatic cerebral infarction and outcome in patients with moderate or severe head trauma. *Biomed Res Int.* 2013;2013:685174.
99. Genét GF, Johansson PI, Meyer MA, Sølbeck S, Sørensen AM, Larsen CF, et al. Trauma-induced coagulopathy: standard coagulation tests, biomarkers of coagulopathy, and endothelial damage in patients with traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 2013;30(4):301-6.
100. Pathak A, Dutta S, Marwaha N, Singh D, Varma N, Mathuriya SN. Change in tissue thromboplastin content of brain following trauma. *Neurol India.* 2005;53(2):178-82.
101. Sun Y, Wang J, Wu X, Xi C, Gai Y, Liu H, et al. Validating the incidence of coagulopathy and disseminated intravascular coagulation in patients with traumatic brain injury--analysis of 242 cases. *Br J Neurosurg.* 2011;25(3):363-8.
102. Zhang J, Zhang F, Dong JF. Coagulopathy induced by traumatic brain injury: systemic manifestation of a localized injury. *Blood.* 2018;131(18):2001-6.
103. Herbert JP, Guillotte AR, Hammer RD, Litofsky NS. Coagulopathy in the Setting of Mild Traumatic Brain Injury: Truths and Consequences. *Brain Sci.* 2017;7(7).
104. Hijazi N, Abu Fanne R, Abramovitch R, Yarovoi S, Higazi M, Abdeen S, et al. Endogenous plasminogen activators mediate progressive intracerebral hemorrhage after traumatic brain injury in mice. *Blood.* 2015;125(16):2558-67.
105. Moore HB, Moore EE, Gonzalez E, Chapman MP, Chin TL, Silliman CC, et al. Hyperfibrinolysis, physiologic fibrinolysis, and fibrinolysis shutdown: the spectrum of postinjury fibrinolysis and relevance to antifibrinolytic therapy. *J Trauma Acute Care Surg.* 2014;77(6):811-7; discussion 7.
106. Sillesen M, Rasmussen LS, Jin G, Jepsen CH, Imam A, Hwabejire JO, et al. Assessment of coagulopathy, endothelial injury, and inflammation after traumatic brain injury and hemorrhage in a porcine model. *J Trauma Acute Care Surg.* 2014;76(1):12-9; discussion 9-20.
107. Amara U, Flierl MA, Rittirsch D, Klos A, Chen H, Acker B, et al. Molecular intercommunication between the complement and coagulation systems. *J Immunol.* 2010;185(9):5628-36.

108. Amara U, Rittirsch D, Flierl M, Bruckner U, Klos A, Gebhard F, et al. Interaction between the coagulation and complement system. *Adv Exp Med Biol.* 2008;632:71-9.
109. Atefi G, Aisiku O, Shapiro N, Hauser C, Dalle Lucca J, Flaumenhaft R, et al. Complement Activation in Trauma Patients Alters Platelet Function. *Shock.* 2016;46(3 Suppl 1):83-8.
110. Foley JH, Conway EM. Cross Talk Pathways Between Coagulation and Inflammation. *Circ Res.* 2016;118(9):1392-408.
111. Williams JL. Cross talk between the inflammation and coagulation systems. *Clin Lab Sci.* 2007;20(4):224-9.
112. Smith DH, Soares HD, Pierce JS, Perlman KG, Saatman KE, Meaney DF, et al. A model of parasagittal controlled cortical impact in the mouse: cognitive and histopathologic effects. *J Neurotrauma.* 1995;12(2):169-78.
113. Dixon CE, Clifton GL, Lighthall JW, Yaghmai AA, Hayes RL. A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat. *J Neurosci Methods.* 1991;39(3):253-62.
114. Xiong Y, Mahmood A, Chopp M. Animal models of traumatic brain injury. *Nat Rev Neurosci.* 2013;14(2):128-42.
115. McIntosh TK, Vink R, Noble L, Yamakami I, Fernyak S, Soares H, et al. Traumatic brain injury in the rat: characterization of a lateral fluid-percussion model. *Neuroscience.* 1989;28(1):233-44.
116. Chen Y, Constantini S, Trembovler V, Weinstock M, Shohami E. An experimental model of closed head injury in mice: pathophysiology, histopathology, and cognitive deficits. *J Neurotrauma.* 1996;13(10):557-68.
117. Dunham NW, Miya TS. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc.* 1957;46(3):208-9.
118. Hamm RJ, Pike BR, O'Dell DM, Lyeth BG, Jenkins LW. The rotarod test: an evaluation of its effectiveness in assessing motor deficits following traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 1994;11(2):187-96.
119. Fujimoto ST, Longhi L, Saatman KE, Conte V, Stocchetti N, McIntosh TK. Motor and cognitive function evaluation following experimental traumatic brain injury. *Neurosci Biobehav Rev.* 2004;28(4):365-78.
120. Hamm RJ. Neurobehavioral assessment of outcome following traumatic brain injury in rats: an evaluation of selected measures. *J Neurotrauma.* 2001;18(11):1207-16.
121. Sysmex Deutschland GmbH N, DE Muster-Standardarbeitsanweisung für den Sysmex Hämatologieanalysator XP-300 [cited 2020 15.04.]. Available from: https://www.sysmex.de/fileadmin/media/f101/Muster-Standardarbeitsanweisung/SOP_XP-300i.pdf.
122. Weber CF. Bedside-Monitoring der Blutgerinnung. Rossaint R, Werner C, Zwißler B (eds) *Die Anästhesiologie*: Springer, Berlin, Heidelberg; 2019. p. 549-58.
123. von Pape KW, Dzijan-Horn M, Bohner J, Spannagl M, Weisser H, Calatzis A. [Control of aspirin effect in chronic cardiovascular patients using two whole blood platelet function assays. PFA-100 and Multiplate]. *Hamostaseologie.* 2007;27(3):155-60; quiz 61-2.
124. Beispielhafte Darstellung eines Messergebnisses [cited 2020 08.05]. Available from: <https://narkosguiden.se/eng/book/multiplate/>.
125. Qiagen N.V. V, NL. RNeasy® Plus Universal Handbook 2014 [cited 2020 15.04.]. Available from: <https://www.qiagen.com/nl/resources/download.aspx?id=a8f31442-95db-4cbd-9f9d-9e6a63b4af58&lang=en>.

126. Qiagen N.V. V, NL. QuantiTect® Reverse Transcription Handbook 2009 [cited 2020 15.04.]. Available from: <https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=f0de5533-3dd1-4835-8820-1f5c088dd800&lang=en>.
127. Kumar MA. Coagulopathy associated with traumatic brain injury. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2013;13(11):391.
128. Zhang J, Jiang R, Liu L, Watkins T, Zhang F, Dong JF. Traumatic brain injury-associated coagulopathy. *J Neurotrauma.* 2012;29(17):2597-605.
129. Fleck RA, Rao LV, Rapaport SI, Varki N. Localization of human tissue factor antigen by immunostaining with monospecific, polyclonal anti-human tissue factor antibody. *Thromb Res.* 1990;59(2):421-37.
130. Eddleston M, de la Torre JC, Oldstone MB, Loskutoff DJ, Edgington TS, Mackman N. Astrocytes are the primary source of tissue factor in the murine central nervous system. A role for astrocytes in cerebral hemostasis. *J Clin Invest.* 1993;92(1):349-58.
131. Maegele M. Coagulopathy after traumatic brain injury: incidence, pathogenesis, and treatment options. *Transfusion.* 2013;53 Suppl 1:28s-37s.
132. McCully SP, Schreiber MA. Traumatic brain injury and its effect on coagulopathy. *Semin Thromb Hemost.* 2013;39(8):896-901.
133. Wahl F, Grosjean-Piot O, Bareyre F, Uzan A, Stutzmann JM. Enoxaparin reduces brain edema, cerebral lesions, and improves motor and cognitive impairments induced by a traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma.* 2000;17(11):1055-65.
134. Li S, Marks JA, Eisenstadt R, Kumasaka K, Samadi D, Johnson VE, et al. Enoxaparin ameliorates post-traumatic brain injury edema and neurologic recovery, reducing cerebral leukocyte endothelial interactions and vessel permeability in vivo. *J Trauma Acute Care Surg.* 2015;79(1):78-84.
135. Murer EH. Clot retraction and energy metabolism of platelets. Effect and mechanism of inhibitors. *Biochim Biophys Acta.* 1969;172(2):266-76.
136. Murer EH, Hellem AJ, Rozenberg MC. Energy metabolism and platelet function. *Scand J Clin Lab Invest.* 1967;19(3):280-2.
137. Karpatkin S. Studies on human platelet glycolysis. Effect of glucose, cyanide, insulin, citrate, and agglutination and contraction on platelet glycolysis. *J Clin Invest.* 1967;46(3):409-17.
138. Doery JC, Hirsh J, Cooper I. Energy metabolism in human platelets: interrelationship between glycolysis and oxidative metabolism. *Blood.* 1970;36(2):159-68.
139. Craik JD, Stewart M, Cheeseman CI. GLUT-3 (brain-type) glucose transporter polypeptides in human blood platelets. *Thromb Res.* 1995;79(5-6):461-9.
140. Heijnen HF, Oorschot V, Sixma JJ, Slot JW, James DE. Thrombin stimulates glucose transport in human platelets via the translocation of the glucose transporter GLUT-3 from alpha-granules to the cell surface. *J Cell Biol.* 1997;138(2):323-30.
141. Fidler TP, Campbell RA, Funari T, Dunne N, Balderas Angeles E, Middleton EA, et al. Deletion of GLUT1 and GLUT3 Reveals Multiple Roles for Glucose Metabolism in Platelet and Megakaryocyte Function. *Cell Rep.* 2017;20(4):881-94.
142. Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R. *Duale Reihe Biochemie: Thieme;* 2016.
143. Sabolic I, Vrhovac I, Erer DB, Gerasimova M, Rose M, Breljak D, et al. Expression of Na⁺-D-glucose cotransporter SGLT2 in rodents is kidney-specific and exhibits sex and species differences. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2012;302(8):C1174-88.

144. Chen J, Williams S, Ho S, Loraine H, Hagan D, Whaley JM, et al. Quantitative PCR tissue expression profiling of the human SGLT2 gene and related family members. *Diabetes Ther.* 2010;1(2):57-92.
145. Zhou L, Cryan EV, D'Andrea MR, Belkowski S, Conway BR, Demarest KT. Human cardiomyocytes express high level of Na⁺/glucose cotransporter 1 (SGLT1). *J Cell Biochem.* 2003;90(2):339-46.
146. Wright EM, Hirayama BA, Loo DF. Active sugar transport in health and disease. *J Intern Med.* 2007;261(1):32-43.
147. Zhao FQ, McFadden TB, Wall EH, Dong B, Zheng YC. Cloning and expression of bovine sodium/glucose cotransporter SGLT2. *J Dairy Sci.* 2005;88(8):2738-48.
148. Bugert P, Klüter H. Profiling of gene transcripts in human platelets: an update of the platelet transcriptome. *Platelets.* 2006;17(7):503-4.
149. Harrison P, Goodall AH. "Message in the platelet"--more than just vestigial mRNA! *Platelets.* 2008;19(6):395-404.
150. Spigoni V, Fantuzzi F, Carubbi C, Pozzi G, Masselli E, Gobbi G, et al. Sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors antagonize lipotoxicity in human myeloid angiogenic cells and ADP-dependent activation in human platelets: potential relevance to prevention of cardiovascular events. *Cardiovasc Diabetol.* 2020;19(1):46.
151. Steven S, Oelze M, Hanf A, Kröller-Schön S, Kashani F, Roohani S, et al. The SGLT2 inhibitor empagliflozin improves the primary diabetic complications in ZDF rats. *Redox Biol.* 2017;13:370-85.
152. Martin GE, Xia B, Kim Y, Johnson MD, Veile R, Friend LA, et al. Platelet Function Changes in a Time-Dependent Manner Following Traumatic Brain Injury in a Murine Model. *Shock.* 2018;50(5):551-6.
153. Ploplis VA, Donahue DL, Sandoval-Cooper MJ, MorenoCaffaro M, Sheets P, Thomas SG, et al. Systemic platelet dysfunction is the result of local dysregulated coagulation and platelet activation in the brain in a rat model of isolated traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 2014;31(19):1672-5.
154. Schreiber MA, Differding J, Thorborg P, Mayberry JC, Mullins RJ. Hypercoagulability is most prevalent early after injury and in female patients. *J Trauma.* 2005;58(3):475-80; discussion 80-1.
155. Maeda T, Katayama Y, Kawamata T, Aoyama N, Mori T. Hemodynamic depression and microthrombosis in the peripheral areas of cortical contusion in the rat: role of platelet activating factor. *Acta Neurochir Suppl.* 1997;70:102-5.
156. Albert-Weissenberger C, Hopp S, Nieswandt B, Siren AL, Kleinschnitz C, Stetter C. How is the formation of microthrombi after traumatic brain injury linked to inflammation? *J Neuroimmunol.* 2019;326:9-13.
157. Nekludov M, Antovic J, Bredbacka S, Blomback M. Coagulation abnormalities associated with severe isolated traumatic brain injury: cerebral arterio-venous differences in coagulation and inflammatory markers. *J Neurotrauma.* 2007;24(1):174-80.
158. Nieswandt B, Pleines I, Bender M. Platelet adhesion and activation mechanisms in arterial thrombosis and ischaemic stroke. *J Thromb Haemost.* 2011;9 Suppl 1:92-104.
159. Park MS, Martini WZ, Dubick MA, Salinas J, Butenas S, Kheirabadi BS, et al. Thromboelastography as a better indicator of hypercoagulable state after injury than prothrombin time or activated partial thromboplastin time. *J Trauma.* 2009;67(2):266-75; discussion 75-6.
160. Faden AI, Tzendzalian PA. Platelet-activating factor antagonists limit glycine changes and behavioral deficits after brain trauma. *Am J Physiol.* 1992;263(4 Pt 2):R909-14.

161. Tokutomi T, Sigemori M, Kikuchi T, Hirohata M. Effect of platelet-activating factor antagonist on brain injury in rats. *Acta Neurochir Suppl (Wien)*. 1994;60:508-10.
162. Travers JB, Rohan JG, Sahu RP. New Insights Into the Pathologic Roles of the Platelet-Activating Factor System. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021;12:624132.
163. Wong DK, Lurie F, Wong LL. The effects of clopidogrel on elderly traumatic brain injured patients. *J Trauma*. 2008;65(6):1303-8.
164. Ivascu FA, Howells GA, Junn FS, Bair HA, Bendick PJ, Janczyk RJ. Predictors of mortality in trauma patients with intracranial hemorrhage on preinjury aspirin or clopidogrel. *J Trauma*. 2008;65(4):785-8.
165. Kleinschnitz C, Pozgajova M, Pham M, Bendszus M, Nieswandt B, Stoll G. Targeting platelets in acute experimental stroke: impact of glycoprotein Ib, VI, and IIb/IIIa blockade on infarct size, functional outcome, and intracranial bleeding. *Circulation*. 2007;115(17):2323-30.
166. Álvarez-Román MT, Fernández-Bello I, Jiménez-Yuste V, Martín-Salces M, Arias-Salgado EG, Rivas Pollmar MI, et al. Procoagulant profile in patients with immune thrombocytopenia. *Br J Haematol*. 2016;175(5):925-34.
167. Wannhoff A, Müller OJ, Friedrich K, Rupp C, Klöters-Plachky P, Leopold Y, et al. Effects of increased von Willebrand factor levels on primary hemostasis in thrombocytopenic patients with liver cirrhosis. *PLoS One*. 2014;9(11):e112583.
168. Lisman T, Bongers TN, Adelmeijer J, Janssen HL, de Maat MP, de Groot PG, et al. Elevated levels of von Willebrand Factor in cirrhosis support platelet adhesion despite reduced functional capacity. *Hepatology*. 2006;44(1):53-61.
169. Ranucci M, Baryshnikova E, Ranucci M, Silveti S. Fibrinogen levels compensation of thrombocytopenia-induced bleeding following cardiac surgery. *Int J Cardiol*. 2017;249:96-100.
170. Rawish E, Nording H, Münte T, Langer HF. Platelets as Mediators of Neuroinflammation and Thrombosis. *Front Immunol*. 2020;11:548631.
171. Dukhinova M, Kuznetsova I, Kopeikina E, Veniaminova E, Yung AWY, Veremeyko T, et al. Platelets mediate protective neuroinflammation and promote neuronal plasticity at the site of neuronal injury. *Brain Behav Immun*. 2018;74:7-27.
172. Gao C, Wang H, Wang T, Luo C, Wang Z, Zhang M, et al. Platelet regulates neuroinflammation and restores blood-brain barrier integrity in a mouse model of traumatic brain injury. *J Neurochem*. 2020;154(2):190-204.
173. Heffron SP, Weinstock A, Scolaro B, Chen S, Sansbury BE, Marecki G, et al. Platelet-conditioned media induces an anti-inflammatory macrophage phenotype through EP4. *J Thromb Haemost*. 2021;19(2):562-73.
174. Gudbrandsdottir S, Hasselbalch HC, Nielsen CH. Activated platelets enhance IL-10 secretion and reduce TNF- α secretion by monocytes. *J Immunol*. 2013;191(8):4059-67.
175. Spani CB, Braun DJ, Van Eldik LJ. Sex-related responses after traumatic brain injury: Considerations for preclinical modeling. *Front Neuroendocrinol*. 2018;50:52-66.
176. Gupte R, Brooks W, Vukas R, Pierce J, Harris J. Sex Differences in Traumatic Brain Injury: What We Know and What We Should Know. *J Neurotrauma*. 2019;36(22):3063-91.
177. Rubin TG, Lipton ML. Sex Differences in Animal Models of Traumatic Brain Injury. *J Exp Neurosci*. 2019;13:1179069519844020.
178. Gunther M, Plantman S, Davidsson J, Angeria M, Mathiesen T, Risling M. COX-2 regulation and TUNEL-positive cell death differ between genders in the secondary inflammatory response following experimental penetrating focal brain injury in rats. *Acta Neurochir (Wien)*. 2015;157(4):649-59.

179. Villapol S, Loane DJ, Burns MP. Sexual dimorphism in the inflammatory response to traumatic brain injury. *Glia*. 2017;65(9):1423-38.
180. Jullienne A, Salehi A, Affeldt B, Baghchechi M, Haddad E, Avitua A, et al. Male and Female Mice Exhibit Divergent Responses of the Cortical Vasculature to Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma*. 2018;35(14):1646-58.
181. Roof RL, Hall ED. Estrogen-related gender difference in survival rate and cortical blood flow after impact-acceleration head injury in rats. *J Neurotrauma*. 2000;17(12):1155-69.
182. Roof RL, Hall ED. Gender differences in acute CNS trauma and stroke: neuroprotective effects of estrogen and progesterone. *J Neurotrauma*. 2000;17(5):367-88.
183. He J, Evans CO, Hoffman SW, Oyesiku NM, Stein DG. Progesterone and allopregnanolone reduce inflammatory cytokines after traumatic brain injury. *Exp Neurol*. 2004;189(2):404-12.
184. VanLandingham JW, Cekic M, Cutler SM, Hoffman SW, Washington ER, Johnson SJ, et al. Progesterone and its metabolite allopregnanolone differentially regulate hemostatic proteins after traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2008;28(11):1786-94.
185. Gee AC, Sawai RS, Differding J, Muller P, Underwood S, Schreiber MA. The influence of sex hormones on coagulation and inflammation in the trauma patient. *Shock*. 2008;29(3):334-41.
186. Coleman JR, Moore EE, Kelher MR, Samuels JM, Cohen MJ, Sauaia A, et al. Female platelets have distinct functional activity compared with male platelets: Implications in transfusion practice and treatment of trauma-induced coagulopathy. *J Trauma Acute Care Surg*. 2019;87(5):1052-60.

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: „Neurological Severity Score“ Protokoll	28
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Messzelle des Multiplate® (122)	33
Abbildung 3: Funktionsprinzip der Sensordrähte in der Messzelle (123)	34
Abbildung 4: Beispielhafte Darstellung eines Messergebnisses (124)	34
Abbildung 5: Beispielhafte Darstellung zweier Hirnschnitte einer Maus 6 Stunden nach induziertem SHT	37
Abbildung 6: Schneideprotokoll	38
Abbildung 7: Ergebnisse der Studien an Mäusen mit einem kompletten Knockout von SGLT-2-Transportern auf allen Zellen	48
Abbildung 8: Körpergewicht der nativen Weibchen	49
Abbildung 9: Körpergewicht der nativen Männchen	50
Abbildung 10: Blutbild der nativen Weibchen – Thrombozyten.....	51
Abbildung 11: Blutbild der nativen Weibchen - Erythrozyten	53

Abbildung 12: Blutbild der nativen Weibchen - Leukozyten	55
Abbildung 13: Blutbild der nativen Männchen - Thrombozyten.....	57
Abbildung 14: Blutbild der nativen Männchen - Erythrozyten	59
Abbildung 15: Blutbild der nativen Männchen - Leukozyten	61
Abbildung 16: Thrombozytenaggregationsfähigkeit der nativen Weibchen	63
Abbildung 17: Thrombozytenaggregationsfähigkeit der nativen Männchen.....	64
Abbildung 18: PCR der nativen Weibchen - mRNA-Expression von TNF- α und IL-1 β	65
Abbildung 19: PCR der nativen Männchen - mRNA-Expression von TNF- α und IL-1 β	66
Abbildung 20: Dot Blot von IgG der nativen Männchen	67
Abbildung 21: Körpergewicht der weiblichen und männlichen Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induzierten SHT.....	69
Abbildung 22: Blutzucker-Messwerte der weiblichen und männlichen Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induzierten SHT.....	71
Abbildung 23: Blutbild der weiblichen und männlichen Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induzierten SHT - Thrombozyten.....	73
Abbildung 24: Blutbild der weiblichen und männlichen Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induzierten SHT - Erythrozyten	75
Abbildung 25: Blutbild der weiblichen und männlichen Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induzierten SHT - Leukozyten	77
Abbildung 26: Thrombozytenaggregationsfähigkeit der Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT – AUC Messkanal 1	79
Abbildung 27: Thrombozytenaggregationsfähigkeit der Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT – AUC Messkanal 2	80
Abbildung 28: Thrombozytenaggregationsfähigkeit der Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT – AUC Messkanal 1 und 2	81
Abbildung 29: Schadensvolumenanalyse der Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT – Kontusionsvolumen prozentual zur ipsilateralen Hemisphäre	83
Abbildung 30: Schadensvolumenanalyse der Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT – Kontusionsvolumen prozentual zur ipsilateralen Hemisphäre	84

Abbildung 31: Schadensvolumenanalyse der Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT – Ödemkorrektur	86
Abbildung 32: Schadensvolumenanalyse der Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT – Ödemkorrektur	87
Abbildung 33: Immunhistochemische IgG-Färbung der Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT – absolute IgG-Extravasation	89
Abbildung 34: Immunhistochemische IgG-Färbung der Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT – absolute IgG-Extravasation	90
Abbildung 35: Immunhistochemische IgG-Färbung der Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT - Gesamtfläche Gehirn.....	92
Abbildung 36: Immunhistochemische IgG-Färbung der Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT - Gesamtfläche Gehirn.....	93
Abbildung 37: PCR der Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT - mRNA-Expression von IL-1 β	95
Abbildung 38: PCR der Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT - mRNA-Expression von IL-1 β	96
Abbildung 39: PCR der Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT - mRNA-Expression von TNF- α	97
Abbildung 40: PCR der Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT - mRNA-Expression von TNF- α	98
Abbildung 41: Dot Blot von IgG der Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT.....	101
Abbildung 42: Dot Blot von IgG der Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT.....	102
Abbildung 43: Körpergewicht der Weibchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT	105
Abbildung 44: Körpergewicht der Männchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT	107
Abbildung 45: Blutzucker-Messwerte der Weibchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT	109
Abbildung 46: Blutzucker-Messwerte der Männchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT	110

Abbildung 47: Blutbild der Weibchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT - Thrombozyten.....	112
Abbildung 48: Blutbild der Weibchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT - Erythrozyten.....	114
Abbildung 49: Blutbild der Weibchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT - Leukozyten	116
Abbildung 50: Blutbild der Männchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT - Thrombozyten.....	117
Abbildung 51: Blutbild der Männchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT - Erythrozyten.....	119
Abbildung 52: Blutbild der Männchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT - Leukozyten	121
Abbildung 53: Motorfunktionsanalyse der Weibchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT - Punktwerte des NSS.....	123
Abbildung 54: Motorfunktionsanalyse der Weibchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT - Rotarod-Leistungstest.....	124
Abbildung 55: Motorfunktionsanalyse der Männchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT - Punktwerte des NSS.....	126
Abbildung 56: Motorfunktionsanalyse der Männchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT - Rotarod-Leistungstest.....	127
Abbildung 57: Motorfunktionsanalyse der Männchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT - Videotrackingsoftware von Noldus.....	129
Abbildung 58: Schadensvolumenanalyse der Weibchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach in induziertem SHT - Kontusionsvolumen prozentual zur ipsilateralen Hemisphäre und Ödemkorrektur	131
Abbildung 59: Schadensvolumenanalyse der Männchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach in induziertem SHT - Kontusionsvolumen prozentual zur ipsilateralen Hemisphäre und Ödemkorrektur	132
Abbildung 60: PCR der Weibchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT - mRNA-Expression von Iba1, TNF- α und IL-1 β	134
Abbildung 61: PCR der Männchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT - mRNA-Expression von Iba1, TNF- α und IL-1 β	135
Abbildung 62: Beispielkurve einer Multiplate [®] Analyzer Messung	144

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien	12
Tabelle 2: Verwendete Lösungen	12
Tabelle 3: Verwendete Pharmakotherapeutika	12
Tabelle 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien	14
Tabelle 5: Verwendete Geräte und Software	17
Tabelle 6: Verwendete Antikörper	17
Tabelle 7: Verwendete Primer	17
Tabelle 8: Anzahl der Versuchstiere in der Studie von Männchen und Weibchen mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT	19
Tabelle 9: Schritte der Kresylviolett-Färbung	39
Tabelle 10: Schritte der immunhistochemischen Färbung von IgG	42
Tabelle 11: Target mit dazugehörigem Assay der RT-PCR	44
Tabelle 12: Blutbild der nativen Weibchen - MW \pm SEM der Thrombozyten	52
Tabelle 13: Blutbild der nativen Weibchen - MW \pm SEM der Erythrozytenindizes	54
Tabelle 14: Blutbild der nativen Weibchen - MW \pm SEM der Leukozyten	56
Tabelle 15: Blutbild der nativen Männchen - MW \pm SEM der Thrombozyten	58
Tabelle 16: Blutbild der nativen Männchen - MW \pm SEM der Erythrozytenindizes ...	60
Tabelle 17: Blutbild der nativen Männchen - MW \pm SEM der Leukozyten	62
Tabelle 18: Thrombozytenaggregationsfähigkeit der nativen Weibchen (MW \pm SEM)	63
Tabelle 19: Thrombozytenaggregationsfähigkeit der nativen Männchen (MW \pm SEM)	64
Tabelle 20: PCR der nativen Weibchen - MW \pm SEM der mRNA-Expression von TNF- α und IL-1 β	65
Tabelle 21: PCR der nativen Männchen - MW \pm SEM der mRNA-Expression von TNF- α und IL-1 β	66
Tabelle 22: Körpergewicht der weiblichen und männlichen Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induzierten SHT (MW \pm SEM)	70
Tabelle 23: Blutzucker-Messwerte der weiblichen und männlichen Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induzierten SHT (MW \pm SEM)	72
Tabelle 24: Blutbild der weiblichen und männlichen Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induzierten SHT - MW \pm SEM der Thrombozyten	74

Tabelle 25: Blutbild der weiblichen und männlichen Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induzierten SHT - MW \pm SEM der Erythrozytenindizes	76
Tabelle 26: Blutbild der weiblichen und männlichen Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induzierten SHT - MW \pm SEM der Leukozyten	78
Tabelle 27: Thrombozytenaggregationsfähigkeit der Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT – MW \pm SEM der AUC Messkanal 1 und 2	82
Tabelle 28: Schadensvolumenanalyse der Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT – MW \pm SEM des Kontusionsvolumens prozentual zur ipsilateralen Hemisphäre.....	85
Tabelle 29: Schadensvolumenanalyse der Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT – MW \pm SEM der Ödemkorrektur	87
Tabelle 30: Immunhistochemische IgG-Färbung der Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT – MW \pm SEM der absolute IgG-Extravasation.....	91
Tabelle 31: Immunhistochemische IgG-Färbung der Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT - MW \pm SEM der Gesamtfläche des Gehirns	93
Tabelle 32: PCR der Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT - MW \pm SEM der mRNA-Expression von IL-1 β	96
Tabelle 33: PCR der Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT - MW \pm SEM der mRNA-Expression von TNF- α	99
Tabelle 34: Dot Blot von IgG der Versuchstiere mit einer Überlebensdauer von 6 Stunden nach induziertem SHT (MW \pm SEM)	103
Tabelle 35: Körpergewicht der Weibchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT (MW \pm SEM)	106
Tabelle 36: Körpergewicht der Männchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT (MW \pm SEM).....	108
Tabelle 37: Blutzucker-Messwerte der Weibchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT (MW \pm SEM).....	110
Tabelle 38: Blutzucker-Messwerte der Männchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT (MW \pm SEM).....	111

Tabelle 39: Blutbild der Weibchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT - MW ± SEM der Thrombozyten.....	113
Tabelle 40: Blutbild der Weibchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT - MW ± SEM der Erythrozytenindizes	115
Tabelle 41: Blutbild der Weibchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT - MW ± SEM der Leukozyten	116
Tabelle 42: Blutbild der Männchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT - MW ± SEM der Thrombozyten.....	118
Tabelle 43: Blutbild der Männchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT - MW ± SEM der Erythrozytenindizes	120
Tabelle 44: Blutbild der Männchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT - MW ± SEM der Leukozyten	122
Tabelle 45: Motorfunktionsanalyse der Weibchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT - MW ± SEM der Punktwerte des NSS.....	124
Tabelle 46: Motorfunktionsanalyse der Weibchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT - MW ± SEM des Rotarod-Leistungstest	125
Tabelle 47: Motorfunktionsanalyse der Männchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT - MW ± SEM der Punktwerte des NSS.....	127
Tabelle 48: Motorfunktionsanalyse der Männchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT - MW ± SEM des Rotarod-Leistungstest	128
Tabelle 49: Motorfunktionsanalyse der Männchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT - MW ± SEM der Videotrackingsoftware von Noldus130	
Tabelle 50: Schadensvolumenanalyse der Weibchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach in induziertem SHT (MW ± SEM).....	131
Tabelle 51: Schadensvolumenanalyse der Männchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach in induziertem SHT (MW ± SEM).....	132
Tabelle 52: PCR der Weibchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT - MW ± SEM der mRNA-Expression von Iba1, TNF-α und IL-1β	134
Tabelle 53: PCR der Männchen mit einer Überlebensdauer von 5 Tagen nach induziertem SHT - MW ± SEM der mRNA-Expression von Iba1, TNF-α und IL-1β	136

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Datenerhebung, den Experimenten und dem Schreiben dieser Doktorarbeit unterstützt haben. Insbesondere gilt mein Dank folgenden Personen, ohne die die Anfertigung dieser Arbeit niemals möglich gewesen wäre:

Mein Dank gilt zunächst meinem Doktorvater ... für die Überlassung dieses Themas und die gute Betreuung, sowie freundliche Hilfe und Unterstützung.

Weiterhin möchte ich dem Direktor Herrn ... und der stellvertretenden Direktorin Frau ... aus der Klinik für Anästhesiologie danken, die es mir ermöglicht haben, diese Arbeit in Ihrer Klinik durchzuführen und auf deren Ressourcen ich zurückgreifen konnte.

Ebenfalls möchte ich dem Team der Arbeitsgruppe „Neuroprotektion“ aus der Klinik für Anästhesiologie danken. Besonders zu erwähnen sind an dieser Stelle Frau ..., die mich vor Allem in der Anfangszeit meiner Versuche sehr unterstützt hat, sowie ... und ..., die mir bei allen technischen und praktischen Fragen immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Auch meinen lieben Eltern, meiner Schwester, meiner Freundin und meinen Freunden möchte ich sehr herzlich für ihre ausdauernde Unterstützung und ihren stetigen Rückhalt danken.

10 Tabellarischer Lebenslauf

Lucas Wiesmann

Geboren: 24.03.1997 in Darmstadt

Studium:

- 10/2015 bis 11/2021 **Studium der Humanmedizin** an der Johannes Gutenberg Universität Mainz
 - 09/2017 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 - Bestanden mit der Note – gut (2,0)
 - 10/2020 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 - Bestanden mit der Note – gut (2,0)
 - 11/2020 bis 10/2021 **Praktisches Jahr**
 - 11/2020 bis 03/2021 1. Tertial Chirurgie
 - Universitätsmedizin Mainz
 - 03/2021 bis 06/2021 2. Tertial Innere Medizin
 - Universitätsmedizin Mainz
 - 06/2021 bis 10/2021 3. Tertial Wahlfach Urologie
 - Universitätsmedizin Mainz
 - 11/2021 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 - Bestanden mit der Note – sehr gut (1,0)
 - Ärztliche Prüfung mit der Gesamtnote – gut (1,66)
 - 12/2021 **Approbation als Arzt**

Promotion:

- 05/2018 bis heute **Experimentelle Promotionsarbeit** „Auswirkungen eines Thrombozyten-spezifischen SGLT-2 Knockouts auf den sekundären Hirnschaden sowie die Gerinnung nach experimentellem Schädelhirntrauma in der Maus“
 - AG Neuroprotektion, Klinik für Anästhesiologie der Universitätsmedizin Mainz – Prof. Dr. med. ...

Praktika und Famulaturen:

- 07/2015 bis 08/2015 Krankenpflegepraktikum auf der Station für Allgemein- und Viszeralchirurgie
 - Agaplesion Elisabethenstift gGmbH in 64287 Darmstadt
- 08/2016 Krankenpflegepraktikum in der Augenklinik
 - Augenklinik – Klinikum Darmstadt GmbH
- 03/2018 Famulatur in der Anästhesie
 - Klinik für Anästhesie und operative Intensivmedizin – Klinikum Darmstadt GmbH
- 03/2019 Famulatur in der Allgemeinmedizin

- Praxis Dr. med. Karl-Franz Gruber-Gerardy in 55129 Mainz
- 09/2019 Famulatur in der Inneren Medizin
 - Klinik für Innere Medizin 2 – Katholisches Klinikum Mainz
- 03/2020 Famulatur in der Gastroenterologie/Innere Medizin
 - Internistenpraxis Mainz – Praxis für Innere Medizin und Gastroenterologie in 55116 Mainz

Berufliche Laufbahn:

- 10/2016 bis 12/2019 Pflegehelfer in der Augenklinik
 - Augenklinik - Klinikum Darmstadt GmbH
- 01/2022 bis heute **Assistenzarzt**
 - 1. Med. Klinik und Poliklinik - Universitätsmedizin Mainz

Schulische Ausbildung:

- 09/2003 bis 07/2007 **Grundschule**
 - Carl-Ulrich-Schule in 64331 Weiterstadt
- 08/2007 bis 06/2015 **Allgemeine Hochschulreife**
 - Albrecht-Dürerer-Schule in 64331 Weiterstadt
 - Abschluss – Ø 1,1

Auszeichnungen:

- 06/2015 Buchpreis für hervorragende Leistungen im Fachbereich Biologie des Abiturjahrgangs 2015
 - Albrecht-Dürerer-Schule in 64331 Weiterstadt

Sprachen:

- **Deutsch** Muttersprache
- **Englisch** Gute Kenntnisse in Wort und Schrift
- **Latein** Großes Latinum