

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

**Evaluation neuroprotektiver Effekte von Hyperforin nach experimentellem
Schädel-Hirn-Trauma in der Maus**

D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin

der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Tobias Kleinschmidt
aus Wittlich

Mainz, 2024

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. H. Schild

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 16.05.2025

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IX
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	XV
TABELLENVERZEICHNIS	XVI
1. EINLEITUNG	1
2. LITERATURDISKUSSION	3
2.1. Schädel-Hirn-Trauma	3
2.1.1. Definition	3
2.1.2. Epidemiologie	4
2.1.3. Pathophysiologie.....	6
2.1.3.1. Primärer Hirnschaden	6
2.1.3.2. Sekundärer Hirnschaden und Neuroinflammation	7
2.1.4. Langzeitfolgen und Therapieansätze	17
2.1.5. Gesellschaftliche Bedeutung	19
2.2. Schädel-Hirn-Trauma in der experimentellen Forschung	20
2.2.1. Tierexperimentelle Forschungsmodelle	20
2.2.2. Controlled Cortical Impact.....	22
2.3. Hyperforin	23
2.3.1. Hyperforin als Wirkstoff	23
2.3.2. Hyperforin und Neuroprotektion	26
3. MATERIAL	30
3.1. Geräte	30
3.2. Verbrauchsmaterialien	32
3.3. Arzneimittel	33
3.4. Chemikalien und Puffer	34
3.5. Antikörper	35
3.6. Hergestellte Lösungen	36
3.7. Kits	37
3.8. Primer und Sonden	37
3.9. Software	38
4. METHODEN	40

4.1. Versuchsplanung	40
4.1.1. Versuchstiere	40
4.1.2. Haltung und Genehmigung	40
4.1.3. Studiendesign	40
4.2. Versuchsdurchführung	41
4.2.1. Präoperative Maßnahmen	41
4.2.2. Anästhesie	42
4.2.3. OP: CCI - Controlled Cortical Impact	42
4.2.4. OP: SHAM - Scheineingriff	43
4.2.5. Postoperative Maßnahmen	44
4.2.6. Körpergewicht	44
4.2.7. Neurological Severity Score	44
4.2.8. Rotarod	45
4.2.9. Euthanasie und Gehirnentnahme	46
4.3. Histologische Methoden	47
4.3.1. Kryotom	47
4.3.2. Kresylviolett Färbung nach Nissl	48
4.3.3. Quantifizierung des Schadenvolumens	49
4.3.4. Immunfluoreszenz Färbung	50
4.3.5. Quantifizierung der Immunhistochemie	51
4.4. Molekularbiologische Datenerhebung	53
4.4.1. RNA Extraktion	53
4.4.2. cDNA	54
4.4.3. qRT-PCR	55
4.5. Proteinanalysen	57
4.5.1. Proteinextraktion	57
4.5.2. Elektrophorese	58
4.5.3. Western Blot	58
4.5.4. Dot Blot	59
4.6. Statistische Auswertung	60
5. ERGEBNISSE	61
5.1. Verhaltensbiologische Ergebnisse	61
5.1.1. Körpergewicht	61
5.1.2. Neurological Severity Score	63
5.1.3. Rotarod	64
5.2. Histologische Ergebnisse	66
5.2.1. Schadensvolumen	66
5.2.2. Immunhistologie	66
5.2.2.1. GFAP	67
5.3. Molekularbiologische Ergebnisse	69
5.3.1. Inflammationsmarker	69
5.3.1.1. IL-1 β	69
5.3.1.2. IL-6	70

5.3.1.3. BDNF	71
5.3.1.4. TRPC6	72
5.3.1.5. c-Fos	73
5.3.1.6. Arc.....	74
5.4. Proteinanalysen	75
5.4.1. Western Blot	75
5.4.1.1. GFAP	75
5.4.1.2. Spektrin.....	76
5.4.1.3. BDNF	77
5.4.1.4. Arc.....	78
5.4.1.5. COX-2	80
5.4.2. Dot Blot	81
5.4.2.1. Immunglobulin G.....	81
6. DISKUSSION	83
6.1. Posttraumatische Verhaltensbiologie.....	83
6.2. Neuronaler Schaden nach CCI	86
6.3. Posttraumatische Neuroinflammation.....	86
6.4. Hyperforin: Neuroprotektive Effekte nach CCI	90
6.5. Limitierungen und Aussicht	93
7. ZUSAMMENFASSUNG	97
8. LITERATURVERZEICHNIS	99
DANKSAGUNG	CXV
LEBENS LAUF	CXVII

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

*	Signifikanzniveau
%	Prozent
°C	Grad Celsius
∅	Durchschnittlich
A	Schadensfläche
Abb.	Abbildung
AD	Alzheimer Disease
ADAM 10	A Disintegrin and Metalloproteinase 10
ADP	Adenosin-Diphosphat
Ak	Antigen spezifischen Antikörper
ANOVA	analysis of variance (engl., deutsch: Varianzanalyse)
Aqua dest.	Aqua destillata (lat., deutsch: destilliertes Wasser)
Arc	Activity-regulated cytoskeleton-associated protein (engl., deutsch: Aktivitätsreguliertes Zytoskelett-assoziiertes Protein)
Arg1	Arginase 1
ATP	Adenosin-Triphosphat
ATPase	Adenosin-Triphosphatase
BDNF	Brain derived neurotrophic factor (engl., deutsch: vom Gehirn stammender neurotropher Faktor)
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BRD	Bundesrepublik Deutschland
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c-Fos	Proto-Onkogen, Transkriptionsfaktor
ca.	circa
CaMK II	Calmodulin-abhängige Proteinkinase 2
CaMK IV	Calmodulin-abhängige Proteinkinase 4
CBF	cerebral blood flow (engl., deutsch: zerebraler Blutfluss)

CCI	controlled cortical impact (engl., deutsch: Kontrollierter Kortikaler Aufprall)
CD	cluster of differentiation (engl., deutsch: Unterscheidungsgruppen)
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid (engl., deutsch: komplementären DNA)
cf	cellfree (engl., deutsch: zellfrei)
CH	Confoederatio Helvetica; Land: Schweiz
cm	Zentimeter
CNAPS	circulating nucleic acids in plasma and serum (engl., deutsch: zirkulierende Nukleinsäuren in Plasma und Serum)
CO₂	Kohlendioxid
COX-2	Cyclooxygenase- 2
CP	Crossing Point (engl., deutsch: Kreuzungspunkt)
CPP	cerebral perfusion pressure (engl., deutsch: zerebraler Perfusionsdruck)
CREB	cAMP response element binding protein (engl., deutsch: cAMP Reaktionselement-Bindungsprotein)
CRNA	RNA Konzentration
CT	Computertomographie
CVR	cerebrovasucular resistance (engl., deutsch: zerebrovaskulärer Gefäßwiderstand)
D1	Post Op, ein Tag nach Operation
D2	Post Op, zwei Tage nach Operation
D3	Post Op, drei Tage nach Operation
D4	Post Op, vier Tage nach Operation
D5	Post Op, fünf Tage nach Operation
DAI	Diffuse Axonal Injury (engl., deutsch: Diffuse Atonale Verletzung)
DAMPs	Damage-associated molecular Patterns (engl., deutsch: Schaden-assoziiertes molekulares Muster)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DE	Deutschland
DK	Dänemark

DNA	Desoxyribonucleic Acid (engl., deutsch: Desoxyribonukleinsäure, DNS)
EAE	Autoimmune Enzephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
Erk	Extracellular-signal regulated Kinases (engl., deutsch: cAMP Extrazellulär-signalgesteuerte Kinases)
et al.	et alii (lat., deutsch: und andere)
Fa.	Firma
FcγR	Fc-Rezeptor
FP	Fluid Percussion (engl., deutsch: Flüssige Erschütterung)
g	g-Kraft
g	Gramm
GAPD	<i>Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase</i>
GCS	Glasgow Coma Scale (engl., deutsch: Glasgow-Koma-Skala)
gDNA	genomische DNA
GFAP	Glial fibrillary acidic Protein (engl., deutsch: saures Gliafaserprotein)
h	Stunden
HPE	Hypericum perforatum-Extrakt
HSPs	Heat Shock Proteins (engl., deutsch: Hitzeschock-Proteine)
HWG	Hirnwassergehalt
Hz	Hertz
i.p.	Intraperitoneal
Iba1	Ionized calcium-binding adapter Molecule 1 (engl., deutsch: Ionisiertes kalziumbindendes Adaptermolekül 1)
IEG	Immediate-Early-Gene (engl., deutsch: Unmittelbar-frühes Gen)
IGF-1	Insulin like Growth Factor 1 (engl., deutsch: Insulinartiger Wachstumsfaktor 1)
IgG	Immunglobulin G

IVIG	Intravenösen Immunglobulin G
IL-10	Interleukin 10
IL-12	Interleukin 12
IL-13	Interleukin 13
IL-1α	Interleukin 1 α
IL-1β	Interleukin 1 beta
IL-4	Interleukin 4
IL-6	Interleukin 6
KG	Körpergewicht
L/min	Liter pro Minute
LFP	Lateral Fluid Percussion (engl., deutsch: seitliche Flüssigkeitserschütterung)
m/s	Meter pro Sekunde
MCAO	Middle Cerebral Artery Occlusion (engl., deutsch: Okklusion der mittleren Zerebralen Arterie)
MHC2	Major histocompatibility complex Class II (engl., deutsch: Haupt-Histokompatibilitätskomplex Klasse II)
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm²	Quadratmillimeter
mm³	Quadratmillimeter
MMP	Matrix Metalloproteinasen
MRT	Magnetresonanztomographie
ms	Millisekunden
MS	Multiple Sklerose
MW	Mittelwert
N	Größe der Grundgesamtheit
NF-κB	Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer Activated B-Cells (engl., deutsch: Nuklearer Faktor Kappa-leichte-Ketten-Verstärker aktivierte B-Zellen)
NGF	Nerve Growth Factor (engl., deutsch: Nervenwachstumsfaktor)

NGS	Normal Goat Serum (engl., deutsch: Normales Ziegenserum)
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor
NMDAR	N-Methyl-D-Aspartat Rezeptoren
n	Anzahl der Merkmalsausprägungen
NSS	Neuological Severity Score (engl., deutsch: Neuologischer Schweregrad-Score)
OD	Optische Dichte
OD₂₆₀	Optische Dichte bei Wellenlänge 260 nm
OD₂₈₀	Optische Dichte bei Wellenlänge 280 nm
OP	Operation
p	p-Wert; Signifikanzwert
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMPs	Pathogen associated Molecular Patterns (engl., deutsch: Pathogen-assoziierte Molekülmuster)
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PBST	Phosphat gepufferte Salzlösung + Triton X 100
PCR	Polymerase Chain Reaktion (engl., deutsch: Polymerasekettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
PI3K/Akt	Phosphoinositid-3-Kinase / ProteinkinaseB
PostOp	Postoperativ, nach der Operation
PPIA	Peptidylprolyl Isomerase A Gen
PräOp	Präoperativ, ein Tag vor der Operation
PRPs	Pattern-Recognition-Receptores (engl., deutsch: Mustererkennungs-Rezeptoren)
qRT-PCR	Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaktion (engl., deutsch: Quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion)
rER	Raues Endoplasmatisches Retikulum
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay Buffer (engl., deutsch: Puffer Radioimmunpräzipitationstest)
RNA	Ribonucleic Acid (engl., deutsch: Ribonukleinsäure, RNS)
RNaseH	Ribonukleasen H
ROI	Region of Interest (engl., deutsch: Bereich von Interesse)

ROS	Reactive Oxygen Species (engl., deutsch: Reaktive Sauerstoffspezies)
RR	Rotarod - Leistungstest
RT	Raumtemperatur
S100B	Calciumbindendes Protein u. a. in Astrozyten
SDS	Sodium Dodecylsulfat
SEM	Standardfehler
SHT	Schädel-Hirn-Trauma
TBST	Tris-buffered saline with Tween20 (engl., deutsch: Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween20)
TGF-β	Transforming Growth Factor beta (engl., deutsch: Transformierender Wachstumsfaktor beta)
TNF-α	Tumornekrosefaktor alpha
TRCP6	Transient Receptor Potential Channel 6 (engl., deutsch: liganden gesteuerter Transmembran Kanal 6)
TrkB	Tropomyosinrezeptor-Kinase B
u. a.	unter anderem
u. U.	unter Umständen
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Schadensvolumen
Veh	Vehikel, Wirkstofffreie Trägerlösung
WD	Weight Drop (engl., deutsch: Gewichtsreduktion)
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
$\mu\text{g/ml}$	Mikrogramm pro Milliliter
$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Mikrogramm pro Mikroliter
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μm^2	Quadratmikrometer

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Illustration der Neuroinflammation nach SHT	8
Abbildung 2: Strukturformeln Hyperforin und Derivat Hyp1	25
Abbildung 3: Illustration der TRPC6-CaMK-CREB Signalkaskade.....	27
Abbildung 4: Illustration des Versuchsaufbau Controlled Cortical Impact	43
Abbildung 5: Protokoll NSS - Neurological Severity Score.....	45
Abbildung 6: Illustration Rota-Rod Versuchsaufbau	46
Abbildung 7: Illustration des Murinen Gehirn nach CCI.....	47
Abbildung 8: Illustration der Schnittführung am murinen Gehirn	49
Abbildung 9: Illustration eines Schadensgebietes nach CCI	50
Abbildung 10: Illustration Region of Interest Immunhistochemie.....	52
Abbildung 11: Immunhistologische Färbung und Auswertung von GFAP	52
Abbildung 12: Entwicklung des Körpergewichts als Differenz zu PräOP	62
Abbildung 13: Entwicklung des NSS als Differenz zu PräOP	64
Abbildung 14: Entwicklung der Rotarod Testläufe als Differenz zu PräOP	65
Abbildung 15: Schadensvolumen nach CCI	66
Abbildung 16: Immunhistologische Färbung GFAP.....	67
Abbildung 17: Immunhistochemischer Nachweis der GFAP-Elemente	68
Abbildung 18: Genexpression IL-1 β	69
Abbildung 19: Genexpression IL-6	70
Abbildung 20: Genexpression BDNF	71
Abbildung 21: Genexpression TRPC6.....	72
Abbildung 22: Genexpression c-Fos.....	73
Abbildung 23: Genexpression Arc	74
Abbildung 24: Proteinexpression von GFAP.....	76
Abbildung 25: Proteinexpression von Spektrin	77
Abbildung 26: Proteinexpression von BDNF	78
Abbildung 27: Proteinexpression von Arc	79
Abbildung 28: Proteinexpression von COX-2	80
Abbildung 29: Quantifizierung IgG Fluoreszenzsignal.....	82

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 3.1: Material Geräte.....	32
Tabelle 3.2: Material Verbrauchsmaterial.....	33
Tabelle 3.3: Material Arzneimittel	34
Tabelle 3.4: Material Chemikalien und Puffer	35
Tabelle 3.5: Material Primärer Antikörper.....	36
Tabelle 3.5.1: Material Sekundärer Antikörper	36
Tabelle 3.6: Material Lösungen.....	37
Tabelle 3.7: Material Kits.....	37
Tabelle 3.8: Material Primer und Sonden.....	38
Tabelle 3.9: Material Software	39
Tabelle 4.1: Randomisierung und Gruppeneinteilung	41

1. EINLEITUNG

Traumatische Hirnverletzungen stellen weltweit ein beträchtliches gesundheitliches und sozioökonomisches Problem dar. Die Inzidenz von Schädel-Hirn-Traumata ist unter den allgemein anerkannten neurologischen Erkrankungen am höchsten (1). Es tritt sowohl in Entwicklungsländern als auch in Industriestaaten auf und betrifft Menschen unterschiedlicher Alterskohorten (2). Es lässt sich prognostizieren, dass das Krankheitsbild bis 2030 eine der drei häufigsten Ursachen für verletzungsbedingte Todesfälle und Behinderungen sein wird (1). Jährlich erleiden weltweit etwa 10 Millionen Menschen ein Schädel-Hirn-Trauma (3, 4). Die Mortalität beläuft sich dabei weltweit auf etwa 1,5 bis 2 Millionen Menschen pro Jahr (5). Dies stellt bei Menschen unter dem 45. Lebensjahr die Hauptursache für Tod und Behinderung dar (6).

Die Ursache eines Schädel-Hirn-Traumas ist eine äußere Krafteinwirkung auf den Schädel und das Gehirn. Das resultierende heterogene Krankheitsbild unterscheidet sich in Schweregrad, Morphologie und in klinischer Symptomatik. Die pathophysiologischen Mechanismen nach einer Hirnverletzung manifestieren sich als primärer und sekundärer Hirnschaden (7-9). Der primäre Hirnschaden ist ein substantieller Defekt, der auf direkte und fokale mechanische Krafteinwirkung zurückzuführen ist und durch unmittelbaren Zelluntergang (Apoptose, Nekrose) irreversibel ist (7-9). Die sekundäre Schädigung entwickelt sich über mehrere Stunden, Tage oder Wochen (25) und bietet damit ein Zeitfenster für therapeutische Maßnahmen. Die zellulären und molekularen Signalwege des sekundären Hirnschadens sind als reversibel und modulierbar anzusehen (7). Dennoch sind die Ergebnisse bisheriger klinischer Studien unbefriedigend und es existiert keine standardisierte kausale Therapie der sekundären Schädigungsprozesse nach einem Schädel-Hirn-Trauma (10-12).

Der in Johanniskraut enthaltene Wirkstoff Hyperforin zeigt gemäß diverser Studien durch die Beeinflussung vielfältiger zellulärer Stoffwechselprozesse und Signalkaskaden, antidepressive, antikarzinogene sowie antibakterielle

Effekte (13-16). In jüngeren Forschungsarbeiten konnten darüber hinaus neuroprotektive Effekte in einigen Schädigungsmodellen nachgewiesen werden (17, 18). Ein potenzielles Ziel für eine pharmakologische Modulation durch Hyperforin, ist der Calcium-permeable Rezeptor, *Transient Receptor Potential Channel 6* (TRPC6) (19, 20). Eine Verstärkung des über TRPC6 induzierten Calcium-Einstromes führt über die Katalyse der Calcium-Calmodulin-abhängigen Proteinkinase (CaMKs) zur Hirnregion-spezifischen Aktivierung des prototypischen, signalregulierten Transkriptionsfaktors *cAMP-response element binding protein* (CREB), wodurch eine verstärkte Gentranskription des brain-derived neurotrophic factor (BDNF) vermittelt wird. Daraus resultierende tropischen und neuroprotektiven Effekte wurden mehrfach untersucht (20-22).

Im Rahmen der vorliegenden Studie wird das Hyperforin-Präparat bzw. ein Placebo über einen Zeitraum von fünf Tagen nach einer chirurgischen Hirnverletzung *Controlled-Cortica-Impact* (CCI) intraperitoneal im Tiermodell verabreicht. Durch verhaltensbiologische Überwachung wird die funktionelle Wiederherstellung bzw. Regeneration bewertet. Im Anschluss findet eine Euthanasie statt, woraufhin eine Darstellung von Inflammationsmarkern mittels immunhistochemischer Verfahren sowie eine Volumetrie zur Objektivierung der Schadensausbreitung am murinen Hirngewebe erfolgt. Des Weiteren werden molekularbiologische und proteanalytische Verfahren zur Analyse diverser Marker eingesetzt, u.a. für die Aktivität von Astrozyten/Mikroglia, die Apoptose sowie die Expression von Indikator- und Transkriptionsfaktoren.

Die vorliegende Forschungsarbeit basiert auf der Annahme, dass das Hyperforin-Derivat *2,4-Diacylphloroglucinol* (Hyp1) im experimentellen Schädel-Hirn-Trauma Modell die Induktion von Signalkaskaden (19) und dadurch potenziell anti-inflammatorische und neuroprotektive Effekte initiiert, damit das Überleben von Neuronen fördert (23) und somit eine mögliche therapeutische Perspektive für zukünftige klinische Anwendungen eröffnet.

2. LITERATURDISKUSSION

2.1. Schädel-Hirn-Trauma

2.1.1. Definition

Eine Schädel-Hirn-Verletzung bzw. ein *Schädel-Hirn-Trauma* (SHT) wird definiert als eine Verletzung des Schädels und/oder des Gehirns durch eine äußere Druck- bzw. Krafteinwirkung. Dies kann eine Funktionsänderung des Gehirns zur Folge haben und/oder zu Symptomen einer Gehirnpathologie führen. Eine solche Verletzung kann mit einer Prellung oder Verletzung der Kopfschwarte, des knöchernen Schädels, der Gefäße und/oder der harten Hirnhaut einhergehen. Im Falle einer simultanen Verletzung der Weichteile und des Knochens sowie einer Ruptur der Dura mater besteht eine Verbindung des Schädelinneren mit der Außenwelt. Diese Konstellation wird als offenes SHT bezeichnet.

Die Diagnosefindung setzt sich aus vielfältigen Faktoren zusammen. Neben Unfallhergang und Zeitpunkt, klinischer Untersuchung von Verletzungsmustern, zentral/peripherer neurologischer und/oder motorischer Defizite, werden diese Erkenntnisse heute durch Messung von Biomarkern und bildgebenden Verfahren gestützt (24).

Der 1974 erstmals veröffentlichte *Glasgow Coma Score* (GCS) (25) gilt bis heute als weltweit anerkannt. Er findet Anwendung als numerisches Bewertungsschema zur Beurteilung der Bewusstseinslage. Da die veränderte Bewusstseinslage im direkten Zusammenhang mit einer Funktionsstörung des Gehirns steht, lassen sich mit Hilfe der Kategorisierung auch direkte Rückschlüsse auf die Schwere des SHT ziehen (26). Ebenso dient die Skala zur Überwachung des Patienten, zur Verlaufsbeurteilung und zur Feststellung der Notwendigkeit von therapeutischen Maßnahmen (26).

Die Bewertung der Bewusstseins Einschränkung eines Patienten erfolgt in drei Teilbereichen. 1. Augen öffnen (1-4 Punkte), 2. die beste verbale Reaktion (1-5 Punkte) und 3. die beste motorische Reaktion (1-6 Punkte). Nach Beobachtung der Reaktionen werden die erreichten Punktzahlen addiert und ergeben eine Gesamtpunktzahl. Auf der Skala können Punktwerte im Bereich von 3-15 Punkten erzielt werden. Interpretiert wird der Schweregrad eines

SHT wie folgt: leichtes SHT (GCS-Score 13-15), mittelschweres SHT (GCS-Score 9-12) und ein schweres SHT (GCS-Score ≤ 8) (27). Aus der Klassifizierung des Schweregrads eines Schädel-Hirn-Traumas anhand der *Glasgow Coma Scale*, ergibt sich ein Wert, mit dessen Hilfe unmittelbare adäquate Therapieentscheidungen getroffen werden können. Eine prognostische Beurteilung des Krankheitsverlaufs ist anhand des GCS jedoch limitiert. Hierzu müssen weitere Faktoren wie beispielsweise: Komorbiditäten, Vorerkrankungen, Alter, Verletzungsmuster/-lokalisation und Hirndruckverhältnisse hinzugezogen und berücksichtigt werden (27).

2.1.2. Epidemiologie

Die Traumatischen Hirnverletzungen stellen weltweit ein großes gesundheitliches und sozioökonomisches Problem dar. Sie sind sowohl in Entwicklungsländern, als auch Industriestaaten verbreitet und betreffen Menschen aller Altersgruppen (2). Traumatische Hirnverletzungen haben die höchste Inzidenz aller gängigen neurologischen Erkrankungen (1). In der weltweiten Betrachtung nimmt die Häufigkeit von Schädel-Hirn-Traumata zu (5) und in Zukunft könnte das Krankheitsbild bis 2030 eine der drei häufigsten Ursachen für verletzungsbedingte Todesfälle und Behinderungen werden (1). Jährlich erleiden global betrachtet etwa 10 Millionen Menschen ein SHT (3, 4). Schädel-Hirn-Traumata stellen die Hauptursache für Tod und Behinderung bei Menschen unter 45 Jahren dar (6). Es wird geschätzt, dass etwa 57 Millionen, der derzeit lebenden Menschen weltweit eine Hirnverletzung erlitten haben (6). Die Hälfte der erwachsenen Patienten, die mit einem leichten SHT ins Krankenhaus eingeliefert werden, erreicht bis zu sechs Monate nach der Verletzung, nicht wieder den Gesundheitszustand wie vor dem Trauma (1). Die Mortalitätsrate weist insbesondere bei schwerwiegenden traumatischen Hirnverletzungen eine signifikante Erhöhung auf. Es wird angenommen, dass jährlich etwa 1,5 bis 2 Millionen Menschen weltweit an den Folgen eines Schädel-Hirn-Traumas sterben (5).

Die Auswertung statistischer Daten aus europäischen Ländern ergibt eine Prävalenz von ca. 235 Hirnverletzungen pro 100.000 Menschen und Jahr, die durch ein Trauma bedingt sind. Die Mortalitätsrate liegt bei durchschnittlich 15 Fällen pro 100.000 Menschen und Jahr. Dies

entspricht einer Todesfallrate von 2,7 Prozent (%). Darstellen lässt sich auch, dass Stürze (30-40 %) derzeit die häufigste Ursache für ein SHT in Europa sind (2). Abgesehen von der akuten Erkrankungssituation sind in der europäischen Union etwa 7,7 Millionen Menschen von Langzeitschäden nach einem SHT betroffen (5).

Allein in den USA erleiden jährlich etwa 1,7 Millionen Menschen ein SHT und etwa 5,3 Millionen Menschen leben mit einer Trauma assoziierten Behinderung (6, 28). Von den auftretenden Schädel-Hirn-Traumata ist die überwiegende Mehrheit leicht bis mittelschwer und macht 80-95 % der Fälle aus (29).

In Ländern mit niedrigem Einkommen sind die meisten Patienten mit SHT junge erwachsene Männer, die bei Verkehrsunfällen oft als ungeschützte Verkehrsteilnehmer wie Fußgänger, Radfahrer und Motorradfahrer verletzt werden. Die zunehmende Motorisierung der Bevölkerung in Verbindung mit unzureichender Verkehrserziehung und langsamer Umsetzung von Verkehrssicherheitsvorschriften sind die Hauptursachen für die hohe Anzahl von Schädel-Hirn-Traumata.

In Ländern mit hohem Einkommen hingegen sind Menschen mit Schädel-Hirn-Verletzung in der Regel Insassen von Kraftfahrzeugen (5). In diesen gibt es seit Jahrzehnten eine Verschiebung zu älteren Altersgruppen. Präventivmaßnahmen haben die Verkehrssicherheit verbessert und die Inzidenz von Schädel-Hirn-Traumata in Zusammenhang mit Verkehrsunfällen verringert. Die absolute Inzidenz bei älteren Menschen nimmt jedoch zu, was auf die höhere Lebenserwartung und Mobilität zurückzuführen ist. Menschen über 75 Jahre weisen dabei die höchste Inzidenz von Krankenhausaufenthalten im Zusammenhang mit Schädel-Hirn-Traumata auf. Schädel-Hirn-Verletzungen mit Todesfolge treten in dieser Gruppe häufiger auf als in jeder anderen Altersgruppe. Prognostische negative Faktoren bei älteren Patienten sind häufig multiple Vorerkrankungen und Polypharmazie, *unter Umständen* (u. U.) auch Gerinnungshemmer und Thrombozytenaggregationshemmer. Dadurch besteht ein hohes Risiko für hämorrhagische Prellungen und intrakranielle Blutungen (5).

2.1.3. Pathophysiologie

Der Aktivator eines Schädel Hirn-Traumas ist eine äußere Krafteinwirkung auf das Gehirn. In der Folge kommt es zur einer heterogenen und komplexen Kaskade von Mechanismen, wobei hier zwischen primärem und sekundärem Hirnschaden unterschieden wird.

Der primäre Hirnschaden ist ein substantieller Defekt, der auf direkte und fokale mechanische Krafteinwirkung zurückzuführen ist und durch unmittelbaren Zelluntergang (Apoptose, Nekrose) irreversibel ist. Daher werden Präventivmaßnahmen, wie beispielsweise die Helmpflicht, die Befolgung von Verkehrsregeln sowie Maßnahmen zur Sturzprävention, als einzige erfolgversprechende Instrumente zur Vermeidung von Primären Hirnschaden erachtet (7-9).

In der Folge des primären Schadens manifestiert sich ein sekundärer Hirnschaden. In einer ausgedehnten Phase (Minuten, Stunden, Tagen und Wochen) (9) spielen sich komplexe pathologische Prozesse ab. Die initiierten zellulären/molekularen Signalwege gelten als reversibel sowie beeinflussbar (7) und stehen deshalb im Fokus der wissenschaftlichen Forschung. Das „Spielfeld“ des sekundären Hirnschadens wird als traumatische Penumbra bezeichnet (30). Diese schließt sich territorial unmittelbar an die primäre Läsion an und breitet sich durch die sekundären zellulären und molekularen Mechanismen u. U. um ein Vielfaches der primären Größe aus (31).

Die Zielsetzung ist es, über das Verständnis dieser Kaskaden, Therapieansätze zu etablieren und potenzielle Interventionsmöglichkeiten weiterzuentwickeln, um die traumatische Penumbra vor Gewebsuntergang durch Nekrose und Apoptose zu schützen und damit direkt das neurologische “Outcome“ der Patienten nach SHT zu verbessern (7, 31, 32).

2.1.3.1. Primärer Hirnschaden

Die biomechanischen Verletzungen des SHT-assoziierten primären Hirnschadens können zu fokalen Verletzungsmustern aus Kontusion, Riss/ Quetschwunden und intrakraniellen Blutungen führen (9). Aufgrund von

physikalischen Beschleunigungs- bzw. Verzögerungskräften, kommt es auch zu multifokalen und diffusen axonalen Verletzungen, Hirnödemen oder mikrovaskulären Verletzungen in entfernteren Hirnarealen (8). Besonderes Augenmerk ist hier auf die *Diffuse Axonal Injury* (DAI) zu richten. Klinisch wird dieser Typus in Verbindung mit einer initialen Vigilanzminderung, bis hin zu einem anhaltenden Koma gebracht und korreliert mit dem Schweregrad des Hirnschadens (33).

Durch *Magnetresonanztomographie* (MRT) lässt sich die Ausprägung eines DAI darstellen und somit eine prognostische Beurteilung des kurz- sowie langfristigen Krankheitsverlaufes treffen (34). Auch viele Jahre nach einem SHT kann der initial entstandene DAI langanhaltend neurodegenerative Prozesse negativ beeinflussen (33). Hierdurch erklärt sich ein elementarer Zusammenhang zwischen dem DAI und der Mortalität bzw. der Morbidität von Patienten.

Durch eine direkte mechanische Einwirkung auf Axone kommt es zur Zerstörung des neuronalen Zytoskellets, wodurch der axoplasmatische Transport unterbrochen wird. Dies führt über verschiedene intrazelluläre Prozesse zur Schwellung und Proteolyse der geschädigten Axone (35). In diesem Prozess kommt es u. a. zu überschießendem intrazellulären Calcium-Einstrom, der zur unkontrollierten Glutamat-Freisetzung führt und damit eine Verbindung zur Exzitotoxizität des sekundären Hirnschadens bildet (36).

2.1.3.2. Sekundärer Hirnschaden und Neuroinflammation

Die Neuroinflammation spielt eine entscheidende Rolle bei verschiedenen neurologischen Erkrankungen, die als "entzündlich" (u.a. Multiple Sklerose oder Gefäßerkrankungen) bzw. als "nicht entzündlich" eingestuft werden, wie z.B. Alzheimer Disease (AD), Morbus Parkinson, amyotrophe Lateralsklerose, Apoplex und SHT. Dies hat unmittelbare Konsequenzen für die Genese und Progression der Erkrankung (37).

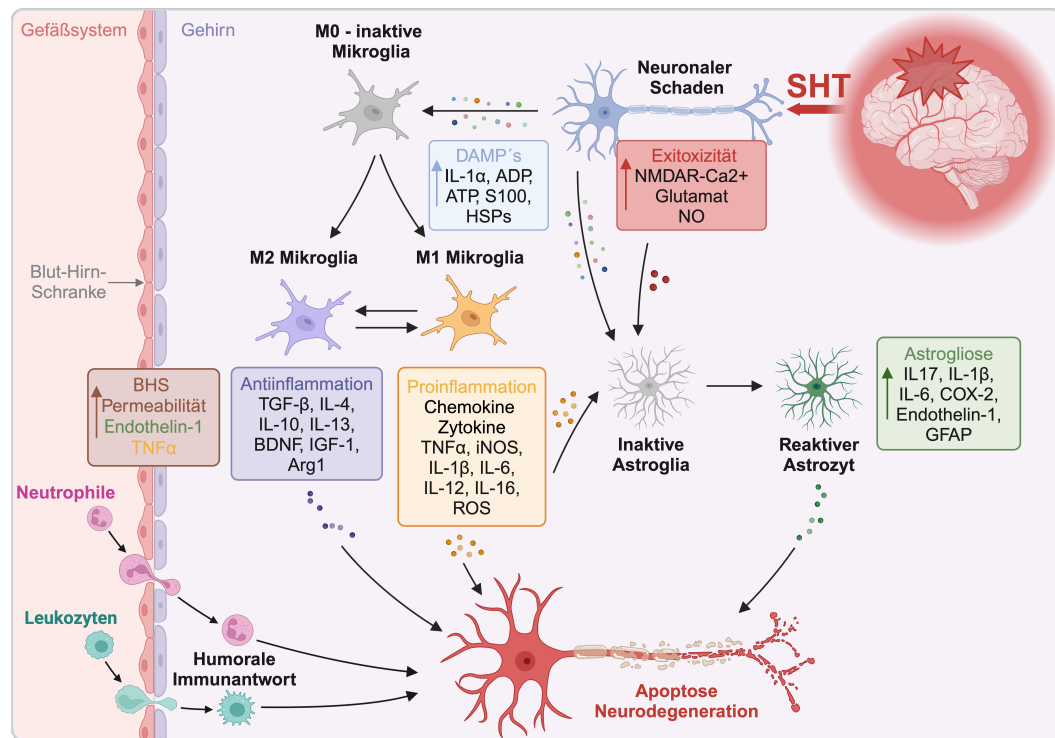


Abbildung 1: Illustration der Neuroinflammation nach SHT

Schematische und vereinfachte Übersicht neuroinflammatorischer Prozesse nach SHT. Erstellt mit Biorender.com und modifiziert nach Bourgeois-Tardif et al. (38), Loane et al. (39), Chiu et al. (9)

Ausgelöst durch den Zellschaden des primären Läsionsgebietes nach SHT, verändern ehemals intrazelluläre Bestandteile des Zytoplasmas das Milieu des Extrazellularraums, wodurch funktionsfähige Zellen beeinflusst werden. Die Exzitotoxizität wird durch übermäßigen Glutamat-Anstieg initiiert (36). Glutamat als exzitatorischer Transmitter öffnet *N-Methyl-D-Aspartat Rezeptoren* (NMDAR), durch die ein verstärkter intrazellulärer Einstrom von Calcium (Calcium influx) entsteht (40). Die neuronale Zelle reagiert mit Depolarisation und treibt damit einen weiteren Calcium-Einstrom über spannungsgesteuerte Ionenkanäle und eine Glutamat-Freisetzung voran (41). Zur Aufrechterhaltung der intrazellulären Hämostase benötigt die Zelle einen erhöhten Energiebedarf, der über einen oxidativen Metabolismus sichergestellt wird (42). Dieser kann durch verminderten Blutfluss und einen Defizit des Sauerstoffangebotes nach Primärschaden, nur vermehrt über einen anaeroben Stoffwechsel zur Verfügung gestellt werden (41, 43). In Konsequenz führt ein gesteigerter Laktatgehalt zu einem azidotischem Milieu und einer Ödembildung.

Die Neuroinflammation wird aufgrund des Fehlens eines exogenen Pathogens auch als steriler Entzündungsprozess bezeichnet (44) und

nimmt eine wesentliche Rolle in der Pathogenese des sekundären Hirnschadens ein. Demgegenüber steht eine Inflammation durch eine Infektion, bei der das Immunsystem mikrobielle Moleküle über sogenannte *Pathogen-associated Molecular Patterns* (PAMPs) erkennt und über spezielle intra- und extrazelluläre Rezeptoren *Pattern-Recognition-Rezeptoren* (PRPs) bindet (45).

Zu den Auslösern der Neuroinflammation zählen u.a. Alarmin-Moleküle, die sich in der Folge eines nicht-apoptotischen Zelluntergang im Extrazellularraum anreichern (44). Durch die spezifischen biochemischen Muster der Alarmine binden diese, ähnlich zu PAMPs, auch an speziellen PRPs. Auch Zellen des Immunsystems können aktiv verschiedene Alarmine freisetzen (44). Hierzu zählen u. a. *Interleukin-1 α* (IL-1 α), *Adenosindiphosphat* (ADP), *Adenosintriphosphat* (ATP), *Heat Shock Proteins* (HSPs) und S100-Proteine.

Residente Mikroglia sind Träger der PRPs und schließen sich nach Aktivierung durch Alarmine oder PAMPs zu *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) zusammen. Die Bindung an PRPs löst intrazelluläre Signaltransduktionswege aus, die zur Ausschüttung pro-inflammatorischer Mediatoren, u. a. Chemokine führen und über weitere zelltypabhängige Aktivierungen eine komplexe Immunantwort auslösen (46, 47).

Als erste aktive Einheit des ZNS-eigenen Abwehrsystems sind im Läsionsgebiet die Zellen der Mikroglia aktiviert (48, 49). Mikroglia proliferieren und bilden hin zum Schadensgebiet vermehrt Verzweigungen und ermöglichen die Migration weiterer peripherer Mikrogliazellen zu den geschädigten Neuronen (50). Zusätzlich phagozytieren sie funktionsloses Nervenzellgewebe, wodurch die synaptische Plastizität (48, 51) unterstützt und das Überleben angrenzender Neuronen gefördert wird (44, 52).

Die als *Immediate-Early-Gene* (IEG) bezeichneten Gene gehören zu einer Gruppe von Genen, deren Transkription innerhalb von wenigen Minuten nach der Stimulation in einer neuronalen Zelle erfolgt (53). Daher eignen sie sich als Marker für neuronale Aktivität. Im Kontext eines SHT sind insbesondere die Vertreter Arc und c-Fos von Relevanz. Das aktivitätsregulierte, mit dem Zytoskelett assoziierte IEG *Activity-regulated cytoskeleton associated protein* (Arc) stellt einen Regulator der synaptischen Plastizität dar, sodass es als Marker zur Evaluation der

Zellplastizität in verschiedenen pathologischen und zellulären Kontexten dienen kann (54-56). Erstmals wurde das c-Fos-Gen als Proto-Onkogen beschrieben. In einer Vielzahl von Studien wird c-Fos bislang als Marker für die neuronale Gehirnaktivität verwendet. Auch Gliazellen sind in der Lage, dieses Proto-Onkogen zu exprimieren. In der Literatur gewinnt c-Fos daher als Aktivitätsmarker von Gliazellen zunehmend an Bedeutung (57, 58).

Die Hauptaufgabe der aktivierten Mikroglia wird durch die modulierte Genexpression bestimmt und unterscheidet sich in den sezernierten Modulatoren. Die Mikroglia lässt sich in drei Differenzierungsstufen einteilen, welche als M0, M1 und M2 bezeichnet werden. Dabei wird die M0-Mikroglia als nicht-aktivierte, homeostatische Mikroglia definiert, während die M1-Mikroglia als klassisch aktivierte Mikroglia und die M2-Mikroglia als alternativ aktivierte Mikroglia bezeichnet wird (59). In den vergangenen Jahre unterlag diese vereinfachte Klassifizierung einer wiederholten Revision bzw. Erweiterung. Nach wie vor bietet sie allerdings die Möglichkeit, grundlegende Aktivierungszustände von Mikroglia zu beschreiben (39, 59). M1-Mikroglia werden potenziell als neurotoxisch angesehen, da sie pro-inflammatorische Zytokine wie *Tumornekrosefaktor alpha* (TNF- α), *Interleukin-1 β* (IL-1 β), *Interleukin-12* (IL-12), *Interleukin-6* (IL-6) sowie *reaktive Sauerstoffspezies* (Reactive Oxygen Species, ROS) und den Botenstoff Glutamat freisetzen. M2-Mikroglia werden in Verbindung mit verschiedenen neuroprotektiven Effekten gebracht, da sie antiinflammatorische Zytokine freisetzen, welche mit der Auflösung von weiteren Entzündungsprozessen assoziiert werden. Dazu gehören beispielsweise *Transforming Growth Factor beta* (TGF- β), *Interleukin 10* (IL-10), *Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF), *Insulin-like Growth Factor 1* (IGF-1), *Interleukin 4* (IL-4), *Interleukin 13* (IL-13) und *Arginase 1* (Arg1). (60)

Nach einem SHT gibt es zunächst eine transiente Phase mit überwiegender M2-Aktivität, der sich eine protrahierte neurologische M1-dominante Phase anschließt und bei chronischer Aktivierung u. a. Neuronen demyelinisiert (61). Neben dem theoretischen Ansatz der gezielten Aktivierung der M1- und M2-Polarisierung wird die M1/M2-Aktivität im physiologischen

zentralen Nervensystem (ZNS) als anpassungsfähig und heterogen sowie als reversibles Zusammenspiel betrachtet, wobei eine klare Abgrenzung der einzelnen Komponenten hier kaum möglich erscheint (50). Die wissenschaftlichen Erkenntnisse geben keine eindeutige Erklärung dafür, welche Mikroglia-Aktivität schlussendlich das direkte "Outcome" des Patienten negativ oder positiv verändert. Herauszustellen ist allerdings, dass u. a. die Schwere eines Schädel-Hirn-Traumas und die Konstellation der Immunantwort direkte proportionale Auswirkung auf die Aktivierung der Mikroglia hat (50, 62, 63).

Die mikrogliale Aktivität nach SHT stellt eine dynamische Reaktion dar. Das *Ionized Calcium-Binding Adapter Molecule 1* (Iba1) dient als allgemeiner Inflammationsmarker sowie als Aktivitätsmarker der Mikroglia. Es wird von Mikrogliazellen und Makrophagen exprimiert. Die Expression des Gens ist bei einer Vielzahl von Erkrankungen des ZNS erhöht. U. a. bei Inflammationen, zerebraler Ischämie und CCI kann ein hohes Expressionsniveau detektiert werden (64). Ein weiterer Aktivitätsmarker ist der *major histocompatibility complex class II* (MHC2). Als Oberflächenprotein von Makrophagen und dendritischen Zellen spielt es eine wesentliche Rolle bei der Erkennung und Präsentation von Antigenen. Die betreffenden Zellen fungieren als Antigenpräsentierende Zellen, wodurch eine humorale Immunantwort ausgelöst wird (65, 66).

Die Steuerung des Umfangs und der Regulation einer Immunreaktion erfolgen maßgeblich durch die Ausschüttung und Wirkung der pro- und anti-inflammatorischen Zytokine (67). Eine Zusammenfassung der wichtigsten Zytokine mit deren Eigenschaften werden im nächsten Abschnitt näher dargestellt.

IL-1 β und TNF- α aktivieren immunkompetente Zellen und lenken diese zum Schadensbereich. Es resultiert eine Immunantwort, die die Apoptose und Ödembildung antreibt (60). Aktiviert werden beide Zytokine, u. a. durch Sauerstoffradikale. Zwischen beiden herrschen synergetische Effekte, die ihre Wirksamkeit beiderseits verstärken (68). IL-1 β wird von dendritischen Zellen und zirkulierenden Monozyten sezerniert. In zahlreichen Studien konnte nachgewiesen werden, dass das Zytokin an akuten neuronalen Defekten und chronischen degenerativen Abläufen,

infolge traumatischer Hirnschädigung, beteiligt ist. Daher kann es als pro-inflammatorischer Marker herangezogen werden (69, 70).

Ein weiterer Inflammationsmarker ist das Interleukin 6. IL-6 hat das höchste Expressionslevel in den ersten Stunden bis Tagen nach SHT (71) und fungiert mit Bindung an den löslichen IL-6 Rezeptor über sogenanntes "trans-signaling" als pro-inflammatorischer Faktor (72). Dies korreliert mit einem schlechteren "Outcome" nach SHT (73). Ein neuroprotektiver Effekt entsteht über die physiologische Bindung an membranständige IL-6-Rezeptoren, wodurch die Expression von ROS verringert wird (60). Oxidativer Stress wird somit gebremst und beeinflusst den Regeneration, sowie das Überleben von Neuronen positiv (60, 74).

Der Inflammationsmediator TNF- α wirkt über verschiedene Mechanismen auf die Permeabilität der *Blut-Hirn-Schranke* (BHS) ein, wodurch das Einwandern peripherer Zellen möglich wird. Dies trägt zum Umfang des sekundären Hirnschadens bei (60). Demgegenüber steht ein positiver Effekt durch die Stimulation des *Nerve Growth Factor* (NGF), welcher zur Protektion und zum dem Überleben von Axonen nach SHT führt (60).

IL-10 werden ausschließlich neuroprotektive Eigenschaften nachgewiesen. Es unterdrückt Mikroglia sowie Astrozyten in ihrer Aktivität, wodurch auch die pro-inflammatorischen Faktoren TNF- α und ROS gehemmt werden (60).

Aus der Gruppe der Wachstumsfaktoren stammen: NGF, BDNF und IGF-1. Allgemein gelten diese Faktoren als neurotropisch aktiv und können die funktionelle Regeneration verbessern, sowie die Apoptose reduzieren (68, 75). IGF-1 beispielsweise wird durch Astrozyten ausgeschüttet und kann nachweislich das Ausmaß von Zelltod sowie motorischen und kognitiven Defiziten nach SHT reduzieren (76).

Neben der bereits o. g. Mikroglia, zählen die Astrozyten zur größten nicht-neuronalen Zellpopulation und sind ebenfalls Hauptdarsteller der zellulären Antwort während der Neuroinflammation im Rahmen einer Schädelhirnverletzung (77). In Kooperation mit der Mikroglia, haben die Astrozyten neurotrophische, strukturelle und metabolische Aufgaben (78). Analog zu den Zustandsformen der Mikroglia und deren potenziell neuroprotektiven bzw. neurotoxischen Ausprägung, lassen sich auch die

Aktivitäten der Astrozyten unterschiedlich beschreiben (77). Beispielhaft zu nennen ist der protektive Effekt über die Ausschüttung von antioxidativem Glutathion zur Wiederherstellung der BHS und der Rückbildung eines Hirnödems (79). Im Gegensatz dazu steht ein negativer Aktivierungszustand, der über IL-17 und eine erhöhte Produktion des Transkriptionsfaktors *Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B Cells* (NF- κ B) und die damit verbundene Ausschüttung pro-inflammatorischer Moleküle (u. a. IL-6, COX-2) die Bildung eines Hirnödems fördert (80). Die Enzymexpression der *Cyclooxygenase-2* (COX-2) wird durch NF- κ B induziert, was zu einer Hochregulierung der Synthese von Entzündungsmediatoren, u. a. Prostaglandin E₂, führt (81). Die spezifischen Effekte des COX-2 während der Neuroinflammation sind bislang nicht vollständig erforscht. Jedoch deuten Untersuchungen darauf hin, dass eine ausgeprägte Expression zum Untergang von Mikroglia und damit zu einer Reduktion neuroinflammatorischer Prozesse führt (82, 83).

Die zelluläre Antwort der Mikroglia sowie der Astrozyten ist insgesamt sehr heterogen. In der Interaktion zwischen beiden Akteuren kommt es bei gesteigerten sekretorischen Aktivitäten des einen zur Verringerung der Aktivität des anderen (61).

Das Zusammenspiel mit Mikroglia konnte u. a. durch die Initiierung der astrozytären Migration und durch eine gemeinsame Phagozytose von Zellfragmenten nachgewiesen werden (43). Das physiologische Aufgabenfeld der Astrozyten besteht im Wesentlichen darin, die Hämostase mit Hilfe von Ionen und Transmittern zu stabilisieren sowie mit der Resorption von Glutamat auf die synaptische Aktivität Einfluss zu nehmen (61, 78). Aktiviert durch den übermäßigen Calcium-Einstrom über mechanosensitive Kanäle und einen erhöhten ATP-Gehalt nach SHT Primärschaden, wird die Astrozytenaktivierung stimuliert (61). Die Zustandsform ändert sich hin zu den reaktiven Astrozyten (84). Der gesamte Prozess, beginnend bei der Aktivierung der Zellen bis hin zu pathologischen bzw. physiologischen Vorgängen, wird als Astrogliose bezeichnet (61, 79). Diese hat prinzipiell eine neuroprotektive Zielsetzung (76).

Die Abgrenzung des Schadensgebiets von angrenzenden, intakten Hirnregionen erfolgt durch die Beteiligung der reaktiven Astrozyten an der

Bildung einer Glianarbe. Dies führt zu einer Eindämmung der Ausbreitung des Entzündungsgebietes (61, 85). Prinzipiell ist dieser Mechanismus als positiv und produktiv zu bewerten. Langfristig führt dies jedoch zu einer deutlichen Einschränkung der funktionellen Wiederherstellung und Reinnervation von geschädigten Axonen (61). In Bezug auf diesen Prozess lassen sich verschiedene Marker heranziehen, um die Aktivität von Astrozyten zu analysieren. Dazu gehören u. a. das zu den Intermediärfilamenten zugehörige *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) und das Vimentin, als Baustein des Zytoskeletts (79). Die pathophysiologisch gesteigerte astrozytäre Aktivität lässt sich durch die gesteigerte Bildung von GFAP nachweisen (41, 86, 87). Nach einem neuronalen Schaden bildet sich durch GFAP eine Glianarbe im betroffenen Nervengewebe aus (88). GFAP kann als ein Aktivitätsmarker für Astrozyten sowie als Verlaufsmarker für reaktive Astroglia, die Gesamtheit der aktiven Astrozyten, fungieren (85, 89). Reaktive Astrozyten sezernieren und resorbieren verschiedene Mediatoren, wodurch sie elementar dazu beitragen, molekulare Trigger anderer Immunzellen auszulösen und damit das gesamte Aktivitätsniveau der Immunreaktion zu steigern (85, 89). Zu den molekularen Triggern zählen u.a. Alarmine, wie ATP, Zytokine, ROS und Glutamat (79, 85). Mit der Resorption von Glutamat wirken Astrozyten aktiv gegen dessen Exzitotoxizität und durch Ausschüttung von Antioxidanzien werden Schäden der ROS eingedämmt (79, 85).

Als essentieller Bestandteil der BHS können Astrozyten durch Ausschüttung des Peptidhormons Endothelin-1 die Barrierefunktion über dessen Permeabilität verändern (90). Zu einer gesteigerten Permeabilität der BHS nach einem Schädel Hirn-Trauma kommt es folglich durch die aktive Beteiligung von Astrozyten (Endothelin-1) und unter Einwirkung von Zytokinen (z. B. TNF- α) (85). Dieser Zustand begünstigt u.a. die Ausschwemmung verschiedener Mediatoren und Zellfragmenten, was wiederum die Aktivierung und Einwanderungen von peripheren Immunzellen in das ZNS zur Folge hat. Der Zustrom ins Schadensgebiet erfolgt durch die Vorläufer der Makrophagen, die Monozyten, innerhalb von Tagen (91) und neutrophilen Granulozyten innerhalb von Stunden (92). Die Neuroinflammation wird dadurch entscheidend gefördert (61, 63). Wird die

neutrophile Beteiligung bzw. deren Effekte aktiv verhindert oder unterbunden, hat dies Einfluss auf die Größe des Schadensgebietes (93). Separat betrachtet lassen sich allerdings auch von Grund auf positive Effekte der Aktivität der neutrophilen Granulozyten und Makrophagen darstellen. Diese tragen zur einer Regeneration und Wiederherstellung von Gewebsschäden bei (50). Die Funktion der Makrophagen bei inflammatorischen Mechanismen und deren Chemokin-Ausstattung zeigen Analogien zu der von Mikroglia (94).

Infolge der Disintegrität der BHS erfolgt ein Übertritt von Blutbestandteilen in das ZNS. Dieser Prozess wird als Extravasation bezeichnet. Die Quantifizierung des *Immunglobulins G* (IgG) im Hirngewebe kann als Indikator für eine Extravasation bzw. eine eingeschränkte BHS-Funktion herangezogen werden (61, 95). IgG-Antikörper im Blutplasma stellen einen Bestandteil der humoralen bzw. sekundären Immunantwort dar. Der primäre Zelltod sowie die Dysfunktion der BHS stellen wesentliche Einflussfaktoren in Bezug auf die durch Glutamat induzierte Exzitotoxizität dar und spielen damit eine entscheidende Rolle in den Prozessen der sekundären Neuroinflammation bzw. letztlich des neuronalen Zelltods (36, 96, 97). Die zuvor dargelegte Annahme wird durch die Ergebnisse von Thom et al. Teilweise negiert. Danach lässt sich ableiten, dass IgG auch im ZNS von Neuronen synthetisiert werden kann und nach einem neuronalem Schadensereignis neuroprotektive Eigenschaften aufweist (98). Neben dem physiologisch vorkommenden IgG, werden dem s.g. *Intravenösen Immunglobulin G* (IVIg) umfangreiche neuromodulative und neuroprotektive Effekte zugeschrieben. IVIg ist ein gereinigtes, homologes und humanes Immunglobulinpräparat, das hauptsächlich aus IgG besteht und aus dem gepoolten Spenderplasma hergestellt wird (99). In der klinischen Praxis findet IVIg vielfach Anwendung bei der Behandlung diverser Entzündungs- und Autoimmunerkrankungen wie u.a. multipler Sklerose, systemischem Lupus erythematodes, rheumatoider Arthritis und Sklerodermie (100, 101). Darunter auch neurologischer Erkrankungen wie die multifokale motorische Neuropathie, die chronisch-entzündliche demyelinisierende Polyneuropathie und des Guillain-Barré-Syndroms (98, 102). Neueste Forschungsergebnisse legen nahe, dass IVIg auch die neuroprotektive Effekte bei erworbenen ZNS-Verletzungen,

Apoplex (101) und SHT (103) aufweist. Die Zusammensetzung eines IVIG-Präparats wird zu über 90 % durch IgG-Moleküle bestimmt. Es wird postuliert, dass diese den Hauptvermittler der therapeutischen Wirksamkeit darstellen (98). Die genauen immunregulatorischen Mechanismen von IVIG bei Verletzungen des ZNS sind gegenwärtig noch nicht hinreichend erforscht (99). Die Struktur des IgG-Moleküls umfasst eine variable, antigenbindende F(ab')₂-Domäne sowie eine konstante Fc-Region (98). Der Fc-Teil von IgG bindet an *Fc-Rezeptoren* (FcγR), welche sich auf der Oberfläche der überwiegenden Mehrheit von Immunzellen befinden. FcγRs sind entweder als stimulierend (FcγRI, FcγRIII und FcγRIV) oder inhibierend (FcγRIIB) klassifiziert werden. Eine Kombination aus aktivierenden und hemmenden FcγRs wird von allen myeloischen Zellen exprimiert. Es wird postuliert, dass insbesondere die Aktivierung des inhibitorischen FcγRIIB-Rezeptors am Wirkmechanismus von IVIG beteiligt ist (99).

Die innerhalb der Penumbra voranschreitende Neuroinflammation ist des Weiteren durch Neurotrophine, eine spezielle Gruppe von Signalmolekülen, beeinflusst. Zu diesen zählen u.a. Neurotrophin-3, Neurotrophin-4, BDNF sowie NGF. Nachgewiesen wurde dieser Gruppe eine Rolle bzgl. synaptischer Plastizität, des neuronalen Überlebens sowie eine Beeinflussung auf axonales Wachstums (104). Laut aktueller Erkenntnisse, sind die Effekte der Neurotrophine nach Hirntrauma in Gänze nicht eindeutig der Neuroprotektion bzw. der Neurodegeneration zuzuordnen (104). Eher negative Anzeichen und Hinweise gibt es allerdings über das Vorläuferprotein proBDNF, dass potentiell zu den Triggern der Apoptose zählen könnte (105).

Das Protein Spektrin ist ein Bestandteil des axonalen Zytoskeletts. Die Detektion des vermehrten Anfalls an Spektrin-Spaltprodukten nach einem SHT, kann somit einen Hinweis auf eine intrazelluläre Calcium-Erhöhung, die Aktivierung von Proteasen, wie Calpain oder Caspasen (106), mitochondriale Funktionsbeeinträchtigungen, axonale Schädigung sowie einen neuronalen Untergang im untersuchten Gewebe geben (107). In der

Konsequenz lässt sich festhalten, dass Spektrin als Marker für das Ausmaß von neuronalem Zelltod anzusehen ist (108).

Neben den bisher dargestellten zellulären Aspekten der Immunantwort, sind weitere Faktoren an Entzündungsprozessen beteiligt. Dazu gehören u.a. die auf Plasmaproteinen basierende humorale Immunabwehr mit ihren Antikörpern, Komplementfaktoren und Interleukinen sowie die membrangebundenen Komponenten der extrazellulären Matrix. Für die Reorganisation der extrazellulären Matrix im physiologisch gesunden menschlichen Gehirn sind die *A Disintegrin and Metalloproteinase 10* (ADAM10) sowie die Gruppe der *Matrix-Metalloproteinasen* (MMP) von entscheidender Bedeutung (109).

In einer pathophysiologischen Neuroinflammation fällt nachweislich eine erhöhte Konzentration von MMPs an, die dem Funktionsverlust der BHS beiträgt und in Folge den apoptotischen Zelltod unterstützt (109). Die ebenfalls pro-apoptotischen Effekte von ADAM10 resultieren in erster Linie aus der Induktion eines Anstiegs der Caspasen, welche die Entstehung eines Hirnödems fördern (109). Eine verlängerte Aktivierung von ADAM10 hat eine schädliche Tendenz und zeigt im zeitlichen Verlauf eine Hemmung der neurologisch funktionellen Regeneration (110).

2.1.4. Langzeitfolgen und Therapieansätze

Ein SHT kann zu neurokognitiven Defiziten oder zu psychologischen Gesundheitsproblemen führen. Es hat sich gezeigt, dass 30-70 % der Überlebenden eines SHT eine Depression entwickeln. Außerdem zeigten sich bei Untersuchungen Defizite in Form von Aufmerksamkeitsstörungen, erhöhter Impulsivität, schlechte Entscheidungsfindung und impulsiv-aggressives Verhalten. Die Beeinträchtigungen von sozialen Funktionen können zu Störungen zwischenmenschlicher Beziehungen führen, zu einer schlechten Integration in die Gesellschaft beitragen und zu verminderten Arbeitsfähigkeit führen (1). Unter Umständen kann dies zu einer langfristigen Behandlung oder zur Unterbringung in einer Einrichtung führen (5). Die Folgen eines SHT werden u. a. deshalb auch als ein multifaktorielles bio-psycho-sozial-ökologischen Modell beschrieben (1).

Eine Schädel-Hirn-Verletzung wird neben der akuten Erkrankung, auch als chronische Erkrankung mit stark erhöhtem Risiko für neurodegenerative und neuropsychiatrische Störungen (111) mit langfristigen Folgen dokumentiert. Verschiedene Untersuchungen zur Genexpression zeigen eine gesteigerte Aktivierung von Schlüsselwegen, welche die Pathogenese von Alzheimer und Parkinson beeinflussen. Diese Aktivierung kann durch eine leichte, mittelschwere oder schwere Form eines SHT ausgelöst werden. In der Folge besteht das Risiko, dass es zu einem frühzeitigen Krankheitsausbruch von Morbus Alzheimer (112, 113) und anderen neurodegenerativen Krankheiten, wie der Parkinson-Krankheit (114, 115), kommen kann. Eine weitere direkte neurodegenerative Spätfolge ist die SHT-spezifische Pathologie der chronischen traumatischen Enzephalopathie, die bei zum Beispiel (z. B.) Leistungssportlern auftreten kann (5). Des Weiteren besteht ein Zusammenhang mit multiplen Proteinopathien, die typischerweise mit einem breiten Spektrum von neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert werden (1). Dies kann bei einigen Patienten einen fortschreitenden kognitiven Verfall auslösen oder den altersbedingten kognitiven Verfall beschleunigen. In post mortem Analysen wurden bei Patientengruppen mit rezidivierenden leichten Schädel-Hirn-Traumata (Sportarten wie Boxen, Hockey, Fußball und American Football; Opfer von Kindesmissbrauch und Militärpersonal nach Explosionsverletzung) über erhöhte Tau-Ablagerungen berichtet. Darüber hinaus wurde bei Überlebenden eines einzelnen SHT, Jahrzehnte nach der Verletzung, eine beschleunigte altersbedingte Ablagerung von Amyloid- β festgestellt. Tau- sowie Amyloid- β -Ablagerungen stehen in einem direktem Zusammenhang mit der Entwicklung der Alzheimer-Krankheit. Beispielsweise die frontale temporale Demenz mit Parkinsonismus und die kortikobasale Degeneration. Insbesondere Männer und Personen mit einer genetischen Veranlagung sind von dieser Erkrankung betroffen (5). Etwa 3 % der auftretenden Demenzfälle in der Allgemeinbevölkerung sind auf eine traumatische Hirnverletzung zurückzuführen (1).

Die Strategie der klinischen Therapiemaßnahmen umfasst, in Abhängigkeit vom Schweregrad der Erkrankung, eine kombinierte intensivmedizinische und chirurgische Behandlung sowie gegebenenfalls eine sich

anschließende Rehabilitationsmaßnahme. Obgleich in den vergangenen Jahrzehnten eine flächendeckende und frühzeitige Diagnostik mittels der Computertomographie eine signifikante Steigerung der Behandlungsqualität traumatischer Hirnverletzungen zur Folge hatte, konnte bei einer hohen Inzidenz und einer damit einhergehenden gesellschaftlichen Relevanz sowie trotz kontinuierlicher Forschungsbemühungen keine nennenswerte Verbesserung der Behandlungsansätze erzielt werden. Der aktuelle therapeutische Ansatz zielt auf die Senkung des intrakraniellen Drucks und die Stabilisierung des zerebralen Perfusionsdrucks ab, wodurch die Aufrechterhaltung des zerebralen Blutflusses gewährleistet werden kann. (10). Die damit einhergehenden Maßnahmen sind ausschließlich darauf ausgerichtet, Defizite zu reduzieren und deren Rückbildung, sowie eine physiologische Wiederherstellung zu fördern. Bis heute existiert demnach kein expliziter und etablierter Ansatz zur therapeutischen oder pharmakologischen Intervention auf die aktiven Signalwege der pathophysiologischen Kaskaden des sekundären Hirnschadens.

2.1.5. Gesellschaftliche Bedeutung

Die in westlichen Ländern bereits beobachtete Tendenz einer Zunahme der Patientenzahlen in den älteren Bevölkerungsgruppen wird aufgrund des demographischen Wandels und der damit einhergehenden Überalterung der Gesellschaft auch in Zukunft anhalten. In der Konsequenz ist davon auszugehen, dass die Relevanz des SHT als Krankheitsbild weiter zunehmen wird. Der Faktor Alter hat einen deutlich nachweisbaren Einfluss auf die posttraumatische Mortalität. In der Altersgruppe unter 65 Jahren liegt die Mortalität bei ca. 30 %, wohingegen in der Altersgruppe über 65 Jahren ein erheblicher Anstieg auf ca. 50 % zu verzeichnen ist (116).

Bei der Betrachtung des Krankheitsbildes spielen soziale Herausforderungen sowie gesundheitsökonomische Aspekte eine außerordentlich bedeutsame Rolle. Es kann konstatiert werden, dass nahezu alle Überlebenden eines Schädel-Hirn-Traumas an einer Behinderung leiden (30). Aufgrund bereits beschriebener Komplikationen und Folgeerkrankungen sind bei Betroffenen noch Jahre bis Jahrzehnte nach einem SHT Einschränkungen

der Lebensqualität zu beobachten (117). In den Vereinigten Staaten von Amerika führten Daten aus dem Jahr 2010 zu einer signifikanten finanziellen Belastung. Das Sozialsystem ist mit Kosten in Höhe von 76,5 Milliarden US-Dollar für Patienten, die ein SHT erlitten haben, belastet. Der kleinere Teil der Kosten, rund 11,5 Milliarden US-Dollar, entfällt auf die direkten Kosten für die medizinische Versorgung und Rehabilitation. Der weitaus größere Teil, rund 64,8 Milliarden US-Dollar, entsteht durch wirtschaftliche Folgeschäden, beispielsweise durch den Verlust von Arbeitskräften (118).

2.2. Schädel-Hirn-Trauma in der experimentellen Forschung

2.2.1. Tierexperimentelle Forschungsmodelle

Das SHT am Menschen steht unter Einfluss vielfältiger Faktoren und Variablen. Die Ausprägung setzt sich aus dem komplexen Zusammenspiel von Art, Ort und Schwere der Verletzung sowie Vorerkrankungen, Alter, Geschlecht, Vormedikationen und Genetik zusammen.

Die Heterogenität der pathophysiologischen Vorgänge beim menschlichen SHT kann bisher von keinem der entwickelten Tiermodelle vollumfänglich imitiert werden (119). Die Versuchsmodelle haben gemeinsam, dass die Hauptvorteile in der ausgeprägten Kontrolle über die Verletzungsparameter, die Umwelteinflüsse, sowie über die Selektion des Alters, des Geschlechts und des genetischen Hintergrundes der Versuchstiere liegen. Dies führt zu homogenen Verletzungsmustern, die in den experimentellen Studien eine Aussagekraft zulassen (120). Die limitierte Verallgemeinerung von Forschungsergebnissen kann durch Diversifizierung der biologischen Variablen der Versuchstiere verbessert werden (121). Durch die Variabilität der humanen Schädel-Hirn-Traumata, muss bei der Auswahl des geeigneten Versuchsmodells abgewägt werden, in welchen spezifischen Zielbereichen die Defizite liegen und welches Modell hier deckungsgleiche Ergebnisse liefern kann (121).

Im funktionellen und strukturellen physiologischen Vergleich gibt es zwischen größeren Tieren (z. B. Schweinen und Hunden) und dem

menschlichen Gehirn weniger Differenzen. Allerdings werden Nagetiere u. a. wegen ihrer platzsparenden Haltungsform und der geringeren Unterhaltungskosten bevorzugt (120). Ein weiterer Vorteil sind vielfältige Möglichkeiten der genetischen Manipulationen. Die Verwendung der "Knock-out"- und "Knock-in Technologie" ermöglicht eine Validierung von genetisch/spezifischen pathologischen Mechanismen (9).

In der Fülle der unterschiedlichen Versuchsmodelle sollen in diesem Abschnitt drei der etabliertesten und meist genutzten Vertreter genannt werden (9): Das *Weight-Drop* (WD)-Verletzungsmodell, das *Fluid Percussion* (FP) bzw. *Lateral Fluid Percussion* (LFP)-Verletzungsmodell und das Controlled-Cortical-Impact (CCI)-Verletzungsmodell. Letzteres kommt in dieser Forschungsarbeit zum Einsatz.

Im Rahmen des WD-Verletzungsmodells erfolgt die Induktion einer Hirnkontusion durch die Kombination einer definierten Höhe und Erdanziehungskraft. Dabei wirkt ein fallengelassenes Gewicht auf die freiliegende Dura Mater oder das intakte Schädeldach des Versuchstieres ein. Im Vergleich zu den offenen und direkten Varianten zeigt sich bei der Versuchsvariante mit intaktem Schädeldach bzw. als geschlossene Schädelverletzung eine divergierende Ausprägung des Verletzungsmusters. Dieses ist gekennzeichnet durch diffuse neuronale Verletzungen, eine erhöhte Konzentration von Apoptosemarkern, eine verstärkte Neuroinflammation sowie kurz- und langfristige kognitive Beeinträchtigungen (9).

Im Modell FP bzw. LFP entstehen vaskuläre und axonale Schäden im Gehirn. Durch die Kombination aus fokaler kortikaler Kontusion und diffuser subkortikaler neuronaler Verletzung, entstehen charakteristische *diffuse axonal Injurie* (DAI) der inneren und äußeren Kapsel sowie dem des Corpus callosum (9).

Der nachfolgende Abschnitt dient der detaillierteren Darstellung des in dieser Arbeit zugrunde gelegten Verletzungsmodells.

2.2.2. Controlled Cortical Impact

Das fokale SHT des kontrollierten kortikalen Aufpralls bzw. *Controlled Cortical Impact* wurde in den 1980er Jahren entwickelt und im Laufe der Zeit zu eines der am häufigsten verwendeten tierexperimentellen Modelle (Frettchen, Ratten, Mäusen, Schweine) in der SHT-Forschung (121).

In der initialen Forschungsphase wurden die biomechanischen Eigenschaften von Hirngewebe nach direkter mechanischer Verformung, wie beispielsweise im Falle eines Verkehrsunfalls, analysiert. Unter stetiger Entwicklung wurde das CCI-Modell bis heute zur standardisierten Technik, um detaillierte schädliche Mechanismen und komplexe molekulare Kaskaden von Schädel-Hirn-Verletzungen zu untersuchen und Therapieansätze zu bewerten. Im Vergleich zu anderen Modellen, dominiert das CCI-Modell, angewandt bei Nagetieren, durch niedrige Kosten, flexible Anwendbarkeit, einfache technische Voraussetzungen und sichere Reproduzierbarkeit (119).

Im Modellversuch kommt es nach einseitiger Kraniektomie unter Anästhesie beim Versuchstier zu einem Aufprall mittels starrem Impaktor (pneumatisch oder elektromagnetisch gesteuerter Stab) auf die freiliegende Dura Mater und den unmittelbar darunter liegenden Kortex.

Der durch den Aufprall verursachte Deformationshirnschaden bei der Maus geht mit einer Reihe von morphologischen und zerebrovaskulären Reaktionen einher, die in einigen Aspekten mit denen eines menschlichen Schädel-Hirn-Traumas vergleichbar sind (121). Die bei den Versuchstieren festgestellten neurologischen und kognitiven Beeinträchtigungen lassen sich ebenfalls mit den klinischen Beobachtungen bei Patienten in Einklang bringen (121). Es muss jedoch konstatiert werden, dass die kognitive und psychiatrische Beeinträchtigung nach einem SHT beim Menschen messbar ist, während sie sich im Tierversuchsmodell bzw. bei kleinen Tierarten nur limitiert analysieren und vergleichen lässt (119).

In CCI-Modell sind axonale Veränderungen, eine Störung der Blut-Hirn-Schranke, intrakranielle bzw. subdurale Hämatome, Ödeme und Veränderungen des zerebralen Blutflusses zu beobachten (121). Als Folge kann eine akute Degeneration der kortikalen, hippocampalen und thalamischen Gehirnareale entstehen (120). Dieses Versuchsmodell postuliert eine signifikante Korrelation zwischen dem Ausmaß der

kortikalen Deformation und der daraus resultierenden neurologischen Schädigung. Durch Anpassung der Größe des Impaktors kann beispielsweise eine kleine präzise und gut definierte Läsion verursacht werden oder mit steigender Größe ein DAI provoziert und damit langfristige funktionelle Defizite erzeugt werden. Da die quantitative Kontrolle über die mechanischen Faktoren Zeit, Geschwindigkeit und Tiefe des Aufpralls spezifisch abgestufte Verformungen ermöglichen, kann das Modell an vielfältigste Forschungsfragen angepasst werden (9).

Die durch den CCI entstandenen Defizite resultieren im Allgemeinen aus der Unterbrechung der komplexen motorischen Bahnen und deren sensomotorischen Integration. Um diese Defizite der Probanden zu bewerten, werden etablierte sensomotorische Funktionstests verwendet. Dazu gehören u.a. der Zylindertest, der Rotarod-Test, der Greifkrafttest, der Treppentest sowie der Neurological Severity Score (NSS), welcher neben den motorischen Funktionen und das Verhalten analysiert (120).

2.3. Hyperforin

2.3.1. Hyperforin als Wirkstoff

Hypericum perforatum, das „Echte Johanniskraut“ zählt zu den weltweit fast 500 vorkommenden Johanniskrautgewächsen, den sogenannten *Hypericaceae*. Als Heilpflanze bzw. Phytotherapeutikum wird es seit Jahrhunderten in der Europäischen Welt sowie in der traditionellen chinesischen Medizin angewandt, da ihm vielfältige positive Effekte nachgesagt werden. Darunter konnten verschiedene Inhaltsstoffe mit beispielsweise antibakterieller, antioxidativer, antiinfektiver oder antikarzinogener Wirkung mehrfach nachgewiesen werden (13-16, 122). Haupteinsatzgebiet des Johanniskraut ist die Therapie von psychiatrischen Krankheitsbildern. Allen voran depressive Krankheitsformen (15, 123). Unter den Behandlungsempfehlungen der unipolaren Depressionen, ist das Phytotherapeutikum fester Bestandteil der deutschen nationalen S3-Versorgungsleitlinie (124). Der Wirkstoff zählt zu den meist verordneten Antidepressiva in Deutschland (124).

Zu den Inhaltsstoffen des Johanniskrauts zählen mehrere Flavonoide (*Isoquercitrin*, *Biapigenin*, *Rutin*), das Naphthodianthron *Hypericin* und als

relevantester Hauptinhaltsstoff das Phloroglucinol-Derivat *Hyperforin* (125). In der Vergangenheit wurde das Johanniskraut mit seinen Inhaltsstoffen und dessen pharmakologischen Eigenschaften aufgrund unterschiedlicher, teils kontroverser wissenschaftlicher Untersuchungen intensiv erforscht (125). Der exakte Wirkmechanismus ist nach aktuellen Forschungen nicht in Gänze geklärt. Nach einer Reihe von Untersuchungen lässt sich jedoch der Wirkstoff Hyperforin mit seinen nachgewiesenen Effekten als Hauptakteur im Rahmen antidepressiver Wirkmechanismen identifizieren (15, 125). Die antidepressive Wirkung der meisten Antidepressiva beruht auf pharmakokinetischen Effekten, durch die die Monoaminkonzentration im synaptischen Spalt durch eine relativ selektive Wiederaufnahmehemmung von Noradrenalin und Serotonin erhöht wird (125).

Durch Hyperforin hingegen entstehen einige weitere Effekte. Mehrere wissenschaftliche Untersuchungen zeigen Erkenntnisse über eine Modulation des synaptosomalen Neurotransmittertransportes. Neben der erhöhten Akkumulation der Neurotransmitter wie Serotonin, Noradrenalin und Dopamin, fallen auch erhöhte Konzentrationen von Glutamat und GABA auf. Dies geschieht u. a. neben der indirekten Hemmung der Transmitterwiederaufnahme und der vesikulären Transmitterbeladung, auch über die Modulation des intrazellulären pH-Wertes (126), einer Hochregulierung von metabolisierenden Enzymen der Cytochrom-P450-Familie (127) und der Modulation von Ionenkanälen (125, 128).

Neben der Verwendung von Hyperforin als Antidepressivum werden darüber hinaus die molekularen Mechanismen und Effekte dieses Wirkstoffes in Bezug auf weitere Krankheitsbilder im Rahmen aktueller wissenschaftlicher Forschung untersucht. U. a. wurden Zusammenhänge in Alzheimer-Modellen, in denen gezeigt werden konnte, dass der Wirkstoff Tetrahydrohyperforin den Amyloid-Beta-Spiegel senkt und die synaptische Plastizität einschließlich der Neurogenese sowie die kognitive Beeinträchtigung verbessert. Hyperforin nimmt damit Einfluss auf die Entwicklung und Ausprägung von AD (125, 129, 130).

Der Hyperforin-Effekt zeigt sich insbesondere durch die Modulation von Ionenkanälen, wobei hier der nicht-selektive Calciumkanal TRPC6 eine

bedeutende Rolle spielt. Dieser gehört zur Familie der *Transient Receptor Potential Channel* TRPC. Die TRPC6-Modulation durch Hyperforin und dessen Beteiligung an verschiedenen neuronalen Störungen, wie Epilepsie (131), Ischämie (18, 132), Autismus (133) sowie Depressionen (134, 135), stehen im Rahmen von verschiedenen Untersuchungen zur Diskussion.

Hyperforin und dessen Derivate können ohne Einfluss auf andere TRPC-Kanäle, selektiv TRPC6 induzieren. Die Derivat-Gruppe des 2,4-Diacylphloroglucinols (Hyp1, Hyp5, Hyp7, Hyp8, Hyp9) hat im Vergleich zum Wirkstoff Hyperforin vielfältigere Vorteile. Sie gelten als stabilere pharmakologische Verbindungen, lassen sich leichter synthetisieren und haben ähnliche bis gleiche Eigenschaften, wie das natürlich vorkommende Hyperforin. Im Tiermodell konnte Fracasso et al. über den intraperitonealen Verabreichungsweg einen Konzentrationsanstieg eines weiteren Derivats, Tetrahydrohypnotikum, über die Blut-Hirn-Schranke hinweg im Gehirn nachweisen (136). Daher ist die intraperitoneale Injektion ein besonders geeigneter Applikationsweg. Zudem eignen sich die Derivate in besonderem Maße für die Erforschung des Schädel-Hirn-Traumas im experimentellen Mausmodell. In den hier abgebildeten Experimenten kommt das 2,4-Diacylphloroglucinol-Derivat - *Hyp1* zum Einsatz (19).

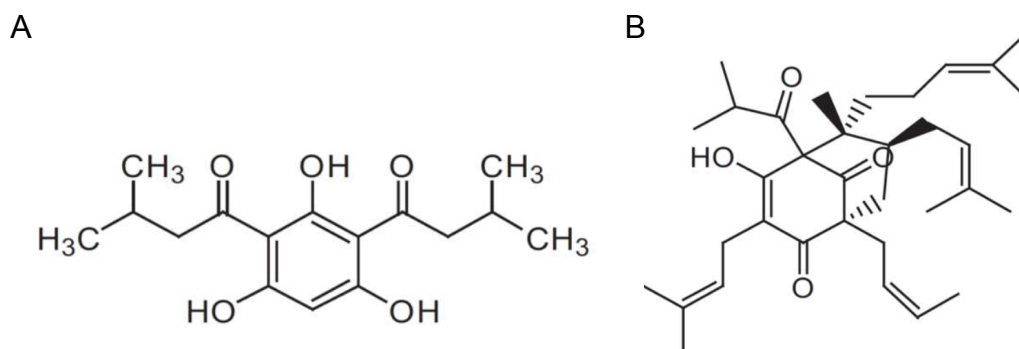


Abbildung 2: Strukturformeln Hyperforin und Derivat Hyp1
 modifiziert nach Leuner et al. 2010 (134)
A: 2,4-Diacylphloroglucinol-Derivat *Hyp1*
B: Hyperforin

2.3.2. Hyperforin und Neuroprotektion

Die Vielzahl an Einflussfaktoren sowie die Komplexität der durch Hyperforin induzierten Effekte, erfordern eine Fokussierung im Rahmen der Hypothese. Der Schwerpunkt der Betrachtung liegt auf den durch Hyperforin induzierten neuroprotektiven Effekten, welche durch die Modulation des Transkriptionsfaktors *Kerntranskriptionsfaktor cAMP-response element binding protein* (CREB) und dessen Schlüsselproteinen sowie der Neuroinflammation des sekundären Hirnschadens nach SHT vermittelt werden.

Zu den wichtigen Zielen gehören Gene aus der Familie der Neurotrophine, insbesondere BDNF, das nachweislich umfangreiche neuroprotektive Effekte hat. BDNF spielt eine bedeutende Rolle bei der neuronalen Reparatur und der funktionellen Wiederherstellung nach SHT (22, 137). Es reguliert das Überleben bestehender Neuronen, die Differenzierung neuer Neuronen sowie die synaptische Plastizität (138, 139), einschließlich des Wachstums von Dendriten und der Veränderung der Stachelmorphologie (20, 140). Erhöhte BDNF-Spiegel im Gehirn haben eine schützende Wirkung gegen traumatische Hirnverletzungen (141). Allerdings schützt die Verabreichung von exogenem BDNF nach einem SHT nicht vor Verhaltensstörungen oder motorischen Defiziten (22).

BDNF bindet als Ligand an die *Tropomyosinrezeptor-Kinase B* (TrkB), die als wichtiger Schutzmechanismus nach SHT gilt und als ein weiterer Schlüsselregulator für das neuronale Überleben beschrieben wird (142). Die beiden Kinasen *Phosphoinositid-3-Kinase/ProteinkinaseB* (PI3K/Akt) und *Extracellular-signal regulated Kinases* (Erk) stellen die zentralen TrkB-vermittelten Überlebenswege dar, welche das neuronale Überleben fördern und vor Apoptose schützen. (143). Eine Einflussnahme der BDNF/TrkB-Signaltransduktion auf die CREB-Expression ist möglich, wenn PI3K/Akt- oder Erk-Signalwege aktiviert werden. Diese beeinflussen wiederum die BDNF-Induktion in hochregulativer Weise (22, 144). Hyperforin verstärkt in vivo die Expression von TrkB im Kortex, was darauf hinweist, dass Hyperforin den kortikalen BDNF/TrkB-Signalweg positiv beeinflusst und die kortikale Neurogenese fördert (128). Die Ergebnisse von Untersuchungen an Hippocampus-Präparaten belegen, dass Hyperforin

über die Aktivierung von TRPC6-Kanälen als BDNF-Mimetikum wirkt und eine Modulation der neuronalen Plastizität bewirkt (20, 125, 145).

Es lässt sich zusammenfassen, dass einige Untersuchungen bewiesen haben, dass TRPC6-Kanäle nachgeschaltete Effektoren der Neurotrophin-Signalgebung in ZNS-Neuronen sind. TRPC6 können einen BDNF-induzierten Anstieg der quantitativen neuronalen Transmitterfreisetzung regulieren und damit bereits beschriebene Effekte auslösen (125, 146-148).

Eine verminderte Expression und Aktivierung von TRPC6-Kanälen wird mit ischämischen Schädigungen in Verbindung gebracht, während die Überexpression oder Aktivierung von TRPC6 durch Hyperforin eine schützende Wirkung hat (132). Die Verabreichung von Hyperforin in einem Ischämiemodell nach dem Verschluss der mittleren Hirnarterie resultiert in einer Reduktion des Infarktolumens, einer Verbesserung des neurologischen Scores sowie einer erhöhten Expression von TRPC6 und einer Phosphorylierung von CREB und der *Calmodulin-abhängigen Proteinkinase IV* (CAMKIV) im ipsilateralen Kortex (18, 125, 132). Eine chronische Hyperforin-Behandlung führt zur Überexpression von TRPC6, die die Phosphorylierung von CREB steigert (128).

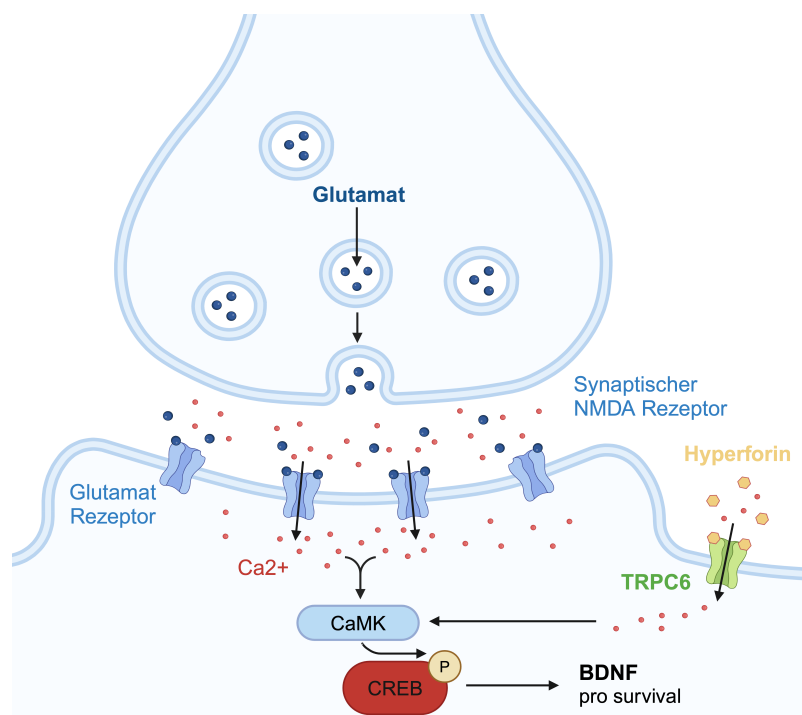


Abbildung 3: Illustration der TRPC6-CaMK-CREB Signalkaskade
Erstellt mit BioRender.com

Es konnte nachgewiesen werden, dass mehrere Ionenkanäle am synaptischen Calcium-Einstrom beteiligt sind (20). Dazu zählen beispielsweise die N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) Rezeptoren oder die spannungsabhängige Calciumkanäle (149). In jüngerer Zeit konnte zudem nachgewiesen werden, dass die Unterfamilie der TRPC eine wesentliche Rolle bei der synaptischen Calcium-Freisetzung spielt (20, 150). Des Weiteren resultiert eine gesteigerte intrazelluläre Calciumkonzentration in einer Aktivierung der *Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II* (CAMKII) bzw. CAMKIV, wodurch eine Phosphorylierung von CREB erfolgt (151). In direktem Zusammenhang damit konnte TRPC6, ähnlich wie in den Studien zu BDNF, auch eine Rolle bei der synaptischen Plastizitätsveränderung nachgewiesen werden. Dazu zählen beispielsweise Veränderungen des dendritischen Wachstums (146), Veränderungen der Stachelmorphologie (150, 152) sowie des Zellüberlebens (132).

Ein weiterer Ansatz konnte in einer Studie von Aghili et al. nachgewiesen werden. Hier zeigte sich ein Effekt auf die humorale Antikörperproduktion durch ein *Hypericum perforatum-Extrakt* (HPE). Der Pflanzenextrakt wurde Ratten über einen Zeitraum von 14 Tagen i.p. verabreicht. Die Resultate der Studie belegen, dass eine Dosis von 200 mg/kg KG des HPE einen Anstieg der IgG-Titer im Blut der Ratten über den Versuchszeitraum induziert. Dieser Aufwärtstrend ist jedoch statistisch nicht signifikant. Des Weiteren konnte eine signifikante Zunahme der Anzahl an Leukozyten, Monozyten und Neutrophilen beobachtet werden. Des Weiteren konnte ein Abnahme-Trend des Körpergewichts zwischen dem siebten und vierzehnten Tag beobachtet werden (153). In weiteren Studie wird dem IgG, einem Vertreter der humoralen Immunabwehr, therapeutisch verwendetes Immunglobulinpräparat neuroprotektives Potenzial attestiert (98, 101, 103).

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wird die Hypothese evaluiert, ob das Hyperforin-Derivat *Hyp1* nach einem SHT potenziell anti-inflammatorische sowie neuroprotektive Effekte initiieren kann. Die relevanten wissenschaftlichen Erkenntnisse aus der analysierten Literatur sowie die Ergebnisse der durchgeführten Experimente in einem etablierten

SHT-Tierversuchsmodell dienen als Grundlage für die Ableitung von Anhaltspunkten hinsichtlich neuroprotektiver Aspekte, Modulation der referenzierten Signalkaskaden und Beeinflussung sekundärer Hirnschäden.

3. MATERIAL

3.1. Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
CCI-Device	Impact One Stereotaxic Impactor	Leica, Richmond, VA, USA
Gefrierschränke	-80 °C	Heraeus Sepatech, Osterode, DE
	-20 °C Liebherr GG 5210	Liebherr, Ochsenhausen, DE
Gel-Analysator	QIAxcel Advanced System	Qiagen N.V., Venlo, NL
Gewebehomogen.	Mastermill MM 300	Retsch Technology GmbH, Haan, DE
Luminometer	Glomax multi Detection System	Promega, Mannheim, DE
Infrarot Fluoreszenz	Odyssey Sa Imager 9260	Li-Cor Biosciences, Bad Homburg, DE
Inkubator	IC 8000	Dräger, Lübeck, DE
Kryostat	Microm NX 70 Cryo-Star	Thermo Fisher Scientific, Walldorf, DE
Lasermikroskop	LSM 5 Exciter	Zeiss, Oberkochen, DE
Laserquelle	Lasos LGK 7812 ML-1/LGN 7812	Lasos Lasertechnik, Jena, DE
LightCycler	LightCycler 480	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
Lochzange	Ohrlochzange	Zoonlab, Castrop-Rauxel, DE
Luftstromschrank	UniProtect THF 3378-VO2	Bioscape, Castrop-Rauxel, DE

Magnetrührer	Fisher Bioblock Scientific, 10515	Fisher Bioblock Scientific, Illkirch Graffenstaden, FR
Mikrobohrer	Uni-Drive N Komplettgerät	Paggen, Starnberg, DE
Mikropipetten	Research, Research plus, Reference	Eppendorf, Hamburg, DE
Mikroskope	Stemi 305, Axio Cam 105	Zeiss, Jena, DE
	Technoskop OPMI 1-FC 459909	Zeiss, Jena, DE
Rota-Rod	LE8200	Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA
Schüttler	Rotamax 120	Heidolph, Schwabach, DE
Spektrophotometer	NanoVue	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Stereotaxierahmen		Kopf Instruments, Tujunga, USA
Temperatursonde	TCAT-2DF Controller	Physitemp, New Jersey, USA
Vapor	VF2, IKA-Labortechnik	Janke und Kunkel, Staufen, DE
Verdampfer	Isofluran	Dräger, Lübeck, DE
Vortex	VF2, IKA-Labortechnik	Janke und Kunkel, Staufen, DE
Waage	CS 200	Ohaus Corporation, Pine Brook, NJ, USA
Waage	Sartorius research	Sartorius, Göttingen, DE

Wärmematte	MINCO HR 5491	Physitemp, New Jersey, USA
Zentrifugen	Micro Star 17 R	VWR, Radnor, PA, USA
	Eppendorf 5804 R	Eppendorf, Hamburg, DE
	MiniStar Silverline	VWR international, Radnor, PA, USA

Tabelle 3.1: Material Geräte

3.2. Verbrauchsmaterialien

Materiel	Typ	Hersteller
Dako - Pen		Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Deckgläser	24 x 60 mm	Diagonal GmbH & Co KG; Münster, DE
Einbettmedium	NEG-50	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Einstreu	Lignocel FS14	J.Rettenmaier & Söhne GmbH, Rosenberg, DE
Einwegpipette	5 ml, 10 ml	VWR international, Radnor, USA
Einwegspritze	Injekt-F 1 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Falconröhrchen	15 ml, 50 ml	Becton, Dickinson, New Jersey, USA
Filterpapier		Whatmann, Maidstone, UK
Gewebekleber	Histoacryl	Braun AG, Berlin, DE
Käfige	Filtertopkäfing Typ-II lang	Bioscape GmbH, Castrop-Rauxel, DE

Kanülen	Microlance™ (26G x 1/2“)	BD, Heidelberg, DE
Kryotomklingen	Feather A35	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
LightCycler Kapillaren		F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, CH
Nahtmaterial	Prolene® 6-0	Ethicon Inc., Somerville, USA
Objektträger	SuperFrost® Plus	Menzel-Gläser, Menzel GmbH, Braunschweig, DE
Papierhandtücher	25 x 21 cm, grün, ZZ Falz, 1-lagig	Schuch Laborhandel und Klinikbedarf, Langgöns, DE
Pelletiertes Spezialfutter		ssnif Spezialdiät GmbH, Soest, D
Pipettenspitzen	10 µl, 200 µl, 1000 µl	Starlab GmbH, Ahrensburg, DE
Plain Skirted Tube	Natural, 0,5 ml	StarLab, Ahrensburg, DE
Reagenzgefäße		StarLab, Ahrensburg, DE
Saugtupfer	Sugi	Kettenbach GmbH&Co KG, Eschenburg, DE
Skalpell	Feather No.23	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Transferpipette	1ml	Sarstedt, Nürnbrecht, DE

Tabelle 3.2: Material Verbrauchsmaterial

3.3. Arzneimittel

Materiel	Typ	Hersteller
Augensalbe	Bepanthen	Bayer Vital, Leverkusen, DE
Anästhetika	Forene® (Wirkstoff: Isofluran)	Baxter, Unterschleißheim, DE

Hyperforin	Hyp1	synthetisiert durch AG Friedland, Institut für Pharmazeutische und Biomedizinische Wissenschaften, Universitätsmedizin Mainz
------------	------	--

Tabelle 3.3: Material Arzneimittel

3.4. Chemikalien und Puffer

Chemikalien	Hersteller
Aqua Spüllösung, sterile	Braun, Melsungen, DE
Chloroform	Sigma, St. Louis, MO, USA
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Sigma, St. Louis, MO, USA
DMSO (Dimethyl Sulfoxid)	Sigma Aldrich, Steinheim, DE
EDTA (Ethylendiaminotetraacetat)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Einbettmedium, NEG 50	Thermo Fisher Scientific, Walldorf, DE
Ethanol	Applichem, Darmstadt, DE
Glycerin	Roth, Karlsruhe, DE
Histoacryl, Gewebekleber	Braun, Melsungen, DE
Isopropanol	Sigma, St. Louis, MO, USA
Kresylviolett (Acetat)	Merck, Darmstadt, DE
Lowry DC Protein Assay Reagent A,B,S	BioRad, Hercules, USA

Magermilch	Roth, Karlsruhe, DE
NaCl (Natriumchlorid)	Roth, Karlsruhe, DE
Natriumcarbonat	Fluka, Buchs, CH
NGS (Normal Goat Serum)	Dako, Hamburg, DE
PBS, Dulbecco Trockensubstanz	Biochrom, Berlin, DE
PFA (Paraformaldehyd)	Merck, Darmstadt, DE
Protease Inhibitor	Roche, Molecular Biochemicals, Mannheim, DE
Roti-Histokitt	Roth, Karlsruhe, DE
Roti-Histol	Roth, Karlsruhe, DE
Stickstoff, flüssig	Air Liquide, Düsseldorf, DE
Triton X-100	Sigma Aldrich, Steinheim, DE

Tabelle 3.4: Material Chemikalien und Puffer

3.5. Antikörper

Primärer Antikörper	Spezies	Verdünnung	Masse	Hersteller
Anti-Arc	Maus	1:100	55 kDa	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
Anti-BDNF	Kaninchen	1:200	23 kDa	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
Anti-COX-2	Kaninchen	1:200	69 kDa	Abcam®, Cambridge, USA

Anti-GAPDH	Maus	1:10000	35 kDa	Acris Antibody Inc., San Diego, USA
Anti-GFAP	Maus	1:500	50 kDa	Dako, Hamburg, DE
Anti-Spektrin	Maus	1:1000	145 kDa	Enzo Life Science, Farmingdale, USA

Tabelle 3.5: Material Primärer Antikörper

Sekundärer Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Anti Kaninchen AL488	Ziege	1:500	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Anti Maus IRDye 800CW 926-32210	Ziege	1:15000	LI-COR® Biosciences, Lincoln, USA
Anti Meerschein AL633	Ziege	1:500	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Anti Ratte AL568	Ziege	1:500	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

Tabelle 3.5.1: Material Sekundärer Antikörper

3.6. Hergestellte Lösungen

Kits	Hersteller
5% BSA Lösung	5 g (w/v) in 100 ml TBST
5% Magermilch Lösung	5 g (w/v) in 100 ml TBST
Blockierlösung Immunhistochemie	0,5% BSA, 5% NGS in 0,1% PBST
Hyperforin (-lösung)	5mg/kg KGW, 1,66% DMSO in 0,9% NaCl, Konzentration = 0,5µg/µl Maus 25g = 250 µl
Kresyl Lösung	0,031 mM Kresylviolett, 20% (v/v) Ethanol

PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 6,5 mM Na ₂ PO ₄ , 1,5 mM, KH ₂ PO ₄ , pH 7,5
PBST	0,1 g (w/v) Sodium-Citrat + 0,1% (v/v) Triton-X in 100 ml H ₂ O
PFA 4%	50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1% NP-40, 0,1% SDS
RIPA Puffer	50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1% NP-40, 0,1% SDS
Vehikel (-lösung)	1,66%DMSO in 0,9%NaCl

Tabelle 3.6: Material Lösungen

3.7. Kits

Kits	Hersteller
Absolute Blue qPCR SYBR Green Mix	Thermo Fisher Scientific, Walldorf, DE
Light Cycler 480 Probes Mast	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, DE
QIAzol Lysis Reagenz	Qiagen, Hilden, DE
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden, DE
RNase-free DNase Kit	Qiagen, Hilden, DE
RNeasy Plus Universal Kit	Qiagen, Hilden, DE

Tabelle 3.7: Material Kits

3.8. Primer und Sonden

Target	Sonden	Basenabfolge 5'-3'
Arc	F	CTCAACTTCCGGGGATGCAG
	R	CTGGTATGAATCACTGGGGGC

BDNF	F	ACTTGGCCTACCCAGGTG
	R	GTTGGGCCGAACCTTCT
c-Fos	F	CGGGTTTCAACGCCGACTA
	R	TGGCACTAGAGACGGACAGAT
IL-1 β	F	GTGCTGTCGGACCCATATGAG
	R	CAGGAAGACAGGCTTGTGCTC
IL-6	F	TCGTGGAAATGAGAAAAGAGTTG
	R	TATGCTTAGGCATAACGCCTAG
PPIA	F	GCGTCTSCTTCGAGCTGTT
	R	RAAGTCACCACCCTGGCA
TRPC6	F	CTCTTCCCTCATTATCCTCTCC
	R	CTCGTCCATCAGCAAATAGTC

Tabelle 3.8: Material Primer und Sonden

3.9. Software

Software	Hersteller
DeltaPix Insight	Delta Pix, Smorum, DK
EndnoteX9	Thomson Reuters Corporation, New York, USA
Image Studio, Version 3.1	Li-Cor Biosciences, Bad Homburg, DE

ImageJ, Version 1.52k	National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA
Pages, Version 10.3.5	Apple Inc. USA
Prism 7 for macOS, Version 7.0a	GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA
Word 2018 für Mac, Version 16.19	Qiagen, Hilden, DE
Zen 2 (blue edition)	Zeiss, Jena, DE
Zen 2008, Version 5.0	Zeiss, Jena, DE

Tabelle 3.9: Material Software

4. METHODEN

4.1. Versuchsplanung

4.1.1. Versuchstiere

Für die Experimente wurden $N = 40$ (*Grundgesamt* (N)) Tiere verwendet. Die Versuchstiere sind Mäuse der häufig in der Forschung verwendeten Zuchtlinie des genetischen Wildtyps C57BL/6N, männlich, 8-9 Wochen alt und haben ein Gewicht von 21,4 – 23,9 *Gramm* (g) (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich).

4.1.2. Haltung und Genehmigung

Die Versuchstiere werden für die gesamte Dauer des Experimentes zu zweit in einen Käfig gesetzt. Die Käfige sind ausgestattet mit entkeimten Holzspänen als Einlage, einem Haus, einer wassergefüllten Trinkflasche und getrockneten Futterpellets. Die Nahrung wird nach Belieben der Tiere aufgenommen. In der postoperativen Phase werden die Futterpellets mit Wasser eingeweicht. Dies erleichtert die Nahrungsaufnahme.

Der Tierschrank sorgt für eine Luftfeuchtigkeit von 55 %, einer Umgebungstemperatur von 22 *Grad Celsius* (°C) und durch eine künstliche Beleuchtung, für einen konstanten 12 *Stunden* (h) Tag-Nacht-Rhythmus.

Der Tierversuch erfolgt nach Genehmigung des Tierversuchsantrages, Aktenzeichen 23177-07/G-16-1-022, durch das Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz und obliegt dem Tierschutzgesetz §8 in der Fassung vom 18. Mai 2006. Daneben erfolgt die Durchführung gemäß der Richtlinien der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

4.1.3. Studiendesign

Innerhalb der Studie werden die Tiere in vier Gruppen, von einer nicht an der Durchführung des Experiments beteiligten Person, durch ein Zufallsprinzip randomisiert. Somit werden die an der Versuchsdurchführung beteiligten Personen, in den potenziell subjektiv manipulierbaren Bereichen der Gruppenzugehörigkeit der Versuchstiere, verblindet.

24 Tiere der Gruppe C, $n = 12$ und der Gruppe D, $n = 12$ werden einem operativen Eingriff unterzogen und erhalten einen kontrollierten Hirnschaden. Bei den restlichen 16 Tieren, der Gruppe A ($n = 8$) und der Gruppe B ($n = 8$), wird ein Scheineingriff durchgeführt.

Allen Tieren wird zwei Tage präoperativ (PräOp), am OP-Tag selbst, sowie drei Tage postoperativ (PostOp) intraperitoneal (i.p.), jeweils einmal täglich, eine Vehikellösung oder die Hyperforinlösung injiziert. Die Gruppe A sowie die Gruppe C erhalten die wirkstofffreie Lösung, *Vehikel* (Veh) und die Gruppe B sowie die Gruppe D erhalten die Hyperforinlösung, *Hyperforin* (Hyp). Nach einer Beobachtungsdauer von fünf Tagen PostOp wird bei allen Tieren eine Euthanasie durchgeführt.

	CCI: Controlled Cortical Impact	SHAM: Scheinoperation
Veh: Wirkstofffreie Lösung	Gruppe C, $n = 12$	Gruppe A, $n = 8$
TRPC6: Hyperforin Lösung	Gruppe D, $n = 12$	Gruppe B, $n = 8$

Tabelle 4.1: Randomisierung und Gruppeneinteilung

4.2. Versuchsdurchführung

4.2.1. Präoperative Maßnahmen

Den Tieren wird ein Zeitraum von drei Tagen gegeben, um eine vor Beginn der ersten Testungen, ausreichende Adaption und Gewöhnung an das neue Umfeld zu gewährleisten. Anschließend wird mit den Testungen begonnen. Durchgeführt werden die Messung des Körpergewichts, die Erhebung eines *Neurological Severity Score* (NSS) und die *Rotarod*-Testläufe, um neurologische und motorische Fähigkeiten festzustellen. Parallel werden den Versuchstieren die ersten Lösungen verabreicht. Um während dieser Phase das Allgemeinbefinden der Tiere zu gewährleisten, wird dies mit neurologisch-/klinischen Untersuchungen beobachtet und überprüft. Aufgrund der positiven Ergebnisse wurden keine Anzeichen für Krankheit oder Nicht-Eignung festgestellt. Somit wurde keines der Tiere präoperativ ausgeschlossen.

4.2.2. Anästhesie

Nach einer Kontrolle der gesundheitlichen Unversehrtheit des Versuchstiers sowie einer Prüfung der Funktionsfähigkeit der benötigten Gerätschaften wird mit der Narkoseeinleitung begonnen. Zum Beginn der Einleitungsphase der Anästhesie bleiben die Tiere in ihren Käfigen. Das Versuchstier befindet sich unter einem Trichter, über den ein Gasgemisch aus Sauerstoff und *Isofluran* 4 % (Inhalationsanästhetikum) zugeführt wird. Nach 1 *Minute* (min) Inhalationszeit wird die Maus auf den Operationsbereich überführt. Dieser ist ausgestattet mit einer Wärmeplatte, auf die die Maus in Bauchlage gelegt wird, um Schwankungen der Körpertemperatur zu verhindern und eine konstante Körpertemperatur von 37 °C zu gewährleisten. Die Körpertemperatur wird zudem kontinuierlich über eine Rektalsonde überprüft. Zur Fortführung der Narkose wird dem Versuchstier über eine angepasste Gesichtsmaske *Isofluron* 2 % mit einem Flow von 0,5 *Liter pro Minute* (l/min) Frischluft und 1,0 l/min Sauerstoff zugeführt. Um Positionsveränderungen des Kopfes während des Eingriffs zu verhindern, wird der Kopf in einen stereotaktischen Rahmen eingespannt. Ein Austrocknen der eventuell geöffneten Augen wird durch Auftragen einer Bepanthen Augensalbe verhindert. Während der gesamten Operationszeit befindet sich das Tier in einer Spontanatmung. Zur Kontrolle einer ausreichenden Narkosetiefe wird an den hinteren Gliedmaßen versucht einen Zwischenzehenreflex auszulösen. Ist dieser nicht vorhanden, lässt sich auf eine ausreichende Narkosetiefe schließen.

4.2.3. OP: CCI - Controlled Cortical Impact

Der Eingriff des *Controller Cortical Impact* (CCI) beginnt mit der Kraniotomie. Dazu wird die Kopfhaut mit einem Scherenschnitt ca. 10 - 15 *Millimeter* (mm) mediansagittal rechts eröffnet. Danach wird die Kopfhaut bis paramedian rechts präpariert und umgeschlagen. Anschließend wird mit Hilfe eines Mikrobohrers die Schädelkalotte eröffnet und ein rechteckiges Knochenfenster eingefräst. Dieses lässt sich durch die erhalten gebliebene Verbindung zur Kopfschwarte, medial aufklappen. Die darunter sichtbar werdende Dura mater cerebri und die Hirnsubstanz bleiben bei der Präparation unverletzt.

Der *CCI-Impactor* wird nun zur Induktion des Schädel-Hirn-Traumas eingesetzt. Dieser wird über das Knochenfenster positioniert und auf die freiliegenden Hirnstrukturen ausgerichtet. Unter der Konfiguration von einer Eindringtiefe von 1,5 mm, einer Aufprallgeschwindigkeit von 6 *Millimeter pro Sekunde* (m/s) und einer Kontaktzeit von 200 *Millisekunden* (ms), wird der elektromechanische Bolzen (Durchmesser 3,5 mm) ausgelöst und ein stumpfer Aufprall auf den Cortex induziert. Nach Entfernung des *CCI-Impactors* wird das Operationsfenster mit dem erhaltenen Kalottenstück verschlossen und mit *Histoacryl* Gewebekleber verschlossen. Die Hautnaht wird zum Abschluss des Eingriffs mit *Prolene*-Nahtmaterial der Stärke 6 in Einzelknopfnahntechnik und abschließender Salbenapplikation verschlossen (121, 154).

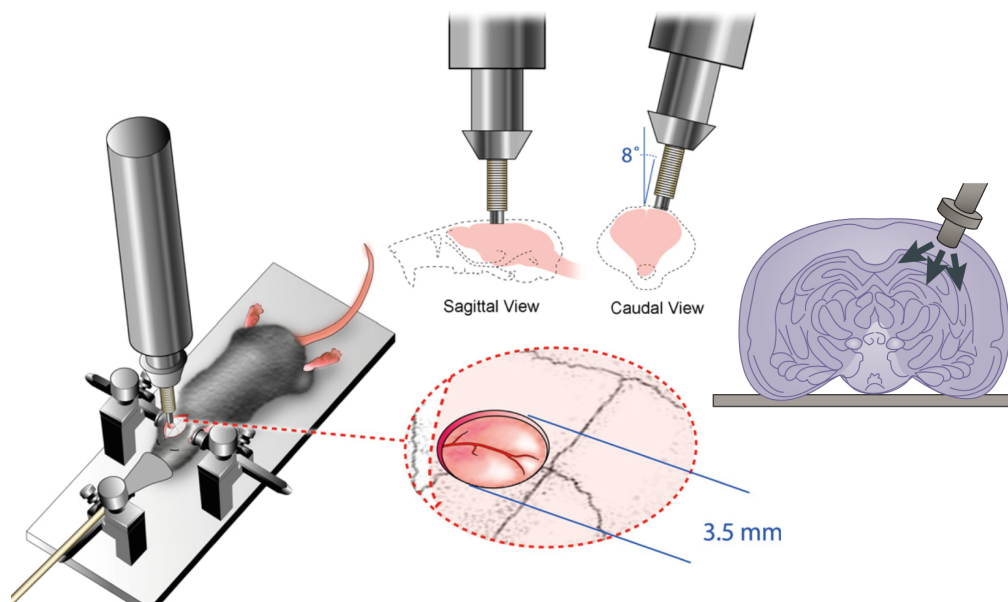


Abbildung 4: Illustration des Versuchsaufbaus Controlled Cortical Impact

Versuchsaufbau mit Ausrichtung Impactors und nach auslösen des Impact
Intraoperativ mit narkotisiertem, stereotaktisch fixiertem Versuchstier
modifiziert nach Onyszchuk et al. (154) und Xiong et al. (120)

4.2.4. OP: SHAM - Scheineingriff

Die Versuchstiere des *Scheineingriffes* (SHAM) durchlaufen den identischen Ablauf mit vollständiger Narkose, der stereotaktischen Fixierung sowie die Präparation der Kopfschwarte. Es wird jedoch keine Kraniotomie durchgeführt und es kommt zu keinem direkten Aufpralltrauma durch einen *CCI-Impactor*. Nach Eröffnung der Kopfhaut wird das Periost zu Seite geschoben und die Kalotte mit einer Pinzette angeraut. Die induzierte Verletzung wird daraufhin, gleich zur CCI-Gruppe, mit einer Einzelknopfnahnt

und Salbenapplikation verschlossen. Insgesamt wird auch die gesamte Eingriffs- bzw. Narkosedauer vergleichbar zur CCI-Gruppe durchgeführt.

4.2.5. Postoperative Maßnahmen

Nach der Operation und Beendigung der Inhalationsnarkose wird die Maus aus dem stereotaktischen Rahmen, sowie von der Gesichtsmaske gelöst und die rektale Temperatursonde entfernt. Zur postoperativen Beobachtung werden die Tiere in einen Inkubator bei 33 °C - 35 °C gelegt und für 1,5 *Stunden* (h) überwacht. Nach Erholung wird das Versuchstier zurück in den eigenen Haltungskäfig gesetzt.

4.2.6. Körpergewicht

Um den Allgemein- und Ernährungszustand der Versuchstiere während des gesamten Experimentes zu kontrollieren und einschätzen zu können, wird täglich das Körpergewicht der Tiere bestimmt.

4.2.7. Neurological Severity Score

Zur Erfassung und Objektivierung des Allgemeinzustandes, sowie der neurologischen und motorischen Fähigkeiten der Tiere, wird der *Neurological Severity Score* (NSS) nach Tsenter et al. (155) in einer optimierten und etablierten Version (156) eingesetzt. Dieser bewertet folgende Kategorien: Suchverhalten, Schreckreflex, Gangverhalten mit Koordination, Balance und motorisches Defizit. Das Versuchstier erhält je Ausprägung eines Defizits und dadurch resultierendem Fehlverhalten während jeder Aufgabe eine Punktzahl. Diese unterscheidet sich je nach Aufgabe zwischen 0-1, 0-2 und 0-3 Punkten. Die sich daraus ergebene Punktzahl gibt bei einem gesamt Score von 0 an, dass keinerlei ersichtliches neurologisches sowie motorisches Defizit vorliegen. Demgegenüber indiziert ein Score von 15 die maximal mögliche Einschränkung in neurologischer bzw. motorischer Hinsicht.

Zur Verlaufsbeurteilung werden die Versuchstiere *PräOp* ein Tag vor Eingriff, sowie im Anschluss, *postoperativ* an *Tag 1* (D1), *Tag 3* (D3) und *Tag 5* (D5) getestet.

A		B	
Animal ID:		4. Coordination	
OP-Date:		Beam walking 3 cm	Score (0-2)
Date and time:		Beam walking 1,5 cm	Score (0-2)
1. Exit from circle?		Beam walking 1 cm	Score (0-2)
	< 30 sec	Criteria: 0 point: normal movement / no impairment (new) 1 points: feet misplacements / unstable movement	
	30-60 sec	2 points: sits down / stops moving on beam / falls down	
	61-119 sec	Criteria (old): Count misplacements (new: in index)	
	> 2 min		
2. Reflexes		5. Balance	
startle reflex	Present (0)	Round stick	Score (0-1)
	Absent (1)	Square stick	Score (0-1)
If the mouse is not moving at all, clap your hands once above the mouse; did it react?		Criteria: 0 point: Can grip the stick with 4 paws for 10 seconds	
3. General behavioral deficit?		1 points: turn the stick: can it do that again, or is a paw (hemiparesis) "hanging out"	
Seeking behavior	Present (0)	6. Motor deficit	
	Absent (1)	Paresis	Absent (0)
Walk straight	Present (0)		One foot (1)
	Absent (1)		Hemiparesis (2)
		7. Body weight (before NS)	

Abbildung 5: Protokoll NSS - Neurological Severity Score

A: Abschnitt 1-3

B: Abschnitt 4-6

4.2.8. Rotarod

Die *Rotarod*-Testung (RR) ermöglicht eine objektive Einschätzung der motorischen Fähigkeiten (u. a. Ausdauerfähigkeit und Greifkraft) der Versuchstiere. Dazu werden die Tiere auf einen perforierten, rotierenden Zylinder mit einem Durchmesser von 3 *Zentimeter* (cm) gesetzt. Dieser rotiert kontinuierlich in vorwärtsgerichtete Laufrichtung der Maus. Die Rotationsgeschwindigkeit wird innerhalb von fünf *Minuten* (min) von, zu Beginn 4 *Umdrehungen pro Minute* (U/min), auf 40 U/min konstant gesteigert. Wenn die Maus sich nicht mehr auf dem rotierenden Zylinder halten kann, fällt sie herab (Fallhöhe ca. 15 cm) und wird von einer Platte aufgefangen. Durch Aufprall des Tieres auf die Platte, wird die Zeit automatisch gestoppt (157, 158).

Um diese Übung prä- und postinterventionell möglichst valide bewerten zu können, werden die Tiere zwei Tage vor Intervention durch eine Trainingseinheit mit zwei Durchgängen an den Ablauf gewöhnt. Der erste gewertete Durchlauf findet PräOP statt und wird postoperativ an D1, D3 und D5 mit weiteren Durchläufen ergänzt.

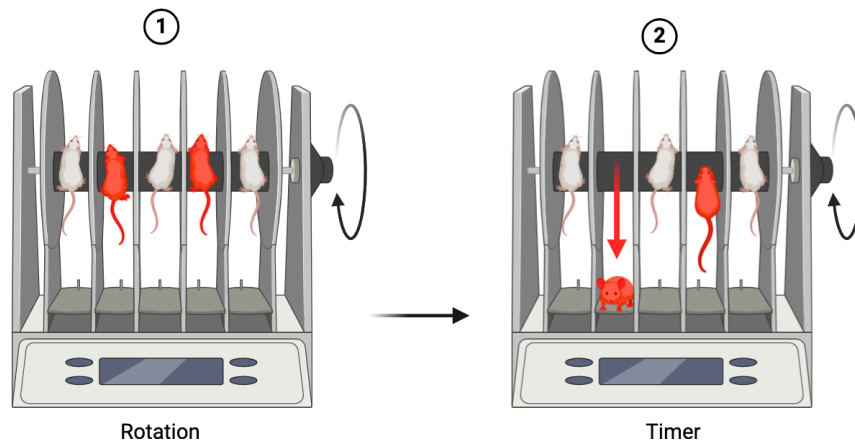


Abbildung 6: Illustration Rota-Rod Versuchsaufbau

1. Testlauf der Versuchstiere; 2. Bodenplatte registriert das Herabfallen jeder Maus; modifiziert nach Lubrich et al. 2022 (159)

4.2.9. Euthanasie und Gehirnentnahme

Nach einer präoperativen Überlebenszeit von fünf Tagen werden die Versuchstiere euthanasiert. Dies erfolgt nach tierschutzgerechter Tötung per zervikaler Dislokation. Dafür wird die Maus für eine Minute mit einem Inhalationsnarkotikum (*Isofluran 4 %*) narkotisiert. Im Anschluss wird der Kopf okzipital mit einer geschlossenen Schere fixiert und durch einen caudal gerichteten kräftigen, ruckartigen Zug an der Schwanzwurzel kommt es zur Durchtrennung des Rückenmark, der Medulla Oblangata und der hirnersorgenden Gefäße. In Folge dessen setzt der sofortige Tod des Versuchstieres ein. Anschließend erfolgt die Dekapitation und das hirnschonende Aufbrechen des Schädelknochens. Nach Freilegung des gesamten Gehirnes und Durchtrennen der ventralen Hirnnerven, erfolgt die Gehirnentnahme. Das entnommene Gehirn wird unmittelbar einem pulverisiertem Trockeneis zugeführt, danach 1 Minute schockgefroren und anschließend einzeln verpackt sowie nummeriert und bei -20 °C im Tiefkühlschrank gelagert.

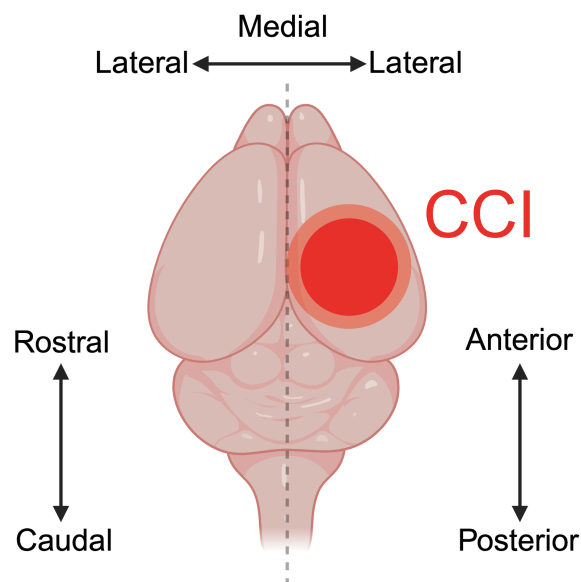


Abbildung 7: Illustration des Murinen Gehirn nach CCI
Lokalisation des Schadensgebietes nach CCI der Interventionsgruppen,
erstellt mit BioRender.com und modifiziert

4.3. Histologische Methoden

4.3.1. Kryotom

Zur Probengewinnung von Hirngewebe, werden die entnommenen Gehirne im Kryotom bei einer konstanten Temperatur von $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in coronare Hirnschnitte zerteilt. Dafür wird das Gehirn mittels Einbettmedium senkrecht auf einer Trägerplatte fixiert. Anschließend folgt zur korrekten Schnittführung, eine Befestigung der Trägerplatte am Objektisch und die Positionierung der Schnittklinge parallel zur Coronarebene des Gehirns.

Die Schnittführung verläuft rostral nach okzipital, beginnt bei Bregma $+3,14\text{ mm}$ und endet bei Bregma $-4,36\text{ mm}$. Dieser Gesamtabschnitt wird in 16 Ebenen unterteilt. Zwischen jeder Einzelebene liegt ein Abstand von $500\text{ Mikrometer } (\mu\text{m})$. Pro Gehirn werden insgesamt 10 *Objekträger* (OT) vorbereitet, auf die jeweils der Hirnschnitt mit einer Schnittdicke von $10\text{ }\mu\text{m}$ aufgenommen wird. Die OT werden anschließend bis zur Kresylviolett-Färbung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Tiefkühlschrank gelagert.

Das entsprechende Schadensgebiet des Gehirns liegt im Bereich der Ebene 6, bei Bregma $+0,64\text{ mm}$ und der Ebene 13, bei Bregma $-2,86\text{ mm}$. Hier wird für die molekulargenetischen Untersuchungen sowie für die Proteinanalytik zusätzliches Probenmaterial präpariert. Dazu werden insgesamt acht Trimmschnitte mit einer Schnittdicke von $30\text{ }\mu\text{m}$ gewonnen.

Diese werden gesammelt und in Reihenfolge aufeinander gelegt. Damit ergibt sich eine Gesamtdicke aller Trimmschnitte von 240 µm pro Gehirn. Diese werden daraufhin mit einem Skalpell medial zerschnitten und somit zum Schadensareal in eine ipsi- sowie kontralateral Seite getrennt. Diese Proben werden seitengetrent in jeweils ein markiertes Kryoröhrchen eingebracht und bis zu weiteren Untersuchungen bei -80 °C gelagert.

4.3.2. Kresylviolett Färbung nach Nissl

Zur Visualisierung von neuronalen Zellkörpern kommt die Kresylviolett-Färbung zum Einsatz. Diese, nach ihrem Erfinder benannte Nissl-Färbung, wird verwendet, um das Schadensvolumen nach SHT zu ermitteln und darzustellen. Der hier genutzte basische Farbstoff lagert sich an basophile Strukturen an. Der Anlagerung liegen Ionenverbindungen zwischen den basophilen (negativ geladenen) Phosphatgruppen der *Ribonukleinsäure* (RNA) bzw. *Desoxyribonukleinsäure* (DNA) zugrunde. Die angefärbten Zellorganellen stellen sich in einem prominenten blau-violetten Farbton dar. Die danach kräftig angefärbten Ribosomen der Membranoberfläche des *rauen Endoplasmatischen Retikulums* (rER) werden hier als *Nissl-Scholle* bezeichnet. Da die Dendriten und Axonen als Fortsätze der Nervenzellen sehr wenig RNA bzw. DNA enthalten, werden diese kaum angefärbt und stellen sich dadurch transparent dar (160).

Zur Vorbereitung werden die Gefrierschnitte nach Entnahme aus dem Gefrierschrank für eine Stunde bei Raumtemperatur aufgetaut und getrocknet. Zur Fixierung und Reinigung werden die OT in 70%igem Ethanol für 2 min eingelegt. Darauf folgt das Eintauchen in die Kresylviolett-Lösung für eine Dauer von 10 min. Der überschüssige Farbstoff wird durch Abwaschen in zwei kurzen Durchgängen mit Aqua dest. entfernt. Zum Entwässern folgt das Eintauchen in 70%iges und daraufhin 96%iges Ethanol. Hiernach werden die Gehirnschnitte 2 min in *Roti-Histol* und 5 min mit *Roti-Histokit* fixiert. Zum Schutz des Präparates wird ein Deckglas auf den OT aufgebracht.

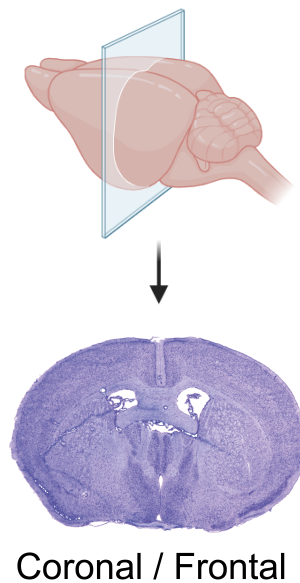


Abbildung 8: Illustration der Schnitfführung am murinen Gehirn

Am Bsp. SHAM Veh Maus #14, Schnittebene 9 nach Kresylviolett-Färbung nach Nissl; generiert und modifiziert mittels Biorender.com

4.3.3. Quantifizierung des Schadenvolumens

Nach der Nissl-Färbung stellt sich vitales Hirngewebe blau-violett und geschädigtes avitales Gewebe blass bzw. ungefärbt dar. Anhand dessen wird mittels mikroskopischer Betrachtungen und Nutzung der Software *DeltaPix Insight*, bei allen 16 Ebenen eines Gehirns, die Gesamtfläche in Quadratmillimeter (mm²) der gesunden (kontralateral) und geschädigten (ipsilateral) Hemisphäre ausgemessen. Des Weiteren wird auf der ipsilateralen Seite die Fläche des gesunden Hirnareals in mm² bestimmt. Aus der Differenz der geschädigten Fläche und der ipsilateralen gesunden Gesamtfläche, ergibt sich die *Schadensfläche* (A) einer Ebene in mm². Die Summe aus allen Schadensflächen eines Gehirns, multipliziert mit dem Abstand (500 µm = 0,5 mm) der einzelnen Schnitte, ergibt das *Schadensvolumen* (V) in Kubikmillimeter (mm³).

$$V = \sum (A_1 + \dots + A_{16}) * 0,5 \text{ mm}$$

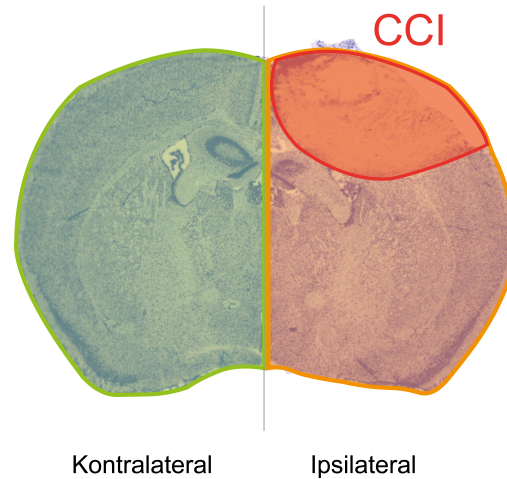


Abbildung 9: Illustration eines Schädensgebietes nach CCI

Am Bsp. eines murinen Gehirns; Kryotomschnitt nach Kresylviolett-Färbung nach Nissl; CCI Hyp Maus #30 Schnittebene 9, Grün: kontralaterale Hemisphäre, Orange: ipsilaterale Hemisphäre, Rot: Schadensgebiet nach CCI

4.3.4. Immunfluoreszenz Färbung

Durch eine immunhistochemische Färbung lassen sich spezifische Proteine durch indirekte Fluoreszenzmarkierung darstellen. Hierbei bindet ein primärer Antikörper, der *Antigen spezifische Antikörper* (AK) an das nachzuweisende Zielprotein. Anschließend folgt ein sekundärer Antikörper, der durch Konjugation mit einem Fluoreszenzfarbstoff sowie Spezies-spezifischer Bindung, den Protein-AK-Komplex bildet. Dieser wird durch Anregung mit einer bestimmten Wellenlänge messbar (161).

Im Rahmen der hier angewendeten immunhistochemischen Färbung wurde GFAP als Zielstruktur ausgewählt, wobei es sich hierbei um ein Intermediärfilament der reaktiven Astrozyten handelt.

Diese Methode wird an den Schnittebenen 9 und 10 aller Gehirne durchgeführt. Dies erfolgt nach folgendem standardisiertem Schema: die OT mit den benötigten Gefrierschnitten werden bei Raumtemperatur für 30 min aufgetaut und getrocknet. Danach folgt die Fixierung durch 10-minütiges Eintauchen in 4 %iges *Paraformaldehyd* (PFA). Gewaschen werden die OT anschließend auf dem *Rotamax*, dreimalig jeweils 5 min mittels *phosphatgepufferter Salzlösung* (PBS). Die ausgewählten Schnitte benötigen eine Umrandung mit einem Fettstift. Dies gewährleistet eine konstante Benetzung mit der Blockierlösung und verhindert eine spätere

unspezifische Proteinbindung. Nach Aufbringen der Blockierlösung, schließt sich die einstündige Inkubation in der Feuchtekammer an. Als nächstes folgt das Auftragen des primären AKs und eine weitere Inkubation in der Feuchtekammer über Nacht bei 4 °C. Die Weiterverarbeitung beginnt mit einem Waschvorgang mit PBS und vier Durchgängen auf dem *Rotamax* für jeweils 10 min. Um die Fluoreszenz des sekundären AKs nicht zu beeinträchtigen, wird die weitere Bearbeitung bei abgedunkeltem Raumlicht durchgeführt. Nach dem Auftragen des sekundären AKs und einer einstündigen Inkubation bei *Raumtemperatur* (RT), schließt sich ein erneuter Waschvorgang (mit PBS, vier Durchgänge auf dem *Rotamax* je 10 min) an. Zum Ende des Vorgangs kommt es zur 5-minütigen Inkubation mit *4,6-Diamidin-2-phenylindol* (DAPI) und anschließender Waschung (mit PBS, 2 Durchgänge auf dem *Rotamax* je 5 min). Nach einer einstündigen Trocknung bei RT wird, zum Schutz der OT, *Immun-Mount* aufgetragen und diese mit Deckgläsern verschlossen. Zum bestmöglichen Erhalt der Fluoreszenz werden die OT im Dunkeln und bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

4.3.5. Quantifizierung der Immunhistochemie

Die immunhistochemisch angefärbten Gehirnschnitte werden zur Zellzahlbestimmung im Gewebe mittels Konfokalmikroskopie in 20-facher Vergrößerung auf beiden Hemisphären, ipsilateral sowie kontralateral zur Läsion, untersucht. Durch das unterschiedliche Emissionsmaximum des sekundären AKs bzw. deren konjugierten Fluoreszenzfarbstoffs, werden die markierten Zellkörper in verschiedenen fluoreszierenden Farbspektren dargestellt. Durch die Wellenlänge von 488 *Nanometer* (nm) werden die entsprechenden Zielstrukturen grün fluoreszierend und mit einer Wellenlänge von 568 nm mit einem roten Fluoreszenzsignal sichtbar.

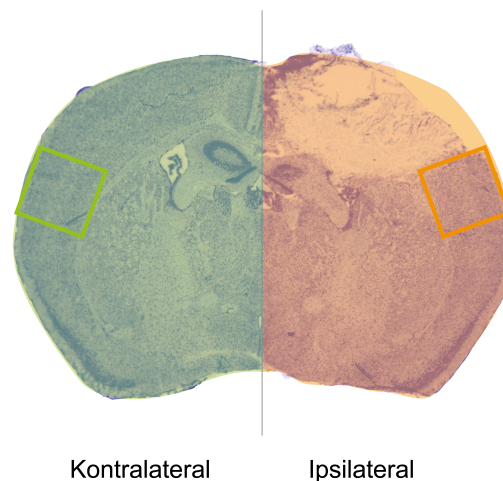


Abbildung 10: Illustration Region of Interest Immunhistochemie

Am Bsp. eines murinen Gehirns; Kryotomschnitt nach Kresylviolett-Färbung nach Nissl; CCI Hyp Maus #30 Schnittebene 9, Grün: ROI kontralaterale Hemisphäre, Orange: ROI ipsilaterale Hemisphäre

Zur Quantifizierung der markierten Zellen wurde eine *Region of Interest* (ROI) im kortikalen Bereich der ipsilateralen sowie kontralateralen Hemisphäre festgelegt. Die ROI liegt ipsilateral subkorkal/periläsional und kontralateral zur Läsion, spiegelhaft zum medialen Hemisphärenspalt in entsprechender Lage. Da bei den SHAM-Gruppen keine Schadensregion vorliegt, wird dort die ROI analog zu den CCI-Gruppen positioniert und analysiert. Innerhalb der ROI sind die fluoreszenzaktiven Zellen durch Erstellung einer Bilddatei dokumentiert und durch die Bearbeitung mit der Software *ImageJ* über eine Schwellenfunktion (Threshold), optimal darstell- sowie analysierbar. Die *Particel-Count* Funktion erfasst die Zielproteine mit einer Partikelgröße von 5-2000 *Quadratmikrometer* (μm^2). Anhand dessen werden die Zellzahlen der kontra- sowie ipsilateralen Hemisphäre eines Gehirns getrennt voneinander ausgewertet und arithmetisch gemittelt.

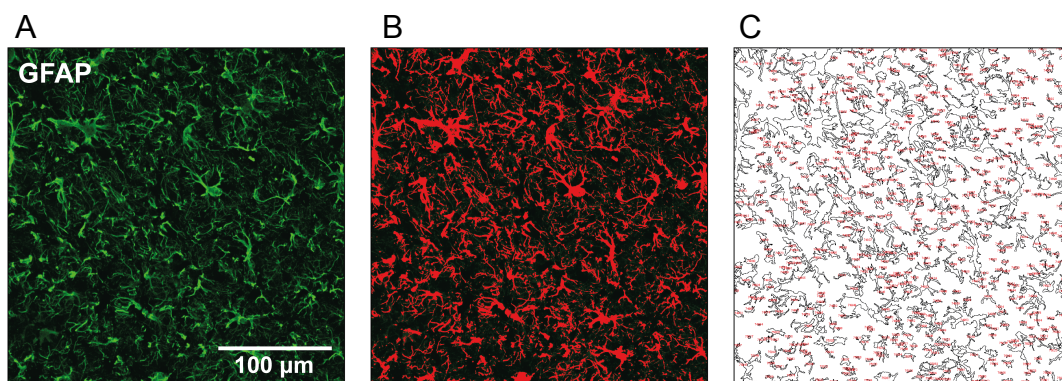


Abbildung 11: Immunhistologische Färbung und Auswertung von GFAP

Hirnschnitt Maus #37, CCI Veh, Schnittebene 12, ROI nach Immunhistologischer Färbung mit Immunfluoreszenzmarkierung, Auswertung mittels der Software *ImageJ*

A: Immunfluoreszenz GFAP **B:** *Threshold* via *ImageJ* **C:** Zellzählung via *ImageJ*

4.4. Molekularbiologische Datenerhebung

4.4.1. RNA Extraktion

Zur RNA-Isolation werden die Trimmschnitte als Probenmaterial herangezogen und mittels *Qiagen-Rneasy plus universal Kit* durchgeführt. Zu Beginn der RNA-Probengewinnung werden die Trimmschnitte in 2 *Milliliter* (ml) Tubes eingefüllt. Zur Lysierung des Gewebes erfolgt die Zugabe von 0,9 ml *Qiazol* Reagenz und anschließend folgt die Homogenisierung bei 20 *Hertz* (hz) für 2 min mittels eingefüllter Metallkugel und Benutzung der *Mastermill*. Nach einer 5-minütigen Inkubationsphase werden im nächsten Schritt 100 *Mikroliter* (μ l) *gDNA-Eliminator* hinzugegeben und anschließend 15 sec auf dem Vortex gemischt. Als nächstes wird 180 μ l Chloroform eingefüllt und auch hier wieder 15 sec mittels *Vortex* gemischt. Im Anschluss der Inkubationszeit von 2 min, folgt die Phasentrennung für 15 min bei 4 °C und 12000 x *g* durch Zentrifugation. Die drei sichtbar gewordenen Phasen zeigen sich von unten nach oben als rote organische Phase mit lysierten Proteinen, milchige DNA-Phase, und als farblose wässrige Phase mit ca. 600 μ l, die die RNA beinhaltet. Nach Abpipettieren der RNA-Fraktion wird diese einem vorbereiteten 1,5 ml Tube mit 600 μ l 70%igem Ethanol hinzugefügt und vermischt. Die Probe wird nun mit 700 μ l in eine Trennsäule umgefüllt. Diese enthält eine Silikatmembran, mit der es durch Ethanol zu einer RNA-selektiven Anheftung kommt. Dies geschieht bei erneuter Zentrifugation (8000 x *g*) für 15 sec bei RT. Hiernach entsteht ein flüssiger Durchlauf, der verworfen wird. Nun folgt die Aufreinigung des RNA-Materials in folgenden Waschschrritten: pipettieren von 700 μ l *RWT Puffer*, Zentrifugation (15 sec, 8000 x *g*), Durchlauf verwerfen, pipettieren von 500 μ l *RPE Puffer*, Zentrifugation (15 sec, 8000 x *g*) und erneuter Vorwurf des Durchlaufs. Anschließend erfolgt eine letzte Waschung mit 500 μ l *RPE Puffer* und einer Zentrifugation für 2 min bei 8000 x *g* zur Trocknung. Hier wird das äußere Collection Tube gegen ein neues ausgetauscht und zum Nachtrocknen für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Zum Eluieren der isolierten RNA wird nochmal das *Collection Tube* gewechselt, die Membran mit 30 μ l RNase-freiem Wasser pipettiert und anschließend für 1 min bei 8000 x *g* zentrifugiert. Die Konzentration des im *Collection*

Tube befindlichen RNA-Eluats wird nun photometrisch gemessen und danach bis zur weiteren Untersuchung bei -80 °C gelagert.

Zur Konzentrationsbestimmung der RNA wird eine photometrische Bestimmung durchgeführt. Dazu wird eine Küvette mit 1 µl des RNA-Eluats in das Photometer gestellt und anhand der *Optischen Dichte* (OD) bei bestimmter Wellenlänge, die *Konzentration* (C_{RNA}) in Mikrogramm pro Mikroliter (µg/µl) bestimmt. Die Messung der Extinktion (OD_{260}) bei einer Wellenlänge von 260 *Nanometer* (nm) entspricht dem Absorptionsmaximum der RNA. Die OD_{260} entspricht bei einem Wert von 1,0 der Konzentration von 0,4 *Mikrogramm pro Milliliter* (µg/ml). Somit errechnet sich die RNA-Konzentration wie folgt:

$$C_{\text{RNA}} = OD_{260} * \text{Verdünnungsfaktor} * 40 \mu\text{g/ml}$$

Um eventuelle Kontaminationen des Eluats durch Proteine festzustellen, wird eine zweite Messung (OD_{280}), passend zum Absorptionsmaximum von Proteinen mit einer Wellenlänge von 280 nm durchgeführt. Hiermit wird der Reinheitsgrad der Probe anhand des Quotient aus OD_{280} und OD_{260} berechnet. Um für die Synthese der *komplementären DNA* (cDNA) geeignet zu sein, sollte dieser Wert in einem Bereich von 1,8 und 2,1 liegen (162).

4.4.2. cDNA

Das extrahierte RNA-Material dient als Matrize und wird mit dem *Qiagen-QuantiTect Reverse Transcription Kit* durch Reverse Transkription in komplementäre DNA umgeschrieben. Um den Abbau der DNA während der folgenden Bearbeitungsschritte zu verhindern, wird das Material auf Eis gelagert und bearbeitet.

Zu Beginn des Vorgangs wird je 0,5 µg der RNA-Probe, 2 µl *gDNA Wipeout Puffer* sowie 14 µl RNase-freies Wasser hinzugefügt und anschließend für 8 min auf 42 °C erwärmt. Durch diesen Bearbeitungsschritt wird jegliche *genomische DNA* (gDNA) destruiert und somit eliminiert. Im nächsten Schritt kommt es zur reversen Transkription. Hierfür wird pro Probe ein

Mastermix angesetzt (1 μ l *Quanti-script Reverse Transkriptase*, 1 μ l *RT Primer Mix* und 4 μ l *Quantiscript RT Puffer*) und dem Probenmaterial hinzugefügt. Während der 30-minütigen Inkubation bei 42 °C, bindet die RNA-abhängige DNA-Polymerase an die Primer der RNA und erzeugt einen cDNA Strang. Durch Inaktivierung mittels 3-minütigem Erhitzen auf 95 °C, wird die reverse Transkription beendet. Zuletzt erfolgt die Hydrolyse zwischen RNA- und cDNA-Strang mit dem Enzym *Ribonuklease H* (RNaseH) und somit die Separation der cDNA von der RNA.

Das synthetisierte cDNA-Material dient als Vorlage zur Analyse mittels *quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction* (qRT-PCR) und wird bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert.

4.4.3. qRT-PCR

Als Grundlage für die qRT-PCR dient das herkömmliche Prinzip der *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Bei dieser *in vitro* Methode werden spezifische DNA-Abschnitte, das sogenannte Amplicon, vervielfältigt. Ein Zyklus der Amplifizierung beinhaltet mehrere Abschnitte, die in einem *Thermocycler* nach standardisiertem Schema durchgeführt werden. Zunächst beginnt die Denaturierungsphase bei 95 °C, wodurch sich die Wasserbrückenbindungen der DNA-Stränge lösen und es zur einer Strangseparation kommt. Um hier eine erneute Bindung zu verhindern, folgt eine rapide Abkühlung auf 65 °C. In der anschließenden *Annealingphase* wird das Amplicon durch die Bindung von verschiedenen spezifischen Oligonukleotidsequenzen, den sogenannten Primern, selektiert. Die Hybridisierung des Primers erfolgte für 30 sec bei einer, je nach Typus und Länge, spezifischen Temperatur zwischen 55 °C und 65 °C. Primer markieren als komplementäre Sequenz, bestehend aus 20-30 Nukleotiden, den Start- und Endpunkt für die DNA-Polymerase. In der Elongationsphase bindet die DNA-Polymerase bei optimaler Arbeitstemperatur zwischen 68 °C und 72 °C an den Primer. Zwischen den Primerpaaren beginnt das Ablesen des Einzelstranges am 3' Ende, wodurch der komplementäre DNA-Strang mit den korrespondierenden desoxygenierten Nukleotiden dATP, dCTP, dTTP und dGTP zusammengesetzt wird (163).

Zur Durchführung, Amplifikation und Detektion kommt hier das *LightCycler 480 System* zum Einsatz. Zur Quantifizierung der RNA wird im Rahmen der Arbeit die qRT-PCR angewandt.

Neben dem Duplizieren der DNA-Abschnitte, wird durch Detektion von Fluoreszenzsignalen in Echtzeit die vorliegende Anzahl der DNA-Kopien gemessen. Der verwendete Cyanin-Farbstoff *SYBR green I* bindet unspezifisch an den DNA-Doppelstrang. Alternativ wäre dieser Vorgang auch mit einer Target spezifischen fluoereszenz Hybridisierungssonde möglich. Der Fluoreszenzfarbstoff wird durch eine externe Lichtquelle angeregt, und die so entstandene Signalemission gemessen. Die Signalintensität korreliert mit der Anzahl der Amplifikationen, wodurch es bei jedem weiterem PCR-Zyklus zu einem proportionalen Anstieg kommt.

Die Signalemission wird anschließend gegen die Anzahl der PCR-Zyklen graphisch aufgetragen. Die Kurve zeigt den Zusammenhang zur Menge an PCR-Produkten an. Nach der relativ flachen Anfangsphase, in der eine langsame Amplifikation stattfindet, zeigt sich in der mittleren exponentiell ansteigenden Phase ein gesteigertes Wachstums mit höchster Amplifikationsrate. Darauf folgt eine Plateauphase, die durch eine konstante Fluoreszenzemission einen Stillstand der Amplifikation anzeigt. Der *Crossing Point* (CP) liegt in der Phase des exponentiellen Anstiegs und beschreibt den Punktwert der Zyklusanzahl, an dem das Fluoreszenzsignal deutlich höher als das Hintergrundsignal ist. Zur Effizienzbestimmung der PCR-Reaktion wird eine in Standardlösung enthaltene bekannte cDNA-Konzentration analysiert und in einer Standardkurve aufgetragen. Durch den Abgleich mit dem CP lässt sich indirekt die cDNA-Konzentration der Probe ermitteln. Bei einer optimalen Effizienz kommt es zu einer Verdopplung des amplifiizierten Genabschnittes je PCR-Durchgang. Diese unterscheidet sich allerdings je nach Zielgen. Um die Effizienz der Zielgene relativ zur Quantifizierung bestimmen zu können, wird zur Normalisierung ein Abgleich mit den Expressionswerten des *Peptidylprolyl Isomerase A* Gen (PPIA) durchgeführt. Dieses Gen codiert das Enzym Cyclophilin A, zählt zu den *Houskeeping* Genen und wird deshalb unabhängig sowie konstant exprimiert (164). Für die Messung wird das

PPIA Gen für jede Probe bestimmt und gegen vier Negativkontrollen mit Wasser abgeglichen.

Die hier angewandte qPCR erfolgt mit folgenden Targets: *Transient Receptor Potential Channel 6* (TRPC6), als ein transmembraner ligandengesteuerter unselektiver Kationenkanal; *Interleukin 1 beta* (IL-1 β), ein Zytokin und Entzündungsmediator; *Interleukin 6* (IL-6), ein Zytokin und Entzündungsmediator; BDNF, ein neuronaler Wachstumsfaktor; *c-Fos*, ein Proto-Onkogen, Transkriptionsfaktor sowie Marker für neuronale und gliale Aktivität; das *Activity-regulated cytoskeleton-associated protein* (Arc), ein neuronales Protein und Marker für synaptische Plastizität.

4.5. Proteinanalysen

4.5.1. Proteinextraktion

Zur Extraktion der Proteine werden die im Vorhinein aus dem Hirngewebe gewonnenen ipsilateralen Trimmstücke als Probenmaterial herangezogen. Zur Lysierung des Gewebes werden 150 μ l *Radioimmunoprecipitation assay buffer* (RIPA) hinzugefügt und für 10 min auf Eis inkubiert. Die im Puffer enthaltene *Ethylendiamintetraessigsäure* (EDTA) dient als Komplexbildner. Der Proteaseinhibitor schützt die Proteine vor einem enzymatischen Abbau und die Detergenzien sorgen für das Auflösen der Tertiär- sowie Quartärstrukturen der Proteine. Es folgen zwei Durchgänge auf dem *Vortex* je 1 min bei 20 Hertz zur Homogenisierung. Im Anschluss folgt eine Zentrifugation bei 4 °C für 20 min und 14000 x g. Der entstandene Überstand wird pipettiert, in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und anschließend bis zur Weiterverwendung bei -80 °C gelagert. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wird das *Lowry DC Protein Assay* verwendet und wie folgt angesetzt: 2 μ l einer Probe werden vor der Messung mit Wasser (1:10) verdünnt und zu je 0,5 μ l im doppelten Ansatz neben einer Standardreihe von je 0,5 μ l (Proteinkonzentration 0; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 μ g/ μ l) auf eine 96-well Platte pipettiert. Anschließend wird jedem Well jeweils 25 μ l ein Gemisch aus Reagent A (50 Teile), Reagent B (250 μ l) und Reagent S (1 Teil) beigegeben. In der 12-

minütigen lichtgeschützten Inkubationszeit wird durch eine enzymatische Reaktion, in Abhängigkeit der Proteinmenge, ein Farbstoff gebildet. Die Lichtabsorption des Farbstoffes wird anschließend photometrisch bei 750 nm analysiert. Die Proteinkonzentrationen ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) wird anhand einer Standardkurve, unter Berücksichtigung der verwendeten Verdünnung, ermittelt.

4.5.2. Elektrophorese

Mittels der *Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamid Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) werden die Proteine anhand ihrer Größe aufgetrennt. Die Auftrennung der Proteine erfolgt durch das im Ladepuffer enthaltene SDS. Daneben dient das β -Mercaptoethanol als Reduktionsmittel, wodurch die Disulfidbrücken der Proteine gelöst werden. Durch die Bindung des SDS an die Eiweißstrukturen, bilden sich folglich negative geladene Komplexe, wodurch das Vorliegen eines Massen/Ladungsverhältnisses im elektrischen Feld eine größen- bzw. ladungsabhängige Bewegung der Proteine zur Anode verursacht. Das SDS-Gel besteht aus einem Sammel- Trenngel. Das Sammelgel stapelt die Proteine im Übergang zum Trenngel, wonach die Proteine ihrer Größe entsprechend unterschiedlich schnell bzw. weit durch das elektrische Feld wandern. Dies wird dadurch unterstützt, dass Glycin im Sammelgel (neutral) als Zwitterion vorkommt und im Trenngel (basisch) als Anion vorliegt.

4.5.3. Western Blot

Nach der Auftrennung der Proteine kommt es mittels Western Blot zur Quantifizierung der Proteine. Hierfür werden diese auf eine Trägermembran übertragen. Von dort aus können die Proteine danach mit Hilfe von unterschiedlichen Detektionsverfahren dargestellt. Dazu werden die Trägermembranen im *Odyssey Infrarot Fluoreszenz Detektionssystem* vermessen und anschließend quantitativ durch die Software *Image Studio Line* ausgewertet. Diese Software misst die Intensität der Proteinbande sowie die Bande eines Kontrollproteins und bildet davon den Quotienten. Damit wird die relative Proteinexpression angegeben. Grundlage dafür ist ein Protein, die *Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase* (GAPDH),

dass wie bei den *Housekeeping* Genen unabhängig und stabil gegenüber endogenen sowie exogenen Einflüsse synthetisiert wird.

Die im Rahmen dieser Untersuchung extrahierten Proteine sind folgende: GFAP, ein Intermediärfilament der reaktiven Astrozyten; BDNF, ein neuronaler Wachstumsfaktor; Arc, ein neuronales Protein und Marker für die synaptische Plastizität; COX-2, ein Enzym, dass an der Katalyse Prostaglandinesynthese beteiligt ist und dadurch ein Regulator von Entzündungsreaktionen darstellt und Spektrin, als ein Bestandteil des Zytoskeletts von Neuronen und Marker für neuronalen Zelltod.

4.5.4. Dot Blot

Die Dot-Blot-Methode ermöglicht einen quantitativen Nachweis von spezifisch markierten Proteinen, deren Detektion auf der Messung eines Fluoreszenzsignals beruht. Die jeweilige Proteinkonzentration dient als Basis für die Untersuchung von 10 µg Protein pro Probe, welche mit RIPA-Puffer bis zu einem Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt wird. Zu Beginn erfolgt die Applikation eines Volumens von 2 µl (entsprechend 10 µg Protein) auf die vormarkierten Stellen, sogenannten *Dots*, einer Nitrozellulose-Membran. Des Weiteren werden Proben einer zweifachen Negativkontrolle mit RIPA-Puffer ergänzt. Nach einer 45-minütigen Lufttrocknung erfolgt die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen durch die Zugabe einer 5 %igen Magermilch-Blockierlösung auf die in einer Reaktionskammer befindliche Membran. Im nächsten Schritt folgt eine Inkubation bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 60 min auf einer Rüttelplatte. Danach findet eine einstündige Inkubation bei Dunkelheit mit einem fluoreszenzfarbstoffbeladenen Antikörper gegen das murine Zielprotein statt. Nach dreimaligem Waschen der Membran auf der Rüttelplatte in *Tris-buffered saline with Tween20* (TBST) für jeweils 10 min, erfolgt die Messung des Fluoreszenzsignals unter Verwendung des *Odyssey Infrarot Fluoreszenz Detektionssystem*s.

Im Rahmen dieser Untersuchung wird IgG als Zielprotein analysiert. Die Detektion des körpereigenen IgG im Hirngewebe kann als exemplarischer Nachweis einer BHS-Störung betrachtet werden.

4.6. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und graphische Darstellung erfolgt mit der Software *GraphPad Prism 7.0a* für *macOS*. Das Signifikanzniveau wird auf *p-Wert* (p) = 0,05 festgelegt. Für $p < 0,05$ wird eine statistische Signifikanz angenommen. In der graphischen Darstellung werden verschiedene Signifikanzniveaus mit Sternsymbolen (*) gekennzeichnet: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Ein Ergebnis, welches keine Signifikanz erreicht, jedoch einen p -Wert $< 0,1$, wird als statistischer Trend bezeichnet. Die erhobenen Datensätze werden nach dem folgendem Schema ausgewertet: zuerst werden in den Daten mittels *ROUT-Test* ($Q = 1\%$) Ausreißer entfernt. Die verbleibenden Werte werden mit dem *Shapiro-Wilk-Test* auf Normalverteilung untersucht. Zwei Gruppen mit normalverteilten Daten werden anschließend mit dem ungepaarten *t-Test* auf Signifikanz geprüft. Bei fehlender Normalverteilung werden die Daten mit dem *Mann-Whitney-U-Test* auf signifikante Unterschiede untersucht. Datensätze mit normalverteilten Daten aus mehr als zwei Gruppen werden mit dem ungepaarten *one-way ANOVA-Test* ausgewertet und der Korrektur nach *Holm-Šídák* unterzogen. Liegt keine Normalverteilung vor, wird der *Kruskal-Wallis-Test* herangezogen und nach *Dunn* korrigiert. Statistische Vergleiche zwischen Gruppen verschiedener Zeitpunkte werden mit dem *Two-Way ANOVA-Test* aufgestellt und mit anschließender Korrektur des Signifikanzniveaus nach *Holm-Šídák* geprüft. Zur graphischen Darstellung werden anhand der *Mittelwerte* (MW) Säulendiagramme erstellt und dessen *Standardfehler* (SEM) als Fehlerbalken angezeigt. Abweichungen davon finden explizite Erwähnung.

5. ERGEBNISSE

Die vorliegenden Ergebnisse fokussieren sich auf die Auswirkungen des Hyperforin-Derivates *Hyp1* und die damit verbundenen Unterschiede zwischen den beiden Interventionsgruppen (CCI Veh, CCI Hyp). Die Auswertung zeigt zwischen den scheinoperierten Gruppen (SHAM Veh, SHAM Hyp) und den CCI-Gruppen einige signifikante Unterschiede, die bei diesem etablierten tierexperimentellen Modell bereits mit zahlreichen Belegen nachgewiesen wurden und deshalb zu erwarten waren. Alle Signifikanzen der statistischen Auswertung werden angezeigt aber nur bei entsprechender Relevanz ausführlich erläutert.

5.1. Verhaltensbiologische Ergebnisse

Die nachfolgenden Analysen basieren auf Daten, die vor der Euthanasie der Tiere und im Rahmen des Experiments erhoben wurden.

5.1.1. Körpergewicht

Das Körpergewicht der Tiere lässt Rückschlüsse auf das jeweilige Essverhalten zu. Es kann somit als Indikator für das Wohlbefinden der Mäuse herangezogen werden. Es wird deshalb angenommen, dass die Nahrungsaufnahme gesunder Mäuse ungestört ist und diese ihr Gewicht konstant halten oder steigern. Bei Mäusen, die körperlichem Stress ausgesetzt werden, kann ein gestörtes Essverhalten festgestellt werden, was letztlich eine abweichende Gewichtsentwicklung zur Folge hat.

Zwischen PräOp vs. D1 und PräOp vs. D3 zeigt sich im Gegensatz zu den SHAM-Gruppen, ein negativer Trend in der Gewichtsabnahme aufseiten der CCI-Gruppen. Bei den SHAM-Gruppen führt der zeitliche Verlauf ab PräÖP vs. D5 zu einer Normalisierung bzw. leichten Gewichtszunahme. Wobei die CCI-Gruppen das Maximum des Gewichtsverlustes nach D3 zu kompensieren scheinen und es an D5 zu eine Trendumkehr kommt.

Im Vergleich D1 vs. D5 prägt sich der Gewichtsverlust bei den CCI -Gruppen aus. Der stärkste Trend liegt bei der Gruppe CCI Hyp. Eine signifikante Differenzierung zwischen den beiden CCI-Gruppen ist jedoch

zu keinem Zeitpunkt vorhanden. Die Hyperforin-Behandlung führt demnach nicht zu einer Verbesserung des allgemeinen Zustandes der Versuchstiere, die einem CCI ausgesetzt wurden. (CCI Veh vs. CCI Hyp; PräOP vs. D1: $p = 0,97$, PräOP vs. D3: $p = 0,52$, PräOP vs. D5: $p = 0,45$, D1 vs. D5: $p = 0,40$). Signifikante Unterschiede zwischen den SHAM- und CCI-Gruppen sind im Kausalzusammenhang mit dem spezifischen Versuchsaufbau zu erwarten.

PräOP: SHAM Veh $n = 8$, SHAM Hyp $n = 8$, CCI Veh $n = 11$, CCI Hyp $n = 12$, Mittelwerte \pm SEM, PräOP vs. D1: SHAM Veh: $0,70 \pm 0,21$, SHAM Hyp: $0,52 \pm 0,43$, CCI Veh: $0,33 \pm 0,14$, CCI Hyp: $0,47 \pm 0,13$; PräOP vs. D3: SHAM Veh: $0,14 \pm 0,26$, SHAM Hyp: $-0,08 \pm 0,28$, CCI Veh: $-0,78 \pm 0,24$, CCI Hyp: $-1,10 \pm 0,19$; PräOP vs. D5: SHAM Veh: $0,21 \pm 0,11$, SHAM Hyp: $0,29 \pm 0,34$, CCI Veh: $-0,28 \pm 0,19$, CCI Hyp: $-0,62 \pm 0,24$; D1 vs. D5: SHAM Veh: $-0,49 \pm 0,26$, SHAM Hyp: $-0,23 \pm 0,40$, CCI Veh: $-0,61 \pm 0,16$, CCI Hyp: $-1,09 \pm 0,18$.

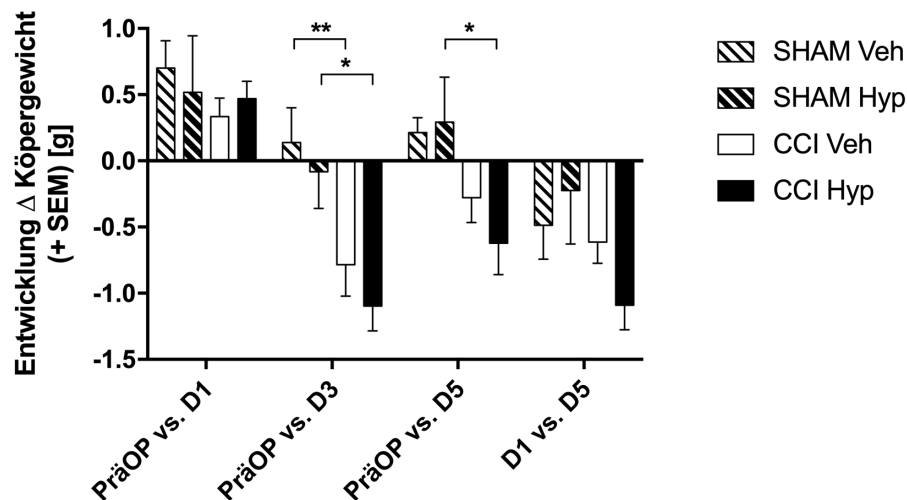


Abbildung 12: Entwicklung des Körpergewichts als Differenz zu PräOP

Entwicklung des Körpergewichts in Gramm (g) als Differenz zum Ausgangswert des präoperativen Tages (PräOP) zum ersten postoperativen Tag (PräOP vs. D1), dritten postoperativen Tag (PräOP vs. D3), fünften postoperativen Tag (PräOP vs. D5) sowie zwischen 1. und 5. postoperativen Tag (D1 vs. D5), Mittelwerte \pm SEM, SHAM Veh $n = 8$, SHAM Hyp $n = 8$, CCI Veh $n = 11$, CCI Hyp $n = 12$, two-way ANOVA, Korrektur nach Holm-Šidák, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

5.1.2. Neurological Severity Score

Der NSS findet Anwendung bei der standardisierten Leistungsbewertung neuromotorischer Fähigkeiten. Der Schweregrad des neurologischen Defizits nimmt mit steigendem Score zu. (155, 156)

Bei der Erhebung des NSS an D1 wurde bei einem der Versuchstiere ein starkes neurologisches Defizit festgestellt. Die daraus resultierende Prognose war nicht vereinbar mit dem Wohlbefinden des Versuchstieres, wodurch eine vorzeitige Euthanasie eingeleitet wurde. Aufgrund dessen reduzierte sich die Gesamtanzahl der Versuchstiere von $n = 40$ auf $n = 39$ und nach Entblindung aus der Gruppe CCI Veh auf $n = 11$.

Die durch SHT verursachten Defizite spiegeln sich in stark erhöhten Punktwerten der CCI-Gruppen wieder. Während sich zwischen D1 und D5 der Score bei SHAM Veh kaum verändert, zeigt sich im Vergleich ein nicht signifikanter, aber erhöhter Score der SHAM Hyp Gruppe. Dieser Trend zeichnet sich auch in den Vergleichen der Zeitpunkte zu PräOP ab. In der CCI-Gruppe kommt es ab D5 zu einem minimalen positiven Trend auf Seiten der CCI Hyp Gruppe verglichen mit dem PräOp Score. Dieser Trend zeigt sich auch in Daten von D1 bis D5. Allerdings lässt sich dies nur mit einer minimal verbesserten Punktzahl im Nachkommabereich bewerten.

Eine signifikante Differenzierung zwischen den beiden CCI-Gruppen ist zu keinem Zeitpunkt vorhanden. Die Hyperforin-Behandlung führt demnach nicht zu einer signifikanten Verbesserung der neuromotorischen Fähigkeiten der Versuchstiere, die einem CCI ausgesetzt wurden (CCI Veh vs. CCI Hyp; PräOP vs. D1: $p = 0,98$, PräOP vs. D3: $p = 0,57$, PräOP vs. D5: $p = 0,68$, D1 vs. D5: $p = 0,85$). Signifikante Unterschiede zwischen den SHAM- und CCI-Gruppen sind im Kausalzusammenhang mit dem spezifischen Versuchsaufbau zu erwarten.

PräOP: SHAM Veh $n = 8$, SHAM Hyp $n = 8$, CCI Veh $n = 11$, CCI Hyp $n = 12$, Mittelwerte \pm SEM, PräOP vs. D1: SHAM Veh: $0,50 \pm 0,42$, SHAM Hyp: $0,00 \pm 0,46$, CCI Veh: $4,73 \pm 0,79$, CCI Hyp: $4,75 \pm 0,64$; PräOP vs.

D3: SHAM Veh: $-0,25 \pm 0,31$, SHAM Hyp: $1,38 \pm 0,53$, CCI Veh: $4,09 \pm 0,71$, CCI Hyp: $4,58 \pm 0,71$; PräOP vs. D5: SHAM Veh: $0,63 \pm 0,60$, SHAM Hyp: $1,88 \pm 0,79$, CCI Veh: $4,36 \pm 0,74$, CCI Hyp: $4,00 \pm 0,62$; D1 vs. D5: SHAM Veh: $0,13 \pm 0,44$, SHAM Hyp: $1,88 \pm 0,79$, CCI Veh: $-0,36 \pm 0,72$, CCI Hyp: $-0,75 \pm 0,65$.

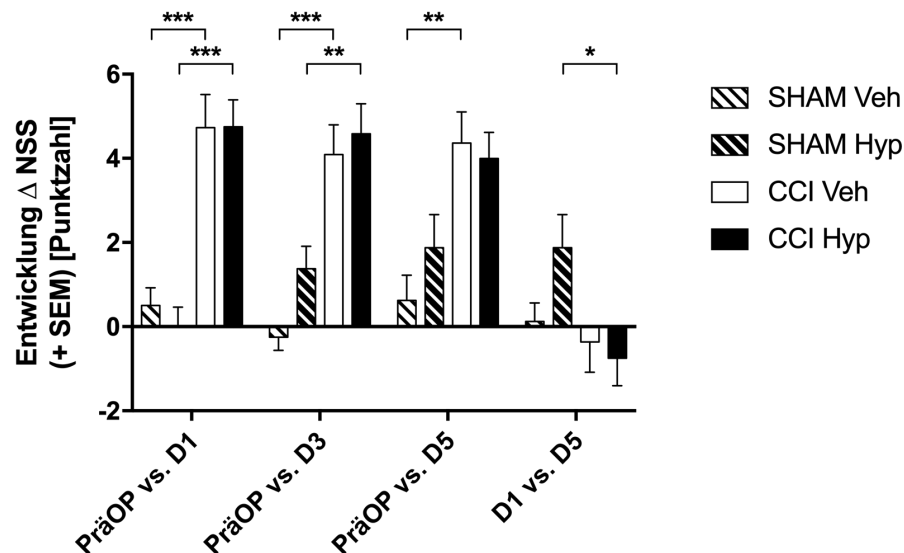


Abbildung 13: Entwicklung des NSS als Differenz zu PräOP

Entwicklung des NSS als Punktzahl in Differenz zum Ausgangswert des präoperativen Tages (PräOP) zum ersten postoperativen Tag (PräOP vs. D1), dritten postoperativen Tag (PräOP vs. D3), fünften postoperativen Tag (PräOP vs. D5) sowie zwischen ersten und fünften postoperativen Tag (D1 vs. D5), Mittelwerte \pm SEM, SHAM Veh n = 8, SHAM Hyp n = 8, CCI Veh n = 11, CCI Hyp n = 12, two-way ANOVA, Korrektur nach Holm-Šidák, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001

5.1.3. Rotarod

Die Rotarod Testung ermöglicht eine objektive Einschätzung der motorischen Fähigkeiten (u. a. Ausdauerfähigkeit und Greifkraft) der Versuchstiere (157).

Die beiden CCI-Gruppen zeigen im Vergleich PräOP zu D1 eine zu erwartenden, ausgeprägte Leistungsminderung. Bis zum Zeitpunkt D5 lässt sich eine Teilkompensation des Defizits darstellen. Bei CCI Hyp lässt sich im Gegensatz zu CCI Veh mit einer 18%igen längeren Laufzeit ein leichter Vorteil und minimaler Trend interpretieren. Die Hyperforin-Behandlung führt demnach nicht zu einer signifikanten Verbesserung der Laufleistung der Versuchstiere, die einem CCI ausgesetzt wurden (CCI Veh vs. CCI Hyp; PräOP vs. D1: p = 0,96, PräOP vs. D3: p = 0,83, PräOP vs. D5: p = 0,94, D1 vs. D5: p = >0,99). Tendenzen zwischen SHAM- und

CCI-Gruppen sind im Kausalzusammenhang mit dem spezifischen Versuchsaufbau zu erwarten.

PräOP: SHAM Veh n = 8, SHAM Hyp n = 8, CCI Veh n = 11, CCI Hyp n = 12, Mittelwerte \pm SEM, PräOP vs. D1: SHAM Veh: $-1,50 \pm 25,37$, SHAM Hyp: $-12,75 \pm 23,64$, CCI Veh: $-57,82 \pm 12,66$, CCI Hyp: $-56,75 \pm 10,12$; PräOP vs. D3: SHAM Veh: $24,44 \pm 23,96$, SHAM Hyp: $7,38 \pm 24,34$, CCI Veh: $-13,18 \pm 19,66$, CCI Hyp: $-18,17 \pm 9,54$; PräOP vs. D5: SHAM Veh: $21,56 \pm 29,77$, SHAM Hyp: $15,38 \pm 24,70$, CCI Veh: $-23,55 \pm 16,00$, CCI Hyp: $-16,21 \pm 13,71$; D1 vs. D5: SHAM Veh: $23,06 \pm 18,16$, SHAM Hyp: $28,13 \pm 9,40$, CCI Veh: $34,27 \pm 10,10$, CCI Hyp: $40,54 \pm 13,58$.

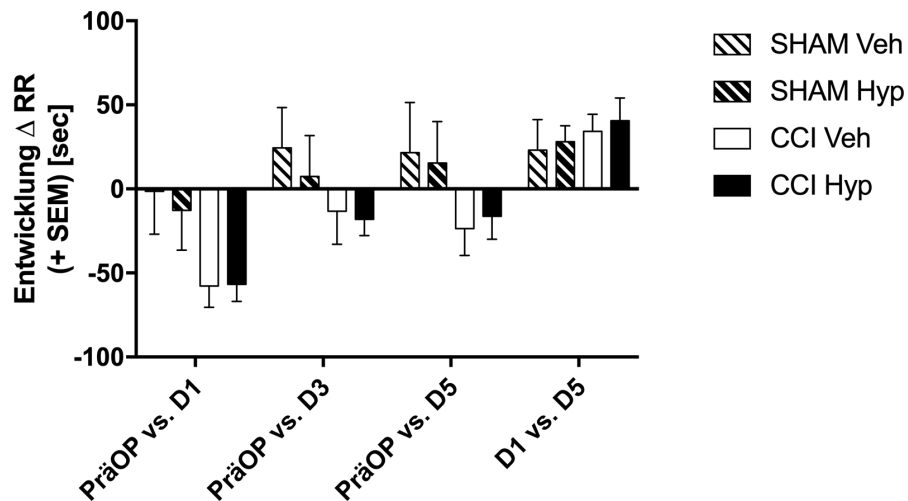


Abbildung 14: Entwicklung der Rotarod Testläufe als Differenz zu PräOP

Entwicklung des Rotarod Testlaufs als Dauer (sec) in Differenz zum Ausgangswert des präoperativen Tages (PräOP) zum ersten postoperativen Tag (PräOP vs. D1), dritten postoperativen Tag (PräOP vs. D3), fünften postoperativen Tag (PräOP vs. D5) sowie zwischen ersten und fünften postoperativen Tag (D1 vs. D5), Mittelwerte \pm SEM, SHAM Veh n = 8, SHAM Hyp n = 8, CCI Veh n = 11, CCI Hyp n = 12, two-way ANOVA, Korrektur nach Holm-Šídák

5.2. Histologische Ergebnisse

5.2.1. Schadensvolumen

Im Rahmen der histopathologischen Untersuchung des Hirnschadens erfolgt zunächst eine Erfassung des Hirnvolumens sowie des Schadensvolumens beider CCI-Gruppen mittels Kresylviolett-Färbung.

Im Vergleich der beiden Interventionsgruppen zeigt sich kein signifikanter Unterschied im Kontusionsvolumen (CCI Veh vs. CCI Hyp: $p = 0,2771$). Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass die Hyperforin-Therapie zu keiner Veränderung des Schadensvolumens nach CCI führt.

Das Schadensvolumen (mm^3) zwischen den beiden CCI-Gruppen ergibt folgende Werte: Mittelwerte \pm SEM, CCI Veh: $n = 11$, 22.32 ± 1.005 , CCI Hyp: $n = 12$, 24.39 ± 1.52 .

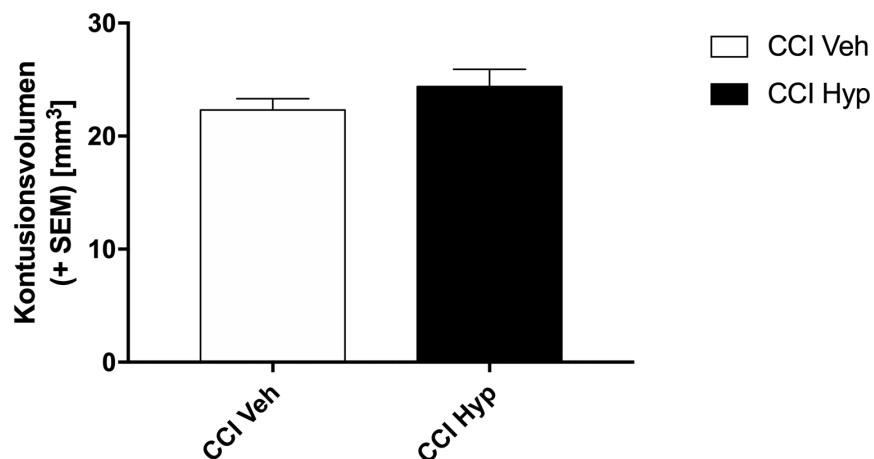


Abbildung 15: Schadensvolumen nach CCI

Schadensvolumen (mm^3) zwischen den beiden CCI-Gruppen, Mittelwerte \pm SEM, CCI Veh $n = 11$, CCI Hyp $n = 12$, ungepaarter t-Test

5.2.2. Immunhistologie

Durch immunhistochemische Methoden lassen sich spezifische Proteine im periläsionalen Areal des ipsilateralen Hirngewebes durch indirekte Fluoreszenzmarkierung darstellen und im Bereich eines Gesichtsfeldes bzw. ROI quantitativ auswerten.

5.2.2.1. GFAP

Eine gesteigerte Expression von GFAP lässt auf einen reaktiven Zustand der Astrozyten schließen, womit sich eine verstärkte Induktion einer neuroprotektiven Astrogliose nachweisen lassen kann. (85, 89)

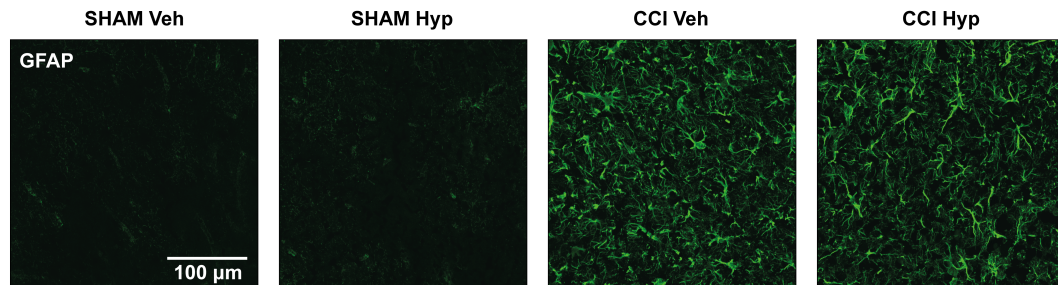


Abbildung 16: Immunhistologische Färbung GFAP

Beispielhafte ROI der jeweiligen Untersuchungsgruppe, GFAP Immunfluoreszenz

Die statistische Auswertung der Anzahl, Gesamtfläche sowie der *durchschnittlichen* (\varnothing) Größe der immunreaktiven GFAP-Strukturen in den jeweiligen ROI ergab keine signifikanten Differenzierungen zwischen den beiden CCI-Gruppen (CCI Veh vs. CCI Hyp: Anzahl $p = > 0,99$, Gesamtfläche $p = > 0,99$, \varnothing -Größe $p = > 0,99$). Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass die Hyperforin-Therapie die Astrozyten-Aktivität nach CCI nicht signifikant steigert. Signifikante Unterschiede zwischen den SHAM- und CCI-Gruppen sind im Kausalzusammenhang mit dem spezifischen Versuchsaufbau zu erwarten.

SHAM Veh $n = 8$, SHAM Hyp $n = 8$, CCI Veh $n = 11$, CCI Hyp $n = 12$.
 Mittelwerte \pm SEM, A: SHAM Veh: $30,6 \pm 11,9$, SHAM Hyp: $48,2 \pm 14,8$,
 CCI Veh: $624 \pm 24,5$, CCI Hyp: $576 \pm 26,7$; B: SHAM Veh: 230 ± 103 ,
 SHAM Hyp: $271 \pm 89,5$, CCI Veh: 15473 ± 1079 , CCI Hyp: 12527 ± 1089 ;
C: SHAM Veh: $6,98 \pm 0,791$, SHAM Hyp: $6,9 \pm 0,509$, CCI Veh: $25 \pm 1,78$,
 CCI Hyp: $21,4 \pm 1,76$.

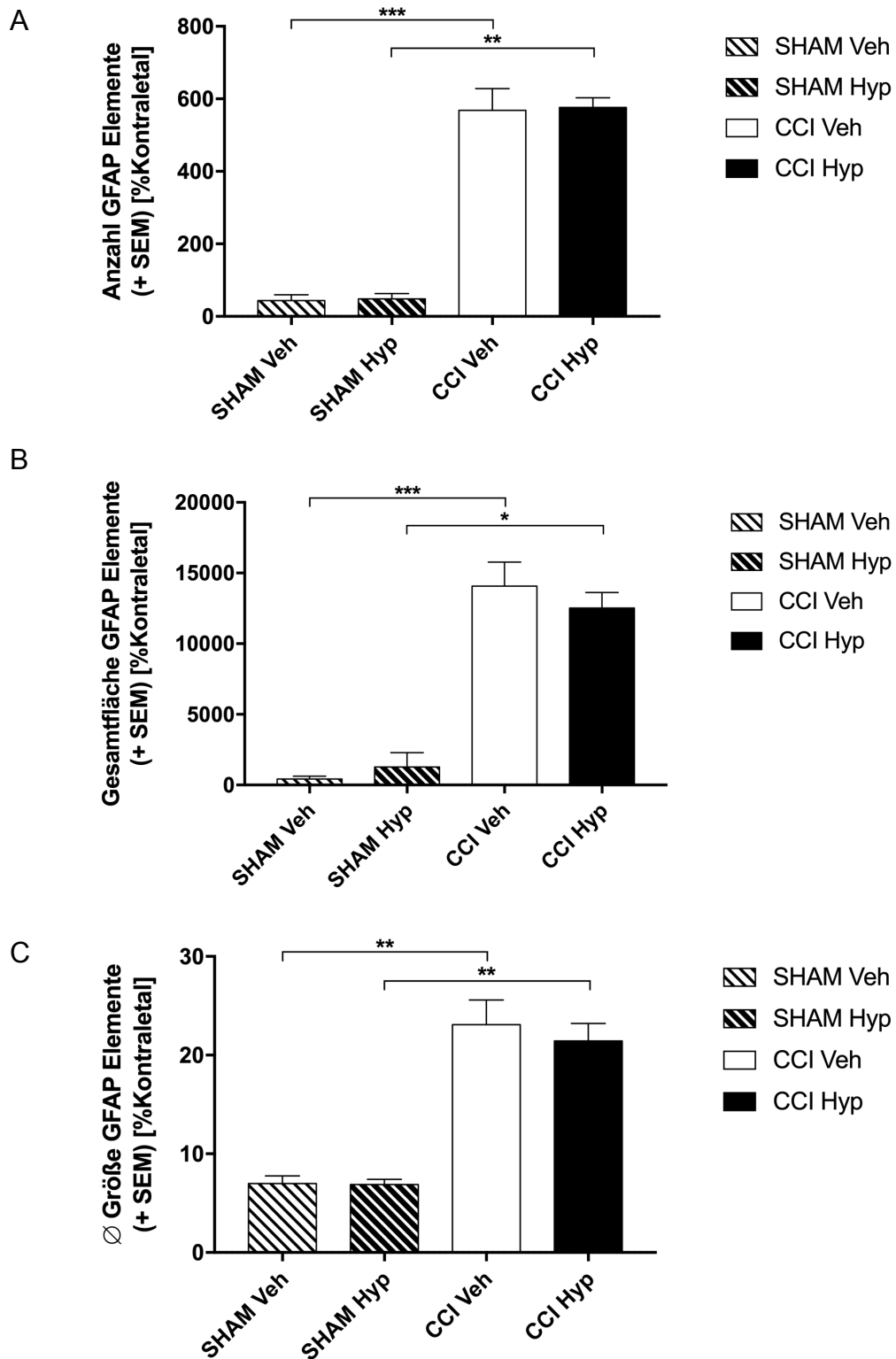


Abbildung 17: Immunhistochemischer Nachweis der GFAP-Elemente

Nachgewiesene GFAP-Elemente in der jeweiligen Region of Interest (ROI). Mittelwerte \pm SEM, SHAM Veh n = 8, SHAM Hyp n = 8, CCI Veh n = 11, CCI Hyp n = 12, Kruskal-Wallis-Test, Korrektur nach Dunn, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001

A: Anzahl (n) GFAP-Elemente, Kruskal-Wallis-Test, Korrektur nach Dunn

B: Gesamtfläche(μm^2) GFAP-Elemente, Kruskal-Wallis-Test, Korrektur nach Dunn

C: Durchschnittliche Größe (μm^2) GFAP-Elemente, Kruskal-Wallis-Test, Korrektur nach Dunn

5.3. Molekularbiologische Ergebnisse

5.3.1. Inflammationsmarker

Die qRT-PCR ermöglicht die Analyse der mRNA-Expression einzelner Zielgene, die als Inflammationsmarker fungieren. Die Anzahl der DNA-Kopien der Gene sind zum Housekeeping-Gen PPIA normalisiert.

5.3.1.1. IL-1 β

Das Zytokin Interleukin-1 β wird als pro-inflammatorischer Mediator von Mikroglia sezerniert (69, 165).

Die statistische Auswertung des mRNA-Expressionslevels von IL-1 β ergab keine signifikante Differenzierung zwischen den beiden CCI-Gruppen (CCI Veh vs. CCI Hyp: $p = 0,67$). Die pharmakologische Therapie mittels Hyp1 zeigt keine reduzierte Zytokinexpression, womit ein anti-inflammatorischer Effekt ausbleibt. Signifikante Unterschiede zwischen den SHAM- und CCI-Gruppen sind im Kausalzusammenhang mit dem spezifischen Versuchsaufbau zu erwarten.

SHAM Veh $n = 8$, SHAM Hyp $n = 8$, CCI Veh $n = 11$, CCI Hyp $n = 12$. Mittelwerte \pm SEM, SHAM Veh: $0,0083 \pm 0,0011$, SHAM Hyp: $0,009 \pm 0,0013$, CCI Veh: $0,0135 \pm 0,0013$, CCI Hyp: $0,0148 \pm 0,0012$.

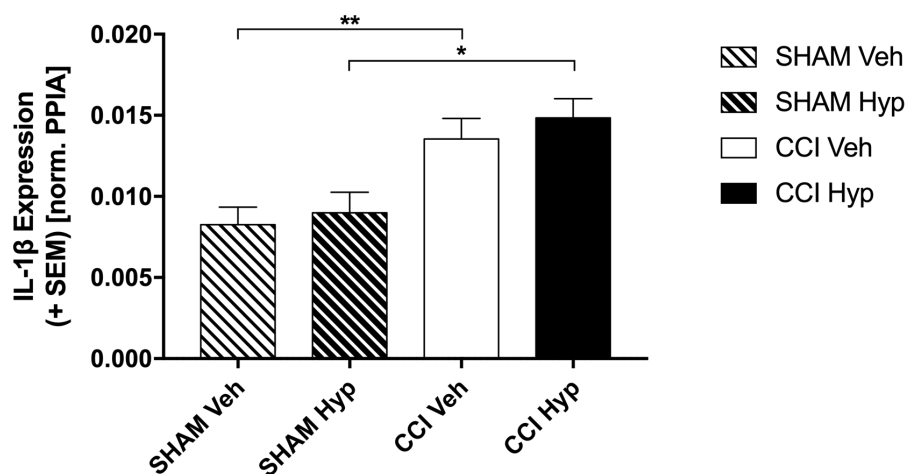


Abbildung 18: Genexpression IL-1 β

Mittels RT-qPCR quantifiziertes mRNA-Expressionslevel von Interleukin-1 β . Normalisiert zum Referenzgen PPIA. Mittelwerte \pm SEM, SHAM Veh $n = 8$, SHAM Hyp $n = 8$, CCI Veh $n = 11$, CCI Hyp $n = 12$, one-way ANOVA, Korrektur nach Holm-Šidák, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

5.3.1.2. IL-6

Das Zytokin Interleukin-6 hat als pro-inflammatorischer Mediator das höchste Expressionslevel in den ersten Stunden bis Tagen nach SHT aber gilt ebenso unter gewissen Umständen als Initiator für neuroregenerative Mechanismen (69, 166).

Die statistische Auswertung des mRNA-Expressionslevels von IL-6 ergab keine signifikante Differenzierung zwischen den beiden CCI-Gruppen (CCI Veh vs. CCI Hyp: $p = 0,96$). Die pharmakologische Therapie mittels Hyp1 zeigt keine Regulation der Zytokinexpression, womit ein inflammatorischer Effekt ausbleibt. Signifikante Unterschiede zwischen den SHAM- und CCI-Gruppen sind im Kausalzusammenhang mit dem spezifischen Versuchsaufbau zu erwarten.

SHAM Veh $n = 8$, SHAM Hyp $n = 8$, CCI Veh $n = 11$, CCI Hyp $n = 12$. Mittelwerte \pm SEM, SHAM Veh: $0,0000193 \pm 0,0000023$, SHAM Hyp: $0,0000203 \pm 0,0000020$, CCI Veh: $0,0000365 \pm 0,0000025$, CCI Hyp: $0,0000367 \pm 0,0000025$.

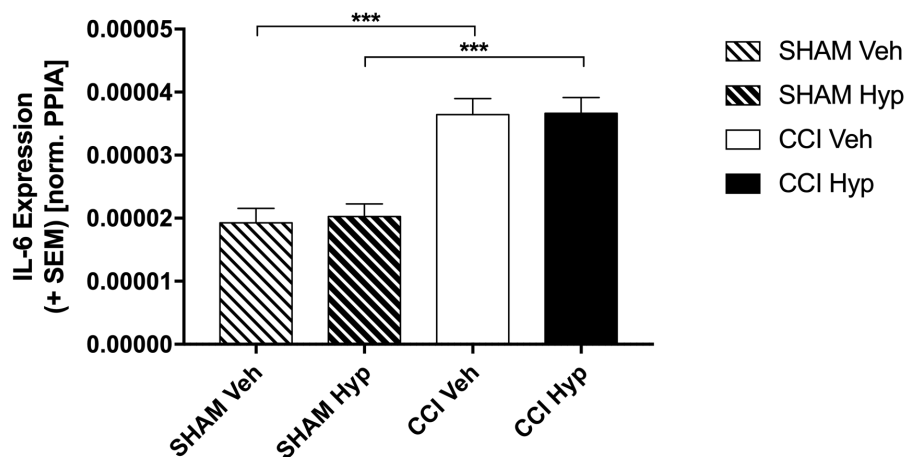


Abbildung 19: Genexpression IL-6

Mittels RT-qPCR quantifiziertes mRNA-Expressionslevel von Interleukin-6. Normalisiert zum Referenzgen PPIA. Mittelwerte \pm SEM, SHAM Veh $n = 8$, SHAM Hyp $n = 8$, CCI Veh $n = 11$, CCI Hyp $n = 12$, one-way ANOVA, Korrektur nach Holm-Šidák, *** $p < 0,001$

5.3.1.3. BDNF

BDNF zählt zu den neuronalen Wachstumsfaktoren und wurde mit einer mikroglia-abhängigen Modulation des neuronalen Überlebens nach SHT assoziiert (137, 139).

Nach SHT zeigte sich eine verminderten mRNA Expression von BDNF im Vergleich zu den Sham-Gruppen. Die statistische Auswertung des mRNA-Expressionslevels von BDNF ergab jedoch keine signifikante Differenzierung zwischen den beiden CCI-Gruppen (CCI Veh vs. CCI Hyp: $p = >0.99$). Die Behandlung mit Hyp1 nach CCI hat am 5. postoperativen Tag keinen Effekt auf das Expressionslevel von BDNF. Signifikante Unterschiede zwischen den SHAM- und CCI-Gruppen sind im Kausalzusammenhang mit dem spezifischen Versuchsaufbau zu erwarten.

SHAM Veh $n = 8$, SHAM Hyp $n = 8$, CCI Veh $n = 11$, CCI Hyp $n = 12$. Mittelwerte \pm SEM, SHAM Veh: $0,0181 \pm 0,0008$, SHAM Hyp: $0,0186 \pm 0,0008$, CCI Veh: $0,0145 \pm 0,0006$, CCI Hyp: $0,0141 \pm 0,0005$.

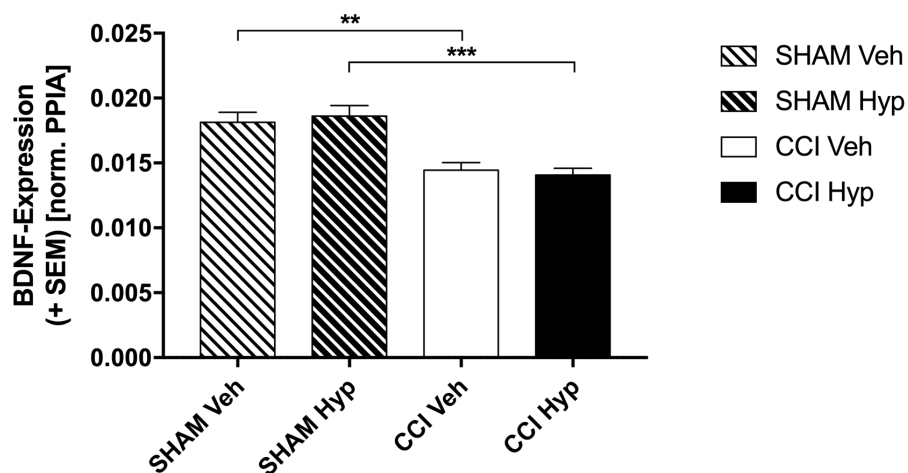


Abbildung 20: Genexpression BDNF

Mittels RT-qPCR quantifiziertes mRNA-Expressionslevel von BDNF. Normalisiert zum Referenzgen PPIA. Mittelwerte \pm SEM, SHAM Veh $n = 8$, SHAM Hyp $n = 8$, CCI Veh $n = 11$, CCI Hyp $n = 12$, Kruskal-Wallis-Test, Korrektur nach Dunn, ** $p < 0,01$

5.3.1.4. TRPC6

Hyperforin steht als selektiver Induktor für den ligandengesteuerten Kationenkanal, TRPC6 im Zusammenhang mit der Modulation von neuroprotektiven Transkriptionsfaktoren. (145, 146, 150)

Die statistische Auswertung des mRNA-Expressionslevels von TRPC6 ergab einen Trend mit reduzierten Werten in beiden Interventionsgruppen. Dies belegt eine allgemeine Suppression von TRPC6 nach SHT. Zwischen den beiden CCI-Gruppen (CCI Veh vs. CCI Hyp) konnte keine signifikante Differenzierung festgestellt werden ($p = 0,90$). Eine gesteigerte Syntheseaktivität des TRPC6 konnte durch die Hyp1-Behandlung nicht nachgewiesen werden. Ein belegbarer Effekt ist ebenfalls nicht festzustellen.

SHAM Veh $n = 8$, SHAM Hyp $n = 8$, CCI Veh $n = 11$, CCI Hyp $n = 12$. Mittelwerte \pm SEM, SHAM Veh: $0,0138 \pm 0,0013$, SHAM Hyp: $0,0144 \pm 0,0013$, CCI Veh: $0,0114 \pm 0,0007$, CCI Hyp: $0,0108 \pm 0,0008$.

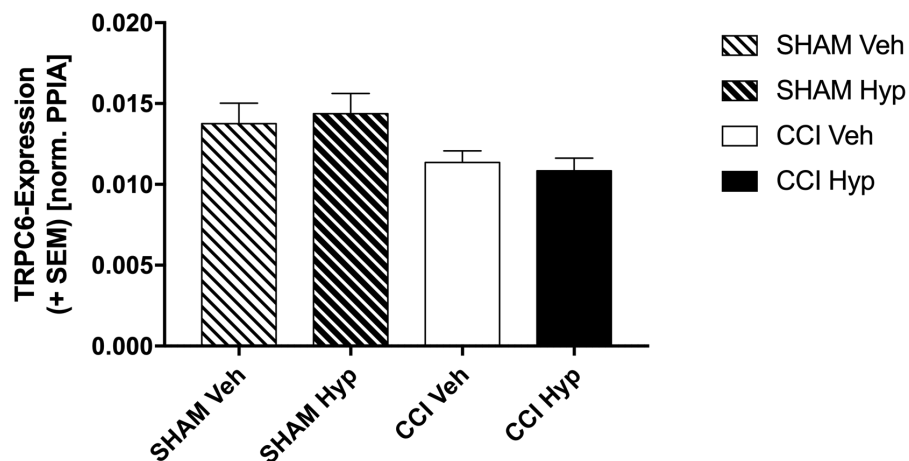


Abbildung 21: Genexpression TRPC6

Mittels RT-qPCR quantifiziertes mRNA-Expressionslevel von TRPC6. Normalisiert zum Referenzgen PPIA. Mittelwerte \pm SEM, SHAM Veh $n = 8$, SHAM Hyp $n = 8$, CCI Veh $n = 11$, CCI Hyp $n = 12$, one-way ANOVA, Korrektur nach Holm-Šidák

5.3.1.5. c-Fos

c-Fos kann als Protoonkogen bezeichnet werden und ist Bestandteil des Transkriptionsfaktors AP-1, dem über eine suppressive Wirkung anti-inflammatorische Effekte zugesprochen werden (57, 58).

Die statistische Auswertung des mRNA-Expressionslevels von c-Fos zeigte in der Interventionsgruppe anhand der Mittelwerte ein tendenziell minimal erhöhtes Expressionslevel auf Seiten der CCI Hyp. Eine signifikante Differenzierung des Trends zwischen den beiden CCI-Gruppen konnte nicht festgestellt werden (CCI Veh vs. CCI Hyp: $p = 0,63$). Eine durch Hyperforin induzierte Regulation der c-Fos-Gentranskription lässt sich nicht herleiten. Ein signifikanter Unterschied zwischen den SHAM- und CCI-Gruppen ist im Kausalzusammenhang mit dem spezifischen Versuchsaufbau zu erwarten.

SHAM Veh $n = 8$, SHAM Hyp $n = 8$, CCI Veh $n = 11$, CCI Hyp $n = 12$. Mittelwerte \pm SEM, SHAM Veh: $0,0473 \pm 0,0059$, SHAM Hyp: $0,043 \pm 0,0041$, CCI Veh: $0,0293 \pm 0,0019$, CCI Hyp: $0,0333 \pm 0,0031$.

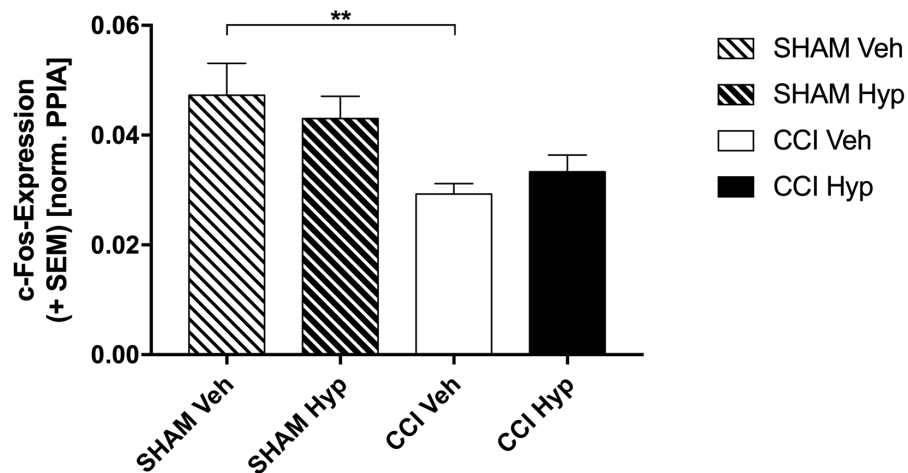


Abbildung 22: Genexpression c-Fos

Mittels RT-qPCR quantifiziertes mRNA Expressionslevel von c-Fos. Normalisiert zum Referenzgen PPIA. Mittelwerte \pm SEM, SHAM Veh $n = 8$, SHAM Hyp $n = 8$, CCI Veh $n = 11$, CCI Hyp $n = 12$, one-way ANOVA, Korrektur nach Holm-Šidák, ** $p < 0,01$

5.3.1.6. Arc

Das neuronale Protein Arc gilt als Marker für synaptische Plastizität (54, 56).

Die statistische Auswertung des mRNA-Expressionslevels von Arc zeigte in der Interventionsgruppe anhand der Mittelwerte ein tendenziell minimal erhöhtes Expressionslevel auf Seiten der CCI Hyp Gruppe. Eine signifikante Differenzierung des Trends zwischen den beiden CCI-Gruppen konnte nicht festgestellt werden (CCI Veh vs. CCI Hyp: $p = 0,56$). Eine Hyp1-Behandlung steigert somit im Rahmen dieses Versuches die mRNA-Expression nicht und zeigt damit keinen Einfluss auf die synaptische Plastizität. Signifikante Unterschiede zwischen den SHAM- und CCI-Gruppen sind im Kausalzusammenhang mit dem spezifischen Versuchsaufbau zu erwarten.

SHAM Veh $n = 8$, SHAM Hyp $n = 8$, CCI Veh $n = 11$, CCI Hyp $n = 12$. Mittelwerte \pm SEM, SHAM Veh: $0,0067 \pm 0,0008$, SHAM Hyp: $0,0054 \pm 0,0012$, CCI Veh: $0,0030 \pm 0,0002$, CCI Hyp: $0,0035 \pm 0,0004$.

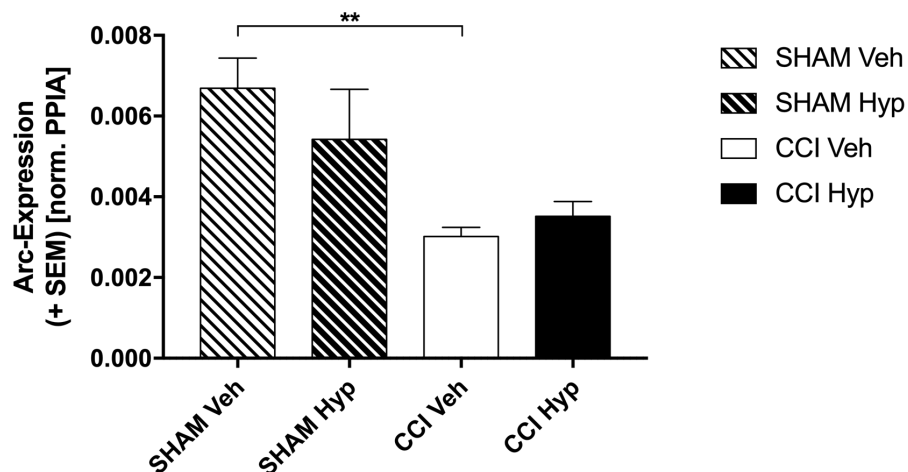


Abbildung 23: Genexpression Arc

Mittels RT-qPCR quantifiziertes mRNA Expressionslevel von Arc. Normalisiert zum Referenzgen PPIA. Mittelwerte \pm SEM, SHAM Veh $n = 8$, SHAM Hyp $n = 8$, CCI Veh $n = 11$, CCI Hyp $n = 12$, one-way ANOVA, Korrektur nach Holm-Šidák, ** $p < 0,01$

5.4. Proteinanalysen

5.4.1. Western Blot

Die Analyse spezifischer Proteine aus post mortem seziierten Hirngewebe erfolgt mittels Western Blot. Die Zielproteine werden zum Referenzprotein GAPDH normalisiert (Abb. A) und als exemplarischer Ausschnitt ist der jeweilige Western Blot (Abb. B) angeführt.

5.4.1.1. GFAP

Das saure Gliafaserprotein stellt einen astrozytären Bestandteil dar. Nach zerebralen Schadensereignissen wird die Proteinsynthese hochreguliert. (85, 89)

Die Analyse zeigt, dass sich in der Interventionsgruppe anhand der Mittelwerte ein tendenziell erhöhtes Expressionslevel auf Seiten der CCI-Hyp-Gruppe feststellen lässt. Eine signifikante Differenzierung des Trends zwischen den beiden CCI-Gruppen lässt sich nicht nachweisen (CCI Veh vs. CCI Hyp: $p = > 0.99$). Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass die Hyperforin-Therapie die Astrozyten-Aktivität nach CCI nicht signifikant steigert. Tendenzen zwischen SHAM- und CCI-Gruppen sind im Kausalzusammenhang mit dem spezifischen Versuchsaufbau zu erwarten.

SHAM Veh $n = 8$, SHAM Hyp $n = 8$, CCI Veh $n = 11$, CCI Hyp $n = 12$.
Mittelwerte \pm SEM, SHAM Veh: $0,791 \pm 0,179$, SHAM Hyp: $2,84 \pm 0,96$,
CCI Veh: $6,59 \pm 0,841$, CCI Hyp: $7,54 \pm 0,786$.

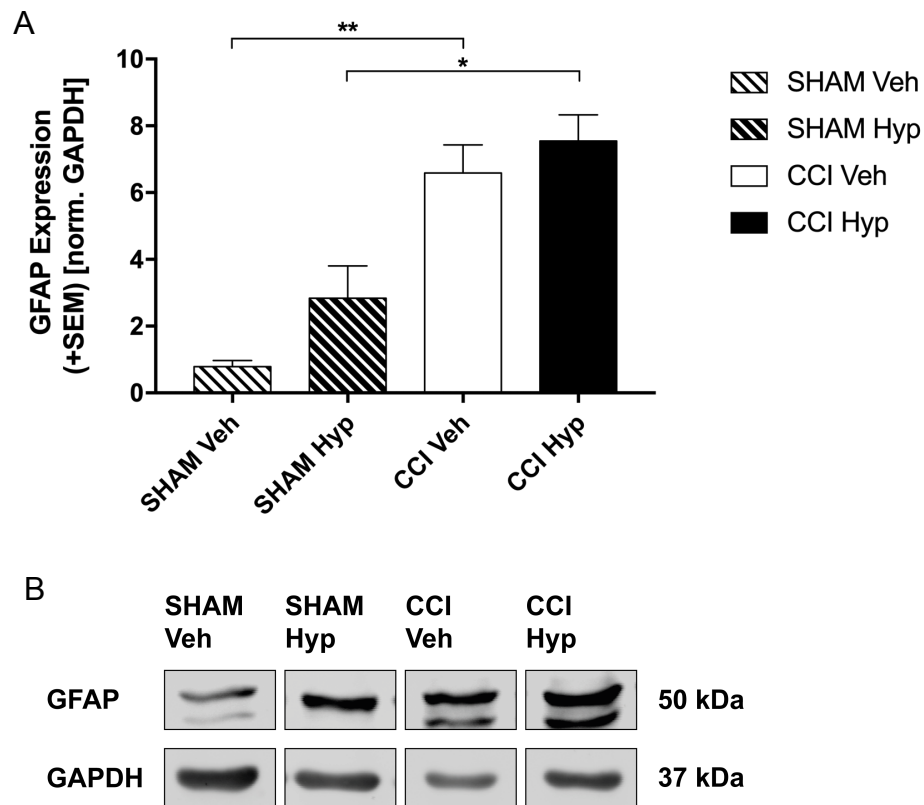


Abbildung 24: Proteinexpression von GFAP

Mittels Western Blot quantifiziertes Proteinexpressionslevel von GFAP. Normalisiert zum Referenzprotein GAPDH. Mittelwerte \pm SEM, SHAM Veh n = 8, SHAM Hyp n = 8, CCI Veh n = 11, CCI Hyp n = 12, * p < 0,05, ** p < 0,01

A: GFAP-Proteinexpression, Kruskal-Wallis-Test, Korrektur nach Dunn

B: Beispielhafter Ausschnitt des Western Blots von GFAP und Referenzprotein GAPDH

5.4.1.2. Spektrin

Spektrin stellt ein Spaltprodukt (145 kDa) des Zytoskeletts von Neuronen dar und fungiert als Marker für neuronalen Zelltod (108).

Die Analyse der Spektrin-Expression (Abb. A) zeigt, dass signifikante Unterschiede zwischen den SHAM- und CCI-Gruppen bestehen. Im Kausalzusammenhang belegt dies einen gesteigerten neuronalen Zelltod nach SHT. In der Interventionsgruppe lässt sich anhand der Mittelwerte ein tendenziell erhöhtes Expressionslevel der CCI-Hyp-Gruppe interpretieren. Eine signifikante Differenzierung des Trends zwischen den beiden CCI-Gruppen lässt sich nicht nachweisen (CCI Veh vs. CCI Hyp: p = > 0.99). Die Hyperforin-Behandlung zeigt im Rahmen des Versuches keinen Effekt auf die Reduktion des neuronalen Zelltods nach CCI.

SHAM Veh n = 8, SHAM Hyp n = 8, CCI Veh n = 11, CCI Hyp n = 12.
 Mittelwerte \pm SEM, SHAM Veh: $0,0087 \pm 0,0026$, SHAM Hyp: $0,0125 \pm 0,0022$, CCI Veh: $0,1180 \pm 0,0191$, CCI Hyp: $0,1510 \pm 0,0266$.

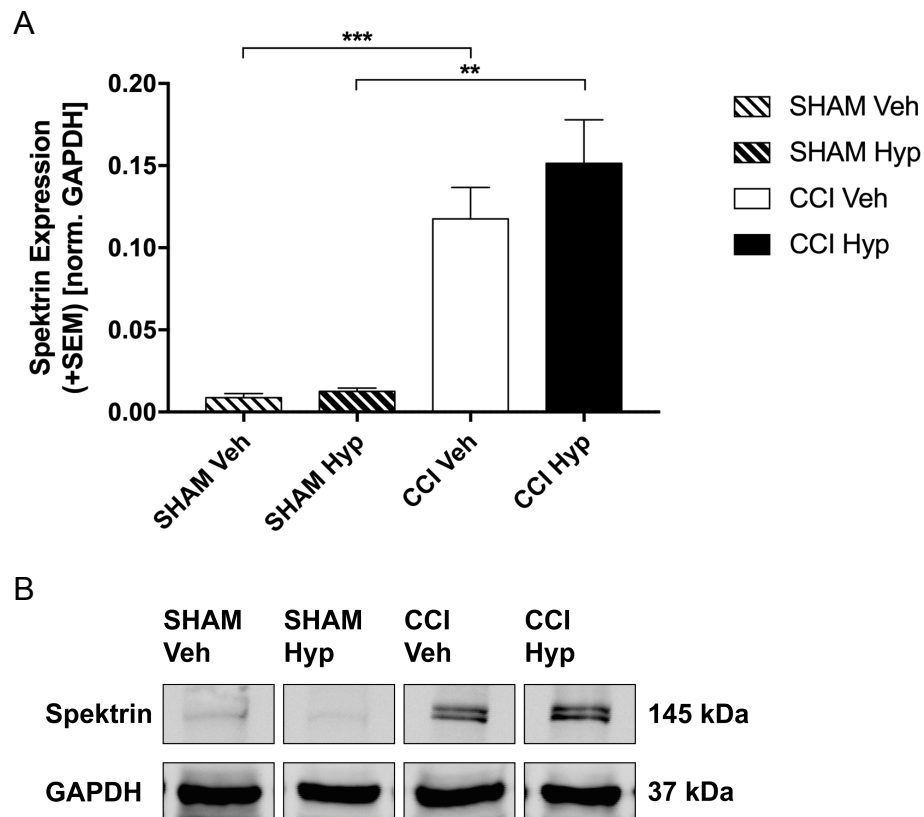


Abbildung 25: Proteinexpression von Spektrin

Mittels Western Blot quantifiziertes Proteinexpressionslevel von Spektrin. Normalisiert zum Referenzprotein GAPDH. Mittelwerte \pm SEM, SHAM Veh n = 8, SHAM Hyp n = 8, CCI Veh n = 11, CCI Hyp n = 12, ** p < 0,01, *** p < 0,001

A: Spektrin-Proteinexpression, Kruskal-Wallis-Test, Korrektur nach Dunn

B: Beispielhafter Ausschnitt des Western Blots von Spektrin und Referenzprotein GAPDH

5.4.1.3. BDNF

BDNF fungiert als Marker für Mikrogliazellen sowie für aktivierte Makrophagen und zählt zu den neuronalen Wachstumsfaktoren (137, 139). Erwartungsgemäß bzw. pathophysiologisch kommt es nach SHT zu einer verminderten Expression in der ipsilateralen Hemisphäre.

Dieser Effekt lässt sich gemäß Abb. A nicht herleiten. Die Analyse der BDNF-Expression zeigt keine zu erwartende herabgesetzte Expression in den CCI-Gruppen. In den beiden Wirkstoffgruppen (SHAM Hyp, CCI Hyp) lässt sich anhand der Mittelwerte ein tendenziell erhöhtes Expressionslevel im Gegensatz zu deren Vehikel-Gruppen feststellen. Eine signifikante

Differenzierung des Trends zwischen den beiden CCI-Gruppen lässt sich nicht nachweisen (CCI Veh vs. CCI Hyp: $p = > 0.99$). Somit hat die Behandlung mit Hyp1 nach CCI am 5. postoperativen Tag keinen Effekt auf die BDNF Expression.

SHAM Veh $n = 8$, SHAM Hyp $n = 8$, CCI Veh $n = 11$, CCI Hyp $n = 12$. Mittelwerte \pm SEM, SHAM Veh: $0,0168 \pm 0,0027$, SHAM Hyp: $0,0333 \pm 0,0092$, CCI Veh: $0,0508 \pm 0,0249$, CCI Hyp: $0,0789 \pm 0,0330$.

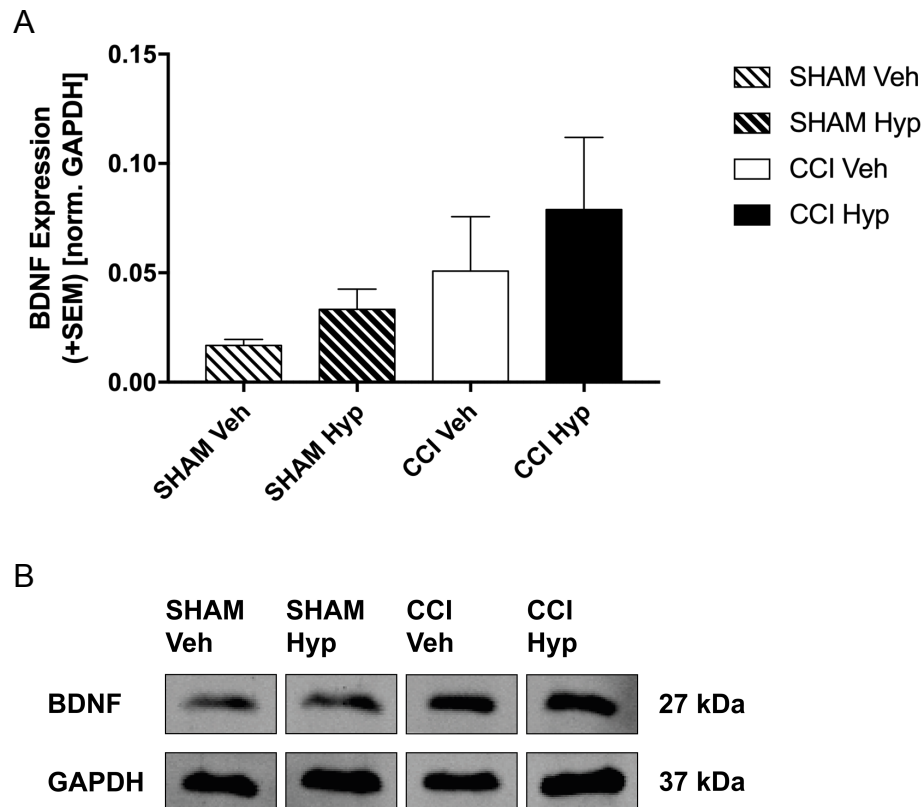


Abbildung 26: Proteinexpression von BDNF

Mittels Western Blot quantifiziertes Proteinexpressionslevel von BDNF. Normalisiert zum Referenzprotein GAPDH. Mittelwerte \pm SEM, SHAM Veh $n = 8$, SHAM Hyp $n = 8$, CCI Veh $n = 11$, CCI Hyp $n = 12$

A: BDNF-Proteinexpression, Kruskal-Wallis-Test, Korrektur nach Dunn

B: Beispielhafter Ausschnitt des Western Blots von BDNF und Referenzprotein GAPDH

5.4.1.4. Arc

Das neuronale Protein Arc gilt als Faktor für synaptische Plastizität (54, 56).

Die Analyse der Arc-Expression (Abb. A) zeigt, dass sich in der Interventionsgruppe anhand der Mittelwerte ein tendenziell erhöhtes

Expressionslevel auf Seiten der CCI-Hyp-Gruppe feststellen lässt. Eine signifikante Differenzierung des Trends zwischen den CCI-Gruppen lässt sich nicht nachweisen (CCI Veh vs. CCI Hyp: $p = > 0.99$). Die Hyp1-Behandlung steigert die Proteinexpression somit nicht und zeigt damit keinen Einfluss auf die synaptische Plastizität im Rahmen dieses Versuches. Tendenzen zwischen SHAM- und CCI-Gruppen sind im Kausalzusammenhang mit dem spezifischen Versuchsaufbau zu erwarten.

SHAM Veh n = 8, SHAM Hyp n = 8, CCI Veh n = 11, CCI Hyp n = 12.
Mittelwerte \pm SEM, SHAM Veh: $0,0842 \pm 0,0158$, SHAM Hyp: $0,066 \pm 0,007$, CCI Veh: $0,065 \pm 0,015$, CCI Hyp: $0,093 \pm 0,022$.

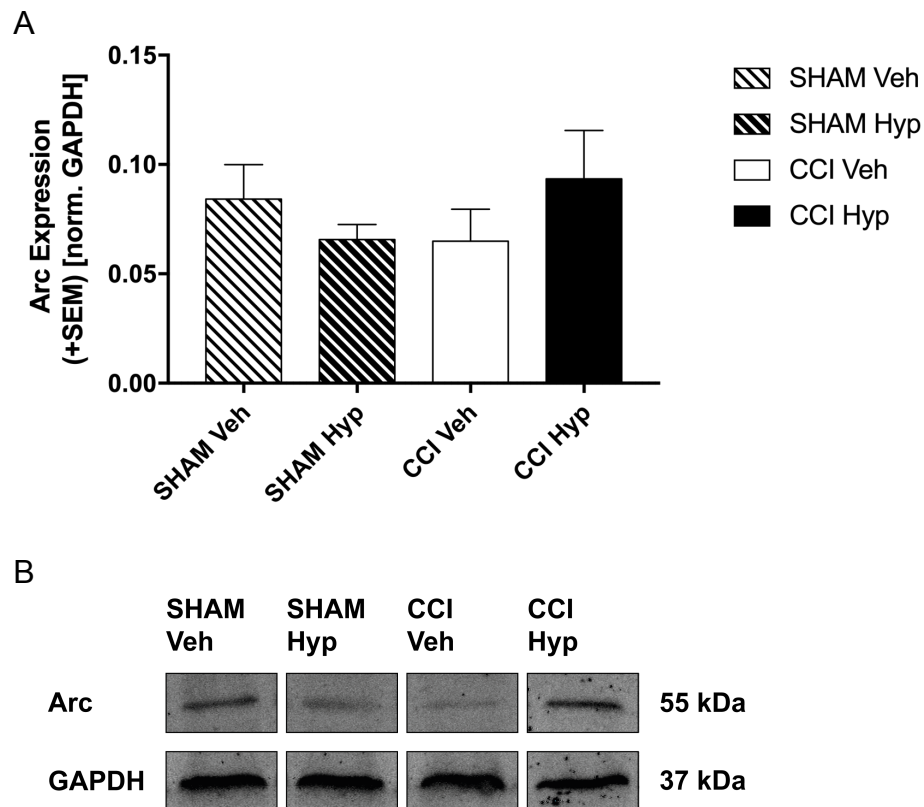


Abbildung 27: Proteinexpression von Arc

Mittels Western Blot quantifiziertes Proteinexpressionslevel von Arc. Normalisiert zum Referenzprotein GAPDH. Mittelwerte \pm SEM, SHAM Veh n = 8, SHAM Hyp n = 8, CCI Veh n = 11, CCI Hyp n = 12

A: Arc-Proteinexpression, Kruskal-Wallis-Test, Korrektur nach Dunn

B: Beispielhafter Ausschnitt des Western Blots von Arc und Referenzprotein GAPDH

5.4.1.5. COX-2

COX-2 induziert Entzündungsmediatoren wie Prostaglandin E2 und steht im Zusammenhang mit pro- und anti-inflammatorischen Effekten (81, 82).

Die Analyse der COX-2-Expression (Abb. A) zeigt anhand der Mittelwerte, dass sich das Expressionslevel in der Interventionsgruppe auf Seiten der CCI-Hyp-Gruppe herunterreguliert. Eine signifikante Differenzierung des Trends zwischen den beiden CCI-Gruppen lässt sich nicht nachweisen (CCI Veh vs. CCI Hyp: $p = 0,7919$). Ein signifikanter Unterschied zu den Kontrollgruppen besteht nicht. Eine Supprimierung der COX-2 Mediatoren durch Hyperforin lässt sich nicht eindeutig belegen.

SHAM Veh $n = 8$, SHAM Hyp $n = 8$, CCI Veh $n = 11$, CCI Hyp $n = 12$.
Mittelwerte \pm SEM, SHAM Veh: $0,0439 \pm 0,0044$, SHAM Hyp: $0,0466 \pm 0,0032$, CCI Veh: $0,0458 \pm 0,0052$, CCI Hyp: $0,0383 \pm 0,0048$.

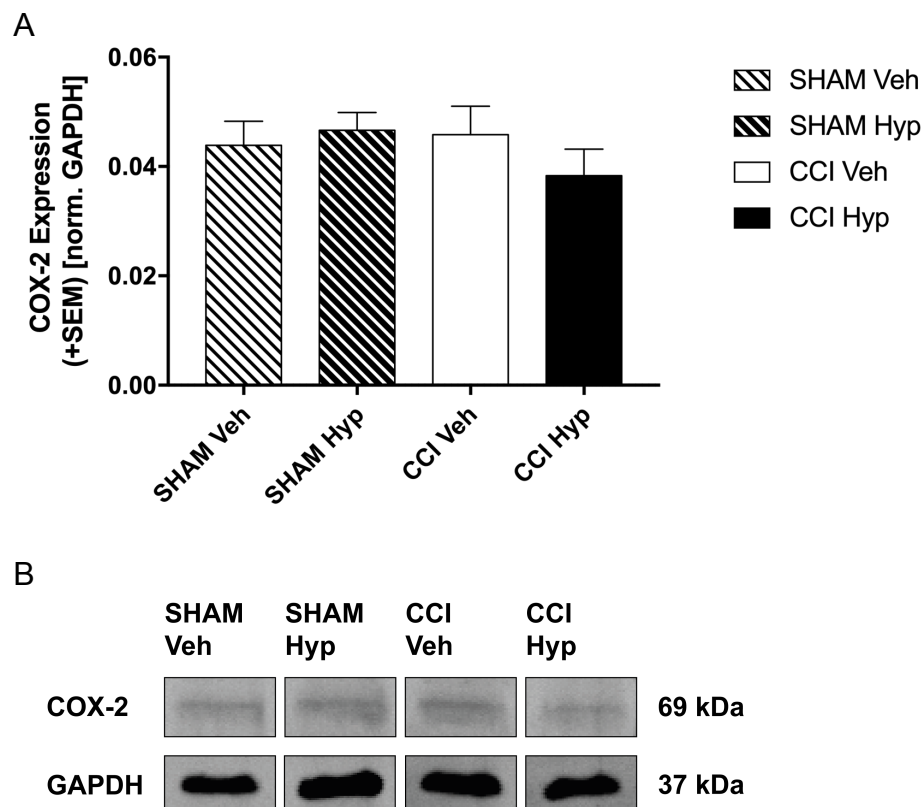


Abbildung 28: Proteinexpression von COX-2

Mittels Western Blot quantifiziertes Proteinexpressionslevel von COX-2. Normalisiert zum Referenzprotein GAPDH. Mittelwerte \pm SEM, SHAM Veh $n = 8$, SHAM Hyp $n = 8$, CCI Veh $n = 11$, CCI Hyp $n = 12$

A: COX-2-Proteinexpression, one-way ANOVA, Korrektur nach Holm-Šídák

B: Beispielhafter Ausschnitt des Western Blots von COX-2 und Referenzprotein GAPDH

5.4.2. Dot Blot

Die Dot-Blot-Analyse stellt ein quantitatives Verfahren zur Analyse des Fluoreszenzsignals von IgG im ipsilateralen murinen Hirngewebe dar. Die Ergebnisse der ipsilateralen Hemisphäre wurden zur jeweiligen kontralateralen Hemisphäre in Relation gesetzt. IgG dient als Marker zur Detektion einer potenziellen Störung der Blut-Hirn-Schranke. (61, 95)

5.4.2.1. Immunglobulin G

In der densitometrischen Bestimmung von IgG zeigt sich, dass signifikante Unterschiede zwischen den SHAM- und CCI-Gruppen bestehen. Im Kausalzusammenhang lässt sich daraus ein zu erwartender Integritätsverlust der BHS nach einem SHT ableiten.

Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden CCI-Gruppen konnte festgestellt werden ($p = 0,039$, CCI G Veh vs. CCI Hyp). Demzufolge hat die posttraumatische Applikation des Hyp1 einen Einfluss auf die IgG-Konzentration am fünften postoperativen Tag. Dies lässt den Rückschluss zu, dass durch die Hyp1-Behandlung die Integrität der BHS negativ beeinträchtigt und diese nach SHT verstärkt destabilisiert werden könnte.

SHAM Veh $n = 8$, SHAM Hyp $n = 8$, CCI Veh $n = 11$, CCI Hyp $n = 12$.
Mittelwerte \pm SEM, SHAM Veh: $1,064 \pm 0,097$, SHAM Hyp: $0,956 \pm 0,058$,
CCI Veh: $2,27 \pm 0,150$, CCI Hyp: $2,903 \pm 0,239$.

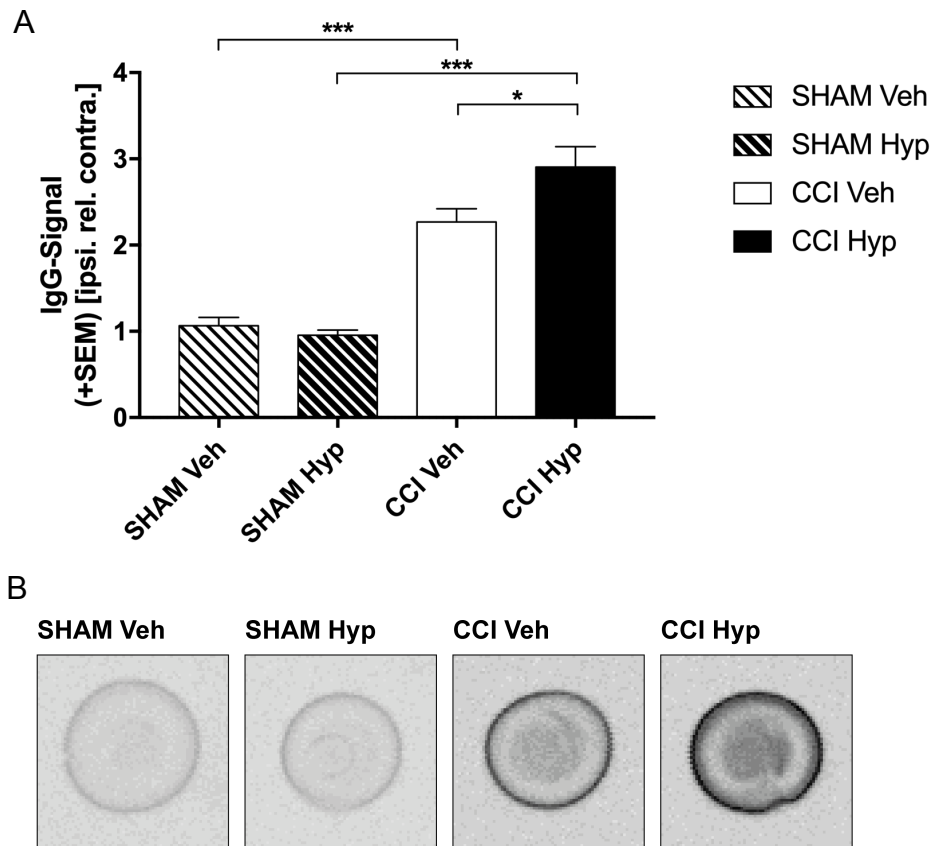


Abbildung 29: Quantifizierung IgG Fluoreszenzsignal

A: Quantifizierung des Fluoreszenzsignals (einheitslos) von IgG im ipsilateralen murinen Hirngewebe mittels Dot Blot. Relativiert zur Kontralateralen Hemisphäre. Mittelwerte \pm SEM, SHAM Veh n = 8, SHAM Hyp n = 8, CCI Veh n = 11, CCI Hyp n = 12, one-way ANOVA, Korrektur nach Holm-Šidák, * p < 0,05, *** p < 0,001

B: Beispielhafte Darstellung der Dot Blot Analyse von Immunglobulin G (IgG)

6. DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Frage, ob das Derivat Hyp1 des Wirkstoffes Hyperforin einen neuroprotektiven Einfluss auf das Überleben von neuronalen Strukturen nach einem SHT aufzeigt. Dazu werden die Effekte einer pharmakologischen Modulation der Astrogliose, Mikrogliaaktivität, verschiedener Transkriptions- und Inflammationsfaktoren, der synaptischen Plastizität, der BHS Permeabilität und der TRCP6-CaMK-CREB-Signalkaskade im tierexperimentellen CCI-Modell an der Maus untersucht. Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Studie den aktuellen Forschungshypothesen gegenübergestellt.

6.1. Posttraumatische Verhaltensbiologie

Die Veränderung des Körpergewichts kann als Indikator für die Einschätzung des Fressverhaltens der Tiere herangezogen werden. Dies erlaubt eine Einschätzung des körperlichen Allgemeinzustandes der Tiere nach Induktion eines Schädeltraumas. Eine tendenziell geringere Zunahme des Körpergewichts ist am ersten postoperativen Tag in der CCI-Gruppe festzustellen. Allerdings manifestiert sich ab dem dritten postoperativen Tag ein signifikanter Gewichtsverlust bei den CCI-Versuchstieren, was auf eine allgemein schlechtere körperliche Konstitution nach SHT zurückzuführen ist. Demgegenüber zeigt sich bei der Kontrollgruppe, die einem Scheineingriff unterzogen wurde, eine derartige Ausprägung nicht. Über den gesamten postoperativen Beobachtungszeitraum ist bei allen Gruppen eine tendenzielle Gewichtsabnahme zu verzeichnen, die im Allgemeinen mit dem Versuchsaufbau bzw. der Narkose, dem Scheineingriff sowie der Intervention in Zusammenhang steht. Die mittleren Körpergewichte derjenigen Versuchstiere, die eine Hyp1-Behandlung erhielten, lagen an allen Tagen unterhalb derer der Vergleichsgruppe. Im Zeitraum D1 vs. D5 zeigt sich ein um 43 % höheres Gewichtsdefizit in der CCI-Hyp-Gruppe im Vergleich zur CCI-Veh-Gruppe. Ein tendenziell negativer Effekt des Hyperforin lässt sich nicht näher begründen. Das Hyperforin-Derivat kann gegenüber der Vergleichsgruppen keine signifikante Erhöhung des Körpergewichts und damit keine beschleunigte Regeneration bzw. einen verbesserten Allgemeinzustand der Tiere bewirken (17).

Die Beurteilung der neuromotorischen Fähigkeiten der Versuchstiere erfolgt anhand einer standardisierten Leistungsbewertung, welche auf dem seit langem etablierten *Neurological Severity Score* basiert (156). Es wird angenommen, dass der Schweregrad eines neurologischen Defizits nach SHT mit einem steigendem Score korreliert. Wie zu erwarten war, zeigt sich in beiden CCI-Gruppen ein deutlicher Anstieg des Punktwerts. Dies lässt den Schluss zu, dass ein ausgeprägtes neurologisches Defizit vorliegt, im Gegensatz zum kaum veränderten Punktwerten der Kontrollgruppen. Die Punktwerte der beiden Interventionsgruppen zeigen vom ersten bis fünften postoperativen Tag eine leicht abnehmende Tendenz, wobei die CCI-Hyp-Gruppe ab dem fünften Tag sogar minimal besser abschneidet als die Veh-Gruppe. Signifikante Unterschiede sind jedoch nur zu den SHAM-Gruppen festzustellen. Es sei darauf hingewiesen, dass in der Vergleichsgruppe der SHAM-Hyp-Tiere eine Tendenz zu einem höheren Defizit zu beobachten ist. Dieser Trend bleibt ohne eine hinreichende Begründung ungeklärt. Die Behandlung mit Hyperforin zeigt im Untersuchungszeitraum keine wesentlichen und signifikanten verbesserten neurologischen Funktionen.

Zu beachten ist, dass die Objektivität des Score-Systems einer kritischen Betrachtung unterzogen werden muss. Obgleich eine Verblindung stattfindet, erfolgt die Erhebung der Punktwerte subjektiv. Die Ergebnisse sind von der Einschätzung des Untersuchers abhängig, sodass eine gewisse Fehleranfälligkeit nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann. In einer Studie von Ma et al. wurde 72 Stunden nach Reperfusion einer Okklusion der mittleren zerebralen Arterie (MCAO), bei pharmakologisch behandelten Ratten, eine verbesserte neuromotorische Funktion beobachtet (18). Auch Nosratabadi et al. konnte in einem Mausmodell für experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE), die mit der menschlichen Multiplen Sklerose (MS) vergleichbar ist, mittels 21-tägiger Hyperforin-Therapie ein verbessertes motorisches „Outcome“ anhand positiver Ergebnisse im Neuroscore nachweisen (17). Die Vergleichbarkeit, der in den genannten Studien gewonnenen Erkenntnisse mit denen der vorliegenden Untersuchung ist aufgrund divergierender methodischer Ansätze und unterschiedlicher Forschungsfragen jedoch eingeschränkt. Bei beiden Untersuchungen wurden unterschiedliche Schwerpunkte

gesetzt, zudem variieren die Aspekte der Pathophysiologie, die Erhebungszeitpunkte und das Scoringssystem. Ausserdem wurden in den Studien nicht konsistent dieselben Tierarten als Modellorganismus verwendet.

Eine weitere Möglichkeit zur Einschätzung der motorischen Fähigkeiten der Versuchstiere, kann anhand der Laufleistung auf einem rotierenden Zylinder, dem sogenannten Rotarod-Test, dargestellt werden (1). Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurden die Mäuse vor der Datenerhebung zweimal trainiert, um einen Gewöhnungseffekt zu induzieren und potenzielles Fehlverhalten während der Datenerhebung zu minimieren (158). In Anlehnung an die bereits vorangegangenen Studienergebnisse lässt sich ableiten, dass Hyp1 einen positiven Effekt auf die neuromotorischen Fähigkeiten hat, was anhand einer verlängerten Laufzeit im Rotarod-Test der CCI Hyp Gruppe erkennbar ist. Diese Erkenntnis lässt sich in diesem Experiment nicht signifikant belegen. Die beiden CCI-Gruppen weisen am ersten postoperativen Tag eine zu erwartende, ausgeprägte Leistungsminderung auf. Bis zum fünften postoperativen Tag lässt sich eine Teilkompensation des Defizits beobachten. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der mit Vehikel behandelten Tiere, lässt sich bei der CCI-Hyp-Gruppe, mit einer 18 %ig längeren Laufzeit eine minimal verbesserte neuromotorische Regeneration interpretieren.

Die gewonnenen neurobiologischen Daten weisen keine signifikanten Unterschiede sowie keinen einheitlichen Trend auf, der auf eine positive Beeinflussung durch die Hyp1-Therapie in der Interventionsgruppe schließen lässt. Im Rahmen weiterer Experimente empfiehlt sich die Durchführung einer eingehenden Untersuchung des Einflusses der Hyp1-Behandlung auf die neuromotorischen Fähigkeiten in vivo, welche die Erhebung des Körpergewichts, des NSS und des Rotarod nach dem hier beschriebenen Vorgehen umfasst. Neuronaler Schaden nach CCI.

6.2. Neuronaler Schaden nach CCI

Die histologische Aufarbeitung des Hirngewebes diente der Quantifizierung des Kontusionsvolumens. Die aus der Analyse gewonnenen Erkenntnisse stützen die pathophysiologische Beobachtung, dass ein SHT mit einem gesteigerten Läsionsvolumen einhergeht. In der Konsequenz erlaubt dieses Versuchsmodell eine Herleitung des Ausmaßes des neuronalen Schadens. Im Vergleich des ipsilateralen Läsionsvolumens beider CCI-Gruppen, konnte am fünften Tag nach CCI kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die von Ma et al. durchgeführte Studie im Rahmen eines Schlaganfallmodells zeigt, dass das Kontusionsvolumen durch Hyperforin-Therapie verringert werden konnte (18). Darüber hinaus wurde eine Beurteilung des neuronalen Zellverlustes mittels einer Proteinanalyse durchgeführt, wobei die Expression von Spektrin, als Spaltprodukt des Zytoskeletts von Neuronen, quantifiziert wurde. Spektrin fungiert als Biomarker für den neuronalen Zelltod. Im Rahmen des Schlaganfallmodells von Lin et al. konnte nach Hyperforin-Behandlung eine herabgesetzte Expression von Spektrinspaltprodukten festgestellt werden (132). Die in der vorliegenden Arbeit postulierte direkte Beeinflussung des Ausmaßes des sekundären Hirnschadens durch Hyperforin, konnte nicht bestätigt werden. Ebenso konnte eine Reduktion der Schadensausprägung und eine gesteigerte Initiierung zentralnervöser Reparatursmechanismen durch Hyperforin nicht nachgewiesen werden. Eine zusätzliche Datenerhebung zur Schadensvolumenanalyse und Detektion von Apoptosemarkern sowie der Neuroinflammation im traumatisierten Hirngewebe könnte weitere Schlussfolgerungen bezüglich der Hyp-1-Effekte auf den neuronalen Verlust bzw. den sekundären Hirnschaden zulassen.

6.3. Posttraumatische Neuroinflammation

Die GFAP-Spiegel sind in beiden CCI-Gruppen im Vergleich zur SHAM-Gruppe signifikant erhöht. Dieser Effekt ist erwartungsgemäß und bestätigt, dass eine erhöhte GFAP-Expression nach traumatischer Hirnverletzung als potentieller Indikator für eine astrozytäre Aktivierung und als Fortschrittsmarker für eine reaktive Astroglie im Rahmen der

Sekundärschädigung verwendet werden kann (41, 79, 85). Erhöhte Spiegel des astrozytären Filamentproteins scheinen mit dem Schweregrad des Zelluntergangs zu korrelieren und könnten dazu beitragen, dass Astrozyten chemotaktisch auf Mikrogliazellen einwirken und über die direkte Sekretion von Botenstoffen neuroinflammatorische Prozesse aktivieren (85, 87). Reaktive Astrozyten zeigen eine verstärkte GFAP-Immunfluoreszenz (85). Mittels immunhistochemischer Fluoreszenzfärbung können morphologische Veränderungen und eine erhöhte GFAP-Expression im Zustand der reaktiven Astroglie untersucht werden. Der Einfluss auf die Expression des Proteins GFAP wurde darüber hinaus durch Proteinanalysen bestimmt. In der Gesamtschau der Ergebnisse zeigte sich, dass die Analysen keinen signifikanten Unterschied in der mit Hyperforin behandelten Interventionsgruppe aufzeigten. Durch Applikation von Hyp1 lässt sich somit kein positiver bzw. eindeutiger Effekt auf die potenziell neuroprotektive reaktive Astroglie am 5. postoperativen Tag nach CCI darstellen.

Der Aktivierungsgrad von Mikrogliazellen und Makrophagen kann durch die Detektion ihrer sezernierten Entzündungs- bzw. Aktivitätsmarker, Iba1 und MHC2, abgeleitet werden. In gesundem Hirngewebe findet kaum eine Expression statt, aber die Aktivierung der Mikroglia korreliert direkt proportional mit der Schwere des SHT (50, 62, 63). Die erhöhte Mikrogliaaktivität nach SHT geht dementsprechend mit einer erhöhten Expression von Aktivitätsmarkern einher (64). Die erhöhte Mikrogliaaktivität führt über Iba1-induzierte indirekte pro-inflammatorische Prozesse und durch das Oberflächenprotein MHC2 aktivierte B- und T-Zellen zu einer adaptiven Immunantwort, die mit einem vermehrten Zelltod einhergeht (50, 62). Durch zusätzliche immunhistochemische Untersuchungen der beiden Marker Iba1 und MHC2 können weitere Aufschlüsse über die Auswirkungen der Hyp1-Therapie auf den Aktivitätszustand der Mikroglia gewonnen werden. Die Daten einer immunhistochemisch analysierten kortikalen ROI erlauben zwar eine regionale Beurteilung im Sinne der Ausbreitung der sekundären Hirnschädigung, schließen jedoch einen anders lokalisierten generellen Hyperforin-Effekt auf die Mikrogliaaktivität nicht gänzlich aus. Die Pathophysiologischen Unterschiede der Hirnregionsspezifisch lokalisierten Mikrogliaaktivität konnten beispielsweise

im Striatum untersucht werden (18). Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass die unterschiedlichen Zeitpunkte der Probenentnahme in den jeweiligen Studien zu einer Diskrepanz hinsichtlich des Einflusses auf das Aktivitätsniveau führt. Um hier eine Vergleichbarkeit mit der Literatur herzustellen, könnte eine molekularbiologische Untersuchung mittels qPCR von ipsilateralen Trimmschnitten die Expression der Marker quantifizieren und repräsentativ über die gesamte Hemisphäre darstellen. Ebenso könnte die spezifische Anpassung des Untersuchungszeitraumes aufschlussreich sein.

Des Weiteren wurde die mRNA-Expression von Zytokinen analysiert. Die Zytokine IL-1 β und IL-6 werden von Mikroglia sezerniert und gelten bei einem erhöhten Expressionslevel nach traumatischer Hirnschädigung als pro-inflammatorische Mediatoren (69, 166). Die Ergebnisse der Studie von Yao et al. weisen darauf hin, dass IL-6 auch im Rahmen des zerebralen Ischämie-Modells nach Hyperforinbehandlung eine Down-Regulation inflammatorischer Prozesse durch überexprimierte Zytokinlevel erreichen kann (167). Die vorliegende molekularbiologische Aufarbeitung zeigt keinen signifikanten Unterschied in der Zytokinexpression zwischen den Interventionsgruppen. Betrachtet man die bisherigen Ergebnisse zur Mikrogliaaktivität, so ist die polytraumatische Expression der Zytokine IL-1 β und IL-6 erwartungsgemäß erhöht. Die pharmakologische Therapie hat somit keinen Einfluss auf das Ausmaß der Zytokinexpression, weder anti-inflammatorische noch pro-inflammatorische Effekte können von Hyp1 abgeleitet werden.

Dem Entzündungsmediator COX-2 werden in unterschiedlichen Studien teils unterschiedliche Effekte nachgewiesen. Wenn gleich die durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B induziert gesteigerte Enzymexpression u.a. von COX-2 über die Hochregulation des Entzündungsmediatoren Prostaglandin E2 prinzipiell pro-inflammatorisch wirkt, lassen sich laut Yang et al. gesteigerte Expressionlevel mit mikroglialen Zelltod und einer daraus entstehenden Dämpfung der Neuroinflammation in Verbindung setzen (82). Die Resultate einer weiteren Untersuchung zeigen gegensätzlich, dass eine durch den TRPC6-Rezeptor induzierte Steigerung der COX-2-Expression mit einem daraus resultierenden hippokampalen

neuronalen Schaden in Verbindung gebracht werden kann (168). Eine weitere Western Blot Analyse der p65-Untereinheit von NF- κ B könnte eine detailliertere Beurteilung und Rückschlüsse zum Hyp1-Einfluss auf Expressionkaskaden weiterer Inflammationsmediatoren ermöglichen.

Infolge der traumassozierten mechanischen Einflüsse und aufgrund weiterer Sekundärprozesse wie Exzitotoxizität oder Neuroinflammation, kommt es zu einer maßgeblichen pathophysiologischen Veränderung der Integrität der BHS (7). Die Störung führt zu einer vasogenen Ödembildung im Hirngewebe (169) sowie zu einer Aktivierung der humoralen Immunabwehr, wobei es gleichzeitig zu einer Einwanderung von Immunzellen kommt (7). Der Nachweis von parenchymalen IgG wird in der wissenschaftlichen Literatur vielfach als Marker für eine erhöhte BHS Permeabilität beschrieben (61, 95).

Die Daten der vorliegenden IgG-Dot-Blots weisen auf eine Störung der BHS-Integrität in der Interventionsgruppe hin. Es besteht weiterhin ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Hyp1-Behandlung und der parenchymalen IgG-Konzentration der CCI-Hyp-Gruppe. Obgleich eine signifikante Abgrenzung im Rahmen dieser Arbeit wurde, lässt sich mit den vorliegenden Ergebnissen kein eindeutiger kausaler Zusammenhang herstellen. Auch eine vollständige Verknüpfung, der in der Literatur dargelegten Ansätze, ist derzeit nicht möglich. In Bezug auf die Fragestellung, ob die Hyp1 Behandlung eine BHS-Permeabilitätsstörung induziert, eine verstärkte neuronale IgG-Expression verursacht (98) oder eine gesteigerte periphere humorale IgG-Expression auslöst (153), wodurch eine Beeinflussung des sekundären Hirnschadens resultiert, könnten drei mögliche Ansätze darstellen bzw. Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Um das Ausmaß und die Ursache der BHS-Störung besser beurteilen zu können, wäre es erforderlich, u.a. eine immunhistochemische Analyse von peripheren Immunzellen im Hirngewebe, von Inflammationsmarkern, wie TNF- α oder Endothelin-1, sowie eine Untersuchung des Wassergehalts im Hirnparenchym durchzuführen. Des Weiteren wäre es von Interesse, den Aspekt der potenziellen neuronalen IgG-Expression zu beleuchten (98). Um eine mögliche IgG-Extravasation von einer neuronalen Expression

abzugrenzen, wäre neben der Objektivierung der BHS-Störung eine zusätzliche Bestimmung des IgG-Titers im Blutplasma hilfreich.

6.4. Hyperforin: Neuroprotektive Effekte nach CCI

Im Zusammenhang mit der Modulation von einigen neuroprotektiven Transkriptionsfaktoren wird Hyperforin als selektiver Induktor des ligandengesteuerten Kationenkanals TRPC6 bezeichnet. Diesbezüglich konnten in einigen Studien aufschlussreiche Effekte der Behandlung mit Hyperforin auf die TRPC6-CaMK-CREB-Signalkaskade beobachtet werden. Der Einstrom von Calciumionen über TRPC6 aktiviert die Proteinkinase CaMK und MAPK, was wiederum die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB induziert. Dieser Prozess trägt zum neuronalen Überleben und einer verbesserten synaptischen Plastizität bei (170).

Die Ergebnisse von Liu et al. demonstrieren, dass es bei zerebraler Ischämie durch Hyperforin als Aktivator zu einer TRPC6-Überexpression kommt, wodurch eine pathophysiologische Downregulation des Kationenkanals gehemmt wird. Der Effekt geht mit einer Steigerung des pCREB sowie einem erhöhten Vorkommen von Astrozyten im Cortex einher (170). Ein ähnlicher Ansatz konnte von Gibon et al. mit einer chronischen Überexpression von TRPC6 nach chronischer Hyperforin-Behandlung nachgewiesen werden (128).

Weitere Belege für die aufgestellte Hypothese sowie Parallelen zu den in dieser Forschungsarbeit durchgeführten Experimenten finden sich in zwei Studien von Lin et al. Dabei wurde bei Ratten eine vorübergehende fokale zerebrale Ischämie durch den Verschluss der mittleren Hirnarterie (MCAO) induziert (132). Die unmittelbar nach dem Ischämiebeginn erfolgte intrazerebroventrikuläre Injektion von Hyperforin resultierte 24 Stunden nach Reperfusion in einer signifikanten Erhöhung der TRPC6- sowie p-CREB-Aktivität, einer Reduktion der Infarkt volumina, einer Verbesserung der Neuroscores sowie einer Verringerung der Apoptosemarker (171).

Diese Wirkung wird unter anderem auf eine durch Hyperforin bedingte Blockierung der durch Calpain induzierten Degradierung von TRPC6 zurückgeführt. Im Abgleich konnte eine spezifische Hemmung der

Proteinkinasen, eine Abnahme der CREB-Phosphorylierung und eine daraus resultierende Reduktion neuroprotektiver Mechanismen beobachtet werden (172). Die Genexpression des TRPC6 in den ipsiläsionalen Hemisphären weist tendenziell geringere Werte in der CCI-Gruppe im Vergleich zu den Tieren mit Scheineingriff auf. Dieser Trend zeigt eine gewisse Übereinstimmung mit den Resultaten der Fachliteratur, wonach ein SHT eine verminderte Expression des TRPC6 bedingt, wodurch der Transkriptionsfaktor CREB herunterreguliert wird, was wiederum eine neuronale Apoptose zur Folge hat (171). Eine statistische Signifikanz kann jedoch für diese Korrelation nicht nachgewiesen werden. Der postulierte Effekt, dass eine Hyp1-Behandlung die TRPC6-Genexpression fünf Tage nach einem SHT steigern könnte, konnte nicht belegt werden. Weitere molekularbiologische Untersuchungen und Proteinanalysen, z.B. von CaMK und pCREB, könnten weitere detaillierte Hinweise auf die Beeinflussung der TRPC6-CaMK-CREB-Signalkaskade liefern und damit einen objektiven Vergleich zu den diskutierten Studien ermöglichen.

Das Neurothrophin BDNF bindet als Ligand an TrkB. Diese Kinase zählt zu den Schlüsselregulatoren für das neuronale Überleben nach SHT (21, 22, 142). In verschiedenen Arbeiten wurde nachgewiesen, dass Hyperforin die BDNF/TrkB-Signaltransduktion Hirnregion-spezifisch induziert bzw. positiv beeinflusst und damit die kortikale Neurogenese (128) und die hippocampale neuronale Plastizität fördert (20, 125, 152). Des Weiteren demonstrieren die Resultate der Studie von Erta et al., dass eine BDNF-Induktion durch IL-6 zu positiven Effekten führt, darunter die Reduktion von oxidativem Stress und Exzitotoxizität, sowie eine verbesserte funktionelle Wiederherstellung und Revaskularisierung nach SHT (173). Die Untersuchungen der BDNF-Expression in dieser Forschungsarbeit zeigen eine Diskrepanz der zu erwartenden Effekten in der Western Blot Analyse. Ein analytischer Fehler ist hier nicht auszuschließen. Realistisch lässt sich hingegen eine quantitativ deutlich verminderte Expression in der qPCR-Analyse der ipsilateralen Hemisphäre darstellen. Die reduzierte BDNF-Synthese steht im Einklang mit der erwartungsgemäßen Pathophysiologie und Neurodegeneration nach SHT. In Abwesenheit eines signifikanten Anstiegs der BDNF-Spiegel kann ein positiver Effekt auf die

Neurogenese durch die Gabe von Hyperforin ausgeschlossen werden. Folglich kann im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Erhöhung der BDNF-Expression, wie durch die TRPC6-vermittelte Genexpression postuliert (145), nicht nachgewiesen werden.

Ein weiterer Ansatz findet sich in eine Studie von Dave et al. (174), in welcher die Präsenz von c-Fos, als Bestandteil des Protoonkogens und Transkriptionsfaktors AP-1, nach einem SHT in verstärkten Bereichen des Cortex, Cerebellums und des Hippocampus nachgewiesen wird. Die Regulation des c-Fos wurde von Gerald et al. in Zellkulturen während eines Hypoxie-Experiments dargestellt. Durch den Einfluss von Hypeforin auf den Calciumstrom, welcher durch induzierte TRPC6-Kanäle erfolgt, konnte eine Beeinflussung von stoffwechselregulierten Proteinkinasen und stoffwechselabhängigen Transkriptionsfaktoren beobachtet werden (175). Dies führte zu einer Regulation der intrazellulären AP-1-Gentranskription. Die in vitro erzielten Ergebnisse konnten in einem in vivo Versuchsmodell jedoch nicht reproduziert werden. Eine gesteigerte synaptische Plastizität steht in vielen Krankheitsbildern in engem Zusammenhang mit der Neurogenese und dem neuronalen Überleben (44, 55). Ein weiterer Aspekt, welcher durch die Literatur von Nikolaienko et al. beleuchtet wird, ist die Beurteilung der synaptischen Plastizität nach SHT (55). Dies erfolgt anhand der Auswertung der Proteinexpression sowie der mRNA-Expressionslevel des Proteins Arc. In beiden Analysen zeigt sich ein minimaler Trend zu einer gesteigerten Expression in der CCI-Gruppe. Eine Interpretation dieses Aspektes durch Hyp1, in Bezug auf die synaptische Plastizität, ist aufgrund der fehlenden Signifikanz jedoch nicht aussagekräftig.

Der statistisch signifikante IgG-Gehalt in der CCI-Hyp-Gruppe lässt Interpretationsspielraum und Parallelen zu potenziellen neuroprotektiven Ansätzen aus der IVIG-Therapie nach ischämischen Schlaganfall (98, 101) und SHT (103) zu. Die mit der IVIG in Zusammenhang stehenden neuroprotektiven Eigenschaften offenbaren ein vielversprechendes therapeutisches Potenzial (98). In einer Untersuchung von Arumugan et al. zu ischämischen Hirnverletzungen bei Mäusen, konnte eine nahezu

vollständige Eliminierung der Sterblichkeit sowie eine Verringerung der Größe des Hirninfarkts um 50–60 % beobachtet werden. Des Weiteren wurde eine Reduktion der Zytokinproduktion (IL-1, IL-6 und TNF- α) sowie eine Inhibition der Apoptose nachgewiesen (101).

Jeong et al. zeigte zudem, dass die Behandlung mit IVIG nach induziertem CCI, das neuromotorische Outcome verbessert, die BHS stabilisiert, zur Eindämmung der Zytokinproduktion sowie zu einer Reduktion der Ödembildung führt. Die genannten Effekte waren mit einer verringerten Konzentration an IL-6 sowie einer verminderten Infiltration von Makrophagen assoziiert. (103)

Die positiven Resultate der wissenschaftlichen Literatur lassen sich nicht vollständig auf die Ergebnisse der vorliegenden Experimente übertragen. Die Hypothese, dass Hyp1 über eine direkte oder indirekte Modulation eines erhöhten IgG-Expressionsniveaus im Hirngewebe neuroprotektive Effekte auslöst, konnte nicht belegt werden. Um die signifikant erhöhte IgG-Expression der CCI-Hyp-Gruppe näher zu begründen, sind weitere Analysen erforderlich. Hierzu wären Genexpressionsstudien mit zellulärer Auflösung, z.B. mittels in-situ Hybridisierung oder Einzellzell-RNA-Sequenzierung notwendig. Obgleich der neuroprotektive Wirkmechanismus des IVIG nicht gänzlich aufgeklärt ist, wird der inhibitorische Rezeptor Fc γ RIIB als Hauptvermittler potenzieller Innervation und Modulation angenommen (98). Eine Erweiterung der Erkenntnisse könnte durch einen molekularbiologischen Nachweis der Fc γ RIIB-Rezeptoren erfolgen.

Inwiefern die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Analysen des Hyp1-Derivats den in der Literatur beschriebenen Effekten tatsächlich widersprechen, kann abschließend nicht sicher geklärt werden. Um festzustellen, ob und inwiefern die TRPC6-CaMK-CREB-Signalkaskade oder die IgG Expression, bei mit Hyperforin behandelten Tieren, im CCI Modell letztlich beeinflusst werden, sind weitere Gen- und Proteinanalysen erforderlich.

6.5. Limitierungen und Aussicht

Eine zentrale Limitation bei sämtlichen bislang durchgeführten SHT-Tierversuchsmodellen besteht darin, dass eine Übertragbarkeit der

Ergebnisse auf den menschlichen Körper nur eingeschränkt möglich ist. Ein SHT beim Menschen ist ein höchst individueller und variabler Prozess, dessen Verlauf von zahlreichen Faktoren beeinflusst wird. Das reale Unfallereignis setzt sich aus komplexen, multimodalen Traumamechanismen zusammen. In bisherigen Tierversuchen können meist nur einseitige Mechanismen wie Rotations-, Direktes-, Fokales-, Diffuses- oder Akzelerations-Dezelerations-Traumata untersucht werden (120). Zusätzlich übt die Heterogenität des menschlichen Organismus sowie das Vorliegen diverser Komorbiditäten einen maßgeblichen Einfluss auf die Pathophysiologie aus. Eine Modifikation des Versuchsaufbaus wäre prinzipiell möglich, um spezifische Fragestellungen zu beleuchten oder mögliche Störfaktoren zu minimieren. In diesem Zusammenhang ist jedoch zu berücksichtigen, dass lediglich Teilbereiche der Traumamechanismen und deren Pathophysiologie darstellbar sind, wobei eine vollständige Reproduktion der Realität in einer standardisierten Laborumgebung nicht gewährleistet werden kann.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen auf, dass das Hyperforin-Derivat Hyp1 keinen eindeutigen Effekt im Modellorganismus Maus ausübt. Die Resultate bestätigen in Teilen die pathophysiologischen Auswirkungen eines Schädel-Hirn-Traumas auf das murine Gehirn, wobei eine Gegenüberstellung mit den Resultaten aus der gesamten Arbeitsgruppe widersprüchliche Erkenntnisse offenbart. Diese lassen Interpretationsspielraum für eine weitere Ausweitung bzw. Optimierung der Analysen und des Versuchsaufbaus, was die Glaubwürdigkeit der Ergebnisse potenziell erhöhen würde.

Die Diskrepanz der Beobachtungen in den immunhistologischen Analysen könnte ihre Ursache in Ungenauigkeiten und einer nicht hinreichenden Objektivität bei der Erhebung der Daten haben. Im Verhältnis zur Gesamtfläche einer zu untersuchenden Hemisphäre, ist der Ausschnitt der Analyse eher klein und geringe Änderungen in der Durchführung können die Auszählung wesentlich beeinflussen. Die erhöhte Fehleranfälligkeit führt in der Konsequenz zu einer deutlichen Reduktion der Objektivität dieses Testverfahrens im Vergleich zu anderen Methoden.

Die Ergebnisse, welche durch die Anwendung der PCR- und Western-Blot-Analysen erzielt werden, sind jedoch deutlich objektiver, sodass diese Verfahren eine erhöhte Validität der Ergebnisse aufzeigen.

Ein weiteres Defizit in Bezug auf die Objektivität ist die Erhebung des Neurological Severity Score zu nennen. Obgleich eine Verblindung stattgefunden hat, kann die subjektive Erhebung des Scores durch den Untersucher potenziell beeinflusst werden, was die Objektivität der Ergebnisse beeinträchtigen könnte.

Eine weitere Limitation ist die Dauer des Beobachtungszeitraums, welcher am fünften Tag nach der Intervention endet. Insofern kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Hyp1-Effekte beispielsweise erst nach langfristiger Therapie (Tage bis Wochen) einen neuroprotektiven Einfluss nehmen, der an dieser Stelle jedoch nicht darstellbar ist. Eine Variation der Untersuchungszeitpunkte würde eine nähergehende Charakterisierung der regulatorischen Mechanismen der Hyp1-Behandlung ermöglichen.

Die Verwendung des Hyperforin-Derivats Dicyclophloroglucans Hyp1 statt des natürlichen Wirkstoffes Hyperforins erschwert zusätzlich die Beurteilung der gewonnenen Ergebnisse, da die Vergleichbarkeit der Resultate beeinträchtigt wird. Obgleich der Nachweis erbracht wurde, dass Hyp1 den Kationenkanal TRPC6 aktiviert, was der Wirkungsweise des Hyperforins entspricht, sind weitere pharmakologische Eigenschaften von Hyp1 bislang nur sehr unzureichend erforscht. Hinsichtlich der Pharmakokinetik sind bislang relevante Informationen zu Resorption, Verteilung im Körper, Gängigkeit im zentralen Nervensystem sowie Elimination und Ausscheidung nicht verfügbar. Ebenso sind die Kenntnisse über die notwendige Dosierung, welche zu wirksamen Konzentrationen in vivo führt, ebenso eingeschränkt. Obgleich in vorangegangenen Studien unter der hier verwendeten Dosierung sowohl in Zellkulturen als auch in Hirngewebe in vivo Veränderungen und Effekte nachgewiesen werden konnten, blieben entsprechende Belege in der vorliegenden Arbeit aus. Zumal der spezifische und optimale Zeitpunkt der Hyperforin-Applikation völlig unklar bleibt. In diesem Experiment erfolgt eine pharmakologische Behandlung bereits drei Tage vor der Induktion der Intervention bzw.

Scheinoperation. In Bezug auf die Realität eines akuten Schädel-Hirn-Traumas am Menschen wäre eine medikamentöse Therapie erst nach dem Schadensereignis realistisch. Anpassungen des Versuchsaufbaus, eine Dosisoptimierungen und eine Anpassungen des Applikationsweges könnten eine Hyp1-Wirksamkeit untersuchen und damit aus den theoretischen Grundlagen heraus die Entwicklung eines Arzneimittels vorantreiben. In Bezug auf die Applikationsform kann ein potenzieller Konflikt in Bezug auf die BHS-Permeabilität nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Die Blut-Hirn-Schrankenpermeabilität des Hyp1 nach i.p.-Injektion lässt sich gemäß Fracasso et al. voraussetzen (136). Allerdings könnte der Wirkstoffspiegel des applizierten Hyp1 durch möglicherweise posttraumatische negative Einflüsse und Störungen der Blut-Hirn-Schranke im Peri-/Läsionsgebiet variieren. Um eine optimale Dosierung zu finden, sind weitere Experimente und ein direkter Substanznachweis im Hirngewebe erforderlich.

Die hier präsentierten Ergebnisse bedürfen der Reevaluation unter Einbezug weiterer Daten aus in vivo Untersuchungen, insbesondere hinsichtlich der pharmakologischen Verwendung von Hyp1, der Schadensvolumenanalyse, eine Objektivierung der BHS-Permeabilität sowie der Analyse von Markern für Apoptose-, Entzündung- und neuroinflammatorischer Prozesse in den betroffenen Hirngeweben. Eine finale Beurteilung der möglichen Effekte von Hyp1 kann erst nach Vorliegen der genannten Daten erfolgen.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Das SHT ist trotz medizintechnischer Fortschritte und der Unfallprävention mit einer hohen Mortalität verbunden. Die Regeneration bei Überlebenden gestaltet sich häufig langwierig und ist mitunter nicht mit einer vollständigen Wiederherstellung der ursprünglichen Funktionalität verbunden. Es besteht nach wie vor ein hoher Bedarf an innovativen klinischen Therapieansätzen. Der Fokus liegt hierbei bisher nur auf der Wiederherstellung eines möglichst physiologischen Allgemeinzustandes, ohne dass aktiv zelluläre Regenerationsprozesse moduliert werden können. Diese limitierten therapeutischen Möglichkeiten sind auf ein bislang unvollständiges Wissen grundlegender molekularbiologischer Prozesse zurückzuführen.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Grundlagenforschung zum SHT und untersucht die pharmakologische Innervation und Modulation des sekundären Hirnschadens durch das Hyperforin-Derivat Hyp1, hinsichtlich potentieller anti-inflammatorischer sowie neuroprotektiver Effekte nach einem Schadensereignis am tierexperimentellen Modell der Maus. Der Versuchsaufbau basiert auf dem SHT-Tierversuchsmodell *Controlled-Cortical-Impact*. Insgesamt wurden 40 männliche murine Versuchstiere vom genetischen Wildtyp C57BL/6N in vier Versuchsgruppen eingeteilt und randomisiert (Sham Veh, Sham Hyp, CCI Veh, CCI Hyp). Den beiden CCI-Gruppen wurde mittels Operation eine rechtshemisphärische Läsion induziert, während die Sham-Gruppen einen Scheineingriff erhielten. Den beiden Interventionsgruppen, Sham Hyp und CCI Hyp, wurde intraperitoneal zwei Tage vor Intervention und fünf Tage nach Intervention das Hyperforin-Präparat verabreicht. Die Kontrollgruppe, Sham Veh und CCI Veh, erhielt demgegenüber ein Placebo. Die Versuchstiere wurden über einen Zeitraum von fünf Tagen einer Reihe von neurologisch-koordinativen und verhaltensbiologischen Tests unterzogen. Im Anschluss erfolgte die Euthanasie der Tiere und die Entnahme der Gehirne für weitere Analysen. Anschließend wurden eine histologische Aufarbeitung des Läsionsvolumen, sowie eine immunhistochemische Markierung zur Quantifizierung von Astrozyten und Mikroglia durchgeführt. Darüber hinaus umfasst die Studie eine molekularbiologische und proteinanalytische

Untersuchung von Neuroprotektiven- und Plastizitätsmarkern sowie pro- und anti-inflammatorischen Mediatoren.

Die Resultate dieser Untersuchung stützen größtenteils die pathophysiologischen Konsequenzen eines Schädel-Hirn-Traumas auf den murinen Organismus sowie die schädigende Auswirkung einer Neuroinflammation auf den sekundären Hirnschaden. Es konnte eine erwartungsgemäße, hochregulierte Astrozyten Aktivität nachgewiesen werden, die durch die Marker GFAP gekennzeichnet ist. Die durchgeführte Hyperforin-Therapie zeigte jedoch keine Wirkung auf die GFAP Expression. Gleiches gilt für die Entzündungs-, Inflammations- und Apoptose-assoziierten Marker IL-1 β , IL-6, Spektrin, cFos und COX2. Die potenzielle Förderung der neuronalen Regeneration, Plastizität und des neuronalen Überlebens als Folge einer erhöhten BDNF-Expression konnte nicht nachgewiesen werden. Die Behandlung mit Hyp1 zeigt eine signifikante Auswirkung auf die Konzentration von IgG im Hirnparenchym. Inwiefern eine verstärkte Störung der BHS-Integrität, eine vermehrte neuronale oder humorale Expression oder ein anderer Mechanismus hierfür verantwortlich ist, kann anhand der vorliegenden Datenlage nicht eindeutig bewiesen werden. Inwieweit die Modulation von Signalkaskaden, die veränderte Integrität der BHS sowie die Eindämmung der Neuroinflammation durch Hyp1 tatsächlich die Entstehung und den Verlauf der Pathogenese sowie das neurologische Outcome nach SHT beeinflussen, muss jedoch zunächst offen gelassen werden.

Zukünftige Forschungsarbeiten sollten durch eine weitere Optimierung des Versuchsaufbaus, zusätzliche molekularbiologische und proteomanalytische Untersuchungen, eine effektive Dosisfindung und eine Evaluierung der Applikationswege dazu beitragen, das Wissen über die Wirksamkeit von Hyp1 zu erweitern, um die Entwicklung eines Arzneimittels voranzutreiben. Die Grundlagenforschung kann dazu beitragen, weitere grundlegende Erkenntnisse zu gewinnen.

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Brazinova A, Rehorcikova V, Taylor MS, Buckova V, Majdan M, Psota M, et al. Epidemiology of Traumatic Brain Injury in Europe: A Living Systematic Review. *J Neurotrauma*. 2021;38(10):1411-40.
2. Peeters W, van den Brande R, Polinder S, Brazinova A, Steyerberg EW, Lingsma HF, et al. Epidemiology of traumatic brain injury in Europe. *Acta Neurochir (Wien)*. 2015;157(10):1683-96.
3. Hyder AA, Wunderlich CA, Puvanachandra P, Gururaj G, Kobusingye OC. The impact of traumatic brain injuries: a global perspective. *NeuroRehabilitation*. 2007;22(5):341-53.
4. Ruff RL, Riechers RG. Effective treatment of traumatic brain injury: learning from experience. *JAMA*. 2012;308(19):2032-3.
5. Roozenbeek B, Maas AI, Menon DK. Changing patterns in the epidemiology of traumatic brain injury. *Nat Rev Neurol*. 2013;9(4):231-6.
6. Langlois JA, Rutland-Brown W, Wald MM. The epidemiology and impact of traumatic brain injury: a brief overview. *J Head Trauma Rehabil*. 2006;21(5):375-8.
7. Werner C, Engelhard K. Pathophysiology of traumatic brain injury. *Br J Anaesth*. 2007;99(1):4-9.
8. Mckee AC, Daneshvar DH. The neuropathology of traumatic brain injury. *Handbook of clinical neurology*. 2015;127:45-66.
9. Chiu CC, Liao YE, Yang LY, Wang JY, Tweedie D, Karnati HK, et al. Neuroinflammation in animal models of traumatic brain injury. *J Neurosci Methods*. 2016;272:38-49.
10. Engelhard K, Muller-Forell W, Werner C. [Therapy of head trauma]. *Anaesthesist*. 2008;57(12):1219-31.
11. Loane DJ, Faden AI. Neuroprotection for traumatic brain injury: translational challenges and emerging therapeutic strategies. *Trends Pharmacol Sci*. 2010;31(12):596-604.
12. Simon DW, McGeachy MJ, Bayir H, Clark RSB, Loane DJ, Kochanek PM. The far-reaching scope of neuroinflammation after traumatic brain injury. *Nat Rev Neurol*. 2017;13(9):572.
13. Schempp CM, Pelz K, Wittmer A, Schopf E, Simon JC. Antibacterial activity of hyperforin from St John's wort, against multiresistant

Staphylococcus aureus and gram-positive bacteria. *Lancet*. 1999;353(9170):2129.

14. Schempp CM, Kirkin V, Simon-Haarhaus B, Kersten A, Kiss J, Termeer CC, et al. Inhibition of tumour cell growth by hyperforin, a novel anticancer drug from St. John's wort that acts by induction of apoptosis. *Oncogene*. 2002;21(8):1242-50.

15. Medina MA, Martinez-Poveda B, Amores-Sanchez MI, Quesada AR. Hyperforin: more than an antidepressant bioactive compound? *Life Sci*. 2006;79(2):105-11.

16. Quiney C, Billard C, Salanoubat C, Fourneron JD, Kolb JP. Hyperforin, a new lead compound against the progression of cancer and leukemia? *Leukemia*. 2006;20(9):1519-25.

17. Nosratabadi R, Rastin M, Sankian M, Haghmorad D, Tabasi N, Zamani S, et al. St. John's wort and its component hyperforin alleviate experimental autoimmune encephalomyelitis through expansion of regulatory T-cells. *J Immunotoxicol*. 2016;13(3):364-74.

18. Ma L, Pan X, Zhou F, Liu K, Wang L. Hyperforin protects against acute cerebral ischemic injury through inhibition of interleukin-17A-mediated microglial activation. *Brain Res*. 2018;1678:254-61.

19. Leuner K, Heiser JH, Derksen S, Mladenov MI, Fehske CJ, Schubert R, et al. Simple 2,4-Diacetylphloroglucinols as Classic Transient Receptor Potential-6 Activators—Identification of a Novel Pharmacophore. *Molecular Pharmacology*. 2010;77(3):368-77.

20. Heiser JH, Schuwald AM, Sillani G, Ye L, Müller WE, Leuner K. TRPC6 channel-mediated neurite outgrowth in PC12 cells and hippocampal neurons involves activation of RAS/MEK/ERK, PI3K, and CAMKIV signaling. *J Neurochem*. 2013;127(3):303-13.

21. Gibon J, Deloulme JC, Chevallier T, Ladeveze E, Abrous DN, Bouron A. The antidepressant hyperforin increases the phosphorylation of CREB and the expression of TrkB in a tissue-specific manner. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2013;16(1):189-98.

22. Su WS, Wu CH, Chen SF, Yang FY. Transcranial ultrasound stimulation promotes brain-derived neurotrophic factor and reduces apoptosis in a mouse model of traumatic brain injury. *Brain Stimul*. 2017;10(6):1032-41.

23. Walton MR, Dragunow I. Is CREB a key to neuronal survival? *Trends Neurosci.* 2000;23(2):48-53.
24. Menon DK, Schwab K, Wright DW, Maas AI, Demographics, Clinical Assessment Working Group of the I, et al. Position statement: definition of traumatic brain injury. *Arch Phys Med Rehabil.* 2010;91(11):1637-40.
25. Teasdale G, Jennett B. Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. *Lancet.* 1974;2(7872):81-4.
26. Jennett B, Teasdale G. Aspects of coma after severe head injury. *Lancet.* 1977;1{Jennett, 1977 #317}(8017):878-81.
27. Matis G, Birbilis T. The Glasgow Coma Scale--a brief review. Past, present, future. *Acta Neurol Belg.* 2008;108(3):75-89.
28. Prins ML, Giza CC. Repeat traumatic brain injury in the developing brain. *Int J Dev Neurosci.* 2012;30(3):185-90.
29. Tagliaferri F, Compagnone C, Korsic M, Servadei F, Kraus J. A systematic review of brain injury epidemiology in Europe. *Acta Neurochir (Wien).* 2006;148(3):255-68; discussion 68.
30. da Silva Meirelles L, Simon D, Regner A. Neurotrauma: The Crosstalk between Neurotrophins and Inflammation in the Acutely Injured Brain. *Int J Mol Sci.* 2017;18(5).
31. Wang K, Liu B, Ma J. Research progress in traumatic brain penumbra. *Chin Med J (Engl).* 2014;127(10):1964-8.
32. Chesnut RM, Marshall LF, Klauber MR, Blunt BA, Baldwin N, Eisenberg HM, et al. The role of secondary brain injury in determining outcome from severe head injury. *J Trauma.* 1993;34(2):216-22.
33. Johnson VE, Stewart W, Smith DH. Axonal pathology in traumatic brain injury. *Exp Neurol.* 2013;246:35-43.
34. van Eijck MM, Schoonman GG, van der Naalt J, de Vries J, Roks G. Diffuse axonal injury after traumatic brain injury is a prognostic factor for functional outcome: a systematic review and meta-analysis. *Brain Inj.* 2018;32(4):395-402.
35. Smith DH, Meaney DF, Shull WH. Diffuse axonal injury in head trauma. *The Journal of head trauma rehabilitation.* 2003;18(4):307-16.
36. Blennow K, Hardy J, Zetterberg H. The neuropathology and neurobiology of traumatic brain injury. *Neuron.* 2012;76(5):886-99.

37. Shabab T, Khanabdali R, Moghadamtousi SZ, Kadir HA, Mohan G. Neuroinflammation pathways: a general review. *Int J Neurosci.* 2017;127(7):624-33.
38. Bourgeois-Tardif S, De Beaumont L, Rivera JC, Chemtob S, Weil AG. Role of innate inflammation in traumatic brain injury. *Neurol Sci.* 2021;42(4):1287-99.
39. Loane DJ, Kumar A. Microglia in the TBI brain: The good, the bad, and the dysregulated. *Exp Neurol.* 2016;275 Pt 3(0 3):316-27.
40. Tehse J, Taghibiglou C. The overlooked aspect of excitotoxicity: Glutamate-independent excitotoxicity in traumatic brain injuries. *Eur J Neurosci.* 2019;49(9):1157-70.
41. Zetterberg H, Smith DH, Blennow K. Biomarkers of mild traumatic brain injury in cerebrospinal fluid and blood. *Nat Rev Neurol.* 2013;9(4):201-10.
42. Plummer S, Van den Heuvel C, Thornton E, Corrigan F, Cappai R. The Neuroprotective Properties of the Amyloid Precursor Protein Following Traumatic Brain Injury. *Aging Dis.* 2016;7(2):163-79.
43. Villapol S, Byrnes KR, Symes AJ. Temporal dynamics of cerebral blood flow, cortical damage, apoptosis, astrocyte-vasculature interaction and astrogliosis in the pericontusional region after traumatic brain injury. *Front Neurol.* 2014;5:82.
44. Corps KN, Roth TL, McGavern DB. Inflammation and neuroprotection in traumatic brain injury. *JAMA Neurol.* 2015;72(3):355-62.
45. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol.* 2007;81(1):1-5.
46. Calovi S, Mut-Arbona P, Sperlagh B. Microglia and the Purinergic Signaling System. *Neuroscience.* 2019;405:137-47.
47. Kim JY, Kim JW, Yenari MA. Heat shock protein signaling in brain ischemia and injury. *Neurosci Lett.* 2020;715:134642.
48. Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci.* 2005;8(6):752-8.
49. Nayak D, Roth TL, McGavern DB. Microglia development and function. *Annu Rev Immunol.* 2014;32:367-402.

50. Jassam YN, Izzy S, Whalen M, McGavern DB, El Khoury J. Neuroimmunology of Traumatic Brain Injury: Time for a Paradigm Shift. *Neuron*. 2017;95(6):1246-65.
51. Weinhard L, di Bartolomei G, Bolasco G, Machado P, Schieber NL, Neniskyte U, et al. Microglia remodel synapses by presynaptic trogocytosis and spine head filopodia induction. *Nat Commun*. 2018;9(1):1228.
52. Fu R, Shen Q, Xu P, Luo JJ, Tang Y. Phagocytosis of microglia in the central nervous system diseases. *Mol Neurobiol*. 2014;49(3):1422-34.
53. Sheng M, Greenberg ME. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron*. 1990;4(4):477-85.
54. Rosi S. Neuroinflammation and the plasticity-related immediate-early gene Arc. *Brain Behav Immun*. 2011;25 Suppl 1(Suppl 1):S39-49.
55. Nikolaienko O, Patil S, Eriksen MS, Bramham CR. Arc protein: a flexible hub for synaptic plasticity and cognition. *Semin Cell Dev Biol*. 2018;77:33-42.
56. Wall MJ, Collins DR, Chery SL, Allen ZD, Pastuzyn ED, George AJ, et al. The Temporal Dynamics of Arc Expression Regulate Cognitive Flexibility. *Neuron*. 2018;98(6):1124-32.e7.
57. Cruz-Mendoza F, Jauregui-Huerta F, Aguilar-Delgadillo A, García-Estrada J, Luquin S. Immediate Early Gene c-fos in the Brain: Focus on Glial Cells. *Brain Sci*. 2022;12(6).
58. Lara Aparicio SY, Laureani Fierro ÁDJ, Aranda Abreu GE, Toledo Cárdenas R, García Hernández LI, Coria Ávila GA, et al. Current Opinion on the Use of c-Fos in Neuroscience. *NeuroSci*. 2022;3(4):687-702.
59. Kumar A, Stoica BA, Sabirzhanov B, Burns MP, Faden AI, Loane DJ. Traumatic brain injury in aged animals increases lesion size and chronically alters microglial/macrophage classical and alternative activation states. *Neurobiol Aging*. 2013;34(5):1397-411.
60. Ziebell JM, Morganti-Kossmann MC. Involvement of pro- and anti-inflammatory cytokines and chemokines in the pathophysiology of traumatic brain injury. *Neurotherapeutics*. 2010;7(1):22-30.
61. Karve IP, Taylor JM, Crack PJ. The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury. *Br J Pharmacol*. 2016;173(4):692-702.

62. Loane DJ, Byrnes KR. Role of microglia in neurotrauma. *Neurotherapeutics*. 2010;7(4):366-77.
63. Hellewell S, Semple BD, Morganti-Kossmann MC. Therapies negating neuroinflammation after brain trauma. *Brain Res*. 2016;1640(Pt A):36-56.
64. Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain Res Mol Brain Res*. 1998;57(1):1-9.
65. Perlmutter LS, Scott SA, Barron E, Chui HC. MHC class II-positive microglia in human brain: association with Alzheimer lesions. *J Neurosci Res*. 1992;33(4):549-58.
66. Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*. 2010;32(5):593-604.
67. Ransohoff RM, Brown MA. Innate immunity in the central nervous system. *J Clin Invest*. 2012;122(4):1164-71.
68. Kline AE, Leary JB, Radabaugh HL, Cheng JP, Bondi CO. Combination therapies for neurobehavioral and cognitive recovery after experimental traumatic brain injury: Is more better? *Prog Neurobiol*. 2016;142:45-67.
69. Yan HQ, Banos MA, Herregodts P, Hooghe R, Hooghe-Peters EL. Expression of interleukin (IL)-1 beta, IL-6 and their respective receptors in the normal rat brain and after injury. *Eur J Immunol*. 1992;22(11):2963-71.
70. Allan SM, Tyrrell PJ, Rothwell NJ. Interleukin-1 and neuronal injury. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(8):629-40.
71. Schmidt O, Leinhase I, Hasenboehler E, Morgan S, Stahel P. Die Bedeutung der posttraumatischen Entzündungsreaktion im verletzten Gehirn. *Der Orthopäde*. 2007;36(3):248-58.
72. Penkowa M, Camats J, Hadberg H, Quintana A, Rojas S, Giralt M, et al. Astrocyte-targeted expression of interleukin-6 protects the central nervous system during neuroglial degeneration induced by 6-aminonicotinamide. *J Neurosci Res*. 2003;73(4):481-96.
73. Rodney T, Osier N, Gill J. Pro- and anti-inflammatory biomarkers and traumatic brain injury outcomes: A review. *Cytokine*. 2018;110:248-56.

74. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813(5):878-88.
75. Mattson MP, Scheff SW. Endogenous neuroprotection factors and traumatic brain injury: mechanisms of action and implications for therapy. *J Neurotrauma*. 1994;11(1):3-33.
76. Madathil SK, Carlson SW, Brelsfoard JM, Ye P, D'Ercole AJ, Saatman KE. Astrocyte-Specific Overexpression of Insulin-Like Growth Factor-1 Protects Hippocampal Neurons and Reduces Behavioral Deficits following Traumatic Brain Injury in Mice. *PLoS One*. 2013;8(6):e67204.
77. Colombo E, Farina C. Astrocytes: Key Regulators of Neuroinflammation. *Trends Immunol*. 2016;37(9):608-20.
78. Chen Y, Swanson RA. Astrocytes and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003;23(2):137-49.
79. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010;119(1):7-35.
80. Jayakumar AR, Tong XY, Ruiz-Cordero R, Bregy A, Bethea JR, Bramlett HM, et al. Activation of NF-kappaB mediates astrocyte swelling and brain edema in traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2014;31(14):1249-57.
81. Hawkey C. COX-1 and COX-2 inhibitors. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2001;15(5):801-20.
82. Yang MS, Ji KA, Jeon SB, Jin BK, Kim SU, Jou I, et al. Interleukin-13 enhances cyclooxygenase-2 expression in activated rat brain microglia: implications for death of activated microglia. *J Immunol*. 2006;177(2):1323-9.
83. Hartig W, Michalski D, Seeger G, Voigt C, Donat CK, Dulin J, et al. Impact of 5-lipoxygenase inhibitors on the spatiotemporal distribution of inflammatory cells and neuronal COX-2 expression following experimental traumatic brain injury in rats. *Brain Res*. 2013;1498:69-84.
84. Martin-Lopez E, Garcia-Marques J, Nunez-Llaves R, Lopez-Mascaraque L. Clonal astrocytic response to cortical injury. *PLoS One*. 2013;8(9):e74039.
85. Burda JE, Bernstein AM, Sofroniew MV. Astrocyte roles in traumatic brain injury. *Exp Neurol*. 2016;275 Pt 3(0 3):305-15.

86. Sofroniew MV. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci.* 2009;32(12):638-47.
87. Liu Z, Li Y, Cui Y, Roberts C, Lu M, Wilhelmsson U, et al. Beneficial effects of gfap/vimentin reactive astrocytes for axonal remodeling and motor behavioral recovery in mice after stroke. *Glia.* 2014;62(12):2022-33.
88. Guillamon-Vivancos T, Gomez-Pinedo U, Matias-Guiu J. Astrocytes in neurodegenerative diseases (I): function and molecular description. *Neurologia.* 2015;30(2):119-29.
89. Cieri MB, Ramos AJ. Astrocytes, reactive astrogliosis, and glial scar formation in traumatic brain injury. *Neural Regen Res.* 2025;20(4):973-89.
90. Abbott NJ. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J Anat.* 2002;200(6):629-38.
91. Beschorner R, Nguyen TD, Gozalan F, Pedal I, Mattern R, Schluesener HJ, et al. CD14 expression by activated parenchymal microglia/macrophages and infiltrating monocytes following human traumatic brain injury. *Acta Neuropathol.* 2002;103(6):541-9.
92. Lu J, Goh SJ, Tng PY, Deng YY, Ling EA, Moochhala S. Systemic inflammatory response following acute traumatic brain injury. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2009;14(10):3795-813.
93. Kenne E, Erlandsson A, Lindbom L, Hillered L, Clausen F. Neutrophil depletion reduces edema formation and tissue loss following traumatic brain injury in mice. *J Neuroinflammation.* 2012;9:17.
94. Nizamutdinov D, Shapiro LA. Overview of Traumatic Brain Injury: An Immunological Context. *Brain Sci.* 2017;7(1).
95. Shapira Y, Setton D, Artru AA, Shohami E. Blood-brain barrier permeability, cerebral edema, and neurologic function after closed head injury in rats. *Anesth Analg.* 1993;77(1):141-8.
96. Hicks RR, Baldwin SA, Scheff SW. Serum extravasation and cytoskeletal alterations following traumatic brain injury in rats. Comparison of lateral fluid percussion and cortical impact models. *Mol Chem Neuropathol.* 1997;32(1-3):1-16.
97. Dorsett CR, McGuire JL, DePasquale EA, Gardner AE, Floyd CL, McCullumsmith RE. Glutamate Neurotransmission in Rodent Models of Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma.* 2017;34(2):263-72.

98. Thom V, Arumugam TV, Magnus T, Gelderblom M. Therapeutic Potential of Intravenous Immunoglobulin in Acute Brain Injury. *Front Immunol.* 2017;8:875.
99. Willis EF, Gillespie ER, Guse K, Zuercher AW, Kasermann F, Ruitenberg MJ, et al. Intravenous immunoglobulin (IVIg) promotes brain repair and improves cognitive outcomes after traumatic brain injury in a FcγRIIB receptor-dependent manner. *Brain Behav Immun.* 2023;109:37-50.
100. Gold R, Stangel M, Dalakas MC. Drug Insight: the use of intravenous immunoglobulin in neurology--therapeutic considerations and practical issues. *Nat Clin Pract Neurol.* 2007;3(1):36-44.
101. Arumugam TV, Selvaraj PK, Woodruff TM, Mattson MP. Targeting ischemic brain injury with intravenous immunoglobulin. *Expert Opin Ther Targets.* 2008;12(1):19-29.
102. Hughes RA, Cornblath DR. Guillain-Barre syndrome. *Lancet.* 2005;366(9497):1653-66.
103. Jeong S, Lei B, Wang H, Dawson HN, James ML. Intravenous immunoglobulin G improves neurobehavioral and histological outcomes after traumatic brain injury in mice. *J Neuroimmunol.* 2014;276(1-2):112-8.
104. Liddel SA, Barres BA. Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity.* 2017;46(6):957-67.
105. Koshimizu H, Hazama S, Hara T, Ogura A, Kojima M. Distinct signaling pathways of precursor BDNF and mature BDNF in cultured cerebellar granule neurons. *Neurosci Lett.* 2010;473(3):229-32.
106. Zhang Z, Lerner SF, Liu MC, Zheng W, Hayes RL, Wang KK. Multiple alphaII-spectrin breakdown products distinguish calpain and caspase dominated necrotic and apoptotic cell death pathways. *Apoptosis.* 2009;14(11):1289-98.
107. Liu Y, Yao X, Lv X, Qian J. The role of spectrin breakdown products in patients with traumatic brain injury: a systematic review and meta-analysis. *Neurol Sci.* 2023;44(4):1171-83.
108. Yan XX, Jeromin A, Jeromin A. Spectrin Breakdown Products (SBDPs) as Potential Biomarkers for Neurodegenerative Diseases. *Curr Transl Geriatr Exp Gerontol Rep.* 2012;1(2):85-93.

109. Abdul-Muneer PM, Pfister BJ, Haorah J, Chandra N. Role of Matrix Metalloproteinases in the Pathogenesis of Traumatic Brain Injury. *Mol Neurobiol.* 2016;53(9):6106-23.
110. Warren KM, Reeves TM, Phillips LL. MT5-MMP, ADAM-10, and N-cadherin act in concert to facilitate synapse reorganization after traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 2012;29(10):1922-40.
111. Chen Y, Garcia GE, Huang W, Constantini S. The involvement of secondary neuronal damage in the development of neuropsychiatric disorders following brain insults. *Front Neurol.* 2014;5:22.
112. Barnes DE, Kaup A, Kirby KA, Byers AL, Diaz-Arrastia R, Yaffe K. Traumatic brain injury and risk of dementia in older veterans. *Neurology.* 2014;83(4):312-9.
113. Gardner RC, Burke JF, Nettiksimmons J, Kaup A, Barnes DE, Yaffe K. Dementia risk after traumatic brain injury vs nonbrain trauma: the role of age and severity. *JAMA Neurol.* 2014;71(12):1490-7.
114. Gardner RC, Burke JF, Nettiksimmons J, Goldman S, Tanner CM, Yaffe K. Traumatic brain injury in later life increases risk for Parkinson disease. *Ann Neurol.* 2015;77(6):987-95.
115. Gardner RC, Yaffe K. Epidemiology of mild traumatic brain injury and neurodegenerative disease. *Mol Cell Neurosci.* 2015;66(Pt B):75-80.
116. Walder B, Haller G, Rebetz MM, Delhumeau C, Bottequin E, Schoettker P, et al. Severe traumatic brain injury in a high-income country: an epidemiological study. *J Neurotrauma.* 2013;30(23):1934-42.
117. Andelic N, Howe EI, Hellstrom T, Sanchez MF, Lu J, Lovstad M, et al. Disability and quality of life 20 years after traumatic brain injury. *Brain Behav.* 2018;8(7):e01018.
118. Centers for Disease C, Prevention. CDC grand rounds: reducing severe traumatic brain injury in the United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2013;62(27):549-52.
119. Marklund N, Hillered L. Animal modelling of traumatic brain injury in preclinical drug development: where do we go from here? *Br J Pharmacol.* 2011;164(4):1207-29.
120. Xiong Y, Mahmood A, Chopp M. Animal models of traumatic brain injury. *Nat Rev Neurosci.* 2013;14(2):128-42.

121. Osier ND, Dixon CE. The Controlled Cortical Impact Model: Applications, Considerations for Researchers, and Future Directions. *Front Neurol.* 2016;7:134.
122. Borrelli F, Izzo AA. Herb-drug interactions with St John's wort (*Hypericum perforatum*): an update on clinical observations. *AAPS J.* 2009;11(4):710-27.
123. Cervo L, Rozio M, Ekalle-Soppo CB, Guiso G, Morazzoni P, Caccia S. Role of hyperforin in the antidepressant-like activity of *Hypericum perforatum* extracts. *Psychopharmacology (Berl).* 2002;164(4):423-8.
124. Schneider F, Härter M, Schorr S. S3-leitlinie/nationale versorgungsleitlinie unipolare depression: Springer-Verlag; 2017.
125. Friedland K, Harteneck C. Hyperforin: To Be or Not to Be an Activator of TRPC(6). *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2015;169:1-24.
126. Sell TS, Belkacemi T, Flockerzi V, Beck A. Protonophore properties of hyperforin are essential for its pharmacological activity. *Sci Rep.* 2014;4:7500.
127. Whitten DL, Myers SP, Hawrelak JA, Wohlmuth H. The effect of St John's wort extracts on CYP3A: a systematic review of prospective clinical trials. *Br J Clin Pharmacol.* 2006;62(5):512-26.
128. Gibon J, Tu P, Bouron A. Store-depletion and hyperforin activate distinct types of Ca(2+)-conducting channels in cortical neurons. *Cell Calcium.* 2010;47(6):538-43.
129. Inestrosa NC, Tapia-Rojas C, Griffith TN, Carvajal FJ, Benito MJ, Rivera-Dictter A, et al. Tetrahydrohyperforin prevents cognitive deficit, Abeta deposition, tau phosphorylation and synaptotoxicity in the APP^{swe}/PSEN1^{DeltaE9} model of Alzheimer's disease: a possible effect on APP processing. *Transl Psychiatry.* 2011;1(7):e20.
130. Abbott AC, Calderon Toledo C, Aranguiz FC, Inestrosa NC, Varela-Nallar L. Tetrahydrohyperforin increases adult hippocampal neurogenesis in wild-type and APP^{swe}/PS1^{DeltaE9} mice. *J Alzheimers Dis.* 2013;34(4):873-85.
131. Kim DS, Ryu HJ, Kim JE, Kang TC. The reverse roles of transient receptor potential canonical channel-3 and -6 in neuronal death following pilocarpine-induced status epilepticus. *Cell Mol Neurobiol.* 2013;33(1):99-109.

132. Lin Y, Zhang JC, Fu J, Chen F, Wang J, Wu ZL, et al. Hyperforin attenuates brain damage induced by transient middle cerebral artery occlusion (MCAO) in rats via inhibition of TRPC6 channels degradation. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2013;33(2):253-62.
133. Griesi-Oliveira K, Acab A, Gupta AR, Sunaga DY, Chailangkarn T, Nicol X, et al. Modeling non-syndromic autism and the impact of TRPC6 disruption in human neurons. *Mol Psychiatry.* 2015;20(11):1350-65.
134. Leuner K, Heiser JH, Derksen S, Mladenov MI, Fehske CJ, Schubert R, et al. Simple 2,4-Diacylphloroglucinols as Classic Transient Receptor Potential-6 Activators—Identification of a Novel Pharmacophore. *MOLECULAR PHARMACOLOGY.* 2010;77(3):368–77.
135. Duman CH, Duman RS. Spine synapse remodeling in the pathophysiology and treatment of depression. *Neurosci Lett.* 2015;601:20-9.
136. Fracasso C, Bagnati R, Passoni A, Guiso G, Cantoni L, Riva A, et al. Brain Uptake of Tetrahydrohyperforin and Potential Metabolites after Repeated Dosing in Mice. *J Nat Prod.* 2015;78(8):2029-35.
137. Rostami E, Krueger F, Plantman S, Davidsson J, Agoston D, Grafman J, et al. Alteration in BDNF and its receptors, full-length and truncated TrkB and p75(NTR) following penetrating traumatic brain injury. *Brain Res.* 2014;1542:195-205.
138. Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci.* 2001;24:677-736.
139. Tessier M, Garcia MS, Goubert E, Blasco E, Consumi A, Dehapiot B, et al. Bumetanide induces post-traumatic microglia-interneuron contact to promote neurogenesis and recovery. *Brain.* 2023;146(10):4247-61.
140. Santos AR, Comprido D, Duarte CB. Regulation of local translation at the synapse by BDNF. *Prog Neurobiol.* 2010;92(4):505-16.
141. Wang Z, Yao W, Deng Q, Zhang X, Zhang J. Protective effects of BDNF overexpression bone marrow stromal cell transplantation in rat models of traumatic brain injury. *J Mol Neurosci.* 2013;49(2):409-16.
142. Numakawa T, Suzuki S, Kumamaru E, Adachi N, Richards M, Kunugi H. BDNF function and intracellular signaling in neurons. *Histol Histopathol.* 2010;25(2):237-58.

143. Hetman M, Kanning K, Cavanaugh JE, Xia Z. Neuroprotection by brain-derived neurotrophic factor is mediated by extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem.* 1999;274(32):22569-80.
144. Du K, Montminy M. CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. *J Biol Chem.* 1998;273(49):32377-9.
145. Leuner K, Kazanski V, Muller M, Essin K, Henke B, Gollasch M, et al. Hyperforin--a key constituent of St. John's wort specifically activates TRPC6 channels. *FASEB J.* 2007;21(14):4101-11.
146. Li Y, Jia YC, Cui K, Li N, Zheng ZY, Wang YZ, et al. Essential role of TRPC channels in the guidance of nerve growth cones by brain-derived neurotrophic factor. *Nature.* 2005;434(7035):894-8.
147. Sossin WS, Barker PA. Something old, something new: BDNF-induced neuron survival requires TRPC channel function. *Nat Neurosci.* 2007;10(5):537-8.
148. Fortin DA, Srivastava T, Dwarakanath D, Pierre P, Nygaard S, Derkach VA, et al. Brain-derived neurotrophic factor activation of CaM-kinase kinase via transient receptor potential canonical channels induces the translation and synaptic incorporation of GluA1-containing calcium-permeable AMPA receptors. *J Neurosci.* 2012;32(24):8127-37.
149. Cullen PJ. Decoding complex Ca²⁺ signals through the modulation of Ras signaling. *Curr Opin Cell Biol.* 2006;18(2):157-61.
150. Tai Y, Feng S, Ge R, Du W, Zhang X, He Z, et al. TRPC6 channels promote dendritic growth via the CaMKIV-CREB pathway. *J Cell Sci.* 2008;121(Pt 14):2301-7.
151. Wayman GA, Lee YS, Tokumitsu H, Silva AJ, Soderling TR. Calmodulin-kinases: modulators of neuronal development and plasticity. *Neuron.* 2008;59(6):914-31.
152. Leuner K, Li W, Amaral MD, Rudolph S, Calfa G, Schuwald AM, et al. Hyperforin modulates dendritic spine morphology in hippocampal pyramidal neurons by activating Ca(2+) -permeable TRPC6 channels. *Hippocampus.* 2013;23(1):40-52.
153. Aghili T, Arshami J, Tahmasbi AM, Haghparast AR. Effects of *Hypericum perforatum* extract on IgG titer, leukocytes subset and spleen index in rats. *Avicenna J Phytomed.* 2014;4(6):413-9.

154. Onyszchuk G, Al-Hafez B, He YY, Bilgen M, Berman NE, Brooks WM. A mouse model of sensorimotor controlled cortical impact: characterization using longitudinal magnetic resonance imaging, behavioral assessments and histology. *J Neurosci Methods*. 2007;160(2):187-96.
155. Tsenter J, Beni-Adani L, Assaf Y, Alexandrovich AG, Trembovler V, Shohami E. Dynamic changes in the recovery after traumatic brain injury in mice: effect of injury severity on T2-weighted MRI abnormalities, and motor and cognitive functions. *J Neurotrauma*. 2008;25(4):324-33.
156. Sebastiani A, Gölz C, Sebastiani PG, Bobkiewicz W, Behl C, Mittmann T, et al. Sequestosome 1 deficiency delays, but does not prevent brain damage formation following acute brain injury in adult mice. *Frontiers in neuroscience*. 2017;11:678.
157. Hamm RJ, Pike BR, O'Dell DM, Lyeth BG, Jenkins LW. The rotarod test: an evaluation of its effectiveness in assessing motor deficits following traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 1994;11(2):187-96.
158. Shiotsuki H, Yoshimi K, Shimo Y, Funayama M, Takamatsu Y, Ikeda K, et al. A rotarod test for evaluation of motor skill learning. *J Neurosci Methods*. 2010;189(2):180-5.
159. Lubrich C, Giesler P, Kipp M. Motor Behavioral Deficits in the Cuprizone Model: Validity of the Rotarod Test Paradigm. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(19):11342.
160. Deitch AD, Murray MR. The Nissl substance of living and fixed spinal ganglion cells. I. A phase contrast study. *J Biophys Biochem Cytol*. 1956;2(4):433-44.
161. Ulfing N. *Kurzlehrbuch Histologie*. 3., überarb. Stuttgart [ua]: Stuttgart ua: Thieme. 2011.
162. Okamoto T, Okabe S. Ultraviolet absorbance at 260 and 280 nm in RNA measurement is dependent on measurement solution. *Int J Mol Med*. 2000;5(6):657-9.
163. Rassow J NR, Hauser K. *Duale Reihe Biochemie*. Georg Thieme Verlag. 2022.
164. Timaru-Kast R, Herbig EL, Luh C, Engelhard K, Thal SC. Influence of Age on Cerebral Housekeeping Gene Expression for Normalization of

- Quantitative Polymerase Chain Reaction after Acute Brain Injury in Mice. *J Neurotrauma*. 2015;32(22):1777-88.
165. Lindblad C, Rostami E, Helmy A. Interleukin-1 Receptor Antagonist as Therapy for Traumatic Brain Injury. *Neurotherapeutics*. 2023;20(6):1508-28.
166. Ciryam P, Gerzanich V, Simard JM. Interleukin-6 in Traumatic Brain Injury: A Janus-Faced Player in Damage and Repair. *J Neurotrauma*. 2023;40(21-22):2249-69.
167. Yao H, Zhang Y, Shu H, Xie B, Tao Y, Yuan Y, et al. Hyperforin Promotes Post-stroke Neuroangiogenesis via Astrocytic IL-6-Mediated Negative Immune Regulation in the Ischemic Brain. *Front Cell Neurosci*. 2019;13:201.
168. Liu N, Zhuang Y, Zhou Z, Zhao J, Chen Q, Zheng J. NF-kappaB dependent up-regulation of TRPC6 by Abeta in BV-2 microglia cells increases COX-2 expression and contributes to hippocampus neuron damage. *Neurosci Lett*. 2017;651:1-8.
169. da Fonseca AC, Matias D, Garcia C, Amaral R, Geraldo LH, Freitas C, et al. The impact of microglial activation on blood-brain barrier in brain diseases. *Front Cell Neurosci*. 2014;8:362.
170. Liu L, Chen M, Lin K, Xiang X, Yang J, Zheng Y, et al. TRPC6 Attenuates Cortical Astrocytic Apoptosis and Inflammation in Cerebral Ischemic/Reperfusion Injury. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:594283.
171. Li H, Huang J, Du W, Jia C, Yao H, Wang Y. TRPC6 inhibited NMDA receptor activities and protected neurons from ischemic excitotoxicity. *J Neurochem*. 2012;123(6):1010-8.
172. Lin Y, Chen F, Zhang J, Wang T, Wei X, Wu J, et al. Neuroprotective effect of resveratrol on ischemia/reperfusion injury in rats through TRPC6/CREB pathways. *J Mol Neurosci*. 2013;50(3):504-13.
173. Erta M, Quintana A, Hidalgo J. Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. *Int J Biol Sci*. 2012;8(9):1254-66.
174. Dave JR, Bauman RA, Long JB. Hypoxia potentiates traumatic brain injury-induced expression of c-fos in rats. *Neuroreport*. 1997;8(2):395-8.

175. Thiel G, Rössler OG. Hyperforin activates gene transcription involving transient receptor potential C6 channels. *Biochem Pharmacol.* 2017;129:96-107.

