

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

Auswirkungen einer intracerebroventrikulären Applikation von rekombinantem Osteopontin auf den sekundären Hirnschaden im murinen Polytraumamodell

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

Vorgelegt von

Jannic Federspiel  
aus Püttlingen

Mainz, 2023

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 04.08.2023

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>vii</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>xii</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>xiv</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Literaturdiskussion .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Das Schädel-Hirn-Trauma .....</b>	<b>3</b>
2.1.1 Definition und Epidemiologie .....	3
2.1.2 Klinische Aspekte.....	4
2.1.3 Pathophysiologie .....	7
2.1.3.1 Primärer Hirnschaden.....	7
2.1.3.2 Sekundärer Hirnschaden.....	7
2.1.3.2.1 Grundlegende Pathomechanismen des SHT und Exzitotoxizität .....	8
2.1.3.2.2 Neuroinflammation und Störung der Bluthirnschranke.....	9
2.1.4 Anwendung von SHT-Modellen in einem tierexperimentellen Kontext .....	17
<b>2.2 Die Begleitverletzung: Knochenfraktur langer Röhrenknochen .....</b>	<b>19</b>
2.2.1 Pathophysiologische Aspekte der Frakturheilung.....	19
2.2.2 Auswirkungen auf den sekundären Hirnschaden .....	22
<b>2.3 Das Polytrauma .....</b>	<b>25</b>
2.3.1 Definition und Epidemiologie .....	25
<b>2.4 Das Glykoprotein Osteopontin.....</b>	<b>29</b>
<b>3 Material .....</b>	<b>39</b>
<b>3.1 Geräte .....</b>	<b>39</b>
<b>3.2 Verbrauchsmaterialien .....</b>	<b>42</b>
<b>3.3 Puffer und Lösungen.....</b>	<b>44</b>
<b>3.4 Chemikalien.....</b>	<b>45</b>
<b>3.5 Medikamente.....</b>	<b>46</b>
<b>3.6 Primäre Antikörper.....</b>	<b>46</b>
<b>3.7 Sekundäre Antikörper .....</b>	<b>47</b>
<b>3.8 Kits.....</b>	<b>48</b>
<b>3.9 Primer .....</b>	<b>48</b>
<b>3.10 Software.....</b>	<b>49</b>
<b>4 Methoden .....</b>	<b>50</b>
<b>4.1 Versuchsübersicht und Studiendesign .....</b>	<b>50</b>

<b>4.2</b>	<b>Genehmigung der Tierversuche</b>	<b>51</b>
<b>4.3</b>	<b>Tiere und Tierhaltung</b>	<b>51</b>
<b>4.4</b>	<b>Erhebung allgemeiner und verhaltenspathophysiologischer Parameter</b>	<b>52</b>
4.4.1	Neuroscore	52
4.4.2	open field test	54
4.4.3	Beinbelastungsscore	55
4.4.4	Bestimmung des Gewichts der Versuchstiere	56
<b>4.5</b>	<b>ICV-Injektion und Polytrauma-Modell</b>	<b>57</b>
4.5.1	Narkose und allgemeine perioperative Maßnahmen	57
4.5.2	ICV-Injektion	57
4.5.3	CCI-Modell	59
4.5.4	Femurfraktur	60
4.5.5	Sham-Operation	62
4.5.6	Euthanasie und Entnahme von Gewebeproben	62
<b>4.6</b>	<b>Histopathologische Analyse</b>	<b>63</b>
4.6.1	Kryostat und Probengewinnung	63
4.6.2	Kresylviolett-Färbung	64
4.6.3	Quantifizierung des Kontusionsvolumens	65
4.6.4	Dickemessung Gyrus dentatus	65
4.6.5	Immunhistochemische Färbung	67
4.6.6	Quantifizierung der immunhistochemischen Färbung	68
<b>4.7</b>	<b>Biochemische und molekularbiologische Analyse</b>	<b>69</b>
4.7.1	Bestimmung der OPN-Konzentration im Blutplasma mittels ELISA	69
4.7.2	RNA-Analyse	70
4.7.2.1	RNA-Extraktion und photometrische Konzentrationsbestimmung	70
4.7.2.2	Synthese der komplementären DNA	71
4.7.2.3	quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion	72
4.7.3	Proteinanalyse	73
4.7.3.1	Proteinextraktion und Konzentrationsbestimmung	73
4.7.3.2	Elektrophorese	74
4.7.3.3	Western-Blot, Detektion und Auswertung	76
<b>4.8</b>	<b>Statistische Auswertung</b>	<b>77</b>
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>79</b>
<b>5.1</b>	<b>Allgemeine und verhaltenspathophysiologische Untersuchungen</b>	<b>80</b>
5.1.1	Gewicht	80
5.1.2	Beinbelastungsscore	83
5.1.3	Neuroscore	84



5.1.4	open field test.....	85
5.1.4.1	Zurückgelegte Distanz.....	86
5.1.4.2	exit from the circle .....	88
5.1.4.3	border zone time .....	89
<b>5.2</b>	<b>Histopathologische Analyse .....</b>	<b>90</b>
5.2.1	Analyse des Kontusionsvolumens .....	90
5.2.2	Dickemessung der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus.....	92
5.2.3	Immunhistochemische Färbungen GFAP und Iba1.....	92
5.2.3.1	Immunhistochemische Färbung GFAP .....	93
5.2.3.2	Immunhistochemische Färbung Iba1 .....	94
<b>5.3</b>	<b>Biochemische und molekularebiologische Analyse .....</b>	<b>96</b>
5.3.1	OPN ELISA .....	96
5.3.2	Quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion.....	97
5.3.2.1	GFAP.....	97
5.3.2.2	Granulin.....	98
5.3.2.3	TSPO.....	99
5.3.2.4	SerpA3n.....	100
5.3.2.5	TNF- $\alpha$ .....	101
5.3.2.6	OPN .....	102
5.3.3	Western Blot.....	103
5.3.3.1	GFAP.....	103
5.3.3.2	OPN .....	104
5.3.3.3	145 kDa/150 kDa SBDPs.....	105
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>107</b>
6.1	<b>Auswirkungen von appliziertem rOPN auf allgemeine und verhaltenspathophysiologische Untersuchungen.....</b>	<b>107</b>
6.2	<b>Auswirkungen von appliziertem rOPN auf den histopathologischen Schaden</b>	<b>110</b>
6.3	<b>Auswirkungen von appliziertem rOPN auf die Aktivierung von Gliazellen..</b>	<b>112</b>
6.4	<b>Auswirkungen von appliziertem rOPN auf die Polytrauma-induzierte Genexpression im Gehirn.....</b>	<b>115</b>
6.5	<b>Auswirkungen von appliziertem rOPN auf die mit Nekrose und Apoptose assoziierte Degradation von <math>\alpha</math>-Spektrin.....</b>	<b>117</b>
6.6	<b>Auswirkungen von appliziertem rOPN auf die OPN-Serumkonzentration und die OPN-Genexpression im Gehirn .....</b>	<b>118</b>
6.7	<b>Limitationen und Aussichten.....</b>	<b>120</b>
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>122</b>

<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>124</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>149</b>
<b>10</b>	<b>Tabellarischer Lebenslauf.....</b>	<b>150</b>

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
<sup>2</sup>	Quadrat-
<sup>3</sup>	Kubik-
AIS	<i>abbreviated injury scale</i>
AMPA	<i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATG5	<i>autophagy related 5</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Bax	<i>bcl-2 associated x protein</i>
BBS	Beinbelastungsscore
Bcl-2	<i>b-cell lymphoma 2</i>
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BSA	Bovines Serumalbumin
bspw.	beispielsweise
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
c-	Zenti-
ca.	circa
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CCI	<i>controlled cortical impact</i>
CCL2	CC-Chemokin-Ligand-2
cDNA	<i>complementary DNA</i> (dt. komplementäre DNA)
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
<i>counts</i>	Anzahl GFAP-positiver oder Iba1-positiver Partikel
CP	<i>crossingpoint</i>
CPP	<i>cerebral perfusion pressure</i> (dt. zerebraler Perfusionsdruck)
CXCL9	CXC-Ligand 9
d	Tag
d1	1. postoperativer Tag

d3	3. postoperativer Tag
d5	5. postoperativer Tag
Da	Dalton
DAMP	<i>damage-associated molecular patterns</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC	<i>dendritic cells</i> (dt. dentritische Zellen)
DGU	Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (dt. Desoxyribonukleinsäure)
dt.	deutsch
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
engl.	englisch
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
ETA-1	<i>early T cell activated gene</i>
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FF	Femurfraktur
FGF-2	<i>fibroblast growth factor 2</i>
FPI	<i>fluid percussion injury</i>
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GBD	<i>global burden of disease</i>
GCS	<i>glasgow-coma-scale</i>
GD	Gyrus dentatus
gDNA	genomische DNA
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
GRN	Granulin
GV-SOLAS	Gesellschaft für Versuchstierkunde / <i>society of laboratory animal science</i>
h	Stunde
HMGB1	<i>high mobility group 1</i>
Hz	Hertz
Iba1	<i>ionized calcium-binding adapter molecule 1</i>
ICP	<i>intracranial pressure</i> (dt. intrakranieller Druck)
ICV	intracerebroventrikulär

IFN- $\alpha$	Interferon alpha
IFN- $\gamma$	Interferon gamma
IL-10	Interleukin-10
IL-12	Interleukin-12
IL-13	Interleukin-13
IL-1ra	Interleukin-1 Rezeptorantagonist
IL-1 $\alpha$	Interleukin-1-alpha
IL-1 $\beta$	Interleukin-1-beta
IL-4	Interleukin-4
IL-6	Interleukin-6
iOPN	intrazelluläres OPN
ISS	<i>injury severity score</i>
JAK2	<i>janus kinase 2</i>
JAM	<i>junctional adhesion molecules</i>
k-	Kilo-
kb	Kilobasen
KG	Körpergewicht
KZS	Körnerzellschicht
l	Liter
lat.	lateinisch
LC3	<i>light chain 3</i>
LPS	Lipopolysachariden
m	Meter
M	Molar
m-	Milli-
m/s	Meter pro Sekunde
MAIS	<i>maximum AIS</i>
MAP	<i>mean arterial pressure</i> (dt. mittlerer arterieller Druck)
min	Minute
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MMP-9	Matrix-Metalloproteinase-9
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
MRT	Magnetresonanztomographie

n-	Nano-
NaCl	Natriumchlorid
NISS	<i>new injury severity score</i>
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NSS	<i>neurological severity score</i>
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OD	Optische Dichte
OP	Operation
OPN	Osteopontin
paCO <sub>2</sub>	arterieller Kohlendioxidpartialdruck
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PFA	Paraformaldehyd
PGRN	Progranulin
PI3K	<i>phosphoinositide 3-kinase</i>
PKB	Protein Kinase B
<i>poly rOPN</i>	CCI- / FF-operierte (Polytrauma-operierte) Tiere mit ICV Applikation von rOPN
<i>poly veh</i>	CCI- / FF-operierte (Polytrauma-operierte) Tiere mit ICV Applikation einer wirkstofflosen Trägerlösung
PPIA	Peptidylprolyl Isomerase A
pre	präoperativer Tag, ein Tag vor der Polytrauma- oder Sham-Operation
qPCR	<i>real-time quantitative PCR</i> (dt. quantitative Echtzeit-PCR)
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (dt. Ribonukleinsäure)
rOPN	rekombinantes OPN
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (dt. reaktive Sauerstoffspezies)
rpm	<i>rounds per minute</i>
s	Sekunde
s.	siehe
SBDPs	<i>spectrin breakdown products</i>
SDF-1	<i>stromal cell-derived factor 1</i>

SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SEM	Standardfehler
SerpA3n	Serin-Protease-Inhibitor A3n
<i>sham rOPN</i>	scheinoperierte Tiere mit ICV Applikation von rOPN
<i>sham veh</i>	scheinoperierte Tiere mit ICV Applikation einer wirkstofflosen Trägerlösung
SHT	Schädel-Hirn-Trauma
SIBLING	<i>small integrin binding ligand N-linked glycoprotein</i>
SpO <sub>2</sub>	kapillare Sauerstoffsättigung
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
TBI	<i>traumatic brain injury</i>
TGF-β	<i>transforming growth factor-beta</i>
TLR	<i>toll-like-receptor</i>
TNF-α	Tumornekrosefaktor alpha
TSPO	<i>translocator protein</i>
u.a.	unter anderem
v/v	<i>volume/volume</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
veh	<i>vehicle</i>
w/v	<i>weight/volume</i>
WHO	<i>world health organisation</i>
YLDs	<i>years lived with disability</i>
ZNS	zentrales Nervensystem
μ-	Mikro-

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Struktureller Aufbau und Aminosäuresequenz von Osteopontin .....	31
<b>Abbildung 2:</b> Regulation von Entzündungs- und Immunzellen durch Osteopontin ..	33
<b>Abbildung 3:</b> Autophagie. Auswirkungen von intranasal appliziertem rOPN in einem Modell für Subarachnoidalblutung in Ratten .....	36
<b>Abbildung 4:</b> Laborinternes Neuroscore-Protokoll .....	54
<b>Abbildung 5:</b> Laborinternes Beinbelastungsscore-Protokoll.....	56
<b>Abbildung 6:</b> ICV-Injektion.....	59
<b>Abbildung 7:</b> CCI-Modell .....	60
<b>Abbildung 8:</b> Postoperative Röntgenkontrolle der linksseitigen Femurfraktur.....	61
<b>Abbildung 9:</b> CCI-Gehirn nach Entnahme .....	63
<b>Abbildung 10:</b> Veranschaulichung des Kontusionsgewebes gegenüber intaktem Gewebe .....	65
<b>Abbildung 11:</b> Dickemessung der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus .....	67
<b>Abbildung 12:</b> Darstellung der immunhistochemisch untersuchten Bereiche .....	69
<b>Abbildung 13:</b> Präoperatives Ausgangsgewicht der Versuchstiere.....	80
<b>Abbildung 14:</b> Gewichtsentwicklung im Zeitverlauf .....	81
<b>Abbildung 15:</b> Absolutes Gewicht im Zeitverlauf .....	82
<b>Abbildung 16:</b> Beinbelastungsscores im Zeitverlauf .....	83
<b>Abbildung 17:</b> Neuroscore im Zeitverlauf .....	84
<b>Abbildung 18:</b> Neuroscore der Polytrauma-operierten Tiere im Zeitverlauf .....	85
<b>Abbildung 19:</b> Zurückgelegte Distanz im Zeitverlauf.....	86
<b>Abbildung 20:</b> Zurückgelegte Distanz der Polytrauma-operierten Tiere im Zeitverlauf .....	87
<b>Abbildung 21:</b> exit from the circle im Zeitverlauf .....	88
<b>Abbildung 22:</b> border zone time im Zeitverlauf.....	89
<b>Abbildung 23:</b> Hirnvolumen gesamt .....	90
<b>Abbildung 24:</b> Graphische und histologische Darstellung des Kontusionsvolumens .....	91
<b>Abbildung 25:</b> Graphische und histologische Darstellung der Dickemessung der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus.....	92
<b>Abbildung 26:</b> Quantifizierung der GFAP-positiven Partikel .....	93
<b>Abbildung 27:</b> Quantifizierung der Iba1-positiven Partikel .....	94



<b>Abbildung 28:</b> Immunhistochemische Färbungen der periläsionalen Region .....	95
<b>Abbildung 29:</b> Konzentration von Osteopontin im Blutserum.....	96
<b>Abbildung 30:</b> mRNA-Expression GFAP .....	97
<b>Abbildung 31:</b> mRNA-Expression GRN.....	98
<b>Abbildung 32:</b> mRNA-Expression TSPO .....	99
<b>Abbildung 33:</b> mRNA-Expression SerpA3n.....	100
<b>Abbildung 34:</b> mRNA-Expression TNF- $\alpha$ .....	101
<b>Abbildung 35:</b> mRNA-Expression OPN.....	102
<b>Abbildung 36:</b> Proteinexpression GFAP.....	103
<b>Abbildung 37:</b> Proteinexpression Osteopontin .....	104
<b>Abbildung 38:</b> 145 kDa/150 kDa SBDPs .....	105

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Die glasgow-coma-scale .....	5
<b>Tabelle 2:</b> Geräte.....	41
<b>Tabelle 3:</b> Verbrauchsmaterialien.....	43
<b>Tabelle 4:</b> Puffer und Lösungen .....	44
<b>Tabelle 5:</b> Chemikalien.....	46
<b>Tabelle 6:</b> Medikamente .....	46
<b>Tabelle 7:</b> Primäre Antikörper.....	47
<b>Tabelle 8:</b> Sekundäre Antikörper.....	47
<b>Tabelle 9:</b> Kits.....	48
<b>Tabelle 10:</b> Primer .....	49
<b>Tabelle 11:</b> Software.....	49
<b>Tabelle 12:</b> Studiendesign.....	50
<b>Tabelle 13:</b> Zeitlicher Ablauf allgemeiner und verhaltenspathophysiologischer Analysen .....	51
<b>Tabelle 14:</b> Parameter Tierhaltungsschrank .....	52
<b>Tabelle 15:</b> Probengewinnung zur molekularbiologischen Analyse .....	64
<b>Tabelle 16:</b> Pipettierschema SYBR-Green.....	73
<b>Tabelle 17:</b> Zusammensetzung Trenngel und Sammelgel.....	75
<b>Tabelle 18:</b> Zur graphischen Darstellung verwendete Abkürzungen.....	79

# 1 Einleitung

Auch in der heutigen Zeit zählt das Schädel-Hirn-Trauma (SHT) bis zum frühen Erwachsenenalter zu den häufigsten Ursachen für Tod und lebenslange Behinderung. In Deutschland muss pro Jahr von einer Inzidenz von 332 Patienten mit SHT pro 100.000 Einwohner ausgegangen werden (1–3). Weltweit geht man von 69 Millionen Menschen pro Jahr aus, die von einem SHT betroffen sind (4).

Das SHT ist die Folge einer Krafteinwirkung auf den Schädelknochen und das darunterliegende Gewebe. Die hieraus resultierenden primären Verletzungsfolgen sind irreversibel und letztendlich nur durch präventive Maßnahmen zu beeinflussen. Bei der Entwicklung von Therapieoptionen liegt der Fokus auf der Eindämmung des sich im Rahmen komplexer pathophysiologischer Prozesse entwickelnden sekundären Hirnschadens (3,5,6).

Häufig geht das SHT mit weiteren Verletzungen, wie beispielsweise Knochenfrakturen der Extremitäten, einher (7–10). Erweist sich eine dieser Verletzung oder die Kombination der Verletzungen als lebensbedrohlich, spricht man von einem Polytrauma (11). Polytrauma-Patienten, die ein SHT erleiden weisen eine höhere Mortalität und eine schlechtere Rehabilitationsfähigkeit auf, als Polytrauma-Patienten ohne SHT (12,13). Für den klinischen Alltag ist es daher höchst relevant das SHT und weitere Verletzungen in einem wissenschaftlichen Kontext kombiniert zu betrachten.

Schultz *et al.* und Yang *et al.* zeigten bereits im Mausmodell, dass bei gleichzeitigem Vorliegen eines geschlossenen Schädel-Hirn-Traumas und einer geschlossenen Tibia Fraktur, es zu einer verstärkten Neuroinflammation und einer erhöhten Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke (BHS) kommt. Dies zeigt sich in ausgeprägteren neurologischen Defiziten und verstärkt darstellbaren histopathologischen Hirnschädigungen in den Tieren mit kombinierter cerebraler und ossärer Schädigung (14,15). Interessanterweise wirkt sich das Vorliegen eines SHTs, bei gleichzeitiger Tibia-Fraktur, wohl fördernd auf die Knochenheilung aus (16).

Ein Aspekt dieser Arbeit ist es, die Wechselwirkungen zwischen SHT und Knochenfraktur, in Form der Mobilisation inflammatorischer Mediatoren von der Knochenfraktur zum Gehirn und die damit einhergehende verstärkte Neuroinflammationsreaktion (15), zu untersuchen. Hierzu wird ein etabliertes Mausmodell für ein offenes SHT mit kombinierter Fraktur des Femurs verwendet (17).

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht das Glykoprotein Osteopontin (OPN), dem in unterschiedlichen Modellen experimenteller Hirnschädigung neuroprotektive Effekte zugesprochen werden konnten (18–20). Darüber hinaus wird OPN als regulatorischer Faktor der Neuroinflammation angesehen (21).

Ziel dieser Arbeit ist die Evaluation der neuroprotektiven Effekte von OPN am murinen Polytrauma-Modell. Hierbei soll die neuroprotektive Rolle von OPN in dem komplexen pathophysiologischen Zusammenspiel der cerebralen Schädigung und der peripheren ossären Pathologie, diskutiert werden. Explizit soll gezeigt werden, ob eine intracerebroventrikuläre (ICV) Applikation von rekombinantem OPN (rOPN) unmittelbar vor Anwendung des SHT / Femurfraktur-Modells den sekundären Hirnschaden vermindert. Die Auswirkungen der ICV Gabe von Osteopontin werden in dieser Arbeit auf verschiedenen Ebenen analysiert. So erfolgt zunächst eine verhaltenspathophysiologische Analyse der Versuchstiere zu verschiedenen Zeitpunkten vor und bis zum 5. Tag nach der Polytrauma-Operation. Zur histopathologischen Analyse des Schadensvolumens werden 5 Tage nach Anwendung des SHT / Femurfraktur-Modells Serienschnitte der *post mortem* entnommen Gehirne durchgeführt und diese entsprechend gefärbt. Zudem werden spezifische immunhistochemische Zusammenhänge analysiert. Außerdem wird das Gewebe in der zum Schaden ipsilateralen Hemisphäre einer Genexpressionsanalyse unterzogen.

In Anbetracht der Tatsache, dass ein SHT häufig zusammen mit Frakturen langer Röhrenknochen auftritt, was experimentell zu einer Zunahme des sekundären Hirnschadens führt (15,17), kommt dieser Arbeit eine hohe Relevanz im klinischen Alltag zu. Eine neuroprotektive Rolle von OPN in dem komplexen pathophysiologischen Zusammenspiel von Gehirnverletzung und Knochenfraktur, wäre hierbei ein vielversprechender therapeutischer Ansatz.

## 2 Literaturdiskussion

### 2.1 Das Schädel-Hirn-Trauma

#### 2.1.1 Definition und Epidemiologie

Als Schädel-Hirn-Trauma bezeichnet man die Folge einer Gewalteinwirkung, die zu einer Funktionsstörung des Gehirns geführt hat und dabei mit einer Verletzung des Gehirns verbunden sein kann. Das SHT kann außerdem mit Verletzungen der Kopfschwarte, des Schädelknochens, der Gefäße sowie der harten Hirnhaut einhergehen. Die Schädelprellung, die keine Funktionsstörung oder Verletzung des Gehirns aufweist, ist von dem SHT abzugrenzen. Kommt es durch das Zerreißen der harten Hirnhaut (Dura mater) und durch Verletzungen der Weichteile und des Knochens zu einer Verbindung des Schädelinneren mit der Außenwelt, spricht man von einem offenen SHT (3).

Nach einer prospektiven Studie über epidemiologische und ursächliche Aspekte des SHTs in Deutschland, muss jährlich von 332 SHT-Patienten pro 100.000 Einwohnern ausgegangen werden. Im Rahmen der Studie waren 91,2 Prozent (%) als leichte-, 3,9 % als moderate- und 5,2 % als schwere Schädel-Hirn-Trauma klassifiziert worden, wobei Männer mit einem Anteil von 58,4 % gegenüber Frauen (41,6 %) und Kindern (29,7 %) häufiger betroffen waren. Die Letalität lag etwa bei 1 %, was bedeutet, dass von ca. 248.000 SHT-Patienten 2750 verstorben sind. Als Hauptursachen wurden mit 52,5 % Stürze und mit 26,3 % Autounfälle eruiert (2).

Aktuellere Zahlen des statistischen Bundesamts zeigen, dass im Jahr 2015 in Deutschland 6333 Menschen ursächlich an einem Schädel-Hirn-Trauma (ICD-10, S06: intrakranielle Verletzungen) verstarben, wobei auch hier Männer (3850) deutlich häufiger als Frauen (2483) betroffen waren (22). Eine Studie aus dem Jahr 2019 postuliert eine Inzidenz von 10,1 SHT-Fällen pro 100.000 Einwohnern pro Jahr in Deutschland, wobei hier nur moderate und schwere SHT beachtet wurden (8).

Im Rahmen einer Metaanalyse zur Epidemiologie des SHTs in Europa wurde eine europaweite Inzidenz von 262 pro 100.000 Einwohner pro Jahr ermittelt, wobei, am ehesten durch den demografischen Wandel bedingt, der Autounfall von dem Sturzereignis als Hauptursache abgelöst wurde. In der Metaanalyse wurden 28 Studien aus 16 europäischen Ländern, darunter auch Deutschland, in den Jahren 1990 bis 2014 berücksichtigt (23,24). Aufgrund zunehmender Lebenserwartung, rückläufiger Geburtenraten und dem damit einhergehenden Anstieg des Anteils älterer Menschen in

Industrienationen, zeigt sich ein deutlicher Zuwachs älterer Patienten, die ein Schädel-Hirn Trauma erleiden. Die mit dem Alter einhergehende eingeschränkte Mobilität und Multimorbidität führt zu Sturzereignissen, die insbesondere in Kombination mit antikoagulatorischer Therapie meist schwere Schädel-Hirn-Traumata zur Folge haben (23–25).

Die Folgen eines SHTs sind vielfältig und oftmals für Betroffene und ihre Angehörige noch lange über den Zeitpunkt des Traumas hinaus relevant. So zeigen schon Überlebende eines moderaten SHTs ein zweifach erhöhtes Risiko gegenüber der Normalbevölkerung verfrüht zu versterben. Darüber hinaus leiden sie an langfristigen Einschränkungen motorischer und kognitiver Funktionen (26). Passend hierzu konnte eine Studie aus dem Jahr 2019 herausarbeiten, dass weltweit im Jahr 2016 die mit Behinderung gelebten Lebensjahre (engl. *years lived with disability*: YLDs) nach SHT bei 111 pro 100.000 Menschen lagen (27). Des Weiteren ist die Inzidenz von psychiatrischen Erkrankungen, neurodegenerativen Erkrankungen (wie beispielsweise (bspw.) Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson oder Chronisch-traumatische Enzephalopathie) und Epilepsien bei Überlebenden eines SHTs deutlich erhöht. Außerdem wirkt sich das stattgefundenene SHT nachteilig auf den Prozess des Alterns aus (28–35).

Es wird deutlich, dass die enormen Nachwirkungen eines SHTs sich nicht nur auf die Betroffenen und ihre Familien auswirken, sondern auch die Wirtschaft und Gesellschaft in großem Maße beeinflussen. Die enorme sozioökonomische Relevanz des SHTs wird anhand folgender in den USA erhobenen Daten aus dem Jahr 2010 deutlich. Die wirtschaftlichen Kosten, die das Schädel-Hirn Trauma verursacht, wurden für das Jahr 2010 auf 76.5 Billionen US-Dollar geschätzt, wobei lediglich 11.5 Billionen US-Dollar für die direkte medizinische Behandlung benötigt wurden. Die verbleibenden 64.8 Billionen US-Dollar wurden für indirekte Kosten wie Lohnausfall, Verlust der Arbeitskraft oder allgemein nicht medizinische Ausgaben aufgewandt (36–38).

### **2.1.2 Klinische Aspekte**

Die Einteilung des Schädel-Hirn Traumas nach Schweregrad erfolgt mithilfe der *glasgow coma-scale* (GCS), eine einfache Bewertungsskala zur Einschätzung einer Bewusstseins- und Hirnfunktionsstörung. Anhand der GCS werden die Kriterien Augenöffnen, verbale Kommunikation und motorische Reaktion standardisiert bewertet

(39)(s. Tabelle 1), wobei ein leichtes SHT einer GCS von 13-15, ein mittelschweres SHT einer GCS von 9-12 und ein schweres SHT einer GCS von 3-8 entspricht.

Kriterium	Reaktion	Punkte
Augenöffnen	Spontan	4
	Auf Aufforderung	3
	Auf Schmerzreiz	2
	Keine Reaktion	1
Beste verbale Reaktion	Orientiert, konversationsfähig	5
	Desorientiert, konversationsfähig	4
	Unzusammenhängende Wörter	3
	Unverständliche Laute	2
	Keine Reaktion	1
Beste motorische Reaktion	Auf Aufforderung	6
	Reagiert gezielt auf Schmerzreize	5
	Reagiert ungezielt auf Schmerzreize	4
	Reagiert mit Beugesynergismen auf Schmerzreiz	3
	Reagiert mit Streckesynergismen auf Schmerzreiz	2
	Keine Reaktion	1

**Tabelle 1:** Die glasgow-coma-scale. (39)

Die Symptome des SHTs sind vielfältig und reichen von subjektiven Störungen (wie bspw. Kopfschmerzen, Übelkeit und Schwindel), objektiven Verletzungen (wie bspw. Riss- oder Platzwunden oder der Austritt von Blut, Liquor oder Hirngewebe), sowie Hinweise auf Schädigungen des Nervensystems (wie bspw. Amnesie, Lähmungen, Krampfanfälle, Streckkrämpfe oder vegetative Störungen) bis hin zu Bewusstseinsstörungen, die sich in Eintrübung des Bewusstseins und Koma differenzieren lassen. Ein Koma geht mit einem GCS < 8 Punkten einher, womit die Indikation einer sofortigen Intubation gegeben ist. Gerade Beuge- oder Streckesynergismen, Störungen der Pupillomotorik, Hemiparese und Krampfanfälle sind Zeichen eines intrakraniellen Druckanstieges und einer transtentoriellen Herniation und stellen somit eine akut lebensbedrohliche Verschlechterung beim bewusstseinsgestörten Patienten dar (3,39–43).

Der primäre Hirnschaden ist der direkte irreversible Defekt, der durch die Gewalteinwirkung verursacht wird und letztendlich nur durch Prävention zu verhindern ist. Als sekundärer Hirnschaden wird ein indirekter Defekt bezeichnet, der sich aus dem initialen Trauma über komplexe zwischengeschaltete pathophysiologische Prozesse entwickelt (44–47). Systemische Faktoren, wie Hypoxämie, Hyperkapnie, arterielle Hypotension, Hyperglykämie und Hyperthermie beeinflussen die Ausbreitung des sekundären Hirnschadens und sind daher essenzielle Ansatzpunkte therapeutischer Maßnahmen (43,47). In diesem Zusammenhang ist das primäre Therapieziel des SHTs die Aufrechterhaltung der Homöostase im Sinne der „Minimalisierung des sekundären Hirnschadens durch Prävention von Hypotension, Hypo-/Hyperkapnie, Hypoxämie, Hypo-/Hyperglykämie und Hyperthermie“ (43). Zur ausreichenden Durchblutung des Gehirns soll, wenn nötig durch Volumen-Therapie, Katecholamin-Therapie oder chirurgische Entlastung (Dekompressions-Kraniotomie), der zerebrale Perfusionsdruck (engl. *cerebral perfusion pressure*, CPP) zwischen 50-70 Millimeter-Quecksilbersäule (mmHg) und der intrakranielle Druck (engl. *intracranial pressure*, ICP) unter 20 mmHg liegen. Der CPP errechnet sich aus der Differenz des mittleren arteriellen Blutdrucks (engl. *mean arterial pressure*, MAP) und des ICPs (43). Die Dekompressions-Kraniotomie, kann hierbei durchaus kritisch betrachtet werden. So zeigt eine neuere Studie, dass Patienten die bei einem ICP > 25 mmHg zu der Basistherapie eine Dekompressions-Kraniotomie erhielten nach 6 Monaten mit einer höheren Wahrscheinlichkeit in einem vegetativen Zustand verweilen als Patienten mit einem IPC > 25 mmHg, die nur die Basistherapie erhielten. Patienten mit moderaten Behinderungen oder guter Erholung waren nach 6 Monaten in beiden Gruppen etwa in gleicher Anzahl vertreten (48). Weitere Therapie-Ziele im Rahmen der Homöostase sind das Erreichen oder die Aufrechterhaltung der Normoxämie ( $SpO_2 > 90 \%$ ,  $SpO_2$ : kapillare Sauerstoffsättigung) und der Normokapnie ( $paCO_2 = 35 - 38 \text{ mmHg}$ ,  $paCO_2$ : arterieller Kohlendioxidpartialdruck). Da das Hirngewebe auf eine kontinuierliche Versorgung mit Sauerstoff angewiesen ist und eine Hypokapnie zu einer Vasokonstriktion (Reduktion des ICPs durch Abnahme des zerebralen Blutvolumen -> Abnahme der Gehirnperfusion) beziehungsweise (bzw.) eine Hyperkapnie zu einer Vasodilatation (Anstieg des ICPs durch Zunahme des zerebralen Blutvolumens) der Hirngefäße führt, sind Normoxämie und Normokapnie essenzielle Faktoren, um die Ausbreitung des sekundären Hirnschadens zu verhindern. Bei gestellter Indikation zur endotrachealen Intubation können die Zielwerte im Rahmen einer Beatmungstherapie durch Anpassen der entsprechenden



Parameter erreicht werden. Hierbei trägt eine adäquate Analgosedierung durch die Verhinderung einer Agitation des Patienten zusätzlich zur Kontrolle des ICPs bei (43). Die Blutglukosekonzentration, welche ggf. durch Insulintherapie zu steuern ist, sollte zwischen 110 - 150 mg/dl liegen (43). Fieber muss konsequent durch bspw. Antipyretika, gekühlte Infusionen oder physikalische Maßnahmen gesenkt werden (43). Eine neuere Studie zeigt, dass bei Patienten mit einem ICP  $\geq 20$  mmHg die Normothermie (36 – 37,5 Grad Celsius ( $^{\circ}\text{C}$ )) gegenüber der Hypothermie bei sonst gleicher Basistherapie überlegen ist (49).

Gegenüber den systemischen Faktoren stehen intrakranielle Prozesse wie Exzitotoxizität, Neuroinflammationsreaktion, Zusammenbruch der BHS und Ödembildung, die die Ausbreitung des sekundären Hirnschadens beeinflussen und ebenso therapeutische Ansatzpunkte darstellen (43,47).

### **2.1.3 Pathophysiologie**

#### **2.1.3.1 Primärer Hirnschaden**

Der Primärschaden ist der Schaden des Gehirns, der unmittelbar durch die Gewalteinwirkung im Rahmen eines SHTs verursacht wird. Der Defekt ist irreversibel und somit nicht behandelbar. Einzig präventive Maßnahmen, wie bspw. das Tragen eines Fahrradhelmes, können die Entstehung eines primären Hirnschadens verhindern (44–47). Der primäre Hirnschaden kann in fokale und diffuse Schädigungsmuster unterteilt werden. Zu den fokalen Defekten zählen intrakranielle Blutungen (epidural, subdural, intrazerebral und subarachnoidal), Lazeration und Kontusionen (auch im Sinne von Coup-Contrecoup-Ereignissen). Zu den diffusen Schädigungsmustern zählen das Hirnödem und der diffuse axonale Schaden (47,50–52).

#### **2.1.3.2 Sekundärer Hirnschaden**

Der Sekundärschaden ist der indirekte Hirnschaden, der sich aus dem initialen Trauma über komplexe zwischengeschaltete pathophysiologische Prozesse entwickelt (44–46). Neben den bereits beschriebenen systemischen Faktoren (Hyperkapnie, Hypoxämie, arterielle Hypotension, Hyperthermie und Hyperglykämie) spielen intrakranielle Prozesse wie Neuroinflammationsreaktion, Exzitotoxizität, Ödembildung und Zusammenbruch der Bluthirnschranke bei der Entstehung des sekundären Hirnschadens eine essenzielle Rolle. Gerade die Exzitotoxizität und die neuroinflammatorische

Reaktion stellen hierbei zentrale Pathomechanismen dar, die mit neuronalem Zelltod durch Apoptose und Nekrose vergesellschaftet sind (43,47).

Die Erforschung und das Verständnis der Prozesse des sekundären Hirnschadens sind, aufgrund ihrer Zugänglichkeit für therapeutische Ansätze, gerade aus klinischer Sicht außerordentlich interessant (47). Aufgrund der hohen Relevanz für diese Arbeit werden die Neuroinflammationsreaktion, die Störung der BHS, sowie die Exzitotoxizität als Prozesse des sekundären Hirnschadens im Folgenden näher erläutert. Gerade der BHS kommt im Rahmen eines Polytraumas als physikalische Barriere zwischen peripheren Pathologien wie bspw. einer Fraktur und den zentralen Prozessen eines SHTs eine wichtige Bedeutung zu.

#### **2.1.3.2.1 Grundlegende Pathomechanismen des SHT und Exzitotoxizität**

Die Exzitotoxizität stellt den Untergang einer Nervenzelle aufgrund andauernder Überaktivierung dar (53) und spielt somit eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie des SHTs. Die Exzitotoxizität ist als Reaktion auf den primären Hirnschaden den Prozessen des sekundären Hirnschadens zuzuordnen (47). Im Folgenden werden zunächst die grundlegenden pathophysiologischen Mechanismen eines SHTs erörtert, bevor das Phänomen der Exzitotoxizität beschrieben wird.

Das Trauma-Geschehen verursacht einen lokalen Schaden des Hirngewebes und eine Dysregulation des zerebralen Blutflusses, was zu einer erheblichen Beeinflussung des Stoffwechsels führt. Es zeigt sich eine Ischämie-ähnlichen Konstellation mit anaerober Glykolyse und entsprechender Akkumulation von Laktat sowie einer erhöhten Permeabilität der Zellmembranen. Der Energiehaushalt der Zellen kann aufgrund der anaeroben Stoffwechsellage nicht aufrechterhalten werden, was zum Versagen von energieabhängigen, membranständigen Ionenpumpen und somit zur Destabilisierung des Membranpotentials führt (47). Das Versagen der Ionenpumpen, die erhöhte Durchlässigkeit der Zellmembranen für Ionen sowie die zelluläre Aufnahme osmotisch aktiver Teilchen führt zum Wassereinstrom in Astrozyten, Neuronen und Mikroglia. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von einem zytotoxischen Hirnödem (47,54). Damit einhergehend depolarisieren synaptische Endigungen, woraufhin es zur massiven Freisetzung exzitatorischer Transmitter, allen voran Glutamat, in den Extrazellularraum kommt (47,55,56). Die initialen Pathomechanismen des Schädel-Hirn-Traumas führen also zu einem massiven Anstieg der extrazellulären Konzentration exzitatorischer Transmitter, was den Vorgang der Exzitotoxizität initiiert

(47,55,56). Hierdurch werden  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor- (AMPA-) und N-Methyl-D-Aspartat- (NMDA-) Rezeptoren, sowie spannungsabhängige Calcium- ( $\text{Ca}^{2+}$ -) und Natrium- ( $\text{Na}^{+}$ -) Kanäle aktiviert bzw. überaktiviert, sowie hochreguliert (47,57). Die Überaktivierung der ionotropen und metabotropen Glutamaterezeptoren, welche hauptsächlich von Neuronen und Astrozyten exprimiert werden, führt zu einem massiven Kalium- ( $\text{K}^{+}$ -),  $\text{Na}^{+}$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zellen (58,59). Hierbei sind auch Zellen betroffen, die in der Umgebung der initialen Schadensregion liegen und zunächst nicht von dem Trauma beeinflusst wurden. Der Versuch der Zelle den Ionengradienten durch Hochregulation der  $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -Adenosintriphosphat- (ATP-) asen aufrecht zu erhalten, führt wiederum zu einer erhöhten Nachfrage an Energie, was die pathophysiologischen Abläufe aufgrund des bereits bestehenden Energiemangels nur noch forciert (60). Die erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führt dazu, dass die Zelle sich durch Aktivierung zahlreicher kataboler Enzyme selbstverdaut. So werden Phospholipasen, Lipidperoxidasen und Proteasen aktiviert, was zu einem intrazellulären Anstieg von freien Fettsäuren und freien Radikalen führt. Außerdem werden Translokasen, Caspasen und Endonukleasen rekrutiert, die die Degradierung biologischer Membranen und die Fragmentierung von Desoxyribonukleinsäure (engl. *deoxyribonucleic acid*, DNA) initiieren (47). Die calciumabhängige Mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore, wird ebenfalls überaktiviert, was letztendlich zur Entkopplung der Atmungskette und zum Stopp der ATP-Synthese führt (61,62). Die beschriebenen Prozesse führen zusammengenommen zur Nekrose oder zum programmierten Zelltod (Apoptose) der betroffenen Zelle (47). Eine Verbindung zwischen Exzitotoxizität und Neuroinflammation stellt der Tumornekrosefaktor alpha ( $\text{TNF-}\alpha$ ) dar, welcher im Rahmen einer neuroinflammatorischen Reaktion die Prozesse der Exzitotoxizität verstärkt (63).

#### **2.1.3.2.2 Neuroinflammation und Störung der Bluthirnschranke**

Die Entzündungsreaktion als Folge eines SHTs ist ein komplexes Zusammenspiel von sowohl zentral angesiedelten als auch peripheren Zellen, sowie löslichen Komponenten des Immunsystems (64,65). Hierbei ist die im Jahr 2002 von Morganti-Kossmann *et al.* verwendete Beschreibung der Neuroinflammation als „zweischneidiges Schwert“ sehr passend, da viele Prozesse zunächst einen neuroprotektiven Charakter im Sinne von Reparatur und Regeneration aufweisen. Eine dysregulierte Entzündungsreaktion birgt jedoch das Risiko einer Ausbreitung des sekundären Hirnschadens, sowie die

Entstehung eines chronischen Hirnschadens. (64,66). So konnte Goldstein *et al.* zeigen, dass SHT, die im Zusammenhang mit Explosionsereignissen stattfanden, mit posttraumatischer Belastungsstörung, Gedächtnisstörung, chronisch traumatischer Enzephalopathie und chronischer Neuroinflammation assoziiert sind (67).

Durch die Gewebeschäden des primären Hirnschadens, aber auch aufgrund pathophysiologischer Prozesse des sekundären Hirnschadens, werden so genannte *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) freigesetzt. Diese endogenen Moleküle initiieren im Extrazellularraum die Entzündungsreaktion. So kommt es zur Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen, sowie zur Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten und zur Rekrutierung zirkulierender, peripherer Immunzellen (64,65,68,69).

**Mikrogliazellen** gehören in ihrer Funktion als spezialisierte Immunzellen zu den Gliazellen des ZNS, wobei sie sich unter anderem durch Phagozytose und Antigenpräsentation auszeichnen (70). Sie sind in ihrem Verhalten den Makrophagen ähnlich und gehören ebenfalls dem Mononukleären Phagozytensystem (71) der hämatopoetischen Zellen an, wobei sie entscheidende Funktionen bei immunologischen als auch inflammatorischen Prozessen des ZNS haben (72). Mikrogliazellen werden aus einem „ruhenden“ Zustand heraus aktiviert und zeichnen sich durch die Fähigkeit der freien Migration im ZNS aus (73). Das *ionized calcium-binding adapter molecule 1* (Iba1) und das mitochondriale *translocator protein* (TSPO) werden im Rahmen der Aktivierung in Mikroglia-Zellen hochreguliert und dienen daher, gerade in einem wissenschaftlichen Kontext, als Marker der Mikroglia-Aktivität und Neuroinflammation (74–77).

Im Rahmen der SHT-bedingten Neuroinflammationsreaktion zeigen Mikrogliazellen ein Spektrum verschiedener Phänotypen mit jeweils unterschiedlichen Expressionsprofilen. So differenzieren sich die Mikrogliazellen im Zuge ihrer Aktivierung zu so genannten *M1-like* Phänotypen, denen ein pro-inflammatorischer, eher schädigender Charakter zugesprochen wird, oder zu *M2-like* Phänotypen, die eher anti-inflammatorische und somit neuroprotektive Charakterzüge aufweisen (78–80). Durch DAMPs, freie Radikale und pro-inflammatorische Zytokine wie Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), wird die Differenzierung zum *M1-like* Phänotyp induziert. Der *M1-like* Phänotyp zeichnet sich durch reduzierte Phagozytoseaktivität, sowie durch die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine (wie bspw. Interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ) und TNF- $\alpha$ ), Chemokine (wie bspw. CC-Chemokin-Ligand-2 (CCL2) und CXC-Ligand 9 (CXCL9)) und reaktiven Sauerstoffspezies (engl. *reactive oxygen species* ROS) aus (64,78–80). Die pro-

inflammatorische Reaktion der *M1-like* Mikrogliazellen ist nicht *per se* als schädigend anzusehen, so kann eine moderate M1-Antwort im Rahmen eines SHTs durchaus neuroprotektiv sein. Eine zu starke oder zu lang andauernde M1-Antwort kann jedoch zur Vergrößerung des sekundären Hirnschadens und zu einem chronischen hyperinflammatorischen Zustand, der mit chronischer Neuroinflammation, oxidativem Stress, Neurodegeneration und der Inhibierung von Regeneration vergesellschaftet ist, beitragen (64,81,82). Die *M2-like* Mikrogliazellen lassen sich nochmals in drei verschiedene Typen (a-c) differenzieren. Der durch Interleukin-4 (IL-4) und Interleukin-13 (IL-13) induzierte *M2a-like* Phänotyp zeichnet sich durch die Sezernierung anti-inflammatorischer Zytokine und einer gesteigerten Phagozytoseaktivität aus (64,79,80). Die Differenzierung zum *M2c-like* Phänotyp wird durch Interleukin-10 (IL-10), Glukokortikoide oder durch die Phagozytose sich in Apoptose befindlicher Zellen ausgelöst, wobei dieser Phänotyp den Umbau, sowie die Reparatur von Gewebe reguliert (64,79,80). Der durch Antigen-Antikörper-Komplexe und *toll-like-receptor-* (TLR-) Liganden induzierte *M2b-like* Phänotyp wirkt sowohl anti-inflammatorisch (Sekretion von IL-10) als auch pro-inflammatorisch (Sekretion von IL-1, Interleukin-6 (IL-6) und TNF $\alpha$ ) (64,79,80). Die Ausprägung der verschiedenen Mikroglia-Phänotypen zeigt über die Zeit deutliche Aktivitätsunterschiede. Unmittelbar nach dem SHT zeigt sich eine vorübergehende Dominanz der *M2-like* Phänotypen, die am 7. Tag ihren Peak erreicht. Hieran schließt sich eine Dominanz des *M1-like* Phänotyps an, der um die Tage 21-28 nach dem SHT seinen Peak erreicht. Bei einer chronischen Neuroinflammationsreaktion nach SHT zeigt sich der *M1-like* Phänotyp als dominant (81,83,84).

Neuere Untersuchungen lehnen eine strikte Einteilung von Mikroglia-Subtypen in M1 versus M2 ab und weisen auf eine hohe Plastizität zwischen diesen Subtypen hin, die hohes therapeutisches Potential bietet (85).

Neben den Mikrogliazellen spielen die **Astrozyten**, als weitere ortständige Zellen des ZNS, eine absolute Schlüsselrolle in der zellulären Antwort auf ein Schädel-Hirn Trauma. Astrozyten, die bis zu 50% des menschlichen Gehirnvolumens ausmachen, stellen die größte Zellpopulation der Gliazellen des zentralen Nervensystems dar (86). Die Aufrechterhaltung der Homöostase im zentralen Nervensystem ist eine Schlüsselfunktion der Astrozyten. Hierbei unterstützen sie Neurone in ihrer Funktion durch Regulation der extrazellulären Glutamat-Konzentration, Koordination des Wassertransportes und Regulation des extrazellulären pH-Wertes sowie des

Kaliumhaushaltes. Außerdem kommt ihnen eine Rolle in der Modulation synaptischer Aktivität zu (87). Eine weitere wichtige Aufgabe der Astrozyten ist die Aufrechterhaltung der Integrität der BHS, indem die Endfüßchen der Astrozyten das im zentralen Nervensystem durch *tight junctions* ausgezeichnete Kapillarendothel umschließen, und durch inter- und intrazelluläre Kommunikation mit dem Endothel interagieren (88–90).

Astrozyten reagieren auf eine Läsion in Form einer gesteigerten Reaktivität, der so genannten Astrogliose (91). Hierbei zeigen die Astrozyten eine gesteigerte Proliferation sowie eine erhöhte Expression der Intermediärfilamente *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) und Vimentin. Außerdem zeichnen sie sich durch eine veränderte Morphologie und das Freisetzen von pro-inflammatorischen Mediatoren aus. Durch auto-krine und parakrine Mechanismen überträgt sich das reaktive Verhalten auch auf umliegende Astrozyten (90,92,93). Neben der astrozytären Synthese von pro-inflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und Matrix-Metalloproteinasen, die zu einer Aggravation des sekundären Hirnschadens führen (94,95), zeigen reaktive Astrozyten auch ein neuroprotektives Expressionsprofil, welches Reparatur- und Regenerationsprozesse unterstützt (96,97). Neuere Studien zeigen hierbei eine Differenzierung der reaktiven Astrozyten in einen A1- sowie einen A2-Phänotyp, die sich in ihrem Expressionsprofil deutlich unterscheiden. Der A1-Phänotyp wird im Rahmen der Neuroinflammationsreaktion von aktivierten Mikrogliazellen durch die Sekretion von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  und dem Komplementfaktor C1q induziert. Der A1-Phänotyp verliert hierdurch neben den anti-apoptischen Eigenschaften die Fähigkeit zur Synaptogenese, zur Phagozytose sowie zum Zellwachstum und weist durch die Induktion von neuronalem Zelltod primär neurotoxische Eigenschaften auf. Zudem konnte der A1-Phänotyp vermehrt in neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Chorea Huntington, Morbus Parkinson und Multiple Sklerose detektiert werden. Dem gegenüber steht der A2-Phänotyp, der sich durch die Expression neurotropher Faktoren auszeichnet und entsprechend neuroprotektive Eigenschaften aufweist (98,99).

Der Serin-Protease-Inhibitor A3n (SerpA3n) wird im Rahmen von Entzündungsreaktionen, sowie als Reaktion auf Nervenverletzungen hochreguliert (100,101), wobei gerade reaktive Astrozyten eine erhöhte Expression des Enzyms aufweisen (99). Aufgrund dieser Eigenschaften hat sich SerpA3n neben GFAP in wissenschaftlichen Arbeiten als Marker für reaktive Astrozyten etabliert.

Die morphologische Veränderung der Astrozyten im Rahmen der reaktiven Gliose vollzieht sich zunächst im Sinne einer Hypertrophie. So konnten Villapol *et al.* 2014 in einem SHT-Maus-Modell am 3. postinterventionellen Tag im läSIONalen sowie perläSIONalen Gewebe hypertrophierte Astrozyten detektieren. Im Rahmen der Astrogliose können Astrozyten neben der Proliferation auch Zellausläufer aktiv zur Läsion hin elongieren (102,103). Ab dem 7. Tag nach SHT vollziehen die Astrozyten eine weitere morphologische Veränderung in ihrer Funktion als Teil der glialen Narbe. Darüber hinaus konnten Villapol *et al.* eine Astrozyten-Tätigkeit im Sinne einer reaktiven Gliose noch bis zu 60 Tage nach SHT nachweisen (90,104). Die gliale Narbe setzt sich hauptsächlich aus Astrozyten aber auch aus Mikrogliazellen, Fibroblasten, Endothelzellen und extrazellulärer Matrix zusammen (105). Auch in Form der glialen Narbe zeigen reaktive Astrozyten in Bezug auf Neuroprotektion ein ambivalentes Verhalten. So hat die gliale Narbe zunächst den neuroprotektiven Effekt gesundes Gewebe durch eine „physikalische Barriere“ (90) von giftigen Zelltrümmern und DAMPs zu trennen. Auf Neubildungs- und Regenerationsprozesse scheint die Narbe aufgrund der Barrierefunktion jedoch einen eher hemmenden Einfluss zu haben (105,106).

Wie bereits beschrieben, führt eine hohe Konzentration an exzitatorischen Neurotransmittern im Extrazellularraum, allen voran Glutamat, zum pathophysiologischen Prozess der Exzitotoxizität, was im Rahmen eines SHTs zur Aggravation des sekundären Hirnschadens führt. Indem Astrozyten über spezifische Glutamat-Transporter aktiv den exzitatorischen Neurotransmitter wiederaufnehmen und somit einer hohen Glutamat-Konzentration im Extrazellularraum entgegenwirken, kommt ihnen hier eine weitere neuroprotektive Funktion zu (87,90).

Es wird deutlich, dass die reaktive Astrogliose sehr heterogen ist und sowohl neuroprotektive als auch neurotoxische Eigenschaften ausweist.

Die **Bluthirnschranke** ist eine selektive Barriere zwischen den Kompartimenten Blut und Hirngewebe mit der Aufgabe die Homöostase des zentralen Nervensystems aufrecht zu erhalten (107,108). Die BHS wird von den Endothelzellen der Gehirnkapillaren, den Perizyten (109) und den Endfüßchen der Astrozyten (89) gebildet. Der elementare Bestandteil der BHS wird von dem Kapillarendothel gebildet, welches im Gegensatz zum Endothel peripherer Strukturen nicht fenestriert ist und durch Transmembranproteine, den so genannten *tight junctions* (bestehend aus Occludin und Proteinen aus der Claudin-Familie) und *junctional adhesion molecules* (JAMs) fest

miteinander verbunden ist. Diese Formation schließt einen parazellulären Stofftransport weitestgehend aus (107,110,111). Auch den Perizyten kommt eine wichtige Rolle zur Aufrechterhaltung der Integrität der BHS zu. So zeigten Armulik *et al.* am Maus-Modell, dass ein Mangel an Perizyten zu einer erhöhten Permeabilität der BHS führt (109).

Im Rahmen eines SHTs können direkte vaskuläre und parenchymale Schäden zu einem Zusammenbruch der BHS führen. Mechanismen des sekundären Hirnschadens wie Ödembildung, Exzitotoxizität und Neuroinflammation können eine direkte Folge der BHS-Störung sein. Die Zunahme dieser Pathomechanismen trägt wiederum zu einem weiteren Integritätsverlust der BHS bei (112).

Die Permeabilität der BHS ist grundsätzlich ein dynamischer Prozess und primär abhängig von dem Expressionslevel verschiedener Proteine, allen voran den *tight-junction*-Proteinen (112). Als Reaktion auf den Hirnschaden im Rahmen eines SHTs synthetisieren Astrozyten und Mikrogliazellen Moleküle wie *transforming growth factor-beta* (TGF- $\beta$ ) (113), ROS (114), *vascular endothelial growth factor* (VEGF) (115) und Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) (116), welche zur Zerstörung oder zur Unterdrückung der Expression von *tight-junction*-Proteinen, wie bspw. Claudin-5 führen (112,117). Hierbei ist über die Zeit auch eine gewisse Dynamik feststellbar. So ist die Durchlässigkeit für Albumin und andere hochmolekulare Proteine über die BHS 4-6 Stunden und an den Tagen 2-3 nach dem SHT besonders hoch (112,118,119). Die Integrität der BHS kann darüber hinaus noch für Jahre gestört sein (120).

Neben dem durch das Trauma verursachten direkten Endothelschaden gibt es grundsätzlich zwei pathophysiologische Abläufe, die zur Störung der BHS führen. Aufgrund des Verlustes von *tight junction*-Proteinen, kommt es zunächst zu einer Zunahme des parazellulären Transportes. Außerdem gelangen größere Moleküle wie Albumin, mit normalerweise nur eingeschränktem Durchtritt über die BHS, durch gesteigerte Transzytose vermehrt in das Gehirn (112,121–123). Diese Pathomechanismen initiieren die Entstehung eines Hirnödems, wobei das zytotoxische Hirnödem von dem vasogenen Hirnödem abgegrenzt werden muss (124). Das vasogene Hirnödem ist eine direkte Folge des Verlustes der Integrität der BHS. Die erhöhte Konzentration von plasmaständigen, osmotisch aktiven Substanzen im Interstitium führt zu einem Wassereinstrom, was wiederum zu einer Beeinflussung des zerebralen Blutflusses, sowie zu einer Erhöhung des intrakraniellen Drucks führt (125,126). Die Entstehung des zytotoxischen Hirnödems, welches aufgrund von Stoffwechselveränderungen und dem



Versagen von membranständigen Ionenpumpen zustande kommt, wurde bereits weiter oben im Rahmen der Exzitotoxizität beschrieben (125).

Im Rahmen eines Polytraumas kommt der BHS als physikalische Barriere zwischen peripheren und zentralen Prozessen, die sich potenziell gegenseitig beeinflussen, eine besondere Bedeutung zu. So konnte mittels experimenteller Modelle für offenes und geschlossenes SHT in der Maus eine erhöhte Permeabilität der BHS, sowie erhöhte Serumkonzentrationen pro-inflammatorischer Zytokine und DAMPs bei gleichzeitig vorliegender geschlossener Fraktur der Tibia nachgewiesen werden. Diese pathophysiologischen Veränderungen bei gleichzeitig vorliegender Tibia-Fraktur gehen mit einem vergrößerten histopathologisch darstellbarem Hirnschaden einher (14,15).

Ein weiterer Effekt eines SHTs und des damit einhergehende Verlustes der Integrität der BHS ist die vermehrte Infiltration **peripherer Immunzellen**, welche die inflammatorische Reaktion im ZNS forcieren (127,128). In Ratten konnte gezeigt werden, dass die ersten peripheren Zellen, die das zentrale Nervensystem (ZNS) infiltrieren, neutrophile Granulozyten sind (129). Als Reaktion auf das SHT werden in der verletzten Hemisphäre spezifische Adhäsionsmoleküle hochreguliert, was die vermehrte Diapedese der neutrophilen Granulozyten erleichtert (130). Der Höchstwert der neutrophilen Infiltration liegt im Zeitraum von 24-48 Stunden nach dem Trauma, bevor die Anzahl der neutrophilen Granulozyten deutlich zurückgeht (129,131). Am Mausmodell konnte gezeigt werden, dass weitere periphere Immunzellen, die in einem Zeitraum von bis zu 3 Tagen nach dem Trauma in das ZNS infiltrieren, Monozyten, dendritische Zellen, T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen sind (83,132,133).

Die nach einem SHT ablaufende Neuroinflammationsreaktion wird durch pro- und anti-inflammatorische **Zytokine**, vermittelt. Diese humoralen Mediatoren sind in gesundem Hirngewebe kaum nachweisbar, wohingegen deren Expression bei entsprechender Trauma-Konstellation schnell hochreguliert werden kann (134). Im Folgenden werden die wichtigsten Zytokine aufgeführt und erläutert.

Der Interleukin-1 (IL-1) Familie sind die Zytokine IL-1 $\beta$ , Interleukin-1-alpha (IL-1 $\alpha$ ) und Interleukin-1 Rezeptorantagonist (IL-1ra), welches den ersten beiden in ihrer pro-inflammatorischen Funktion entgegenwirkt, zuzuordnen (135). In Ratten konnte gezeigt werden, dass die ICV Gabe des antagonistisch wirkenden IL-1ra in Zusammenhang mit einem SHT zu einer Reduktion des neuronalen Schadens führt (136). Zusätzlich

konnte in Tierversuchen gezeigt werden, dass die Hemmung der Expression von IL-1 durch die Gabe von Immunsuppressiva deutliche neuroprotektive Effekte hat (137,138). Zusammenfassend sprechen diese Ergebnisse für einen pro-inflammatorischen, neurotoxischen Charakter von IL-1 (139).

Das Zytokin IL-6 gehört zu der Familie der Neuropeitin-Zytokine, welche sich durch neurotrophe Effekte auf Neurone auszeichnen (140). IL-6 scheint im Rahmen der Neuroinflammationsreaktion ambivalente Effekte aufzuweisen. So konnte am Mausmodell gezeigt werden, dass das Fehlen von IL-6 im Zusammenhang mit einem SHT zu erhöhtem oxidativen Stress und Neurodegeneration führt, was dem Zytokin neuroprotektive Eigenschaften zuschreibt (141). Damit einhergehend, scheint eine Überexpression von IL-6 in transgenen Mäusen ebenfalls neuroprotektive Effekte auszuweisen (142). Dem gegenüber postulieren Yang *et al.*, dass IL-6 durchaus pro-inflammatorische Eigenschaften aufweist. So konnten sie mittels eines Modells für SHT in der Maus zeigen, dass die Neutralisation von IL-6 zu einer geringeren Neuroinflammationsreaktion einhergehend mit einem geringeren neuronalen Schaden, sowie einem geringeren Defizit der motorischen Fähigkeiten führt(143).

Dem Zytokin IL-10, welches von Mikrogliazellen und Astrozyten synthetisiert wird, werden hauptsächlich neuroprotektive Eigenschaften zugeschrieben (139,144). So unterdrückt IL-10 die Aktivierung von Mikrogliazellen und Astrozyten, sowie die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine (145,146) und ROS (139,147).

Der TNF- $\alpha$  spielt als pro-inflammatorisches Zytokin eine entscheidende Rolle bei der Initiierung und Koordination der Neuroinflammationsreaktion (139). Der TNF- $\alpha$  wird hauptsächlich durch Gliazellen, allen voran aktivierten Mikrogliazellen, als Reaktion auf ein Schadensereignis synthetisiert, wobei auch eine neuronale Synthese nachgewiesen werden konnte (148). Obwohl sich die IL-1- und TNF- $\alpha$ -Rezeptoren in ihrer Struktur unterscheiden, zeigen die jeweiligen intrazellulären Signaltransduktionskaskaden deutliche Übereinstimmungen, was eine ähnliche Funktion der beiden inflammatorischen Mediatoren zur Folge hat. So potenzieren sich diese beiden Zytokine in ihrer neurotoxischen Wirkung synergistisch, was sie wohl zu den zentralen Mediatoren der Neuroinflammationsreaktion und weiteren Prozessen des sekundären Hirnschadens macht (139,149,150).

#### **2.1.4 Anwendung von SHT-Modellen in einem tierexperimentellen Kontext**

Anhand tierexperimenteller SHT-Modelle insbesondere in Ratten und Mäusen versucht die Wissenschaft Erkenntnisse zu gewinnen, die auf den Menschen, gerade in einem therapeutischen Kontext, übertragbar sind. So bieten Gehirn und Rückenmark von Mäusen und Ratten durchaus anatomische und physiologische Ähnlichkeiten zum ZNS des Menschen. Außerdem bieten Nagetieren neben einer recht kurzen Generationszeit, die Möglichkeit mit gleichaltrigen, geschlechtsdefinierten und genetisch ähnlichen Tieren arbeiten zu können, was viele Störvariablen, die in einem klinischen Kontext häufig sind, ausschließt. Des Weiteren bieten gerade Mäuse die Möglichkeit zur genetischen Manipulation wie bspw. im Sinne eines genspezifischen „*knock outs*“. Generell weist die Übertragbarkeit tierexperimenteller Erkenntnisse auf den Menschen jedoch deutliche Limitationen auf. So zeigte bspw. der Einsatz verschiedener Medikamente in SHT-Tiermodellen einen außerordentlich neuroprotektiven Effekt, was sich jedoch in klinischen Studien nicht bestätigen konnte (151,152). Eine weitere Herausforderung ist die Konstruktion eines SHT-Tiermodells, das zu Mechanismen und Verletzungsmustern, die den komplexen biomechanischen Abläufen und komplizierten Schadensmustern eines menschlichen SHTs möglichst entsprechen, führt. So unterscheiden sich bspw. Schädel und Gehirn der Maus in Form und Größe deutlich von den menschlichen Varianten (153). Zudem zeichnet sich ein SHT unter nicht experimentellen Bedingungen primär durch Kräfte aus, die frontal, okzipital oder temporal wirken und mit einem Contre-Coup-Ereignis einhergehen. Im Gegensatz dazu wirken die Kräfte im Rahmen der meisten tierexperimentellen SHT-Modelle in der Maus meist von oben. Zudem ist in diesem Zusammenhang eine Contre-Coup Verletzung nicht reproduzierbar. Diese anspruchsvollen Anforderungen erschweren zusätzlich die Übertragbarkeit tierexperimenteller Erkenntnisse auf den Menschen (152). Im Folgenden sind nun die relevantesten SHT-Modelle im tierexperimentellen Kontext aufgeführt.

Das *controlled cortical impact* (CCI) Modell verwendet einen elektromagnetisch oder pneumatisch betriebenen Bolzen, der unter definierten Bedingungen auf die exponierte Dura getrieben wird und dort einen fokalen Schaden setzt (genaue Beschreibung siehe 4.4.2.3.). Hierbei kommt es zu Verletzungsmustern wie dem direkten Parenchymschaden mit Zelluntergang, intrakraniellen Blutungen, sowie diffuser axonaler Schaden und Störung der BHS (151,154,155). Durch die freie Modulation von

Stempeldurchmesser, Aufprallgeschwindigkeit, Aufpralldauer und Eindringtiefe, lässt sich die Größe des Primärschadens steuern und bei gleichen Parametern interindividuell reproduzieren. Ein weiterer Vorteil dieses Modells gegenüber Modellen, die mit Schwerkraft arbeiten, ist das Ausbleiben einer „rebound“ Verletzung. Wie bereits erwähnt, entspricht die von oben wirkende Kraft und das nicht reproduzierbare Contre-Coup-Ereignis jedoch nicht den biomechanisch komplexen Bedingungen eines menschlichen SHTs (151).

Im Rahmen des *fluid percussion injury* (FPI) Modells wird der fokale Schaden durch einen Flüssigkeitsdruckimpuls auf die exponierte Dura ausgelöst, wobei die Kraniotomie zur Freilegung der Hirnstrukturen entweder zentral entlang der Mittellinie (156) oder über dem Os parietale (157) durchgeführt wird. Die Schwere der Verletzung kann über die Stärke des Druckpulses variiert werden (151,157).

Ein weiteres tierexperimentelles SHT-Modell ist das *weight drop* TBI Modell. Hier wird ein Gewicht gezielt entweder auf den Schädelknochen oder die exponierte Dura fallen gelassen (158). Das Ausmaß der Verletzung ist über die Fallhöhe und die Masse des Gewichts regulierbar. Ein Nachteil dieser Methode sind die bereits erwähnten „rebound“ Verletzungen, die durch ein erneutes Aufprallen des Gewichts auf den Schädelknochen oder das Gehirn entstehen (151).

Darüber hinaus existierten so genannte *blast injury models*, die die Auswirkungen von Druckwellen auf das zentrale Nervensystem untersuchen. So wurde bei Militärangehörigen, die einer Explosion ausgesetzt waren ein SHT diagnostiziert, ohne dass äußere Verletzungen oder Hinweise auf eine mechanische Einwirkung ersichtlich waren (151,159).

Damit einhergehend existieren tierexperimentelle Modelle, die sich die Erforschung penetrierender Schussverletzungen des Gehirns (engl. *penetrating ballistic-like brain injury models*) zur Aufgabe gemacht haben (151,160).

## 2.2 Die Begleitverletzung: Knochenfraktur langer Röhrenknochen

Die Knochenfraktur langer Röhrenknochen wird im Folgenden als Begleitverletzung eines SHTs näher erläutert. Hierbei stehen die grundsätzlichen pathophysiologischen Prozesse der Frakturheilung, sowie die Auswirkungen einer Fraktur auf das Gehirnparenchym bei gleichzeitig vorliegendem SHT im Mittelpunkt.

### 2.2.1 Pathophysiologische Aspekte der Frakturheilung

Knochen ist ein komplexes Organ mit vielfältigen Aufgaben wie Speicherung von Calcium und Phosphat, Regulation der Calciumhomöostase, Schutz lebenswichtiger Organe, Blutbildung, sowie Erleichterung der Bewegung als Teil des Stützapparats. Zudem ist Knochen ein Gewebe, das sich durch ein hohes Maß an Dynamik auszeichnet. So finden im Knochen kontinuierlich Umbauprozesse durch Osteoblasten- und Osteoklasten-Tätigkeit zur Anpassung an wechselnde mechanische Beanspruchungen und zur Vorbeugung von Ermüdungsbrüchen statt (so genanntes *remodeling*) (161–163). Kommt es zu einer Fraktur des Knochens, wird die Frakturheilung, ein komplexer Prozess aus Entzündungsreaktion, Reaktion des angeborenen Immunsystems und Reaktion ortsständiger Zellen, initiiert. Hierbei unterscheidet man eine primäre und eine sekundäre Frakturheilung (163).

Frakturen, die sich durch einen minimalen Frakturspalt, sowie eine geringe interfragmentäre Beweglichkeit auszeichnen, sind für die **primäre Frakturheilung** zugänglich. Diese Voraussetzungen sind in der Regel nur durch eine chirurgische Versorgung im Sinne einer Osteosynthese zu erreichen. Bei exakter Adaption der Frakturrenden ist der Prozess der Frakturheilung mit dem bereits beschriebenen *remodeling* vergleichbar. Es kommt zu einer Osteoklasten vermittelten Resorption von Knochen entlang des Frakturspalt, woraufhin sich eine direkte Synthese von Lamellenknochen durch Osteoblasten anschließt. Der neu gebildete Lamellenknochen kann als organisierte Gewebsform direkt in das System der Havers-Kanäle reintegriert werden (161,163,164). Ist der Frakturspalt für eine Knochenheilung über direkten Kontakt zu groß (jedoch kleiner als 1 mm), wird die „Lücke“ zunächst mit unreifem Geflechtknochen gefüllt und im Anschluss im Rahmen des *remodelings* zu Lamellenknochen umgebaut. Bei beiden Varianten der primären Knochenheilung kommt es zu keiner äußeren Kallusbildung (161,163,165).

In den meisten Fällen ist die Adaption der Frakturrenden jedoch nicht ideal, was mit einer größeren interfragmentären Beweglichkeit und einem größeren Frakturspalt

einhergeht (166). In solchen Fällen kommt es im Rahmen der **sekundären Frakturheilung** zu komplexen pathophysiologischen Prozessen, welche Hämatombildung, Entzündungsreaktion, Bildung von Granulationsgewebe, Kallusbildung und *remodeling* beinhalten (166). Der Knochenschaft (Diaphyse) langer Röhrenknochen (bspw. Femurknochen) zeichnet sich hauptsächlich durch kompakte Knochensubstanz (*substantia compacta*) aus, die die Markhöhle, welche gelbes Knochenmark enthält, umgibt. Die *substantia compacta* organisiert sich in Osteone, welche aus konzentrischen Knochenlamellen mit je einem zentralen Havers-Kanal bestehen. Die Havers-Kanäle enthalten Blutgefäße zur Versorgung des Knochens. Das Trabekelwerk der Knochenschwammsubstanz (*substantia spongiosa*) ist im Bereich der *Diaphyse* weitestgehend vollständig zurückgebildet. *Substantia compacta* und *substantia spongiosa* sind Gewebetypen des Lamellenknochens. Die Phasen der sekundären Frakturheilung im klassischen Sinne laufen hauptsächlich nach Pathologien der *substantia compacta*, also bei der Heilung von Frakturen langer Röhrenknochen im Bereich der *Diaphyse*, ab (161–163). Die Knochenenden langer Röhrenknochen (Epiphysen) sowie die Übergangszone von Epiphyse zu Diaphyse (Metaphyse) zeichnen sich primär durch *substantia spongiosa* aus, die von einer dünnen Schicht *substantia compacta* umgeben ist. Zwischen den Knochenbälkchen der *substantia spongiosa*, den Trabekeln, befindet sich rotes Knochenmark (161,162). Frakturen der *Metaphyse* langer Röhrenknochen heilen klassischerweise über den Prozess der direkten (desmalen) Ossifikation aus und weisen daher nicht die typischen Phasen der sekundären Frakturheilung auf (163,167,168). Bei erhöhter mechanischer Belastung und Mikrobewegungen werden jedoch Prozesse wie die indirekte (chondrale) Ossifikation und Kallusbildung stimuliert, wodurch auch *metaphysäre* Frakturen langer Röhrenknochen Charakteristika der sekundären Frakturheilung aufweisen können (163,169).

Sowohl Knochen und Periost als auch Knochenmark und umliegendes Gewebe sind durchblutet, sodass es bei einer Fraktur zur **Hämatombildung** kommt, was die zelluläre und plasmatische Hämostase aktiviert. DAMPs sezerniert von Zellen, die sich in Nekrose befinden, sowie zerstörte Extrazellulärmatrix und verschiedene Botenstoffe, die von Thrombozyten und lokalen Gewebsmakrophagen sezerniert werden, führen zum Einstrom von Entzündungszellen und initiieren somit die **Inflamationsreaktion**, welche den zweiten Schritt der sekundären Frakturheilung darstellt. Innerhalb der ersten 24 Stunden stellen neutrophile Granulozyten die ersten infiltrierenden Zellen dar (163,166,170), wobei eine übermäßige Infiltration, wie sie bspw. im Rahmen eines

Polytraumas stattfindet, ursächlich für eine schlechte Knochenheilung sein könnte (171). Die neutrophilen Granulozyten sezernieren weitere inflammatorische Mediatoren wie IL-6 und CCL2 und rekrutieren hierdurch Monozyten respektive Makrophagen zum Ort der Fraktur (172,173). Neben der Phagozytose extrazellulärer sowie zellulärer Trümmer, sezernieren Makrophagen weitere Zytokine und Chemokine, wie IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  und CCL2, welche wiederum zur Rekrutierung von Fibroblasten, mesenchymalen Stammzellen und Osteoprogenitorzellen führen. Osteoprogenitorzellen stellen hierbei wenig differenzierte Vorläuferzellen des Knochens dar, die sich aus mesenchymalen Stammzellen differenzieren. Die Rekrutierung der Vorläuferzellen erfolgt primär lokal aus Knochenmark, Periost und Perizyten, wobei mit Hilfe des Chemokins *stromal cell-derived factor 1* (SDF-1) mesenchymale Stammzellen auch aus dem Blutstrom rekrutiert werden können. Zusätzlich kommt es zur Resorption von nekrotischem Knochengewebe durch Osteoklasten (161,163,174–176). Die nun folgenden Proliferations- und Differenzierungsprozesse der mesenchymalen Stammzellen und der Osteoprogenitorzellen, sowie die Produktion von Extrazellulärmatrix, werden durch die von Thrombozyten und Makrophagen sezernierten pro-inflammatorischen Zytokine und Chemokine koordiniert. Weitere Mediatoren, die eine Schlüsselrolle bei diesen Differenzierungs- und Syntheseprozessen innehaben, sind *fibroblast growth factor 2* (FGF-2), *platelet-derived growth factor* (PDGF), VEGF sowie Mitglieder der TGF- $\beta$ -Familie (163,177,178). Aus dem ursprünglichen Bild unmittelbar nach der Fraktur, bestehend aus Hämatom und akuter Entzündungsreaktion, entwickelt sich somit sukzessive über Tage bis Wochen **Granulationsgewebe**, welches sich durch proliferierende Vorläuferzellen, Neovaskularisation und unorganisierte Extrazellulärmatrix auszeichnet (163,166,170). Hypoxische Bedingungen, verschiedene Botenstoffe und kleinste interfragmentäre Bewegungen, initiieren unmittelbar am Frakturspalt den Weg der chondralen Ossifikation. Hierbei differenzieren mesenchymale Stammzellen über Chondroblasten zu Chondrozyten, welche im Laufe mehrerer Wochen nach der Fraktur im Sinne der perichondralen Ossifikation ein Gerüst aus Knorpel- und Bindegewebe (fibrokartilaginärer Kallus) synthetisieren, das die Frakturrenden verbindet und den Frakturspalt letztendlich ausfüllt. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von einem **weichen Kallus**, welcher der Fraktur eine gewisse Stabilität verleiht und das Grundgerüst für die enchondrale Ossifikation bildet. Des Weiteren bilden Osteoblasten, die sich im Perichondrium befinden, eine Manschette aus Geflechtknochen um den fibrokartilaginären Kallus, was zur weiteren Stabilität beiträgt und den ersten Schritt

der Mineralisation der Knorpelmatrix darstellt (161,163,166,170,177–179). Zur gleichen Zeit differenzieren Osteoprogenitorzellen und mesenchymale Stammzellen an vereinzelt lokalen Stellen, die eine bessere mechanische Stabilität und Sauerstoffversorgung aufweisen, zu Osteoblasten und synthetisieren im Sinne der desmalen Ossifikation Geflechtknochen (163,166,175). In einem nächsten Schritt initiieren die Chondrozyten die Mineralisation des weichen Kallus, indem sie hypertrophieren und in Apoptose übergehen. Hierbei hinterlassen sie teilweise kalzifizierte, knorpelige Extrazellulärmatrix und setzen  $\text{Ca}^{2+}$  und verschiedene Botenstoffe frei, was die Vaskularisation des Gewebes stimuliert (163,177,178). Einhergehend mit der besseren Blutzirkulation und der besseren Sauerstoffversorgung differenzieren sich Osteoblasten aus Osteoprogenitorzellen und synthetisieren, innerhalb des Knorpelgerüsts, Geflechtknochen, was die Bildung des **harten Kallus** initiiert (163,166,177,178). Letztendlich werden der Geflechtknochen sowie das Knorpelgerüst von Osteoklasten resorbiert und durch die in Osteone organisierte *substantia compacta* ersetzt. Das **remodeling**, welches den abschließenden Prozess der sekundären Frakturheilung darstellt, kann mehrere Monate oder sogar Jahre andauern (163,166).

### 2.2.2 Auswirkungen auf den sekundären Hirnschaden

In Zusammenhang mit einem SHT sind die Auswirkungen von begleitenden Frakturen langer Röhrenknochen auf den sekundären Hirnschaden noch nicht vollends aufgeklärt. Da beide Verletzungen jedoch häufig kombiniert auftreten, ist die weitere Vertiefung der pathophysiologischen Zusammenhänge gerade in einem klinischen Kontext sinnvoll (8,17). Die SHT-bedingte Störung der Blut-Hirn-Schranke stellt eine Ausnahmesituation dar, die den Übertritt peripherer Faktoren, die unter physiologischen Bedingungen die BHS nicht überwinden können, in das zentrale Nervensystem ermöglicht. So wurde die vermehrte Infiltration peripherer Immunzellen in Zusammenhang mit einer SHT-bedingten erhöhten Permeabilität der BHS, sowie die daraus resultierende verstärkte Neuroinflammationsreaktion beschrieben (127,128). Dem gegenüber steht eine enorme Inflammationsreaktion, als Prozess der sekundären Frakturheilung nach Fraktur langer Röhrenknochen. Im Rahmen dieser Inflammationsreaktion kommt es zur Proliferation von Immunzellen, die den Ort der Fraktur infiltrieren und verschiedene pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und IL-6 freisetzen (163). Diese pro-inflammatorischen Mediatoren übernehmen ebenso im Rahmen der Neuroinflammationsreaktion nach SHT eine essenzielle Rolle (134). Treten nun beide



Verletzungen in Kombination auf, liegt die Vermutung nahe, dass pro-inflammatorische Zytokine, die im Rahmen der Knochenfraktur entstehen, über den Blutstrom und die gestörte BHS das Gehirnparenchym erreichen, wo sie die Neuroinflammationsreaktion beeinflussen. (15) Diese These wird durch erhöhte Serumkonzentrationen proinflammatorischer Zytokine bei kombiniertem SHT und peripherer Knochenfraktur unterstützt (180,181). Schultz *et al.* konnten anhand eines experimentellen Modells für geschlossenes SHT in der Maus eine verstärkte Neuroinflammationsreaktion nachweisen, wenn als Begleitverletzung eine geschlossene Fraktur der Tibia bestand. Hierbei konnte in den Polytrauma-Tieren 24 h und 35 Tage nach SHT und Fraktur eine signifikant erhöhte IL-1 $\beta$ -Konzentration im Gehirnparenchym, sowie wie eine vermehrte Astroglieose detektiert werden. Zudem zeigte sich nach 24 h eine signifikant erhöhte Konzentration neutrophiler Granulozyten im Gehirnparenchym. Das am ehesten frakturbedingt erhöhte IL-1 $\beta$ , könnte hier der entscheidende Mediator sein, der sowohl die vermehrte neutrophile Infiltration als auch die verstärkte Astroglieose initiiert und im Sinne eines chronischen Prozesses aufrecht erhält (15,182). Neben der verstärkten Neuroinflammationsreaktion konnte in den Tieren mit kombinierter Verletzung eine verstärkte Störung der BHS einhergehend mit vermehrter Ödembildung, sowie ein vergrößerter Hirnschaden und vermehrt motorische Dysfunktionen und Verhaltensauffälligkeiten detektiert werden (15). Auch wenn die Vermutung nahe liegt, dass die Zunahme dieser Pathologien auf die ausgeprägtere Neuroinflammationsreaktion zurückzuführen ist, sollte immer bedacht werden, dass Neuroinflammation durchaus auch neuroprotektive Aspekte ausweisen kann (15,139). Neben ähnlichen Erkenntnissen bezüglich Neuroinflammationsreaktion und Schadensvolumen, postulierten Yang *et al.* anhand eines experimentellen Modells für offenes SHT in der Maus eine verstärkte Expression des inflammatorischen Mediators *high mobility group 1* (HMGB1) im Blutserum, wenn als Begleitverletzung eine geschlossene Fraktur der Tibia bestand. HMGB1 ist ein Protein, das von geschädigten oder sich in Apoptose befindlichen Zellen sezerniert wird und als Marker für DAMPs gilt (14,183). So konnte die Arbeitsgruppe eine signifikante Zunahme der Blutserums-Konzentration in Polytrauma-Tieren sowohl 2 h als auch 4 h nach Intervention gegenüber SHT-Tieren detektieren. Interessanterweise stagnierte die HMGB1-Serumkonzentration in SHT-Tieren nach 2 h, wohingegen die HMGB1-Serumkonzentration in Polytrauma-Tieren weiterhin deutlich anstieg. Diese Daten legen die Vermutung nahe, dass die frakturbedingte systemische Inflammationsreaktion die Freisetzung von HMGB1 verstärkt, was eine Aggravation

des sekundären Hirnschadens zur Folge hat (14). Neben bereits beschriebenen Erkenntnissen konnten Ritter *et al.* mittels eines experimentellen Modells für offenes SHT in der Maus zeigen, dass es zu signifikant erhöhten OPN-Serumkonzentrationen kommt, wenn zusätzlich eine Fraktur des Femurs besteht. Zudem konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass sich die cerebrale Expression von OPN in SHT-Tieren und Polytrauma-Tieren nicht unterscheidet, wohingegen eine deutlich erhöhte Expression von OPN im Knochengewebe von Polytrauma-Tieren gegenüber SHT-Tieren nachgewiesen werden konnte (17). Die Funktionen von Osteopontin werden unter 2.4. ausführlich erläutert.

Interessanterweise konnte in Tiermodellen gezeigt werden, dass es zu einer beschleunigten Knochenheilung und einer verstärkten Kallusbildung kommt, wenn gleichzeitig ein SHT vorliegt (16,184,185). Diese Daten konnten auch in einem klinischen Kontext bestätigt werden (186,187).

## 2.3 Das Polytrauma

### 2.3.1 Definition und Epidemiologie

Tscherne *et al.* definierten 1984 das Polytrauma, ein vor allem in Zentraleuropa verwendeter Begriff, als das Vorliegen mehrerer Verletzungen, wobei eine Verletzung oder die Kombination dieser Verletzungen lebensbedrohlich ist (engl. „*multiple injuries, of which one, or their combination, is life threatening*“) (11). Im angloamerikanischen Raum existiert der Begriff „Polytrauma“ eigentlich nicht, hier wird eher auf Begriffe wie „*critically injured*“ „*severely injured*“, „*critically ill with multiple injuries*“ oder „*multiple trauma*“ zurückgegriffen. Diese Vielfalt an Begrifflichkeiten, sowie unterschiedliche Interpretationen bzw. Übersetzungen des Begriffs „Polytrauma“, erschweren die Findung einer einheitlichen Definition deutlich (188,189). In einem wissenschaftlichen und klinischen Kontext wird das Polytrauma oft über den *injury severity score* (ISS) (190) definiert. Der ISS beschreibt die anatomische Verletzungsschwere auf Grundlage der Schwere der Einzelverletzungen. Die Einzelverletzungen werden jeweils mittels der *abbreviated injury scale* (AIS) kategorisiert. Die aktuelle Version der AIS (Version 2005 und Update 2008) beinhaltet etwa 2000 verschiedene Verletzungen in neun Körperregionen, wobei die Schwere jeder einzelnen Verletzung auf einer Skala von 1 (leichte Verletzung) bis 6 (nicht behandelbar, meist tödlich) bewertet wird. Der ISS wird nun als Summe der Quadrate des jeweils höchsten AIS-Schweregrades einer Körperregion, wobei die drei am schwersten verletzten Körperregionen miteinbezogen werden, berechnet. Der ISS kann maximal einen Wert von 75 annehmen. Findet sich ein AIS-Wert von 6 resultiert hieraus sofort ein ISS-Wert von 75. (188,190,191). Der *new injury severity score* (NISS), eine Modifikation des ISS, wird berechnet, indem die drei höchsten AIS-Schweregrade unabhängig der Körperregion quadriert und addiert werden (192). Ein Polytrauma liegt nun ab einem ISS  $\geq 16$  Punkten vor. Ein ISS  $\geq 16$  Punkten bedeutet jedoch nicht zwingend, dass mehr als eine Verletzung vorliegen muss, was der ursprünglichen Definition von Tscherne *et al.* widerspricht. So erfüllt eine isoliert vorliegende Verletzung mit einem AIS-Schweregrad von 4 oder 5 ebenfalls die Polytrauma-Definition. Gerade bezüglich (bzgl.) der Einschlusskriterien in klinische Studien, stellen widersprüchliche Definitionen ein Problem dar, was die Findung einer einheitlichen Definition sinnvoll macht (188). Mit dieser Fragestellung haben sich Pape *et al.* beschäftigt und mit der Berliner Polytrauma-Definition eine international vergleichbare Definition geschaffen, die sowohl anatomische also auch pathophysiologische Aspekte beinhaltet. Hiernach liegt ein Polytrauma vor, wenn mindestens zwei

Verletzungen mit einem AIS-Schweregrad  $\geq 3$  Punkten vorliegen und zusätzlich mindestens eine der folgenden pathophysiologischen Kriterien zutrifft: Hypotension (systolischer Blutdruck  $< 90$  mmHg), quantitative Bewusstseinsminderung (GCS  $\leq 8$ ), Azidose (Base Excess  $\leq -6,0$ ), Koagulopathie (INR  $\geq 1,4$  / PTT  $\geq 40$  Sekunden (s)), Alter  $\geq 70$  Jahre (189).

Die *global burden of disease* (GBD) Studie ist eine Initiative unter der Schirmherrschaft der *world health organisation* (WHO) mit der Aufgabe die weltweite Verbreitung von Todesfällen, Krankheiten, Behinderung und Risikofaktoren für die Gesundheit zu quantifizieren (193,194). Hiernach stellt das Trauma weltweit die sechsthäufigste Todesursache und die fünfhäufigste Ursache für Behinderung dar, wobei bei unter 35-jährigen das Trauma sogar die Hauptursache für Tod und Behinderung ist. Hervorzuheben ist hier der Verkehrsunfall, der mit 1,3 Millionen Toten jährlich 35 % aller weltweiten Trauma-bedingten Todesfälle ausmacht. Hinzu kommen 45 Millionen Fälle von Behinderung, die jährlich aus Verkehrsunfällen resultieren (193,195). Zwischen dem 25. und 35. Lebensjahr sind Verkehrsunfälle, Gewalt und Selbstverletzung die führenden Trauma-bedingten Todesursachen. Dem gegenüber stehen Stürze als die führende Art des Traumas nach dem 75. Lebensjahr (193). Ältere Patienten stellen eine wachsende Kohorte an Trauma-Patienten dar, die sich durch Komorbiditäten und Polymedikation auszeichnet. Gerade die Einnahme von Antikoagulantien und Thrombozytenaggregationshemmern verkomplizieren den Verlauf eines Traumas, aufgrund der Blutungsgefahr, deutlich (196). So konnte gezeigt werden, dass traumatisierte Patienten die über 65 Jahre alt waren eine doppelt so hohe Mortalität aufwiesen, als traumatisierte Patienten, die unter 65 Jahre alt waren, wobei beide Kohorten einen vergleichbaren ISS (ISS  $< 65$  Jahren = 23,8 vs. ISS  $> 65$  Jahren = 24,1) aufzeigten (193,197). Ein weiterer wichtiger Aspekt für Patienten aber auch für Angehörige sind die Langzeitfolgen eines Traumas. Die schwerwiegendsten Folgen lassen sich in der Regel auf ein SHT im Rahmen des Traumas zurückführen. So leben in den USA etwa 5,3 Millionen Menschen (198) und in Europa etwa 7,7 Millionen Menschen (199), die mit ernsthaften neurokognitiven und psychosozialen Folgen nach einem Trauma-Ereignis kämpfen.

Das TraumaRegister der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie (DGU) erfasst schwerverletzte Patienten aus 689 Kliniken, wobei diese hauptsächlich in Deutschland

(629 Kliniken) aber auch in Belgien (16 Kliniken), Finnland, Luxemburg, Niederlande, Österreich (23 Kliniken), Schweiz (11 Kliniken), Slowenien und den Vereinigten Arabischen Emiraten lokalisiert sind (Stand: Ende 2020). Das erfasste Basiskollektiv wird über den *maximum* AIS (MAIS), also den höchsten AIS-Schweregrad der verletzten Person, definiert. Demnach beinhaltet das Basiskollektiv des TraumaRegisters der DGU alle Patienten mit einem MAIS  $\geq 3$ , sowie Patienten mit einem MAIS = 2, die entweder verstorben sind oder auf Intensivstation waren. Für das Jahr 2020 zählt das Basiskollektiv 28.947 Fälle, wobei 24.863 (86%) auf Intensivstation behandelt wurden, 3.452 (12,7 %) im Krankenhaus verstorben sind, 15.743 (54%) einen ISS  $\geq 16$  aufwiesen und 4.332 (15%) einem Polytrauma gemäß der „Berlin-Definition“ entsprachen. Weiterhin bezogen auf das Basiskollektiv im Jahr 2020: der Altersdurchschnitt lag bei 54,2 Jahren (Kinder unter 16 Jahren: 3,5 %, Ältere ab 70 Jahre: 29,0%), 70,1 % waren männlich, der mittlere ISS betrug 18,4, 36,5 % erlitten ein SHT (ASI Kopf  $\geq 3$ ), 15,6 % waren bewusstlos (GCS  $\leq 8$ ), 7,9 % waren im Schock (RR  $\leq 90$  mmHg), 67,7 % wurden operiert. Bei 96,3 % war der Unfallmechanismus stumpf, bei 3,7 % penetrierend. Hierbei waren die Unfallursachen: Sturz aus niedriger Höhe ( $\leq 3$  m) 27,9 %, Verkehrsunfall: Auto 16,2 %, Sturz aus großer Höhe ( $> 3$  m) 15,6 %, Verkehrsunfall: Fahrrad 13 %, Verkehrsunfall: Motorrad 12 %, Verdacht auf Suizid 4,6 %, Verkehrsunfall: Fußgänger: 4,3 %, Verdacht auf Verbrechen 2,4 %. In den Jahren 2018-2020 zeigte sich die Verteilung der Verletzungen bei Patienten des Basiskollektivs wie folgt: Patienten mit SHT 35 %, Patienten mit Thoraxtrauma 38 %, Patienten mit Abdominaltrauma 10 %, wobei jeweils ein AIS  $\geq 3$  für die jeweilige Körperregion vorliegen muss. Verletzungen der Extremitäten und/oder des Beckens werden mit 28,2 % angegeben. Von den 28.947 Fällen des Basiskollektivs aus dem Jahr 2020 wurden 24.957 primär versorgt, 2.262 wurde zuverlegt und 1.728 früh weiter verlegt. Angaben zu Letalitätsrate und Mortalitätsprognose wurden nur bei primär versorgten Patienten gemacht. Außerdem wurden hierzu Patienten mit einem therapielimitierenden Patientenwillen (1.224 Patienten), die innerhalb der ersten Wochen nach Aufnahme verstorben sind, ebenfalls nicht berücksichtigt. Der Altersdurchschnitt der verbleibenden 23.733 Patienten betrug 53,2 Jahre, 71 % waren männlich, der ISS lag im Mittel bei 17,5 Punkten. Die Letalität betrug 8,3 % (1970 Patienten) und die Mortalitätsprognose lag bei 8,6 %, was einer Differenz zwischen Letalität und Prognose von 0,3% entspricht (9).

Die epidemiologische Aufarbeitung von Polytrauma und SHT (siehe 2.1.1.) unterstreichen nochmals die individuelle Betroffenheit des schwerverletzten Patienten aber eben auch die enormen sozioökonomischen Probleme, die aufgrund dieser schweren Verletzungsmuster entstehen. Gerade in Anbetracht der Tatsache, dass das Vorhandensein eines SHTs im Rahmen eines Polytraumas zu erhöhter Mortalität und schlechterer Rehabilitationsfähigkeit führt (12), nimmt die Neuroprotektion bei der wissenschaftlichen Betrachtung des Polytraumas eine zentrale Rolle ein. Zudem stellen Verletzungen der Extremitäten, wie Frakturen langer Röhrenknochen, eine häufige Begleitverletzung dar (9), so dass die Entwicklung eines tierexperimentellen Polytrauma-Modells bestehend aus einem CCI-Modell kombiniert mit einem Modell für eine Fraktur des Femurs ein sinnvoller wissenschaftlicher Ansatz ist.

## 2.4 Das Glykoprotein Osteopontin

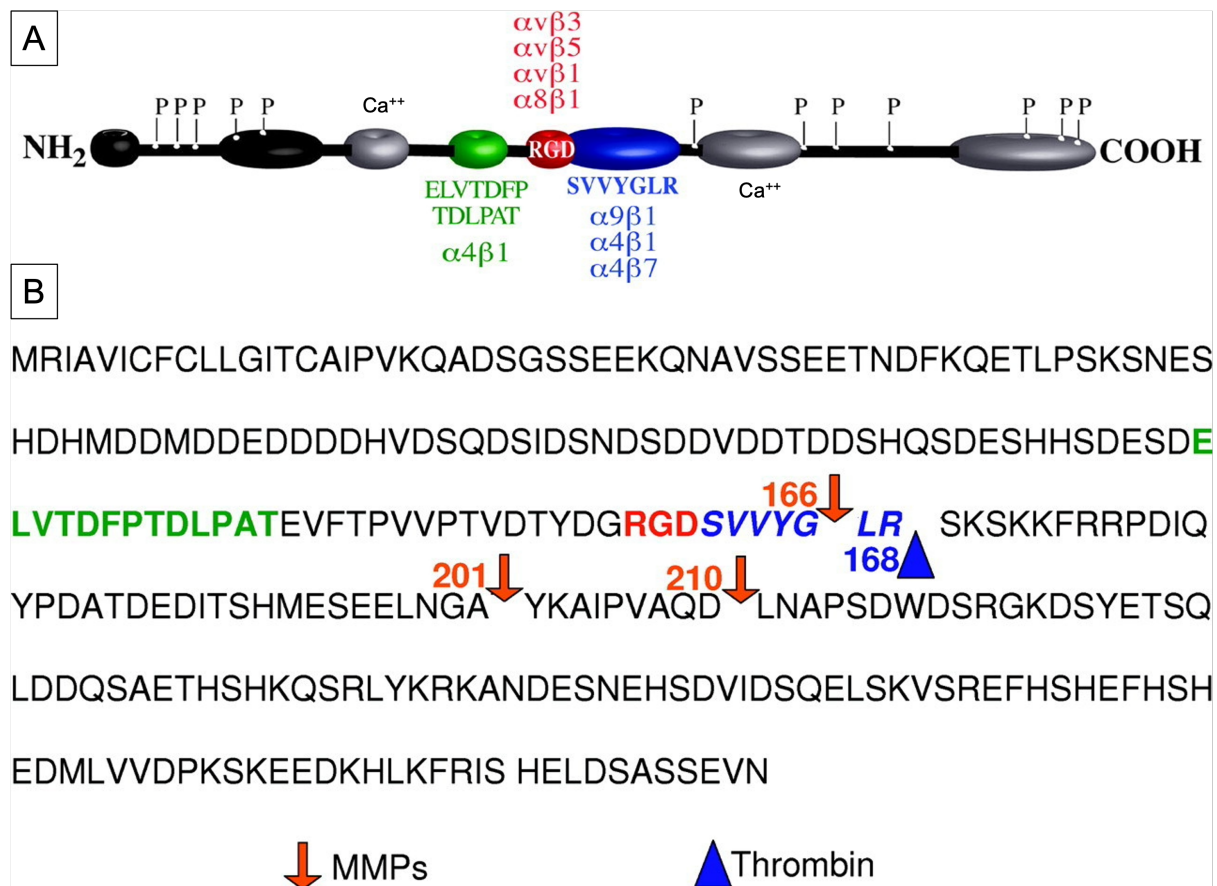
Osteopontin, welches Mitglied der so genannten *small integrin binding ligand N-linked glycoprotein* (SIBLING) Familie ist (200), wurde erstmals 1985 als Sialoprotein I beschrieben (201). Das sezernierte Protein konnte aus der Extrazellulärmatrix von Rinderknochen isoliert werden (201) und wurde 1986 aufgrund seiner Funktion als „Brücke“ zwischen Zellen und Hydroxylapatit-Kristallen in Osteopontin (*Pons*: lat. für Brücke) umbenannt (202). Die Funktion von OPN geht jedoch weit über die des immobilisierten Proteins der Extrazellulärmatrix hinaus. So ist OPN bspw. auch als das im Rahmen eines Entzündungsprozesses von Makrophagen, aktivierten T-Zellen oder Epithel- und Endothelzellen freigesetzte Zytokin *early T cell activated gene* (ETA-1) bekannt (203,204). Gerade der Einfluss von OPN auf die Inflammation macht das Glykoprotein für diese Arbeit interessant.

OPN ist ein vielfach phosphoryliertes Glykoprotein, das aus 314 Aminosäuren besteht, dabei reich an Asparaginsäure ist und einen sauren Charakter aufweist. Über N- und O-glykosidische Bindungen enthält OPN als Glykoprotein Oligosacharide, die im Rahmen posttranslationaler Modifikationen angefügt werden. Alternatives Spleißen sowie Prozesse der posttranslationalen Modifikation führen zu verschiedenen OPN-Varianten mit Molekülmassen zwischen 44-75 Kilodalton (kDA). Aufgrund seiner starken negativen Ladung, ist die Sekundärstruktur von OPN mit 8  $\alpha$ -Helices und 6  $\beta$ -Faltblattstrukturen nicht sonderlich ausgeprägt (201,205–208). Das OPN-Gen liegt auf dem langen Arm von Chromosom 4 (Genlocus: 4q13), umfasst 8 kb und ist aus 7 Exons zusammengesetzt, wobei Exon 1 nicht transkribiert wird (209). Neben der Spleiß-Variante OPN-a, die alle Exons 2-7 enthält und somit die vollständige Variante darstellt, existieren zwei weitere Spleiß-Varianten. Variante OPN-b zeichnet sich durch das Fehlen von Exon 5 aus, bei Variante OPN-c fehlt das Exon 4. Der DNA-Abschnitt, der für das Signalpeptid kodiert, liegt in Exon 2 und ist somit in allen Spleiß-Varianten enthalten, was den resultierenden Proteinen einen sekretorischen Charakter zuspricht. Allerdings gibt es eine weitere OPN -Variante mit alternativem Transkriptionsbeginn, wodurch die Expression des Signalpeptids ausbleibt und eine intrazelluläre Osteopontin-Variante (iOPN) resultiert. Weitere OPN Varianten entstehen durch verschiedene posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung und Glykosylierung (205,207,210,211).

OPN wird durch viele verschiedene Zelltypen wie B- und T-Lymphozyten, Natürliche Killerzellen, Makrophagen, Neutrophile Granulozyten, Dendritische Zellen,

Osteoblasten, Osteozyten, epitheliale Zellen der Brust und Neurone synthetisiert, wobei eine hohe Expression in Knochen, Lunge, Leber, Gehirn, Gelenken, Fettgewebe, Blut, Urin und Muttermilch festgestellt werden konnte (207,212–214). Wie bereits erwähnt, liegt OPN grundsätzlich in zwei Formen vor: als immobilisiertes Molekül der extrazellulären Matrix in mineralisiertem Gewebe und als freies Zytokin in Körperflüssigkeiten. Hierbei interagiert das Protein mit verschiedenen Liganden wie diversen Membran- bzw. Oberflächenrezeptoren, intrazellulären Signalmoleküle,  $\text{Ca}^{2+}$  und Heparin (207). Die vielseitigen Funktionen von OPN spiegeln sich in einer großen Anzahl von Bindungsstellen wider. So hat OPN eine RGD-Sequenz (Arg-Gly-Asp), die Integrine bindet und somit gerade für die Funktion als Protein der Extrazellulärmatrix aber auch im Rahmen von Entzündungsprozessen wichtig ist. Integrine gehören zur Gruppe der Adhäsionsmoleküle und sind als Heterodimere ( $\alpha_x\beta_y$ ) konfiguriert (202,215,216). Außerdem besitzt OPN Bindungsstellen für Heparin,  $\text{Ca}^{2+}$  und Varianten des CD44-Rezeptors (217–219). Zudem weist OPN eine konservierte Spaltstelle für Thrombin ( $^{168}\text{RS}^{169}$ ) auf, wobei durch enzymatisches Schneiden zwei funktionale Spaltprodukte entstehen (217). Das N-terminale Fragment (OPN-N) enthält die RGD-Sequenz sowie ein durch die Thrombin-Spaltung entstandenes Motiv ( $^{162}\text{SVVYGLR}^{168}$ ), welches ebenfalls Integrine bindet (220). Das C-terminale Fragment enthält 2 Heparin-Bindungsstellen und das Motiv welches Varianten des CD44-Rezeptors bindet. Neben der Spaltstelle für Thrombin, weist OPN drei weitere Spaltstellen für die MMPs auf ( $^{166}\text{GL}^{167}$ ,  $^{201}\text{AT}^{202}$ ,  $^{210}\text{DL}^{211}$ )(218). Abbildung 1 zeigt nochmals übersichtlich den strukturellen Aufbau, sowie die Aminosäuresequenz von OPN. Zusammenfassend führen verschiedene Spleiß-Varianten, ein alternativer Transkriptionsbeginn, posttranslationale Modifikationen, verschiedene Spaltprodukte, sowie diverse Bindungsstellen zu vielen verschiedenen OPN-Varianten, die die facettenreiche Funktionalität des Glykoproteins widerspiegeln.





**Abbildung 1:** Struktureller Aufbau und Aminosäuresequenz von Osteopontin (modifiziert nach 221). **Teil A** zeigt den strukturellen Aufbau von OPN. Die Adhäsions-Motive sowie deren Aminosäuresequenz sind hier farblich hervorgehoben. Außerdem sind die Integrine, welche die Motive binden, in der jeweils gleichen Farbe des Adhäsions-Motivs aufgeführt. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen sind in grau dargestellt. Der Buchstabe P zeigt Orte der Phosphorylierung. **Teil B** zeigt die Aminosäuresequenz von OPN in Form des 1-Buchstabencodes. Die Adhäsions-Sequenzen sind auch hier, wie in A farblich markiert. Außerdem sind die Schnittstellen für die MMPs sowie Thrombin in orange bzw. blau dargestellt.

Wie bereits erwähnt zeigt OPN hohe Expressionslevel in mineralisiertem Gewebe wie Knochen und Zähnen, wobei dem Glykoprotein hier eine entscheidende Rolle in der Regulation der Mineralisierung zukommt (212). Neben der Tatsache, dass OPN die Anheftung der Knochenzellen untereinander steigert, moduliert OPN über das Integrin  $\alpha_v\beta_3$  die Osteoklasten-Tätigkeit, was zu vermehrter Knochenresorption führt (222,223). Außerdem bindet OPN Hydroxylapatit und  $\text{Ca}^{2+}$ , was im Sinne einer physikalischen Barriere die Kristallisation und das Knochenwachstum hemmt (224). Somit verhindert OPN eine Hypermineralisierung des Knochens, was das Risiko für Knochenbrüche verringern kann. Entsprechend zeigen OPN<sup>-/-</sup> Mäuse eine gestörte Knochenresorption, was zu einer gesteigerten Mineralisierung des Knochens mit großen Kristallen führt und eine gewisse Instabilität des Knochens zur Folge hat (225).

Sezerniert von Makrophagen, aktivierten T-Lymphozyten, Epithel- und Endothelzellen, sowie von glatten Muskelzellen ist OPN als Zytokin ein Regulator der

Entzündungsreaktion (204). Als chemotaktisches Molekül führt OPN zur Migration proinflammatorischer Zellen, wobei seine adhäsiven Eigenschaften zum Verbleib der Entzündungszellen beitragen. OPN interagiert über seine Adhäsions-Motive wie die RGD-Sequenz und die durch Thrombin-Spaltung entstandene SVVYGLR-Sequenz mit Entzündungszellen aber auch glatten Muskelzellen oder Endothelzellen, die verschiedene Integrine auf ihrer Oberfläche präsentieren (226–228). Gerade Makrophagen, T-Lymphozyten und Neutrophile Granulozyten exprimieren  $\alpha_9\beta_1$   $\alpha_4\beta_1$   $\alpha_4\beta_7$  Integrine, welche die SVVYGLR-Sequenz von OPN binden, auf ihrer Zelloberfläche (220).

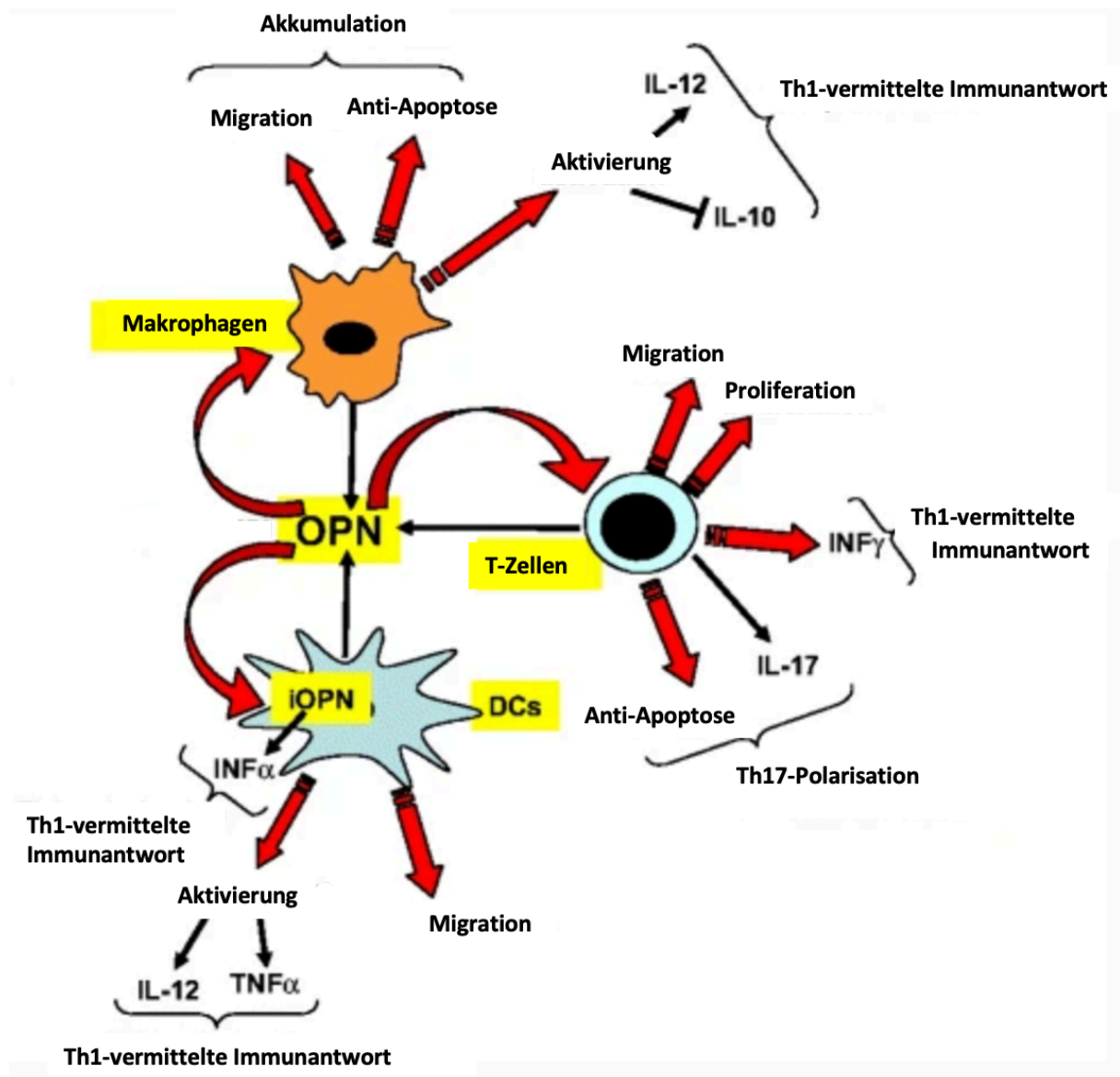
OPN ist in zirkulierenden Monozyten nicht exprimiert. Im Rahmen der Differenzierung zu **Makrophagen** kommt es jedoch zu einer enormen Hochregulation des Proteins, wodurch OPN eines der Hauptsyntheseprodukte von Makrophagen darstellt (229). OPN selbst führt als chemotaktisches Molekül wiederum zur Migration von Makrophagen zum Ort der Entzündung und beeinflusst darüber hinaus deren Zytokinsynthese in Richtung einer Th1-vermittelten Immunantwort. Hierbei kommt es zu einer Hochregulation von Interleukin-12 (IL-12), wohingegen die Expression von IL10 inhibiert wird (203,230). Außerdem hemmt OPN die Apoptose von Makrophagen über die Interaktion mit  $\alpha_4$  Integrinen und dem CD44-Rezeptor (231,232).

OPN hat außerdem eine Schlüsselrolle bei der Migration und Reifung **Dendritischer Zellen** (engl. dendritic cells, DC), wobei auch hier eine Differenzierung und Polarisierung im Sinne einer Th1-vermittelten Immunantwort stattfindet. So beeinflusst OPN die Zytokinsynthese der DCs durch die Hochregulation der Expression von IL-12 und TNF- $\alpha$  (233). Außerdem scheint die intrazelluläre Variante von OPN (iOPN) die Synthese von Interferon alpha (IFN- $\alpha$ ) zu regulieren, was ebenfalls eine Th1-vermittelte Immunantwort stimuliert (234).

Obwohl **neutrophile Granulozyten** selbst nur sehr geringe Expressionslevel von OPN aufweisen, scheint das Glykoprotein auch hier als chemotaktisches Molekül eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung und Migration Neutrophiler Granulozyten zu spielen (235).

Neben der OPN-vermittelten Migration und Adhäsion von **T-Lymphozyten** im Rahmen einer Entzündungsreaktion (236), ist OPN ein wichtiger Regulator der Differenzierung von T-Lymphozyten respektive von naiven T-Helferzellen. OPN induziert über die Interaktion mit dem Integrin  $\alpha_v\beta_3$  und dem CD44-Rezeptor die Synthese von IL-17 und die Inhibierung der Expression von IL-10 in den T-Helferzellen. Gerade die Interaktion mit dem CD44-Rezeptor steigert die Expression von IL-17 und IFN- $\gamma$ , wodurch sich T-

Helferzellen zu Th1- und Th17-Zellen differenzieren. Die Differenzierung zu Th2-Zellen wird unterdrückt. Th1-Zellen initiieren eine zellvermittelte Immunantwort, wohingegen Th2-Zellen eine humorale Immunantwort vermitteln. Th17-Zellen sind mit Autoimmunität assoziiert (237,238). Abbildung 2 stellt die regulatorischen Eigenschaften von OPN im Rahmen einer Entzündungsreaktion übersichtlich dar.



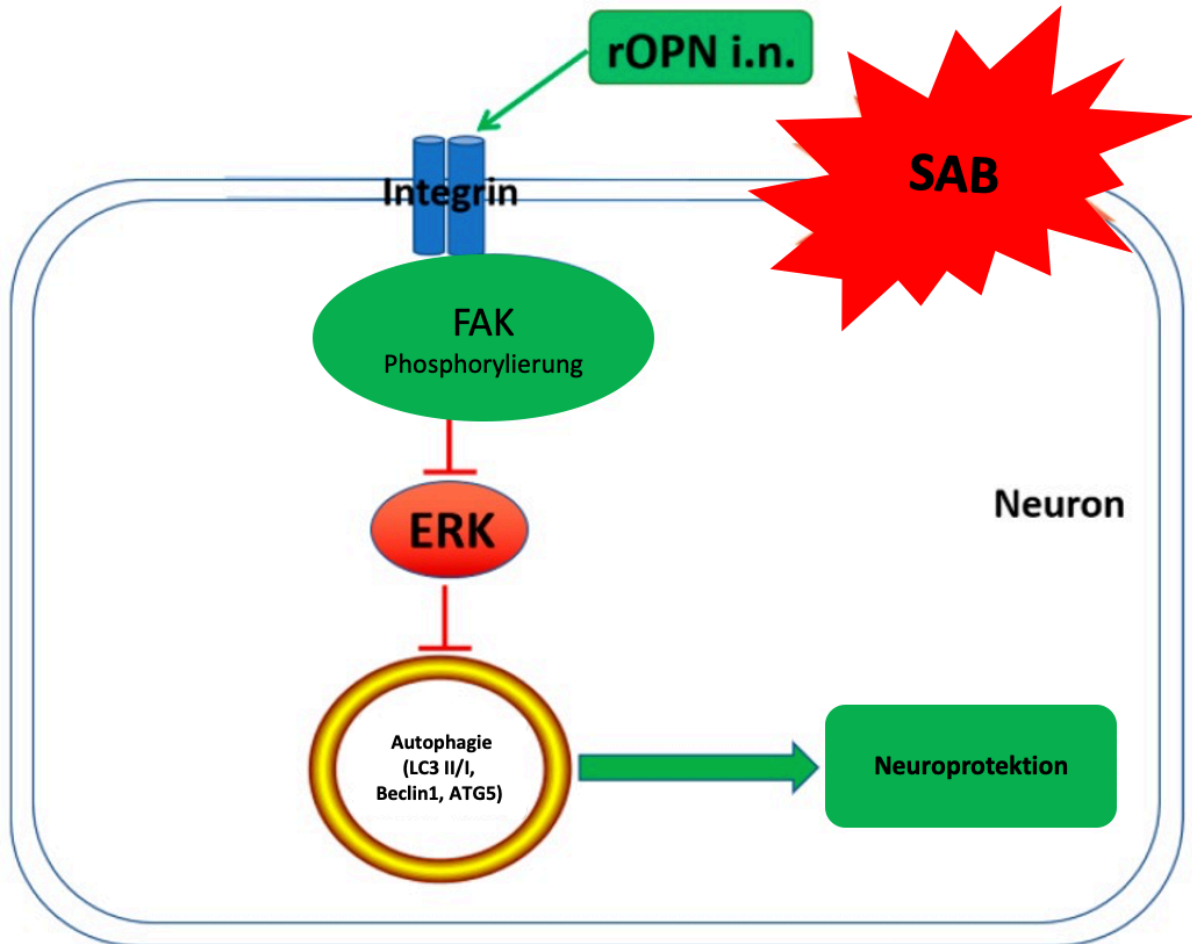
**Abbildung 2:** Regulation von Entzündungs- und Immunzellen durch Osteopontin (modifiziert nach 239). Als chemotaktisches Molekül führt OPN zur Migration von **Makrophagen** und verhindert, darüber hinaus deren Apoptose, was zusammengekommen zur Akkumulation von Makrophagen führt. Zudem induziert OPN die Expression von IL-12 und inhibiert die Expression von IL-10 in Makrophagen, was eine Th1-vermittelte Immunantwort fördert. Auf **DC** Zellen wirkt OPN als lösliches Zytokin aber auch in Form der intrazellulären Variante iOPN. Beide fördern eine Th1-vermittelte Immunantwort, wobei iOPN die Expression von IFN-α in DCs induziert. OPN als lösliches Zytokin induziert die Expression von IL-12 und TNF-α in DCs. In **T-Zellen** induziert OPN Migration, Proliferation und anti-Apoptose. Außerdem induziert OPN die Expression von IL-17 und IFN-γ in T-Zellen, wodurch T-Helferzellen zu Th1- und Th17-Zellen differenzieren.

Darüber hinaus scheint Osteopontin auch Einfluss auf viele weiterer Prozesse wie die Metastasierung von Tumorzellen (240), Gefäßerkrankungen (241), Wundheilung (242), Nierensteinbildung (243) und Diabetes (244) zu haben. Hierbei sind die Auswirkungen auf die Gesundheit oftmals gegensätzlich. So scheint OPN gerade aufgrund seiner Funktion als chemotaktisches Molekül gegenüber Makrophagen ein Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen (241) und Insulinresistenz (244) darzustellen. Demgegenüber steht bspw. die OPN-vermittelte Stabilisierung von Knochen durch Regulation der Mineralisierung (225).

Von elementarer Wichtigkeit für diese Arbeit sind mögliche neuroprotektive Eigenschaften von OPN im Kontext eines Polytrauma-Modells. So konnten für OPN bereits in verschiedenen Modellen experimenteller Hirnschädigung wie intrazerebrale Blutung (245,246), Subarachnoidalblutung (20,247–249), Schlaganfall (250) und SHT (251,252) neuroprotektive Effekte aufgezeigt werden.

In diesem Zusammenhang werden OPN anti-apoptotische und Autophagie fördernde Eigenschaften zugesprochen. Die anti-apoptotischen Eigenschaften von OPN konnten bereits in Zusammenhang mit Tumorwachstum und Metastasierung nachgewiesen werden, wobei das anti-apoptotische Signal über die *focal adhesion kinase* (FAK) initiiert wird. Hierbei bindet die RGD-Sequenz von OPN Integrine, die auf der Oberfläche von Tumorzellen exprimiert sind, was zur Phosphorylierung der zytosolischen Tyrosinkinase FAK führt und den anti-apoptotischen Signalweg in der Tumorzelle aktiviert (253–255). Die anti-apoptotischen Eigenschaften von OPN konnten von Topkoru *et al.* in einen neuroprotektiven Zusammenhang gebracht werden, indem die Arbeitsgruppe anhand eines Modells für Subarachnoidalblutung in Ratten einen Tag nach der Operation einen verringerten neuronalen Zelltod nach nasaler OPN-Applikation nachweisen konnte. Pathomechanistisch postulieren sie hierbei eine FAKPI3K-Akt-induzierte Hemmung der enzymatischen Caspase-3 Spaltung, wobei PI3K für *phosphoinositide 3-kinase* steht und Akt ein Synonym für Protein Kinase B (PKB) ist (20). Die Autophagie-fördernden Eigenschaften von OPN konnten bereits in einem *in vitro* Modell eines Bauchortenaneurysmas (256), sowie eines hepatozellulären Karzinoms (257) nachgewiesen werden, wobei die entsprechende Signaltransduktionskaskade über Bindung von Integrin-Rezeptoren und CD44-Rezeptoren initiiert wird (256). Sun *et al.* konnten anhand eines Modells für Subarachnoidalblutung in Ratten nachweisen, dass

es nach nasaler Applikation von rOPN zu einer Steigerung der Expression von Autophagie-bezogenen Proteinen wie Beclin1, sowie einer erhöhten Expression anti-apoptotischer Proteine wie *b-cell lymphoma 2* (Bcl-2) in der Akutphase nach dem experimentellen Eingriff kommt. Damit einhergehend werden die pro-apoptotischen Proteine aktivierte Caspase-3 und *bcl-2 associated x protein* (Bax) herunterreguliert, wodurch OPN durch Regulation der Autophagie-Apoptose-Interaktion neuronalen Zelltod verhindert (248). Ebenfalls Sun *et al.* postulieren, dass die OPN-bedingte gesteigerte Autophagie über den FAK-ERK-Signalweg initiiert werden könnte (249), wobei ERK für *extracellular signal-regulated kinase* steht und ein klassisches „downstream“-Protein der FAK darstellt (258). In Abbildung 3 ist der FAK-ERK-Signalweg, welcher Autophagie induzieren könnte, nochmals übersichtlich veranschaulicht. Hierbei bindet das intranasal applizierte OPN den Integrin-Rezeptor, welcher auf der Zelloberfläche eines Neurons exprimiert ist. Die Bindung führt zur Phosphorylierung der zytosolischen FAK, was zu einer Hypophosphorylierung der ERK führt, wodurch Prozesse der Autophagie initiiert werden (249).



**Abbildung 3:** Autophagie. Auswirkungen von intranasal appliziertem rOPN in einem Modell für Subarachnoidalblutung in Ratten (modifiziert nach 249). Zu sehen ist das intranasal applizierte rOPN, das im Rahmen einer Subarachnoidalblutung den auf einem Neuron exprimierten Integrin-Rezeptor bindet. Die Bindung führt zur Phosphorylierung der FAK, was sekundär zu einer geringeren Phosphorylierung der ERK führt. Diese Prozesse führen zur Expression Autophagie-assoziiierter Proteine (*light chain 3 (LC3) II/I*, Beclin1, *autophagy related 5 (ATG5)*) und damit zu verringertem neuronalem Zelltod.

In verschiedenen Modellen experimenteller Hirnschädigung konnten OPN modulierende Eigenschaften in der synaptischen Reorganisation und funktionalen Wiederherstellung von geschädigtem Gewebe zugeschrieben werden. Hierbei fördert OPN die Prozesse der Synaptogenese, womit sich das Glykoprotein durch eine weitere neuroprotektive Eigenschaft auszeichnet (18,251). Damit einhergehend wird OPN mit der Proliferation und Migration neuronaler Stammzellen in Richtung des geschädigten Hirngewebes nach Schlaganfall in Zusammenhang gebracht (259,260).

Ein weiterer wichtiger Aspekt für diese Arbeit sind die Auswirkungen von OPN auf die Neuroinflammationsreaktion. OPN ist grundsätzlich ein pro-inflammatorisches Zytokin, das sich durch seine chemotaktischen, adhäsiven und anti-apoptischen Eigenschaften auszeichnet und somit als Regulator der Neuroinflammationsreaktion gilt. Trotz

des pro-inflammatorischen Charakters werden dem Glykoprotein eine Vielzahl neuroprotektiver Eigenschaften zugeschrieben, die sich im Rahmen der Neuroinflammationsreaktion entwickeln (261,262).

Gliem *et al.* konnten anhand eines experimentellen Modelles für Schlaganfall in der Maus nachweisen, dass OPN eine entscheidende Rolle in der Polarisierung reaktiver **Astrozyten** spielt. Darüber hinaus konnte die Arbeitsgruppe feststellen, dass OPN hauptsächlich von hämatogenen Monozyten respektive Makrophagen, die die innere Grenzzone des Infarktes infiltrieren, exprimiert wird, wobei residente Gliazellen wohl eine untergeordnete Rolle bei der OPN-Synthese spielen. So konnte die Arbeitsgruppe 6 Tage nach dem experimentellen Schlaganfall in OPN<sup>-/-</sup> Mäusen zeigen, dass reaktive Astrozyten, die sich in der äußeren Grenzzone des Infarktes befinden, es nicht schaffen, ihre Fortsätze in Richtung des Infarktkerns zu elongieren. Entsprechend können neugebildete Gefäße nicht vollends von den Endfüßchen der Astrozyten bedeckt werden, woraus eine persistierende Schädigung der BHS mit Ödembildung resultiert (19). Grundlage für die Interaktion von OPN mit reaktiven Astrozyten könnten auch hier die Adhäsions-Motive des Glykoproteins sein, die Integrine auf den Zelloberflächen der Astrozyten binden, gerade da die Polarisation von Astrozyten bereits mit Mechanismen der Integrin-Bindung in Zusammenhang gebracht werden konnte (19,263,264).

Vay *et al.* konnten in einer aktuellen *in vitro* Studie nachweisen, dass OPN unter Stressbedingungen die Proliferation, Migration und das Überleben von primären Astrozyten fördert. Zudem postuliert die Arbeitsgruppe, dass OPN die Astrozyten-Differenzierung insofern reguliert, dass die Entwicklung des neurotoxischen A1-Phänotyps unterdrückt wird und die Entwicklung des A2-Phänotyps, welcher neuroprotektive Eigenschaften aufweist, gefördert wird. Das Potential der beiden Phänotypen zur Expression von sowohl anti- als auch pro-inflammatorischer Zytokine bleibt hierbei erhalten (265).

Julienne *et al.* konnten mittels eines CCI-Modells in der Maus zeigen, dass eine intranasale Applikation von rOPN zu einer erhöhten Anzahl von aktivierter **Mikroglia** in der zum Schaden ipsilateralen Hemisphäre führt, wobei die Detektion der Mikrogliazellen ein Tag nach der Verletzung erfolgte. Die durch OPN verursachte Verstärkung der frühen Mikroglia-Aktivierung, könnte ein verbessertes neuroprotektives Setting zu späteren Zeitpunkten zur Folge haben (252). Damit übereinstimmend konnte eine *in vitro* Studie zeigen, dass die Inkubation von Mikrogliazellen aus dem Schwein mit rOPN zu

einer erhöhten Proliferation und Aktivierung der Mikroglia führt (266). Analog zu der Expression in Makrophagen, wurden auch Mikrogliazellen im Rahmen der Neuroinflammation als Syntheseort von OPN identifiziert, wodurch auch Mikrogliazellen mit der Initiierung anti-apoptischer Signalwege in Zusammenhang gebracht werden können (247,252,267). Damit einhergehend, konnte in einer *in vitro* Studie gezeigt werden, dass sich OPN unter Stressbedingungen positiv auf das Überleben von Mikrogliazellen auswirkt (268). Darüber hinaus konnten Rabenstein *et al.* in dem gleichen Versuchsaufbau zeigen, dass Mikrogliazellen, die mit Lipopolysacchariden (LPS) stimuliert wurden und zusätzlich mit rOPN anbehandelt wurden, eine signifikant geringere TNF- $\alpha$  und IL-6 Expressionen aufwiesen. Entsprechend moduliert OPN die Zytokin-Expression in Mikrogliazellen in Richtung eines anti-inflammatorischen Profils, wobei beachtet werden muss, dass die Übertragbarkeit von Erkenntnissen aus einer *in vitro* Studie nur begrenzt möglich ist (268). Analog hierzu konnte in einer Zelllinie von Makrophagen in denen OPN herunterreguliert wurde, unter Stressbedingungen eine verstärkte Expression von TNF- $\alpha$ , IL-6, sowie verstärkter oxidativer Stress detektiert werden (269). Gong *et. al* konnten mittels eines Modells für intrazerebrale Blutung in Ratten zeigen, dass die intranasale Applikation von rOPN zu einer Dämpfung der akuten Neuroinflammationsreaktion führt, was mit einem verringerten Hirnödem und verbesserten neurologischen Funktionen einhergeht. Bzgl. des Mechanismus auf molekularer Ebene postulieren sie hierbei eine Integrin- $\beta$ 1 induzierte Hemmung der *janus kinase 2/signal transducers and activators of transcription (JAK2/STAT)* Signaltransduktionskaskade, was zu einer reduzierten Expression von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  führt. Zudem führt die intranasale Applikation von rOPN zu einer reduzierten Infiltration neutrophiler Granulozyten sowie einer geringeren Expression der MMP-9 (246).

Gegenüber den neuroprotektiven Charakterzügen von OPN werden aber auch Effekte beschrieben, die Neurodegeneration fördern, so bspw. bei Morbus Alzheimer (270) und Morbus Parkinson (271). An dieser Stelle zeigen die pleiotropen Eigenschaften von OPN, dass eine reine Betrachtung des Glykoproteins in einem neuroprotektiven Kontext schwierig ist. Gerade in seiner Funktion als pro-inflammatorisches Zytokin, müssen die Effekte von OPN differenziert betrachtet werden. Zusammenfassend scheinen die neuroprotektiven Charakterzüge jedoch deutlich zu überwiegen, was die Erforschung von Osteopontin im Zusammenhang mit Pathologien des ZNS, gerade in einem therapeutischen Kontext, so interessant macht.



## 3 Material

### 3.1 Geräte

<b>Funktion</b>	<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
Blotkammer	Mini Trans-Blot System	Bio-Rad, Hercules, USA
CCI-Impactor	Impact One Stereotaxic Impactor	Leica Biosystems, Richmond, USA
Detektionssystem	GloMax®-Multi + Detection System	Promega, Mannheim, DE
Elektrophoresekammer	Mini-Protean® Electrophoresis Cell	Bio-Rad, Hercules, USA
Femur-3-Punkt-Biegevorrichtung	Fracture Device small	RISystem AG, Landquart, CH
Flächenkamera <i>open field test</i>	Basler ace, acA1300-60gm	Basler AG, Ahrensburg, DE
Fluoreszenz-Detektionssystem	Odyssey® 9260	LI-COR® Biosciences, Lincoln, USA
Homogenisator	Mastermill MM 300	Retsch Technology GmbH, Haan, DE
Inkubator	Inkubator 8000	Drägerwerk AG & Co. KGaA, Lübeck, DE
<i>open field test</i> -Arena	40 x 40 x 40 Zentimeter (cm)	Noldus, Wageningen, NL
Käfige	Filtertopkäfig Typ 2	Bioscape GmbH, Castrop-Rauxel, DE
Kleintier-Röntgengerät	MX-20 Faxitron	Faxitron Bioptics, LLC, Tucson, USA
Konfokalmikroskop	LSM 5 Exciter	Zeiss, Jena, DE
Konfokalmikroskop, Laserquelle	Lasos LGK 7812	Lasos Lasertechnik, Jena, DE
Kryostat	Microm NX 70 Cryo-Star	Thermo Fisher Scientific Inc., Walldorf, DE
Lochzange	Ohrlochzange	Zoonlab GmbH, Castrop-Rauxel, DE

Luftstromschrank (Tierhaltungsschrank)	UniProtect THF 3378-VO2	Bioscape, Castrop-Rauxel, DE
Magnetrührer	Ikamag® Ret	Janke und Kunkel, Staufen, DE
	IKA® Ret basic	Janke und Kunkel, Staufen, DE
Mikroliterspritze	1700 Series, 5 Mikroliter (µl)	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, CH
Mikroskop	Stemi 305	Zeiss, Jena, DE
Mikroskopkamera	Axiocam 105 color	Zeiss, Jena, DE
<i>Mouse Screw</i> -Nagel	Mouse Screw	RISystem AG, Landquart, CH
Narkosegasvapor	Vapor 19.3	Drägerwerk AG & Co. KGaA, Lübeck, DE
Objektiv Flächenkamera <i>open field test</i>	CS-Mount Computar Objektiv	Computar, Cary, USA
Operationsmikroskop	Technoskop OPMI 11	Carl Zeiss Meditec AG, Jena, DE
<i>polymerase chain reaction</i> -(PCR-) Block	Mastercycler gradient	Eppendorf AG, Hamburg, DE
pH-Meter	CG 842	Schott AG, Mainz, DE
Photometer	NanoVue System	GE Healthcare, Chalfont Saint Giles, UK
Pipetten	Research, Research Plus, Reference	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Pipettierhilfe	Pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH und Co. KG, Eberstadt, DE
Präzisionsbohrer	Uni-Drive N Komplettgerät	Paggen Werkzeugtechnik GmbH, Starnberg, DE
<i>real-time quantitative PCR</i> -(qPCR-) System	LightCycler® LC 480	Roche Molecular Systems Inc., Pleasanton, USA
Schüttel- und Mischgeräte	Unimax 2010	Heidolph Instruments, Schwabach, DE

	Rocking Platform	VWR GmbH, Darmstadt, DE
	Rotamax 120	Heidolph Instruments, Schwabach, DE
	Reax control	Heidolph Instruments, Schwabach, DE
Stereotaxierahmen		World Precision Instruments Germany GmbH, Friedberg, DE
Stromversorgung	PowerPac™ 300	Bio-Rad, Hercules, USA
	PowerPac™ HC	Bio-Rad, Hercules, USA
Thermoblock	ThermoMixer® comfort	Eppendorf AG, Hamburg, DE
	ThermoMixer® 5436	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Waage	Sartorius R 180 D	Sartorius AG, Göttingen, DE
	Sartorius laboratory	Sartorius AG, Göttingen, DE
	DIPSE TP-Serie – Digitale Tischwaage 2000 Gramm (g) / 0,1 g	DIPSE, Oldenburg, DE
Wärmematte	ThermoLux®	Witte + Sutor GmbH, Murrhardt, DE
Zentrifuge	Centrifuge 5804 R	Eppendorf AG, Hamburg, DE
	Heraeus Megafuge® 1.0	Thermo Scientific, Walldorf, DE
	Micro Star 17R	VWR GmbH, Darmstadt, DE
	Mini Star silverline	VWR GmbH, Darmstadt, DE

**Tabelle 2: Geräte**

### 3.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Produktbeschreibung	Hersteller
96-well Zellkulturplatten	Cellstar®	Greiner Bio One International GmbH, Kremstünster, AT
Chirurgisches Nahtmaterial	Prolene® 6-0	Ethicon Inc., Somerville, USA
Deckgläser	24 x 60 Millimeter (mm)	Waldemar Knittel Glasbearbeitungs-GmbH, Braunschweig, DE
Einbettmedium	NEG-50™	Thermo Fisher Scientific Inc., Walldorf, DE
Einstreu	Lignocel® FS 14	J. Rettenmaier & Söhne GmbH & Co. KG, Rosenberg, DE
Einmalkanülen	Sterican® 19 G, 26 G	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Einmalspritze	BD Discardit™ II 2 Milliliter (ml), 5 ml, 10 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
	Injekt®-F	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Filterpapier		Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Dassel, DE
Futterpellets	Maus-Zucht Extrudat	ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, DE
Kompressen, steril	10 x 10 cm	MaiMed GmbH, Neuenkirchen, DE
Kryoboxen		Ratiolab GmbH, Dreieich, DE
Kryoröhrchen	0,5 ml Schraubdeckelgefäße, glatt, mit Stehrand, Natur	Starlab International GmbH, Hamburg, DE

	Standarddeckel für Schraubdeckelgefäße	Starlab International GmbH, Hamburg, DE
Kryotomklingen	Microtome Blade C35	Feather Safety Razor Co., Osaka, J
Mikropipettenspitzen	TipOne®, 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Starlab International GmbH, Hamburg, DE
Mikropipettenspitzen, Filter	TipOne®, 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Starlab International GmbH, Hamburg, DE
Nitrozellulosemembranen		Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA
Objektträger	Superfrost® plus	Thermo Scientific, Braunschweig, DE
Papierhandtücher	1-lagig, grün	Schuch Laborhandel, Langgöns. DE
Pipetten, serologisch, steril	Cellstar® 25 ml, 10 ml, 5 ml	Greiner Bio One International GmbH, Kremsmünster, AT
Reaktionsgefäße	Falcon™ 15 ml, 50 ml	Greiner Bio One International GmbH, Kremsmünster, AT
	PCR-Einzelgefäß, 0,5 ml	Starlab International GmbH, Hamburg, DE
	Safe-Lock (2,0 ml, 1,5 ml, 0,5 ml)	Eppendorf, Hamburg, DE
	TubeOne® 1,5 ml, 2 ml	Starlab International GmbH, Hamburg, DE
Saugtupfer	Sugi® Sponge Points	Kettenbach GmbH, Eschenburg, DE
Skalpelle	Einwegskalpelle, No.23	Feather Safety Razor Co., Osaka, J
Wattestäbchen	steril, Holz, 15 cm lang mit Wattekopf	Centramed Medizintechnik, Koblenz, DE

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

### 3.3 Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung/Hersteller
Blockierlösung Western Blot	2,5 % <i>weight/volume</i> (w/v) Magermilch in TBS
Blockierlösung Immunhistochemie	5 % NGS, 1 % Bovines Serumalbumin (BSA) in PBST
Blotpuffer	25 Millimolar (mM) Tris, 192 mM Glycin, 20 % <i>volume/volume</i> (v/v) Methanol (MeOH)
Kresylviolett-Färbelösung	0,031 mM Kresylviolett, 20 % (v/v) Ethanol
Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. <i>phosphate-buffered saline</i> , PBS)	137 mM Natriumchlorid (NaCl), 2,7 mM KCl, 6,5 mM Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1,5 mM, Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) (pH 7,5)
RPE-Puffer	Qiagen N.V., Venlo, NL
RWT-Puffer	Qiagen N.V., Venlo, NL
<i>radioimmunoprecipitation assay</i> (RIPA) Puffer	50 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA), 1 % (v/v) NP-40, 1 Tablette Protease-Inhibitor (auf 10 ml RIPA), 1 Tablette Phosphatase-Inhibitor (auf 10 ml RIPA), 0,1% (w/v) SDS
Sammelgelpuffer	50 mM Tris, 4 % (v/v) SDS (pH 6,8)
SDS-Elektrophoresepuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0.1 % (w/v) SDS
SDS-Ladepuffer	0,125 Molar (M) Tris-HCl pH 6,8, 4 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Glycerin, 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 0.004 % (w/v) Bromphenolblau
TBS-Puffer	15 mM NaCl, 5 mM Tris, 0,2 mM HCl (pH 7,4)
TBST-Puffer	TBS-Puffer + 0,05 % (v/v) Tween-20
Trenngelpuffer	150 mM Tris, 4 % (v/v) SDS (pH 8,8)

**Tabelle 4:** Puffer und Lösungen

### 3.4 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Acrylamid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Aqua destillata	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
$\beta$ -Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Bovines Serumalbumin A	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Chameleon™ Duo Prestained Protein Ladder	LI-COR® Biosciences, Lincoln, USA
Chloroform	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethanol absolut	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
EDTA	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Glycerin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Glycin	Applichem, Darmstadt, DE
Isopropanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Merck, Darmstadt, DE
Kresylviolett (Acetat)	Merck, Darmstadt, DE
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Methanol (MeOH)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i> , SDS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Nonidet™ P-40 (NP-40)	Applichem, Darmstadt, DE
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt, DE
Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets PhosSTOP	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, DE
Protease Inhibitor Cocktail Tablets cOmplete Tablets, Mini, EDTA-free	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, DE
Protein Assay Reagent DC™ (A, B, S)	Bio-Rad, Hercules, USA
RNase-freies Wasser	Fermentas, St. Leon Rot, DE

Roti®Histokitt	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Roti®Histol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt, DE
Stickstoff, flüssig	Air Liquide S.A., Düsseldorf, DE
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Tween-20	GE Healthcare, Chalfont Saint Giles, UK

**Tabelle 5:** Chemikalien

### 3.5 Medikamente

Wirkstoff	Handelsname	Hersteller
Dexpanthenol	Bepanthen® Augen- und Nasensalbe	Bayer, Leverkusen, DE
Fentanyl	Fentanyl-Janssen	Janssen-Cilag GmbH, Neuss, DE
Isofluran	Forene®	AbbVie Deutschland, Wiesbaden, DE
n-Butyl-2-Cyanoacrylat	Histoacryl® Gewebekleber	B. Braun Melsungen, Melsungen, DE
rekombinantes Osteopontin		BioLegend®, San Diego, USA
Tramadol hydrochlorid	Tramadol-ratiopharm®, Tropfen	Ratiopharm GmbH, Ulm, DE

**Tabelle 6:** Medikamente

### 3.6 Primäre Antikörper

Target	Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
αII-Spectrin	BML-FG6090	Maus	1:1000 (2,5 % Magermilch (MM)/TBS)	Enzo Life Sciences Inc., Farmingdale, USA
Glycerinaldehyd-3-	ACR001PS	Maus	1:1000 (2,5 % MM/TBS)	Acris Antibody Inc., San Diego, USA



phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)				
GFAP	Z033401-2	Kaninchen	1:1000 (2,5 % MM/TBS)	Dako Omnis, Agilent Technologies, Sanata Clara, USA
GFAP	13-0300	Ratte	1:1000	Invitrogen AG, Carlsbad, USA
Iba1	019-19741	Kaninchen	1:1000	FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH, Neuss, DE
Osteopontin	AF808	Ziege	1:1000 (2,5 % MM/TBS)	Bio Techne, Minneapolis, USA

**Tabelle 7:** Primäre Antikörper

### 3.7 Sekundäre Antikörper

Target	Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Anti-Kaninchen	Alexa Fluor 488 A-11034	Ziege	1:500	Invitrogen AG, Carlsbad, USA
Anti-Kaninchen	IRDye 800CW 926-32211	Ziege	1:15000 (in 2,5 % MM/TBST)	LI-COR® Biosciences, Lincoln, USA
Anti-Maus	IRDye 800CW 926-32210	Ziege	1:15000 (in 2,5 % MM/TBST)	LI-COR® Biosciences, Lincoln, USA
Anti-Ratte	Alexa Fluor 568 A-11077	Ziege	1:500	Invitrogen AG, Carlsbad, USA
Anti-Ziege	IRDye 680RD 926-68074	Affe	1:15000 (in 2,5 % MM/TBST)	LI-COR® Biosciences, Lincoln, USA

**Tabelle 8:** Sekundäre Antikörper

### 3.8 Kits

Produkt	Hersteller
Absolute Blue qPCR, SybrgreenMix	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
LightCycler® 480 Probes Master	Roche Molecular Systems Inc., Pleasanton, USA
RNeasy® Mini Kit	Qiagen N.V., Venlo, NL
QIAzol® Lyse-Reagenz	Qiagen N.V., Venlo, NL
Mouse/Rat Osteopontin (OPN) Quantikine® ELISA Kit	Research and Diagnostic Systems Inc, Minneapolis, USA
QuantiTect® Reverse Transcription Kit	Qiagen N.V., Venlo, NL

Tabelle 9: Kits

### 3.9 Primer

Target – Richtung	Basenabfolge in 5' -> 3'	Hersteller
GFAP-Forward(F)	CGGAGACGCATCACCTCTG	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
GFAP-Reverse(R)	TGGAGGAGTCATTCGAGACAA	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
GRN-F	ATGCTGTGTGCTGTGAGGAC	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
GRN-R	CACTCCACATTCCCAACCTT	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
PPIA-F	GCGTCTSCTTCGAGCTGTT	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
PPIA-R	RAAGTCACCACCCTGGCA	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
SerpA3n-F	GCCTCGTCAGGCCAAAAAG	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
SerpA3n-R	TGAACGTGTCAAGAGGGTCAA	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

SPP1/OPN-F	ATGTCATCCCTGTTGCCAG	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
SPP1/OPN-R	GACTGATCGGCACTCTCCTG	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
TNF $\alpha$ -F	TTCATCAGTTCTATGGCCC	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
TNF $\alpha$ -R	GGGAGTAGACAAGGTACAAC	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
TSPO-F	GCCTACTTTGTACGTGGCGAG	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
TSPO-R	CCTCCCAGCTCTTTCCAGAC	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

Tabelle 10: Primer

### 3.10 Software

Software	Hersteller
Image Studio, Version 3.1	LI-COR® Biosciences, Lincoln, USA
Image J, Version 1.52e	Entwickelt von Wayne Rasband, ehemaliger Mitarbeiter des National Institutes of Health, Bethesda, USA
LightCycler® Software 4.5	Roche Molecular Systems Inc., Pleasanton, USA
Mendeley Desktop, Version 1.19.4	Mendeley Ltd., London, UK
Microsoft® Excel für Mac, Version 16.41	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft® Word für Mac, Version 16.40	Microsoft Corporation, Redmond, USA
EthoVision XT	Noldus Information Technology, Wageningen, NL
Prism 8 for Mac OS X, Version 8.4.3	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
ZEN 2 (blue edition)	Zeiss, Jena, DE

Tabelle 11 Software

## 4 Methoden

### 4.1 Versuchsübersicht und Studiendesign

Die im Rahmen der Experimente verwendeten 40 Versuchstiere werden in vier Gruppen randomisiert.

Durch einen chirurgischen Eingriff wird bei 24 Tieren ein kontrollierter Hirnschaden mittels CCI sowie eine Femurfraktur verursacht. Unmittelbar vor Anwendung des CCI / FF Modells wird den Tieren entweder rOPN (Gruppe: *poly rOPN*, n=12) oder eine wirkstofflose Trägerlösung (Gruppe: *poly veh*; n=12) ICV appliziert.

Die verbleibenden 16 Tiere werden als Kontrollgruppe scheinoperiert. Auch diesen Tieren wird vor Durchführung der Scheinoperation (Sham-Operation) entweder rOPN (Gruppe: *sham rOPN*, n=8) oder eine wirkstofflose Trägerlösung (Gruppe: *sham veh*, n=8) ICV appliziert.

Zur besseren Übersicht werden in dieser Arbeit die Formulierungen Anwendung des CCI- und FF-Modells und Polytrauma-Operation synonym verwendet. Das Studiendesign ist in folgender Tabelle zur Übersicht nochmals aufgeführt.

Operation	Sham		CCI+FF	
Behandlung (ICV)	Vehikel	rOPN	Vehikel	rOPN
Anzahl	8	8	12	12

Tabelle 12: Studiendesign

Zur Erfassung allgemeiner und verhaltenspathophysiologischer Parameter werden die Tiere vor und nach den chirurgischen Eingriffen verschiedenen Tests unterzogen. Hierzu gehören Neuroscore, Beinbelastungsscore (BBS), *open field test* und Erfassung des Körpergewichts. Die Tests beginnen einen Tag vor den chirurgischen Interventionen und werden bis zum 5. postinterventionellen Tag regelmäßig durchgeführt. Am 5. Tag nach den chirurgischen Interventionen werden die Tiere euthanasiert. Folgende Tabelle zeigt die zeitliche Abfolge der verschiedenen Tests und der Euthanasie in Relation zum Operationstag (ICV-Injektion, CCI / FF-Modell, Scheinoperationen).

	Prä-Op	Post-OP		
	1d	1d	3d	5d
<b>Neuroscore</b>	X	X	X	X
<b>BBS</b>		X	X	X
<b>Open Field Test</b>	X	X	X	X
<b>Gewicht</b>	X	X	X	X
<b>Euthanasie</b>				X

**Tabelle 13:** Zeitlicher Ablauf allgemeiner und verhaltenspathophysiologischer Analysen

Am Tag der Euthanasie werden die Gehirne der Versuchstiere entnommen, im Verlauf Serienschnitte angefertigt und das Kontusionsvolumen sowie die Dicke der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus anhand einer Kresylviolett-Färbung bestimmt. Außerdem werden immunhistochemische Färbungen angefertigt und analysiert, um die Differenzierung von Astrozyten und Mikroglia im periläsionalen Gewebe zu beurteilen. Überdies werden in dieser Arbeit molekularbiologische Verfahren wie die quantitative Echtzeit-PCR (engl. *real-time quantitative PCR*, qPCR) und Western Blot angewandt um Parameter bzgl. neuronalem Zelltod und Neuroinflammation zu erheben.

## 4.2 Genehmigung der Tierversuche

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche sind nach Prüfung des Tierversuchsantrags mit dem Aktenzeichen 23 177-07/ G 17-1-062 durch das Landesuntersuchungsamts Rheinland-Pfalz bewilligt. Die Versuche wurden demnach gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes (Fassung vom 18. Mai 2006) durchgeführt.

## 4.3 Tiere und Tierhaltung

Das Experiment wird mit 8-9 Wochen alten weiblichen C57BL/6N Mäusen der Firma Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) durchgeführt. Die Tiere wiegen zwischen 17,7 und 21,8 g.

Während der Versuche werden die Tiere in den Laboren der Klinik für Anästhesiologie, gemäß den Vorgaben der Gesellschaft für Versuchstierkunde / *society of laboratory*

*animal science* (GV-SOLAS), in einem Tierhaltungsschrank gehalten. Hiernach ist der Tierhaltungsschrank mit folgenden Haltungsparemtern voreingestellt:

Paramater	Wert
Temperatur	20–24°C
Luftfeuchte	55%
Luftwechsel	30 LW/h
Beleuchtungsprogramm	12 h Hell-Dunkel-Rhythmus

**Tabelle 14:** *Parameter Tierhaltungsschrank*

Die Mäuse befinden sich zu viert in Standardkäfigen des Typs 2-Filtertop mit einer Grundfläche von 350 cm<sup>2</sup>. Die Käfige sind mit Streu aus Holzspänen bestückt. Als Nestbaumaterial dient einfacher Zellstoff, wobei in jedem Käfig zusätzlich eine Plastikrolle vorhanden ist. Das Einstreu- und Nestmaterial wird wöchentlich gewechselt.

Das in pelletierter Form verabreichte Spezialfutter wird den Mäusen mittels eines sich über den Tieren befindlichen Gittereinsatzes *ad libitum* angeboten, wodurch eine Kontamination durch Fäkalien verhindert wird. Über Trinkflaschen haben die Tiere stets Zugang zu frischem Wasser. Futter und Wasser werden im Rahmen des Käfigwechsels mit erneuert. Nach den operativen Eingriffen werden den Mäusen einzelne in Wasser getränkte Futterpellets an den Boden des Käfigs gelegt, um die Nahrungsaufnahme für die geschwächten Tiere zu vereinfachen.

#### **4.4 Erhebung allgemeiner und verhaltenspathophysiologischer Parameter**

##### **4.4.1 Neuroscore**

Der *neurological severity score* (NSS) ist eine etablierte Methode, die den funktionalen Status von Mäusen nach *traumatic brain injury* (TBI) erfasst (272). Laborintern wird ein nach Huang *et al.* (273) angepasster NSS verwendet, der die Kriterien von Shohami (272) aufgreift, diese aber differenzierter auswertet (laborinterne Bezeichnung des Tests: Neuroscore).

In dieser Arbeit wird auf die Erhebung des Kriteriums „*failure to exit a 30-cm-diameter circle*“ im Rahmen des NSS verzichtet, da diese Fragestellung in dem ebenfalls durchgeführten *open field test* erfasst wird. Abbildung 4 zeigt das verwendete Neuroscore-

Protokoll, welches die verschiedenen Aufgaben und Kriterien sowie die Punktevergabe zur Auswertung beinhaltet.

Der Neuroscore besteht somit aus fünf verschiedenen Aufgaben, die jeweils differenziert mit Punkten bewertet werden. Null Punkte entsprechen hierbei einer voll funktionalen Maus ohne neurologisch-motorische Defizite. Die maximale Punktzahl des modifizierten Tests, die ein Versuchstier erreichen kann, beträgt 13 Punkte und beschreibt eine Maus mit hochgradigem neurologisch-motorischem Defizit.

Im Rahmen dieser Arbeit werden mit Hilfe des Neuroscores die motorischen und neurologischen Fähigkeiten der Tiere vor und nach der Polytrauma- oder Sham-Operation erfasst. Zu berücksichtigen ist, dass hierbei eine funktionale Einschränkung durch die Femurfraktur von einer zentral bedingten Einschränkung der Extremität durch einen Hirnschaden unterschieden werden sollte. Wenn die Einschränkung lediglich auf die Femurfraktur zurückzuführen ist und eine zentrale Komponente ausgeschlossen werden kann, werden im Neuroscore für die entsprechende Aufgabe keine Punkte vergeben. Diese Differenzierung ist allerdings schwierig und in vielen Fällen nur bedingt möglich. Zu welchem Zeitpunkt der Neuroscore erfasst wird, ist in Tabelle 13 aufgeführt. Wichtig hierbei ist, dass der Test immer zur gleichen Tageszeit durchgeführt wird, um eine entsprechende Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

Im Folgenden sind die einzelnen Kriterien des Neuroscore dargestellt, wobei die jeweiligen Details zur Punktevergabe Abbildung 4 zu entnehmen sind:

#### Reflexe:

Indem man über der Maus in die Hände klatscht, wird geprüft, ob das Tier hierauf eine entsprechende Schreckreaktion zeigt.

#### Verhaltensdefizite:

Hier wird geprüft, ob die Maus ein natürliches Erkundungsverhalten zeigt und ob das Tier geradeaus laufen kann.

#### Koordination:

Die Koordination des Tieres wird geprüft, indem die Maus eine Distanz von 50 cm über einen 1, 2 und 3 cm breiten Balken zurücklegen soll.

#### Balance:

Die Gleichgewichtsfähigkeit der Maus wird geprüft, indem das Tier sich für 10 Sekunden mit allen 4 Pfoten an einem runden und einem quadratischen Stab (jeweils mit einem Durchmesser von 0,5 cm) festhalten soll.

#### Motorische Defizite:

Hier wird geprüft, ob eine Parese einer Pfote oder eine komplette Hemiparese vorliegt.

		PreOP	Day 1	Day 3	Day 5
<b>1. Reflexes</b>					
startle reflex	Present	(0)			
	Absent	(1)			
		If the mouse is not moving at all, clap your hands once above the mouse; did it react?			
<b>2. General behavioral deficit?</b>					
Seeking behavior	Present	(0)			
	Absent	(1)			
Walk straight	Present	(0)			
	Absent	(1)			
<b>3. Coordination</b>					
Beam 3 cm	walking	Score	(0-2)		
Beam 1,5 cm	walking	Score	(0-2)		
Beam 1 cm	walking	Score	(0-2)		
Criteria:		0 point: normal movement / no impairment (new) 1 points: feet misplacements / unstable movement 2 points: sits down / stops moving on beam / falls down Criteria (old): Count misplacements (new: in index)			
<b>4. Balance</b>					
Round stick		Score	(0-1)		
Square stick		Score	(0-1)		
Criteria:		0 point: Can grip the stick with 4 paws for 10 seconds 1 points: turn the stick: can it do that again, or is a paw (hemiparesis) "hanging out"			
<b>5. Motor deficit</b>					
Paresis	Absent	(0)			
	One foot	(1)			
	Hemiparesis	(2)			

Abbildung 4: Laborinternes Neuroscore-Protokoll

#### 4.4.2 open field test

Mit Hilfe des *open field tests* werden verhaltensbiologische Parameter wie allgemeine Aktivität, Erkundungsverhalten sowie Vermeidungsverhalten bzw. Ängstlichkeit von Testtieren quantifiziert und erfasst. Der *open field test* ermöglicht einen Vergleich des Verhaltens der Tiere vor und nach der Polytrauma- bzw. Sham-Operation, sowie eine Verlaufsanalyse des Verhaltens vom 1. bis zum 5. postoperativen Tag. Die zeitlichen Zusammenhänge sind in Tabelle 13 dargestellt, wobei auch hier wichtig ist, dass der Test immer zur gleichen Tageszeit durchgeführt wird, um eine entsprechende Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

Zum Test wird die Maus zentral in eine blickdichte Arena (40 x 40 x 40 cm) gesetzt und verbleibt dort für 3 Minuten (min). Die Maus wird dabei von einer Kamera erfasst und aufgezeichnet. Mittels der computergestützten Software EthoVision XT werden



anhand der Videodaten verschiedene verhaltensbiologische Parameter erfasst. Zu beachten ist hierbei, dass die Analyse immer bei gleichen Lichtverhältnissen (gleichmäßig hell erleuchtet) und in Stille durchgeführt wird.

Als Aktivitätsparameter wird in dieser Arbeit die Distanz, die während der dreiminütigen Analysezeit zurückgelegt wird, bestimmt.

Analog zu dem im NSS erfassten Parameter „*failure to exit a 30-cm-diameter circle*“ wird im *open field test* die Zeit gemessen, die die Maus benötigt um den zentral in der quadratischen Grundfläche gelegenen virtuellen Kreis ( $452,4 \text{ cm}^2$ ), in den sie mittig gesetzt wird, zu verlassen.

Als *border zone*, wird die äußere Fläche bezeichnet, die innerhalb des quadratischen Messbereiches liegt, aber nicht zu dem zentralen Kreis gehört ( $1600 \text{ cm}^2 - 452,4 \text{ cm}^2 = 1147,6 \text{ cm}^2$ ). Ein weiterer Parameter, der in diesem Zusammenhang erfasst wird, ist die Zeit, die das Versuchstier während der dreiminütigen Analyse in der *border zone* verbringt.

#### **4.4.3 Beinbelastungsscore**

Der Beinbelastungsscore erhebt drei Kriterien anhand derer die allgemeine Aktivität des Versuchstieres im Käfig sowie die Belastung und Beweglichkeit der frakturierten Extremität objektiviert werden sollen. Hieraus ergibt sich die Möglichkeit die Femurfraktur der Tiere im Verlauf zu beurteilen und entsprechend zwischen den Gruppen zu vergleichen. Die linke untere Extremität der scheinoperierten Tiere wird ebenfalls analysiert. Der Beinbelastungsscore wird am 1., 3. und 5. postoperativen Tag immer zur gleichen Tageszeit erhoben.

Im Rahmen der Testung werden die allgemeine Bewegung und Aktivität der Maus im Käfig beurteilt. Anschließend wird das Tier aus dem Käfig genommen. Die Belastbarkeit und die Beweglichkeit des frakturierten Beins werden somit auf freier Fläche analysiert. Nachfolgend ist das laborinterne Protokoll aufgeführt. Details zur Punktevergabe und Bewertung sind dem Protokoll zu entnehmen.

	1d	3d	5d
<b>1. Bewegung im Käfig</b>			
normal (0)			
wenig (1)			
keine (2)			
<b>2. Beinbelastung</b>			
normal (0)			
wenig (1)			
keine (2)			
<b>3. Beweglichkeit des Beins</b>			
normal (0)			
wenig (1)			
keine (2)			

Abbildung 5: Laborinternes Beinbelastungsscore-Protokoll

#### 4.4.4 Bestimmung des Gewichts der Versuchstiere

Die Nahrungsaufnahme und damit indirekt das Gewicht ist ein wichtiger Indikator für die Befindlichkeit der Tiere. Beginnend einen Tag vor den chirurgischen Eingriffen, werden die Mäuse regelmäßig zur gleichen Tageszeit gewogen. Bei zu starkem Gewichtsverlust (> 20%) in Kombination mit ausgeprägter Schmerzsymptomatik und Verhaltensdefiziten werden betroffene Tiere entsprechend der vordefinierten Abbruchkriterien des Versuchs in tiefer Narkose (Isofluran) unmittelbar durch Genickbruch euthanasiert.

Darüber hinaus ist durch das kontinuierliche Wiegen und die dadurch sicher gestellte Nahrungsaufnahme weitestgehend auszuschließen, dass mögliche messbare Effekte aufgrund einer katabolen Stoffwechsellage des Tieres zustande kommen bzw. dadurch beeinflusst werden.

## **4.5 ICV-Injektion und Polytrauma-Modell**

### **4.5.1 Narkose und allgemeine perioperative Maßnahmen**

Im Rahmen einer grundlegenden Schmerztherapie wird den Tieren zwei Tage vor den Eingriffen bis zum Zeitpunkt der Euthanasie Tramadol (ratiopharm®, 1mg/ml) über das Trinkwasser zugeführt.

Am Operationstag wird den Tieren Fentanyl (Fentanyl-Janssen®, 50 Mikrogramm (µg)/Kilogramm Körpergewicht (kgKG)) intraperitoneal appliziert. Die Gabe erfolgt 15 min vor dem Eingriff, um eine ausreichende Anflutung des Medikamentes zu gewährleisten.

Zur stressfreien Induktion der Narkose wird das Tier anschließend unter eine Haube gelegt und darüber in eine Atmosphäre mit dem 4 Vol % Inhalationsanästhetikum Isofluran verbracht, bis alle motorischen Reaktionen erloschen sind (circa (ca.) 1 min). Zur Aufrechterhaltung der Narkose während den operativen Eingriffen (ICV-Injektion, CCI- und FF-Modell), wird dem spontan atmenden Tier kontinuierlich über eine in den jeweiligen Operationsplatz integrierte Inhalationsmaske 2 Vol % Isofluran in einem Luft-Sauerstoffgemisch zugeführt.

Um ein Austrocknen der Augen des narkotisierten Tieres zu verhindern, wird eine Augensalbe aufgetragen.

Zur bestmöglichen Anwendung der ICV-Injektion und des CCI-Modells ist der Kopf des Tieres in einem stereotaktischen Rahmen fixiert. Hierzu befindet sich das Tier in Bauchlage. Um die Körpertemperatur während der Operation aufrecht zu erhalten, liegt das Tier auf einer Wärmplatte, wobei die Körpertemperatur des Tieres kontinuierlich rektal gemessen wird.

Für die FF-Operation ist keine Fixierung des Kopfes in einen stereotaktischen Rahmen nötig. Die Operation erfolgt an einem zweiten Operationsplatz ebenfalls in Bauchlage und unter Monitoring der Körpertemperatur mittels Wärmplatte und rektaler Messung. Im Anschluss sollen die Tiere in einem beheizten Säuglingsinkubator (Bei 33 °C und 35 % Luftfeuchte) aufwachen, wo sie für weitere 1,5 Stunden überwacht werden.

### **4.5.2 ICV-Injektion**

Unmittelbar vor der Polytrauma- oder Sham-Operation wird dem Tier je nach Gruppenzugehörigkeit entweder 4 µl rekombinantes Osteopontin (BioLegend®, 0,1 µg/µl)

oder 4 µl Vehikel-Substanz (NaCl) ICV appliziert. Die Injektion findet unter den in 4.5.1 beschriebenen Bedingungen statt.

Zunächst wird eine ca. 1,5 cm lange mediane Inzision der Kopfhaut zur Freilegung der Schädelkalotte von der *Sutura coronalis* auf Höhe des Bregmas bis zur *Sutura lambdoidea* gesetzt. Mit Hilfe eines Wattetupfers wird das freigelegte Periost nach lateral präpariert. Anschließend wird an den stereotaktischen Koordinaten anteroposterior – 0.5 mm und lateral von Bregma + 1 mm ein Bohrloch gefräst. Die entsprechende Substanz wird mit einer Hamilton Spritze in 1,6 mm Tiefe langsam injiziert. Um die Verteilung der Substanz im intraventrikulären Raum zu gewährleisten, wird die Spritze für 3 min in Applikationsposition belassen. Nach dem Entfernen der Applikationsvorrichtung, wird das Bohrloch mit Histoacrylkleber verklebt. Je nach Gruppenzugehörigkeit des Tieres erfolgt nun der Verschluss des Hautschnitts mit Knopfnähten oder das CCI-Modell. Folgende Abbildung zeigt ein Versuchstier zum Zeitpunkt der ICV Injektion.



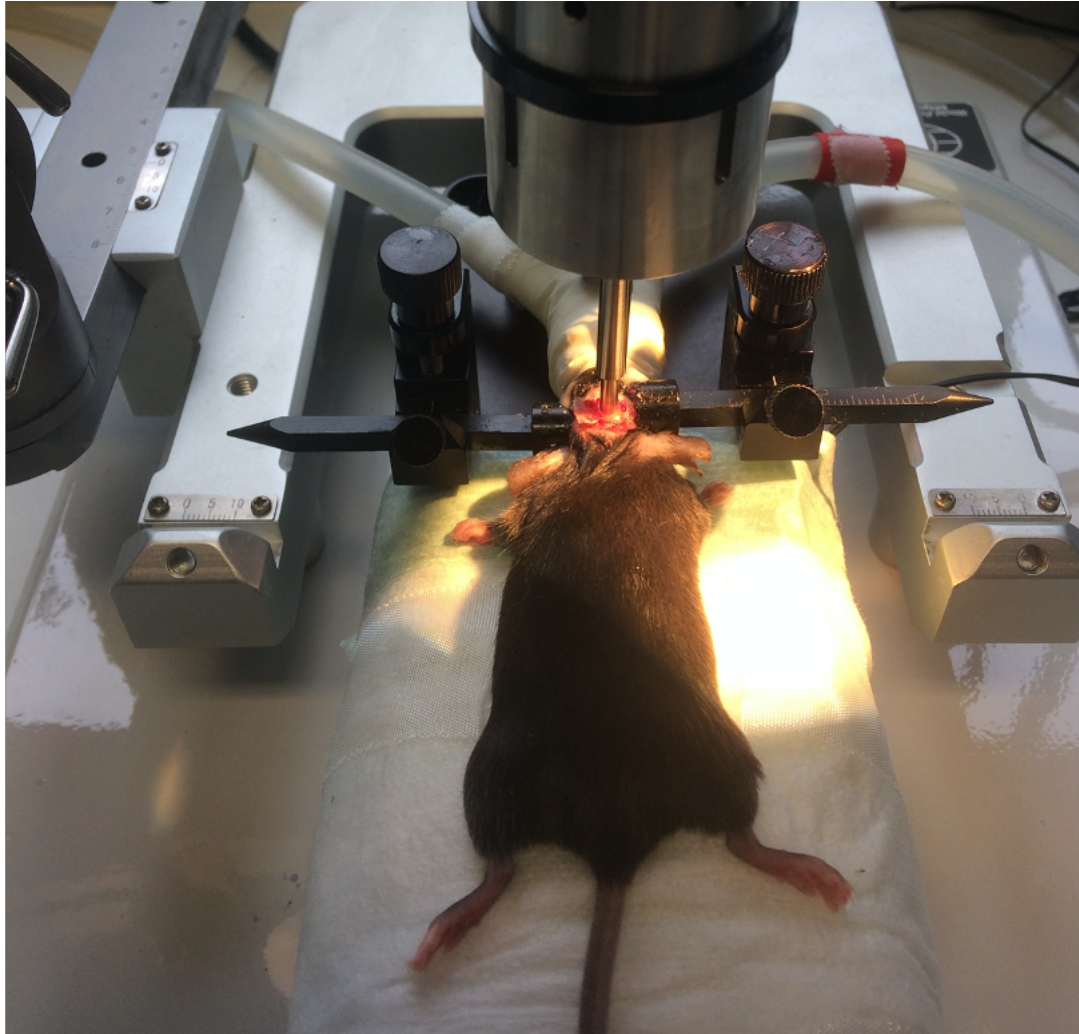
**Abbildung 6: ICV-Injektion** Zu sehen ist eine sich in Bauchlage befindliche Maus, die am Operationsplatz „ICV / CCI“ mit dem Kopf in einen stereotaktischen Rahmen gespannt ist. Über die der Schnauze anliegende Maske wird dem Tier 2 Vol% Isofluran in einem Luft-Sauerstoffgemisch zugeführt. Die Schädelkalotte ist freipräpariert und die Hamilton-Spritze über ein gefrästes Bohrloch (stereotaktische Koordinaten: anteroposterior – 0.5 mm und lateral von Bregma + 1 mm) in Applikationsposition platziert. Zur ICV Applikation ist die Hamilton-Spritze hier in 1,6mm Tiefe positioniert.

### 4.5.3 CCI-Modell

Die CCI-Operation findet im Anschluss an die ICV-Injektion unter den in 4.5.1 beschriebenen Bedingungen statt.

Aufgrund der ICV-Injektion ist die Schädelkalotte des Tieres bereits freigelegt. Orientierend am Bregma wird über der rechten Hemisphäre ein quadratisches Bohrloch mit einer Seitenlänge von ca. 7 mm unter Erhalt der Dura mater gefräst. Die mediale Seite der Knochenplatte, welche der *Sutura sagittalis* entspricht, wird beim Fräsen ausgespart und fixiert somit die Knochenplatte an der Schädelkalotte. Die Knochenplatte wird nun nach medial aufgeklappt und der druckluftgetriebene CCI-Applikator über dem freigelegten Hirngewebe platziert. Das SHT wird durch einen Stempel (Durchmesser 3,0 mm) computergesteuert mit einer definierten Geschwindigkeit von 6 Meter pro Sekunde (m/s), einer Eindringtiefe von 1,5 mm und einer Aufpralldauer von 200 Millisekunden (ms) auf das Gehirn induziert. Nach Versuchsende wird die

Knochenplatte wieder nach lateral über das Hirngewebe gelegt und mit Histoacrylkleber fixiert. Die verbleibende Hautwunde wird mit Einzelknopfnähten verschlossen. Abbildung 7 zeigt ein Versuchstier zum Zeitpunkt der CCI-Applikation.



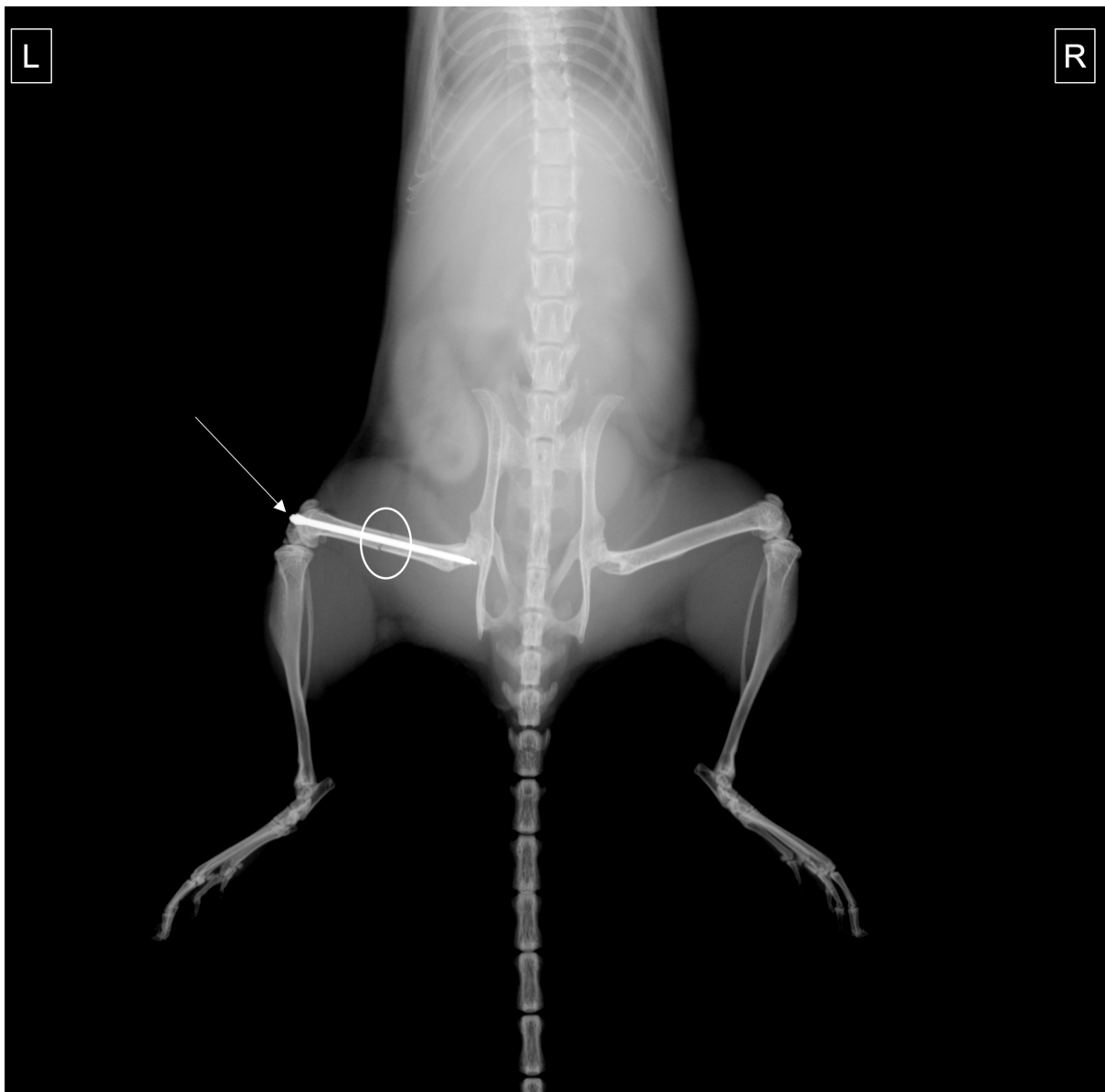
**Abbildung 7:** CCI-Modell. Zu sehen ist eine sich in Bauchlage befindliche Maus, die am Operationsplatz „ICV / CCI“ mit dem Kopf in einen stereotaktischen Rahmen gespannt ist. Über die der Schnauze anliegende Maske wird dem Tier 2 Vol% Isofluran in einem Luft-Sauerstoffgemisch zugeführt. Die Schädelkalotte ist freipräpariert, die Knochenplatte wie oben beschrieben nach medial aufgeklappt. Der CCI-Applikator ist über dem freigelegten Hirngewebe platziert.

#### 4.5.4 Femurfraktur

Die operative Femurfrakturierung erfolgt direkt im Anschluss an die CCI-Operation unter den in 4.5.1 beschriebenen Bedingungen.

Das linke Bein des Tieres wird desinfiziert und rasiert. Anschließend wird ein ca. 4mm langer Hautschnitt medial der Kniescheibe gesetzt. Nach Mobilisation der Patellarsehne wird die Kniescheibe nach lateral aufgeklappt, was den Zugang zum distalen Femur ermöglicht. Zur Eröffnung der Markhöhle wird eine 0,5 mm dicke Trephine

verwendet. Hiernach wird der MouseScrew-Nagel so tief in die Markhöhle eingeführt, dass proximal der Trochanter major penetriert wird. Die Frakturierung des Femurs erfolgt kontrolliert unter Verwendung einer 3-Punkt-Biegevorrichtung. Die intramedulläre Schienung der Fraktur erfolgt über den zuvor eingebrachten MouseScrew-Nagel. Abschließend wird die Patella reponiert und der Hautschnitt vernäht. Das Operationsergebnis wird radiologisch mit Hilfe des Kleintier-Röntgengerät MX-20 Faxitron (35kV für 5s) kontrolliert (Abbildung 8).



**Abbildung 8:** Postoperative Röntgenkontrolle der linksseitigen Femurfraktur. Zu sehen ist eine postoperative Röntgenaufnahme eines Polytrauma-operierten Tieres. Die Seiten sind anhand der weißen Buchstaben L (links) und R (rechts) definiert. Linksseitig imponiert der durch den weißen Pfeil markierte, röntgendichte MouseScrew-Nagel. Der Nagel ist intramedullär platziert. Der weiße Kreis markiert den Frakturspalt der linksseitigen Femurfraktur.



#### **4.5.5 Sham-Operation**

Alle scheinoperierten Tiere werden wie in 4.5.1 beschrieben in Narkose versetzt. Eine ICV-Injektion erfolgt jedoch auch bei den Tieren, die der Sham-Gruppe angehören. Je nach Gruppenzugehörigkeit (s. 4.1) wird hierbei dann entweder rOPN oder eben eine Vehikel-Substanz appliziert.

Die scheinoperierten Tiere werden nach der ICV-Injektion für den Zeitraum einer CCI-Operation mit freipräparierter Schädelkalotte ohne weitere Intervention (keine weitere Kraniotomie und kein Impact) belassen. Die Hautwunde wird anschließend mit Einzelknopfnähten verschlossen.

Im Anschluss werden die scheinoperierten Tiere aus der stereotaktischen Fixierung befreit und auf den zweiten Operationsplatz gelegt. Unter kontinuierlicher Narkose erfolgt der Hautschnitt und die Muskelpräparation am linken Oberschenkel ohne weitere Interventionen. Auch hier werden die Tiere für den Zeitraum einer FF-Operation in Narkose belassen. Anschließend wird die Hautinzision analog zum FF-Modell verschlossen.

Um hiernach behutsam aus der Narkose zu erwachen, werden auch die scheinoperierten Tiere für 1,5 Stunden in einem Säuglingsinkubator überwacht.

#### **4.5.6 Euthanasie und Entnahme von Gewebeproben**

Fünf Tage nach den Eingriffen werden die Tiere zur Entnahme von Gewebeproben euthanasiert. Dazu wird das Tier für 90 s mit 4 Vol % Isofluranbegasung narkotisiert. Anschließend wird das Tier dekapitiert. Das aus dem Torso hervortretende Blut wird in einem mit 80 µl Heparin versetzten Falcon aufgefangen und bei 4 °C und 3000 rpm-1 für 8 min zentrifugiert. Das zellfreie Blutplasma wird bis zur weiteren Analyse bei -80 °C weggefroren.

Zur Hirnentnahme wird zunächst die Kopfhaut mediansagittal mit einer Schere aufgeschnitten und die Schädelkalotte freigelegt. Anschließend wird am *Foramen magnum* mit der Schere ein kleiner Schnitt gesetzt und die Schädelkalotte von occipital nach rostral vorsichtig aufgebrochen, bis das Gehirn freiliegt. Nach Durchtrennung der ventralen Hirnnerven, kann das Gehirn vorsichtig entnommen werden. Direkt im Anschluss wird das entnommene Gehirn in pulverisiertem Trockeneis für 1 min schockgefroren und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C weggefroren.





**Abbildung 9:** CCI-Gehirn nach Entnahme. Zu sehen ist ein nach Euthanasie entnommenes Gehirn eines CCI-Tieres. Die dorsale Aufsicht zeigt die beiden Hemisphären, sowie den rechtshemisphärisch gelegenen Schaden, welcher sich deutlich von dem sonst homogenen Gewebe abhebt.

## 4.6 Histopathologische Analyse

### 4.6.1 Kryostat und Probengewinnung

Um Präparate für histologische Färbungen zu erhalten, werden die Gehirne der Versuchstiere mittels eines Kryostats bei  $-20\text{ °C}$  in der Frontalebene geschnitten und auf Objektträger aufgenommen. Außerdem wird hierbei Gewebe zur molekularbiologischen Analyse gewonnen.

Zunächst wird das Gehirn in rostraler Ausrichtung mit Hilfe eines Einbettmediums auf dem Objektisch fixiert. Das am Objektisch fixierte Gehirn wird nun so gegen das Messer ausgerichtet, dass Schnitte in der Frontalebene resultieren. Hiernach wird das Gehirn komplett mit Einbettmedium umhüllt. Um das Anfertigen der Schnitte verschiedener Gehirne vergleichbar zu machen, wird jedes Gehirn von rostral nach kaudal in 16 500 (Mikrometer)  $\mu\text{m}$  dicke Frontalebenen unterteilt, beginnend bei Ebene Bregma  $+3,14\text{ mm}$ , welche als Ebene 1 ( $\pm 0\text{ }\mu\text{m}$ ) definiert wird. Am Anfang jeder Ebene werden fünf Serienschritte, mit der Dicke von  $12\text{ }\mu\text{m}$  auf jeweils einen Objektträger aufgenommen, wobei die Ebenen 1-10 und 11-16 jeweils zusammen auf einem Objektträger aufgenommen werden. Die mit den Präparaten bestückten Objektträger werden bis zur weiteren Verwendung bei  $-20\text{ °C}$  gelagert.

Die Probengewinnung zur molekularbiologischen Analyse erfolgt zwischen den Ebenen 6 ( $\cong 2500 \mu\text{m}$ , Bregma +0,64 mm) und Ebene 13 ( $\cong 6000 \mu\text{m}$ , Bregma -2,86 mm). Hierzu werden nach Aufnahmen der jeweiligen Serienschnitte so genannte Trimm-schnitte, die  $60 \mu\text{m}$  dick sind, angefertigt. Es werden sechs Trimmschnitte angefertigt ( $\cong 240 \mu\text{m}$ ), welche in gleicher Ausrichtung deckungsgleich aufeinander gestapelt werden. Das ventrale Drittel wird abgetrennt und verworfen, der verbleibende Anteil wird entsprechend den Hemisphären entlang der Mittellinie in eine ipsiläsionale und eine kontraläsionale Seite geteilt und jeweils in einem Kryoröhrchen aufbewahrt. Pro Tier werden für jede Hemisphäre zwei Kryoröhrchen verwendet, die abwechselnd zur Probenaufnahme zwischen den Ebenen 6-13 verwendet werden (s. Tabelle 15). Das sich in den Kryoröhrchen befindliche Gewebe wird bis zur Transkript- und Proteinanalyse bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

<i>Kryoröhrchen</i>	<i>Ebenen (je 4 x 60 <math>\mu\text{m}</math>)</i>
<b>1.Kryoröhrchen</b> <sub>li.Hemisphäre</sub>	2500, 3500, 4500, 5500 ( $\mu\text{m}$ )
<b>1.Kryoröhrchen</b> <sub>re.Hemisphäre</sub>	2500, 3500, 4500, 5500 ( $\mu\text{m}$ )
<b>2.Kryoröhrchen</b> <sub>li.Hemisphäre</sub>	3000, 4000, 5000, 6000 ( $\mu\text{m}$ )
<b>2.Kryoröhrchen</b> <sub>re.Hemisphäre</sub>	3000, 4000, 5000, 6000 ( $\mu\text{m}$ )

**Tabelle 15:** Probengewinnung zur molekularbiologischen Analyse

#### 4.6.2 Kresylviolett-Färbung

Die nach Franz Nissl benannte Nissl-Färbung (in diesem Experiment mit dem Farbstoff Kresylviolett) dient insbesondere der Darstellung von Nervengewebe. Kresylviolett bindet basophile Verbindungen wie Ribonukleinsäure (engl. *ribonucleic acid*, RNA) und DNA, was zu einem violetten Anfärben von Zellkernen und Ribosomen führt. Die Ribosomen sind im Nervenzellkörper deutlich konzentrierter als in Axon oder Dendrit, weshalb weitestgehend nur die Zellkörper angefärbt werden. Zu nennen ist noch das Phänomen der so genannten „Nissl-Schollen“, die dem rauen Endoplasmatischen Retikulum entsprechen.

Zunächst werden die zu färbenden Objektträger für 30 min an der Luft getrocknet, anschließend für 2 min in 70%igem Ethanol belassen und dann für 10 min in Kresylviolett-Färbelösung eingetaucht. Hiernach werden die Objektträger kurz in zwei Behälter mit destilliertem Wasser eingetaucht, um überschüssige Farbe zu entfernen. Zum Entwässern der Schnitte werden die Objektträger jeweils zweimal kurz in zunächst

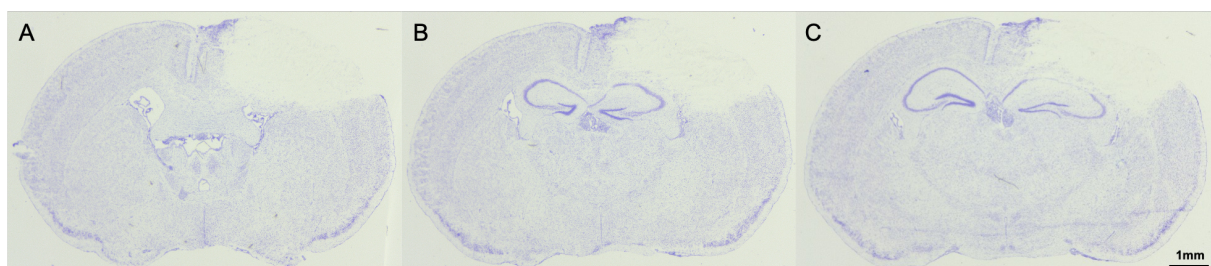
70%igem und dann in 96%igem Alkohol gewaschen. Durch das anschließende Eintauchen der Objektträger für zunächst 5 und dann 2 min in jeweils frischem RotiHistol werden die Schnitte fixiert. Um die angefärbten Schnitte über längere Zeit zu konservieren, werden diese mit Hilfe des RotiHistokitts und einem Deckgläschen nach außen verschlossen.

#### 4.6.3 Quantifizierung des Kontusionsvolumens

Die mit Kresylviolett gefärbten Schnitte eignen sich gut zur Erfassung des Kontusionsvolumens, da sich das gesunde, angefärbte Hirngewebe, von dem nicht gefärbten Kontusionsgewebe klar absetzt.

Zunächst werden alle 16 Schnitte eines Gehirns mit Hilfe eines Mikroskops, einer Mikroskopie-Kamera und der Software ZEN 2 (blue edition) aufgenommen und ausgemessen. Zur Bestimmung des Kontusionsvolumens eines Gehirns werden zunächst von allen 16 Schnitten die Fläche der linken und rechten Hemisphäre und die Fläche, die das vitale Gewebe der rechten Hemisphäre einnimmt, bestimmt. Das Kontusionsvolumen eines Schnittes ergibt sich aus der Differenz der Fläche der rechten Hemisphäre und der Fläche des vitalen Gewebes der rechten Hemisphäre. Um das Kontusionsvolumen ( $V$ ) über alle 16 Schnitte zu berechnen, wird folgende Formel verwendet:

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



**Abbildung 10:** Veranschaulichung des Kontusionsgewebes gegenüber intaktem Gewebe. Zu sehen sind drei Frontalschnitte eines CCI-Gehirns der Ebenen 9 (Bregma - 0,86 mm, A), 10 (Bregma - 1,36 mm, B) und 11 (Bregma - 1,86 mm, C), die nach Nissl mit Kresylviolett gefärbt sind. Der Bereich des Schadens ist, da dieses Gewebe nicht angefärbt ist, deutlich zu identifizieren.

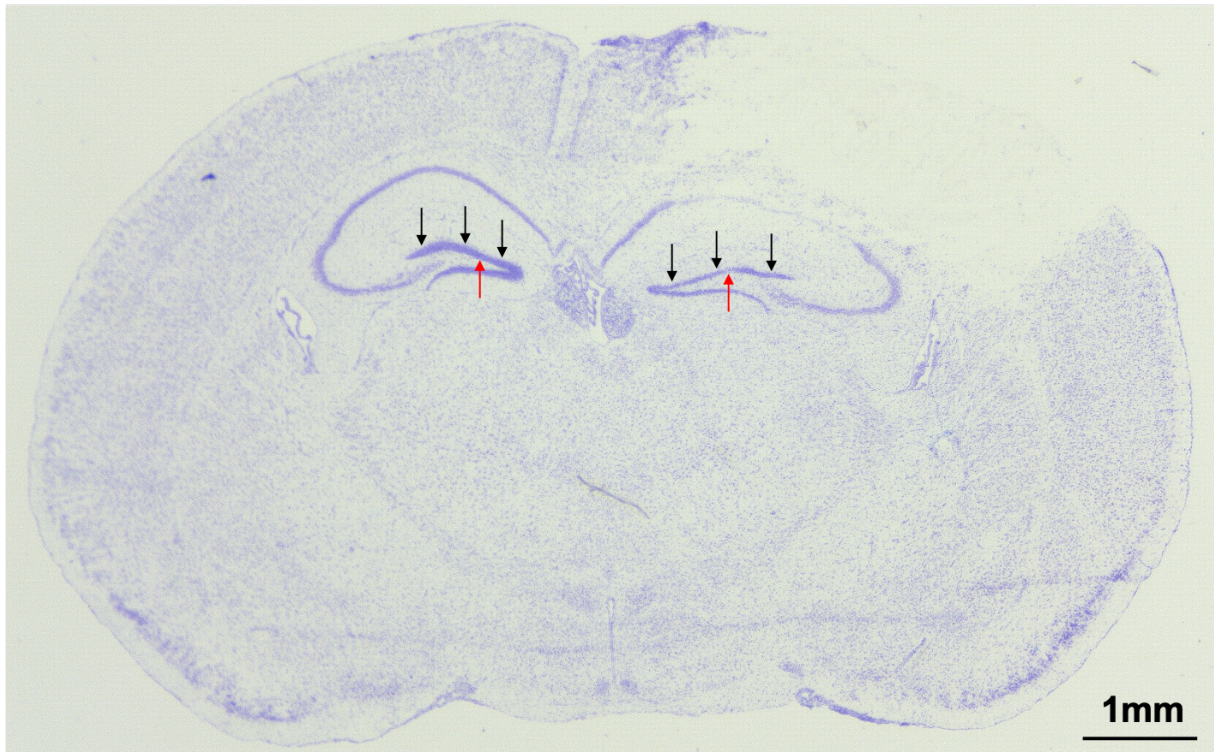
#### 4.6.4 Dickemessung Gyrus dentatus

Der Gyrus dentatus ist Teil der Hippocampusformation und einer der wenigen Orte im zentralen Nervensystem, mit der Fähigkeit zur Neurogenese im adulten Organismus.

Der Gyrus dentatus besteht aus einem inneren *Stratum plexiforme*, dem mittig gelegenen *Stratum granulosum*, welches mit dicht gepackten Körnerzellen den Hauptbestandteil darstellt und dem äußeren *Stratum moleculare*. Die neuronalen Stammzellen liegen in der subgranulären Zone zwischen *Stratum granulosum* und *Stratum plexiforme* (161).

In dieser Arbeit soll die Dicke der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus bestimmt werden, wodurch die Schadensauswirkung des SHTs in weiter entfernten Hirnregionen untersucht und quantifiziert werden kann. Hierzu werden die mit Kresylviolett gefärbten Schnitte der Ebenen 11-13 (Bregma – 1,86 mm (11), - 2,36 mm (12), -2,86 mm (13)) verwendet. Aufgrund der hohen Dichte der Körnerzellen ist das *Stratum granulosum* in der Nissl-Färbung gut darstellbar. Die fotografierten Schnitte werden mit der computergestützten Software ZEN 2 (blue edition) ausgemessen.

Pro Versuchstier werden zwei Schnittebenen so vermessen, dass jeweils ipsi- und kontraläsional innen, mittig und außen die Dicke der Körnerzellschicht bestimmt wird, wobei darauf zu achten ist, dass für diese Lokalisationen an jeweils vergleichbaren Stellen gemessen wird. Zudem wird für die ipsi- und kontraläsionale Seite jeweils die dünnste Stelle des *Stratum granulosum* bestimmt. Hierbei ist darauf zu achten, dass nicht das dünn auslaufende laterale Ende der Zellschicht gewählt wird, sondern die Stelle mit dem größten Strukturverlust. Aus den pro Hemisphäre (kontra- vs. ipsiläsional) erhobenen vier Werten (innen, mittig, außen, dünnste Stelle) wird der Mittelwert gebildet. Die Daten der zwei verschiedenen Schnittebenen pro Tier (Ebenen 11-13) werden nochmals arithmetisch gemittelt und dann zur statistischen Analyse verwendet. Folgende Abbildung zeigt einen mit Kresylviolett gefärbten Schnitt der Ebene 11 eines Polytrauma-operierten Tieres, wobei die genauen Lokalisationen der zu messenden Stellen anhand von Pfeilen veranschaulicht sind.



**Abbildung 11:** *Dickemessung der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus.* Zu sehen ist ein mit Kresylviolett gefärbter Schnitt der Ebene 11 (Bregma – 1,86 mm) eines Polytrauma-Tieres. Die schwarzen Pfeile deuten auf die zu messenden Stellen (innen, mittig und außen) der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus, die jeweils an vergleichbaren Stellen (ipsi- vs. kontraläsional) liegen sollen. Der rote Pfeil zeigt jeweils auf die Stelle mit dem größten Strukturverlust, deren Dicke ebenfalls bestimmt werden soll.

#### 4.6.5 Immunhistochemische Färbung

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz werden Proteine oder andere Strukturen durch Antikörper, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert sind, sichtbar gemacht.

In dem hier angewandten Protokoll bindet zunächst ein so genannter primärer Antikörper spezifisch an das Zielprotein. Der sekundäre Antikörper ist fluoreszenzmarkiert und bindet den primären Antikörper spezies-spezifisch, wodurch die Zielstruktur nach Anregung durch die entsprechende Wellenlänge indirekt sichtbar wird. In dieser Studie werden die Proteine Iba1 und GFAP immunhistochemisch gefärbt. GFAP wird als Marker für Astrozyten (92) und Iba1 als Marker für Mikrogliazellen (75) verwendet, wobei eine durch Inflammation bedingte Aktivierung der Zellen zu einer gesteigerten Expression der jeweiligen Proteine führt.

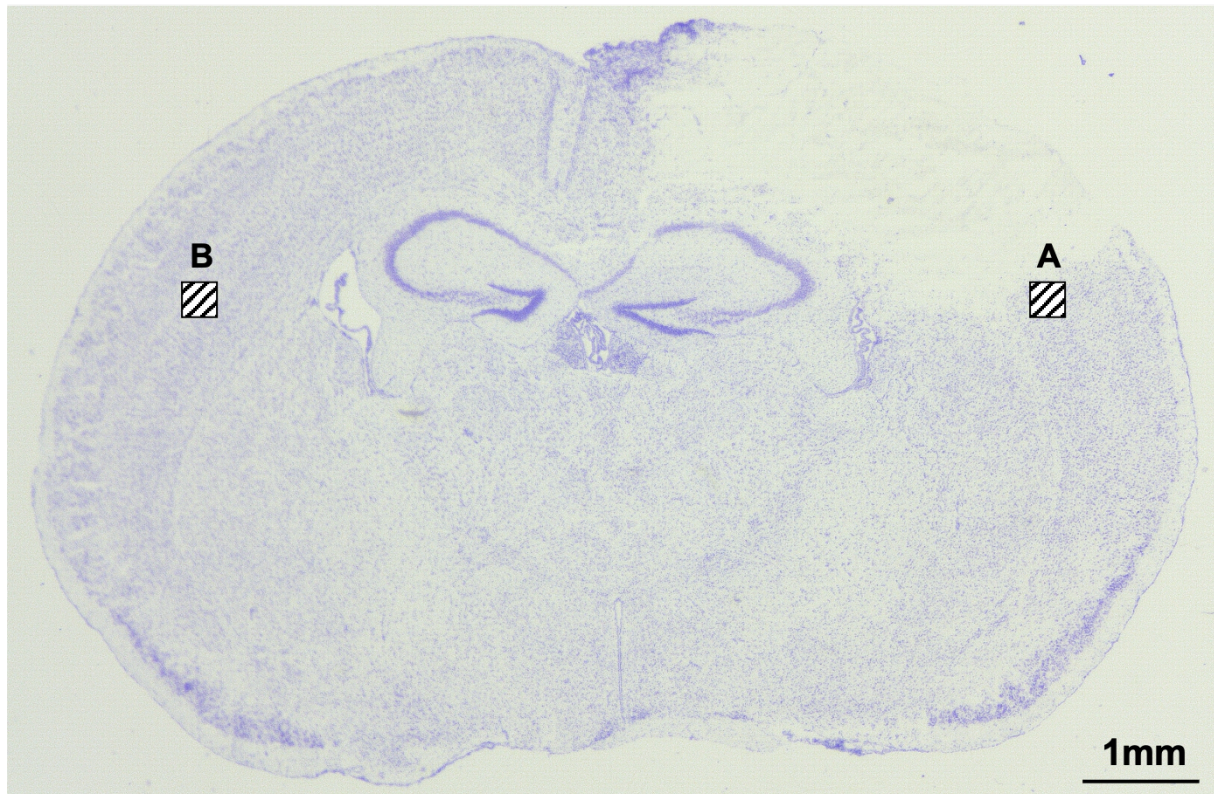
Immunhistochemisch gefärbt werden die Schnitte der Ebenen 11-13 (Bregma – 1,86 mm (11), - 2,36 mm (12), -2,86 mm (13)). Die entsprechenden Objektträger werden 30 min an der Luft getrocknet bevor sie für 10 min in 4%igem Paraformaldehyd (PFA) fixiert werden. Anschließend werden die Schnitte dreimal für 3 min in PBS gewaschen bevor sie für 30 min in einer Blockierlösung (5 % NGS, 1 % BSA in PBST) in einer



Feuchtkammer inkubiert werden, was eine unspezifische Proteinbindung verhindert. Hiernach werden die primären Antikörper, die in Blockierlösung entsprechend konzentriert sind (rabbit anti Iba1 (1:1000) + rat anti GFAP (1:1000)), hinzugegeben und bei 4 °C in einer Feuchtkammer über Nacht inkubiert. Am Folgetag werden die Schnitte zunächst dreimal für 10 min in PBS gewaschen. Anschließend werden die sekundären Antikörper, die in Blockierlösung entsprechend konzentriert sind (goat anti rabbit Alexa 488 (1:500), goat anti rat Alexa 568), hinzugegeben und für 2 Stunden (h) im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die nachfolgenden Schritte finden weiterhin im Dunkeln statt um eine Irritation des Fluoreszenzfarbstoffes zu vermeiden. Nach der zweistündigen Inkubation folgt ein dreimaliges Waschen in PBS bevor die Schnitte für 5 min in einer 4',6-Diamidin-2-phenylindol- (DAPI-) Lösung (1:10000 in PBS) inkubieren. Hiernach folgt noch ein einmaliges fünfminütiges Waschen in PBST bevor die Schnitte mit Immunomount eingedeckelt werden und über Nacht im Dunkeln bei 4 °C trocknen. Am nächsten Tag werden die gefärbten Schnitte mit Nagellack versiegelt. Die Lagerung erfolgt bei 4 °C im Dunkeln.

#### **4.6.6 Quantifizierung der immunhistochemischen Färbung**

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung erfolgt unter einem konfokalen Mikroskop bei 20-facher Vergrößerung und den Wellenlängen von 488 Nanometer (nm) und 568 nm. Die zwei zu analysierenden Regionen liegen hierbei in der rechten Hemisphäre periläsional und in der, zu diesem Bereich an der Mittellinie gespiegelte Region, in der kontraläsionalen linken Hemisphäre (s. Abbildung 12). In den Sham-Gruppen, die keinen Schaden aufweisen, wird ein analoger Bereich zu den CCI-Tieren eruiert und analysiert. Von den zu analysierenden Regionen werden Bilder angefertigt, die mit der computergestützten Software ImageJ ausgewertet werden. Mit Hilfe der Software werden die immunhistochemisch durch ihre Marker-Proteine angefärbten, immunreaktiven Zellen (Astrozyten – GFAP und Mikroglia – Iba1) quantifiziert, bzw. die GFAP-positiven und Iba1-positiven Partikel gezählt. Sowohl für die GFAP- als auch für die Iba1-Färbung wird die Größe der zu analysierenden Partikel zwischen 50 µm - 2000 µm gesetzt. Die Fläche, die zur Zählung der Partikel verwendet wird, ist für jedes Bild gleich groß (300,60 µm x 300,6 µm). Für die Analyse der ipsi- und kontraläsionalen Seite eines Schnittes, soll der gleiche Treshold gewählt werden. Pro Tier werden hierbei jeweils die Ebenen 11 (Bregma – 1,86 mm) und 12 (Bregma – 2,36 mm) untersucht und aus den jeweiligen Werten einer Hemisphäre die Mittelwerte gebildet.



**Abbildung 12:** Darstellung der immunhistochemisch untersuchten Bereiche. Zu sehen ist ein mit Kresylviolett gefärbter Frontalschnitt eines CCI-Gehirns der Ebene 11 (Bregma – 1,86 mm). Die schwarz schraffierten Kästchen zeigen den Bereich, der im Rahmen der immunhistochemischen Analyse untersucht werden soll (300,60 µm x 300,6 µm). A zeigt den periläsionalen Bereich in der rechten Hemisphäre, B zeigt den zu A an der Mittellinie gespiegelten Bereich in der kontraläsionalen linken Hemisphäre.

## 4.7 Biochemische und molekularbiologische Analyse

### 4.7.1 Bestimmung der OPN-Konzentration im Blutplasma mittels ELISA

Zur Bestimmung der OPN-Konzentration mittels *enzym-linked immunosorbent assay* (ELISA) wird das in 4.5.6 gewonnene Blutplasma verwendet.

Die ELISA-Technik ist ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren mit dessen Hilfe unter anderem (u.a.) Proteine spezifisch nachgewiesen und quantifiziert werden können. In dieser Studie wird das Mouse/Rat Osteopontin (OPN) Quantikine® ELISA Kit verwendet, welches die Sandwich-ELISA-Technik aufgreift. Hierbei wird zunächst ein erster polyklonaler Antikörper (auch *capture antibody*), der Osteopontin bindet, an eine Mikrotiterplatte gebunden. In die *wells* der Mikrotiterplatte werden dann die Serumproben sowie Standard- und Kontrollproben gegeben und für 2 h inkubiert, um die Bindung von OPN an den *capture antibody* zu ermöglichen. Zur Entfernung ungebundener Substanzen wird die Platte nach der Inkubation zunächst gewaschen. Anschließend wird ein zweiter, enzymgebundener polyklonaler Antikörper, der ebenfalls OPN bindet in die *wells* gegeben. Auch hier werden nach zweistündiger Inkubation

ungebundene Antikörper-Substrat-Komplexe durch Waschen entfernt, bevor eine Substrat-Lösungen in die *wells* gegeben wird. Die Enzymreaktion ergibt ein blaues Produkt, das nach Zugabe der Stopp-Lösung in ein gelbes Produkt umschlägt. Die bei 450 nm photometrisch bestimmte Farbintensität der Probe (korrigiert durch Subtraktion des bei 570 nm bestimmten Wertes) ist proportional zur Menge an Osteopontin, welche initial den *capture antibody* gebunden hat. Die genaue Konzentration lässt sich dann mit einer Standardkurve bestimmen, die anhand der Farbintensitäten der Standardproben erstellt wird.

Bevor die in 4.5.6 gewonnenen Plasma-Proben für dieses Assay verwendet werden können, müssen diese zunächst 200-fach verdünnt werden. Hierzu werden 10 µl der Probe mit 90 µl Calibrator Diluent RD6-12-Lösung versetzt, bevor 20 µl der verdünnten Probe mit weiteren 180 µl der Calibrator Diluent RD6-12-Lösung gemischt werden.

Das weitere Vorgehen ist dem Mouse/Rat Osteopontin (OPN) Quantikine® ELISA Kit zu entnehmen.

## **4.7.2 RNA-Analyse**

### **4.7.2.1 RNA-Extraktion und photometrische Konzentrationsbestimmung**

Zur molekularbiologischen Analyse des aus den Trimmschnitten gewonnenen Gewebes der ipsiläsionalen Hemisphäre (Gewinnung s. 4.6.1), muss zunächst die RNA aus diesem Gewebe extrahiert werden. Hierzu wird das RNeasy Mini Kit und das QIAzol Lyse-Reagenz von Qiagen verwendet.

Zunächst wird zu den jeweiligen Geweben eine Metallkugel und 0,9 ml Qiazol-Lyse-Reagenz, welches das Gewebe lysiert und zusätzlich RNasen inhibiert, gegeben. Hiernach wird das Gewebe im Mastermill zweimal 1 min lang bei 20 Hertz (Hz) zerkleinert und anschließend für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation werden 100 µl genomische DNA (gDNA) Eliminator und 180 µl Chloroform hinzugegeben, bevor das Gemisch weitere 3 min inkubiert und anschließend für 15 min bei 4 °C und 12000 x g zentrifugiert wird. Hiernach wird die obere, farblos-wässrige Phase, welche die RNA beinhaltet, vorsichtig aufgenommen und in 600 µl 70%igem Ethanol resuspendiert. Das Gemisch wird auf eine Mini-Spin-Säule mit einer RNA-selektiven Silikatmembran pipettiert und für 15 s bei Raumtemperatur und 8000 x g abzentrifugiert, wobei der Durchlauf verworfen wird. Es folgen Waschschrte mit zunächst 700 µl RWT Buffer bei 8000 x g und anschließend mit 500 µl RPE Buffer bei 8000 x g, wobei auch



hier der Durchlauf jeweils verworfen wird. Zum Trocknen werden nochmals 500 µl RPE Buffer einpipettiert und bei 8000 x g für 2 min zentrifugiert, bevor die Säule ohne erneute Zugabe von Flüssigkeit für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert wird. Zum Eluieren werden 30-50 µl RNase-freies Wasser genau auf die Membran pipettiert und 1 min bei 8000 x g zentrifugiert. Die extrahierte RNA befindet sich im Durchlauf und wird bei -80°C gelagert.

In einem nächsten Schritt wird die Konzentration (c) der jeweils eluierten RNA mittels eines Photometers bestimmt. Hierzu werden 1 µl des Eluats eingesetzt und die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm (Absorptionsmaximum von Nucleinsäuren) und 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) bestimmt. Der Reinheitsgrad ergibt sich aus  $\frac{OD(260)}{OD(280)}$  und sollte zwischen 1,8 und 2,1 liegen. Eine  $OD_{(260)} = 1,0$  entspricht einer Konzentration von 40 µg/ml. Entsprechend kann anhand folgender Formel die RNA-Konzentration berechnet werden.

$$c = OD(260) * 40\mu\text{g/ml} * \text{Verdünnungsfaktor}$$

#### 4.7.2.2 Synthese der komplementären DNA

Damit die extrahierte RNA im Rahmen einer PCR analysiert werden kann, muss diese zunächst in komplementäre DNA (engl. *complementary* DNA, cDNA) umgeschrieben werden. Hierzu wird ein Enzym, die so genannte Reverse Transkriptase (auch: RNA-abhängige DNA-Polymerase) verwendet, welche mit Hilfe der RNA als Matrize einen exakt komplementären DNA-Strang synthetisiert.

Zur cDNA-Synthese wird das QuantiTect reverse Transcription Kit von Qiagen verwendet. Zunächst wird das Volumen, welches 1 µg extrahierte RNA enthält mit 2 µl gDNA Wipeout Buffer versetzt und auf ein Gesamtvolumen von 14 µl mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt. Zur Eliminierung von genomischer DNA wird der Ansatz bei 42 °C für 8 min inkubiert. Im nächsten Schritt synthetisiert die reverse Transkriptase den zur RNA komplementären DNA-Strang. Hierzu wird ein Mastermix mit einem Gesamtvolumen von 20 µl bestehend aus: 1 µl Quantiscript RTanskriptase, 4 µl Quantiscript RT-Buffer, 1 µl RT-Primermix und 14 µl gDNA-freie RNA angesetzt. Der Ansatz wird bei 42 °C für 30 min inkubiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Zur Inaktivierung der reversen Transkriptase folgt eine dreiminütige Inkubation bei 95 °C. Die cDNA wird abschließend 1:1 mit Wasser verdünnt und bei -80 °C gelagert.

#### **4.7.2.3 quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion**

Mithilfe der qPCR werden die zuvor in cDNA umgeschriebenen Transkripte quantifiziert, was eine über Primer definierte, spezifische Genexpressionsanalyse der ipsilateralen Hemisphäre ermöglicht.

Die qPCR basiert auf dem Prinzip der Polymerasekettenreaktion, welche der Vervielfältigung (Amplifizierung) von DNA mit Hilfe des Enzyms DNA-Polymerase dient. Die Reaktionen laufen jeweils in Zyklen ab, wobei die Produkte des vorherigen Zyklus als Edukte des nächsten Zyklus dienen, wodurch die Amplifikations-Rate exponentiell zunimmt. Es werden zwischen 20-50 Zyklen in einem Thermocycler absolviert, wobei ein Zyklus grundsätzlich aus drei Reaktionen besteht. Während der ersten Reaktion, der Denaturierung, werden bei 94-96°C die Wasserstoffbrücken zwischen den DNA-Strängen aufgebrochen, sodass die jeweiligen Einzelstränge resultieren. Anschließend, in der Phase der Hybridisierung, binden die Primer, welche die zu amplifizierenden Targets umrahmen, jeweils komplementär an die Einzelstrang-DNA. Die Annealing-Temperatur richtet sich hierbei individuell nach Primer-Größe und Basenzusammensetzung der Primer. Damit das Target „umrahmt“ werden kann, gibt es entsprechend einen Forward-Primer, welcher den Sense-Strang bindet, und einen Reverse-Primer, welcher den Anti-Sense-Strang bindet. In der dritten Phase, der Elongationsphase synthetisiert die DNA-Polymerase ausgehend vom 3'-Ende des jeweiligen Primers einen neuen DNA-Strang. Hierzu verwendet das Enzym die dem Reaktionsgemisch zugesetzten Desoxy-Nukleotide. Die Temperatur richtet sich nach dem Arbeitsoptimum der verwendeten DNA-Polymerase. Hierauf schließt sich eine erneute Denaturierungsphase und somit ein neuer Zyklus an.

Zur Quantifizierung der DNA erfasst die qPCR am Ende der Elongation jedes Zyklus in Echtzeit Fluoreszenzemissionen. Zur Fluoreszenzmarkierung der DNA wird in dieser Studie der Farbstoff SYBR-Green, welcher in die DNA interkaliert, verwendet. Entsprechend korreliert die Konzentrationszunahme der markierten zu amplifizierenden DNA mit der Zunahme der Fluoreszenz.

Zur genauen Konzentrationsbestimmung trägt man die Intensität der Fluoreszenz gegen die PCR-Zyklen auf, wobei sich drei typische Phasen abzeichnen. Auf die erste, durch eine langsame Zunahme der Fluoreszenz gekennzeichnete Phase, schließt sich die Phase des exponentiellen Wachstums an. Das exponentielle Wachstum erklärt sich durch das in dieser Phase bestehende optimale Verhältnis zwischen DNA, Primern und Polymerase. In der anschließenden dritten Phase stagniert das Wachstum,

da sich die Produkte gegenseitig hemmen und die Enzyme sich zunehmend erschöpfen.

Während der Phase des exponentiellen Wachstums wird mit Hilfe der Software LightCycler® der so genannte Umschlagspunkt (engl. *crossingpoint*, CP) bestimmt, der den Zyklus beschreibt, in dem die Fluoreszenzintensität erstmals signifikant die Hintergrund-Fluoreszenz überschreitet. Durch den Vergleich des Umschlagspunktes mit einer Standardkurve, kann die absolute DNA-Konzentration bestimmt werden.

Die Proben der verschiedenen Targets werden im Doppelansatz bestimmt und arithmetisch gemittelt. Zusätzlich zu den definierten Targets wird die Expression des Housekeeping-Gens Peptidylprolyl Isomerase A (PPIA) analysiert. Das Gen zeichnet sich durch eine kontinuierliche Expression aus, die auch nach CCI unbeeinflusst bleibt. Die Ergebnisse der verschiedenen Targets werden entsprechend auf die PPIA-Expression normalisiert.

In diesem Experiment werden alle Targets (GFAP, SerpA3n, TSPO, OPN/SPP1, GRN, TNF- $\alpha$ ) mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR-Green bestimmt. Die Proben werden nach dem unten aufgeführten Schema auf eine 96-Well-Platte pipettiert, zentrifugiert und gemessen. Als Negativkontrolle wird Wasser verwendet.

<b>SYBR-Green Pipettierschema</b>
5 $\mu$ l SYBR-Green
0,25 $\mu$ l Primer Forward (Target-spezifisch)
0,25 $\mu$ l Primer Reverse (Target-spezifisch)
3,5 $\mu$ l H <sub>2</sub> O
1 $\mu$ l Proben-DNA

**Tabelle 16:** Pipettierschema SYBR-Green.

### 4.7.3 Proteinanalyse

#### 4.7.3.1 Proteinextraktion und Konzentrationsbestimmung

Zur proteinbezogenen Analyse des Gewebes der ipsiläsionalen Hemisphäre (Gewinnung s. 4.6.1) mittels Western-Blot müssen die Proteine zunächst extrahiert werden. Hierzu wird das Gewebe in einem Verhältnis von 10  $\mu$ l/ $\mu$ g mit RIPA-Puffer, welcher intakte Zellen lysiert und Proteine denaturiert, versetzt. Der Ansatz wird 30 min auf Eis inkubiert, wobei die Proben alle 10 min durch das Streichen über einen Eppi-Ständer

mechanisch beansprucht und durchmischt werden. Hiernach werden die Proben für 20 min bei 14000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand, der die gelösten Proteine enthält, wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung erfolgt bei -80°C. In einem nächsten Schritt wird die Proteinkonzentration jeder einzelnen Probe mit dem Lowry DC Protein Assay bestimmt. Zuerst werden acht Standard-Proben im Doppelansatz mit aufsteigender, definierter Proteinkonzentration (0, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0 µg/µl) auf eine 96-Well-Platte aufgetragen. Die Proben, die die gelösten Proteine enthalten, werden zunächst 1:10 verdünnt, bevor, ebenfalls im Doppelansatz, je 5 µl auf die 96-Well-Platte pipettiert werden. Die Proben, sowie die Standard-Proben werden mit 25 µl eines Reaktions-Gemisches, bestehend aus 50 Teilen Reagent A und 1 Teil Reagent S, sowie 200 µl Reagent B versetzt. Der Ansatz wird für 12 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Hierbei entsteht ein Farbstoff, dessen Extinktion<sub>750nm</sub> proportional zu der Proteinkonzentration der jeweiligen Probe bzw. Standard-Probe ist. Die Extinktion der jeweiligen Proben und Standard-Proben wird mithilfe des Glomax-Detektionssystem bei 750 nm photometrisch bestimmt und die Mittelwerte aus den jeweiligen Doppelansätzen errechnet. Anhand der Standardreihe kann, auf Grund der bekannten Proteinkonzentrationen, eine Standardkurve erstellt werden. Unter Zuhilfenahme dieser Kurve und unter Berücksichtigung der initialen Verdünnung, kann nun anhand der gemittelten Extinktionswerte der Proben die jeweilige Proteinkonzentration bestimmt werden.

#### **4.7.3.2 Elektrophorese**

Um einen Western-Blot durchzuführen, müssen die zu analysierenden Proteine zunächst mittels Gelelektrophorese bzw. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) der Größe nach aufgetrennt werden.

Am Vortag der Elektrophorese werden die Gele nach dem Prinzip der radikalischen Polymerisation zwischen zwei abgedichteten Glasplatten hergestellt. Zunächst wird das untere Gel, das Trenngel gegossen und mit einer dünnen Schicht Isopropanol übergossen, was einen Schutz vor dem Radikalfänger Sauerstoff darstellt und gleichzeitig die Oberfläche glättet. Nachdem das Trenngel auspolymerisiert ist (ca. 30 min), wird zunächst das Isopropanol abgegossen und anschließend das Sammelgel auf dem Trenngel gegossen. In das noch flüssige Sammelgel wird ein Kamm eingesteckt, wodurch die Taschen zum Befüllen des Gels entstehen. Das Sammelgel härtet ebenfalls für 30 min aus. Die jeweilige Gellösung besteht aus dem Gelbildner Akrylamid (~7

% im Sammelgel, ~10 % im Trenngel), dem Radikalstarter APS, dem Katalysator TEMED sowie Trenn- bzw. Sammelgelpuffer und Wasser. Die genaue Zusammensetzung eines 10%igen Polyacrylamid-Gels sowie eines Sammelgels ist unten aufgeführt (Tabelle 17).

	<b>Sammelgel</b>	<b>Trenngel 10 %</b>
<b>Acrylamid</b>	1,25 ml	3,25 ml
<b>APS</b>	75 µl	150 µl
<b>TEMED</b>	5 µl	5 µl
<b>Sammelgel- / Trenngelpuffer</b>	1,25 ml	2,5 ml
<b>Wasser</b>	2,5 ml	4 ml

*Tabelle 17: Zusammensetzung Trenngel und Sammelgel (je zwei Gele)*

Zum Beladen der Gele, werden diese zunächst in eine Elektrophoresekammer eingespannt, die mit Elektrophoresepuffer aufgefüllt ist. Zur Probenvorbereitung werden anschließend 25 µg Protein (Konzentrationsbestimmung nach Lowry DC Protein Assay, s. 4.7.3.1) mit dem SDS-Ladepuffer in einem Verhältnis von 1:5 versetzt, bevor die Proben für 5 min bei 95°C inkubieren, was zum Aufbrechen von Sekundär- und Tertiärstruktur führt. Der SDS-Ladepuffer enthält β-Mercaptoethanol, welches zusätzlich Disulfidbrücken durch Reduktion spaltet. Das ebenfalls in dem SDS-Ladepuffer enthaltene SDS (Natriumdodecylsulfat) hat die Aufgabe als anionisches Tensid die Eigenladungen der Proteine zu überdecken, wodurch diese vernachlässigt werden können. 1,4 g SDS binden hierbei ca. 1 g Protein, wodurch ein konstantes Masse-/Ladungsverhältnis entsteht und die Proteine somit im elektrischen Feld größenabhängig und unabhängig der Eigenladung aufgetrennt werden können. Die durch das SDS bedingte negative Ladung führt zu einem gegenseitigen Abstoßen der Proteine, was zusammen mit der zuvor beschriebenen Denaturierung durch Erhitzen und dem Spalten der Disulfidbrücken durch β-Mercaptoethanol zu einer Linearisierung der Moleküle führt.

Die denaturierten Proben werden nun auf das vorbereitete Gel geladen, wobei in die erste Tasche der Marker Chameleon™ und in die letzte Tasche der Prestained-Marker pipettiert wird. Nach Anlegen einer elektrischen Spannung migrieren die Proteine aufgrund ihrer negativen Ladung Richtung Anode, wobei das Polyacrylamid-Gel eine Art

Sieb darstellt und die größeren Proteine langsamer als kleinere Proteine durch das Gel wandern. Zur vollständigen Auftrennung der Proteine laufen die Gele für ca. 70 min bei 0,03 Ampere (A).

#### **4.7.3.3 Western-Blot, Detektion und Auswertung**

Beim Western-Blot werden die Proteine mittels eines senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichteten elektrischen Feldes auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und anschließend durch fluoreszenzmarkierte Antikörper detektiert.

Nach der Elektrophorese (s. 4.7.3.2) wird zunächst das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel in Blotpuffer überführt. Zum Transferieren der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran werden mehrere Lagen verschiedener Materialien, die in Blotpuffer äquilibriert sind, übereinander in einen Rahmen eingespannt. Zwischen den beiden Kompressionskassetten sind die Materialien wie folgt angeordnet: ein Schwamm, zwei Filterpapiere, das Gel mit den zu transferierenden Proteinen, die Nitrozellulose-Membran, zwei Filterpapiere und nochmals ein Schwamm. Das übereinander Anordnen der verschiedenen Materialien findet im Blotpufferbad statt, wobei jegliche Luftblasen zwischen den verschiedenen Schichten vermieden werden sollen. Das zusammengesetzte Konstrukt wird in eine Blotkammer überführt und diese mit Blotpuffer gefüllt. Zur Kühlung ist die Kammer während des Western-Blots in Eis eingebettet. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes senkrecht zum Acrylamid-Gel, migrieren die negativ geladenen Proteine Richtung Anode und damit Richtung Nitrozellulose-Membran. Der Transfer findet bei einer konstanten Stromstärke von 380 mA statt und dauert je nach Größe des zu transferierenden Proteins bis zu 2 h.

Zum Blocken wird die Nitrozellulose-Membran anschließend für 1 h bei Raumtemperatur in 2,5 % Magermilch TBS inkubiert. Hiernach wird die Membran über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper, welcher die Zielstruktur bindet, inkubiert. Die primären Antikörper sind in 2,5 % Magermilch TBS gelöst. Die jeweilige Konzentration der Antikörper ist in Tabelle 7 angegeben.

Am nächsten Tag wird die Membran zweimal für 5 min in 1 x TBST gewaschen. Hiernach wird die Nitrozellulose-Membran für 1 h mit dem sekundären Antikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Der sekundäre Antikörper richtet sich gegen die Spezies, die zur Gewinnung des primären Antikörpers verwendet wurde und ist an einen Fluoreszenzfarbstoff zur späteren Detektion gekoppelt. Die sekundären Antikörper sind in der Verdünnung 1:15000 in 2,5 % Magermilch TBST gelöst. Nach der

Inkubation mit dem sekundären Antikörper wird die Membran abschließend zweimal für 5 min in 1 x TBST gewaschen. Alle Wasch- und Inkubationsschritte finden auf dem Schüttler statt. Außerdem finden mit der Inkubation des fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpers dieser und alle folgenden Schritte im Dunkeln statt.

Die computergestützte Detektion der Fluoreszenzsignale wird mit dem Licor Odyssey Imaging System durchgeführt. Die zur Messung verwendeten Wellenlängen richten sich hierbei nach den Fluoreszenzfarbstoffen, mit denen die sekundären Antikörper assoziiert sind, wobei diese je nach Farbstoff bei 680 nm ein rotes und bei 800 nm ein grünes Signal zeigen (s. auch Tabelle 8).

Die quantitative Bestimmung des Fluoreszenzsignals erfolgt mit der Software Image Studio von Licor. Hierbei wird die Differenz aus dem Fluoreszenzsignal der zu messenden Protein-Bande und dem Fluoreszenzsignal des Hintergrundes bestimmt. Bei jeder Probe wird zusätzlich das Protein GAPDH bestimmt, welches trotz äußerer Einflüsse stabil exprimiert wird und somit als Kontrollprotein dient. Entsprechend wird das Fluoreszenzsignal des zu bestimmenden Proteins auf das Fluoreszenzsignal von GAPDH normalisiert, indem das Verhältnis von beiden bestimmt wird. Dieser relative Wert wird zur statistischen Auswertung verwendet.

#### **4.8 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der in dieser Arbeit erhobenen Daten erfolgt mit der Software GraphPad Prism Version 8.4.3, wobei das Signifikanzniveau  $\alpha$  auf 5 % festgelegt wird ( $\alpha = 0,05$ ). In den graphischen Abbildungen sind die  $p$ -Werte wie folgt definiert: \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$  und \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ . Wenn der  $p$ -Wert in folgendem Intervall liegt:  $0,05 \leq p < 0,1$ , spricht man von einem statistischen Trend.

Die Daten werden zunächst mittels ROUT-Test (Q=1%) auf Ausreißer untersucht. Etwaige Ausreißer werden, wenn nicht anders angegeben, ausgeschlossen, bevor die verbleibenden Werte mittels Shapiro-Wilk-Testung auf Normalverteilung geprüft werden. Normalverteilte Daten, die zum selben Zeitpunkt erhoben wurden, werden mittels einfaktorieller Varianzanalyse (engl. *one-way analysis of variance*, *one way ANOVA*) auf Signifikanz untersucht und anhand des Holm-Sidak-Tests für multiples Testen korrigiert. Nicht normalverteilte Daten, die zum selben Zeitpunkt erhoben wurden, werden mittels Kruskal-Wallis-Test auf Signifikanz untersucht und mithilfe des Dunn-Tests für multiples Testen korrigiert.

Normalverteilte Daten von lediglich zwei Gruppen, die zum gleichen Zeitpunkt erhoben wurden, werden mittels zweiseitigem t-test auf Signifikanz geprüft. Sind die Daten hierbei nicht normalverteilt, wird die Signifikanztestung mittels Mann-Whitney-Test durchgeführt.

Gewicht, Neuroscore, Beinbelastungsscore und *open field test* werden zu verschiedenen Zeitpunkten erhoben, weshalb hier eine Testung auf Signifikanz mittels zweifaktorieller ANOVA (engl. *two-way analysis of variance*, *two-way ANOVA*) durchgeführt wird, wobei auch hier mittels Holm-Sidak-Test für multiples Testen korrigiert wird.



## 5 Ergebnisse

Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (auf zwei Nachkommastellen gerundet) angegeben, wobei die Werte graphisch als Balken- oder X-Y-Punkt-Diagramm dargestellt sind.

Auch wenn in den statistischen Auswertungen grundsätzlich alle Gruppen miteinander verglichen wurden, sind zur besseren Übersicht nur signifikante Unterschiede von Gruppen, die sich in einem Merkmal unterscheiden, dargestellt (*sham veh vs. sham rOPN / sham veh vs. poly veh / sham rOPN vs. poly rOPN / poly veh. vs. poly rOPN*). In folgender Tabelle sind die wichtigsten Abkürzungen, die gerade in den graphischen Darstellungen verwendet wurden, nochmals aufgeführt.

<b>Abkürzung</b>	<b>Erklärung</b>
<i>sham veh</i>	Scheinoperierte Tiere mit ICV Applikation einer wirkstofflosen Trägerlösung
<i>sham rOPN</i>	Scheinoperierte Tiere mit ICV Applikation von rekombinantem Osteopontin
<i>poly veh</i>	CCI- / FF-operierte (Polytrauma-operierte) Tiere mit ICV Applikation einer wirkstofflosen Trägerlösung
<i>poly rOPN</i>	CCI- / FF-operierte (Polytrauma-operierte) Tiere mit ICV Applikation von rekombinantem Osteopontin
pre	Präoperativer Tag, ein Tag vor der Polytrauma- oder Sham-Operation
d1	1. postoperativer Tag
d3	3. postoperativer Tag
d5	5. postoperativer Tag
OP	Operation
<i>counts</i>	Anzahl GFAP-positiver oder Iba1-positiver Partikel

**Tabelle 18:** Zur graphischen Darstellung verwendete Abkürzungen

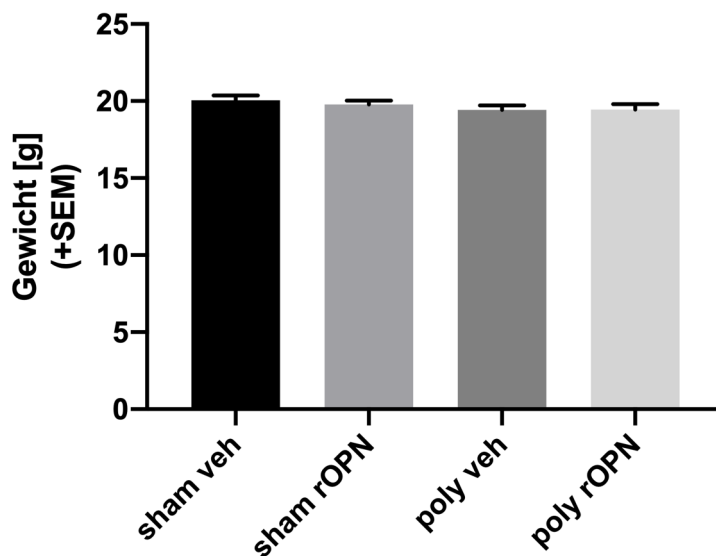
## 5.1 Allgemeine und verhaltenspathophysiologische Untersuchungen

Ziel dieser Versuchsreihe war es, die Auswirkungen der ICV Injektion von Osteopontin auf allgemeine und verhaltenspathophysiologische Parameter der Polytrauma- und scheinoperierten Versuchstiere zu erfassen. Hierzu wurden in einem Zeitintervall (pre – d5) um den Operationstag herum verschiedene Tests durchgeführt. Für die Auswertung der Daten zu Gewicht, Neuroscore, Beinbelastungsscore und *open field test* wurden keine Ausreißer exkludiert.

### 5.1.1 Gewicht

Das Körpergewicht der Versuchstiere, welches ein Indikator für das Wohlbefinden der Mäuse ist, wurde ab dem Tag vor der Polytrauma- oder Scheinoperation regelmäßig (pre, d1, d3, d5) zum gleichen Tageszeitpunkt bestimmt.

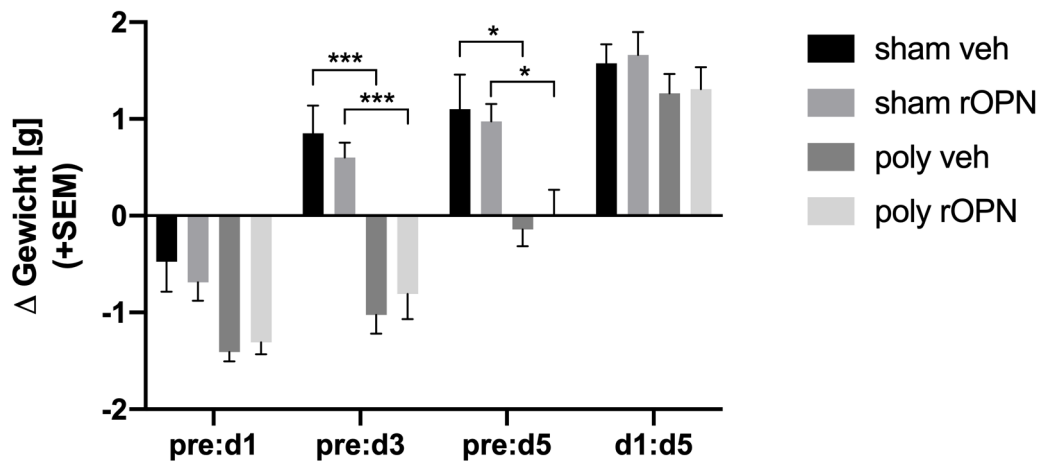
Folgender Graph beschreibt zunächst das Ausgangsgewicht der Versuchstiere, welches ein Tag vor dem Operationstag gemessen wurde.



**Abbildung 13:** Präoperatives Ausgangsgewicht der Versuchstiere. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. n=8 (sham), n=12 (poly), One-Way-ANOVA, Holm-Sidak Korrektur.

Die präoperativen Ausgangsgewichte der Tiere in der *sham veh*-Gruppe ( $20,05 \pm 0,32$  g), der *sham rOPN*-Gruppe ( $19,76 \pm 0,26$  g), der *poly veh*-Gruppe ( $19,42 \pm 0,30$  g) und der *poly rOPN*-Gruppe ( $19,44 \pm 0,36$  g) unterscheidet sich nicht signifikant voneinander.

Folgender Graph beschreibt die Gewichtsentwicklung der Versuchstiere im Zeitverlauf (pre – d5).

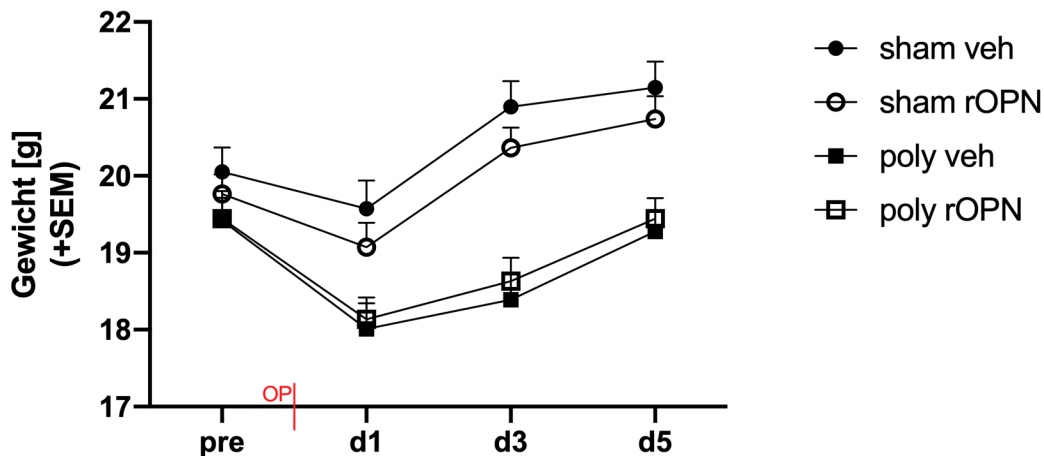


**Abbildung 14:** Gewichtsentwicklung im Zeitverlauf (pre - d5). Die Daten sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. n=8 (sham), n=12 (poly), Two-Way-ANOVA, Holm-Sidak Korrektur, \*\*\* p < 0,001, \* p < 0,05

Die Gewichtsentwicklung der Tiere wird hier gezeigt, indem die Differenz aus dem präoperativen Ausgangsgewicht und dem jeweiligen Gewicht am 1., 3. und 5. postoperativen Tag bestimmt wird. Auf gleiche Weise wird die Gewichtsentwicklung vom 1. bis zum 5. postoperativen Tag bestimmt. Am 1. postoperativen Tag zeigt sich, dass alle Gruppen nach den operativen Eingriffen zunächst an Gewicht verlieren, wobei sich die Gewichtsabnahmen der verschiedenen Gruppen nicht signifikant voneinander unterscheiden (*sham veh*: -0,47 ± 0,31 g, *sham rOPN*: -0,69 ± 0,19 g, *poly veh*: -1,41 ± 0,01 g, *poly rOPN*: -1,31 ± 0,12 g). Am 3. postoperativen Tag unterscheidet sich die Gewichtsentwicklung der *sham veh*- und *poly veh*-Gruppe (*sham veh*: 0,85 ± 0,29 g vs. *poly veh*: -1,02 ± 0,19 g,  $p=0,0006$ ) sowie die Gewichtsentwicklung der *sham rOPN*- und *poly rOPN*-Gruppe (*sham rOPN*: 0,6 ± 0,16 g vs. *poly rOPN*: -0,81 ± 0,26 g,  $p = 0,0009$ ) signifikant voneinander, insofern, dass die scheinoperierten Tiere gegenüber dem präoperativen Ausgangswert nun schwerer sind und die Polytraumaoperierten Tiere gegenüber dem präoperativen Ausgangswert weiterhin weniger wiegen. Dieser Unterschied zeigt sich auch noch am 5. postoperativen Tag signifikant (*sham veh*: 1,10 ± 0,36 g vs. *poly veh*: -0,14 ± 0,17 g,  $p = 0,0413$  / *sham rOPN*: 0,97 ± 0,18 g vs. *poly rOPN*: 0,00 ± 0,27 g,  $p = 0,0379$ ). Die Gewichtsentwicklung der Tiere vom 1.- bis zum 5. postoperativen Tag zeigt zwischen den Gruppen keinen signifikanten Unterschied. Hierbei zeigt sich aber, dass alle Gruppen vom 1.- bis zum 5.

postoperativen Tag an Gewicht gewinnen (*sham veh*:  $1,57 \pm 0,20$  g, *sham rOPN*:  $1,66 \pm 0,24$  g, *poly veh*:  $1,27 \pm 0,20$  g, *poly rOPN*:  $1,31 \pm 0,23$  g).

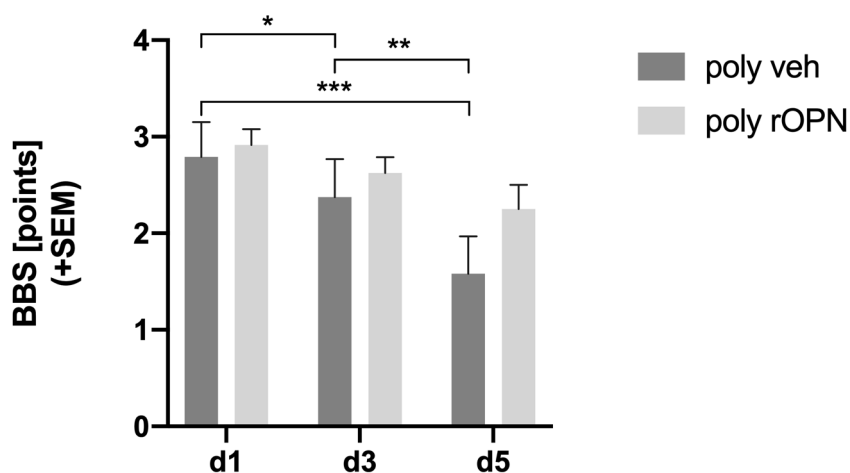
Zur Veranschaulichung zeigt folgender Graph den Gewichtsverlauf der absoluten Gewichte als X-Y-Punkt-Diagramm (pre: *sham veh*:  $20,05 \pm 0,32$  g, *sham rOPN*:  $19,76 \pm 0,26$  g, *poly veh*:  $19,42 \pm 0,30$  g, *poly rOPN*:  $19,44 \pm 0,36$  g; d1: *sham veh*:  $19,58 \pm 0,037$  g, *sham rOPN*:  $19,08 \pm 0,31$  g, *poly veh*:  $18,01 \pm 0,34$  g, *poly rOPN*:  $18,13 \pm 0,29$  g; d3: *sham veh*:  $20,90 \pm 0,33$  g, *sham rOPN*:  $20,36 \pm 0,27$  g, *poly veh*:  $18,39 \pm 0,33$  g, *poly rOPN*:  $18,63 \pm 0,30$  g; d5: *sham veh*:  $21,15 \pm 0,33$  g, *sham rOPN*:  $20,74 \pm 0,30$  g, *poly veh*:  $19,28 \pm 0,26$  g, *poly rOPN*:  $19,44 \pm 0,27$  g). Da dieser Graph lediglich der besseren Übersicht dient, wird auf das Darstellen von Signifikanzen verzichtet.



**Abbildung 15:** Absolutes Gewicht im Zeitverlauf. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. n=8 (sham), n=12 (poly), Two-Way-ANOVA, Holm-Sidak Korrektur.

### 5.1.2 Beinbelastungsscore

Anhand des BBS wurde die Belastbarkeit und Beweglichkeit der frakturierten Extremität, die den Versuchstieren im Rahmen der FF-Operation zugeführt wurde, objektiviert. Durch das mehrfache Testen nach den operativen Eingriffen (d1, d3, d5), ist eine postoperative Verlaufsbeurteilung möglich. Alle scheinoperierten Tiere erzielten am 1., 3. und 5. postoperativen Tag 0 Punkte im BBS. Die scheinoperierten Tiere wurden daher in der folgenden statistischen Analyse nicht berücksichtigt.

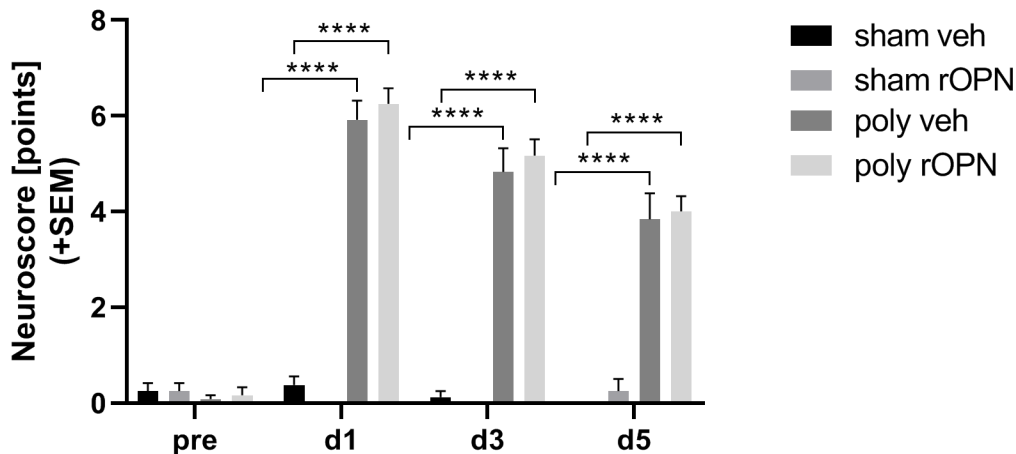


**Abbildung 16:** Beinbelastungsscores im Zeitverlauf. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt.  $n=12$  (poly), Two-Way-ANOVA, Holm-Sidak Korrektur, \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $< 0,01$ , \*  $p < 0,05$

Die von den Versuchstieren erzielten Ergebnisse im Beinbelastungsscore unterscheiden sich zwischen den Gruppen *poly veh* und *poly rOPN* an den postoperativen Tagen 1, (*poly veh*:  $2,79 \pm 0,36$  Punkte, *poly rOPN*:  $2,92 \pm 0,16$  Punkte) 3 (*poly veh*:  $2,37 \pm 0,39$  Punkte, *poly rOPN*:  $2,62 \pm 0,16$  Punkte) und 5 (*poly veh*:  $1,58 \pm 0,38$  Punkte, *poly rOPN*:  $2,25 \pm 0,25$  Punkte) nicht signifikant voneinander. Betrachtet man nur die *poly veh*-Gruppe, nimmt die von den Versuchstieren erzielte Punktzahl über die Zeit signifikant ab (*poly veh* d1:  $2,79 \pm 0,36$  Punkte vs. *poly veh* d3:  $2,37 \pm 0,39$  Punkte,  $p = 0,0251$  / *poly veh* d1:  $2,79 \pm 0,36$  Punkte vs. *poly veh* d5:  $1,58 \pm 0,38$  Punkte,  $p = 0,0005$  / *poly veh* d3:  $2,37 \pm 0,39$  Punkte vs. *poly veh* d5:  $1,58 \pm 0,38$  Punkte,  $p = 0,0020$ )

### 5.1.3 Neuroscore

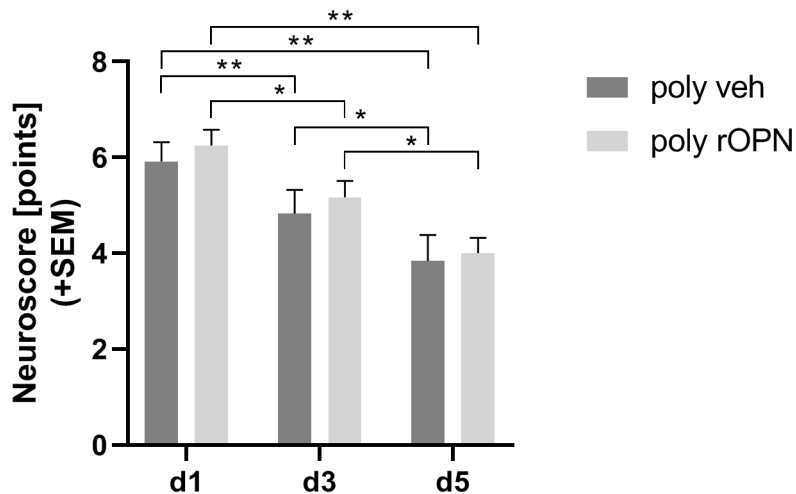
Der Neuroscore soll den neurologisch-funktionalen Status der Versuchstiere vor und nach der CCI-Operation erfassen. Um diesbezüglich auch Aussagen den Zeitverlauf betreffend tätigen zu können, wurde der Neuroscore zu mehreren Zeitpunkten (pre, d1, d3, d5) immer zur gleichen Tageszeit erhoben.



**Abbildung 17:** Neuroscore im Zeitverlauf (pre - d5). Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. n=8 (sham), n=12 (poly), Two-Way-ANOVA, Holm-Sidak Korrektur, \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

Ein Tag vor den operativen Eingriffen gibt es zwischen den Gruppen bzgl. der erzielten Punkte im Neuroscore keinen signifikanten Unterschied (*sham veh*:  $0,25 \pm 0,16$  Punkte, *sham rOPN*:  $0,25 \pm 0,16$  Punkte, *poly veh*:  $0,08 \pm 0,08$  Punkte, *poly rOPN*:  $0,17 \pm 0,17$  Punkte). An den postoperativen Tagen 1, 3 und 5 erzielen die scheinoperierten Tiere gegenüber den Polytrauma-operierten Tieren stets signifikant unterschiedliche Ergebnisse im Neuroscore, insofern, dass die Polytrauma-operierten Tiere höhere Punktzahlen erzielen. Hierbei wird die *sham veh*-Gruppe mit der *poly veh*-Gruppe und die *sham rOPN*-Gruppe mit der *poly rOPN*-Gruppe verglichen (d1: *sham veh*:  $0,37 \pm 0,18$  Punkte vs. *poly veh*:  $5,92 \pm 0,40$  Punkte,  $p < 0,0001$  / *sham rOPN*:  $0,00 \pm 0,00$  Punkte vs. *poly rOPN*:  $6,25 \pm 0,33$  Punkte,  $p < 0,0001$  ; d3: *sham veh*:  $0,13 \pm 0,13$  Punkte vs. *poly veh*:  $4,83 \pm 0,49$  Punkte,  $p < 0,0001$  / *sham rOPN*:  $0,00 \pm 0,00$  Punkte vs. *poly rOPN*:  $5,17 \pm 0,34$  Punkte,  $p < 0,0001$  ; d5: *sham veh*:  $0,00 \pm 0,00$  Punkte vs. *poly veh*:  $3,83 \pm 0,55$  Punkte,  $p < 0,0001$  / *sham rOPN*:  $0,25 \pm 0,25$  Punkte vs. *poly rOPN*:  $4,00 \pm 0,33$  Punkte,  $p < 0,0001$ ). Betrachtet man nur die Polytrauma-operierten Tiere (*poly veh* vs. *poly rOPN*) zeigt sich im Neuroscore an den postoperativen Tagen 1, 3 und 5 kein signifikanter Unterschied.

Zur übersichtlicheren Betrachtung des postoperativen Zeitverlaufs (d1-d5), werden im Folgenden lediglich die Neuroscore-Ergebnisse der Polytrauma-operierten Tiere statistisch analysiert und graphisch dargestellt.



**Abbildung 18:** Neuroscore der Polytrauma-operierten Tiere im Zeitverlauf (d1-d5). Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. n=12 (poly), Two-Way-ANOVA, Holm-Sidak Korrektur, \*\* p < 0.01, \* p < 0,05.

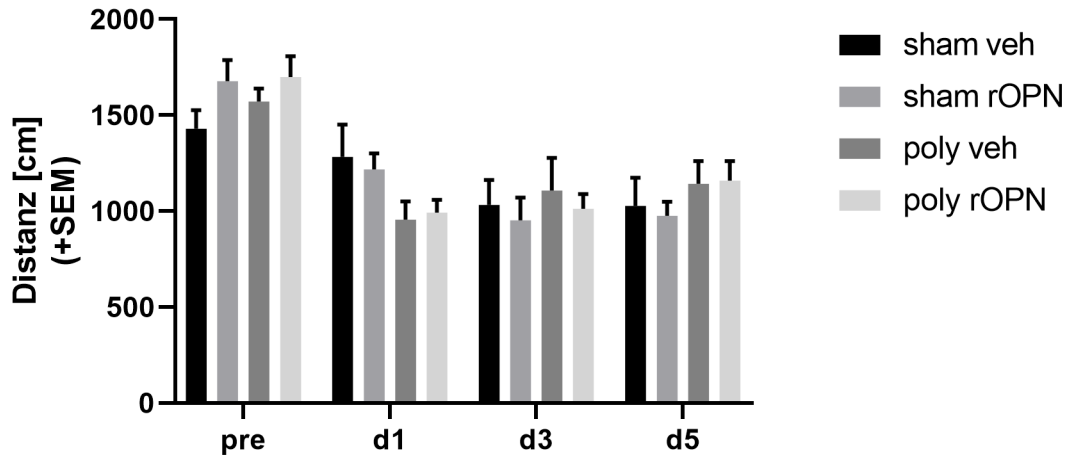
Betrachtet man die *poly veh*-Gruppe im postoperativen Verlauf (d1-d5) zeigt sich, dass die erzielten Punkte im Neuroscore über die Zeit signifikant abnehmen (*poly veh* d1: 5,92  $\pm$  0,40 Punkte vs. *poly veh* d3: 4,83  $\pm$  0,49 Punkte, p = 0,0062 / *poly veh* d1: 5,92  $\pm$  0,40 Punkte vs. *poly veh* d5: 3,83  $\pm$  0,55 Punkte p = 0,0047 / *poly veh* d3: 4,83  $\pm$  0,49 Punkte vs. *poly veh* d5: 3,83  $\pm$  0,55 Punkte p = 0,0388). In gleicher Weise nehmen die von der *poly rOPN*-Gruppe erzielten Punkte im Neuroscore im postoperativen Verlauf (d1-d5) signifikant ab (*poly rOPN* d1: 6,25  $\pm$  0,33 Punkte vs. *poly rOPN* d3: 5,17  $\pm$  0,34 Punkte, p = 0,0231 / *poly rOPN* d1: 6,25  $\pm$  0,33 Punkte vs. *poly rOPN* d5: 4,00  $\pm$  0,33 Punkte, p = 0,0031 / *poly rOPN* d3: 5,17  $\pm$  0,34 Punkte vs. *poly rOPN* d5: 4,00  $\pm$  0,33 Punkte, p = 0,0231).

#### 5.1.4 open field test

Anhand des *open field tests* werden verhaltensbiologische Parameter wie allgemeine Aktivität, Erkundungs- und Vermeidungsverhalten von Versuchstieren erfasst und quantifiziert. Um diese Parameter in einem zeitlichen Bezug zu den Polytrauma- oder Scheinoperationen beurteilen zu können, wurde der *open field test* an verschiedenen Tagen (pre, d1, d3, d5) immer zur gleichen Tageszeit durchgeführt.

### 5.1.4.1 Zurückgelegte Distanz

Hier wird die Distanz bestimmt, die die Maus während der dreiminütigen Versuchsdauer zurücklegt.

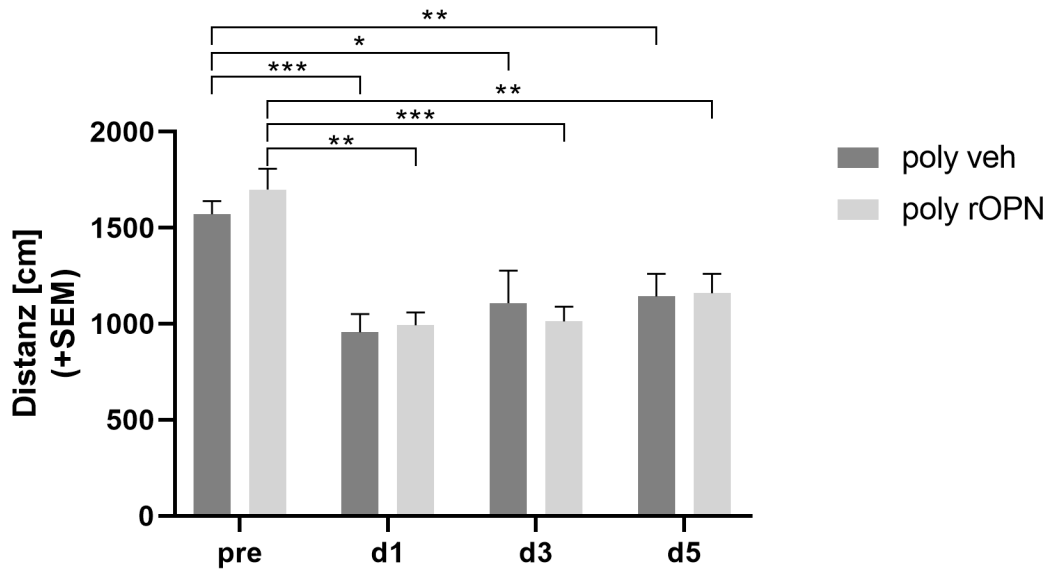


**Abbildung 19:** Zurückgelegte Distanz im Zeitverlauf (pre - d5). Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. n=8 (sham), n=12 (poly), Two-Way-ANOVA, Holm-Sidak Korrektur.

An allen Tagen (pre, d1, d3, d5), an denen die zurückgelegte Distanz der Versuchstiere im Rahmen des *open field tests* bestimmt wurde, gibt es zwischen den Gruppen (*sham veh*, *sham rOPN*, *poly veh*, *poly rOPN*) keine signifikanten Unterschiede (pre: *sham veh*: 1429  $\pm$  96,51 cm, *sham rOPN*: 1678  $\pm$  109,2 cm, *poly veh*: 1571  $\pm$  68,27 cm, *poly rOPN*: 1699  $\pm$  108,3 cm / d1: *sham veh*: 1283  $\pm$  168,3 cm, *sham rOPN*: 1217  $\pm$  83,79 cm, *poly veh*: 955,4  $\pm$  94,93 cm, *poly rOPN*: 992,2  $\pm$  67,09 cm / d3: *sham veh*: 1032  $\pm$  130,7 cm, *sham rOPN*: 952,6  $\pm$  118,3 cm, *poly veh*: 1107  $\pm$  171,0 cm, *poly rOPN*: 1012  $\pm$  77,26 cm / d5: *sham veh*: 1028  $\pm$  146,1 cm, *sham rOPN*: 976,4  $\pm$  72,48 cm, *poly veh*: 1142  $\pm$  119,5 cm, *poly rOPN*: 1160  $\pm$  100,1 cm ).



Zur besseren Veranschaulichung der signifikanten Unterschiede im Zeitverlauf sind in folgendem Graph nur die Polytrauma-operierten Tiere dargestellt.

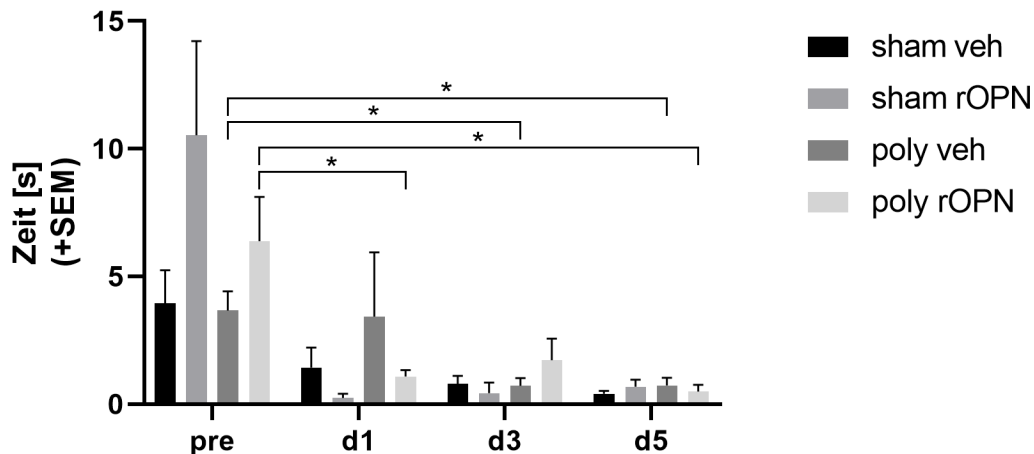


**Abbildung 20:** Zurückgelegte Distanz der Polytrauma-operierten Tiere im Zeitverlauf (pre - d5). Die Daten sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. n=12 (poly), Two-Way-ANOVA, Holm-Sidak Korrektur. \*\*\* p < 0.001, \*\* p < 0.01, \* p < 0,05

Betrachtet man die *poly veh*-Gruppe im Zeitverlauf (pre-d5) zeigt sich, dass die im *open field test* zurückgelegte Distanz ein Tag vor der Polytrauma-Operation signifikant größer ist als jeweils an den postoperativen Tagen 1, 3 und 5 (*poly veh* pre: 1571 ± 68,27 cm vs. *poly veh* d1: 955,4 ± 94,93 cm, p = 0,0005 / *poly veh* pre: 1571 ± 68,27 cm vs. *poly veh* d3: 1107 ± 171,0cm, p = 0,0375 / *poly veh* pre: 1571 ± 68,27 cm vs. *poly veh* d5: 1142 ± 119,5 cm, p = 0,0045). Gleiches lässt sich auch für die *poly rOPN*-Gruppe feststellen (*poly rOPN* pre: 1699 ± 108,3 cm vs. *poly rOPN* d1: 992,2 ± 67,09 cm, p = 0,0013 / *poly rOPN* pre: 1699 ± 108,3 cm vs. *poly rOPN* d3: 1012 ± 77,26 cm, p = 0,0006 / *poly rOPN* pre: 1699 ± 108,3 cm vs. *poly rOPN* d5: 1160 ± 100,1 cm, p = 0,0062).

### 5.1.4.2 exit from the circle

In diesem Experiment wurde die Zeit bestimmt, die das Versuchstier benötigt, um den zentral in der quadratischen Grundfläche gelegenen virtuellen Kreis (452,4 cm<sup>2</sup>), in den die Maus mittig gesetzt wurde, zu verlassen.



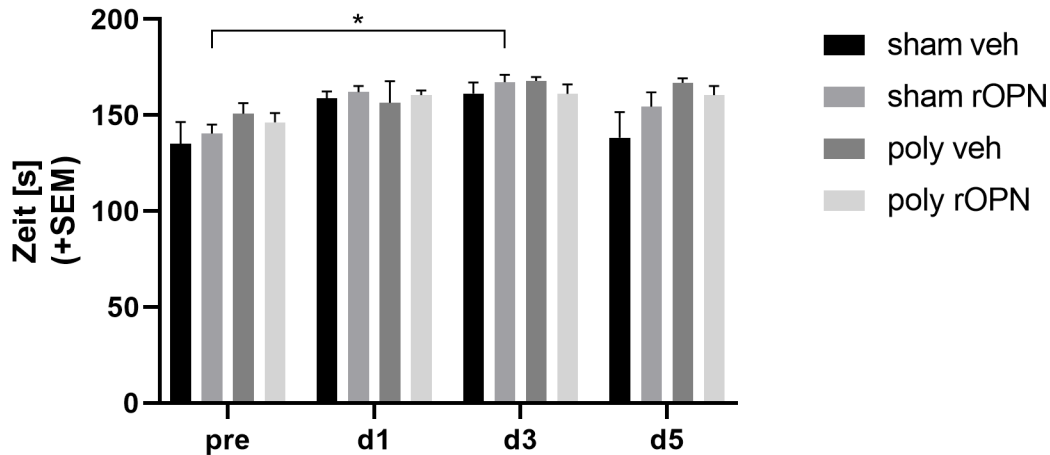
**Abbildung 21:** *exit from the circle* im Zeitverlauf (pre - d5). Die Daten sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. n=8 (sham), n=12 (poly), Two-Way-ANOVA, Holm-Sidak Korrektur. \* p < 0,05.

An allen Tagen (pre, d1, d3, d5), an denen die *exit from the circle*-Zeit im Rahmen des *open field tests* bestimmt wurde, gibt es zwischen den Gruppen (*sham veh*, *sham rOPN*, *poly veh*, *poly rOPN*) keine signifikanten Unterschiede (pre: *sham veh*: 3,95 ± 1,29 s, *sham rOPN*: 10,53 ± 3,70 s, *poly veh*: 3,66 ± 0,75 s, *poly rOPN*: 6,38 ± 1,74 s / d1: *sham veh*: 1,43 ± 0,79 s, *sham rOPN*: 0,25 ± 0,16 s, *poly veh*: 3,43 ± 2,51 s, *poly rOPN*: 1,08 ± 0,24 s / d3: *sham veh*: 0,80 ± 0,31 s, *sham rOPN*: 0,44 ± 0,41 s, *poly veh*: 0,72 ± 0,30 s, *poly rOPN*: 1,72 ± 0,84 s / d5: *sham veh*: 0,40 ± 0,11 s, *sham rOPN*: 0,68 ± 0,28 s, *poly veh*: 0,74 ± 0,30 s, *poly rOPN*: 0,50 ± 0,26 s).

Betrachtet man nur die *poly veh*-Gruppe im zeitlichen Verlauf, benötigt diese an den postoperativen Tagen 3 und 5 signifikant weniger Zeit den Kreis zu verlassen als am präoperativen Ausgangstag (*poly veh* pre: 3,66 ± 0,75 s vs. *poly veh* d3: 0,72 ± 0,30 s, p = 0,0474 / *poly veh* pre: 3,66 ± 0,75 s vs. *poly veh* d5: 0,74 ± 0,30 s, p = 0,0135). Betrachtet man nun nur die *poly rOPN*-Gruppe im zeitlichen Verlauf, benötigten diese Versuchstiere an den postoperativen Tagen 1 und 5 signifikant weniger Zeit den Kreis zu verlassen als am präoperativen Ausgangstag (*poly rOPN* pre: 6,38 ± 1,74 s vs. *poly rOPN* d1: 1,08 ± 0,24 s, p = 0,0480 / *poly rOPN* pre: 6,38 ± 1,74 s vs. *poly rOPN* d5: 0,50 ± 0,26 s, p = 0,0390).

### 5.1.4.3 border zone time

Hier wurde die Zeit bestimmt, die das Tier während der 3-minütigen Analysezeit in der so genannten *border zone* verbringt.



**Abbildung 22:** *border zone time* im Zeitverlauf (pre - d5). Die Daten sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. n=8 (sham), n=12 (poly), Two-Way-ANOVA, Holm-Sidak Korrektur. \*  $p < 0,05$ .

An allen Tagen (pre, d1, d3, d5), an denen die *border zone*-Zeit im Rahmen des *open field tests* bestimmt wurde, gibt es zwischen den Gruppen (*sham veh*, *sham rOPN*, *poly veh*, *poly rOPN*) keine signifikanten Unterschiede (pre: *sham veh*: 135,1 ± 11,35 s, *sham rOPN*: 140,4 ± 4,65 s, *poly veh*: 150,8 ± 5,42 s, *poly rOPN*: 146,3 ± 4,70 s / d1: *sham veh*: 158,8 ± 3,63 s, *sham rOPN*: 162,1 ± 3,13 s, *poly veh*: 156,4 ± 11,31 s, *poly rOPN*: 160,5 ± 2,35 s / d3: *sham veh*: 161,3 ± 5,83 s, *sham rOPN*: 167,3 ± 3,79 s, *poly veh*: 168,0 ± 1,99 s, *poly rOPN*: 161,1 ± 4,95 s / d5: *sham veh*: 138,2 ± 13,32 s, *sham rOPN*: 154,4 ± 7,51 s, *poly veh*: 166,9 ± 2,34 s, *poly rOPN*: 160,4 ± 4,82 s ). Betrachtet man die *sham rOPN*-Gruppe im zeitlichen Verlauf, halten sich die Tiere am 3. postoperativen Tag signifikant länger in der *border zone* auf als am Tag vor den operativen Eingriffen (*sham rOPN* pre: 140,4 ± 4,65 s vs. *sham rOPN* d3: 167,3 ± 3,79 s,  $p = 0,0497$ ).

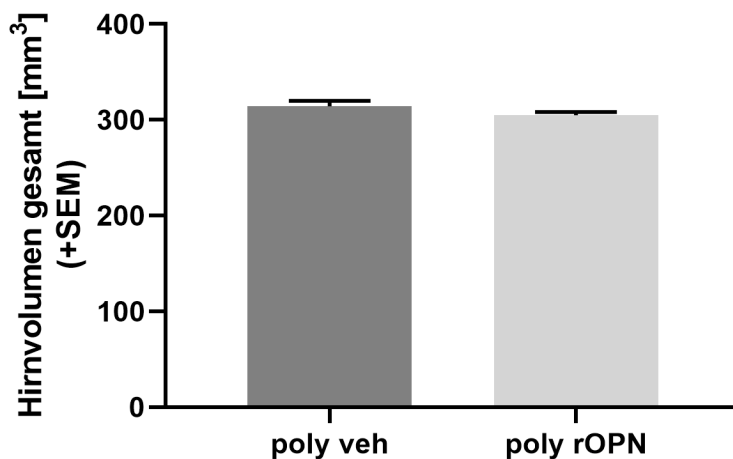
## 5.2 Histopathologische Analyse

Um in einer zweiten Versuchsreihe dieser Polytrauma-Studie die Auswirkungen der ICV Gabe von OPN auf histologischer Ebene zu erfassen, wurden von den Gehirnen, die nach Euthanasie der Versuchstiere am 5. postoperativen Tag entnommen wurden, histologische Schnitte angefertigt und diese weiter untersucht.

### 5.2.1 Analyse des Kontusionsvolumens

Zur Bestimmung der verschiedenen Hirnvolumina (linke Hemisphäre, rechte Hemisphäre, vitales Gewebe der rechten Hemisphäre und Kontusionsvolumen) wurden die histologischen Schnitte mit Kresylviolett gefärbt und anschließend vermessen.

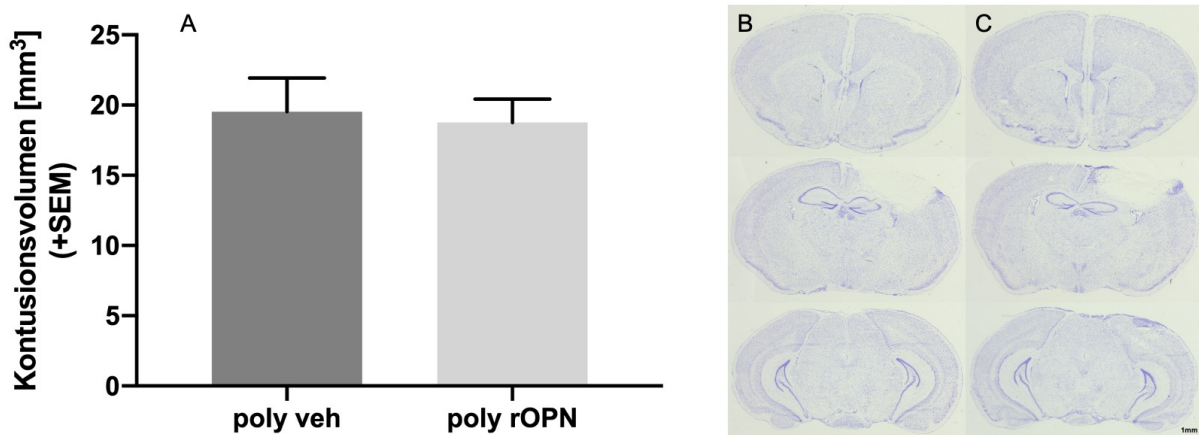
In folgendem Graph ist zunächst das gesamte Hirnvolumen (Volumen der linken Hemisphäre + Volumen der rechten Hemisphäre) der *poly veh*-Tiere dem gesamten Hirnvolumen der *poly rOPN*-Tiere gegenübergestellt.



**Abbildung 23:** *Hirnvolumen gesamt.* Die Daten sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. n=12 (poly), Unpaired t Test.

Die Hirnvolumina der *poly veh*-Gruppe ( $314,0 \pm 5,71 \text{ mm}^3$ ) und der *poly rOPN*-Gruppe ( $304,8 \pm 3,31 \text{ mm}^3$ ) unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

In dem folgenden Abschnitt wird das Kontusionsvolumen der Polytrauma-operierten Tiere (*poly veh*, *poly rOPN*), welches sich aus der Differenz des Volumens der rechten Hemisphäre und dem Volumen des vitalen Gewebes der rechten Hemisphäre berechnet, statistisch ausgewertet und graphisch dargestellt.



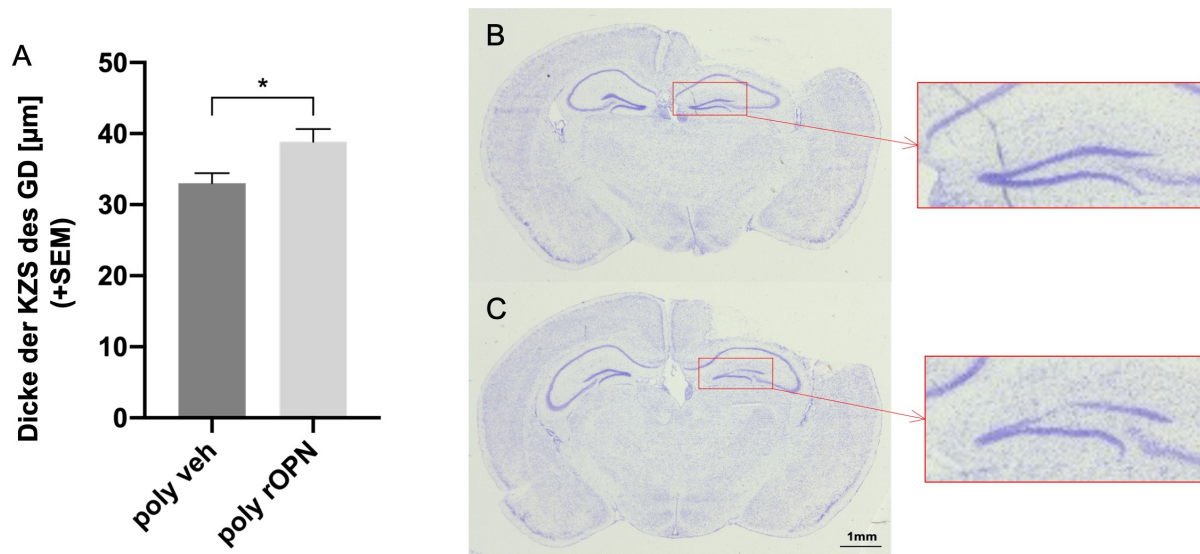
**Abbildung 24:** Graphische und histologische Darstellung des Kontusionsvolumens **A:** Graphische Darstellung des Kontusionsvolumens der Gruppen *poly veh* und *poly rOPN*. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt.  $n=12$  (poly), Mann-Whitney Test **B:** Dieser Teil der Abbildung zeigt drei mit Kresylviolett gefärbte Schnitte der Ebenen 5 (Bregma + 1,14 mm, Oben), 10 (Bregma - 1,36 mm, Mitte) und 15 (Bregma - 3,86 mm, Unten) eines *poly rOPN*-Tieres. Hierbei repräsentiert Ebene 5 die Ebene, in der die Ausbreitung Schadensvolumen nach rostral gerade beginnt, Ebene 10 repräsentiert die Ebene, in der das Kontusionsvolumen maximal ausgeprägt ist und Ebene 15 repräsentiert die Ebene, in der die Ausbreitung des Kontusionsvolumens kaudal gerade endet. **C:** Dieser Teil der Abbildung zeigt drei mit Kresylviolett gefärbte Schnitte der Ebenen 5 (Bregma + 1,14 mm, Oben), 10 (Bregma - 1,36 mm, Mitte) und 15 (Bregma - 3,86 mm, Unten) eines *poly veh*-Tieres. Hierbei repräsentiert Ebene 5 die Ebene, in der die Ausbreitung Schadensvolumen nach rostral gerade beginnt, Ebene 10 repräsentiert die Ebene, in der das Kontusionsvolumen maximal ausgeprägt ist und Ebene 15 repräsentiert die Ebene, in der die Ausbreitung des Kontusionsvolumens nach kaudal gerade endet.

Die Kontusionsvolumina der *poly veh*-Gruppe ( $19,53 \pm 2,40 \text{ mm}^3$ ) und der *poly rOPN*-Gruppe ( $18,76 \pm 1,67 \text{ mm}^3$ ) unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Die in B und C gezeigten repräsentativen histologischen Schnitte deuten nahezu gleich große Kontusionsvolumina in dem *poly veh*- und *poly rOPN*-Tier an.

### 5.2.2 Dickemessung der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus

Ein weiterer Aspekt des histologischen Versuchsteils ist die Dickemessung der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus, die ebenfalls anhand der mit Kresylviolett gefärbten histologischen Schnitte durchgeführt wurde.

In der statistischen Auswertung wird lediglich der ipsiläsionale Gyrus dentatus der Polytrauma-operierten Tiere berücksichtigt.



**Abbildung 25:** Graphische und histologische Darstellung der Dickemessung der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus. **A:** Graphische Darstellung der Dickemessung der Körnerzellschicht (KZS) des Gyrus dentatus (GD). Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt.  $n = 12$  (poly), Unpaired t Test,  $* p < 0,05$ . **B:** Zu sehen ist ein repräsentativer mit Kresylviolett gefärbter Schnitt der Ebene 11 (Bregma – 1,86 mm) eines poly rOPN-Tieres. Die Körnerzellschicht des Gyrus dentatus der ipsiläsionalen Seite ist in dem rot umrahmten Ausschnitt zur Veranschaulichung vergrößert dargestellt. **C:** Zu sehen ist ein repräsentativer mit Kresylviolett gefärbter Schnitt der Ebene 11 (Bregma – 1,86 mm) eines poly veh-Tieres. Die Körnerzellschicht des Gyrus dentatus der ipsiläsionalen Seite ist in dem rot umrahmten Ausschnitt zur Veranschaulichung vergrößert dargestellt.

Die Körnerzellschicht des Gyrus dentatus der *poly veh*-Gruppe ( $33,02 \pm 1,41 \mu\text{m}$ ) ist signifikant dünner ( $p = 0,0188$ ) als die Körnerzellschicht des Gyrus dentatus der *poly rOPN*-Gruppe ( $38,84 \pm 1,81 \mu\text{m}$ ). Dies wird auch anhand der repräsentativen histologischen Schnitte (B, C), wo sich das *poly veh*-Tier gegenüber dem *poly rOPN*-Tier mit einem größeren Substanzverlust der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus zeigt, bestätigt.

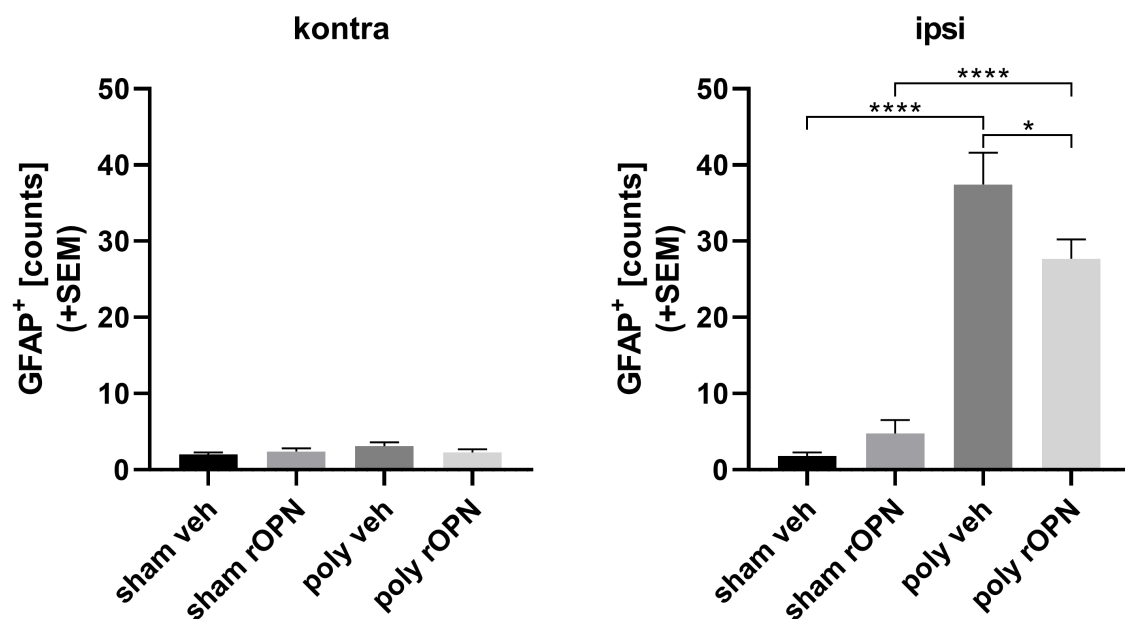
### 5.2.3 Immunhistochemische Färbungen GFAP und Iba1

Um die Auswirkungen der ICV Gabe von OPN in dieser Polytrauma-Studie auf die Astrozyten- und Mikroglia-Aktivierung zu untersuchen, wurden die angefertigten Serienschritte immunhistochemisch mit GFAP (Marker für Astrozyten-Reaktivität (92))

und Iba1 (Marker für Mikroglia-Aktivität (75)) gefärbt und analysiert. Hierbei liegen die Regionen, die auf GFAP- oder Iba1-positive Partikel untersucht wurden, in der rechten Hemisphäre periläsional und in der zu diesem Bereich an der Mittellinie gespiegelte Region in der kontraläsionalen linken Hemisphäre. Bei den scheinoperierten Tieren, die keinen Schaden aufweisen, wurden analogen Bereiche zu den CCI-Tieren bestimmt und analysiert.

### 5.2.3.1 Immunhistochemische Färbung GFAP

Bei der Analyse der Daten zur ipsiläsionalen Region mithilfe des ROUT-Tests, wurde ein Tier der *poly veh*-Gruppe zunächst als Ausreißer identifiziert und zur statistischen Analyse ausgeschlossen.

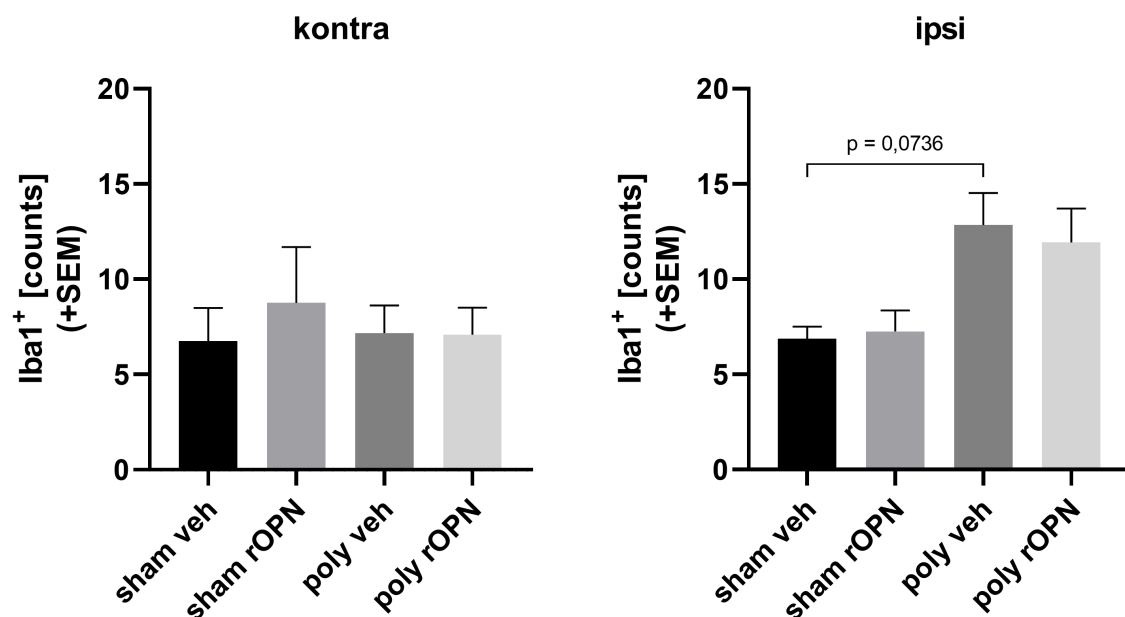


**Abbildung 26:** Quantifizierung der GFAP-positiven Partikel. **kontra:** Quantifizierung der kontraläsionalen Seite. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. n=8 (sham), n=12 (poly), Kruskal-Wallis Test, Dunn-Korrektur. **ipsi:** Quantifizierung der ipsiläsionalen Seite. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. n=8 (sham veh), n=8 (sham rOPN), n=11 (poly veh), n=12 (poly rOPN), One-Way-ANOVA, Holm-Sidak Korrektur, \*\*\*\* p < 0.0001, \* p < 0,05.

Die Anzahl der GFAP-positiven Partikel in der definierten Region der kontraläsionalen, linken Hemisphäre unterscheidet sich zwischen den Gruppen nicht signifikant (*sham veh*:  $2 \pm 0,27$  counts, *sham rOPN*:  $2,38 \pm 0,42$  counts, *poly veh*:  $3,08 \pm 0,51$  counts, *poly rOPN*:  $2,25 \pm 0,43$  counts). Polytrauma-operierte Tiere zeigen eine signifikant höhere Anzahl GFAP-positiver Partikel in der periläsionale Region der rechten

Hemisphäre als scheinoperierte Tiere (*sham veh*:  $1,81 \pm 0,47$  counts vs. *poly veh*:  $37,45 \pm 4,13$  counts,  $p < 0,0001$  / *sham rOPN*:  $4,75 \pm 1,75$  counts vs. *poly rOPN*:  $27,67 \pm 2,58$  counts,  $p < 0,0001$ ). Außerdem weist die *poly veh*-Gruppe gegenüber der *poly rOPN*-Gruppe eine signifikant höhere Anzahl GFAP-positiver Partikel in der periläsionale Region auf (*poly veh*:  $37,45 \pm 4,13$  counts vs. *poly rOPN*:  $27,67 \pm 2,58$  counts,  $p = 0,0297$ ).

### 5.2.3.2 Immunhistochemische Färbung Iba1



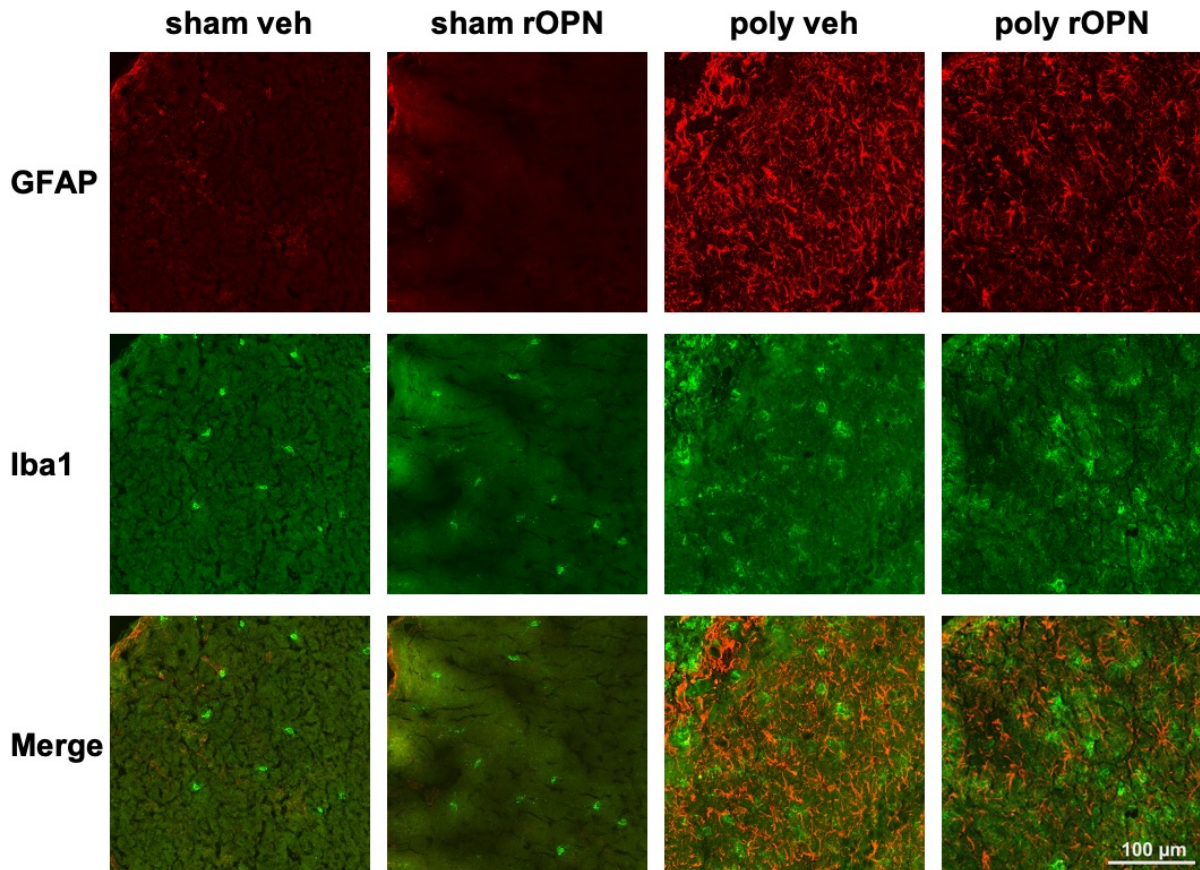
**Abbildung 27:** Quantifizierung der Iba1-positiven Partikel. **kontra:** Quantifizierung der kontraläsionalen Seite. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt.  $n = 8$  (sham),  $n = 12$  (poly), One-Way-ANOVA, Holm-Sidak Korrektur. **ipsi:** Quantifizierung der ipsiläsionalen Seite. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt.  $n = 8$  (sham),  $n = 12$  (poly), One-Way-ANOVA, Holm-Sidak Korrektur.

Die Anzahl der Iba1-positiven Partikel in der definierten Region der kontraläsionalen, linken Hemisphäre unterscheidet sich zwischen den Gruppen nicht signifikant (*sham veh*:  $6,75 \pm 1,74$  counts, *sham rOPN*:  $8,75 \pm 2,94$  counts, *poly veh*:  $7,17 \pm 1,46$  counts, *poly rOPN*:  $7,08 \pm 1,43$  counts). Auch bei Betrachtung der Iba1-positiven Partikel in der periläsionale Region der rechten Hemisphäre zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (*sham veh*:  $6,88 \pm 0,64$  counts, *sham rOPN*:  $7,25 \pm 1,11$  counts, *poly veh*:  $12,83 \pm 1,69$  counts, *poly rOPN*:  $11,92 \pm 1,79$  counts). Der Graph zeigt eine höhere Anzahl Iba1-positiver Partikel in der periläsionale Region bei Polytrauma-operierten Tieren gegenüber den scheinoperierten Tieren. Dies wird statistisch



jedoch lediglich in Form eines Trends ( $p = 0,0736$ ) zwischen der *sham veh*- und der *poly veh*-Gruppe bestätigt.

Folgende Abbildung zeigt immunhistochemische Färbungen der periläsionalen Region (analog gewählte Region bei scheinoperierten Tieren) von je einem repräsentativen Tier der vier Gruppen.



**Abbildung 28:** Immunhistochemische Färbungen der periläsionalen Region. Die Abbildung zeigt immunhistochemische Färbungen der periläsionalen Region von je einem repräsentativ gewählten Tier aus den vier verschiedenen Gruppen. Bei den scheinoperierten Tieren, die keinen Schaden aufweisen, sind zu der periläsionalen Region der CCI-Tiere analoge Bereiche gefärbt. Es ist jeweils sowohl die GFAP- als auch die Iba1-Färbung zu sehen, sowie eine „Merge“-Ansicht beider Färbungen.

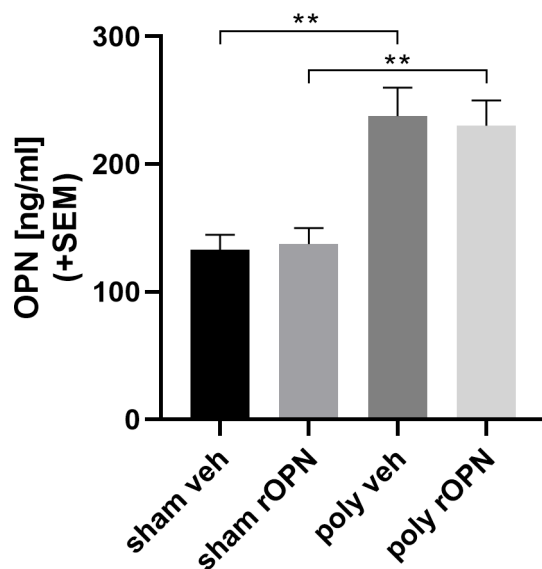
Die in der Abbildung gezeigten repräsentativen immunhistochemischen Färbungen der periläsionalen Region unterstreichen nochmals die zuvor beschriebenen Unterschiede. So wird auch hier deutlich, dass Polytrauma-operierte Tiere eine signifikant höhere Anzahl GFAP-positiver Partikel aufweisen, bzw. deutlich mehr Astrozyten in den entsprechenden Färbungen dargestellt sind. Die erhöhte Astrogliose der *poly veh*-Gruppe gegenüber der *poly rOPN*-Gruppe, lässt sich ebenfalls anhand der Abbildung nachvollziehen.

### 5.3 Biochemische und molekularbiologische Analyse

Ziel einer dritten Versuchsreihe war es, die im Rahmen dieser Polytrauma-Studie untersuchten Auswirkungen des ICV applizierten OPNs auf biochemischer und molekularbiologischer Ebene zu untersuchen. Hierzu wurde Gewebe der ipsiläsionalen, rechten Hemisphäre verwendet, welches in Form von Trimmchnitten, während der Kryotomie gewonnen wurde. Zur Bestimmung der OPN-Konzentration im Blutplasma der Versuchstiere mittels ELISA, wurde das nach Dekapitation gewonnene Blutplasma verwendet.

#### 5.3.1 OPN ELISA

Mithilfe der ELISA-Technik wurden in dieser Polytrauma-Studie die Auswirkungen der ICV Injektion von OPN auf die Konzentration von OPN im Blutserum der Versuchstiere untersucht.



**Abbildung 29:** Konzentration von Osteopontin im Blutserum. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. n=8 (sham), n=12 (poly), One-Way-ANOVA, Holm-Sidak Korrektur, \*\* p < 0.01.

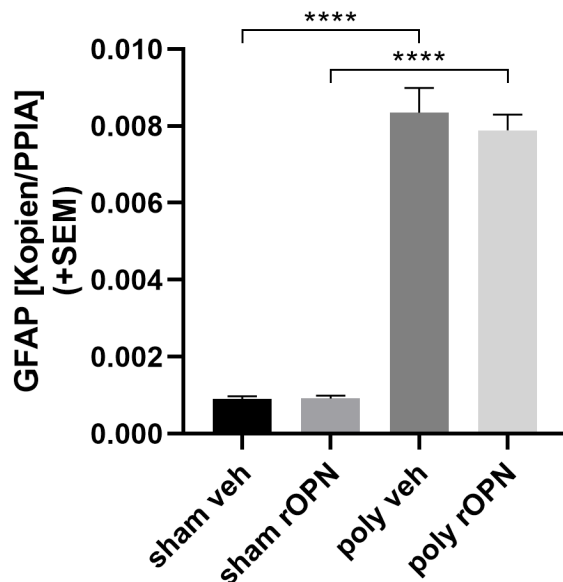
Die OPN-Konzentration im Blutserum ist bei den Polytrauma-operierten Tieren signifikant höher als bei den scheinoperierten Tieren (*sham veh*: 132,9  $\pm$  11,72 vs. *poly veh*: 237,6  $\pm$  22,22,  $p < 0,0035$  / *sham rOPN*: 137,5  $\pm$  12,43 vs. *poly rOPN*: 230,2  $\pm$  19,71,  $p < 0,0058$ ). Die beiden Polytrauma-operierten Gruppen (*poly veh* vs. *poly rOPN*) weisen ähnliche OPN-Konzentrationen im Blutserum auf.

### 5.3.2 Quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion

Um die Auswirkungen des im Rahmen dieses Polytrauma-Modells ICV applizierten rOPNs auf die Transkription verschiedener Zielgene zu untersuchen, wurden die Transkripte zunächst aus dem rechtshemisphärischen Hirngewebe extrahiert, in komplementäre DNA umgeschrieben und anschließend mittels qPCR quantifiziert.

Die in der qPCR bestimmte Anzahl der DNA-Kopien wurde auf das Housekeeping-Gen PPIA, dessen Expression ebenfalls bestimmt wurde, normalisiert und dann zur statistischen Analyse verwendet.

#### 5.3.2.1 GFAP

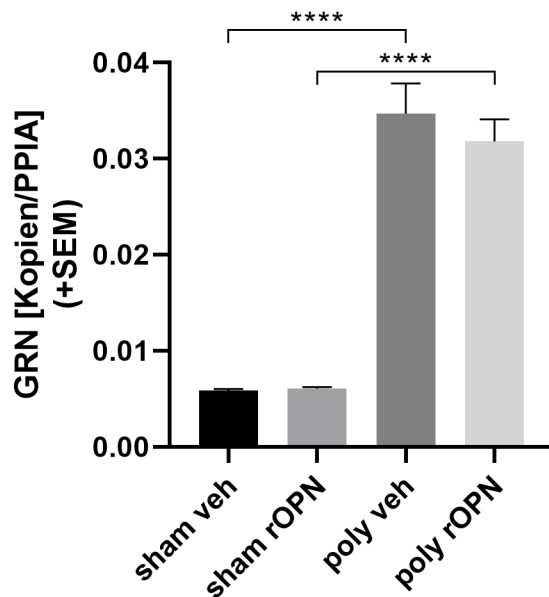


**Abbildung 30:** mRNA-Expression GFAP. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt.  $n=8$  (sham),  $n=12$  (poly), One-Way-ANOVA, Holm-Sidak Korrektur, \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

Die Polytrauma-operierten Tiere zeigen gegenüber den scheinoperierten Tieren rechtshemisphärisch eine signifikant höhere Anzahl an GFAP-Transkripten (*sham veh*:  $9,10 \times 10^{-4} \pm 6,42 \times 10^{-5}$  vs. *poly veh*:  $8,34 \times 10^{-3} \pm 6,43 \times 10^{-4}$ ,  $p < 0,0001$  / *sham rOPN*:  $9,13 \times 10^{-4} \pm 7,74 \times 10^{-5}$  vs. *poly rOPN*:  $7,89 \times 10^{-3} \pm 4,05 \times 10^{-4}$ ,  $p < 0,0001$ ). Die Anzahl der rechtshemisphärischen GFAP mRNA-Kopien der beiden Polytrauma-operierten Gruppen (*poly veh* vs. *poly rOPN*) unterscheidet sich nicht signifikant voneinander.

### 5.3.2.2 Granulin

Granulin (GRN) ist ein Spaltprodukt von Progranulin (PGRN), welches anti-inflammatorische und neurotrophe Eigenschaften besitzt und im ZNS von Neuronen und Mikrogliazellen synthetisiert wird. Das Spaltprodukt GRN bewirkt jedoch eine erhöhte Synthese pro-inflammatorischer Mediatoren und dient daher in dieser Arbeit als Marker der Neuroinflammationsreaktion (274,275).

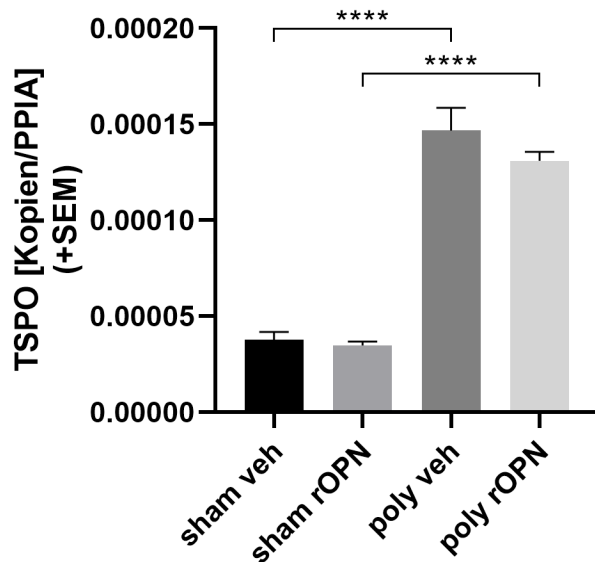


**Abbildung 31:** mRNA-Expression GRN. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. n=8 (sham), n=12 (poly), One-Way-ANOVA, Holm-Sidak Korrektur, \*\*\*\* p < 0.0001.

Die rechtshemipärische mRNA-Expression von GRN ist in den Polytrauma-operierten Tieren gegenüber den scheinoperierten Tieren signifikant höher reguliert (*sham veh*:  $5,84 \times 10^{-3} \pm 1,84 \times 10^{-4}$  vs. *poly veh*:  $3,47 \times 10^{-2} \pm 3,14 \times 10^{-3}$ ,  $p < 0,0001$  / *sham rOPN*:  $6,06 \times 10^{-3} \pm 1,71 \times 10^{-4}$  vs. *poly rOPN*:  $3,18 \times 10^{-2} \pm 2,30 \times 10^{-3}$ ,  $p < 0,0001$ ). Die beiden Polytrauma-operierten Gruppen (*poly veh* vs. *poly rOPN*) unterscheiden sich hierbei nicht signifikant voneinander.

### 5.3.2.3 TSPO

Zur statistischen Auswertung der mRNA-Expressionsdaten des Markers für aktivierte Mikroglia TSPO, wurden zwei Tiere der *poly rOPN*-Gruppe mittels ROUT-Test zunächst als Ausreißer identifiziert und dann ausgeschlossen.

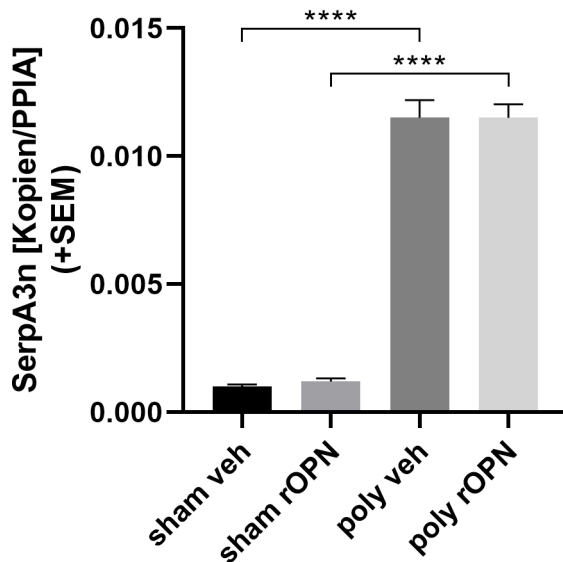


**Abbildung 32:** mRNA-Expression TSPO. Die Daten sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. n=8 (sham veh), n=8 (sham rOPN), n=12 (poly veh), n=10 (poly rOPN), One-Way-ANOVA, Holm-Sidak Korrektur, \*\*\*\* p < 0.0001.

Die Anzahl der mRNA-Kopien des TSPO-Gens ist rechtshemisphärisch in den Polytrauma-operierten Tieren signifikant höher als in den scheinoperierten Tieren (*sham veh*:  $3,75 \times 10^{-5} \pm 4,17 \times 10^{-6}$  vs. *poly veh*:  $1,47 \times 10^{-4} \pm 1,19 \times 10^{-5}$ ,  $p < 0,0001$  / *sham rOPN*:  $3,47 \times 10^{-5} \pm 2,12 \times 10^{-6}$  vs. *poly rOPN*:  $1,31 \times 10^{-4} \pm 4,62 \times 10^{-6}$ ,  $p < 0,0001$ ). Vergleicht man die beiden Polytrauma-operierten Gruppen (*poly veh* vs. *poly rOPN*), zeigt sich diesbezüglich kein signifikanter Unterschied.

### 5.3.2.4 SerpA3n

Zur statistischen Auswertung der mRNA-Expressionsdaten des Astrozytenmarkers SerpA3n wurde ein Tier der *sham veh*-Gruppe und ein Tier der *poly veh*-Gruppe mittels ROUT-Test zunächst als Ausreißer identifiziert und dann ausgeschlossen.

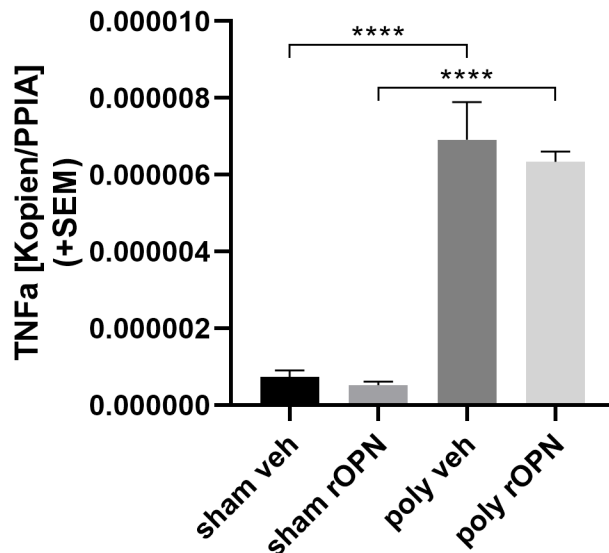


**Abbildung 33:** mRNA-Expression *SerpA3n*. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. n=7 (*sham veh*), n=8 (*sham rOPN*), n=11 (*poly veh*), n=12 (*poly rOPN*), One-Way-ANOVA, Holm-Sidak Korrektur, \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

Die Polytrauma-operierten Tiere weisen gegenüber den scheinoperierten Tieren rechtshemisphärisch eine signifikant höhere Anzahl von SerpA3n mRNA-Transkripten auf (*sham veh*:  $1,00 \times 10^{-3} \pm 7,88 \times 10^{-5}$  vs. *poly veh*:  $1,15 \times 10^{-2} \pm 6,92 \times 10^{-4}$ ,  $p < 0,0001$  / *sham rOPN*:  $1,19 \times 10^{-3} \pm 1,29 \times 10^{-4}$  vs. *poly rOPN*:  $1,15 \times 10^{-2} \pm 5,32 \times 10^{-4}$ ,  $p < 0,0001$ ). Vergleicht man die beiden Polytrauma-operierten Gruppen (*poly veh* vs. *poly rOPN*) bzgl. der rechtshemisphärischen mRNA-Expression von SerpA3n, zeigt sich kein signifikanter Unterschied.

### 5.3.2.5 TNF- $\alpha$

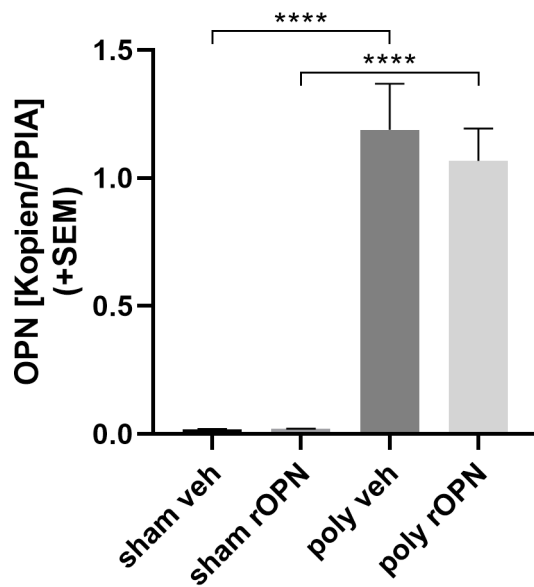
Zur statistischen Auswertung der mRNA-Expressionsdaten des Inflammationsmarkers TNF- $\alpha$  wurde ein Tier der *poly rOPN*-Gruppe mittels ROUT-Test zunächst als Ausreißer identifiziert und dann ausgeschlossen.



**Abbildung 34:** mRNA-Expression TNF- $\alpha$ . Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. n=8 (sham veh), n=8 (sham rOPN), n=12 (poly veh), n=11 (poly rOPN), One-Way-ANOVA, Holm-Sidak Korrektur, \*\*\*\* p < 0.0001.

Die rechtshemisphärische mRNA-Expression des TNF- $\alpha$  ist in den Polytrauma-operierten Tieren gegenüber den scheinoperierten Tieren signifikant höher reguliert (*sham veh*:  $7,32 \times 10^{-7} \pm 1,70 \times 10^{-7}$  vs. *poly veh*:  $6,91 \times 10^{-6} \pm 9,86 \times 10^{-7}$ ,  $p < 0,0001$  / *sham rOPN*:  $5,22 \times 10^{-7} \pm 9,40 \times 10^{-8}$  vs. *poly rOPN*:  $6,34 \times 10^{-6} \pm 2,69 \times 10^{-7}$ ,  $p < 0,0001$ ). Die rechtshemisphärische Anzahl der TNF- $\alpha$  mRNA-Kopien der beiden Polytrauma-operierten Gruppen (*poly veh* vs. *poly rOPN*) unterscheidet sich nicht signifikant voneinander.

### 5.3.2.6 OPN



**Abbildung 35:** mRNA-Expression OPN. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. n=8 (sham), n=12 (poly), One-Way-ANOVA, Holm-Sidak Korrektur, \*\*\*\* p < 0.0001.

Die rechtshemisphärische mRNA-Expression von OPN ist in den Polytrauma-operierten Tieren gegenüber den scheinoperierten Tieren signifikant hochreguliert (*sham veh*:  $1,81 \times 10^{-2} \pm 8,52 \times 10^{-4}$  vs. *poly veh*:  $1,19 \pm 0,18$ ,  $p < 0,0001$  / *sham rOPN*:  $1,92 \times 10^{-2} \pm 8,17 \times 10^{-4}$  vs. *poly rOPN*:  $1,07 \pm 0,13$ ,  $p < 0,0001$ ). Die beiden Polytrauma-operierte Gruppen (*poly veh* vs. *poly rOPN*) zeigen bzgl. der rechtshemisphärischen mRNA-Expression von OPN keinen signifikanten Unterschied.

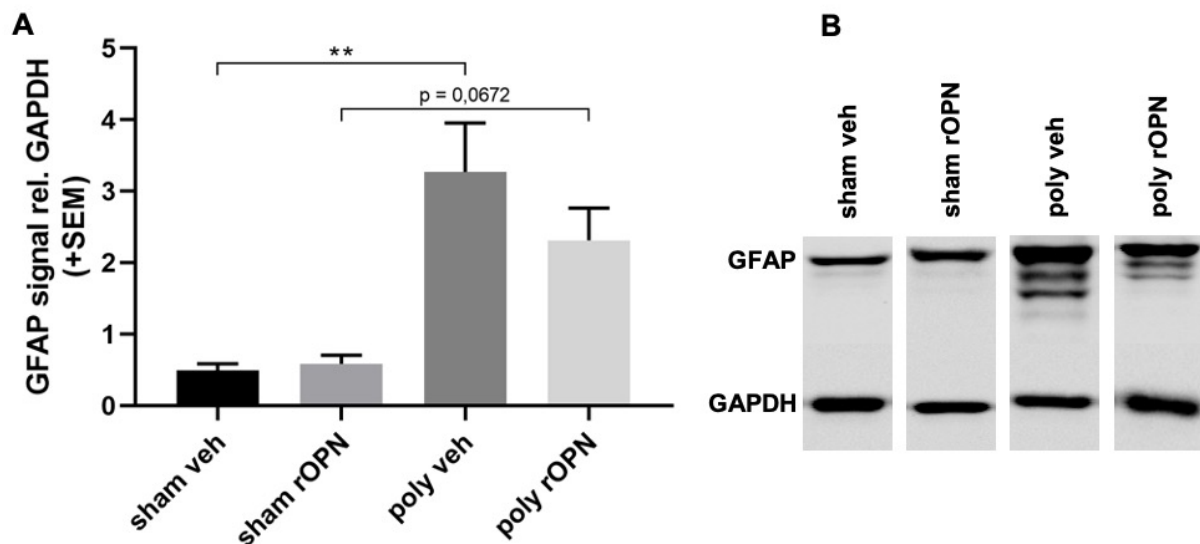


### 5.3.3 Western Blot

Die Western Blot-Analyse ermöglicht es im Kontext dieser Polytrauma-Studie die Auswirkungen der ICV Applikation von rOPN auf die Expression bestimmter Proteine zu untersuchen. Die Proteine wurden zunächst aus dem Hirngewebe der ipsiläsionalen rechten Hemisphäre extrahiert und nach Bestimmung des Expressionslevels mittels Western Blot, auf das Kontrollprotein GAPDH normalisiert. Dieser relative Wert wurde zur statistischen Auswertung verwendet.

Für alle drei Western Blot-Analysen wurde ein Tier der *poly rOPN*-Gruppe ausgeschlossen, da die GAPDH-Bande dieses Tieres im Western Blot nicht auswertbar war.

#### 5.3.3.1 GFAP



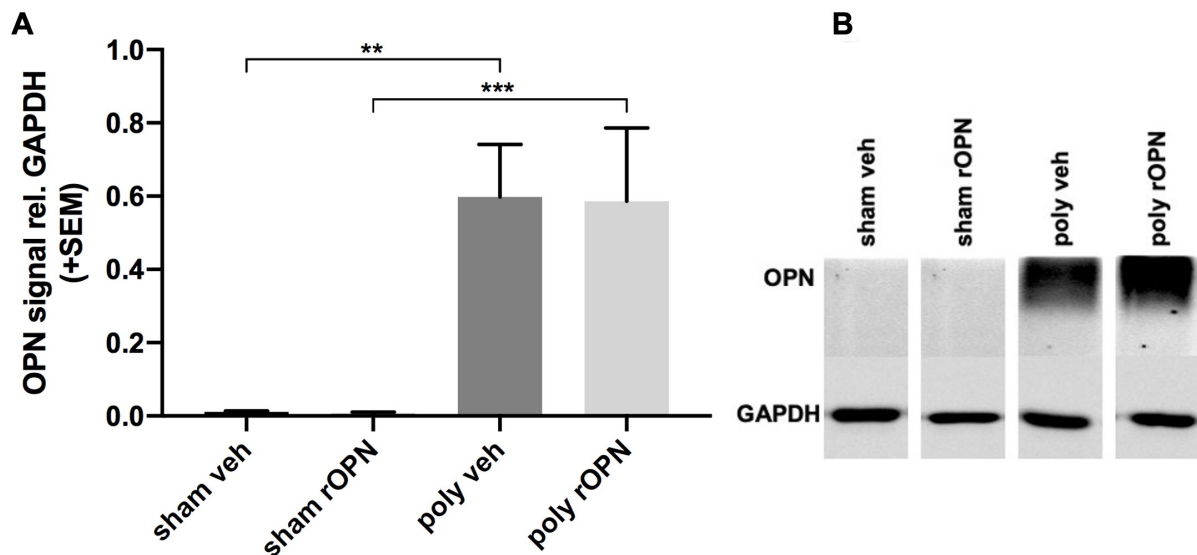
**Abbildung 36:** Proteinexpression GFAP. **A:** Graphische Darstellung der GFAP-Proteinexpression aller Gruppen relativ zu GAPDH. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt.  $n=8$  (sham veh),  $n=8$  (sham rOPN),  $n=12$  (poly veh),  $n=11$  (poly rOPN), One-Way-ANOVA, Holm-Sidak Korrektur,  $** p < 0.01$ . **B:** Darstellung der Western Blot-Banden GFAP (55 kDa) und GAPDH (37 kDa) von je einem repräsentativ gewählten Tier aller 4 Gruppen (sham veh, sham rOPN, poly veh, poly rOPN).

Das Protein GFAP ist rechtshemisphärisch in den *poly veh* Tieren signifikant höher exprimiert als in den *sham veh* Tieren (*sham veh*:  $0,49 \pm 0,094$  vs. *poly veh*:  $3,27 \pm 0,69$ ,  $p = 0,0026$ ). Beim Vergleich der *sham rOPN*-Gruppe mit der *poly rOPN*-Gruppe zeigt sich hierbei lediglich ein statistischer Trend (*sham rOPN*:  $0,58 \pm 0,12$  vs. *poly rOPN*:  $2,32 \pm 0,45$ ,  $p = 0,0672$ ), insofern, dass die Tiere der *poly rOPN*-Gruppe in der rechten Hemisphäre mehr GFAP-Expression aufweisen als die Tiere der *sham rOPN*-Gruppe. Die geringeren GFAP-Expressionslevel der scheinoperierten Tiere

gegenüber den Polytrauma-operierten Tieren lassen sich auch anhand der Fluoreszenzintensitäten der Western Blot-Banden in B verifizieren.

Der Graph A zeigt ein höheres rechtshemisphärisches GFAP-Expressionslevel in den *poly veh*-Tieren gegenüber den *poly rOPN*-Tieren. Die in B gezeigten repräsentativen Western Blot-Banden zeigen auch ein entsprechend intensiveres Fluoreszenzsignal des *poly veh*-Tieres bei vergleichbarer GAPDH-Intensität. Dieser Unterschied ist nach statistischer Analyse jedoch nicht signifikant ( $p = 0,2849$ ). Entsprechend ergibt sich beim Vergleich der beiden Polytrauma-operierten Gruppen (*poly veh* vs. *poly rOPN*) bzgl. der Proteinexpression von GFAP in der rechten Hemisphäre kein signifikanter Unterschied.

### 5.3.3.2 OPN



**Abbildung 37: Proteinexpression Osteopontin.** **A:** Graphische Darstellung der OPN-Proteinexpression aller Gruppen relativ zu GAPDH. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt.  $n=8$  (sham veh),  $n=8$  (sham rOPN),  $n=12$  (poly veh),  $n=11$  (poly rOPN), Kruskal-Wallis Test, Dunn-Korrektur \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . **B:** Darstellung der Western Blot-Banden Osteopontin (60-70 kDa) und GAPDH (37 kDa) von je einem repräsentativ gewählten Tier aller 4 Gruppen (*sham veh*, *sham rOPN*, *poly veh*, *poly rOPN*). Die Osteopontin-Bande stellt sich aufgrund verschiedener Spleißvarianten und unterschiedlicher posttranslationaler Modifikationen breit (60-70 kDa) dar.

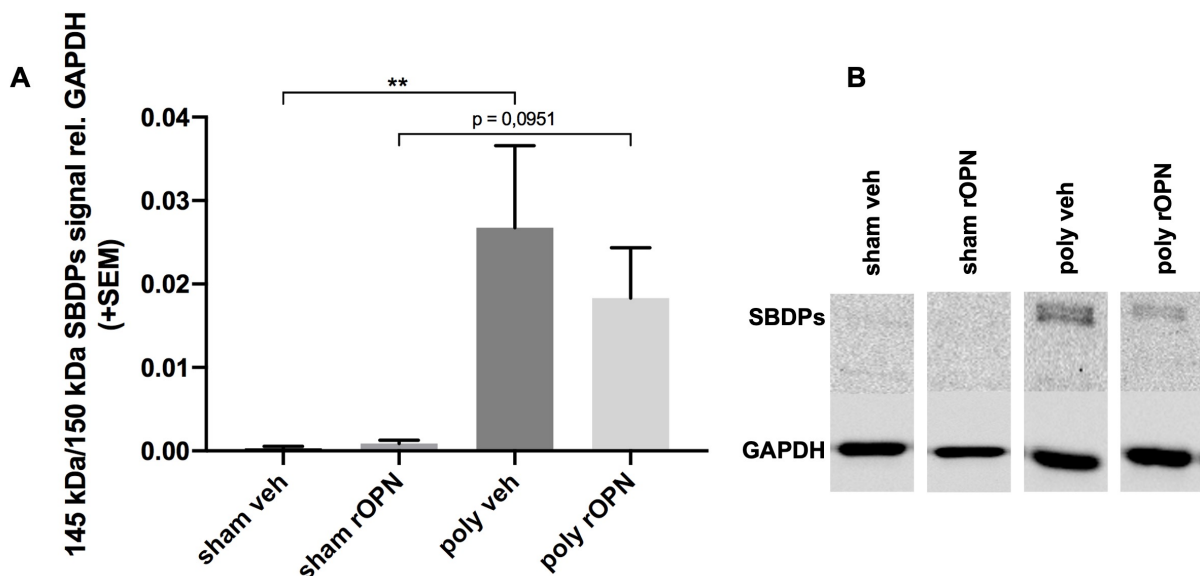
In der graphischen Darstellung A ist eine signifikant höhere rechtshemisphärische OPN Proteinexpression in den Polytrauma-operierten Tieren gegenüber den scheinoperierten Tieren erkennbar (*sham veh*:  $0,01 \pm 2,62 \times 10^{-3}$  vs. *poly veh*:  $0,60 \pm 0,14$ ,  $p = 0,0017$  / *sham rOPN*:  $6,57 \times 10^{-3} \pm 3,04 \times 10^{-3}$  vs. *poly rOPN*:  $0,59 \pm 0,20$ ,  $p = 0,0009$ ). Dies zeigt sich auch in B, wo die scheinoperierten Tiere nahezu keine OPN-Bande aufweisen. Die Polytrauma-operierten Gruppen (*poly veh* vs. *poly rOPN*) zeigen

ähnliche OPN-Expressionslevel in der rechten Hemisphäre und unterscheiden sich somit diesbezüglich nicht signifikant voneinander, was sowohl graphisch (A) als auch repräsentativ anhand des Western-Blots (B) nachvollziehbar ist.

### 5.3.3.3 145 kDa/150 kDa SBDPs

Aufgrund nicht auswertbarer Banden wurden 2 Tiere der *sham veh*-Gruppe, 3 Tiere der *sham rOPN*-Gruppe, 4 Tiere der *poly veh*-Gruppe und 5 Tiere der *poly rOPN*-Gruppe zur statistischen Analyse ausgeschlossen.

$\alpha$ II-Spektrin ist ein Protein des Zytoskeletts, dass im Gegensatz zu  $\alpha$ I-Spektrin nicht in Erythrozyten exprimiert ist, dafür aber in anderen Zelltypen wie bspw. in Neuronen (276).  $\alpha$ II-Spektrin (280kDa) ist ein Hauptsubstrat der Proteasen Calpain und Caspase 3, wobei die Calpain-vermittelte Degradation zu zwei einzigartigen und sehr stabilen Spaltprodukten mit 145 kDa und 150 kDa führt. Diese Spaltprodukte dienen als Marker für Nekrose, Apoptose und neuronalen Zelltod, da sie im Zusammenhang mit diesen Pathologien schon früh auftreten (277,278). Spaltprodukte von  $\alpha$ II-Spektrin werden auch *spectrin breakdown products* (SBDPs) genannt.



**Abbildung 38:** 145 kDa/150 kDa SBDPs. **A:** Graphische Darstellung der 145 kDa/150 kDa SBDPs aller Gruppen relativ zu GAPDH. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. n=6 (*sham veh*), n=5 (*sham rOPN*), n=8 (*poly veh*), n=7 (*poly rOPN*), Kruskal-Wallis test, Dunn-Korrektur, \*\* p < 0.01. **B:** Darstellung der Western Blot-Banden der 145 kDa/150 kDa SBDPs und GAPDH (37 kDa) von je einem repräsentativ gewählten Tier aller 4 Gruppen (*sham veh*, *sham rOPN*, *poly veh*, *poly rOPN*).

Die *poly veh*-Tiere zeigen gegenüber den *sham veh*-Tieren eine signifikant höhere Anzahl der 145 kDa/150 kDa Spaltprodukte von  $\alpha$ II Spektrin in der rechten Hemisphäre

(*sham veh*:  $3,17 \times 10^{-4} \pm 2,17 \times 10^{-4}$  vs. *poly veh*:  $2,68 \times 10^{-2} \pm 9,83 \times 10^{-3}$ ,  $p = 0,0032$ ). Der Vergleich der *sham rOPN*-Gruppe mit der *poly rOPN*-Gruppe zeigt diesbezüglich lediglich einen statistischen Trend (*sham rOPN*:  $8,92 \times 10^{-4} \pm 3,97 \times 10^{-4}$  vs. *poly rOPN*:  $1,83 \times 10^{-2} \pm 6,03 \times 10^{-3}$ ,  $p = 0,0951$ ). Die unterschiedlichen Konzentrationen der Spaltprodukte von  $\alpha$ II Spektrin in der rechten Hemisphäre der Polytrauma- und scheinoperierten Tiere werden durch die entsprechenden Banden im Western Blot (B) bestätigt. Der Graph A deutet eine höhere Anzahl der  $\alpha$ II Spektrin-Spaltprodukte in der rechten Hemisphäre der *poly veh*-Tiere gegenüber den *poly rOPN*-Tieren an. Die in B gezeigten repräsentativen Western Blot-Banden zeigen auch ein entsprechend intensiveres Fluoreszenzsignal des *poly veh*-Tieres bei vergleichbarer GAPDH-Intensität. Dieser Unterschied ist nach statistischer Analyse jedoch nicht signifikant. Entsprechend ergibt sich beim Vergleich der beiden Polytrauma-operierten Gruppen (*poly veh* vs. *poly rOPN*) bzgl. der Anzahl der 145 kDa/150 kDa SBDPs in der rechten Hemisphäre kein signifikanter Unterschied.

## 6 Diskussion

### 6.1 Auswirkungen von appliziertem rOPN auf allgemeine und verhaltenspathophysiologische Untersuchungen

Im Rahmen dieser Versuchsreihe wurden die Auswirkungen der ICV Injektion von rOPN auf allgemeine und verhaltenspathophysiologische Parameter der Polytrauma- und scheinoperierten Versuchstiere erfasst.

Das **Gewicht** der Versuchstiere ist ein Indikator für Wohlbefinden und allgemeine Konstitution und weist indirekt darauf hin, ob die Nahrungsaufnahme ausreichend ist. Die scheinoperierten Tiere weisen nach einem initialen Gewichtsverlust schon ab dem 3. postoperativen Tag ein Körpergewicht auf, das den Wert des präoperativen Ausgangsgewichts bereits überschreitet. Der Gewichtsverlust am ersten postoperativen Tag ist durch die Scheinoperation, welche eine Narkose, sowie das Freipräparieren der Schädelkalotte und des Femurs beinhaltet, erklärbar. Die Polytrauma-operierten Tiere erreichen erst am 5. postoperativen Tag ein Gewicht, das in etwa dem Wert des präoperativen Ausgangsgewichts entspricht. Diese verzögerte Gewichtszunahme der Polytrauma-operierten Tiere ist durch die Nachwirkungen der deutlich invasiveren Operation erklärbar. Wichtig hierbei ist, dass die Polytrauma-operierten Tiere nach dem initialen Gewichtsverlust ab dem 1. postoperativen Tag kontinuierlich an Gewicht gewonnen haben. So wurde bei allen Tieren zu keinem Zeitpunkt ein kritisches Gewicht erreicht, was zu einem Ausschluss gemäß tierschutzrechtlichen Verordnungen geführt hätte. Entsprechend kann eine Beeinflussung der Versuchsreihe durch unterernährte, schwache Tiere weitestgehend ausgeschlossen werden.

Zwischen den *rOPN*- und *veh*-Gruppen, gab es bezüglich des Gewichts keine signifikanten Unterschiede, sodass sich die ICV Applikation von rOPN nicht auf das Körpergewicht der Versuchstiere im postoperativen Verlauf (d1-d5) auswirkt.

Der **Beinbelastungsscore** objektiviert die Belastbarkeit und Beweglichkeit der frakturierten Extremität der Polytrauma-operierten Tiere. Bei idealer Umsetzung der experimentellen Femurfraktur, sollte die frakturierte Extremität im postoperativen Verlauf, gerade aufgrund der intramedullären Schienung, weitestgehend belastbar und beweglich sein. Am 1. postoperativen Tag, zeigen die Polytrauma-operierten Tiere eine erhöhte Punktzahl im Beinbelastungsscore (*poly veh*: 2,79 und *poly rOPN*: 2,92 von 6

möglichen Punkten), wobei sowohl die *poly rOPN*- als auch die *poly veh*-Gruppe im postoperativen Verlauf eine bessere Belastbarkeit und Beweglichkeit der frakturierten Extremität aufweisen. Hierbei ist die Reduktion der Punkte im Beinbelastungsscore der *poly veh*-Gruppe im postoperativen Verlauf signifikant. Die bessere Beweglichkeit und Belastbarkeit der frakturierten Extremität der Versuchstiere im postoperativen Verlauf, spricht für eine gute Umsetzung der experimentellen Femurfraktur mit intramedullärer Schienung. Hierdurch wird der Einfluss der frakturierten Extremität, im Sinne einer peripheren Funktionseinschränkung, auf Untersuchungen, die zentral-motorische Defizite betreffen, zumindest reduziert.

Die *poly rOPN*- und die *poly veh*-Gruppe unterscheiden sich an den jeweiligen postoperativen Tagen (d1, d3, d5) nicht signifikant in den erreichten Punkten des BBS, sodass die ICV Applikation von rOPN in den ersten fünf Tagen nach der Polytraumoperation keinen Einfluss auf die Belastbarkeit und Beweglichkeit der frakturierten Extremität hat.

Der BBS eignet sich nur bedingt, um die Auswirkungen einer rOPN-Applikation auf die von Brady et al postulierte verstärkte Kallusbildung im Rahmen eines Polytrauma-Modells (16) zu untersuchen. Eine andere Messmethode wie bspw. die von Tsitsilonis et al. verwendete Micro-CT-Untersuchung, die die Knochenstrukturen hochauflösend darstellt, wäre für diese Fragestellung besser geeignet (279). Darüber hinaus ist das Untersuchungsintervall von fünf Tagen zu kurz, um Rückschlüsse auf Prozesse der sekundären Frakturheilung, die über Monate andauern, ziehen zu können.

Anhand des **Neuroscores** lässt sich das neuromotorische Defizit der Versuchstiere im postoperativen Verlauf beurteilen. Das neuromotorische Defizit ist ein indirekter Marker für die Schwere der Hirnschädigung. Entsprechend ist davon auszugehen, dass die Hirnschädigung umso ausgeprägter ist, je beeinträchtigt sich die Versuchstiere in ihrem artspezifischen Verhalten und ihren koordinativ-motorischen Fähigkeiten zeigen.

Erwartungsgemäß zeigen die Polytrauma-operierten Tiere zu allen postoperativen Zeitpunkten deutlich stärker ausgeprägte neuromotorische Defizite als die scheinoperierten Tiere.

Sowohl bei den *poly rOPN*- als auch bei den *poly veh*-Tieren kommt es im postoperativen Verlauf zu einer signifikanten Abnahme der erreichten Punkte im Neuroscore, was für eine gute Erholungsfähigkeit der Tiere spricht. Vergleicht man die *poly rOPN*-

Gruppe mit der *poly veh*-Gruppe, unterscheiden sich die Versuchstiere an den postoperativen Tagen 1, 3 und 5 nicht signifikant in den erreichten Punkten im Neuroscore. Somit scheint das ICV verabreichte rOPN in diesem Zeitraum keinen Einfluss auf den neurologischen Status der Polytrauma-operierten Tiere zu haben. Dieses Resultat ähnelt einem vorherigen Ergebnis in einem CCI-Modell für SHT in Ratten, in dem keine Beeinflussung neurologischer Defizite nach intranasaler Verabreichung von rOPN 24 h nach CCI festgestellt wurde (252). Dem gegenüber stehen jedoch mehrere Studien, die mittels verschiedener Modelle experimenteller Hirnschädigung, wie SAB in Ratten (247), ICB in Ratten (245,246) und Schlaganfall in Mäusen (250) eine Verbesserung des neuromotorischen Defizits durch eine Behandlung mit OPN, respektive rOPN erreichen konnten, wobei die signifikanten Daten je nach Studie in den Tagen 1-5 nach der Hirnschädigung erhoben wurden. Die unterschiedlichen Modelle experimenteller Hirnschädigung, die unterschiedlichen Applikationsformen, sowie die unterschiedlichen Orte und Varianten der Hirnschädigung, könnten eine Erklärung für die widersprüchlichen Ergebnisse sein. Ebenso könnte der Aspekt des Polytraumas, im Sinne einer Beeinflussung der frakturierten Extremität auf die Erhebung des Neuroscores, ein relevanter und limitierender Faktor dieser Arbeit sein. Hierbei kann der periphere Frakturschaden eine zentral-bedingte Störung imitieren und zu falsch-hohen Punkten führen. Von dieser potenziellen Störvariable sind aber die *poly rOPN*- als auch die *poly veh*-Tiere gleichermaßen betroffen, sodass deren Vergleich nicht beeinflusst sein sollte. In Zusammenschau der aktuellen Literatur scheint sich zusammenfassend ein Trend abzuzeichnen, sodass die Behandlung mit OPN in verschiedenen Modellen tierexperimenteller Hirnschädigung, gerade in der Akutphase zu einer Verbesserung des neuromotorischen Defizits zu führen scheint, was nahelegt, dass OPN neuroprotektive Mechanismen initiiert.

Anhand des ***open field test*** werden verhaltensbiologische Parameter wie allgemeine Aktivität, sowie Erkundungs- und Vermeidungsverhalten von Versuchstieren erfasst und quantifiziert.

Zu allen postoperativen Zeitpunkten (d1, d3, d5), zeigen die Gruppen, insbesondere die *poly rOPN*- und *poly veh*- Gruppen, keine signifikanten Unterschiede in den Ergebnissen der Disziplinen „zurückgelegte Distanz“, „*exit from the circle*“ und „*border zone time*“ des *open field tests*. Hiernach scheint die ICV Applikation von rOPN im

postoperativen Verlauf (d1-d5) der Polytrauma-Operation keine Auswirkungen auf verhaltensbiologische Parameter der Versuchstiere zu haben.

Anhand der Disziplin „zurückgelegte Distanz“ zeigt sich, dass die Polytrauma-operierten Tiere im postoperativen Verlauf ähnliche Entfernungen absolvieren wie die scheinoperierten Tiere, was womöglich ein indirekter Hinweis für die gute Umsetzung der medullär geschienten experimentellen Femurfraktur ist. So scheint die frakturierte Extremität die Polytrauma-Tiere in ihrem Bewegungsumfang und Bewegungsverhalten nicht zu stören, was dafürspricht, dass die Femurfraktur Untersuchungen, die das neurologische „*outcome*“ betreffen, womöglich nur in geringem Maße beeinflusst.

## **6.2 Auswirkungen von appliziertem rOPN auf den histopathologischen Schaden**

Zur Bestimmung des histopathologischen Hirnschadens wurden mit Kresylviolett gefärbte Hirnschnitte verwendet.

Das Ausmaß des Kontusionsvolumens und die Dicke der Körnerzellschicht des ipsiläsionalen Gyrus dentatus können als histopathologisches Korrelat für die Schwere des Primärdefekts und des sekundären Hirnschadens angesehen werden (17). Gerade durch die Analyse der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus soll die Schadensauswirkung des SHTs in weiter entfernten Hirnregionen untersucht und quantifiziert werden. Die jeweiligen Gesamt-Hirnvolumina der *poly rOPN*- und der *poly veh*-Gruppe unterscheiden sich nicht signifikant voneinander, wodurch gleiche Grundvoraussetzungen gegeben sind.

Vergleicht man die Kontusionsvolumen der *poly rOPN*- und der *poly veh*-Gruppe miteinander, zeigt sich kein signifikanter Unterschied. Die *poly rOPN*-Tiere zeigen jedoch einen signifikant geringer ausgeprägten Substanzverlust der Körnerzellschicht des ipsiläsionalen Gyrus dentatus im Vergleich mit den *poly veh*-Tieren.

Während also das Läsionsvolumen unbeeinflusst bleibt, reduziert die ICV Applikation von rOPN die lokale histopathologische Schädigung der Körnerzellschicht des ipsiläsionalen Gyrus dentatus 5 Tage nach kombiniertem Trauma aus CCI und Femurfraktur.

Julienne *et al.* konnten in einem CCI-Modell in Ratten nach intranasaler rOPN-Applikation ebenfalls keine signifikante Änderung des Läsionsvolumens gegenüber Tieren feststellen, die keine rOPN-Behandlung erhalten haben. Die Ermittlung des



Läsionsvolumens wurde hier einen Tag nach der experimentellen Operation anhand von MRT-Bildern durchgeführt (252). Eine Untersuchung, die den Substanzverlust in periläsionalen Strukturen betrifft, wurde von der Arbeitsgruppe nicht durchgeführt.

Der Gyrus dentatus ist als periläsionale Struktur nicht unmittelbar von dem initialen Schaden betroffen. Ein Substanzverlust der Körnerzellschicht könnte somit primär durch frühe pathophysiologische Mechanismen, die sich nach initialem Schaden entwickeln verursacht sein, was dieses Messverfahren zu einem Marker für frühe Prozesse des sekundären Hirnschadens machen könnte. So konnten He *et al.* zeigen, dass es in einer frühen Phase der Hirnschädigung zur Beeinträchtigung hippocampaler Strukturen kommt, wobei hier ein tierexperimentelles Modell für Subarachnoidalblutung in Ratten verwendet wurde (280).

Ein Pathomechanismus, der den geringeren Substanzverlust in den *poly rOPN*-Tieren gegenüber den *poly veh*-Tieren erklären könnte, wäre die von Sun *et al.* postulierte regulatorische Wirkung von OPN auf die Autophagie-Apoptose-Interaktion (248). So könnte das ICV bereitgestellte rOPN über den FAK-ERK Signalweg vermehrt Autophagie fördern (249) und über den FAKPI3K-akt Signalweg vermehrt Apoptose hemmen (20). Diese Mechanismen könnten zu geringerem Zelltod hippocampaler Neurone führen, und entsprechend den geringeren Substanzverlust der Körnerzellschicht 5 Tage nach der Polytrauma-Operation erklären. Um diese Theorie weiter zu erforschen, müsste das periläsionale Gewebe im Rahmen dieses Polytrauma-Modells, gerade in Hinblick auf die Expression anti- und pro-apoptotischer, sowie Autophagie-bezogener Proteine, weiter untersucht werden. Ein weiterer interessanter Aspekt der Arbeitsgruppe um Sun *et al.* ist die Untersuchung der histopathologischen Auswirkungen einer rOPN-Applikation auf Strukturen des Hippocampus im Kontext einer Langzeituntersuchung. So konnte die Arbeitsgruppe anhand eines Modells für Subarachnoidalblutung in Ratten zeigen, dass die frühe intranasale Applikation von rOPN zu einem geringeren Schaden hippocampaler Strukturen führt, wobei die Daten 28 Tage nach den experimentellen Operationen erhoben wurden (249).

Mit dem in dieser Arbeit verwendeten Polytrauma-Modell konnten Ritter *et al.* einen vermehrten Substanzverlust der ipsiläsionalen Körnerzellschicht in Polytrauma-Tieren gegenüber Versuchstieren, die nur ein CCI erhalten haben, nachweisen (17). Bereits Schultz *et al.* konnten anhand eines experimentellen Modells für geschlossenes SHT in der Maus einen verstärkten histopathologischen Defekt, sowie eine verstärkte Neuroinflammationsreaktion nachweisen, wenn als Begleitverletzung eine geschlossene

Fraktur eines langen Röhrenknochens bestand. Hierbei konnte in den Polytrauma-Tieren 24 h und 35 Tage nach SHT und Fraktur eine signifikant erhöhte IL-1 $\beta$ -Konzentration im Gehirnparenchym nachgewiesen werden (15). Yang *et al.* konnten anhand eines experimentellen Modells für offenes SHT in der Maus 4 Tage nach der Operation ebenfalls, neben dem verstärkten histopathologischen Defekt, eine verstärkte Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 im Gehirnparenchym feststellen, wenn als Begleitverletzung eine geschlossene Fraktur der Tibia vorlag (14). Interessant für diese Arbeit ist nun die Rolle von OPN in dem komplexen pathophysiologischen Zusammenspiel von cerebraler und ossärer Schädigung, gerade da diese Arbeit zeigt, dass die Applikation von rOPN in einem Polytrauma-Modell zu einer Reduktion der lokalen histopathologischen Schädigung führt. Gong *et al.* konnten mittels eines Modells für intrazerebrale Blutung in Ratten zeigen, dass die intranasale Applikation von rOPN zu einer Dämpfung der akuten Neuroinflammationsreaktion führt. Hierbei postulieren sie eine Integrin- $\beta$ 1 induzierte Hemmung der JAK2/STAT-Signaltransduktionskaskade, was zu einer reduzierten Expression von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  führt (246). Über diesen Pathomechanismus könnte das in dem Polytrauma-Modell dieser Arbeit ICV applizierte rOPN, der frakturbedingten Mobilisation peripherer pro-inflammatorischer Mediatoren wie TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  entgegenwirken, und den lokalen histopathologischen Schaden durch eine Dämpfung der akuten Neuroinflammationsreaktion reduzieren. Die Genexpressions-Analyse im geschädigten Hirngewebe von TNF- $\alpha$  und weiteren neuroinflammatorischen Markern in dieser Arbeit, bestätigt diese Theorie zunächst nicht, aber dennoch sind weitere Untersuchungen in diesem interessanten Kontext durchaus sinnvoll.

### **6.3 Auswirkungen von appliziertem rOPN auf die Aktivierung von Gliazellen**

Neben der Genexpressionsanalyse von GFAP auf Transkript- und Proteinebene mittels qPCR und Western Blot, wurde der **Astrozyten**-Marker mittels immunhistochemischer Färbung detektiert. Im Rahmen der reaktiven Astroglieose steigern Astrozyten in einem hohen Ausmaß die Expression des Intermediärfilaments GFAP sowie des Serin-Protease-Inhibitors SerpA3n (92,99). Anhand der Anzahl GFAP-positiver Partikel in dem definierten rechtshemisphärischen Bereich, lässt sich auf die Aktivierung der lokalen periläsionalen Astrozyten schließen. Die mRNA- und Protein-Expressionslevel von GFAP und die mRNA-Expressionslevel von SerpA3n im geschädigten

Hirngewebe dienen ebenfalls als Marker der Astrogliose und damit auch als Marker der Neuroinflammationsreaktion.

Erwartungsgemäß zeigt die immunhistochemische Färbung 5 Tage nach Polytrauma-Operation in den ungeschädigten Hemisphären in allen Gruppen nur wenige reaktive Astrozyten, wobei keine signifikanten Unterschiede feststellbar sind.

In der verletzten Hemisphäre zeigen die Polytrauma-operierten Tiere 5 Tage nach dem Eingriff eine signifikant höhere Anzahl GFAP-positiver Partikel im periläsionalen Cortex gegenüber den scheinoperierten Tieren. Ergänzend kommt es zu diesem Zeitpunkt zu einer deutlichen Hochregulation der mRNA- und Protein Expression von GFAP, sowie der mRNA-Expression von Serp3An im geschädigten Hirngewebe der Polytrauma-operierten Tiere gegenüber den scheinoperierten Tieren. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse die zu erwartende gesteigerte Astrogliose im Rahmen der akuten Neuroinflammationsreaktion in den Polytrauma-operierten Tieren als Reaktion auf das SHT (91).

Vergleicht man nun die *poly rOPN*-Tiere mit den *poly veh*-Tieren, sind im periläsionalen Gewebe der *rOPN*-Tiere signifikant weniger GFAP-positive Partikel detektierbar als im periläsionalen Gewebe der Versuchstiere, die eine Trägerlösung erhalten haben. Entsprechend vermindert die ICV Applikation von rOPN die Ausbildung einer periläsionalen Astrogliose im geschädigten Hirngewebe fünf Tage nach kombiniertem Trauma aus CCI und Femurfraktur. Die Analyse der Genexpressionen der Astrozyten-Marker GFAP und Serp3An kann dies nicht bestätigen. Vergleicht man die *poly rOPN*-Gruppe mit der *poly veh*-Gruppe, so zeigen diese 5 Tage nach der Intervention keine signifikanten Unterschiede in der mRNA- und Protein-Expression von GFAP, sowie in der mRNA-Expression von Serp3An im geschädigten Hirngewebe. Eine Erklärung für diese zunächst widersprüchlichen Ergebnisse, könnte eine primär periläsionale Beeinflussung der Astrogliose durch OPN sein. So konnten Gliem *et al.* anhand eines experimentellen Modelles für Schlaganfall in der Maus nachweisen, dass OPN primär von hämatogenen Monozyten respektive Makrophagen, die die innere Grenzzone des Infarktes infiltrieren, exprimiert wird (19). Auch wenn die Pathomechanismen von Schlaganfall und SHT verschieden sind, könnte die ICV Applikation von rOPN zu einer gesteigerten Infiltration von hämatogenen Makrophagen in das periläsionale Gewebe führen. Dies hätte eine gesteigerte Expression von OPN im periläsionalen Gewebe zur Folge und würde somit die lokal reduzierte Astrogliose erklären. Dieser lokale Effekt

könnte zu gering sein, um anhand der mRNA- und Protein-Expressionsanalyse der ipsiläsionalen Hemisphäre reproduzierbar zu sein.

Die reduzierte periläsionale Astrogliose könnte für eine kontrollierte und milde Aktivierung der Astrozyten sprechen, wobei OPN die Differenzierung und Proliferation der Astrozyten in eine neuroprotektive Richtung regulieren könnte. So postulieren Vay *et al.* in einer aktuellen *in vitro* Studie, dass OPN unter Stressbedingungen die Entwicklung des neurotoxischen A1-Phänotyps unterdrückt und die Entwicklung des A2-Phänotyps, welcher neuroprotektive Eigenschaften aufweist, fördert, wobei deren Potential zur Expression von sowohl anti- als auch pro-inflammatorischer Zytokine erhalten bleibt (265). Ein weiterer neuroprotektiver Effekt von OPN der im Zusammenhang mit aktivierten Astrozyten diskutiert wird, ist die von Gliem *et al.* postulierte Rolle von OPN in der Polarisierung reaktiver Astrozyten. So konnte die Arbeitsgruppe anhand eines experimentellen Modelles für Schlaganfall in der Maus nachweisen, dass OPN mitverantwortlich dafür ist, dass Astrozyten, die sich in der äußeren Grenzzone des Infarktes befinden, ihre Fortsätze in Richtung des Infarktkernes migrieren. Hierdurch ist gewährleistet, dass die Endfüßchen der Astrozyten neugebildete Gefäße erreichen, was zu einer gesicherten Reetablierung der BHS führt (19). Die möglichen neuroprotektiven Effekte von OPN im Rahmen der Aktivierung und Differenzierung von Astrozyten in einem Polytrauma-Modell, gerade in Hinblick auf die Mechanismen, sind interessante Themen für weiterführende Untersuchungen.

Die **Mikroglia**-Marker Iba1 und TSPO wurden mittels immunhistochemischer Färbung bzw. mittels qPCR im Rahmen der mRNA-Expressionsanalyse detektiert.

In den Polytrauma-operierten Tieren kommt es gegenüber den scheinoperierten Tieren erwartungsgemäß zu einer deutlichen Hochregulation der mRNA-Expression von TSPO im geschädigten Hirngewebe 5 Tage nach Intervention. Auch die immunhistochemische Färbung zeigt zu diesem Zeitpunkt eine erhöhte Anzahl von Iba1-positiven Partikeln im periläsionalen Gewebe in den Polytrauma-operierten Tieren gegenüber den scheinoperierten Tieren, wobei sich hier lediglich ein Trend abzeichnet und keine signifikanten Unterschiede zu eruieren sind. Zusammenfassend spricht die Hochregulation der Mikroglia-Marker in den Polytrauma-Tieren für die zu erwartende Aktivierung von Mikrogliazellen im Rahmen der akuten Neuroinflammation als Reaktion auf das experimentelle SHT (74–77).

Sowohl bezogen auf die mRNA-Expression von TSPO im geschädigten Hirngewebe als auch auf die Anzahl Iba1-positiver Partikel im periläsionalen Hirngewebe, zeigt ein Vergleich der *poly rOPN*-Gruppe mit der *poly veh*-Gruppe am 5. posttraumatischen Tag keinen signifikanten Unterschied. Nach diesen Ergebnissen hat die ICV Applikation von rOPN keine Auswirkungen auf die Mikroglia-Aktivierung im geschädigten Hirngewebe 5 Tage nach kombiniertem Trauma aus CCI und Femurfraktur. Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit, konnte in einer *in vitro* Studie gezeigt werden, dass die Inkubation von Mikrogliazellen aus dem Schwein mit rOPN zu einer erhöhten Proliferation und Aktivierung der Mikroglia führt (266). Damit einhergehend konnten Julienne *et al.* mittels eines CCI-Modells in der Maus zeigen, dass eine intranasale Applikation von rOPN zu einer erhöhten Anzahl von aktivierter Mikroglia in der ipsiläsionalen Hemisphäre führt, wobei die Ergebnisse einen Tag nach Intervention erhoben wurden (252). Wichtig zu erwähnen ist, dass die Arbeitsgruppe zur Quantifizierung der Iba1-positiven Partikel die komplette zum Schaden ipsilaterale Hemisphäre verwendete, wohingegen in dieser Arbeit ein periläsionaler Ausschnitt ausgezählt wurde. Dennoch könnten die Ergebnisse dieser Arbeit sowie die Ergebnisse von Julienne *et al.* insofern übereinstimmen, dass eine erhöhte Verfügbarkeit von OPN einen Tag nach dem experimentellen SHT zu einer verstärkten Mikroglia-Aktivität führt, die nach 5 Tagen jedoch wieder auf das Niveau der *vehicle*-applizierten Tiere zurückfällt. Diese frühe Hochregulation der Mikroglia-Aktivität durch OPN, die sich im Verlauf wieder limitiert, könnte durchaus als neuroprotektiv interpretiert werden. Die Prozesse der Mikroglia-Aktivierung beider Studien in einen zeitlichen Zusammenhang zu bringen, erweist sich jedoch aufgrund des Polytrauma-Aspekts dieser Studie, sowie der unterschiedlichen Auswertung der immunhistochemischen Färbung und der unterschiedlichen Applikationsformen von rOPN, als schwierig. Um diese Theorie entsprechend zu verifizieren, müssen weitere Untersuchungen zu gleichen Bedingungen durchgeführt werden.

#### **6.4 Auswirkungen von appliziertem rOPN auf die Polytrauma-induzierte Genexpression im Gehirn**

Die Genexpressionsanalyse des geschädigten Hirngewebes wurde 5 Tage nach Intervention auf mRNA-Ebene mittels qPCR und auf Proteinebene mittels Western-Blot durchgeführt.

Mit den Ergebnissen der immunhistochemischen Färbung übereinstimmend, kommt es 5 Tage nach Intervention in den Polytrauma-operierten Tieren gegenüber den scheinoperierten Tieren zu einer Hochregulation der Astrozyten-Marker GFAP und SerpA3n, sowie des Mikroglia-Markers TSPO im geschädigten Hirngewebe. Damit einhergehend sind das akute Phase Zytokin TNF- $\alpha$ , sowie das pro-inflammatorisch wirkende Spaltprodukt GRN im geschädigten Hirngewebe der Polytrauma-Tiere deutlich hochreguliert, wohingegen die scheinoperierten Tiere lediglich geringe Expressionslevel aufweisen. Diese Ergebnisse lassen sich mit der Hochregulation pro-inflammatorischer Mediatoren im geschädigten Hirngewebe, sowie der Aktivierung von Astrozyten und Mikrogliazellen im Rahmen der CCI-bedingten akuten Neuroinflammationsreaktion vereinbaren.

Vergleicht man nun die *poly rOPN*- mit der *poly veh*-Gruppe, hat die ICV Applikation von rOPN keine Auswirkungen auf die Expression der Astrozyten- und Mikroglia-Marker, sowie auf die Expression der neuroinflammatorischen Marker GRN und TNF- $\alpha$  im geschädigten Hirngewebe am 5. Tag nach kombinierter cerebraler und ossärer Schädigung. Diese Daten sprechen dafür, dass die Neuroinflammationsreaktion 5 Tage nach Anwendung des Polytrauma-Modells von der erhöhten Verfügbarkeit von OPN unbeeinflusst bleibt. Entgegen diesen Erkenntnissen konnten Rabenstein *et al.* in einer *in vitro* Studie zeigen, dass OPN die Zytokin-Expression in Mikrogliazellen unter Stressbedingungen in Richtung eines anti-inflammatorischen Profils moduliert. So wiesen Mikrogliazellen, die mit LPS stimuliert und mit OPN inkubiert wurden eine signifikant geringere TNF- $\alpha$  und IL-6 Expression auf als Mikrogliazellen, die nicht mit OPN inkubiert wurden (268). Selbsterklärend ist die Übertragung von Ergebnissen aus *in vitro* Studien auf einen Modellorganismus oder den Menschen schwierig, dennoch zeigt OPN hier deutliche neuroprotektive Eigenschaften. Damit einhergehend konnten Gong *et. al* anhand eines tierexperimentellen Modells für intrazerebrale Blutung in Ratten zeigen, dass die intranasale Applikation von rOPN zu einer Dämpfung der akuten Neuroinflammationsreaktion einhergehend mit einer reduzierten Expression von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  führt. Die Genexpressionsdaten wurden 24 Stunden nach den experimentellen Operationen erhoben (246). Die Zusammenschau dieser Arbeit mit der Studie von Gong *et al.* impliziert, dass messbare neuroprotektive Effekte von appliziertem OPN, gerade die Zytokin-Expression im geschädigten Hirngewebe betreffend, primär früh nach den experimentellen Operationen auftreten, und zum Beobachtungszeitpunkt dieser Arbeit (5 Tage nach Intervention) nicht mehr nachweisbar sind. Aber auch hier

ist ein Vergleich beider Studien aufgrund der unterschiedlichen Applikationsformen von rOPN und den unterschiedlichen Modellen experimenteller Hirnschädigung schwierig, was weitere Studien zu gleichen Bedingungen zur Klärung dieser Fragestellung sinnvoll macht.

Ein weiterer wichtiger Punkt, der bei der Expressionsanalyse pro-inflammatorischer Mediatoren im geschädigten Hirngewebe beachtet werden muss, ist der Polytrauma-Aspekt dieser Studie. So konnte bereits mehrfach anhand eines experimentellen SHT-Modells in der Maus eine verstärkte Neuroinflammation nachgewiesen werden, wenn gleichzeitig eine Fraktur eines langen Röhrenknochens vorliegt (14,15,17,281). Entsprechend sind in dieser Polytrauma-Studie gegenüber Studien, die die Auswirkungen einer rOPN Applikation rein anhand von Modellen tierexperimenteller Hirnschädigung erforschen, schwierigere Grundvoraussetzungen im Sinne einer verstärkten Neuroinflammation gegeben. Die fraktur-bedingte Induktion pro-inflammatorischer Zytokine, sowie die Mobilisation peripherer pro-inflammatorischer Mediatoren von der Fraktur zum Gehirn, könnten hierbei das Messen möglicher neuroprotektiver Effekte durch die ICV Applikation von rOPN erschweren.

## **6.5 Auswirkungen von appliziertem rOPN auf die mit Nekrose und Apoptose assoziierte Degradation von $\alpha$ -Spektrin**

Die 145 kDa und 150 kDa schweren Spaltprodukte, die aus der Degradation von  $\alpha$ -Spektrin durch Calpain resultieren und als Nekrose- und Apoptose-Marker dienen (277,278), wurden mittels Western Blot detektiert.

Die Polytrauma-operierten Tiere zeigen gegenüber den scheinoperierten Tieren 5 Tage nach den experimentellen Operationen eine höhere Konzentration der  $\alpha$ -Spektrin-Spaltprodukte in dem geschädigten Hirngewebe, wobei der Vergleich der *sham rOPN*-Gruppe mit der *poly rOPN*-Gruppe hierbei lediglich einen statistischen Trend ( $p = 0,0951$ ) aufweist. Dennoch spiegeln diese Ergebnisse den gesteigerten neuronalen Zelltod in Form von Nekrose und Apoptose im Rahmen eines SHTs wider (47).

Vergleicht man nun die *poly rOPN*-Gruppe mit der *poly veh*-Gruppe zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der Konzentration der Nekrose- und Apoptose-Marker im geschädigten Hirngewebe. Nach diesen Ergebnissen kann am 5. postinterventionellen Tag kein Einfluss der ICV Applikation von rOPN im Rahmen dieses Polytrauma-Modells auf die Prozesse der Nekrose und Apoptose im geschädigten Hirngewebe

nachgewiesen werden. Dem gegenüber postulieren Topkoru *et al.* anhand eines Modells für Subarachnoidalblutung in Ratten einen verringerten neuronalen Zelltod nach nasaler OPN-Applikation, wobei diese Daten einen Tag nach den experimentellen Operationen erhoben wurden (20). Gerade in Hinblick auf den in dieser Studie detektierten verringerten Zelltod hippocampaler Neurone, lässt sich auch hier die These aufstellen, dass das applizierte rOPN in einer frühen Phase nach den experimentellen Operationen neuronalen Zelltod verhindert, wobei dieser neuroprotektive Effekt auf Proteinebene nach 5 Tagen nicht mehr messbar ist. Der Vergleich beider Studien ist aufgrund der bekannten Limitationen, wie die unterschiedliche Applikationsform von rOPN und den verschiedenen Modellen experimenteller Hirnschädigung, erschwert. Zudem verwenden beide Arbeiten unterschiedliche Zielproteine die Signaltransduktionskaskade von Apoptose und Nekrose betreffend. Neben der Hemmung der Apoptose, wird OPN die Förderung von Autophagie, sowie die Regulation der Interaktion von Autophagie und Apoptose in eine neuroprotektive Richtung zugeschrieben (248,249). Dies sind weitere interessante Aspekte, die gerade in Zusammenhang mit der Frage nach dem Zeitpunkt der anti-apoptotischen Wirkung von OPN, eine Grundlage für weitere Forschungsprojekte bilden.

## **6.6 Auswirkungen von appliziertem rOPN auf die OPN-Serumkonzentration und die OPN-Genexpression im Gehirn**

Die Genexpressionsanalyse von OPN im geschädigten Hirngewebe erfolgte auf mRNA-Expressionsebene mittels qPCR und auf Protein-Expressionsebene mittels Western-Blot, die OPN-Serumkonzentration wurde mittels ELISA bestimmt.

Fünf Tage nach den experimentellen Operationen zeigen die Polytrauma-Tiere eine signifikant höhere OPN-Serumkonzentration als die scheinoperierten Tiere, was durch Ritter *et al.* im Rahmen einer Polytrauma-Studie bestätigt werden kann. Darüber hinaus konnte die Arbeitsgruppe 5 Tage nach den Interventionen eine signifikant höhere OPN-Serumkonzentration in den Polytrauma-operierten Tieren gegenüber Versuchstieren mit den Einzelverletzungen Femurfraktur oder CCI feststellen, was die Vermutung eines additiven Effekts in den Tieren mit kombinierter Verletzung nahelegt (17). Zusammenfassend ist OPN als pro-inflammatorisches Zytokin (204) im akuten Verlauf nach kombinierter cerebraler und ossärer Schädigung im Serum vermehrt verfügbar, wobei sowohl die akute Neuroinflammationsreaktion im Rahmen des CCI, als auch die akute Entzündungsreaktion im Rahmen der Frakturheilung dazu beitragen.



Vergleicht man nun am 5. postinterventionellen Tag die *poly rOPN*-Gruppe mit der *poly veh*-Gruppe, zeigt sich, dass die ICV Applikation von rOPN keine Auswirkungen auf die Serumkonzentration von OPN hat.

Im Rahmen der Genexpressionsanalyse des geschädigten Hirngewebes auf mRNA- und Protein-Ebene zeigt sich, dass OPN am 5. Tag nach Intervention in den scheinoperierten Tieren kaum exprimiert ist, wohingegen das experimentelle Trauma zu einer enormen Hochregulation des Glykoproteins führt. Diese Ergebnisse spiegeln die Hochregulation des pro-inflammatorischen Zytokins OPN im geschädigten Hirngewebe im Rahmen der akuten Neuroinflammationsreaktion (262) nach CCI wider und decken sich mit den Ergebnissen der Polytrauma-Studie von Ritter *et al.*. Weiterhin konnten Ritter *et al.* in dieser Studie zeigen, dass die Femurfraktur keinen Einfluss auf die OPN-Genexpression im geschädigten Hirngewebe hat, wobei diese Daten ebenfalls am 5. postinterventionellen Tag erhoben wurden (17). Somit scheint die Hochregulation von OPN in der geschädigten Hirnregion von dem Polytrauma-Aspekt unbeeinflusst und rein eine Reaktion auf die cerebrale Pathologie zu sein.

Die ICV Applikation von rOPN scheint hingegen keine Auswirkungen auf die endogene Expression von OPN im geschädigten Hirngewebe 5 Tage nach den experimentellen Operationen zu haben, da sich die *poly rOPN*-Tiere und die *poly veh*-Tiere zu diesem Zeitpunkt nicht in der OPN mRNA- und Protein-Expression unterscheiden. Unter der Annahme, dass das applizierte rOPN anhand des Western-Blots auf Proteinebene detektiert wird, ist das verabreichte rOPN am 5. Tag postinterventionell im geschädigten Hirngewebe nicht oder nicht mehr nachweisbar, da beide Polytrauma-operierten Gruppen annähernd gleiche OPN-Proteinkonzentrationen im geschädigten Hirngewebe aufweisen. Die Vermutung liegt nahe, dass eine mögliche Hochregulation der endogenen OPN Genexpression durch das applizierte rOPN, sowie das rekombinante Protein selbst, am 5. postinterventionellen Tag im geschädigten Hirngewebe nicht mehr nachweisbar sind, da die Induktion in einer früheren postinterventionellen Phase stattfinden könnte und das rekombinante OPN bereits degradiert sein könnte. Grundsätzlich stellt sich aber die Frage nach der Art der Applikation von rOPN und inwieweit das rekombinante Protein den Ort des Schadens erreicht. In Modellen tierexperimenteller Hirnschädigung konnten bereits neuroprotektive Effekte durch die ICV Applikation von rOPN nachgewiesen werden, was nahe legt, dass das rekombinante Protein auf diesem Wege das entsprechende Zielgewebe erreicht (282,283). Eine weitere etablierte Applikationsform ist die intranasale Gabe von rOPN, die in einem klinischen Kontext

anwendbar ist (247) und mögliche Limitationen durch die invasivere Methode der ICV Applikation nicht aufweist, wobei sich bei dieser Applikationsform die Frage stellt, ob das rekombinante Protein über den nasalen Zugangsweg das verletzte Hirngewebe erreicht. Topkoru *et al.* konnten in Ratten anhand erhöhter OPN-Liquorkonzentrationen nachweisen, dass das intranasal applizierte rOPN das zentrale Nervensystem erreicht (20). Sun *et al.* konnten anhand eines Modells für Subarachnoidalblutung in Ratten feststellen, dass die intranasale Applikation von rOPN zu einer deutlichen Zunahme der OPN-Proteinkonzentration, sowie verschiedener Spaltprodukte von OPN in der ipsiläsionalen Hemisphäre führt, wobei diese Daten 24 Stunden postinterventionell mittels Western Blot erhoben wurden (248). Diese erhöhten Proteinkonzentrationen in der ipsiläsionalen Hemisphäre sind vermutlich durch die rOPN-bedingte Induktion der endogenen OPN-Expression, sowie durch den additiven Effekt des rekombinanten Proteins selbst erklärbar. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass das rekombinante OPN über den nasalen Weg das Zielgewebe im zentralen Nervensystem erreicht, was die intranasale Applikation zu einer interessanten Alternative gegenüber der ICV Variante macht. Außerdem stützt die Studie von Sun *et al.* die These, dass das applizierte, rekombinante OPN in einer frühen postinterventionellen Phase die endogene Expression von OPN induziert, wobei diese Effekte am 5. postinterventionellen Tag möglicherweise nicht mehr messbar sind.

## 6.7 Limitationen und Aussichten

Diese Arbeit weist Limitationen auf, die beachtet werden müssen. So wurden nur weibliche Mäuse als Versuchstiere verwendet. Eine neuere Studie zeigt, dass sowohl tierexperimentelle SHT-Studien, als auch Schädel-Hirn-Trauma des Menschen durch das Geschlecht beeinflusst sind (284). Eine weitere Limitation der Studie ist der Einfluss der Femurfraktur auf Untersuchungen, die das neurologische „outcome“ betreffen. Im Rahmen der experimentellen Femur-Operation wird zwar durch die intramedulläre Schienung eine gewisse Stabilität und Beweglichkeit sichergestellt, dennoch ist es hierbei schwierig Funktionsstörungen in den Versuchstieren sicher einer Störung des Bewegungsapparates oder einer zentral-motorischen Störung zuzuordnen. Abschließend sind noch mögliche, nicht gewünschte Gehirnverletzungen, die durch die Kraniotomie und durch die ICV Applikation entstehen könnten, als Limitationen dieser Studie zu nennen.

Zusammenfassend reduziert die ICV Applikation von rOPN die lokale histopathologische Schädigung, sowie die periläsionale Astroglie im geschädigten Hirngewebe fünf Tage nach kombiniertem Trauma aus CCI und Femurfraktur. In Zusammenschau mit anderen Studien, lässt sich vermuten, dass weitere neuroprotektive Effekte des applizierten rOPNs, in einer frühen Phase nach den experimentellen Operationen initiiert werden, am 5. postinterventionellen Tag jedoch schon nicht mehr messbar sind. Somit wären weitere tierexperimentelle SHT- oder Polytrauma-Studien sinnvoll, die die neuroprotektive Wirkung von OPN in einem zeitlichen Kontext betrachten, um mögliche Dynamiken im Verlauf zu eruieren. Damit einhergehend wären auch tierexperimentelle Langzeitstudien, die die neuroprotektive Wirkung von OPN untersuchen, interessant, da sich aktuelle Studien zur Datenerhebung primär auf frühe Zeitpunkte nach den experimentellen Operationen konzentrieren. Weiterhin ist es sinnvoll das tierexperimentelle Polytrauma-Modell im Kontext der OPN-Forschung verstärkt zu etablieren. Die aktuelle Literatur verwendet in diesem Kontext primär isolierte Modelle experimenteller Hirnschädigung, ohne einen möglichen Polytrauma-Aspekt, wie die Fraktur eines langen Röhrenknochens, zu beachten. Um die Auswirkungen der Femurfraktur oder generell die Auswirkungen des Polytrauma-Aspekts auf neuroprotektive Effekte einer rOPN-Applikation genauer zu untersuchen, wäre eine Polytrauma-Studie, die zusätzlich CCI-Tiere, FF-Tiere und Polytrauma-Tiere miteinander vergleicht, ein sinnvoller Ansatz. Darüber hinaus hat sich die intranasale Applikation von rOPN in aktuellen Studien etabliert und bewährt. Gerade aufgrund der möglichen Anwendung in einem klinischen Kontext, sowie der deutlich geringeren Invasivität gegenüber der ICV Applikation, wäre es interessant, diese Form der rOPN-Gabe im Rahmen einer Polytrauma-Studie zu erproben.

## 7 Zusammenfassung

Das Schädel-Hirn-Trauma (SHT) ist eine der führenden Ursachen für Tod und Behinderung, wobei weltweit pro Jahr von 69 Millionen Menschen, die von einem SHT betroffen sind, ausgegangen werden muss (4). Da ein SHT oft im Zusammenhang mit Autounfällen oder Stürzen auftritt, wird es häufig von weiteren Verletzungen, wie Frakturen langer Röhrenknochen, begleitet (7–10). Erweist sich eine dieser Verletzung oder die Kombination der Verletzungen als lebensbedrohlich, spricht man von einem Polytrauma (11). Bei prognostischen Überlegungen spielt das SHT im Rahmen eines Polytraumas eine entscheidende Rolle. So weisen Polytrauma-Patienten mit SHT eine höhere Mortalität und schlechtere Regenerationsfähigkeit auf (12,13). Entsprechend nimmt die Neuroprotektion und damit die Verringerung der Sekundärschädigung in der Forschung und Therapie des Polytraumas eine zentrale Rolle ein.

Für das Glykoprotein Osteoponin (OPN) wurden bereits in verschiedenen Modellen experimenteller Hirnschädigung wie intrazerebrale Blutung (245,246), Subarachnoidalblutung (20,247–249), Schlaganfall (250) und SHT (251,252) neuroprotektive Effekte aufgezeigt. Ziel dieser Arbeit war die Evaluation der neuroprotektiven Eigenschaften von OPN in einem murinen Polytrauma-Modell aus kombinierter cerebraler und ossärer Schädigung. Hierbei erfolgte die Applikation von rekombinantem Osteopontin (rOPN) oder einer Vehikellösung durch eine intracerebroventrikuläre (ICV) Injektion, die unmittelbar vor dem kombinierten Trauma aus rechtsparietalem *controlled cortical impact* (CCI) und intramedullär stabilisierter linksseitiger Femurfraktur oder der Scheinoperation durchgeführt wurde. Postinterventionell wurden zunächst verhaltenspathophysiologische Untersuchungen durchgeführt, bevor am fünften posttraumatischen Tag die Euthanasie der Versuchstiere erfolgte. Hieran schlossen sich weitere Untersuchungen auf histopathologischer, molekularbiologischer und biochemischer Ebene an.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die ICV Applikation von rOPN zu einer Reduktion der histopathologischen Schädigung ipsiläsional-hippocampaler Strukturen, sowie zu einer Reduktion der periläsionalen Astrogliose fünf Tage nach der experimentellen Polytrauma-Operation führt. Die immunhistochemischen und histopathologischen Effekte konnten zu diesem Zeitpunkt durch die Gen-Expressionsanalyse der Marker für Neuroinflammation und Apoptose nicht bestätigt werden. In

Zusammenschau mit anderen Studien, lässt sich vermuten, dass die neuroprotektiven Effekte des applizierten rOPNs in einer frühen posttraumatischen Phase initiiert werden und auf mRNA- und Protein-Expressionsebene am 5. postinterventionellen Tag womöglich nicht mehr messbar sind. Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse darauf schließen, dass eine erhöhte Verfügbarkeit von OPN in dem komplexen pathophysiologischen Zusammenspiel von cerebraler und ossärer Schädigung neuroprotektive Effekte hat.

Neben bereits postulierten neuroprotektiven Effekten in verschiedenen Modellen experimenteller Hirnschädigung, konnte diese Arbeit zeigen, dass OPN auch im Kontext eines murinen Polytrauma-Modells neuroprotektive Eigenschaften aufzeigt, was das Glykoprotein umso interessanter für mögliche therapeutische Anwendungen am Menschen macht.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Maas AI, Stocchetti N, Bullock R. Moderate and severe traumatic brain injury in adults. *Lancet Neurol.* 2008 Aug 1;7(8):728–41.
2. Rickels E, von Wild K, Wenzlaff P BW. Schädel-Hirn-Verletzung. Epidemiologie und Versorgung. Ergebnisse einer prospektiven Studie. Zuckschwerdt; 2006. 258 p.
3. Firsching R, Rickels E, Mauer UM, Sakowitz OW, Messing-Jünger M. Leitlinie Schädel-Hirn-Trauma im Erwachsenenalter. Leitlin Schädel-Hirn-Trauma im Erwachsenenalter, Dtsch Gesellschaft für Neurochir. 2015;
4. Dewan MC, Rattani A, Gupta S, Baticulon RE, Hung Y-C, Punchak M, et al. Estimating the global incidence of traumatic brain injury. *J Neurosurg.* 2018 Apr 27;130(4):1080–97.
5. Walter J, Zweckberger K. Traumatic Injuries of the Central Nervous System. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmedizin Schmerztherapie.* 2018;53(10):668–81.
6. Freude G, Mauer UM, Gässler H, Datzmann T. Prähospitale Versorgung des Schädel-Hirn-Traumas. *Notarzt.* 2017 Dec 1;33(6):300–9.
7. Gennarelli TA, Champion HR, Copes WS, Sacco WJ. Comparison of mortality, morbidity, and severity of 59,713 head injured patients with 114,447 patients with extracranial injuries. *J Trauma - Inj Infect Crit Care.* 1994;37(6):962–8.
8. Maegele M, Lefering R, Sakowitz O, Kopp MA, Schwab JM, Steudel W-I, et al. The Incidence and Management of Moderate to Severe Head Injury. *Dtsch Arztebl Int.* 2019;116(10):167–73.
9. Höfer C, Lefering R. Jahresbericht 2021 - TraumaRegister DGU. 2021;
10. Li M, Zhao Z, Yu G, Zhang J. Epidemiology of Traumatic Brain Injury over the World: A Systematic Review. *Austin Neurol Neurosci.*
11. Tscherne H, Oestern H-J, Sturm JA. Stress tolerance of patients with multiple injuries and its significance for operative care. *Langenbecks Arch Chir.* 1984 Dec 1;364(1):71–7.
12. Gross T, Schüepp M, Attenberger C, Pargger H, Amsler F. Outcome in polytraumatized patients with and without brain injury. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2012;56(9):1163–74.
13. Andruszkow H, Probst C, Grün O, Krettek C, Hildebrand F. Does additional head trauma affect the long-term outcome after upper extremity trauma in multiple traumatized patients: Is there an additional effect of traumatic brain injury? *Clin*

- Orthop Relat Res. 2013;471(9):2899–905.
14. Yang L, Guo Y, Wen D, Yang L, Chen Y, Zhang G, et al. Bone Fracture Enhances Trauma Brain Injury. *Scand J Immunol.* 2016;83(1):26–32.
  15. Shultz SR, Sun M, Wright DK, Brady RD, Liu S, Beynon S, et al. Tibial fracture exacerbates traumatic brain injury outcomes and neuroinflammation in a novel mouse model of multitrauma. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2015;35(8):1339–47.
  16. Brady RD, Grills BL, Church JE, Walsh NC, McDonald AC, Agoston D V., et al. Closed head experimental traumatic brain injury increases size and bone volume of callus in mice with concomitant tibial fracture. *Sci Rep.* 2016;6(September):1–9.
  17. Ritter K, Jung K, Dolderer C, Appel D, Oswald CC, Ritz U, et al. Early Reciprocal Effects in a Murine Model of Traumatic Brain Injury and Femoral Fracture. *Mediators Inflamm.* 2021;2021:8835730.
  18. Chan JL, Reeves TM, Phillips LL. Osteopontin expression in acute immune response mediates hippocampal synaptogenesis and adaptive outcome following cortical brain injury. *Exp Neurol.* 2014 Nov 1;261:757–71.
  19. Gliem M, Krammes K, Liaw L, van Rooijen N, Hartung H-P, Jander S. Macrophage-derived osteopontin induces reactive astrocyte polarization and promotes re-establishment of the blood brain barrier after ischemic stroke. *Glia.* 2015 Dec;63(12):2198–207.
  20. Topkuru BC, Altay O, Duris K, Krafft PR, Yan J, Zhang JH. Nasal Administration of Recombinant Osteopontin Attenuates Early Brain Injury After Subarachnoid Hemorrhage. *Stroke.* 2013 Nov;44(11):3189–94.
  21. Brown A. OSTEOPONTIN: A KEY LINK BETWEEN IMMUNITY, INFLAMMATION AND THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM. *Transl Neurosci.* 2012 Feb 1;3(3):288–93.
  22. Statistisches Bundesamt. Gesundheit - Todesursachen in Deutschland [Internet]. Vol. 12, Destatis. 2017. p. Wiesbaden. Available from: [https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen2120400157004.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen2120400157004.pdf?__blob=publicationFile)
  23. Peeters W, van den Brande R, Polinder S, Brazinova A, Steyerberg EW, Lingsma HF, et al. Epidemiology of traumatic brain injury in Europe. *Acta Neurochir (Wien).* 2015;157(10).
  24. Roozenbeek B, Maas AIR, Menon DK. Changing patterns in the epidemiology

- of traumatic brain injury. *Nat Rev Neurol*. 2013;9(4).
25. Gardner RC, Dams-O'Connor K, Morrissey MR, Manley GT. Geriatric traumatic brain injury: Epidemiology, outcomes, knowledge gaps, and future directions. Vol. 35, *Journal of Neurotrauma*. 2018.
  26. Ratcliff G, Colantonio A, Escobar M, Chase S, Vernich L. Long-term survival following traumatic brain injury. Vol. 27, *Disability and Rehabilitation*. 2005.
  27. GBD 2016 Traumatic Brain Injury and Spinal Cord Injury Collaborators G 2016 TBI and SCI. Global, regional, and national burden of traumatic brain injury and spinal cord injury, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol*. 2019;18(1):56–87.
  28. Gavett BE, Stern RA, Cantu RC, Nowinski CJ, McKee AC. Mild traumatic brain injury: A risk factor for neurodegeneration. Vol. 2, *Alzheimer's Research and Therapy*. 2010.
  29. Collins RL, Pastorek NJ, Tharp AT, Kent TA. Behavioral and Psychiatric Comorbidities of TBI. In: *Traumatic Brain Injury*. 2012.
  30. Chauhan NB. Chronic neurodegenerative consequences of traumatic brain injury. *Restor Neurol Neurosci*. 2014;32(2).
  31. Jorge RE, Arciniegas DB. Mood Disorders After TBI. Vol. 37, *Psychiatric Clinics of North America*. 2014.
  32. Pitkänen A, Kempainen S, Ndoe-Ekane XE, Huusko N, Huttunen JK, Gröhn O, et al. Posttraumatic epilepsy - Disease or comorbidity? Vol. 38, *Epilepsy and Behavior*. 2014.
  33. Cole JH, Leech R, Sharp DJ. Prediction of brain age suggests accelerated atrophy after traumatic brain injury. *Ann Neurol*. 2015;77(4).
  34. Pöttker B, Stöber F, Hummel R, Angenstein F, Radyushkin K, Goldschmidt J, et al. Traumatic brain injury causes long-term behavioral changes related to region-specific increases of cerebral blood flow. *Brain Struct Funct*. 2017;222(9):4005–21.
  35. Tagge CA, Fisher AM, Minaeva O V., Gaudreau-Balderrama A, Moncaster JA, Zhang XL, et al. Concussion, microvascular injury, and early tauopathy in young athletes after impact head injury and an impact concussion mouse model. *Brain*. 2018;141(2).
  36. Coronado VG, McGuire LC, Faul M, Sugerman DE, Pearson WS. Traumatic Brain Injury Epidemiology and Public Health Issues. In: *Brain Injury Medicine*.



- 2018.
37. Finkelstein EA, Corso PS, Miller TR. The Incidence and Economic Burden of Injuries in the United States. *The Incidence and Economic Burden of Injuries in the United States*. 2009.
  38. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) DW, Kellermann A, McGuire LC, Chen B, Popovic T. CDC grand rounds: reducing severe traumatic brain injury in the United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2013 Jul 12;62(27):549–52.
  39. Teasdale G, Jennett B. ASSESSMENT OF COMA AND IMPAIRED CONSCIOUSNESS. A Practical Scale. *Lancet*. 1974;304(7872).
  40. Brihaye J, Frowein RA, Lindgren S, Loew F, Stroobandt G. Report on the meeting of the W.F.N.S. neuro-traumatology committee, Brussels, 19-23 September 1976. *Acta Neurochir (Wien)*. 1978 Mar;40(1–2):181–6.
  41. Lorenz R. Neurotraumatologie. Standardisierte Nomenklatur. Berlin: Springer; 1990.
  42. Teasdale G, Jennett B. Assessment and prognosis of coma after head injury. *Acta Neurochir (Wien)*. 1976;34(1–4):45–55.
  43. Engelhard K, Müller-Forell W, Werner C. Therapie des schweren schädel-hirn-traumas. Vol. 57, *Anaesthesist*. 2008.
  44. Adams JH, Graham DI, Anderson JR. An introduction to neuropathology. Churchill Livingstone; 1994. 417 p.
  45. Kinoshita K. Traumatic brain injury: pathophysiology for neurocritical care. 2016;
  46. Saatman KE, Duhaime A, Bullock R, Maas AI, Valadka A, Manley GT, et al. Classification of Traumatic Brain Injury for Targeted Therapies. 2008;
  47. Werner C, Engelhard K. Pathophysiology of traumatic brain injury. Vol. 99, *British Journal of Anaesthesia*. 2007.
  48. Hutchinson PJ, Koliakos AG, Timofeev IS, Corteen EA, Czosnyka M, Timothy J, et al. Trial of decompressive craniectomy for traumatic intracranial hypertension. *N Engl J Med*. 2016;375(12).
  49. Andrews PJD, Sinclair HL, Rodriguez A, Harris BA, Battison CG, Rhodes JKJ, et al. Hypothermia for intracranial hypertension after traumatic brain injury. *N Engl J Med*. 2015;373(25).
  50. Baethmann A, Eriskat J, Stoffel M, Chapuis D, Wirth A, Plesnila N. Special aspects of severe head injury: recent developments. *Curr Opin Anaesthesiol*.

- 1998 Apr;11(2):193–200.
51. McIntosh TK, Smith DH, Meaney DF, Kotapka MJ, Gennarelli TA, Graham DI. Neuropathological sequelae of traumatic brain injury: relationship to neurochemical and biomechanical mechanisms. *Lab Invest.* 1996 Feb 1;74(2):315–42.
  52. Nortje J, Menon DK. Traumatic brain injury: physiology, mechanisms, and outcome. *Curr Opin Neurol.* 2004 Dec;17(6):711–8.
  53. Szydlowska K, Tymianski M. Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium.* 2010 Feb 1;47(2):122–9.
  54. Stiefel MF, Tomita Y, Marmarou A. Secondary ischemia impairing the restoration of ion homeostasis following traumatic brain injury. *J Neurosurg.* 2005 Oct 1;103(4):707–14.
  55. Bullock R, Zauner A, Woodward JJ, Myseros J, Choi SC, Ward JD, et al. Factors affecting excitatory amino acid release following severe human head injury. *J Neurosurg.* 1998;89(4).
  56. Robertson CL, Bell MJ, Kochanek PM, Adelson PD, Ruppel RA, Carcillo JA, et al. Increased adenosine in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury in infants and children: Association with severity of injury and excitotoxicity. *Crit Care Med.* 2001;29(12).
  57. 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. Vol. 11, *Neuropsychiatric Disease and Treatment.* 2015.
  58. Floyd CL, Gorin FA, Lyeth BG. Mechanical strain injury increases intracellular sodium and reverses Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange in cortical astrocytes. *Glia.* 2005;51(1).
  59. Yi JH, Hazell AS. Excitotoxic mechanisms and the role of astrocytic glutamate transporters in traumatic brain injury. *Neurochem Int.* 2006;48(5).
  60. DeWitt DS, Prough DS. Traumatic Cerebral Vascular Injury: The Effects of Concussive Brain Injury on the Cerebral Vasculature. *J Neurotrauma.* 2003 Sep 8;20(9):795–825.
  61. Sullivan PG, Rabchevsky AG, Waldmeier PC, Springer JE. Mitochondrial permeability transition in CNS trauma: Cause or effect of neuronal cell death? In: *Journal of Neuroscience Research.* 2005.

62. Schäfer MKE, Pfeiffer A, Jaeckel M, Pouya A, Dolga AM, Methner A. Regulators of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> homeostasis in cerebral ischemia. *Cell Tissue Res.* 2014 Aug 9;357(2):395–405.
63. Olmos G, Lladó J. Tumor necrosis factor alpha: a link between neuroinflammation and excitotoxicity. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:861231.
64. Simon DW, Mcgeachy M, Bayır H, Clark RSB, Loane DJ, Kochanek PM. Neuroinflammation in the Evolution of Secondary Injury, Repair, and Chronic Neurodegeneration after Traumatic Brain Injury HHS Public Access. *Nat Rev Neurol.* 2017;13(3).
65. Corps KN, Roth TL, McGavern DB. Inflammation and neuroprotection in traumatic brain injury. *JAMA Neurol.* 2015;72(3).
66. Morganti-Kossmann MC, Rancan M, Stahel PF, Kossmann T. Inflammatory response in acute traumatic brain injury: A double-edged sword. Vol. 8, *Current Opinion in Critical Care.* 2002.
67. Goldstein LE, Fisher AM, Tagge CA, Zhang X-L, Velisek L, Sullivan JA, et al. Chronic traumatic encephalopathy in blast-exposed military veterans and a blast neurotrauma mouse model. *Sci Transl Med.* 2012 May 16;4(134):134ra60.
68. Uchidan K. Redox-derived damage-associated molecular patterns: Ligand function of lipid peroxidation adducts. Vol. 1, *Redox Biology.* 2013.
69. Sheikh AM, Nagai A, Ryu JK, McLarnon JG, Kim SU, Masuda J. Lysophosphatidylcholine induces glial cell activation: Role of rho kinase. *Glia.* 2009;57(8).
70. Loane DJ, Byrnes KR. Role of microglia in neurotrauma. *Neurotherapeutics.* 2010 Oct;7(4):366–77.
71. van Furth R, Cohn ZA, Hirsch JG, Humphrey JH, Spector WG, Langevoort HL. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull World Health Organ.* 1972;46(6):845–52.
72. Ransohoff RM, Cardona AE. The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. Vol. 468, *Nature.* 2010.
73. Graeber MB. Changing Face of Microglia. *Science* (80- ). 2010 Nov 5;330(6005):783–8.
74. Manitz MP, Plümper J, Demir S, Ahrens M, Eßlinger M, Wachholz S, et al. Flow cytometric characterization of microglia in the offspring of PolyI:C treated mice.

- Brain Res. 2016 Apr 1;1636:172–82.
75. Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain Res Mol Brain Res.* 1998 Jun 1;57(1):1–9.
  76. Airas L, Rissanen E, Tuisku J, Gardberg M, Rinne JO. Microglial activation correlates with disease progression in multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 2015;357.
  77. Hummel R, Ulbrich S, Appel D, Li S, Hirnet T, Zander S, et al. Administration of all- *trans* retinoic acid after experimental traumatic brain injury is brain protective. *Br J Pharmacol.* 2020 Nov 23;177(22):5208–23.
  78. Colton CA. Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. Vol. 4, *Journal of Neuroimmune Pharmacology.* 2009.
  79. Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: Mechanism and functions. Vol. 32, *Immunity.* 2010.
  80. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: In vivo veritas. Vol. 122, *Journal of Clinical Investigation.* 2012.
  81. Wang G, Zhang J, Hu X, Zhang L, Mao L, Jiang X, et al. Microglia/macrophage polarization dynamics in white matter after traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2013;33(12).
  82. Loane DJ, Kumar A, Stoica BA, Cabatbat R, Faden AI. Progressive neurodegeneration after experimental brain trauma: Association with chronic microglial activation. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2014;73(1).
  83. Jin X, Ishii H, Bai Z, Itokazu T, Yamashita T. Temporal changes in cell marker expression and cellular infiltration in a controlled cortical impact model in adult male C57BL/6 mice. *PLoS One.* 2012;7(7).
  84. Turtzo LC, Lescher J, Janes L, Dean DD, Budde MD, Frank JA. Macrophagic and microglial responses after focal traumatic brain injury in the female rat. *J Neuroinflammation.* 2014 Apr 24;11:82.
  85. Morganti-Kossmann MC, Semple BD, Hellewell SC, Bye N, Ziebell JM. The complexity of neuroinflammation consequent to traumatic brain injury: from research evidence to potential treatments. *Acta Neuropathol.* 2019;137(5):731–55.
  86. Tower DB, Young OM. THE ACTIVITIES OF BUTYRYLCHOLINESTERASE AND CARBONIC ANHYDRASE, THE RATE OF ANAEROBIC GLYCOLYSTS, AND THE QUESTION OF A CONSTANT DENSITY OF GLIAL CELLS IN

- CEREBRAL CORTICES OF VARIOUS MAMMALIAN SPECIES FROM MOUSE TO WHALE. *J Neurochem.* 1973 Feb 1;20(2):269–78.
87. Chen Y, Swanson RA. Astrocytes and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2003 Feb;23(2):137–49.
  88. Risau W, Wolburg H. Development of the blood-brain barrier. *Trends Neurosci.* 1990 May;13(5):174–8.
  89. Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci.* 2006 Jan;7(1):41–53.
  90. Karve IP, Taylor JM, Crack PJ. The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury. *Br J Pharmacol.* 2016 Feb 1;173(4):692–702.
  91. Sofroniew M V, Vinters H V. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 2010 Jan;119(1):7–35.
  92. Pekny M, Johansson CB, Eliasson C, Stakeberg J, Wallén A, Perlmann T, et al. Abnormal reaction to central nervous system injury in mice lacking glial fibrillary acidic protein and vimentin. *J Cell Biol.* 1999 May 3;145(3):503–14.
  93. Gorina R, Font-Nieves M, Márquez-Kisinousky L, Santalucia T, Planas AM. Astrocyte TLR4 activation induces a proinflammatory environment through the interplay between MyD88-dependent NFκB signaling, MAPK, and Jak1/Stat1 pathways. *Glia.* 2011 Feb;59(2):242–55.
  94. Carpentier PA, Begolka WS, Olson JK, Elhofy A, Karpus WJ, Miller SD. Differential activation of astrocytes by innate and adaptive immune stimuli. *Glia.* 2005 Feb;49(3):360–74.
  95. Kim HJ, Fillmore HL, Reeves TM, Phillips LL. Elevation of hippocampal MMP-3 expression and activity during trauma-induced synaptogenesis. *Exp Neurol.* 2005 Mar;192(1):60–72.
  96. Kim J-H, Min K-J, Seol W, Jou I, Joe E-H. Astrocytes in injury states rapidly produce anti-inflammatory factors and attenuate microglial inflammatory responses. *J Neurochem.* 2010 Dec;115(5):1161–71.
  97. Madathil SK, Carlson SW, Brelsfoard JM, Ye P, D’Ercole AJ, Saatman KE. Astrocyte-Specific Overexpression of Insulin-Like Growth Factor-1 Protects Hippocampal Neurons and Reduces Behavioral Deficits following Traumatic Brain Injury in Mice. *PLoS One.* 2013;8(6):e67204.
  98. Liddel SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature.*

- 2017 Jan 26;541(7638):481–7.
99. Zamanian JL, Xu L, Foo LC, Nouri N, Zhou L, Giffard RG, et al. Genomic analysis of reactive astrogliosis. *J Neurosci*. 2012 May 2;32(18):6391–410.
  100. Takamiya A, Takeda M, Yoshida A, Kiyama H. Inflammation induces serine protease inhibitor 3 expression in the rat pineal gland. *Neuroscience*. 2002;113(2):387–94.
  101. Gesase AP, Kiyama H. Peripheral Nerve injury induced expression of mRNA for serine protease inhibitor 3 in the rat facial and hypoglossal nuclei but not in the spinal cord. *Ital J Anat Embryol*. 2007;112(3).
  102. Susarla BTS, Villapol S, Yi J-H, Geller HM, Symes AJ. Temporal patterns of cortical proliferation of glial cell populations after traumatic brain injury in mice. *ASN Neuro*. 2014 May 8;6(3):159–70.
  103. Bardehle S, Krüger M, Buggenthin F, Schwausch J, Ninkovic J, Clevers H, et al. Live imaging of astrocyte responses to acute injury reveals selective juxtavascular proliferation. *Nat Neurosci*. 2013 May;16(5):580–6.
  104. Villapol S, Byrnes KR, Symes AJ. Temporal Dynamics of Cerebral Blood Flow, Cortical Damage, Apoptosis, Astrocyte–Vasculature Interaction and Astrogliosis in the Pericontusional Region after Traumatic Brain Injury. *Front Neurol*. 2014 Jun 4;5:82.
  105. Silver J, Miller JH. Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci*. 2004 Feb;5(2):146–56.
  106. Ribotta MG, Menet V, Privat A. Glial scar and axonal regeneration in the CNS: lessons from GFAP and vimentin transgenic mice. *Acta Neurochir Suppl*. 2004;89:87–92.
  107. Stamatovic SM, Keep RF, Andjelkovic A V. Brain endothelial cell-cell junctions: how to “open” the blood brain barrier. *Curr Neuropharmacol*. 2008 Sep;6(3):179–92.
  108. Rubin LL, Staddon JM. The cell biology of the blood-brain barrier. *Annu Rev Neurosci*. 1999;22:11–28.
  109. Armulik A, Genové G, Mäe M, Nisancioglu MH, Wallgard E, Niaudet C, et al. Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature*. 2010 Nov 25;468(7323):557–61.
  110. Citi S, Cordenonsi M. Tight junction proteins. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 1998 Nov 19;1448(1):1–11.

111. Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, et al. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol.* 1998 Jul 13;142(1):117–27.
112. Price L, Wilson C, Grant G. Blood–Brain Barrier Pathophysiology following Traumatic Brain Injury. *Translational Research in Traumatic Brain Injury.* CRC Press/Taylor and Francis Group; 2016.
113. Shen W, Li S, Chung SH, Zhu L, Stayt J, Su T, et al. Tyrosine phosphorylation of VE-cadherin and claudin-5 is associated with TGF- $\beta$ 1-induced permeability of centrally derived vascular endothelium. *Eur J Cell Biol.* 2011 Apr;90(4):323–32.
114. Mertsch K, Blasig I, Grune T. 4-Hydroxynonenal impairs the permeability of an in vitro rat blood-brain barrier. *Neurosci Lett.* 2001 Nov 16;314(3):135–8.
115. Argaw AT, Gurfein BT, Zhang Y, Zameer A, John GR. VEGF-mediated disruption of endothelial CLN-5 promotes blood-brain barrier breakdown. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Feb 10;106(6):1977–82.
116. Rosenberg GA, Yang Y. Vasogenic edema due to tight junction disruption by matrix metalloproteinases in cerebral ischemia. *Neurosurg Focus.* 2007 May 15;22(5):E4.
117. Nag S, Venugopalan R, Stewart DJ. Increased caveolin-1 expression precedes decreased expression of occludin and claudin-5 during blood-brain barrier breakdown. *Acta Neuropathol.* 2007 Nov;114(5):459–69.
118. Shapira Y, Setton D, Artru AA, Shohami E. Blood-brain barrier permeability, cerebral edema, and neurologic function after closed head injury in rats. *Anesth Analg.* 1993 Jul;77(1):141–8.
119. Başkaya MK, Rao AM, Doğan A, Donaldson D, Dempsey RJ. The biphasic opening of the blood-brain barrier in the cortex and hippocampus after traumatic brain injury in rats. *Neurosci Lett.* 1997 Apr 18;226(1):33–6.
120. Hay JR, Johnson VE, Young AMH, Smith DH, Stewart W. Blood-Brain Barrier Disruption Is an Early Event That May Persist for Many Years After Traumatic Brain Injury in Humans. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2015 Dec;74(12):1147–57.
121. Hawkins BT, Davis TP. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev.* 2005 Jun;57(2):173–85.
122. Keaney J, Campbell M. The dynamic blood-brain barrier. *FEBS J.* 2015 Nov;282(21):4067–79.

123. Cash A, Theus MH. Mechanisms of Blood-Brain Barrier Dysfunction in Traumatic Brain Injury. *Int J Mol Sci.* 2020 May 8;21(9).
124. Campbell M, Hanrahan F, Gobbo OL, Kelly ME, Kiang A-S, Humphries MM, et al. Targeted suppression of claudin-5 decreases cerebral oedema and improves cognitive outcome following traumatic brain injury. *Nat Commun.* 2012 May 22;3:849.
125. Chodobski A, Zink BJ, Szmydynger-Chodobska J. Blood-brain barrier pathophysiology in traumatic brain injury. *Transl Stroke Res.* 2011 Dec;2(4):492–516.
126. Jha RM, Kochanek PM, Simard JM. Pathophysiology and treatment of cerebral edema in traumatic brain injury. *Neuropharmacology.* 2019;145(Pt B):230–46.
127. Hausmann R, Kaiser A, Lang C, Bohnert M, Betz P. A quantitative immunohistochemical study on the time-dependent course of acute inflammatory cellular response to human brain injury. *Int J Legal Med.* 1999;112(4):227–32.
128. Bao F, Shultz SR, Hepburn JD, Omana V, Weaver LC, Cain DP, et al. A CD11d monoclonal antibody treatment reduces tissue injury and improves neurological outcome after fluid percussion brain injury in rats. *J Neurotrauma.* 2012 Sep 20;29(14):2375–92.
129. Clark RS b., Schiding JK, Kaczorowski SL, Marion DW, Kochanek PM. Neutrophil Accumulation After Traumatic Brain Injury in Rats: Comparison of Weight Drop and Controlled Cortical Impact Models. *J Neurotrauma.* 1994;11(5).
130. Carlos TM, Clark RS, Franicola-Higgins D, Schiding JK, Kochanek PM. Expression of endothelial adhesion molecules and recruitment of neutrophils after traumatic brain injury in rats. *J Leukoc Biol.* 1997 Mar;61(3):279–85.
131. Soares HD, Hicks RR, Smith D, McIntosh TK. Inflammatory leukocytic recruitment and diffuse neuronal degeneration are separate pathological processes resulting from traumatic brain injury. *J Neurosci.* 1995;15(12).
132. Hsieh CL, Kim CC, Ryba BE, Niemi EC, Bando JK, Locksley RM, et al. Traumatic brain injury induces macrophage subsets in the brain. *Eur J Immunol.* 2013;43(8).
133. Morganti JM, Jopson TD, Liu S, Riparip LK, Guandique CK, Gupta N, et al. CCR2 antagonism alters brain macrophage polarization and ameliorates cognitive dysfunction induced by traumatic brain injury. *J Neurosci.* 2015;35(2).



134. Lucas S-M, Rothwell NJ, Gibson RM. The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br J Pharmacol*. 2006 Jan;147 Suppl 1(Suppl 1):S232-40.
135. Boraschi D, Bossù P, Ruggiero P, Tagliabue A, Bertini R, Macchia G, et al. Mapping of receptor binding sites on IL-1 beta by reconstruction of IL-1ra-like domains. *J Immunol*. 1995 Nov 15;155(10):4719–25.
136. Loddick SA, Rothwell NJ. Neuroprotective effects of human recombinant interleukin-1 receptor antagonist in focal cerebral ischaemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1996 Sep;16(5):932–40.
137. Crack PJ, Gould J, Bye N, Ross S, Ali U, Habgood MD, et al. The genomic profile of the cerebral cortex after closed head injury in mice: effects of minocycline. *J Neural Transm*. 2009 Jan;116(1):1–12.
138. Sanchez Mejia RO, Ona VO, Li M, Friedlander RM. Minocycline reduces traumatic brain injury-mediated caspase-1 activation, tissue damage, and neurological dysfunction. *Neurosurgery*. 2001 Jun;48(6):1393–9; discussion 1399-401.
139. Ziebell JM, Morganti-Kossmann MC. Involvement of pro- and anti-inflammatory cytokines and chemokines in the pathophysiology of traumatic brain injury. *Neurotherapeutics*. 2010 Jan;7(1):22–30.
140. Benveniste EN. Cytokine actions in the central nervous system. *Cytokine Growth Factor Rev*. 1998;9(3–4):259–75.
141. Penkowa M, Giralt M, Carrasco J, Hadberg H, Hidalgo J. Impaired inflammatory response and increased oxidative stress and neurodegeneration after brain injury in interleukin-6-deficient mice. *Glia*. 2000 Dec;32(3):271–85.
142. Penkowa M, Camats J, Hadberg H, Quintana A, Rojas S, Giralt M, et al. Astrocyte-targeted expression of interleukin-6 protects the central nervous system during neuroglial degeneration induced by 6-aminonicotinamide. *J Neurosci Res*. 2003 Aug 15;73(4):481–96.
143. Yang SH, Gangidine M, Pritts TA, Goodman MD, Lentsch AB. Interleukin 6 mediates neuroinflammation and motor coordination deficits after mild traumatic brain injury and brief hypoxia in mice. *Shock*. 2013 Dec;40(6):471–5.
144. Wu Z, Zhang J, Nakanishi H. Leptomeningeal cells activate microglia and astrocytes to induce IL-10 production by releasing pro-inflammatory cytokines during systemic inflammation. *J Neuroimmunol*. 2005 Oct;167(1–2):90–8.
145. Knoblach SM, Faden AI. Interleukin-10 improves outcome and alters

- proinflammatory cytokine expression after experimental traumatic brain injury. *Exp Neurol*. 1998 Sep;153(1):143–51.
146. Kremlev SG, Palmer C. Interleukin-10 inhibits endotoxin-induced pro-inflammatory cytokines in microglial cell cultures. *J Neuroimmunol*. 2005 May;162(1–2):71–80.
  147. Csuka E, Morganti-Kossmann MC, Lenzlinger PM, Joller H, Trentz O, Kossmann T. IL-10 levels in cerebrospinal fluid and serum of patients with severe traumatic brain injury: relationship to IL-6, TNF-alpha, TGF-beta1 and blood-brain barrier function. *J Neuroimmunol*. 1999 Nov 15;101(2):211–21.
  148. Breder CD, Tsujimoto M, Terano Y, Scott DW, Saper CB. Distribution and characterization of tumor necrosis factor-alpha-like immunoreactivity in the murine central nervous system. *J Comp Neurol*. 1993 Nov 22;337(4):543–67.
  149. Allan SM, Rothwell NJ. Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci*. 2001 Oct;2(10):734–44.
  150. Chao CC, Hu S, Ehrlich L, Peterson PK. Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha synergistically mediate neurotoxicity: involvement of nitric oxide and of N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain Behav Immun*. 1995 Dec;9(4):355–65.
  151. Xiong Y, Mahmood A, Chopp M. Animal models of traumatic brain injury. *Nat Rev Neurosci*. 2013 Feb;14(2):128–42.
  152. Zhang YP, Cai J, Shields LBE, Liu N, Xu X-M, Shields CB. Traumatic Brain Injury Using Mouse Models. *Transl Stroke Res*. 2014 Aug 5;5(4):454–71.
  153. Vinogradov AE. Human more complex than mouse at cellular level. *PLoS One*. 2012;7(7):e41753.
  154. Dixon CE, Clifton GL, Lighthall JW, Yaghami AA, Hayes RL. A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat. *J Neurosci Methods*. 1991 Oct;39(3):253–62.
  155. Lighthall JW. Controlled cortical impact: a new experimental brain injury model. *J Neurotrauma*. 1988;5(1):1–15.
  156. McIntosh TK, Noble L, Andrews B, Faden AI. Traumatic brain injury in the rat: characterization of a midline fluid-percussion model. *Cent Nerv Syst Trauma*. 1987;4(2):119–34.
  157. 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.

158. Morales DM, Marklund N, Lebold D, Thompson HJ, Pitkanen A, Maxwell WL, et al. Experimental models of traumatic brain injury: do we really need to build a better mousetrap? *Neuroscience*. 2005;136(4):971–89.
159. Warden D. Military TBI during the Iraq and Afghanistan wars. *J Head Trauma Rehabil*. 2006;21(5):398–402.
160. Williams AJ, Hartings JA, Lu X-CM, Rolli ML, Dave JR, Tortella FC. Characterization of a new rat model of penetrating ballistic brain injury. *J Neurotrauma*. 2005 Feb;22(2):313–31.
161. Lüllmann-Rauch R, Asan E 1957-, Georg Thieme Verlag KG. Taschenlehrbuch Histologie.
162. Aumüller G, Aust G, Conrad A, Engele J, Kirsch J, Georg Thieme Verlag KG. Duale Reihe Anatomie.
163. Loi F, Córdova LA, Pajarinen J, Lin T, Yao Z, Goodman SB. Inflammation, fracture and bone repair. *Bone*. 2016 May;86:119–30.
164. McKibbin B. The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg Br*. 1978 May;60-B(2):150–62.
165. Perren SM. Evolution of the internal fixation of long bone fractures. The scientific basis of biological internal fixation: choosing a new balance between stability and biology. *J Bone Joint Surg Br*. 2002 Nov;84(8):1093–110.
166. Claes L, Recknagel S, Ignatius A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nat Rev Rheumatol*. 2012 Jan 31;8(3):133–43.
167. Uthoff HK, Rahn BA. Healing patterns of metaphyseal fractures. *Clin Orthop Relat Res*. 1981;160.
168. Chen WT, Han DC, Zhang PX, Han N, Kou YH, Yin XF, et al. A special healing pattern in stable metaphyseal fractures. *Acta Orthop*. 2015 Apr;86(2):238–42.
169. Claes L, Reusch M, Göckelmann M, Ohnmacht M, Wehner T, Amling M, et al. Metaphyseal fracture healing follows similar biomechanical rules as diaphyseal healing. *J Orthop Res*. 2011 Mar;29(3):425–32.
170. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury*. 2011 Jun;42(6):551–5.
171. Bastian O, Pillay J, Alblas J, Leenen L, Koenderman L, Blokhuis T. Systemic inflammation and fracture healing. *J Leukoc Biol*. 2011 May;89(5):669–73.
172. Xing Z, Lu C, Hu D, Yu Y, Wang X, Colnot C, et al. Multiple roles for CCR2 during fracture healing. *Dis Model Mech*. 2010;3(7–8):451–8.

173. Hurst SM, Wilkinson TS, McLoughlin RM, Jones S, Horiuchi S, Yamamoto N, et al. Il-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. *Immunity*. 2001 Jun;14(6):705–14.
174. Kon T, Cho TJ, Aizawa T, Yamazaki M, Nooh N, Graves D, et al. Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. *J Bone Miner Res*. 2001 Jun;16(6):1004–14.
175. Bielby R, Jones E, McGonagle D. The role of mesenchymal stem cells in maintenance and repair of bone. *Injury*. 2007 Mar;38 Suppl 1:S26-32.
176. Wu AC, Raggatt LJ, Alexander KA, Pettit AR. Unraveling macrophage contributions to bone repair. *Bonekey Rep*. 2013;2:373.
177. Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem*. 2003 Apr 1;88(5):873–84.
178. Tsiridis E, Upadhyay N, Giannoudis P. Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules? *Injury*. 2007 Mar;38 Suppl 1:S11-25.
179. Grundnes O, Reikerås O. Blood flow and mechanical properties of healing bone. Femoral osteotomies studied in rats. *Acta Orthop Scand*. 1992 Oct;63(5):487–91.
180. Probst C, Mirzayan MJ, Mommsen P, Zeckey C, Tegeder T, Geerken L, et al. Systemic inflammatory effects of traumatic brain injury, femur fracture, and shock: an experimental murine polytrauma model. *Mediators Inflamm*. 2012;2012:136020.
181. Beeton CA, Chatfield D, Brooks RA, Rushton N. Circulating levels of interleukin-6 and its soluble receptor in patients with head injury and fracture. *J Bone Joint Surg Br*. 2004 Aug;86(6):912–7.
182. Algattas H, Huang JH. Traumatic Brain Injury pathophysiology and treatments: early, intermediate, and late phases post-injury. *Int J Mol Sci*. 2013 Dec 30;15(1):309–41.
183. Yang H, Ochani M, Li J, Qiang X, Tanovic M, Harris HE, et al. Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jan 6;101(1):296–301.
184. Ching-Yun Y-PC, Chen C-Y, Ke C-J, Chao Y-H, Sun J-S. Traumatic brain injury

- result in accelerated fracture healing: A Rat Model. *J Clin Exp Orthop*. 2015;01(01).
185. Locher RJ, Lünemann T, Garbe A, Schaser K-D, Schmidt-Bleek K, Duda G, et al. Traumatic brain injury and bone healing: radiographic and biomechanical analyses of bone formation and stability in a combined murine trauma model. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2015 Dec;15(4):309–15.
  186. Hofman M, Koopmans G, Kobbe P, Poeze M, Andruszkow H, Brink PRG, et al. Improved fracture healing in patients with concomitant traumatic brain injury: proven or not? *Mediators Inflamm*. 2015;2015:204842.
  187. Brady RD, Shultz SR, McDonald SJ, O'Brien TJ. Neurological heterotopic ossification: Current understanding and future directions. *Bone*. 2018;109:35–42.
  188. Paffrath T, Lefering R, Flohé S. How to define severely injured patients?—An Injury Severity Score (ISS) based approach alone is not sufficient. *Injury*. 2014 Oct 1;45:S64–9.
  189. Pape H-C, Lefering R, Butcher N, Peitzman A, Leenen L, Marzi I, et al. The definition of polytrauma revisited. *J Trauma Acute Care Surg*. 2014 Nov;77(5):780–6.
  190. Baker SP, O'Neill B. The injury severity score: an update. *J Trauma*. 1976 Nov;16(11):882–5.
  191. Lossius HM, Rehn M, Tjosevik KE, Eken T. Calculating trauma triage precision: effects of different definitions of major trauma. *J Trauma Manag Outcomes*. 2012 Dec 17;6(1):9.
  192. Osler T, Baker SP, Long W. A modification of the injury severity score that both improves accuracy and simplifies scoring. *J Trauma*. 1997 Dec;43(6):922–5; discussion 925-6.
  193. Alberdi F, García I, Atutxa L, Zabarte M, Trauma and Neurointensive Care Work Group of the SEMICYUC. Epidemiology of severe trauma. *Med intensiva*. 2014 Dec;38(9):580–8.
  194. Murray CJL, Vos T, Lozano R, Naghavi M, Flaxman AD, Michaud C, et al. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet (London, England)*. 2012 Dec 15;380(9859):2197–223.
  195. Sharma BR. Road traffic injuries: a major global public health crisis. *Public*

- Health. 2008 Dec;122(12):1399–406.
196. Parekh AK, Barton MB. The challenge of multiple comorbidity for the US health care system. *JAMA*. 2010 Apr 7;303(13):1303–4.
  197. Alberdi Odriozola F, Azaldegui Berroeta F, Marco Garde P, Laviñeta Romano E, Mintegi Malcorra I, Murgialdai Iturrioz A, et al. Metodologia para la audicion de la calidad de un sistema traumatologico. Vol. 23, *Medicina Intensiva*. 1999.
  198. Langlois JA, Sattin RW. Traumatic brain injury in the United States: research and programs of the Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *J Head Trauma Rehabil*. 2005;20(3):187–8.
  199. Tagliaferri F, Compagnone C, Korsic M, Servadei F, Kraus J. A systematic review of brain injury epidemiology in Europe. *Acta Neurochir (Wien)*. 2006 Mar;148(3):255–68; discussion 268.
  200. Fisher LW, Torchia DA, Fohr B, Young MF, Fedarko NS. Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Jan 19;280(2):460–5.
  201. Franzen A, Heinegard D. Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix. *Biochem J*. 1985;232(3):715–24.
  202. Oldberg A, Franzen A, Heinegard D. Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(23):8819–23.
  203. Ashkar S, Weber GF, Panoutsakopoulou V, Sanchirico ME, Jansson M, Zawaideh S, et al. Eta-1 (osteopontin): An early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science (80- )*. 2000;287(5454):860–4.
  204. Patarca R, Freeman GJ, Singh RP, Wei FY, Durfee T, Blattner F, et al. Structural and functional studies of the early T lymphocyte activation 1 (Eta-1) gene. Definition of a novel T cell-dependent response associated with genetic resistance to bacterial infection. *J Exp Med*. 1989;170(1):145–61.
  205. Young MF, Kerr JM, Termine JD, Wewer UM, Wang MG, McBride OW, et al. cDNA cloning, mRNA distribution and heterogeneity, chromosomal location, and RFLP analysis of human osteopontin (OPN). *Genomics*. 1990;7(4):491–502.
  206. Kon S, Maeda M, Segawa T, Hagiwara Y, Horikoshi Y, Chikuma S, et al. Antibodies to different peptides in osteopontin reveal complexities in the various secreted forms. *J Cell Biochem*. 2000;77(3):487–98.
  207. Clemente N, Raineri D, Cappellano G, Boggio E, Favero F, Soluri MF, et al.

- Osteopontin Bridging Innate and Adaptive Immunity in Autoimmune Diseases. *J Immunol Res.* 2016;2016(haplotype C).
208. Kazanecki CC, Uzwiak DJ, Denhardt DT. Control of osteopontin signaling and function by post-translational phosphorylation and protein folding. *J Cell Biochem.* 2007 Nov 1;102(4):912–24.
  209. Yamamoto S, Hijiya N, Setoguchi M, Matsuura K, Ishida T, Higuchi Y AS. Structure of the Osteopontin Gene and Its Promoter. *Ann N Y Acad Sci.* 1995;760:44-58.
  210. Nemir M, DeVouge MW, Mukherjee BB. Normal rat kidney cells secrete both phosphorylated and nonphosphorylated forms of osteopontin showing different physiological properties. *J Biol Chem.* 1989 Oct 25;264(30):18202–8.
  211. Singh K, DeVouge MW, Mukherjee BB. Physiological properties and differential glycosylation of phosphorylated and nonphosphorylated forms of osteopontin secreted by normal rat kidney cells. *J Biol Chem.* 1990 Oct 25;265(30):18696–701.
  212. Denhardt DT, Noda M. Osteopontin expression and function: Role in bone remodeling. *J Cell Biochem.* 1998;(SUPPL. 30/31).
  213. Ramaiah SK, Rittling S. Role of osteopontin in regulating hepatic inflammatory responses and toxic liver injury. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2007 Aug;3(4):519–26.
  214. Uede T. Osteopontin, intrinsic tissue regulator of intractable inflammatory diseases. *Pathol Int.* 2011 May;61(5):265–80.
  215. Yokosaki Y, Tanaka K, Higashikawa F, Yamashita K, Eboshida A. Distinct structural requirements for binding of the integrins  $\alpha\beta 6$ ,  $\alpha\beta 3$ ,  $\alpha\beta 5$ ,  $\alpha 5\beta 1$  and  $\alpha 9\beta 1$  to osteopontin. *Matrix Biol.* 2005 Sep 1;24(6):418–27.
  216. Hynes RO. Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell.* 2002 Sep 20;110(6):673–87.
  217. Weber GF. The metastasis gene osteopontin: A candidate target for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer.* 2001;1552(2):61–85.
  218. Agnihotri R, Crawford HC, Haro H, Matrisian LM, Havrda MC, Liaw L. Osteopontin, a Novel Substrate for Matrix Metalloproteinase-3 (Stromelysin-1) and Matrix Metalloproteinase-7 (Matrilysin). *J Biol Chem.* 2001;276(30):28261–7.
  219. Kon S, Ikesue M, Kimura C, Aoki M, Nakayama Y, Saito Y, et al. Syndecan-4

- protects against osteopontin-mediated acute hepatic injury by masking functional domains of osteopontin. *J Exp Med*. 2008 Jan 21;205(1):25–33.
220. Green PM, Ludbrook SB, Miller DD, Horgan CMT, Barry ST. Structural elements of the osteopontin SVVYGLR motif important for the interaction with  $\alpha 4$  integrins. *FEBS Lett*. 2001;503(1):75–9.
221. Scatena M, Liaw L, Giachelli CM. Osteopontin A Multifunctional Molecule Regulating Chronic Inflammation and Vascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007 Nov 1;27(11):2302–9.
222. Reinholt FP, Hultenby K, Oldberg A, Heinegård D. Osteopontin--a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Jun;87(12):4473–5.
223. Ross FP, Chappel J, Alvarez JI, Sander D, Butler WT, Farach-Carson MC, et al. Interactions between the bone matrix proteins osteopontin and bone sialoprotein and the osteoclast integrin alpha v beta 3 potentiate bone resorption. *J Biol Chem*. 1993 May 5;268(13):9901–7.
224. Boskey AL, Maresca M, Ullrich W, Doty SB, Butler WT, Prince CW. Osteopontin-hydroxyapatite interactions in vitro: inhibition of hydroxyapatite formation and growth in a gelatin-gel. *Bone Miner*. 1993 Aug;22(2):147–59.
225. Boskey AL, Spevak L, Paschalis E, Doty SB, McKee MD. Osteopontin deficiency increases mineral content and mineral crystallinity in mouse bone. *Calcif Tissue Int*. 2002 Aug;71(2):145–54.
226. Liaw L, Skinner MP, Raines EW, Ross R, Cheresh DA, Schwartz SM, et al. The adhesive and migratory effects of osteopontin are mediated via distinct cell surface integrins. Role of alpha v beta 3 in smooth muscle cell migration to osteopontin in vitro. *J Clin Invest*. 1995 Feb;95(2):713–24.
227. Yokosaki Y, Tanaka K, Higashikawa F, Yamashita K, Eboshida A. Distinct structural requirements for binding of the integrins alphavbeta6, alphavbeta3, alphavbeta5, alpha5beta1 and alpha9beta1 to osteopontin. *Matrix Biol*. 2005 Sep;24(6):418–27.
228. Iida T, Wagatsuma K, Hirayama D, Nakase H. Is Osteopontin a Friend or Foe of Cell Apoptosis in Inflammatory Gastrointestinal and Liver Diseases? *Int J Mol Sci*. 2017 Dec 21;19(1):7.
229. Krause SW, Rehli M, Kreutz M, Schwarzfischer L, Paulauskis JD, Andreesen R. Differential screening identifies genetic markers of monocyte to macrophage



- maturation. *J Leukoc Biol.* 1996 Oct;60(4):540–5.
230. Weber GF, Zawaideh S, Hikita S, Kumar VA, Cantor H, Ashkar S. Phosphorylation-dependent interaction of osteopontin with its receptors regulates macrophage migration and activation. *J Leukoc Biol.* 2002 Oct 1;72(4):752–61.
  231. Marcondes MCG, Poling M, Watry DD, Hall D, Fox HS. In vivo osteopontin-induced macrophage accumulation is dependent on CD44 expression. *Cell Immunol.* 2008;254(1):56–62.
  232. Lund SA, Wilson CL, Raines EW, Tang J, Giachelli CM, Scatena M. Osteopontin mediates macrophage chemotaxis via  $\alpha 4$  and  $\alpha 9$  integrins and survival via the  $\alpha 4$  integrin. *J Cell Biochem.* 2013 May;114(5):1194–202.
  233. Renkl AC, Wussler J, Ahrens T, Thoma K, Kon S, Uede T, et al. Osteopontin functionally activates dendritic cells and induces their differentiation toward a Th1-polarizing phenotype. *Blood.* 2005 Aug 1;106(3):946–55.
  234. Shinohara ML, Lu L, Bu J, Werneck MBF, Kobayashi KS, Glimcher LH, et al. Osteopontin expression is essential for interferon-alpha production by plasmacytoid dendritic cells. *Nat Immunol.* 2006 May;7(5):498–506.
  235. Koh A, da Silva APB, Bansal AK, Bansal M, Sun C, Lee H, et al. Role of osteopontin in neutrophil function. *Immunology.* 2007 Dec;122(4):466–75.
  236. O'Regan AW, Chupp GL, Lowry JA, Goetschkes M, Mulligan N, Berman JS. Osteopontin is associated with T cells in sarcoid granulomas and has T cell adhesive and cytokine-like properties in vitro. *J Immunol.* 1999;162(2).
  237. Murugaiyan G, Mittal A, Weiner HL. Increased osteopontin expression in dendritic cells amplifies IL-17 production by CD4<sup>+</sup> T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis and in multiple sclerosis. *J Immunol.* 2008 Dec 1;181(11):7480–8.
  238. Guan H, Nagarkatti PS, Nagarkatti M. Role of CD44 in the differentiation of Th1 and Th2 cells: CD44-deficiency enhances the development of Th2 effectors in response to sheep RBC and chicken ovalbumin. *J Immunol.* 2009 Jul 1;183(1):172–80.
  239. Lund SA, Giachelli CM, Scatena M. The role of osteopontin in inflammatory processes. *J Cell Commun Signal.* 2009 Dec 2;3(3–4):311–22.
  240. Wai PY, Kuo PC. The role of Osteopontin in tumor metastasis. *J Surg Res.* 2004 Oct 1;121(2):228–41.

241. Bruemmer D, Collins AR, Noh G, Wang W, Territo M, Arias-Magallona S, et al. Angiotensin II-accelerated atherosclerosis and aneurysm formation is attenuated in osteopontin-deficient mice. *J Clin Invest*. 2003 Nov;112(9):1318–31.
242. Liaw L, Birk DE, Ballas CB, Whitsitt JS, Davidson JM, Hogan BL. Altered wound healing in mice lacking a functional osteopontin gene (*spp1*). *J Clin Invest*. 1998 Apr 1;101(7):1468–78.
243. Ophascharoensuk V, Giachelli CM, Gordon K, Hughes J, Pichler R, Brown P, et al. Obstructive uropathy in the mouse: Role of osteopontin in interstitial fibrosis and apoptosis. *Kidney Int*. 1999 Aug 1;56(2):571–80.
244. Nomiyama T, Perez-Tilve D, Ogawa D, Gizard F, Zhao Y, Heywood EB, et al. Osteopontin mediates obesity-induced adipose tissue macrophage infiltration and insulin resistance in mice. *J Clin Invest*. 2007 Oct;117(10):2877–88.
245. Zhang W, Cui Y, Gao J, Li R, Jiang X, Tian Y, et al. Recombinant Osteopontin Improves Neurological Functional Recovery and Protects Against Apoptosis via PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  Pathway Following Intracerebral Hemorrhage. *Med Sci Monit*. 2018 Mar 18;24:1588–96.
246. Gong L, Manaenko A, Fan R, Huang L, Enkhjargal B, McBride D, et al. Osteopontin attenuates inflammation via JAK2/STAT1 pathway in hyperglycemic rats after intracerebral hemorrhage. *Neuropharmacology*. 2018;138:160–9.
247. Wu J, Zhang Y, Yang P, Enkhjargal B, Manaenko A, Tang J, et al. Recombinant Osteopontin Stabilizes Smooth Muscle Cell Phenotype via Integrin Receptor/Integrin-Linked Kinase/Rac-1 Pathway After Subarachnoid Hemorrhage in Rats. *Stroke*. 2016;47(5):1319–27.
248. Sun CM, Enkhjargal B, Reis C, Zhou KR, Xie ZY, Wu LY, et al. Osteopontin attenuates early brain injury through regulating autophagy-apoptosis interaction after subarachnoid hemorrhage in rats. *CNS Neurosci Ther*. 2019 Oct 1;25(10):1162–72.
249. Sun C, Enkhjargal B, Reis C, Zhang T, Zhu Q, Zhou K, et al. Osteopontin-Enhanced Autophagy Attenuates Early Brain Injury via FAK–ERK Pathway and Improves Long-Term Outcome after Subarachnoid Hemorrhage in Rats. *Cells*. 2019 Aug 27;8(9):980.
250. Doyle KP, Yang T, Lessov NS, Ciesielski TM, Stevens SL, Simon RP, et al.

- Nasal administration of osteopontin peptide mimetics confers neuroprotection in stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2008 Jun;28(6):1235–48.
251. Powell MA, Black RT, Smith TL, Reeves TM, Phillips LL. Matrix Metalloproteinase 9 and Osteopontin Interact to Support Synaptogenesis in the Olfactory Bulb after Mild Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma.* 2019 May 15;36(10):1615–31.
  252. Jullienne A, Hamer M, Haddad E, Morita A, Gifford P, Hartman R, et al. Acute intranasal osteopontin treatment in male rats following TBI increases the number of activated microglia but does not alter lesion characteristics. *J Neurosci Res.* 2020;98(1):141–54.
  253. Courter D, Cao H, Kwok S, Kong C, Banh A, Kuo P, et al. The RGD domain of human osteopontin promotes tumor growth and metastasis through activation of survival pathways. *PLoS One.* 2010 Mar 10;5(3):e9633.
  254. Guan JL. Focal adhesion kinase in integrin signaling. *Matrix Biol.* 1997 Oct;16(4):195–200.
  255. Golubovskaya VM, Nyberg C, Zheng M, Kweh F, Magis A, Ostrov D, et al. A small molecule inhibitor, 1,2,4,5-benzenetetraamine tetrahydrochloride, targeting the y397 site of focal adhesion kinase decreases tumor growth. *J Med Chem.* 2008 Dec 11;51(23):7405–16.
  256. Zheng Y-H, Tian C, Meng Y, Qin Y-W, Du Y-H, Du J, et al. Osteopontin stimulates autophagy via integrin/CD44 and p38 MAPK signaling pathways in vascular smooth muscle cells. *J Cell Physiol.* 2012 Jan;227(1):127–35.
  257. Liu G, Fan X, Tang M, Chen R, Wang H, Jia R, et al. Osteopontin induces autophagy to promote chemo-resistance in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett.* 2016;383(2):171–82.
  258. Ku MJ, Kim JH, Lee J, Cho JY, Chun T, Lee SY. Maclurin suppresses migration and invasion of human non-small-cell lung cancer cells via anti-oxidative activity and inhibition of the Src/FAK-ERK- $\beta$ -catenin pathway. *Mol Cell Biochem.* 2015 Apr;402(1–2):243–52.
  259. Rabenstein M, Unverricht-Yeboah M, Keuters MH, Pikhovych A, Hucklenbroich J, Vay SU, et al. Transcranial Current Stimulation Alters the Expression of Immune-Mediating Genes. *Front Cell Neurosci.* 2019;13:461.
  260. Rogall R, Rabenstein M, Vay S, Bach A, Pikhovych A, Baermann J, et al. Bioluminescence imaging visualizes osteopontin-induced neurogenesis and

- neuroblast migration in the mouse brain after stroke. *Stem Cell Res Ther.* 2018;9(1):182.
261. Kim MD, Cho HJ, Shin T. Expression of osteopontin and its ligand, CD44, in the spinal cords of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 2004 Jun;151(1–2):78–84.
262. Shin T. Osteopontin as a two-sided mediator in acute neuroinflammation in rat models. Vol. 114, *Acta Histochemica.* 2012.
263. Peng H, Shah W, Holland P, Carbonetto S. Integrins and dystroglycan regulate astrocyte wound healing: the integrin beta1 subunit is necessary for process extension and orienting the microtubular network. *Dev Neurobiol.* 2008 Apr;68(5):559–74.
264. Peng H, Ong YM, Shah WA, Holland PC, Carbonetto S. Integrins regulate centrosome integrity and astrocyte polarization following a wound. *Dev Neurobiol.* 2013 May;73(5):333–53.
265. Vay SU, Olschewski DN, Petereit H, Lange F, Nazarzadeh N, Gross E, et al. Osteopontin regulates proliferation, migration, and survival of astrocytes depending on their activation phenotype. *J Neurosci Res.* 2021 Nov 12;99(11):2822–43.
266. Tambuyzer BR, Casteleyn C, Vergauwen H, Van Cruchten S, Van Ginneken C. Osteopontin alters the functional profile of porcine microglia in vitro. *Cell Biol Int.* 2012;36(12):1233–8.
267. Suzuki H, Hasegawa Y, Kanamaru K, Zhang JH. Mechanisms of osteopontin-induced stabilization of blood-brain barrier disruption after subarachnoid hemorrhage in rats. *Stroke.* 2010;41(8):1783–90.
268. Rabenstein M, Vay SU, Flitsch LJ, Fink GR, Schroeter M, Rueger MA. Osteopontin directly modulates cytokine expression of primary microglia and increases their survival. *J Neuroimmunol.* 2016;299:130–8.
269. Patouraux S, Rousseau D, Rubio A, Bonnafous S, Lavallard VJ, Lauron J, et al. Osteopontin deficiency aggravates hepatic injury induced by ischemia-reperfusion in mice. *Cell Death Dis.* 2014 May 8;5(5):e1208.
270. Wung JK, Perry G, Kowalski A, Harris PLR, Bishop GM, Trivedi MA, et al. Increased expression of the remodeling- and tumorigenic-associated factor osteopontin in pyramidal neurons of the Alzheimer's disease brain. *Curr Alzheimer Res.* 2007 Feb;4(1):67–72.

271. Maetzler W, Berg D, Schalamberidze N, Melms A, Schott K, Mueller JC, et al. Osteopontin is elevated in Parkinson's disease and its absence leads to reduced neurodegeneration in the MPTP model. *Neurobiol Dis.* 2007 Mar;25(3):473–82.
272. Tsenter J, Beni-Adani L, Assaf Y, Alexandrovich AG, Trembovler V, Shohami E. Dynamic changes in the recovery after traumatic brain injury in mice: Effect of injury severity on T2-weighted MRI abnormalities, and motor and cognitive functions. *J Neurotrauma.* 2008;25(4):324–33.
273. Huang C, Sakry D, Menzel L, Dangel L, Sebastiani A, Krämer T, et al. Lack of NG2 exacerbates neurological outcome and modulates glial responses after traumatic brain injury. *Glia.* 2016;64(4):507–23.
274. Eriksen JL, Mackenzie IRA. Progranulin: normal function and role in neurodegeneration. *J Neurochem.* 2007 Oct 22;0(0):071024001227009-???
275. Zhu J, Nathan C, Jin W, Sim D, Ashcroft GS, Wahl SM, et al. Conversion of Proepithelin to Epithelins: Roles of SLPI and Elastase in Host Defense and Wound Repair. *Cell.* 2002 Dec 13;111(6):867–78.
276. Baines AJ. Evolution of spectrin function in cytoskeletal and membrane networks. *Biochem Soc Trans.* 2009 Aug;37(Pt 4):796–803.
277. Yan X-X, Jeromin A, Jeromin A. Spectrin Breakdown Products (SBDPs) as Potential Biomarkers for Neurodegenerative Diseases. *Curr Transl Geriatr Exp Gerontol Rep.* 2012 Jun;1(2):85–93.
278. Zhang Z, Larner SF, Liu MC, Zheng W, Hayes RL, Wang KKW. Multiple alphaII-spectrin breakdown products distinguish calpain and caspase dominated necrotic and apoptotic cell death pathways. *Apoptosis.* 2009 Nov;14(11):1289–98.
279. Tsitsilonis S, Seemann R, Misch M, Wichlas F, Haas NP, Schmidt-Bleek K, et al. The effect of traumatic brain injury on bone healing: An experimental study in a novel in vivo animal model. *Injury.* 2015;46(4):661–5.
280. He Z, Ostrowski RP, Sun X, Ma Q, Huang B, Zhan Y, et al. CHOP silencing reduces acute brain injury in the rat model of subarachnoid hemorrhage. *Stroke.* 2012 Feb;43(2):484–90.
281. Suto Y, Nagata K, Ahmed SM, Jacovides C, Browne KD, Cognetti J, et al. A concomitant bone fracture delays cognitive recovery from traumatic brain injury. In: *Journal of Trauma and Acute Care Surgery.* 2018.
282. Suzuki H, Ayer R, Sugawara T, Chen W, Sozen T, Hasegawa Y, et al. Protective

- effects of recombinant osteopontin on early brain injury after subarachnoid hemorrhage in rats. *Crit Care Med*. 2010 Feb;38(2):612–8.
283. Suzuki H, Hasegawa Y, Chen W, Kanamaru K, Zhang JH. Recombinant osteopontin in cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *Ann Neurol*. 2010 Nov;68(5):650–60.
284. 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.

## 9 Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Prof. \_\_\_\_\_ möchte ich für die beispiellos gute Betreuung und die konstruktiven Anregungen danken.

Ein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Dr. med. \_\_\_\_\_ für die herzliche Unterstützung und die sorgfältigen Korrekturen meiner Arbeit.

Frau \_\_\_\_\_, Frau \_\_\_\_\_, Herrn \_\_\_\_\_, Herrn Dr. \_\_\_\_\_ und Herrn Dr. med. \_\_\_\_\_ möchte ich für die tatkräftige Unterstützung meiner Projekte danken.

Zum Schluss natürlich noch ein großes Dankeschön an die gesamte Arbeitsgruppe Neuroprotektion für die herzliche Aufnahme in das Team und eine stets angenehme Arbeitsatmosphäre.

# 10 Tabellarischer Lebenslauf