

# UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Neuroanatomie  
Zentrum für Experimentelle Medizin

stellvertretender Direktor: Prof. Dr. Roland Bender

## **Einfluss von Östrogen auf neurodegenerative Prozesse in einem *in vitro*-Modell für traumatische Hirnschädigung**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Houman Hemmat  
aus Teheran

Hamburg 2022

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 12.10.2022**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Stefan Kindler**

**Prüfungsausschuss, zweite Gutachter: Prof. Dr. Roland Bender**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b>	<b>5</b>
<b>2.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>6</b>
<b>3.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>8</b>
3.1.	<b>Gegenstand der Arbeit</b>	<b>8</b>
3.2.	<b>Schädel-Hirn-Trauma</b>	<b>9</b>
3.3.	<b>Östrogen in Zusammenhang mit Neurodegeneration</b>	<b>10</b>
3.4.	<b>Experimentelle Modelle zur Untersuchung von <i>TBI</i></b>	<b>12</b>
3.5.	<b>Organotypische Gewebekulturen und Hippocampus</b>	<b>13</b>
3.6.	<b>Neurodegenerative Prozesse nach <i>TBI</i> und Folge-mechanismen</b>	<b>14</b>
3.6.1.	Neuronaler Zelltod	14
3.6.2.	Mikrogliaaktivierung	15
3.7.	<b>Ziele der Arbeit</b>	<b>16</b>
<b>4.</b>	<b>Materialien</b>	<b>17</b>
4.1.	<b>Chemikalien</b>	<b>17</b>
4.2.	<b>Antikörper</b>	<b>18</b>
4.3.	<b>Apparative und technische Hilfsmittel</b>	<b>18</b>
4.4.	<b>Software</b>	<b>20</b>
4.5.	<b>Lösungen und Kulturmedien</b>	<b>20</b>
<b>5.</b>	<b>Methoden</b>	<b>22</b>
5.1.	<b>Versuchstiere</b>	<b>22</b>
5.2.	<b>Präparation der Gewebekulturen</b>	<b>22</b>
5.3.	<b>Trauma-Induktion durch die <i>rolling-cylinder</i>-Technik</b>	<b>25</b>
5.4.	<b>Behandlung der Gewebekulturen nach <i>in vitro-TBI</i></b>	<b>25</b>
5.5.	<b>Fixieren und Einfrieren der Gewebekulturen</b>	<b>26</b>
5.6.	<b>Schneiden der Gewebekulturen</b>	<b>27</b>
5.7.	<b>Immunhistochemie</b>	<b>27</b>
5.7.1.	Iba1-Immunhistochemie	28
5.7.2.	NeuN-Immunhistochemie	28
5.8.	<b>Mikroskopie und Aufnahme der Gewebekulturen</b>	<b>29</b>
5.8.1.	Fluoreszenzmikroskopie	29
5.8.2.	Lichtmikroskopie	31
5.9.	<b>Auswertung</b>	<b>31</b>
5.9.1.	Auswertung der Propidiumiodid-positiven Zellen	31
5.9.2.	Auswertung der Iba1-positiven Zellen	31
5.9.3.	Auswertung der NeuN-positiven Zellen	32
5.10.	<b>Grafische Darstellung und statistische Analyse</b>	<b>32</b>
<b>6.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>34</b>
6.1.	<b>Darstellung von Zelltod und Mikrogliaaktivierung nach <i>in vitro-TBI</i> in der CA1-Region</b>	<b>34</b>

<b>6.2. Quantitative Auswertung der nach <i>in vitro-TBI</i> eintretenden PI-Aufnahme (Zelltod) in der CA1-Region (gesamt) .....</b>	<b>35</b>
<b>6.3. Auswirkungen von <i>in vitro-TBI</i> auf Mikrogliazellen in der CA1-Region .....</b>	<b>39</b>
6.3.1. Anzahl der Iba1-positiven Zellen in der CA1-Region .....	40
6.3.2. Gesamtintensität von Iba1 in der CA1-Region .....	42
<b>6.4. Gibt es eine Assoziation von Mikrogliazellen mit absterbenden Zellen im Stratum pyramidale? .....</b>	<b>44</b>
<b>6.5. Untersuchung der Neuronendichte in der CA1-Region .....</b>	<b>47</b>
<b>7. Diskussion .....</b>	<b>48</b>
7.1. Ausmaß und Zeitverlauf von Zelltod nach <i>in vitro-TBI</i> in CA1-Region .....	49
7.2. Auswirkungen von <i>in vitro-TBI</i> auf die Aktivierung von Mikroglia .....	51
7.3. Einfluss von E2 auf die Dynamiken der Neurodegeneration .....	52
7.4. Geschlechtsspezifische Einflüsse auf Prozesse der Neurodegeneration .....	53
7.5. Methodische Aspekte/ Limitationen .....	55
7.6. Ausblick.....	56
<b>8. Zusammenfassung.....</b>	<b>58</b>
8.1. Summary .....	59
<b>9. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>60</b>
<b>10. Danksagung .....</b>	<b>67</b>
<b>11. Curriculum Vitae.....</b>	<b>68</b>
<b>12. Erklärung des Eigenanteils.....</b>	<b>69</b>
<b>13. Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>70</b>

# 1. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Schematische Darstellung der histologischen Schichten im Hippocampus sowie der mikroskopischen Nahaufnahme einer Hippocampus-Scheibe.....	<b>13</b>
<b>Abbildung 2:</b> Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Präparation, Gruppierung der Gewebekulturen und Inkubation .....	<b>24</b>
<b>Abbildung 3:</b> Schematische Darstellung der <i>rolling-cylinder</i> -Technik .....	<b>26</b>
<b>Abbildung 4:</b> Übersichtsaufnahme in der DAPI-Färbung .....	<b>30</b>
<b>Abbildung 5:</b> Exemplarische Darstellung einer Übersichtsaufnahme der Resultate eines Kultur-Triplets zum Nachweis von Zelltod und Mikrogliaaktivierung .....	<b>35</b>
<b>Abbildung 6:</b> Grafische Darstellung und statistische Daten der Dichte mit PI-markierter Zellen in der CA1-Region nach 12 h nach <i>in vitro</i> -TBI .....	<b>36</b>
<b>Abbildung 7:</b> Grafische Darstellung und statistische Daten der Dichte mit PI-markierter Zellen in der CA1-Region nach 24 h nach <i>in vitro</i> -TBI .....	<b>37</b>
<b>Abbildung 8:</b> Grafische Darstellung und statistische Daten der Dichte mit PI-markierter Zellen in der CA1-Region nach 48 h nach <i>in vitro</i> -TBI .....	<b>38</b>
<b>Abbildung 9:</b> Anzahl der Iba1-positiven Zellen in der CA1-Region 12, 24 und 48 h nach <i>in vitro</i> -TBI..	<b>41</b>
<b>Abbildung 10:</b> Iba1-Intensität in der CA1-Region 12, 24 und 48 h nach <i>in vitro</i> -TBI.....	<b>43</b>
<b>Abbildung 11:</b> Exemplarische Einzelaufnahmen von Iba1- und PI-Nachweis sowie grafische Darstellung der Dichte mit PI-markierter Zellen im Vergleich zu Dichte der Iba1-positiven Zellen in Stratum pyramidale 12, 24 und 48 h nach <i>in vitro</i> -TBI.....	<b>45</b>
<b>Abbildung 12:</b> Statistische Werte zur Auswertung der PI-positiven Nuclei und Iba1-positiven Zellen im Stratum pyramidale 12, 24 und 48 h nach <i>in vitro</i> -TBI .....	<b>46</b>
<b>Abbildung 13:</b> Exemplarische Darstellung der NeuN-Färbung in der CA1-Region eines Gewebekulturtriplets und Quantifizierung der Neuronendichte .....	<b>47</b>
<b>Tabelle 1:</b> Verwendete Chemikalien.....	<b>17</b>
<b>Tabelle 2:</b> Verwendete Antikörper.....	<b>18</b>
<b>Tabelle 3:</b> Verwendete Apparaturen und technische Hilfsmittel.....	<b>20</b>
<b>Tabelle 4:</b> Verwendete Software.....	<b>20</b>

## 2. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
Aqua dest.	Aqua destillata
AR	Androgenrezeptor
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
bzw.	beziehungsweise
CA	Cornu ammonis
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CCI	<i>controlled cortical impact</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CREB	<i>cyclic AMP-response element binding protein</i>
Ctl	Kontrolle
DAB	3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DG / GD	<i>Dentate gyrus</i> (dt. Gyrus dentatus)
DHT	Dihydrotestosteron
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
E1	Estron
E2	17β-Estradiol
E3	Estriol
E4	Estetrol
Erα	Estrogenrezeptor alpha
Erβ	Estrogenrezeptor beta
Et al.	Lat. Et alii (und andere)
FBS	<i>fetal bovine Serum</i>
FPI	<i>fluid percussion injury</i>
g	Gramm
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
GP1R	<i>G protein-coupled estrogen receptor 1</i>
h	Lat. Hora (Stunde)
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HCl	Hydrogenchlorid
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl) -1-piperazineethanesulfonic acid</i>

Iba1	<i>ionized calcium-binding adapter molecule 1</i>
IgGs	Immunglobuline
<i>in vitro</i>	im Glas
<i>in vivo</i>	im Lebenden
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
KCl	Kaliumchlorid
L	Liter
Lat	Lateinisch
M	Molar
mg	Milligramm
mGluR	Metabotroper Glutamatrezeptor
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
N <sub>2</sub>	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NeuN-Protein	<i>neuronal nuclear protein</i>
NGS	<i>normal goat Serum</i>
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NMDA-Rezeptor	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
OT	Objektträger
P7	7. postnataler Tag
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBS-T	<i>phosphate buffered saline + Triton X100</i>
PFA	Paraformaldehyd
pH	Pondus hydrogenii
<i>p</i> -Wert	<i>probability</i> -Wert
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
Str. gra.	Stratum granulosum
Str. lac/mol	Stratum lacunosum-moleculare
Str. pyr. / SP	Stratum pyramidale
Str.mol	Stratum moleculare
Sub	Subiculum
<i>TBI</i>	<i>traumatic brain injury</i>
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
ZNS	Zentralnervensystem

## 3. Einleitung

### 3.1. Gegenstand der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wird der Einfluss des Sexualhormons Östrogen auf aus einem Schädel-Hirn-Trauma (*traumatic brain injury, TBI*) resultierende neurodegenerative Prozesse untersucht. Schädel-Hirn-Traumata sind weltweit eine der Hauptursachen für Tod und Behinderung. Dabei wird eine mechanische Schädigung des Gehirns hervorgerufen (primäre Schädigung), die zudem molekulare und zelluläre Prozesse in Gang setzt (sekundäre Schädigung), die die Verletzung oft noch verschlimmern (Werner und Engelhard, 2007). Eine günstige pharmakologische Beeinflussung dieser Prozesse wäre wünschenswert und dahingehende experimentelle Untersuchungen sind von erheblichem klinischen Interesse. Allerdings konnten nachhaltig erfolgreiche klinische Therapien bisher noch nicht etabliert werden (Plesnila, 2016; McConeghy et al., 2012). Bisherige Untersuchungen wurden überwiegend in Tierversuchen durchgeführt (in der Regel an Ratten oder Mäusen), da zum Verständnis dieser Prozesse ein neuronaler Gewebeverband erforderlich ist. Diese Versuche, bei denen die Schädelkalotte eröffnet und das Gehirn einer definierten mechanischen Schädigung ausgesetzt wird, sind für die Tiere jedoch außerordentlich belastend. Um dies zu umgehen, wurden die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit daher unter Verwendung von organotypischen hippocampalen Gewebekulturen in einem *in vitro*-Modell durchgeführt. Die *TBI* wurde dabei durch die mechanische Einwirkung eines über die Kultur rollenden Metallzylinders hervorgerufen (*rolling-cylinder-Technik*; Adamchik et al., 2000). Dieses Modell bietet weiterhin durch seine gute experimentelle Zugänglichkeit Möglichkeiten zur Testung pharmakologischer Substanzen. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Östrogen auf neurodegenerative Prozesse untersucht. Hintergrund dieser Auswahl ist die Erkenntnis, dass Frauen häufig im Vergleich zu Männern eine bessere klinische Prognose nach *TBI* besitzen (Späni et al., 2018; Ley et al., 2013). Dies könnte unter anderem aus dem Einfluss von Sexualhormonen begründet sein, der geschlechtsabhängig und im Laufe des Lebens variiert (Gölz et al., 2019). Dieser Zusammenhang bedarf weiterer wissenschaftlicher Betrachtung, daher wird im Folgenden der Einfluss des als Neuromodulator etablierten (Taxier et al., 2020; Fester und Rune, 2015) und als neuroprotektiv vermuteten (Arevalo et al., 2015) Sexualhormons 17 $\beta$ -Estradiol (E2) auf durch *in vitro-TBI* ausgelöste neurodegenerative Prozesse untersucht.

### 3.2. Schädel-Hirn-Trauma

Die Folgen eines Schädel-Hirn-Trauma bzw. *TBI* sind weltweit eine der Hauptursachen für Tod und Behinderung und stellen sowohl ein sozioökonomisches Problem (Jassam et al., 2017) als auch ein kritisches Problem für das öffentliche Gesundheitssystem dar (Maas et al., 2017). In Deutschland ist *TBI* eine der häufigsten Todesursachen bei Erwachsenen bis 45 Jahre mit einer Inzidenz von 332/100.000 über alle Altersgruppen hinweg (Hagebusch et al., 2020). *TBI* resultiert häufig aus einer Kraft- bzw. Gewalteinwirkung, die auf den Schädelknochen und das darunterliegende Gewebe einwirkt. Je nach Grad der Schädigung der Weichteile, des knöchernen Schädels und der Hirnhaut werden eine offene (Verbindung des Schädelinneren nach außen durch Schädigung der Dura mater) (Firsching et al., 2017) und eine gedeckte (ödematöse Blutungen, die epidural, subdural oder intrazerebral auftreten können) Kopfverletzung mit Gehirnbeteiligung unterschieden (Schwenzer und Ehrenfeld, 2010). Die Folgen einer *TBI* lassen sich außerdem pathophysiologisch in die von mechanischen Kräften verursachte „primäre Schädigung“ und die sich nach Minuten, Stunden oder Tagen entwickelnden Folgeschäden („sekundäre Schädigung“) unterteilen (Sande und West, 2010; Zhang et al., 2008).

In der primären (akuten) Phase kann es insbesondere zu diffusen axonalen Verletzungen, Hirnschwellungen sowie intrakraniellen Blutungen kommen, welche zum Absterben von Neuronen bzw. dem sofortigen (nekrotischen) Zelltod führen können (Chiu et al., 2016). Diese primären Schädigungen aktivieren eine Vielzahl von molekularen und zellulären Reaktionskaskaden, die zur sekundären Phase überleiten (Abdelmalik et al., 2019; Greig et al., 2014; Werner und Engelhard, 2007). Zu den Mechanismen der sekundären Phase gehören Prozesse wie Depolarisation, Störung der ionischen Homöostase und Freisetzung von Neurotransmittern (insbesondere exzitatorisches Glutamat) innerhalb der ersten Minuten nach *TBI* (Simon et al., 2017; Loane und Faden, 2010). Nachfolgend werden entzündungsfördernde Moleküle wie Stickoxid, Prostaglandine, reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies (Lucke-Wold et al., 2018; Marklund et al., 2001) und proinflammatorische Zytokine freigesetzt, die zu einer Schädigung der Blut-Hirn-Schranke und der Entwicklung von Ödemen führen können (Yang et al., 2018). Innerhalb des Hirngewebes kommt es in der Regel zur Aktivierung von Astrozyten und Mikrogliazellen, die – ist die Blut-Hirn-Schranke geschädigt – von einer Infiltration des Gewebes durch periphere Immunzellen begleitet wird. (Loane et al., 2014; Das et al., 2012; Bains und Hall, 2012; Laird et al., 2008). Diese neuroinflammatorischen Prozesse, die unter anderem auf die Wiederherstellung der zellulären Homöostase des geschädigten Gewebes abzielen, sind jedoch nicht besonders gut kontrolliert und führen häufig zu verzögerter, nicht-mechanischer Neurodegeneration durch Apoptose, die die primäre Schädigung noch verschlimmern kann (Lozano et al., 2015; Kabadi und Faden, 2014; Chiu et

al., 2016; Loane et al., 2014). Diese Verzögerung legt jedoch nahe, dass es ein therapeutisches Fenster für eine pharmakologische oder eine andere neuroprotektive Behandlung gibt, um eine fortschreitende Neurodegeneration zu verhindern und das neurologische Ergebnis zu verbessern (Loane und Faden, 2010).

Die derzeitigen Behandlungsmodalitäten variieren stark, je nach Schwere der Verletzung und reichen von radikalen chirurgischen Eingriffen bis hin zu unterstützenden Therapiemöglichkeiten wie z.B. täglichen kognitiven Therapiesitzungen (Galgano et al., 2017). Nachhaltig erfolgreiche klinische Therapien konnten allerdings bisher, trotz jahrzehntelanger präklinischer und klinischer Forschung noch nicht etabliert werden (Plesnila, 2016; McConeghy et al., 2012). Ein in diesem Kontext interessanter Zusammenhang konnte innerhalb einiger klinischer und tierexperimenteller Studien aufgedeckt werden, die geschlechtsspezifische Unterschiede in histopathologischen und neurologischen Ergebnissen nach *TBI* fanden (Gözl et al., 2019; Späni et al., 2018). Einige berichten über eine bessere Genesung weiblicher Probanden nach stumpfer *TBI* (Späni et al., 2018; Ratcliff et al., 2007), und eine verbesserte klinische Prognose dieser im Vergleich zu Männern mit mittelschwerer bis schwerer *TBI* (Ley et al., 2013; Berry et al., 2009). Wenngleich sowohl die geschlechtsspezifischen Effekte bei *TBI* (Renner et al., 2012), als auch die günstigeren klinischen Prognosen bei weiblichen Probanden mit mildem *TBI* (Covassin und Bay, 2012; Tsushima et al., 2009) nicht immer nachgewiesen werden konnten, scheint hier ein Zusammenhang zu bestehen, der weiterer Betrachtung bedarf.

Unter Berücksichtigung weiterer wissenschaftlicher Arbeiten liegt die Annahme nahe, dass Sexualhormone ein potenziell bestimmender Faktor bei den betrachteten geschlechtsspezifischen Effekten bei *TBI* darstellen könnten (Villapol et al., 2017; Chakrabarti et al., 2016; Fanaei et al., 2014; Wright et al., 2014; Pietranera et al., 2010).

### **3.3. Östrogen in Zusammenhang mit Neurodegeneration**

Östrogene sind neben Gestagenen (z. B. Progesteron) die wichtigsten weiblichen Sexualhormone. Östrogene werden vor allem in den Ovarien hergestellt, zusätzlich in geringen Mengen in den Nebennierenrinden und bei Schwangeren in der Plazenta. Interessanterweise werden Östrogene auch von Neuronen synthetisiert, wirken dann nach ihrer Freisetzung jedoch überwiegend als Neurosteroid (Fester und Rune, 2015). Östrogene werden ausgehend vom Cholesterin über die Vorstufen Testosteron und Androstendion synthetisiert. Es gibt insgesamt vier unterschiedliche Formen von Östrogenen: Estron (E1), 17 $\beta$ -Estradiol (E2), Estriol (E3) und Estetrol (E4) (Westerhorstmann, 2019). Das in dieser Arbeit speziell

untersuchte 17 $\beta$ -Estradiol (E2) wird durch das Enzym Aromatase aus Testosteron gebildet (Kretz et al., 2004). Aromatase findet man in hoher Konzentration in den Granulosazellen der Ovarien, aber auch im Fettgewebe, Knochengewebe und sogar – wie oben genannt – in Neuronen. Nach Aktivierung können auch Astrozyten Aromatase exprimieren (Arevalo et al., 2015). Männer besitzen im Allgemeinen einen deutlich geringeren E2-Spiegel im Blutplasma als Frauen (Boon et al., 2010).

E2 entfaltet seine Wirkung durch Bindung an einen der folgenden, bisher bekannten Östrogenrezeptoren: alpha (ER $\alpha$ ) und beta (ER $\beta$ ) bzw. den *G protein-coupled estrogen receptor 1* (GPER-1) (Sandén et al., 2011). Die Rezeptoren ER $\alpha$  und ER $\beta$  gehören zur sogenannten „klassischen“ Familie der Östrogenrezeptoren, während der GPER-1 einen „nicht-klassischen“ Östrogenrezeptor darstellt, der hauptsächlich in der Plasmamembran lokalisiert ist (Bustamante-Barrientos et al., 2021). ERs sind Liganden-aktivierte Transkriptionsfaktoren in Geweben, die bei Aktivierung regulierend auf die Expression von Zielgenen in mehreren Geweben und Organen, wie dem Gehirn, kardiovaskulärem Gewebe, Knochen und Immunzellen einwirken (Bender et al., 2017; Bender et al., 2010; Kretz et al., 2004; Kuiper et al., 1997). Im Gehirn werden ERs von Neuronen, Mikroglia, Astrozyten, Oligodendrozyten und Endothelzellen exprimiert, wie durch immunhistochemische Verfahren und *in situ* Hybridisierung nachgewiesen wurde (Li et al., 2014). E2-Effekte über den „klassischen“ Weg sind jedoch langsam und können Stunden bis Tage anhalten, während E2 seine schnellen, „nicht-klassischen“ Effekte über die Membranrezeptoren GPER-1 und intrazelluläre Signalmoleküle vermittelt. Die „nicht-klassische“ Wirkung von E2 beinhaltet auch die schnelle Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren wie dem cAMP-responsiven Element-bindenden Protein (CREB) (Abrahám et al., 2003), das die indirekte Gentranskription initiiert (Carlstrom et al., 2001) und die Expression verschiedener neurotropher und neuroprotektiver Faktoren reguliert (Azcoitia et al., 2019).

Bei Frauen hat E2 als positiver und negativer Feedback-Regulator eine wichtige regulatorische Wirkung auf die Fortpflanzungsprozesse (Porter, 1974; Robertson und King, 1974). Zusätzlich besitzt E2 bei Frauen und Männern Funktionen zur Regulierung des Elektrolythaushalts, der Knochendichte, der Hautphysiologie, des Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsels sowie des kardiovaskulären und zentralen Nervensystems (ZNS) (Nilsson und Gustafsson, 2011). Im Gehirn ist E2 vorwiegend an der Regulation der synaptischen Plastizität beteiligt (Taxier et al., 2020), kann aber auch neuroprotektiv wirken (Chaychi et al., 2018; Arevalo et al., 2015), beispielsweise indem es antioxidative Reaktionen in der Zelle verstärkt (Rekkas et al., 2014; Bellanti et al., 2013) und DNA-Reparatur induziert (Bethea et al., 2016). Kürzlich wurde außerdem in einem Tiermodell für *TBI* (*controlled cortical impact* = CCI) ein

geschlechtsspezifischer Einfluss von E2 auf die GFAP-Expression (= Astrozytenaktivierung) gezeigt (Gölz et al., 2019), sowie weitere geschlechtsspezifische Besonderheiten, wie signifikant geringere Läsionsgröße nach *CCI* bei weiblichen Mäusen im Vergleich zu männlichen (Gölz et al., 2019). In einer weiteren Studie wurden ebenfalls nach *CCI* neurologische Defizite und ein Hirnödem festgestellt, die durch eine tägliche intraperitoneale E2-Behandlung über 7 Tage signifikant reduziert wurden (Lu et al., 2018).

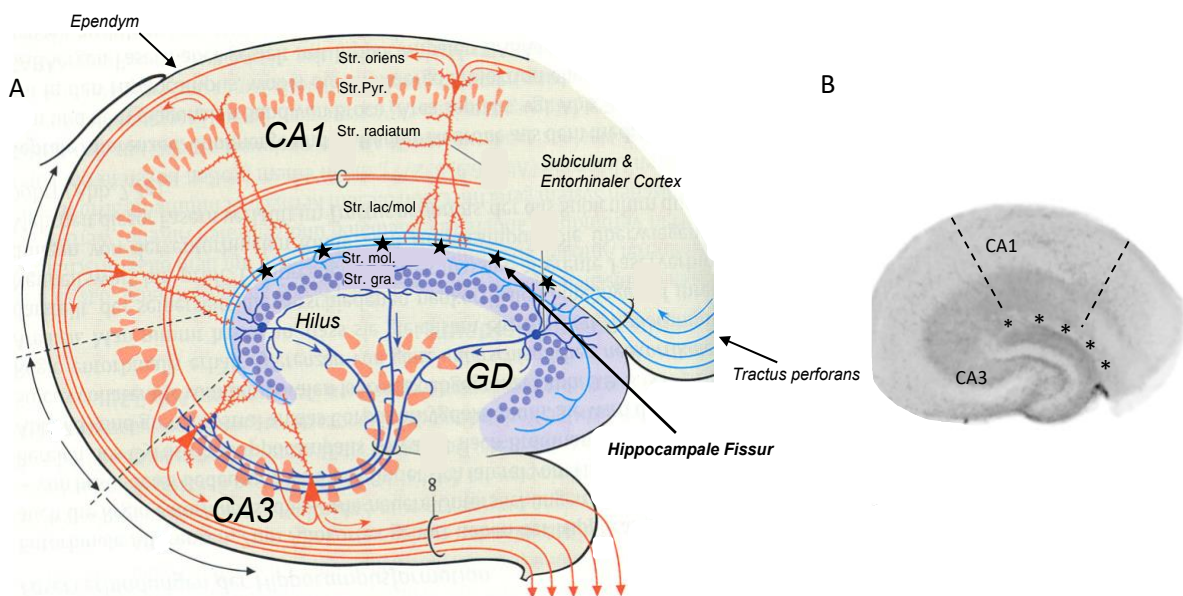
### **3.4. Experimentelle Modelle zur Untersuchung von *TBI***

Tierversuche ermöglichen es, die Wirkung von *TBI* auf verschiedene Aspekte wie Geschlechtsunterschiede, Alter, sowie Art und Schweregrad der Verletzung zu untersuchen. Die Modellierung von *TBI* ist jedoch eine große Herausforderung für Neurowissenschaftler. Bis heute gibt es kein umfassendes experimentelles Modell von *TBI*, das alle Aspekte der Verletzung darstellen kann (Kövesdi et al., 2021). Zu den experimentellen fokalen *in vivo*-Modellen gehören u.a. das *controlled cortical impact (CCI)*, das mediane/laterale *fluid percussion injury (FPI)*, das *controlled concussion* (kontrollierte Gehirnerschütterung) und verschiedene *weight-drop*-Modelle (Feeney et al., 1981). Die am weitesten verbreiteten Tiermodelle sind das *CCI*- und *FPI*-Modell, die die Pathophysiologie und kognitiven Defizite von *TBI* nachahmen können (Xiong et al., 2013). *CCI* wird in den meisten Fällen (Wang et al., 2021; Kövesdi et al., 2021) an Mäusen durchgeführt, während das *FPI*-Modell bei Ratten verwendet wird.

Zusätzlich zu den meist verwendeten *in vivo*-Modellen sind bereits in der Literatur verschiedene Modelle zur Erzeugung einer mechanischen Schädigung von Nervengewebe *in vitro* beschrieben (Li et al., 2016). Diese können zwar Tierversuche *in vivo* zur *TBI*-Problematik nicht komplett ersetzen, jedoch können *in vitro*-Untersuchungen über die Wirkungen bestimmter Substanzen grundsätzlich dabei helfen, die im Tierversuch zu beantwortenden Fragen präziser zu stellen (*refine*) und die Anzahl der verwendeten Tiere zu reduzieren (*reduce*). Zu den für *TBI*-Untersuchungen eingesetzten *in vitro*-Modellen gehört auch die *rolling-cylinder*-Technik nach Adamchik et al. (2000), die für die vorliegende Arbeit verwendet wurde. Zur Erzeugung einer definierten traumatischen Gewebeschädigung werden hier die Kulturen von einem sterilen Metallzylinder mit definierter Größe und Gewicht überrollt (für Details, siehe 5.3). Daraus resultiert eine mechanische Schädigung des Gewebes, die mit der primären Schädigung des Gehirns nach einem heftigen Stoß oder Aufprall des Schädels zu vergleichen ist (Adamchik et al., 2000).

### 3.5. Organotypische Gewebekulturen und Hippocampus

Ein großer Vorteil dieses *in vitro*-Modells besteht darin, dass dafür organotypische Gewebekulturen verwendet werden können, die einer experimentellen Manipulation leicht zugänglich sind. In der neurobiologischen Forschung werden sie bereits seit Jahrzehnten erfolgreich für die Untersuchung pathologischer und physiologischer Prozesse im Hirngewebe eingesetzt (Meseke et al., 2018; Grabiec et al., 2017; Li et al., 2016; Stoppini et al., 1991). In der vorliegenden Untersuchung wurden speziell Gewebekulturen des Hippocampus verwendet, einer zum limbischen System gehörenden Struktur, die vor allem an der Gedächtnisbildung beteiligt ist und bei einer *TBI* oft in Mitleidenschaft gezogen wird (siehe z. B. Gözl et al., 2019). Der Hippocampus besitzt mehrere Anteile, weshalb man auch von der „Hippocampusformation“ spricht, die im Temporallappen liegt und an das Unterhorn des Seitenventrikels lateral angrenzt. Die Hippocampusformation wird im Querschnitt (frontal) in die Abschnitte „Subiculum“, „Cornu ammonis“ (aufgebaut aus den Regionen CA1-CA3) und „Gyrus dentatus“ untergliedert (Abb. 1). Diese Regionen werden in weitere histologische Schichten unterteilt (siehe Abb. 1A). Für die vorliegende Untersuchung wurde die leicht zu erkennende bzw. gut definierbare (oberhalb des suprapyramidalen Blattes der Körnerzellschicht gelegene) CA1-Region für Analysen ausgewählt.



**Abbildung 1:** **A)** Schematische Darstellung der histologischen Schichten im Hippocampus (A: Verändert nach: Bähr, Frotscher (Duus), 2003,“) und **B)** der mikroskopischen Nahaufnahme 400 µm dicke Hippocampus-Scheibe, Hippocampale Fissur (mit Sternen markiert) trennt die Cornu ammonis von Gyrus dentatus ab. Gyrus dentatus (in Lila dargestellt) und Cornu ammonis bilden zusammen mit dem Subiculum die Hippocampusformation. Das Subiculum ist das Übergangsfeld vom archicorticalen Hippocampus zum Neocortex und es liegt zwischen der CA1-Region und dem Cortex entorhinalis. Abkürzungen: CA: Cornu Ammonis, GD: Gyrus dentatus, Str.Pyr.: Stratum Pyramidale, Str. lac/mol.: Stratum lacunosum-moleculare, Str.mol.: Stratum moleculare, Str. gra.: Stratum granulosum.

### **3.6. Neurodegenerative Prozesse nach *TBI* und Folge Mechanismen**

Das Schädel-Hirn-Trauma (*TBI*) verursacht einen akuten Zelltod im Kontusionsbereich sowie neurologische Dysfunktion durch sekundäre biochemische Veränderungen (Loane et al., 2014). Nach dem akuten Zelltod folgt mit Verzögerung als lokale Antwort eine apoptotische Neurodegeneration, die deutlich stärker ausgeprägt ist und verschiedene Gehirnregionen ipsi- und kontralateral zum Kontusionsherd betrifft (Ikonomidou et al., 1996). Diese „sekundäre Schädigung“ ist u. a. durch neuronalen Zelltod, Astrozytenaktivierung, Infiltration peripherer Monozyten und Aktivierung residenter Mikroglia gekennzeichnet (Loane et al., 2014). In der vorliegenden Studie wurden insbesondere E2-Effekte auf die Neurodegeneration und die Mikrogliaaktivierung nach *in vitro-TBI* untersucht. Auf diese beiden Aspekte soll daher im Folgenden näher eingegangen werden.

#### **3.6.1. Neuronaler Zelltod**

Nach einer *TBI* sterben Nervenzellen im Gehirn je nach Schweregrad der Schädigung unterschiedlich stark ab. Dabei findet der Zelltod auf zwei unterschiedliche Arten statt: durch Zellauflösung (Nekrose) oder durch programmierten Zelltod (Apoptose). Die Nekrose wird primär durch mechanische oder ischämische Gewebsverletzungen, also hypotoxische Gewebsschäden über eine metabolische Dysfunktion oder eine exzessive exzitatorische Neurotransmitterfreisetzung (hauptsächlich Glutamat) verursacht (Hellewell et al., 2016), welche wesentlich in der primären (akuten) Phase zum Absterben von Neuronen bzw. dem sofortigen (nekrotischen) Zelltod führen können (Chiu et al., 2016). Apoptose ist ursprünglich ein physiologischer Regulationsprozess, der dazu dient, während der Embryogenese nicht benötigte sowie überalterte oder beschädigte Zellen zu eliminieren. Allerdings können auch viele andere Mechanismen zur Apoptose in neuronalem Gewebe führen, wie die Erhöhung von intrazellulärem Calcium, freien Radikalen und exzitatorischen Aminosäuren (Eldadah und Faden, 2000).

Des Weiteren führt die primäre Schädigung beispielweise zu einem deutlichen Anstieg reaktiver Sauerstoffradikale (*reactive oxygen species*, ROS), was innerhalb der ersten Stunden nach *TBI* in einer experimentellen *in vivo*-Untersuchung (Marklund et al., 2001) zu einem erheblichen oxidativen Stress im Gewebe führte, welche mit Aktivierung des intrinsischen und extrinsischen apoptotischen Signalweges verbunden ist (Bittigau et al., 2004). *TBI* verursacht außerdem die Aktivierung von Cysteinproteasen (Caspase-3, Calpain), was den Abbau von Zytoskelettproteinen wie  $\alpha$ -Spektrin zur Folge hat (Pike et al., 1998). Letztlich führt eine Dysbalance von pro- und anti-apoptotischen Proteinen zur Induktion der Apoptose (Hoppe und Klingler, 2021).

Um das Ausmaß des neuronalen Zelltods nach *in vitro-TBI* – und den Einfluss von E2 darauf – zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit die Methodik des Propidiumiodid-Nachweises verwendet. Propidiumiodid (PI) ist ein fluoreszierender Farbstoff, der rasch in Zellen mit beschädigter Plasmamembran eindringt und sich danach in die DNA einlagert (Macklis und Madison, 1990; Harris, 2014). Nach Bindung an die DNA fluoresziert PI mit einer Emission im roten Bereich und kann darüber im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden (Noraberg et al., 1999). Da die PI-Methode zwar Hinweise auf das Ausmaß von Zelltod gibt, allein jedoch keine Rückschlüsse auf die Art der absterbenden Zellen erlaubt, wurde zusätzlich ein immunhistochemischer Nachweis des *neuronal nuclear protein* (NeuN) durchgeführt. NeuN wird spezifisch im Zellkern und im perinukleären Zytoplasma von Neuronen exprimiert und kann daher zur Abgrenzung der Neurone von Gliazellen genutzt werden (Gusel'nikova und Korzhevskiy, 2015). In der vorliegenden Arbeit wurde die immunhistochemische Darstellung von NeuN dafür verwendet, in ausgewählten Kulturen eine Untersuchung der Neuronendichte in der CA1-Region durchzuführen, um darüber Rückschlüsse über das tatsächliche Absterben von Neuronen nach *in vitro-TBI* ziehen zu können.

### **3.6.2. Mikrogliaaktivierung**

Gliazellen machen die Mehrheit der Zellen im Gehirn aus. Zu Gliazellen gehören Astrozyten, Makroglia (Oligodendrozyten) sowie Mikrogliazellen. Mikrogliazellen stellen 5-10 % der Zellen im Zentralnervensystem dar und tragen zur Entwicklung, Homöostase und Reparatur von neuronalem Gewebe bei (Bohlen et al., 2019). Mikrogliazellen sind bei intakter Blut-Hirnschranke die primären Immunabwehrzellen im Gehirn und zeigen eine neuroinflammatorische Reaktion auf traumatische Hirnverletzungen (Habib et al., 2014). Ihre Aufgaben umfassen jedoch bereits im gesunden Gehirn zahlreiche Funktionen (Bohlen et al., 2019). Als Reaktion auf verschiedene Umweltereignisse werden Mikrogliazellen zu morphologischer Transformation, Proliferation, Migration, Phagozytose und der Produktion bioaktiver Moleküle angeregt und in sogenannte „aktivierte Mikroglia“ umgewandelt (Kreutzberg, 1996; Streit und Kincaid-Colton, 1995). Nach Aktivierung verändern Mikrogliazellen ihre Morphologie, d. h. die Zahl der strahlenförmigen Fortsätze der Mikrogliazellen reduziert sich und sie nehmen einen amöboiden Phänotyp an (Kettenmann et al., 2011). Aktivierte Mikroglia kann verschiedene Faktoren sezernieren, darunter pro- und anti-entzündliche Zytokine, Chemokine und neurotrophe Faktoren, die eine wichtige Rolle bei der Bestimmung des molekularen Phänotyps und der funktionellen Reaktion der Mikroglia nach einer Hirnverletzung spielen (Loane et al., 2014). Es wird angenommen, dass aktivierte Mikrogliazellen insgesamt neuroprotektiv wirken, indem sie neuroprotektive Wirkstoffe sezernieren und Zelltrümmer entfernen, die aus Verletzungen oder Krankheiten resultieren.

Weiterhin ist bekannt, dass Mikrogliazellen E2-responsiv sind und sich daher als Vermittler sexualhormoneller Einflüsse auf neurodegenerative Prozesse anbieten (Villa et al., 2016; Habib et al., 2014). Aktivierte Mikrogliazellen erhöhen die Expression des Calcium-bindenden Proteins Iba1 (Imai und Kohsaka, 2002) und reduzieren die Expression des Purin-Rezeptors P2Y12 (Haynes et al., 2006). Iba1 ist ein Mikroglia-spezifisches Protein (Imai und Kohsaka, 2002), das zur Identifizierung von Mikroglia in Gewebekulturen eingesetzt werden kann, da hier gewöhnlich keine peripheren Makrophagen, die ebenfalls Iba1 exprimieren, angesiedelt sind. Zur Bestimmung der Rolle der Mikroglia nach *in vitro-TBI* wurde in dieser Arbeit die Expression von Iba1 in den Kulturen mit Hilfe quantitativer Immunhistochemie dargestellt und der Einfluss des Sexualhormons E2 auf die Mikrogliaaktivierung untersucht.

### 3.7. Ziele der Arbeit

Unmittelbares Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss von E2 (17 $\beta$ -Estradiol) auf *TBI*-induzierte Prozesse in einem *in vitro*-Modell für traumatische Hirnschädigung zu erforschen. Speziell wurden das Ausmaß und der Zeitverlauf (12, 24 und 48 h) des durch *TBI* induzierten Zelltods in der CA1-Region mithilfe der PI-Auswertung untersucht, sowie, um Erkenntnisse über die Art der vom Absterben betroffenen Zellen gewinnen zu können, eine Untersuchung der Dichte der Neuronen mit Hilfe des neuronspezifischen Markerproteins NeuN durchgeführt. Weiterhin wurde die Rolle der Mikrogliaaktivierung nach *in vitro-TBI* mit Hilfe von Iba1-Immunhistochemie in der CA1-Region untersucht.

Dafür wurden die folgenden Fragestellungen herangezogen:

1. Wie wirkt sich *in vitro-TBI* auf den Zelltod in der CA1-Region aus?
2. Wie wirkt sich *in vitro-TBI* auf die Aktivierung von Mikroglia in der CA1-Region aus?
3. Hat E2 einen Einfluss auf diese Dynamiken?
4. Lassen sich Unterschiede zwischen den Geschlechtern in Bezug auf Zelltod oder die Aktivierung von Mikroglia in der CA1-Region nach *in vitro-TBI* feststellen?

Generell bestand zusätzlich auch das Ziel mit diesen Untersuchungen, das in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Bender neu etablierte *in vitro-TBI*-Modell weiterzuentwickeln und zu verfeinern, um dadurch die Notwendigkeit von Tierversuchen zur *TBI*-Problematik zu reduzieren, bzw. das Testen in der Kulturschale den *in vivo*-Experimenten voranzustellen, um im Tierversuch präzisere Fragen stellen zu können.

## 4. Materialien

### 4.1. Chemikalien

Produkt	Hersteller	Produktnummer
Aqua destillata	B. BRAUN	75/12604052/1212
B-27	GIBCO	17504-044
Bromphenolblau	MERCK	1.08122.0005
DAB PEROXIDASE SUBSTRATE KIT	VECTOR	SK-4100
DAPI (4, 6-diamidino-2-phenylindol)	SIGMA	D9564-10ML
E2 (17 $\beta$ -Estradiol)	SIGMA	E4389
Einbettmedium (für Fluoreszenz)	DAKO	S3023
Einfriermedium ( <i>Tissue Tek</i> )	SAKURA	4583
Ethanol (100%)	BAKER ANALYZED	8025
Ethanol (99%)	TH GEYER	2212.5000
FBS Premium (fetal bovine Serum)	PAN BIOTECH	P30-2302
HBSS	GIBCO	14180-046
HEPES	SIGMA	H3537
L-Glucose	MILLIPORE	1.08337.0250
L-Glutamin Solution	SIGMA	G7513-100ML
Methanol	J.T.BAKER	8045
Natronlauge (NaOH)	MERCK	1.09136.1000
Neurobasal-A Medium (1X)	GIBCO	12349-015
Paraformaldehyd	ROTH	03353
PBS (Tabletten)	GIBCO	18912-014
Penicillin Streptomycin	GIBCO	15140-122
Propidiumiodid	SIGMA	P4170-25M6
Saccharose	ROTH	4621.1
Salzsäure (HCl)	MERCK	1.09063.1000
Sterilium	BODE	975512
Stickstoff (N <sub>2</sub> )	UKE KLINIKAPOTHEKE	22-100291
Ziegenserum ( <i>normal Goat Serum, NGS</i> )	ABCAM	AB7481-10ML

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien

## 4.2. Antikörper

Antikörper (anti-)	Hersteller (Bestellnummer)	Verdünnung (Puffer)	Herkunft (Typ)
Iba1	Synaptic System (234004)	1:500 (PBS-T + 3% NGS)	Meerschweinchen ( <i>guinea pig</i> ) (polyklonal)
NeuN	Milipore (MAB377)	1:500 (PBS-T + 3% NGS)	Maus (monoklonal)
Meerschweinchen ( <i>guinea pig</i> ) IgG (Alexa Fluor 647- gekoppelt)	Invitrogen (A-21450)	1:500 (PBS)	Ziege ( <i>goat</i> ) (polyklonal)
Maus-IgG (Biotin-gekoppelt)	Vector (SK-4100)	1:250 (PBS)	Ziege ( <i>goat</i> ) (polyklonal)

Tabelle 2: Verwendete Antikörper

## 4.3. Apparative und technische Hilfsmittel

Produkt	Hersteller
Accu-Jet Saugpipette	BRAND
Analyse-Waage	SARTORIUS
Aufbewahrungsboxen	HS
Centrifuge 5415C	EPPENDORF
Cryostat NX70	THERMO SCIENTIFIC
Deckgläser 24x60mm	AUTOMAT STAR
Einmalhandschuhe, Nitril	ANSELL
Erlenmeyerkolben	SCHOTT
Feuchte Kammer	UKE LABOR NEUROANATOMIE
Folienstift	FABER-CASTELL
<i>Rolling-cylinder</i>	UKE
Gefrierschrank (-20° C)	BOSCH, LIEBHERR

<b>Gefrierschrank (-80° C)</b>	KRYOTEC
<b>Gewebehäcksler (<i>Tissue chopper</i>)</b>	MCILWAIN
<b>Inkubator</b>	BINDER
<b>Kosmetiktücher</b>	TAPIRA
<b>Küvetten</b>	RESISTANCE
<b>Macbook, Air 2020</b>	APPLE
<b>MACS-Mix-Tube-Rotator</b>	MILTENYL BIOTECH
<b>Magnetrührer</b>	DIVERSE
<b>Magnetrührer</b>	IKAMAG
<b>Magnetrührstäbchen, Standard</b>	VWR
<b>Mikroliter-Pipetten (2/20/200/100 µl)</b>	EPPENDORF
<b>Mikroskop</b>	ZEISS
<b>Mikroskop, Biorevo BZ 9000</b>	KEYENCE
<b>Millicell-Kultur-Membranen</b>	MILLIPORE
<b>Multiwell-Zellkulturplatten (<i>Six-well</i>)</b>	BD-FALCON
<b>Objektive, 2x und 10x</b>	Nikon
<b>Objektträger (Super Frost Plus)</b>	GLASWARENFABRIK KARL HECHT
<b>Parafilm</b>	PECHINEY PLASTIC PACKAGING
<b>pH Meter, PH M93 Reference ph Meter</b>	RADIOMETER COPENHAGEN
<b>Pinzette Schere FST</b>	FST (Fine Science Tools)
<b>Pipettenspitzen</b>	EPPENDORF
<b>Reaktionsgefäße 15ml, 50ml, 100ml</b>	GREINER
<b>Schüttelgerät ST 5, ST 5D</b>	CAT, M Zipperer GmbH
<b>Schüttler, MS-2</b>	VWR
<b>Schüttler</b>	EDMUND BÜHLER

<b>Spritzflasche</b>	MERCK
<b>Sterile Werkbank</b>	HERAEUS INSTRUMENTS
<b>Stoppuhr</b>	JUNGHANS
<b>Tube transparent, 1,5/2 ml Eppendorf</b>	EPPENDORF

**Tabelle 3:** Verwendete Apparaturen und technische Hilfsmittel

#### 4.4. Software

<b>Programm</b>	<b>Hersteller</b>
<b>BZ-2-Analyser</b>	KEYENCE
<b>BZ-2-Viewer</b>	KEYENCE
<b>Endnote</b>	Thomson Reuters
<b>Fiji (<i>ImageJ</i>)</b>	WAYNE RASBAND (NIH)
<b>Graphpad Prism</b>	Graphpad Software inc.
<b>macOS Catalina 2020</b>	APPLE
<b>Office 365</b>	Microsoft Inc.
<b>Photoshop</b>	Adobe
<b>Windows 10</b>	Microsoft Inc.

**Tabelle 4:** Verwendete Software

#### 4.5. Lösungen und Kulturmedien

##### **1x PBS (Phosphate-Buffered Saline), 1000 ml:**

8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

ad 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen und im Anschluss mit 1 M HCl oder 1 M NaOH auf pH 7,4 bei Raumtemperatur einstellen.

##### **4% PFA (Paraformaldehyd), 1000 ml:**

40 g PFA Pulver

+ 750 ml PBS

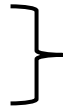
Unter Rühren auf 50-60° C erhitzen, danach mit 1M HCl oder 1M NaOH auf pH 7,4 einstellen, auf Eis bis Raumtemperatur rühren und auf 1000 ml mit 1x PBS auffüllen. Zur Lagerung bei -18° C einfrieren.

**Präparationsmedium, HBSS (für Gewebekulturen):**

50 ml 10x HBSS

5,04 ml HEPES

Aqua dest. ad 450 ml



unter steriler Werkbank

Durch Zugabe von steriler 1M NaOH wird das Präparationsmedium auf einen pH-Wert von 7,3 eingestellt.

Aqua dest. ad 500 ml steril filtriert und im Kühlschrank eingelagert.

**Neurobasal-Kulturmedium (Inkubationsmedium für Gewebekulturen):**

45 ml Neurobasal A

5 ml 10% FBS (10%)

500 µl B27

125 µl L-Glutamat

500 µl Penicillin Streptomycin

500µl Glucose (0,3%)

**Permeabilisierung- /Blockierungslösung für Immunhistochemie:**

PBS-T (1x PBS + 0,3% Triton-x100) plus 3% Normal Goat Serum

**17β-Estradiol (E2):**

2,72 mg E2 werden in 100 ml Aqua dest. gelöst (= 10<sup>-4</sup> M); anschließende 1:1000

Verdünnung mit Inkubationsmedium führt zur 10<sup>-7</sup> M Endkonzentration.

## 5. Methoden

### 5.1. Versuchstiere

Zur Herstellung der Gewebekulturen wurden Mäuse des Zuchtstammes C57BL/6J aus der Versuchstierhaltung des UKE verwendet. Insgesamt wurden 82 sieben bis acht Tage alte (P7-8) Mäuse zur Gewinnung von organotypischen hippocampalen Gewebekulturen (*in vitro*) nach den veröffentlichten Protokollen (Meseke et al., 2018; Bender et al., 2010; Stoppini et al., 1991) präpariert. Dabei wurde versucht, die Geschlechtsverteilung der zu präparierenden Tiere gleichmäßig zu halten. Es wurden keine Versuche an lebenden Tieren durchgeführt. Alle Experimente wurden nach den deutschen gesetzlichen Bestimmungen und Vorschriften bezüglich Tierhaltung und Tierexperimenten durchgeführt.

### 5.2. Präparation der Gewebekulturen

Zur Präparation der organotypischen hippocampalen Gewebekulturen wurden die folgenden Schritte unter semisterilen Bedingungen durchgeführt (*Präparation durch Prof. Dr. Bender*): Am Präparationstag wurden 8 Mäuse (je 4 männlich und 4 weiblich) zur Präparation bestellt. Zuerst wurde das Geschlecht der Mäuse durch visuelle Prüfung festgestellt und vermerkt. Anschließend wurden die Mäuse mit Hilfe einer Schere dekapiert und die Kopfschwarte mittig-dorsal Richtung sagittal aufgetrennt und beidseitig nach lateral aufgeklappt, bis das knorpelige Dach des Schädels (Kalotte) vollständig sichtbar war. Im nächsten Schritt wurde die Hirnschale (Kalotte) ebenfalls mit der Schere entlang der Sutura coronalis eröffnet und nach lateral mobilisiert. Im darauffolgenden Schritt wurde das Gehirn vorsichtig mit Hilfe des sog. Heidemannspatels aus der Kalotte entnommen und in eine auf Eis gestellte Petrischale, gefüllt mit Präparationsmedium, platziert. Dann wurden das Cerebellum und das Frontalhirn mittels Skalpell entfernt, und mithilfe eines Median-Sagittal-Schnitts wurden die beiden Hemisphären auseinandergetrennt. Als nächstes wurden die verbliebenen Anteile des Hirnstamms und des Diencephalons unter der Stereolupe mit Hilfe eines gebogenen Spatels auf der Innenseite der Hemisphären abgetrennt und dadurch die Hippocampi freigelegt. Diese wurden mit Hilfe feiner Skalpell aus dem Hirnmantel herausgetrennt, danach auf die Verarbeitungsplattform eines Gewebehäckslers („*tissue-chopper*“) platziert und rechtwinklig zu ihrer Longitudinalachse in transversale Scheiben mit einer Dicke von 0,4 mm geschnitten (siehe Abb. 2A). Um die Varianz zwischen den Gewebekulturschnitten zu minimieren und eine bestmögliche Vergleichbarkeit innerhalb der experimentellen Gruppen gewährleisten zu können, wurden anschließend aus den resultierenden ca. 20 Hippocampus-scheiben 3-4 Gruppen bestehend aus drei benachbart liegenden Scheiben (sog. Schwesterkulturen oder Triplets) separiert

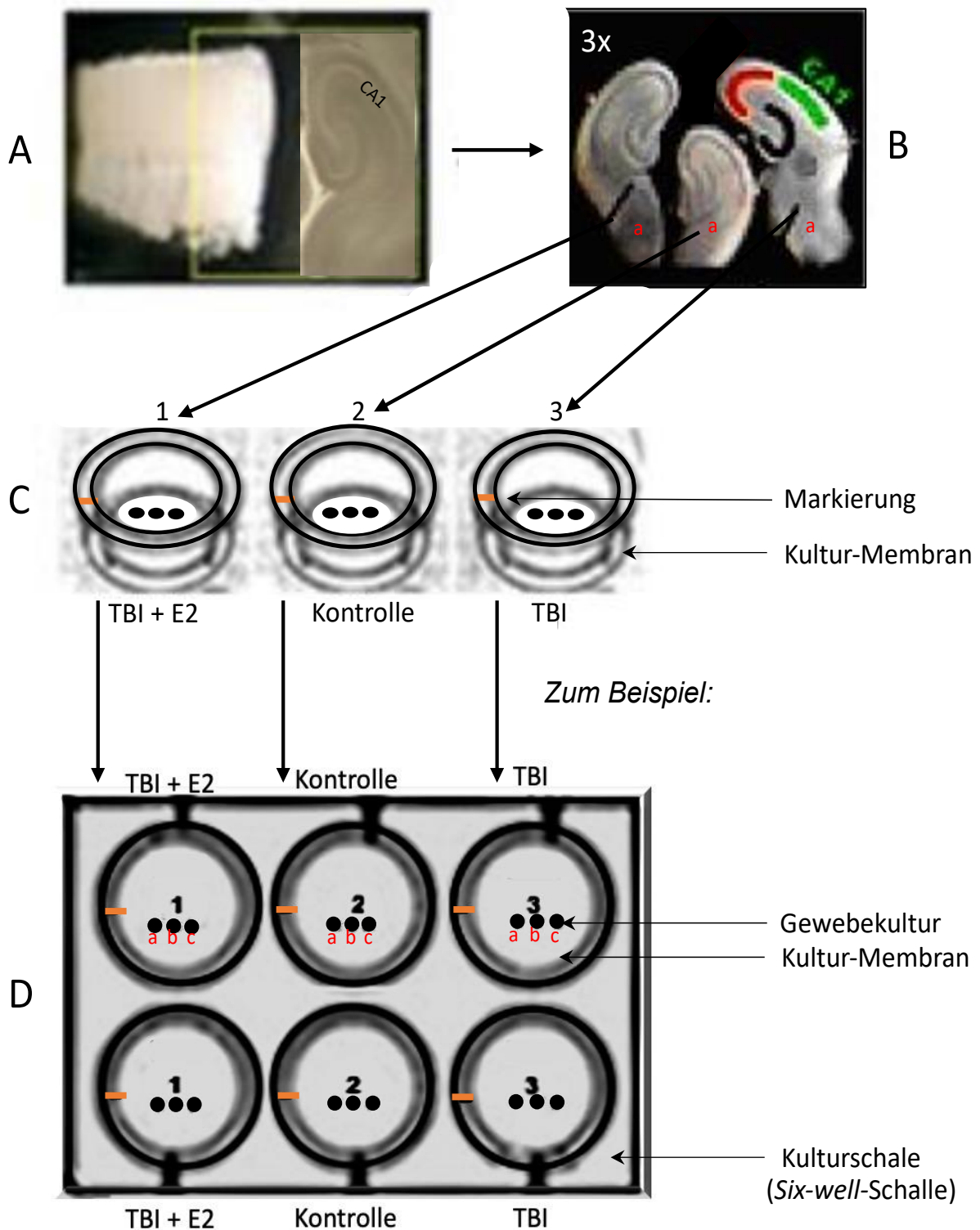
(Meseke et al., 2018) und jeweils eine Kultur aus einem solchen Triplet einer der drei experimentellen Gruppen zugeordnet (siehe Abb. 2C):

(1) „*TBI* + E2“

(2) „Kontrolle“

(3) „nur *TBI*“

Bei der Gruppe 2 (Kontrolle) handelt es sich um Gewebekulturen, bei denen weder *TBI* herbeigeführt noch E2 zugegeben wird. Diese dienen als Vergleichskulturen für die jeweiligen Kulturen der Gruppen 1 und 3, die experimentellen Bedingungen ausgesetzt wurden, welche in Kapitel 5.3. und 5.4. näher beschrieben werden. Es wurde außerdem darauf geachtet, dass nur Scheiben ausgewählt werden, die durch die Präparation nicht vorbeschädigt waren. Die Gewebekulturen wurden im weiteren Verlauf zusammen mit dem Präparationsmedium zentral nach einem reproduzierbaren Muster (siehe Abb. 2C) auf Kultur-Membranen (Millicell CM mit 0,4 µm große Poren, 30 mm Durchmesser) überführt (Stoppini et al., 1991). Anschließend wurde das Präparationsmedium abgesaugt und die auf den Membranen liegenden Gewebekulturschnitte unter ständiger Berücksichtigung der Sterilität in die mit je 1 ml Kulturmedium gefüllten Kulturschalen (*Six-well*-Schalen) transferiert (siehe Abb. 2D). Danach wurden die Gewebekulturen im Inkubator bei 37° C und 95% CO<sub>2</sub>-Gehalt 14 Tage lang (DIV14) inkubiert, damit diese sich von Verletzungen, die während der Präparation aufgetreten sind, regenerieren können. Das Kulturmedium wurde erstmalig nach 24 Stunden und danach alle 48 Stunden gewechselt.



**Abbildung 2: A-D)** Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Präparation, Gruppierung der Gewebekulturen und Inkubation. A) Abgeschnittene Hippocampus-Scheibe (400µm), B) Benachbarte Schwesterkulturen als ein Triplet (3x) im Querschnitt, C: Platzierung der Gewebekulturen zentral auf Kultur-Membranen (Millicell CM, 0.4-µm Kulturplatte, 30 mm Durchmesser; Merck Millipore) in einer reproduzierbaren Anordnung mit Hilfe der Markierung seitlich der Membran, D) Experimentelle Anordnung der auf Kultur-Membran platzierten Gewebekulturen in einer Kulturschale (Six-well-Schalen). Durch Markierung seitlich der Kultur-Membranen ist eine reproduzierbare Anordnung der Gewebekulturen möglich (Beispiel 1a, 2a, 3a bilden ein Triplet) (Grafik modifiziert nach Prof. Dr. Bender).

### **5.3. Trauma-Induktion durch die *rolling-cylinder*-Technik**

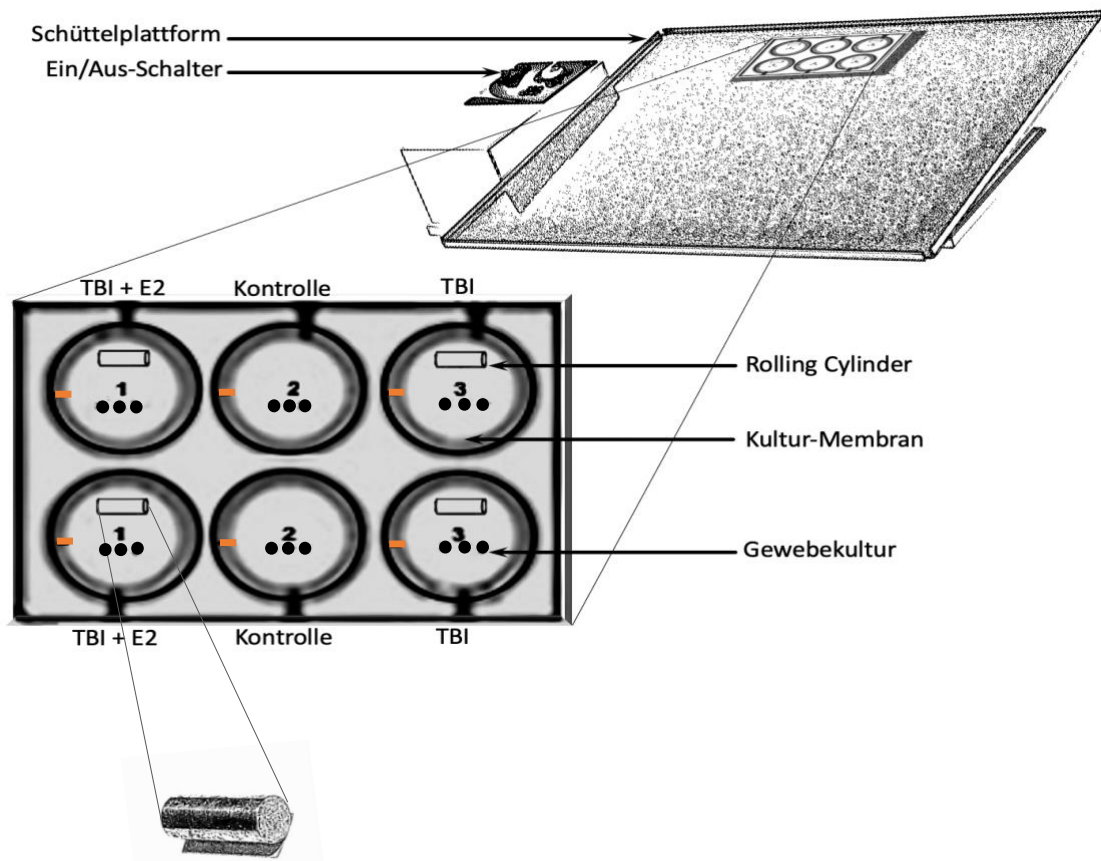
Die *TBI*-Induktion bei den Gewebekulturen wird mit Hilfe der *rolling-cylinder*-Technik herbeigeführt.

Dazu wird die Kulturschale mitsamt den Gewebekulturen dem Inkubator entnommen und auf einen regulierbaren Schüttler platziert, der die vertikale Kippung einer horizontalen Platte mit variabel einstellbarem Neigungswinkel ermöglicht. Bei dem verwendeten Gerät handelte es sich um einen Wipp-Schüttler mit variabler Drehzahl, dessen Neigungswinkel mit 3°, 6°, 9° oder 12° eingestellt werden kann. Für die Experimente wurde ein Neigungswinkel von 12° verwendet.

Die Kulturschale wird auf dem hinteren Drittel der Schüttelplattform des Schüttlers platziert, die sich zu Beginn des Experimentes in der maximalen Inklination (12°) nach hinten befindet. Dann werden vorsichtig Zylinder aus Stahl mit einem Gewicht von 3,16 g, 12 mm Länge und 5 mm Durchmesser hinter den Gewebekulturen der Gruppen 1 (*TBI* + E2) und 3 (*TBI*) am tiefst gelegenen Rand des Membraneinsatzes platziert (Abb. 3). Schließlich wird die Einschalt-Taste betätigt und die Schüttelplattform neigt sich zuerst zur Gegenseite (12° nach vorne), um danach wieder in die Ausgangsposition zurückzuschwingen, in der die Bewegung durch Ausschalten gestoppt wird. Dabei werden die Gewebekulturen von den Zylindern zweimal mit einer Geschwindigkeit von ca. 140 mm/s überrollt und durch den dabei entstehenden mechanischen Druck auf das Gewebe wird eine traumatische Schädigung hervorgerufen.

### **5.4. Behandlung der Gewebekulturen nach *in vitro*-TBI**

Nach Beendigung der *in vitro*-*TBI* und dem Entfernen der Zylinder wurden die Gewebekulturen in Kulturschalen (*Six-well*-Schalen) zurücktransferiert, die mit frischem Medium befüllt waren, dem jedoch Propidiumiodid (5 µM) beigefügt war. Zusätzlich wurde dem Medium der experimentellen Gruppe 1 (*TBI* + E2) 17β-Estradiol (20 nM) zugegeben. Anschließend wurden die Gewebekulturen umgehend in den Inkubator zurückgebracht und dort bis zur Fixierungszeit aufbewahrt.



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung der *rolling-cylinder*-Technik

## 5.5. Fixieren und Einfrieren der Gewebekulturen

Das Fixieren und das anschließende Einfrieren der Gewebekulturen wurde zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten vorgenommen: nach 12, 24 oder 48 Stunden. Zur Fixierung wurde wie folgt vorgegangen:

Wenn der jeweilige Fixierungszeitpunkt erreicht war, wurden die Kulturen aus dem Inkubator entnommen und in eine neue *Six-well*-Schale transferiert, welche mit 1x PBS-Puffer befüllt war. Dort wurden sie eine Minute lang gewaschen und anschließend in eine Kulturschale weitertransferiert, in der sie zwecks Fixierung mit 4% PFA-Lösung (5ml) überschichtet wurden. Danach wurden sie mindestens 2 Stunden im Kühlschrank gelagert. Im nächsten Schritt wurden die Gewebekulturen zur Kryoprotektion mit 25% Saccharose-Lösung (in 1x PBS) für mindestens 4 h überschichtet, anschließend mit einem Pinsel von der Membran abgelöst und auf ein Glasplättchen (Deckglas) übertragen. Auf diesem Deckglas wurden die zuvor auf verschiedenen Kulturmembranen verteilten und verschiedenen Experimentalbedingungen ausgesetzten Einzelkulturen eines Triplets (z. B. 1a, 2a und 3a in Abb. 2D) in reproduzierbarer Anordnung wieder zusammengeführt. Danach wurden die Reste der Saccharose-Lösung vorsichtig abgetupft, die Gewebekulturen mit einem Tropfen Gefriermedium (*Tissue Tec*)

überschichtet und dann auf Trockeneis eingefroren. Bis zum nächsten Arbeitsschritt wurden die Gewebekulturen bei -80° C eingelagert.

## 5.6. Schneiden der Gewebekulturen

Zum Schneiden der Gewebekulturen mit Hilfe des Kryostat-Geräts (*Cryostar NX70*) wurden Gewebekulturen dem Gefrierschrank (-80° C) entnommen und in die Kühlkammer des Kryostats (-16° C) gelegt. Danach wurden die Tropfen Gefriermedium mit den eingefrorenen Gewebekulturen vom Glasplättchen gelöst und auf den Objekthalter (passend zum *Cryostar NX70* Gerät) mit Hilfe des Gefriermediums aufgefroren. Nun wurde der Objekthalter mitsamt der Gewebekultur im Objektkopf so eingespannt und eingerichtet, dass die Gewebekultur parallel zur Schneidekante ausgerichtet ist, um eine gleichmäßige Schnitfführung gewährleisten zu können. Die Gewebekulturen wurden danach mit einer Schnittdicke von 20 µm geschnitten (Klingentemperatur -17° C). Die so entstandenen Gewebekulturschnitte wurden mittels Spatel vom Klingenthaler genommen und in eine Kulturschale mit 1x PBS übertragen. Danach wurden die akkurat geschnittenen bzw. verwendbaren Kulturschnitte mittels eines feinen Pinsels auf einen Objektträger (OT) platziert. Dabei wurde beachtet, dass Schnitte von zusammengehörenden, jedoch experimentell verschieden behandelten Schwesterkulturen nach einem reproduzierbaren Muster (z. B.: *TBI+E2 – Ctl – TBI* in paralleler Reihe) auf demselben Objektträger platziert wurden, um bei der anschließenden Immunhistochemie denselben Bedingungen ausgesetzt zu sein. Nach einer mindestens 4-stündigen Trocknungsphase an der Luft, wurden die OT bis zur weiteren Verarbeitung (Immunhistochemie) im Gefrierschrank bei -20° C eingefroren.

## 5.7. Immunhistochemie

In der Immunhistochemie werden Antikörper verwendet, um spezifische Antigene (meist Proteine) in verschiedenen Arten von Geweben nachzuweisen. Antikörper können mit direkten oder indirekten Methoden sichtbar gemacht werden (Im et al., 2019). Bei dieser Studie wurde die indirekte Methode für den Nachweis von Iba1 (Mikroglia) und NeuN (Neuronenspezifischer Marker) verwendet. Bei der indirekten Immunhistochemie werden gegen das Antigen gerichtete primäre Antikörper von gegen die Immunglobuline (IgGs) der Spezies, aus der die Primärantikörper gewonnen wurden (hier Meerschweinchen/Iba1 bzw. Maus/NeuN), gerichteten sekundären Antikörpern erkannt. Die Sekundärantikörper sind mit Signalmolekülen markiert (z. B. Fluorophore oder Biotin), die eine Darstellung der Bindung im Fluoreszenz- oder Lichtmikroskop ermöglichen.

### **5.7.1. Iba1-Immunhistochemie**

Für den immunhistochemischen Iba1-Nachweis wurden die eingefrorenen OTs mit den Gewebekulturschnitten dem Gefrierschrank (-20° C) entnommen und für 30 Minuten auf Raumtemperatur gebracht. Danach wurden die OTs zur Nachfixierung des Gewebes in Küvetten mit 4%-iger PFA-Lösung für 10 Minuten gelagert und anschließend für weitere 10 Minuten in 1x PBS gewaschen. Die OTs wurden dann in einer feuchten Kammer platziert. Es folgte zuerst die Überschichtung der Schnitte mit 200 µl PBS-T (1x PBS + 0,3% Triton-X100) für die Dauer von 10 Minuten, um die Zellmembranen zu permeabilisieren. Danach folgte die Präinkubation mit der Blockierungslösung (3% Ziegenserum (NGS) + PBS-T; 200 µl pro OT, 30 Minuten), um unspezifische Bindungen der Antikörper, die durch elektrostatische Ladungen im Gewebe entstehen könnten, zu reduzieren. Anschließend wurde die Präinkubationslösung von den OTs entfernt und 300 µl Inkubationslösung ersetzt, in der die Primärantikörper enthalten waren (polyklonale anti-Iba1 Antikörper aus Meerschweinchen, in Präinkubationslösung 1: 500 verdünnt). Mit diesen wurden die Gewebekulturschnitte über Nacht in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Die OTs wurden am nächsten Tag in einer mit 1x PBS befüllten Küvette für 2 x 10 Minuten gewaschen und danach wieder in die feuchte Kammer transferiert. Es folgte für 3 h bei Raumtemperatur die Inkubation mit den Sekundärantikörpern (mit dem Fluorophor Alexa647 markierte, gegen Meerschweinchen IgGs gerichtete, polyklonale Antikörper aus der Ziege, in 1 x PBS 1:500 verdünnt). Anschließend wurden die OTs 10 Minuten in 1x PBS gewaschen, danach für ca. 1 Minute mit DAPI-Lösung überschichtet und nochmals für 10 Minuten gewaschen, bevor sie abschließend wenige Sekunden in Aqua dest. eingetaucht und abgedunkelt zum Trocknen abgelegt wurden. Sobald sie getrocknet waren, wurden sie mit einem Tropfen Einbettmedium (Dako) überschichtet, mit einem Deckgläschen bedeckt und bis zur Fluoreszenz-Mikroskopie (siehe 5.8.) im Kühlschrank aufbewahrt.

### **5.7.2. NeuN-Immunhistochemie**

Die immunhistochemische Darstellung NeuN-exprimierender Zellen (Neurone) wurde erst nach Abschluss der Iba1-Auswertung durchgeführt. Es wurden dafür dieselben OTs genutzt, an denen zuvor der Iba1-Nachweis erfolgt war. Dazu wurden zuerst die Deckgläschen von diesen OTs wieder entfernt und die Gewebekulturschnitte für ca. 30 Minuten in 1x PBS gewaschen. Danach wurden sie in eine feuchte Kammer überführt und wie oben beschrieben zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen präinkubiert. Es folgte die Inkubation mit den Primärantikörpern (monoklonale anti-NeuN Antikörper aus Mauszellen, in Präinkubationslösung 1:500 verdünnt) über Nacht und im Anschluss daran erneute Waschschrte mit 1x PBS (2x 10 Minuten). Nachfolgend wurde der Antigenbindungsnachweis

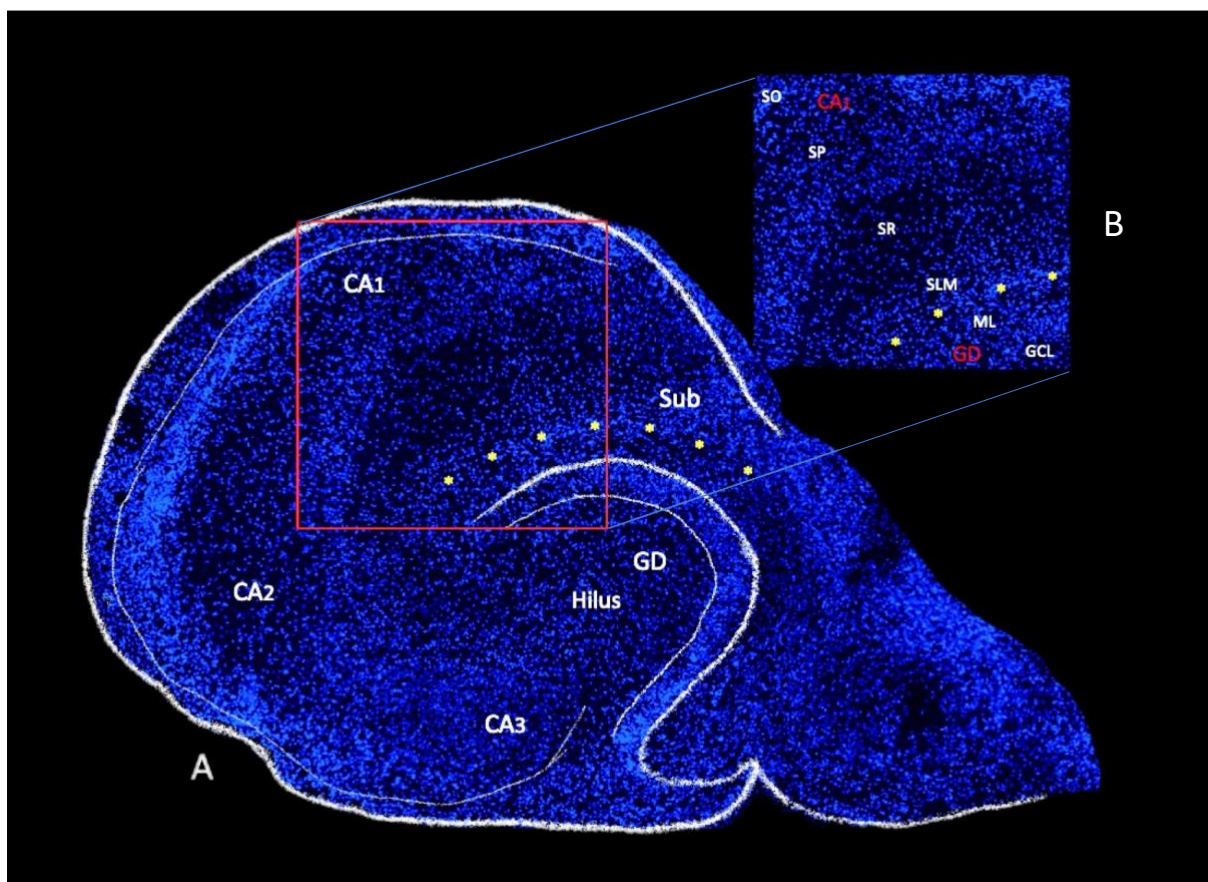
für die Lichtmikroskopie durchgeführt: die OTs wurden mit Sekundärantikörpern inkubiert, die mit Biotin markiert waren (gegen Maus IgGs gerichtete Antikörper aus der Ziege, in 1x PBS 1:250 verdünnt). Nach ca. 3-stündiger Inkubation bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer wurden die OTs erneut gewaschen (1x PBS, 2x 10 Minuten) und danach mit einer Lösung überschichtet, in der an Avidin-Moleküle gekoppelte Peroxidase enthalten war. Zur Vorbereitung dieser Lösung mussten zwei individuelle Komponenten des 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Nachweiskits der Fa. Vectastain (ABC-Elite-Kit) für 15 Minuten zusammen inkubiert werden (Lösung A: Avidin; Lösung B: Peroxidase). Die aus dieser Vereinigung entstehenden Avidin-Peroxidase-Komplexe binden mit hoher Affinität an die Biotin-Moleküle der Sekundärantikörper und ermöglichen dadurch den Antigennachweis über eine enzymatische Peroxidasereaktion. Zu diesem Zweck werden nach ca. 1 Stunde die Peroxidase-Substrate 3, 3'-Diaminobenzidin und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugegeben (zuvor werden die OTs nochmals mit 1x PBS gewaschen) und es entsteht dann an der Stelle der Peroxidase-Reaktion ein bräunlicher Niederschlag, der im Lichtmikroskop erkannt und zur Bestimmung des Antigennachweises genutzt werden kann. Die Reaktion wird nach ca. 5 Minuten durch Eintauchen der OTs in Aqua dest. gestoppt, die OTs danach zur Dehydrierung des Gewebes durch eine aufsteigende Ethanolreihe geführt (30, 50, 70, 95, 2x 100%, jeweils 3 Minuten) und über das Zwischenmedium Xylol (2x 5 Minuten) die Einbettung mit dem wasserfreien Medium Eukitt vorbereitet. Nach Überschichtung mit Eukitt und Bedeckung mit einem Deckglas sind die OTs unbegrenzt haltbar.

## **5.8. Mikroskopie und Aufnahme der Gewebekulturen**

### **5.8.1. Fluoreszenzmikroskopie**

Für die Analyse wurden die OTs mit Schnitten aus den unterschiedlich behandelten Kulturen eines Triplets unter Verwendung eines Keyence Biorevo BZ 9000-Fluorescence-Mikroskops fotografiert. Um einer subjektiven Beeinflussung bei der Auswertung vorzubeugen (siehe auch 5.9.) wurden diese Aufnahmen nicht von mir selbst durchgeführt, sondern von einem Mitarbeiter des Instituts für Neuroanatomie. Für die nachfolgende Auswertung durch mich (siehe 5.9.) wurden die Bilder codiert. Für die Fotografie wurde folgendermaßen vorgegangen: zuerst wurde unter 20-facher Vergrößerung (10x Okular, 2x Objektiv) mit dem DAPI-Filter (358 nm Wellenlänge Anregung; Emission 461 nm Wellenlänge) die Qualität der Schnitte überprüft und dabei insbesondere darauf geachtet, dass die CA1-Region bei allen drei experimentellen Gruppen in mindestens einem Schnitt vollständig vorhanden und klar abgrenzbar ist. Zur Definition der CA1-Region wurden das Körnerzellband und die hippocampale Fissur herangezogen. War das Körnerzellband klar zu erkennen, so wurde oberhalb seines suprapyramidalen Anteils der Aufnahmebereich festgelegt (siehe Abb. 4). Als Begrenzung

zum Gyrus dentatus diente die hippocampale Fissur, die in der Regel durch ihre Zellkonzentration (überwiegend Gliazellen) leicht zu identifizieren war (Abb. 4). Die Aufnahmen wurden danach bei 200x Vergrößerung (10x Okular, 20x Objektiv) in 5 Gewebeschichten von je 1 µm Tiefenabstand (Z-Stack) getätigt. Die Festlegung der Gewebeschichten erfolgte anhand des PI-Bildes (Rotfilter, siehe unten). Dazu wurde durch Fokussieren im Präparat zuerst die Schicht bestimmt, in der PI-positive Nuclei gerade noch zu erkennen waren („*upper level*“). Daraufhin wurde 5 µm weiter in der Tiefe der „*lower level*“ festgelegt. Das Programm erzeugte danach 5 Aufnahmen in jeweils 1 µm Abstand, die anschließend durch den Befehl „*Full Focus*“ zu einem Gesamtbild vereinigt wurden. Es wurden nach diesem Muster von der ausgewählten Stelle jeweils 3 Aufnahmen angefertigt: mit Blaufilter (358 nm Anregung) zur Darstellung der DAPI-Färbung, mit Rotfilter (546 nm Anregung) zur Darstellung von Propidiumiodid (PI) und mit Ultrarotfilter (647 nm Anregung) zur Darstellung der Iba1-Immunstochemie (siehe Abb. 5). Die dabei verwendeten Einstellungen (Belichtungszeiten) wurden für alle Aufnahmen eines Kulturtriplets identisch beibehalten.



**Abbildung 4:** Übersichtsaufnahme in der DAPI-Färbung, A) 20x Vergrößerung, B) 100x Vergrößerung. Die gelben Sterne stellen die hippocampale Fissur dar. Abkürzungen: CA: Cornu Ammonis, GD: Gyrus dentatus, Sub: Subiculum, GCL: Stratum granulare bzw. Körnerzellschicht (*granule cell layer*), ML: Stratum moleculare bzw. Molekularschicht (*molecular layer*), SLM: Stratum lacunosum-moleculare, SR: Stratum radiatum, SP: Stratum pyramidale, SO: Stratum oriens

## 5.8.2. Lichtmikroskopie

Für die lichtmikroskopischen Aufnahmen aus NeuN-immungefärbten Schnitten wurde anfangs so vorgegangen, wie in 5.8.1 dargestellt: zuerst wurde die CA1-Region in der Übersicht (20x) sondiert und danach Aufnahmen mit 200x Vergrößerung angefertigt. Allerdings wurden diese Aufnahmen im Keyence-Mikroskop nicht im Fluoreszenz-Modus durchgeführt, sondern es wurde der „*Brightfield*“-Modus verwendet, in dem reguläres Licht ohne Filterung durch das Präparat gesandt wird.

## 5.9. Auswertung

Die Auswertungen der bei der Mikroskopie erzeugten Aufnahmen erfolgten blind (d. h. die Bilder lagen mir in codierter Form vor, siehe 5.8.), um möglichst objektive Ergebnisse sicherzustellen. Das Analyse-Programm Fiji (ehemals Image J) wurde als Hilfsmittel für die Auswertungen genutzt.

### 5.9.1. Auswertung der Propidiumiodid-positiven Zellen

Ziel der Auswertung der Propidiumiodid- (PI) positiven Zellen war die Ermittlung der Dichte PI-positiver Zellen in der CA1-Region, um das Ausmaß des durch die Kompression induzierten Zelltods bestimmen zu können. Zuerst wurde dafür durch Überlagerung der DAPI-Aufnahme und der PI-Aufnahme die CA1-Region abgegrenzt. Anschließend wurde über das Fiji-Programm Schwellenwerte (*threshold*) für die Intensität und Größe der rot gefärbten Punkte gesetzt, um möglichst objektive und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Für jedes Triplet wurde in Abhängigkeit von der Helligkeit der Bilder ein passender Schwellenwert (z.B. relative Intensität über 80% und Größe über 5  $\mu\text{m}^2$ ) definiert. Anschließend wurden die sichtbaren Punkte (Zellen) markiert, die Morphologie und Intensität der Punkte ermittelt und die Werte in eine Excel-Tabelle übertragen. Abschließend wurde die Fläche der CA1-Region in  $\text{mm}^2$  bestimmt und die Anzahl der PI-positiven Zellen innerhalb dieser berechnet. Dieselbe Auswertung wurde anschließend noch spezifisch für das Stratum pyramidale (SP) durchgeführt, wobei das SP mit Hilfe des DAPI-Bildes abgegrenzt wurde.

### 5.9.2. Auswertung der Iba1-positiven Zellen

Bei der Auswertung der Iba1-Immunhistochemie in der CA1-Region wurden zwei Werte ermittelt: 1) die Anzahl Iba1-positiver Zellen und 2) die Gesamtintensität der Iba1-Färbung in der CA1-Region. Bei der Abgrenzung der CA1-Region und der Berechnung der Fläche in  $\text{mm}^2$

wurde analog zur PI-Auswertung (5.9.1) vorgegangen. Danach wurde zur Bestimmung Iba1-positiver Zellen und deren Ausläufern die Toleranz so angepasst, dass die Iba1-positiven Zellen vollständig markiert werden konnten. Anschließend wurde die Anzahl der markierten Iba1-positiven Zellen bestimmt und die Intensität der Iba1-Expression in der gesamten CA1-Region ermittelt. Auch hier wurde, analog zur PI-Auswertung, noch eine zweite Auswertung spezifisch für das Stratum pyramidale durchgeführt.

### **5.9.3. Auswertung der NeuN-positiven Zellen**

Bei der Auswertung der NeuN-Immunhistochemie wurde die Neuronendichte in der CA1-Region nach *in vitro-TBI* ermittelt. Diese Auswertung wurde nachträglich in das Programm der Dissertation aufgenommen, nachdem festgestellt worden war, dass *in vitro-TBI* zu einer signifikanten Erhöhung der PI-Aufnahme führte (Abb. 7, 8 und 11). Ziel war es, zu überprüfen, ob aus dieser, mutmaßlich verstärkten Zelltod anzeigenden, erhöhten PI-Aufnahme eine geringere Neuronendichte resultierte. Bei dieser ergänzenden Untersuchung wurde daher nur der Zeitpunkt „48h nach *in vitro-TBI*“ betrachtet. Die Stichprobengröße betrug hier nur 10 Triplets (5 weiblich, 5 männlich), weil zu diesem Zweck die zuvor bereits für die PI- bzw. Iba1-Analysen eingesetzten Schnitte nochmals verwendet wurden und einige Triplets wegen zu großer Gewebelastung durch das Wiederablösen des Deckglases nicht mehr ausgewertet werden konnten. Wie für die PI- und Iba1-Auswertungen wurde zuerst die Fläche der CA1-Region in mm<sup>2</sup> für jede einzelne Aufnahme ermittelt, anschließend die Anzahl der NeuN-positiven Zellen darin mit Hilfe des Fiji-Programms berechnet und durch Division dieser Anzahl durch die Fläche die Dichte der NeuN-positiven Zellen in der CA1-Region ermittelt.

### **5.10. Grafische Darstellung und statistische Analyse**

Die Ergebnisse wurde mittels des Statistikprogrammes *Graph Pad Prism* statistisch ausgewertet. Die Darstellung der Ergebnisse in dieser Arbeit erfolgt in Form von Balkendiagrammen.

Zur statistischen Analyse der gepaarten experimentellen Gruppen (Kontrolle, *TBI* und *TBI* + E2) wurde zunächst mittels *Column statistics* der Mittelwert und der Standardfehler ermittelt, welche allen Balkendiagrammen dieser Arbeit zu entnehmen sind. Anschließend wurde geprüft, ob die Werte normalverteilt (parametrisch) sind oder nicht. Hierfür wurde der *Kolmogorow-Smirnow normality Test* (ein statistischer Test auf Übereinstimmung zweier Wahrscheinlichkeitsverteilungen) verwendet. Bei nicht gegebener Normalverteilung wurde zum Vergleich der drei experimentellen Gruppen der *Friedman Test* (ein nicht-parametrischer Test für drei oder mehr gepaarte Stichproben) verwendet. War eine Normalverteilung in allen

Gruppen gegeben, erfolgte die statistische Auswertung über eine *repeated measure One-way-ANOVA with Greenhouse-Geisser correction*. Zur Post-hoc Analyse wurde der *Dunn`s Multiple Comparison Test* für die Gegenüberstellung einzelner experimenteller Gruppen innerhalb eines Triplets verwendet. Als Signifikanzniveau wurde  $p < 0,05$  festgesetzt (in den Diagrammen sind Unterschiede mit einem Signifikanzniveau  $< 0,05$  durch \* markiert; stärkere Signifikanzen sind durch \*\* $<0.01$ , \*\*\* $<0.001$  ausgewiesen).

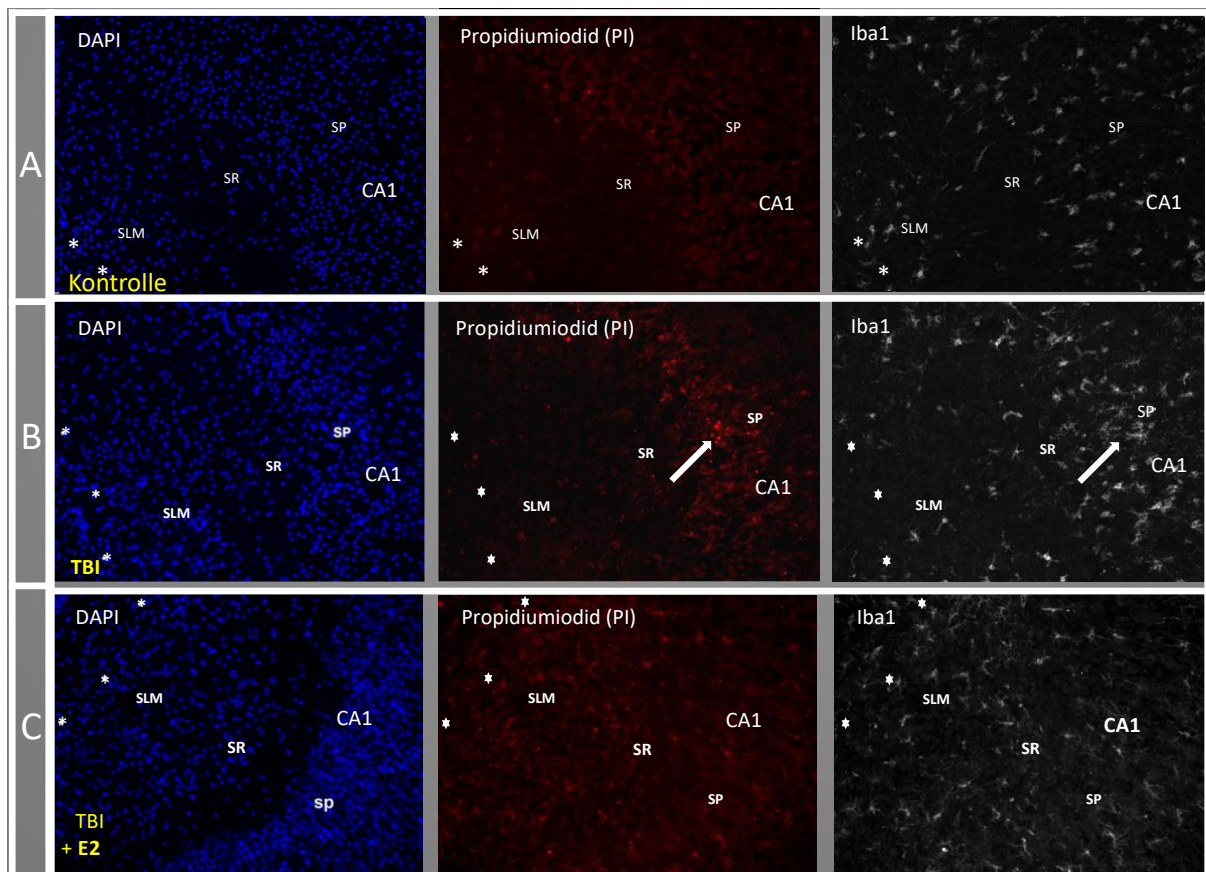
## 6. Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der beschriebenen *in vitro*-Untersuchungen zu Zelltod und Mikrogliaaktivierung nach *TBI* grafisch dargestellt, mit den relevanten statistischen Daten versehen und erläutert. Fotografische Illustrationen der Ergebnisse sind in den Abb. 5 + 12 (PI und Iba1) und Abb. 13 (NeuN) gegeben.

### 6.1. Darstellung von Zelltod und Mikrogliaaktivierung nach *in vitro-TBI* in der CA1-Region

Um das Ausmaß und den Zeitverlauf des durch *in vitro-TBI* induzierten Zelltods in der CA1-Region, die begleitende Mikrogliaaktivierung und den potenziellen Einfluss von E2 untersuchen zu können, wurde, wie im Kapitel „Methoden“ beschrieben, dem Kulturmedium nach *in vitro-TBI* der Nukleinsäure-Interkalator Propidiumiodid zugegeben (zur Bestimmung des Zelltods) und die Darstellung von Mikrogliaaktivierung wurde mithilfe eines immunhistochemischen Nachweises des calciumbindenden Moleküls Iba1 durchgeführt. Abb. 5 zeigt eine exemplarische Darstellung des Nachweises von Zelltod und Mikrogliaaktivierung in der CA1-Region, 24 h nach Durchführung der *in vitro-TBI* anhand eines Kultur-Triplets, aus dem je eine Kultur einer der drei experimentellen Gruppen zugeordnet wurde. In der Abbildung repräsentiert (A) die Kontrollgruppe, (B) die *TBI*-Gruppe und (C) die *TBI* + E2-Gruppe.

Auffällig ist ein erhöhter Anteil PI-markierter Zellkerne in der *TBI*-Gruppe (Abb. 5B, Mitte), sowohl im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 5A, Mitte) als auch im Vergleich zur *TBI*+E2-Gruppe (Abb. 5C, Mitte). Außerdem scheinen die PI-markierten Zellen nach *TBI* im Stratum pyramidale (SP) konzentriert und dort mit Iba1-immunpositiven Mikrogliazellen assoziiert zu sein (z. B. siehe Pfeile in Abb. 5B Mitte und rechts). Diese Hypothese wird nachfolgend mit quantitativen Auswertungen untersucht.

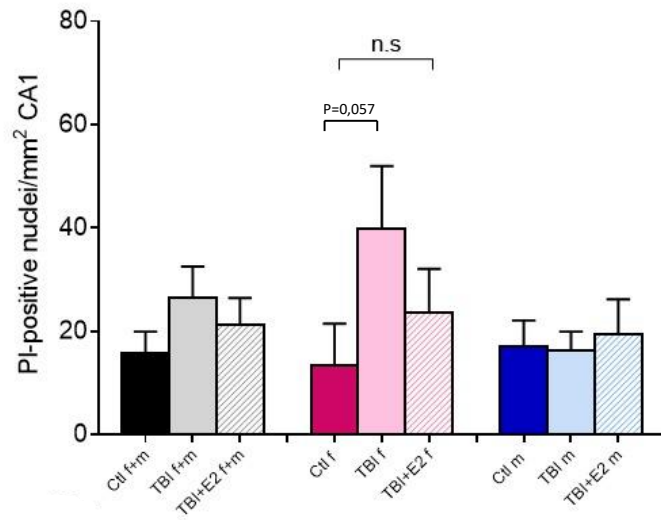


**Abbildung 5:** Exemplarische Darstellung einer Übersichtsaufnahme der Resultate eines Kultur-Triplets auf einem Objektträger zum Nachweis von Zelltod und Mikrogliaaktivierung in der CA1-Region von hippocampalen Gewebekulturen. Sterne (\*) markieren die hippocampale Fissur, A) Kontrolle, B) *TBI*, C) *TBI* + E2, SLM: Stratum lacunosum-moleculare, SR: Stratum radiatum, SP: Stratum pyramidale

## 6.2. Quantitative Auswertung der nach *in vitro-TBI* eintretenden PI-Aufnahme (Zelltod) in der CA1-Region (gesamt)

Die Bewertung des Ausmaßes des nach *in vitro-TBI* eintretenden Zelltods erfolgte wie beschrieben durch die Ermittlung der Anzahl PI-positiver Zellen in der CA1-Region. Diese Auswertung erfolgte an drei Zeitpunkten (12, 24 und 48h) nach *in vitro-TBI*, um auch die Entwicklung im Zeitverlauf betrachten zu können. Die Ergebnisse dieser Auswertungen finden sich in den nachfolgenden Abb. 6, 7 und 8.

12 h



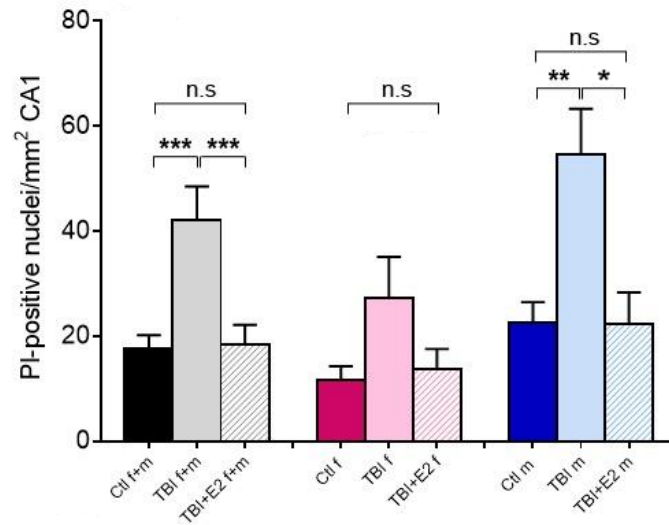
PI-positive nuclei 12 h (f+m)	Ctl f+m	TBI f+m	TBI+E2 f+m
N	23	23	23
Mittelwert	15,6	26,5	21,2
Standardabweichung	21,0	29,0	25,1
Standardfehler	4,4	6,0	5,2
Friedman-Test/-Statistik: $p=0,175/ 3,48$ (f+m) post-hoc: keine Signifikanz			

PI-positive nuclei 12 h (f)	Ctl f	TBI f	TBI+E2 f
N	10	10	10
Mittelwert	13,5	39,9	23,5
Standardabweichung	25,3	38,3	27,2
Standardfehler	8,0	12,1	8,6
Friedman-Test/-Statistik: $p=0,028/ 6,98$ (f) post-hoc: $p=0,057^*$ (Ctl vs. TBI, f)			

PI-positive nuclei 12 h (m)	Ctl m	TBI m	TBI+E2 m
N	13	13	13
Mittelwert	17,2	16,2	19,5
Standardabweichung	18,0	13,5	24,4
Standardfehler	5,0	3,7	6,8
Friedman-Test/-Statistik: $p=0,86/ 0,29$ (m) post-hoc: keine Signifikanz			

**Abbildung 6:** Grafische Darstellung und statistische Daten der Dichte mit PI-markierter Zellen in der CA1-Region nach 12 h nach *in vitro*-TBI. Die Darstellung erfolgt unabhängig vom Geschlecht in grau, sowie nach Geschlecht getrennt (männlich in blau; weiblich in rosa). Weiterhin sind die Kulturen der Kontrollgruppe grafisch jeweils in dunkel, TBI-Gruppe hell und TBI + E2-Gruppe schraffiert dargestellt.

24 h



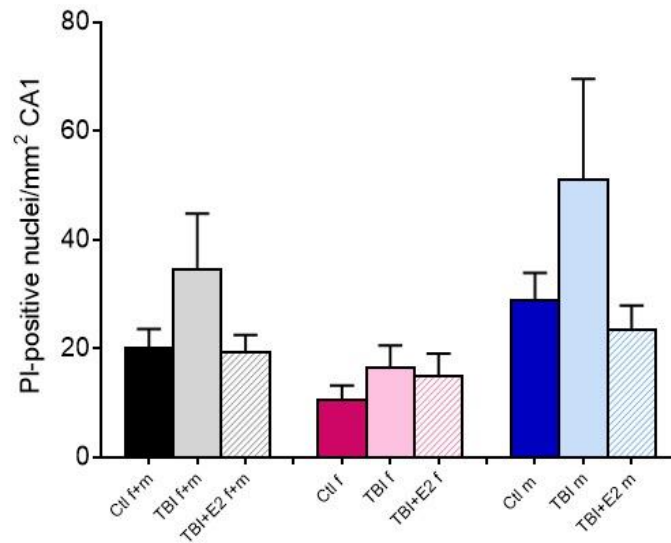
PI-positive nuclei 24 h (f+m)	Ctl f+m	TBI f+m	TBI+E2 f+m
N	24	24	24
Mittelwert	17,54	42,04	18,38
Standardabweichung	13,00	31,69	18,34
Standardfehler	2,65	6,47	3,74
Friedman-Test/-Statistik: $p < 0,0001 / 19,98$ (f+m) post-hoc (Dunn): $p = 0,0004^{***}$ (Ctl vs. TBI f+m), $p = 0,0005^{***}$ (TBI vs. TBI+E2 f+m)			

PI-positive nuclei 24 h (f)	Ctl f	TBI f	TBI+E2 f
N	11	11	11
Mittelwert	11,73	27,27	13,82
Standardabweichung	8,39	25,98	12,39
Standardfehler	2,53	7,84	3,73
Friedman-Test/-Statistik: $p = 0,0265 / 7,171$ post-hoc (Dunn): $p = 0,076$ (Ctl vs. TBI f), $p = 0,076$ (TBI vs. TBI+E2 f)			

PI-positive nuclei 24 h (m)	Ctl m	TBI m	TBI+E2 m
N	13	13	13
Mittelwert	22,46	54,54	22,23
Standardabweichung	14,42	31,52	21,95
Standardfehler	4,00	8,74	6,09
RM One-way ANOVA: $p = 0,001$ , $F = 10,03$ post-hoc (Dunn): $p = 0,006^{**}$ (Ctl vs. TBI m), $p = 0,012^*$ (TBI vs. TBI+E2 m)			

**Abbildung 7:** Grafische Darstellung und statistische Daten der Dichte mit PI-markierter Zellen in der CA1-Region nach 24 h nach *in vitro*-TBI. Die Darstellung erfolgt unabhängig vom Geschlecht in grau, sowie nach Geschlecht getrennt (männlich in blau; weiblich in rosa). Weiterhin sind die Kulturen der Kontrollgruppe grafisch jeweils in dunkel, TBI-Gruppe hell und TBI + E2-Gruppe schraffiert dargestellt.

48 h



PI-positive nuclei 48 h (f+m)	Ctl f+m	TBI f+m	TBI+E2 f+m
N	23	23	23
Mittelwert	20,17	34,52	19,30
Standardabweichung	16,48	49,36	15,34
Standardfehler	3,44	10,29	3,20

Friedman-Test/-Statistik:  $p=0,6483/ 0,8667$  (f+m)  
post-hoc: keine Signifikanz

PI-positive nuclei 48 h (f)	Ctl f	TBI f	TBI+E2 f
N	11	11	11
Mittelwert	10,64	16,36	14,91
Standardabweichung	8,66	14,04	13,09
Standardfehler	2,61	4,23	4,02

Friedman-Test/-Statistik:  $p=0,906/ 0,325$  (f)  
post-hoc: keine Signifikanz

PI-positive nuclei 48 h (m)	Ctl m	TBI m	TBI+E2 m
N	12	12	12
Mittelwert	28,92	51,17	23,33
Standardabweichung	17,34	63,74	16,06
Standardfehler	5,00	18,04	4,64

Friedman-Test/-Statistik:  $p=0,273/ 2,596$  (m)  
post-hoc: keine Signifikanz

**Abbildung 8:** Grafische Darstellung und statistische Daten der Dichte mit PI-markierter Zellen in der CA1-Region nach 48 h nach *in vitro*-TBI. Die Darstellung erfolgt unabhängig vom Geschlecht in grau, sowie nach Geschlecht getrennt (männlich in blau; weiblich in rosa). Weiterhin sind die Kulturen der Kontrollgruppe grafisch jeweils in dunkel, TBI-Gruppe hell und TBI + E2-Gruppe schraffiert dargestellt.

Nach 12 Stunden war in der CA1-Region ein Anstieg PI-markierter Zellen in der *TBI*-Gruppe speziell bei den weiblichen (f, rosa) Kulturen erkennbar (Abb. 6), welcher nach vom *Friedman-Test* generell als „signifikant“ ausgewiesen wurde ( $p= 0,028$ ). Allerdings zeigte die Post-hoc Analyse mit dem *Dunn`s Multiple Comparison Test* keine Signifikanz zwischen einzelnen Gruppen auf. Dennoch kann aufgrund des  $p$ -Werts von 0,057 im Vergleich der Gruppen *Ctl* (f) und *TBI* (f) ein Unterschied in der PI-Aufnahme als relativ wahrscheinlich angenommen werden. Kein Unterschied wurde im Vergleich der männlichen (m, blau) Gruppen detektiert. Und auch wenn alle Kulturen in die Analyse einbezogen wurden (f + m, grau), ergab der statistische Vergleich kein signifikantes Resultat.

Deutlicher war die Situation 24 Stunden nach *in vitro-TBI* (Abb. 7): Hier zeigte der Vergleich der experimentellen Gruppen bei Einbeziehung aller Kulturen (f+m, grau) einen deutlichen Anstieg der PI-Aufnahme in CA1 nach *in vitro-TBI*. Dieser war sowohl gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe (*Ctl*), als auch gegenüber der *TBI*+E2-Gruppe hochsignifikant. Die geschlechtsabhängige Analyse lässt vermuten, dass dieser Effekt in den männlichen Kulturen (m, blau) ausgeprägter war als in den weiblichen (f, rosa), da die Post-hoc Analysen nur für die männlichen Kulturen signifikante Unterschiede erbrachten, und zwar sowohl beim Vergleich der Kontroll- (*Ctl*) mit der *TBI*-Gruppe, als auch bei der *TBI*- mit der *TBI*+E2-Gruppe. Eine deutliche Tendenz in dieselbe Richtung wurde jedoch auch bei den weiblichen Kulturen beobachtet.

Nach 48 Stunden wurde in keiner der durchgeführten Analysen ein Effekt der *in vitro-TBI* auf die PI-Aufnahme beobachtet (Abb. 8). Auf Basis dieser Ergebnisse lässt sich schlussfolgern, dass in der CA1-Region der durch *in vitro-TBI* induzierte Zelltod nach 24 Stunden ein Maximum zu erreichen scheint und danach abflacht. In der *TBI* + E2-Gruppe war dieser Effekt jedoch zu keinem Zeitpunkt sichtbar. Somit belegen diese Befunde die Hypothese eines durch *in vitro-TBI* induzierten Zelltodes in der CA1-Region und sie unterstützen auch die Annahme eines neuroprotektiven Effektes von E2. Betrachtet man die Zeitverläufe geschlechtsspezifisch, so entsteht weiterhin der Eindruck, dass der Zelltod in den männlichen Kulturen mit Verzögerung eintritt, dafür jedoch ein größeres Ausmaß annimmt. Hier sind die Stichproben jedoch nicht ausreichend, um eine zuverlässige Aussage zu treffen.

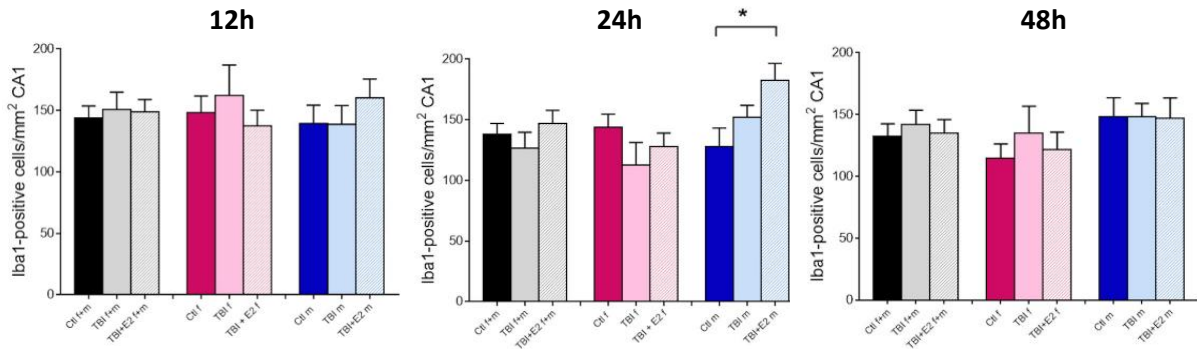
### **6.3. Auswirkungen von *in vitro-TBI* auf Mikrogliazellen in der CA1-Region**

Für die Bewertung der Auswirkungen einer *in vitro-TBI* auf die Mikrogliazellen wurden zwei Parameter untersucht: 1) es wurde in den 3 experimentellen Gruppen (Triplets) die Anzahl

Iba1-immunpositiver Zellen (pro mm<sup>2</sup> CA1) 12, 24 und 48 h nach *in vitro*-TBI bestimmt, und 2) es wurde die Intensität der Iba1-Immunreaktion (pro mm<sup>2</sup> CA1) als Indikator der Iba1-Expression in der CA1-Region quantifiziert. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in den Abbildungen 9 („Anzahl Iba1-positiver Zellen“) und 10 („Iba1-Intensität“) grafisch dargestellt und mit statistischen Werten versehen.

### **6.3.1. Anzahl der Iba1-positiven Zellen in der CA1-Region**

Wurde die Anzahl der Iba1-positiven Zellen in der gesamten CA1-Region betrachtet, so war zu keinem der analysierten Zeitpunkte ein signifikanter Effekt der *in vitro*-TBI nachweisbar. Ein signifikanter Unterschied ergab sich nur in den männlichen Kulturen beim Vergleich der Kontrollgruppe mit der TBI+E2-Gruppe 24 h nach *in vitro*-TBI (Abb. 9). Da zu diesem Zeitpunkt kein erhöhter Zelltod (bzw. erhöhte PI-Aufnahme) in der männlichen TBI+E2-Gruppe feststellbar war, wäre ein Zusammenhang zwischen der erhöhten Mikroglia-Anzahl und dem im Vergleich zur TBI-Gruppe reduzierten Zelltod denkbar. Allerdings lässt die in dieser Untersuchung geringe Stichprobengröße (n=6) diesen Rückschluss nicht verlässlich zu.



Iba1- positive Zellen in CA1, 12 h	Ctl f+m	TBI f+m	TBI+E2 f+m	Ctl f	TBI f	TBI+E2 f	Ctl m	TBI m	TBI+E2 m
N	20	20	20	10	10	10	10	10	10
Mittelwert	144	151	108	148	162	137	140	139	160
Standardabweichung	43,9	64,7	61,3	42,4	79,6	40,2	47,2	47,7	48,5
Standardfehler	9,8	14,5	13,7	13,4	25,0	12,7	14,9	15,1	15,4
<i>RM One-Way ANOVA: p=0,89, F=0,1 (f+m); p=0,57, F=0,52 (f); p=0,36, F=1,02 (m)</i> post-hoc: keine Signifikanz									

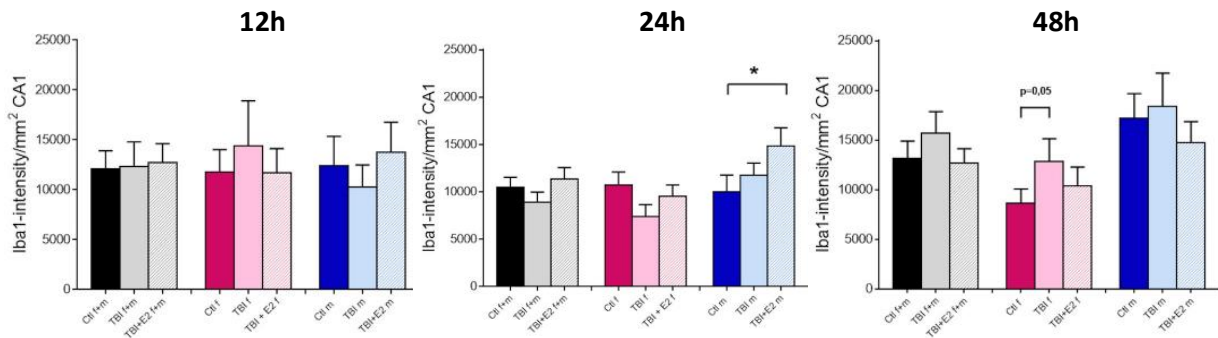
Iba1- positive Zellen in CA1, 24 h	Ctl f+m	TBI f+m	TBI+E2 f+m	Ctl f	TBI f	TBI+E2 f	Ctl m	TBI m	TBI+E2 m
N	17	17	17	11	11	11	6	6	6
Mittelwert	138	126	147	143	112	128	128	152	183
Standardabweichung	35,5	54,8	44,0	37,0	62,5	36,8	36,8	24,2	34,2
Standardfehler	8,9	13,3	10,7	11,2	18,8	11,1	15,0	10,0	13,9
<i>RM One-Way ANOVA (m): p=0,019, F=6,236</i> post-hoc (Dunn): <i>p=0,028*</i> (Ctl vs. TBI+E2 m)									

Iba1- positive Zellen in CA1, 48 h	Ctl f+m	TBI f+m	TBI+E2 f+m	Ctl f	TBI f	TBI+E2 f	Ctl m	TBI m	TBI+E2 m
N	19	19	19	9	9	9	10	10	10
Mittelwert	132	142	135	115	135	121	148	148	147
Standardabweichung	45,0	49,9	47,9	35,2	65,0	43,1	48,6	33,5	50,8
Standardfehler	10,3	11,4	10,9	11,7	21,7	14,4	15,4	10,6	16,1
<i>RM One-Way ANOVA: p=0,67, F=0,4 (f+m); p=0,2143, F=1,746 (f); p=0,99, F=0,002 (m)</i> post-hoc: keine Signifikanz									

**Abbildung 9:** Anzahl der Iba1-positiven Zellen in der CA1-Region 12, 24 und 48 h nach *in vitro*-TBI. Die Darstellung erfolgt unabhängig vom Geschlecht in grau, sowie nach Geschlecht getrennt (männlich in blau; weiblich in rosa). Weiterhin sind die Kulturen der Kontrollgruppe grafisch jeweils in dunkel, TBI-Gruppe hell und TBI + E2-Gruppe schraffiert dargestellt.

### 6.3.2. Gesamtintensität von Iba1 in der CA1-Region

Auch bei Betrachtung der Gesamtintensität der Iba1-Immunreaktion in der CA1-Region traten kaum Unterschiede zwischen den experimentellen Gruppen in Erscheinung. Ein signifikanter Unterschied ergab sich beim Vergleich der männlichen *TBI+E2*-Gruppe mit der Kontrollgruppe nach 24 h (Abb. 10), was durch die signifikant erhöhte Anzahl Iba1-positiver Zellen in dieser Gruppe (vgl. Abb. 9) zu erklären ist. Weiterhin war eine nahezu signifikante ( $p=0,05$ ) Erhöhung der Iba1-Intensität in den weiblichen Kulturen der *TBI*-Gruppe 48 h nach *in vitro-TBI* auffällig (Abb. 10). Diese könnte als verzögerte Reaktion der Mikroglia auf die nach 12 h und 24 h erhöhte (jedoch ebenfalls nicht signifikante) PI-Aufnahme bzw. die damit verbundene Zellschädigung gedeutet werden, was in Einklang mit der in Abb. 5 dargestellten Assoziation von Iba1-immunpositiver Mikroglia mit PI-positiven Zellen stehen würde. Jedoch lässt die Gesamtbetrachtung der CA1-Region hier eine eindeutige Interpretation nicht zu. Daher wurde in einem nachfolgenden Schritt eine Auswertung spezifisch für das Stratum pyramidale durchgeführt.



Iba1-Intensität in CA1, 12 h	Ctl f+m	TBI f+m	TBI+E2 f+m	Ctl f	TBI f	TBI+E2 f	Ctl m	TBI m	TBI+E2 m
N	20	20	20	10	10	10	10	10	10
Mittelwert	12093	12333	12743	11785	14420	11679	12402	10246	13807
Standardabweichung	8102	11153	8458	7142	14227	7766	9346	7107	9391
Standardfehler	1812	2494	1891	2258	4499	2456	2956	2247	2970
<i>RM One-Way ANOVA: p=0,92, F=0,07 (f+m); p=0,45, F=0,73 (f); p=0,338, F=1,14 (m)</i> post-hoc: keine Signifikanz									

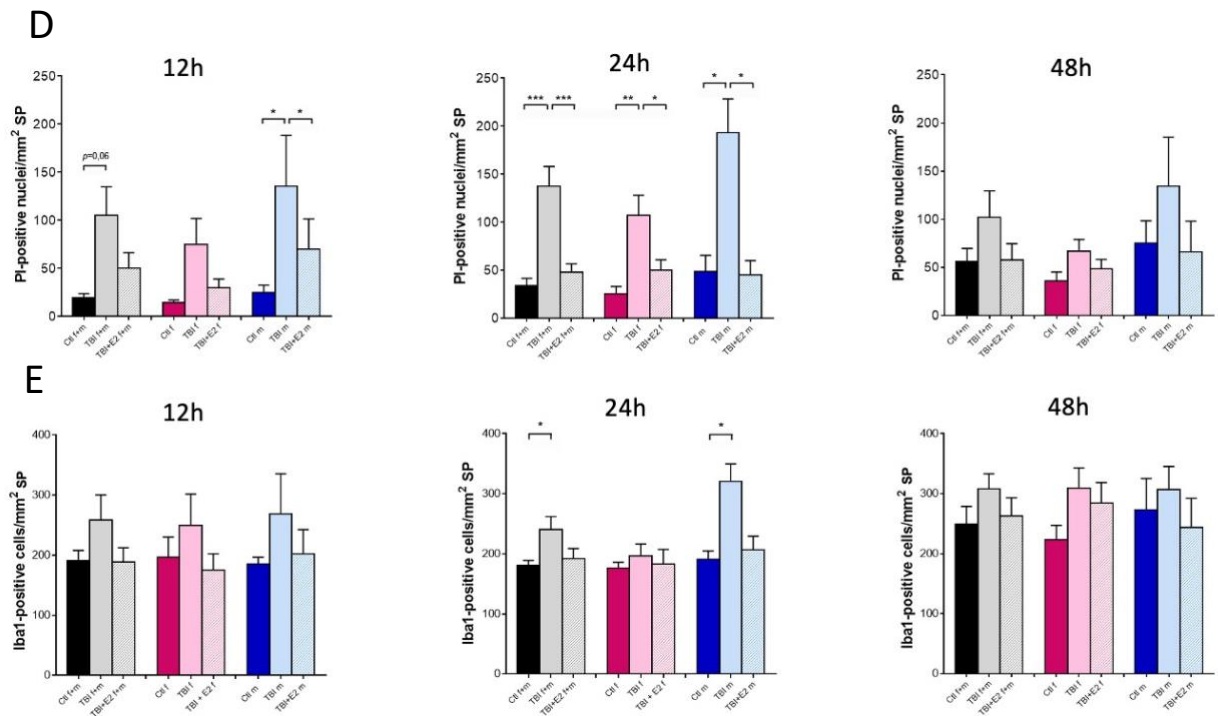
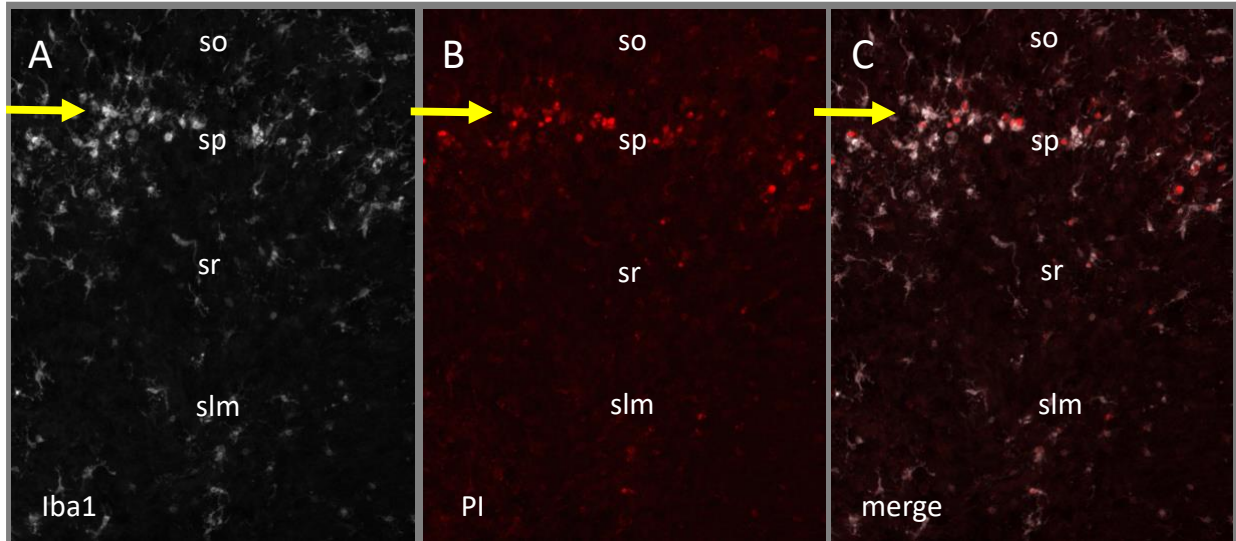
Iba1-Intensität in CA1, 24 h	Ctl f+m	TBI f+m	TBI+E2 f+m	Ctl f	TBI f	TBI+E2 f	Ctl m	TBI m	TBI+E2 m
N	17	17	17	11	11	11	6	6	6
Mittelwert	10473	8910	11389	10729	7359	9530	10003	11755	14798
Standardabweichung	4359	4412	4877	4556	4316	3958	4344	3166	4819
Standardfehler	1057	1070	1183	1374	1301	1193	1774	1293	1967
<i>RM One-Way ANOVA (m): p=0,039, F=5,164</i> post-hoc (Dunn): p=0,04* (Ctl vs. TBI+E2 m)									

Iba1-Intensität in CA1, 48h	Ctl f+m	TBI f+m	TBI+E2 f+m	Ctl f	TBI f	TBI+E2 f	Ctl m	TBI m	TBI+E2 m
N	19	19	19	9	9	9	10	10	10
Mittelwert	13163	15725	12645	8663	12810	10348	17213	18349	14712
Standardabweichung	7548	9316	6508	4215	6973	5736	7726	10687	6742
Standardfehler	1732	2137	1493	1405	2324	1912	2443	3380	2132
<i>RM One-Way ANOVA (f): p=0,032, F=4,649</i> post-hoc (Dunn): p=0,05 (Ctl vs. TBI f)									

**Abbildung 10:** Iba1-Intensität in der CA1-Region 12, 24 und 48 h nach *in vitro*-TBI. Die Darstellung erfolgt unabhängig vom Geschlecht in grau, sowie nach Geschlecht getrennt (männlich in blau; weiblich in rosa). Weiterhin sind die Kulturen der Kontrollgruppe grafisch jeweils in dunkel, TBI-Gruppe hell und TBI + E2-Gruppe schraffiert dargestellt.

#### **6.4. Gibt es eine Assoziation von Mikrogliazellen mit absterbenden Zellen im Stratum pyramidale?**

Die Auswertungen zur Iba1-Expression in der gesamten CA1-Region (Abb. 9 + 10) ergaben somit keine deutlichen Hinweise für eine Aktivierung der Mikroglia durch *in vitro-TBI*. Wie in Abb. 5 exemplarisch dargestellt und durch Abb. 11 nochmals unterstützt, entstand jedoch bei Betrachtung einzelner Aufnahmen der Eindruck, dass eine Mikrogliaaktivierung bevorzugt an Stellen auftritt, an denen durch die Anhäufung PI-positiver Nuclei auch gehäufte Zelltod vermutet werden kann, und dies insbesondere in der Pyramidenzellschicht (Stratum pyramidale, SP). Aus diesem Grund wurde eine zusätzliche Auswertung speziell für das Stratum pyramidale durchgeführt. Dabei ergab sich bei Betrachtung der PI-Aufnahme ein ähnliches Bild, wie in der gesamten CA1-Region. Die PI-Aufnahme war in der *TBI*-Gruppe signifikant erhöht. Bei beiden Geschlechtern war dieser Effekt nach 24 h am stärksten ausgeprägt und schien nach 48 h bereits wieder abzuklingen. Bei den Männchen setzte dieser bereits früher, nach 12 h, ein (Abb. 11D). Im Vergleich dazu waren bei der Betrachtung der Anzahl der Iba1-positiven Zellen im SP kaum signifikante Unterschiede innerhalb der analysierten Zeitpunkte nachweisbar. Nur bei den männlichen Kulturen beim Vergleich der Kontrollgruppe mit der *TBI*-Gruppe 24 h nach *in vitro-TBI* und, als Resultat daraus, auch in der geschlechtsunabhängigen Auswertung zeigten sich signifikante Unterschiede (Abb. 11E). Dennoch ist eine Korrelation zwischen der Anzahl der Iba1-positiven Zellen und den PI-positiven Nuclei im SP optisch ersichtlich. Die jeweiligen Verteilungen weisen ähnliche Muster auf, die eine durch *TBI*-induzierten Zelltod induzierte Mikrogliaaktivierung im SP vermuten lassen.



**Abbildung 11:** **A-C** Exemplarische Einzelaufnahmen von Iba1- (A) und PI-Nachweis (B), sowie überlappende Darstellung (C) zum Vergleich. Die gelben Pfeile markieren die durch Iba1 markierte Mikrogliaaktivierung an den Stellen gehäufte PI-positive Nuclei insbesondere in SP. SLM: Stratum lacunosum-moleculare, SR: Stratum radiatum, SP: Stratum pyramidale, SO: Stratum oriens. **D-E** Grafische Darstellung der Dichte mit PI-markierter Zellen (D) im Vergleich zu Dichte der Iba1-positiven Zellen (E) in SP 12, 24 und 48 h nach *in vitro*-TBI. Die Werte-Verteilung in D und E weist ein ähnliches Muster auf, welches auf eine Korrelation zwischen der Anzahl der PI-positiven Nuclei (D) und der Anzahl der Iba1-positiven Zellen (E) hindeutet, auch wenn keine Signifikanz innerhalb der Gruppen der Iba1-positiven Zellen (E) nachzuweisen ist. Die Darstellung erfolgt unabhängig vom Geschlecht in grau, sowie nach Geschlecht getrennt (männlich in blau; weiblich in rosa). Weiterhin sind die Kulturen der Kontrollgruppe grafisch jeweils in dunkel, TBI-Gruppe hell und TBI + E2-Gruppe schraffiert dargestellt.

12h									
PI-positive nuclei, SP	Ctl f+m	TBI f+m	TBI+E2 f+m	Ctl f	TBI f	TBI+E2 f	Ctl m	TBI m	TBI+E2 m
N	20	20	20	10	10	10	10	10	10
Mittelwert	19,5	105,3	50,1	14,3	75,1	29,8	24,7	135,4	70,4
Standardabweichung	19,1	133,3	73,5	9,1	84,8	28,8	25	168,3	98,3
Standardfehler	4,3	29,8	16,4	2,9	26,8	9,1	7,9	53,2	31,1
Friedman-Test/-Statistik: $p=0,044/ 6,25$ (f+m); $p=0,9/ 0,3590$ (f); $p=0,008/ 9,6$ (m) post-hoc (Dunn): $p=0,06$ (Ctl vs. TBI f+m), $p=0,022^*$ (TBI vs. TBI+E2 m)									
Iba1-positive Zellen, SP	Ctl f+m	TBI f+m	TBI+E2 f+m	Ctl f	TBI f	TBI+E2 f	Ctl m	TBI m	TBI+E2 m
Mittelwert	190,6	259,1	189,1	196,1	249,2	175,6	185,1	268,9	202,6
Standardabweichung	78,7	185,5	105,7	108,0	166,8	84,37	36,73	211,2	126,8
Standardfehler	17,61	41,49	23,64	34,17	52,76	26,68	11,61	66,79	40,08
Friedman-Test/-Statistik: $p=0,64/ 0,9$ (f+m); $p=0,7/ 0,8$ (m) RM One-Way ANOVA: $p= 0,03$ , $F=1,12$ (m) post-hoc: keine Signifikanz									

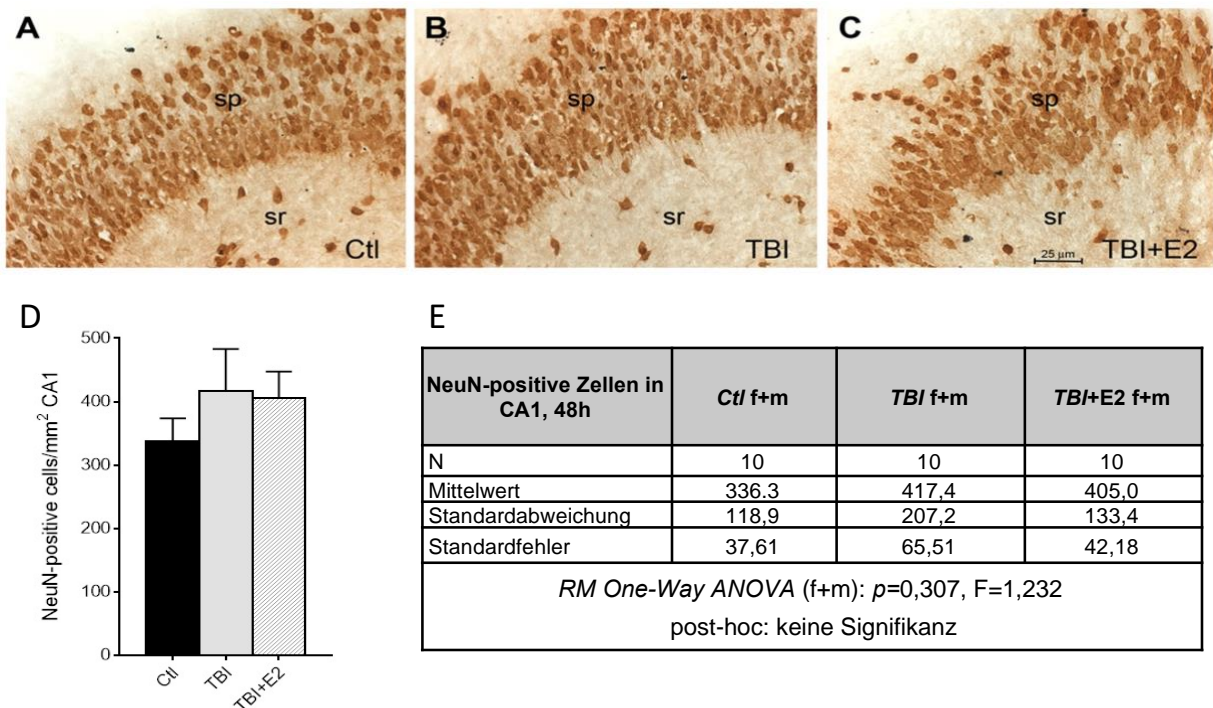
24h									
PI-positive nuclei, SP	Ctl f+m	TBI f+m	TBI+E2 f+m	Ctl f	TBI f	TBI+E2 f	Ctl m	TBI m	TBI+E2 m
N	17	17	17	11	11	11	6	6	6
Mittelwert	33,59	137,7	48,24	25,18	107,03	50,09	49,00	193,5	44,83
Standardabweichung	32,92	83,83	35,03	26,33	68,74	35,52	40,50	85,25	37,17
Standardfehler	7,983	20,33	8,495	7,938	20,72	10,71	16,53	34,80	15,17
Friedman-Test/-Statistik: $p<0,0001/23,2$ (f+m); $p=0,76/0,62$ (f) post-hoc (Dunn): $p<0,001^{***}$ (Ctl vs. TBI, f+m), $p<0,001^{***}$ (TBI vs. TBI+E2, f+m), $p=0,0013^{**}$ (Ctl vs. TBI, f), $p=0,012^*$ (TBI vs. TBI+E2 f) RM One-Way ANOVA: $p=0,071$ , $F=12,12$ (m) post-hoc (Tukey): $p=0,03^*$ (Ctl vs. TBI, m), $p=0,03^*$ (TBI vs. TBI+E2, m)									
Iba1-positive Zellen, SP	Ctl f+m	TBI f+m	TBI+E2 f+m	Ctl f	TBI f	TBI+E2 f	Ctl m	TBI m	TBI+E2 m
Mittelwert	181,0	240,2	191,6	175,8	196,5	183,6	190,5	320,5	206,3
Standardabweichung	34,17	89,80	71,41	34,0	66,13	79,76	36,45	71,48	56,53
Standardfehler	8,287	21,78	17,32	10,25	19,94	24,05	14,47	29,18	23,08
Friedman-Test/-Statistik: $p=0,0002/14,37$ (f) RM One-Way ANOVA: $p=0,028$ , $F=4,05$ (f+m); $p=0,02$ , $F=7,44$ (m) post-hoc (Tukey): $p=0,048^*$ (Ctl vs. TBI, f+m), $p=0,02^*$ (Ctl vs. TBI, m)									

48h									
PI-positive nuclei, SP	Ctl f+m	TBI f+m	TBI+E2 f+m	Ctl f	TBI f	TBI+E2 f	Ctl m	TBI m	TBI+E2 m
N	23	23	23	11	11	11	12	12	12
Mittelwert	56,43	101,90	57,65	36,00	66,73	48,36	75,17	134,10	66,17
Standardabweichung	63,40	132,50	81,41	30,58	40,74	32,83	79,93	176,80	110,0
Standardfehler	13,22	27,63	16,98	9,221	12,28	9,898	23,07	51,03	31,77
Friedman-Test/-Statistik: $p=0,09/ 4,84$ (f+m); $p=0,0002/ 14,37$ (f); $p=0,185/ 3,38$ (m) RM One-Way ANOVA: $p= 0,1516$ , $F= 2,104$ (f) post-hoc: keine Signifikanz									
Iba1-positive Zellen, SP	Ctl f+m	TBI f+m	TBI+E2 f+m	Ctl f	TBI f	TBI+E2 f	Ctl m	TBI m	TBI+E2 m
Mittelwert	249,4	308,3	263,1	223,1	309,3	284,6	272,8	307,3	243,4
Standardabweichung	140,6	119,3	143,5	77,12	110,7	113,0	181,4	131,7	169,5
Standardfehler	29,32	24,88	29,93	23,25	33,37	34,06	52,36	38,01	48,92
Friedman-Test/-Statistik: $p=0,086/5,09$ (f) RM One-Way ANOVA: $p=0,1$ , $F=2,43$ (f+m); $p=0,34$ , $F=1,11$ (m) post-hoc: keine Signifikanz									

**Abbildung 12:** Statistische Werte zur Auswertung der PI-positiven Nuclei und Iba1-positiven Zellen im Stratum pyramidale (SP) 12, 24 und 48 h nach *in vitro*-TBI aus Abb. 11

## 6.5. Untersuchung der Neuronendichte in der CA1-Region

Der Befund einer Zelltod indizierenden, erhöhten PI-Aufnahme 24 h nach *in vitro*-TBI, veranlasste mich weiterhin, zu untersuchen, ob dadurch die Anzahl von Neuronen in der CA1-Region reduziert wurde. Für diese Untersuchung wurde von Präparaten aus der 48 h-Gruppe, bei denen bereits die PI-Aufnahme und die Iba1-Expression ausgewertet worden waren, das Deckglas nochmals abgelöst und nachträglich eine NeuN-Immunhistochemie durchgeführt. Hierbei konnten nur einige der zuvor analysierten Triplets der 48 h-Gruppe ausgewertet werden, da diese nachträgliche Prozedur in einigen Präparaten eine Gewebeschädigung hervorrief, die eine Auswertung in der CA1-Region nicht mehr zuließ. In den ausgewerteten Triplets (n=10, 5 männlich, 5 weiblich) ergab sich jedoch der eher überraschende Befund, dass kein Neuronenverlust nach TBI im Vergleich zu den Kontrollen feststellbar war (Abb. 13). Die Neuronendichte war in beiden Gruppen nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 13D-E). Auch in der TBI+E2-Gruppe unterschied sich die Neuronendichte nicht signifikant von den anderen beiden Gruppen.



**Abbildung 13: A-C)** Exemplarische Darstellung der NeuN-Färbung in der CA1-Region eines Gewebekulturtriplets, von dem (B) und (C) 48 h zuvor einer *in vitro*-TBI ausgesetzt wurden, während (A) als unbehandelte Vergleichskultur (Kontrolle, Ctl) diente. Bei (C) wurde nach der TBI E2 zugesetzt. Bei visueller Betrachtung der Kulturen ist kein Neuronenverlust in einer der TBI-Gruppen zu erkennen. **D-E)** Die Quantifizierung der Neuronendichte in der CA1-Region bestätigte den visuellen Befund. Weder nach TBI- noch nach TBI+E2-Behandlung war eine Abnahme der Neuronendichte im Vergleich zu den Kontrollen feststellbar. Abkürzungen: sp = Stratum pyramidale, sr = Stratum radiatum.

## 7. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, ein *in vitro*-Modell zum Studium der Folgen traumatischer Hirnschädigung (*TBI*) zu etablieren und den Einfluss von Östrogen, spezifisch E2, auf neurodegenerative Prozesse in diesem Modell zu untersuchen. Der Fokus lag dabei auf durch *TBI* induziertem Zelltod in der CA1-Region sowie auf der diesen mutmaßlich begleitenden Mikrogliaaktivierung 12, 24 und 48 h nach *in vitro-TBI*. Speziell wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- 1) Wie wirkt sich *in vitro-TBI* auf den Zelltod in der CA1-Region aus?
- 2) Wie wirkt sich *in vitro-TBI* auf die Aktivierung von Mikroglia in der CA1-Region aus?
- 3) Hat E2 einen Einfluss auf diese Dynamiken?
- 4) Lassen sich Unterschiede zwischen den Geschlechtern in Bezug auf Zelltod oder die Aktivierung von Mikroglia in der CA1-Region nach *in vitro-TBI* feststellen?

Als wesentliche Ergebnisse können festgehalten werden:

- 1) *In vitro-TBI* zeigt einen Effekt in Bezug auf die PI-Aufnahme, die als Parameter für mutmaßlich eintretenden Zelltod verwendet wurde (Abb. 6-8). Statistisch signifikant war dieser Effekt in der gesamten CA1-Region jedoch nur bei den männlichen Kulturen 24 h nach *in vitro-TBI*. Allerdings war im Vergleich mit den Kontrollen auch bei den weiblichen Kulturen eine ausgeprägte Erhöhung der PI-Aufnahme zu beobachten ( $p = 0,057$  bzw.  $0,076$  nach 12 bzw. 24 h), die eine Auswirkung der *TBI* auch im weiblichen Hippocampusgewebe nahelegt. Dies wurde durch die Auswertung speziell im Stratum pyramidale (Abb. 11-12) nochmals unterstrichen. Hier war die PI-Aufnahme 24 h nach *TBI* in beiden Geschlechtern signifikant erhöht und schien nach 48 h bereits wieder abgeklungen zu sein. Insgesamt deuten diese Ergebnisse somit auf einen erhöhten Zelltod nach *in vitro-TBI* insbesondere im Stratum pyramidale hin. Jedoch war in diesem Kontext unerwartet, dass bei der Untersuchung der Neuronendichte 48 h nach *in vitro-TBI* kein signifikanter Unterschied zwischen den experimentellen Gruppen nachweisbar war (Abb. 13).
- 2) Wurde die CA1-Region insgesamt betrachtet, war zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Effekt der *in vitro-TBI* auf die Mikrogliaaktivierung zu erkennen (Abb. 9 + 10). Wurde jedoch nur das Stratum pyramidale angeschaut, so zeigte sich eine Korrelation zwischen der Anzahl der Iba1-positiven Zellen und den PI-positiven Nuclei, was

vermuten lässt, dass lokale Mikroglia-Subpopulationen in der Nähe absterbender Zellen aktiviert werden.

- 3) Bemerkenswerterweise lagen die PI-Werte bei sofortiger E2-Gabe nach der *in vitro-TBI* stets im Bereich der Kontrollen, was auf einen neuroprotektiven Effekt von E2 hindeutet. Möglicherweise hat E2 auch eine stimulierende Wirkung auf Mikrogliazellen, da ihre Anzahl nach 24 h in den E2-behandelten männlichen Kulturen im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöht war. Aufgrund der Exklusivität dieses Befundes für die männliche 24 h-Gruppe wäre jedoch eine tiefergehende Studie mit erhöhter Stichprobenanzahl zur Festigung des Befunds sinnvoll.
- 4) Eindeutige Geschlechtsunterschiede waren in Bezug auf Zelltod oder die Aktivierung von Mikroglia in der CA1-Region nach *in vitro-TBI* nicht festzustellen. Zwar war das Ausmaß der PI-Aufnahme bei den männlichen Kulturen nach *in vitro-TBI* tendenziell etwas größer, aber der Trend ging in den weiblichen Kulturen in dieselbe Richtung. Möglich wäre auch ein unterschiedlicher Zeitverlauf der PI-Aufnahme im weiblichen und männlichen Hippocampusgewebe, da in den weiblichen Kulturen deutliche Unterschiede zu den Kontrollen bereits 12 h nach *in vitro-TBI* zu beobachten waren, während sie bei den männlichen Kulturen erst nach 24 h in Erscheinung traten. Auch an dieser Stelle reichen die Stichproben für eine zuverlässige Aussage noch nicht aus. Jedoch kann festgestellt werden, dass sich das *in vitro-TBI*-Modell zur Beantwortung derartiger Fragestellungen grundsätzlich eignet.

Diese Resultate werden im Folgenden diskutiert.

### **7.1. Ausmaß und Zeitverlauf von Zelltod nach *in vitro-TBI* in CA1-Region**

Der deutlichste Befund der Studie war die stark erhöhte Anzahl PI-positiver Nuclei speziell in der *TBI*-Gruppe. Dies deutet darauf hin, dass die mechanische Belastung des Gewebes im *in vitro-TBI*-Modell zu einer Schädigung der Zellmembran in betroffenen Zellen geführt hat. Dieser Befund war besonders ausgeprägt in den männlichen Kulturen 24 h nach *TBI*. Jedoch auch in den weiblichen Kulturen war eine signifikante Erhöhung der PI-Aufnahme zu beobachten, die darauf schließen lässt, dass es auch hier im Gewebe zu merklichen Schäden kam. Bemerkenswerterweise führte E2-Gabe im Anschluss an die *TBI* (*TBI*+E2-Gruppe) zu einer deutlichen Reduktion der PI-Aufnahme im Vergleich zur *TBI*-Gruppe, was aus einer neuroprotektiven Wirkung von E2 resultieren könnte.

Propidiumiodid (PI) ist ein Farbstoff, der mit DNA interkaliert und dann bei Anregung mit Licht von ca. 535 nm rot fluoresziert (Norberg et al., 1999). Da intakte Zellmembranen für PI impermeabel sind (Macklis und Madison, 1990), wird PI gerne eingesetzt, um absterbende von gesunden Zellen zu unterscheiden. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass PI-Aufnahme weitgehend mit Zelltod korreliert (Cho et al., 2004; Newell et al., 1995). In der vorliegenden Studie wurde PI sofort nach der *in vitro-TBI* dem Medium zugegeben. Markierte Nuclei können daher sowohl ein nekrotisches Absterben von Zellen direkt nach der *TBI* widerspiegeln (primäre Schädigung), als auch einen im weiteren Verlauf durch sekundäre neurodegenerative Prozesse hervorgerufenen apoptotischen Zelltod. Der Befund, dass die höchste PI-Aufnahme nicht 12 h, sondern 24 h nach *TBI* beobachtet wurde, spricht jedoch dafür, dass es sich hier nicht um ein direktes Resultat der primären (mechanischen) Schädigung handelt, sondern um das Ergebnis sekundärer Prozesse, die durch die mechanische Schädigung ausgelöst wurden. In der kontrollierten *in vitro*-Modell-Situation kommen dafür am ehesten Störungen des Gleichgewichts von Exzitation und Inhibition im neuronalen Gewebeverband in Frage, bedingt beispielsweise durch veränderte Ionenkanalaktivitäten (Zünder, 2014). Alternativ – oder begleitend – ist auch erhöhter oxidativer Stress im Gewebe nach *in vitro-TBI* denkbar, der eine Apoptose vulnerabler Zellpopulationen begünstigt (Shao et al., 2006; Bayir et al., 2005; Chong et al., 2005). Auch eine Beteiligung aktivierter Mikroglia und/oder Astrozyten, die nach *TBI* Zytokine und andere, die Neuronenfunktion beeinflussende Faktoren ausschütten (Arevalo et al., 2015; Habib et al., 2014; Loane et al., 2014), muss zur Interpretation des mutmaßlich erhöhten Zelltods berücksichtigt werden (siehe auch 7.2).

Angesichts der oben diskutierten PI-Befunde, war das Ergebnis der nachträglich an einigen Triplets der 48 h-Gruppe durchgeführten NeuN-Untersuchung unerwartet, weil sich hier kein Neuronenverlust nachweisen ließ. Verschiedene Faktoren könnten diese Diskrepanz erklären: 1) Die PI-Methode lieferte bezüglich des Zelltyps der geschädigten Zellen keine direkten Hinweise. Es ist daher denkbar, dass nicht Neurone, sondern Gliazellen nach *in vitro-TBI* absterben. Allerdings spricht die Auswertung der Iba1-Immunhistochemie nicht dafür, dass es sich dabei um Mikroglia handelt, da keine Abnahme von Mikrogliazellen festgestellt wurde. Im Gegenteil: Mikrogliazellen scheinen sich am Ort der Schädigung zu konzentrieren (Abb. 11C), vermutlich um die Reste der geschädigten Zellen zu beseitigen. Astrozyten wurden jedoch in der vorliegenden Studie nicht untersucht. Ein Absterben von Astrozyten nach *TBI* kann daher nicht ausgeschlossen werden. Eine immunhistochemische Studie unter Verwendung von GFAP als Astrozytenmarker könnte hierüber Aufschluss geben.

2) Es ist weiterhin denkbar, dass der Anteil degenerierender Neurone prozentual zu gering ist, um bei Neuronendichte-Bestimmungen festgestellt zu werden. Diese Möglichkeit könnte

eventuell über Variationen des Experimentaufbaus – wie eine schwerere Schädigung oder ein längerer Betrachtungszeitraum – verifiziert werden. Auch die Durchführung von Co-Lokalisationsstudien mit PI und NeuN als neuronalem Marker im selben Gewebeschnitt (hier aus technischen Gründen nicht durchgeführt) würde Hinweise auf den Typ der absterbenden Zellen geben.

3) Weiterhin muss die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass die abgestorbenen Neurone durch neugebildete Neurone ersetzt wurden, da Neurogenese in geringem Maße offenbar nach Verletzung in der CA1-Region stattfindet (Nakatomi et al., 2002). Weiterführende Studien müssen jedoch durchgeführt werden, um diese Fragen zu klären.

## **7.2. Auswirkungen von *in vitro*-TBI auf die Aktivierung von Mikroglia**

Mikrogliazellen sind die vorrangigen Makrophagen des zentralen Nervensystems (ZNS) und sind bei intakter Blut-Hirnschranke die primären Immunabwehrzellen des Gehirns (Habib et al., 2014). Unter physiologischen Umständen siedeln sie sich in allen Regionen des ZNS an und überprüfen auch im sog. „*resting state*“ kontinuierlich mittels membranständiger Rezeptoren (z. B. für ATP, Glutamat) und Pinozytose die für die Neuronenfunktion erforderliche extrazelluläre Homöostase (Kettenmann et al., 2011). Kommt es zu bedrohlichen Veränderungen dieser Homöostase – z. B. durch Gewebsschädigung –, können Mikrogliazellen vom „*resting state*“ in einen aktivierten Zustand übergehen, in dem sie eine amöboide Morphologie annehmen, mittels der sie zu Orten einer Schädigung migrieren können (Kettenmann et al., 2011). Diese „aktivierte Mikroglia“ ist in der Lage immunologische Signalmoleküle (z. B. Interleukine) (Villapol et al., 2017) aber auch neurotrophe Faktoren (z. B. BDNF: engl. *brain-derived neurotrophic factor*) (Parekkadan et al., 2008; Skaper, 2018) auszuschütten und kann Zelltrümmer phagozytieren. Mikrogliazellen können durch *TBI* innerhalb von 6-48 h aktiviert werden (Toklu und Tümer, 2015) und die Mikrogliaaktivierung kann im verletzten Areal für Wochen und Monate persistieren (Witcher et al., 2015). Bei der Aktivierung von Mikroglia kommt es häufig auch zu einer Mikroglia-Proliferation (Imai und Kohsaka, 2002). Weiterhin ist erwähnenswert, dass Mikrogliazellen E2-responsiv sein können und sich daher als Vermittler sexualhormoneller Einflüsse auf neurodegenerative Prozesse anbieten (Villa et al., 2016; Habib et al., 2014). Aktivierte Mikrogliazellen erhöhen die Expression des Calcium-bindenden Proteins Iba1 (Imai und Kohsaka, 2002) und reduzieren die Expression des Purin-Rezeptors P2Y<sub>12</sub> (Haynes et al., 2006). In der vorliegenden Studie wurde daher die Iba1-Expression als Maßstab für eine Mikrogliaaktivierung herangezogen und mittels Iba1-Immunhistochemie nachgewiesen. Diese Untersuchung erbrachte bei Betrachtung der gesamten CA1-Region keine eindeutigen Hinweise auf eine Verstärkung der Iba1-Expression nach *in vitro*-TBI. Jedoch ergab eine spezifische Betrachtung des Stratum pyramidale, dass die Anzahl der Mikrogliazellen durchaus mit der Anzahl PI-positiver Nuclei

korreliert und somit eine lokale Aktivierung der Mikroglia in der Umgebung absterbender Zellen angenommen werden kann. Weiterhin war in der CA1-Region insgesamt (Abb. 9) speziell bei den männlichen Kulturen in der *TBI*+E2-Gruppe die Anzahl der Iba1-positiven Zellen im Vergleich zu den Kontrollen nach 24 h signifikant erhöht, was auf einen stimulierenden Effekt von E2 auf die Mikroglia-Proliferation hinweisen könnte. Dieser Befund steht jedoch im Gegensatz zu den Befunden anderer Forscher, die E2 eher eine hemmende Wirkung auf die Mikrogliaaktivierung zuschreiben (Vegeto et al., 2006; Benedusi et al., 2012). Wie bereits angedeutet (6.3.1), sind daher weitere Untersuchungen nötig, um den in dieser Studie erhobenen Befund zu stützen.

### **7.3. Einfluss von E2 auf die Dynamiken der Neurodegeneration**

Der eindrücklichste Befund dieser Studie war die deutliche Reduktion der PI-Aufnahme (= mutmaßlicher Zelltod) in beiden Geschlechtern, wenn E2 sofort nach der *in vitro*-*TBI* zugegeben wurde. Auch wenn diese E2-Wirkung in diesem Ausmaß überraschend war und die zu Grunde liegenden Mechanismus noch weiterer Überprüfung bedürfen, steht sie in Einklang mit der Hypothese einer im Allgemeinen neuroprotektiven Wirkung von E2. Tatsächlich legen mehrere Studien vorteilhafte Wirkungen von Östrogenen bei neurodegenerativen Krankheiten nahe. So existieren beispielsweise Berichte über eine mögliche Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten durch Östrogengabe bei postmenopausalen weiblichen Alzheimer Patientinnen, sowie generell eine Prävention neurodegenerativer Prozesse (Sahab-Negah et al., 2020; Asthana et al., 2001). Die meisten Hinweise für eine neuroprotektive Wirkung insbesondere von E2 stammen jedoch aus tierexperimentellen Studien, in denen beispielsweise eine verbesserte Endprognose nach Ischämie (Wise et al., 2005) und *TBI* festgestellt wurde (Soustiel et al., 2005; Day et al., 2013). Östrogene spielen zudem eine zentrale Rolle im erwachsenen und sich entwickelnden Gehirn (Morissette et al., 2008; Brännvall et al., 2002), dort üben sie eine möglicherweise neuroprotektive Wirkung auch unter homöostatischen Bedingungen aus (Bustamante-Barrientos et al., 2021; Arevalo et al., 2015). Auch die Befunde der vorliegenden Studie deuten darauf hin, dass E2 neuroprotektive Wirkung hat und seine Gabe somit eine mögliche Therapiestrategie für *TBI*-induzierte Verletzungen sein könnte.

Als mögliche Mechanismen einer neuroprotektiven E2-Wirkung wird vermutet, dass es antioxidative Aktivitäten verstärkt (Rekkas et al., 2014; Bellanti et al., 2013) und DNA-Reparatur induziert (Bethea et al., 2016). Es wird darüber hinaus angenommen, dass Östrogene die Expression verschiedener Wachstumsfaktoren und anti-apoptotischer Moleküle erhöhen (Solum und Handa, 2002; Singh et al., 1995). Zielzellen der Östrogene sind dabei neben Mikrogliazellen (siehe 7.2) auch Astrozyten (Escartin et al., 2021). Eine Hirn-Verletzung

induziert in der Regel die Proliferation von Astrozyten, die durch die Verletzung vermehrt freigesetztes und potenziell neurotoxisches Glutamat aus dem Extrazellulärraum entfernen (Arevalo et al., 2015). Astrozyten scheinen außerdem responsiv auf Sexualhormone zu sein, wie die Befunde von Gözl et al. (2019) nahelegen, in deren Studie nach Inhibition der Aromatase (→ E2 niedrig) die durch *TBI* induzierte Erhöhung der Expression des Astrozyten-Markerproteins GFAP deutlich reduziert war. Dieser Effekt beschränkte sich jedoch auf weibliche Mäuse, in denen auch das Ausmaß der durch *TBI* induzierten Läsion geringer war als in den männlichen Mäusen (Gözl et al., 2019). Es ist somit denkbar, dass E2 die neuroprotektiven Aktivitäten von Astrozyten nach einer Läsion geschlechtsspezifisch fördert. Reaktive Astrozyten sind darüber hinaus nach *TBI* auch selbst in der Lage, E2 zu produzieren und an ihre Umgebung abzugeben, da eine Expression der E2-generierenden Aromatase in Astrozyten durch eine Schädigung des neuronalen Gewebes induziert wird (Arevalo et al., 2015). Astrozyten sind daher potenzielle Mediatoren eines neuroprotektiven Effekts von E2 und könnten auch für die Resultate der vorliegenden Studie eine Rolle spielen. Jedoch wurde die Untersuchung von Astrozyten nicht in diese Studie miteinbezogen, sondern ist Gegenstand einer anderen, sich derzeit in Arbeit befindlichen Dissertation.

#### **7.4. Geschlechtsspezifische Einflüsse auf Prozesse der Neurodegeneration**

In einigen klinischen und tierexperimentellen Studien konnten geschlechtsspezifische Unterschiede in histopathologischen und neurologischen Ergebnissen nach *TBI* aufgedeckt werden (Späni et al., 2018; Gözl et al., 2019), die insbesondere bei weiblichen Probanden günstigere klinische Prognosen (Ley et al., 2013; Covassin und Bay, 2012; Berry et al., 2009; Tsushima et al., 2009) und bessere Genesung (Späni et al., 2018; Ratcliff et al., 2007), als bei männlichen gleichen Alters (Groswasser et al., 1998) aufzeigten. Derartige geschlechtsspezifische Einflüsse im Kontext von *TBI* konnten jedoch, wie bereits einleitend erwähnt, nicht immer nachgewiesen werden. Grundsätzlich liegt die Annahme jedoch nahe, dass Sexualhormone (Östrogene, Gestagene, Androgene) ein potenziell bestimmender Faktor bei *TBI* darstellen könnten, wenn man die diversen wissenschaftlichen Befunde in diesem Kontext berücksichtigt (Villapol et al., 2017; Chakrabarti et al., 2016; Fanaei et al., 2014; Wright et al., 2014; Pietranera et al., 2010). In der bereits angeführten Studie von Gözl et al. (2019), in der bei Mäusen durch die Gabe von Inhibitoren der Enzyme Aromatase bzw. 5 $\alpha$ -Reduktase die Synthese von E2 bzw. DHT systemisch unterbunden und danach nach definierter Methodik (*CCI*) ein Hirn-Trauma ausgelöst wurde, waren einige Befunde nach *TBI* geschlechtsspezifisch diskrepant. Auffällig war etwa, dass das Ausmaß der Läsion in männlichen Mäusen ausgeprägter war als in weiblichen. Auch war die Expression von Androgen- bzw. Östrogenrezeptoren nach *TBI* geschlechtsspezifisch verändert. Es wurde z.B.

herausgefunden, dass drei Tage nach der experimentell induzierten *TBI* die mRNA-Produktion für die Östrogenrezeptoren in weiblichen Mäusen signifikant erhöht war. In männlichen Mäusen hingegen wurde eine verminderte mRNA-Expression für Testosteronrezeptoren festgestellt. Dies zeigt, dass geschlechtsspezifische Veränderungen bei der Bildung von Sexualhormonrezeptoren nach *TBI* eintreten und dadurch geschlechtsspezifische Prozesse in Gang setzen können. Weiterhin konnten die Forscher herausstellen, dass einige durch experimentelle *TBI* induzierte Prozesse durch die Inhibition der Sexualhormonproduktion geschlechtsspezifisch verändert wurden. So führte beispielsweise die Inhibition der 5 $\alpha$ -Reduktase ( $\rightarrow$  reduzierte DHT-Synthese) in männlichen Mäusen zu einem verminderten Proteinabbau im betrachteten Hirngewebe, nicht jedoch in weiblichen Mäusen. Umgekehrt verringert eine Inhibition der Aromatase ( $\rightarrow$  reduzierte E2-Synthese) die nach *TBI* eintretende Steigerung der GFAP-Expression speziell in weiblichen Mäusen. Zusammenfassend deuten diese Studienergebnisse von Gölz et al. (2019) darauf hin, dass Sexualhormone pathogene Prozesse nach *TBI* beeinflussen und eine geschlechtsspezifische Regulation der Sexualhormone einen geschlechtsspezifisch unterschiedlichen Krankheitsverlauf nach *TBI* bedingen könnte. Dies steht auch in Einklang mit neueren Befunden zur Wirkung der von Neuronen selbst gebildeten Sexualhormone (= Neurosteroiden). So haben zum Beispiels Brandt et al. (2020) Hinweise darauf gefunden, dass Neurosteroiden geschlechtsspezifisch die synaptische Plastizität im Hippocampus von weiblichen und männlichen Tieren beeinflussen. Die Autoren zeigen, dass DHT, das potenteste Androgen die synaptische Dichte im Hippocampus männlicher Mäuse beeinflusst, aber im Hippocampus von weiblichen Mäusen keine Wirkung hat. Umgekehrt führt bei weiblichen Mäusen eine Hemmung der neuronalen E2-Synthese zu Synapsenverlust, der bei männlichen Mäusen nicht zu beobachten ist. Dies ist vermutlich auf eine bereits embryonal angelegte geschlechtsspezifische Prägung der Sexualhormonsignalwege zurückzuführen (Brandt et al., 2020; Brandt und Rune, 2020).

In der vorliegenden Arbeit waren jedoch keine stringent eindeutigen Geschlechtsunterschiede in Bezug auf den Zelltod oder die Aktivierung von Mikroglia in der CA1-Region nach *in vitro-TBI* festzustellen. Es konnten nur geschlechtsspezifische Tendenzen beobachtet werden. So war das Ausmaß der PI-Aufnahme als Indikator für den Zelltod bei den männlichen Kulturen nach *in vitro-TBI* tendenziell etwas stärker ausgeprägt als bei den weiblichen Kulturen. Zudem waren tendenzielle Unterschiede im zeitlichen Verlauf der PI-Aufnahme im Hippocampusgewebe zwischen den Geschlechtern auffällig. Eine Antwort auf die Frage, ob es sich dabei um tatsächliche Geschlechtsunterschiede handelt oder nur um Zufallsbefunde, müssen weiterführende Studien mit höheren Stichprobenzahlen liefern. Bemerkenswert ist auch, dass die Reduktion der PI-Aufnahme bei E2-Gabe in beiden Geschlechtern gleich ausfiel. Eine geschlechtsabhängig unterschiedliche Reaktion auf die E2-Gabe war hier nicht erkennbar. Dies könnte jedoch auch ein altersabhängiger Effekt sein, da für die vorliegende

Studie Gewebe von früh postnatalen Mäusen verwendet wurde, die noch nicht die Pubertät durchlaufen hatten, während beispielsweise die Studie von Götz et al. (2019) adulte Mäuse untersuchte.

### **7.5. Methodische Aspekte/ Limitationen**

Die Erforschung menschlicher Erkrankungen erfordert in der Regel ein Tiermodell, das die pathologischen Prozesse beim Menschen möglichst realitätsnah widerspiegelt. Experimentelle Tierforschung ist jedoch aufwendig und erfordert hohe Tierzahlen, um zu schlüssigen Interpretationen zu kommen. An dieser Stelle können *in vitro*-Modelle helfen, die im Tiermodell zu erforschenden Fragestellungen zu präzisieren. Zur Frage der Auswirkungen einer *TBI* wurden bereits verschiedene Modelle in der Literatur beschrieben. So verwendeten Harris et al. (2013) ein *Stylus drop*-Modell, bei dem in organotypischen Gewebekulturen des Hippocampus eine definierte, fokale Läsion erzeugt wurde, von der ausgehend die sekundäre Schädigung des umliegenden Gewebes analysiert wurde. Auch diese Autoren verwendeten PI zur Darstellung von Zelltod und kamen zu ähnlichen Ergebnissen, wie die vorliegende Untersuchung, in dem sie eine signifikante PI-Aufnahme nach 24 h darstellen, die danach progressiv weiter zunimmt. Harris et al. (2013) verwendeten ihr Modell zur Untersuchung der Wirkung von Edelgasen und fanden neuroprotektive Effekte von Xenon, die vermutlich über die Hemmung von NMDA-Rezeptoren vermittelt werden. Diese Untersuchungen wurden nachfolgend von der Arbeitsgruppe um Robert Dickinson (Imperial College London) mit Hilfe von organotypischen Kulturen auf noch andere *TBI*-Varianten ausgeweitet (z. B. das „Blast“-Modell, in dem Schockwellen auf das Gewebe einwirken, wie sie nach einer Explosion auftreten (Campos-Pires et al., 2018)). Auch das *rolling-cylinder*-Modell, das für die vorliegende Studie verwendet wurde, wurde bereits früher zur Untersuchung von neurodegenerativen Prozessen eingesetzt. Es wurde entwickelt, um darüber die Ausbreitung einer primären Schädigung nach mechanischem Impact im hippocampalen Gewebe zu bestimmen (Adamchik et al., 2000). Auch diese Studie kam mit Hilfe der PI-Methode zu ähnlichen Ergebnissen wie die vorliegende Studie. Dies belegt, dass das Modell zur Untersuchung neurodegenerativer Prozesse nach *TBI* – und dem Einfluss potenziell neuroprotektiver Substanzen, wie hier E2 – grundsätzlich verwendet werden kann.

Jedoch kann dieses *in vitro*-Modell, die tatsächlichen pathologischen Abläufe nach einer traumatischen Hirnverletzung nur eingeschränkt reproduzieren. Der hauptsächliche Grund dafür besteht in seiner Isolation vom Gesamtorganismus. Zwar werden organotypische Gewebekulturen des Hippocampus wegen ihrer guten experimentellen Zugänglichkeit bei gleichzeitigem Erhalt des hippocampalen Gewebeverbandes seit Jahrzehnten in der neurobiologischen Forschung eingesetzt (Stoppini et al., 1991). Es handelt sich dabei jedoch

stets um isolierte Gewebeverbände, die eine ganzheitliche Betrachtung pathologischer Abläufe nur eingeschränkt zulassen. Dies gilt insbesondere für traumatische Hirnverletzungen, für die ein wesentliches Merkmal die Eröffnung der Blut-Hirnschranke und, damit verbunden, das Eindringen von Blut in das verletzte Hirngewebe ist (Barzó et al., 1997). Eine Folge davon ist häufig eine Ödembildung (Yang et al., 2018) und das Eindringen peripherer Immunzellen (z. B. periphere Makrophagen) in das verletzte Gewebe (Loane et al., 2014), wodurch infolge eines entstehenden metabolischen Ungleichgewichts die primäre Schädigung meist noch verstärkt wird (Wu et al., 2004; Chiu et al., 2016). Diese Situation kann das *in vitro-TBI*-Modell nicht nachstellen, sondern ist auf die Untersuchung intrinsischer Prozesse begrenzt.

Eine weitere Einschränkung des gewählten Modells besteht darin, dass organotypische Gewebekulturen nur von früh postnatalen Tieren angelegt werden können. Die Altersgrenze liegt bei Mäusen ca. beim postnatalen Tag 10 (P10), was bei Menschen in etwa dem Ende der Kindheit entspricht. Werden die Kulturen zwischen P0 und P10 angelegt, können sie bei guter Pflege problemlos 3-4 Wochen gehalten und für Untersuchungen genutzt werden. Mit zunehmendem Alter sinkt jedoch die Überlebensfähigkeit der Kulturen, und damit ihre experimentelle Nutzbarkeit.

Die vorliegende Studie zeigt jedoch, dass das *rolling-cylinder*-Modell trotz dieser Einschränkungen wertvolle Ergebnisse liefern kann. So wurde der durch eine mechanische Schädigung bei *TBI* zu erwartende Zelltod (angezeigt durch die erhöhte PI-Aufnahme) im Modell reproduziert, was ihn für weiterführende Untersuchungen zugänglich macht. Dadurch konnte hier auch weitere Evidenz dafür erhoben werden, dass E2 tatsächlich neuroprotektive Wirkungen hat, die in Folgestudien unter Verwendung des Modells weiter untersucht werden können.

## 7.6. Ausblick

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von E2 auf neurodegenerative Prozesse in einem *in vitro*-Modell für traumatische Hirnschädigung zu untersuchen. Tatsächlich liefern die erhobenen Daten Hinweise auf einen solchen Einfluss: So war das Ausmaß des nach *in vitro-TBI* eintretenden Zelltods (bzw. PI- Aufnahme) in den mit E2 versetzten Kulturen weit weniger stark ausgeprägt als in den *TBI* Kulturen, die kein E2 erhalten hatten. Somit scheint das Modell geeignet zu sein, auch die Mechanismen dieser mutmaßlich neuroprotektiven Wirkung von E2 weiter zu untersuchen und dadurch ggf. im Tierversuch zu beantwortende Fragen präziser stellen (*refine*) und die Anzahl der verwendeten Tiere so weit wie möglich reduzieren zu können (*reduce*).

Ansatzpunkte für diese weiterführenden Untersuchungen ergeben sich aus zuvor identifizierten Wirkungen von E2. So existieren mehrere Hinweise, dass E2 über die Aktivierung von Astrozyten eine neuroprotektive Wirkung vermitteln könnte (Arevalo et al., 2015; Gölz et al., 2019). Anschlussstudien im *in vitro-TBI*-Modell können diesen Aspekt aufgreifen und gezielt untersuchen, welche Veränderungen in Astrozyten nach *TBI* ablaufen und welchen Einfluss E2 darauf nimmt. Unter Verwendung spezifischer Agonisten oder Antagonisten für die bekannten Östrogenrezeptoren ER $\alpha$ , ER $\beta$  und GPER1 könnte weiterhin festgestellt und konkretisiert werden, über welche Signalwege diese Wirkungen vermittelt werden. Weiterhin könnte angesichts der vermuteten anti-oxidativen Wirkung von E2 (Rekkas et al., 2014; Bellanti et al., 2013) im *in vitro-TBI*-Modell untersucht werden, welchen Einfluss E2 auf apoptotisch induzierten Zelltod nimmt, der häufig in Folge von intrazellulären Schädigungen ausgelöst wird (He et al., 2009). Hier bieten sich Studien unter Verwendung der TUNEL-Technik (Torres et al., 2010) oder unter Einbeziehung des Caspase-3-Signalwegs (Duan et al., 2003) an. Und auch die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Studie zur Aktivierung von Mikroglia lieferte Anhaltspunkte für eine Beeinflussung durch E2, die in weiterführenden Studien präzisiert werden könnten.

Letztendlich sollte auch nicht vergessen werden, dass neben E2 vermutlich auch noch andere Sexualhormone die Neurodegeneration nach *TBI* beeinflussen. So lässt die Studie von Gölz et al. (2019) auch einen Einfluss von DHT vermuten, dessen Hemmung durch den 5 $\alpha$ -Reduktase-Inhibitor Finasterid zu einer Hemmung des Calpain-vermittelten Proteinabbaus nach *TBI* im Tiermodell führte. Analog zu E2 können die zu Grunde liegenden Mechanismen dieser DHT-Wirkung im *in vitro-TBI*-Modell voruntersucht werden, bevor neue Tierversuche dazu konzipiert werden. Auch für eine Untersuchung zum Einfluss von DHT sind Rezeptor-Agonisten und Antagonisten verfügbar, und die Signalwege teilweise bekannt (Murakami et al., 2018). Somit sind diverse weiterführenden Studien und Untersuchungen denkbar, die die Neurodegeneration im Kontext von *TBI* aus den unterschiedlichsten Blickwinkeln beleuchten, um diese in ihrer großen Komplexität besser durchdringen zu können und der Etablierung nachhaltig erfolgreicher klinischer Therapien näher zu kommen.

## 8. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit hatte die Zielsetzung, ein *in vitro*-Modell zum Studium der Folgen traumatischer Hirnschädigung (*traumatic brain injury, TBI*) zu etablieren und den Einfluss von 17 $\beta$ -Estradiol (E2) auf neurodegenerative Prozesse in diesem Modell zu untersuchen. Der Fokus lag dabei auf durch *TBI* induzierten Zelltod in der CA1-Region des Hippocampus, der mithilfe einer Propidiumiodid-Auswertung jeweils 12, 24 und 48 h nach *in vitro-TBI* abgebildet wurde, sowie auf der, diesen Zelltod mutmaßlich begleitenden Mikrogliaaktivierung, die mit Hilfe von Iba1-Immunhistochemie untersucht wurde. Alle Untersuchungen wurden jeweils unter Berücksichtigung des Geschlechts durchgeführt, um gegebenenfalls geschlechtsspezifische Unterschiede ermitteln zu können. Zur Durchführung der Studie wurde eine mechanische Kompression von Hirngewebe (*TBI*) mit Hilfe der *rolling-cylinder*-Technik *in vitro* an organotypischen hippocampalen Gewebekulturen von Mäusen herbeigeführt.

Die *in vitro* induzierte *TBI* führte in beiden Geschlechtern zu einer erhöhten PI-Aufnahme insbesondere im Stratum pyramidale der CA1-Region. Diese war 24 h nach *in vitro-TBI* besonders ausgeprägt und schien nach 48 h bereits wieder abgeklungen zu sein. Begleitend dazu war nach 24 h im Stratum pyramidale auch die Anzahl der Mikrogliazellen erhöht (im männlichen Gewebe signifikant), was auf eine Aktivierung der Mikroglia durch absterbende Zellen rückschließen lässt. Allerdings war bei einer abschließenden Bestimmung der Neuronendichte in der CA1-Region mit Hilfe des neuronenspezifischen Markers NeuN keine reduzierte Neuronendichte nach *in vitro-TBI* festzustellen. Bemerkenswerterweise reduzierte eine Zugabe von E2 zum Kulturmedium direkt im Anschluss an die *TBI* sowohl die erhöhte PI-Aufnahme als auch die Mikrogliaaktivierung im Stratum pyramidale, wodurch die Hypothese einer neuroprotektiven Wirkung von E2 unterstützt wird.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass sich das verwendete *in vitro-TBI*-Modell zur Untersuchung bestimmter, durch traumatische Hirnschädigung ausgelöste pathologische Prozesse grundsätzlich eignet. Einschränkungen bestehen aufgrund der Altersbeschränktheit (organotypische Gewebekulturen können nur aus sehr jungem Hirngewebe gewonnen werden), sowie der Tatsache, dass wesentliche Aspekte eines Schädel-Hirn-Traumas – wie die mit dem Eindringen peripherer Immunzellen in das Hirngewebe verbundene Eröffnung der Blut-Hirn-Schranke – im Modell nicht berücksichtigt werden. Dennoch können Untersuchungen, wie die hier vorgestellten zur Wirkung von E2, wertvolle Hinweise liefern, die helfen können, Fragestellungen in Tierversuchen präziser zu stellen (*refine*) und dadurch die Anzahl im Tierversuch verwendeter Tiere zu reduzieren (*reduce*).

## 8.1. Summary

The objective of the present study was to establish an *in vitro* model for studying the consequences of traumatic brain injury (*TBI*) and to investigate the influence of estrogen, specifically E2 (17 $\beta$ -estradiol), on neurodegenerative processes in this model. The focus of this study was placed on *TBI*-induced cell death in the CA1 region, which was assessed using propidium iodide (PI) analysis 12, 24, and 48h after *in vitro-TBI*. Equally, this study focused on *TBI*-induced microglia activation, putatively accompanying the cell death, which was assessed using Iba1 immunohistochemistry. All tests were carried out taking gender into account to be able to determine possible gender-specific differences. To conduct the study, mechanical compression of brain tissue (*TBI*) was induced using the rolling cylinder technique *in vitro* on organotypic mouse hippocampal tissue cultures.

*TBI* induced *in vitro* led to increased PI uptake in both sexes, especially in the stratum pyramidale of the CA1 region. This was particularly pronounced 24 h after *in vitro-TBI* and seemed to have subsided after 48 h. At the same time, the number of microglial cells in the stratum pyramidale was also increased after 24 h (significant in male tissue), which suggests activation of the microglia by dying cells. However, in a final determination of the neuron density in the CA1 region using the neuron-specific marker NeuN, no reduced neuron density could be determined after *in vitro-TBI*. Notably, addition of E2 to the culture medium immediately following *TBI* reduced both increased PI uptake and microglia activation in the stratum pyramidale, supporting the hypothesis of a neuroprotective effect of E2.

The present results allow the conclusion that the *in vitro-TBI* model used is suitable for investigating certain pathological processes triggered by traumatic brain damage. There are limitations due to age restrictions (organotypic tissue cultures can only be obtained from very young brain tissue) and the fact that essential aspects of a *TBI* – such as the opening of the blood-brain barrier – cannot be considered in the model. Nevertheless, studies such as those presented here on the effect of E2 can provide valuable information that can help to pose questions in animal experiments more precisely (refine) and thereby reduce the number of animals used in animal experiments (reduce).

## 9. Literaturverzeichnis

- ABDELMALIK, P. A., DRAGHIC, N. & LING, G. S. F. 2019. Management of moderate and severe traumatic brain injury. *Transfusion*, 59, 1529-1538.
- ABRAHÂM, I. M., HAN, S. K., TODMAN, M. G., KORACH, K. S. & HERBISON, A. E. 2003. Estrogen receptor beta mediates rapid estrogen actions on gonadotropin-releasing hormone neurons in vivo. *J Neurosci*, 23, 5771-7.
- 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 Res Brain Res Protoc*, 5, 153-8.
- AREVALO, M. A., AZCOITIA, I. & GARCIA-SEGURA, L. M. 2015. The neuroprotective actions of oestradiol and oestrogen receptors. *Nat Rev Neurosci*, 16, 17-29.
- ASTHANA, S., BAKER, L. D., CRAFT, S., STANCZYK, F. Z., VEITH, R. C., RASKIND, M. A. & PLYMATE, S. R. 2001. High-dose estradiol improves cognition for women with AD: results of a randomized study. *Neurology*, 57, 605-12.
- AZCOITIA, I., BARRETO, G. E. & GARCIA-SEGURA, L. M. 2019. Molecular mechanisms and cellular events involved in the neuroprotective actions of estradiol. Analysis of sex differences. *Front Neuroendocrinol*, 55, 100787.
- BAINS, M. & HALL, E. D. 2012. Antioxidant therapies in traumatic brain and spinal cord injury. *Biochim Biophys Acta*, 1822, 675-84.
- BARZÓ, P., MARMAROU, A., FATOUROS, P., HAYASAKI, K. & CORWIN, F. 1997. Contribution of vasogenic and cellular edema to traumatic brain swelling measured by diffusion-weighted imaging. *J Neurosurg*, 87, 900-7.
- BAYIR, H., KAGAN, V. E., BORISENKO, G. G., TYURINA, Y. Y., JANESKO, K. L., VAGNI, V. A., BILLIAR, T. R., WILLIAMS, D. L. & KOCHANNEK, P. M. 2005. Enhanced oxidative stress in iNOS-deficient mice after traumatic brain injury: support for a neuroprotective role of iNOS. *J Cereb Blood Flow Metab*, 25, 673-84.
- BÄHR, FROTSCHER, 2003, Neurologisch-topische Diagnostik (ISBN 3135358089). Georg Thieme Verlag
- 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 Biol*, 1, 340-6.
- BENDER, R. A., ZHOU, L., VIERK, R., BRANDT, N., KELLER, A., GEE, C. E., SCHÄFER, M. K. & RUNE, G. M. 2017. Sex-Dependent Regulation of Aromatase-Mediated Synaptic Plasticity in the Basolateral Amygdala. *J Neurosci*, 37, 1532-1545.
- BENDER, R. A., ZHOU, L., WILKARS, W., FESTER, L., LANOWSKI, J. S., PAYSEN, D., KÖNIG, A. & RUNE, G. M. 2010. Roles of 17 $\beta$ -estradiol involve regulation of reelin expression and synaptogenesis in the dentate gyrus. *Cereb Cortex*, 20, 2985-95.
- BENEDUSI, V., MEDA, C., DELLA TORRE, S., MONTELEONE, G., VEGETO, E. & MAGGI, A. 2012. A lack of ovarian function increases neuroinflammation in aged mice. *Endocrinology*, 153, 2777-88.
- 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. *J Trauma*, 67, 950-3.
- 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. *Neurobiol Aging*, 37, 179-191.
- BITTIGAU, P., SIFRINGER, M., FELDERHOFF-MUESER, U. & IKONOMIDOU, C. 2004. Apoptotic neurodegeneration in the context of traumatic injury to the developing brain. *Exp Toxicol Pathol*, 56, 83-9.
- BOHLEN, C. J., BENNETT, F. C. & BENNETT, M. L. 2019. Isolation and Culture of Microglia. *Curr Protoc Immunol*, 125, e70.
- BOON, W. C., CHOW, J. D. & SIMPSON, E. R. 2010. The multiple roles of estrogens and the enzyme aromatase. *Prog Brain Res*, 181, 209-32.

- BRANDT, N. & RUNE, G. M. 2020. Sex-dependency of oestrogen-induced structural synaptic plasticity: Inhibition of aromatase versus application of estradiol in rodents. *Eur J Neurosci*, 52, 2548-2559.
- BRANDT, N., VIERK, R., FESTER, L., ANSTÖTZ, M., ZHOU, L., HEILMANN, L. F., KIND, S., STEFFEN, P. & RUNE, G. M. 2020. Sex-specific Difference of Hippocampal Synaptic Plasticity in Response to Sex Neurosteroids. *Cereb Cortex*, 30, 2627-2641.
- BRÄNNVALL, K., KORHONEN, L. & LINDHOLM, D. 2002. Estrogen-receptor-dependent regulation of neural stem cell proliferation and differentiation. *Mol Cell Neurosci*, 21, 512-20.
- BUSTAMANTE-BARRIENTOS, F. A., MÉNDEZ-RUETTE, M., ORTLOFF, A., LUZ-CRAWFORD, P., RIVERA, F. J., FIGUEROA, C. D., MOLINA, L. & BÁTIZ, L. F. 2021. The Impact of Estrogen and Estrogen-Like Molecules in Neurogenesis and Neurodegeneration: Beneficial or Harmful? *Front Cell Neurosci*, 15, 636176.
- CAMPOS-PIRES, R., YONIS, A., MACDONALD, W., HARRIS, K., EDGE, C. J., MAHONEY, P. F. & DICKINSON, R. 2018. A Novel In Vitro Model of Blast Traumatic Brain Injury. *J Vis Exp*.
- CARLSTROM, L., KE, Z. J., UNNERSTALL, J. R., COHEN, R. S. & PANDEY, S. C. 2001. Estrogen modulation of the cyclic AMP response element-binding protein pathway. Effects of long-term and acute treatments. *Neuroendocrinology*, 74, 227-43.
- CHAKRABARTI, M., DAS, A., SAMANTARAY, S., SMITH, J. A., BANIK, N. L., HAQUE, A. & RAY, S. K. 2016. Molecular mechanisms of estrogen for neuroprotection in spinal cord injury and traumatic brain injury. *Rev Neurosci*, 27, 271-81.
- CHAYCHI, S., POLOSA, A., CHEMTOB, S. & LACHAPELLE, P. 2018. Evaluating the neuroprotective effect of 17 $\beta$ -estradiol in rodent models of oxidative retinopathies. *Doc Ophthalmol*, 137, 151-168.
- 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. *J Neurosci Methods*, 272, 38-49.
- CHO, S., LIU, D., FAIRMAN, D., LI, P., JENKINS, L., MCGONIGLE, P. & WOOD, A. 2004. Spatiotemporal evidence of apoptosis-mediated ischemic injury in organotypic hippocampal slice cultures. *Neurochem Int*, 45, 117-27.
- CHONG, Z. Z., LI, F. & MAIESE, K. 2005. Oxidative stress in the brain: novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease. *Prog Neurobiol*, 75, 207-46.
- COVASSIN, T. & BAY, E. 2012. Are there gender differences in cognitive function, chronic stress, and neurobehavioral symptoms after mild-to-moderate traumatic brain injury? *J Neurosci Nurs*, 44, 124-33.
- DAS, M., MOHAPATRA, S. & MOHAPATRA, S. S. 2012. New perspectives on central and peripheral immune responses to acute traumatic brain injury. *J Neuroinflammation*, 9, 236.
- DAY, N. L., FLOYD, C. L., D'ALESSANDRO, T. L., HUBBARD, W. J. & CHAUDRY, I. H. 2013. 17 $\beta$ -estradiol confers protection after traumatic brain injury in the rat and involves activation of G protein-coupled estrogen receptor 1. *J Neurotrauma*, 30, 1531-41.
- DUAN, W. R., GARNER, D. S., WILLIAMS, S. D., FUNCKES-SHIPPIY, C. L., SPATH, I. S. & BLOMME, E. A. 2003. Comparison of immunohistochemistry for activated caspase-3 and cleaved cytokeratin 18 with the TUNEL method for quantification of apoptosis in histological sections of PC-3 subcutaneous xenografts. *J Pathol*, 199, 221-8.
- ELDADAH, B. A. & FADEN, A. I. 2000. Caspase pathways, neuronal apoptosis, and CNS injury. *J Neurotrauma*, 17, 811-29.
- ESCARTIN, C., GALEA, E., LAKATOS, A., O'CALLAGHAN, J. P., PETZOLD, G. C., SERRANO-POZO, A., STEINHÄUSER, C., VOLTERRA, A., CARMIGNOTO, G., AGARWAL, A., ALLEN, N. J., ARAQUE, A., BARBEITO, L., BARZILAI, A., BERGLES, D. E., BONVENTO, G., BUTT, A. M., CHEN, W. T., COHEN-SALMON, M., CUNNINGHAM, C. 2021. Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nat Neurosci*, 24, 312-325.

- FANAEI, H., KARIMIAN, S. M., SADEGHIPOUR, H. R., HASSANZADE, G., KASAEIAN, A., ATTARI, F., KHAYAT, S., RAMEZANI, V. & JAVADIMEHR, M. 2014. Testosterone enhances functional recovery after stroke through promotion of antioxidant defenses, BDNF levels and neurogenesis in male rats. *Brain Res*, 1558, 74-83.
- FEENEY, D. M., BOYESON, M. G., LINN, R. T., MURRAY, H. M. & DAIL, W. G. 1981. Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat. *Brain Res*, 211, 67-77.
- FESTER, L. & RUNE, G. M. 2015. Sexual neurosteroids and synaptic plasticity in the hippocampus. *Brain Res*, 1621, 162-9.
- FIRSCHING, R., RICKELS, E. & MAUER, U. E. A. 2017. Traumatic Brain Injury in Infancy and Childhood. *OP-JOURNAL* 2018; 34(03): 232-242. DOI: 10.1055/a-0623-5848.
- GALGANO, M., TOSHKEZI, G., QIU, X., RUSSELL, T., CHIN, L. & ZHAO, L. R. 2017. Traumatic Brain Injury: Current Treatment Strategies and Future Endeavors. *Cell Transplant*, 26, 1118-1130.
- 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. *J Neurochem*, 150, 173-187.
- GRABIEC, U., HOHMANN, T., HAMMER, N. & DEGHANI, F. 2017. Organotypic Hippocampal Slice Cultures As a Model to Study Neuroprotection and Invasiveness of Tumor Cells. *J Vis Exp*.
- GREIG, N. H., TWEEDIE, D., RACHMANY, L., LI, Y., RUBOVITCH, V., SCHREIBER, S., CHIANG, Y. H., HOFFER, B. J., MILLER, J., LAHIRI, D. K., SAMBAMURTI, K., BECKER, R. E. & PICK, C. G. 2014. Incretin mimetics as pharmacologic tools to elucidate and as a new drug strategy to treat traumatic brain injury. *Alzheimers Dement*, 10, S62-75.
- GROSWASSER, Z., COHEN, M. & KEREN, O. 1998. Female TBI patients recover better than males. *Brain Inj*, 12, 805-8.
- GUSEL'NIKOVA, V. V. & KORZHEVSKIY, D. E. 2015. NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker. *Acta Naturae*, 7, 42-7.
- 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. *J Mol Neurosci*, 52, 277-85.
- HAGEBUSCH, P., ANDREAS, P. & AL., E. 2020. Notfallmedizin up2date 2020. 15(01): 59-74. DOI:10.1055/a-0958-0649.
- HARRIS, K. 2014. Mechanism of noble gas neuroprotection in an in vitro model of traumatic brain injury. *Imperial College London*, 170.
- HAYNES, S. E., HOLLOPETER, G., YANG, G., KURPIUS, D., DAILEY, M. E., GAN, W. B. & JULIUS, D. 2006. The P2Y12 receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nat Neurosci*, 9, 1512-9.
- HE, B., LU, N. & ZHOU, Z. 2009. Cellular and nuclear degradation during apoptosis. *Curr Opin Cell Biol*, 21, 900-12.
- HELLEWELL, S., SEMPLE, B. D. & MORGANTI-KOSSMANN, M. C. 2016. Therapies negating neuroinflammation after brain trauma. *Brain Res*, 1640, 36-56.
- HOPPE K & KLINGLER W 2021. Schädel-Hirn-Trauma: Pathophysiologie und Notfallmanagement. *Anästh Intensivmed* 2021;62:118–127. DOI: 10.19224/ai2021.118.
- IKONOMIDOU, C., QIN, Y., LABRUYERE, J., KIRBY, C. & OLNEY, J. W. 1996. Prevention of trauma-induced neurodegeneration in infant rat brain. *Pediatr Res*, 39, 1020-7.
- IM, K., MARENINOV, S., DIAZ, M. F. P. & YONG, W. H. 2019. An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Methods Mol Biol*, 1897, 299-311.
- IMAI, Y. & KOHSAKA, S. 2002. Intracellular signaling in M-CSF-induced microglia activation: role of Iba1. *Glia*, 40, 164-74.
- JASSAM, Y. N., IZZY, S., WHALEN, M., MCGAVERN, D. B. & EL KHOURY, J. 2017. Neuroimmunology of Traumatic Brain Injury: Time for a Paradigm Shift. *Neuron*, 95, 1246-1265.

- KABADI, S. V. & FADEN, A. I. 2014. Neuroprotective strategies for traumatic brain injury: improving clinical translation. *Int J Mol Sci*, 15, 1216-36.
- KETTENMANN, H., HANISCH, U. K., NODA, M. & VERKHRATSKY, A. 2011. Physiology of microglia. *Physiol Rev*, 91, 461-553.
- KÖVESDI, E., SZABÓ-MELEG, E. & ABRAHÁM, I. M. 2021. The Role of Estradiol in Traumatic Brain Injury: Mechanism and Treatment Potential. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 11.
- KRETZ, O., FESTER, L., WEHRENBURG, U., ZHOU, L., BRAUCKMANN, S., ZHAO, S., PRANGE-KIEL, J., NAUMANN, T., JARRY, H., FROTSCHER, M. & RUNE, G. M. 2004. Hippocampal synapses depend on hippocampal estrogen synthesis. *J Neurosci*, 24, 5913-21.
- KREUTZBERG, G. W. 1996. Principles of neuronal regeneration. *Acta Neurochir Suppl*, 66, 103-6.
- KUIPER, G. G., CARLSSON, B., GRANDIEN, K., ENMARK, E., HÄGGBLAD, J., NILSSON, S. & GUSTAFSSON, J. A. 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*, 138, 863-70.
- LAIRD, M. D., VENDER, J. R. & DHANDAPANI, K. M. 2008. Opposing roles for reactive astrocytes following traumatic brain injury. *Neurosignals*, 16, 154-64.
- 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. *J Trauma Acute Care Surg*, 75, 682-6.
- LI, Q., HAN, X. & WANG, J. 2016. Organotypic Hippocampal Slices as Models for Stroke and Traumatic Brain Injury. *Mol Neurobiol*, 53, 4226-4237.
- LI, R., CUI, J. & SHEN, Y. 2014. Brain sex matters: estrogen in cognition and Alzheimer's disease. *Mol Cell Endocrinol*, 389, 13-21.
- LOANE, D. J. & FADEN, A. I. 2010. Neuroprotection for traumatic brain injury: translational challenges and emerging therapeutic strategies. *Trends Pharmacol Sci*, 31, 596-604.
- 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. *J Neuropathol Exp Neurol*, 73, 14-29.
- LOZANO, D., GONZALES-PORTILLO, G. S., ACOSTA, S., DE LA PENA, I., TAJIRI, N., KANEKO, Y. & BORLONGAN, C. V. 2015. Neuroinflammatory responses to traumatic brain injury: etiology, clinical consequences, and therapeutic opportunities. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 11, 97-106.
- LU, H., MA, K., JIN, L., ZHU, H. & CAO, R. 2018. 17 $\beta$ -estradiol rescues damages following traumatic brain injury from molecule to behavior in mice. *J Cell Physiol*, 233, 1712-1722.
- LUCKE-WOLD, B. P., LOGSDON, A. F., NGUYEN, L., ELTANAHAY, A., TURNER, R. C., BONASSO, P., KNOTTS, C., MOECK, A., MAROON, J. C., BAILES, J. E. & ROSEN, C. L. 2018. Supplements, nutrition, and alternative therapies for the treatment of traumatic brain injury. *Nutr Neurosci*, 21, 79-91.
- MAAS, A. I. R., MENON, D. K., ADELSON, P. D., ANDELIC, N., BELL, M. J., BELLI, A., BRAGGE, P., BRAZINOVA, A., BÜKI, A., CHESNUT, R. M., CITERIO, G., COBURN, M., COOPER, D. J., CROWDER, A. T., CZEITER, E., CZOSNYKA, M., DIAZ-ARRASTIA, R., DREIER, J. P., DUHAIME, A. C., ERCOLE, A., VAN ESSEN, T. A., FEIGIN, V. L., GAO, G., GIACINO, J., GONZALEZ-LARA, L. E., GRUEN, R. L., GUPTA, D., HARTINGS, J. A., HILL, S., JIANG, J. Y., KETHARANATHAN, N., KOMPANJE, E. J. O., LANYON, L., LAUREYS, S., LECKY, F., LEVIN, H., LINGSMA, H. F., MAEGELE, M. 2017. Traumatic brain injury: integrated approaches to improve prevention, clinical care, and research. *Lancet Neurol*, 16, 987-1048.
- 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. *J Neurosci Methods*, 31, 43-6.
- MARKLUND, N., CLAUSEN, F., LEWANDER, T. & HILLERED, L. 2001. Monitoring of reactive oxygen species production after traumatic brain injury in rats with

- microdialysis and the 4-hydroxybenzoic acid trapping method. *J Neurotrauma*, 18, 1217-27.
- 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, 613-36.
- 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, ENEURO.0258-18.2018.
- MORISSETTE, M., LE SAUX, M., D'ASTOUS, M., JOURDAIN, S., AL SWEIDI, S., MORIN, N., ESTRADA-CAMARENA, E., MENDEZ, P., GARCIA-SEGURA, L. M. & DI PAOLO, T. 2008. Contribution of estrogen receptors alpha and beta to the effects of estradiol in the brain. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 108, 327-38.
- 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. *J Neuroendocrinol*, 30.
- 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, 429-41.
- NEWELL, D. W., BARTH, A., PAPERMASTER, V. & MALOUF, A. T. 1995. Glutamate and non-glutamate receptor mediated toxicity caused by oxygen and glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures. *J Neurosci*, 15, 7702-11.
- NILSSON, S. & GUSTAFSSON, J. 2011. Estrogen receptors: therapies targeted to receptor subtypes. *Clin Pharmacol Ther*, 89, 44-55.
- NORABERG, J., KRISTENSEN, B. W. & ZIMMER, J. 1999. Markers for neuronal degeneration in organotypic slice cultures. *Brain Res Brain Res Protoc*, 3, 278-90.
- PAREKKADAN, B., BERDICHEVSKY, Y., IRIMIA, D., LEEDER, A., YARMUSH, G., TONER, M., LEVINE, J. B. & YARMUSH, M. L. 2008. Cell-cell interaction modulates neuroectodermal specification of embryonic stem cells. *Neurosci Lett*, 438, 190-5.
- PIETRANERA, L., LIMA, A., ROIG, P. & DE NICOLA, A. F. 2010. Involvement of brain-derived neurotrophic factor and neurogenesis in oestradiol neuroprotection of the hippocampus of hypertensive rats. *J Neuroendocrinol*, 22, 1082-92.
- PIKE, B. R., ZHAO, X., NEWCOMB, J. K., POSMANTUR, R. M., WANG, K. K. & HAYES, R. L. 1998. Regional calpain and caspase-3 proteolysis of alpha-spectrin after traumatic brain injury. *Neuroreport*, 9, 2437-42.
- PLESNILA, N. 2016. The immune system in traumatic brain injury. *Curr Opin Pharmacol*, 26, 110-7.
- PORTER, J. C. 1974. Proceedings: Hormonal regulation of breast development and activity. *J Invest Dermatol*, 63, 85-92.
- 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 Inj*, 21, 1023-30.
- REKKAS, P. V., WILSON, A. A., LEE, V. W., 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, 873-9.
- RENNER, C., HUMMELSHEIM, H., KOPCZAK, A., STEUBE, D., SCHNEIDER, H. J., SCHNEIDER, M., KREITSCHMANN-ANDERMAHR, I., JORDAN, M., UHL, E. & STALLA, G. K. 2012. The influence of gender on the injury severity, course and outcome of traumatic brain injury. *Brain Inj*, 26, 1360-71.
- ROBERTSON, H. A. & KING, G. J. 1974. Plasma concentrations of progesterone, oestrone, oestradiol-17beta and of oestrone sulphate in the pig at implantation, during pregnancy and at parturition. *J Reprod Fertil*, 40, 133-41.

- SAHAB-NEGAH, S., HAJALI, V., MORADI, H. R. & GORJI, A. 2020. The Impact of Estradiol on Neurogenesis and Cognitive Functions in Alzheimer's Disease. *Cell Mol Neurobiol*, 40, 283-299.
- SANDE, A. & WEST, C. 2010. Traumatic brain injury: a review of pathophysiology and management. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*, 20, 177-90.
- SANDÉN, C., BROSELID, S., CORNMARK, L., ANDERSSON, K., DASZKIEWICZ-NILSSON, J., MÅRTENSSON, U. E., OLDE, B. & LEEB-LUNDBERG, L. M. 2011. G protein-coupled estrogen receptor 1/G protein-coupled receptor 30 localizes in the plasma membrane and traffics intracellularly on cytokeratin intermediate filaments. *Mol Pharmacol*, 79, 400-10.
- SCHWENZER & EHRENFELD 2010. Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie (ZMK-Heilkunde). *Georg Thieme Verlag*.
- SHAO, C., ROBERTS, K. N., MARKESBERY, W. R., SCHEFF, S. W. & LOVELL, M. A. 2006. Oxidative stress in head trauma in aging. *Free Radic Biol Med*, 41, 77-85.
- SIMON, D. W., MCGEACHY, M. J., BAYIR, H., CLARK, R. S., LOANE, D. J. & KOCHANNEK, P. M. 2017. The far-reaching scope of neuroinflammation after traumatic brain injury. *Nat Rev Neurol*, 13, 171-191.
- SINGH, M., MEYER, E. M. & SIMPKINS, J. W. 1995. The effect of ovariectomy and estradiol replacement on brain-derived neurotrophic factor messenger ribonucleic acid expression in cortical and hippocampal brain regions of female Sprague-Dawley rats. *Endocrinology*, 136, 2320-4.
- SKAPER, S. D. 2018. Neurotrophic factors: an overview. *Neurotrophic Factors*, 1-17.
- SOLUM, D. T. & HANDA, R. J. 2002. Estrogen regulates the development of brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein in the rat hippocampus. *J Neurosci*, 22, 2650-9.
- SOUSTIEL, J. F., PALZUR, E., NEVO, O., THALER, I. & VLODAVSKY, E. 2005. Neuroprotective anti-apoptosis effect of estrogens in traumatic brain injury. *J Neurotrauma*, 22, 345-52.
- SPÄNI, C. B., BRAUN, D. J. & VAN ELDIK, L. J. 2018. Sex-related responses after traumatic brain injury: Considerations for preclinical modeling. *Front Neuroendocrinol*, 50, 52-66.
- STOPPINI, L., BUCHS, P. A. & MULLER, D. 1991. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods*, 37, 173-82.
- STREIT, W. J. & KINCAID-COLTON, C. A. 1995. The brain's immune system. *Sci Am*, 273, 54-5, 58-61.
- TAXIER, L. R., GROSS, K. S. & FRICK, K. M. 2020. Oestradiol as a neuromodulator of learning and memory. *Nat Rev Neurosci*, 21, 535-550.
- TOKLU, H. Z. & TÜMER, N. 2015. Frontiers in Neuroengineering Oxidative Stress, Brain Edema, Blood–Brain Barrier Permeability, and Autonomic Dysfunction from Traumatic Brain Injury. In: KOBEISSY, F. H. (ed.) *Brain Neurotrauma: Molecular, Neuropsychological, and Rehabilitation Aspects*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis 2015 by Taylor & Francis Group, LLC.
- TORRES, B. B., CALDEIRA, F. M., GOMES, M. G., SERAKIDES, R., DE MARCO VIOTT, A., BERTAGNOLLI, A. C., FUKUSHIMA, F. B., DE OLIVEIRA, K. M., GOMES, M. V. & DE MELO, E. G. 2010. Effects of dantrolene on apoptosis and immunohistochemical expression of NeuN in the spinal cord after traumatic injury in rats. *Int J Exp Pathol*, 91, 530-6.
- TSUSHIMA, W. T., LUM, M. & GELING, O. 2009. Sex differences in the long-term neuropsychological outcome of mild traumatic brain injury. *Brain Inj*, 23, 809-14.
- VEGETO, E., BELCREDITO, S., GHISLETTI, S., MEDA, C., ETTERI, S. & MAGGI, A. 2006. The endogenous estrogen status regulates microglia reactivity in animal models of neuroinflammation. *Endocrinology*, 147, 2263-72.
- VILLA, A., VEGETO, E., POLETTI, A. & MAGGI, A. 2016. Estrogens, Neuroinflammation, and Neurodegeneration. *Endocr Rev*, 37, 372-402.
- VILLAPOL, S., LOANE, D. J. & BURNS, M. P. 2017. Sexual dimorphism in the inflammatory response to traumatic brain injury. *Glia*, 65, 1423-1438.

- WANG, J., HOU, Y., ZHANG, L., LIU, M., ZHAO, J., ZHANG, Z., MA, Y. & HOU, W. 2021. Estrogen Attenuates Traumatic Brain Injury by Inhibiting the Activation of Microglia and Astrocyte-Mediated Neuroinflammatory Responses. *Mol Neurobiol*, 58, 1052-1061.
- WERNER, C. & ENGELHARD, K. 2007. Pathophysiology of traumatic brain injury. *Br J Anaesth*, 99, 4-9.
- WESTERHORSTMANN, Jana. Regulation der kortikalen Neurotrophin-Expression durch Sexualhormone nach experimentell induziertem Schädel-Hirn-Trauma. 2019. Doktorarbeit. Staats-und Universitätsbibliothek Hamburg Carl von Ossietzky.
- WISE, P. M., DUBAL, D. B., RAU, S. W., BROWN, C. M. & SUZUKI, S. 2005. Are estrogens protective or risk factors in brain injury and neurodegeneration? Reevaluation after the Women's health initiative. *Endocr Rev*, 26, 308-12.
- WITCHER, K. G., EIFERMAN, D. S. & GODBOUT, J. P. 2015. Priming the inflammatory pump of the CNS after traumatic brain injury. *Trends Neurosci*, 38, 609-620.
- WRIGHT, D. W., ESPINOZA, T. R., MERCK, L. H., RATCLIFF, J. J., BACKSTER, A. & STEIN, D. G. 2014. Gender differences in neurological emergencies part II: a consensus summary and research agenda on traumatic brain injury. *Acad Emerg Med*, 21, 1414-20.
- WU, H. M., HUANG, S. C., HATTORI, N., GLENN, T. C., VESPA, P. M., YU, C. L., HOVDA, D. A., PHELPS, M. E. & BERGSNEIDER, M. 2004. Selective metabolic reduction in gray matter acutely following human traumatic brain injury. *J Neurotrauma*, 21, 149-61.
- XIONG, Y., MAHMOOD, A. & CHOPP, M. 2013. Animal models of traumatic brain injury. *Nat Rev Neurosci*, 14, 128-42.
- YANG, L., WANG, F., YANG, L., YUAN, Y., CHEN, Y., ZHANG, G. & FAN, Z. 2018. HMGB1 a-Box Reverses Brain Edema and Deterioration of Neurological Function in a Traumatic Brain Injury Mouse Model. *Cell Physiol Biochem*, 46, 2532-2542.
- ZHANG, Y. B., LI, S. X., CHEN, X. P., YANG, L., ZHANG, Y. G., LIU, R. & TAO, L. Y. 2008. Autophagy is activated and might protect neurons from degeneration after traumatic brain injury. *Neurosci Bull*, 24, 143-9.
- ZÜNDER, R. M. Altersabhängige Mikrogliaaktivierung und Proliferation nach Schlaganfall. 2014.

## 10. Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Roland Bender herzlichst danken für seine unermüdliche Betreuung zu jedem Zeitpunkt und die wertvollen Tipps, die mir stets den weiteren wissenschaftlichen Weg in dieser spannenden Studie gewiesen haben. Des Weiteren möchte ich ihm für sein Vertrauen in mich und die Geduld, die er aufgebracht hat, bedanken. Ich weiß, dass dies nicht selbstverständlich ist und wusste es jederzeit sehr zu schätzen.

Mein Dank gilt ebenfalls den MitarbeiterInnen des Instituts für eine stets unterstützende und angenehme Arbeitsatmosphäre, sowie insbesondere den technischen AssistentInnen, und hier Frau Herdis Hamann für die Kultivierung der Gewebekulturen, sowie ein stets offenes Ohr.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Eltern und meiner Verlobten, Susanne Blohm für die jahrelange Unterstützung im Studium und der Promotion danken. Ohne diese wichtige Stütze und den stetigen Rückhalt in dieser turbulenten und anspruchsvollen Zeit, wäre dies nicht möglich gewesen.

## **11. Curriculum Vitae**

Der Lebenslauf entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

## 12. Erklärung des Eigenanteils

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

- Fixierung, Einfrieren und Schneiden der Gewebekulturen
- Immunhistochemie
- Auswertung der photographischen Aufnahmen (inklusive Statistik)

Die Präparation und die Pflege der Kulturen wurde von Prof. Bender bzw. Mitarbeitern des Instituts für Neuroanatomie übernommen.

Auch die Aufnahmen wurden – zwecks Verblindung der Studie – von Mitarbeitern des Instituts für Neuroanatomie, und nicht von mir selbst durchgeführt.

Unterschrift: .....

### **13. Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe 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.

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

Unterschrift: .....