

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

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

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Universitätsmedizin

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Tim Niklas Külzer

aus Wiesbaden

Mainz, 2022

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Hansjörg Schild
1. Gutachter: (Name für Online-Version entfernt)
2. Gutachter: (Name für Online-Version entfernt)
Tag der Promotion: 06. August 2024

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	5
2	STAND DER WISSENSCHAFT	8
2.1	KLINIK	8
2.2	PHH PATHOPHYSIOLOGIE	9
2.3	TIERMODELL	10
2.4	BLUTHIRNSCHRANKE	11
2.5	CLAUDIN 5	13
2.6	IGG	13
2.7	AQUAPORIN 4	14
2.8	ENTWICKLUNG DER HYPOTHESEN	15
3	MATERIAL UND METHODEN	17
3.1	VERSUCHSTIERE	17
3.2	KARDIALE PUNKTION DER DONOR-TIERE	18
3.3	VORBEREITUNG DER BLUT- UND NACL-GRUPPE	19
3.4	INTERVENTIONSABLAUF DER BLUT-GRUPPE	20
3.5	INTERVENTIONSABLAUF DER NACL-GRUPPE	21
3.6	INTERVENTIONSABLAUF DER SHAM-GRUPPE	21
3.7	MRT-AUFNAHMEN	22
3.8	HIRNENTNAHME UND FIXIERUNG	22
3.9	IMMUNHISTOCHEMIE	24
3.10	ERHEBUNG DER IMMUNOREAKTIVEN FLÄCHE UND DER RELATIVEN VENTRIKELGRÖÙE	25
3.11	STATISTISCHE AUSWERTUNG	27
4	ERGEBNISSE	29
4.1	DEFINITION DER VENTRIKULÄREN DILATATION	29
4.2	GEWICHTSENTWICKLUNG	30
4.3	IMMUNHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN	31
4.3.1	<i>Claudin-5</i>	32
4.3.2	<i>IgG</i>	36
4.3.3	<i>Aquaporin-4</i>	40
5	DISKUSSION	43
5.1	METHODENKRITIK	43
5.1.1	<i>Tiermodell</i>	43
5.1.2	<i>Immunhistochemie</i>	46
5.2	ERGEBNISDISKUSSION	46
5.2.1	<i>Gewichtsentwicklung und Hydrocephalus</i>	46
5.2.2	<i>Hydrozephalusrate</i>	47
5.2.3	<i>Einfluss einer BHS-Störung auf den PHH</i>	48
5.2.4	<i>Einfluss von Aquaporin-4 auf den PHH</i>	55
5.2.5	<i>Tiermodell</i>	58
6	FAZIT	62
7	ZUSAMMENFASSUNG	63
8	LITERATURVERZEICHNIS	65
9	ANHANG	70
9.1	MATERIALIEN	70
9.1.1	<i>Pharmaka/Chemikalien</i>	70
9.1.2	<i>Verbrauchsmaterialien</i>	70

9.1.3	<i>Chirurgisches Instrumentarium</i>	71
9.1.4	<i>Geräte und Software</i>	71
9.1.5	<i>Histologie</i>	72
9.2	FÄRBEPROTOKOLLE IMMUNHISTOCHEMIE	74
9.2.1	<i>Claudin-5 und Aquaporin-4</i>	74
9.2.2	<i>IgG</i>	75
9.2.3	<i>Ansätze</i>	75
9.3	TABELLEN ZUM VERGLEICH DER LINKEN UND RECHTEN HEMISPHERE.....	77
9.3.1	<i>Claudin-5</i>	77
9.3.2	<i>IgG</i>	81
9.3.3	<i>Aquaporin-4</i>	85
9.4	TABELLEN ZUM ROI-VERGLEICH INNERHALB DER EINZELNEN HIRNSTRUKTUREN	89
9.4.1	<i>Claudin-5</i>	89
9.4.2	<i>IgG</i>	95
9.4.3	<i>Aquaporin-4</i>	101
9.5	MESSWERTE DER IMMUNOREAKTIVEN FLÄCHEN	108
9.5.1	<i>Claudin-5</i>	108
9.5.2	<i>IgG</i>	109
9.5.3	<i>Aquaporin-4</i>	110
9.6	GRAPHISCHER VERGLEICH DER UNTERSUCHUNGSGRUPPEN	111
9.6.1	<i>Claudin-5</i>	111
9.6.2	<i>IgG</i>	115
9.6.3	<i>Aquaporin-4</i>	119
9.7	GRAPHISCHER VERGLEICH ZWISCHEN TIEREN MIT- UND OHNE PHVD.....	123
9.7.1	<i>Claudin-5</i>	123
9.7.2	<i>IgG</i>	124
9.7.3	<i>Aquaporin-4</i>	125
9.8	TABELLEN ZUR SPEARMAN-KORRELATION ZWISCHEN IRF UND RELATIVER VENTRIKELGRÖÖE	126
9.8.1	<i>Claudin-5</i>	126
9.8.2	<i>IgG</i>	129
9.8.3	<i>Aquaporin-4</i>	131
9.9	GRAPHISCHE DARSTELLUNG DES ZEITLICHEN VERLAUFS DER IRF VON IGG	133
10	DANKSAGUNG	134
11	TABELLARISCHER LEBENSLAUF	135

1 Einleitung

Frühgeborene Säuglinge <30. Schwangerschaftswoche (Frühstgeborene) erleiden aufgrund der noch eingeschränkten Fähigkeit zur Autoregulation der Hirndurchblutung, unreifer arterieller Gefäße und allgemeinen Stressreaktionen, die mit der verfrühten Geburt und deren möglichen Komplikationen einher gehen, häufiger intraventrikuläre Blutungen.

Diese können wiederum zu einem Ungleichgewicht zwischen Liquorproduktion und Liquorresorption, sowie einer veränderten Liquordynamik führen, und so die Entwicklung eines posthämorrhagischen Hydrozephalus nach sich ziehen. Dieses Krankheitsbild geht mit erhöhter Morbidität, in Form von motorischen und kognitiven Defiziten, sowie erhöhter Mortalität einher.

Die Bluthirnschranke stellt eine Barriere zwischen Blutkreislauf und zentralem Nervensystem dar. Sie ermöglicht dem ZNS den Erhalt eines eigenen Milieus und schützt es vor zahlreichen extrathekalen Einflüssen.

Eine Entzündungsreaktion (z.B. ausgelöst durch Blutbestandteile), sowie Zellschäden durch Ischämie, Trauma oder veränderte Druckverhältnisse, können die Bluthirnschranke schädigen, und so ihre Barrierefunktion schwächen. Der Defekt der Bluthirnschranke kann wiederum zu Entzündungsreaktionen und stoffwechselbedingter Zellschädigung führen, und somit eine neurologische Symptomatik aggravieren.

Diese Arbeit ist Teil eines übergeordneten Projekts, dessen Ziel der Aufbau und die Evaluation eines Tiermodells für das Krankheitsbild des posthämorrhagischen Hydrozephalus ist. Anhand dieses Tiermodells werden im Rahmen des Projektes die Pathomechanismen hinter der Entwicklung eines posthämorrhagischen Hydrozephalus erforscht.

Folgende Hypothesen werden im Rahmen dieser Arbeit überprüft:

1. Die bilaterale Injektion von Blut in die Seitenventrikel 1-Tag alter neugeborener Ratten führt zu einem Hydrozephalus, wodurch zugrundeliegende Pathomechanismen studiert werden können.
2. Die IVH nach Geburt führt zu Störungen der Blut-Hirn-Schranke und der Wasserkanäle, welche immunhistochemisch mit den Markern Claudin-5, Immunglobulin G und Aquaporin-4 detektiert werden können.
3. Die Störung der Blut-Hirn-Schranke und der Wasserkanäle ist maßgeblich an der Entstehung eines posthämorrhagischen Hydrozephalus beteiligt.

Als weitere Arbeiten gingen „Posthämorrhagischer Hydrozephalus bei Frühgeborenen: Aufbau eines experimentellen Tiermodells und zeitliche Entwicklung des neuronalen und axonalen Schadens und Hydrozephalus nach intraventrikulärer Injektion von Blut bei neugeborenen Ratten“ C. Leistner 2020 und „Posthämorrhagischer Hydrozephalus bei Frühgeborenen: Einfluss der Inflammationsreaktion über die Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten und der Expression von High Mobility Group Box-1 und Tumornekrosefaktor- α auf die Entwicklung eines PHH im Rattenmodell“, D. Wocheßlander 2020 aus diesem Projekt hervor.

Mit den gewonnenen Ergebnissen soll ein besseres Verständnis der Erkrankung erreicht werden, um perspektivisch mögliche Angriffspunkte für neue Therapiemethoden identifizieren zu können.

Stand bisheriger Forschung ist, dass neugeborene Ratten von ihrem Entwicklungsstand vergleichbar mit frühgeborenen Säuglingen sind, weshalb von einer Eignung als Modellorganismus auszugehen ist.

Zur Simulation der intraventrikulären Hämorrhagie wird den neugeborenen Ratten am ersten Postnataltag je 100 μ l allogenes Vollblut bilateral (Gesamtvolumen 200 μ l) in die Seitenventrikel injiziert (Blut-Gruppe). Vergleichsgruppen erhalten je 100 μ l NaCl bilateral (Gesamtvolumen 200 μ l, NaCl-Gruppe), oder eine Schein-OP in Form eines Hautschnittes unter Narkose (Sham-Gruppe). Mittels MRT Untersuchung wird bei einigen Tieren die erfolgreiche intraventrikuläre Injektion überprüft.

Um den zeitlichen Verlauf einer sich entwickelnden Bluthirnschrankenstörung und/oder einer Wasserhaushaltsveränderung immunhistochemisch darstellen zu

können, werden die Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten (1, 3, 7, 21 Tage Post-OP) euthanasiert, die Hirne entnommen, fixiert und eingefroren. Anschließend werden Gefrierschnitte angefertigt und immunhistochemisch gefärbt. Untersucht werden Ventrikelgröße im Verhältnis zur Größe des Gehirns, die Dichte der Tight-Junction-Proteine (Claudin-5), der Wasserhaushalt des Gehirns (Aquaporin-4) und die Durchlässigkeit der Bluthirnschranke (Immunglobulin G).

2 Stand der Wissenschaft

2.1 Klinik

Die Intraventrikuläre Hämorrhagie (IVH) ist eine gefürchtete Komplikation des Frühgeborenen, welche bei 20-25% der Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht <1500g auftritt. Die ersten sieben Lebenstage des Frühgeborenen stellen die vulnerable Phase für eine IVH dar, wobei ein Großteil der Blutungen innerhalb der ersten 24 Stunden nach Geburt erfolgt. Die Länge dieser Risikoperiode ist unabhängig vom Gestationsalter (McCrea und Ment 2008). In Einer Studie zur IVH bei Frühgeborenen (48 % Frühstgeborene, 21 % Frühgeborene, 31% unbekanntes Gestationsalter) führte die IVH in etwa 9% der Fälle zur Entwicklung eines posthämorrhagischen Hydrozephalus (PHH) (Christian et al. 2016). Damit zählt die IVH zu den Häufigsten Ursachen eines Hydrozephalus beim Neugeborenen (Riva-Cambrin et al. 2016). Sowohl die IVH als auch das Krankheitsbild des PHH gehen mit einer deutlich erhöhten Morbidität und Mortalität (Christian et al. 2016), sowie der Gefahr neurologischer Spätfolgen (Bolisetty et al. 2014) einher. Morbidität, Mortalität und die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung eines PHH korrelieren deutlich mit dem Grad der IVH. Patienten mit höhergradigen IVH (Grad III/IV) entwickeln in 25-28% der Fälle einen PHH, Patienten mit IVH Grad I/II nur in 1-4% der Fälle (Christian et al. 2016).

Derzeitig empfohlene Therapiemöglichkeiten der Posthämorrhagischen ventrikulären Dilatation (PHVD) und des PHH umfassen Methoden der invasiven temporären Liquorableitung, sowie die dauerhafte Liquorableitung, beispielsweise mittels ventrikuloperitonealer Shunteinlage. Für nichtoperative Verfahren konnte bisher keine Empfehlung ausgesprochen werden (Mazzola et al. 2014). Dauerhafte Ventrikeldrainage bleibt bislang die Therapie der Wahl bei persistierendem PHH. Doch auch dieses Verfahren ist Komplikationsreich (Riva-Cambrin et al. 2016).

Auch von der wirtschaftlichen Seite betrachtet präsentiert sich der PHH als ein bedeutsames Krankheitsbild: Der Initiale Krankenhausaufenthalt eines Frühgeborene mit PHH dauerte im Jahr 2010 in den Vereinigten Staaten im Mittel 62 Tage, und kostete knapp 500.000 US-Dollar, bei steigender Tendenz (Christian et al. 2016).

Ein besseres Verständnis der Pathophysiologie des PHH könnte zur Erschließung weniger invasiver und komplikationsärmerer Therapieverfahren führen, und somit langfristig das Outcome der jüngsten Patienten verbessern.

2.2 PHH Pathophysiologie

Ursprung der Blutung ist die subependymale germinale Matrix. Von diesem an unreifen Gefäßen reichen Gewebe, bricht die Blutung in das Ventrikelsystem ein (Hambleton und Wigglesworth 1976, Ballabh 2010). Schwankungen des zerebralen Blutflusses und – Blutdrucks, häufig bedingt durch Komplikationen der Frühgeburtlichkeit, wie zum Beispiel das durch Surfactant-Mangel bedingte Atemnotsyndrom, tragen zur Entstehung dieser Hämorrhagie bei (Whitelaw 2001).

Die Pathophysiologie des PHH ist noch wenig verstanden. Auch ist unklar, ob dem akuten Hydrozephalus andere pathophysiologische Mechanismen zugrunde liegen, als dem chronischen (Strahle et al. 2012). Neben der Unterteilung in akut und chronisch, wird auch zwischen dem okklusiven- und dem kommunizierenden Hydrozephalus unterschieden: Für die Entstehung eines akuten okklusiven Hydrozephalus, wird davon ausgegangen, dass Blut(-koagel) Engstellen des Ventrikelsystems verschließen (Strahle et al. 2012). Zur Entstehung des kommunizierenden Hydrozephalus gibt es mehrere Theorien. Als mögliche Ursache wird unter anderem eine Resorptionseinschränkung durch Funktionsverlust der Arachnoidalzotten aufgrund von Mikrothromben, Entzündung und/oder Narbenbildung genannt (Hill et al. 1984). Da bei menschlichen Frühgeborenen je nach Gestationsalter noch wenig bis keine Arachnoidalzotten ausgebildet sind, wird davon ausgegangen, dass die Liquorresorption auch an anderen Stellen stattfindet. Im Tiermodell konnte nachgewiesen werden, dass Liquor zusätzlich über nasale Lymphbahnen, Nervenscheiden und über Ependymzellen und subependymale Venen drainiert wird (Papaiconomou et al. 2002, Strahle et al. 2012). Eine Schädigung und ein damit einhergehender Funktionsverlust der Arachnoidalzotten erscheint also als Erklärung für eine mangelnde Liquorresorption als nicht ausreichend. Auch eine Vermehrte Liquorproduktion durch Hypersekretion des Plexus Choroideus wird als Teil der Pathogenese des PHH gesehen (Karimy et al. 2017). Die Hydrodynamische Theorie vermutet in der Veränderung der Liquordynamik und -pulsation die Ursache der ventrikulären Dilatation beim PHH: Die Intrakranielle Compliance zeigt sich beim PHH vermindert, vermutlich durch eine Druckbelastung des Hirnparenchyms durch die IVH, welche zur Komprimierung der Mikrozirkulation und des venösen Systems führt. Dieser Compliancemangel führt zu einer gesteigerten Arteriellen Pulsation, welche sich auf das Liquorsystem überträgt. Die gesteigerte Liquorpulsation drängt das Hirnparenchym ausgehend vom Ventrikelsystem in Richtung Schädelknochen, was

sich in der Erweiterung der inneren Liquorräume, bei gleichzeitiger Verkleinerung des Subarachnoidalraums äußert. Die Verdrängung des Hirngewebes kann sich nun in einer weiteren Verminderung der Intrakraniellen Compliance äußern, wodurch eine Art Teufelskreis entsteht (Greitz 2007). Als Teil des Mechanismus der Chronifizierung der Erkrankung werden Entzündungsprozesse und die darauf folgende Fibrosierung genannt (Strahle et al. 2012). Im Tiermodell konnte zudem gezeigt werden, dass auch eine alleinige Dehnung des Ventrikelsystems durch Volumenbelastung mit künstlichem Liquor, und damit einhergehende Hirndruckzunahme, ohne Vorliegen einer Blutung, zu einer PHVD führen kann (Cherian et al. 2003).

Ventrikulomegalie, zunächst bedingt durch die IVH, später durch den PHH, führt über zahlreiche Mechanismen zur Schädigung des Hirnparenchyms. Beispielfhaft zu nennen wären die gleichzeitige Dehnung und Kompression des periventrikulären Gewebes, Ependymschäden, reduzierter cerebraler Blutfluss bis hin zur Ischämie, Hypoxie, Neuroinflammation und Gliose, Entwicklung eines periventrikulären Ödems, Demyelinisierung und axonale- sowie synaptische Degeneration. Die Schwere der Schädigung korreliert hierbei mit der Dauer und der Ausprägung der ventrikulären Dilatation (McAllister 2012).

2.3 Tiermodell

Bislang konnte sich kein einheitliches Tiermodell zur Untersuchung der Pathophysiologie des PHH durchsetzen. Ein obstruktiver, beziehungsweise nicht-kommunizierender Hydrozephalus lässt sich durch Injektion von Kaolin (hydratisiertes Aluminiumsilikat) in den vierten Ventrikel erzeugen (Schurr et al. 1953) (da Silva Lopes et al. 2009). Die uni- oder bilaterale Injektion von clostridialer Kollagenase in die Seitenventrikel von Rattenjungern löst durch Schädigung der Ventrikelwandungen und der darunter gelegenen gefäßreichen germinalen Matrix eine intraventrikuläre Blutung aus. Dieses Modell scheint der weiter oben beschriebenen Pathophysiologie der IVH sehr nahe zu kommen, konnte allerdings bislang nicht die Entwicklung eines PHH provozieren (Alles et al. 2010). Die bilaterale Injektion von autologem (Balasubramaniam und Del Bigio 2006) oder allogenen Blut in das Ventrikelsystem stellt ein recht zuverlässiges Modell der IVH dar, und führte in anderen Studien in über der Hälfte der Fälle zur Entwicklung eines PHH. Einige Tiermodelle verwenden zur Injektion Vollblut, andere zentrifugiertes Citratblut, um den erhöhten Hämatokrit von

Neugeborenen zu simulieren. Die Injektion findet innerhalb der ersten 7 Lebenstage der Jungtiere statt (Cherian et al. 2003, Ahn et al. 2013). Um die neurologische Entwicklung von neugeborenen Ratten mit denen eines frühgeborenen Säuglings zu vergleichen, führte eine Studie amplitudenintegrierter Elektroencephalographie (aEEG) zu verschiedenen Zeitpunkten bei neugeborenen Ratten durch, und verglich diese mit aEEG-Daten, welche bei klinischen Studien an menschlichen frühgeborenen erhoben wurden. Die Studie kam zu dem Ergebnis, dass Postnataltag 1 etwa der 23. Gestationswoche, Postnataltag 7 der 30-32. Gestationswoche, und Postnataltag 10 der 40.-42. Gestationswoche, also einem reifgeborenen Säugling entspricht (Tucker et al. 2009). Andere Quellen terminieren das Stadium des Reifgeborenen auf Postnataltag 12 bis 13 (Romijn et al. 1991). Ein Alter von kleiner 7 Tagen bei der Ratte, welches es in den bisherigen Tiermodellen zum PHH als Interventionszeitpunkt gewählt wurde, entspricht beim Menschen also einem Gestationsalter kleiner 30 Wochen (Tucker et al. 2009). Getestet wurden auch Modelle der Germinalen Matrix Hämorrhagie an Mäusen, Hasen, Schafen, Schweinen, Hunden, Katzen und Primaten. Nagetiermodelle zeigen sich im Vergleich jedoch aufgrund des oben genannten neurologischen Entwicklungsstatus bei Geburt mit Vorhandensein der germinalen Matrix, sowie der Einfachheit der Pflege der Tiere, für grundlegende experimentelle Studien als praktikabelste und ethisch vertretbarste Variante (Balasubramaniam und Del Bigio 2006).

2.4 Bluthirnschranke

Die Bluthirnschranke (BHS) ist verantwortlich für die Aufrechterhaltung eines speziellen Milieus innerhalb des zentralen Nervensystems (ZNS) (Zlokovic 2008, Sweeney et al. 2019). Hierzu transportiert sie Stoffwechselprodukte und andere Moleküle aus dem Blut in das ZNS und umgekehrt. Zudem verhindert sie das Eindringen von neurotoxischen Plasmabestandteilen, Blutzellen und Pathogenen (Zlokovic 2008, Sweeney et al. 2019). Diese Barrierefunktion beruht auf dem komplexen Zusammenspiel einer Vielzahl von Strukturen, die unter dem Begriff der Neurovaskulären Einheit (NVE) zusammengefasst werden können. Bestandteile der NVE sind das mit Tight Junctions (TJs) verbundene, nicht fenestrierte Kapillarendothel, die Basalmembran, Perizyten, Astrozytenfortsätze, Mikroglia, Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM) und neuronale Endigungen (Zlokovic 2008, Sweeney et al. 2019). TJs limitieren die parazelluläre Durchlässigkeit des Kapillarendothels, indem

sie den Interzellularraum zwischen den Endothelzellen an ihrer Position nahezu verschließen (Tsukita et al. 2001). Astrozytenfortsätze weisen an ihren perivaskulär gelegenen Enden hohe Konzentrationen an Aquaporin-4 auf, und sind somit maßgeblich am Wasserhaushalt des Gehirns beteiligt (Iloff et al. 2012). Zudem spielen sie eine tragende Rolle in der Reifung und dem Erhalt der BHS, indem sie über den Hedgehog Pathway die Expression von Claudin-5 und anderen TJ-Proteinen regulieren (Alvarez et al. 2011). Im Zusammenspiel mit neuronalen Endigungen können Astrozytenfortsätze zudem den cerebralen Blutfluss je nach Energiebedarf der Hirnregion anpassen. Dieser Vorgang wird neurovaskuläre Kopplung genannt (Attwell et al. 2010). Perizyten tragen zur Integrität der BHS bei, indem sie den transzytären Transport durch die Endothelzellen regulieren und die korrekte Polarisierung der Astrozytenfortsätze unterstützen (Armulik et al. 2010). Außerdem können sie durch kontraktile Proteine den Kapillardurchmesser verändern, und sind so an der Regulation des cerebralen Blutflusses im Rahmen der neurovaskulären Kopplung beteiligt (Hamilton et al. 2010). Im Ratten-Modell konnte gezeigt werden, dass die Komplexität und Dichte der TJs in den letzten Tagen der Embryonalentwicklung deutlich zunimmt und am Postnataltag 1 (PND1) mit der eines ausgewachsenen Tieres vergleichbar ist (Kniesel et al. 1996).

Es konnte gezeigt werden, dass körpereigenes Albumin, sowie injiziertes Kaninchen-IgG bei 2-4 Tage alten Jungtieren deutlich vermehrt die BHS überwindet, als bei adulten Ratten (Fabian und Hulsebosch 1989, Skultetyova et al. 1993). Es ist also davon auszugehen, dass die BHS neugeborener Ratten trotz reifer TJ-Strukturen in den ersten Lebenstagen noch unreif ist.

Einen bekannten Schädigungsmechanismus der Bluthirnschranke stellt die Entzündungsreaktion dar: Proinflammatorische Zytokine wie TNF- α sorgen für eine gesteigerte Durchlässigkeit der BHS, eine Verringerung der nachweisbaren TJ-Proteine und, über eine Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen, für einen Abbau bestehender TJ-Proteine (Yang et al. 2007, Förster et al. 2008, Rosenberg 2009, Aslam et al. 2012). Der Ablauf eines BHS-Schadens konnte in Studien zu Schlaganfall und traumatischem Hirnschaden als biphasisch beschrieben werden, wobei der vermehrten Durchlässigkeit in jeder Phase ein anderer Mechanismus zugrunde liegt. Beim ischämischen Schlaganfall konnte sechs Stunden nach der Schädigung ein erhöhter transzytärer Transport über die BHS nachgewiesen werden, was der ersten Phase der BHS-Schädigung zu entsprechen scheint. Die zweite Phase der BHS-

Schädigung lässt sich durch einen Verlust von TJs, etwa 48-58 Stunden nach Trauma erklären (Baskaya et al. 1997, Knowland et al. 2014).

2.5 Claudin 5

Claudin-5 spielt als Tight-Junction Protein eine tragende Rolle für die Funktion der BHS, indem es dazu beiträgt den parazellulären Übertritt von Molekülen aus den Blutgefäßen in das Hirnparenchym zu verhindern. Hierzu interagieren Claudin-5 Proteine mit Claudin Proteinen der benachbarten Endothelzelle (Abbott et al. 2010, Greene et al. 2019). An diesen sogenannten „kissing points“ geht der interzelluläre Abstand gegen Null (Tsukita et al. 2001). Neben Claudin-5 konnten im Gehirn auch Claudin-1, -3 und -12 nachgewiesen werden, wobei die mRNA Level von Claudin-5 fast 600-mal höher als die der anderen Claudin-Proteine ausfallen (Ohtsuki et al. 2008).

Der isolierte Verlust von Claudin-5 führt bei Claudin-5 Knockout-Mäusen zu einer selektiven Durchlässigkeit der BHS für Moleküle < 800 Da (Nitta et al. 2003). TNF-alpha und andere proinflammatorische Faktoren führen zur verminderten Expression von Claudin-5, und über die Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen zu einem Abbau bestehender Claudine (Aslam et al. 2012). In der Klinik zeigt sich etwa 48 Stunden nach traumatischer Hirnverletzung oder ischämischem Schlaganfall eine verminderte Expression von Claudin-5. Vier Tage nach der Läsion stellt sich die Claudin-5 Expression wieder als normalisiert dar (Nag et al. 2007).

2.6 IgG

Als allgemeinen Marker für erhöhte Durchlässigkeit der BHS wird in der Literatur häufig der Immunhistochemische Nachweis von erhöhten Konzentrationen an Immunglobulin-G (IgG) im Hirngewebe gewählt (Shindo et al. 2016, Haley und Lawrence 2017, Cheng et al. 2018). Im Physiologischen Zustand ist der IgG-Gehalt im Hirn und Liquor der Ratte äußerst gering (Chang et al. 2018). Eine intrathekale Produktion von IgG ist bei chronischen Entzündungszuständen des ZNS beschrieben, z.B. bei Multipler Sklerose oder Infektionserkrankungen des ZNS (Kostulas et al. 1987, Reiber et al. 1998). In einer Studie zum Thema Temporallappenepilepsie konnte gezeigt werden, dass es einhergehend mit der BHS-Schädigung, sowohl beim

Menschen als auch im Rattenmodell, zu extravasalen IgG-Ansammlungen kommt (Rousset et al. 2012). Plasmaproteine wie IgG, die ins Hirngewebe gelangen, zeigen sich nach einiger Zeit intrazellulär, vor allem in Nervenzellen (Loberg et al. 1993, Rousset et al. 2012). Eine Studie zur Pharmakokinetik von monoklonalen Antikörpern im Rattengehirn konnte noch 30 Tage nach hochdosierter intravenöser Gabe von Trastuzumab, einem rekombinanten humanisierten monoklonalen IgG1 κ -Antikörper, diesen mittels Mikrodialyse im Hirnparenchym nachweisen (Chang et al. 2018). Geht man von einer Übertragbarkeit dieser Beobachtung auf autologe IgG aus, so ist von einem langsamen Abbau der Immunglobuline und somit einem langen Verweilen im ZNS auszugehen.

2.7 Aquaporin 4

Aquaporine sind Transmembranproteine die als bidirektionale Wasserkanäle fungieren (Guo et al. 2018). Neben der Regulation des Wasserhaushalts des Gehirns, spielt Aquaporin-4 bei Zellmigration und neuronaler Signaltransduktion eine Rolle (Papadopoulos und Verkman 2008). Lokalisiert ist Aquaporin-4 vor allem an jenen Astrozytenfortsätzen, die als Teil der NVE mit der BHS und somit dem Gefäßsystem in Kontakt stehen, sowie an Astrozytenfortsätzen an der Hirn-Liquor-Grenze (Badaut et al. 2002, Guo et al. 2018). Es konnte gezeigt werden, dass Aquaporin-4 bei Vorliegen eines Hydrozephalus vermehrt exprimiert wird. Hierbei korreliert das Level an Aquaporin-4 positiv mit der Ausprägung des Hydrozephalus (Mao et al. 2006, Guo et al. 2018).

Weitere Tiermodelle zeigten, dass die Expression von Aquaporin-4 24 Stunden nach transientser Ischämie zunächst herabreguliert wird, um sich anschließend wieder zu erholen (Frydenlund et al. 2006). In einem Rattenmodell zum traumatischen Hirnschaden wurde beschrieben, dass Aquaporin-4 im Kontusionsgebiet mit vorliegendem BHS-Schaden herabreguliert wurde, an Hirnarealen mit erhaltener BHS-Integrität jedoch unverändert blieb. Die Autoren zogen hier den Schluss, dass im Falle eines vasogenen Hirnödems eine Mehrexpression von Aquaporin-4 erfolgt, im Falle eines cytotoxischen Hirnödems hingegen die Aquaporin-4 Expression unverändert bleibt (Ke et al. 2001).

Neben Aquaporin-4 werden im Gehirn auch Aquaporin-1 und Aquaporin-9 exprimiert. Aquaporin-1 ist an der ventrikelzugewandten Zellmembran der Epithelzellen des

Plexus choroideus lokalisiert, was für eine Rolle von Aquaporin-1 in der Sekretion von Liquor cerebrospinalis spricht (Nielsen et al. 1993). Aquaporin-9 konnte im Gehirn hauptsächlich in Katecholaminergen Zellen nachgewiesen werden, eine tragende Rolle von Aquaporin-9 für den globalen Wasserhaushalt des Gehirns ist unwahrscheinlich (Badaut et al. 2004).

2.8 Entwicklung der Hypothesen

Das Krankheitsbild des PHH stellt in der modernen Medizin weiterhin eine Herausforderung dar. Ein besseres Verständnis der Pathophysiologie dieser Erkrankung ist ein nötiger Schritt auf dem Weg zu neuen Behandlungs- oder gar Präventionsmöglichkeiten.

Zur Erforschung der Pathophysiologie des PHH wäre ein reproduzierbares Tiermodell, welches in seinen klinischen Eigenschaften möglichst nahe am Krankheitsbild des menschlichen Frühgeborenen liegt, ein wichtiges Werkzeug.

Die Literatur beschreibt BHS-Störungen bei zahlreichen neurologischen und neurochirurgischen Pathologien. Eine Störung der BHS ist auch in Reaktion auf eine IVH zu erwarten. Durch immunhistochemische Untersuchung der Funktion der BHS durch intraparenchymalen IgG-Nachweis und Untersuchung der Expression des TJ-Proteins Claudin-5 sollte sich diese BHS-Störung abbilden und beschreiben lassen.

Eine Veränderung in der Expression der Wasserkanäle Aquaporin-4 wurde ebenfalls bei zahlreichen neurologischen und neurochirurgischen Pathologien beschrieben, unter anderem beim Krankheitsbild des Hydrozephalus.

Durch eine immunhistochemische Untersuchung der benannten Parameter zu mehreren Zeitpunkten nach IVH im Tiermodell erwarten wir, Rückschlüsse auf eine mögliche Rolle der BHS und der Wasserkanäle in der Pathophysiologie des PHH ziehen zu können.

Folgende Hypothesen sollen demnach in dieser Arbeit überprüft werden:

1. Die bilaterale Injektion von Blut in die Seitenventrikel 1-Tag alter neugeborener Ratten führt zu einem Hydrozephalus, wodurch zugrundeliegende Pathomechanismen studiert werden können.

2. Die IVH nach Geburt führt zu Störungen der Blut-Hirn-Schranke und der Wasserkanäle, welche immunhistochemisch mit den Markern Claudin-5, Immunglobulin G und Aquaporin-4 detektiert werden können.
3. Die Störung der Blut-Hirn-Schranke und der Wasserkanäle ist maßgeblich an der Entstehung eines posthämorrhagischen Hydrozephalus beteiligt.

3 Material und Methoden

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde in einem gemeinsamen Projekt mit (Name für Online-Version entfernt) und (Name für Online-Version entfernt) durchgeführt, weshalb derselbe Versuchsaufbau, sowie große Teile des Weiteren methodischen Vorgehens auch in ihren jeweiligen Promotionsarbeiten beschrieben werden (Leistner 2020, WocheSlander 2020).

Die Vorversuche in diesem Projekt, sowie ein Großteil der Operationen wurden gemeinsam mit Dr. Amin Hashemi durchgeführt.

Eine Auflistung der verwendeten Materialien, Instrumenten, Geräten und Chemikalien ist im Anhang zu finden (siehe Kapitel 9.1 und 9.2).

3.1 Versuchstiere

Insgesamt wurden 101 Jungtiere beider Geschlechter zur Auswertung eingeschlossen. Diese stammten aus den Würfen von 9 Sprague-Dawley®-Ratten, welche ca. 5-12 Tage präpartum von Charles River Deutschland (Sulzfeld, Deutschland) bezogen wurden.

Etwa 24-48 Stunden nach der Geburt wurden die Jungtiere in drei Gruppen eingeteilt, und unterliefen, entsprechend ihrer Gruppe, einer der folgenden Interventionen: Die Blut-Gruppe (35 Tiere) erhielt eine bilaterale ventrikuläre Injektion von je 100µl Donorblut (Gesamtinjektionsvolumen 200µl je Tier), die NaCl-Gruppe (32 Tiere) eine bilaterale ventrikuläre Injektion von je 100µl 0,9-prozentiger steriler Kochsalzlösung (Gesamtinjektionsvolumen 200µl je Tier) und die Sham-Gruppe (34 Tiere) eine Scheinoperation in Form eines Hautschnitts mit anschließender Freipräparation der Schädelkalotte. Aus Gründen der Praktikabilität führten wir meist mehrere Interventionen des gleichen Typs hintereinander durch, weshalb die Gruppenzuteilung nicht strikt randomisiert erfolgte. Die Neugeborenen wurden mit einem Filzschreiber markiert und erhielten eine individuelle Nummer zur Identifikation. Die Gruppenzugehörigkeit der Tiere wurde in einem hierfür angelegten Protokoll dokumentiert. Im weiteren Verlauf war also eine klare Identifikation jedes einzelnen Jungtieres gegeben, ohne dass die Gruppenzugehörigkeit ersichtlich war. Erst zur statistischen Auswertung wurde die Gruppenzugehörigkeit durch Zuhilfenahme des oben genannten Protokolls erneut nachvollzogen.

Die Jungtiere wurden im Käfig der Mutter gehalten. Dieser befand sich in einem Tierstall mit zwölfstündigem Hell-Dunkel-Rhythmus, konstanter Raumtemperatur

($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) und Luftfeuchtigkeit ($>50\%$). Die Käfige waren mit Nistmaterial und einer Versteckmöglichkeit ausgestattet, den Tieren zu jeder Zeit Wasser und Futter zur freien Verfügung. Die Käfige wurden je nach Verschmutzungsgrad, jedoch mindestens einmal wöchentlich, gereinigt.

Die Jungtiere wurden täglich gewogen, und je nach Versuchsreihe 1, 3, 7, oder 21 Tage nach Intervention zur Hirnentnahme euthanasiert.

3.2 Kardiale Punktion der Donor-Tiere

Zur Gewinnung des Donor-Blutes wurden Sprague-Dawley®-Ratten der Firma Charles River Deutschland (Sulzfeld, Deutschland) verwendet.

Die Donor-Tiere wurden mittels subkutaner Injektion von Medetomidinhydrochlorid $0,25\text{ mg/kg}$ Körpergewicht und Midazolam $2,5\text{ mg/kg}$ Körpergewicht narkotisiert. Die Tiefe der Narkose wurde durch Überprüfung des Kornealreflexes und durch Setzen eines Schmerzreizes an der Schwanzspitze des Tieres kontrolliert. Bei unzureichender Narkosetiefe oder zur Verlängerung der Narkose wurden weitere Injektionen mit einem Bruchteil der Initialdosis durchgeführt. Die Tiere wurden für die Dauer der Operation, spontan Raumluft atmend, in Rückenlage bei leicht überstreckter Brustwirbelsäule unter einer Wärmelampe gelagert. Zum Schutz vor Austrocknung, wurden die Augen des Tieres mit Bepanthen® Augencreme (Bayer, Deutschland) benetzt. Das Fell an Thorax und Abdomen des Tieres wurden mit einem elektrischen Rasierer entfernt und die Haut gründlich desinfiziert. Zum Auffinden der Punktionsstelle wurde der Herzspitzenstoß kaudal des Xyphoids palpirt. Nach dem Markieren der geplanten Punktionsstelle wurde unter Aspiration durch eine 1ml Spritze eine G20 Kanüle im Winkel von $20\text{-}30^{\circ}$ zur Hautoberfläche nach kranial Richtung Herz vorgeschoben.

Sobald sich der Spritzenzylinder mit Blut füllte wurde die Kanüle in ihrer Position belassen, bis etwa $0,3\text{ ml}$ Blut entnommen worden waren. Anschließend wurde die Kanüle entfernt. Dieser Prozess wurde für jedes Jungtier der Blut-Gruppe wiederholt und von den Donor-Tieren problemlos vertragen. Ein Donor-Tier wurde hierbei zwischen zwei- und neunmal punktiert. Geht man für die Donor-Tiere von einem Gewicht von ca. 300 g aus, so beträgt das Blutvolumen des Tieres etwa $18,77\text{ ml}$ (Lee und Blaufox 1985). Durch neun Punktionen würde einer Donor-Ratte ein Blutvolumen von $2,7\text{ ml}$ entnommen werden. Dies entspricht einer maximalen Entnahme von $14,4$

% des Blutvolumens des Donor-Tiers. Nach Abschluss des Operationstages wurden die Donor-Tiere euthanasiert.

3.3 Vorbereitung der Blut- und NaCl-Gruppe

Am Arm des Stereotax wurden zwei G26 Kanülen im Abstand von 2mm zueinander angebracht. Diese wurden jeweils über einen Polyethylenschlauch mit 0,4mm Innendurchmesser mit einer mit 0,9-prozentiger Kochsalzlösung gefüllter 1ml Spritze verbunden, welche in einer Mikroinjektionspumpe (TSI Systems, Bad Homburg) eingespannt waren. Aus einem Polyethylenschlauch mit 6 mm Innendurchmesser und Paraffinwachs wurde eine Mund-Nasen-Maske gefertigt, über welche die Zufuhr von Narkosegas und Sauerstoff, sowie die Abfuhr von Ausatemluft der Jungtiere während der Operation geregelt wurde. Die Arbeitsfläche wurde mit einer Heizmatte angewärmt, um einem Absinken der Körpertemperatur der Jungtiere während der Operation entgegenzuwirken.

Abbildung 1

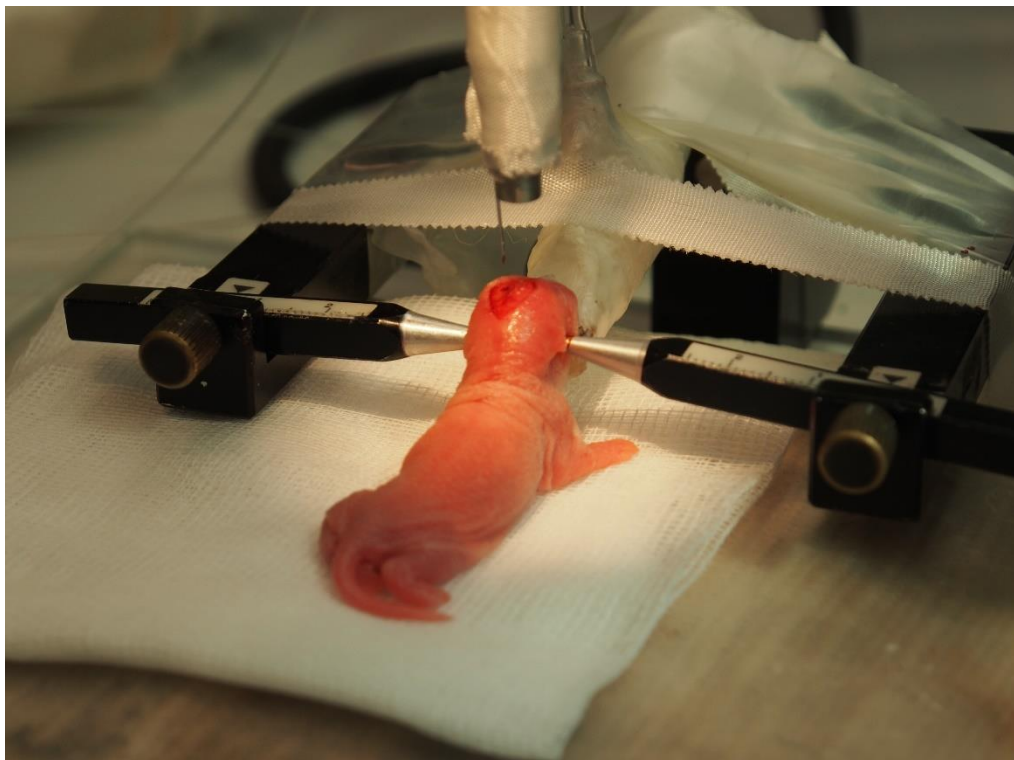


Abbildung 1: Operationsaufbau: Neugeborenes mit freipräpariertem Operationsgebiet kurz vor intraventrikulärer Injektion. Das Bild zeigt eine unilaterale Injektion, weshalb nur eine Injektionskanüle intraventrikulär eingeführt ist.

3.4 Interventionsablauf der Blut-Gruppe

Die Neugeborenen wurden vor Operationsbeginn gewogen. Anschließend wurden sie durch Vorhalten von Isofluran über die Mund-Nasen-Maske narkotisiert. Die Narkosetiefe wurde durch setzen eines Schmerzreizes an der Schwanzspitze überprüft. Der Schädel des narkotisierten Jungtieres wurde in einem Stereotaktischen Rahmen fixiert, wobei man sich beim Anbringen der Halterungsstifte am äußeren Gehörgang der Tiere orientierte. Die Mund-Nasen-Maske blieb zum Erhalt der Gasnarkose während des gesamten Operationsvorgangs in Position.

Nach Lokalanästhesie mittels Xylokainspray erfolgte ein etwa 5mm langer Hautschnitt von rostral nach occipital in der Mittellinie des Schädels. Zur Darstellung des Bregma und der Punktionsstellen, wurde die Schädelkalotte mittels stumpfer Präparation freigelegt. Der Arm des Stereotax wurde so eingestellt, dass sich die linke Kanüle exakt oberhalb des Bregma befand. Anschließend wurde sie 1mm nach links und 1mm nach occipital verschoben, sodass sich beide Kanülen oberhalb der jeweils angedachten Punktionsstelle befanden. Die Punktionsstellen wurden mit einem Stift markiert und die Kanülen anschließend wieder angehoben. Nun wurde die Schädelkalotte an den markierten Stellen mittels Bohrer eröffnet, die Injektionskanülen testweise bis knapp über die Hirnoberfläche abgesenkt und anschließend erneut angehoben.

Abbildung 2

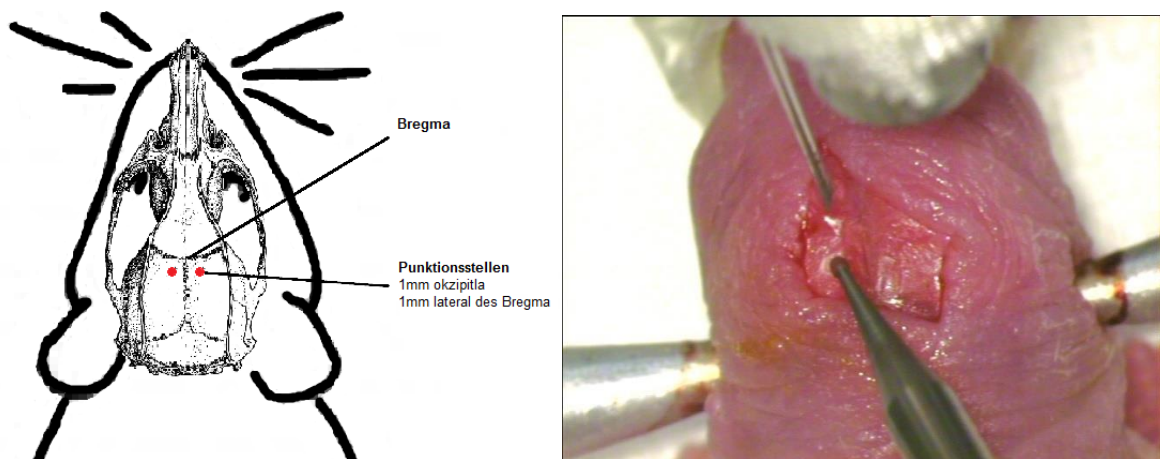


Abbildung 2: links: Schematische Darstellung der Injektionsstellen: 1mm lateral und 1mm posterior des Bregma, 3mm ventral der Hirnoberfläche; rechts: Eröffnung der Schädelkalotte an den Punktionsstellen mittels Bohrer.

Nach oben beschriebener Gewinnung von Donor-Blut, wurden die Polyethylenschläuche von der Mikroinjektionspumpe getrennt, blasenfrei mit Donorblut befüllt und anschließend erneut an die Spritzen in der Mikroinjektionspumpe

konnektiert. Die dabei aus den Injektionskanülen austretende Kochsalzlösung und erste Blutstropfen wurden mit Tupfern aufgefangen und verworfen.

Die Injektionskanülen wurden nun durch absenken der Kanülenspitze um 3mm ab Hirnoberfläche in den Seitenventrikeln des Jungtieres platziert und befand sich somit 1mm posterior und 1mm lateral des Bregma, bei einer Injektionstiefe von 3mm nach Ventral, ausgehend von der Hirnoberfläche.

Anschließend wurden über die Mikroinjektionpumpe je 100µl Blut mit einer Flussrate von 50 µl/min über zwei Minuten injiziert (Gesamtvolumen 200µl). Nach Abschluss des Injektionsvorganges wurden die Kanülen noch für eine Minute in ihrer Position belassen und anschließend, im Verlauf einer weiteren Minute langsam zurückgezogen. Dies sollte einem möglichen Rücktritt von Anteilen des Injektionsvolumens durch den Stichkanal entgegenwirken.

Das Neugeborene wurde aus der Stereotaktischen Fixierung entfernt und der Hautschnitt mittels Gewebekleber verklebt, oder mit zwei Einzelknopfnähten vernäht. Anschließend erhielt das Neugeborene zur Identifikation eine Markierung mit einem Permanent-Marker. Der Aufwachprozess wurde unter einer Wärmelampe überwacht. Nachdem das Jungtier sich wieder gezielt bewegte, wurde es zurück in den Käfig der Mutter gelegt. Alle Neugeborenen wurden vom Muttertier akzeptiert und zum Wurf zurückgetragen

3.5 Interventionsablauf der NaCl-Gruppe

Die Tiere der NaCl-Gruppe wurden auf dieselbe Weise für die Operation vorbereitet, narkotisiert, stereotaktisch eingespannt, und das Operationsgebiet ebenso freipräpariert. Neugeborene der NaCl- Gruppe erhielten eine Injektion von je 100µl 0,9-prozentiger steriler Kochsalzlösung in den rechten und linken Seitenventrikel (Gesamtvolumen 200µl). Das Schlauchsystem war hier zu jeder Zeit mit 0,9-prozentiger Kochsalzlösung gefüllt. Die Injektion erfolgte ebenfalls über zwei mit 0,9-prozentiger Kochsalzlösung befüllten 1 ml Spritzen, eingespannt in eine Mikroinjektionpumpe, bei einer Flussrate von 50 µl/min über zwei Minuten.

Die Vorgehensweise nach der Injektion entsprach der der Blut-Gruppe.

3.6 Interventionsablauf der Sham-Gruppe

Neugeborene der Sham-Gruppe erhielten eine Scheinoperation in Form einer Narkose mittels Isofluran, gefolgt von einem ca. 5 mm langen Hautschnitt von rostral nach

occipital in der Mittellinie des Schädels. Die Schädelkalotte wurde wie bei den Tieren der Injektionsgruppen stumpf freipräpariert, und der Hautschnitt im Anschluss mit Gewebekleber oder zwei Einzelknopfnähten verschlossen. Die weitere Vorgehensweise entsprach der der anderen beiden Gruppen.

3.7 MRT-Aufnahmen

Zur Kontrolle des gewählten Operationsverfahrens wurden in Vorversuchen bei einigen Tieren 24 Stunden nach erfolgter Operation MRT-Aufnahmen angefertigt, um das injizierte Blut in den Seitenventrikeln darzustellen.

Hierzu wurden die Jungtiere mittels subcutaner Injektion von Medetomidinhydrochlorid 0,5 mg/kg Körpergewicht und Midazolam 5 mg/kg Körpergewicht narkotisiert. Daraufhin wurden die Tiere in einem durch 3D-Druck erstellten Schlitten fixiert und zum Wärmehalt mit Kompressen zugedeckt. Die Augen der Jungtiere wurden mit Bepanthen® Augencreme vor dem Austrocknen geschützt.

Nach Abschluss der MRT-Untersuchung wurde der Aufwachprozess unter einer Wärmelampe überwacht. Wenn die Jungtiere sich wieder gezielt bewegten, wurden sie zurück in den Käfig der Mutter verbracht.

3.8 Hirnentnahme und Fixierung

Die Jungtiere wurden, je nach Versuchsreihe, 1, 3, 7 oder 21 Tage nach Intervention euthanasiert. Hierzu wurden sie mit Medetomidinhydrochlorid 0,5 mg/kg Körpergewicht und Midazolam 5 mg/kg Körpergewicht in eine tiefe Narkose versetzt. Die Tiefe der Narkose wurde durch Überprüfung des Kornealreflexes und durch Setzen eines Schmerzreizes an der Schwanzspitze des Tieres überprüft. Im Falle einer nicht ausreichend tiefen Narkose wurde ein Bruchteil der Initialdosis nachgegeben.

Die hierdurch entstandenen Gruppen unterschiedlicher Überlebenszeit benannten wir Post-Trauma 1 (PT1), Post-Trauma 3 (PT3), Post-Trauma 7 (PT7) und Post-Trauma 21 (PT21).

Bei Jungtieren der Gruppe PT1 und PT3 erfolgte nun die Dekapitation mittels Präparationsschere, da sich eine Perfusionsfixierung aufgrund des noch sehr kleinen Herzens dieser Tiere als inkonsistent erwies.

Jungtiere der Gruppe PT7 und PT21 wurden Perfusionsfixiert. Hierzu wurde mit der Präparationsschere Bauchhaut und Peritoneum mit einem Querschnitt unterhalb des

Xyphoids eröffnet. Der Schnitt wurde erweitert und der gesamte Rippenbogen, sowie die Leber stumpf freipräpariert. Anschließend erfolgte die Eröffnung des Thorax durch Durchtrennung des Zwerchfells und der Pleura parietalis entlang des ventralen Rippenbogens mit der Präparationsschere. Das Sternum des Jungtieres wurde nun in einer Klemme fixiert. Die Rippen wurden entlang der Medioklavikularlinie mit der Präparierschere durchtrennt, und der mittlere Teil des Brustkorbes über die am Sternum befindliche Klemme nach kranial aufgeklappt. Nun erfolgte die stumpfe Präparation des Herzens und die Punktion des linken Ventrikels von apikal mit einer abgestumpften 23G Kanüle (Perfusionskanüle). Die Leber des Tieres wurde durch einen Vertikalen Schnitt mit der Präparierschere eröffnet, und über die Perfusionskanüle mit einem Infusionssystem zunächst 0,9-prozentige sterile Kochsalzlösung transkardial infundiert. Sobald klare Flüssigkeit aus dem Leberschnitt austrat, wurde mittels Dreiwegehahn der Zufluss an Kochsalzlösung gestoppt, und mit Paraformaldehyd (pH 7,4; siehe Anhang Kapitel 9.1.1) für etwa 3 Minuten weiter perfundiert, bis das Tier sichtlich ersteifte. Der Perfusionsdruck betrug 100 cm Wassersäule.

Anschließend erfolgte die Hirnentnahme bei den Jungtieren aller Versuchsreihen nach dem gleichen Prinzip:

Mit der Präparierschere wurde die Kopfschwarte von occipital nach rostral durchtrennt und die Schädelkalotte stumpf freipräpariert. Nachdem die Schädelnähte mit einem Skalpell angeschnitten worden waren, erfolgte das stückweise Abtragen des Schädeldachs mit einer gebogenen Mikropinzette. Mit der gebogenen Mikropinzette wurde die Dura Mater anschließend vorsichtig abgezupft und verworfen. Hirnnerven und Myelencephalon wurden mit einem Dissektor stumpf durchtrennt, und das Gehirn in eine mit Paraformaldehyd befüllte Schraubröhre (50 ml) gelegt. Hier verblieb es für 48h bei 4°C zum Nachfixieren.

Anschließend wurde das Gehirn aus dem Paraformaldehyd entnommen und in einer 20-prozentigen Saccharose-Lösung bei 4°C weitere 48 Stunden dehydriert, um dem Entstehen von Gefrierartefakten beim Einfrierungsprozess entgegenzuwirken.

Zum Einfrieren wurden die Gehirne aus der Saccharose-Lösung entfernt, mit Kompressen abgetupft, und für 60 Sekunden in mit Trockeneis gekühltes Isopentan gelegt. Die gefrorenen Gehirne wurden zunächst in Aluminiumfolie gewickelt, in Plastikbehälter verpackt und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert.

Das Schneiden der Gehirne erfolgte mittels Kryostat (Leica CM1850 UV) bei -20 °C. Hierzu wurde der occipitale Anteil des Gehirns mit Kryo-Gel (Leica Biosystems, Richmond, IL - USA) am Objekthalter des Kryostats befestigt. Von Frontal wurde das Gehirn nun schichtenweise abgetragen, und immer wieder mittels Lichtmikroskopie eines Schnittes die Lage im Gehirn bestimmt. Wenn sich die Seitenventrikel des Gehirns unter dem Lichtmikroskop zeigten, wurde mit der Anfertigung der Objektträger begonnen. Hierzu wurden je drei 5µm dicke Schnitte auf einem Objektträger platziert, der Objektträger beschriftet und bei -20 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

3.9 Immunhistochemie

Um die Ausmessung der Ventrikel und die immunhistochemischen Untersuchungen in ausreichender Entfernung vom Stichkanal, bei gleichzeitiger Beurteilbarkeit der Seitenventrikel durchführen zu können, wählten wir Schnitte in der Ebene Bregma +1,0 mm.

Für die immunhistochemischen Färbungen von Claudin-5 und Aquaporin-4 wurden die Schnitte zunächst auf einer Streckplatte bei etwa 35 °C aufgetaut, anschließend in ein mit Citratpuffer (pH 6,0; siehe Anhang Kapitel 9.2.3) gefülltem Gefäß gestellt, und 25 Minuten in einem Heißluftdämpfer demaskiert. Nachdem die Schnitte nach weiteren 30 Minuten im Citratpuffer abgekühlt waren, erfolgte nach kurzem Spülen in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) das Blocken der endogenen Peroxidase durch ein 20-minütiges Bad in einer Mischung aus 100 Teilen Methanol, 100 Teilen PBS und zwei Teilen 35-prozentigem Wasserstoffperoxid. Nach weiteren Spülvorgängen umrandeten wir die Schnitte auf den Objektträgern einzeln mit einem hydrophoben Stift (Dako-Pen®, Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark), legten sie in eine feuchte Kammer und bedeckten die Schnitte mit fünfprozentigem Normal-Maus-Serum. Nach Ablauf der 30-minütigen Inkubationszeit wurde das Serum abgekippt und der primäre Antikörper aufgetragen. Den primären Antikörper gegen Claudin-5 (Maus, 4C3C2, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts) verwendeten wir in Verdünnung von 1:500, den primären Antikörper gegen Aquaporin-4 (Maus, ab9512, Abcam, Cambridge, England) in Verdünnung 1:100. Ein Schnitt pro Objektträger diente als Negativkontrolle, hier wurde PBS anstelle des primären Antikörpers aufpipettiert. Die Schnitte wurden bei 4 °C über Nacht in der feuchten Kammer belassen.

Am Folgetag wurde der primäre Antikörper abgekippt, und nach mehreren Spülvorgängen der Sekundäre Antikörper aufgetropft. Nach 30 Minuten Inkubation

wurde erneut gespült und der AB-Komplex aufgetragen, welcher ebenfalls 30 Minuten auf den Schnitten belassen wurde. Nach erneuten Spülvorgängen erfolgte die Färbung mittels 3,3'-Diaminobenzidin (DAB). Die Inkubationszeit des DAB variierte hier je nach zuvor verwendetem primärem Antikörper. Nach einem letzten Spülvorgang und einer Alkoholreihe aufsteigender Konzentration, wurden die Schnitte in ein mit Xylol gefülltes Gefäß gestellt, und nach 5 Minuten mit dem Eindeckeln begonnen.

Zur immunhistochemische Färbung von IgG wurden die Schnitte ebenfalls auf einer Streckplatte bei ca. 35 °C aufgetaut. Nach waschen der Schnitte mit PBS erfolgte das Blocken der endogenen Peroxidase in dreiprozentiger Wasserstoffperoxid-Lösung. Nach erneutem Waschen in PBS wurde der 1:500 verdünnte Antikörper gegen Ratten-IgG (Ziege, BA-9400, Vector Laboratories, Petersborough, UK) aufgetragen, und 90 Minuten in der feuchten Kammer inkubiert. Nach erneuter Waschung in PBS erfolgte die 30-minütige Inkubation des AB-Komplexes. Anschließend wurden die Schnitte in PBS gewaschen, und mit DAB eingefärbt. Nach Abwaschen des DAB in PBS und einer aufsteigenden Alkoholreihe, wurden die Schnitte in ein Xylolbad gestellt, und nach fünf Minuten mit dem Eindeckeln begonnen.

Für die exakten Färbeprotokolle sei an dieser Stelle an den Anhang dieser Arbeit verwiesen (Kapitel 9.2).

3.10 Erhebung der Immunoreaktiven Fläche und der relativen Ventrikelgröße

Die Kollegen der Biobank der Universitätsmedizin Mainz erstellten mit einem Objektträgerscanner (NanoZoomer, Hamamatsu, Japan) Aufnahmen der gefärbten Schnitte in 20-Facher Vergrößerung.

Für die Auswertung der immunhistochemischen Schnitte wählten wir fünf Hirnstrukturen, in welchen wir mehrere quadratische Flächen als Regions of Interest (ROI) definierten. Die Kantenlänge der ROIs wurde an die durchschnittliche Größe der Gehirne gruppiert nach Überlebenszeit angepasst (Für eine Beschreibung dieses Vorgangs siehe Leistner, 2020). Bei Hirnen der PT1 Tiere betrug die Kantenlänge einer ROI 275µm, bei PT3 Tieren 300µm, bei PT7 Tieren 370µm und bei PT21 Tieren 455µm. Neben den periventrikulären Strukturen des Striatums und des lateralen Septums, untersuchten wir mehrere Kortexareale: den cingulären Kortex, den motorischen Kortex, und den somatosensorischen Kortex. In folgendem Schaubild (Abbildung 3) sind exemplarisch die Untersuchten ROI in der rechten Hemisphäre

3.11 Statistische Auswertung

Die Datenaufbereitung erfolgte mit Microsoft Excel. Die Statistische Auswertung, sowie die Graphische Darstellung wurde mit SigmaPlot 11.0 durchgeführt. Die Tabellen wurden mit Microsoft Word erstellt. Für die statistischen Testungen wählten wir ein Signifikanzniveau von $P < 0,05$.

Die 101 untersuchten Tiere teilten sich in 12 Gruppen auf. Entscheidend für diese Aufteilung waren die Faktoren der Interventionsart (Blut, NaCl, Sham) und der Überlebenszeit (PT1, PT3, PT7, PT21).

Zunächst wurde überprüft, ob sich die generierten Daten innerhalb der einzelnen Gruppen zusammenfassen ließen. Hierzu wurde im ersten Schritt mittels T-Test bzw. Mann-Whitney U Test die IRF der einzelnen ROI der linken Hemisphäre (ROI-L) mit den entsprechenden ROI der rechten Hemisphäre (ROI-R) verglichen. Wenn sich hier kein signifikanter Unterschied zeigte, bildeten wir für die weitere Statistische Auswertung einen Mittelwert (ROI-M) aus ROI-L und entsprechendem ROI-R.

Als nächstes verglichen wir die IRF der ROI-M innerhalb einer Hirnstruktur miteinander, um mögliche ortsabhängige Veränderungen innerhalb der untersuchten Hirnstrukturen zu detektieren. Hierzu verwendeten wir One-Way-Repeated-Measures-ANOVA bzw. Repeated-Measures-ANOVA-on-Ranks.

Zusätzlich verglichen wir die einzelnen ROI-M einer Hirnstruktur mit den korrespondierenden ROI-M der anderen Untersuchungsgruppen (Blut, NaCl, Sham) zu jedem Untersuchungszeitpunkt (PT1, PT3, PT7, PT21) mittels One-Way-ANOVA bzw. One-Way-ANOVA-on-Ranks untereinander verglichen. Bei ermittelter Signifikanz wurde mittels Post-hoc-Test (Student-Newman-Keuls bzw. Dunn's-Test) ermittelt, welche der Gruppen sich signifikant von den anderen unterschied.

Keiner der einzelnen ROI-M einer Hirnstruktur zeigte sich als besonders vulnerabel oder repräsentativ, woraufhin wir für die weitere Statistik und graphische Darstellung für jedes Tier und jede untersuchte Hirnstruktur einen Mittelwert aus den IRF aller ROI-M einer Hirnstruktur bildeten. Von der hierdurch komprimierten Anzahl an Werten (Ein Wert pro Tier pro Hirnstruktur) und damit reduzierter Anzahl statistischer Testungen pro Hirnstruktur, versprachen wir uns eine höhere Zuverlässigkeit der statistischen Daten.

Nach der beschriebenen Zusammenfassung der generierten Daten erfolgte die statistische Auswertung zum Vergleich der einzelnen Gruppen untereinander.

Hierzu wurden die einzelnen Untersuchungsgruppen (Blut, NaCl, Sham) an jedem Untersuchungszeitpunkt (PT1, PT3, PT7, PT21) mittels One-Way-ANOVA bzw. One-Way-ANOVA-on Ranks untereinander verglichen. Anschließend wurde mittels Post-hoc-Test (Student-Newman-Keuls bzw. Dunn's-Test) ermittelt, welche der Gruppen sich signifikant von den anderen unterschied. Die erhaltenen Werte wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung graphisch dargestellt.

Um die generierten Daten auf einen Zusammenhang zwischen BHS-Störung und Entwicklung eines PHH zu überprüfen, untersuchten wir die IRF der Einzelnen Hirnstrukturen und die relative Ventrikelgröße innerhalb jeder Gruppe auf eine Korrelation. Hierzu verwendeten wir den Rangkorrelationstest nach Spearman.

Als weiteren Untersuchungsschritt teilten wir ausschließlich die Blut-Gruppe in Tiere mit und ohne posthämorrhagische ventrikuläre Dilatation (PHVD) auf und verglichen die IRF dieser Gruppen mittels T-Test bzw. Mann-Whitney U Test. Ziel dieses Auswertungsschrittes war es, etwaige Unterschiede in der Expression der untersuchten Parameter zwischen jenen Tieren die einen PHH entwickelten und jenen die keinen PHH entwickelten zu detektieren.

4 Ergebnisse

4.1 Definition der Ventrikulären Dilatation

Um eventuelle Zusammenhänge zwischen den von uns untersuchten Parametern und der Entwicklung eines PHH machen zu können, mussten wir festlegen, unter welchen Kriterien wir von der Entwicklung einer Ventrikulären Dilatation ausgingen.

Um eine bessere Vergleichbarkeit der Ventrikelgrößen der Tiere zu ermöglichen, berechneten wir die „relative Ventrikelgröße“ jedes Tieres. Hierzu ermittelten wir den prozentualen Anteil der Fläche des jeweiligen Seitenventrikels an der Gesamtfläche der Hemisphäre in der Ebene Bregma -0,2 mm. Anschließend bildeten wir den Mittelwert aus der relativen Ventrikelgröße der linken und rechten Hemisphäre eines Tiers. Ausgenommen vom zuletzt genannten Schritt war ein Sham-Tier, bei welchem eine Messung der Fläche des linken Ventrikels aufgrund einer Beschädigung beim Einfrierungsprozess nicht möglich war. Für dieses Tier führen wir mit der relativen Ventrikelgröße der rechten Hemisphäre als stellvertretenden Wert für das gesamte Gehirn fort.

Abbildung 4

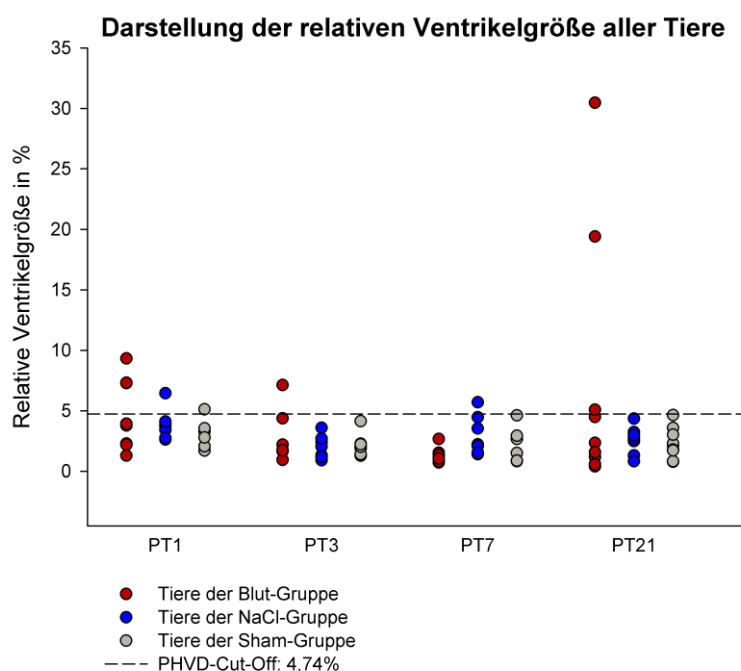


Abbildung 4 stellt die relativen Ventrikelgrößen (in %) der untersuchten Tiere zu allen Zeitpunkten und nach Behandlung unterteilt dar.

Als Grenzwert für eine unauffällige relative Ventrikelgröße definierten wir den Mittelwert plus zweifache Standardabweichung der relativen Ventrikelgröße aller Sham Tiere (4,74%). Wir betrachteten alle Tiere, deren relative Ventrikelgröße

oberhalb von 4,74% lag als Tiere mit ventrikulärer Dilatation, beziehungsweise als Tiere mit Hydrozephalus (siehe Abbildung 4).

Eine statistische Aufarbeitung der Daten zur Ventrikelgröße der einzelnen Tiere findet sich in der Arbeit von Corinna Leistner. In ihrer Analyse zeigten sich zu den Zeitpunkten PT1 und PT21 innerhalb der Blut-Gruppe deutliche Variationen in der relativen Ventrikelgröße der einzelnen Tiere (Leistner 2020).

4.2 Gewichtsentwicklung

Die allgemeine Gewichtsentwicklung wurde in der Arbeit von (Name für Online-Version entfernt) (Wocheslander 2020) untersucht. In dieser Arbeit wurde überprüft, ob sich die Entwicklung eines PHH in der Gewichtsentwicklung widerspiegelt. Hierzu wurde die PT21 Blut-Gruppe nach relativer Ventrikelgröße subgruppiert, und so die Gewichte der Tiere mit PHH mit denen der Tiere ohne PHH mittels T-Test bzw. Mann-Whitney U Test verglichen. Untersucht wurden die Zeitpunkte PND1, PND2, PND3, PND5, PND7, PND10, PND15 und PND20. Zu keinem Untersuchungszeitpunkt zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Körpergewicht zwischen Tieren die zum Zeitpunkt PT21 einen PHH entwickelt hatten und Tieren die zum Zeitpunkt PT21 keinen PHH entwickelt hatten. (Siehe Tabelle 1 und Abbildung 5).

Tabelle 1 Gewicht der Tiere der PT21 Blut-Gruppe, subgruppiert nach Ventrikelgröße

	Tiere mit PHH		Tiere ohne PHH	
	M	SD	M	SD
PND1	6,133	0,153	6,571	0,502
PND2	7,000	0,100	7,557	0,665
PND3	8,000	0,300	8,386	0,696
PND5	11,567	0,603	12,157	1,013
PND7	16,067	0,666	16,729	2,600
PND10	25,533	1,007	26,514	5,450
PND15	43,100	1,411	44,014	8,228
PND20	59,300	2,623	56,314	10,787

M = Mittelwert, SD = Standardabweichung

Abbildung 5

Vergleich der Gewichtsentwicklung der PT21 Tiere der Blut-Gruppe, subgruppiert nach relativer Ventrikelgröße

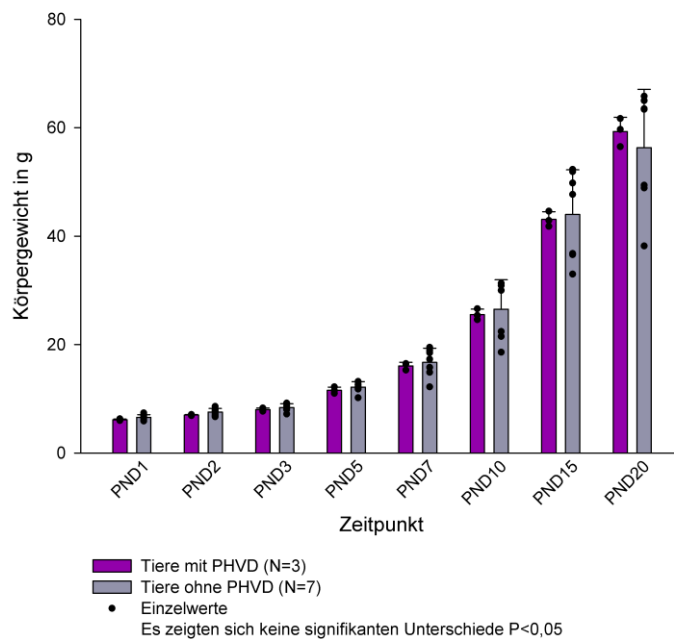


Abbildung 5 zeigt die Gewichtsentwicklung von Tieren der PT21 Blut-Gruppe. Mittels T-Test bzw. Mann-Whitney U Test wurden Tiere mit PHH mit Tieren ohne PHVD verglichen, ohne dass sich signifikante Unterschiede ($P < 0,05$) zeigten. Die Säulen zeigen die Mittelwerte, die Fehlerbalken die Standardabweichung und die Punkte die Einzelwerte. Zu beachten ist die aus Gründen der Übersichtlichkeit gestauchte X-Achse. Ohne Stauchung zeigt sich ein linearer Gewichtsverlauf.

4.3 Immunhistochemische Untersuchungen

Dadurch, dass die Injektion von Blut oder NaCl bilateral erfolgte, wurde angenommen, dass sich die korrespondierenden IRF der einzelnen ROI (ROI-L und ROI-R) nicht voneinander unterscheiden. Beim Vergleich der IRF der ROI-L und ROI-R mittels T-Test oder Mann-Whitney-U-Test zeigte sich für die einzelnen Regionen kein signifikanter Unterschied, sodass für die weitere Statistik ein Mittelwert aus der IRF der korrespondierenden ROIs verwendet wurde (ROI-M) (siehe Anhang Kapitel 9.3).

Mittels One-Way-Repeated-Measures-ANOVA bzw. Repeated-Measures-ANOVA-on-Ranks wurden die ROI-M innerhalb der untersuchten Hirnstrukturen miteinander verglichen, um ortsabhängige Veränderungen innerhalb von vorgegebenen Hirnstrukturen zu detektieren. Hierbei zeigte sich für die neokortikalen Hirnstrukturen (Cingulärer-Kortex, Motorkortex, Somatosensorischer Kortex) gelegentlich die der Hirnoberfläche nahen ROI-M (z.B. ROI 5) signifikant stärker angefärbt als die zentraler gelegenen ROIs (z.B. ROI 1) (siehe Anhang Kapitel 9.4). Diese Beobachtung zeigte sich in allen untersuchten Gruppen, unabhängig vom gewählten immunhistochemischen Marker.

Im Vergleich der einzelnen ROI-M einer Hirnstruktur mit den korrespondierenden ROI-M der anderen Untersuchungsgruppen (Blut, NaCl, Sham) zu jedem Untersuchungszeitpunkt (PT1, PT3, PT7, PT21) mittels One-Way-ANOVA bzw. One-Way-ANOVA-on-Ranks zeigte sich keiner der einzelnen ROI-M einer Hirnstruktur als schadensanfälliger als die anderen, woraufhin wir für die weitere Statistik und graphische Darstellung für jedes Tier und jede untersuchte Hirnstruktur einen Mittelwert aus den IRF aller ROI-M einer Hirnstruktur bildeten. Von der dadurch reduzierten Anzahl statistischer Tests pro Hirnstruktur, versprachen wir uns eine höhere Zuverlässigkeit der statistischen Daten.

4.3.1 Claudin-5

Beim Vergleich der Untersuchungsgruppen mittels One-Way-ANOVA bzw. One-Way-ANOVA-on-Ranks, zeigt sich zum Zeitpunkt PT1 im Bereich des cingulären Kortex eine signifikant kleinere IRF in der Blut-Gruppe (IRF=1,49%±0,40%), verglichen mit der NaCl-Gruppe (IRF=2,85%±1,21%) und der Sham-Gruppe (IRF=3,11%±0,98; P<0,05). Auch im Bereich des lateralen Septums zeigt sich zum Zeitpunkt PT1 eine signifikant kleinere IRF in der Blut-Gruppe (IRF=1,42%±0,51%) im Vergleich mit der NaCl-Gruppe (IRF= 2,27%±0,73%) und der Sham-Gruppe (IRF=2,36%±0,54%; P<0,05). Im Bereich des motorischen Kortex zeigt sich die Blut-Gruppe (IRF=1,46%±0,37%), aber nicht die NaCl-Gruppe, signifikant schwächer gefärbt im Vergleich mit der Sham-Gruppe (IRF=2,76%±0,93%; P<0,05). Zwischen den beiden Traumagruppen war hier kein signifikanter Unterschied zu finden (P>0,05).

Abbildung 6

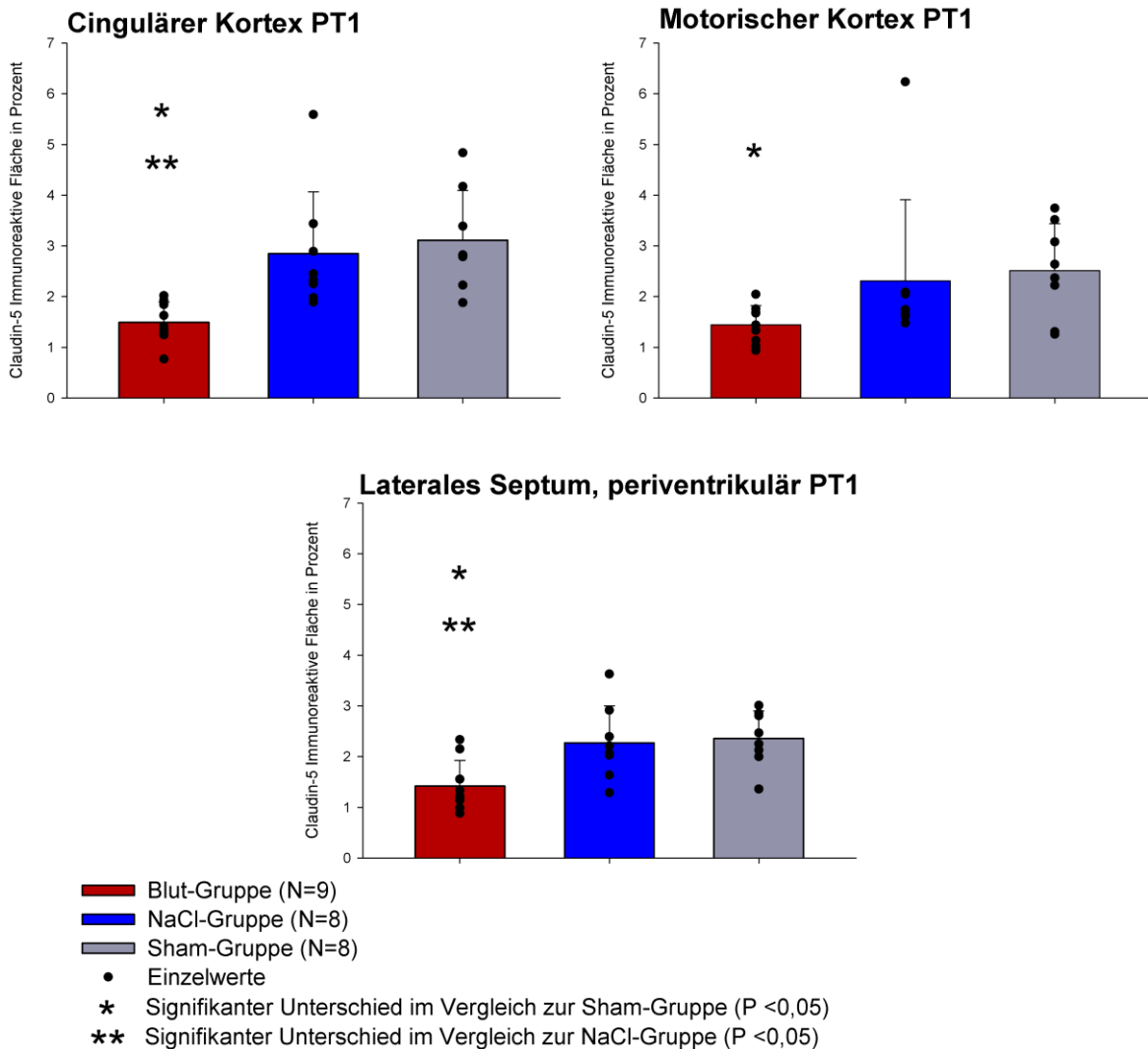


Abbildung 6 zeigt die IRF von Claudin-5 zum Zeitpunkt PT1 Ranks in den Bereichen des cingulären Cortex, des motorischen Kortex und des lateralen Septums in Prozent. Die Untersuchungsgruppen wurden mittels One-Way-ANOVA bzw. One-Way-ANOVA-on- miteinander verglichen. Die Säulen zeigen die Mittelwerte, die Fehlerbalken die Standardabweichung und die Punkte die Einzelwerte. Signifikante Unterschiede (P<0,05) sind mit Sternchen markiert. Eine graphische Darstellung der übrigen Hirnareale findet sich im Anhang (Kapitel 9.6.1).

Zum Zeitpunkt PT3 stellten wir im Bereich des cingulären Kortex eine signifikant kleinere IRF in der NaCl-Gruppe (IRF=1,80%±0,69%), verglichen mit der Sham-Gruppe (IRF=2,91%±0,69%) fest (P = 0,025). Auch im Bereich des motorischen Kortex zeigte sich die IRF der NaCl-Gruppe (IRF=1,54%±0,69%) zum Zeitpunkt PT3 signifikant kleiner als die der Sham Gruppe (IRF=2,37%±0,60%; P=0,032).

Abbildung 7

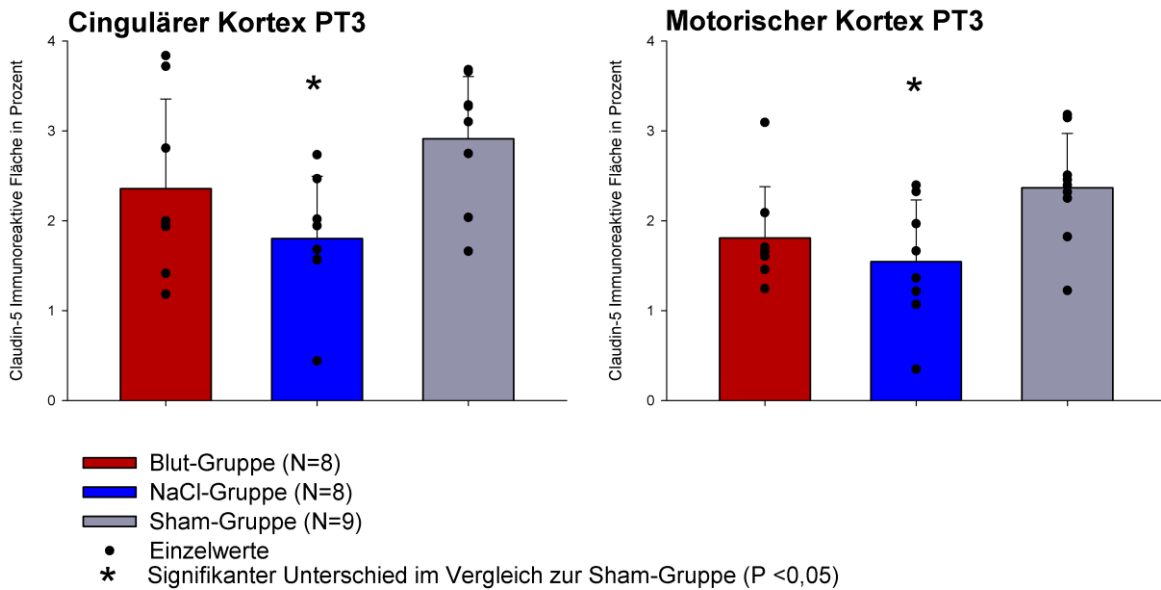


Abbildung 7 zeigt die IRF von Claudin-5 zum Zeitpunkt PT3 in den Bereichen des cingulären Cortex und des motorischen Cortex in Prozent. Die Untersuchungsgruppen wurden mittels One-Way-ANOVA bzw. One-Way-ANOVA-on-Ranks miteinander verglichen. Die Säulen zeigen die Mittelwerte, die Fehlerbalken die Standardabweichung und die Punkte die Einzelwerte. Signifikante Unterschiede (P<0,05) sind mit Sternchen markiert. Eine graphische Darstellung der übrigen Hirnareale findet sich im Anhang (Kapitel 9.6.1).

Weiterhin zeigte sich im Bereich des somatosensorischen Kortex eine signifikant geringere Anfärbung in der Blut-Gruppe (IRF=1,96%±0,69%) und der NaCl-Gruppe (IRF=1,54%±0,62%), im Vergleich zur Sham-Gruppe (IRF=2,80%±0,83%) (P < 0,03). Auch im Bereich des Striatums lag eine signifikant kleinere IRF in der Blut-Gruppe (IRF=1,20%±0,28%) und der NaCl-Gruppe (IRF=1,30%±0,47%) verglichen mit der Sham-Gruppe (IRF=1,89%±0,49%) vor (P < 0,01). Zwischen den beiden Traumagruppen zeigte sich hier kein signifikanter Unterschied in der IRF.

Abbildung 8

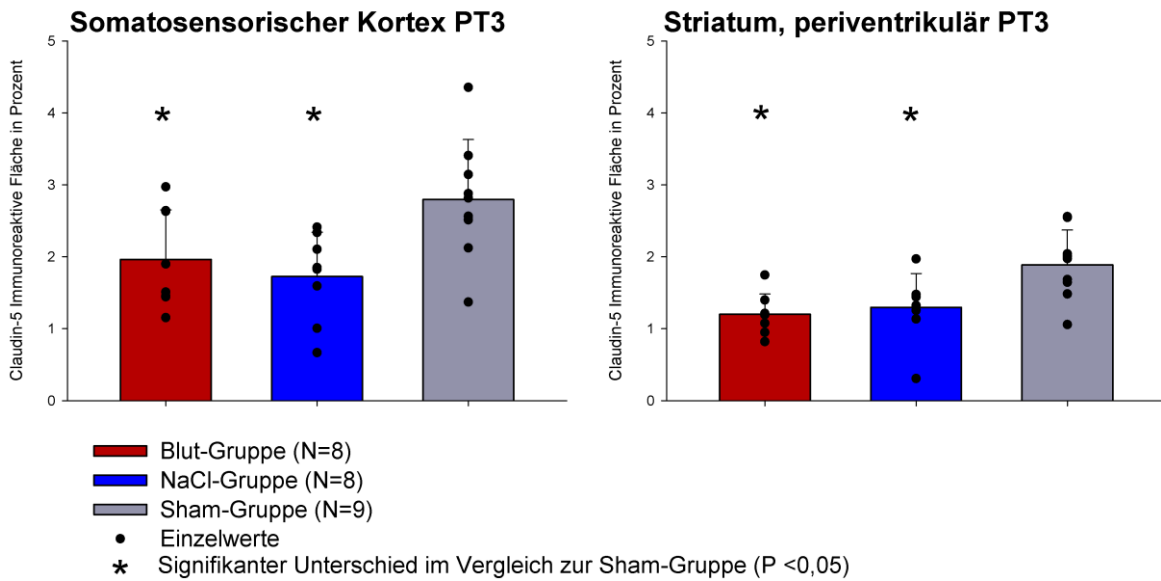


Abbildung 8 zeigt die IRF von Claudin-5 zum Zeitpunkt PT3 in den Bereichen des somatosensorischen Cortex und des Striatums in Prozent. Die Untersuchungsgruppen wurden mittels One-Way-ANOVA bzw. One-Way-ANOVA-on-Ranks. Die Säulen zeigen die Mittelwerte, die Fehlerbalken die Standardabweichung und die Punkte die Einzelwerte. Signifikante Unterschiede ($P < 0,05$) sind mit Sternchen markiert. Eine graphische Darstellung der übrigen Hirnareale findet sich im Anhang (Kapitel 9.6.1).

Zu den Zeitpunkten PT7 und PT21 konnten wir in keinem untersuchten Bereich des Gehirns Signifikanzen zwischen den drei Gruppen feststellen (Tabellen aller IRF-Werte finden sich im Anhang im Kapitel 9.5.1. Für eine Übersicht aller graphischen Vergleiche der Behandlungsgruppen bezüglich Claudin-5 siehe Anhang Kapitel 9.6.1).

Beim Vergleich der IRF von Blut-Tieren mit PHVD mit Blut-Tieren ohne PHVD mittels T-Test bzw. Mann-Whitney U Test stellten wir weder in der Akutphase (PT1), noch zum Zeitpunkt PT21, einen signifikanten Unterschied fest (Siehe Anhang Seite 104).

Der Rangkorrelationstest nach Spearman zeigte zum Zeitpunkt PT3 in den periventriculären Regionen eine deutliche negative Korrelation der IRF von Claudin-5 mit der relativen Ventrikelgröße in der NaCl-Gruppe (Striatum: Korrelationskoeffizient (K) = -0,76; P = 0,02, laterales Septum: K = -0,81; P < 0,01). Im cingulären Kortex und im Motorischen Kortex ließ sich eine Tendenz dieser Korrelation erkennen (K = -0,52; P = 0,16).

Die Sham-Gruppe präsentierte zum Zeitpunkt PT21 eine deutliche positive Korrelation der IRF mit der relativen Ventrikelgröße im cingulären Kortex (K = 0,79; P = 0,01), im motorischen Kortex (K = 0,71; P = 0,04) und im Bereich des Striatums (K = 0,69; P < 0,05). Im Bereich des lateralen Septums deutet sich eine Tendenz zu dieser Korrelation an

(K= 0,57; P=0,12). In der Blut- und der NaCl-Gruppe zeigte sich weder eine Korrelation dieser Art, noch konnte diesbezüglich eine Tendenz festgestellt werden.

4.3.2 IgG

Beim Vergleich der Behandlungsgruppen mittels One-Way-ANOVA bzw. One-Way-ANOVA-on-Ranks, zeigten sich zu den Zeitpunkten PT1 und PT3 keine signifikanten Unterschiede in den untersuchten Hirnbereichen zwischen den Gruppen.

Die IRF-Werte zum Zeitpunkt PT7 sind in der Tabelle 2 weiter unten aufgeführt. Hier zeigte sich in der Blut-Gruppe in den Bereichen des cingulären Kortex ($P<0,05$), des motorischen Kortex ($P<0,01$), des somatosensorischen Kortex ($P<0,05$) und des Striatums ($P<0,01$) eine signifikant größere IRF nachweisbar, als in der Sham-Gruppe, aber nicht der NaCl-Gruppe. Im Areal des lateralen Septums zeichnete sich dieser Unterschied ebenfalls ab, ohne jedoch Signifikanz zu erreichen ($P>0,05$). In der NaCl-Gruppe beobachteten wir zu diesem Zeitpunkt in sämtlichen untersuchten Regionen eine signifikant größere IRF im Vergleich zur Sham-Gruppe ($P<0,05$).

Tabelle 2: IRF IgG in Prozent nach Hirnstruktur, PT7

	Blut-Gruppe		NaCl-Gruppe		Sham-Gruppe	
	M	SD	M	SD	M	SD
Cingulärer Kortex	1,023*	1,050	0,773*	0,323	0,288	0,285
Motorischer Kortex	1,404*	0,402	1,554*	0,669	0,529	0,537
Somatosensorischer Kortex	1,293*	0,709	1,222*	0,599	0,327	0,246
Striatum	1,403*	0,872	1,189*	0,433	0,314	0,336
Laterales Septum	0,679*	0,673	1,234*	0,879	0,377	0,618

M = Mittelwert, SD = Standardabweichung, *signifikanter Unterschied im Vergleich zur Sham-Gruppe ($P<0,05$)

Abbildung 9

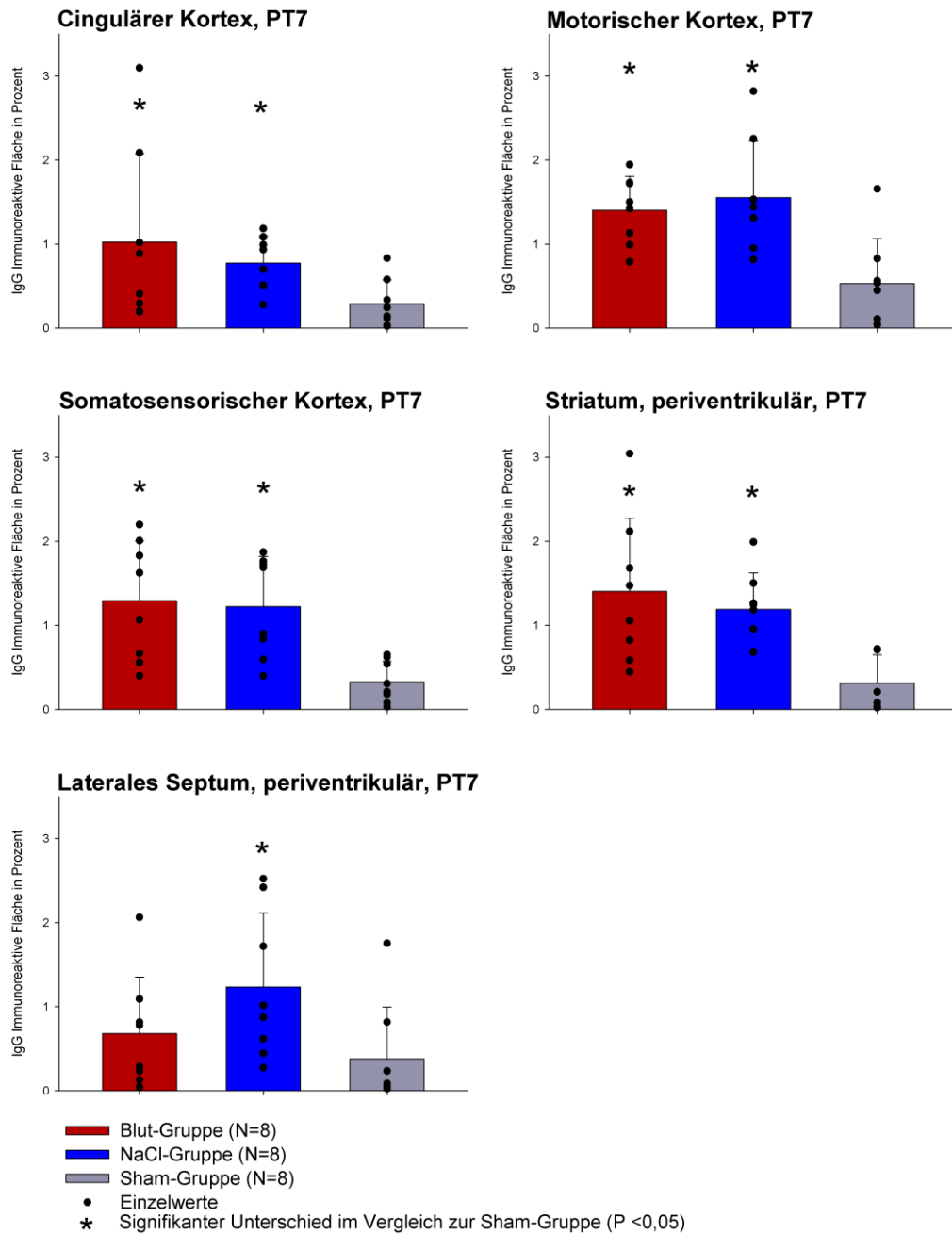


Abbildung 9 zeigt die IRF von IgG zum Zeitpunkt PT7 in allen untersuchten Hirnarealen in Prozent. Die Untersuchungsgruppen wurden mittels One-Way-ANOVA bzw. One-Way-ANOVA-on-Ranks verglichen. Die Säulen zeigen die Mittelwerte, die Fehlerbalken die Standardabweichung und die Punkte die Einzelwerte. Signifikante Unterschiede (P < 0,05) sind mit Sternchen markiert.

In Bereich des motorischen Kortex beobachteten wir zum Zeitpunkt PT21 eine signifikant höhere Konzentration an IgG in den Tieren der Blut-Gruppe (IRF=0,55%±0,75%), verglichen mit der NaCl-Gruppe (IRF=0,06%±0,05%) und der Sham-Gruppe (IRF=0,06%±0,05%; P < 0,05). Im Bereich des lateralen Septums zeigte

sich eine signifikant stärkere Anfärbung in der Blut-Gruppe (IRF=0,44%±0,48%) verglichen mit der NaCl-Gruppe (IRF=0,26%±0,44%; P<0,05).

Abbildung 10

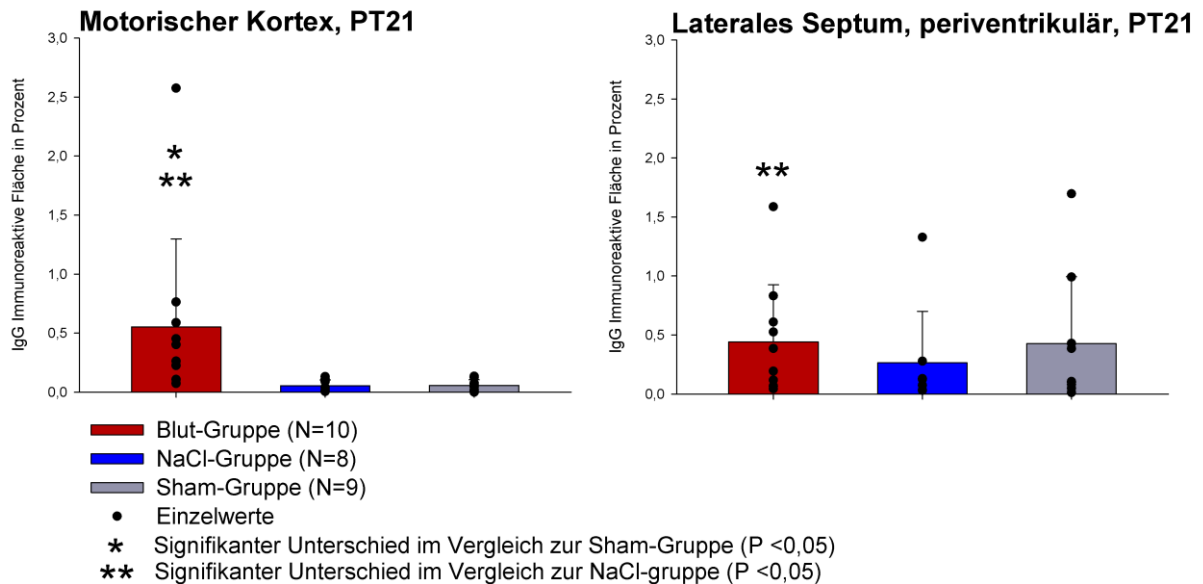


Abbildung 10 zeigt die IRF von IgG zum Zeitpunkt PT21 in den Bereichen des motorischen Cortex und des lateralen Septums. Die Untersuchungsgruppen wurden mittels One-Way-ANOVA bzw. One-Way-ANOVA-on-Ranks verglichen. Die Säulen zeigen die Mittelwerte, die Fehlerbalken die Standardabweichung und die Punkte die Einzelwerte. Signifikante Unterschiede (P<0,05) sind mit Sternchen markiert. Eine graphische Darstellung der übrigen Hirnareale findet sich im Anhang (Kapitel 9.6.2).

Auch in den Bereichen des cingulären Kortex, des somatosensorischen Kortex und des Striatums zeigte sich die IgG IRF in der Blutgruppe am größten, jedoch konnte hier keine Signifikanz nachgewiesen werden (Tabellen aller IRF-Werte finden sich im Anhang im Kapitel 9.5.2. Für eine Übersicht aller graphischen Vergleiche der Behandlungsgruppen bezüglich IgG siehe Anhang Kapitel 9.6.2).

Beim Vergleich der Blut-Subgruppen mit und ohne PHVD mittels T-Test bzw. Mann-Whitney U Test zeigten sich zum Zeitpunkt PT21 in einzelnen ROI der periventrikulären Regionen (Striatum und laterales Septum) eine signifikant größere IRF bei Tieren mit einer PHVD.

Abbildung 11

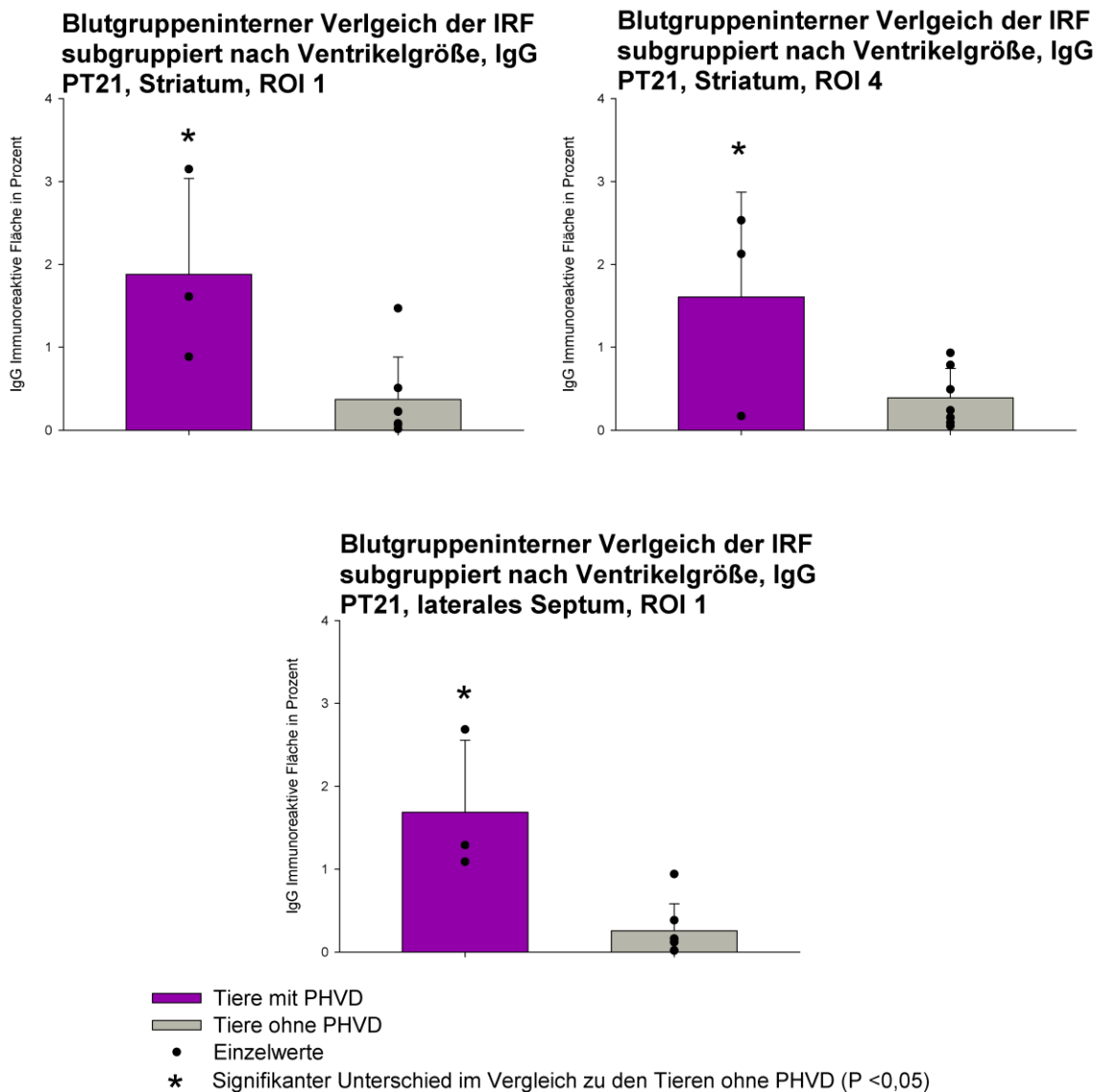


Abbildung 11 zeigt den blutgruppeninternen Vergleich der Tiere mit PHH mit den Tieren ohne PHH mittels T-Test bzw. Mann-Whitney U Test. Dargestellt sind einzelne ROI der Bereiche des Striatums und des lateralen Septums, in welchen sich eine signifikant größere IRF von IgG bei Tieren mit PHVD als bei Tieren ohne PHVD zeigte. Die Säulen zeigen die Mittelwerte, die Fehlerbalken die Standardabweichung und die Punkte die Einzelwerte. Signifikante Unterschiede (P<0,05) sind mit Sternchen markiert.

Im Rangkorrelationstest nach Spearman zeigen sich keine signifikanten Korrelationen in der Blut-Gruppe. In der NaCl-Gruppe stellten wir zum Zeitpunkt PT1 eine deutliche positive Korrelation zwischen IRF IgG und relativer Ventrikelgröße in den untersuchten Kortextarealen fest (cingulärer Kortex: K= 0,81; P<0,01, motorischer Kortex: K= 0,69; P=0,05, somatosensorischer Kortex: K= 0,86; P<0,01). Im Bereich des Striatums in der NaCl-Gruppe zeigte sich eine Tendenz zu dieser Korrelation (K= 0,67; P=0,06).

Zu den übrigen Untersuchungszeitpunkten zeigten sich in keiner der Untersuchungsgruppen eine signifikante Korrelation zwischen der IRF von IgG und der relativen Ventrikelgröße der Tiere (siehe Anhang Kapitel 9.8.2).

4.3.3 Aquaporin-4

Beim Vergleich der Behandlungsgruppen mittels One-Way-ANOVA bzw. One-Way-ANOVA-on-Ranks, zeigte sich zum Zeitpunkt PT3 im Bereich des Striatums eine signifikant kleinere IRF in der Blut-Gruppe (IRF=0,34%±0,33%) im Vergleich zur Sham-Gruppe (IRF=0,73%±0,46%; P<0,05). Auch die NaCl-Gruppe (IRF=0,36%±0,18%) zeigt sich tendenziell weniger stark angefärbt als die Sham-Gruppe (IRF=0,73%±0,46%), wobei es sich hierbei um nicht um einen signifikanten Unterschied handelt (P>0,05).

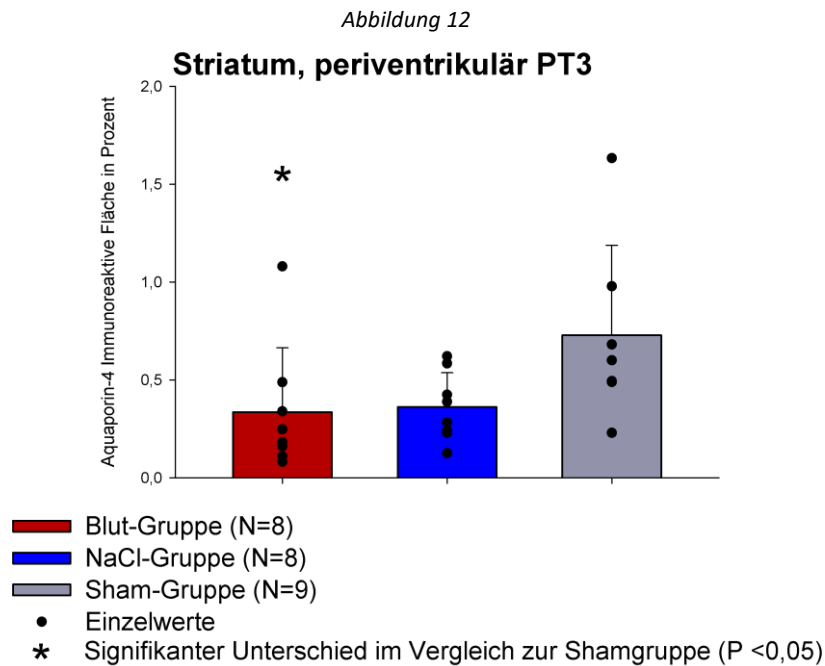


Abbildung 12 zeigt die IRF von Aquaporin-4 zum Zeitpunkt PT3 im Bereich des Striatums in Prozent. Die Untersuchungsgruppen wurden mittels One-Way-ANOVA bzw. One-Way-ANOVA-on-Ranks verglichen. Die Säulen zeigen die Mittelwerte, die Fehlerbalken die Standardabweichung und die Punkte die Einzelwerte. Signifikante Unterschiede (P<0,05) sind mit Sternchen markiert. Eine graphische Darstellung der übrigen Hirnareale findet sich im Anhang (Kapitel 9.6.3).

Zum Zeitpunkt PT7 zeigten sich in der Struktur des Striatums eine signifikant stärkere immunhistochemische Anfärbung in der Blut-Gruppe (IRF=0,89%±0,25%) und der NaCl-Gruppe (IRF=0,92%±0,25%), verglichen mit der Sham-Gruppe (IRF=0,44%±0,18%; P<0,01). Auch im Bereich des lateralen Septums zeigte sich zum Zeitpunkt PT7 eine signifikant höhere IRF in der Blut-Gruppe (IRF=0,49%±0,14%) und der NaCl-Gruppe (IRF=0,46%±0,17%) im Vergleich mit der Sham-Gruppe

(IRF=0,27%±0,13%; P=0,02). Zwischen den beiden Traumagruppen war hier kein signifikanter Unterschied zu finden.

Abbildung 13

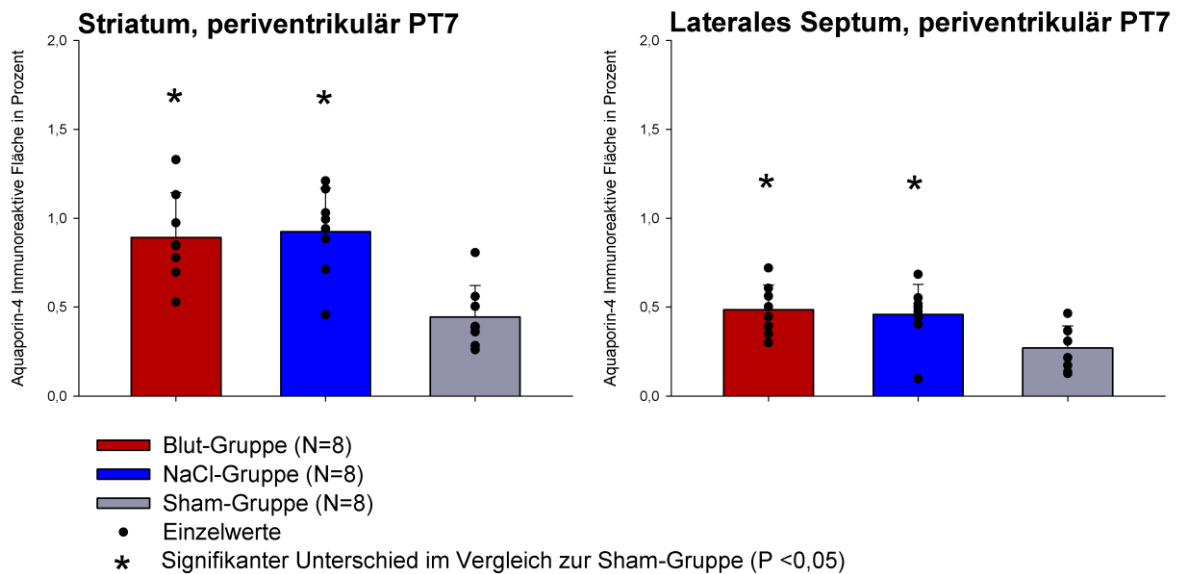


Abbildung 13 zeigt die IRF von Aquaporin-4 zum Zeitpunkt PT7 in den Bereichen des somatosensorischen Cortex und des Striatums in Prozent. Die Untersuchungsgruppen wurden mittels One-Way-ANOVA bzw. One-Way-ANOVA-on-Ranks verglichen. Die Säulen zeigen die Mittelwerte, die Fehlerbalken die Standardabweichung und die Punkte die Einzelwerte. Signifikante Unterschiede (P<0,05) sind mit Sternchen markiert. Eine graphische Darstellung der übrigen Hirnareale findet sich im Anhang (Kapitel 9.6.3).

Zu den Untersuchungszeitpunkten PT1 und PT21 zeigten sich für Aquaporin-4 in keinem der untersuchten Hirnareale eine Signifikanz zwischen den Gruppen (Tabellen aller IRF-Werte finden sich im Anhang im Kapitel 9.5.3. Für eine Übersicht aller graphischen Vergleiche der Behandlungsgruppen bezüglich Aquaporin-4 siehe Anhang Kapitel 9.6.3).

Beim Vergleich der PHVD-positiven und PHVD-negativen Subgruppen der Blut-Gruppe mittels T-Test bzw. Mann-Whitney U Test zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (Siehe Anhang Kapitel 9.7.3).

Die Überprüfung auf eine Korrelation zwischen IRF und relativer Ventrikelgröße mittels Spearman Rangkorrelationstest ergab eine deutliche negative Korrelation im Bereich des Motorkortex in der NaCl-Gruppe zum Zeitpunkt PT1 (K= -0,71; P=0,04). Im Bereich des cingulären Kortex zeigte sich eine Tendenz zur deutlich negativen Korrelation in der Blut-Gruppe (K= -0,63; P=0,06) und der NaCl-Gruppe (K= -0,62; P=0,09).

Weiterhin zeigte sich zum Zeitpunkt PT3 eine deutliche negative Korrelation in der Region des somatosensorischen Kortex in der Interventions-Gruppe (K= -0,76;

P=0,02) und der Sham-Gruppe (K= -0,94; P=0,02). Die übrigen untersuchten Kortexareale (cingulärer Kortex und motorischer Kortex) zeigten in der Sham-Gruppe zu diesem Zeitpunkt eine Tendenz zur negativen Korrelation (K= -0,77; P=0,10).

Zum Zeitpunkt PT7 ließ sich eine deutliche negative Korrelation in der Sham-Gruppe im Bereich des somatosensorischen Kortex (K= -0,86; P<0,01), und eine Tendenz zur negativen Korrelation im Bereich des motorischen Kortex (K= -0,68; P=0,08) feststellen.

Zum Zeitpunkt PT21 zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen IRF von Aquaporin-4 und relativer Ventrikelgröße (Siehe Anhang Kapitel 9.8.3).

5 Diskussion

5.1 Methodenkritik

5.1.1 Tiermodell

Bei der Erarbeitung unseres Tiermodells orientierten wir uns an den von Cherian, et al., 2003, und von Ahn et al., 2013, verwendeten Modellen, wichen jedoch in einigen Punkten von ihnen ab. Cherian et al., 2003, injizierten 80µl zentrifugiertes Citratblut einer Donorratte vom selben Stamm in die Ventrikel von 7 Tage alten (PND7) Wistar Ratten. Ahn et al, 2013, injizierten 200µl maternales Vollblut in die Ventrikel 4 Tage alter (PND4) neugeborener Sprague-Dawley Ratten unter Isoflurannarkose.

Wir entschieden uns für eine Injektion von allogenen Vollblut. Als Spendertiere wählten wir ebenfalls Sprague-Dawley®-Ratten der Firma Charles River Deutschland, bzw. Muttertiere vergangener Würfe, also Tiere mit möglichst hoher genetischer Ähnlichkeit zu den Neugeborenen. Autologes Blut erschien unter Betrachtung der hohen Injektionsvolumina von insgesamt 200µl, der geringen Blutmenge der Jungtiere, sowie der problematischen Entnahme des Blutes als nicht praktikabel.

In der Injektion von Vollblut anstelle zentrifugierten Zitratblutes wie bei Cherian et al., 2003, sahen wir den Vorteil, durch Erhalt der Gerinnungsfähigkeit näher an der tatsächlichen Pathophysiologie einer IVH zu sein. In mehreren Studien konnte nachgewiesen werden, dass die Gerinnungsfaktoren, allen voran Thrombin, an der Pathophysiologie des PHH beteiligt sind (Hao et al. , Garton et al. 2016). Daher erschien es uns als sinnvoll, nicht in die Gerinnungskaskade einzugreifen, auch wenn wir hierdurch einen für Frühgeborene untypisch niedrigen Hämatokrit des injizierten Blutes in Kauf nehmen mussten.

Wir entschieden uns für eine bilaterale intraventrikuläre Injektion von Blut, da diese häufiger zu PHVD bzw. zu PHH führt, als die unilaterale Injektion (Cherian et al. 2003). Parallel zu dieser experimentellen Beobachtung, konnte auch beim Menschen eine höhere Rate an PHH bei Frühgeborenen nachgewiesen werden, welche eine bilaterale IVH erlitten (29%-38% bei bilateraler Blutung >Grad 2 vs. 6%-17% bei unilateraler Blutung >Grad2) (Klinger et al. 2016). Auch bei Injektion von 100µl je Ventrikel kam es in unserem Experiment nicht zu nennenswertem Rückfluss durch den Stichkanal, sodass wir verglichen mit Cherian, et al. (80µl Zitratblut) ein höheres Injektionsvolumen von 100µl je Ventrikel wählten. Als Zeitpunkt der Intervention wählten wir Postnataltag 1-2, zwischen 24 und 48 Stunden nach Geburt, da es sich bei der IVH um eine

Komplikation handelt, welche vor allem besonders leichte Frühgeborene mit geringem Gestationsalter erleiden (Lu et al. 2016), und die Blutung beim Menschen zu großen Teilen innerhalb der ersten 24 Stunden nach Geburt auftritt (McCrea und Ment 2008). In der Literatur wird der Reifegrad eines Rattenhirns 24 Stunden nach Termingeburt als mit dem Reifegrad eines Menschlichen Frühgeborenen der 23.-26. Gestationswoche vergleichbar beschrieben (Balasubramaniam und Del Bigio 2006, Tucker et al. 2009).

Lichtmikroskopisch konnten bei PT1-Tieren der Blut-Gruppe erythrozytengefüllte Seitenventrikel dargestellt werden. In keinem der Hirne fanden wir Anzeichen für eine intraparenchymale Blutung oder Injektion.

Abbildung 14

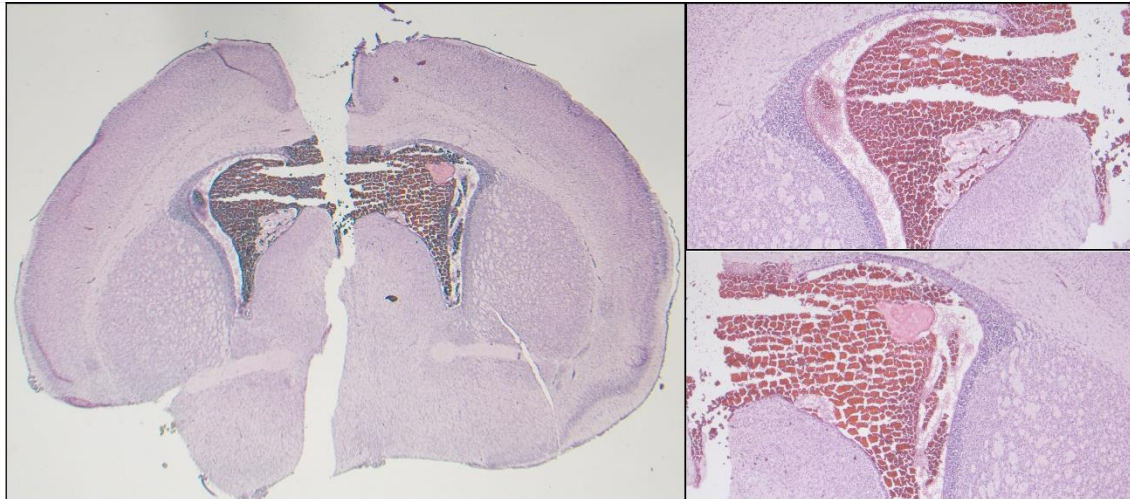


Abbildung 14: Lichtmikroskopische Darstellung in HE-Färbung Erythrozytengefüllter Seitenventrikel bei einem 24 Stunden nach Blut-Injektion (PT1) euthanasiertem Tier.

Auch die Magnetresonanztomographie von Tieren aus Vorversuchen (nach unilateraler intraventrikulärer Injektion von Blut), zeigte ein nach Injektion erweitertes Ventrikelsystem.

Abbildung 15

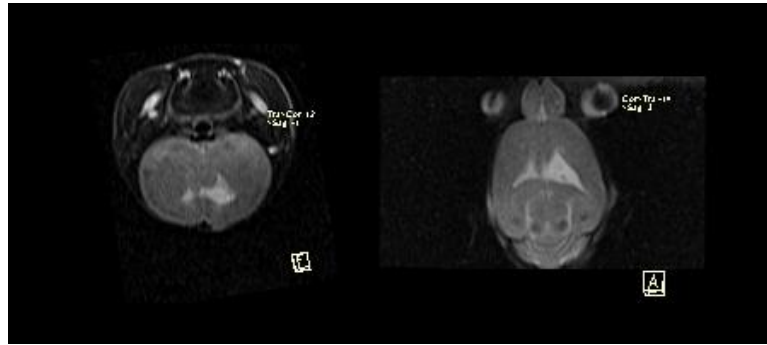


Abbildung 15: T2 gewichtete MRT-Aufnahmen 24 Stunden (PT1) nach unilateraler Injektion von 50 μ l Vollblut. Diese Bilder entstammten aus einem Vorversuch.

Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass das von uns gewählte stereotaktische Injektionsverfahren eine zuverlässige und zielsichere intraventrikuläre Injektion gewährleistet.

Schwächen des Injektionsverfahrens stellen die Verletzung des Hirngewebes durch die Injektionskanülen, sowie der Ursprung der Blutung im Allgemeinen dar: die germinale Matrix bleibt bei diesem Verfahren Intakt, der Ursprung der induzierten Blutung liegt nicht subependymal.

Cherian et al. werteten alle Tiere mit einer Ventrikelfläche $>1\text{mm}^2$ als ventrikulär dilatiert bzw. PHH positiv. Sie konnten nach diesen Kriterien in ihrem Tiermodell 14 Tage nach Injektion in mehr der Hälfte der Tiere, die eine Blutinjektion erhielten, einen PHH feststellen (Cherian et al. 2003). Ahn et al., 2013 berechneten den Anteil der Ventrikel am Hirnvolumen, und werteten Tiere mit Volumenanteil $>10\%$ als ventrikulär dilatiert bzw. PHH positiv. In diesem Modell konnten bereits 7 Tage nach Blutinjektion PHH nachgewiesen werden (Ahn et al. 2013). Es ist also davon auszugehen, dass die Pathogenese des PHH bei Ratten innerhalb der ersten 7 bis maximal 14 Tagen nach IVH stattfindet. Um diesen Prozess untersuchen zu können, wählten wir für die immunhistochemischen Untersuchungen die Zeitpunkte 1 Tag-, 3 Tage- und 7 Tage nach simulierter IVH (PT1, PT3, PT7). Um längerfristige Veränderungen abzubilden, und die Hydrozephalusrate unseres Modells sicher abschätzen zu können, untersuchten wir eine zusätzliche Gruppe 21 Tage nach Intervention (PT21).

5.1.2 Immunhistochemie

Die im Vergleich zu den tiefen Kortexschichten stärkere Immunreaktivität der oberflächlicheren Kortexschichten, welche Gruppenübergreifend beobachtet werden konnte, könnte in Form eines Systematischen Fehlers in der Färbemethodik begründet liegen. Ein entsprechender Unterschied im Ausmaß der Mikrovaskularisierung der verschiedenen Kortexschichten wird in der Literatur nicht beschrieben (Tsai et al. 2009). Zudem zeigt sich dieses Phänomen ebenfalls bei den immunhistochemischen Untersuchungen von Entzündungsparametern in der Promotionsarbeit von (Name für Online-Version entfernt), welche nach gleichem Färbeprotokoll durchgeführt wurden (Wocheslander 2020).

Trotz aller Bemühungen um einen Einheitlichen Prozess von Hirnentnahme bis zur immunhistochemischen Färbung, ist nicht auszuschließen, dass es, gerade bei umfangreicheren Maßnahmen wie der Perfusionsfixierung, zu Abweichungen in der Aufbereitung gekommen sein kann. Diese Unterschiede könnten sich im Sinne zufälliger Fehler wiederum auf die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen ausgewirkt haben.

Auch sollte bei der Betrachtung unserer Ergebnisse bedacht werden, dass es sich bei der Immunhistochemie nicht um ein exaktes quantitatives Nachweisverfahren handelt (Torlakovic et al. 2017). Für quantitativ exaktere Daten zur Expression der untersuchten Parameter wäre in Folgeexperimenten z.B. eine quantitative Western-Blot Analyse denkbar (Taylor und Posch 2014). Für unser Experiment nahmen wir die quantitativ weniger exakten Ergebnisse der Immunhistochemie in Kauf, da sich durch die immunhistochemische Färbung der Hirnschnitte etwaige regionale Verteilungsunterschiede der untersuchten Parameter innerhalb der untersuchten Hirnstrukturen detektieren lassen.

5.2 Ergebnisdiskussion

5.2.1 Gewichtsentwicklung und Hydrocephalus

Wie auch in anderen Rattenmodellen beschrieben, zeigte sich in unserem Experiment kein Zusammenhang zwischen Hydrozephalus und Gewichtsentwicklung innerhalb unseres Untersuchungszeitraums (Cherian et al. 2003). Zur Gewichtsentwicklung menschlicher Frühstgeborener nach IVH bzw. mit PHH sind in der Literatur keine beschriebenen Zusammenhänge zu finden.

5.2.2 Hydrozephalusrate

Die Definition unseres Cut-Off-Wertes für eine ventrikuläre Dilatation als Mittelwert der relativen Ventrikelgröße aller Sham-Tiere plus doppelte Standardabweichung erlaubt den Rückschluss, dass 97,5% aller Tiere, an welchen keine Injektion vorgenommen wurde, eine relative Ventrikelgröße $\leq 4,74\%$ aufweisen. Tiere, deren relative Ventrikelgröße diesen Cut-Off-Wert überschritten, betrachteten wir als ventrikulär dilatiert.

Zum Zeitpunkt PT1, also 24 Stunden nach Injektion, ist die Ventrikuläre Dilatation bei Tieren der Blut- und NaCl-Gruppe am ehesten durch die direkte Volumenbelastung durch das injizierte Blut, bzw. durch die injizierte Kochsalzlösung zu erklären. Unter dem Mikroskop zeigten sich die Ventrikel der Tiere der Blut-Gruppe zu diesem Zeitpunkt noch vollkommen blutgefüllt (siehe Abbildung 14).

Zum Zeitpunkt PT3 zeigte ein Tier der Blut-Gruppe eine PHVD und zum Zeitpunkt PT7 konnten wir bei einem Tier der NaCl-Gruppe eine ventrikuläre Dilatation feststellen. 21 Tage nach Injektion wiesen drei Tiere der Blut-Gruppe einen PHH auf, wobei zwei von ihnen eine massiv vergrößerte relative Ventrikelfläche zeigten (19,4% bzw. 30,5%). Vernachlässigt man also aus oben genannten Gründen die Tiere der PT1-Gruppen bei der Suche nach Tieren mit Hydrozephalus, so ergibt sich für die Blut-Gruppe eine Hydrozephalusrate von 15,38% (4/26 Tieren) und für die NaCl-Gruppe eine Hydrozephalusrate von 4,17% (1/24 Tieren). Geht man davon aus, dass sich der PHH in unserem Tiermodell erst nach PT7, also im Zeitraum zwischen PT8 und PT21 entwickelt, so ergibt sich eine Hydrozephalus-Quote von 30% (3/10 Tieren), welche der Klinischen Häufigkeit des Auftretens eines PHH nach höhergradiger IVH (25-28%) sehr nahe kommt (Christian et al. 2016).

Basierend auf der beobachteten ventrikulären Dilatation bei vier Tieren der Blut-Gruppe zum Zeitpunkt PT1, sowie drei Tieren der Blut-Gruppe zum Zeitpunkt PT21, teilten wir die Blut-Gruppe an diesen beiden Zeitpunkten in eine PHVD-positive - und eine PHVD-negative Subgruppe ein, um diese auf eventuelle Unterschiede in der Immunreaktivität zu untersuchen. Zudem führten wir zu allen Zeitpunkten einen Spearman Rangkorrelationstests durch, um auf eine Korrelation zwischen der IRF der jeweiligen Färbung mit der relativen Ventrikelgröße zu prüfen.

5.2.3 Einfluss einer BHS-Störung auf den PHH

Die BHS erhält durch ihre Barrierefunktion ein schützendes Milieu innerhalb des ZNS aufrecht. Claudin-5 ist als TJ-Protein für die Integrität dieser Barriere mitverantwortlich (Zlokovic 2008). BHS-Schäden sind bei zahlreichen Erkrankungen des ZNS beschrieben, ein bekannter Schädigungsmechanismus ist hierbei die Entzündungsreaktion (Yang et al. 2007, Aslam et al. 2012). Im Falle einer BHS-Schädigung treten Moleküle, welche die BHS unter physiologischen Umständen nicht überwinden können, ins Hirnparenchym über. Ein Beispiel hierfür stellt IgG dar (Rousset et al. 2012).

Die signifikant verminderte Expression von Claudin-5 in der Blut-Gruppe zu den Zeitpunkten PT1 und PT3 lässt auf eine akute, möglicherweise über Tage anhaltende, Schädigung der BHS als Folge der intraventrikulären Injektion von Blut schließen. In der NaCl-Gruppe ließ sich zum Zeitpunkt PT3 ebenfalls signifikant reduzierte Expression von Claudin-5, und damit eine verzögerte BHS-Störung nachweisen. Eine gesteigerte Nachweisbarkeit von IgG im Parenchym verglichen mit der Sham-Gruppe konnte zu diesen Zeitpunkten in keiner der Traumagruppen nachgewiesen werden.

Die Abwesenheit der akuten BHS-Störung zum Zeitpunkt PT1 in der NaCl-Gruppe deutet auf einen Unterschied im Pathomechanismus der BHS-Störung zwischen der Blut-Gruppe und der NaCl-Gruppe hin: Die Injektion von Blut scheint schneller zu einer Beeinträchtigung der BHS-Funktion zu führen als die alleinige Volumenbelastung, beziehungsweise Dehnung des die Seitenventrikel umgebenden Hirngewebes, durch Injektion von NaCl. Da identische Volumina injiziert wurden, war das Ausmaß der Volumenbelastung/Dehnung des Hirngewebes also in beiden Gruppen wahrscheinlich von gleicher Intensität. Da NaCl im Vergleich zu Vollblut keine festen bzw. zellulären Bestandteile aufweist ist davon auszugehen, dass die Volumenbelastung/Dehnung des Ventrikelsystems nach NaCl-Injektion schneller durch Resorption vom Organismus behoben werden kann als nach Blut-Injektion. Eine mögliche Ursache für den früheren BHS-Schaden in der Blut-Gruppe wäre also eine länger andauernde Volumenbelastung/Dehnung des Ventrikelsystems.

Weiterhin liegt der Gedanke nahe, dass verschiedene Blutbestandteile für die frühere Schädigung der BHS verantwortlich sein könnten.

Im Rattenmodell konnte gezeigt werden, dass vor allem das aus Hämoglobin freiwerdende Eisen eine entscheidende Rolle in der ventrikulären Dilatation nach IVH zu spielen scheint (Gao et al. 2014). Auch wurde beschrieben, dass die intrazerebrale Injektion von Hämoglobin bei erwachsenen Ratten zu einer Schädigung der BHS führt, welcher sich auch in einer vorübergehenden Verminderung der Expression von Claudin-5 äußert (Fu et al. 2014).

Zum zeitlichen Ablauf der Lyse eines intrazerebralen Hämatoms wurde im Schweinemodell beschrieben, dass eine initial hohe Nachweisbarkeit von Hämoglobin im Bereich des Hämatoms 4 Stunden nach Injektion von autologem Vollblut nach 3 Tagen signifikant reduziert wurde (Cao et al. 2016). Bei intraventrikulärer Lokalisation des Hämatoms im flüssigen Medium des Liquor cerebrospinalis, ist eine schnellere Verstoffwechslung der Blutbestandteile denkbar. Ein Einfluss des aus Erythrozyten freiwerdenden Hämoglobins, sowie dem darin enthaltenen Eisen zu den Zeitpunkten PT1 und PT3 ist also anzunehmen.

Auch Thrombin führt im Rattenmodell bei ausgewachsenen Tieren sowohl bei intraventrikulärer als auch bei intraparenchymaler Injektion innerhalb von 24 Stunden zu deutlichen BHS-Schäden (Lee et al. 1997, Liu et al. 2010).

Der größtenteils in der Leber synthetisierte Blutplasmabestandteil Prothrombin wird im Rahmen der Gerinnungskaskade zu Thrombin gespalten. Auch das Gehirn selbst produziert Prothrombin bzw. Thrombin, jedoch in deutlich geringerem Maße als die Leber (Dihanich et al. 1991). Neben der Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin, und damit dem Vorantreiben der Blutgerinnung, wurden für Thrombin weitere Effekte beschrieben, auch spezifisch auf das ZNS. Die Wirkung Thrombins auf das ZNS gelten als dosisabhängig. In geringer Konzentration scheint Thrombin neuroprotektive Eigenschaften zu haben, in hohen Konzentrationen hingegen wirkt Thrombin neurotoxisch, führt zu Entzündungsreaktion, Ödembildung und, über Hochregulation von TNF- α und MMP9, zur Störung der BHS (Zheng et al. 2016). In vitro Experimente an Endothelzellen konnten zeigen, dass Thrombinapplikation zu einem schnellen, aber reversiblen Verlust von Claudin-5 führt (Kondo et al. 2009), möglicherweise durch Internalisierung des TJ-Proteins (Stamatovic et al. 2017).

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass es im Mausmodell der intrazerebralen Blutung auch bei Injektion von Silikonöl zur Aktivierung des zerebralen Thrombinsystems und damit zur gesteigerten Thrombinexpression im Läsionsgebiet kommt, ohne das Einwirken von Blutbestandteilen (Krenzlin et al. 2020). Überträgt man diese

Erkenntnisse auf unser Modell, so kann man postulieren, dass die NaCl-Injektion eine Aktivierung des endogenen Thrombinsystems- und so eine BHS-Schädigung nach sich erwirkt haben könnte.

In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass Erythrozyten und Thrombozyten die Konversion von Prothrombin zu Thrombin unterstützen und beschleunigen (Whelihan et al. 2012).

Es ist also davon auszugehen, dass die intraventrikuläre Injektion von Vollblut auch über neurotoxische Thrombinkonzentrationen zu einer BHS-Störung führt. Einerseits wird das über das Blut zugeführte plasmatische Prothrombin über die Gerinnungskaskade zu Thrombin gespalten und andererseits wird das zerebrale Thrombinsystem in Folge der Volumeninjektion aktiviert. Die von Whelihan, Zachary et al., 2012, beschriebene durch Erythrozyten und Thrombozyten beschleunigte Konversation von Prothrombin zu Thrombin ist hierbei gut mit der früheren BHS-Störung in der Blut-Gruppe verglichen mit der NaCl-Gruppe vereinbar.

In den genannten Tiermodellen zur BHS-Störung nach Thrombin-Injektion zeigte sich die BHS sieben Tage nach Injektion bereits deutlich regeneriert, 14 Tage post injectionem waren weder BHS-Schaden noch Hirnödemen nachweisbar (Liu et al. 2010). Auch wir beobachteten eine Erholung der geschädigten BHS 7 und 21 Tage nach Trauma, hier waren keine signifikanten Unterschiede in der Expression von Claudin-5 mehr nachweisbar.

Die zum Zeitpunkt PT7 signifikant größere IRF von IgG in der Blut- und der NaCl-Gruppe als in der Sham-Gruppe lässt sich einerseits durch einen länger bestehenden BHS-Schaden, welcher nicht durch eine verminderte Claudin-5-Expression abzubilden ist, erklären. Unterstützend hierfür konnten Liu, Ander et al., 2010, zeigen, dass sich die BHS 7 Tage nach intraventrikulärer Thrombin-Injektion zwar bereits erholt, jedoch weiterhin vermehrt durchlässig für Natrium Fluorescein und Evans Blue präsentiert (Liu et al. 2010).

Ein Mangel an Claudin-5 führt zur selektiven Durchlässigkeit der BHS für Moleküle kleiner 800 Dalton (Nitta et al. 2003). IgG haben ein Molekulargewicht von ca. 150000 Dalton (Edelman et al. 1969). Der Übertritt von IgG über die beschädigte BHS ist also nicht unmittelbar durch Claudin-5-Mangel bedingt, eine zeitliche Diskrepanz zwischen den Veränderungen dieser beiden Parameter zur Beurteilung der BHS-Integrität, wie wir sie hier beobachten konnten, ist also denkbar.

Auch ist möglich, dass IgG im Rahmen der zu PT1 und PT3 bestehenden BHS-Schädigung im ZNS kumuliert, und sich dies in einem Verbleiben von IgG im Hirnparenchym bis zum Zeitpunkt PT7 äußert. Eine Studie zur Pharmakokinetik von monoklonalen Antikörpern im Rattengehirn konnte noch 30 Tage nach hochdosierter intravenöser Gabe von Trastuzumab diesen monoklonalen Antikörper mittels Mikrodialyse im Hirnparenchym nachweisen (Chang et al. 2018). Dies spricht für einen eher langsamen Abbau von Immunglobulinen im Rattenhirn, sodass eine Nachweisbarkeit von IgG 7 oder gar 21 Tage nach IVH (PT7, PT21) durchaus durch eine BHS-Schädigung an den Tagen PT1 und PT3 zu erklären wäre.

Zudem wurde beschrieben, dass Thrombin die Angiogenese nach intrazerebraler Blutung anzuregen scheint. Die so entstehenden unreifen Gefäße zeigten sich bereits 3 Tage nach intrazerebraler Blutung und gipfelten am 7 Post-Trauma-Tag in ihrer Nachweisbarkeit (Zhou et al. 2012). Eine erhöhte Durchlässigkeit dieser unreifen Gefäße, unter anderem für IgG, könnte bei gegebener Übertragbarkeit des beschriebenen Phänomens auf die IVH eine erhöhte Nachweisbarkeit von IgG im Hirnparenchym erklären. Jedoch sollte sich dieser Effekt auf die Blutungsnahen Bereiche, in unserem Versuch Striatum und laterales Septum, beschränken.

Eine mögliche Erklärung für das Ausbleiben einer signifikant erhöhten Nachweisbarkeit von IgG im Hirnparenchym zu den Zeitpunkten PT1 und PT3 in der Blut- und NaCl-Gruppe verglichen mit der Sham-Gruppe könnte darin bestehen, dass die BHS im Hirn neugeborener Ratten für gewissen Proteine zunächst physiologisch deutlich durchlässiger ist als die BHS erwachsener Ratten. Eine Studie, in welcher zwei bis vier Tage alten Ratten Kaninchen-IgG injiziert und anschließend die Konzentration der Kaninchen-IgG im Hirnparenchym immunhistochemisch nachgewiesen wurde, beobachtete einen deutlich stärkeren Übertritt der Hasen-IgG über die BHS der Neugeborenen, im Vergleich zu erwachsenen Ratten. Regionale Unterschiede im Gehirn konnten nicht nachgewiesen werden (Fabian und Hulsebosch 1989). Auch Albumin scheint im Hirn neugeborener Ratten in höheren Konzentrationen vertreten zu sein als bei adulten Tieren (Skultetyova et al. 1993). Geht man davon aus, dass es sich mit den jungtiereigenen IgG ähnlich verhält, so erklärt dies die über alle Untersuchungsgruppen hinweg beobachtete erhöhte IgG-konzentration zu den Zeitpunkten PT1 und PT3, verglichen mit den späteren Untersuchungszeitpunkten (Siehe Abbildung 16).

Abbildung 16

Vergleich der IgG-IRF der Behandlungsgruppen im zeitlichen Verlauf, cingulärer Kortex

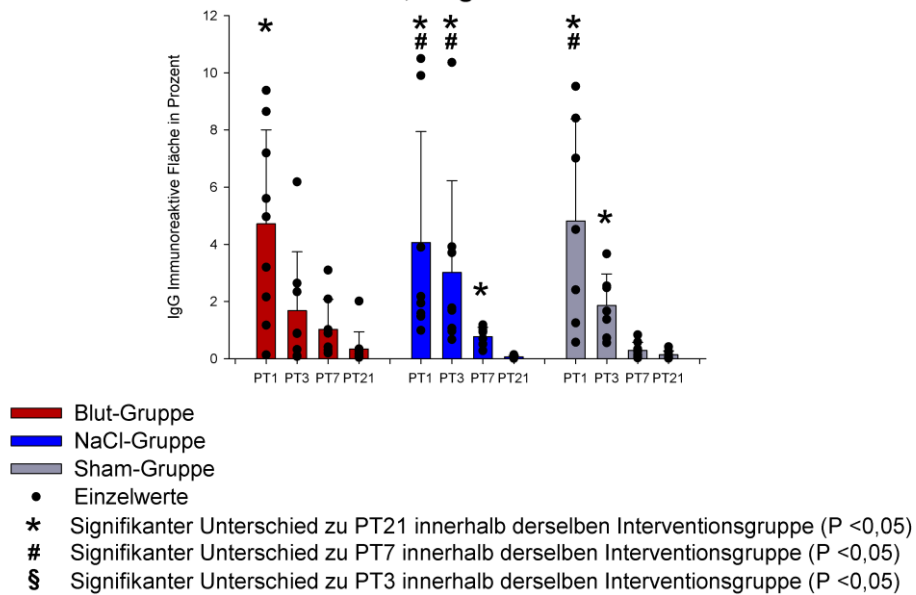


Abbildung 16 zeigt den zeitlichen Verlauf der IRF von IgG in Prozent, aufgeteilt nach Interventionsgruppen im Bereich des cingulären Kortex. Mittels One-Way-ANOVA bzw. One-Way-ANOVA-on-Ranks wurden die Untersuchungszeitpunkte innerhalb einer Interventionsgruppe miteinander verglichen. Die Säulen zeigen die Mittelwerte, die Fehlerbalken die Standardabweichung und die Punkte die Einzelwerte. Signifikante Unterschiede sind mit Sonderzeichen markiert (siehe Legende). Eine graphische Darstellung der übrigen Hirnareale findet sich im Anhang (Kapitel 9.9)

IgG stellt mit diesem Vorwissen und unter der Voraussetzung, dass die oben postulierte Übertragbarkeit gegeben sei, möglicherweise keinen geeigneten Marker für einen BHS-Schaden bei ein- bzw. drei Tage alten Ratten dar. Die BHS scheint zu diesen Zeitpunkten physiologisch durchlässiger für IgG zu sein, und ein vorliegender BHS-Schaden scheint diese Durchlässigkeit nicht in signifikantem Maße zu erhöhen.

Zum Zeitpunkt PT21 zeigt sich die Blut-Gruppe am stärksten immunoreaktiv bezüglich IgG. Dies könnte für einer erneute bzw. weiterhin bestehende BHS-Störung sprechen, welche sich nicht durch eine Mindereexpression von Claudin-5 zeigt. Als wahrscheinlicher werten wir jedoch, dass die vermehrte intraparenchymale Nachweisbarkeit von IgG Rückstände von der BHS-Störung, welche wir zu den Zeitpunkten PT1 und PT3 nachweisen können, darstellen. Diese Beobachtung spricht dafür, dass nach Blut-Injektion ein massiverer oder länger anhaltender BHS-Schaden als nach NaCl-Injektion auftritt. Diese Ergebnisse sollten jedoch nur zurückhaltend interpretiert werden: Sämtliche Schnitte zum Zeitpunkt PT21 zeigten sich ausgesprochen schwach angefärbt und waren dementsprechend schwer auszuwerten. Die beobachteten Unterschiede in der IRF waren äußerst gering, sodass bereits kleinste Veränderungen im Threshold während des Auswertungsprozesses

verhältnismäßig große Auswirkungen auf das letztendliche Ergebnis hatten. Bei einer so schwachen Färbung zu diesem Zeitpunkt stößt unser Auswertungsverfahren also, trotz großer Sorgfalt und Verblindung beim Auswerten, an seine Grenzen.

Beim Vergleich der Claudin-5 IRF von Tieren mit einer PHVD mit Tieren ohne PHVD innerhalb der Blut-Gruppe mittels T-Test bzw. Mann-Whitney U Test stellten wir weder in der Akutphase (PT1), noch zum Zeitpunkt PT21, eine signifikant geringere Claudin-5-Expression bei Tieren mit vergrößerten Ventrikeln fest (Siehe Anhang Kapitel 9.7.1).

Zum Zeitpunkt PT21 zeigte sich in einzelnen ROI der periventrikulären Regionen (Striatum und laterales Septum) eine signifikant größere IRF von IgG bei Tieren mit einer PHVD im Vergleich mit Tieren ohne PHVD. Diese punktuellen IgG-Nachweise im Hirnparenchym könnten von einer erneuten bzw. weiterhin bestehenden BHS-Störung herrühren, welche sich nicht durch eine Minderexpression von Claudin-5 zeigt. Als wahrscheinlicher werten wir, dass diese IgG-Extravasationen Rückstände von der BHS-Störung, welche wir zu den Zeitpunkten PT1 und PT3 nachweisen können, darstellen. Dies könnte dafür sprechen, dass bei Tieren, welche später einen PHH entwickelten, eine massivere BHS-Störung auftrat, sodass zum Zeitpunkt PT21 immer noch IgG im Parenchym nachweisbar waren. Dies könnte als schwaches Indiz für einen Zusammenhang zwischen BHS-Störung und der Entwicklung eines PHH interpretiert werden. Aufgrund der oben genannten Problematik bei der Auswertung der PT21 Tiere der IgG-Färbung, und der Begrenzung der Signifikanzen auf zwei von neun ROI in der Region des Striatums, und einem von drei ROI in der Region des lateralen Septums, müssen die erhobenen Werte jedoch mit Vorsicht interpretiert werden (Siehe Abbildung 11).

Aus diesen vereinzelt Signifikanzen im Spearman Rangkorrelationstest lassen sich nur schwer sinnvolle Schlüsse ziehen: Die Korrelationen zwischen Claudin-5-Expression und der relativen Ventrikelgröße traten jeweils nur zu einem einzelnen Zeitpunkt innerhalb ihrer Gruppe auf, an welchen auch die jeweiligen Daten zur relativen Ventrikelgröße keine ausgeprägte Streuung oder Besonderheiten jeglicher Art aufwiesen. Die negative Korrelation der periventrikulären IRF von Claudin-5 mit der Ventrikelgröße in der NaCl-Gruppe zum Zeitpunkt PT3 könnte man so interpretieren, dass eine verminderte Claudin-5 Konzentration auf eine Störung der BHS hinweist, welche zur ventrikulären Dilatation beiträgt. Eine weitere Interpretationsmöglichkeit wäre, dass eine ventrikuläre Dilatation zu einer verminderten Claudin-5 Konzentration führt. Diese Thesen bestätigen sich beim Blick auf die anderen Gruppen jedoch nicht.

Zu den übrigen Zeitpunkten innerhalb der NaCl-Gruppe findet sich keine Korrelation dieser Art. Auch in der Blut-Gruppe, welche eine Volumenbelastung in gleichem Maße erlitt, und bereits zu einem früheren Zeitpunkt eine BHS-Störung entwickelte, zeigt zu keinem Zeitpunkt eine ähnliche Korrelation.

Die positive Korrelation zwischen Claudin-5 IRF und Ventrikelgröße in der Sham-Gruppe zum Zeitpunkt PT21 findet sich ebenfalls zu keinem anderen Zeitpunkt. Auch zeigte der Vergleich der IRF der einzelnen Gruppen untereinander, dass sich die BHS der Tiere der Injektionsgruppen zu diesem späten Untersuchungszeitpunkt bereits von ihren Schäden erholt hat. In Anbetracht der Geringen Streuung der relativen Ventrikelgrößen innerhalb der Sham-Gruppe zu diesem Zeitpunkt gehen wir davon aus, dass diese Korrelationen durch Zufall bedingt sind.

Bei Betrachtung der Spearman-Korrelation für die IRF von IgG mit der relativen Ventrikelgröße zeigt sich ebenfalls ein schwer zu interpretierendes Gesamtbild. Die gefundenen Korrelationen beschränken sich auf die NaCl-Gruppe zum Zeitpunkt PT1. Zu diesem Zeitpunkt zeigt weder IgG noch der TJ-Marker Claudin-5 eine Schädigung der BHS bei diesen Tieren. Auch sollten Veränderungen in der NaCl-Gruppe, da sie am wahrscheinlichsten eine Folge der Volumenbelastung des Ventrikelsystems oder der Nachwirkungen des Traumas der Operation darstellen, in mindestens gleichem Maße in der Blut-Gruppe feststellbar sein, da Tiere der Blut-Gruppe die gleichen Volumina im gleichen Operationsprocedere erhielten.

Auch die weiter oben postulierte physiologisch erhöhte Durchlässigkeit der BHS für IgG zu diesem Entwicklungszeitpunkt, und der damit einhergehend ausbleibende Unterschied in der IRF von IgG zwischen den Untersuchungsgruppen, macht es schwer diese Korrelationen einzuordnen.

Ist, wie oben beschrieben, IgG zum Zeitpunkt PT1 und PT3 kein zuverlässiger Marker für eine BHS-Störung, so ist auch diese Korrelation in Bezug auf die Fragestellung nach einer BHS-Schädigung zu vernachlässigen.

Zusammenfassend lässt sich aus der immunhistochemischen Untersuchung der BHS schließen, dass eine Injektion von Vollblut in das Ventrikelsystem neugeborener PND1 Ratten zu einer Störung der BHS führt. Diese Störung zeigt sich zu den Zeitpunkten PT1 und PT3 durch verminderte Claudin-5-Expression, und führt 7 Tage nach Trauma (PT7) zu einer vermehrten Nachweisbarkeit von IgG im Hirnparenchym, welche auch zum Zeitpunkt PT21 noch nachweisbar ist. Eine direkte Korrelation der BHS-Störung

mit der Entwicklung eines PHH konnten wir nicht nachweisen. Lediglich die stellenweise Extravasion von IgG zum Zeitpunkt PT21 in Tieren mit PHH verglichen mit Tieren ohne PHH innerhalb der Blut-Gruppe lässt sich als schwaches Indiz hierfür werten.

5.2.4 Einfluss von Aquaporin-4 auf den PHH

Aquaporin-4 ist ein an bidirektionaler Wasserkanal, welcher vor allem an Astrozytenfortsätzen der NVE und der Hirn-Liquor-Grenze lokalisiert ist (Badaut et al. 2002, Guo et al. 2018). Bei Vorliegen eines Hydrozephalus ist beschrieben, dass Aquaporin-4 vermehrt exprimiert wird. Hierbei korreliert die Aquaporin-4 Expression positiv mit der Ausprägung des Hydrozephalus (Mao et al. 2006, Guo et al. 2018). Bei einem vorliegenden vasogenen Hirnödem mit BHS-Störung wird in der Literatur initial eine verminderte Aquaporin-4 Expression beschrieben, in der Auflösungsphase des vasogenen Ödems wiederum (ca. 7 Tage nach Hirnschädigung) kommt es zu vermehrter Expression von Aquaporin-4 (Tourdias et al. 2009). Es sollte bedacht werden, dass die Expression von Aquaporin-4 bei Ratten in den ersten zwei Lebenswochen verglichen mit ausgewachsenen Tieren deutlich reduziert ist (Wen et al. 1999). Da dies für alle drei Untersuchungsgruppen gleichermaßen zutrifft, sollten die von uns festgestellten Ergebnisse dennoch aussagekräftig sein.

Die von uns zum Zeitpunkt PT7 beobachtete vermehrte Nachweisbarkeit von Aquaporin-4 in den periventrikulären Regionen ist kongruent zur aktuellen Studienlage: An Spargue Dawley Ratten mit zu PND1 oder PND21 durch Kaolin-Injektion induziertem Hydrozephalus konnte – ebenso wie bei 12 Wochen alten SD Ratten mit Hydrozephalus nach Injektion von 200µl autologem Vollblut – gezeigt werden, dass Aquaporin-4 bei Hydrozephalus vermehrt exprimiert wird. Hierbei korreliert das Level an Aquaporin-4 mit der Ausprägung des Hydrozephalus (Mao et al. 2006, Guo et al. 2018). Dieser Zusammenhang konnte ebenfalls in der Liquordiagnostik beim angeborenen Hydrozephalus des Menschen nachgewiesen werden, sowohl bei der okklusiven-, als auch bei der kommunizierenden Form (Castañeyra-Ruiz et al. 2013). Silencing von Aquaporin-4 im Mausmodell verstärkt die Ausprägung eines Hydrozephalus, und scheint BHS-Schäden zu aggravieren (Guo et al. 2018). Auch Aquaporin-4 Knockout-Mäuse zeigen bei Kaolin-induziertem okklusivem Hydrozephalus eine ausgeprägtere Dilatation der Ventrikel als Wildtyp-Mäuse (Bloch et al. 2006). Dies legt die Vermutung nahe, dass eine vermehrte

Expression von Aquaporin-4 als Kompensationsmechanismus fungiert, also der Schädigung der BHS, sowie der Progression des Hydrozephalus entgegenwirkt.

Eine Hochregulation von Aquaporin-4 wird auch in der Auflösungsphase eines vasogenen Ödems, welches durch eine BHS-Störung bedingt sein kann, beschrieben. Tourdias et al. induzierten durch Lysolecithin-Injektion in das Hirnparenchym eine Entzündungsreaktion und eine BHS-Schädigung, um die Entwicklung des Vasogenen Hirnödems zu untersuchen. Sie Terminierten die Auflösungsphase und die damit einhergehende vermehrte Aquaporin-4 Expression 7 bis 20 Tage nach Injektion (Tourdias et al. 2011). Da wir eine Schädigung der BHS zum Zeitpunkt PT1 in der Blut-Gruppe, sowie zum Zeitpunkt PT3 in der Interventions- und der NaCl-Gruppe feststellen konnten, ist zu diesen Zeitpunkten auch von einer vermehrten Extravasation von Wasser, und somit der Entstehung eines vasogenen Ödems auszugehen. Die zu PT7 beobachtete gesteigerte Expression von Aquaporin-4 in unserem Experiment und die zum Zeitpunkt PT21 normalisierten Aquaporin-4 Werte können also im Rahmen einer Antwort auf dieses vasogene Hirnödem gewertet werden.

In der Subakuten Phase, drei Tage nach der simulierten IVH, fiel entgegen unserer Erwartungen eine signifikant verminderte Expression von Aquaporin-4 in der Blut-Gruppe auf. Zu diesem Zeitpunkt wäre, in Anbetracht der Studienlage bezüglich Aquaporin-4 und Hydrozephalus, bereits ein milder Anstieg des Aquaporin-4 Niveaus zu erwarten gewesen (Mao et al. 2006, Guo et al. 2018). Eine mögliche Erklärung für den stattdessen beobachteten Abfall wäre, dass es durch die bilaterale Injektion von je 100µl Blut bzw. Kochsalzlösung in die Seitenventrikel der 24 Stunden alten Tiere zu einer ausgeprägten Druckbelastung des periventrikulären Hirngewebes und dadurch zur Komprimierung versorgender Gefäße in diesen Bereichen gekommen ist. Frydenlund et al. beschreiben einen Initialen Abfall der Aquaporin-4 Konzentration im Striatum nach 90-minütigem Verschluss der Arteria cerebri media im Mausmodell. 24 Stunden nach Reperfusion erreicht die Aquaporin-4 Konzentration ihren Tiefpunkt, und steigt anschließend langsam wieder an (Frydenlund et al. 2006). Sollte die von uns gesetzte Intervention zu einer Ischämie der ventrikelnahen Hirnregionen geführt haben, so ist diese wahrscheinlich deutlich weniger ausgeprägt gewesen als eine auf einen Verschluss der Arteria cerebri media folgende Ischämie. Diese Diskrepanz im induzierten ischämischen Schaden kann die im Vergleich zum oben genannten Mausmodell eher schwache Ausprägung des von uns beobachteten Aquaporin-4 Abfalls erklären. Hierbei handelt es sich jedoch allgemein um einen sehr spekulativen

Erklärungsansatz. Die Promotionsarbeit von Corinna Leistner untersucht unter anderem Zellschaden und Zelluntergang in den Hirnen der von uns untersuchten Tiere. Sie konnte in ihrer Arbeit zeigen, dass es nach IVH vor allem in den periventrikulären Bereichen des Rattengehirns zu axonalen Schädigungen kommt (Leistner 2020). Dieser Schaden könnte zwar auch in einer anderen Ursache, beispielsweise die mechanische Dehnung des Gewebes durch die Volumenbelastung der Ventrikel, begründet liegen, jedoch ist er ebenso mit der weiter oben postulierten transienten ventrikelnahen Ischämie vereinbar.

Ähnlich wie bei Claudin-5 sind auch im Falle von Aquaporin-4 die gefundenen Signifikanzen in den Spearman Rangkorrelationstest schwer zu interpretieren. Wir fanden vereinzelte negative Korrelationen in allen drei Untersuchungsgruppen, verteilt über verschiedene Hirnregionen und Untersuchungszeitpunkte. Diese punktuelle Verteilung bei einem ansonsten eher globalen Geschehen, die unauffälligen Ergebnisse in den ventrikelnahen Bereichen und die der Literatur entgegengesetzte negative Beziehung zwischen Aquaporin-4-Expression und Ventrikelgröße, lassen keine sinnvollen Rückschlüsse auf eine erklärende Ursache zu.

In anderen Studien konnte in verschiedenen Hydrozephalus-Modellen eine positive Korrelation zwischen Aquaporin-4-Expression und Grad der Ausprägung eines Hydrozephalus nachgewiesen werden. Untersucht wurden in diesen Studien ausgewachsene Tiere sowie Jungtiere (1-9 Wochen alt) zu den Entitäten des inflammatorischen Hydrozephalus, des PHH und des Kaolin-Induzierten Hydrozephalus (Mao et al. 2006, Tourdias et al. 2009, Guo et al. 2018). Mit diesem Vorwissen wäre eine erhöhte Aquaporin-4 Konzentration bei den PHVD-positiven Tieren zum Zeitpunkt PT21, ebenso wie eine positive Korrelation der Aquaporin-4 Konzentration mit der Ventrikelgröße zu erwarten gewesen. In unserem Experiment konnten wir jedoch keine derartigen Beobachtungen machen, weder in der Akutphase noch sieben oder 21 Tage nach simulierter IVH.

Obwohl wir zum Zeitpunkt PT7 die erwarteten erhöhten Aquaporin-4 Level fanden, zeigte sich auch hier keine Korrelation mit der Ventrikelgröße. Da wir zu diesem Untersuchungszeitpunkt durch unsere Intervention keinen PHH induzieren konnten, wäre eine mögliche Erklärung für die erhöhten Aquaporin-4-Werte – wie oben beschrieben – ein auf die IVH folgendes vasogenes Hirnödem, welches sich zum Zeitpunkt der immunhistochemischen Untersuchung in der Auflösungsphase befand.

Hinweise auf eine maßgebliche Beteiligung von Aquaporin-4 an der Entstehung eines PHH, z.B. durch eine Abflussstörung durch die Wasserkanäle, fanden wir in unseren Experimenten nicht. Da die Entwicklung des PHH in unserem Modell erst nach PT7 stattzufinden scheint und unser Experiment deutliche Veränderungen in der Expression von Aquaporin-4 auslöste, ist ein Einfluss von Aquaporin-4 auf die Entwicklung des PHH, welcher sich im Zeitraum von PT7 bis PT21 abzeichnen könnte, nicht gänzlich auszuschließen.

5.2.5 Tiermodell

Unser Tiermodell schneidet mit einer Hydrozephalus-Rate von 30% (3/10) in der Blut-Gruppe nach 21 Tagen, und 0% (0/8) in der NaCl-Gruppe nach 21 Tagen, bzw. insgesamt (PT3, PT7 und PT21) 15,38% (4/26) nach Blutinjektion und 4,17% (1/24) nach Injektion von Kochsalzlösung, deutlich schlechter ab, als das Modell von Cherian et al., welches Raten von 65% nach Blut-Injektion, und 50% nach NaCl-Injektion erzielte, oder das Modell von Ahn et al., welches durch die bilaterale Injektion von je 100µl allogenen Vollblut am vierten Postnataltag eine Hydrozephalusrate von 85% erreichen konnte (Ahn et al. 2013). Dass wir zum Zeitpunkt PT7 keinen Hydrozephalus in der Blut-Gruppe feststellen konnten, kann in der Gruppengröße von N=8 in Kombination mit der eher geringen Hydrozephalus-Rate unseres Modells begründet liegen. Auch ist denkbar, dass sich ein PHH in unserem Modell erst nach PT7 entwickelt. Dies würde ein Fehlen von PHH zum Zeitpunkt PT7 erklären. Gleichzeitig ergäbe sich unter dieser Annahme eine Hydrozephalusquote von 30% (3/10 Tieren) an PT21, was der klinischen Wahrscheinlichkeit der Entwicklung eines PHH nach höhergradiger IVH von 25% bis 28% beim Frühgeborenen Menschen sehr nahekommt.

Da sich bei keinem der untersuchten Faktoren eine interpretierbare Korrelation mit der Ventrikelgröße zeigt, und sich auch der Vergleich der PHVD-positiven und PHVD-negativen Tiere bezüglich der untersuchten Faktoren nicht signifikant unterscheiden, lässt sich kein klarer Zusammenhang zwischen den untersuchten Parametern und der Pathophysiologie des PHH nachweisen. Lediglich die erhöhte IRF von IgG, welche wir bei Tieren mit PHVD zum Zeitpunkt PT21 innerhalb der Blut-Gruppe nachweisen können, ließe sich als schwaches Indiz für einen Zusammenhang werten.

Die simulierte IVH löste Veränderungen in den Untersuchten Parametern Claudin-5, IgG und Aquaporin-4 zu den Zeitpunkten PT1, PT3 und PT7 aus. Diese Veränderungen lassen sich in Form einer akuten Störung der Bluthirnschranke, eines vasogenen Hirnödems und ggf. einer ischämischen Komponente, bedingt durch das Ausmaß des gesetzten Schadens, interpretieren. Drei Wochen nach Intervention (PT21) ließen sich all diese Folgen nicht mehr nachweisen, die Störung der BHS und die Veränderung des Wasserhaushaltes scheinen zu diesem Zeitpunkt also ausgeheilt zu sein.

Zum Zeitpunkt PT21 stellten wir bei drei Tieren der Blut-Gruppe einen PHH fest, wobei zwei dieser PHH-Tiere mit einer relativen Ventrikelgröße von 19,4% bzw. 30,5% (als normal definierten wir Werte bis 4,74%, s.o.) eine erhebliche PHVD aufwiesen, und somit definitiv einen Hydrozephalus als Folge der Injektion entwickelten. Dass sich bei diesen Tieren kein signifikanter Unterschied bei den Untersuchten Parametern Claudin-5 und IgG zeigt, lässt darauf schließen, dass sich die BHS zu diesem späten Zeitpunkt nach IVH bereits vom erlittenen Schaden erholt hat. Das Fehlen der erwarteten erhöhten Aquaporin-4 Konzentration in den Hirnen PHH-Tieren erscheint vor allem hier wenig einleuchtend. Da sich die übrigen Ergebnisse der Aquaporin-4 Färbung größtenteils plausibel Interpretieren lassen, und im Einklang mit aktueller Literatur stehen, ist davon auszugehen, dass die gewählte immunhistochemische Färbemethode zuverlässige Ergebnisse liefert. Denkbar wäre, dass die Intervention bei diesen Tieren zu massiven Parenchymschäden und Zelluntergang durch Druck oder Ischämie führte, was sich nun in einem an einen Hydrozephalus e vacuo erinnernden Bild darstellt. Corinna Leistner konnte in ihrer Doktorarbeit zum Zeitpunkt PT21 in der Blut-Gruppe eine positive Korrelation zwischen relativer Ventrikelgröße und dem Apoptosemarker aktivierte Caspase 3 zeigen. Auch der Marker für Axonschäden SMI zeigte in ihrer Arbeit eine positive Korrelation mit der relativen Ventrikelgröße (Leistner 2020). Diese Befunde sind mit dem postulierten vermehrten Zelluntergang vereinbar. Zelluntergang, Apoptose und Axonschäden wurden allerdings auch beim Kaolin-Induzierten Hydrozephalus im Rattenmodell beschrieben, sodass der von C. Leistner beschriebene Zelluntergang auch als Folge des PHH gewertet werden könnte (Del Bigio und Zhang 1998).

Auch wäre denkbar, dass diese Tiere gerade deshalb einen so massiven PHH entwickelten, weil sie aus unklaren Gründen dem sich entwickelnden PHH nicht mit einer kompensatorischen Hochregulation von Aquaporin-4 begegnen konnten. Dies

könnte eine Erklärung für das Ausbleiben der in der Literatur beschriebenen erhöhten Aquaporin-4 Konzentration bei Hydrozephalus darstellen, welche im Einklang mit der Beobachtung der Aggravierung von Hydrozephalus in Aquaporin-4 Knockout-Mäusen steht (Guo et al. 2018).

Als am ehesten verantwortlich für die Diskrepanz in der Hydrozephalusrate zwischen dem hier vorgestellten Tiermodell, und dem von Cherian et al. und Ahn et al. sehen wir den Zeitpunkt der Injektion: Das Operationsverfahren von Ahn et al. ähnelte unserem Vorgehen sehr, der nennenswerteste Unterschied ist die Wahl des Interventionszeitpunktes am vierten Lebenstag der Jungtiere. In ihrem Modell beobachteten Ahn et al. vier Wochen nach simulierter IVH (bilaterale Injektion von je 100µl allogenen Vollblut in die Seitenventrikel) bei 85% der Tiere einen Progress zum PHH (Ahn et al. 2013). Auch der Vergleich mit dem Modell von Cherian et al., die am siebten Postnataltag injizierten und in 65% der Tiere, die eine Blutinjektion erhielten, einen PHH beobachten konnten, legt nahe, dass ein späterer Injektionszeitpunkt den Progress der simulierten IVH in einen PHH deutlich begünstigt. Interessant ist auch, dass sich bei Cherian et al. nach Injektion von je 80µl künstlichem Liquor bilateral in der Hälfte der Fälle eine ventrikuläre Dilatation entwickelte, während sich in unserer NaCl-Gruppe, nach Injektion von 100µl isotoner Kochsalzlösung bilateral, über die gesamte Beobachtungsperiode nur ein Hydrozephalus (4,17%) zeigte (Cherian et al. 2003).

Tiere, welche vier bis sieben Tage nach Geburt eine bilaterale intraventrikuläre Injektion von allogenen Blut erhalten, zeigen sich also deutlich vulnerabler für den Progress in einen PHH, als Tiere die bereits 24 Stunden nach Geburt der Injektion unterzogen werden. Auch gegenüber den Folgen des Schadens, welcher allein durch die Dehnung des Ventrikelsystems durch Volumenbelastung entsteht, scheinen letztere Tiere deutlich resistenter zu sein. Als mitverantwortlich für dieses Phänomen könnte die bei PND1 Ratten noch sehr weiche und nachgiebige Schädelkalotte sein, was einer Druckentwicklung nach Injektion entgegenwirken könnte. Zum zeitlichen Verlauf der Verknöcherung der Schädelkalotte und der damit einhergehenden zunehmenden Rigidität des Hirnschädels konnten wir keine Literatur finden. Im Prozess der Hirnentnahme beobachteten wir jedoch zu den Zeitpunkten PT3 und PT7 eine deutlich weniger verformbare Kalotte als zum Zeitpunkt PT1, wobei wir diese Unterschiede nicht durch Messungen objektivierten.

Die vermehrte Vulnerabilität für den Progress in einen PHH, nach einer vier bis sieben Tage nach Geburt induzierten IVH, im Vergleich zu einer 24 Stunden nach Geburt induzierten IVH, wird zudem von der klinischen Erkenntnis gestützt, dass ein frühes Gestationsalter zwar die Wahrscheinlichkeit einer IVH erhöht (Lu et al. 2016), die Wahrscheinlichkeit, dass diese einen PHH zur Folge hat, jedoch mit steigendem Gestationsalter zunimmt (Klinger et al. 2016).

6 Fazit

Das von uns gewählte Tiermodell zur Erforschung der Pathophysiologie des PHH, führte in klinisch relevantem Maße zur Entwicklung eines PHH. Spätere Injektionszeitpunkte scheinen zu höheren PHVD-Quoten zu führen, weshalb andere Rattenmodelle mehr PHH induzieren konnten.

Die Injektion von allogenen Vollblut führt zu einer frühen Störung der BHS, während sich nach NaCl-Injektion ein verzögerter Effekt auf die BHS zeigte. Die Veränderung der BHS waren am 7. Tag nach IVH (PT7) und später nicht mehr nachweisbar. Die BHS-Störung führte jedoch zum langanhaltenden Übertritt von IgG in das Parenchym, was für die Blut-Gruppe bis zum 21. Tag nach IVH (PT21) andauerte.

Die an den Endfüßchen der Astrozyten lokalisierten Aquaporin-4 Wasserkanäle waren nur in den ventrikelnahen Strukturen der Traumagruppen verändert. Sie zeigten sich zunächst erniedrigt, und 7 Tage nach Injektion (PT7) erhöht. 21 Tage nach IVH waren diese Veränderungen nicht mehr nachweisbar.

Zusammenhänge zwischen untersuchten Parametern Claudin-5 und IgG mit der Ventrikelgröße, bzw. dem Vorliegen einer PHVD, konnten wir nicht direkt nachweisen, weshalb wir nur indirekt auf eine Rolle einer Schädigung der Bluthirnschranke in der Pathophysiologie des PHH schließen konnten. Auch bei der Untersuchung der Veränderungen des Wasserhaushaltes anhand des Parameters Aquaporin-4, konnten wir keinen direkten Zusammenhang mit der Pathogenese des PHH feststellen. Eine Longitudinalstudie, mit oder ohne pharmakologische Intervention, könnte genaueren Aufschluss über etwaige direkte Zusammenhänge zwischen den untersuchten Parametern und der Pathophysiologie des PHH bringen.

Da sich als Folge der simulierten IVH signifikante Veränderungen in den untersuchten Parametern zeigten, lassen sich etwaigen Einflüsse der untersuchten Entitäten auf die Pathogenese des PHH auch nicht ausschließen.

7 Zusammenfassung

Frühgeborene haben ein erhöhtes Risiko eine IVH, hervorgehend aus einer Blutung der germinalen Matrix, zu erleiden, welche, je nach Schweregrad der Blutung, einen PHH nach sich ziehen kann. Dieser entsteht durch ein Missverhältnis von Liquorproduktion und -Resorption, sowie aufgrund veränderter Liquordynamik. Die genaue Pathogenese ist jedoch noch Teil aktueller Forschung.

Ziel dieser Studie war es, ein geeignetes Tiermodell zur Erforschung der Pathophysiologie des PHH zu entwickeln, und anhand dessen eine Beteiligung einer BHS-Störung, sowie einer Veränderung des Wasserhaushaltes an der Entwicklung des PHH nachzuweisen. Folgende Hypothesen wurden formuliert:

1. Die bilaterale Injektion von Blut in die Seitenventrikel 1-Tag alter neugeborener Ratten führt zu einem Hydrocephalus, wodurch zugrundeliegende Pathomechanismen studiert werden können.
2. Die IVH nach Geburt führt zu Störungen der Blut-Hirn-Schranke und der Wasserkanäle, welche immunhistochemisch mit den Markern Claudin-5, Immunglobulin G und Aquaporin-4 detektiert werden können.
3. Die Störung der Blut-Hirn-Schranke und der Wasserkanäle ist maßgeblich an der Entstehung eines posthämorrhagischen Hydrozephalus beteiligt.

Hierzu wurden 101 Rattenjungen in die Auswertung eingeschlossen. Am ersten Postnataltag erhielten 35 von ihnen eine bilaterale Injektion von je 100µl allogenen Vollblut in jeden Seitenventrikel, 32 Neugeborene erhielten eine Injektion von je 100µl isotoner Kochsalzlösung in jeden Seitenventrikel, und die übrigen 34 Jungtiere eine Scheinoperation in Form eines Hautschnittes gefolgt von stumpfer Freipräparation der Schädelkalotte unter Narkose. Die Hirne der Jungtiere wurden 1-, 3-, 7- und 21 Tage nach intraventrikulärer Injektion oder Scheinoperation entnommen, um die untersuchten Parameter im zeitlichen Verlauf abbilden zu können.

In unserer Studie konnten wir folgende Erkenntnisse gewinnen:

1. Das Modell der sehr frühen IVH bei 1 Tag alten Ratten eignet sich um mit Blut-Injektion – aber nicht mit NaCl-Injektion – eine klinisch relevante Anzahl (ca. 30%) post-hämorrhagischer Hydrocephali zu induzieren.

2. Das beschriebene Modell der sehr frühen IVH führt zu einer frühen Störung der Blut-Hirn-Schranke, sowie zu einer frühen und einer verzögerten Veränderung der Expression von Aquaporin-4.
3. Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen den Veränderungen der Blut-Hirn-Schranke und der astrozytären Wasserkanäle mit der Entwicklung des posthämorrhagischen Hydrozephalus konnte in diesem Modell nicht bewiesen werden.

Die Anzahl der Tiere die konsekutiv einen PHH entwickelten bleibt in unserem Modell deutlich hinter den Ergebnissen aus anderen Studien zurück. Als verantwortlich für diese Diskrepanz sehen wir vor allem den von uns sehr früh gewählten Injektionszeitpunkt, 24 bis 48 Stunden nach Geburt. Die intraventrikuläre Injektion von allogenen Vollblut bzw. NaCl führten in der Blut-Gruppe zu einer schnellen Störung der BHS, während die NaCl-Gruppe einen verzögerten Effekt auf die BHS zeigte. Die Veränderung der BHS waren am 7. Tag nach IVH (PT7) und später nicht mehr nachweisbar. Die BHS-Störung führte jedoch zum langanhaltenden Übertritt von IgG in das Parenchym, was für die Blut-Gruppe bis zum 21. Tag nach IVH (PT21) andauerte.

Die an den Endfüßchen der Astrozyten lokalisierten Aquaporin-4 Wasserkanäle waren nur in den ventrikelnahen Strukturen der Traumagruppen verändert. Sie zeigten sich zunächst erniedrigt, und 7 Tage nach Injektion (PT7) erhöht.

Obwohl die Veränderungen 21 Tage nach IVH (PT21) nicht mehr zu finden waren, entwickelten 30% der mit Blut injizierten Tiere erst in dieser Spätphase einen PHH. Ein Zusammenhang zwischen der BHS-Störung und den Veränderungen der Wasserkanäle mit der Entwicklung eines PHH lässt sich in unserem Modell nicht klar beweisen, allerdings lässt sich eine Rolle der beschriebenen frühen Veränderungen der untersuchten Parameter in der späteren Entwicklung des PHH nicht ausschließen.

8 Literaturverzeichnis

- Abbott, N. J., A. A. Patabendige, D. E. Dolman, S. R. Yusof and D. J. Begley (2010). "Structure and function of the blood-brain barrier." Neurobiol Dis **37**(1): 13-25.
- Ahn, S. Y., Y. S. Chang, D. K. Sung, S. I. Sung, H. S. Yoo, J. H. Lee, W. I. Oh and W. S. Park (2013). "Mesenchymal Stem Cells Prevent Hydrocephalus After Severe Intraventricular Hemorrhage." Stroke **44**(2): 497-504.
- Alles, Y. C., S. Greggio, R. M. Alles, P. N. Azevedo, L. L. Xavier and J. C. DaCosta (2010). "A novel preclinical rodent model of collagenase-induced germinal matrix/intraventricular hemorrhage." Brain Res **1356**: 130-138.
- Alvarez, J. I., A. Dodelet-Devillers, H. Kebir, I. Ifergan, P. J. Fabre, S. Terouz, M. Sabbagh, K. Wosik, L. Bourbonniere, M. Bernard, J. van Horssen, H. E. de Vries, F. Charron and A. Prat (2011). "The Hedgehog pathway promotes blood-brain barrier integrity and CNS immune quiescence." Science **334**(6063): 1727-1731.
- Armulik, A., G. Genove, M. Mae, M. H. Nisancioglu, E. Wallgard, C. Niaudet, L. He, J. Norlin, P. Lindblom, K. Strittmatter, B. R. Johansson and C. Betsholtz (2010). "Pericytes regulate the blood-brain barrier." Nature **468**(7323): 557-561.
- Aslam, M., N. Ahmad, R. Srivastava and B. Hemmer (2012). "TNF-alpha induced NFkB signaling and p65 (RelA) overexpression repress Cldn5 promoter in mouse brain endothelial cells." Cytokine **57**(2): 269-275.
- Attwell, D., A. M. Buchan, S. Charpak, M. Lauritzen, B. A. MacVicar and E. A. Newman (2010). "Glial and neuronal control of brain blood flow." Nature **468**: 232.
- Badaut, J., F. Lasbennes, P. J. Magistretti and L. Regli (2002). "Aquaporins in Brain: Distribution, Physiology, and Pathophysiology." Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism **22**(4): 367-378.
- Badaut, J., J. M. Petit, J. F. Brunet, P. J. Magistretti, C. Charriaut-Marlangue and L. Regli (2004). "Distribution of Aquaporin 9 in the adult rat brain: preferential expression in catecholaminergic neurons and in glial cells." Neuroscience **128**(1): 27-38.
- Balasubramaniam, J. and M. R. Del Bigio (2006). "Animal models of germinal matrix hemorrhage." J Child Neurol **21**(5): 365-371.
- Ballabh, P. (2010). "Intraventricular Hemorrhage in Premature Infants: Mechanism of Disease." Pediatric Research **67**: 1.
- Baskaya, M. K., A. M. Rao, A. Dogan, D. Donaldson and R. J. Dempsey (1997). "The biphasic opening of the blood-brain barrier in the cortex and hippocampus after traumatic brain injury in rats." Neurosci Lett **226**(1): 33-36.
- Bloch, O., K. I. Auguste, G. T. Manley and A. Verkman (2006). "Accelerated Progression of Kaolin-Induced Hydrocephalus in Aquaporin-4-Deficient Mice." Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism **26**(12): 1527-1537.
- Bolisetty, S., A. Dhawan, M. Abdel-Latif, B. Bajuk, J. Stack and K. Lui (2014). "Intraventricular hemorrhage and neurodevelopmental outcomes in extreme preterm infants." Pediatrics **133**(1): 55-62.
- Cao, S., M. Zheng, Y. Hua, G. Chen, R. F. Keep and G. Xi (2016). "Hematoma Changes During Clot Resolution After Experimental Intracerebral Hemorrhage." Stroke **47**(6): 1626-1631.
- Castañeyra-Ruiz, L., I. González-Marrero, J. M. González-Toledo, A. Castañeyra-Ruiz, H. de Paz-Carmona, A. Castañeyra-Perdomo and E. M. Carmona-Calero (2013). "Aquaporin-4 expression in the cerebrospinal fluid in congenital human hydrocephalus." Fluids and Barriers of the CNS **10**(1): 18.
- Chang, H. Y., K. Morrow, E. Bonacquisti, W. Zhang and D. K. Shah (2018). "Antibody pharmacokinetics in rat brain determined using microdialysis." MAbs **10**(6): 843-853.
- Cheng, Z., L. Wang, M. Qu, H. Liang, W. Li, Y. Li, L. Deng, Z. Zhang and G.-Y. Yang (2018). "Mesenchymal stem cells attenuate blood-brain barrier leakage after cerebral ischemia in mice." Journal of Neuroinflammation **15**(1): 135.

Cherian, S. S., S. Love, I. A. Silver, H. J. Porter, A. G. Whitelaw and M. Thoresen (2003). "Posthemorrhagic ventricular dilation in the neonate: development and characterization of a rat model." J Neuropathol Exp Neurol **62**(3): 292-303.

Christian, E. A., D. L. Jin, F. Attenello, T. Wen, S. Cen, W. J. Mack, M. D. Krieger and J. G. McComb (2016). "Trends in hospitalization of preterm infants with intraventricular hemorrhage and hydrocephalus in the United States, 2000–2010." **17**(3): 260.

da Silva Lopes, L., I. Slobodian and M. R. Del Bigio (2009). "Characterization of juvenile and young adult mice following induction of hydrocephalus with kaolin." Experimental Neurology **219**(1): 187-196.

Del Bigio, M. R. and Y. W. Zhang (1998). "Cell death, axonal damage, and cell birth in the immature rat brain following induction of hydrocephalus." Exp Neurol **154**(1): 157-169.

Dihanich, M., M. Kaser, E. Reinhard, D. Cunningham and D. Monard (1991). "Prothrombin mRNA is expressed by cells of the nervous system." Neuron **6**(4): 575-581.

Edelman, G. M., B. A. Cunningham, W. E. Gall, P. D. Gottlieb, U. Rutishauser and M. J. Waxdal (1969). "The covalent structure of an entire gammaG immunoglobulin molecule." Proc Natl Acad Sci U S A **63**(1): 78-85.

Fabian, R. H. and C. E. Hulsebosch (1989). "Time course of penetration of xenogeneic IgG into the central nervous system of the neonatal rat: an immunohistochemical and radionuclide tracer study." J Neuroimmunol **24**(3): 183-189.

Förster, C., M. Burek, I. A. Romero, B. Weksler, P. O. Couraud and D. Drenckhahn (2008). "Differential effects of hydrocortisone and TNFalpha on tight junction proteins in an in vitro model of the human blood-brain barrier." J Physiol **586**(7): 1937-1949.

Frydenlund, D. S., A. Bhardwaj, T. Otsuka, M. N. Mylonakou, T. Yasumura, K. G. V. Davidson, E. Zeynalov, Ø. Skare, P. Laake, F.-M. Haug, J. E. Rash, P. Agre, O. P. Ottersen and M. Amiry-Moghaddam (2006). "Temporary loss of perivascular aquaporin-4 in neocortex after transient middle cerebral artery occlusion in mice." Proceedings of the National Academy of Sciences **103**(36): 13532-13536.

Fu, Z., Y. Chen, F. Qin, S. Yang, X. Deng, R. Ding, L. Feng, W. Li and J. Zhu (2014). "Increased activity of Rho kinase contributes to hemoglobin-induced early disruption of the blood-brain barrier in vivo after the occurrence of intracerebral hemorrhage." International journal of clinical and experimental pathology **7**(11): 7844-7853.

Gao, C., H. Du, Y. Hua, R. F. Keep, J. Strahle and G. Xi (2014). "Role of red blood cell lysis and iron in hydrocephalus after intraventricular hemorrhage." J Cereb Blood Flow Metab **34**(6): 1070-1075.

Garton, T., R. F. Keep, D. A. Wilkinson, J. M. Strahle, Y. Hua, H. J. L. Garton and G. Xi (2016). "Intraventricular Hemorrhage: the Role of Blood Components in Secondary Injury and Hydrocephalus." Translational Stroke Research **7**(6): 447-451.

Greene, C., N. Hanley and M. Campbell (2019). "Claudin-5: gatekeeper of neurological function." Fluids and Barriers of the CNS **16**(1): 3.

Greitz, D. (2007). "Paradigm shift in hydrocephalus research in legacy of Dandy's pioneering work: rationale for third ventriculostomy in communicating hydrocephalus." Childs Nerv Syst **23**(5): 487-489.

Guo, J., X. Mi, R. Zhan, M. Li, L. Wei and J. Sun (2018). "Aquaporin 4 Silencing Aggravates Hydrocephalus Induced by Injection of Autologous Blood in Rats." Med Sci Monit **24**: 4204-4212.

Haley, M. J. and C. B. Lawrence (2017). "The blood–brain barrier after stroke: Structural studies and the role of transcytotic vesicles." Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism **37**(2): 456-470.

Hambleton, G. and J. S. Wigglesworth (1976). "Origin of intraventricular haemorrhage in the preterm infant." Archives of disease in childhood **51**(9): 651-659.

Hamilton, N. B., D. Attwell and C. N. Hall (2010). "Pericyte-mediated regulation of capillary diameter: a component of neurovascular coupling in health and disease." Front Neuroenergetics **2**.

Hao, X.-D., C.-S. Le, H.-M. Zhang, D.-S. Shang, L.-S. Tong and F. Gao "Thrombin disrupts vascular endothelial-cadherin and leads to hydrocephalus via protease-activated receptors-1 pathway." CNS Neuroscience & Therapeutics **0**(0).

Hill, A., G. D. Shackelford and J. J. Volpe (1984). "A potential mechanism of pathogenesis for early posthemorrhagic hydrocephalus in the premature newborn." Pediatrics **73**(1): 19-21.

Iliff, J. J., M. Wang, Y. Liao, B. A. Plogg, W. Peng, G. A. Gundersen, H. Benveniste, G. E. Vates, R. Deane, S. A. Goldman, E. A. Nagelhus and M. Nedergaard (2012). "A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid beta." *Sci Transl Med* **4**(147): 147ra111.

Karimy, J. K., J. Zhang, D. B. Kurland, B. C. Theriault, D. Duran, J. A. Stokum, C. G. Furey, X. Zhou, M. S. Mansuri, J. Montejo, A. Vera, M. L. DiLuna, E. Delpire, S. L. Alper, M. Gunel, V. Gerzanich, R. Medzhitov, J. M. Simard and K. T. Kahle (2017). "Inflammation-dependent cerebrospinal fluid hypersecretion by the choroid plexus epithelium in posthemorrhagic hydrocephalus." *Nat Med* **23**(8): 997-1003.

Ke, C., W. S. Poon, H. K. Ng, J. C.-S. Pang and Y. Chan (2001). "Heterogeneous responses of aquaporin-4 in oedema formation in a replicated severe traumatic brain injury model in rats." *Neuroscience Letters* **301**(1): 21-24.

Klinger, G., M. Osovsky, V. Boyko, N. Sokolover, L. Sirota, L. Lerner-Geva and B. Reichman (2016). "Risk factors associated with post-hemorrhagic hydrocephalus among very low birth weight infants of 24-28 weeks gestation." *J Perinatol* **36**(7): 557-563.

Kniesel, U., W. Risau and H. Wolburg (1996). "Development of blood-brain barrier tight junctions in the rat cortex." *Brain Res Dev Brain Res* **96**(1-2): 229-240.

Knowland, D., A. Arac, K. J. Sekiguchi, M. Hsu, S. E. Lutz, J. Perrino, G. K. Steinberg, B. A. Barres, A. Nimmerjahn and D. Agalliu (2014). "Stepwise recruitment of transcellular and paracellular pathways underlies blood-brain barrier breakdown in stroke." *Neuron* **82**(3): 603-617.

Kondo, N., M. Ogawa, H. Wada and S.-I. Nishikawa (2009). "Thrombin induces rapid disassembly of claudin-5 from the tight junction of endothelial cells." *Experimental Cell Research* **315**(17): 2879-2887.

Kostulas, V. K., H. Link and A. K. Lefvert (1987). "Oligoclonal IgG bands in cerebrospinal fluid. Principles for demonstration and interpretation based on findings in 1114 neurological patients." *Arch Neurol* **44**(10): 1041-1044.

Krenzlin, H., E. Gresser, D. Jussen, N. Riede, L. Taylor, C. F. Vogelaar, F. Ringel, O. Kempfski and B. Alessandri (2020). "The Cerebral Thrombin System Is Activated after Intracerebral Hemorrhage and Contributes to Secondary Lesion Growth and Poor Neurological Outcome in C57Bl/6 Mice." *J Neurotrauma*.

Lee, H. B. and M. D. Blafox (1985). "Blood volume in the rat." *J Nucl Med* **26**(1): 72-76.

Lee, K. R., N. Kawai, S. Kim, O. Sagher and J. T. Hoff (1997). "Mechanisms of edema formation after intracerebral hemorrhage: effects of thrombin on cerebral blood flow, blood-brain barrier permeability, and cell survival in a rat model." **86**(2): 272.

Leistner, C. (2020). "Posthämorrhagischer Hydrozephalus bei Frühgeborenen: Aufbau eines experimentellen Tiermodells und zeitliche Entwicklung des neuronalen und axonalen Schadens und Hydrozephalus nach intraventrikulärer Injektion von Blut bei neugeborenen Ratten."

Liu, D. Z., B. P. Ander, H. Xu, Y. Shen, P. Kaur, W. Deng and F. R. Sharp (2010). "Blood-brain barrier breakdown and repair by Src after thrombin-induced injury." *Ann Neurol* **67**(4): 526-533.

Loberg, E. M., B. R. Karlsson and A. Torvik (1993). "Neuronal uptake of plasma proteins after transient cerebral ischemia/hypoxia. Immunohistochemical studies on experimental animals and human brains." *Apmis* **101**(10): 777-783.

Lu, H., Q. Wang, J. Lu, Q. Zhang and P. Kumar (2016). "Risk Factors for Intraventricular Hemorrhage in Preterm Infants Born at 34 Weeks of Gestation or Less Following Preterm Premature Rupture of Membranes." *J Stroke Cerebrovasc Dis* **25**(4): 807-812.

Mao, X., T. L. Enno and M. R. Del Bigio (2006). "Aquaporin 4 changes in rat brain with severe hydrocephalus." *Eur J Neurosci* **23**(11): 2929-2936.

Mazzola, C. A., A. F. Choudhri, K. I. Auguste, D. D. Limbrick, M. Rogido, L. Mitchell and A. M. Flannery (2014). "Pediatric hydrocephalus: systematic literature review and evidence-based guidelines. Part 2: Management of posthemorrhagic hydrocephalus in premature infants." **14**(Supplement_1): 8.

McAllister, J. P. (2012). "Pathophysiology of congenital and neonatal hydrocephalus." *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* **17**(5): 285-294.

McCrea, H. J. and L. R. Ment (2008). "The diagnosis, management, and postnatal prevention of intraventricular hemorrhage in the preterm neonate." Clin Perinatol **35**(4): 777-792, vii.

Nag, S., R. Venugopalan and D. J. Stewart (2007). "Increased caveolin-1 expression precedes decreased expression of occludin and claudin-5 during blood-brain barrier breakdown." Acta Neuropathologica **114**(5): 459-469.

Nielsen, S., B. L. Smith, E. I. Christensen and P. Agre (1993). "Distribution of the aquaporin CHIP in secretory and resorptive epithelia and capillary endothelia." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(15): 7275-7279.

Nitta, T., M. Hata, S. Gotoh, Y. Seo, H. Sasaki, N. Hashimoto, M. Furuse and S. Tsukita (2003). "Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice." J Cell Biol **161**(3): 653-660.

Ohtsuki, S., H. Yamaguchi, Y. Katsukura, T. Asashima and T. Terasaki (2008). "mRNA expression levels of tight junction protein genes in mouse brain capillary endothelial cells highly purified by magnetic cell sorting." J Neurochem **104**(1): 147-154.

Papadopoulos, M. C. and A. S. Verkman (2008). "Potential utility of aquaporin modulators for therapy of brain disorders." Prog Brain Res **170**: 589-601.

Papaiconomou, C., R. Bozanovic-Sosic, A. Zakharov and M. Johnston (2002). "Does neonatal cerebrospinal fluid absorption occur via arachnoid projections or extracranial lymphatics?" Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **283**(4): R869-876.

Reiber, H., S. Ungefehr and C. Jacobi (1998). "The intrathecal, polyspecific and oligoclonal immune response in multiple sclerosis." Mult Scler **4**(3): 111-117.

Riva-Cambrin, J., J. R. Kestle, R. Holubkov, J. Butler, A. V. Kulkarni, J. Drake, W. E. Whitehead, J. C. Wellons, 3rd, C. N. Shannon, M. S. Tamber, D. D. Limbrick, Jr., C. Rozzelle, S. R. Browd and T. D. Simon (2016). "Risk factors for shunt malfunction in pediatric hydrocephalus: a multicenter prospective cohort study." J Neurosurg Pediatr **17**(4): 382-390.

Romijn, H. J., M. A. Hofman and A. Gramsbergen (1991). "At what age is the developing cerebral cortex of the rat comparable to that of the full-term newborn human baby?" Early Hum Dev **26**(1): 61-67.

Rosenberg, G. A. (2009). "Matrix metalloproteinases and their multiple roles in neurodegenerative diseases." Lancet Neurol **8**(2): 205-216.

Rousset, M.-C., M. D. Miceli, A. Lebrun, M. Lerner-Natoli, V. Rigau, A. Crespel, P. Coubes, Z. Michalak and D. C. Henshall (2012). "IgG Leakage May Contribute to Neuronal Dysfunction in Drug-Refractory Epilepsies With Blood-Brain Barrier Disruption." Journal of Neuropathology & Experimental Neurology **71**(9): 826-838.

Schurr, P. H., R. L. McLaurin and F. D. Ingraham (1953). "Experimental studies on the circulation of the cerebrospinal fluid and methods of producing communicating hydrocephalus in the dog." J Neurosurg **10**(5): 515-525.

Shindo, A., T. Maki, E. T. Mandeville, A. C. Liang, N. Egawa, K. Itoh, N. Itoh, M. Borlongan, J. C. Holder, T. T. Chuang, J. D. McNeish, H. Tomimoto, J. Lok, E. H. Lo and K. Arai (2016). "Astrocyte-Derived Pentraxin 3 Supports Blood-Brain Barrier Integrity Under Acute Phase of Stroke." Stroke **47**(4): 1094-1100.

Skultetyova, I., D. I. Tokarev and D. Jezova (1993). "Albumin content in the developing rat brain in relation to the blood-brain barrier." Endocr Regul **27**(4): 209-213.

Stamatovic, S. M., A. M. Johnson, N. Sladojevic, R. F. Keep and A. V. Andjelkovic (2017). "Endocytosis of tight junction proteins and the regulation of degradation and recycling." Annals of the New York Academy of Sciences **1397**(1): 54-65.

Strahle, J., H. J. L. Garton, C. O. Maher, K. M. Muraszko, R. F. Keep and G. Xi (2012). "Mechanisms of Hydrocephalus After Neonatal and Adult Intraventricular Hemorrhage." Translational Stroke Research **3**(1): 25-38.

Sweeney, M. D., Z. Zhao, A. Montagne, A. R. Nelson and B. V. Zlokovic (2019). "Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back." Physiological Reviews **99**(1): 21-78.

Taylor, S. C. and A. Posch (2014). "The design of a quantitative western blot experiment." Biomed Res Int **2014**: 361590.

Torlakovic, E. E., C. C. Cheung, C. D'Arrigo, M. Dietel, G. D. Francis, C. B. Gilks, J. A. Hall, J. L. Hornick, M. Ibrahim, A. Marchetti, K. Miller, J. H. van Krieken, S. Nielsen, P. E. Swanson, M. Vyberg, X. Zhou and C. R. Taylor (2017). "Evolution of Quality Assurance for Clinical Immunohistochemistry in the Era of Precision Medicine - Part 2: Immunohistochemistry Test Performance Characteristics." Appl Immunohistochem Mol Morphol **25**(2): 79-85.

Tourdias, T., I. Dragonu, Y. Fushimi, M. S. Deloire, C. Boiziau, B. Brochet, C. Moonen, K. G. Petry and V. Dousset (2009). "Aquaporin 4 correlates with apparent diffusion coefficient and hydrocephalus severity in the rat brain: a combined MRI-histological study." Neuroimage **47**(2): 659-666.

Tourdias, T., N. Mori, I. Dragonu, N. Cassagno, C. Boiziau, J. Aussudre, B. Brochet, C. Moonen, K. G. Petry and V. Dousset (2011). "Differential aquaporin 4 expression during edema build-up and resolution phases of brain inflammation." J Neuroinflammation **8**: 143.

Tsai, P. S., J. P. Kaufhold, P. Blinder, B. Friedman, P. J. Drew, H. J. Karten, P. D. Lyden and D. Kleinfeld (2009). "Correlations of neuronal and microvascular densities in murine cortex revealed by direct counting and colocalization of nuclei and vessels." J Neurosci **29**(46): 14553-14570.

Tsukita, S., M. Furuse and M. Itoh (2001). "Multifunctional strands in tight junctions." Nature Reviews Molecular Cell Biology **2**: 285.

Tucker, A. M., K. Aquilina, E. Chakkarapani, C. E. Hobbs and M. Thoresen (2009). "Development of amplitude-integrated electroencephalography and interburst interval in the rat." Pediatr Res **65**(1): 62-66.

Wen, H., E. A. Nagelhus, M. Amiry-Moghaddam, P. Agre, O. P. Ottersen and S. Nielsen (1999). "Ontogeny of water transport in rat brain: postnatal expression of the aquaporin-4 water channel." European Journal of Neuroscience **11**(3): 935-945.

Whelihan, M. F., V. Zachary, T. Orfeo and K. G. Mann (2012). "Prothrombin activation in blood coagulation: the erythrocyte contribution to thrombin generation." Blood **120**(18): 3837-3845.

Whitelaw, A. (2001). "Intraventricular haemorrhage and posthaemorrhagic hydrocephalus: pathogenesis, prevention and future interventions." Semin Neonatol **6**(2): 135-146.

Wocheslander, D. (2020). "Post-hämorrhagischer Hydrozephalus bei Frühgeborenen: Einfluss der Inflamationsreaktion über die Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten und der Expression von High Mobility Group Box-1 und Tumornekrosefaktor- α auf die Entwicklung eines PHH im Rattenmodell."

Yang, Y., E. Y. Estrada, J. F. Thompson, W. Liu and G. A. Rosenberg (2007). "Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat." J Cereb Blood Flow Metab **27**(4): 697-709.

Zheng, H., C. Chen, J. Zhang and Z. Hu (2016). "Mechanism and Therapy of Brain Edema after Intracerebral Hemorrhage." Cerebrovasc Dis **42**(3-4): 155-169.

Zhou, H.-J., T. Tang, H.-J. Cui, A.-L. Yang, J.-K. Luo, Y. Lin, Q.-D. Yang and X.-Q. Li (2012). "Thrombin-triggered angiogenesis in rat brains following experimental intracerebral hemorrhage." **117**(5): 920.

Zlokovic, B. V. (2008). "The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders." Neuron **57**(2): 178-201.

9 Anhang

9.1 Materialien

9.1.1 Pharmaka/Chemikalien

- Isofluran: Forene®, Abott, Wiesbaden
- Medetomidinhydrochlorid: Dorbene vet Zoetis Deutschland GmbH, Berlin
- Midazolam: Hameln Pharma Plus GmbH, Hameln
- Natriumchloridlösung: B. Braun Melsungen AG, Deutschland
- Xylocainspray: Aspen Germany GmbH Bad Oldesloe
- Paraformaldehyd: 40g/L Paraformaldehyd Nr. 0335.3 Carl Roth GmbH
Karlsruhe (40g/l, Paraformaldehyd 15,7g/l
Dinatriumhydrogenphosphat, 3,8g/l
Natriumdihydrogenphosphat auf 1. Aqua dest.)
- Saccharose-Lösung: D+Sacchrose Roth Art.-Nr. 9286.2
- Isopentan: 2-Methylbutan Carl Roth GmbH Art.-Nr. 3927.1

9.1.2 Verbrauchsmaterialien

- Kanüle: Sterican® G20; B. Braun Melsungen AG,
Deutschland
Sterican® G23; B. Braun Melsungen AG,
Deutschland
Sterican® G26; B. Braun Melsungen AG,
Deutschland
- Spritze: Injekt®-F, 1 ml, B. Braun Melsungen AG,
Deutschland
Injekt®-Solo, 2 ml, B. Braun Melsungen AG,
Deutschland
Injekt®-Solo, 5 ml, B. Braun Melsungen AG,
Deutschland
- Infusionsbesteck: Intrafix® SafeSet, B. Braun Melsungen AG,
Deutschland
- Dreiwegehahn: Discofix-3, B.Braun, Melsungen
- Hautfaden: 3,0 Prolene, Ethicon GmbH, Norderstedt
- Gewebekleber: Histoacryl®, B. Braun, Surgical S.A., Spanien

- Augensalbe: Bepanthen® Augencreme, Bayer, Leverkusen
- Polyethylenschläuche: 0,4 mm Innendurchmesser; Smiths Medical Deutschland GmbH, Grasbrunn
- Einbettmedium: Cryo-Gel, Leica Biosystems, Richmond, IL - USA
- Objektträger: Diagonal, Münster
- Hydrophober Stift: Dako-Pen S2002, Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
- Coverslips: ApopTag® Plastic Coverslips, Millipore, Merck™ S7117
- Eppendorfggefäß: Safeseal Reagiergefäß 2ml, PP, Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
- Tierfutter: Standard Diätfutter, Altromin Gesellschaft für Tierernährung mbH, Lage

9.1.3 Chirurgisches Instrumentarium

- Präparationsschere: Aesculap, Tuttlingen
- Skalpell: Cutfix®, B.Braun, Melsungen
- Nadelhalter: Aesculap, Tuttlingen
- Pinzette chirurgisch: Aesculap, Tuttlingen
- Pinzette anatomisch: Aesculap, Tuttlingen
- Mikropinzette gebogen: Aesculap, Tuttlingen
- Dissektor: Aesculap, Tuttlingen

9.1.4 Geräte und Software

- Stereotaktischer Rahmen: 430005-GR-GP-K, TSE-Systems, Bad Homburg
- Operationsmikroskop: OPMI 1-FC, Carl Zeiss, Jena
- Bohrer: Microtron 60, Aesculap, Tuttlingen
- Bohrerhandstück: GD604, Aesculap Tuttlingen
- Wärmematte: Homeothermic Blanket Control Unit; Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten
- Rasierer: Favorita II, GT104/GH204, Aesculap, Tuttlingen
- Narkosegasmonitor: Artema MM206C, Heyer, Bad Ems
- Mikroinjektionspumpe: Syringe Pump TSE Systems GmbH, Bad Homburg
- Lichtmikroskop: Axioskop 2 Plus, Zeiss, Oberkochen

- Waage: Scaltec SPO61, Labotec, Wiesbaden
- MRT: Simens Magnetom Prisma (3T), Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland
- Kryostat: Leica CM1850 UV
- Objektträgerscanner: NanoZoomer, Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu City, Japan
- Bildbearbeitungssoftware: NDP.View 2.5.19, Copyright Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu City, Japan
- Bildanalysesoftware: Image J 1.51k, National Institute of Health, USA
- Tabellenkalkulationssoftware: Microsoft Excel 2016
- Statistiksoftware: Sigmaplot 11.0

9.1.5 Histologie

- Primärantikörper:
 1. Claudin-5 Antibody, Maus (4C3C2), Cat-Nr. 35-2500 Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
 2. Anti-Aquaporin 4 Antibody, Maus, [4/18] ab9512, Abcam, Cambridge, England
 3. Biotnylated Anti-Rat-IgG, Ziege, Cat-Nr: BA-9400, Vector Laboratories, Petersborough, UK
- Sekundärantikörper: Vectastain Elite ABC KIT Mouse IgG, Cat-Nr: PK-6102, Vector Laboratories, Petersborough, UK
- Normal Horse Serum: Normal Horse Serum Blocking Solution, Vector Laboratories, Petersborough, UK; Cat-Nr. S-2000
- Avidin-Biotin-Complex: VECTASTAIN® ABC Kit (Avidin-Biotin-Complex) PK-6100, Vector Laboratories, Petersborough, UK
- DAB: DAB Peroxidase Substrate, Cat-Nr. SK-4100, Vector Laboratories, Petersborough, UK
- Wasserstoffperoxid: 35%, Merck AG, Darmstadt, Deutschland
- Methanol: Methanol zur Analyse, AppliChem GmbH, Darmstadt
- Citratlösung: C-7254, Sigma-Aldrich, Missouri, USA
- PBS: Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline, Gibco®, Maryland, USA
- Triton: Triton X-100, Merck AG, Darmstadt, Deutschland

- Destilliertes Wasser:

B. Braun Melsungen AG, Deutschland

9.2 Färbeprotokolle Immunhistochemie

9.2.1 Claudin-5 und Aquaporin-4

Ausgangsmaterial: 5µm dicke Kryoschnitte.

- | | |
|--|------------|
| 1. Auftauen der Kryoschnitte auf der Streckplatte (~35 °C) | 10 Min. |
| 2. In Citratpuffer im Dampfgerar demaskieren | 20 Min. |
| 3. Abkühlen lassen | 30 Min. |
| 4. Kurz in PBS spülen | max.1 Min. |
| 5. Blocken der endogenen Peroxidase in
100ml Methanol + 100ml PBS + 2ml H ₂ O ₂ (35%) | 20 min |
| 6. Waschen in PBS | 5 Min. |
| 7. Waschen in PBST | 5 Min. |
| 8. Inkubieren mit 5% Normal Mouse Serum | 30 Min. |
| 9. Inkubieren des Primären-Antikörpers bei 4°C
in der feuchten Kammer | über Nacht |
| 10. Waschen in PBST | 2 x 5 Min. |
| 11. Inkubieren des sekundären Antikörpers | 30 Min. |
| 12. Waschen in PBST | 2 x 5 Min. |
| 13. Inkubieren des AB-Komplex | 30 Min. |
| 14. Waschen in PBST | 5 Min. |
| 15. Waschen in PBS | 5 Min. |
| 16. Färben mit DAB | 2 Min. |
| 17. Waschen in PBS | 5 Min. |
| 18. Aufsteigende Alkoholreihe | |
| 19. Xylol | ≥5 Min. |
| 20. Eindecken | |

9.2.2 IgG

Ausgangsmaterial: 5µm dicke Kryoschnitte.

- | | |
|--|---------|
| 1. Auftauen der Kryoschnitte auf der Streckplatte (~35 °C) | 10 Min. |
| 2. Waschen in PBS | 5 Min. |
| 3. Blocken der endogenen Peroxidase mit 3%igem H ₂ O ₂ | 3 Min. |
| 4. Waschen in PBS | 5 Min. |
| 5. Inkubieren des Antikörpers gegen Ratten-IgG (1:500) | 90 Min. |
| 6. Waschen in PBS | 5 Min. |
| 7. Inkubieren des AB-Komplex | 30 Min. |
| 8. Waschen in PBS | 5 Min. |
| 9. Färben mit DAB | 2 Min. |
| 10. Waschen in PBS | 5 Min. |
| 11. Aufsteigende Alkoholreihe | |
| 12. Xylol | ≥5 Min. |
| 13. Eindeckeln | |

9.2.3 Ansätze

Citratpuffer: 2,94g Zitronensäure auf 1 Liter Aqua Dest, pH 6,0;
eingestellt mit HCl

DAB: 5ml Aqua Dest
2 Tropfen Buffer Stock Solution
4 Tropfen DAB Stock Solution
2 Tropfen Hydrogen Peroxide Solution

AB-Komplex: 2,5ml PBS
1 Tropfen A
1 Tropfen B
Mindestens 30 Minuten vor Gebrauch ansetzen!

Sekundärer Antikörper: 10ml PBS
3 Tropfen Normal-Mouse-Serum
1 Tropfen Sekundär-Antikörper

Primäre Antikörper: Claudin-5 1:500
Aquaporin-4 1:100
IgG 1:500
Zur Verdünnung wurde PBS verwendet.

PBST: 2ml Triton
1l PBS

9.3 Tabellen zum Vergleich der linken und rechten Hemisphäre

9.3.1 Claudin-5

Tabelle 3: Vergleich der IRF der linken und rechten Hemisphäre mittels T-Test/Mann-Whitney-U-Test, Claudin-5, PT1

	Blut-Gruppe	NaCl-Gruppe	Sham-Gruppe
Cingulärer Kortex			
ROI 1	P = 0,225	P = 0,234	P = 0,476
ROI 2	P = 0,289	P = 0,868	P = 0,743
ROI 3	P = 0,510	P = 0,955	P = 0,828
ROI 4	P = 0,042*	P = 0,570	P = 0,274
ROI 5	P = 0,127	P = 0,908	P = 0,235
Motorischer Kortex			
ROI 1	P = 0,185	P = 0,279	P = 0,320
ROI 2	P = 0,710	P = 0,798	P = 0,367
ROI 3	P = 0,007*	P = 0,798	P = 0,705
ROI 4	P = 0,571	P = 1,000	P = 0,209
Somatosensorischer Kortex			
ROI 1	P = 0,845	P = 0,281	P = 0,615
ROI 2	P = 0,614	P = 0,867	P = 0,943
ROI 3	P = 0,475	P = 0,397	P = 0,973
ROI 4	P = 0,097	P = 0,950	P = 0,470
ROI 5		P = 1,000	P = 0,517
Striatum			
ROI 1	P = 0,294	P = 0,065	P = 0,226
ROI 2	P = 0,838	P = 0,959	P = 0,736
ROI 3	P = 0,913	P = 0,645	P = 0,654
ROI 4	P = 0,712	P = 0,798	P = 0,328
ROI 5	P = 0,049*	P = 0,279	P = 0,218
ROI 6	P = 0,809	P = 0,161	P = 0,439
ROI 7	P = 0,791	P = 0,382	P = 0,806
ROI 8	P = 0,536	P = 0,328	P = 0,665
ROI 9	P = 0,027*	P = 0,290	P = 0,651
Laterales Septum			
ROI 1	P = 0,791	P = 0,597	P = 0,276
ROI 2	P = 0,730	P = 0,279	P = 0,513
ROI 3	P = 0,927	P = 0,403	P = 0,448

* Signifikanz bei $P < 0,05$

Tabelle 4: Vergleich der IRF der linken und rechten Hemisphäre mittels T-Test/Mann-Whitney-U-Test, Claudin-5, PT3

	Blut-Gruppe	NaCl-Gruppe	Sham-Gruppe
Cingulärer Kortex			
ROI 1	P = 0,854	P = 0,878	P = 0,009*
ROI 2	P = 0,729	P = 0,819	P = 0,659
ROI 3	P = 0,727	P = 0,962	P = 0,286
ROI 4	P = 0,731	P = 0,816	P = 0,289
ROI 5	P = 0,465	P = 0,367	P = 0,290
Motorischer Kortex			
ROI 1	P = 0,244	P = 0,878	P = 0,064
ROI 2	P = 0,034*	P = 0,239	P = 0,801
ROI 3	P = 0,160	P = 0,516	P = 0,468
ROI 4	P = 0,388	P = 0,814	P = 0,333
Somatosensorischer Kortex			
ROI 1	P = 0,574	P = 0,603	P = 0,167
ROI 2	P = 0,025*	P = 0,594	P = 0,453
ROI 3	P = 0,798	P = 0,488	P = 0,546
ROI 4	P = 0,109	P = 0,718	P = 0,504
ROI 5	P = 0,867	P = 0,671	P = 0,463
Striatum			
ROI 1	P = 0,798	P = 0,877	P = 0,112
ROI 2	P = 0,110	P = 0,105	P = 0,879
ROI 3	P = 0,379	P = 0,848	P = 0,289
ROI 4	P = 0,154	P = 0,694	P = 0,864
ROI 5	P = 0,064	P = 0,429	P = 0,547
ROI 6	P = 0,460	P = 0,955	P = 0,719
ROI 7	P = 0,227	P = 0,787	P = 0,905
ROI 8	P = 0,186	P = 0,062	P = 0,866
ROI 9	P = 0,237	P = 0,183	P = 0,410
Laterales Septum			
ROI 1	P = 0,906	P = 0,246	P = 0,975
ROI 2	P = 0,122	P = 0,913	P = 0,093
ROI 3	P = 0,333	P = 0,990	P = 0,784

* Signifikanz bei $P < 0,05$

Tabelle 5: Vergleich der IRF der linken und rechten Hemisphäre mittels T-Test/Mann-Whitney-U-Test, Claudin-5, PT7

	Blut-Gruppe	NaCl-Gruppe	Sham-Gruppe
Cingulärer Kortex			
ROI 1	P = 0,070	P = 0,777	P = 0,273
ROI 2	P = 0,775	P = 0,704	P = 0,015*
ROI 3	P = 0,574	P = 0,722	P = 0,886
ROI 4	P = 0,912	P = 0,749	P = 0,780
ROI 5	P = 0,936	P = 0,047*	P = 0,947
Motorischer Kortex			
ROI 1	P = 0,415	P = 0,547	P = 0,878
ROI 2	P = 0,981	P = 0,321	P = 0,162
ROI 3	P = 0,370	P = 0,165	P = 0,800
ROI 4	P = 0,705	P = 0,279	P = 0,634
Somatosensorischer Kortex			
ROI 1	P = 0,234	P = 0,844	P = 0,279
ROI 2	P = 0,946	P = 0,507	P = 0,996
ROI 3	P = 0,328	P = 0,702	P = 0,088
ROI 4	P = 0,752	P = 0,498	P = 0,405
ROI 5	P = 0,836	P = 0,533	P = 0,464
Striatum			
ROI 1	P = 0,286	P = 0,073	P = 0,070
ROI 2	P = 0,089	P = 0,698	P = 0,073
ROI 3	P = 0,674	P = 0,798	P = 0,499
ROI 4	P = 0,263	P = 0,279	P = 0,437
ROI 5	P = 0,505	P = 0,439	P = 0,179
ROI 6	P = 0,825	P = 0,246	P = 0,425
ROI 7	P = 0,568	P = 0,105	P = 0,697
ROI 8	P = 0,136	P = 0,328	P = 0,505
ROI 9	P = 0,488	P = 0,507	P = 0,431
Laterales Septum			
ROI 1	P = 0,382	P = 0,382	P = 0,645
ROI 2	P = 0,918	P = 0,266	P = 0,698
ROI 3	P = 0,279	P = 0,956	P = 0,050

* Signifikanz bei $P < 0,05$

Tabelle 6: Vergleich der IRF der linken und rechten Hemisphäre mittels T-Test/Mann-Whitney-U-Test, Claudin-5 PT21

	Blut-Gruppe	NaCl-Gruppe	Sham-Gruppe
Cingulärer Kortex			
ROI 1	P = 0,713	P = 0,721	P = 0,860
ROI 2	P = 0,536	P = 0,843	P = 0,724
ROI 3	P = 0,860	P = 0,321	P = 0,597
ROI 4	P = 0,875	P = 0,809	P = 0,273
ROI 5	P = 0,931	P = 0,409	P = 0,887
Motorischer Kortex			
ROI 1	P = 0,775	P = 0,379	P = 0,168
ROI 2	P = 0,863	P = 0,539	P = 0,360
ROI 3	P = 0,498	P = 0,330	P = 0,621
ROI 4	P = 0,543	P = 0,499	P = 0,960
Somatosensorischer Kortex			
ROI 1	P = 0,768	P = 0,034*	P = 0,378
ROI 2	P = 0,305	P = 0,030*	P = 0,507
ROI 3	P = 0,421	P = 0,011*	P = 0,877
ROI 4	P = 0,662	P = 0,020*	P = 1,000
Striatum			
ROI 1	P = 0,382	P = 0,133	P = 0,983
ROI 2	P = 0,273	P = 0,898	P = 0,797
ROI 3	P = 0,382	P = 0,108	P = 0,324
ROI 4	P = 0,096	P = 0,455	P = 0,360
ROI 5	P = 0,562	P = 0,159	P = 0,816
ROI 6	P = 0,534	P = 0,926	P = 0,441
ROI 7	P = 0,052	P = 0,609	P = 0,392
ROI 8	P = 0,579	P = 0,684	P = 0,454
ROI 9	P = 0,316	P = 0,334	P = 0,531
Laterales Septum			
ROI 1	P = 0,260	P = 0,749	P = 0,063
ROI 2	P = 0,601	P = 0,361	P = 0,597
ROI 3	P = 0,432	P = 0,627	P = 0,933

* Signifikanz bei $P < 0,05$

9.3.2 IgG

Tabelle 7: Vergleich der IRF der linken und rechten Hemisphäre mittels T-Test/Mann-Whitney-U-Test, IgG, PT1

	Blut-Gruppe	NaCl-Gruppe	Sham-Gruppe
Cingulärer Kortex			
ROI 1	P = 0,724	P = 0,568	P = 0,479
ROI 2	P = 0,772	P = 0,392	P = 0,300
ROI 3	P = 0,986	P = 0,959	P = 0,357
ROI 4	P = 0,917	P = 1,000	P = 0,809
ROI 5		P = 0,755	P = 0,842
Motorischer Kortex			
ROI 1	P = 0,791	P = 0,798	P = 0,813
ROI 2	P = 0,377	P = 0,505	P = 0,710
ROI 3	P = 0,860	P = 0,574	P = 1,000
ROI 4	P = 0,736	P = 0,535	P = 0,836
ROI 5		P = 0,323	
Somatosensorischer Kortex			
ROI 1	P = 0,724	P = 0,959	P = 0,445
ROI 2	P = 0,052	P = 0,442	P = 0,445
ROI 3	P = 0,146	P = 0,878	P = 0,533
ROI 4	P = 0,441	P = 0,755	P = 0,794
ROI 5		P = 0,570	P = 0,349
Striatum			
ROI 1	P = 0,965	P = 0,645	P = 0,279
ROI 2	P = 0,965	P = 0,279	P = 0,383
ROI 3	P = 0,860	P = 0,878	P = 1,000
ROI 4	P = 0,681	P = 0,574	P = 0,478
ROI 5	P = 0,859	P = 0,195	P = 0,731
ROI 6	P = 1,000	P = 0,328	P = 0,710
ROI 7	P = 0,612	P = 0,247	P = 0,821
ROI 8	P = 0,965	P = 0,959	P = 0,620
ROI 9	P = 0,962	P = 0,959	P = 1,000
Laterales Septum			
ROI 1	P = 0,453	P = 0,955	P = 0,882
ROI 2	P = 0,627	P = 0,867	P = 0,620
ROI 3	P = 1,000	P = 0,955	P = 0,259

* Signifikanz bei $P < 0,05$

Tabelle 8: Vergleich der IRF der linken und rechten Hemisphäre mittels T-Test/Mann-Whitney-U-Test, IgG, PT3

	Blut-Gruppe	NaCl-Gruppe	Sham-Gruppe
Cingulärer Kortex			
ROI 1	P = 0,798	P = 0,645	P = 0,710
ROI 2	P = 0,798	P = 0,645	P = 0,677
ROI 3	P = 0,878	P = 0,574	P = 0,605
ROI 4	P = 0,902	P = 0,867	P = 0,344
ROI 5	P = 0,667	P = 0,231	P = 0,285
Motorischer Kortex			
ROI 1	P = 0,959	P = 0,175	P = 0,165
ROI 2	P = 0,574	P = 0,406	P = 0,620
ROI 3	P = 0,505	P = 0,574	P = 0,535
ROI 4	P = 0,381	P = 0,055	P = 0,209
ROI 5	P = 0,647	P = 0,381	
Somatosensorischer Kortex			
ROI 1	P = 0,798	P = 0,617	P = 0,710
ROI 2	P = 0,645	P = 0,526	P = 0,973
ROI 3	P = 0,331	P = 0,279	P = 0,582
ROI 4	P = 0,334	P = 0,441	P = 0,645
ROI 5	P = 0,910	P = 0,622	P = 0,333
Striatum			
ROI 1	P = 0,798	P = 0,085	P = 0,456
ROI 2	P = 1,000	P = 0,279	P = 0,710
ROI 3	P = 0,645	P = 0,328	P = 0,868
ROI 4	P = 0,798	P = 0,161	P = 0,472
ROI 5	P = 0,959	P = 0,195	P = 0,318
ROI 6	P = 0,798	P = 0,108	P = 0,805
ROI 7	P = 0,258	P = 0,279	P = 0,902
ROI 8	P = 0,721	P = 0,295	P = 0,620
ROI 9	P = 0,382	P = 1,000	P = 0,805
Laterales Septum			
ROI 1	P = 0,442	P = 0,442	P = 0,383
ROI 2	P = 0,574	P = 0,442	P = 0,535
ROI 3	P = 0,694	P = 0,878	P = 0,620

* Signifikanz bei $P < 0,05$

Tabelle 9: Vergleich der IRF der linken und rechten Hemisphäre mittels T-Test/Mann-Whitney-U-Test, IgG, PT7

	Blut-Gruppe	NaCl-Gruppe	Sham-Gruppe
Cingulärer Kortex			
ROI 1	P = 1,000	P = 0,878	P = 1,000
ROI 2	P = 1,000	P = 0,080	P = 0,328
ROI 3	P = 0,959	P = 0,023*	P = 0,959
ROI 4	P = 0,445	P = 0,165	P = 0,645
ROI 5	P = 0,229	P = 0,622	P = 0,923
Motorischer Kortex			
ROI 1	P = 0,124	P = 0,793	P = 0,798
ROI 2	P = 0,083	P = 0,392	P = 0,959
ROI 3	P = 0,505	P = 0,161	P = 0,574
ROI 4	P = 0,394	P = 0,429	P = 0,836
Somatosensorischer Kortex			
ROI 1	P = 0,574	P = 0,164	P = 0,198
ROI 2	P = 0,161	P = 0,959	P = 0,798
ROI 3	P = 0,304	P = 0,959	P = 0,959
ROI 4	P = 0,755	P = 0,328	P = 0,297
ROI 5	P = 0,381		
Striatum			
ROI 1	P = 0,090	P = 0,645	P = 1,000
ROI 2	P = 0,212	P = 0,195	P = 0,798
ROI 3	P = 0,103	P = 0,505	P = 0,959
ROI 4	P = 0,399	P = 0,594	P = 0,382
ROI 5	P = 0,279	P = 0,505	P = 0,574
ROI 6	P = 0,721	P = 0,959	P = 0,574
ROI 7	P = 0,083	P = 0,125	P = 0,959
ROI 8	P = 0,382	P = 0,382	P = 0,442
ROI 9	P = 0,234	P = 0,645	P = 0,279
Laterales Septum			
ROI 1	P = 0,878	P = 0,224	P = 0,878
ROI 2	P = 0,878	P = 0,959	P = 0,328
ROI 3	P = 0,574	P = 0,574	P = 0,645

* Signifikanz bei $P < 0,05$

Tabelle 10: Vergleich der IRF der linken und rechten Hemisphäre mittels T-Test/Mann-Whitney-U-Test, IgG, PT21

	Blut-Gruppe	NaCl-Gruppe	Sham-Gruppe
Cingulärer Kortex			
ROI 1	P = 1,000	P = 0,279	P = 0,506
ROI 2	P = 0,596	P = 0,382	P = 0,626
ROI 3	P = 0,967	P = 0,085	P = 0,685
ROI 4	P = 0,181	P = 0,029*	P = 0,247
ROI 5	P = 0,288	P = 0,383	P = 0,808
Motorischer Kortex			
ROI 1	P = 0,733	P = 0,645	P = 0,755
ROI 2	P = 0,970	P = 0,505	P = 0,858
ROI 3	P = 0,910	P = 0,878	P = 0,241
ROI 4	P = 0,931	P = 0,534	P = 0,530
Somatosensorischer Kortex			
ROI 1	P = 0,449	P = 0,161	P = 0,420
ROI 2	P = 1,000	P = 0,798	P = 0,855
ROI 3	P = 0,596	P = 0,328	P = 0,503
ROI 4	P = 0,662	P = 0,694	P = 0,955
Striatum			
ROI 1	P = 0,705	P = 0,442	P = 0,965
ROI 2	P = 0,211	P = 0,195	P = 0,353
ROI 3	P = 0,821	P = 0,878	P = 0,894
ROI 4	P = 0,384	P = 0,328	P = 0,791
ROI 5	P = 0,161	P = 0,442	P = 0,724
ROI 6	P = 1,000	P = 0,505	P = 0,426
ROI 7	P = 0,326	P = 0,382	P = 0,064
ROI 8	P = 0,406	P = 0,161	P = 0,723
ROI 9	P = 0,344	P = 0,505	P = 0,791
Laterales Septum			
ROI 1	P = 0,226	P = 0,442	P = 0,353
ROI 2	P = 1,000	P = 0,878	P = 0,401
ROI 3	P = 0,344	P = 0,382	P = 0,565

* Signifikanz bei $P < 0,05$

9.3.3 Aquaporin-4

Tabelle 11: Vergleich der IRF der linken und rechten Hemisphäre mittels T-Test/Mann-Whitney-U-Test, Aquaporin-4, PT1

	Blut-Gruppe	NaCl-Gruppe	Sham-Gruppe
Cingulärer Kortex			
ROI 1	P = 0,718	P = 0,878	P = 0,382
ROI 2	P = 0,233	P = 0,798	P = 0,721
ROI 3	P = 0,965	P = 0,574	P = 0,232
ROI 4	P = 0,773	P = 0,867	P = 0,108
ROI 5	P = 0,662	P = 0,620	P = 0,228
Motorischer Kortex			
ROI 1	P = 0,377	P = 0,463	P = 0,878
ROI 2	P = 0,508	P = 0,397	P = 0,694
ROI 3	P = 0,269	P = 0,779	P = 0,573
ROI 4	P = 0,097	P = 0,961	P = 0,777
Somatosensorischer Kortex			
ROI 1	P = 0,825	P = 0,279	P = 0,574
ROI 2	P = 0,456	P = 0,103	P = 0,959
ROI 3	P = 0,550	P = 0,382	P = 0,234
ROI 4	P = 0,314	P = 0,432	P = 0,706
ROI 5	P = 0,286	P = 0,524	P = 0,104
Striatum			
ROI 1	P = 0,092	P = 0,878	P = 0,387
ROI 2	P = 0,022*	P = 0,878	P = 0,798
ROI 3	P = 0,812	P = 0,505	P = 0,897
ROI 4	P = 0,810	P = 0,145	P = 0,606
ROI 5	P = 0,483	P = 0,382	P = 0,645
ROI 6	P = 0,691	P = 0,105	P = 0,878
ROI 7	P = 0,133	P = 0,071	P = 0,959
ROI 8	P = 0,027*	P = 0,195	P = 0,878
ROI 9	P = 0,659	P = 0,279	P = 0,645
Laterales Septum			
ROI 1	P = 0,251	P = 0,959	P = 0,878
ROI 2	P = 0,757	P = 0,878	P = 0,490
ROI 3	P = 0,930	P = 0,721	P = 0,577

* Signifikanz bei $P < 0,05$

Tabelle 12: Vergleich der IRF der linken und rechten Hemisphäre mittels T-Test/Mann-Whitney-U-Test, Aquaporin-4, PT3

	Blut-Gruppe	NaCl-Gruppe	Sham-Gruppe
Cingulärer Kortex			
ROI 1	P = 0,442	P = 0,746	P = 0,764
ROI 2	P = 0,729	P = 0,134	P = 0,539
ROI 3	P = 0,536	P = 0,798	P = 0,580
ROI 4	P = 0,432	P = 0,091	P = 0,417
ROI 5	P = 0,950	P = 0,673	P = 0,965
Motorischer Kortex			
ROI 1	P = 0,058	P = 0,046*	P = 0,179
ROI 2	P = 0,798	P = 0,840	P = 0,959
ROI 3	P = 0,798	P = 0,959	P = 0,902
ROI 4	P = 1,000	P = 0,336	P = 0,731
Somatosensorischer Kortex			
ROI 1	P = 0,505	P = 0,442	P = 0,128
ROI 2	P = 0,645	P = 0,959	P = 0,801
ROI 3	P = 0,645	P = 0,521	P = 0,073
ROI 4	P = 0,398	P = 0,553	P = 0,097
ROI 5	P = 0,325	P = 0,779	P = 0,311
Striatum			
ROI 1	P = 0,878	P = 0,505	P = 0,277
ROI 2	P = 0,721	P = 0,876	P = 0,620
ROI 3	P = 0,645	P = 0,234	P = 0,535
ROI 4	P = 0,645	P = 0,787	P = 0,073
ROI 5	P = 0,878	P = 0,254	P = 0,026*
ROI 6	P = 0,645	P = 0,645	P = 0,383
ROI 7	P = 0,878	P = 0,637	P = 0,026*
ROI 8	P = 0,721	P = 0,641	P = 0,383
ROI 9	P = 0,645	P = 0,328	P = 0,038*
Laterales Septum			
ROI 1	P = 0,505	P = 0,959	P = 0,902
ROI 2	P = 0,959	P = 0,878	P = 0,529
ROI 3	P = 0,505	P = 0,664	P = 0,209

* Signifikanz bei $P < 0,05$

Tabelle 13: Vergleich der IRF der linken und rechten Hemisphäre mittels T-Test/Mann-Whitney-U-Test, Aquaporin-4, PT7

	Blut-Gruppe	NaCl-Gruppe	Sham-Gruppe
Cingulärer Kortex			
ROI 1	P = 0,301	P = 0,056	P = 0,574
ROI 2	P = 0,495	P = 0,328	P = 0,442
ROI 3	P = 0,659	P = 0,382	P = 0,721
ROI 4	P = 0,613	P = 0,112	P = 0,798
ROI 5	P = 0,628	P = 0,068	P = 0,217
ROI 6	P = 0,782	P = 0,846	P = 0,216
Motorischer Kortex			
ROI 1	P = 0,917	P = 0,590	P = 0,645
ROI 2	P = 0,301	P = 0,771	P = 0,234
ROI 3	P = 0,397	P = 0,620	P = 0,165
ROI 4	P = 0,121	P = 0,534	P = 0,214
ROI 5	P = 0,787	P = 0,612	P = 0,113
Somatosensorischer Kortex			
ROI 1	P = 0,051	P = 0,685	P = 0,680
ROI 2	P = 0,188	P = 0,375	P = 0,710
ROI 3	P = 0,152	P = 0,152	P = 0,764
ROI 4	P = 0,094	P = 0,878	P = 0,915
ROI 5	P = 0,699	P = 0,476	
Striatum			
ROI 1	P = 0,480	P = 0,509	P = 0,505
ROI 2	P = 0,234	P = 0,342	P = 0,219
ROI 3	P = 0,174	P = 0,576	P = 0,798
ROI 4	P = 0,177	P = 0,254	P = 0,768
ROI 5	P = 0,033*	P = 0,109	P = 0,382
ROI 6	P = 0,050	P = 0,085	P = 0,574
ROI 7	P = 0,891	P = 0,393	P = 0,910
ROI 8	P = 0,130	P = 0,989	P = 0,328
ROI 9	P = 0,028*	P = 0,974	P = 0,328
Laterales Septum			
ROI 1	P = 0,721	P = 0,021*	P = 0,378
ROI 2	P = 0,382	P = 0,472	P = 0,279
ROI 3	P = 0,721	P = 0,265	P = 0,246

* Signifikanz bei $P < 0,05$

Tabelle 14: Vergleich der IRF der linken und rechten Hemisphäre mittels T-Test/Mann-Whitney-U-Test, Aquaporin-4, PT21

	Blut-Gruppe	NaCl-Gruppe	Sham-Gruppe
Cingulärer Kortex			
ROI 1	P = 0,229	P = 0,959	P = 0,962
ROI 2	P = 0,571	P = 0,798	P = 1,000
ROI 3	P = 0,807	P = 0,878	P = 0,581
ROI 4	P = 0,440	P = 0,382	P = 1,000
ROI 5	P = 0,610	P = 0,731	P = 0,455
ROI 6	P = 0,128	P = 0,445	P = 0,648
Motorischer Kortex			
ROI 1	P = 0,473	P = 0,645	P = 0,593
ROI 2	P = 0,571	P = 0,721	P = 0,607
ROI 3	P = 0,962	P = 0,959	P = 0,903
ROI 4	P = 0,627	P = 0,959	P = 0,842
Somatosensorischer Kortex			
ROI 1	P = 0,571	P = 0,959	P = 0,295
ROI 2	P = 0,140	P = 0,645	P = 0,860
ROI 3	P = 0,045*	P = 0,328	P = 0,532
ROI 4	P = 0,289	P = 0,955	P = 0,574
ROI 5			P = 0,100
Striatum			
ROI 1	P = 0,734	P = 0,721	P = 0,536
ROI 2	P = 0,623	P = 0,505	P = 0,873
ROI 3	P = 0,427	P = 0,878	P = 0,592
ROI 4	P = 0,186	P = 0,798	P = 0,724
ROI 5	P = 0,571	P = 0,878	P = 0,806
ROI 6	P = 0,520	P = 0,574	P = 0,466
ROI 7	P = 0,571	P = 0,878	P = 0,930
ROI 8	P = 0,734	P = 0,721	P = 0,795
ROI 9	P = 0,705	P = 0,959	P = 0,659
Laterales Septum			
ROI 1	P = 0,705	P = 0,959	P = 0,594
ROI 2	P = 0,970	P = 0,878	P = 0,235
ROI 3	P = 0,791	P = 0,878	P = 0,724

* Signifikanz bei $P < 0,05$

9.4 Tabellen zum ROI-Vergleich innerhalb der einzelnen Hirnstrukturen

Statistische Vergleiche erfolgten mittels One-Way-Repeated-Measures-ANOVA, bzw. Repeated-Measures-ANOVA-on-Ranks. Als Posthoc-Test wurden Student-Newman-Keuls bzw. Dunn's-Test verwendet.

9.4.1 Claudin-5

PT1

ROI-Vergleich innerhalb der Region des cingulären Kortex, Blut-Gruppe, Claudin-5, PT1
P = 0,725

ROI-Vergleich innerhalb der Region des cingulären Kortex, Blut-Gruppe, Claudin-5, PT1
P = 0,779

Tabelle 16: ROI-Vergleich innerhalb der Region des motorischen Kortex, NaCl-Gruppe, Claudin-5, PT1

	ROI 2	ROI 3	ROI 4
ROI 1	0,766	0,159	0,009*
ROI 2		0,121	0,010*
ROI 3			0,096

* Signifikanz bei $P < 0,05$

Tabelle 18: ROI-Vergleich innerhalb der Region des somatosensorischen Kortex, Blut-Gruppe, Claudin-5, PT1

	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5
			<0,001	
ROI 1	0,122	0,009*	*	<0,001*
			<0,001	
ROI 2		0,114	*	<0,001*
ROI 3			0,016*	<0,001*
ROI 4				<0,001*

* Signifikanz bei $P < 0,05$

Tabelle 20: ROI-Vergleich innerhalb der Region des somatosensorischen

	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5
ROI 1	0,429	0,070	0,003*	<0,001*
ROI 2		0,140	0,010*	0,002*
ROI 3			0,103	0,022*
ROI 4				0,167

* Signifikanz bei $P < 0,05$

ROI-Vergleich innerhalb der Region des cingulären Kortex, NaCl-Gruppe, Claudin-5, PT1
P = 0,839

Tabelle 15: ROI-Vergleich innerhalb der Region des Motorischen Kortex, Blut-Gruppe, Claudin-5, PT1

	ROI 2	ROI 3	ROI 4
ROI 1	0,307	0,143	<0,001*
ROI 2		0,366	0,002*
ROI 3			0,005*

* Signifikanz bei $P < 0,05$

Tabelle 17: ROI-Vergleich innerhalb der Region des Motorischen Kortex, Sham-Gruppe, Claudin-5, PT1

	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5
			<0,001	
ROI 1	0,106	0,046*	*	0,212
ROI 2		0,400	0,015*	0,723
ROI 3			0,056	0,890
ROI 4				0,109

* Signifikanz bei $P < 0,05$

Tabelle 19: ROI-Vergleich innerhalb der Region des somatosensorischen Kortex, NaCl-Gruppe, Claudin-5, PT1

	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5
ROI 1	0,580	0,035*	0,001*	<0,001*
ROI 2		0,047*	0,003*	<0,001*
ROI 3			0,120	0,001*
ROI 4				0,011*

* Signifikanz bei $P < 0,05$

ROI-Vergleich innerhalb der Region des Striatums, Blut-Gruppe, Claudin-5, PT1

P = 0,436

ROI-Vergleich innerhalb der Region des Striatums.
NaCl-Gruppe, Claudin-5, PT1
P = 0,432

ROI-Vergleich innerhalb der Region des lateralen
Septums Blut-Gruppe, Claudin-5, PT1
P = 0,739

ROI-Vergleich innerhalb der Region des lateralen
Septums Sham-Gruppe, Claudin-5, PT1
P = 0,430

ROI-Vergleich innerhalb der Region des Striatums.
Sham-Gruppe, Claudin-5, PT1
P = 0,325

ROI-Vergleich innerhalb der Region des lateralen
Septums NaCl-Gruppe, Claudin-5, PT1
P = 0,776

PT3

ROI-Vergleich innerhalb der Region des cingulären
Kortex, Blut-Gruppe, Claudin-5, PT3
P = 0,762

Tabelle 21: ROI-Vergleich innerhalb der Region des cingulären
Kortex, Sham-Gruppe, Claudin-5, PT3

	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5
ROI 1	0,503	0,610	0,402	0,106
ROI 2		0,783	0,640	0,064
ROI 3			0,534	0,061
ROI 4				0,021*

* Signifikanz bei $P < 0,05$

Tabelle 23: ROI-Vergleich innerhalb der Region des motorischen
Kortex, NaCl-Gruppe, Claudin-5, PT3

	ROI 2	ROI 3	ROI 4
ROI 1	>0,05	>0,05	<0,05*
ROI 2		>0,05	<0,05*
ROI 3			<0,05*

* Signifikanz bei $P < 0,05$

Tabelle 25: ROI-Vergleich innerhalb der Region des
somatosensorischen Kortex, Blut-Gruppe, Claudin-5, PT3

	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5
ROI 1	0,771	0,745	0,111	0,002*
ROI 2		0,809	0,104	0,002*
ROI 3			0,090	0,002*
ROI 4				0,047*

* Signifikanz bei $P < 0,05$

ROI-Vergleich innerhalb der Region des cingulären
Kortex, NaCl-Gruppe, Claudin-5, PT3
P = 0,172

Tabelle 22: ROI-Vergleich innerhalb der Region des
motorischen Kortex, Blut-Gruppe, Claudin-5, PT3

	ROI 2	ROI 3	ROI 4
ROI 1	0,619	0,704	0,007*
ROI 2		0,652	0,005*
ROI 3			0,006*

* Signifikanz bei $P < 0,05$

Tabelle 24: ROI-Vergleich innerhalb der Region des
motorischen Kortex, Sham-Gruppe, Claudin-5, PT3

	ROI 2	ROI 3	ROI 4
ROI 1	0,761	0,037*	0,020*
ROI 2		0,029*	0,022*
ROI 3			0,591

* Signifikanz bei $P < 0,05$

Tabelle 26: ROI-Vergleich innerhalb der Region des
Somatosensorischen Kortex, NaCl-Gruppe, Claudin-5, PT3

	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5
ROI 1	0,224	0,119	0,192	<0,001*
ROI 2		0,932	0,859	0,009*
ROI 3			0,860	0,019*
ROI 4				0,016*

* Signifikanz bei $P < 0,05$

Tabelle 27: ROI-Vergleich innerhalb der Region des somatosensorischen Kortex, Sham-Gruppe, Claudin-5, PT3

	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5
ROI 1	0,246	0,004*	<0,001*	<0,001*
ROI 2		0,024*	<0,001*	0,001*
ROI 3			0,003*	0,034*
ROI 4				0,620

* Signifikanz bei $P < 0,05$

ROI-Vergleich innerhalb der Region des Striatums. NaCl-Gruppe, Claudin-5, PT3

$P = 0,015$, Student Newman Coils: $P > 0,05$

ROI-Vergleich innerhalb der Region des lateralen Septums Blut-Gruppe, Claudin-5, PT3

$P = 0,580$

ROI-Vergleich innerhalb der Region des lateralen Septums Sham-Gruppe, Claudin-5, PT3

$P = 0,684$

PT7

ROI-Vergleich innerhalb der Region des cingulären Kortex, Blut-Gruppe, Claudin-5, PT7

$P = 0,514$

Tabelle 29: ROI-Vergleich innerhalb der Region des cingulären Kortex, Sham-Gruppe, Claudin-5, PT7

	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5
ROI 1	0,330	0,741	0,811	0,137*
ROI 2		0,252	0,309	0,020*
ROI 3			0,820	0,114
ROI 4				0,078

* Signifikanz bei $P < 0,05$

Tabelle 31: ROI-Vergleich innerhalb der Region des motorischen Kortex, NaCl-Gruppe, Claudin-5, PT7

	ROI 2	ROI 3	ROI 4
ROI 1	0,002*	<0,001*	<0,001*
ROI 2		0,221	<0,001*
ROI 3			0,006*

* Signifikanz bei $P < 0,05$

ROI-Vergleich innerhalb der Region des Striatums. Blut-Gruppe, Claudin-5, PT3

$P = 0,635$

ROI-Vergleich innerhalb der Region des Striatums. Sham-Gruppe, Claudin-5, PT3

$P = 0,120$

Tabelle 28: ROI-Vergleich innerhalb der Region des lateralen Septums, NaCl-Gruppe, Claudin-5, PT3

	ROI 2	ROI 3
ROI 1	0,065	0,001*
ROI 2		0,026*

* Signifikanz bei $P < 0,05$

ROI-Vergleich innerhalb der Region des cingulären Kortex, NaCl-Gruppe, Claudin-5, PT7

$P = 0,031$, Student Newman Coils: $P > 0,05$

Tabelle 30: ROI-Vergleich innerhalb der Region des motorischen Kortex, Blut-Gruppe, Claudin-5, PT7

	ROI 2	ROI 3	ROI 4
ROI 1	0,203	0,008*	<0,001*
ROI 2		0,053	<0,001*
ROI 3			0,016*

* Signifikanz bei $P < 0,05$

Tabelle 32: ROI-Vergleich innerhalb der Region des motorischen Kortex, Sham-Gruppe, Claudin-5, PT7

	ROI 2	ROI 3	ROI 4
ROI 1	0,094	0,055	<0,001*
ROI 2		0,478	0,009*
ROI 3			0,018*

* Signifikanz bei $P < 0,05$

Tabelle 33: ROI-Vergleich innerhalb der Region des somatosensorischen Kortex, Blut-Gruppe, Claudin-5, PT7

	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5
ROI 1	0,412	0,084	0,023*	<0,001*
ROI 2		0,172	0,073	0,002*
ROI 3			0,342	0,021*
ROI 4				0,072

* Signifikanz bei $P < 0,05$

Tabelle 34: ROI-Vergleich innerhalb der Region des somatosensorischen Kortex, NaCl-Gruppe, Claudin-5, PT7

	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5
ROI 1	<0,05*	<0,05*	<0,05*	<0,05*
ROI 2		<0,05*	<0,05*	<0,05*
ROI 3			>0,05	>0,05
ROI 4				>0,05

* Signifikanz bei $P < 0,05$

Tabelle 35: ROI-Vergleich innerhalb der Region des somatosensorischen Kortex, Sham-Gruppe, Claudin-5, PT7

	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5
ROI 1	0,795	0,226	0,001*	0,004*
ROI 2		0,164	0,001*	0,004*
ROI 3			0,017*	0,041*
ROI 4				0,698

* Signifikanz bei $P < 0,05$

Tabelle 36: ROI-Vergleich innerhalb der Region des Striatums, Blut-Gruppe, Claudin-5, PT7

	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5	ROI 6	ROI 7	ROI 8	ROI 9
ROI 1	0,042*	0,032*	0,197	0,117	0,030*	0,033*	0,035*	0,040*
ROI 2		0,831	0,435	0,751	1,000	0,955	0,973	0,991
ROI 3			0,397	0,743	0,975	0,940	0,972	0,996
ROI 4				0,479	0,328	0,425	0,304	0,485
ROI 5					0,581	0,790	0,441	0,850
ROI 6						0,991	0,825	0,998
ROI 7							0,986	0,994
ROI 8								0,995

* Signifikanz bei $P < 0,05$

ROI-Vergleich innerhalb der Region des Striatums.

NaCl-Gruppe, Claudin-5, PT7

$P = 0,125$

Tabelle 37: ROI-Vergleich innerhalb der Region des Striatums, Sham-Gruppe, Claudin-5, PT7

	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5	ROI 6	ROI 7	ROI 8	ROI 9
ROI 1	>0,05	<0,05*	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
ROI 2		>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
ROI 3			>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
ROI 4				>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
ROI 5					>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
ROI 6						>0,05	>0,05	>0,05
ROI 7							>0,05	>0,05
ROI 8								>0,05

* Signifikanz bei $P < 0,05$

ROI-Vergleich innerhalb der Region des lateralen Septums Blut-Gruppe, Claudin-5, PT7
P = 0,350

ROI-Vergleich innerhalb der Region des lateralen Septums NaCl-Gruppe, Claudin-5, PT7
P = 0,905

ROI-Vergleich innerhalb der Region des lateralen Septums Sham-Gruppe, Claudin-5, PT7
P = 0,303

PT21

Tabelle 38: ROI-Vergleich innerhalb der Region des cingulären Kortex, Blut-Gruppe, Claudin-5, PT21

	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5
ROI 1	0,068	0,304	0,599	0,378
ROI 2		0,024*	0,065	0,028*
ROI 3			0,990	0,768
ROI 4				0,526

* Signifikanz bei $P < 0,05$

ROI-Vergleich innerhalb der Region des cingulären Kortex, Sham-Gruppe, Claudin-5, PT21
P = 0,780

ROI-Vergleich innerhalb der Region des cingulären Kortex, NaCl-Gruppe, Claudin-5, PT21
P = 0,649

Tabelle 39: ROI-Vergleich innerhalb der Region des motorischen Kortex, Blut-Gruppe, Claudin-5, PT21

	ROI 2	ROI 3	ROI 4
ROI 1	0,111	0,007*	0,014*
ROI 2		0,117	0,117
ROI 3			0,798

* Signifikanz bei $P < 0,05$

ROI-Vergleich innerhalb der Region des motorischen Kortex, NaCl-Gruppe, Claudin-5, PT21
P = 0,388

ROI-Vergleich innerhalb der Region des motorischen Kortex, Sham-Gruppe, Claudin-5, PT21
P = 0,075

Tabelle 40: ROI-Vergleich innerhalb der Region des somatosensorischen Kortex, Blut-Gruppe, Claudin-5, PT21

	ROI 2	ROI 3	ROI 4
ROI 1	0,464	0,086	0,003*
ROI 2		0,151	0,008*
ROI 3			0,075

* Signifikanz bei $P < 0,05$

ROI-Vergleich innerhalb der Region des somatosensorischen Kortex, NaCl-Gruppe, Claudin-5, PT21
P = 0,123

ROI-Vergleich innerhalb der Region des somatosensorischen Kortex, Sham-Gruppe, Claudin-5, PT21
P = 0,425

ROI-Vergleich innerhalb der Region des Striatums. Blut-Gruppe, Claudin-5, PT21
P = 0,153

ROI-Vergleich innerhalb der Region des Striatums. NaCl-Gruppe, Claudin-5, PT21
P = 0,060

ROI-Vergleich innerhalb der Region des Striatums. Sham-Gruppe, Claudin-5, PT21
P = 0,242

*ROI-Vergleich innerhalb der Region des lateralen
Septums Blut-Gruppe, Claudin-5, PT21*
P = 0,537

*ROI-Vergleich innerhalb der Region des lateralen
Septums NaCl-Gruppe, Claudin-5, PT21*
P = 0,533

9.4.2 IgG

PT1

Tabelle 41: ROI-Vergleich innerhalb der Region des cingulären Kortex, Blut-Gruppe, IgG, PT1

	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5
ROI 1	0,350	0,155	0,005*	<0,001*
ROI 2		0,346	0,029*	0,002*
ROI 3			0,088	0,005*
ROI 4				0,042*

* Signifikanz bei $P < 0,05$

Tabelle 42: ROI-Vergleich innerhalb der Region des cingulären Kortex, Sham-Gruppe, IgG, PT1

	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5
ROI 1	0,163	0,198	0,117	0,002*
ROI 2		0,737	0,643	0,020*
ROI 3			0,578	0,022*
ROI 4				0,026*

* Signifikanz bei $P < 0,05$

ROI-Vergleich innerhalb der Region des motorischen Cortex NaCl-Gruppe, IgG, PT1

$P = 0,987$

Tabelle 44: ROI-Vergleich innerhalb der Region des somatosensorischen Kortex, Blut-Gruppe, IgG, PT1

	ROI 2	ROI 3	ROI 4
ROI 1	0,467	0,035*	0,054
ROI 2		0,094	0,098
ROI 3			0,650

* Signifikanz bei $P < 0,05$

ROI-Vergleich innerhalb der Region des somatosensorischen Cortex Sham-Gruppe, IgG, PT1

$P = 0,955$

ROI-Vergleich innerhalb der Region des cingulären Cortex NaCl-Gruppe, IgG, PT1

$P = 0,205$

Tabelle 43: ROI-Vergleich innerhalb der Region des motorischen Cortex, Blut-Gruppe, IgG, PT1

	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5
ROI 1	0,817	0,199	0,006*	0,021*
ROI 2		0,137	0,006*	0,021*
ROI 3			0,075	0,172
ROI 4				0,736

* Signifikanz bei $P < 0,05$

ROI-Vergleich innerhalb der Region des motorischen Cortex Sham-Gruppe, IgG, PT1

$P = 0,812$

ROI-Vergleich innerhalb der Region des somatosensorischen Cortex NaCl-Gruppe, IgG, PT1

$P = 0,317$

ROI-Vergleich innerhalb der Region des Striatums Blut-Gruppe, IgG, PT1

$P = 0,018$, Student Newman Koils: $P > 0,05$

Tabelle 45: ROI-Vergleich innerhalb der Region des Striatums, NaCl-Gruppe, IgG, PT1

	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5	ROI 6	ROI 7	ROI 8	ROI 9
ROI 1	0,513	0,031*	0,893	0,399	0,002*	0,919	0,421	<0,001*
ROI 2		0,191	0,602	0,641	0,021*	0,319	0,806	0,013*
ROI 3			0,029	0,274	0,262	0,029*	0,168	0,330
ROI 4				0,434	0,001*	0,969	0,430	<0,001*
ROI 5					0,045*	0,310	0,876	0,032*
ROI 6						0,002*	0,037*	0,764
ROI 7							0,369	<0,001*
ROI 8								0,032*

* Signifikanz bei $P < 0,05$

Tabelle 46: ROI-Vergleich innerhalb der Region des Striatums, Shamgruppe, IgG, PT1

	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5	ROI 6	ROI 7	ROI 8	ROI 9
--	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

ROI 1	<0,05*	<0,05*	<0,05*	<0,05*	<0,05*	<0,05*	<0,05*	<0,05*
ROI 2		>0,05	<0,05*	>0,05	>0,05	<0,05*	<0,05*	>0,05
ROI 3			<0,05*	>0,05	>0,05	<0,05*	<0,05*	>0,05
ROI 4				<0,05*	<0,05*	>0,05	<0,05*	<0,05*
ROI 5					>0,05	<0,05*	<0,05*	>0,05
ROI 6						<0,05*	<0,05*	>0,05
ROI 7							<0,05*	<0,05*
ROI 8								<0,05*

* Signifikanz bei $P < 0,05$

Tabelle 47: ROI-Vergleich innerhalb der Region des Lateralen Septums, Blut-Gruppe, IgG, PT1

	ROI 2	ROI 3
ROI 1	>0,05	<0,05*
ROI 2		<0,05*

* Signifikanz bei $P < 0,05$

Tabelle 48: ROI-Vergleich innerhalb der Region des Lateralen Septums, NaCl-Gruppe, IgG, PT1

	ROI 2	ROI 3
ROI 1	0,105	0,013*
ROI 2		0,134

* Signifikanz bei $P < 0,05$

Tabelle 49: ROI-Vergleich innerhalb der Region des Lateralen Septums, Sham-Gruppe, IgG, PT1

	ROI 2	ROI 3
ROI 1	0,003*	0,002*
ROI 2		0,354

* Signifikanz bei $P < 0,05$

PT3

ROI-Vergleich innerhalb der Region des cingulären Cortex Blut-Gruppe, IgG, PT3
 $P = 0,104$

Tabelle 50: ROI-Vergleich innerhalb der Region des cingulären Kortex, NaCl-Gruppe, IgG, PT3

	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5
ROI 1	0,055	0,050	0,075	0,004*
ROI 2		0,644	0,854	0,172
ROI 3			0,946	0,224
ROI 4				0,114

* Signifikanz bei $P < 0,05$

Tabelle 51: ROI-Vergleich innerhalb der Region des cingulären Kortex, Sham-Gruppe, IgG, PT3

	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5
ROI 1	0,233	0,036*	0,008*	0,090
ROI 2		0,227	0,081	0,305
ROI 3			0,411	0,575
ROI 4				0,375

* Signifikanz bei $P < 0,05$

Tabelle 52: ROI-Vergleich innerhalb der Region des motorischen Kortex, Blut-Gruppe, IgG, PT3

	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5
ROI 1	0,595	0,864	0,030*	0,056
ROI 2		0,760	0,013*	0,036*
ROI 3			0,025*	0,031*
ROI 4				0,919

* Signifikanz bei $P < 0,05$

Tabelle 53: ROI-Vergleich innerhalb der Region des motorischen Kortex, NaCl-Gruppe, IgG, PT3

	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5
ROI 1	0,577	0,684	0,050	0,069
ROI 2		0,788	0,109	0,114
ROI 3			0,111	0,078
ROI 4				0,943

* Signifikanz bei $P < 0,05$

Tabelle 54: ROI-Vergleich innerhalb der Region des somatosensorischen Kortex, Blut-Gruppe, IgG, PT3

	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5
ROI 1	0,968	0,066	<0,001*	<0,001*
ROI 2		0,143	<0,001*	<0,001*
ROI 3			0,010*	0,007*
ROI 4				0,429

* Signifikanz bei $P < 0,05$

ROI-Vergleich innerhalb der Region des somatosensorischen Cortex NaCl-Gruppe, IgG, PT3

P = 0,430

ROI-Vergleich innerhalb der Region des motorischen Cortex Sham-Gruppe, IgG, PT3

P = 0,944

ROI-Vergleich innerhalb der Region des somatosensorischen Cortex NaCl-Gruppe, IgG, PT3

P = 0,454

ROI-Vergleich innerhalb der Region des Striatums Blut-Gruppe, IgG, PT3

P = 0,066

Tabelle 55: ROI-Vergleich innerhalb der Region des Striatums, NaCl-Gruppe, IgG, PT3

	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5	ROI 6	ROI 7	ROI 8	ROI 9
ROI 1	<0,05*	>0,05	>0,05	<0,05*	<0,05*	>0,05	<0,05*	<0,05*
ROI 2		<0,05*	<0,05*	>0,05	<0,05*	<0,05*	>0,05	<0,05*
ROI 3			<0,05*	<0,05*	>0,05	<0,05*	<0,05*	>0,05
ROI 4				<0,05*	<0,05*	>0,05	<0,05*	<0,05*
ROI 5					<0,05*	<0,05*	>0,05	<0,05*
ROI 6						<0,05*	<0,05*	>0,05
ROI 7							<0,05*	<0,05*
ROI 8								<0,05*

* Signifikanz bei $P < 0,05$

ROI-Vergleich innerhalb der Region des Striatums, Sham-Gruppe, IgG, PT3

P = 0,430

ROI-Vergleich innerhalb der Region des lateralen Septums, Blut-Gruppe, IgG, PT3

P = 0,080

Tabelle 56: ROI-Vergleich innerhalb der Region des Lateralen Septums, NaCl-Gruppe, IgG, PT3

	ROI 2	ROI 3
ROI 1	0,015*	0,012*
ROI 2		0,568

* Signifikanz bei $P < 0,05$

Tabelle 57: ROI-Vergleich innerhalb der Region des Lateralen Septums, Sham-Gruppe, IgG, PT3

	ROI 2	ROI 3
ROI 1	<0,05*	<0,05*
ROI 2		>0,05

* Signifikanz bei $P < 0,05$

PT7

ROI-Vergleich innerhalb der Region des cingulären Kortex, Blut-Gruppe, IgG, PT7

P = 0,735

Tabelle 59: ROI-Vergleich innerhalb der Region des cingulären Kortex, Sham-Gruppe, IgG, PT7

	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5
ROI 1	0,602	0,057	0,027*	0,029*
ROI 2		0,031*	0,021*	0,014*
ROI 3			0,933	0,441
ROI 4				0,669

* Signifikanz bei P < 0,05

Tabelle 61: ROI-Vergleich innerhalb der Region des motorischen Kortex, Blut-Gruppe, IgG, PT7

	ROI 2	ROI 3	ROI 4
ROI 1	0,011*	0,016*	0,296
ROI 2		0,938	0,074
ROI 3			0,149

* Signifikanz bei P < 0,05

Tabelle 62: ROI-Vergleich innerhalb der Region des somatosensorischen Kortex, Blut-Gruppe, IgG, PT7

	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5
ROI 1	0,025*	0,008*	0,005	0,840
ROI 2		0,489	0,295	0,084
ROI 3			0,932	0,026*
ROI 4				0,020*

* Signifikanz bei P < 0,05

ROI-Vergleich innerhalb der Region des somatosensorischen Kortex, Sham-Gruppe, IgG, PT7

P = 0,392

Tabelle 58: ROI-Vergleich innerhalb der Region des cingulären Kortex, NaCl-Gruppe, IgG, PT7

	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5
ROI 1	0,003*	0,002*	0,002*	<0,001*
ROI 2		0,673	0,430	0,174
ROI 3			0,988	0,175
ROI 4				0,374

* Signifikanz bei P < 0,05

Tabelle 60: ROI-Vergleich innerhalb der Region des motorischen Kortex, Blut-Gruppe, IgG, PT7

	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5
ROI 1	<0,001*	<0,001*	<0,001*	0,003*
ROI 2		0,465	0,562	0,563
ROI 3			0,582	0,550
ROI 4				0,624

* Signifikanz bei P < 0,05

ROI-Vergleich innerhalb der Region des motorischen Kortex, Sham-Gruppe, IgG, PT7

P = 0,431

Tabelle 63: ROI-Vergleich innerhalb der Region des somatosensorischen Kortex, NaCl-Gruppe, IgG, PT7

	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5
ROI 1	0,002*	0,001*	0,002*	0,124
ROI 2		0,794	0,814	0,135
ROI 3			0,871	0,146
ROI 4				0,086

* Signifikanz bei P < 0,05

Tabelle 64: ROI-Vergleich innerhalb der Region des Striatums, Blut-Gruppe, IgG, PT7

	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5	ROI 6	ROI 7	ROI 8	ROI 9
--	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

ROI 1	<0,05*	<0,05*	<0,05*	<0,05*	<0,05*	>0,05	<0,05*	<0,05*
ROI 2		>0,05	<0,05*	>0,05	>0,05	<0,05*	<0,05*	>0,05
ROI 3			<0,05*	>0,05	>0,05	<0,05*	<0,05*	>0,05
ROI 4				<0,05*	<0,05*	<0,05*	<0,05*	<0,05*
ROI 5					<0,05*	<0,05*	<0,05*	>0,05
ROI 6						<0,05*	<0,05*	>0,05
ROI 7							<0,05*	<0,05*
ROI 8								<0,05*

* Signifikanz bei $P < 0,05$

Tabelle 65: ROI-Vergleich innerhalb der Region des Striatums, NaCl-Gruppe, IgG, PT7

	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5	ROI 6	ROI 7	ROI 8	ROI 9
ROI 1	<0,05*	<0,05*	<0,05*	<0,05*	<0,05*	<0,05*	<0,05*	<0,05*
ROI 2		<0,05*	>0,05	>0,05	<0,05*	>0,05	<0,05*	<0,05*
ROI 3			<0,05*	>0,05	<0,05*	<0,05*	>0,05	<0,05*
ROI 4				>0,05	<0,05*	>0,05	<0,05*	<0,05*
ROI 5					<0,05*	>0,05	>0,05	<0,05*
ROI 6						<0,05*	<0,05*	>0,05
ROI 7							<0,05*	<0,05*
ROI 8								<0,05*

* Signifikanz bei $P < 0,05$

Tabelle 66: ROI-Vergleich innerhalb der Region des Striatums, Sham-Gruppe, IgG, PT7

	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5	ROI 6	ROI 7	ROI 8	ROI 9
ROI 1	<0,05*	<0,05*	<0,05*	<0,05*	<0,05*	<0,05*	<0,05*	<0,05*
ROI 2		>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
ROI 3			>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
ROI 4				>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
ROI 5					>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
ROI 6						>0,05	>0,05	>0,05
ROI 7							>0,05	>0,05
ROI 8								>0,05

* Signifikanz bei $P < 0,05$

ROI-Vergleich innerhalb der Region des
Lateralen Septums, Blut-Gruppe, IgG, PT7
P = 0,133

ROI-Vergleich innerhalb der Region des
Lateralen Septums, NaCl-Gruppe, IgG, PT7
P = 0,135

ROI-Vergleich innerhalb der Region des
Lateralen Septums, Sham-Gruppe, IgG, PT7
P = 0,285

PT21

ROI-Vergleich innerhalb der Region des cingulären Kortex, Blut-Gruppe, IgG, PT21
P = 0,724

ROI-Vergleich innerhalb der Region des cingulären Kortex, NaCl-Gruppe, IgG, PT21
P = 0,420

ROI-Vergleich innerhalb der Region des cingulären Kortex, Sham-Gruppe, IgG, PT21
P = 0,414

ROI-Vergleich innerhalb der Region des motorischen Kortex, Blut-Gruppe, IgG, PT21
P = 0,759

ROI-Vergleich innerhalb der Region des motorischen Kortex, NaCl-Gruppe, IgG, PT21
P = 0,461

ROI-Vergleich innerhalb der Region des motorischen Kortex, Sham-Gruppe, IgG, PT21
P = 0,637

ROI-Vergleich innerhalb der Region des somatosensorischen Kortex, Blut-Gruppe, IgG, PT21
P = 0,319

ROI-Vergleich innerhalb der Region des somatosensorischen Kortex, NaCl-Gruppe, IgG, PT21
P = 0,271

ROI-Vergleich innerhalb der Region des somatosensorischen Kortex, Sham-Gruppe, IgG, PT21
P = 0,051

ROI-Vergleich innerhalb der Region des Striatums, Blut-Gruppe, IgG, PT21
P = 0,953

ROI-Vergleich innerhalb der Region des Striatums, NaCl-Gruppe, IgG, PT21
P = 0,475

Tabelle 67: ROI-Vergleich innerhalb der Region des Striatums, Sham-Gruppe, IgG, PT21

	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5	ROI 6	ROI 7	ROI 8	ROI 9
ROI 1	>0,05	>0,05	<0,05*	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
ROI 2		>0,05	<0,05*	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
ROI 3			>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
ROI 4				>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
ROI 5					>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
ROI 6						>0,05	>0,05	>0,05
ROI 7							>0,05	>0,05
ROI 8								>0,05

* Signifikanz bei $P < 0,05$

Tabelle 68: ROI-Vergleich innerhalb der Region des Lateralen Septums, Blut-Gruppe, IgG, PT21

	ROI 2	ROI 3
ROI 1	0,089	0,045*
ROI 2		0,430

* Signifikanz bei $P < 0,05$

ROI-Vergleich innerhalb der Region des Lateralen Septums, NaCl-Gruppe, IgG, PT21
P = 0,149

ROI-Vergleich innerhalb der Region des Lateralen Septums, Sham-Gruppe, IgG, PT21
P = 0,398

9.4.3 Aquaporin-4

PT1

Tabelle 69: ROI-Vergleich innerhalb der Region des cingulärer Kortex, Blut-Gruppe, Aquaporin-4, PT1

	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5	ROI 6
ROI 1	0,846	0,953	0,609	0,015*	0,054
ROI 2		0,920	0,758	0,017*	0,067
ROI 3			0,848	0,021*	0,083
ROI 4				0,020*	0,049*
ROI 5					0,158

* Signifikanz bei $P < 0,05$

Tabelle 70: ROI-Vergleich innerhalb der Region des cingulärer Kortex, NaCl-Gruppe, Aquaporin-4, PT1

	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5	ROI 6
ROI 1	0,605	0,647	0,121	0,017*	0,756
ROI 2		0,591	0,072	0,007*	0,740
ROI 3			0,126	0,033*	0,714
ROI 4				0,387	0,925
ROI 5					0,627

* Signifikanz bei $P < 0,05$

Tabelle 71: ROI-Vergleich innerhalb der Region des cingulärer Kortex, Sham-Gruppe, Aquaporin-4 PT1

	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5
ROI 1	>0,05	>0,05	>0,05	<0,05*
ROI 2		>0,05	>0,05	<0,05*
ROI 3			>0,05	<0,05*
ROI 4				<0,05*

* Signifikanz bei $P < 0,05$

Tabelle 72: ROI-Vergleich innerhalb der Region des motorischen Kortex, Blut-Gruppe, Aquaporin-4, PT1

	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5
ROI 1	0,951	0,824	<0,001*	0,843
ROI 2		0,912	<0,001*	0,972
ROI 3			<0,001*	0,967
ROI 4				0,175

* Signifikanz bei $P < 0,05$

ROI-Vergleich innerhalb der Region des motorischen Kortex, NaCl-Gruppe, Aquaporin-4, PT1
P = 0,312

Tabelle 73: ROI-Vergleich innerhalb der Region des motorischen Kortex, Sham-Gruppe, Aquaporin-4, PT1

	ROI 2	ROI 3	ROI 4
ROI 1	>0,05	>0,05	<0,05*
ROI 2		<0,05*	<0,05*
ROI 3			<0,05*

* Signifikanz bei $P < 0,05$

ROI-Vergleich innerhalb der Region des somatosensorischen Kortex, Blut-Gruppe, Aquaporin-4, PT1
P = 0,076

ROI-Vergleich innerhalb der Region des somatosensorischen Kortex, NaCl-Gruppe, Aquaporin-4, PT1
P = 0,298

Tabelle 74: ROI-Vergleich innerhalb der Region des somatosensorischen Kortex, Sham-Gruppe, Aquaporin-4, PT1

	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5
ROI 1	0,832	0,379	0,030*	0,605
ROI 2		0,516	0,029*	0,673
ROI 3			0,103	0,795
ROI 4				0,160

* Signifikanz bei $P < 0,05$

Tabelle 75: ROI-Vergleich innerhalb der Region des Striatums, Blut-Gruppe, Aquaporin-4, PT1

	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5	ROI 6	ROI 7	ROI 8	ROI 9
ROI 1	<0,05*	<0,05*	<0,05*	<0,05*	<0,05*	<0,05*	<0,05*	<0,05*
ROI 2		>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
ROI 3			>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
ROI 4				>0,05	<0,05*	>0,05	>0,05	>0,05
ROI 5					>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
ROI 6						>0,05	>0,05	>0,05
ROI 7							>0,05	>0,05
ROI 8								>0,05

* Signifikanz bei $P < 0,05$

Tabelle 76: ROI-Vergleich innerhalb der Region des Striatums, NaCl-Gruppe, Aquaporin-4, PT1

	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5	ROI 6	ROI 7	ROI 8	ROI 9
ROI 1	<0,05*	<0,05*	<0,05*	<0,05*	<0,05*	<0,05*	<0,05*	<0,05*
ROI 2		>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
ROI 3			>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
ROI 4				>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
ROI 5					>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
ROI 6						>0,05	>0,05	>0,05
ROI 7							>0,05	>0,05
ROI 8								>0,05

* Signifikanz bei $P < 0,05$

ROI-Vergleich innerhalb der Region des Striatums
Sham-Gruppe, Aquaporin-4, PT1
P = 0,030, Student Newman Koils: P > 0,05

ROI-Vergleich innerhalb der Region des lateralen Septums
Blut-Gruppe, Aquaporin-4, PT1
P = 0,069

Tabelle 77: ROI-Vergleich innerhalb der Region des lateralen Septums, NaCl-Gruppe, Aquaporin-4, PT1

	ROI 2	ROI 3
ROI 1	0,239	0,009*
ROI 2		0,037*

* Signifikanz bei P < 0,05

ROI-Vergleich innerhalb der Region des lateralen Septums
Sham-Gruppe, Aquaporin-4, PT1
P = 0,034, Student Newman Koils: P > 0,05

PT3

ROI-Vergleich innerhalb der Region des cingulären Kortex, Blut-Gruppe, Aquaporin-4, PT3
P = 0,064

ROI-Vergleich innerhalb der Region des cingulären Kortex, NaCl-Gruppe, Aquaporin-4, PT3
P = 0,064

Tabelle 78: ROI-Vergleich innerhalb der Region des cingulärer Kortex, Sham-Gruppe Aquaporin-4, PT3

	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5	ROI 6
ROI 1	0,648	0,860	0,434	0,046*	0,135
ROI 2		0,951	0,432	0,025*	0,116
ROI 3			0,560	0,030*	0,153
ROI 4				0,135	0,174
ROI 5					0,934

* Signifikanz bei P < 0,05

ROI-Vergleich innerhalb der Region des motorischen Kortex, Blut-Gruppe, Aquaporin-4, PT3
P = 0,039, Student Newman Koils: P > 0,05

ROI-Vergleich innerhalb der Region des motorischen Kortex, NaCl-Gruppe, Aquaporin-4, PT3
P = 0,379

ROI-Vergleich innerhalb der Region des motorischen Kortex, Sham-Gruppe, Aquaporin-4, PT3
P = 0,367

ROI-Vergleich innerhalb der Region des somatosensorischer Kortex, Blut-Gruppe, Aquaporin-4, PT3
P = 0,475

ROI-Vergleich innerhalb der Region des somatosensorischer Kortex, NaCl-Gruppe, Aquaporin-4, PT3
P = 0,231

ROI-Vergleich innerhalb der Region des somatosensorischer Kortex, Sham-Gruppe, Aquaporin-4, PT3
P = 0,632

Tabelle 79: ROI-Vergleich innerhalb der Region des Striatums, Blut-Gruppe, Aquaporin-4, PT3

	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5	ROI 6	ROI 7	ROI 8	ROI 9
ROI 1	>0,05	<0,05*	>0,05	>0,05	<0,05*	>0,05	>0,05	>0,05
ROI 2		<0,05*	>0,05	>0,05	<0,05*	>0,05	>0,05	>0,05
ROI 3			<0,05*	<0,05*	<0,05*	<0,05*	<0,05*	<0,05*
ROI 4					<0,05*	>0,05	>0,05	>0,05
ROI 5					<0,05*	>0,05	>0,05	>0,05
ROI 6						<0,05*	<0,05*	<0,05*
ROI 7							>0,05	>0,05
ROI 8								>0,05

* Signifikanz bei P < 0,05

Tabelle 80: ROI-Vergleich innerhalb der Region des Striatums, NaCl-Gruppe, Aquaporin-4, PT3

	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5	ROI 6	ROI 7	ROI 8	ROI 9
ROI 1	<0,05*	<0,05*	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
ROI 2		<0,05*	<0,05*	<0,05*	<0,05*	<0,05*	<0,05*	<0,05*
ROI 3			<0,05*	<0,05*	<0,05*	<0,05*	<0,05*	<0,05*
ROI 4				>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
ROI 5					>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
ROI 6						>0,05	>0,05	>0,05
ROI 7							>0,05	>0,05
ROI 8								>0,05

* Signifikanz bei $P < 0,05$

ROI-Vergleich innerhalb der Region des Striatums
Sham-Gruppe, Aquaporin-4, PT3

P = 0,511

Tabelle 81: ROI-Vergleich innerhalb der Region des lateralen Septums, Blut-Gruppe, Aquaporin-4, PT3

	ROI 2	ROI 3
ROI 1	<0,05*	<0,05*
ROI 2		>0,05

* Signifikanz bei $P < 0,05$

ROI-Vergleich innerhalb der Region des Striatums
NaCl-Gruppe, Aquaporin-4, PT3

P = 0,059

ROI-Vergleich innerhalb der Region des Striatums
Sham-Gruppe, Aquaporin-4, PT3

P = 0,085

PT7

Tabelle 82: ROI-Vergleich innerhalb der Region des cingulärer Kortex,
Blut-Gruppe, Aquaporin-4, PT7

	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5	ROI 6
ROI 1	0,076	0,013*	0,009*	0,014*	0,024*
ROI 2		0,242	0,271	0,401	0,338
ROI 3			0,705	0,918	0,775
ROI 4				0,991	0,791
ROI 5					0,523

* Signifikanz bei $P < 0,05$

Tabelle 83: ROI-Vergleich innerhalb der Region des cingulärer Kortex,
NaCl-Gruppe, Aquaporin-4, PT7

	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5	ROI 6
ROI 1	0,037*	0,011*	<0,001*	0,050*	<0,001*
ROI 2		0,476	0,106	0,780	0,074
ROI 3			0,245	0,378	0,218
ROI 4				0,110	0,494
ROI 5					0,083

* Signifikanz bei $P < 0,05$

ROI-Vergleich innerhalb der Region des cingulären
Kortex, Sham-Gruppe, Aquaporin-4, PT7

P = 0,179

Tabelle 84: ROI-Vergleich innerhalb der Region des motorischen Kortex, Blut-Gruppe, Aquaporin-4, PT7

	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5
ROI 1	0,013*	0,004*	<0,001*	<0,001*
ROI 2		0,352	0,133	0,046*
ROI 3			0,305	0,155
ROI 4				0,345

* Signifikanz bei $P < 0,05$

Tabelle 85: ROI-Vergleich innerhalb der Region des motorischen Kortex, NaCl-Gruppe, Aquaporin-4, PT7

	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5
ROI 1	0,012*	<0,001*	<0,001*	<0,001*
ROI 2		0,005*	0,001*	0,004*
ROI 3			0,353	0,592
ROI 4				0,902

* Signifikanz bei $P < 0,05$

ROI-Vergleich innerhalb der Region des motorischen Kortex, Sham-Gruppe, Aquaporin-4, PT7
 $P = 0,389$

Tabelle 86: ROI-Vergleich innerhalb der Region des somatosensorischen Kortex, Blut-Gruppe, Aquaporin-4, PT7

	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5
ROI 1	0,488	0,172	0,017*	0,137
ROI 2		0,260	0,055	0,261
ROI 3			0,287	0,581
ROI 4				0,404

* Signifikanz bei $P < 0,05$

Tabelle 87: ROI-Vergleich innerhalb der Region des somatosensorischen Kortex, NaCl-Gruppe, Aquaporin-4, PT7

	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5
ROI 1	0,033*	0,018*	<0,001*	<0,001*
ROI 2		0,502	0,056	0,065
ROI 3			0,132	0,106
ROI 4				0,748

* Signifikanz bei $P < 0,05$

Tabelle 88: ROI-Vergleich innerhalb der Region des somatosensorischen Kortex, Sham-Gruppe, Aquaporin-4, PT7

	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5
ROI 1	0,017*	0,030*	0,015*	0,120
ROI 2		0,881	0,806	0,950
ROI 3			0,739	0,854
ROI 4				0,693

* Signifikanz bei $P < 0,05$

Tabelle 89: ROI-Vergleich innerhalb der Region des Striatums, Blut-Gruppe, Aquaporin-4, PT7

	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5	ROI 6	ROI 7	ROI 8	ROI 9
--	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

ROI 1	0,121	0,627	0,061	0,081	0,099	0,060	0,070	0,063
ROI 2		0,107	0,653	0,663	0,602	0,692	0,778	0,735
ROI 3			0,024*	0,038*	0,057	0,022*	0,024*	0,022*
ROI 4				0,770	0,800	0,891	0,993	0,973
ROI 5					0,733	0,902	0,979	0,954
ROI 6						0,865	0,941	0,910
ROI 7							0,990	0,932
ROI 8								0,958

* Signifikanz bei $P < 0,05$

Tabelle 90: ROI-Vergleich innerhalb der Region des Striatums, NaCl-Gruppe, Aquaporin-4, PT7

	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5	ROI 6	ROI 7	ROI 8	ROI 9
ROI 1	0,586	0,353	0,174	0,301	0,202	0,166	0,015*	0,148
ROI 2		0,957	0,037*	0,109	0,115	0,029*	0,001*	0,021*
ROI 3			0,031*	0,083	0,075	0,025*	0,001*	0,019*
ROI 4				0,564	0,714	0,838	0,488	0,914
ROI 5					0,839	0,713	0,276	0,758
ROI 6						0,755	0,248	0,757
ROI 7							0,445	0,842
ROI 8								0,311

* Signifikanz bei $P < 0,05$

Tabelle 91: ROI-Vergleich innerhalb der Region des Striatums, Sham-Gruppe, Aquaporin-4, PT7

	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5	ROI 6	ROI 7	ROI 8	ROI 9
ROI 1	0,363	0,049*	0,884	0,679	0,578	0,869	0,972	0,940
ROI 2		0,202	0,302	0,291	0,421	0,342	0,406	0,347
ROI 3			0,021*	0,026*	0,099	0,029*	0,029*	0,024*
ROI 4				0,446	0,698	0,823	0,999	0,973
ROI 5					0,596	0,712	0,997	0,985
ROI 6						0,928	0,837	0,771
ROI 7							0,994	0,964
ROI 8								1,000

* Signifikanz bei $P < 0,05$

ROI-Vergleich innerhalb der Region des lateralen Septums,
Blut-Gruppe, Aquaporin-4, PT7
P = 0,059

ROI-Vergleich innerhalb der Region des lateralen Septums,
NaCl-Gruppe, Aquaporin-4, PT7
P = 0,355

ROI-Vergleich innerhalb der Region des lateralen Septums,
Sham-Gruppe, Aquaporin-4, PT7
P = 0,332

PT21

ROI-Vergleich innerhalb der Region des cingulären Kortex, Blut-Gruppe, Aquaporin-4, PT21
P = 0,131

ROI-Vergleich innerhalb der Region des cingulären Kortex, NaCl-Gruppe, Aquaporin-4, PT21
P = 0,227

ROI-Vergleich innerhalb der Region des cingulären Kortex, Sham-Gruppe, Aquaporin-4, PT21
P = 0,030, Student Newman Koils: P > 0,05

Tabelle 92: ROI-Vergleich innerhalb der Region des motorischen Kortex, Blut-Gruppe, Aquaporin-4, PT21

	ROI 2	ROI 3	ROI 4
ROI 1	0,932	0,646	0,022*
ROI 2		0,424	0,015*
ROI 3			0,036*

* Signifikanz bei P < 0,05

ROI-Vergleich innerhalb der Region des motorischen Kortex, NaCl-Gruppe, Aquaporin-4, PT21
P = 0,924

ROI-Vergleich innerhalb der Region des motorischen Kortex, Sham-Gruppe, Aquaporin-4, PT21
P = 0,133

ROI-Vergleich innerhalb der Region des somatosensorischen Kortex, Blut-Gruppe, Aquaporin-4, PT21
P = 0,015, Student Newman Koils: P > 0,05

ROI-Vergleich innerhalb der Region des somatosensorischen Kortex, Vehikelgruppe, Aquaporin-4, PT21
P = 0,702

ROI-Vergleich innerhalb der Region des somatosensorischen Kortex, Sham-Gruppe, Aquaporin-4, PT21
P = 0,448

ROI-Vergleich innerhalb der Region des Striatums, Blut-Gruppe, Aquaporin-4, PT21
P = 0,054

ROI-Vergleich innerhalb der Region des Striatums, Vehikelgruppe, Aquaporin-4, PT21
P = 0,421

Tabelle 93: ROI-Vergleich innerhalb der Region des Striatums, Sham-Gruppe, Aquaporin-4, PT21

	ROI 2	ROI 3	ROI 4	ROI 5	ROI 6	ROI 7	ROI 8	ROI 9
ROI 1	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<0,05*	>0,05	<0,05*	<0,05*
ROI 2		>0,05	>0,05	>0,05	<0,05*	>0,05	<0,05*	<0,05*
ROI 3			>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<0,05*
ROI 4				>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<0,05*
ROI 5					>0,05	>0,05	>0,05	<0,05*
ROI 6						>0,05	>0,05	<0,05*
ROI 7							>0,05	<0,05*
ROI 8								<0,05*

* Signifikanz bei P < 0,05

ROI-Vergleich innerhalb der Region des lateralen Septums, Blut-Gruppe, Aquaporin-4, PT21
P = 0,415

ROI-Vergleich innerhalb der Region des lateralen Septums, NaCl-Gruppe, Aquaporin-4, PT21
P = 0,402

ROI-Vergleich innerhalb der Region des lateralen Septums, Sham-Gruppe, Aquaporin-4, PT21
P = 0,902

9.5 Messwerte der Immunoreaktiven Flächen

9.5.1 Claudin-5

IRF Claudin-5 in % nach Hirnstruktur, PT1

	Blut-Gruppe		NaCl-Gruppe		Sham-Gruppe	
	M	SD	M	SD	M	SD
Cingulärer Kortex	1,494	0,398	2,850	1,215	3,114	0,982
Motorischer Kortex	1,445	0,373	2,308	1,600	2,515	0,926
Somatosensorischer Kortex	1,691	0,263	2,394	2,132	2,762	1,096
Striatum	1,279	0,314	2,038	1,632	1,841	0,782
Laterales Septum	1,418	0,506	2,269	0,732	2,356	0,543

M = Mittelwert, SD = Standardabweichung

IRF Claudin-5 in % nach Hirnstruktur, PT3

	Blut-Gruppe		NaCl-Gruppe		Sham-Gruppe	
	M	SD	M	SD	M	SD
Cingulärer Kortex	2,357	0,999	1,802	0,693	2,911	0,693
Motorischer Kortex	1,807	0,572	1,544	0,689	2,367	0,604
Somatosensorischer Kortex	1,963	0,688	1,724	0,617	2,796	0,833
Striatum	1,200	0,283	1,297	0,470	1,888	0,485
Laterales Septum	1,517	0,777	1,600	0,672	1,918	0,534

M = Mittelwert, SD = Standardabweichung

IRF Claudin-5 in % nach Hirnstruktur, PT7

	Blut-Gruppe		NaCl-Gruppe		Sham-Gruppe	
	M	SD	M	SD	M	SD
Cingulärer Kortex	4,288	0,754	5,425	1,209	4,943	0,883
Motorischer Kortex	3,793	0,772	4,574	1,269	4,414	0,927
Somatosensorischer Kortex	4,345	1,213	5,340	1,201	4,557	0,506
Striatum	3,622	0,497	3,910	0,643	3,520	0,557
Laterales Septum	2,696	0,418	3,407	0,743	2,935	0,633

M = Mittelwert, SD = Standardabweichung

IRF Claudin-5 in % nach Hirnstruktur, PT21

	Blut-Gruppe		NaCl-Gruppe		Sham-Gruppe	
	M	SD	M	SD	M	SD
Cingulärer Kortex	6,750	4,043	7,185	2,592	7,662	1,923
Motorischer Kortex	7,339	4,053	6,528	2,025	7,507	2,370
Somatosensorischer Kortex	6,569	3,248	7,351	3,156	7,635	2,115
Striatum	5,943	2,650	8,104	2,598	7,570	1,928
Laterales Septum	4,609	2,667	6,376	1,927	5,458	1,888

M = Mittelwert, SD = Standardabweichung

9.5.2 IgG

IRF IgG in % nach Hirnstruktur, PT1

	Blut-Gruppe		NaCl-Gruppe		Sham-Gruppe	
	M	SD	M	SD	M	SD
Cingulärer Kortex	4,717	3,290	4,059	3,887	4,815	3,571
Motorischer Kortex	5,017	3,789	4,643	4,160	5,597	3,928
Somatosensorischer Kortex	2,627	1,539	2,294	1,239	1,972	0,844
Striatum	2,568	2,271	1,910	1,959	1,308	1,127
Laterales Septum	2,512	2,353	2,110	2,896	0,831	0,567

M = Mittelwert, SD = Standardabweichung

IRF IgG in % nach Hirnstruktur, PT3

	Blut-Gruppe		NaCl-Gruppe		Sham-Gruppe	
	M	SD	M	SD	M	SD
Cingulärer Kortex	1,678	2,064	3,017	3,209	1,858	1,109
Motorischer Kortex	2,083	2,308	2,205	1,306	1,578	1,035
Somatosensorischer Kortex	1,403	1,076	1,619	0,653	0,853	0,487
Striatum	0,468	0,539	0,677	0,430	0,172	0,150
Laterales Septum	0,145	0,125	0,806	0,815	0,433	0,533

M = Mittelwert, SD = Standardabweichung

IRF IgG in % nach Hirnstruktur, PT7

	Blut-Gruppe		NaCl-Gruppe		Sham-Gruppe	
	M	SD	M	SD	M	SD
Cingulärer Kortex	1,023	1,050	0,773	0,323	0,288	0,285
Motorischer Kortex	1,404	0,402	1,554	0,669	0,529	0,537
Somatosensorischer Kortex	1,293	0,709	1,222	0,599	0,327	0,246
Striatum	1,403	0,872	1,189	0,433	0,314	0,336
Laterales Septum	0,679	0,673	1,234	0,879	0,377	0,618

M = Mittelwert, SD = Standardabweichung

IRF IgG in % nach Hirnstruktur, PT21

	Blut-Gruppe		NaCl-Gruppe		Sham-Gruppe	
	M	SD	M	SD	M	SD
Cingulärer Kortex	0,342	0,596	0,065	0,048	0,138	0,136
Motorischer Kortex	0,552	0,746	0,055	0,049	0,058	0,048
Somatosensorischer Kortex	0,432	0,689	0,039	0,032	0,082	0,099
Striatum	0,625	0,516	0,222	0,278	0,358	0,441
Laterales Septum	0,442	0,484	0,264	0,436	0,426	0,568

M = Mittelwert, SD = Standardabweichung

9.5.3 Aquaporin-4

IRF Aquaporin-4 in % nach Hirnstruktur, PT1

	Blut-Gruppe		NaCl-Gruppe		Sham-Gruppe	
	M	SD	M	SD	M	SD
Cingulärer Kortex	0,621	0,406	0,909	0,695	0,683	0,582
Motorischer Kortex	0,532	0,273	0,872	1,077	0,432	0,351
Somatosensorischer Kortex	0,507	0,589	0,671	0,569	0,398	0,268
Striatum	0,565	0,156	0,593	0,507	0,460	0,269
Laterales Septum	0,696	0,717	0,588	0,516	0,265	0,237

M = Mittelwert, SD = Standardabweichung

IRF Aquaporin-4 in % nach Hirnstruktur, PT3

	Blut-Gruppe		NaCl-Gruppe		Sham-Gruppe	
	M	SD	M	SD	M	SD
Cingulärer Kortex	0,698	0,535	0,386	0,119	0,870	0,553
Motorischer Kortex	0,433	0,255	0,515	0,335	0,666	0,463
Somatosensorischer Kortex	0,185	0,103	0,269	0,115	0,340	0,203
Striatum	0,336	0,328	0,362	0,175	0,729	0,459
Laterales Septum	0,469	0,592	0,180	0,084	0,245	0,194

M = Mittelwert, SD = Standardabweichung

IRF Aquaporin-4 in % nach Hirnstruktur, PT7

	Blut-Gruppe		NaCl-Gruppe		Sham-Gruppe	
	M	SD	M	SD	M	SD
Cingulärer Kortex	0,877	0,551	0,761	0,236	1,130	1,023
Motorischer Kortex	0,838	0,348	0,617	0,194	0,859	0,548
Somatosensorischer Kortex	0,608	0,325	0,381	0,166	0,598	0,270
Striatum	0,892	0,251	0,924	0,245	0,444	0,178
Laterales Septum	0,485	0,141	0,459	0,169	0,269	0,125

M = Mittelwert, SD = Standardabweichung

IRF Aquaporin-4 in % nach Hirnstruktur, PT21

	Blut-Gruppe		NaCl-Gruppe		Sham-Gruppe	
	M	SD	M	SD	M	SD
Cingulärer Kortex	0,621	0,406	0,909	0,695	0,683	0,582
Motorischer Kortex	0,532	0,273	0,872	1,077	0,432	0,351
Somatosensorischer Kortex	0,507	0,589	0,671	0,569	0,398	0,268
Striatum	0,565	0,156	0,593	0,507	0,460	0,269
Laterales Septum	0,696	0,717	0,588	0,516	0,265	0,237

M = Mittelwert, SD = Standardabweichung

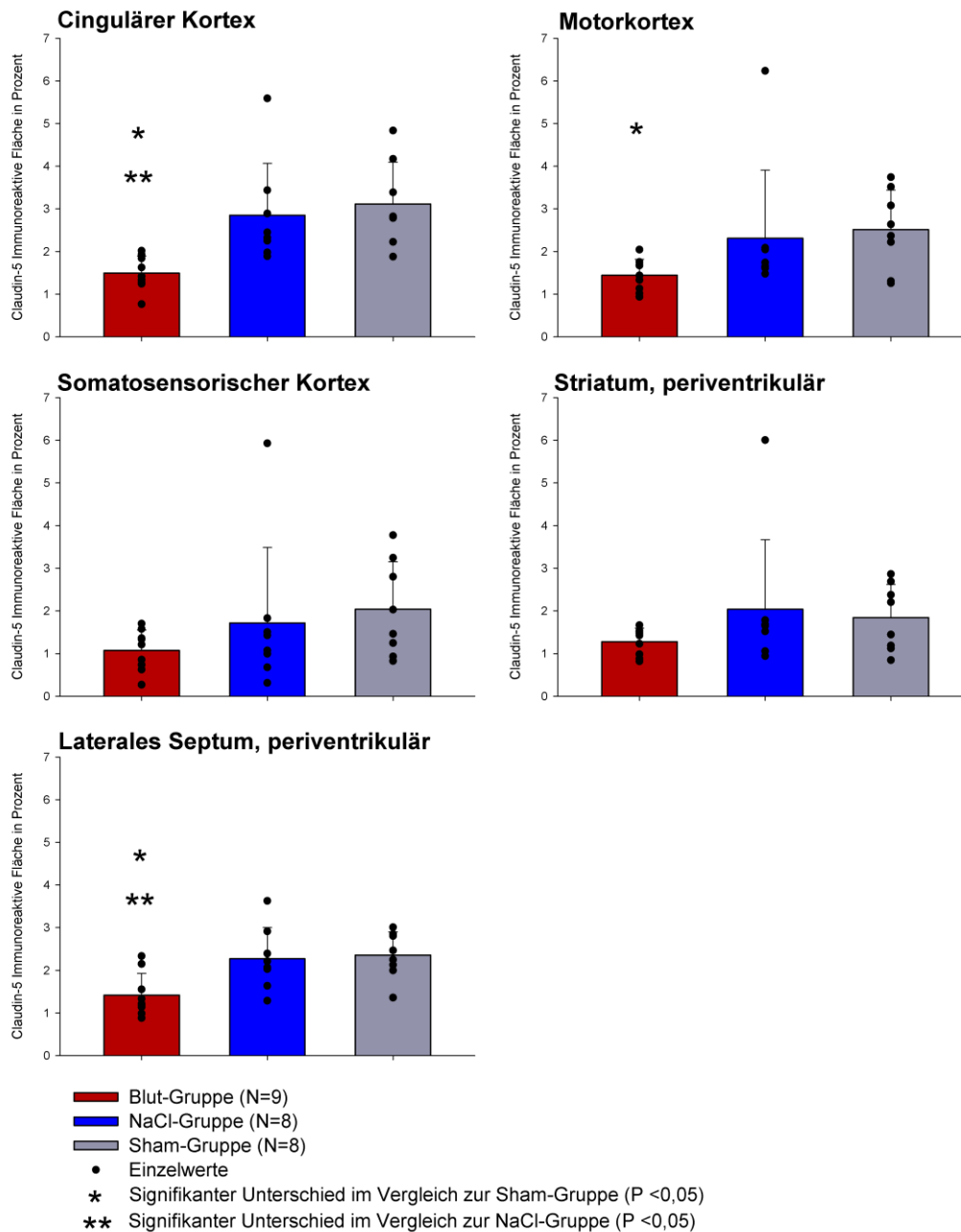
9.6 Graphischer Vergleich der Untersuchungsgruppen

Für die Grafiken in diesem Kapitel gilt:

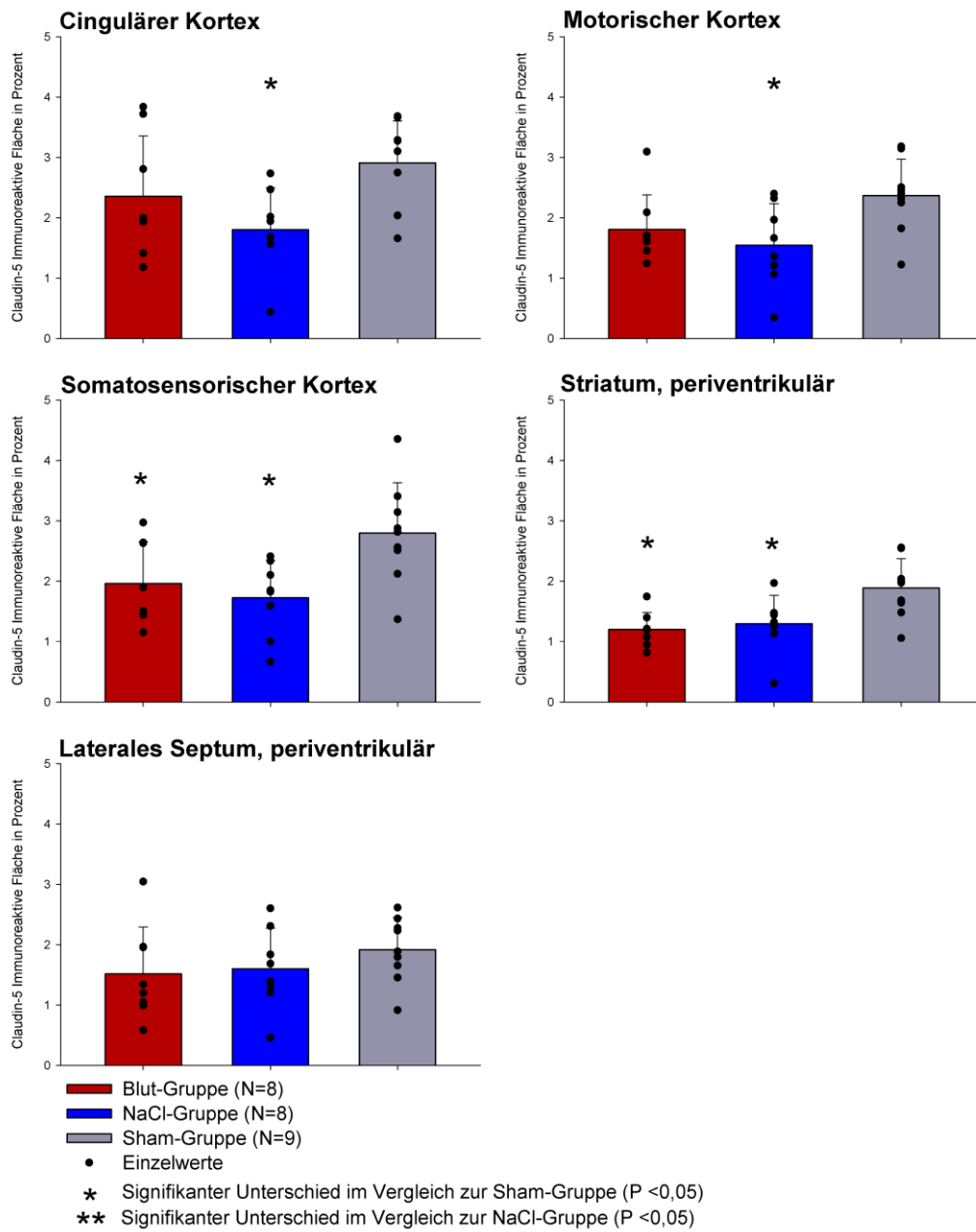
Säulen = Mittelwerte, Punkte = Einzelwerte, Fehlerbalken = Standardabweichung. Statistische Vergleiche erfolgten mittels One-Way-ANOVA bzw. One-Way-ANOVA-on-Ranks. Als post-hoc-Tests wurden Student-Newman-Keuls bzw. Dunn's-Test verwendet. Signifikanzniveau $P < 0,05$.

9.6.1 Claudin-5

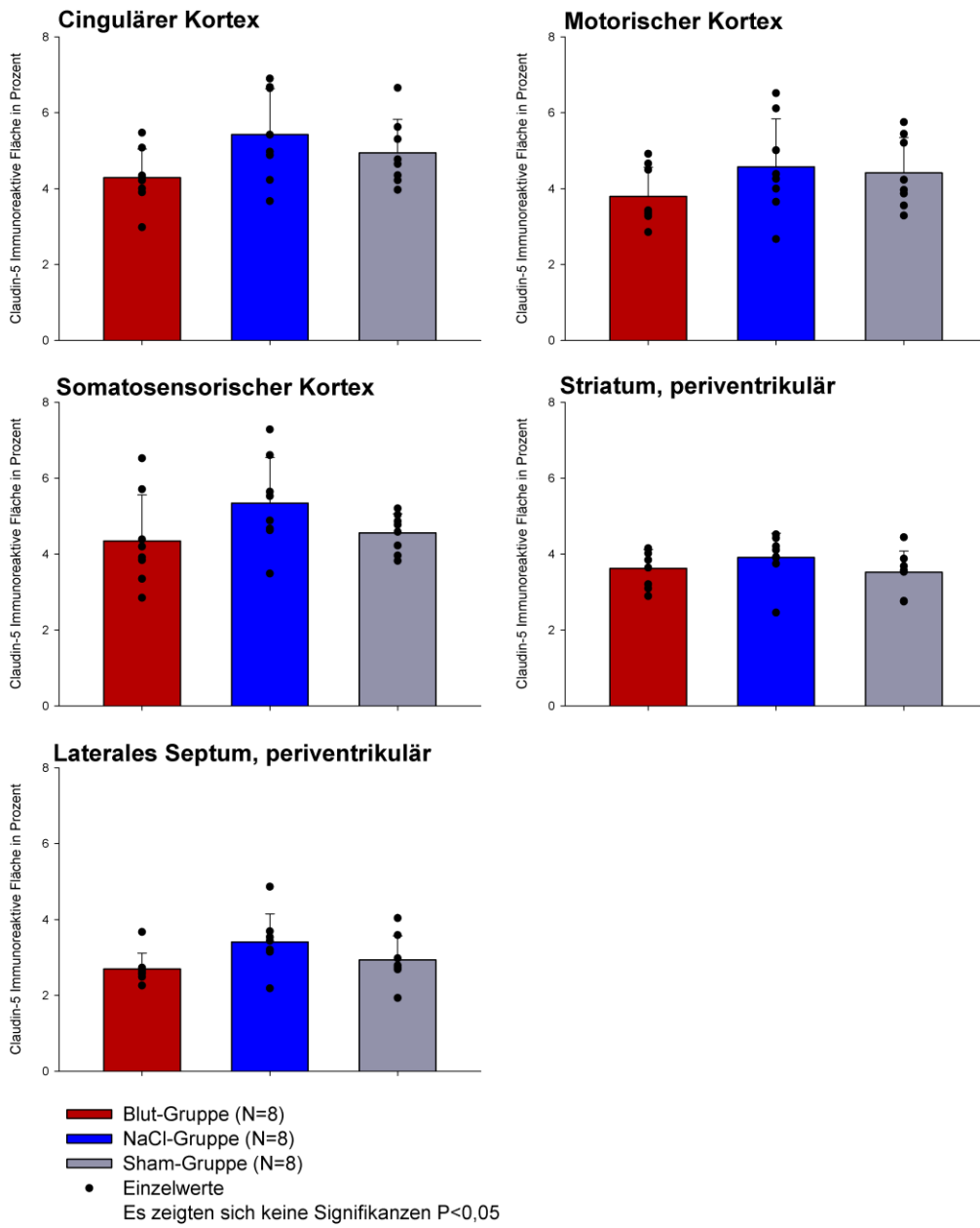
Vergleich der immunoreaktiven Fläche der Behandlungsgruppen zum Zeitpunkt PT1 Claudin-5



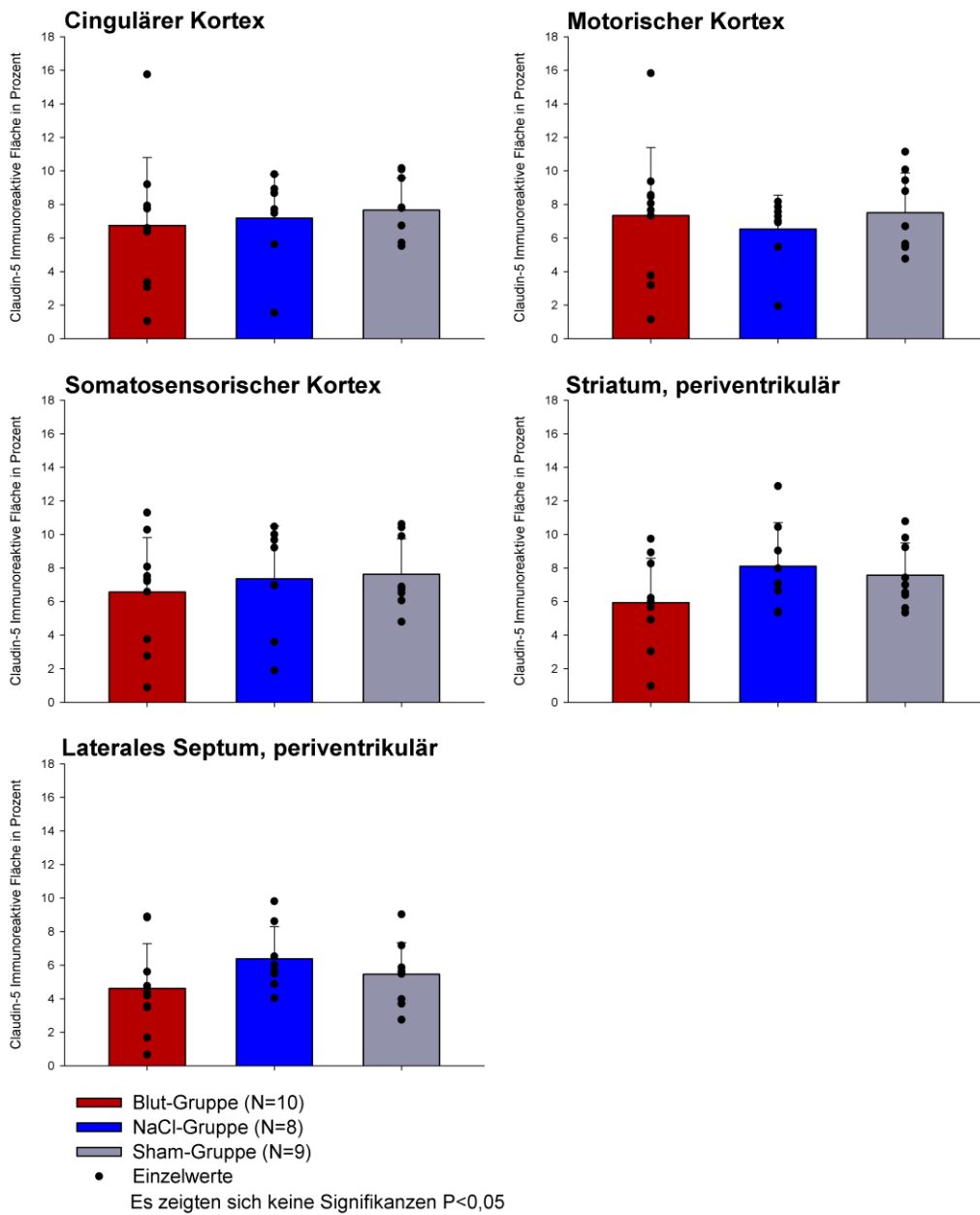
Vergleich der immunoreaktiven Fläche der Behandlungsgruppen zum Zeitpunkt PT3
Claudin-5



Vergleich der immunoreaktiven Fläche der Behandlungsgruppen zum Zeitpunkt PT7
Claudin-5

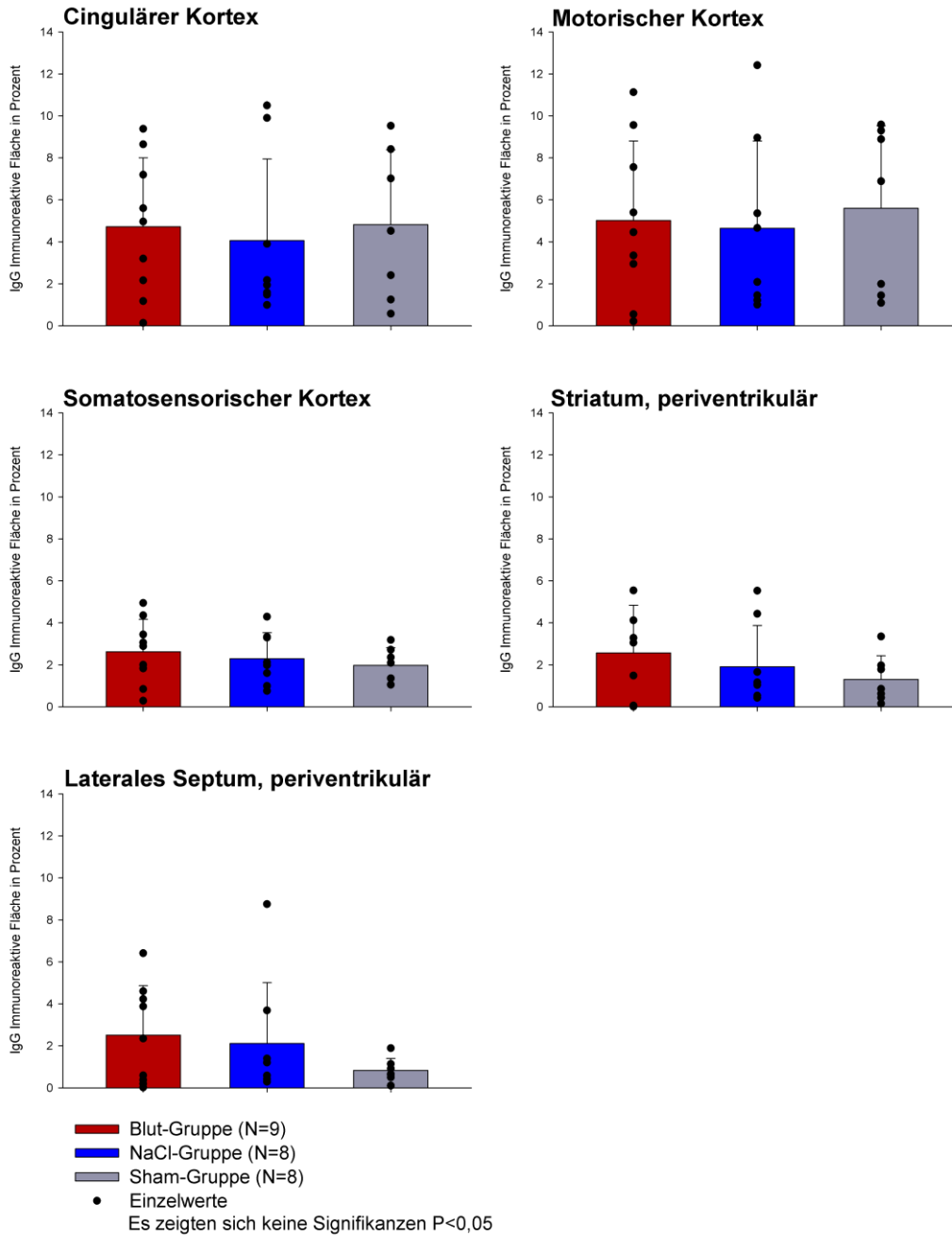


Vergleich der immunoreaktiven Fläche der Behandlungsgruppen zum Zeitpunkt PT21
Claudin-5

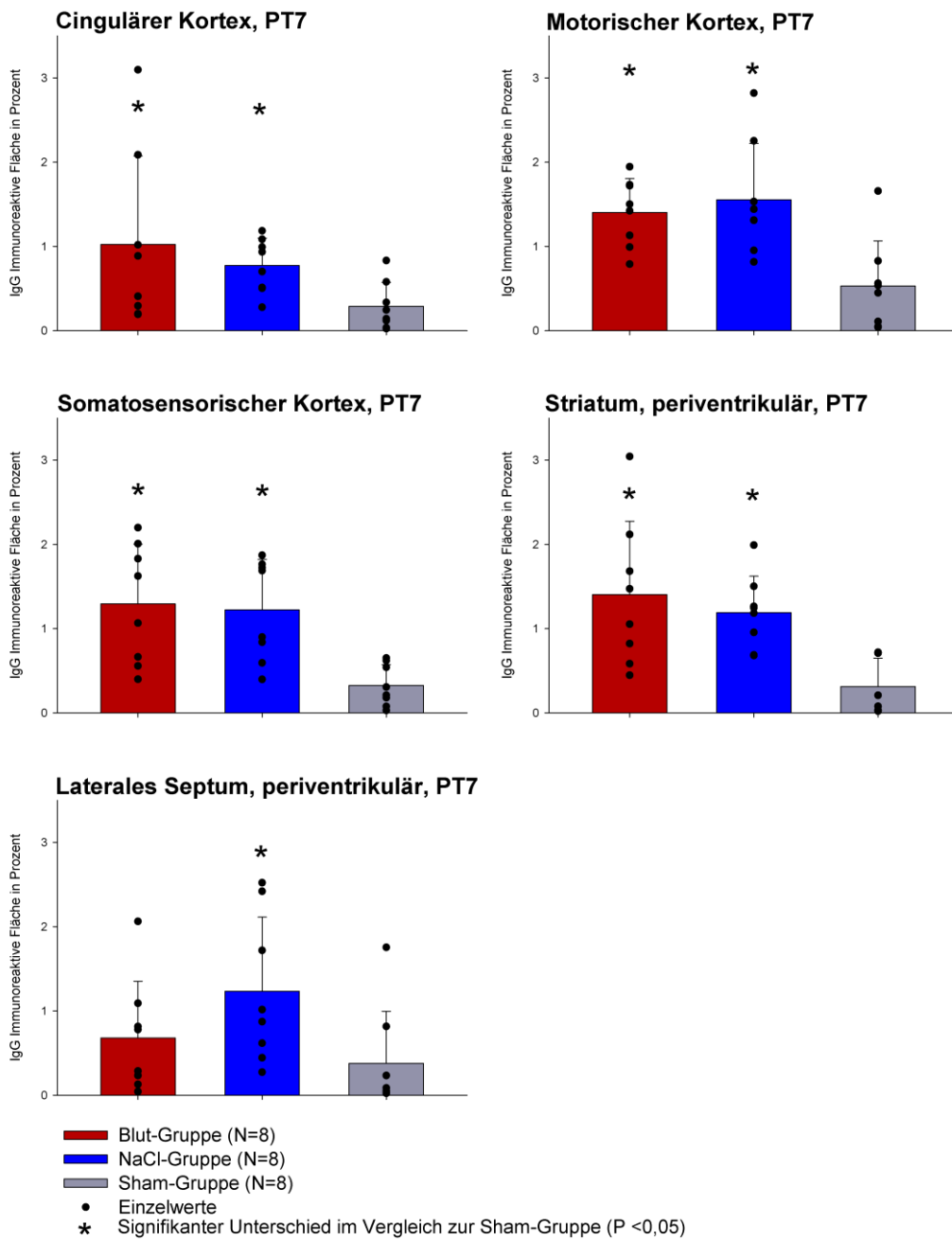


9.6.2 IgG

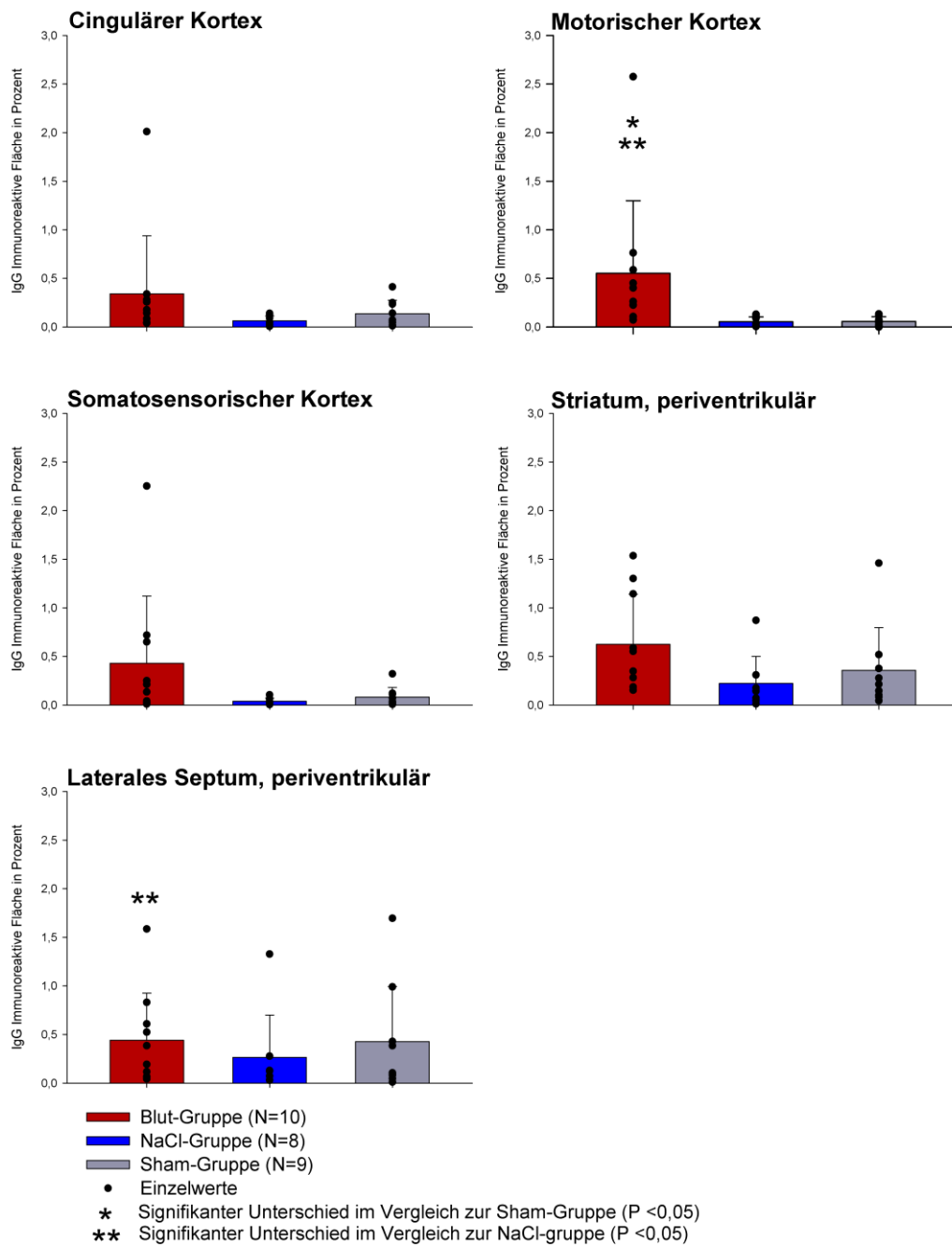
Vergleich der immunoreaktiven Fläche der Behandlungsgruppen zum Zeitpunkt PT1
IgG



Vergleich der immunoreaktiven Fläche der Behandlungsgruppen zum Zeitpunkt PT7
IgG

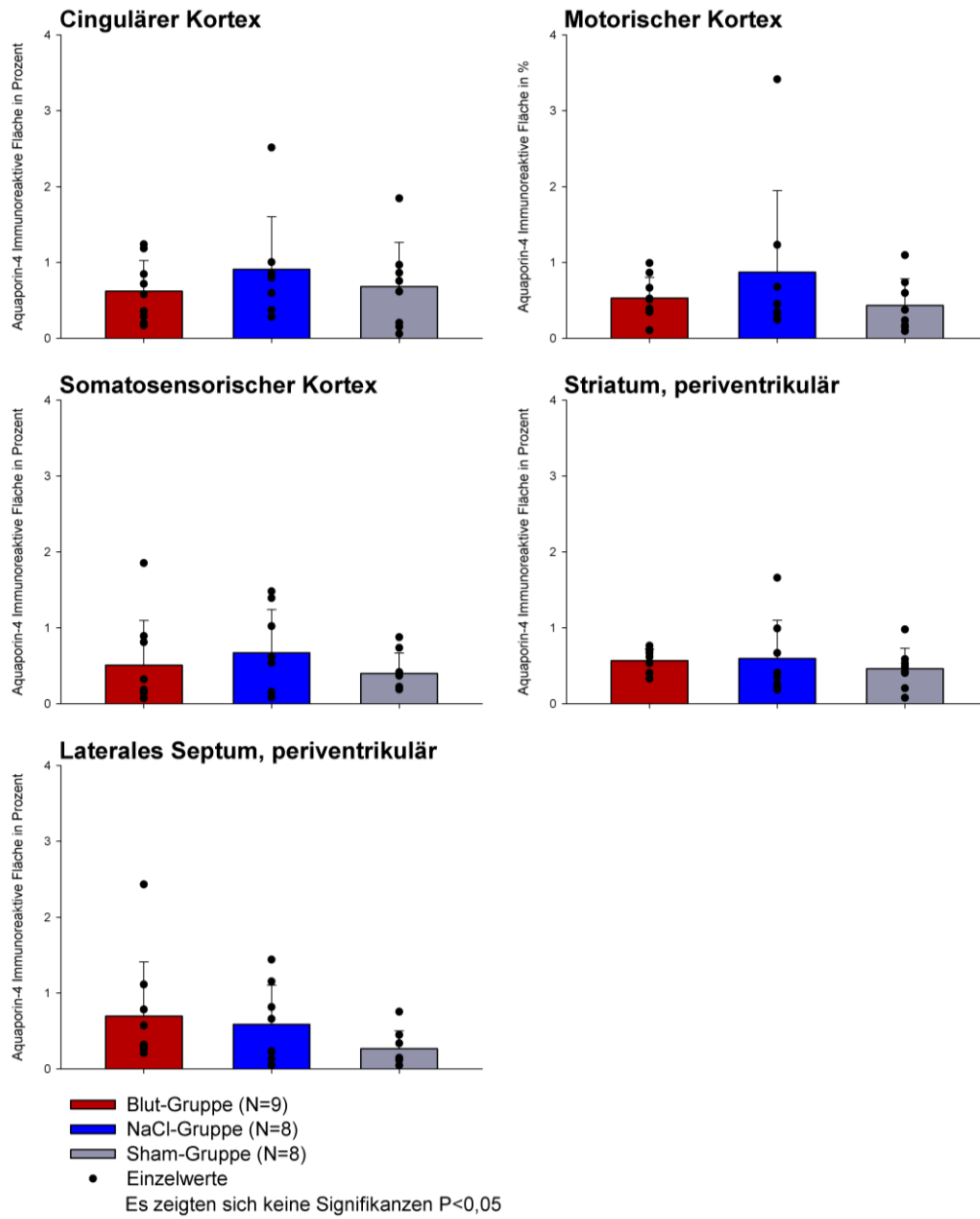


Vergleich der immunoreaktiven Fläche der Behandlungsgruppen zum Zeitpunkt PT21
IgG

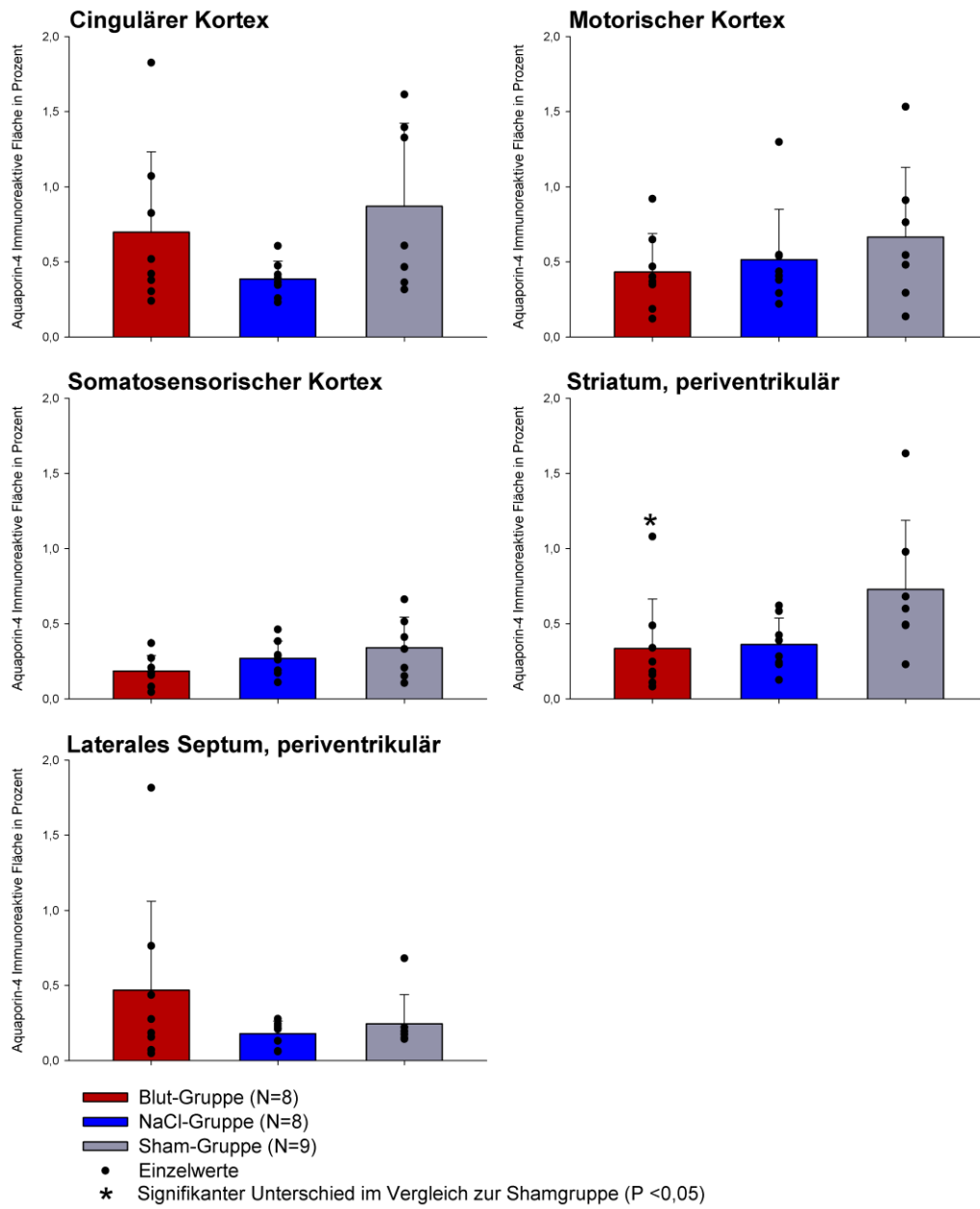


9.6.3 Aquaporin-4

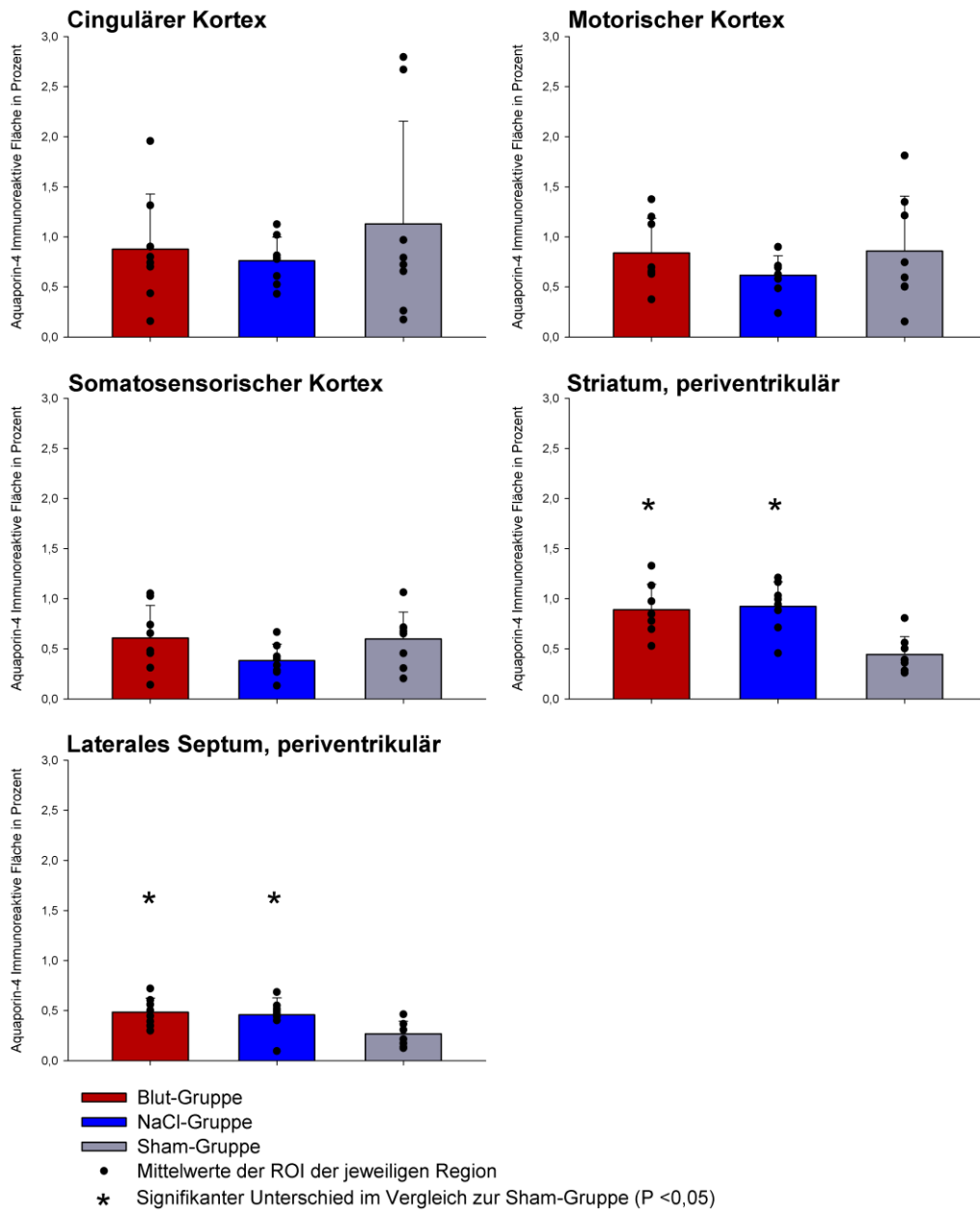
Vergleich der immunoreaktiven Fläche der Behandlungsgruppen zum Zeitpunkt PT1 Aquaporin-4



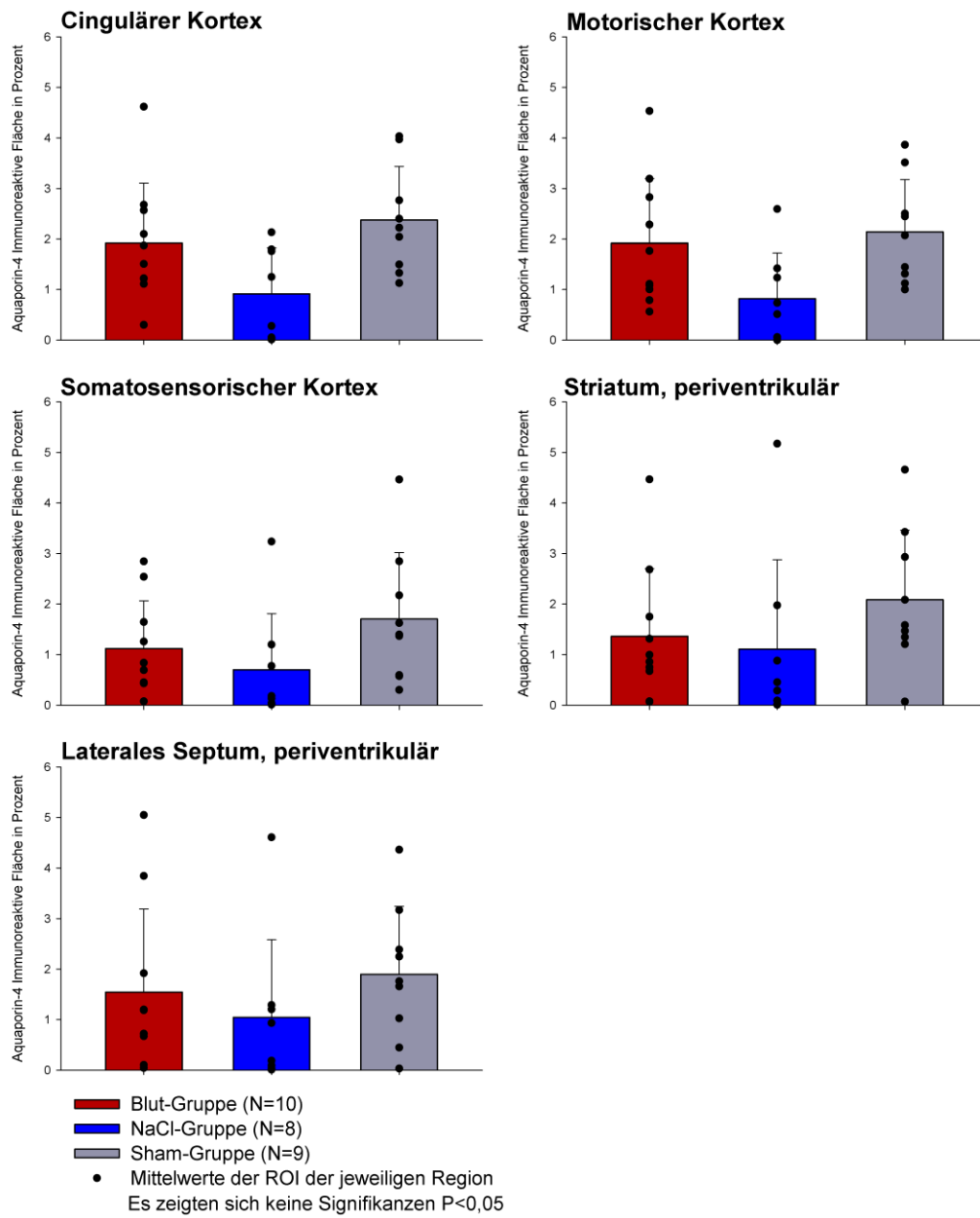
Vergleich der immunoreaktiven Fläche der Behandlungsgruppen zum Zeitpunkt PT3
Aquaporin-4



Vergleich der immunoreaktiven Fläche der Behandlungsgruppen zum Zeitpunkt PT7
Aquaporin-4



Vergleich der immunoreaktiven Fläche der Behandlungsgruppen zum Zeitpunkt PT21
Aquaporin-4

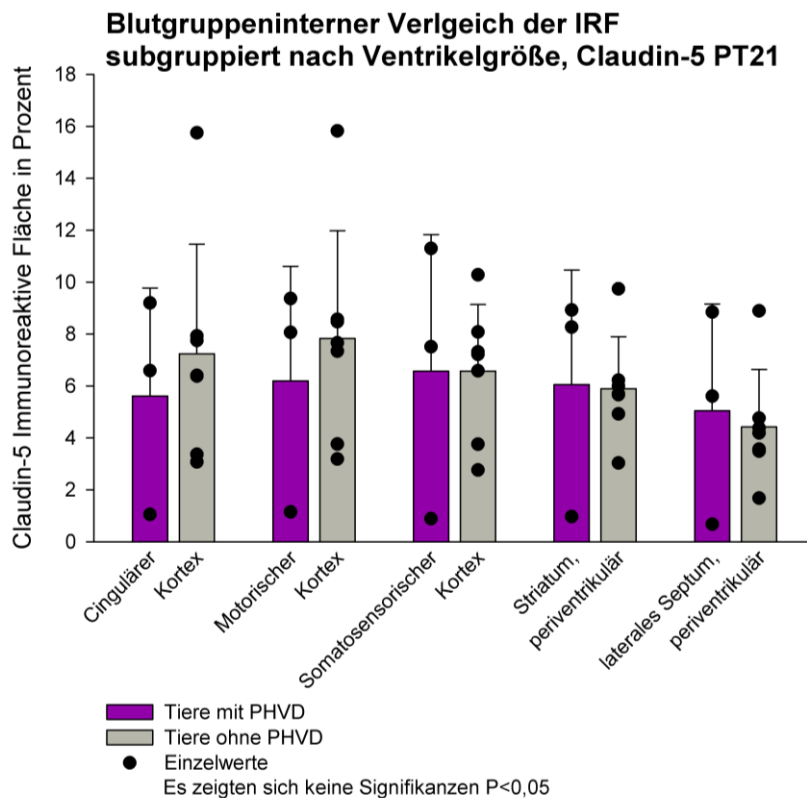
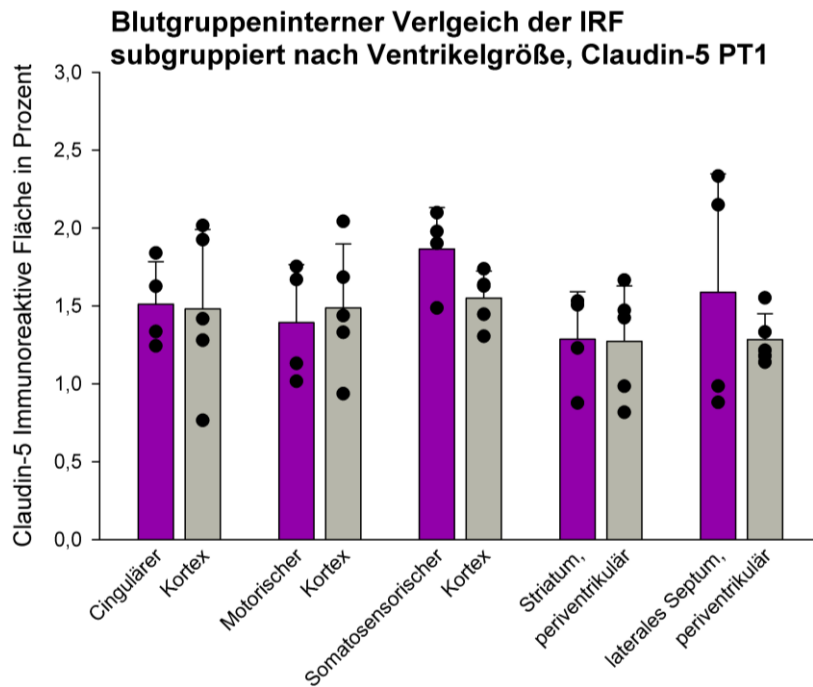


9.7 Graphischer Vergleich zwischen Tieren mit- und ohne PHVD

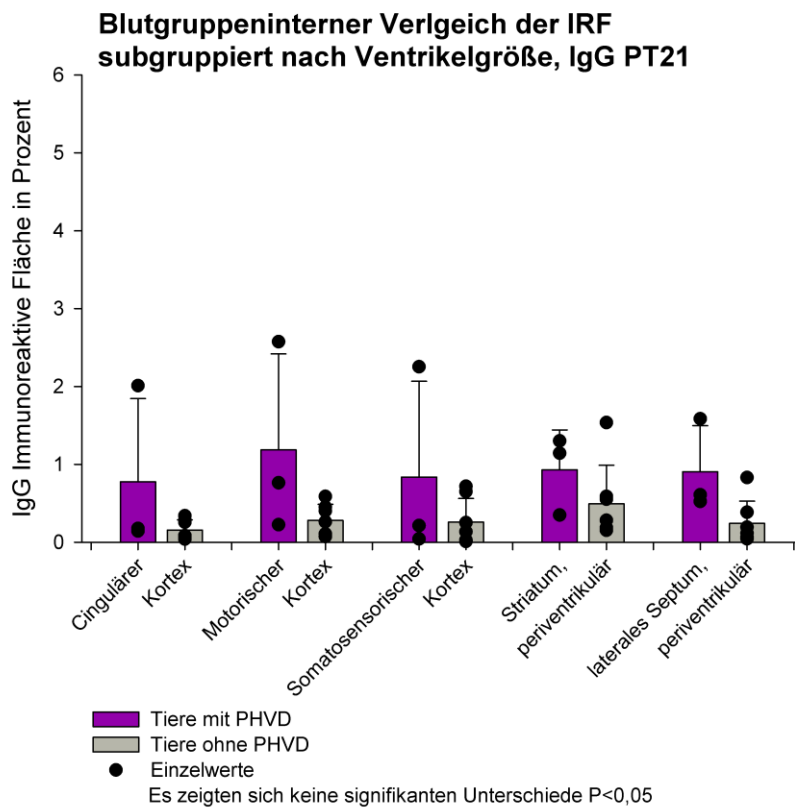
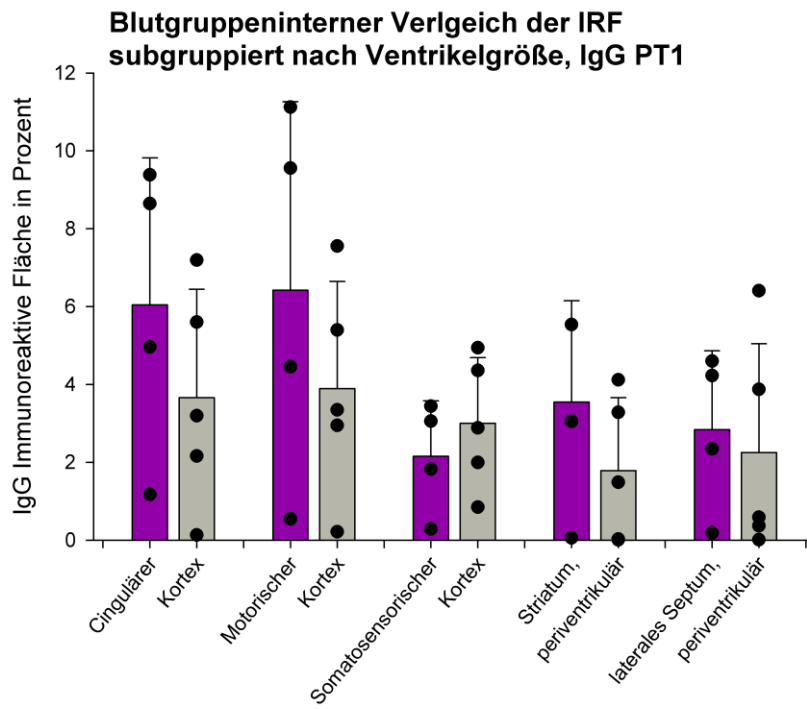
Für die Grafiken in diesem Kapitel gilt:

Säulen = Mittelwerte, Punkte = Einzelwerte, Fehlerbalken = Standardabweichung. Statistische Vergleiche
 Statistische Vergleiche wurden mittels T-Test bzw. Mann-Whitney U Test durchgeführt. Signifikanzniveau $P < 0,05$

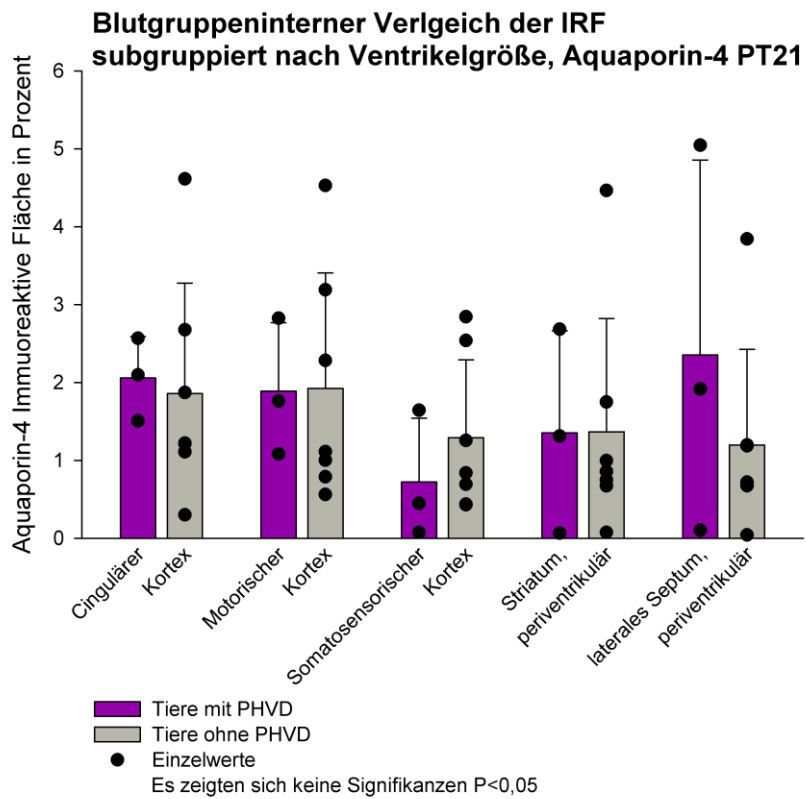
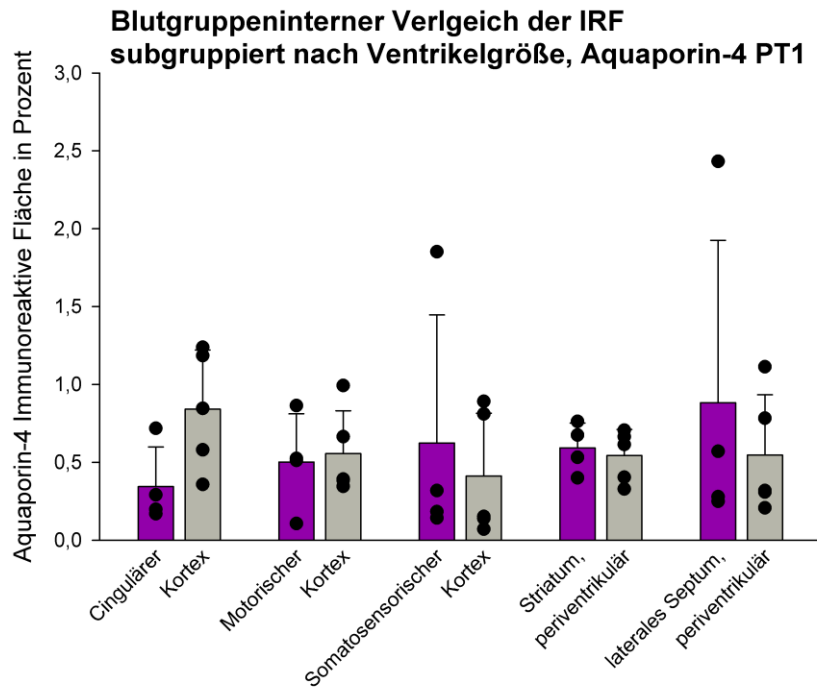
9.7.1 Claudin-5



9.7.2 IgG



9.7.3 Aquaporin-4



9.8 Tabellen zur Spearman-Korrelation zwischen IRF und relativer Ventrikelgröße

9.8.1 Claudin-5

Tabelle 94: Spearman Korrelation, Claudin-5, PT1

Region und Untersuchungsgruppe	Korrelationskoeffizient	P-Wert
Cingulärer Cortex		
Intervention	-0,367	0,308
Vehikel	-0,095	0,794
Sham	-0,143	0,705
Motorischer Kortex		
Intervention	-0,433	0,223
Vehikel	-0,333	0,387
Sham	-0,238	0,537
Somatosensorischer Kortex		
Intervention	-0,267	0,462
Vehikel	-0,500	0,182
Sham	-0,143	0,705
Striatum, periventrikulär		
Intervention	-0,067	0,844
Vehikel	-0,048	0,885
Sham	-0,286	0,460
Laterales Septum, periventrikulär		
Intervention	-0,233	0,520
Vehikel	-0,524	0,160
Sham	-0,286	0,460

* Signifikanz bei $P < 0,05$

Tabelle 95: Spearman Korrelation, Claudin-5, PT3

Region und Untersuchungsgruppe	Korrelationskoeffizient	P-Wert
Cingulärer Cortex		
Blut	-0,024	0,931
NaCl	-0,524	0,160
Sham	-0,286	0,460
Motorischer Kortex		
Blut	-0,476	0,207
NaCl	-0,524	0,160
Sham	-0,548	0,139
Somatosensorischer Kortex		
Blut	-0,048	0,885
NaCl	-0,452	0,233
Sham	-0,286	0,460
Striatum, periventriculär		
Blut	-0,262	0,498
NaCl	-0,762	0,021*
Sham	-0,643	0,072
Laterales Septum, periventriculär		
Blut	-0,548	0,139
NaCl	-0,810	0,010*
Sham	-0,214	0,578

* Signifikanz bei $P < 0,05$

Tabelle 96: Spearman Korrelation, Claudin-5, PT7

Region und Untersuchungsgruppe	Korrelationskoeffizient	P-Wert
Cingulärer Cortex		
Intervention	-0,333	0,387
Vehikel	-0,286	0,460
Sham	-0,643	0,096
Motorischer Kortex		
Intervention	-0,167	0,662
Vehikel	-0,381	0,321
Sham	-0,393	0,341
Somatosensorischer Kortex		
Intervention	-0,143	0,705
Vehikel	-0,167	0,662
Sham	-0,714	0,055
Striatum, periventriculär		
Intervention	-0,0952	0,794
Vehikel	-0,310	0,423
Sham	-0,143	0,720
Laterales Septum, periventriculär		
Intervention	-0,119	0,749
Vehikel	-0,429	0,260
Sham	-0,179	0,660

* Signifikanz bei $P < 0,05$

Tabelle 97: Spearman Korrelation, Claudin-5, PT21

Region und Untersuchungsgruppe	Korrelationskoeffizient	P-Wert
Cingulärer Cortex		
Blut	-0,273	0,425
NaCl	-0,048	0,885
Sham	-0,786	0,015*
Motorischer Kortex		
Blut	-0,297	0,384
NaCl	-0,143	0,705
Sham	-0,714	0,037*
Somatosensorischer Kortex		
Blut	-0,394	0,243
NaCl	-0,119	0,749
Sham	-0,381	0,321
Striatum, periventrikulär		
Blut	-0,455	0,172
NaCl	-0,000	0,977
Sham	-0,690	0,047*
Laterales Septum, periventrikulär		
Blut	-0,261	0,446
NaCl	-0,071	0,839
Sham	-0,571	0,120

* Signifikanz bei $P < 0,05$

9.8.2 IgG

Tabelle 98: Spearman Korrelation, IgG, PT1

Region und Untersuchungsgruppe	Korrelationskoeffizient	P-Wert
Cingulärer Cortex		
Intervention	-0,283	0,434
Vehikel	-0,810	0,010
Sham	-0,036	0,905
Motorischer Kortex		
Intervention	-0,233	0,520
Vehikel	-0,690	0,047
Sham	-0,250	0,545
Somatosensorischer Kortex		
Intervention	-0,417	0,243
Vehikel	-0,857	0,002
Sham	-0,250	0,545
Striatum, periventriculär		
Intervention	-0,450	0,204
Vehikel	-0,667	0,059
Sham	-0,143	0,720
Laterales Septum, periventriculär		
Intervention	-0,183	0,612
Vehikel	-0,286	0,460
Sham	-0,536	0,181

* Signifikanz bei $P < 0,05$

Tabelle 99: Spearman Korrelation, IgG, PT3

Region und Untersuchungsgruppe	Korrelationskoeffizient	P-Wert
Cingulärer Cortex		
Intervention	-0,619	0,086
Vehikel	-0,405	0,290
Sham	-0,486	0,356
Motorischer Kortex		
Intervention	-0,429	0,260
Vehikel	-0,262	0,498
Sham	-0,0857	0,919
Somatosensorischer Kortex		
Intervention	-0,190	0,619
Vehikel	-0,571	0,120
Sham	-0,429	0,419
Striatum, periventriculär		
Intervention	-0,429	0,260
Vehikel	-0,024	0,931
Sham	-0,029	1,000
Laterales Septum, periventriculär		
Intervention	-0,095	0,794
Vehikel	-0,048	0,885
Sham	-0,371	0,497

* Signifikanz bei $P < 0,05$

Tabelle 100: Spearman Korrelation, IgG, PT7

Region und Untersuchungsgruppe	Korrelationskoeffizient	P-Wert
Cingulärer Cortex		
Intervention	-0,143	0,705
Vehikel	-0,071	0,839
Sham	-0,714	0,055
Motorischer Kortex		
Intervention	-0,405	0,290
Vehikel	-0,405	0,290
Sham	-0,107	0,781
Somatosensorischer Kortex		
Intervention	-0,310	0,423
Vehikel	-0,238	0,537
Sham	-0,286	0,491
Striatum, periventriculär		
Intervention	-0,333	0,387
Vehikel	-0,095	0,794
Sham	-0,107	0,781
Laterales Septum, periventriculär		
Intervention	-0,619	0,086
Vehikel	-0,143	0,705
Sham	-0,536	0,181

* Signifikanz bei $P < 0,05$

Tabelle 101: Spearman Korrelation, IgG, PT21

Region und Untersuchungsgruppe	Korrelationskoeffizient	P-Wert
Cingulärer Cortex		
Intervention	-0,067	0,838
Vehikel	-0,524	0,160
Sham	-0,048	0,885
Motorischer Kortex		
Intervention	-0,091	0,785
Vehikel	-0,381	0,321
Sham	-0,238	0,537
Somatosensorischer Kortex		
Intervention	-0,212	0,535
Vehikel	-0,167	0,662
Sham	-0,190	0,619
Striatum, periventriculär		
Intervention	-0,091	0,785
Vehikel	-0,071	0,839
Sham	-0,071	0,839
Laterales Septum, periventriculär		
Intervention	-0,345	0,309
Vehikel	-0,238	0,537
Sham	-0,143	0,705

* Signifikanz bei $P < 0,05$

9.8.3 Aquaporin-4

Tabelle 102: Spearman Korrelation, Aquaporin-4, PT1

Region und Untersuchungsgruppe	Korrelationskoeffizient	P-Wert
Cingulärer Cortex		
Intervention	-0,633	0,058
Vehikel	-0,619	0,086
Sham	-0,167	0,662
Motorischer Kortex		
Intervention	-0,100	0,775
Vehikel	-0,714	0,037*
Sham	-0,548	0,139
Somatosensorischer Kortex		
Intervention	-0,083	0,809
Vehikel	-0,333	0,387
Sham	-0,095	0,794
Striatum, periventrikulär		
Intervention	-0,167	0,643
Vehikel	-0,119	0,749
Sham	-0,357	0,353
Laterales Septum, periventrikulär		
Intervention	-0,167	0,643
Vehikel	-0,143	0,705
Sham	-0,524	0,160

* Signifikanz bei $P < 0,05$

Tabelle 103: Spearman Korrelation, Aquaporin-4, PT3

Region und Untersuchungsgruppe	Korrelationskoeffizient	P-Wert
Cingulärer Cortex		
Intervention	-0,286	0,460
Vehikel	-0,262	0,498
Sham	-0,771	0,103
Motorischer Kortex		
Intervention	-0,214	0,578
Vehikel	-0,405	0,290
Sham	-0,771	0,103
Somatosensorischer Kortex		
Intervention	-0,762	0,021*
Vehikel	-0,167	0,662
Sham	-0,943	0,017*
Striatum, periventrikulär		
Intervention	-0,429	0,260
Vehikel	-0,548	0,139
Sham	-0,543	0,297
Laterales Septum, periventrikulär		
Intervention	-0,214	0,578
Vehikel	-0,048	0,885
Sham	-0,029	1,000

* Signifikanz bei $P < 0,05$

Tabelle 104: Spearman Korrelation, Aquaporin-4, PT7

Region und Untersuchungsgruppe	Korrelationskoeffizient	P-Wert
Cingulärer Cortex		
Intervention	-0,381	0,321
Vehikel	-0,476	0,207
Sham	-0,429	0,297
Motorischer Kortex		
Intervention	-0,095	0,794
Vehikel	-0,476	0,207
Sham	-0,679	0,074
Somatosensorischer Kortex		
Intervention	-0,381	0,321
Vehikel	-0,476	0,207
Sham	-0,857	0,006*
Striatum, periventrikulär		
Intervention	-0,262	0,498
Vehikel	-0,167	0,662
Sham	-0,321	0,438
Laterales Septum, periventrikulär		
Intervention	-0,238	0,537
Vehikel	-0,286	0,460
Sham	-0,393	0,341

* Signifikanz bei $P < 0,05$

Tabelle 105: Spearman Korrelation, Aquaporin-4, PT21

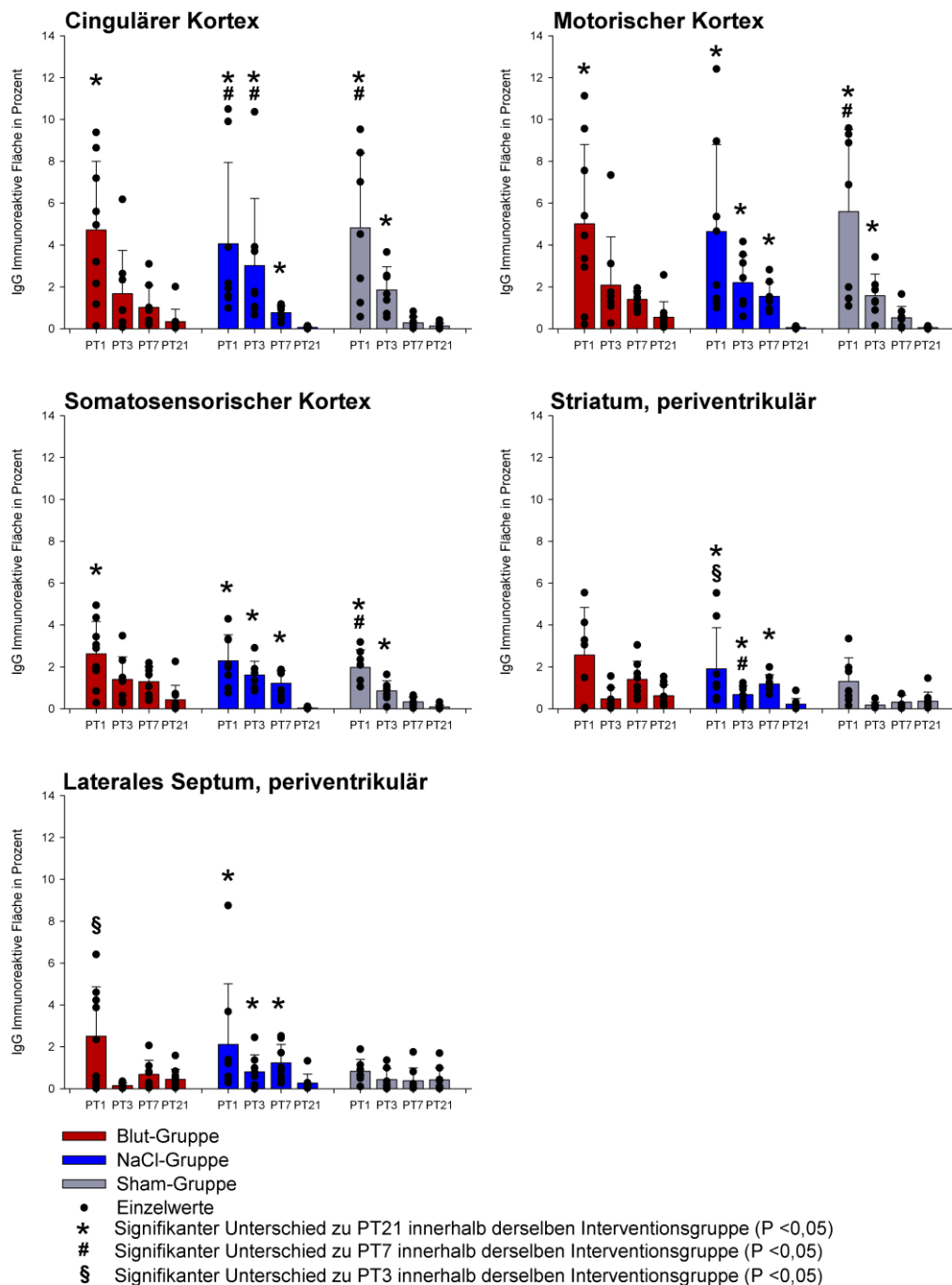
Region und Untersuchungsgruppe	Korrelationskoeffizient	P-Wert
Cingulärer Cortex		
Intervention	-0,442	0,185
Vehikel	-0,310	0,423
Sham	-0,167	0,662
Motorischer Kortex		
Intervention	-0,248	0,468
Vehikel	-0,286	0,460
Sham	-0,310	0,423
Somatosensorischer Kortex		
Intervention	-0,248	0,468
Vehikel	-0,310	0,423
Sham	-0,548	0,139
Striatum, periventrikulär		
Intervention	-0,333	0,327
Vehikel	-0,286	0,460
Sham	-0,214	0,578
Laterales Septum, periventrikulär		
Intervention	-0,382	0,258
Vehikel	-0,500	0,182
Sham	-0,381	0,321

* Signifikanz bei $P < 0,05$

9.9 Graphische Darstellung des zeitlichen Verlaufs der IRF von IgG

Säulen = Mittelwerte, Punkte = Einzelwerte, Fehlerbalken = Standardabweichung.
 Statistische Vergleiche erfolgten mittels One-Way-ANOVA bzw. One-Way-ANOVA-on-Ranks. Als post-hoc-Tests wurden Student-Newman-Keuls bzw. Dunn's-Test verwendet. Signifikanzniveau $P < 0,05$.

Vergleich der immunoreaktiven Fläche der Behandlungsgruppen im Zeitlichen Verlauf - IgG



10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all den Menschen meinen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt (Name für Online-Version entfernt) und (Name für Online-Version entfernt) für die ausgezeichnete Betreuung und durchgehende Unterstützung in den vergangenen Jahren. Zudem danke ich (Name für Online-Version entfernt) für die wissenschaftliche Betreuung als Zweitgutachter.

Weiterhin möchte ich (Name für Online-Version entfernt) und (Name für Online-Version entfernt) für beispielhafte Zusammenarbeit innerhalb des PHH-Projektes und die über das Projekt hinausgehende freundschaftliche Unterstützung Danken.

Vielen Dank an (Name für Online-Version entfernt), an (Name für Online-Version entfernt) und an die Kolleg:innen vom Institut für neurochirurgische Pathophysiologie, die uns beim Erlernen der nötigen praktischen Fähigkeiten eine große Hilfe waren.

Außerdem möchte ich mich bei der Gewebe-Biobank des Instituts für Pathologie der Universitätsmedizin Mainz für die Digitalisierung der zahlreichen Gewebeschnitte bedanken.

Vielen Dank an (Name für Online-Version entfernt), die mir half die nötige Motivation für das Regelmäßige Schreiben aufzubringen.

Meinen Freunden und meiner Familie möchte ich mich für den stetigen Zuspruch danken und für den Ausgleich vom Arbeitsalltag, der es mir möglich machte, über die Jahre am Ball zu bleiben.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Eltern (Name für Online-Version entfernt) und (Name für Online-Version entfernt) besonderen Dank aussprechen. Vielen Dank dafür, dass ihr mich immer unterstützt- und mir mein Studium und auch die Erstellung dieser Arbeit ermöglicht habt.

11 Tabellarischer Lebenslauf

(Lebenslauf für Online-Version entfernt)