

**Einfluss von 17 β -Estradiol (E2) auf die Apoptose in
einem *in vitro* Modell für Hirntrauma**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Zahnmedizin (Dr. med. dent.)

an der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Paula Meiringer

aus

Bad Neustadt an der Saale

2025

Betreuer / Gutachter der Dissertation: Prof. Dr. Roland Bender

Gutachter der Dissertation: Prof. Dr. Jörg Flitsch

Vorsitz der Prüfungskommission: Prof. Dr. Jörg Flitsch

Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. Petra Arck

Mitglied der Prüfungskommission: PD Dr. Bastian Cheng

Datum der mündlichen Prüfung: 18.08.2025

Für Dr. Jochen Frank MSc. MSc. & Dr. Andreas Pflumm, die das Feuer in mir entfachten.

INHALTSVERZEICHNIS

1. ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG	6
2. EINLEITUNG	7
2.1 SCHÄDEL-HIRN-TRAUMA.....	7
2.2 PATHOLOGISCHE PROZESSE NACH SHT	8
2.3 EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNG DER FOLGEN VON SHT.....	9
2.4 ZELLTOD NACH SHT	10
2.4.1 Nekrose	10
2.4.2 Apoptose.....	11
2.5 GESCHLECHTSUNTERSCHIEDE BEI SHT UND DIE WIRKUNG VON SEXUALHORMONEN	13
2.6 HIPPOCAMPUS	14
2.7 ZIELE DER ARBEIT	16
3. MATERIAL UND METHODEN	17
3.1 CHEMIKALIEN.....	17
3.2 ANTIKÖRPER.....	18
3.3 TECHNISCHE UND LABORMEDIZINISCHE HILFSMITTEL	18
3.4 SOFTWARE	20
3.5 KULTURMEDIEN UND LÖSUNGEN	21
3.6 VERSUCHSTIERE	22
3.7 PRÄPARATION DER GEWEBEKULTUREN	23
3.8 MECHANISCHE SCHÄDIGUNG (= <i>IN VITRO</i> SHT).....	24
3.9 FIXIERUNG UND EINFRIEREN DER GEWEBEKULTUREN	26
3.10 GEFRIERSCHNITTE	26
3.11 <i>TdT-MEDIATED dUTP-BIOTIN NICK END LABELING (TUNEL)</i>	27
3.12 IMMUNHISTOCHEMIE	28
3.13 MIKROSKOPIE UND FOTODOKUMENTATION DER GEWEBEKULTUREN	28
3.14 AUSWERTUNG.....	31
3.15 STATISTISCHE ANALYSE	31
4. ERGEBNISSE	33
4.1 APOPTOSE IN DER CA1-REGION 8 H NACH <i>IN VITRO</i> SHT	33
4.2 APOPTOSE IN DER CA1-REGION 24 H NACH <i>IN VITRO</i> SHT	38
4.3 CHARAKTERISIERUNG VON APOPTOSE BETROFFENER ZELLEN	42
5. DISKUSSION	44
5.1 AUSMAß VON APOPTOSE NACH <i>IN VITRO</i> SHT IN DER CA1-REGION UND ZELLTYPSSPEZIFISCHE DIFFERENZIERUNG APOPTOTISCHER ZELLEN	46
5.2 NEUROPROTEKTIVES POTENZIAL VON E2	48
5.3 GESCHLECHTSSPEZIFISCHE EINFLÜSSE AUF NEURODEGENERATIVE PROZESSE NACH SHT.....	51
5.4 STÄRKEN UND LIMITATIONEN DER METHODE	53
5.5 INTERPRETATION UND ZUKÜNFTIGE PERSPEKTIVEN	55

6. ZUSAMMENFASSUNG	57
6.1 SUMMARY.....	58
7. LITERATURVERZEICHNIS	59
7.1 EIGENE PUBLIKATION.....	71
8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	72
9. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	75
10. TABELLENVERZEICHNIS.....	76
11. ERKLÄRUNG DES EIGENANTEILS	77
12. EIDESSATTLICHE VERSICHERUNG	78
13. DANKSAGUNG	79

1. ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG

Äußere Gewalteinwirkungen auf den Schädel, z.B. bei Verkehrsunfällen oder Kollisionen bei Kontaktsportarten, führen häufig zu Schädel-Hirn-Traumata (SHT; Maas et al., 2022; Späni et al., 2018). Dabei kommt es zu einer mechanischen Verletzung des Gehirns (Primärschaden), die zelluläre und molekulare Prozesse im Nervengewebe auslöst (Sekundärschaden), die das Ausmaß der Schädigung weiter vergrößern (Sulhan et al., 2020; Werner & Engelhard, 2007). SHT-induzierte neurodegenerative Prozesse können zu Funktionsstörungen führen, die die Lebensqualität stark einschränken und im schlimmsten Fall zum Tod führen (Kundu & Singh, 2023). Ein detailliertes Verständnis dieser Prozesse, um sie eventuell pharmakologisch beeinflussen zu können, ist daher erstrebenswert (Balakin et al., 2024; Kövesdi et al., 2020).

Zur Untersuchung von SHT-Folgen werden häufig Tiermodelle verwendet (zur Übersicht: Kundu & Singh, 2023; Zhao et al., 2023). Da diese jedoch aufwändig sind und gezielte experimentelle Beeinflussung bestimmter Abläufe dabei oft nur eingeschränkt möglich ist, hat die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Bender am Institut für Neuroanatomie ein *in vitro* Modell für SHT mit organotypischen Kulturen des Hippocampus entwickelt – einer Gehirnregion, die wesentlich für Lern- und Gedächtnisprozesse verantwortlich ist und häufig bei SHT geschädigt wird (Barha et al., 2011; Duarte-Guterman et al., 2015; Rabelo et al., 2024). Dieses Modell induziert SHT-vergleichbare molekulare Mechanismen durch eine definierte mechanische Kompression. Pilotstudien lieferten Hinweise auf Zelltod und Astrozytenaktivierung nach *in vitro* SHT (Bongarts, 2024; Hemmat, 2022). Da der Zelltod bislang jedoch nur durch eine verstärkte Aufnahme von Propidiumiodid (PI) belegt wurde, das in Zellen mit geschädigter Zellmembran eindringt (Macklis & Madison, 1990; Newell et al., 1995), dadurch aber keine nähere Charakterisierung der Zellen erlaubt, wurde in dieser Studie die TUNEL (Tdt-mediated dUTP-biotin nick end labeling) -Technik eingesetzt und damit das Ausmaß des apoptotischen Zelltods nach *in vitro* SHT sowie die davon betroffenen Zelltypen analysiert. Untersucht wurden zudem die potenziell neuroprotektive Wirkung des Sexualhormons 17 β -Estradiol (E2) und geschlechtsspezifische Unterschiede.

Ziel war es, eine Datengrundlage für weiterführende Studien zur Erforschung neuroprotektiver Substanzen zu schaffen. Teile dieser Untersuchung wurden in einer kürzlich erschienenen Publikation veröffentlicht (Hemmat / Bongarts / Meiringer et al., 2024).

2. EINLEITUNG

2.1 Schädel-Hirn-Trauma

Ein Schädel-Hirn-Trauma (SHT; engl. *traumatic brain injury*, TBI) ist definiert als eine Verletzung des Schädels mit Beteiligung des Gehirns durch äußere Gewalteinwirkung. Diese kann stumpf (diffuses SHT) oder penetrierend (fokales SHT) sein. Zusätzlich wird zwischen geschlossenem und offenem SHT unterschieden (Kövesdi et al., 2020; Uhl & Tonn, 2013). Das offene oder direkte SHT beschreibt eine offene Schädelverletzung mit Schädigung der Hirnhäute, wodurch auch die Liquorräume eröffnet werden. Das geschlossene oder indirekte SHT definiert sich durch subdural, epidural oder intrazerebral lokalisierten, ödematösen Blutungen; verläuft jedoch ohne offene Schädelverletzung (Schwenzer & Ehrenfeld, 2011). Die häufigsten Ursachen eines SHT sind Verkehrsunfälle, Stürze und Gewalteinwirkungen (Andriessen et al., 2010; Sulhan et al., 2020). Das SHT ist abzugrenzen von nicht-traumatischen Hirnverletzungen, die z.B. durch Infektionen oder Schlaganfälle ausgelöst werden (Späni et al., 2018).

Die Inzidenz von SHT in Deutschland liegt bei 332/100.000 Einwohner (Hagebusch et al., 2020). Der klinische Schweregrad des SHT wird anhand der Glasgow Coma Scale (GCS) unterteilt (Jacquens et al., 2022). Die Kriterien sind 1) das Öffnen der Augen, 2) die verbale Reaktion und 3) die motorische Reaktion, die jeweils mit Punkten bewertet werden. Damit können Bewusstseins- und Hirnfunktionsstörungen eingeschätzt und die klinische Prognose erstellt werden (Seno et al., 2024). Obwohl in Deutschland ca. 90% der Fälle als „leicht“ (GCS 13-15) und nur ca. 10% als „mittelschwer“ (GCS 9-12) oder „schwer“ (GCS 8) eingestuft werden (Andriessen et al., 2010; Rickels et al., 2010), ist das SHT eine der häufigsten Todesursachen bei Erwachsenen bis zum Alter von 45 Jahren (Hagebusch et al., 2020). Auch weltweit ist das SHT eine der Hauptursachen für Mortalität und Morbidität (Maas et al., 2022). Die Betroffenen erleiden durch die neurodegenerativen Folgen schwere kognitive und emotionale Beeinträchtigungen, die ihre Lebensqualität stark einschränken (Fleminger, 2008; Kundu & Singh, 2023; Sulhan et al., 2020). Selbst bei den häufigen (90%) „leichten“ SHT sind nur etwa 50% aller Betroffenen nach sechs Monaten wieder vollständig rehabilitiert (Andriessen et al., 2010; Maas et al., 2022).

2.2 Pathologische Prozesse nach SHT

Pathophysiologisch wird bei einem SHT zwischen Primär- und Sekundärschäden unterschieden: Primärschäden entstehen akut im Moment der Gewalteinwirkung (Kövesdi et al., 2020; Sulhan et al., 2020). Dabei kommt es durch die Schädelfraktur oder einen penetrierenden Gegenstand (beim fokalen SHT) bzw. durch die Hirnkontusion oder Scherkräfte (beim diffusen SHT) zu einer akuten Schädigung von Nervenzellen (v.a. einer Durchtrennung von Axonen), wodurch exzitatorische Neurotransmitter (wie Glutamat) exzessiv in das Gewebe freigesetzt werden (Andriessen et al., 2010). Je nach Schweregrad kommt es auch zu einer Ruptur von Blutgefäßen und folglich einer Eröffnung der Blut-Hirn-Schranke (Abdul-Muneer et al., 2017; Werner & Engelhard, 2007). Die empfindliche zerebrale Homöostase wird dadurch gestört.

Sekundärschäden sind dadurch bedingt, dass die gestörte Homöostase im Hirngewebe zelluläre und molekulare Prozesse aktiviert, die im Prinzip darauf abzielen, den entstandenen Schaden zu minimieren (Borlongan et al., 2015; Chiu et al., 2016; Loane et al., 2014; Thelin et al., 2017). Beispielsweise verstärken Astrozyten in Folge einer Verletzung die Aufnahme von Glutamat aus dem Extrazellulärraum und setzen neurotrophe Faktoren und Zytokine frei (Arevalo et al., 2015; Habib et al., 2014; Loane et al., 2014). Letztere aktivieren u. a. Zellen der Immunabwehr, darunter auch die ZNS-spezifischen Mikrogliazellen, die ihrerseits geschädigte Zellen und Zellkomponenten beseitigen (Sulhan et al., 2020). Oft sind die aktivierten Zellen jedoch selbst indirekt von der Primärschädigung betroffen, z. B. wenn in Folge einer Schädigung der Mitochondrien (durch eine Hypoxie im Gewebe oder durch die erhöhte extrazelluläre Glutamatkonzentration in deren Folge eine erhöhte Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern auftritt) ein ATP-Mangel entsteht (Andriessen et al., 2010). In diesem Fall können die ausgelösten (und tendenziell protektiven) Mechanismen ineffizient werden oder durch eine überschießende Reaktion auch umliegendes, gesundes Gewebe in Mitleidenschaft ziehen (Andriessen et al., 2010; Borlongan et al., 2015; Liddelow et al., 2017; Thelin et al., 2017). Dies ist insbesondere dann der Fall, wenn nach Eröffnung der Blut-Hirn-Schranke auch Immunabwehrzellen aus der Peripherie in das Hirngewebe eingedrungen sind, die auf die von Astrozyten und Mikroglia sezernierten Zytokine reagieren (Sulhan et al., 2020; Thelin et al., 2017). Die Folgen dieser Entwicklungen können bereits nach Stunden oder erst nach Tagen bis Monaten eintreten (Jacquens et al., 2022; Kundu & Singh, 2023; Werner & Engelhard, 2007).

SHT stellen daher sowohl aus medizinischer als auch aus sozioökonomischer Sicht ein ernstzunehmendes Gesundheitsproblem dar (Chiu et al., 2016; Maas et al., 2022). Bisherige Therapieansätze reichen von chirurgischen Eingriffen bis hin zu adjuvanten Behandlungen wie regelmäßigem kognitivem Training (Galgano et al., 2017). Trotz intensiver präklinischer und klinischer Forschung konnte sich jedoch bislang keine klinische Therapie erfolgreich etablieren (McConeghy et al., 2012; Plesnila, 2016). Da die primäre Schädigung in der Regel nicht vorhersehbar ist, konzentrieren sich die Bemühungen um therapeutische Alternativen vor allem auf eine Milderung der sekundären Schäden, wofür die dabei ablaufenden Prozesse noch weiter erforscht werden müssen, um ausreichend verstanden zu werden (Day et al., 2013; Kabadi & Faden, 2014).

2.3 Experimentelle Untersuchung der Folgen von SHT

Die Untersuchung und pharmakologische Beeinflussung der SHT-Pathologie erfordern ein Verständnis der neurodegenerativen Kaskaden. Diese benötigen einen neuronalen Gewebeverband, weshalb für diesbezügliche Experimente keine neuronalen Einzelkulturen verwendet werden können und die Studien in der Regel *in vivo* an Tiermodellen durchgeführt wurden (zur Übersicht: Kundu & Singh, 2023; Zhao et al., 2023). Es gibt jedoch kein Modell, das alle Aspekte eines SHT adäquat abbilden könnte (Kövesdi et al., 2020; Sulhan et al., 2020). Darüber hinaus sind diese Experimente belastend für die Versuchstiere, sowie zeit- und kostenintensiv (Zhao et al., 2023). Es ist daher wünschenswert, Voruntersuchungen in einem geeigneten *in vitro* Modell durchzuführen, deren Resultate dann spezifisch *in vivo* zu überprüfen und gezielt weiterzuentwickeln. Aus diesem Grund wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen *in vitro* Modelle zur Untersuchung von SHT-Folgen entwickelt (zur Übersicht: Kumaria, 2017; B. Morrison et al., 2011). Diese Modelle vereinfachen zwar die Komplexität der SHT-Pathologie – können also Tierversuche nicht vollständig ersetzen (*replace*) – helfen aber, die Fragestellungen für nachfolgende Tierversuche zu präzisieren (*refine*). Somit wird die Anzahl der benötigten Versuchstiere reduziert (*reduce*). Zudem sind sie kostengünstiger und für die Testung mutmaßlich neuroprotektiver Substanzen leicht zugänglich. Da die Untersuchungen einen neuronalen Zellverband erfordern, sind organotypische Gewebekulturen dafür die Methode der Wahl. Diese Kulturen – meist vom Hippocampus – wurden auch bereits eingesetzt, um verschiedene Varianten einer traumatischen Schädigung zu untersuchen: z. B. Druckwellen-induziertes SHT (*blast-induced TBI*), wie es nach Explosionen auftritt (Campos-Pires et al., 2018; Miller et al., 2015, 2017), durch Scherkräfte

induziertes SHT (*stretch-induced TBI*), wie es für Autounfälle typisch ist (Cater et al., 2007; Di Pietro et al., 2013) oder durch stumpfe Gewalteinwirkung induziertes SHT (*blunt-induced TBI*; Coburn et al., 2008; Harris et al., 2013). Auch die Folgen eines fokalen SHT wurden bereits mit Hilfe organotypischer Gewebekulturen untersucht (Adamchik et al., 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine modifizierte Variante der „*rolling cylinder*-Technik“ nach Adamchik et al. (2000) verwendet. Dabei wird durch einen sterilen Metallzylinder, der über die organotypischen Kulturen rollt, durch Kompression eine mechanische Schädigung des Gewebes (Primärschaden) erzeugt (Details siehe 3.8) und danach die Folgen (mögliche Sekundärschäden) untersucht. Die Vorteile dieses Modells, das ein diffuses SHT durch stumpfe Gewalteinwirkung widerspiegelt, liegen in seiner einfachen Anwendbarkeit und dadurch guten Reproduzierbarkeit. Unter Verwendung von Propidiumiodid durchgeführte Pilotstudien erbrachten Hinweise für eine signifikante Zellschädigung, die bereits nach 12 h erkennbar war und ihre Spitze nach ca. 24 h erreichte (Hemmat, 2022). Weiterhin erbrachten am Modell durchgeführte Studien Hinweise auf eine Aktivierung von Mikroglia (Hemmat, 2022) und Astrozyten (Bongarts, 2024). In der vorliegenden Arbeit werden die Befunde hinsichtlich eines durch die mechanische Schädigung induzierten Zelltod durch Untersuchungen speziell auf apoptotischen („induzierten“) Zelltod erweitert, da dieser als Sekundärschaden des Traumas angesehen werden kann (siehe 2.4.2).

2.4 Zelltod nach SHT

Nach einem SHT kommt es im Hirngewebe zum Absterben von Zellen, wobei man hier nekrotischen und apoptotischen Zelltod unterscheidet. Das Ausmaß des Zelltods ist dabei von der Schwere und dem Umfang der Schädigung (Sulhan et al., 2020), sowie von der verfügbaren Energiemenge im betroffenen Gewebe abhängig (Raghupathi, 2004; Tsujimoto, 1997). Eine therapeutische Beeinflussung der Folgen eines SHT sollte darauf abzielen, diesen Zelltod so weit wie möglich zu reduzieren, da abgestorbene Neurone nur in sehr geringem Maße erneuert werden können (Duarte-Guterman et al., 2015; Nakatomi et al., 2002).

2.4.1 Nekrose

Die akute mechanische Verletzung des Nervengewebes führt unmittelbar meist zu nekrotischem Zelltod (Kabadi & Faden, 2014). Dabei wird aufgrund der Schädigung der

Zellmembran der Zellinhalt in das umgebende Gewebe freigesetzt, was dort Folgereaktionen auslöst (Tonnus et al., 2019). In der pathologischen Terminologie beschreibt der Begriff „Nekrose“ (Zellauflösung, akzidenteller Zelltod) generell den Untergang von Gewebe und man unterscheidet je nach Morphologie die Koagulationsnekrose (häufigste Form, Zellschwellung mit Eosinophilie), die Kolliquationsnekrose (Verflüssigung von abgestorbenem Gewebe) und die fibrinoide und die hämorrhagische Nekrose (Tonnus et al., 2019). Mikroskopisch lässt sich bei nekrotischem Zelltod beobachten, dass die Zellorganellen zerfallen, Proteine denaturieren und sich als schollenartige Strukturen im Zytoplasma ablagern. Daraufhin folgt die Karyorrhexis (Fragmentierung des Chromatins im Zellkern) sowie die Karyolyse (Abbau des Zellkerns durch DNA-Abbau durch die Desoxyribonuklease (Raghupathi, 2004). Die Nekrose tritt energieunabhängig ein (Tsujimoto, 1997) und ist oft die Folge eines intrinsischen Energiemangels der Zelle, wie er z. B. nach mitochondrialer Zerstörung, bedingt durch einen erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel, zu beobachten ist (Andriessen et al., 2010; Greve & Zink, 2009; Harms et al., 2001; Zipfel et al., 2000).

2.4.2 Apoptose

Nach dem initialen, überwiegend nekrotischen Zelltod folgt mit zeitlicher Verzögerung der apoptotische Zelltod (Raghupathi, 2004; Zhang et al., 2004). Apoptose ist ein physiologischer Prozess, der in mehrzelligen Organismen dazu dient, überflüssige, überalterte oder potenziell beschädigte Zellen zu eliminieren. Im Rahmen der biologischen Entwicklung sorgt das Gleichgewicht zwischen Zellwachstum und apoptotischem Zelltod beispielsweise dafür, dass die Zellzahl und damit die Organgrößen im vorgesehenen Rahmen bleiben. Apoptotischer Zelltod wirkt u. a. auch der Entstehung von Tumoren und Autoimmunerkrankungen entgegen (Budihardjo et al., 1999; Hemmat, 2022; Hoppe & Klingler, 2021; Zhang et al., 2004; Zipfel et al., 2000). Die Prozesse der Apoptose werden durch komplexe Signalkaskaden reguliert, die sicherstellen, dass sie nicht inzidentell auftreten. Die Apoptose wird daher auch als „induzierter“ oder „programmierter“ Zelltod bezeichnet (Zhang et al., 2004).

Grundsätzlich wird zwischen einem intrinsischen und einem extrinsischen Signalweg unterschieden. (Liou et al., 2003).

Die extrinsische Apoptose (Typ I) wird durch äußere Signale initiiert. Dabei binden Liganden an Transmembran-Todesrezeptoren (*death receptors*) der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Rezeptorfamilie (z. B. Fas-R, TRAIL-R1, TNF-R1) auf der Zellmembran betroffener Zellen

(Stoica & Faden, 2010). Dies führt zur Rekrutierung von Adaptermolekülen (z. B. *Fas-Associating Death Domain-Containing Protein*, FADD), welches wiederum die Pro-Caspase 8 rekrutiert. Der dadurch entstehende „*Death Inducing Signaling Complex*“ (DISC) aktiviert die Effektorcaspasen 3, 6 und 7, die daraufhin Zielproteine zerschneiden (Budihardjo et al., 1999; Zhang et al., 2004).

Die intrinsische Apoptose (Typ II) wird durch zellinterne Stressfaktoren (z.B. DNA-Schäden, osmotischer Stress) initiiert und verläuft über einen mitochondrialen Signalweg (Stoica & Faden, 2010). Es kommt zu einem Ungleichgewicht zwischen pro- und anti-apoptotischen Proteinen, die die Integrität und das Membranpotenzial der Mitochondrien regulieren (Chong et al., 2005; Hoppe & Klingler, 2021). Aktivierung des Tumorsuppressors p53 führt zur Expression des pro-apoptotischen Proteins BAD (*Bcl-2 associated agonist of cell death*), welches ein weiteres pro-apoptotisches Protein Bax (*Bcl-2 associated X protein*) aktiviert. Pro-apoptotische Proteine bilden Oligomere in der äußeren Mitochondrienmembran, was zu deren Permeabilisierung (*Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization*, MOMP) führt (Morrison et al., 1998; Stoica & Faden, 2010). Dadurch wird das Membranpotenzial gestört und es kommt zur Freisetzung von Cytochrom c aus der inneren Membran der Mitochondrien. Cytochrom c bildet im Zytosol mit Apaf-1 (*Apoptotic protease-activating factor 1*) einen Proteinkomplex, das sogenannte Apoptosom. Die dabei entstehende Konformationsänderung führt zu einer Rekrutierung und Aktivierung von Pro-Caspase 9, welche wiederum Effektorcaspasen zum Schneiden von Zielproteinen aktiviert (Zhang et al., 2004).

Beide Signalwege führen zur Schrumpfung und Fragmentierung der Zelle in kleine, membranumhüllte Apoptosekörperchen, auf deren Oberfläche charakteristisch Phosphatidylserin exprimiert wird. Dadurch werden sie als Target für phagozytierende Makrophagen markiert (Chong et al., 2005; Zhang et al., 2004). Die Zellmembranen bleiben jedoch intakt, was die Entstehung einer Entzündungsreaktion verhindert (Andriessen et al., 2010). Apoptotische Prozesse erfordern außerdem Energie in Form von ATP, was mindestens in der Induktionsphase noch funktionsfähige Mitochondrien oder eine Bereitstellung von ATP durch Glykolyse voraussetzt (Tsujiimoto, 1997).

Apoptotischer Zelltod tritt nach SHT im Rahmen der sekundären Schädigung auf, d. h. er wird durch Signale aus der Umgebung der Primärschädigung induziert (Raghupathi, 2004; Zhang et al., 2004). Die Wirkung dieser Signale kann weitreichend sein. Denn durch SHT induzierter

apoptischer Zelltod kann sowohl ipsi- als auch kontralateral zum Kontusionsherd in Erscheinung treten. Er trägt dadurch maßgeblich zu den langfristigen neurologischen Beeinträchtigungen nach einem SHT bei (Liou et al., 2003).

2.5 Geschlechtsunterschiede bei SHT und die Wirkung von Sexualhormonen

Von einem SHT sind Frauen und Männer gleichermaßen betroffen, wobei die proportionalen Anteile altersabhängig schwanken (in der Kindheit und Pubertät Männer > Frauen; im Erwachsenenalter Frauen > Männer; Späni et al., 2018). Jedoch ergaben klinische Untersuchungen Hinweise darauf, dass Frauen – mindestens im Erwachsenenalter – eine bessere klinische Prognose haben als Männer (Berry et al., 2009; Ley et al., 2013). Die möglichen Ursachen dafür werden kontrovers diskutiert (Späni et al., 2018). Eine Erklärung könnte jedoch in der unterschiedlichen Exposition von Männern und Frauen zu Sexualhormonen liegen. Insbesondere dem vorwiegend weiblichen Sexualhormon 17 β -Estradiol (E2) wird dabei eine neuroprotektive Wirkung nachgesagt (Arevalo et al., 2015; Brotfain et al., 2016; Kövesdi et al., 2020). Eine tierexperimentelle Studie hat sich kürzlich dieser Frage angenommen und ein experimentelles SHT (hervorgerufen durch *Controlled Cortical Impact*, CCI) mit der Hemmung von Enzymen kombiniert, die entweder E2 (Aromatase) oder das dominant männliche Dihydrotestosteron (DHT; 5 α -Dehydroxylase) inhibierten (Gölz et al., 2019). Tatsächlich fanden sich in diesen Untersuchungen geschlechtsspezifische Wirkungen der Enzymhemmung. So war nach Aromatase-Hemmung die Expression des Astrozyten-spezifischen *Glial fibrillary acidic protein* (GFAP) speziell bei den weiblichen Tieren im geschädigten Gewebe erhöht, während bei den männlichen Tieren eher die 5 α -Dehydroxylase-Hemmung signifikante Wirkung (bei der Produktion Calpain-induzierter Protein-Fragmente) zeigte. Ein interessanter Befund war auch, dass in weiblichen Tieren das Ausmaß des Gewebeschaden nach CCI deutlich geringer war als in männlichen Tieren, was ebenfalls auf einen protektiven Einfluss weiblicher Hormone hinweist und in ähnliche Richtung weisende Befunde anderer Arbeitsgruppen bestätigt (Emerson et al., 1993; Roof & Hall, 2000; Späni et al., 2018; Villapol et al., 2017). Aus diesem Grund wurde E2 als potenzieller neuroprotektiver Faktor in die vorliegende Arbeit einbezogen und es wurden die Auswirkungen einer E2-Gabe auf die *in vitro* induzierte Apoptose untersucht.

2.6 Hippocampus

Für die vorliegende Untersuchung wurden organotypische Kulturen aus dem Hippocampus von Mäusen verwendet. Der Hippocampus ist eine paarig angelegte Hirnstruktur am medialen, kaudalen Rand des Temporallappens. Er ist, da er relativ nahe an der Hirnoberfläche liegt (unterhalb des Neocortex), häufig von den durch SHT induzierten Gewebeschäden betroffen. Der Hippocampus ist Bestandteil des limbischen Systems und gehört entwicklungs geschichtlich zum Archicortex (Chauhan et al., 2021; Destrieux et al., 2013). Morphologisch setzt er sich aus dem Gyrus dentatus (distaler Anteil), dem Cornu ammonis (= Hippocampus proprius) mit seinen drei Subfeldern CA1-CA3, sowie dem Subiculum, das den Übergang zum Neocortex (Cortex entorhinalis) bildet, zusammen. Diese Strukturen werden gelegentlich zur „Hippocampusformation“ zusammengefasst (Andersen, 2006). Funktionell gilt der Hippocampus als assoziatives Zentrum für deklarative Lern- und Gedächtnisprozesse. Hier erfolgt auch die Informationsübertragung vom Kurzzeit- ins Langzeitgedächtnis (Duarte-Guterman et al., 2015; Murakami et al., 2018).

Histologisch besteht der Hippocampus aus drei Schichten (Abb. 1; vgl. Neocortex mit sechs Schichten):

Im Gyrus dentatus sind dies von außen (pial, d. h. an der hippocampalen Fissur gelegen) nach innen: das *Stratum moleculare* (es erhält Afferenzen aus der Area entorhinalis und die Dendriten der Körnerzellen), das *Stratum granulosum* (die Körnerzellschicht: sie enthält die Perikaryen der Körnerzellen) und das *Stratum plexi- / multiforme* (die polymorphe Schicht, auch als CA4-Region bezeichnet; sie enthält u. a. die Axone der Körnerzellen, sog. Moosfasern) (Andersen, 2006; Szabo & Hennerici, 2014).

Im Cornu ammonis (CA1-CA3) wird das pial gelegene *Stratum moleculare* noch in zwei Unterschichten unterteilt: das *Stratum lacunosum-moleculare* (es erhält ebenfalls Afferenzen aus der Area entorhinalis und die distalen apikalen Dendriten der Pyramidenzellen) und das *Stratum lucidum* in CA3 (hier terminieren die Moosfasern aus dem Gyrus dentatus) bzw. das *Stratum radiatum* in CA1 (hier terminieren speziell die Schaffer-Kollaterale aus der CA3-Region und es enthält die proximalen apikalen Dendriten der Pyramidenzellen). Nach innen hin folgt das *Stratum pyramidale* (die Pyramidenzellschicht: sie enthält die Perikaryen der Pyramidenzellen) und das an die lateralen Ventrikel grenzende *Stratum oriens* (es enthält die basalen Dendriten der Pyramidenzellen) (Szabo & Hennerici, 2014).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Fokus auf die CA1-Region gelegt, da sich diese auch in der Gewebekultur morphologisch gut definieren lässt (siehe Abb. 1). Innerhalb der CA1-Region wurden getrennte Auswertungen im *Stratum pyramidale* (SP) und im *Stratum radiatum* + *Stratum lacunosum-moleculare* (SR/SLM; die beiden *Strata* wurden für die Auswertung zusammengefasst) durchgeführt.

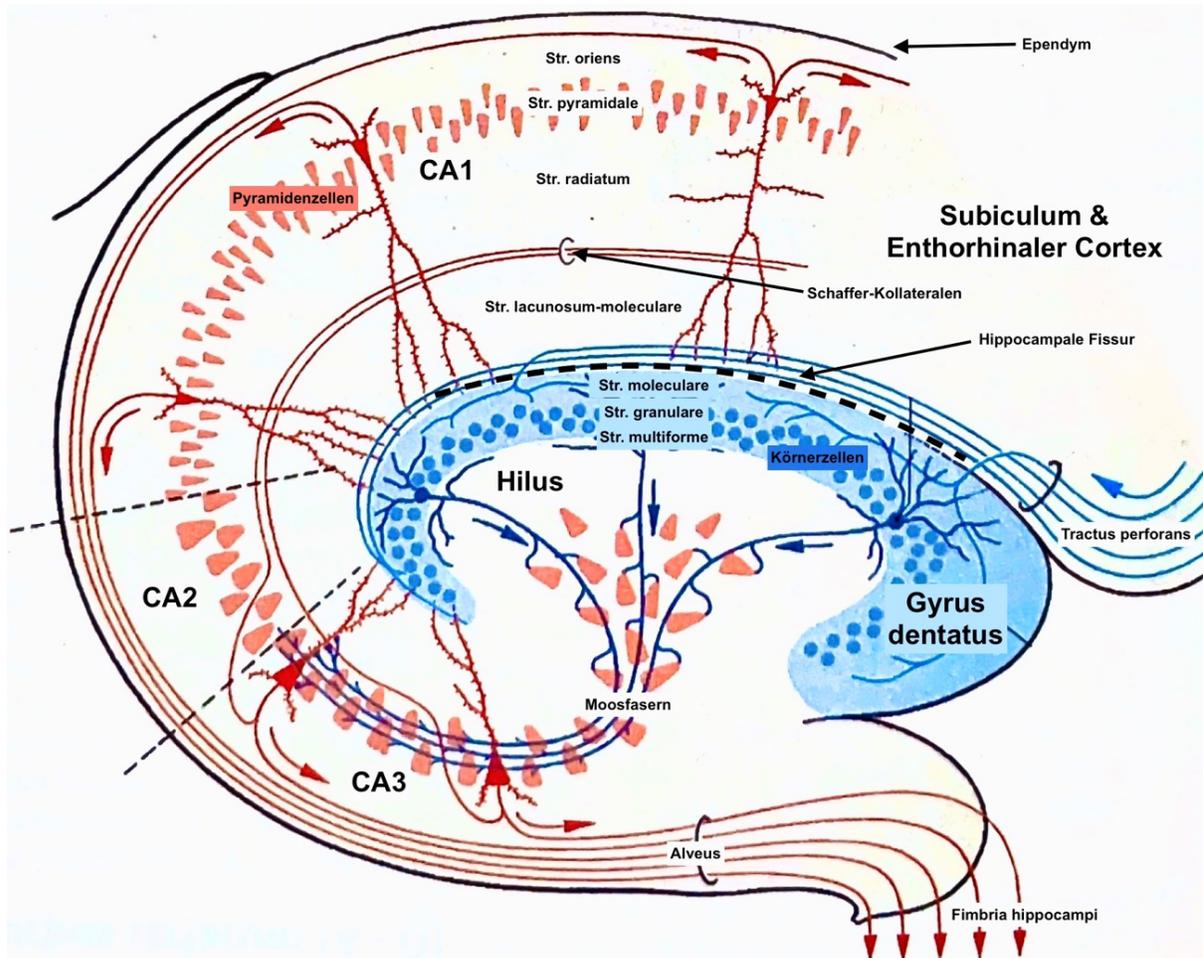


Abbildung 1: Schematische Darstellung der histologischen Schichten im Hippocampus.

(verändert nach: Frotscher & Kahle, 2002)

Gyrus dentatus (in hellblau dargestellt), Cornu ammonis (CA1-CA3) und Subiculum bilden die Hippocampusformation. Hippocampale Fissur (durch gestrichelte Linie gekennzeichnet) trennt das Cornu ammonis vom Gyrus dentatus ab. Das Subiculum liegt zwischen der CA1-Region und dem Cortex entorhinalis und bildet dort den Übergang vom archicorticalen Hippocampus zum Neocortex.

Abkürzungen: CA = Cornu ammonis, Str. = Stratum.

2.7 Ziele der Arbeit

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, den Zeitverlauf und das Ausmaß des apoptotischen Zelltodes in der CA1-Region organotypischer hippocampaler Gewebekulturen nach experimenteller SHT *in vitro* zu untersuchen, sowie die betroffenen Zelltypen zu charakterisieren. Darüber hinaus wurde untersucht, welchen Einfluss 17 β -Estradiol (E2) auf das Ausmaß der Apoptose im gewählten experimentellen Modell hat.

Für die Untersuchungen wurden nach Geschlecht getrennte Gewebekulturen von Mäusen verwendet, um potenzielle Unterschiede zwischen den Geschlechtern ausfindig machen zu können. Berücksichtigt wurde für die Untersuchung ein Zeitraum von 8 bis 24 Stunden nach induziertem SHT. Zur Identifizierung und Quantifizierung apoptotischer Zellen wurde die TUNEL-Methode eingesetzt. Die Differenzierung der Zelltypen erfolgte durch immunhistochemische Färbungen mit dem neuronenspezifischen Markerprotein NeuN und dem Astrozytenmarker GFAP.

Speziell wurden folgende Fragestellungen analysiert:

- 1) Welches quantitative Ausmaß an apoptotischem Zelltod tritt nach *in vitro*-induziertem SHT in der CA1-Region (differenziert nach den *Strata pyramidale* und *radiatum* + *lacunosum-moleculare*) des Hippocampus auf?
- 2) Welche Zelltypen sind betroffen?
- 3) Welchen Einfluss hat E2 auf das Ausmaß der Apoptose?
- 4) Gibt es geschlechtsspezifische Unterschiede?

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller, Produktnummer
17 β -Estradiol, wasserlöslich	SIGMA, E4389
Aqua destillata (Aqua dest.)	B. BRAUN, 75/12604052/1212
B-27	GIBCO, 17504-044
Chlorwasserstoffsäure, HCl (1 N, 2 N)	MERCK, 1.09063.1000
Citratpuffer	SIGMA-ALDRICH, 33114
Einbettmedium (für Fluoreszenz)	DAKO, S3023
Einfriermedium (Tissue Tek)	SAKURA, 4583
Ethanol (96%)	TH GEYER, 2212.5000
FBS Premium (<i>Fetal Bovine Serum</i>)	PAN BIOTECH, P30-2302
HBSS (<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>)	GIBCO, 14180-046
HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure)	SIGMA, H3537
<i>In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein (TUNEL-Reaction Mix): Enzyme Solution Label Solution</i>	ROCHE, 11684795910
L-Glucose	MILLIPORE, 1.08337.0250
L-Glutamin Solution	SIGMA, G7513-100ML
Natronlauge, NaOH (1 N, 2 N)	MERCK, 1.09136.1000
Neurobasal-A Medium (1X)	GIBCO, 12349-015
Paraformaldehyd (PFA)	ROTH, 03353
<i>Phosphate-Buffered Saline (PBS, Tabletten)</i>	GIBCO, 18912-014
Penicillin Streptomycin	GIBCO, 15140-122

Chemikalien	Hersteller, Produktnummer
Saccharose	ROTH, 4661.1
Sterilium	BODE, 975512
Stickstoff (N ₂)	UKE APOTHEKE, 22-100291
Ziegenserum (<i>Normal Goat Serum</i> , NGS)	ABCAM, AB7481-10ML

Tabelle 1: angewendete Chemikalien mit Herstellerangaben

3.2 Antikörper

Antikörper (anti-)	Hersteller (Bestellnummer)	Verdünnung (Blockierlösung)	Herkunft (Typ)
Primärantikörper			
GFAP	DAKO (Z0334)	1:800	Kaninchen, polyklonal
NeuN clone A60	Merck (MAB377)	1:400	Maus, monoklonal
Sekundärantikörper			
Kaninchen-IgG+ Alexa Fluor 555	Molecular Probes (A-21428)	1:500	Ziege
Maus-IgG+Alexa Fluor 647	Invitrogen (A-21237)	1:500	Ziege

Tabelle 2: angewendete Antikörper mit Herstellerangaben

3.3 Technische und Labormedizinische Hilfsmittel

Hilfsmittel	Hersteller
Accu-Jet Saugpipette	BRAND
Analyse-Waage	SARTORIUS AG, GÖTTINGEN
Aufbewahrungsboxen	HS
Becherglas	SCHOTT, DURAN
Deckgläser 24 x 60 mm	AUTOMAT STAR
Edelstahlzylinder	UKE LABOR NEUROANATOMIE

Hilfsmittel	Hersteller
Einmalhandschuhe, Nitril	ANSELL
EpT.I.P.S. Standard (Pipettenspitzen)	EPPENDORF
Erlenmeyerkolben	SCHOTT, MAINZ
Feuchte Kammer	UKE LABOR NEUROANATOMIE
Folienstift	FABER-CASTELL, STEIN
Gefrierschrank, -25 °C	BOSCH, LIEBHERR
Gefrierschrank, -80 °C	FORMA SCIENTIFIC; MARIETTA OHIO
Gewebeschneider (<i>Tissue Chopper</i>)	MCILWAIN
Heidemann Spatel	HENRY SCHEIN
Inkubator	DRAEGER
Kosmetiktücher	TAPIRA, GVS
Kryostat, HM560	THERMO FISHER SCIENTIFIC™ INC.
Kulturschalen (<i>Six-Well-Platten</i>)	FALCON
Kühlschrank (+4 °C)	BOSCH
Küvetten	RESISTANCE
Magnetrührer	HEIDOLPH
Magnetrührstäbchen	VWR INTERNATIONAL GMBH
Mikroliter Pipetten (10, 20, 200, 1000 µl)	EPPENDORF
Mikroskop, Biorevo BZ 9000	KEYENCE
Mikrowelle	SHARP, R-2V26
Millicell-Kultur-Membranen	MILLIPORE
Milliliter Pipetten (2, 5, 10, 25 ml)	SARSTEDT
Minikühlbox (-20 °C)	VWR
Objektiv (10x, 20x)	NIKON
Objekträger (Super Frost Plus)	GLASWARENFABRIK KARL HECHT KG
Perfusionspumpe, Masterflex L/S	COLE-PARMER
pH Meter, PH M93 Reference pH Meter	RADIOMETER COPENHAGEN
Pinsel	DA VINCI, FARBER CASTELL
Pinzette	FST
Pipettenspitzen (5 ml)	TIP ONE
Plastikbox (250 ml)	VITRIS 908

Hilfsmittel	Hersteller
Reaktionsgefäße (0,5, 1,5, 2, 3, 50 ml)	GREINER
Reagenzglasschüttler, Vortex Genie 2	SCIENTIFIC INDUSTRIES
Schere, gebogen	FST
Schere, gerade	FST
Schüttler	EDMUND BÜHLER
Sterile Werkbank	HAREUS INSTRUMENTS
Stoppuhr	JUNGHANS
Wärmeschrank	MEMMERT
Zentrifuge VFL-2400	BIOSAN

Tabelle 3: Technische und Labormedizinische Hilfsmittel mit Herstellerangaben

3.4 Software

Software	Hersteller
BZ-2 (Analyser, Viewer)	KEYENCE
Fiji (ImageJ)	WAYNE RASBAND (NIH)
GraphPad Prism 8	GRAPHPAD SOFTWARE, INC.
MacOS Ventura	APPLE
Office 365 (Excel, Word)	MICROSOFT
Photoshop	ADOBE
Windows 11	MICROSOFT
Zotero	CORPORATION FOR DIGITAL SCHOLARSHIP

Tabelle 4: Softwareprogramme zur Datenanalyse und -auswertung

3.5 Kulturmedien und Lösungen

PBS (Phosphate-Buffered Saline), 1000 ml:

8 g NaCl
0,2 g KCl
1,44 g Na₂HPO₄
0,2 g KH₂PO₄⁻

Bei Raumtemperatur (RT) wurden zwei PBS-Tabletten mit 1000 ml Aqua dest. in ein Becherglas gegeben und durch Zugabe von 1 M HCl und 1 M NaOH auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Dabei wurde ein Magnetrührer verwendet.

Paraformaldehyd (PFA) 4%, 1000 ml:

40 g PFA
760 ml PBS

Die Lösung wurde unter Nutzung eines Magnetrührers mit 1 M HCl und 1 M NaOH auf einen pH-Wert von 7,4 angepasst, danach eingefroren und im Gefrierschrank bei -18 °C gelagert.

Präparationsmedium, 500 ml:

50 ml 10x HBSS
5,04 ml HEPES 1 M

Das Medium wurde in einen Erlenmeyerkolben gegeben und mit Aqua dest. auf 500 ml aufgefüllt. Unter Verwendung eines Magnetrührers wurde die Lösung mit 1 M HCl oder 1 M NaOH auf einen pH-Wert von 7,3 angeglichen, bevor sie abschließend steril filtriert wurde.

Inkubationsmedium, 50 ml:

45 ml Neurobasal A
5 ml 10% FBS
500 µl B-27
125 µl L-Glutamin
500 µl Penicillin
500 µl 30% Glucose

Saccharose 25%, 250 ml:

250 ml PBS

62,5 g D+Saccharose

Die Saccharose wurde in einem Messzylinder aufgelöst und anschließend in einem Becherglas mit PBS aufgefüllt.

17 β -Estradiol, E2:

2,72 mg E2

2,72 mg E2 wurden in 100 ml Aqua dest. gelöst ($M = 9,99 \times 10^{-5}$ mol/L) und anschließend mit dem Inkubationsmedium auf 1:1000 verdünnt, um eine Endkonzentration von 10^{-7} M zu erhalten.

Zitronensäure-Gebrauchslösung 0,1 M, 1000 ml:

21 g Citratpuffer (Molekulargewicht 210,14 g/mol)

21 g Citratpuffer wurden in einen Erlenmeyerkolben mit 800 ml Aqua dest. gegeben und durch Zugabe von 1 M NaOH oder 1 M HCl auf einen pH-Wert von 6,0 eingestellt. Dabei wurde ein Magnetrührstäbchen und ein pH-Meter verwendet. Danach wurde die Lösung mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt.

TUNEL-*Reaction Mix*, 50 μ l:

5 μ l *Enzyme Solution*: Terminale Desoxyribonukleotidyltransferase (10x konzentriert)

45 μ l *Label Solution*: Fluoreszenz-dUTPs in Reaktionspuffer

Zur Herstellung des TUNEL-*Reaction Mix* wurden 5 μ l der *Enzyme Solution* in 45 μ l *Label Solution* gegeben. Das Reaktionsgefäß stand dabei in einer Kühlbox, um einen frühzeitigen Start der Reaktion zu verhindern.

3.6 Versuchstiere

Für das Experiment kamen weibliche (n=37) und männliche Mäuse (n=38) des Zuchtstamms C57BL/ 6J_2019 im Alter von 7 (P7) oder 8 (P8) Tagen aus der Forschungstierhaltung des

UKEs zum Einsatz. Die Haltung der Mäuse sowie die Durchführung der Experimente erfolgte nach den gesetzlichen Richtlinien für Tierhaltung und Tierversuche der Bundesrepublik Deutschland.

3.7 Präparation der Gewebekulturen

Für die Präparation der organotypischen Gewebekulturen wurde eine etablierte und bewährte Methode angewendet (Meseke et al., 2018), die unter semisterilen Bedingungen durchgeführt wurde. Dieser Präparationsprozess erfolgte durch meinen Doktorvater, Prof. Dr. Roland Bender. Zunächst wurde das Geschlecht des Tieres bestimmt, bevor es mit einer autoklavierten Schere dekapitiert wurde. Anschließend erfolgte die Eröffnung der Kopfhaut in dorso-sagittaler Richtung, wobei diese nach lateral abgeklappt wurde. Danach wurde die Schädelkalotte entlang der Kranznaht (*Sutura coronalis*) getrennt und ebenfalls nach lateral aufgeklappt. Unter direkter Sicht konnte das gesamte Gehirn entnommen und in eine eisgekühlte Petrischale überführt werden, die mit Präparationsmedium gefüllt war.

Im weiteren Verlauf wurden das Kleinhirn (*Cerebellum*) und der Stirnlappen (*Lobus frontalis*) entfernt. Die rechte und linke Gehirnhälfte wurden voneinander separiert, und der Hirnstamm (*Truncus cerebri*) sowie das Zwischenhirn (*Diencephalon*) wurden von der Großhirnrinde (*Cortex cerebri*) abgetrennt. Unter dem Mikroskop wurde der Hippocampus zusammen mit dem entorhinalen Cortex (EC) aus der Großhirnrinde (*Cortex cerebri*) herauspräpariert. Mithilfe eines Gewebeschniders (McIlwain) wurden diese Bereiche in 0,4 mm dicke Schnitte senkrecht zur Längsachse des Hippocampus geschnitten.

Aus den, aus einer Maus gewonnenen, Hippocampusschnitten wurden unter dem Mikroskop Triplets benachbarter Schnitte isoliert und jeweils ein Schnitt des Triplets einer der unten aufgeführten drei experimentellen Gruppen zugeordnet (siehe Abb. 2, zur Veranschaulichung). Durch die gleichmäßige Aufteilung benachbart liegender – d. h. anatomisch sehr ähnlicher – Schnitte auf die experimentellen Gruppen, wurde die experimentelle Variabilität minimiert. Die Schnitte (= Kulturen) wurden mittig auf Kulturmembranen (Millicell CM, 0,4 µm Porengröße, 30 mm Durchmesser) übertragen. Danach wurde das Präparationsmedium abgesaugt und die Kulturmembranen wurden in Kulturschalen (*Six-Well*s) mit jeweils 1 ml Inkubationsmedium überführt.

Die Gewebekulturen wurden im Inkubator bei 37 °C und 95 % CO₂ für 14 Tage inkubiert, um vor einer experimentellen Beeinflussung eine ausreichende Regeneration des, durch den Präparationsprozess geschädigten, Gewebes zu ermöglichen. Das Inkubationsmedium wurde regelmäßig gewechselt, zunächst 24 Stunden nach der Präparation und anschließend alle 48 Stunden.

Experimentelle Gruppen:

- SHT: Schädel-Hirn-Trauma
- Ktl: Kontrolle
- SHT+E2: Schädel-Hirn-Trauma + 17β-Estradiol

3.8 Mechanische Schädigung (= *in vitro* SHT)

Für die Durchführung der Experimente wurde mithilfe der „*rolling cylinder*-Technik“ (Adamchik et al., 2000) an den Gewebekulturen der SHT- und SHT+E2-Gruppen (jedoch nicht in der Kontroll-Gruppe) durch Gewebekompression eine mechanische Schädigung des Nervengewebes induziert (= „*in vitro* SHT“; siehe Abb. 2, zur Verdeutlichung). Dazu wurde die Kulturschale mit den Gewebekulturen am Rand eines Wippschüttlers positioniert, der in seiner stärksten Auslenkung (Neigungswinkel von 12°) fixiert war. An den tiefsten Punkten der Kulturmembranen der SHT- und SHT+E2-Gruppen wurden autoklavierte Stahlzylinder mit festgelegten Maßen (Gewicht 3,6 g, Länge 12 mm, Durchmesser 5 mm) so platziert, dass bei einer Kippbewegung die mittig auf der Membran kultivierten Schnitte überrollt wurden. Nach Betätigung des Einschaltknopfes kippte die Platte des Wippschüttlers in das Extrem der Gegenseite (ebenfalls 12°) und anschließend wieder zurück in die Ausgangsposition. Diese Bewegung führte dazu, dass die Stahlzylinder mit einer Geschwindigkeit von 140 mm/s zweimal über die Gewebekulturen der SHT- und SHT+E2-Gruppen rollten. Die Kontrollgruppe kippte währenddessen lediglich mit, ohne durch den Zylinder überrollt zu werden.

Nach Abschluss der Prozedur wurden die Gewebekulturen in neue *Six-Well*-Kulturschalen mit frischem Inkubationsmedium überführt. In der SHT+E2-Gruppe wurde dem Inkubationsmedium 20 nM E2 hinzugefügt. Die Kulturen wurden danach für 8 oder 24 Stunden im Inkubator gelagert.

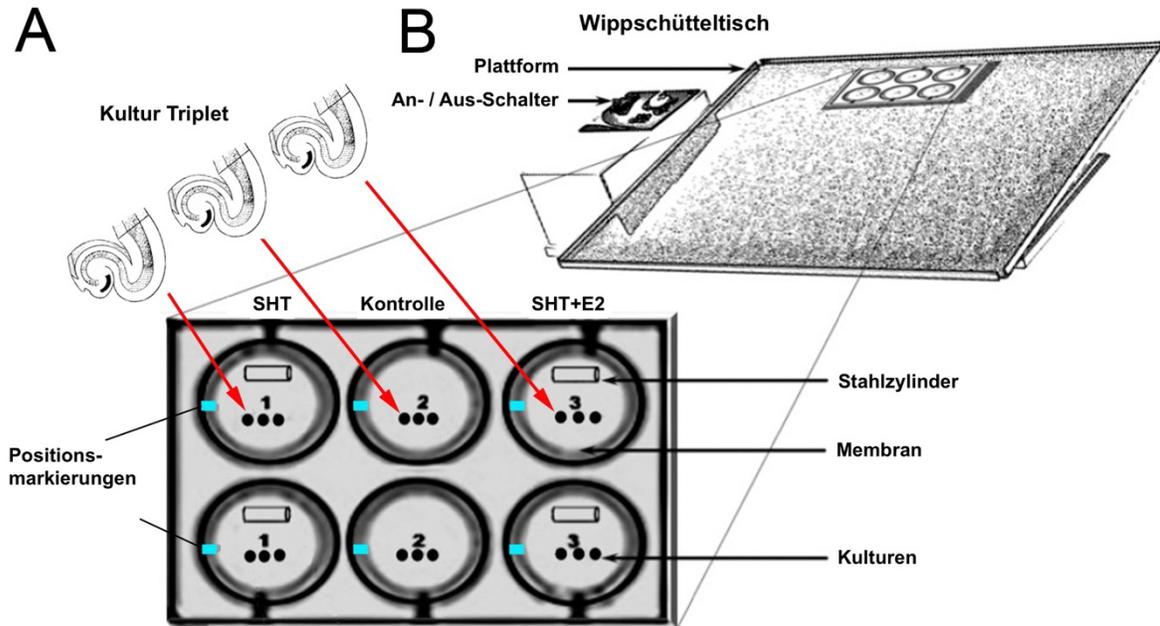


Abbildung 2: Experimentelle Methodik für das *in vitro* SHT.
(verändert nach: Hemmat / Bongarts / Meiringer et al, 2024)

A) Zuordnung der hippocampalen Gewebeproben: Gruppierung von drei räumlich benachbarten („*matching*“) Hippocampus-Schnitten (400 μm) eines Tiers zu Triplets, um die Variabilität zu reduzieren. Mittige Platzierung jedes Schnitts eines Triplets auf einer Kulturen-Membraneinheit (jeweils einer experimentellen Gruppe Ktl, SHT, SHT+E2 zugeordnet). Jeweils drei Triplets pro Tier auf den Membranen, eine horizontale Gruppe von drei Membranen enthält Scheiben aus einem Tier. Zur Identifizierung der Schnitte dienen die Positionsmarkierungen am linken Rand der Membranen. Platzierung der Schnitte nach vorgegebener Reihenfolge: SHT markierungsnah, Kontrolle mittig, SHT+E2 markierungsfern. Überführung der Membranen in eine *Six-Well* Schale mit Inkubationsmedium. Inkubation für 14 Tage (DIV14) zur Regeneration von Präparationsverletzungen und Stress. Die Stahlzylinder sind in ihrer Ausgangsposition gezeigt.

B) „*Rolling cylinder-Technik*“: Transfer der Kulturplatten auf die Oberfläche eines vertikal kippbaren Wippschütteltisches (Fixierung in maximaler Neigungsposition 12°). Platzierung eines sterilen Edelstahlzylinders (\varnothing 5 mm, Länge 12 mm, Gewicht 3,6 g) am Rand der SHT- und SHT+E2-Membraneinheiten. Einschalten des Schüttlers am An- / Aus-Schalter zur Kippung des Wippschüttlers mit einer Geschwindigkeit von 30 Zyklen/min auf die gegenüberliegende Extremposition (ebenfalls 12°) und wieder zurück in die Ausgangsposition. Dabei rollten die Zylinder zwei Mal über die Kulturen, um mechanische Kräfte auf das Gewebe auszulösen. Der Schüttler wurde gestoppt, die Zylinder entfernt und die Membraneinheiten in eine neue Kulturplatte mit frischem Medium überführt und zurück in den Inkubator gebracht.

3.9 Fixierung und Einfrieren der Gewebekulturen

Zum vorgesehenen Zeitpunkt (8 oder 24 Stunden nach *in vitro* SHT) wurden die Kulturen aus dem Inkubator entnommen, danach die Membranen kurz in PBS-Puffer abgewaschen und die Kulturen selbst anschließend mit 4% PFA-Lösung überschichtet und zur Fixierung für zwei Stunden im Kühlschrank (4 °C) gelagert.

Vor dem Einfrieren der Gewebekulturen erfolgte die Kryoprotektion. Hierfür wurden die Kulturmembranen in eine neue *Six-Well*-Schale, gefüllt mit 25% Saccharose/PBS, überführt und für mindestens vier Stunden im Kühlschrank (4 °C) gelagert.

Danach wurden die Kulturen vorsichtig mit einem Pinsel von den Membranen abgelöst und in vorgegebener Reihenfolge (von links nach rechts: SHT, Ktl, SHT+E2) auf Deckgläsern (24 x 60 mm) platziert. Dabei wurde darauf geachtet, dass jeweils die Kulturen eines Triplets auf dasselbe Deckglas übertragen wurden, um eine konsistente Zuordnung zu gewährleisten. Überschüssige Saccharose-Lösung wurde vorsichtig mit einer Mikroliterpipette entfernt, die Kulturen mit einem Tropfen Gefriermedium (*Tissue Tek*) bedeckt und danach auf Trockeneis eingefroren.

Die Lagerung der Deckgläser mit den Kulturen erfolgte bis zur weiteren Verwendung im Gefrierschrank (-80 °C). Zuvor wurden die Deckgläser nummeriert und die mit Gefriermedium überschichteten Kulturen wie folgt markiert, um bei einem eventuellen Abfallen der Kulturen vom Deckglas weiterhin eine Zuordnung zu ermöglichen.

- SHT: ein Punkt
- Ktl: kein Punkt
- SHT+E2: zwei Punkte

3.10 Gefrierschnitte

Zur Weiterverarbeitung wurden von den Gewebekulturen Kryoschnitte angefertigt. Dazu wurden die mit Gefriermedium bedeckten Kulturen vorsichtig vom Deckglas abgelöst und so in ein Kryostat (CryoStar, Eppredia) eingespannt, dass die plane Fläche der Kulturen zur Schnittfläche zeigte. Bei einer Schneidetemperatur von -17 °C wurden die Kulturen in 20 µm dicke Scheiben geschnitten. Aus jeder Kultur wurden drei bis sechs Schnitte gewonnen, die in

Six-Well-Schalen mit PBS gesammelt wurden. Daraus wurden die am besten erhaltenen ein oder zwei Schnitte selektiert und vorsichtig mit einem Pinsel auf einen Objektträger (OT) mit Aqua dest. aufgeschwemmt. Auf jeden OT wurden nur Schnitte der Kulturen eines Triplets aufgebracht und diese in einer festgelegten Reihenfolge (von links nach rechts: SHT, Ktl, SHT+E2) angeordnet. Die OT wurden danach für ein bis zwei Stunden bei RT getrocknet und anschließend im Gefrierschrank (-20 °C) gelagert.

3.11 TdT-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling (TUNEL)

Nach Entnahme der OT aus dem Gefrierschrank (-20 °C) wurde der TUNEL-Test gemäß Herstellerangaben mit dem *In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein* durchgeführt. Zunächst wurden die OT für eine Stunde bei RT zum Trocknen ausgelegt. Anschließend erfolgte eine Nachfixierung in Küvetten mit 4 % PFA für 10 Minuten. Daraufhin wurden die Objektträger 3x für jeweils 10 Minuten bei RT in PBS gewaschen.

Im nächsten Schritt wurden die OT in eine Plastikbox mit einer 0,1 M Zitronensäurelösung überführt. Diese wurde in der Mikrowelle bei 800 Watt aufgekocht und anschließend für weitere 20 Minuten bei 180 Watt warmgehalten. Nach Entnahme aus der Mikrowelle ließ man die Lösung auf RT abkühlen. Daraufhin wurden die OT erneut in PBS gewaschen (2 x 10 min bei RT). Nach der letzten Waschung wurden die OT vorsichtig mit Zellstoff getrocknet.

Anschließend wurden die OT jeweils mit 50 µl TUNEL-*Reaction Mix* (grün-fluoreszierend) bedeckt. Dieser bestand aus 5 µl *terminal deoxynucleotidyl transferase* (10-fach konzentriert) und 45 µl *labeling solution*, die fluorescein-markierte dUTPs (Desoxyuridintriphosphat) enthielt. Für die Reaktion wurden die OT in einer feuchten Kammer (Plastikbox mit Tüchern in Aqua dest. getränkt) für 60 Minuten bei 37 °C bei Dunkelheit im Wärmeschrank platziert. Ab diesem Zeitpunkt wurde darauf geachtet, alle weiteren Schritte im Dunkeln durchzuführen.

Nach Abschluss der Reaktion wurden die OT erneut in PBS gewaschen (2 x 10 min bei RT) und waren damit für die nachfolgende Immunhistochemie (IHC) vorbereitet.

3.12 Immunhistochemie

Für die Durchführung der immunhistochemischen Färbung erfolgte zunächst die Inkubation mit den Primärantikörpern. Hierfür wurden die OT vorsichtig getrocknet, bevor die Schnitte gleichmäßig mit der Primärantikörper-Lösung benetzt wurden. Diese Lösung bestand aus 3 % *Normal Goat Serum* (NGS) und den Primärantikörpern (Maus anti-NeuN, Verdünnung 1:400; bei Doppelmarkierung zusätzlich Kaninchen anti-GFAP, Verdünnung 1:800). Pro OT wurden 250 µl der Lösung verwendet. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei RT.

Am folgenden Tag wurden die OT in Küvetten gewaschen (2 × 10 min in PBS bei RT) und anschließend mit den Sekundärantikörpern inkubiert. Dabei kamen zum Nachweis von NeuN Alexa 647-gekoppelte Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper (infrarot-fluoreszierend, Verdünnung 1:500) zum Einsatz. Bei Doppelmarkierungsstudien wurden zusätzlich Alexa 555-gekoppelte Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (rot-fluoreszierend, Verdünnung 1:500) zum Nachweis von GFAP eingesetzt. Jeder OT wurde dabei mit 250 µl Antikörperlösung überschichtet. Die Inkubation erfolgte für drei Stunden in einer feuchten Kammer.

Nach einer weiteren Waschung (1 × 10 min in PBS) wurden die OT kurz in destilliertes Wasser getaucht und vorsichtig mit Zellstoff getrocknet. Anschließend wurden sie lichtgeschützt zum Lufttrocknen abgelegt. Nach dem Trocknen erfolgte die Überschichtung der Schnitte mit einigen Tropfen Einbettmedium und die Bedeckung mit Deckgläsern. Die fertigen Präparate wurden im Kühlschrank (4 °C) aufbewahrt.

3.13 Mikroskopie und Fotodokumentation der Gewebekulturen

Aufnahmen von den Präparaten wurden zwecks Verblindung der Analyse von meinem Doktorvater, Prof. Dr. Roland Bender, angefertigt und mit einer Codierung verschlüsselt an mich weitergegeben. Zur fotografischen Dokumentation wurde dabei zuerst die Qualität des Gewebes und der Färbung mithilfe eines Keyence Biorevo BZ9000 Fluoreszenzmikroskops bei 100-facher Vergrößerung (10x Okular, 10x Objektiv) überprüft. Wenn die Kultur insgesamt intakt war und die Schichten mit Hilfe der NeuN-Färbung identifiziert werden konnten, wurde die CA1-Region aufgesucht und bei 200-facher Vergrößerung (10x Okular, 20x Objektiv) fotografisch dokumentiert (exemplarisch in Abb. 3). Die CA1-Region wurde dabei wie folgt definiert: Zunächst wurde das Körnerzellband (*Stratum granulosum*) lokalisiert und der

Aufnahmebereich oberhalb des suprapyramidalen Anteils festgelegt. Die Grenze zum Gyrus dentatus wurde durch die hippocampale Fissur bestimmt, die meist durch einen markanten Wechsel der Zelldichte gut zu lokalisieren war. Der festgelegte Aufnahmebereich umfasste in der Regel den größten Teil des *Stratum pyramidale* in CA1, sowie die darüber liegenden Anteile des *Stratum radiatum* und des *Stratum lacunosum-moleculare* bis zur hippocampalen Fissur. Von diesem Bereich wurden zwei – bzw. bei NeuN/GFAP-Doppelmarkierung drei – Aufnahmen mit unterschiedlichen Filtern angefertigt:

- NeuN-IHC: Anregung 653 nm, Emission 669 nm (Infrarot), Weißfilter
- GFAP-IHC: Anregung 553 nm, Emission 568 nm (Rot), Rotfilter
- TUNEL: Anregung 493 nm, Emission 520 nm (Grün), Grünfilter

Diese Aufnahmen wurden in allen Schnitten eines Triplets mit denselben Belichtungszeiten aufgenommen, um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Weiterhin wurden die Z-Ebenen auf $5 \times 1 \mu\text{m}$ eingestellt. Für die quantitative Bestimmung der Anzahl TUNEL-positiver Kerne im Aufnahmebereich wurden diese Ebenen übereinandergelegt („full focus“), der Auswertungsbereich umfasste somit $5 \mu\text{m}$ aus der Mittelebene des Schnittes. Für die qualitative Bestimmung TUNEL-positiver Zelltypen wurden einzelne Ebenen mit einer Tiefe von $1 \mu\text{m}$ analysiert, um Fehlzuordnungen der Kerne zu vermeiden.

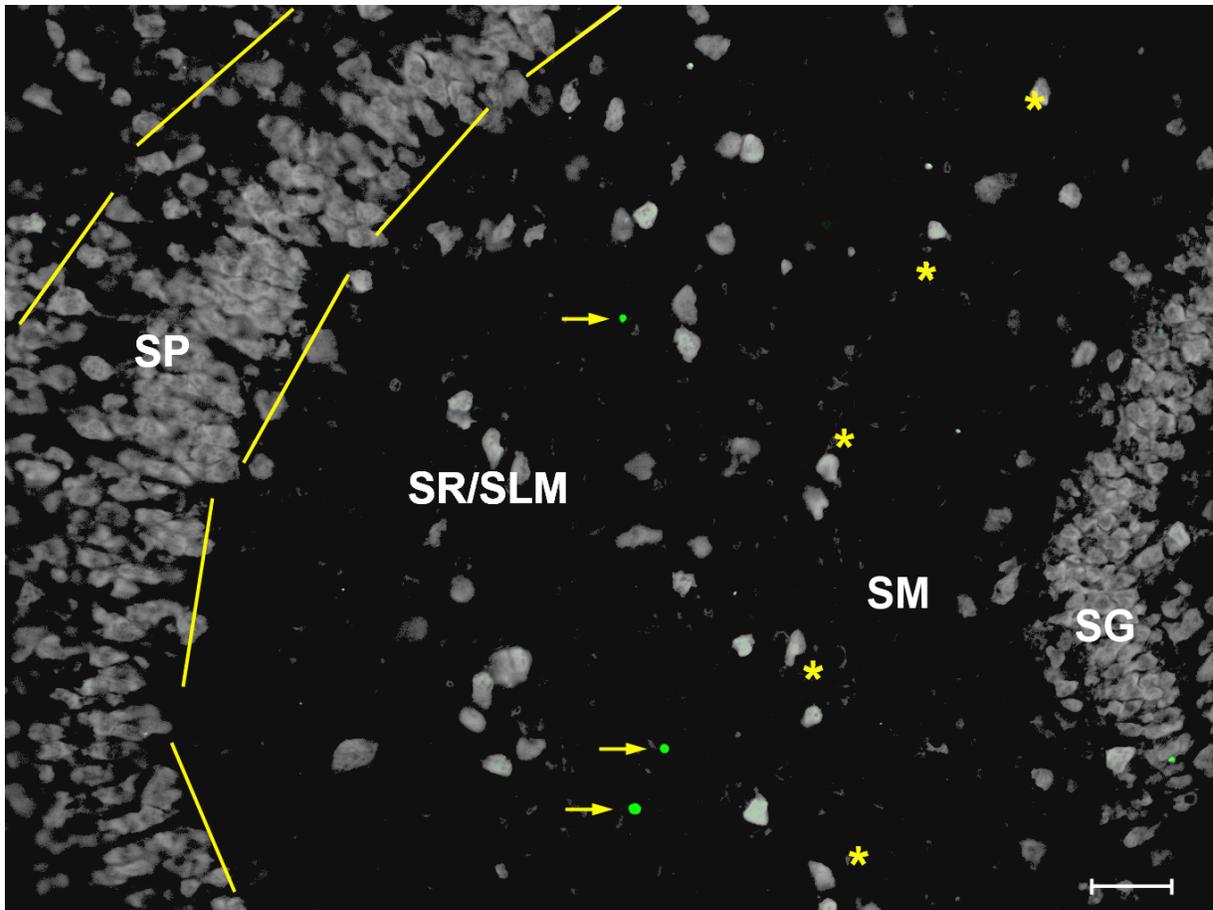


Abbildung 3: Exemplarische Darstellung einer Übersichtsaufnahme der CA1-Region des Hippocampus in der NeuN-Färbung, 200-fache Vergrößerung.

Neuronen sind in weiß (NeuN), TUNEL-positive Zellen in grün (mit gelben Pfeilen markiert) visualisiert. Gelbe Striche stellen die Begrenzung des *Stratum pyramidale* (SP) dar, gelbe Sterne verweisen auf die hippocampale Fissur zwischen Cornu ammonis und Gyrus dentatus.

Abkürzungen: SP: *Stratum pyramidale*, SR/SLM: *Strata radiatum/lacunosum-moleculare*, SM: *Stratum moleculare*, SG: *Stratum granulare*.

Skalierung: 30 µm.

3.14 Auswertung

Die quantitative Auswertung der Bilddaten wurde mit der Fiji / ImageJ Software durchgeführt. Zunächst wurden die Bilddateien auf einheitliche Einstellungen kalibriert (Pixelgröße: 0,05329 µm, Bit-Tiefe: 16 Bit). In den NeuN-Färbungen wurden die Gesamtbildgröße der CA1-Region sowie die Bereiche des *Stratum pyramidale* (SP) und des *Stratum radiatum/lacunosum-moleculare* (SR/SLM) markiert. Diese definierten Regionen wurden daraufhin auf die TUNEL-Aufnahmen projiziert und die einzelnen TUNEL-positiven Nuklei in den verschiedenen Bereichen gezählt.

Die qualitative Auswertung der doppelt-markierten Schnitte (NeuN, GFAP) erfolgte mit dem BZ-II Analyzer (Keyence). Einzelne TUNEL-positive Nuklei im SP bzw. SR/SLM wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop aufgesucht und Aufnahmen der NeuN-, GFAP- und TUNEL-Färbungen wurden erstellt. Diese Aufnahmen wurden anschließend übereinandergelegt, um zu bestimmen, ob der TUNEL-positive Zellkern einem Neuron oder einem Astrozyten zugeordnet werden kann.

3.15 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der Daten wurde mit der Prism Software (GraphPad 8) durchgeführt. Zunächst wurden die TUNEL-Daten der Kontrollgruppen auf Ausreißer überprüft, wobei Werte, die mehr als drei Standardabweichungen vom Mittelwert abwichen, als Ausreißer festgelegt wurden, da eine hohe Konzentration an apoptotischen Zellen in der Kontrolle auf einen atypischen Zustand der Kultur hinweist. Als Konsequenz wurden alle Daten aus dem betroffenen Triplet aus der Wertung genommen (8 h: 4 Triplets aus 52 → n = 48; 24 h: 1 Triplet aus 23 → n = 22). Die verbleibenden Daten wurden mit dem Kolmogorow-Smirnow-Test auf ihre Normalverteilung hin überprüft und danach mit einem geeigneten Verfahren zur Bestimmung signifikanter Unterschiede in gepaarten Einzelwerten bei >2 experimentellen Gruppen untersucht. Aufgrund der nicht-normalverteilten Daten wurde dafür der Friedmann-Test angewendet. Für die Post-hoc-Analysen wurde der Dunn's Multiple Comparison Test verwendet.

Die grafische Darstellung dieser Ergebnisse erfolgte in Form von Balken- und Streudiagrammen, um die Variabilität der Werte zu verdeutlichen. Das Signifikanzniveau wurde

auf $p < 0,05$ (*) festgelegt. In den Abbildungen der Ergebnisse (Abb. 5 und 7) sind Unterschiede nur dann markiert, wenn sie im Post-hoc-Test entweder signifikant waren (*) oder einen Trend zur Signifikanz aufwiesen ($p < 0,2$).

Zusätzlich wurde für die statistische Analyse von Geschlechtsunterschieden eine *Two-Way*-ANOVA mit den Faktoren „Sex“ (w, m) und „Treatment“ (SHT, Ktl, SHT+E2) durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Auswertung sind im Text vermerkt.

4. ERGEBNISSE

Zur Untersuchung des Ausmaßes und zeitlichen Verlaufs der durch *in vitro* SHT induzierten Apoptose in der CA1-Region des Hippocampus, sowie den als neuroprotektiv vermuteten Einfluss von E2 darauf, wurde, wie im Kapitel „3. Material und Methoden“ beschrieben, die TUNEL-Methode angewendet. Diese Methode markiert spezifisch die freien 3'-OH-Enden der fragmentierten DNA, die beim programmierten Zelltod entstehen. Somit weisen TUNEL-positive Nuklei auf Zellen hin, die apoptotische Prozesse durchlaufen und kurz vor dem Zelltod stehen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen stellen daher Momentaufnahmen über das Ausmaß des programmierten Zelltods speziell zu den Untersuchungszeitpunkten dar, die in der vorliegenden Untersuchung auf 8 h und 24 h nach *in vitro* SHT festgelegt wurden. Der Zeitpunkt 8 h wurde gewählt, weil der Fachliteratur zu entnehmen ist, dass zu diesem Zeitpunkt erste apoptotische Reaktionen zu erwarten sind (frühester Zeitpunkt ca. 4 h, nach Pike et al., 1998). Die Untersuchung wurde mit dem Zeitpunkt 24 h abgeschlossen, weil bereits zu diesem Zeitpunkt nur noch geringfügige Unterschiede zwischen den experimentellen Gruppen feststellbar waren (siehe Abb. 6 und 7). In der nachfolgenden Darstellung der Ergebnisse wird zusätzlich zu einer Gesamtauswertung aller Kulturen (schwarz/grau Balken bzw. Punkte in den Abb. 5 und 7) auch zwischen Kulturen aus weiblichen (rötliche Balken bzw. Punkte in den Abb. 5 und 7) und männlichen (bläuliche Balken bzw. Punkte in den Abb. 5 und 7) Mäusen differenziert, um mögliche Geschlechtsunterschiede zu untersuchen.

4.1 Apoptose in der CA1-Region 8 h nach *in vitro* SHT

In der Gesamtauswertung aller Kulturen (schwarz/grau in Abb. 5) war 8 h nach der mechanischen Schädigung in der CA1-Region eine deutlich erhöhte Anzahl apoptotischer Nuklei bei den SHT-behandelten Kulturen festzustellen (Abb. 4 und 5). Die Zunahme wurde vor allem in der Pyramidenzellschicht (*Stratum pyramidale*, SP) beobachtet, wo die Anzahl apoptotischer Nuklei von durchschnittlich $3,2/\text{mm}^2$ in den Kontrollen auf durchschnittlich $14,4/\text{mm}^2$ in der SHT-Gruppe und $23,8/\text{mm}^2$ in der SHT+E2-Gruppe anwuchs (Friedman-Statistik: 9,4; $p=0,009$; $n=48$; Abb. 5A, E). In der SHT-Gruppe erwies sich dieser Anstieg als statistisch signifikant (post-hoc: $p=0,04$; Abb. 5A, E), in der SHT+E2-Gruppe erreichte er wegen hoher Variabilität der Einzelwerte nicht das Signifikanzniveau, war jedoch als deutlicher Trend zu erkennen (post-hoc: $p=0,07$; Abb. 5A, E). Interessanterweise zeigte die geschlechtsspezifische Auswertung eine stärkere Ausprägung dieses Effekts in den weiblichen

(rot; Friedman-Statistik: 7,9; $p=0,019$; $n=26$; Abb. 5A, F) im Vergleich zu den männlichen Kulturen (blau; Friedman-Statistik: 3,6; $p=0,168$; $n=22$; Abb. 5A, G). In diesen waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den experimentellen Gruppen nachweisbar. Eine *Two-Way*-ANOVA mit den Faktoren „Sex“ und „Treatment“ erbrachte jedoch keine statistische Bestätigung für einen Geschlechtsunterschied (Faktor „Sex“: $p=0,734$).

In den *Strata radiatum/lacunosum moleculare* (SR/SLM) waren hingegen 8 h nach *in vitro* SHT weder in der Gesamtauswertung aller Kulturen (schwarz/grau; Friedman-Statistik: 2,6; $p=0,274$; $n=48$; Abb. 5C, E), noch in den weiblichen (rot; Friedman-Statistik: 3,6; $p=0,168$; $n=26$; Abb. 5C, F) oder männlichen (blau; Friedman-Statistik: 0,7; $p=0,698$; $n=22$; Abb. 5C, G; *Two-Way*-ANOVA, Faktor „Sex“: $p=0,752$) Kulturen statistisch relevante Unterschiede zwischen den experimentellen Gruppen zu erkennen. Dies könnte auf eine besondere Anfälligkeit der Pyramidenzellen auf mechanischen Stress hinweisen, aber auch durch die geringere Zelldichte in den SR/SLM zu erklären sein.

Es kann aus diesen Ergebnissen somit geschlossen werden, dass die im Modell induzierte, mechanische Schädigung 8 h nach *in vitro* SHT vor allem im SP apoptotischen Zelltod induziert hat, der möglicherweise in den weiblichen Kulturen etwas stärker ausfällt als in den männlichen. Darüber hinaus muss jedoch konstatiert werden, dass eine protektive Wirkung der E2-Gabe nicht evident ist, da die Werte der SHT- und der SHT+E2-Gruppe sowohl im SP als auch in den SR/SLM nicht signifikant unterschiedlich waren. Dies war auch der Fall, wenn weibliche und männliche Kulturen getrennt betrachtet wurden (post-hoc, jeweils: $p>0,999$; siehe Abb. 5A, C, F, G).

Auffällig war weiterhin, dass in weniger als 50% aller Triplets im SP ein deutlicher Unterschied zwischen den experimentellen Gruppen zu erkennen war. Dies ist im Streudiagramm (Abb. 5B) zu sehen, welches zeigt, dass die Dichte apoptotischer Nuklei im SP in den SHT- und SHT+E2-Kulturen häufig im Bereich der Kontrollen lag (abgeschwächt ist dies auch in den SR/SLM zu erkennen; Abb. 5D). Dieser Befund erklärt auch die relativ hohe Variabilität der Ergebnisse aus den SHT-behandelten Gruppen: möglicherweise tolerierten einige der Kulturtriplets die durch den Zylinder bewirkte Kompression besser als andere. Alternativ ist denkbar, dass der optimale Zeitpunkt für eine Apoptose-Bestimmung in diesen Kulturen verpasst wurde, weil der Höhepunkt der Apoptose zeitlich entweder bereits vorüber war oder noch bevorstand. Die

dadurch hervorgerufene Variabilität stellt jedoch eine Schwäche des Modells dar, die für künftige Anwendungen zu berücksichtigen ist (siehe dazu 5.4).

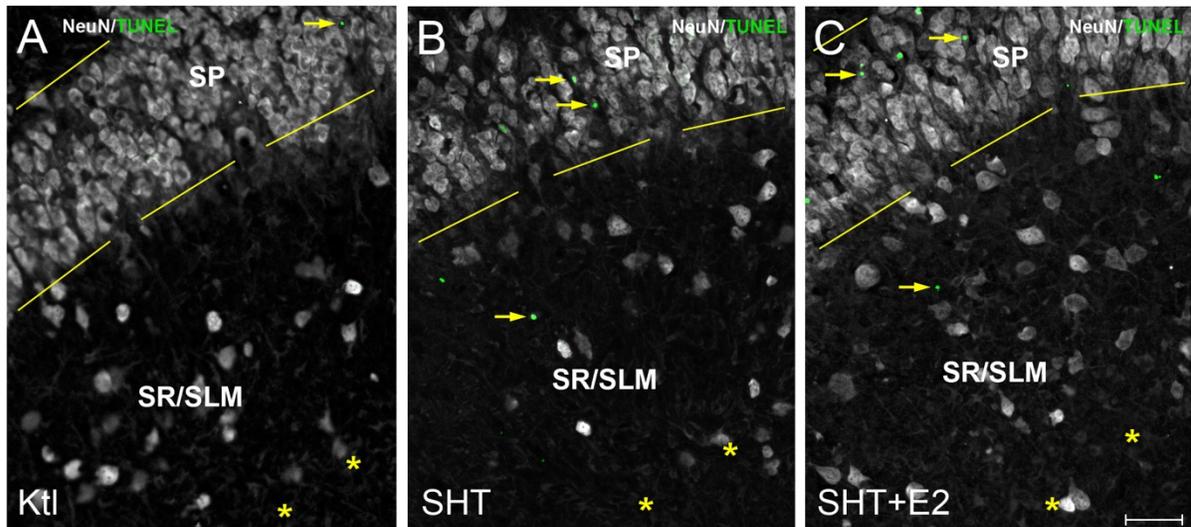


Abbildung 4: Exemplarische fotografische Darstellung der Resultate einer Anwendung der TUNEL-Methode in einem Kultur-Triplet in der CA1-Region 8 h nach *in vitro* SHT.

A) Kontrolle (Ktl), B) SHT, C) SHT+E2.

Die mit gelben Pfeilen angezeigten, grünen Punkte gehören zu apoptotischen Zellkernen, in denen die DNA-Fragmente mit der TUNEL-Methode markiert wurden. Auffällig ist, dass apoptotische Nuklei sowohl in der SHT- als auch in der SHT+E2-Kultur in der durch NeuN-Färbung (weiß) erkennbaren Pyramidenzellschicht (*Stratum pyramidale*, SP) im Vergleich zur Kontrolle vermehrt auftreten, während in den *Strata radiatum/lacunosum-moleculare* (SR/SLM) keine Unterschiede merklich ins Auge fallen. Diesen Eindruck bestätigt auch die quantitative Auswertung (siehe Abb. 5).

Die gelben Striche markieren die Grenze des SP zum *Stratum radiatum* (unten) bzw. zum *Stratum oriens* (oben); die gelben Sterne markieren die hippocampale Fissur.

Skalierung: 20 μm .

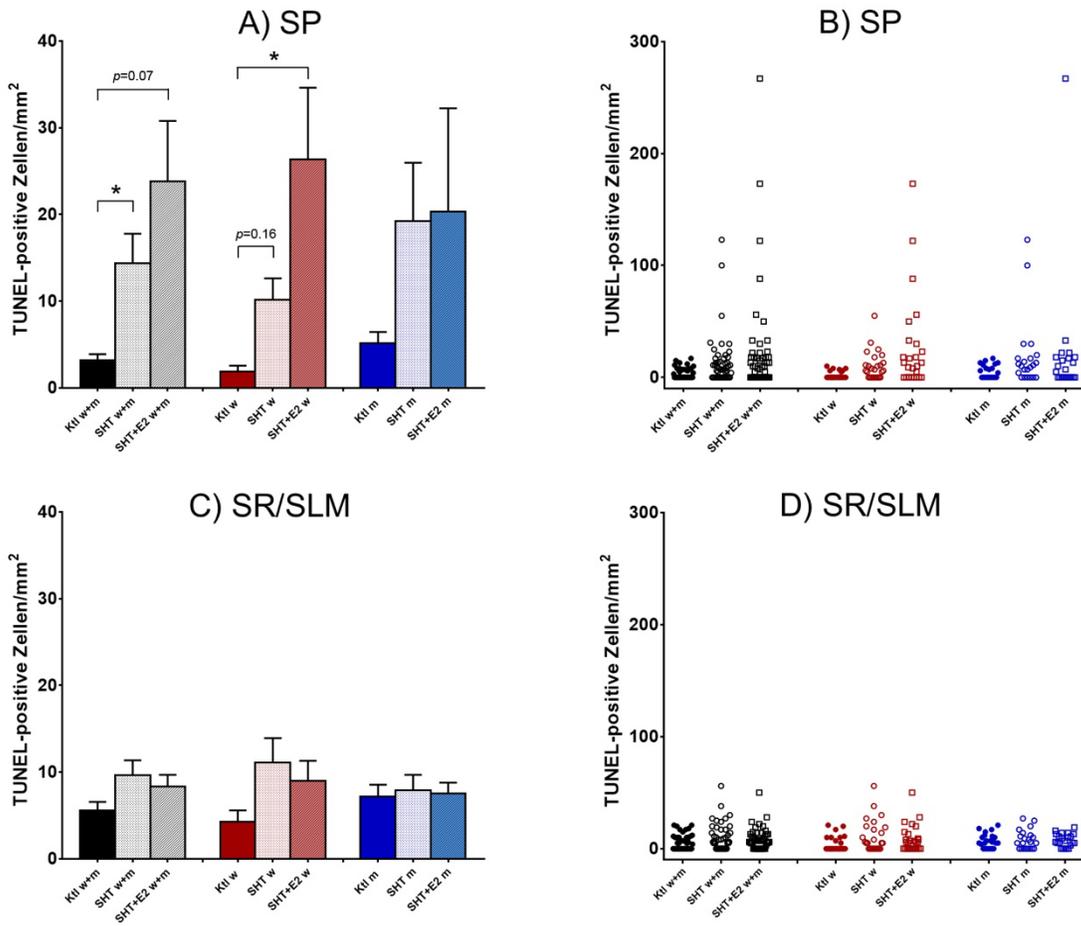


Abbildung 5a: Grafische Darstellung der quantitativen Bestimmung TUNEL-positiver Zellen in der CA1-Region 8 h nach *in vitro* SHT.

A-D) Darstellung der Ergebnisse in Form von Balkendiagrammen (A: *Stratum pyramidale*, SP; C: *Strata radiatum/lacunosum-moleculare*, SR/SLM) und Streudiagrammen (B: SP; D: SR/SLM).

Die Streudiagramme verdeutlichen die Variabilität der Einzelmessungen in den Kulturtriplets.

Die Gesamtauswertung aller Kulturen (schwarz/grau), bzw. die Auswertungen nur der weiblichen (rot) und männlichen Kulturen (blau) sind farblich separiert dargestellt. Innerhalb jeder Auswertung ist die Ktl-Gruppe jeweils einfarbig, die SHT-Gruppe hell schraffiert und die der SHT+E2-Gruppe dunkel schraffiert abgebildet.

Statistisch signifikante Unterschiede sind mit * markiert. Nominelle *p*-Werte indizieren statistische Trends.

E)	SP			SR/SLM		
TUNEL-positive Zellen: 8h, w+m	Ktl	SHT	SHT+E2	Ktl	SHT	SHT+E2
N	48	48	48	48	48	48
Mittelwert	3,2	14,4	23,8	5,6	9,6	8,3
Standardabweichung	4,8	23,4	48,4	6,7	12	9,5
Standardfehler	0,7	3,4	7	1	1,7	1,4
Friedman-Statistik	9,4 $p = 0,009 (*)$			2,6 $p = 0,274$		
Post-hoc Analyse: Dunn	SHT vs. Ktl: $p = 0,04 (*)$ SHT+E2 vs. Ktl: $p = 0,07$ SHT vs. SHT+E2: $p > 0,999$			$p > 0,05$ (alle Werte)		

F)	SP			SR/SLM		
TUNEL-positive Zellen: 8h, w	Ktl	SHT	SHT+E2	Ktl	SHT	SHT+E2
N	26	26	26	26	26	26
Mittelwert	1,9	10,2	26,4	4,3	11,1	9,0
Standardabweichung	3,3	12,7	42,0	6,8	14,3	11,8
Standardfehler	0,7	2,5	8,2	1,3	2,8	2,3
Friedman-Statistik	7,9 $p = 0,019 (*)$			3,6 $p = 0,168$		
Post-hoc Analyse: Dunn	SHT vs. Ktl: $p = 0,16$ SHT+E2 vs. Ktl: $p = 0,046 (*)$ SHT vs. SHT+E2: $p > 0,999$			$p > 0,05$ (alle Werte)		

G)	SP			SR/SLM		
TUNEL-positive Zellen: 8h, m	Ktl	SHT	SHT+E2	Ktl	SHT	SHT+E2
N	22	22	22	22	22	22
Mittelwert	5,2	19,3	20,3	7,2	7,9	7,5
Standardabweichung	6	31,4	56	6,4	8,4	5,8
Standardfehler	1,3	6,7	11,9	1,4	1,8	1,2
Friedman-Statistik	1,6 $p = 0,460$			0,7 $p = 0,698$		
Post-hoc Analyse: Dunn	$p > 0,05$ (alle Werte)			$p > 0,05$ (alle Werte)		

Abbildung 5b: Statistische Daten der quantitativen Bestimmung TUNEL-positiver Zellen in der CA1-Region 8 h nach *in vitro* SHT.
E-G) Statistische Daten für die Auswertung der Gesamtkulturen (E) bzw. die geschlechtsspezifischen Auswertungen weiblicher (F) oder männlicher (G) Kulturen.

4.2 Apoptose in der CA1-Region 24 h nach *in vitro* SHT

24 h nach *in vitro* SHT war ein Apoptose-fördernder Effekt der mechanischen Schädigung in der CA1-Region bereits deutlich weniger ausgeprägt (Abb. 6 und 7). In der Gesamtauswertung aller Kulturen (schwarz/grau in Abb. 7) waren weder im SP (Friedman-Statistik: 4,2; $p=0,12$; $n=22$; Abb. 7A, E) noch in den SR/SLM (Friedman-Statistik: 3,3; $p=0,19$; $n=22$; Abb. 7C, E) statistisch signifikante Unterschiede zwischen den experimentellen Gruppen zu erkennen. Jedoch zeigte die Friedman-Analyse bei der Auswertung der männlichen Kulturen im SP eine statistische Differenz an (blau; Friedman-Statistik: 6,1; $p=0,047$; $n=14$; Abb. 7A, G), welche auf eine tendenziell erhöhte Dichte apoptotischer Zellen in der SHT-Gruppe im Vergleich zu den Kontrollen hinweist (post-hoc: $p=0,07$). Eine vergleichbare Differenz war bei den weiblichen Kulturen im SP nicht festzustellen (rot; Friedman-Statistik: 0,0; $p>0,999$; $n=8$; Abb. 7A, F). Dies ist insofern ein interessanter Befund, weil zum 8 h Zeitpunkt in der SHT-Gruppe eine erhöhte Anzahl apoptotischer Nuklei im SP bei den weiblichen Kulturen, jedoch nicht bei den männlichen, festzustellen war und das umgekehrte Verhältnis nach 24 h somit auf eine verzögerte Apoptose in den männlichen Kulturen hinweisen könnte. Umgekehrt zeigte die Friedman-Analyse speziell bei den weiblichen Kulturen eine statistische Differenz in den SR/SLM an (rot; Friedman-Statistik: 7,9; $p=0,02$; $n=8$; Abb. 7A, F), die ebenfalls auf eine tendenziell erhöhte Apoptose in der SHT-Gruppe im Vergleich zu den Kontrollen hinweist (post-hoc: $p=0,05$). Für beide Befunde erbrachte die *Two-Way*-ANOVA jedoch keine statistische Bestätigung für einen Geschlechtsunterschied (Faktor „Sex“: SP $p=0,569$; SR/SLM $p=0,204$).

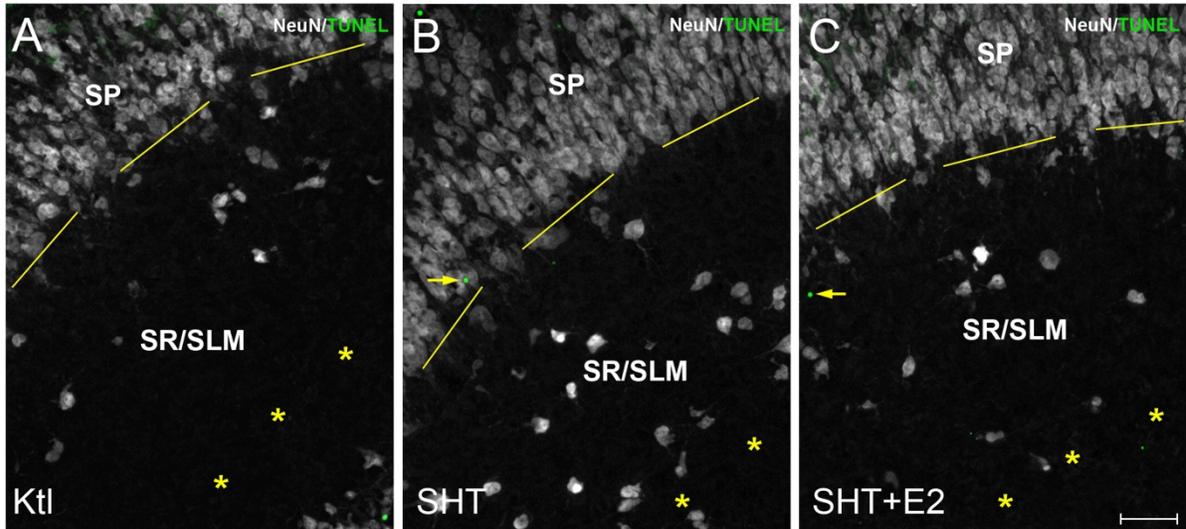


Abbildung 6: Exemplarische fotografische Darstellung der Resultate einer Anwendung der TUNEL-Methode in einem Kultur-Triplet in der CA1-Region 24 h nach *in vitro* SHT.

A) Kontrolle (Ktl), B) SHT, C) SHT+E2.

Die mit gelben Pfeilen angezeigten, grünen Punkte gehören zu apoptotischen Zellkernen, in denen die DNA-Fragmente mit der TUNEL-Methode markiert wurden. In den SHT- und SHT+E2-Gruppen lässt sich im Vergleich zur Kontrolle nur ein geringfügiger Anstieg apoptotischer Nuklei in der durch NeuN-Färbung (weiß) erkennbaren Pyramidenzellschicht (*Stratum pyramidale*, SP), sowie in den *Strata radiatum/lacunosum-moleculare* (SR/SLM) nachweisen. Diesen Eindruck bestätigt auch die quantitative Auswertung (siehe Abb. 7).

Die gelben Striche markieren die Grenze zwischen SP und SR; die gelben Sterne markieren die hippocampale Fissur.

Skalierung: 20 µm.

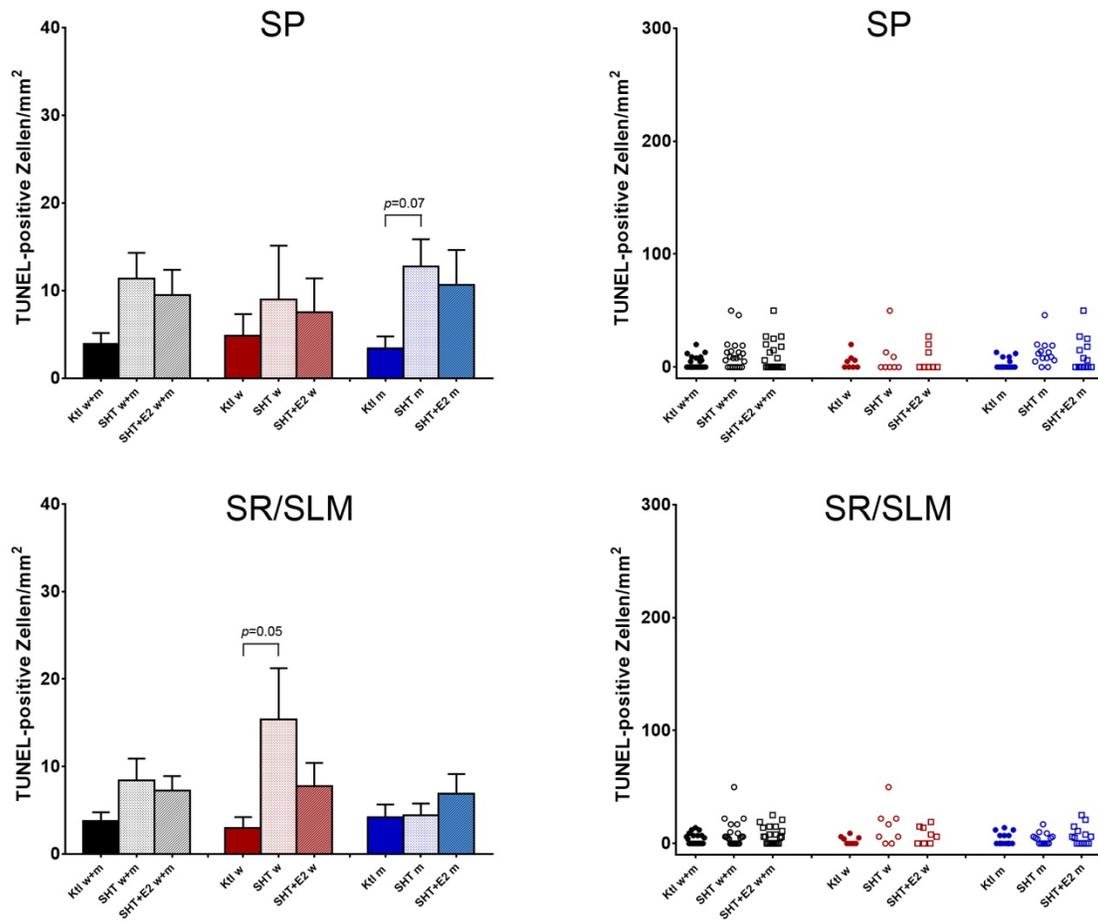


Abbildung 7a: Grafische Darstellung der quantitativen Bestimmung TUNEL-positiver Zellen in der CA1-Region 24 h nach *in vitro* SHT.

A-D) Darstellung der Ergebnisse in Form von Balkendiagrammen (A: *Stratum pyramidale*, SP; C: *Stratum radiatum/lacunosum-moleculare*, SR/SLM) und Streudiagrammen (B: SP; D: SR/SLM).

Die Streudiagramme verdeutlichen die Variabilität der Einzelmessungen in den Kulturtriplets.

Die Gesamtauswertung aller Kulturen (schwarz/grau), bzw. die Auswertungen nur der weiblichen (rot) und männlichen Kulturen (blau) sind farblich separiert abgebildet. Innerhalb jeder Auswertung ist die Ktl-Gruppe jeweils einfarbig, die SHT-Gruppe hell schraffiert und die der SHT+E2-Gruppe dunkel schraffiert dargestellt.

Nominelle *p*-Werte indizieren statistische Trends.

E)	SP			SR/SLM		
TUNEL-positive Zellen: 24h, w+m	Ktl	SHT	SHT+E2	Ktl	SHT	SHT+E2
N	22	22	22	22	22	22
Mittelwert	4,0	11,4	9,5	3,8	8,4	7,2
Standardabweichung	5,7	13,6	13,5	4,8	11,7	7,9
Standardfehler	1,2	2,9	2,9	1,0	2,5	1,7
Friedman-Statistik	4,2 $p = 0,12$			3,3 $p = 0,19$		
Post-hoc Analyse: Dunn	$p > 0.05$ (alle Werte)			$p > 0.05$ (alle Werte)		

F)	SP			SR/SLM		
TUNEL-positive Zellen: 24h, w	Ktl	SHT	SHT+E2	Ktl	SHT	SHT+E2
N	8	8	8	8	8	8
Mittelwert	4,9	9,0	7,5	3,0	15,4	7,8
Standardabweichung	6,9	17,3	11,0	3,5	16,6	7,6
Standardfehler	2,4	6,1	3,9	1,2	5,9	2,7
Friedman-Statistik	0,0 $p > 0,999$			7,9 $p = 0,02$ (*)		
Post-hoc Analyse: Dunn	$p > 0.05$ (alle Werte)			SHT vs. Ktl: $p = 0,05$		

G)	SP			SR/SLM		
TUNEL-positive Zellen: 24h, m	Ktl	SHT	SHT+E2	Ktl	SHT	SHT+E2
N	14	14	14	14	14	14
Mittelwert	3,4	12,8	10,4	4,2	4,4	6,9
Standardabweichung	5,1	11,5	15	5,4	5,1	8,3
Standardfehler	1,4	3,1	4,0	1,4	1,4	2,2
Friedman-Statistik	6,1 $p = 0,047$ (*)			0,6 $p = 0,76$		
Post-hoc Analyse: Dunn	SHT vs. Ktl: $p = 0,07$			$p > 0.05$ (alle Werte)		

Abbildung 7b: Statistische Daten der quantitativen Bestimmung TUNEL-positiver Zellen in der CA1-Region 24 h nach *in vitro* SHT. E-G) Statistische Daten für die Auswertung der Gesamtkulturen (E) bzw. die geschlechtsspezifischen Auswertungen weiblicher (F) oder männlicher (G) Kulturen.

4.3 Charakterisierung von Apoptose betroffener Zellen

Zur näheren Charakterisierung der Zellen, die von apoptotischen Prozessen nach *in vitro* SHT betroffen sind, wurde mit Hilfe von immunhistochemischen Markierungen untersucht, welchem Zelltyp die TUNEL-markierte Nuklei angehören. Diese Analyse beschränkte sich auf den Zeitpunkt 8 h nach *in vitro* SHT und das *Stratum pyramidale* (SP), da hier die deutlichsten Effekte der SHT-Behandlung erkennbar waren (Abb. 5). Immunhistochemisch dargestellt wurden Neurone (Marker: NeuN) und Astrozyten (Marker: GFAP). Auf eine Darstellung weiterer, im Nervengewebe vorkommender Zelltypen, wie Mikroglia und Oligodendrozyten, wurde im Rahmen dieser Untersuchung verzichtet.

Abbildung 8 illustriert exemplarisch apoptotische Nuklei im SP zum Zeitpunkt von 8 h nach *in vitro* SHT in den genannten Zelltypen. Sowohl in Astrozyten (Abb. 8A) als auch in Neuronen (Abb. 8B) konnte Apoptose nachgewiesen werden. Eine genaue Quantifizierung der Häufigkeiten gestaltete sich jedoch im vorliegenden Modell schwierig, da die den TUNEL-positiven Nuklei zugehörigen Zellen in vielen Fällen nicht darstellbar waren („nd“ in Abb. 8C). Dies könnte durch einen bereits fortgeschrittenen Abbau des Cytoplasmas in den betroffenen Zellen zu erklären sein (worauf z. B. die relativ schwache NeuN-Markierung in Abb. 8B hindeutet) oder dadurch zu Stande kommen, dass noch weitere Zelltypen – wie die oben erwähnten Mikrogliazellen – von Apoptose betroffen sind. Dies lässt sich nach derzeitigem Stand der Untersuchung nicht beantworten. Die verfügbaren Daten deuten jedoch darauf hin, dass Astrozyten 8 h nach *in vitro* SHT etwas häufiger als Neurone in den apoptotischen Zelltod eintreten (Abb. 8C). Dieser Befund ist von Bedeutung, weil er auf komplexe zelluläre Reaktionen nach einem SHT hinweist, die sowohl neuronale als auch nicht-neuronale Zelltypen betreffen können. Daraus erschließt sich die Notwendigkeit einer umfassenderen Analyse der Zellpopulationen, die an pathophysiologischen Prozessen nach SHT beteiligt sind, um so ein besseres Verständnis der molekularen und zellulären Mechanismen zu gewinnen, die zur Gewebeschädigung beitragen.

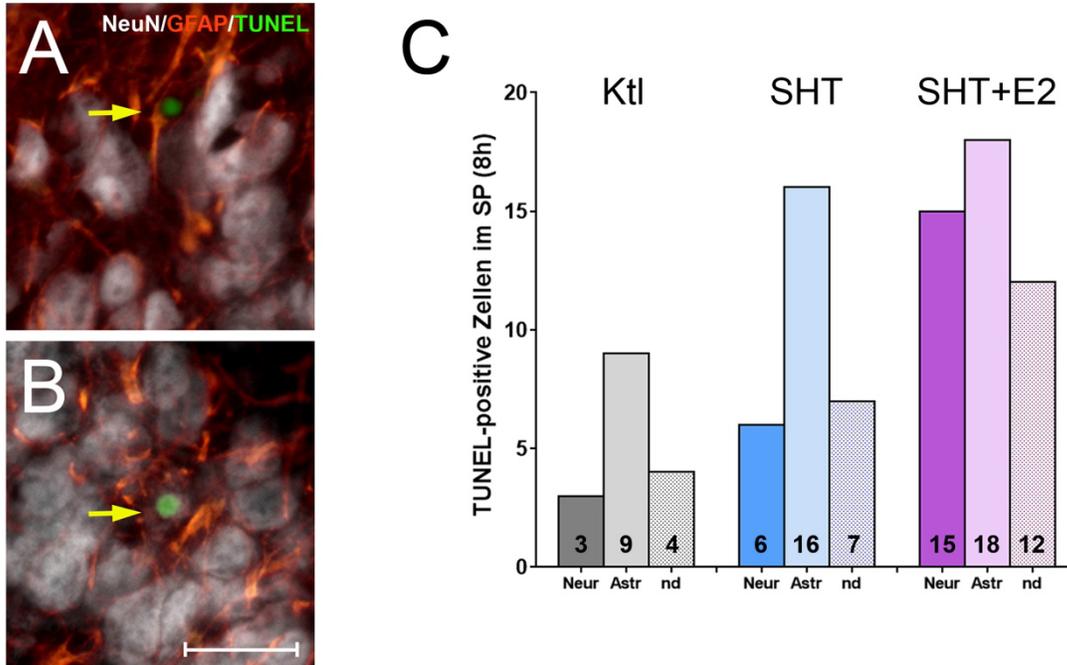


Abbildung 8: Exemplarisch fotografische und grafische Darstellung der Charakterisierung von Apoptose betroffener Zelltypen 8 h nach *in vitro* SHT im *Stratum pyramidale* (SP) der CA1-Region.

A) Der gelbe Pfeil zeigt hier auf einen TUNEL-positiven Zellkern (grün) inmitten einer Zelle, die immunpositiv für GFAP (rot) ist. Es handelt sich hierbei um einen im SP befindlichen Astrozyten. Seine Ausläufer erstrecken sich zwischen die NeuN-positiven Neurone im SP.

B) Der gelbe Pfeil zeigt hier auf einen TUNEL-positiven Zellkern (grün) inmitten einer Zelle, die immunpositiv für NeuN (weiß) ist. Es handelt sich hierbei um ein Neuron. Die NeuN-Markierung ist jedoch recht schwach im Vergleich zu den umliegenden Neuronen. Dies könnte ein Hinweis auf einen progressiven Abbau des Cytoplasmas in der apoptotischen Zelle sein, der letztendlich dazu führt, dass die Zelle immunhistochemisch nicht mehr zu charakterisieren ist. Tatsächlich konnte häufig die einem apoptotischen Nukleus zugehörige Zelle mit den eingesetzten immunhistochemischen Methoden nicht dargestellt werden (nd).

C) Balkendiagramm zur Veranschaulichung der Anzahl TUNEL-positiver Zellen in den einzelnen Zelltypen – Neurone (Neur, einfarbig dunkel), Astrozyten (Astr, einfarbig hell), nicht definierbarer Zelltyp (nd, schraffiert) – und aufgeschlüsselt nach experimentellen Gruppen (Ktl: grau, SHT: blau, SHT+E2: lila; die Zahlen in den Balken geben die Anzahl identifizierter apoptotischer Zellen wieder). Interessanterweise waren Astrozyten in diesen Stichproben häufiger betroffen als Neurone.

Skalierung: 20 μ m.

5. DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe eines *in vitro* Modells für Hirntraumata die Auswirkungen einer mechanischen Primärschädigung auf sekundär ausgelöste apoptotische Prozesse in der CA1-Region des Hippocampus zu untersuchen und den Einfluss des Sexualhormons E2 auf diese neurodegenerativen Prozesse festzustellen.

Im Fokus standen dabei folgende Fragestellungen:

- 1) Quantitatives Ausmaß der apoptotischen Neurodegeneration: Wie stark ist die durch *in vitro* induziertes SHT ausgelöste Apoptose in der CA1-Region des Hippocampus ausgeprägt?
- 2) Zellspezifische Differenzierung: Inwiefern betrifft dieser Prozess Neurone und Astrozyten?
- 3) Einfluss von 17 β -Estradiol (E2): Welchen neuroprotektiven Effekt hat das Sexualhormon in diesem Zusammenhang?
- 4) Geschlechtsspezifische Unterschiede: Gibt es Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Kulturen?

Als wesentliche Ergebnisse können festgehalten werden:

Zu 1) Quantitatives Ausmaß der Apoptose:

Das hier eingesetzte Modell für *in vitro* SHT führt zu Apoptose in der CA1-Region der hippocampalen Kulturen. Diese Apoptose war besonders ausgeprägt im SP 8 h nach SHT. Nach 24 h war jedoch der Effekt bereits weitestgehend wieder abgeklungen. In den SR/SLM war Apoptose an beiden Zeitpunkten nur geringfügig festzustellen. Nur in den weiblichen Kulturen war die Apoptoserate nach 24 h nahe zur Signifikanz erhöht. Grundsätzlich muss jedoch konstatiert werden, dass die Ergebnisse in den Kulturtriplets sehr unterschiedlich ausfielen: bei weniger als 50 % der Kulturen war nach SHT eine erhöhte Apoptose zu erkennen. Dies lässt darauf rückschließen, dass die eingesetzte Technik zur Erzeugung einer Gewebekompression („*rolling cylinder*-Technik“) in der hier verwendeten Form eine eher milde Gewebeschädigung hervorruft und von den Kulturen mehrheitlich gut toleriert wird.

Zu 2) Zellspezifische Differenzierung:

Durch immunhistochemische Markierung von Neuronen mit dem neuronalen Marker NeuN und von Astrozyten mit dem glialen Marker GFAP konnte gezeigt werden, dass das *in vitro* SHT sowohl in Neuronen als auch in Astrozyten apoptotischen Zelltod induziert. Astrozyten scheinen etwas häufiger als Neurone betroffen zu sein. Eine präzise Bestimmung der Häufigkeiten konnte jedoch aufgrund unzureichender Färbbarkeit der apoptotischen Zellen nicht durchgeführt werden. Ähnliche Beobachtungen werden auch von anderen Untersuchern berichtet (Conti et al., 1998).

Zu 3) Einfluss von 17 β -Estradiol (E2):

E2 wird als potenziell neuroprotektiver Faktor nach SHT diskutiert. In den hier durchgeführten Experimenten konnte diese Annahme jedoch nicht bestätigt werden. Die Zugabe von E2 zum Kulturmedium nach SHT (SHT+E2-Gruppe) führte zu keiner statistisch signifikanten Abnahme der Apoptoserate im Vergleich zur SHT-Gruppe. Daraus muss geschlossen werden, dass E2 unter den gewählten experimentellen Bedingungen (Dosierung 20 nM) keinen messbaren neuroprotektiven Einfluss hat.

Zu 4) Geschlechtsspezifische Unterschiede:

Statistische Analysen auf mögliche Geschlechtsunterschiede (*Two-Way* ANOVA) erbrachten keine Hinweise auf signifikante Unterschiede zwischen weiblichen und männlichen Kulturen zu den beiden Untersuchungszeitpunkten. Auffällig war jedoch, dass bei geschlechtsspezifischer Analyse in den weiblichen Kulturen (aber nicht in den männlichen) im SP nach 8 h eine signifikant erhöhte Apoptoserate nachzuweisen war, während diese in den männlichen Kulturen (jedoch nicht in den weiblichen) nach 24 h signifikant erhöht war. Dies könnte auf einen verzögerten Eintritt von apoptotischem Zelltod in den männlichen Kulturen hinweisen, der eventuell durch eine geschlechtsspezifisch unterschiedliche Ausstattung mit Estrogen-Rezeptoren bedingt ist. Um diese Vermutung zu erhärten (oder zu widerlegen), müssten jedoch weitere, spezifisch auf diese Fragestellung ausgerichtete Untersuchungen durchgeführt werden.

Nachfolgend sollen die Schlussfolgerungen 1-4 im Kontext wissenschaftlicher Erkenntnisse diskutiert werden.

5.1 Ausmaß von Apoptose nach *in vitro* SHT in der CA1-Region und zelltypspezifische Differenzierung apoptotischer Zellen

In den Vorläuferstudien von Hemmat (2022) und Bongarts (2024) wurden bereits Untersuchungen zum Zelltod in der CA1-Region des Hippocampus durchgeführt. Dabei wurde die Aufnahme von Propidiumiodid (PI) untersucht, einem Marker für Zelldegeneration, der in Zellen mit beschädigter Zellmembran eindringt (Cho, 2004; Macklis & Madison, 1990; Newell et al., 1995). Die Ergebnisse zeigten eine Zunahme der PI-Aufnahme 12 h nach *in vitro* SHT, die nach 24 h statistisch signifikant wurde und nach 48 h wieder abnahm (Hemmat / Bongarts / Meiringer et al., 2024). Daraus wurde geschlossen, dass die mechanische Schädigung Zelltod im Gewebe induziert. Mit der PI-Methode konnte jedoch weder eindeutig bestimmt werden, ob dieser Zelltod auf nekrotische oder apoptotische Mechanismen zurückzuführen war, noch welche spezifischen Zellpopulationen betroffen waren.

Um diese Fragen näher eingrenzen zu können, wurde in der vorliegenden Studie der TUNEL-Test zum Nachweis apoptotischen Zelltods eingesetzt. Die Studie bestätigte das frühe Auftreten von apoptotischem Zelltod durch die mechanische Schädigung, da nach 8 h in den SHT-behandelten Kulturen eine signifikant erhöhte Apoptoserate im Vergleich zu den Kontrollen beobachtet wurde. Nach 24 h war eine erhöhte Anzahl apoptotischer Nuklei jedoch kaum noch zu sehen. Diese Befunde legen nahe, dass die Induktion der Apoptose der Aufnahme von PI vorangeht und es sich bei den in den Vorläuferstudien beobachteten PI-positiven Zellen vermutlich um Zellen handelt, deren Zellmembran in Folge des apoptotischen Zelltods degradiert ist. Apoptose erscheint also im verwendeten SHT-Modell ein temporäres und frühzeitig ablaufendes Ereignis zu sein, was in anderen Studien ebenfalls so beschrieben wurde (Beer et al., 2000; DeRidder et al., 2006; Miller et al., 2017; Newcomb et al., 1999).

Zu den möglichen Auslösern eines apoptotischen Zelltods nach Hirnschädigung gehören ein gestörtes Gleichgewicht zwischen Exzitation und Inhibition im neuronalen Gewebeverband (Zünder, 2013), erhöhter oxidativer Stress im Gewebe (Bayir et al., 2005; Chong et al., 2005; Shao et al., 2006) und/oder die Aktivierung von Mikroglia und/oder Astrozyten, wodurch neurofunktionell relevante Substanzen wie Zytokine ausgeschüttet werden (Arevalo et al., 2015; Habib et al., 2014; Loane et al., 2014). Als Folge werden in der Zelle die in der „Einleitung“ (2.4.2 Apoptose) näher beschriebenen Proteasekaskaden aktiviert und dadurch der enzymatische Abbau des Zellinhalts eingeleitet (Budihardjo et al., 1999; Zhang et al., 2005). Zu einer Auflösung der Zellmembran kommt es dabei erst im fortgeschrittenen Verlauf (nach ca. 4-5 h; Smolewski et al., 2002), was den verzögerten Zeitverlauf der PI-Aufnahme

(Hemmat / Bongarts / Meiringer et al., 2024) möglicherweise erklärt. Auf Grundlage der vorliegenden Daten kann nicht entschieden werden, ob die beobachtete Apoptose vorwiegend durch extrinsische oder intrinsische (mitochondriale) Signale ausgelöst wurde. Da der intrinsische Signalweg vor allem durch Hypoxie ausgelöst wird (Abdul-Muneer et al., 2017; Andriessen et al., 2010; Raghupathi et al., 2000; Zhang et al., 2004), die nach SHT insbesondere durch eine Störung der Sauerstoffzufuhr hervorgerufen wird (Andriessen et al., 2010; Newell et al., 1995), ist dieser Weg im verwendeten *in vitro* Modell eher unwahrscheinlich, weil hier die Kulturen nach Abkopplung vom Organismus im Inkubator kontrolliert mit Sauerstoff versorgt werden. Konkretere Hinweise könnten hier jedoch Folgestudien geben, die die Expression spezifischer Marker für den extrinsischen (z. B. TNF-Rezeptoren und deren Liganden) oder den intrinsischen Signalweg (z. B. BAD/Bax) untersuchen.

In der vorliegenden Studie wurde weiterhin gezeigt, dass sowohl in Neuronen als auch in Astrozyten apoptotischer Zelltod ausgelöst wird, was mit Ergebnissen anderer Studien nach SHT übereinstimmt (Beer et al., 2000; DeRidder et al., 2006; Newcomb et al., 1999). Welcher der beiden Zelltypen dabei anfälliger für Zelltod ist, konnte nicht abschließend geklärt werden. Tendenziell deuten die vorliegenden Befunde auf eine erhöhte Zellsterblichkeit von Astrozyten hin, was in Einklang mit der ebenfalls *in vitro* durchgeführten Studie von DeRidder et al. (2006) stehen würde. In der *in vivo* Studie von Beer et al. (2000) waren hingegen die Neuronen mehrheitlich betroffen. Dies könnte Unterschiede zwischen *in vivo* und *in vitro* widerspiegeln. Grundsätzlich bedarf dieser Befund jedoch weiterer Überprüfungen, weil die Bestimmung des Zelltyps in den Kulturen mit einem hohen Unsicherheitsfaktor verbunden war, da sich die Zellkörper apoptotischer Zellen – evtl. in Folge progredienter Zellyse – häufig nicht mehr darstellen ließen.

Die Vorläuferstudie von Hemmat (2022) zeigte weiterhin eine Korrelation zwischen PI-Aufnahme und lokaler Zunahme aktivierter Mikroglia. Mikroglia übernehmen bei intakter Blut-Hirn-Schranke eine zentrale Rolle als primäre Immunabwehrzellen des Gehirns, indem sie als Makrophagen des ZNS fungieren (Habib et al., 2014; Kettenmann et al., 2011). In physiologischer Umgebung kontrollieren sie in ihrem sog. „resting state“ die extrazelluläre Homöostase, die für die Neuronenfunktion notwendig ist. Bei pathophysiologischer Veränderung dieser Homöostase können sie innerhalb von 6-48 h nach SHT in einen aktivierten amöboiden Zustand übergehen, in welchem sie zu geschädigten Gehirnarealen

migrieren und dort unter anderem Zelltrümmer phagozytieren können (Kettenmann et al., 2011; Toklu & Tümer, 2015). Angesichts der postulierten Bedeutung dieser Zellen in der Pathophysiologie des SHT wäre es von Interesse festzustellen, ob auch in diesen Zellen Apoptose induziert wird. Dies wurde in der vorliegenden Studie auf Grund der methodischen Schwierigkeiten bei der Darstellung der Zellkörper apoptotischer Zellen (siehe oben) nicht unternommen. Verfügbare Informationen aus der Literatur sprechen jedoch dafür, dass Mikroglia im Vergleich zu Neuronen und Astrozyten nur geringfügig von Apoptose betroffen sind (Shuman et al., 1997; Zhang et al., 2004; Oligodendrozyten können im unreifen Hippocampus wegen noch nicht ausgeprägter Myelinisierung vernachlässigt werden). Umgekehrt könnten aktivierte Mikroglia, die vermehrt in Arealen mit Zelltod auftreten (Hemmat, 2022), die Ergebnisse der vorliegenden Studie beeinflusst haben, indem sie die im Verlauf des apoptotischen Prozesses gebildeten „Apoptosekörperchen“ erkannt und phagozytiert haben. Solche Zellen sind durch die TUNEL-Methode nicht mehr detektierbar. Somit könnte insbesondere die Anzahl apoptotischer Zellen zum Zeitpunkt von 24 h nach *in vitro* SHT etwas geringer als tatsächlich gegeben ausgefallen sein. Dieses Phänomen sollte die resultierende Aussage jedoch nur unwesentlich beeinträchtigen.

5.2 Neuroprotektives Potenzial von E2

Das Steroidhormon 17 β -Estradiol (E2), das potenteste der Östrogene, wird mit Hilfe des Enzyms Aromatase aus dem Vorläufer Testosteron gebildet (Arevalo et al., 2015). Es ist somit in beiden Geschlechtern vorhanden, spielt im weiblichen Organismus jedoch durch die Regulation des weiblichen Zyklus, d. h. die Stimulation von Zellproliferation und Gewebewachstum in den weiblichen Geschlechtsorganen (R. Li et al., 2014; Porter, 1974) im Laufe des Lebens eine weit größere Rolle als im männlichen. Darüber hinaus regulieren Östrogene die Knochendichte, den Fett- und Kohlenhydratstoffwechsel, den Elektrolythaushalt, die Hautphysiologie sowie das kardiovaskuläre System (Heldring et al., 2007; Turgeon et al., 2006).

Im zentralen Nervensystem wirken Östrogene in beiden Geschlechtern z. B. dadurch, dass sie die neuronale Plastizität beeinflussen (Bender et al., 2017; Taxier et al., 2020; Vierk et al., 2012). Zu diesem Zweck können kortikale Neuronen, sowie aktivierte Astrozyten E2 auch selbst synthetisieren und als Neurosteroid freisetzen (Arevalo et al., 2015; Bender et al., 2010; Furukawa et al., 1998; Hojo et al., 2004; R. Li et al., 2014; Prange-Kiel et al., 2003). Eine

besondere Aufgabe besitzt E2 darüber hinaus für die Entwicklung des Gehirns. So besagt die führende Theorie zur Etablierung männlicher und weiblicher Verhaltensweisen im Gehirn, dass in männlichen Feten Testosteron im Gehirn zu E2 umgewandelt wird und dieses eine Maskulinisierung in den für Sexualität zuständigen Kerngebieten des Hypothalamus bewirkt, während die Abwesenheit von Testosteron in weiblichen Feten zu einer Feminisierung des Verhaltens führt (McCarthy, 2010). Unzweifelhaft ist jedoch, dass die Zellen des Gehirns in Männern und Frauen während des Lebens wechselnden Konzentrationen an Sexualhormonen ausgesetzt sind und aus diesem Grund zu erwarten ist, dass sich geschlechtsspezifische Mechanismen der Signalverarbeitung herausgebildet haben (Fester & Rune, 2015; McCarthy, 2010). Dies ist auch die Grundlage für die Annahme, dass vermutete neuroprotektive Effekte von E2 (siehe unten) sich bei Männern und Frauen unterschiedlich auswirken und dadurch geschlechtsspezifische Verläufe nach SHT erklären könnten (siehe dazu 5.3).

Für die mehrfach in experimentellen Studien beobachteten, neuroprotektiven Effekte von E2 werden diverse Mechanismen diskutiert (zur Übersicht: Arevalo et al., 2015; Brotfain et al., 2016; Kövesdi et al., 2020). Dazu gehört die Reduktion von apoptotischem Zelltod durch die Förderung der Expression anti-apoptotischer Proteine wie Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*), die Hemmung pro-apoptotischer Proteine wie BAD und BIM (*Bcl2-interacting mediator of cell death*), die Unterdrückung pro-apoptotischer Signalkaskaden sowie die gesteigerte Freisetzung neuroprotektiver Wachstumsfaktoren wie *Insulin-like Growth Factor 1* (IGF1) (Arevalo et al., 2015; Behl et al., 1997; Day et al., 2013; Kövesdi et al., 2020; Liu et al., 2010; Lu et al., 2018; Soustiel et al., 2005; Taxier et al., 2020; Yang et al., 2010). Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Unterstützung der mitochondrialen Funktion. E2 fördert hier antioxidative und DNA-reparative Mechanismen und verhindert die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und Lipid-Peroxidation, wodurch Zellmembranschäden vermieden werden (Behl et al., 1997; Bellanti et al., 2013; Bethea et al., 2016; Brotfain et al., 2016; Lasisi-Sholola et al., 2024; Rekkas et al., 2014). Zusätzlich trägt E2 durch die Erhöhung der OXSPHOS-Aktivität (oxidative Phosphorylierung) und der Reduktion der ATPase-Aktivität zu einer verbesserten ATP-Produktion bei (Kövesdi et al., 2020) und verhindert die Freisetzung von Cytochrom c ins Zytosol, wodurch die nachfolgende Caspase-Aktivierung unterbunden wird (Brotfain et al., 2016; Day et al., 2013; Kövesdi et al., 2020; Soustiel et al., 2005). Darüber hinaus wirkt E2 der Exzitotoxizität entgegen, indem es in Astrozyten die Expression von Glutamat-Transportern und Glutamin-Synthase steigert, wodurch das neurotoxische Glutamat aus dem extrazellulären

Raum aufgenommen wird und in das nicht-toxische Glutamin umwandelt werden kann (Burda et al., 2016; Martin-Jiménez et al., 2019; Muñoz-Ballester & Robel, 2023).

Diese experimentellen Beobachtungen lieferten die Motivation, die Wirkung von E2 auf apoptotischen Zelltod auch im hier verwendeten *in vitro* SHT-Modell zu untersuchen. Es konnten jedoch durch Zugabe von 20 nM E2 unmittelbar nach SHT keine signifikanten Effekte auf die Apoptoserate nach 8 h und 24 h gefunden werden. Dies spricht eindeutig gegen einen neuroprotektiven Effekt von E2 in der vorliegenden Anwendung. Folgende Faktoren könnten dieses Negativresultat jedoch erklären bzw. relativieren:

1) Eine Dosisabhängigkeit des Effekts: die Wahl der hier eingesetzten E2-Konzentration fiel auf 20 nM, weil zuvor ähnliche E2-Konzentrationen zu messbaren Effekten auf die neuronale Morphologie (X. Li et al., 2021), sowie auf die Expression synaptischer Proteine im organotypischen Kulturmodell des Hippocampus geführt haben (X. Li et al., 2021; Meseke et al., 2018). Außerdem wurden in *in vivo* SHT-Studien protektive Effekte nach systemischer Gabe von E2 in physiologischer Dosis (20-80 µg/kg) nachgewiesen (Day et al., 2013; Lu et al., 2018; Soustiel et al., 2005), jedoch nicht, wenn die Dosis darunter lag (Bruce-Keller et al., 2007; Lebesgue et al., 2006). Lamprecht & Morrison (2015) fanden jedoch unter Verwendung eines ähnlichen *in vitro* SHT-Modells, dass eine geringe E2-Dosis (100 pM) Zelltod signifikant reduzierte, während bei Konzentrationen >1nM kein Effekt zu beobachten war. Eine Erklärung für diese Diskrepanz könnte darin bestehen, dass bei höheren E2-Konzentrationen kompetitive E2-Effekte die neuroprotektiven Effekte überlagern. So wurde in diversen Studien gezeigt, dass E2 NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptoren mit NR2B-Untereinheiten (*N-methyl D-aspartate receptor subtype 2B*) aktiviert und dadurch einen erhöhten Ca²⁺-Einstrom in die Nervenzelle bewirkt (Foy et al., 1999; Smith & McMahon, 2005). Außerdem bewirkt E2 kurzfristig eine Vermehrung exzitatorischer Synapsen im Hippocampus (Srivastava et al., 2013), mit der Folge, dass die Erregbarkeit des Neuronenverbands steigt. Bei einer Gewebeschädigung mit nachfolgender Exzitotoxizität ist eine erhöhte Erregbarkeit des verbleibenden Neuronenverbands jedoch kontraindiziert, da sie die Exzitotoxizität noch verstärkt. Dies könnte der Grund sein, warum bei vergleichsweise hoher E2-Konzentration kein neuroprotektiver Effekt zu beobachten ist, während die erregende Komponente bei geringer E2-Dosis gegenüber der protektiven möglicherweise in den Hintergrund tritt. Es wäre daher eine sinnvolle Erweiterung der vorliegenden Studien, die E2-Wirkung auf Apoptose dosisabhängig zu untersuchen.

2) Die Dauer der Behandlung: Es ist möglich, dass E2 akut zwar keinen neuroprotektiven Effekt zeigt, bei längerer Gabe die Regenerationsfähigkeit des Neuronenverbands jedoch steigert. Anlass für diese Vermutung bietet der Befund, dass Astrozyten Rezeptoren für E2 besitzen und nach Gewebeschädigung sogar selbst damit beginnen, E2 zu produzieren (Arevalo et al., 2015; Azcoitia et al., 2010). Umgekehrt bewirkt E2 in Astrozyten die Erhöhung der Expression des Intermediärfilaments GFAP und eine Anpassung der Astrozytenmorphologie an die veränderten, pathologischen Bedingungen (Burda et al., 2016; Martin-Jiménez et al., 2019). Wie die Studie von Bongarts (2024; siehe auch Hemmat / Bongarts / Meiringer et al., 2024) vermuten lässt, benötigt diese Aktivierung jedoch einige Zeit, da eine erhöhte GFAP-Expression nach E2-Gabe erst nach 48 h zu beobachten war (Hemmat / Bongarts / Meiringer et al., 2024). Es ist somit denkbar, dass protektive Effekte – z. B. wenn sie über Astrozyten vermittelt werden – erst nach 48 h (oder später) in Erscheinung treten. Um diese Hypothese zu testen, wäre ein längerer Untersuchungszeitraum zu wählen. Es ist dann jedoch zu erwarten, dass diese protektiven Effekte nicht die Apoptose in der Akutphase betreffen, sondern eher eine Verstärkung der Aufgaben der Astrozyten, wie z. B. die Stabilisierung der Homöostase im Neuronenverband, bewirken.

5.3 Geschlechtsspezifische Einflüsse auf neurodegenerative Prozesse nach SHT

Geschlechtsspezifische Einflüsse auf neurodegenerative Prozesse nach einem SHT werden auf Grundlage präklinischer und klinischer Befunde angenommen. Die Effekte endogener Geschlechtshormone sowie therapeutisch applizierter Hormone auf den Schweregrad der Verletzung und die daraus resultierenden Behandlungsergebnisse werden jedoch in der wissenschaftlichen Literatur kontrovers diskutiert (siehe Späni et al., 2018). Einige Studien legen nahe, dass Frauen tendenziell weniger Komplikationen erleiden und eine günstigere klinische Prognose nach einem SHT aufweisen (Berry et al., 2009; Ratcliff et al., 2007). Dieser Vorteil scheint insbesondere bei jüngeren Patientinnen ausgeprägt zu sein (Bayir et al., 2004; Ley et al., 2013). Tierexperimentelle Studien liefern dafür unterstützende Hinweise: So wiesen weibliche Nagetiere nach Ovariectomie stärkere neurologische Defizite nach einem experimentell induzierten SHT auf als nicht-ovariectomierte Kontrollen. Interessanterweise waren die Resultate weiblicher Tiere nach Ovariectomie mit denen männlicher Nagetiere vergleichbar, so dass daraus geschlossen werden kann, dass weibliche Sexualhormone auf die Pathologie Einfluss nahmen (Bramlett & Dietrich, 2001). In eine ähnliche Richtung weisen Studien, die herausfanden, dass das Ausmaß der Gewebeschädigung nach experimenteller

SHT *in vivo* in weiblichen Nagern im Durchschnitt geringer war als in männlichen (Gölz et al., 2019; Roof et al., 1996; Villapol et al., 2017). In der Studie von Gölz et al. (2019) wird darüber hinaus ein statistisch erhöhter *Neuroscore* (= zusammengefasstes Ergebnis mehrerer neurologischer Tests) berichtet, wenn die endogene Synthese von E2 durch Gabe des Aromatase-Inhibitors Letrozol unterbunden wurde. Allerdings existieren auch gegenteilige Befunde: Emerson et al. (1993) berichteten, dass männliche Nagetiere nach einem experimentellen SHT (*Fluid Percussion Injury*) von einer Behandlung mit E2 profitierten, während die gleiche Behandlung bei weiblichen Nagetieren die Folgen des Traumas verschlimmerte. Roof & Hall (2000) beobachteten hingegen eine ausgeprägte neuroprotektive Wirkung der E2-Gabe bei weiblichen Nagetieren. Dieser Effekt wurde auf den Erhalt des zerebralen Blutflusses zurückgeführt.

In der vorliegenden Studie wurden Kulturen aus männlichen und weiblichen Mäusen getrennt analysiert, um mögliche Geschlechtsunterschiede in der Apoptoserate oder der Reaktion auf E2 zu identifizieren. Es ergaben sich jedoch keine signifikanten Hinweise auf derartige Geschlechtsunterschiede. Denkbar wäre jedoch eine verzögerte Apoptose in den männlichen Kulturen (der Zeitfaktor wurde bei der statistischen Analyse nicht berücksichtigt), da in diesen die Apoptoserate im Gegensatz zu den weiblichen erst nach 24 h signifikant erhöht war. Jedoch lässt die insgesamt hohe Variabilität in den SHT-behandelten Kulturen eine solche Interpretation unsicher erscheinen. Hinzu kommt, dass eine E2-Gabe in beiden Geschlechtern keine merkliche Änderung der Apoptoserate bewirkte, so dass eine geschlechtsspezifische Wirkung des Sexualhormons – bei vorliegender Anwendung – ausgeschlossen werden kann. Um in dieser Frage verlässliche Schlüsse ziehen zu können, müsste das Modell mindestens dahingehend modifiziert werden, dass die Gewebekompression den apoptotischen Zelltod zuverlässiger induziert (siehe 5.4.). Zu bedenken ist dann jedoch immer noch, dass es sich bei den Hippocampuskulturen um neuronales Gewebe von immaturren Tieren handelt, die (im Falle der Weibchen) noch nicht in den Sexualzyklus eingetreten sind. Mit Beginn der Sexualreife verändert sich jedoch auch der Einfluss der Sexualhormone, da sich u. a. die Expression von Sexualhormonrezeptoren ändert (für Östrogenrezeptoren, siehe: Bean et al., 2014). Mit dem hier verwendeten Kulturmodell kann man somit nur relevante Aussagen für eine frühe Entwicklungsphase treffen (siehe 5.4.).

5.4 Stärken und Limitationen der Methode

Die hier verwendete „*rolling cylinder*-Technik“, modifiziert nach Adamchik et al. (2000), stellt ein *in vitro* Modell für SHT dar, das ursprünglich entwickelt wurde, um die Ausbreitung einer primären Schädigung nach mechanischer Krafteinwirkung im hippocampalen Gewebe zu bestimmen (Adamchik et al., 2000). Dabei rollt ein Stahlzylinder mit festgelegten Maßen über organotypische hippocampale Gewebeschnitte und übt definierte Druck- und Scherkräfte auf die Kulturen aus. In der Literatur sind noch weitere *in vitro* SHT-Modelle beschrieben, die nach dem 3R-Prinzip (*replace, reduce, refine*) den Einsatz von Tierversuchen in der Wissenschaft auf ein vertretbares Maß begrenzen sollen und jeweils spezifische Aspekte eines SHT abzudecken versuchen: z. B. die *blast-induced injury* (Campos-Pires et al., 2018; Miller et al., 2015), die *stretch-induced injury* (Di Pietro et al., 2013, 2015; Lamprecht & Morrison, 2015), oder die *blunt injury* (Harris et al., 2013).

Der Vorteil all dieser Modelle ist eine (im Vergleich zu Versuchstieren) relativ einfache experimentelle Manipulierbarkeit eines intakten neuronalen Gewebeverbands (bzgl. anatomischer und synaptischer Organisation), sowie die Möglichkeit, weitaus mehr Stichproben durchzuführen (d. h. ein höheres „n“ zu erhalten) als in Tierversuchen in der Regel erreichbar sind. Dadurch eröffnet sich auch die Möglichkeit, Substanzen *in vitro* zu testen (wie hier E2), um daraus grundlegende Erkenntnisse über ihr neuroprotektives Potenzial zu gewinnen. Voraussetzung dafür ist jedoch eine streng kontrollierte Vergleichbarkeit der eingesetzten Kulturen. Um diese zu erreichen, wurden in der vorliegenden Arbeit stets nur Gewebeschnitte aus Kulturtriplets – bestehend aus experimentell unterschiedlich behandelten, jedoch auf Grund ihrer benachbarten Lage im Hippocampus anatomisch nahezu identischen Kulturen – miteinander verglichen. Dieses Vorgehen ermöglichte jeweils die unbehandelte Kontrolle aus dem Triplet als „Norm“ zu nehmen und die Resultate aus den experimentell behandelten Kulturen des Triplets (SHT bzw. SHT+E2) dazu in Vergleich zu setzen. Dadurch wurde die *intra*-experimentelle Variabilität stark reduziert und Tendenzen wurden deutlich. Allerdings stellte sich zusätzlich eine markante *inter*-experimentelle Variabilität ein, die die statistische Auswertung erschwerte. Diese *inter*-experimentelle Variabilität ist vermutlich dadurch zu erklären, dass die hippocampalen Kulturen die kurzfristige Kompression mehrheitlich gut tolerierten und diese somit nicht zu einer erhöhten Anzahl apoptotischer Nuklei führte. Eine ähnliche Verteilung wurde bereits bei der Bestimmung der PI-Aufnahme in den Vorläuferstudien von Hemmat (2022) und Bongarts (2024) beobachtet. Es muss daraus

gefolgert werden, dass die im Modell gewählte mechanische Belastung eine eher milde Schädigung hervorruft und somit am ehesten das Krankheitsbild eines *mild diffuse* SHT widerspiegelt (die häufigste Form eines SHT: Maas et al., 2022). Für die Untersuchung pathologischer Prozesse wären jedoch stärkere Effekte wünschenswert und daher sollten in künftigen Untersuchungen Methoden erprobt werden (z. B. stärkere Gewichte oder wiederholte Kompression), die den Zelltod zuverlässiger hervorrufen. Dennoch war es möglich, aus den Studienergebnissen Resultate zu extrahieren, die weitere Untersuchungen wertvoll erscheinen lassen (siehe dazu auch 5.5): So konnte gezeigt werden, dass apoptotischer Zelltod im Modell bereits nach wenigen Stunden sowohl in Neuronen als auch in Astrozyten auftritt und bevorzugt im SP vorkommt. Dieser Befund ermöglicht eine Eingrenzung sowohl des Zeitfensters als auch der Lokalisation, sollte man die Abläufe bei diesem apoptotischen Zelltod näher untersuchen wollen. Dies könnte beispielsweise in Zusammenhang mit der Mikroglia-Reaktion von Interesse sein, die ein Resultat der Vorläufer-Studie von Hemmat (2022) war. Hier zeigte sich häufig eine Ansammlung von Mikroglia in der unmittelbaren Umgebung absterbender (PI-positiver) Zellen. Auch die experimentelle Zugänglichkeit der Gewebekulturen – z. B. auch für *Live-Imaging* und ähnliche Techniken – bietet Möglichkeiten, diese Abläufe näher zu untersuchen und ggf. zu beeinflussen.

Dem Vorteil einer guten experimentellen Manipulierbarkeit der Gewebekulturen steht speziell für die Untersuchung der Folgen eines SHT als schwerwiegender Nachteil die Isolation der Kultur vom Rest des Körpers entgegen. Denn systemische Folgen eines SHT, wie z. B. die Einwanderung peripherer Immunzellen nach Disruption der Blut-Hirn-Schranke oder eine Hypoxie infolge einer Unterbrechung der Blutversorgung (Jacquens et al., 2022; Werner & Engelhard, 2007), sind dadurch einer Untersuchung nicht zugänglich bzw. müssen in speziell dafür entworfenen experimentellen Settings erzeugt werden. Der Nutzen des Modells besteht daher vorrangig in der Untersuchung grundlegender pathologischer Prozesse, wie z. B. der Astrozyten- oder Mikroglia-Aktivierung, die, wie im Modell gezeigt (Hemmat / Bongarts / Meiringer et al., 2024), auch *in vitro* darstellbar sind.

Weiterhin muss einschränkend betont werden, dass organotypische hippocampale Gewebekulturen unreifes neuronales Gewebe darstellen. Ihre Präparation aus Mäusen muss innerhalb von ca. 10 Tagen postnatal erfolgen (hier P7 und P8) und die Schnitte können für 3-4 Wochen (hier 14-16 Tage) in Kultur gehalten werden. Es handelt sich somit um neuronale Netzwerke im Entwicklungsstadium, die plastischer und damit widerstandfähiger gegenüber

Verletzungen sind als älteres Gewebe, das eine weit begrenztere Regenerationsfähigkeit besitzt (Del Turco & Deller, 2007; Stoppini et al., 1991). Da SHT überwiegend bei Erwachsenen (72 %) und vergleichsweise selten bei Kindern unter 16 Jahren (28 %) auftreten (Rickels et al., 2010), schränkt auch dieses Faktum den Interpretationspielraum der Ergebnisse ein.

5.5 Interpretation und zukünftige Perspektiven

Die primäre Verletzung eines SHT ist in der Regel nicht vorhersehbar und bietet somit nur schlecht die Möglichkeit zur therapeutischen Prävention. Die durch die Primärschäden ausgelösten Prozesse der sekundären Schädigung hingegen bieten ein geeignetes Zeitfenster zur therapeutischen Intervention. Wie auch die Daten der vorliegenden Studie nahelegen, scheint vor allem der frühe Zeitabschnitt nach der mechanischen Krafteinwirkung für eine therapeutische Einflussnahme, die dazu beiträgt langwierige Sekundärschäden zu reduzieren, geeignet zu sein (Arevalo et al., 2015; Johann & Beyer, 2013). Eine diesem Ziel gerecht werdende Therapiemethode wurde bislang jedoch noch nicht gefunden.

Ein SHT ist eine komplexe und facettenreiche Erkrankung, der kein existierendes Modell bislang vollständig gerecht wird (Kövesdi et al., 2020; Sulhan et al., 2020). Dies gilt angesichts der oben genannten Einschränkungen in verstärktem Maße für das in der vorliegenden Untersuchung eingesetzte *in vitro*-Modell. Dieses kann zwar nur Detailspekte abbilden, die jedoch für nähere Untersuchungen zugänglich sind – so beispielsweise der Mechanismus der beobachteten Apoptose. Wird sie extrinsisch oder intrinsisch induziert? Ist die Ansammlung von Mikroglia in der Umgebung der absterbenden Zellen Ursache oder Folge der Apoptose? Dies sind Fragen, die mit Hilfe des Modells untersucht und potenziell beantwortet werden können. Auch das Negativresultat eines nicht-protektiven Effekts von hoch dosiertem E2 auf die Induktion der Apoptose ist nicht *per se* entmutigend, sondern regt angesichts entsprechender Literaturhinweise dazu an, niedrigere Konzentration im Modell zu testen und dies vielleicht sogar über einen längeren Zeitraum hinweg. Sollte sich bei niedrig dosiertem E2 ein protektiver Effekt bestätigen, könnte das Modell genutzt werden, um die zu Grunde liegenden Mechanismen detaillierter zu untersuchen.

Hinzu kommt, dass neben E2 auch bei anderen Sexualhormonen neuroprotektive Eigenschaften vermutet werden, die analog im Modell untersucht werden könnten. So wird in einigen Studien ein neuroprotektiver Einfluss des weiblichen Sexualhormons Progesteron

nahegelegt (Barha et al., 2011). Dem potentesten Androgen, DHT, werden dagegen Apoptose-fördernde Eigenschaften zugeschrieben. So führte eine Hemmung des DHT-generierenden Enzyms 5 α -Reduktase in einem *in vivo* SHT-Modell zu einer Reduktion des Calpain-vermittelten Proteinabbaus (Gölz et al., 2019).

Zusammenfassend stellt die vorliegende Studie an einem *in vitro* SHT-Modell den Versuch dar, am Detail der durch mechanische Schädigung im Hirngewebe induzierten Apoptose zu einem besseren Verständnis der komplexen neurodegenerativen Prozesse nach SHT, sowie der Rolle von Sexualhormonen dabei, zu gelangen. Ein solches Verständnis könnte auch neue Ansätze für die Behandlung von Krankheiten wie Alzheimer, Parkinson und Multiple Sklerose eröffnen. Der hormonelle Status und die Regulation der Sexualhormone im Gehirn stellen hier wichtige Forschungsfelder dar, die in *in vitro* Modellen theoretisch voruntersucht werden können, bevor Tierversuche konzipiert werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Schädel-Hirn-Traumata (SHT) stellen ein bedeutendes medizinisches und sozioökonomisches Problem dar, da sie neurodegenerative Prozesse mit langfristigen kognitiven und funktionellen Beeinträchtigungen auslösen können. Bisher spielen Tiermodelle eine zentrale Rolle bei der Forschung – sie sind jedoch kostenintensiv und ethisch umstritten. Diese Arbeit untersucht mithilfe eines *in vitro* Modells auf Basis organotypischer hippocampaler Gewebekulturen das Ausmaß von SHT-induziertem apoptotischen Zelltod sowie mögliche neuroprotektive Effekte von 17 β -Estradiol (E2).

Zur mechanischen Schädigung wurde die „*rolling cylinder*-Technik“ eingesetzt und deren Folgen nach 8 h und 24 h analysiert. Der Fokus lag auf apoptotischem Zelltod im *Stratum pyramidale* (SP) und in den *Strata radiatum/lacunosum moleculare* (SR/SLM) der CA1-Region, detektiert mittels TUNEL-Technik. Immunhistochemische Färbungen (Neuronen: NeuN, Astrozyten: GFAP) ermöglichten die Differenzierung betroffener Zelltypen.

Die Ergebnisse zeigten durch *in vitro* SHT induzierten apoptotischen Zelltod in Neuronen sowie in Astrozyten, insbesondere nach 8 h im SP, mit weitestgehendem Rückgang nach 24 h. Neuroprotektive Effekte von E2 wurden nicht bestätigt. Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Apoptoserate zu den unterschiedlichen Zeitpunkten deuteten sich an.

Außerdem zeigte sich eine hohe Variabilität der Ergebnisse zwischen den Kulturen, was auf Optimierungspotenziale der Versuchsmethodik hinweist. Grundsätzlich bietet diese Arbeit jedoch eine funktionierende Grundlage für die Weiterentwicklung *in vitro*-basierter Untersuchungen zu sekundären Schäden nach SHT und deren pharmakologischer Modulation.

6.1 Summary

Traumatic brain injury (TBI) represents a significant medical and socio-economic problem, as it can trigger neurodegenerative processes leading to long-term cognitive and functional impairments. To date, animal models have played a central role in research – however they are costly and ethically controversial. This study uses an in vitro model based on organotypic hippocampal tissue cultures to investigate the extent of TBI-induced apoptotic cell death and potential neuroprotective effects of 17 β -estradiol (E2).

The “rolling cylinder-technique” was used to induce mechanical damage, and its consequences were analyzed after 8 h and 24 h. The focus was on apoptotic cell death in the stratum pyramidale (SP) and in the strata radiatum/lacunosum moleculare (SR/SLM) of the CA1 region, detected via the TUNEL-technique. Immunohistochemical staining (neurons: NeuN, astrocytes: GFAP) allowed the differentiation of affected cell types.

The results showed TBI-induced apoptotic cell death in both neurons and astrocytes, especially after 8 h in the SP, with extensive regression by 24 h. Neuroprotective effects of E2 were not confirmed. However, sex-specific differences in apoptosis rates at the different time points were indicated.

Additionally, high variability in results across cultures indicated optimization potential in the experimental methodology. Nonetheless, this study provides a functional foundation for the further development of in vitro-based investigations into secondary damage following TBI and its pharmacological modulation.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Abdul-Muneer, P. M., Long, M., Conte, A. A., Santhakumar, V., & Pfister, B. J. (2017). High Ca²⁺ Influx During Traumatic Brain Injury Leads to Caspase-1-Dependent Neuroinflammation and Cell Death. *Molecular Neurobiology*, *54*(6), 3964–3975. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9949-4>.
- Adamchik, Y., Frantseva, M. V., Weisspapir, M., Carlen, P. L., & Perez Velazquez, J. L. (2000). Methods to induce primary and secondary traumatic damage in organotypic hippocampal slice cultures. *Brain Research Protocols*, *5*(2), 153–158. [https://doi.org/10.1016/S1385-299X\(00\)00007-6](https://doi.org/10.1016/S1385-299X(00)00007-6).
- Andersen, P. (with Morris, R., Amaral, D., Bliss, T., & O'Keefe, J.). (2006). *The Hippocampus Book*. Oxford University Press, Incorporated.
- Andriessen, T. M. J. C., Jacobs, B., & Vos, P. E. (2010). Clinical characteristics and pathophysiological mechanisms of focal and diffuse traumatic brain injury. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *14*(10), 2381–2392. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01164.x>.
- Arevalo, M.-A., Azcoitia, I., & Garcia-Segura, L. M. (2015). The neuroprotective actions of oestradiol and oestrogen receptors. *Nature Reviews Neuroscience*, *16*(1), 17–29. <https://doi.org/10.1038/nrn3856>.
- Azcoitia, I., Santos-Galindo, M., Arevalo, M. A., & Garcia-Segura, L. M. (2010). Role of astroglia in the neuroplastic and neuroprotective actions of estradiol. *European Journal of Neuroscience*, *32*(12), 1995–2002. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07516.x>.
- Balakin, E., Yurku, K., Fomina, T., Butkova, T., Nakhod, V., Izotov, A., Kaysheva, A., & Pustovoyt, V. (2024). A Systematic Review of Traumatic Brain Injury in Modern Rodent Models: Current Status and Future Prospects. *Biology*, *13*(10), 813. <https://doi.org/10.3390/biology13100813>.
- Barha, C. K., Ishrat, T., Epp, J. R., Galea, L. A. M., & Stein, D. G. (2011). Progesterone treatment normalizes the levels of cell proliferation and cell death in the dentate gyrus of the hippocampus after traumatic brain injury. *Experimental Neurology*, *231*(1), 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.05.016>.
- Bayir, H., Marion, D. W., Puccio, A. M., Wisniewski, S. R., Janesko, K. L., Clark, R. S. B., & Kochanek, P. M. (2004). Marked Gender Effect on Lipid Peroxidation after Severe Traumatic Brain Injury in Adult Patients. *Journal of Neurotrauma*, *21*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1089/089771504772695896>.
- Bayir, H., Kagan, V. E., Borisenko, G. G., Tyurina, Y. Y., Janesko, K. L., Vagni, V. A., Billiar, T. R., Williams, D. L., & Kochanek, P. M. (2005). Enhanced Oxidative Stress in iNOS-Deficient Mice after Traumatic Brain Injury: Support for a Neuroprotective Role of iNOS. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, *25*(6), 673–684. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600068>.

- Bean, L. A., Ivanov, L., & Foster, T. C. (2014). Estrogen Receptors, the Hippocampus, and Memory. *The Neuroscientist*, 20(5), 534–545. <https://doi.org/10.1177/1073858413519865>.
- Beer, R., Franz, G., Srinivasan, A., Hayes, R. L., Pike, B. R., Newcomb, J. K., Zhao, X., Schmutzhard, E., Poewe, W., & Kampfl, A. (2000). Temporal Profile and Cell Subtype Distribution of Activated Caspase-3 Following Experimental Traumatic Brain Injury. *Journal of Neurochemistry*, 75(3), 1264–1273. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0751264.x>.
- Behl, C., Skutella, T., Lezoualc'H, F., Post, A., Widmann, M., Newton, C. J., & Holsboer, F. (1997). Neuroprotection against Oxidative Stress by Estrogens: Structure-Activity Relationship. *Molecular Pharmacology*, 51(4), 535–541. <https://doi.org/10.1124/mol.51.4.535>.
- Bellanti, F., Matteo, M., Rollo, T., De Rosario, F., Greco, P., Vendemiale, G., & Serviddio, G. (2013). Sex hormones modulate circulating antioxidant enzymes: Impact of estrogen therapy. *Redox Biology*, 1(1), 340–346. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.05.003>.
- Bender, R. A., Zhou, L., Vierk, R., Brandt, N., Keller, A., Gee, C. E., Schäfer, M. K. E., & Rune, G. M. (2017). Sex-Dependent Regulation of Aromatase-Mediated Synaptic Plasticity in the Basolateral Amygdala. *The Journal of Neuroscience*, 37(6), 1532–1545. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1532-16.2016>.
- Bender, R. A., Zhou, L., Wilkars, W., Fester, L., Lanowski, J.-S., Paysen, D., König, A., & Rune, G. M. (2010). Roles of 17 β -Estradiol Involve Regulation of Reelin Expression and Synaptogenesis in the Dentate Gyrus. *Cerebral Cortex*, 20(12), 2985–2995. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhq047>.
- Berry, C., Ley, E. J., Tillou, A., Cryer, G., Margulies, D. R., & Salim, A. (2009). The Effect of Gender on Patients With Moderate to Severe Head Injuries. *Journal of Trauma: Injury, Infection & Critical Care*, 67(5), 950–953. <https://doi.org/10.1097/TA.0b013e3181ba3354>.
- Bethea, C. L., Kohama, S. G., Reddy, A. P., & Urbanski, H. F. (2016). Ovarian steroids regulate gene expression in the dorsal raphe of old female macaques. *Neurobiology of Aging*, 37, 179–191. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.10.004>.
- Bongarts, L. (2024). Untersuchung der Astrozytenaktivierung in einem in vitro-Modell für Hirntrauma. *Doktorarbeit. Staats-und Universitätsbibliothek Hamburg Carl von Ossietzky*.
- Borlongan, C., Acosta, S., De La Pena, I., Tajiri, N., Kaneko, Y., Lozano, D., & Gonzales-Portillo, G. (2015). Neuroinflammatory responses to traumatic brain injury: Etiology, clinical consequences and therapeutic opportunities. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 97. <https://doi.org/10.2147/NDT.S65815>.
- Bramlett, H. M., & Dietrich, W. D. (2001). Neuropathological Protection after Traumatic Brain Injury in Intact Female Rats Versus Males or Ovariectomized Females. *Journal of Neurotrauma*, 18(9), 891–900. <https://doi.org/10.1089/089771501750451811>.

- Brotfain, E., E. Gruenbaum, S., Boyko, M., Kutz, R., Zlotnik, A., & Klein, M. (2016). Neuroprotection by Estrogen and Progesterone in Traumatic Brain Injury and Spinal Cord Injury. *Current Neuropharmacology*, 14(6), 641–653. <https://doi.org/10.2174/1570159X14666160309123554>.
- Bruce-Keller, A. J., Dimayuga, F. O., Reed, J. L., Wang, C., Angers, R., Wilson, M. E., Dimayuga, V. M., & Scheff, S. W. (2007). Gender and Estrogen Manipulation Do Not Affect Traumatic Brain Injury in Mice. *Journal of Neurotrauma*, 24(1), 203–215. <https://doi.org/10.1089/neu.2006.0163>.
- Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., & Wang, X. (1999). Biochemical Pathways of Caspase Activation During Apoptosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 15(1), 269–290. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.15.1.269>.
- Burda, J. E., Bernstein, A. M., & Sofroniew, M. V. (2016). Astrocyte roles in traumatic brain injury. *Experimental Neurology*, 275, 305–315. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.03.020>.
- Campos-Pires, R., Koziakova, M., Yonis, A., Pau, A., Macdonald, W., Harris, K., Edge, C. J., Franks, N. P., Mahoney, P. F., & Dickinson, R. (2018). Xenon Protects against Blast-Induced Traumatic Brain Injury in an In Vitro Model. *Journal of Neurotrauma*, 35(8), 1037–1044. <https://doi.org/10.1089/neu.2017.5360>.
- Cater, H. L., Gitterman, D., Davis, S. M., Benham, C. D., Morrison, B., & Sundstrom, L. E. (2007). Stretch-induced injury in organotypic hippocampal slice cultures reproduces in vivo post-traumatic neurodegeneration: Role of glutamate receptors and voltage-dependent calcium channels. *Journal of Neurochemistry*, 101(2), 434–447. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04379.x>.
- Chauhan, P., Jethwa, K., Rathawa, A., Chauhan, G., & Mehra, S. (2021). The Anatomy of the Hippocampus. In Laboratory of Ischemic and Neurodegenerative Brain Research, Mossakowski Medical Research Institute, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland & P. Ryszard (Hrsg.), *Cerebral Ischemia* (S. 17–30). Exon Publications. <https://doi.org/10.36255/exonpublications.cerebralischemia.2021.hippocampus>.
- Chiu, C.-C., Liao, Y.-E., Yang, L.-Y., Wang, J.-Y., Tweedie, D., Karnati, H. K., Greig, N. H., & Wang, J.-Y. (2016). Neuroinflammation in animal models of traumatic brain injury. *Journal of Neuroscience Methods*, 272, 38–49. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2016.06.018>.
- Cho, S. (2004). Spatiotemporal evidence of apoptosis-mediated ischemic injury in organotypic hippocampal slice cultures. *Neurochemistry International*, 45(1), 117–127. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2003.11.012>.
- Chong, Z. Z., Li, F., & Maiese, K. (2005). Oxidative stress in the brain: Novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease. *Progress in Neurobiology*, 75(3), 207–246. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.02.004>.
- Coburn, M., Maze, M., & Franks, N. P. (2008). The neuroprotective effects of xenon and helium in an in vitro model of traumatic brain injury. *Critical Care Medicine*, 36(2), 588–595. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0B013E3181611F8A6>.

- Conti, E., Uy, M., Leighton, L., Blobel, G., & Kuriyan, J. (1998). Crystallographic Analysis of the Recognition of a Nuclear Localization Signal by the Nuclear Import Factor Karyopherin α . *Cell*, *94*(2), 193–204. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81419-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81419-1).
- Day, N. L., Floyd, C. L., D'Alessandro, T. L., Hubbard, W. J., & Chaudry, I. H. (2013). 17 β -Estradiol Confers Protection after Traumatic Brain Injury in the Rat and Involves Activation of G Protein-Coupled Estrogen Receptor 1. *Journal of Neurotrauma*, *30*(17), 1531–1541. <https://doi.org/10.1089/neu.2013.2854>.
- Del Turco, D., & Deller, T. (2007). Organotypic Entorhino-Hippocampal Slice Cultures—A Tool to Study the Molecular and Cellular Regulation of Axonal Regeneration and Collateral Sprouting In Vitro. In T. Borsello (Hrsg.), *Neuroprotection Methods and Protocols* (Bd. 399, S. 55–66). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-504-6_5.
- DeRidder, M. N., Simon, M. J., Siman, R., Auberson, Y. P., Raghupathi, R., & Meaney, D. F. (2006). Traumatic mechanical injury to the hippocampus in vitro causes regional caspase-3 and calpain activation that is influenced by NMDA receptor subunit composition. *Neurobiology of Disease*, *22*(1), 165–176. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2005.10.011>.
- Destrieux, C., D. Bourry, & Velut, S. (2013). Surgical anatomy of the hippocampus. *Neurochirurgie*, *59*(4–5), 149–158. <https://doi.org/10.1016/j.neuchi.2013.08.003>.
- Di Pietro, V., Amorini, A. M., Lazzarino, G., Yakoub, K. M., D'Urso, S., Lazzarino, G., & Belli, A. (2015). S100B and Glial Fibrillary Acidic Protein as Indexes to Monitor Damage Severity in an In Vitro Model of Traumatic Brain Injury. *Neurochemical Research*, *40*(5), 991–999. <https://doi.org/10.1007/s11064-015-1554-9>.
- Di Pietro, V., Amorini, A. M., Tavazzi, B., Hovda, D. A., Signoretti, S., Giza, C. C., Lazzarino, G., Vagnozzi, R., Lazzarino, G., & Belli, A. (2013). Potentially neuroprotective gene modulation in an in vitro model of mild traumatic brain injury. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *375*(1–2), 185–198. <https://doi.org/10.1007/s11010-012-1541-2>.
- Duarte-Guterman, P., Yagi, S., Chow, C., & Galea, L. A. M. (2015). Hippocampal learning, memory, and neurogenesis: Effects of sex and estrogens across the lifespan in adults. *Hormones and Behavior*, *74*, 37–52. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2015.05.024>.
- Emerson, C. S., Headrick, J. P., & Vink, R. (1993). Estrogen improves biochemical and neurologic outcome following traumatic brain injury in male rats, but not in females. *Brain Research*, *608*(1), 95–100. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)90778-L](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)90778-L).
- Fester, L., & Rune, G. M. (2015). Sexual neurosteroids and synaptic plasticity in the hippocampus. *Brain Research*, *1621*, 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.10.033>.
- Fleminger, S. (2008). Long-term psychiatric disorders after traumatic brain injury: *European Journal of Anaesthesiology*, *25*, 123–130. <https://doi.org/10.1017/S0265021507003250>.

- Foy, M. R., Xu, J., Xie, X., Brinton, R. D., Thompson, R. F., & Berger, T. W. (1999). 17 β -Estradiol Enhances NMDA Receptor-Mediated EPSPs and Long-Term Potentiation. *Journal of Neurophysiology*, 81(2), 925–929. <https://doi.org/10.1152/jn.1999.81.2.925>.
- Frotscher, M., & Kahle, W. (Hrsg.). (2002). *Taschenatlas der Anatomie: In 3 Bänden. 3: Nervensystem und Sinnesorgane / Werner Kahle. Fortgef. von Michael Frotscher. Zeichn. von Gerhard Spitzer* (8., korrigierte Aufl).
- Furukawa, A., Miyatake, A., Ohnishi, T., & Ichikawa, Y. (1998). Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR) Transcripts Constitutively Expressed in the Adult Rat Central Nervous System: Colocalization of StAR, Cytochrome P-450SCC (CYP XIA1), and 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase in the Rat Brain. *Journal of Neurochemistry*, 71(6), 2231–2238. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1998.71062231.x>.
- Galgano, M., Toshkezi, G., Qiu, X., Russell, T., Chin, L., & Zhao, L.-R. (2017). Traumatic Brain Injury: Current Treatment Strategies and Future Endeavors. *Cell Transplantation*, 26(7), 1118–1130. <https://doi.org/10.1177/0963689717714102>.
- Gölz, C., Kirchhoff, F. P., Westerhorstmann, J., Schmidt, M., Hirnet, T., Rune, G. M., Bender, R. A., & Schäfer, M. K. E. (2019). Sex hormones modulate pathogenic processes in experimental traumatic brain injury. *Journal of Neurochemistry*, 150(2), 173–187. <https://doi.org/10.1111/jnc.14678>.
- Greve, M. W., & Zink, B. J. (2009). Pathophysiology of traumatic brain injury. *Mount Sinai Journal of Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine*, 76(2), 97–104. <https://doi.org/10.1002/msj.20104>.
- Habib, P., Slowik, A., Zendedel, A., Johann, S., Dang, J., & Beyer, C. (2014). Regulation of Hypoxia-Induced Inflammatory Responses and M1-M2 Phenotype Switch of Primary Rat Microglia by Sex Steroids. *Journal of Molecular Neuroscience*, 52(2), 277–285. <https://doi.org/10.1007/s12031-013-0137-y>.
- Hagebusch, P., Pingel, A., Kandziora, F., Hoffmann, R., & Schweigkofler, U. (2020). Das Schädel-Hirn-Trauma im Erwachsenenalter: Aktuelle präklinische Handlungsempfehlungen. *Notfallmedizin up2date*, 15(01), 59–74. <https://doi.org/10.1055/a-0958-0649>.
- Harms, C., Lautenschlager, M., Bergk, A., Katchanov, J., Freyer, D., Kapinya, K., Herwig, U., Megow, D., Dirnagl, U., Weber, J. R., & Hörtnagl, H. (2001). Differential Mechanisms of Neuroprotection by 17 β -Estradiol in Apoptotic versus Necrotic Neurodegeneration. *The Journal of Neuroscience*, 21(8), 2600–2609. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-08-02600.2001>.
- Harris, K., Armstrong, S. P., Campos-Pires, R., Kiru, L., Franks, N. P., & Dickinson, R. (2013). Neuroprotection against Traumatic Brain Injury by Xenon, but Not Argon, Is Mediated by Inhibition at the N-Methyl-D-Aspartate Receptor Glycine Site. *Anesthesiology*, 119(5), 1137–1148. <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e3182a2a265>.

- Heldring, N., Pike, A., Andersson, S., Matthews, J., Cheng, G., Hartman, J., Tujague, M., Ström, A., Treuter, E., Warner, M., & Gustafsson, J.-Å. (2007). Estrogen Receptors: How Do They Signal and What Are Their Targets. *Physiological Reviews*, 87(3), 905–931. <https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2006>.
- Hemmat, H. (2022). Einfluss von Östrogen auf neurodegenerative Prozesse in einem in vitro-Modell für traumatische Hirnschädigung. *Doktorarbeit. Staats-und Universitätsbibliothek Hamburg Carl von Ossietzky*. <https://ediss.sub.uni-hamburg.de/bitstream/ediss/9884/1/Dissertation%20.pdf>.
- Hojo, Y., Hattori, T., Enami, T., Furukawa, A., Suzuki, K., Ishii, H., Mukai, H., Morrison, J. H., Janssen, W. G. M., Kominami, S., Harada, N., Kimoto, T., & Kawato, S. (2004). Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017 α and P450 aromatase localized in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(3), 865–870. <https://doi.org/10.1073/pnas.2630225100>.
- Hoppe, K., & Klingler, W. (2021). Schädel-Hirn-Trauma: Pathophysiologie und Notfallmanagement. *Anästh Intensivmed*, 62, 118–127. <https://doi.org/10.19224/ai2021.118>.
- Jacquens, A., Needham, E. J., Zanier, E. R., Degos, V., Gressens, P., & Menon, D. (2022). Neuro-Inflammation Modulation and Post-Traumatic Brain Injury Lesions: From Bench to Bed-Side. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19), 11193. <https://doi.org/10.3390/ijms231911193>.
- Johann, S., & Beyer, C. (2013). Neuroprotection by gonadal steroid hormones in acute brain damage requires cooperation with astroglia and microglia. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 137, 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2012.11.006>.
- Kabadi, S., & Faden, A. (2014). Neuroprotective Strategies for Traumatic Brain Injury: Improving Clinical Translation. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(1), 1216–1236. <https://doi.org/10.3390/ijms15011216>.
- Kettenmann, H., Hanisch, U.-K., Noda, M., & Verkhratsky, A. (2011). Physiology of Microglia. *Physiological Reviews*, 91(2), 461–553. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2010>.
- Kövesdi, E., Szabó-Meleg, E., & Abrahám, I. M. (2020). The Role of Estradiol in Traumatic Brain Injury: Mechanism and Treatment Potential. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 11. <https://doi.org/10.3390/ijms22010011>.
- Kumaria, A. (2017). In Vitro Models as a Platform to Investigate Traumatic Brain Injury. *Alternatives to Laboratory Animals*, 45(4), 201–211. <https://doi.org/10.1177/026119291704500405>.
- Kundu, S., & Singh, S. (2023). What Happens in TBI? A Wide Talk on Animal Models and Future Perspective. *Current Neuropharmacology*, 21(5), 1139–1164. <https://doi.org/10.2174/1570159X20666220706094248>.

- Lamprecht, M. R., & Morrison, B. (2015). A Combination Therapy of 17 β -Estradiol and Memantine Is More Neuroprotective Than Monotherapies in an Organotypic Brain Slice Culture Model of Traumatic Brain Injury. *Journal of Neurotrauma*, 32(17), 1361–1368. <https://doi.org/10.1089/neu.2015.3912>.
- Lasisi-Sholola, A. S., Hammed, S. O., Ajike, R. A., Akhigbe, R. E., & Afolabi, O. A. (2024). Estrogen replacement therapy reverses spatial memory loss and pyramidal cell neurodegeneration in the prefrontal cortex of lead-exposed ovariectomized Wistar rats. *Current Research in Toxicology*, 7, 100200. <https://doi.org/10.1016/j.crttox.2024.100200>.
- Lebesgue, D., LeBold, D. G., Surles, N. O., Morales, D. M., Etgen, A. M., Zukin, R. S., & Saatman, K. E. (2006). Effects of Estradiol on Cognition and Hippocampal Pathology after Lateral Fluid Percussion Brain Injury in Female Rats. *Journal of Neurotrauma*, 23(12), 1814–1827. <https://doi.org/10.1089/neu.2006.23.1814>.
- Ley, E. J., Short, S. S., Liou, D. Z., Singer, M. B., Mirocha, J., Melo, N., Bukur, M., & Salim, A. (2013). Gender impacts mortality after traumatic brain injury in teenagers. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 75(4), 682–686. <https://doi.org/10.1097/TA.0b013e31829d024f>.
- Li, R., Cui, J., & Shen, Y. (2014). Brain sex matters: Estrogen in cognition and Alzheimer's disease. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 389(1–2), 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.12.018>.
- Li, X., Johann, S., Rune, G. M., & Bender, R. A. (2021a). Sex-specific Regulation of Spine Density and Synaptic Proteins by G-protein-coupled Estrogen Receptor (GPER)1 in Developing Hippocampus. *Neuroscience*, 472, 35–50. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2021.07.035>.
- Li, X., Johann, S., Rune, G. M., & Bender, R. A. (2021b). Sex-specific Regulation of Spine Density and Synaptic Proteins by G-protein-coupled Estrogen Receptor (GPER)1 in Developing Hippocampus. *Neuroscience*, 472, 35–50. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2021.07.035>.
- Liddel, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., Schirmer, L., Bennett, M. L., Münch, A. E., Chung, W.-S., Peterson, T. C., Wilton, D. K., Frouin, A., Napier, B. A., Panicker, N., Kumar, M., Buckwalter, M. S., Rowitch, D. H., Dawson, V. L., Dawson, T. M., ... Barres, B. A. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, 541(7638), 481–487. <https://doi.org/10.1038/nature21029>.
- Liou, A. K. F., Clark, R. S., Henshall, D. C., Yin, X.-M., & Chen, J. (2003). To die or not to die for neurons in ischemia, traumatic brain injury and epilepsy: A review on the stress-activated signaling pathways and apoptotic pathways. *Progress in Neurobiology*, 69(2), 103–142. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(03\)00005-4](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(03)00005-4).
- Liu, M., Kelley, M. H., Herson, P. S., & Hurn, P. D. (2010). Neuroprotection of sex steroids. *Minerva Endocrinologica*, 35(2), 127–143.

- Loane, D. J., Kumar, A., Stoica, B. A., Cabatbat, R., & Faden, A. I. (2014). Progressive Neurodegeneration After Experimental Brain Trauma: Association With Chronic Microglial Activation. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 73(1), 14–29. <https://doi.org/10.1097/NEN.0000000000000021>.
- Lu, H., Ma, K., Jin, L., Zhu, H., & Cao, R. (2018). 17 β -estradiol rescues damages following traumatic brain injury from molecule to behavior in mice. *Journal of Cellular Physiology*, 233(2), 1712–1722. <https://doi.org/10.1002/jcp.26083>.
- Maas, A. I. R., Menon, D. K., Manley, G. T., Abrams, M., Åkerlund, C., Andelic, N., Aries, M., Bashford, T., Bell, M. J., Bodien, Y. G., Brett, B. L., Büki, A., Chesnut, R. M., Citerio, G., Clark, D., Clasby, B., Cooper, D. J., Czeiter, E., Czosnyka, M., ... Zemek, R. (2022). Traumatic brain injury: Progress and challenges in prevention, clinical care, and research. *The Lancet Neurology*, 21(11), 1004–1060. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(22\)00309-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(22)00309-X).
- Macklis, J. D., & Madison, R. D. (1990). Progressive incorporation of propidium iodide in cultured mouse neurons correlates with declining electrophysiological status: A fluorescence scale of membrane integrity. *Journal of Neuroscience Methods*, 31(1), 43–46. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(90\)90007-3](https://doi.org/10.1016/0165-0270(90)90007-3).
- Martin-Jiménez, C., Gaitán-Vaca, D. M., Areiza, N., Echeverria, V., Ashraf, G. M., González, J., Sahebkar, A., Garcia-Segura, L. M., & Barreto, G. E. (2019). Astrocytes Mediate Protective Actions of Estrogenic Compounds after Traumatic Brain Injury. *Neuroendocrinology*, 108(2), 142–160. <https://doi.org/10.1159/000495078>.
- McCarthy, M. M. (2010). How it's Made: Organisational Effects of Hormones on the Developing Brain. *Journal of Neuroendocrinology*, 22(7), 736–742. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2010.02021.x>.
- McConeghy, K. W., Hatton, J., Hughes, L., & Cook, A. M. (2012). A Review of Neuroprotection Pharmacology and Therapies in Patients with Acute Traumatic Brain Injury. *CNS Drugs*, 26(7), 613–636. <https://doi.org/10.2165/11634020-000000000-00000>.
- Meseke, M., Neumüller, F., Brunne, B., Li, X., Anstötz, M., Pohlkamp, T., Rogalla, M. M., Herz, J., Rune, G. M., & Bender, R. A. (2018). Distal Dendritic Enrichment of HCN1 Channels in Hippocampal CA1 Is Promoted by Estrogen, but Does Not Require Reelin. *Eneuro*, 5(5), ENEURO0258-18.2018. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0258-18.2018>.
- Miller, A. P., Shah, A. S., Aperi, B. V., Budde, M. D., Pintar, F. A., Tarima, S., Kurpad, S. N., Stemper, B. D., & Glavaski-Joksimovic, A. (2015). Effects of Blast Overpressure on Neurons and Glial Cells in Rat Organotypic Hippocampal Slice Cultures. *Frontiers in Neurology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fneur.2015.00020>.
- Miller, A. P., Shah, A. S., Aperi, B. V., Kurpad, S. N., Stemper, B. D., & Glavaski-Joksimovic, A. (2017). Acute death of astrocytes in blast-exposed rat organotypic hippocampal slice cultures. *PLOS ONE*, 12(3), e0173167. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173167>.
- Morrison, B., Elkin, B. S., Dollé, J.-P., & Yarmush, M. L. (2011). In Vitro Models of Traumatic Brain Injury. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 13(1), 91–126. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071910-124706>.

- Morrison, R. S., Kinoshita, Y., Xiang, H., Johnson, M. D., Kuntz, C., Ghatan, S., Ho, J. T., & Schwartzkroin, P. A. (1998). Mechanisms of neuronal cell death. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews*, 4(3), 157–170. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2779\(1998\)4:3<157::AID-MRDD3>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2779(1998)4:3<157::AID-MRDD3>3.0.CO;2-L).
- Muñoz-Ballester, C., & Robel, S. (2023). Astrocyte-mediated mechanisms contribute to traumatic brain injury pathology. *WIREs Mechanisms of Disease*, 15(5), e1622. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1622>.
- Murakami, G., Hojo, Y., Kato, A., Komatsuzaki, Y., Horie, S., Soma, M., Kim, J., & Kawato, S. (2018). Rapid nongenomic modulation by neurosteroids of dendritic spines in the hippocampus: Androgen, oestrogen and corticosteroid. *Journal of Neuroendocrinology*, 30(2), e12561. <https://doi.org/10.1111/jne.12561>.
- Nakatomi, H., Kuriu, T., Okabe, S., Yamamoto, S., Hatano, O., Kawahara, N., Tamura, A., Kirino, T., & Nakafuku, M. (2002). Regeneration of Hippocampal Pyramidal Neurons after Ischemic Brain Injury by Recruitment of Endogenous Neural Progenitors. *Cell*, 110(4), 429–441. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00862-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00862-0).
- Newcomb, J. K., Zhao, X., Pike, B. R., & Hayes, R. L. (1999). Temporal Profile of Apoptotic-like Changes in Neurons and Astrocytes Following Controlled Cortical Impact Injury in the Rat. *Experimental Neurology*, 158(1), 76–88. <https://doi.org/10.1006/exnr.1999.7071>.
- Newell, D., Barth, A., Papermaster, V., & Malouf, A. (1995). Glutamate and non-glutamate receptor mediated toxicity caused by oxygen and glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures. *The Journal of Neuroscience*, 15(11), 7702–7711. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-11-07702.1995>.
- Pike, B. R., Zhao, X., Newcomb, J. K., Wang, K. K. W., Posmantur, R. M., & Hayes, R. L. (1998). Temporal relationships between de novo protein synthesis, calpain and caspase 3-like protease activation, and DNA fragmentation during apoptosis in septo-hippocampal cultures. *Journal of Neuroscience Research*, 52(5), 505–520. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19980601\)52:5<505::AID-JNR3>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19980601)52:5<505::AID-JNR3>3.0.CO;2-G).
- Plesnila, N. (2016). The immune system in traumatic brain injury. *Current Opinion in Pharmacology*, 26, 110–117. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2015.10.008>.
- Porter, J. C. (1974). Hormonal Regulation of Breast Development and Activity. *Journal of Investigative Dermatology*, 63(1), 85–92. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12678099>.
- Prange-Kiel, J., Wehrenberg, U., Jarry, H., & Rune, G. M. (2003). Para/autocrine regulation of estrogen receptors in hippocampal neurons. *Hippocampus*, 13(2), 226–234. <https://doi.org/10.1002/hipo.10075>.
- Rabelo, T. K., Campos, A. C. P., Almeida Souza, T. H., Mahmud, F., Popovic, M. R., Covolan, L., Betta, V. H. C., DaCosta, L., Lipsman, N., Diwan, M., & Hamani, C. (2024). Deep brain stimulation mitigates memory deficits in a rodent model of traumatic brain injury. *Brain Stimulation*, 17(6), 1186–1196. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2024.10.006>.

- Raghupathi, R. (2004). Cell Death Mechanisms Following Traumatic Brain Injury. *Brain Pathology*, 14(2), 215–222. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2004.tb00056.x>.
- Raghupathi, R., Graham, D. I., & McIntOSH, T. K. (2000). Apoptosis After Traumatic Brain Injury. *Journal of Neurotrauma*, 17(10), 927–938. <https://doi.org/10.1089/neu.2000.17.927>.
- Ratcliff, J. J., Greenspan, A. I., Goldstein, F. C., Stringer, A. Y., Bushnik, T., Hammond, F. M., Novack, T. A., Whyte, J., & Wright, D. W. (2007). Gender and traumatic brain injury: Do the sexes fare differently? *Brain Injury*, 21(10), 1023–1030. <https://doi.org/10.1080/02699050701633072>.
- Rekkas, P. V., Wilson, A. A., Lee, V. W. H., Yogalingam, P., Sacher, J., Rusjan, P., Houle, S., Stewart, D. E., Kolla, N. J., Kish, S., Chiuccariello, L., & Meyer, J. H. (2014). Greater Monoamine Oxidase A Binding in Perimenopausal Age as Measured With Carbon 11–Labeled Harmine Positron Emission Tomography. *JAMA Psychiatry*, 71(8), 873. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2014.250>.
- Rickels, E., von Wild, K., & Wenzlaff, P. (2010). Das Schädel-Hirn-Trauma Epidemiologie und Versorgung. *Zentrum für Qualität und Management im Gesundheitswesen*. https://nachsorgekongress.de/fileadmin/user_upload/Presse/Presse_2010/SHT-Expose-Projektergebnisse.pdf.
- Roof, R. L., Duvdevani, R., Heyburn, J. W., & Stein, D. G. (1996). Progesterone Rapidly Decreases Brain Edema: Treatment Delayed up to 24 Hours Is Still Effective. *Experimental Neurology*, 138(2), 246–251. <https://doi.org/10.1006/exnr.1996.0063>.
- Roof, R. L., & Hall, E. D. (2000). Estrogen-Related Gender Difference in Survival Rate and Cortical Blood Flow After Impact-Acceleration Head Injury in Rats. *Journal of Neurotrauma*, 17(12), 1155–1169. <https://doi.org/10.1089/neu.2000.17.1155>.
- Schwenzer, N., & Ehrenfeld, M. (Hrsg.). (2011). *Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie* (4. Aufl., S. b-002-15441). Georg Thieme Verlag. <https://doi.org/10.1055/b-002-15441>.
- Seno, S., Aoki, M., Kiyozumi, T., Wada, K., & Tomura, S. (2024). Usefulness of the Simple Coma Scale, a Simplified Version of the Glasgow Coma Scale. *Neurotrauma Reports*, 5(1), 883–889. <https://doi.org/10.1089/neur.2024.0096>.
- Shao, C., Roberts, K. N., Markesbery, W. R., Scheff, S. W., & Lovell, M. A. (2006). Oxidative stress in head trauma in aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 41(1), 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.03.007>.
- Shuman, S. L., Bresnahan, J. C., & Beattie, M. S. (1997). Apoptosis of microglia and oligodendrocytes after spinal cord contusion in rats. *Journal of Neuroscience Research*, 50(5), 798–808. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19971201\)50:5<798::AID-JNR16>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19971201)50:5<798::AID-JNR16>3.0.CO;2-Y).
- Smith, C. C., & McMahon, L. L. (2005). Estrogen-Induced Increase in the Magnitude of Long-Term Potentiation Occurs Only When the Ratio of NMDA Transmission to AMPA Transmission Is Increased. *The Journal of Neuroscience*, 25(34), 7780–7791. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0762-05.2005>.

- Smolewski, P., Grabarek, J., Halicka, H. D., & Darzynkiewicz, Z. (2002). Assay of caspase activation in situ combined with probing plasma membrane integrity to detect three distinct stages of apoptosis. *Journal of Immunological Methods*, 265(1–2), 111–121. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(02\)00074-1](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(02)00074-1).
- Soustiel, J. F., Palzur, E., Nevo, O., Thaler, I., & Vlodavsky, E. (2005). Neuroprotective Anti-Apoptosis Effect of Estrogens in Traumatic Brain Injury. *Journal of Neurotrauma*, 22(3), 345–352. <https://doi.org/10.1089/neu.2005.22.345>.
- Späni, C. B., Braun, D. J., & Van Eldik, L. J. (2018). Sex-related responses after traumatic brain injury: Considerations for preclinical modeling. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 50, 52–66. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2018.03.006>.
- Srivastava, D. P., Woolfrey, K. M., & Penzes, P. (2013). Insights into Rapid Modulation of Neuroplasticity by Brain Estrogens. *Pharmacological Reviews*, 65(4), 1318–1350. <https://doi.org/10.1124/pr.111.005272>.
- Stoica, B. A., & Faden, A. I. (2010). Cell Death Mechanisms and Modulation in Traumatic Brain Injury. *Neurotherapeutics*, 7(1), 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2009.10.023>.
- Stoppini, L., Buchs, P.-A., & Muller, D. (1991). A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *Journal of Neuroscience Methods*, 37(2), 173–182. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(91\)90128-M](https://doi.org/10.1016/0165-0270(91)90128-M).
- Sulhan, S., Lyon, K. A., Shapiro, L. A., & Huang, J. H. (2020). Neuroinflammation and blood–brain barrier disruption following traumatic brain injury: Pathophysiology and potential therapeutic targets. *Journal of Neuroscience Research*, 98(1), 19–28. <https://doi.org/10.1002/jnr.24331>.
- Szabo, K., & Hennerici, M. G. (Hrsg.). (2014). *The Hippocampus in Clinical Neuroscience* (Bd. 34). S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/isbn.978-3-318-02568-2>.
- Taxier, L. R., Gross, K. S., & Frick, K. M. (2020). Oestradiol as a neuromodulator of learning and memory. *Nature Reviews Neuroscience*, 21(10), 535–550. <https://doi.org/10.1038/s41583-020-0362-7>.
- Thelin, E. P., Tajsic, T., Zeiler, F. A., Menon, D. K., Hutchinson, P. J. A., Carpenter, K. L. H., Morganti-Kossmann, M. C., & Helmy, A. (2017). Monitoring the Neuroinflammatory Response Following Acute Brain Injury. *Frontiers in Neurology*, 8, 351. <https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00351>.
- Toklu, H. Z., & Tümer, N. (2015). Oxidative Stress, Brain Edema, Blood–Brain Barrier Permeability, and Autonomic Dysfunction from Traumatic Brain Injury. In F. H. Kobeissy (Hrsg.), *Brain Neurotrauma: Molecular, Neuropsychological, and Rehabilitation Aspects*. CRC Press/Taylor & Francis. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK299195/>.
- Tonnus, W., Meyer, C., Paliege, A., Belavgeni, A., Von Mässenhausen, A., Bornstein, S. R., Hugo, C., Becker, J. U., & Linkermann, A. (2019). The pathological features of regulated necrosis. *The Journal of Pathology*, 247(5), 697–707. <https://doi.org/10.1002/path.5248>.

- Tsujimoto, Y. (1997). Apoptosis and necrosis: Intracellular ATP level as a determinant for cell death modes. *Cell Death & Differentiation*, 4(6), 429–434. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400262>.
- Turgeon, J. L., Carr, M. C., Maki, P. M., Mendelsohn, M. E., & Wise, P. M. (2006). Complex Actions of Sex Steroids in Adipose Tissue, the Cardiovascular System, and Brain: Insights from Basic Science and Clinical Studies. *Endocrine Reviews*, 27(6), 575–605. <https://doi.org/10.1210/er.2005-0020>.
- Uhl, E., & Tonn, J.-C. (2013). Schädel-Hirn-Trauma. In K.-W. Jauch, W. Mutschler, J. N. Hoffmann, & K.-G. Kanz (Hrsg.), *Chirurgie Basisweiterbildung* (S. 583–591). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-23804-8_72.
- Vierk, R., Glassmeier, G., Zhou, L., Brandt, N., Fester, L., Dudzinski, D., Wilkars, W., Bender, R. A., Lewerenz, M., Gloger, S., Graser, L., Schwarz, J., & Rune, G. M. (2012). Aromatase Inhibition Abolishes LTP Generation in Female But Not in Male Mice. *Journal of Neuroscience*, 32(24), 8116–8126. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5319-11.2012>.
- Villapol, S., Loane, D. J., & Burns, M. P. (2017). Sexual dimorphism in the inflammatory response to traumatic brain injury. *Glia*, 65(9), 1423–1438. <https://doi.org/10.1002/glia.23171>.
- Werner, C., & Engelhard, K. (2007). Pathophysiology of traumatic brain injury. *British Journal of Anaesthesia*, 99(1), 4–9. <https://doi.org/10.1093/bja/aem131>.
- Yang, L., Zhang, Q.-G., Zhou, C., Yang, F., Zhang, Y., Wang, R., & Brann, D. W. (2010). Extranuclear Estrogen Receptors Mediate the Neuroprotective Effects of Estrogen in the Rat Hippocampus. *PLoS ONE*, 5(5), e9851. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009851>.
- Zhang, X., Chen, Y., Jenkins, L. W., Kochanek, P. M., & Clark, R. S. (2004). Bench-to-bedside review: Apoptosis/programmed cell death triggered by traumatic brain injury. *Critical Care*, 9(1), 66. <https://doi.org/10.1186/cc2950>.
- Zhao, Q., Zhang, J., Li, H., Li, H., & Xie, F. (2023). Models of traumatic brain injury-highlights and drawbacks. *Frontiers in Neurology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fneur.2023.1151660>.
- Zipfel, G. J., Babcock, D. J., Lee, J.-M., & Choi, D. W. (2000). Neuronal Apoptosis After CNS Injury: The Roles of Glutamate and Calcium. *Journal of Neurotrauma*, 17(10), 857–869. <https://doi.org/10.1089/neu.2000.17.857>.
- Zünder, R. (2013). *Altersabhängige Mikrogliaaktivierung und Proliferation nach Schlaganfall*. <https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:gbv:27-20140226-092938-3>.

7.1 Eigene Publikation

Hemmat H.*, Bongarts L.*, Meiringer P.*, & Bender, R. A. (2024). Studying estrogen effects in an in vitro-model of traumatic brain injury (TBI). *Brain Organoid and Systems Neuroscience Journal*, 2, 31–42. <https://doi.org/10.1016/j.bosn.2024.07.001>.
*contributed equally.

8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celcius
%	Prozent
Abb.	Abbildung
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
Apaf-1	<i>Apoptotic protease-activating factor 1</i>
Aqua dest.	<i>Aqua destillata</i>
Astr.	Astrozyt
ATP	Adenosintriphosphat
BAD	<i>Bcl-2 associated agonist of cell death</i>
Bax	<i>Bcl-2 associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BIM	<i>Bcl2-interacting mediator of cell death</i>
Bzgl.	Bezüglich
Bzw.	Beziehungsweise
Ca ²⁺	Calcium
Ca.	Circa
CA	Cornu ammonis
CCI	<i>Controlled Cortical Impact</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
D. h.	Das heißt
DHT	Dihydrotestosteron
DISC	<i>Death Inducing Signaling Complex</i>
DIV	<i>Days in vitro</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
E2	17β-Estradiol
EC	Entorhinaler Cortex
FADD	<i>Fas-Associating Death Domain-Containing Protein</i>
Fas-R	Fas-Rezeptor, <i>apoptosis antigen 1</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
g, mg, kg	Gramm, Milligramm, Kilogramm
GCS	<i>Glasgow Coma Scale</i>
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
h	<i>Hora</i> (lat. Stunde)
HBSS	<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>
HCl	Chlorwasserstoffsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
IHC	Immunhistochemie
ILGF1	<i>Insulin-like Growth Factor 1</i>

Abkürzung	Bedeutung
KCl	Kaliumchlorid
KH_2PO_4^-	Kaliumdihydrogenphosphat
Ktl	Kontrolle
L, ml, μl	Liter, Milliliter, Mikroliter
m	Männlich
M, nM, pM	Molare Konzentration, Nanomolar, Pikomolar
min	Minute
mm	Millimeter
mm/s	Millimeter pro Sekunde
mol	Stoffmenge
MOMP	<i>Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization</i>
n	Stichprobengröße
N_2	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natronlauge
nd	Nicht darstellbar
NeuN	Neuronenspezifisches Nuklearprotein
Neur.	Neuron
NGS	<i>Normal Goat Serum</i>
NMDA	<i>N-Methyl-D-Aspartat</i>
NR2B	<i>N-methyl D-aspartate receptor subtype 2B</i>
OH	Hydroxidion
OT	Objektträger
OXSPHOS	Oxidative Phosphorylierung
$p; (*)$	p -Wert / Irrtumswahrscheinlichkeit; Statistische Signifikanz, $p < 0,05$
P7, P8	Postnataler Tag 7 / 8
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
pH	Pondus Hydrogenii
PI	Propidiumiodid
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RT	Raumtemperatur
SG	<i>Stratum granulare</i>
SHT	Schädel-Hirn-Trauma
SM	<i>Stratum moleculare</i>
Sog.	Sogenannt
SP	<i>Stratum pyramidale</i>
SR/SLM	<i>Strata radiatum/lacunosum-moleculare</i>
Str.	<i>Stratum</i>

Abkürzung	Bedeutung
TBI	<i>Traumatic Brain Injury</i>
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNF-R1	Tumornekrosefaktor-Rezeptor Typ1
TRAIL-R1	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand-receptor 1</i>
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling</i>
UKE	Universitätsklinikum Eppendorf
u. a.	Unter anderem
v. a.	Vor allem
w	weiblich
ZNS	Zentrales Nervensystem
z. B.	Zum Beispiel

Tabelle 5: Abkürzungsverzeichnis

9. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Schematische Darstellung der histologischen Schichten im Hippocampus

Abbildung 2: Experimentelle Methodik für das *in vitro* SHT

Abbildung 3: Exemplarische Darstellung einer Übersichtsaufnahme der CA1-Region des Hippocampus in der NeuN-Färbung

Abbildung 4: Exemplarische fotografische Darstellung der Resultate einer Anwendung der TUNEL-Methode in einem Kultur-Triplet in der CA1-Region 8 h nach *in vitro* SHT

Abbildung 5a: Grafische Darstellung der quantitativen Bestimmung TUNEL-positiver Zellen in der CA1-Region 8 h nach *in vitro* SHT

Abbildung 5b: Statistische Daten der quantitativen Bestimmung TUNEL-positiver Zellen in der CA1-Region 8 h nach *in vitro* SHT

Abbildung 6: Exemplarische fotografische Darstellung der Resultate einer Anwendung der TUNEL-Methode in einem Kultur-Triplet in der CA1-Region 24 h nach *in vitro* SHT

Abbildung 7a: Grafische Darstellung und statistische Daten der quantitativen Bestimmung TUNEL-positiver Zellen in der CA1-Region 24 h nach *in vitro* SHT

Abbildung 7b: Statistische Daten der quantitativen Bestimmung TUNEL-positiver Zellen in der CA1-Region 24 h nach *in vitro* SHT

Abbildung 8: Exemplarisch fotografische und grafische Darstellung der Charakterisierung von Apoptose betroffener Zelltypen 8 h nach *in vitro* SHT im *Stratum pyramidale* (SP) der CA1-Region

10. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Angewendete Chemikalien mit Herstellerangaben

Tabelle 2: Angewendete Antikörper mit Herstellerangaben

Tabelle 3: Technische und Labormedizinische Hilfsmittel mit Herstellerangaben

Tabelle 4: Softwareprogramme zur Datenanalyse und -auswertung

Tabelle 5: Abkürzungsverzeichnis

11. ERKLÄRUNG DES EIGENANTEILS

Ich erkläre hiermit, folgende Arbeitsschritte der vorgestellten Dissertation selbst durchgeführt zu haben:

- Fixierung, Einfrieren und Schneiden der Gewebekulturen
- TUNEL-Test und Immunhistochemie
- Auswertung der fotografischen Aufnahmen (inklusive Statistik)

Die Präparation und die Pflege der Kulturen wurden von meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. R. Bender bzw. Mitarbeiter*innen des Instituts für Neuroanatomie übernommen. Auch die Aufnahmen wurden – zwecks Verblindung der Studie – von Herrn Prof. Dr. R. Bender, und nicht von mir selbst durchgeführt.

Datum:

Unterschrift:

12. EIDESSATTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe, insbesondere ohne entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten, verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Das gilt insbesondere auch für alle Informationen aus Internetquellen.

Soweit beim Verfassen der Dissertation KI-basierte Tools („Chatbots“) verwendet wurden, versichere ich ausdrücklich, den daraus generierten Anteil deutlich kenntlich gemacht zu haben. Die „Stellungnahme des Präsidiums der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) zum Einfluss generativer Modelle für die Text- und Bilderstellung auf die Wissenschaften und das Förderhandeln der DFG“ aus September 2023 wurde dabei beachtet.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Datum:

Unterschrift:

13. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich all jenen meinen aufrichtigen Dank aussprechen, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Roland Bender, der mich während meiner gesamten Promotionszeit mit seiner fachlichen Expertise, unermüdlichen Geduld und außerordentlichen Unterstützung begleitet hat. Seine wertvollen Anregungen und sein konstruktives Feedback haben wesentlich dazu beigetragen, dass diese Arbeit in ihrer jetzigen Form entstehen konnte.

Ein herzliches Dankeschön richte ich an die ehemalige Direktorin des Instituts für Neuroanatomie, Frau Prof. Dr. Gabriele Rune, sowie an die derzeitige Direktorin, Frau Prof. Dr. Dr. Barbara M. Braunger, die mir ermöglicht haben, meine Experimente in den Räumlichkeiten des Instituts durchzuführen. Mein Dank gilt ebenso den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Herdis Hamann und Frau Helga Herbort, die mich mit Rat und Tat unterstützt, all meine Fragen geduldig beantwortet und zu einer stets angenehmen Arbeitsatmosphäre im Labor beigetragen haben.

Mein tiefster Dank gehört meiner Familie und Freund*innen. Eure allzeit offenen Ohren und euer Glaube an mich haben mir die Kraft gegeben, diese Arbeit anzugehen und zu vollenden. Danke an meine Eltern für die finanzielle Unterstützung und das unerschütterliche Vertrauen in mich – damit eröffnet ihr mir die Tore in die Welt. Von Herzen danke ich meiner sichersten Basis, Maximilian Glas, für die radikalsten zärtlichen Ermutigungen und den loyalen Rückhalt.

Zu guter Letzt möchte ich Lianne Bongarts danken für die jahrelange Rückendeckung während unseres Studiums und unserer Promotion – mit niemandem sonst hätte ich mir eine effizientere und zugleich liebevollere sowie verständnisvollere Zusammenarbeit vorstellen können. Ohne Dich wäre dieser Weg weitaus schwieriger gewesen.

Diese Dissertation ist das Ergebnis vieler kleiner und großer Gesten – DANKE.