

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

Langzeituntersuchung von synchronem
Schädelhirntrauma und Femurfraktur in einem
Mausmodell

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

Vorgelegt von

Markus Gerhard Baalman
aus Sögel

Mainz, 2022

Tag der Promotion:

03. April 2023

Für das Leben

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	IV
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VIII
SONDERZEICHEN	XI
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	XII
DIAGRAMMVERZEICHNIS.....	XIII
TABELLENVERZEICHNIS.....	XIV
1. EINLEITUNG	1
1.1 DAS POLYTRAUMA	2
1.1.1 DEFINITION	2
1.1.2 EPIDEMIOLOGIE.....	2
1.1.3 PATHOPHYSIOLOGIE	3
1.2 DAS SCHÄDEL-HIRN-TRAUMA	6
1.2.1 DEFINITION UND EINTEILUNG	6
1.2.2 EPIDEMIOLOGIE.....	7
1.2.3 PATHOPHYSIOLOGIE	7
1.2.4 PRIMÄRSCHADEN.....	8
1.2.5 SEKUNDÄRSCHADEN	10
1.2.6 AUSWIRKUNGEN UND FOLGEN EINER HIRNVERLETZUNG.....	13
1.2.7 EFFEKTE VON PERIPHEREN VERLETZUNGEN AUF DAS SHT	15
1.3 DIE FEMURFRAKTUR	15
1.3.1 DEFINITION EINER FRAKTUR	15
1.3.2 AO-KLASSIFIKATION.....	16
1.3.3 REPARATURMECHANISMEN	16
1.3.4 KNOCHENHEILUNG UNTER SHT	18

2. MATERIAL	20
2.1 VERBRAUCHSMATERIAL	20
2.2 GERÄTE.....	21
2.3 CHEMIKALIEN	22
2.4 LÖSUNGEN UND PUFFER	23
2.5 ARZNEIMITTEL	24
2.6 KITS.....	24
2.7 ANTIKÖRPER	24
2.7.1 PRIMÄRE ANTIKÖRPER.....	24
2.7.2 SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER	25
2.8 PRIMER.....	25
2.9 SOFTWARE.....	26
3. METHODEN	27
3.1 TIEREXPERIMENT	27
3.1.1 TIERVERSUCHSANTRAG	27
3.1.2 VERSUCHSPLANUNG.....	27
3.1.3 TIERSTAMM	28
3.1.4 HALTUNG UND PFLEGE.....	28
3.1.5 OP-VORBEREITUNG UND ANÄSTHESIE	29
3.1.6 <i>CONTROLLED CORTICAL IMPACT (CCI)</i>	30
3.1.7 FEMURFRAKTUR	32
3.1.8 SCHEINEINGRIFF	33
3.1.9 RÖNTGEN	34
3.1.10 GEWICHTSBEURTEILUNG.....	35
3.1.11 ABBRUCHKRITERIEN.....	35
3.1.12 VERHALTENSBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN.....	35
3.1.13 NEUROLOGICAL SEVERITY SCORE	35
3.1.14 BEINBELASTUNGSTEST.....	37
3.1.15 ROTA-ROD.....	37
3.1.16 EXIT FROM THE CIRCLE.....	38
3.1.17 ELEVATED PLUS MAZE.....	39
3.1.18 EUTHANASIE UND PROBENGWINNUNG	40

3.2	HISTOLOGIE	41
3.2.1	KRYOTOMSCHNITTE.....	41
3.2.2	FÄRBUNG DER HIRNSCHNITTE NACH NISSL.....	42
3.2.3	VOLUMETRIE	43
3.2.4	DICKMESSUNG DER KÖRNERZELLSCHICHT IM GYRUS DENTATUS	43
3.2.5	VERGLEICHSMESSUNG DER LÄNGE VON FEMURNAGEL UND FEMUR.....	44
3.2.6	IMMUNHISTOCHEMIE.....	44
3.2.7	IMMUNFLOURESZENZFÄRBUNG	44
3.2.8	AUSWERTUNG IMMUNFÄRBUNG	45
3.3	MOLEKULARBIOLOGISCHE VERFAHREN	46
3.3.1	RNA EXTRAKTION.....	46
3.3.2	PHOTOMETRISCHE KONZENTRATIONSBESTIMMUNG	47
3.3.3	REVERSE TRANSKRIPTASE	47
3.3.4	POLYMERASEKETTENREAKTION.....	48
3.3.5	PROTEINEXTRAKTION.....	49
3.3.6	PROTEINBESTIMMUNG.....	50
3.3.7	GELELEKTROPHORESE	50
3.3.8	WESTERN BLOT.....	51
3.3.9	ENZYME-LINKED IMMUNOSORBANT ASSAY	52
3.4	STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	53
4.	<u>ERGEBNISSE</u>	<u>54</u>
4.1	VERHALTEN UND GEWICHT.....	54
4.1.1	GEWICHT.....	54
4.1.2	NEUROLOGICAL SEVERITY SCORE	55
4.1.2.1	NSS am Tag 1.....	56
4.1.2.2	NSS am Tag 3.....	56
4.1.2.3	NSS am Tag 7.....	57
4.1.2.4	NSS am Tag 14.....	57
4.1.2.5	NSS am Tag 21.....	57
4.1.2.6	NSS am Tag 42.....	58
4.1.3	BEINBELASTUNGSTEST	58
4.1.4	ROTA-ROD.....	59
4.1.5	ALLGEMEINE BEWEGUNGSFÄHIGKEIT.....	60

4.1.6	ELEVATED PLUS MAZE	64
4.2	HISTOLOGISCHE DATENERHEBUNG.....	70
4.2.1	VOLUMETRIE	70
4.2.2	DICKMESSUNG DER KÖRNERZELLSCHICHT IM GYRUS DENTATUS	73
4.3	IMMUNHISTOCHEMIE.....	74
4.3.1	GFAP	75
4.3.2	IBA1	78
4.4	MOLEKULARBIOLOGISCHE ANALYSE	79
4.4.1	QUANTITATIVE REAL-TIME POLYMERASEKETTENREAKTION	79
4.4.2	ANALYSE DER GENEXPRESSION.....	79
4.5	PROTEINANALYSE	82
4.5.1	IMMUNOBLOT.....	82
4.5.1.1	GFAP	83
4.5.1.2	Alpha-2-Spektrin.....	83
4.5.2	ELISA.....	84
5.	<u>DISKUSSION</u>	<u>86</u>
5.1	EVALUATION DER METHODEN	86
5.2	VERHALTENSBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNG	89
5.3	HISTOLOGISCHE PROZESSE UND NEURONALER VERLUST.....	93
5.4	MOLEKULARE NEUROINFLAMMATION	95
6.	<u>ZUSAMMENFASSUNG.....</u>	<u>100</u>
7.	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>102</u>
	DANKSAGUNG.....	115
	LEBENS LAUF	116

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
ANOVA	<i>analysis of variance</i> (engl., deutsch: Varianzanalyse)
Aqua dest.	<i>Aqua destillata</i> (lat., deutsch: destilliertes Wasser)
ATP	Adenosin-Triphosphat
BBS	Beinbelastungsscore
BBT	Beinbelastungstest
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BRD	Bundesrepublik Deutschland
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CCI	<i>controlled cortical impact</i> (engl.)
cDNA	<i>complementary desoxyribonucleic acid</i> (engl.)
CH	Schweiz
cm	Zentimeter
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DE	Deutschland
DG	dentate gyrus
DGU	Deutsche Gesellschaft für Unfallchirurgie
DIC	disseminierte intravasale Gerinnung
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (engl., deutsch: Desoxyribonukleinsäure, DNS)
dpi	days post injury
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> (engl.)
engl.	englisch
ER	endoplasmatisches Retikulum
et al.	<i>et alii</i> (lat., deutsch: und andere)
EU	Europäische Union
Fa.	Firma
FF	femoral fracture, Femurfraktur
g	Gramm
G	Gauge

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCL	<i>Granule cell layer (engl.)</i>
GCS	<i>Glasgow Coma Scale (engl., deutsch: Glasgow Koma Skala)</i>
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein (engl.)</i>
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunde
i.p.	intraperitoneal
Iba-1	<i>ionized calcium-binding adapter molecule 1 (engl.)</i>
ICP	<i>intracranial pressure (engl., deutsch: intrakranialer Druck)</i>
IL	Interleukin
IL-1β	interleukin 1 beta
ISS	<i>Injury Severity Score (engl.)</i>
kDA	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
kV	Kilo Volt
l	Liter
BBT	Beinbelastungstest
m	Meter
M	Molar
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid (engl.)</i>
ms	Millisekunde
MW	Mittelwert
n	Anzahl untersuchter Individuen
NaCl	Natriumchlorid
NGS	<i>normal goat serum (engl.)</i>
NL	Niederlande
nm	Nanometer
NSS	<i>Neurological Severity Score (engl., deutsch: neurologische Defizitwertung)</i>
OFT	<i>open field test (engl.)</i>

OP	Operation
OPN	Osteopontin
OT	Objektträger
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
PPIA	Peptidylprolyl Isomerase A
qPCR	quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay buffer, (engl.)</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (engl., deutsch: Ribonukleinsäure, RNS)
RNase	Ribonuklease
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>rounds per minute (engl.)</i>
RT	Raumtemperatur
rT	reverse Transkriptase
s	Sekunde
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis, (engl.)</i>
SEM	Standarfehler (engl. <i>standard error of mean</i>)
SHT	Schädel-Hirn-Trauma
SIRS	systemic inflammatory response syndrome, (engl.)
SPP1	secreted phosphoprotein 1
TBS	<i>tris-buffered saline, (engl.)</i>
TJ	<i>tight junction (engl.)</i>
TNFα	Tumornekrosefaktor alpha
UK	<i>United Kingdom</i> (engl., deutsch: Vereinigtes Königreich)
USA	<i>United States of America</i> (engl., deutsch: Vereinigte Staaten von Amerika)
V. a.	vor allem
ZNS	Zentralnervensystem

Sonderzeichen

%	Prozent
°C	Grad Celsius
>	größer oder gleich
<	kleiner oder gleich
±	plus/minus
2	Quadrat
3	Kubik
α	alpha
β	beta
μ	mü
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
*	Multiplikation

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Traumakreislaufs	4
Abbildung 2: Schematische Darstellung der biologischen Reaktion auf eine Hirnverletzung.	9
Abbildung 3: Darstellung von Mikroglia und Astrozyten im Verlauf eines SHT	13
Abbildung 4: Phasenmodell des Knochenheilungsprozesses.....	18
Abbildung 5: Schematischer Aufbau eines CCI-Applikators.....	31
Abbildung 6: Maus in Vorbereitung zur FF-OP.....	33
Abbildung 7: Röntgenbild einer Maus mit FF.	34
Abbildung 8: Versuchstier bei der Erhebung vom NSS.....	36
Abbildung 9: Im Versuchsaufbau verwendetes Rota-Rod.	38
Abbildung 10: Aufbau EPM	40
Abbildung 11: Mäusegehirn mit SHT nach 42 Tagen Überlebenszeit.....	42
Abbildung 12: A) Darstellung einer Maus im EPM B) Beispiele einer <i>Heatmap</i> einer Maus im EPM.	64
Abbildung 13: Histologischer Hirnschnitt mit Nisslfärbung.....	72
Abbildung 14: Exemplarische Darstellung der Körnerzellschicht im Gyrus Dentatus .	73
Abbildung 15: Die IHC-Färbungen Iba-1 und GFAP.	75

Diagrammverzeichnis

Diagramm 1: Die Entwicklung des KG im Versuchsverlauf	54
Diagramm 2: NSS der einzelnen Gruppen an den jeweiligen Kontrolltagen	56
Diagramm 3: Vergleich der Gruppen zum Kontrollzeitpunkt.....	58
Diagramm 4: Rota-Rod Test am Tag 21. Vergleich der Zeit bis zum Fall	59
Diagramm 5: Vergleich der Gesamtstrecke in den Gruppen an den Kontrolltagen	60
Diagramm 6: Vergleich der mittleren Geschwindigkeit der Gruppen an den Kontrolltagen	62
Diagramm 7: Exit from the Circle am Tag 42.	63
Diagramm 8: Mittelwert der zurückgelegten Geschwindigkeit im EPM	66
Diagramme 9: A) Gesamtzeit, B) die Frequenz der Tiere in den offenen Armen und <i>Center Zone</i> des EPM.....	67
Diagramm 10: A) Gesamtzeit, B) die Frequenz der Tiere in den geschlossenen Armen des EPM.....	68
Diagramm 11: Erkundungsverhalten im EPM.....	69
Diagramm 12: Prozentuales Verhältnis rechte und linke Hirnhälfte der Gruppen CCI und CCI+FF.....	70
Diagramm 13: Volumen der Hirnhälften A) linke Hemisphäre B) rechte Hemisphäre.	71
Diagramm 14: A) Gesamtvolumen der Gruppen CCI und CCI+FF. B) Verhältnis rechte Hirnhälfte zum TBV.....	71
Diagramm 15: Dickemessung GCL im Verhältnis ipsi zu contraläsional.....	74
Diagramm 16: Anzahl GFAP-Immunpositive Zellen im Verhältnis ipsi/contraläsional	76
Diagramm 17: Fläche GFAP-Immunpositive Zellen im Verhältnis ipsi/contraläsional.	77
Diagramm 18: Darstellung Genexpression <i>Gfap</i> , <i>SerpA3n</i> , <i>Mhc2</i> und <i>C3</i>	80
Diagramm 19: Darstellung der Genexpression <i>Vglut1</i> , <i>Il1β</i> , <i>Tspo</i> und <i>Spp1</i>	81
Diagramm 20: Proteinexpression von GFAP	83
Diagramm 21: Proteinexpression von alpha-II-Spektrinspaltprodukten	84
Diagramm 22: Plasmaspiegel von Osteopontin.....	85

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Schweregrad SHT nach GCS Punkten	7
Tabelle 2: Einteilung der Versuchsgruppen	28
Tabelle 3: MW±SEM vom Körpergewicht.	55
Tabelle 4: MW±SEM Beinbelastungstest.	59
Tabelle 5: MW±SEM Gesamtstrecke	61
Tabelle 6: MW±SEM mittlere Geschwindigkeit	63
Tabelle 7: MW±SEM der Biomarker	81
Tabelle 8: MW±SEM der Biomarker	82

1. Einleitung

Traumatische Ereignisse gehören weltweit zu den häufigsten tödlichen Ursachen junger Erwachsener (1). Ausschlaggebend für einen letalen Verlauf ist zumeist das Ausmaß einer Hirnverletzung (2). Wird ein Hirnschaden überlebt, besteht die Gefahr, Behinderungen mit lebenslangen Einschränkungen im Alltag davon zu tragen. Zusätzlich resultieren aus dem Unfallhergang häufig Weichteilverletzungen sowie Frakturen des knöchernen Skeletts. Standardisierte Behandlungsstrategien werden dem individuellen Schadensausmaß vor allem junger Patienten nur annähernd gerecht (3-5). Kaum ein Patientenkollektiv benötigt eine derart interdisziplinäre und individuelle Behandlung. Entscheidend für das langfristige Behandlungsergebnis ist oftmals die initiale Therapie (6).

Trotz rückläufiger Fallzahlen in den einkommensstarken Nationen und stetigem Fortschritt der medizinischen Versorgung imponieren die langfristigen Folgen. Folgen, die auch sozioökonomisch von der Gesellschaft getragen werden müssen (7). Erwähnenswert ist, dass die Inzidenz von Schädel-Hirn-Traumen (SHT) in Ländern mit mittlerem bis niedrigem Einkommen weiterhin zunimmt (5). Das SHT verursacht eine integrale Beeinträchtigung der kognitiven, motorischen und affektiven Funktionen im Menschen (8-10).

Neurobiologisch lassen sich neurodegenerative und neuroinflammatorische Komponenten einer Hirnverletzung feststellen (11). Diffuse Strukturschäden im neuronalen Netzwerk und Störungen der Barriere zwischen Blut und Hirngewebe folgen auf das primäre Ereignis und werden als sekundärer Hirnschaden bezeichnet (12, 13). Die neurovaskulären Schäden manifestieren sich ausgehend vom Unfallzeitpunkt innerhalb von Stunden, teilweise sogar über Jahre (11, 14, 15). Mehrfachverletzungen bilden ein Forschungsterrain mit speziellen Anforderungen an alle Beteiligten. Pathophysiologische Interaktionen zwischen Frakturen und SHT eröffnen zudem vielfältige Kombinationsvarianten (16-18).

Auf knöchernen Frakturen folgt ein komplexer Heilungsprozess. Dieser beinhaltet eine ausgedehnte Entzündungsreaktion. Immunzellen und Zytokine bewirken eine systemische Reaktion. Bei begleitendem SHT ist die kompromittierte

Barriere zwischen Blut und Hirngewebe dabei von besonderem Interesse. Es gilt zu klären, welchen Einfluss zirkulierende Faktoren auf die Neuroinflammation respektive den sekundären Hirnschaden haben (16, 17, 19).

Ziel dieser Studie ist es, die Langzeitfolgen einer kombinierten Verletzung aus SHT und Femurfraktur am Mausmodell zu untersuchen. Zur Anwendung kommen operative Methoden, die kontrollierte und reproduzierbare Schäden hervorrufen. Im Überlebenszeitraum von 6 Wochen erfolgten diverse verhaltensbiologische Testverfahren. Ferner kam es im Anschluss zu biochemischen, histologischen und molekularbiologischen Analysen.

Für das Gelingen und zielorientierte Einsetzen evidenzbasierter Medizin sind Kenntnisse über die Grundlagen der pathophysiologischen Prozesse unabdingbar. Durch diese Studie soll Wissen gewonnen werden, das dem tieferen Verständnis der Interaktionen großer Knochenfrakturen und schweren Hirnverletzungen dient.

1.1 Das Polytrauma

1.1.1 Definition

Bisher konnte sich weltweit keine einheitliche Beschreibung für den Begriff „Polytrauma“ durchsetzen (20). Jedoch hat sich in der Fachliteratur eine allgemein anerkannte Definition etabliert: So handele es sich um ein Polytrauma bei „Gleichzeitig entstandene Verletzungen mehrerer Körperregionen/Organsysteme, wobei wenigstens eine Verletzung oder die Kombination mehrerer Verletzungen vital bedrohlich ist“ (21-23). Demnach sind Verletzungen, die zu keiner vitalen Bedrohung führen oder Einzelverletzungen von dieser Definition ausgeschlossen (21). Verschiedene *Scoring*-Methoden ermöglichen eine nationale und internationale Vergleichbarkeit. Gegenwärtig hat sich vor allem (v. a.) die Orientierung an der Unfallschwere bewährt. Angegeben werden die Werte mit dem *Injury Severity Score* (ISS). Mit dem ISS etablierte sich eine medizinische Bewertung der Traumaschwere. Die klinische Beurteilung korreliert mit der Sterblichkeit und Hospitalisation (24). Insgesamt umfasst die Bewertung Zahlenwerte von 0 bis 75, die sich beispielsweise aus der betroffenen Körperregion berechnen lassen. Die Einstufung „schwer verletzt“ wird durch einen Score ab einschließlich 16 Punkten erreicht (24, 25).

1.1.2 Epidemiologie

Durch das TraumaRegister DGU® (TR-DGU) werden in Deutschland nahezu flächendeckend alle Verletzungen dokumentiert. Die Zahl der Verletzten wird entsprechend ihren unterschiedlichen Scorings und der jeweiligen Definitionen zugeordnet. Bei einem Basiskollektiv von 32.580 versorgten Patienten im Jahr 2018 erfüllten hiervon 4735 die Definition eines Polytraumas (26). Bei einer Anzahl von circa (ca.) 18.300 Schwerverletzten entspricht dies einer Inzidenz von 0,02 % pro Jahr in Deutschland (7).

Bei genauerer Betrachtung offenbart sich, dass v. a. Männer mit schweren Verletzungen registriert wurden. Das Durchschnittsalter lag bei 45,9 Jahren. Mit Blick auf die Ursache für ein polytraumatisches Verletzungsmuster spielen mit 57 % v. a. Verkehrsunfälle eine bedeutende Rolle. Erwähnenswert sei hier, dass bei 25 % der Patienten ein schweres SHT am Unfallort vorgelegen habe. Wie relevant eine adäquate Versorgung auf evidenzbasierten Daten ist, lässt sich an der hohen

Klinikletalität mit 14 % erkennen (27). Die akute Versorgung und Rehabilitation eines Schwerverletzten gehen mit durchschnittlich 106.000 Euro einher. Die Rückkehr ins Berufsleben liegt bei etwa 60 %. Zusammenfassend hat eine polytraumatische Verletzung neben den individuellen Belastungen somit auch wirksame sozioökonomische Folgen (7).

1.1.3 Pathophysiologie

Der verursachte Schaden bei einem Trauma ist stark abhängig von verschiedenen Faktoren. Lokalisation, Intensität und die Dauer der einwirkenden Kräfte sind hier maßgebend. Sie bestimmen das Ausmaß und die individuellen Muster des entstehenden Gewebedefekts. Vom verletzten Gewebe wird umgehend eine Großzahl an Ribonukleinsäure (RNA), Desoxyribonukleinsäure (DNA) und weitere Zellbestandteile in die Umgebung freigesetzt. Die ausgelösten Fragmente und Moleküle werden als schadenassoziierte molekulare Muster (*damage-associated molecular patterns* = DAMPs) bezeichnet (28). Zugleich kommt es durch eine Schädigung physiologischer Barrieren zum Eindringen pathogener Mikroorganismen. Als Reaktion darauf folgt eine Freisetzung der pathogenassoziierten Muster (*pathogen-associated molecular patterns* = PAMPs) (29). Summarisch führt die Freisetzung von DAMPs und PAMPs, sowie das rasche Offenlegen der für das körpereigene Immunsystem physiologisch verborgenen Strukturen zu einer wirksamen Belastung als Antigen (28). Verletzungen sind oft mit äußeren Gegenständen verbunden, welche dann in sonst für sie unzugängliche Strukturen eindringen. Bei Kontakt mit unbekanntem Oberflächen kommt es zu einer Aktivierung des Gerinnungs- und Kallikrein-Kinin-Systems. Dies soll dem körpereigenen Verschluss von undichten subendothelialen Strukturen dienen (30).

Triggermoleküle wie beispielsweise C3 als Komplementfaktor sind unter anderem in der Lage, fremdes Material zu identifizieren. Überdies erkennen sie DAMPs aus endogenen Gefahren, wie sie bei apoptotischen Zellen entstehen (31). Ergänzend kommt es zur Aktivierung einer spezifischen Immunantwort, um sowohl endogene als auch exogene Gefahren abzuwehren. Kommt es zu einem ausgedehnten Ereignis durch Hypoxie, Begleitverletzungen oder Operationen, kann eine unkontrollierte inflammatorische Reaktion des Organismus die Folge sein. Klinisch erscheint ein Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom

(SIRS). Bei Beteiligung von Mikroorganismen, beispielsweise nach Eindringen über traumatisch entstandene Eintrittspforten, kann darüber hinaus eine Sepsis resultieren. Weiterhin wird die Funktion diverser Zellen so weit beschränkt, dass dies ein Multiorganversagen nach sich ziehen kann (MODS) (28).

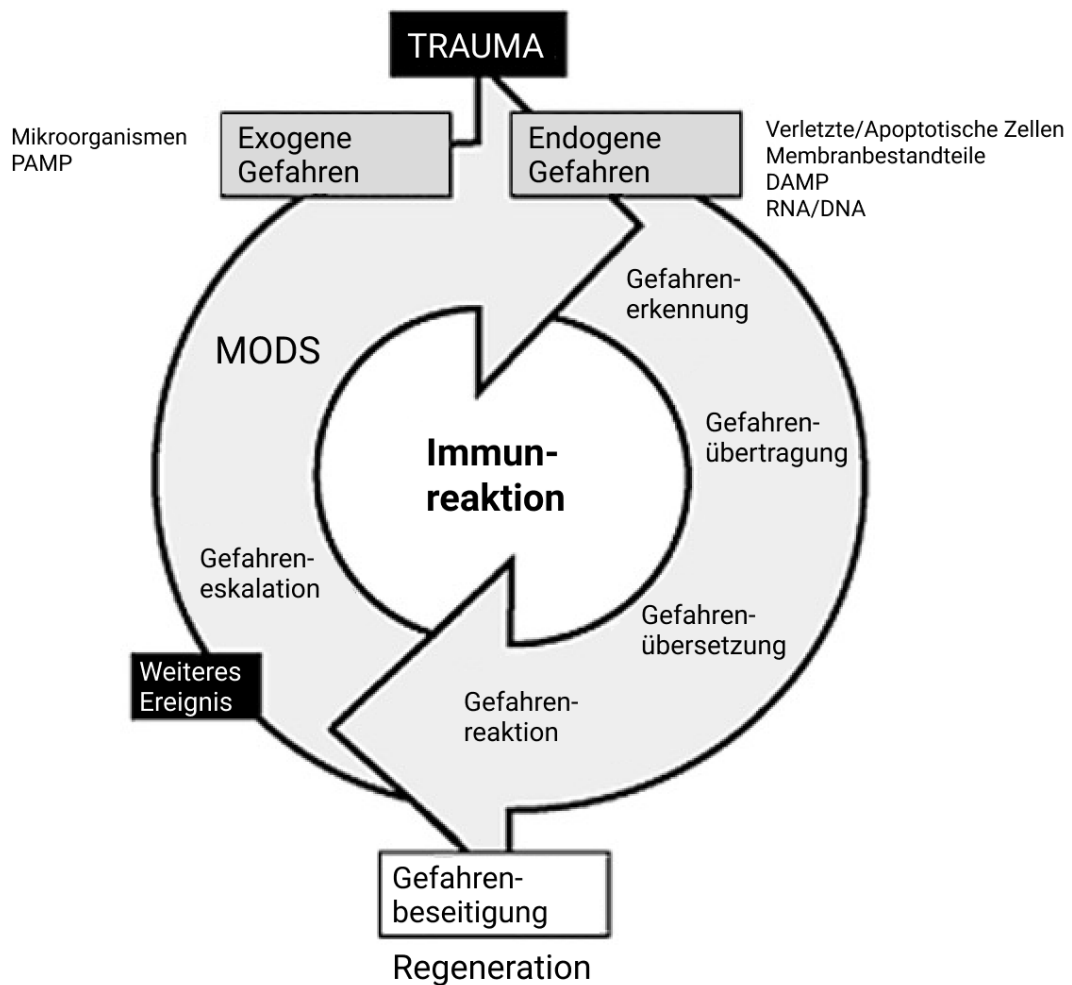


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Traumakreislaufs

Auf der Abbildung wird eine schematische Darstellung eines Trauma-Kreislaufs gezeigt. Ausgangspunkt bildet das Traumaereignis. Die endogenen Zellfaktoren sorgen für die gefahrassoziierte Reaktion im Körper. Kommt es im Ablauf der Regeneration zu einem zweiten Ereignis durch exogene Faktoren, führt dies zu einer Überreaktion des Immunsystems bis hin zu einem Multiorganversagen. Die Abbildung ist modifiziert nach (28).

Eine weitere Herausforderung für den Organismus ist die Fehlkommunikation der einzelnen Kaskaden im Immunsystem. Dies kann nachfolgend eine unkontrollierte Aktivierung des Komplementsystems auslösen. Diese Aktivierung geschieht bereits in der frühen Phase des Traumas. Grad und Dynamik dieser Aktivierung haben Auswirkungen auf die nachkommende Inflammation im verletzten Organismus. So kann das Verhältnis der Komplementfaktoren C3a/C3 als Bewertung für die Schwere eines Traumas herangezogen werden. Vermutlich kommt es ferner zu einer Interaktion zwischen den Serinprotease-Kaskaden im Gerinnungs- und Komplementärsystem (28, 32).

Ungefähr ein Viertel der schwer verletzten Patienten entwickelt eine Koagulopathie. Ursächlich dafür kommen zumeist unkontrollierbare Blutungen in Betracht, die eine disseminierte intravasale Gerinnung (DIC) zur Folge haben können. Als gefürchtete Komplikation kann es darüber hinaus zu einer traumainduzierten intravaskulären Koagulopathie (TIC) kommen (33). Nach Aktivierung der neuroendokrinen Achse durch verletztes Gewebe und hämodynamischer Instabilität kommt es über den Protein-C-Signalweg zu einer akuten Koagulopathie. Eine erhöhte Thrombinfreisetzung und Fibrinolyse wird überdies vom verletzten Gewebe induziert. Bei verstärkter systemischer Aktivierung der Gerinnungskaskade mit anschließender Fibrinolyse führt dies nachfolgend zu einem Fibrinogenverlust. Ferner bedroht eine globale Beeinträchtigung der Hämostase den Organismus (34).

Im Rahmen der posttraumatischen zellulären Antwort kommt es sowohl zu einer pro-inflammatorischen als auch zu einer anti-inflammatorischen Wirkung. Insbesondere neutrophile Granulozyten werden durch Chemokine in geschädigte Bereiche gelockt. Dort zerstören sie mithilfe von Proteasen und oxidativen Radikalen geschädigte Zellen. Die Granulozyten reduzieren weiterhin die apoptotische Rate, was zu einem verbesserten Gleichgewicht zwischen verletzten und apoptotischen Zellen führt. Nach einem schweren Trauma kann ihre Funktion dagegen reduziert sein. Kommt es zu einer Fehlkommunikation innerhalb der Immunantwort, kann eine schwere Immunsuppression die Folge sein. Mit einer verringerten Fähigkeit des Immunsystems, auf Reize adäquat zu antworten, steigt das Risiko eines MODs, was wiederum tiefgreifende Konsequenzen für die Prognose hat (34, 35).

Es können die Folgen einer schweren traumatischen Verletzung in drei Phasen unterteilt werden. Die erste Phase ist v. a. durch eine hyper-inflammatorische Reaktion geprägt. Die Abwehrfunktion des Organismus reagiert unkontrolliert und übermäßig. Ursächlich ist hierfür ebenfalls eine Antigen-Belastung aus DAMPs und PAMPs (28, 36, 37).

In der sich anschließenden zweiten Phase kommt es zu einer reduzierten Antwort des Immunsystems. Mit Blick auf die Klinik bietet dieser Zeitraum gute Operationsbedingungen (38).

In der tertiären Phase führt eine Unterdrückung des Immunsystems zu einer erhöhten Gefahr für sekundäre Infektionen (28).

1.2 Das Schädel-Hirn-Trauma

1.2.1 Definition und Einteilung

Mit dem Begriff Schädel-Hirn-Trauma (SHT) wird eine Verletzung durch eine externe Kraft oder eine Gewalteinwirkung auf Hirngewebe und den Schädelknochen bezeichnet (39). In Folge dessen kommt es zu einer Störung der Hirnfunktion. Ist diese nicht vorhanden, wird das Ereignis als Schädelprellung bezeichnet (40). Falls zusätzlich bei einer Knochen- und Weichteilverletzung am Schädel auch die harte Hirnhaut (Dura Mater) verletzt ist, wird dies als offenes SHT bezeichnet (40).

Ein etabliertes Verfahren zur Bewertung eines SHT in die drei Schweregrade leicht, mittel und schwer ist die *Glasgow Coma Scale* (GCS) (41). Beurteilt werden die beste verbale Reaktion. Außerdem das Augenöffnen sowie die motorische Reaktion. In jeder Kategorie werden Punkte vergeben. Bei 13-15 Punkten handelt es sich um ein leichtes SHT, 9-12 um ein mittleres und bei unter 8 Punkten um ein schweres SHT. Es können insgesamt nicht weniger als 3 Punkte erreicht werden. Ausschlaggebend ist der niedrigste Wert innerhalb von 48 h nach Trauma (42). Die Klassifikation eines Verletzten hat unter anderem direkten Einfluss auf therapeutische Entscheidungen und wird bereits prähospital erhoben (40, 43).

Erhaltene Score-Punkte im GCS	Schweregrad SHT
13 – 15 Punkte	Leichtes SHT
9 – 12 Punkte	Mittelschweres SHT
3 – 8 Punkte	Schweres SHT

Tabelle 1: Schweregrad SHT nach GCS Punkten

1.2.2 Epidemiologie

In Deutschland hat das Schädel-Hirntrauma insgesamt eine Inzidenz von 332/100.000 Einwohner mit einer Letalität von 1 % (44). Altersspezifisch lassen sich drei Peaks erkennen. Der Erste im Kindesalter, der Zweite im jungen Erwachsenenalter und der dritte bei Personen über 75 Jahren (45). Weiterhin lässt sich die Altersstruktur noch differenzierter analysieren. Bei den über 29 und unter 45-jährigen stellt das SHT eine der führenden Todesursachen und den Hauptgrund für Behinderungen dar (5, 46-48). Für die Bundesrepublik Deutschland (BRD) wird in der Leitlinie Schädelhirntrauma aus dem Jahr 2015 summarisch von 248.000 SHT-Patienten ausgegangen. Davon sind etwa 90 % als leicht einzustufen (40). Das SHT kann berechtigterweise als eine der größten Herausforderungen an unsere Gesellschaft gesehen werden (5, 49-51).

Hauptursächlich kommt es bei älteren Patienten durch Stürze zu einem SHT. Verkehrsunfälle und Sportverletzungen sind bei jüngeren Patienten ausschlaggebend (52, 53). Allein in der BRD kann von jährlichen Kosten in Höhe von 2,8 Milliarden Euro ausgegangen werden, die direkt oder indirekt mit einem SHT im Zusammenhang stehen (54).

1.2.3 Pathophysiologie

Allgemein lässt sich das neuronale System in ein zentrales und ein peripheres Nervensystem unterteilen. Das zentrale Nervensystem besteht aus Rückenmark und Gehirn. Dort werden komplexe Prozesse koordiniert und Stimuli verarbeitet. Äußere und innere Reize führen so zu motorischen oder vegetativen Reaktionen. Ergänzend werden das Gehirn und Rückenmark in eine graue und eine weiße Substanz unterschieden. Während die weiße Substanz überwiegend aus Leitungsbahnen besteht, wird die graue Substanz aus Nervenzellkörpern

gebildet. Das periphere Nervensystem wird aufgrund der topografischen Lagebeziehungen zum zentralen Nervensystem (ZNS) abgegrenzt und bildet den Kontakt zur Außenwelt (55, 56). Derart komplexe und strukturierte Abläufe erfordern eine stabile Struktur und Umgebung. Auf eine Vielzahl von Abweichungen im System gelingt es dem menschlichen Organismus eigenständig zu reagieren und so eine entsprechende Homöostase aufrecht zu erhalten. In diesem Zusammenhang ist es von besonderer Bedeutung, Erkenntnisse über das Verhalten dieser Strukturen und pathophysiologischer Abläufe nach einer externen unwiderruflichen Gewalteinwirkung zu gewinnen. Die Verletzung von Gehirn und Gewebe wird als Primärschaden bezeichnet, die daraus entstandenen Folgen werden als sekundärer Hirnschaden benannt (57). Beides soll im Folgenden etwas genauer erläutert werden.

1.2.4 Primärschaden

Durch eine direkte oder indirekte Gewalteinwirkung kommt es zu einem unmittelbaren und zudem noch irreversiblen Schaden an Knochen und Gewebe. Die Gewebedeformationen führen zu einer direkten Verletzung von bedeutsamen Strukturen wie dem Nervengewebe und Blutgefäßen. Funktionelle Ausfälle und Symptome korrelieren stark mit dem betroffenen Gebiet. Ausmaß und Lokalisation des Primärschadens haben einen großen Einfluss auf die Überlebenschancen (58). Als Resultat einer Verletzung kommt es dann zu einem fokalen Schaden sowie zu einem diffusen Schaden. Bei fokalen Läsionen folgen intrakranielle Blutungen mit Hämatomen in den unterschiedlichen Hirnhautschichten oder intraparenchymale Kontusionsblutungen. Ferner kommt es zu Lacerationen und zu Verletzungen von Axonen im betroffenen Gewebe (45). Zu den diffusen Schäden werden der diffuse axonale Schaden (DAI) und der diffuse vaskuläre Schaden gezählt (DVI) (58).

Vor allem der DAI gilt als dominierender Mechanismus bei traumatischen Hirnverletzungen. Vermutlich ist dieser bei allen Autounfällen mit traumatischem Bewusstseinsverlust beteiligt (59). Vor allem die weiße Substanz ist durch ihre hochdirektionale Struktur besonders stark gefährdet. Verschiedene physikalische Einwirkungen fordern die Axone stark, hierbei ist der viskoelastische Aufbau von Axonen ein wesentlicher präventiver Faktor (60).

Axone können sich unter physiologischen Begebenheiten bis auf das Doppelte ihrer Länge dehnen. Kommt es allerdings zu abrupten Veränderungen, besteht die Gefahr eines Bruchs (61).

Mikroskopisch lassen sich axonale Degenerationen feststellen. Hauptsächlich ist ein Verlust der Membranintegrität und Schäden an den Zellorganellen, die zu einem Ungleichgewicht der chemischen Homöostase führen (59). Erwähnenswert sei hier der Kalziumzufluss, dessen Folge zum einen schädliche Proteasenwirkungen induzieren kann, zum anderen aber auch eine veränderte Ionenkonzentration mit einer sekundären zytoskelettalen Störung nach sich zieht (62).

Ein primärer Schaden kann nur mithilfe von Primärprävention verhütet werden. Helme und Sicherheitsgurte reduzieren das Auftreten schwerer Hirnverletzungen und können so das Outcome zum positiven Beeinflussen (63).

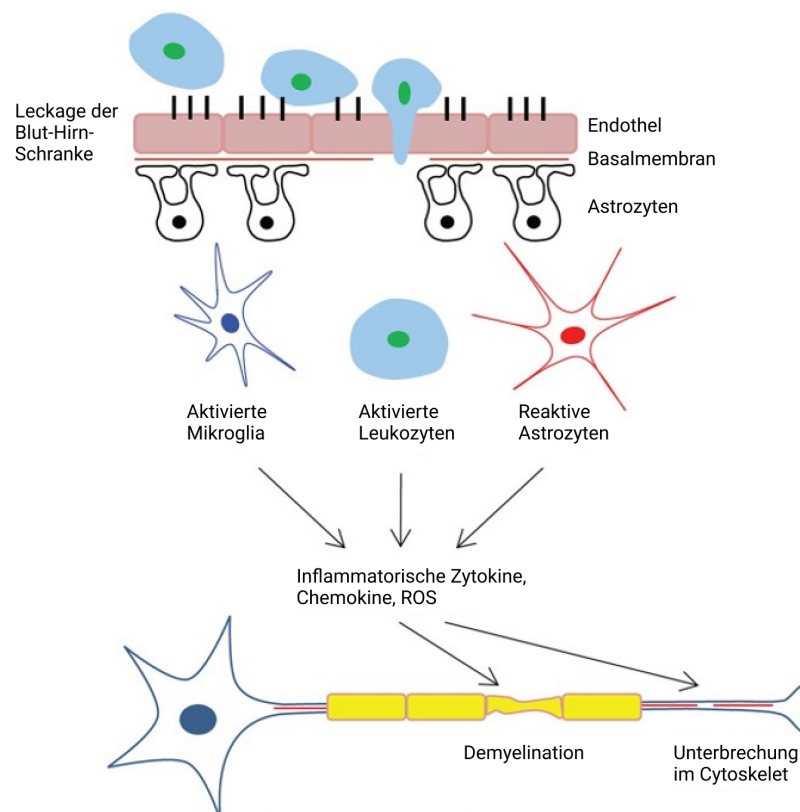


Abbildung 2: Schematische Darstellung der biologischen Reaktion auf eine Hirnverletzung

Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung einer traumatischen Hirnverletzung. Nach Verlust der Blut-Hirn-Schranke (BHS) vermittelt durch ein traumatisches Ereignis, können aktivierte Leukozyten in das Hirnparenchym transmigrieren. Das Zusammenspiel von aktivierten Leukozyten, Mikroglia und Astrozyten unterstützt die Demyelination und führt zur Zerstörung des axonalen Skeletts. Dies ist maßgeblich für den resultierenden DAI mit einhergehender Neurodegeneration. Abbildung modifiziert nach (64).

1.2.5 Sekundärschaden

Der Sekundärschaden kann als zweite Phase der Hirnverletzung verstanden werden. Er besteht aus einer komplexen Abfolge von Kaskaden und Ereignissen nach dem Primärschaden. Der Sekundärschaden ist nicht nur abhängig von der primären Gewalteinwirkung, sondern auch von Faktoren wie systemischer Ischämie und Hypoxie. Ödeme, Exzitotoxizität und Inflammation sind die wesentlichen Merkmale des sekundären Hirnschadens (65, 66).

Zur Aufrechterhaltung eines physiologischen Ruhemembranpotenzials dienen Natrium-Kalium-Pumpen, die sich in der Zellmembran befinden (67). Kommt es zu Beschädigungen dieser Membran, folgt eine Neuverteilung der Ionen und Neurotransmitter mit Auswirkungen auf das Membranpotenzial. Innerhalb der ersten Stunde (h) nach Schadensereignis kommt es zu einer massiven Freisetzung von Glutamat aus den präsynaptischen Vesikeln. Diese Freisetzung wirkt sich direkt auf das ionische Gleichgewicht der postsynaptischen Membran aus (65). Der plötzliche Überschuss an extrazellulärem Glutamat führt zu einer Überstimulation der ionotropen und metabotropen Glutamatrezeptoren. Dies hat Auswirkungen auf die Verteilung von Kalzium, Natrium und Kaliumionen. Durch den Versuch der Zelle, mit Hilfe der Natrium-Kalium-Pumpe die unphysiologischen Verhältnisse zu kompensieren, folgt ein erhöhter metabolischer Energiebedarf (68). Um diesen Bedarf zu decken, kommt es zu einem vermehrten Glukoseverbrauch. Dies wiederum löst einen Kalziumeinfluss in die Mitochondrien aus, der den oxidativen Stoffwechsel beeinträchtigt. Eine anaerobe Glykolyse mit gesteigerten Lactatproduktion und einhergehender Azidose sind die Folge (69).

Als weitere Ursache für eine Stoffwechselkrise kommen entstehende freie Radikale in Betracht. Bei freien Radikalen handelt es sich um Moleküle mit ungepaarten Elektronen, wodurch diese sich hochreaktiv verhalten. Sie entstehen im Mitochondrium als Stoffwechselprodukte bei der Energiegewinnung. Es werden zwei Gruppen unterschieden. Zum einen die reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), zum anderen die reaktiven Stickstoffarten. Während es unter physiologischen Verhältnissen genug Kapazitäten gibt, ROS abzufangen, wird bei einem traumatischen Ereignis ein schädliches Niveau erreicht (70). Es kommt zu oxidativen Schäden. Ferner entstehen Interaktionen mit dem umliegenden Gewebe. Hierzu zählen Zellmembranen, Proteine oder

sogar DNA. Trotz der Kurzlebigkeit von freien Radikalen ist ihre Anzahl auch noch Minuten bis Stunden deutlich erhöht (71, 72).

Im Rahmen der traumatischen Verletzung kommt es zu einem Ungleichgewicht von Wasser und osmotisch wirksamen Kräften. Die Permeabilitätsstörung der BHS begünstigt ein vasogenes Hirnödem. Ursächlich kommt ein funktionaler Abbau von Endothelzellen in Betracht. Ein unkontrollierter Fluss von Ionen und Proteinen sind die Folge. Wasser folgt entsprechend dem entstandenen Gradienten und es entstehen interstitielle Ödeme. Damit einhergehend naht eine pathologische Volumenzunahme des Extrazellularraumes. Als weiterer Faktor bestimmt der Ausfall von Ionenpumpen und eine erhöhte Membrandurchlässigkeit für Ionen in Mikroglia, Astrozyten und Neuronen den Verlauf. Es entsteht ein zytotoxisches Ödem. Aus der Volumenzunahme resultiert eine Erhöhung des intrakraniellen Drucks (ICP) (68).

Mikroglia nehmen als Teil des angeborenen Immunsystems im ZNS bei der Initiierung der Neuroinflammation eine entscheidende Rolle ein. Sie können als dynamische Zellen beschrieben werden, die ihre Umgebung ständig auf schädliche Vorgänge und potenziell schädliche Agenzien untersuchen. Extrazelluläre Signale veranlassen sie, mittels Phagozytose Zelltrümmer und toxische Substanzen zu beseitigen (73). Während sie sich im gesunden Gehirn in einer Art Ruhezustand befinden, kontrahieren sie als Reaktion auf eine Verletzung und nehmen zuweilen eine amöboide Morphologie an, mit deren Hilfe sie zum Verletzungsort migrieren können (73, 74). Zelloberflächenmarker wie MHC2 dienen während ihrer Aktivität der Kommunikation mit weiteren Immunzellen (75). Interleukin-1 beta (IL-1 β) ist ein unter anderem von Mikroglia sezerniertes, proinflammatorisches Zytokin. Als Inflammationsmediator nimmt es zusätzlich Einfluss auf die Zellproliferation und Differenzierung. Hierbei handelt es sich um eines der wesentlichen Merkmale einer Neuroimmunreaktion (76).

Neben dem Maß der Aktivität ist auch die Quantifizierung der Mikrogliazellen in dieser Arbeit von Interesse. Das ionisierte Kalziumbindungsadaptermolekül Iba-1 befindet sich in verzweigter, aktivierter Mikroglia und bietet sich entsprechend gut zur immunhistochemischen Darstellung an (77).

Die gestörte Perfusion im Bereich der traumatischen Verletzung führt zu einer vielfältigen Aufeinanderfolge von Gewebereaktionen. Es werden verschiedene proinflammatorische Zytokine und zelluläre Mediatoren in Umlauf gebracht. Ein

kaskadenartiger Verlauf mit weiteren Chemokinen und Adhäsionsmolekülen schließt sich an. Letztendlich infiltrieren somit aktivierte Mikroglia und T-Lymphozyten das verletzte Gewebe. Es folgt der Umbau zu Narbengewebe durch Astrozyten. Sie bilden dabei die dominierende Domäne (68, 78). Astrozyten reagieren sensibel auf Veränderungen in ihrem Umfeld. Nach einer traumatischen Verletzung kommt es zu einer reaktiven Astroglie. Hiermit werden Veränderungen an Morphologie, Genexpression, Proliferation und Funktion beschrieben. In ihrem reaktiven Zustand sind sie durch die Hypertrophie gekennzeichnet (79). Hier sei v. a. die durch die Astrozyten extrazellulär freigesetzten phosphathaltigen Purine, namentlich Adenosintriphosphat (ATP), erwähnt sowie die einhergehende Aktivierung purinergere Rezeptoren, die beispielsweise durch wellenförmige Ausbreitung von Kalzium eine Kommunikation zwischen ihnen und der Mikroglia ermöglichen (80). Durch das Zusammenspiel dieser Faktoren sorgen Astrozyten wesentlich für die Migration der aktivierten Mikroglia (81, 82). Es handelt sich somit um eine heterogene Reaktion, mit deren Hilfe in dieser Arbeit die Schwere des Gewebeschadens dargestellt werden kann (83, 84). Als Hauptbestandteil der glialen Zwischenfilamente in differenzierten faserigen und protoplasmatischen Astrozyten des zentralen Nervensystems eignet sich insbesondere saures Gliafaserprotein (*glial fibrillary acidic protein* engl., GFAP) als molekularer Marker (85, 86). Bei TSPO (*translocator protein* engl.) handelt es sich um ein Translokator-Protein der äußeren Mitochondrienmembran, das als Biomarker für die reaktive Gliose und Inflammationen genutzt wird. Während die TSPO Spiegel im gesunden Hirngewebe niedrig sind, steigen sie bei Hirnverletzungen und Entzündungen deutlich an (87).

Reaktive Astrozyten lassen sich ebenfalls im Hippocampus finden. Im frühen Stadium einer Verletzung wurde dort der Serinprotease-Inhibitor SerpinA3n nachgewiesen (88, 89). Unmittelbar beim Ereignis sowie bis zu Monaten danach kommt es zur Hochregulation der proinflammatorischen Enzymen (76).

Die BHS ist entsprechend essenziell für die Schaffung einer geschützten Umgebung im Nervengewebe. Sie bildet im Wesentlichen die Barriere zwischen dem Blut und dem ZNS. Sie ist sowohl eine physikalische Struktur als auch eine Transportbarriere. Als Mikrogefäßendothel wird sie aus astrozytären Gliazellen, Mikroglia und Perizyten gebildet. Ihren Zusammenhalt verdankt sie den

endothelialen Tight Junctions (TJ) (90). Sie ist verantwortlich für den Eintritt von blutübertragenen Faktoren und Immunzellen. Entscheidend für eine intakte Funktion ist das anatomische und funktionelle Zusammenspiel von Astrozyten und Mikroglia mit dem Endothel. Bei einer traumatischen Verletzung kommt es zum einen zu einer sofortigen, zum anderen zu einer verzögerten Verletzung dieser Barriere. Diese parazelluläre Durchlässigkeit trägt eine wesentliche Mitverantwortung am sekundären Schadensprozess (13).

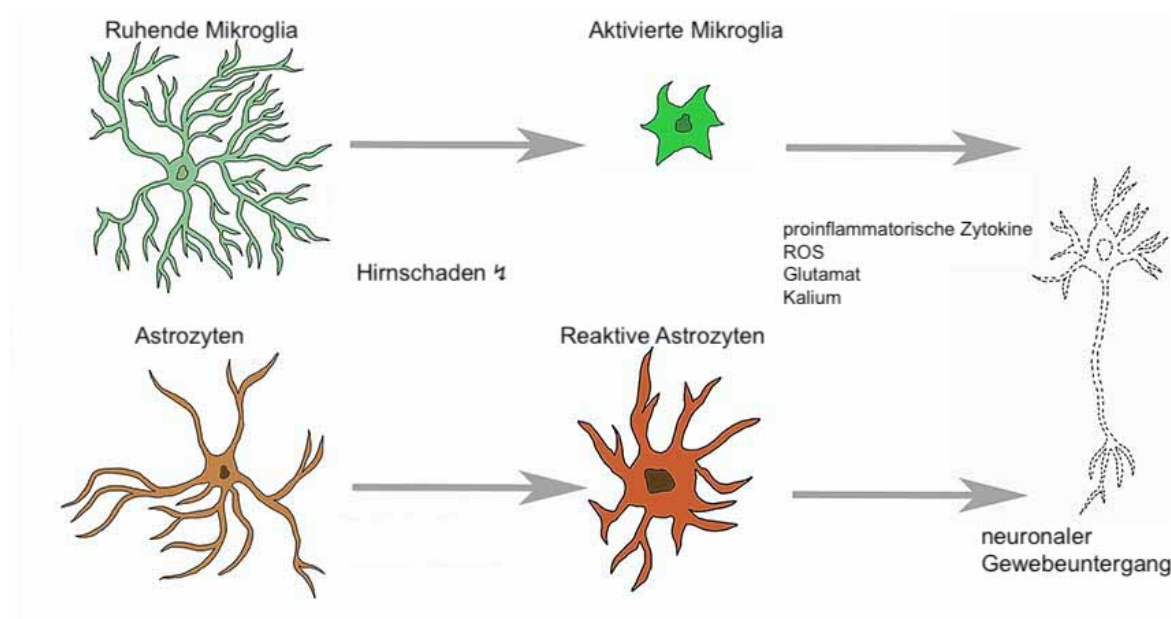


Abbildung 3: Darstellung von Mikroglia und Astrozyten im Verlauf eines SHT

Die Abbildung zeigt eine vereinfachte Darstellung von Astrozyten und Mikroglia im Verlauf eines Hirntraumas. Links im Bild befinden sich die ruhenden Mikroglia und Astrozyten. Durch einen Hirnschaden gehen diese in ihren aktiven respektive reaktiven Zustand über. Dies ist in dieser Abbildung durch Veränderungen der Morphologie gekennzeichnet. Im Rahmen dieses Zustands führen weitere Faktoren wie ein Überangebot an Kalium, Glutamat, ROS und proinflammatorischen Zytokinen zum neuronalen Gewebeuntergang. Abbildung modifiziert nach (91).

1.2.6 Auswirkungen und Folgen einer Hirnverletzung

Bei Betrachtung eines SHT sind neben einem Verständnis von akuten Mechanismen ebenso die Kenntnis über Langzeitfolgen unerlässlich. Häufige Krankheitsbilder, die in Folge eines SHT auftreten, sind unter anderem: Epilepsie, Schlafstörungen, neurodegenerative Erkrankungen und Alzheimer (92). Ein Viertel der Patienten mit schwerem SHT erfuhren ein epileptisches Ereignis innerhalb der ersten 24 h nach Trauma (93). Vor allem bei Patienten nach SHT mit posttraumatischer Epilepsie wurde eine längere Blut-Hirn-Schrankenstörung festgestellt. Zwar dient der entzündliche

Prozess der Schadensregulierung, aber die Entzündungsmediatoren, die das Hirngewebe weiter infiltrieren, könnten somit einen Anteil an der Epileptogenese haben. Vor allem späte Anfälle können im Gegensatz zu unmittelbaren Verletzungen als Folge veränderter neuronaler Netzwerke betrachtet werden (94, 95).

Monate bis Jahre nach einem akuten Ereignis kommt es noch zuzunehmen zu einem Abbau von weißer und grauer Hirnsubstanz (96, 97).

Diese Atrophie konnte im Rahmen von Langzeituntersuchungen festgestellt werden. Entsprechend zeichnet sich das SHT nicht nur durch die akute vitale Bedrohung aus, es ist ein komplexes Krankheitsbild mit einer Reihe von Folgen für den gesamten Organismus (93).

Einige Überlebende schwerer SHT zeigen noch Jahre später erhebliche Verhaltensauffälligkeiten bis hin zu Persönlichkeitsveränderungen. Sowohl mangelnde Kontrolle als auch mangelnder Antrieb und Reizbarkeit wirken sich auf die Lebensqualität aus (98).

Überdies haben jene Patienten oftmals mit einer Depression oder einem gesteigerten Angstverhalten zu kämpfen. Auch im Mausmodell wurde in bisherigen Studien ein verändertes Angstverhalten beschrieben (9). Ein depressives und ängstliches Verhalten wird oftmals mit der Erhöhung von exzitatorisch-hemmenden Verhältnissen im ZNS in Verbindung gebracht. Es bestehen Hinweise darauf, dass eine verminderte Expression von dem Transporter-Protein VGLUT1 (vesikulärer Glutamat-Transporter 1) im Mausmodell damit zusammenhängt (99, 100).

Mit Blick auf mögliche Rehabilitationsverfahren entsteht durch ein für die kognitiven Folgen durch SHT fehlendes Bewusstsein eine deutlich schlechtere Ausgangssituation. Zufriedenstellende Ergebnisse werden mühsamer und seltener erreicht (98). In diesem Zusammenhang sei die chronisch-traumatische Enzephalopathie erwähnt. Diese wird durch wiederholende Schädeltraumen ausgelöst und findet sich v. a. bei Sportlern mit starkem körperlichem Kontakt (101).

Hormonale Achsen beeinflussen über vielfältige Wege ebenfalls die Knochenheilung, was in dieser Arbeit noch näher erläutert werden soll (102).

1.2.7 Effekte von peripheren Verletzungen auf das SHT

Während die BHS in intaktem Gewebe eine Barriere zwischen Gehirn und umgebenden Strukturen darstellt, kommt es bei einem SHT zu einem Aufbrechen schützender Strukturen. Zusätzlich kommt es bei Begleitverletzungen in der Peripherie zu einem vermehrten Anfall von Stoffwechselprodukten, Mediatoren und Entzündungszellen, die ungehindert in das neuronale Gewebe eindringen können. Kommt es im Rahmen einer extrakraniellen Verletzung zu einem erheblichen Anstieg der Entzündungsreaktionen, können diese die neuroinflammatorischen Reaktionen des SHT unterstützen (103, 104). Weitere systemische Veränderungen, beispielsweise eine erhöhte Konzentration von ROS, Wachstumsfaktoren und Zytokine können sich ebenfalls auf den sekundären Hirnschaden auswirken (103).

Im Zusammenhang mit einer Fraktur und SHT wurden in Tierversuchen bisher Verschlechterungen der motorischen Fähigkeiten und kognitive Leistungseinbußen festgestellt. Ergänzend kam es zu verlängerten schmerzassoziierten Verhaltensweisen (16, 105). Vor allem die Wechselwirkungen eines Hirnödems und der Neuroinflammation bei einem SHT nehmen bei der Kombination mit einer Fraktur eine herauszustellende Rolle ein (106).

1.3 Die Femurfraktur

1.3.1 Definition einer Fraktur

Frakturen von Knochen gehören zu den ältesten Krankheitsbildern der Menschheit. Das Wort Fraktur stammt aus dem Lateinischen „*frangere*“ und bedeutet frei übersetzt „zerbrechen“ (107). Es kommt demgemäß zu einem Bruch im physiologischen Aufbau eines Knochens. Dabei kann die Kontinuität zum Teil oder vollständig unterbrochen sein. Begleitend kommen Gewebeerletzungen im direkten Umfeld der Fraktur hinzu. Durch Verlust der Funktionalität und Stabilität resultiert aus der Verletzung eine Durchblutungsstörung von Knochen und Gewebe, ein messbarer Kraftverlust und einhergehende Weichteilverletzungen. Ferner kann es bei einer Gelenkbeteiligung der Fraktur zu einem Funktionsverlust kommen. Kausal für eine Fraktur kommen zumeist eine Überbelastung, pathologische Knochenstruktur oder traumatische Ereignisse infrage (108, 109). Eine Fraktur

kann sowohl geschlossen als auch in Gestalt einer offenen Verletzung imponieren. Im Sinne einer offenen Fraktur kann durch das Gewebe bis auf den verletzten Knochen geblickt werden. Als allgemein sichere Frakturzeichen gelten Krepitationen, falsche Beweglichkeit und offene Frakturen (110).

1.3.2 AO-Klassifikation

Klassifikationen bieten die Möglichkeit, den Schweregrad einer Verletzung zu definieren und zu standardisieren. Demgemäß abgeleitet, kann ein entsprechendes Therapieverfahren ausgewählt und die Prognose eingeschätzt werden (111). Mit Einführung der AO-Klassifikation für lange Röhrenknochen wurde eine Möglichkeit geschaffen, Frakturen systematisch einzuordnen (112). AO steht hierbei als Abkürzung für die *Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthese*. Zunächst wird die verletzte Region bestimmt. Jeder Knochen hat dafür eine ihm zugeordnete Ziffer inne. Im nächsten Schritt wird das betroffene Segment eingeordnet und erhält dann ebenso eine Ziffer. Das Femur wird beispielgebend in 3 Segmente unterteilt: proximal, diaphysär und distal. Der Frakturtyp kann anhand des Zentrums seines Bruchverlaufs einem Schweregrad zugeordnet werden. Der Schweregrad wird mit den Buchstaben A, B und C kodiert. Die den Lettern nachgestellte Ziffer zwischen 1 und 3 lässt eine weitere Differenzierung des Schweregrades zu (113). Eine einfache Femurschaftfraktur mit diagonal verlaufender Frakturlinie, wie sie in dieser Studie angewandt wurde, bekäme in der AO-Klassifikation folgende Codierung: 32-A3.

1.3.3 Reparaturmechanismen

Die Heilung eines Knochens beinhaltet sowohl mechanische als auch biologische Mechanismen (114). Ziel der Knochenheilung ist es, dem Gewebe die ursprünglichen physikalischen und mechanischen Eigenschaften wieder zurückzugeben. Es lassen sich orientierend drei Phasen identifizieren, die eher fließend ineinander übergehen. Primär kommt es zu einer frühen Inflammation, an die sich die Reparaturphase anschließt. Es folgt das späte Umbaustadium (115).

Es entsteht eine Kombination aus intramembranöser und endochondraler Ossifikation (116).

Aus den verletzten peripheren und intramedullären blutversorgenden Gefäßen kommt es in der Frakturhülle zu einer Blutung mit einhergehender Hämatombildung (114, 117). Als eine Art Baugerüst für einströmende Zellen und deren Aktivität stellt das Hämatom den Raum und die Struktur für nachfolgende Kaskaden zur Verfügung. Die Hämatom-Phase einschließlich des Granulationsprozesses bildet den Ausgangspunkt für eine erfolgreiche Frakturheilung (114). Es strömen eine Vielzahl proinflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren ein. Ferner kommt es zu einer Freisetzung angiogener Faktoren als Reaktion auf den Gefäßabriss. Die entstandene Entzündungsreaktion hält nun einige Tage an. Es ist davon auszugehen, dass dies erforderlich ist für den Heilungsprozess. Während der einhergehenden Reparaturphase gelingt der Aufbau einer neuen extrazellulären Matrix. Diese dient unter anderem der Stabilisierung einer Bruchstelle (117). Als Grundlage einer funktionierenden Matrix bedarf es ausreichende mesenchymale Stammzellen und ihre Differenzierung in Osteoblasten und Chondrozyten. Die Rekrutierung dieser Stammzellen ist essenziell für die Knochenheilung. Sie stammen unter anderem aus dem Knochenmark, Blutgefäßen und der Peripherie (118).

Der entstehende weiche und avaskuläre Knorpel besteht aus Chondrozyten. Auf diese Weise einhergehend entsteht eine hypoxische Gewebesituation (117).

Die Chondrozyten hypertrophieren im Anschluss und bilden eine endochondrale Formation, die der Knochenstruktur ähnelt. Unterdessen kommt es zu einer Mineralisation der Chondrozyten. Der mineralisierte Knorpel wird durch Osteoklasten resorbiert und verwertet. Osteoblasten bauen künftig Knochengewebe dort auf. Der entstehende Geflechtknochen bildet den harten Kallus. Hierbei handelt es sich um eine Struktur der sekundären Knochenheilung. Dieser besitzt zwar schlechtere mechanische Eigenschaften als Lamellenknochen, ist allerdings schnell verfügbar. Der Kallus bildet ein größeres Gerüst um die verletzte Stelle und sorgt so für eine verbesserte Gefäßversorgung (117, 119).

Als letzte und ausgiebigste Phase schließt sich die Umwandlung von Geflechtknochen in Lamellenknochen an. Dies gelingt durch Bildung von Osteonen im kortikalen Frakturspalt. Verschiedene Faktoren, wie beispielsweise IL-1 und TNF-alpha, sorgen für einen kontrollierten Umbau, unterdessen nimmt

die Expression der meisten entzündlichen Zytokine ab. Ebenfalls reduziert wird die Vaskularisation, bis ein nahezu physiologisches Ausgangsniveau erreicht ist (120). Osteoklasten verwerten durch Resorption den periostealen und medullären Kallus. Der äußere Kallus kann nachfolgend sukzessiv wieder mit lamellärer Knochenstruktur ersetzt werden. Der medulläre Hohlraum kann entsprechend durch die interne Metamorphose wiederhergestellt werden. Wenngleich immer noch abhängig von weiteren individuellen Bedingungen, kann an dieser Stelle ein charakteristischer diaphysärer Knochenaufbau entstehen (121).

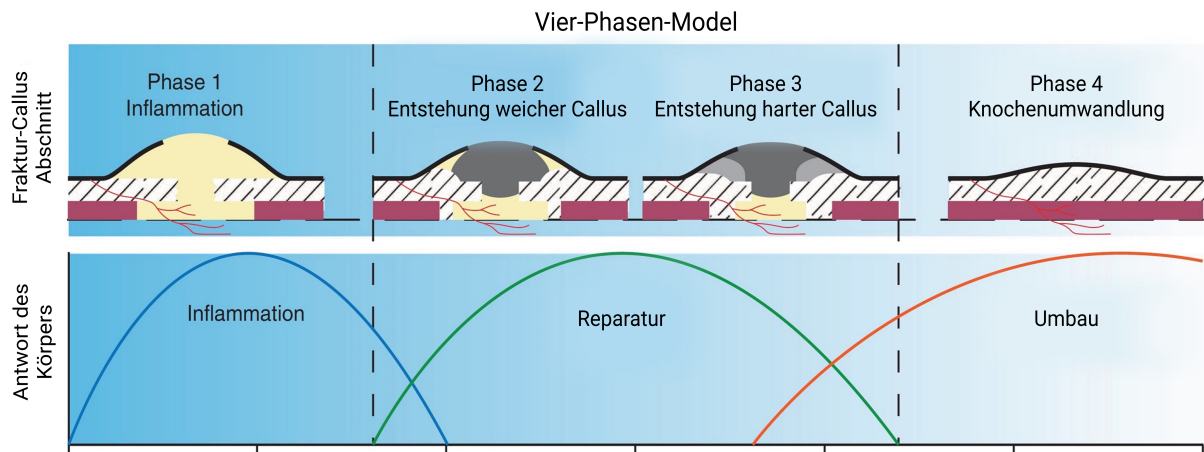


Abbildung 4: Phasenmodell des Knochenheilungsprozesses.

Die Illustration zeigt das vier Phasen-Modell einer Kallusbildung sowie die drei Phasen der ineinander übergehenden Reparaturmechanismen im zeitlichen Verlauf. Zwischen der Inflammation und der Umwandlung des Knochens werden zwei Phasen der Kallusbildung unterschieden. Primär entsteht die weiche Kallus-Formation. Darauf aufbauend bildet sich der harte Kallus. Im unteren Teil der Abbildung lassen sich die ineinander übergehenden Reaktionen des Körpers einer Knochenreparatur erkennen. Abbildung modifiziert nach (117).

1.3.4 Knochenheilung unter SHT

Das Blut hat eine besondere Rolle inne. Es ist der Vektor und damit die Verbindung zwischen traumatischem Hirngewebe und Knochenheilung. Im Rahmen von experimentellen Studien konnte bei gleichzeitiger Femurfraktur und SHT ein erhöhtes Kallusvolumen festgestellt werden (106).

Auf das SHT folgt ein Verlust von Nervengewebe, weiterhin kommt es zu einer Öffnung der BHS. Auf die systemische und lokale Immunaktivierung folgt eine Zytokinproduktion mit direkten Folgen für verletztes Nervengewebe und dessen Regeneration. Bei einer Fraktur kommt es ebenfalls zu einer entzündlichen Reaktion. Ferner findet bei der Knochenheilung ein komplexes Zusammenspiel diverser Kaskaden statt, die in mehreren Phasen verlaufen. Wesentlicher Bestandteil der Reparatur ist hier gleichsam zum SHT, der Entzündungsprozess (105).

Es wird zudem vermutet, dass eine vermehrte Expression der zirkulierenden epidermalen Wachstumsfaktoren und das Prolaktin einen Einfluss auf die gesteigerte Osteogenese haben könnten (106).

Eine weitere These besagt, dass eine alkalische Umgebung die Kalziumfällung fördert und somit zur Kallusbildung beiträgt (122).

Diskutiert wird ebenfalls eine heterotope Ossifikation, bei der entzündliche Prozesse eine wesentliche Rolle spielen. Näher bezeichnet handelt es sich um den Umbau aus Weichteilgewebe in knöchernen Strukturen (123-125).

In dieser Arbeit wird in diesem Zusammenhang das multifunktionale, extrazelluläre Matrixprotein Osteopontin untersucht, das bei einer Störung der BHS protektiv wirken und zudem als Blutbiomarker für Hirnverletzungen dienen kann (126, 127). Zudem ist es ein erheblicher Bestandteil der mineralisierten Extrazellulärmatrix von Knochen und Zähnen (128).

Ob und inwiefern freigesetzte Faktoren nach einem SHT-Einfluss auf die Frakturheilung haben, ist Gegenstand vieler Diskussionen. Es konnten bereits einige Faktoren in Serum und Zellen von Patienten mit SHT festgestellt werden, die einen Einfluss auf Signalkaskaden beim Heilungsprozess von verletztem Knochengewebe haben. Ferner haben verschiedene Hormonachsen einen Einfluss auf die Knochenheilung und Knochendichte (102, 129).

2. Material

2.1 Verbrauchsmaterial

- Deckgläser: Diagonal GmbH & Co KG, Münster, DE
- Einbettmedium, Tissue-Tek®: Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, NL
- Einstreu, Lignocel® FS14: J.Rettenmaier & Söhne GmbH+CoKG, Rosenberg, DE
- Einweg-Handschuhe: Safe Ex, SafeMed, Zimmerwald, CH
- Eppendorf Gefäße: Eppendorf, Hamburg, DE
- Falcon (50ml): Sarstedt, Nümbrecht, DE
- Faltenfilter: Whatman GmbH, Dassel, DE
- Gewebekleber, Histoacryl®: Braun AG, Berlin, DE
- Immu-Mount®, 9990402: Thermo Scientific, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA
- Injektionskanüle: 23 G x 1 ¼“ – Nr.14 (0,6 x 30 mm)
- MouseScrew® Nagel (17,2 mm) RISystem AG, Davos, CH
- Nahtmaterial: Perma-Hand™ Seide Nahtmaterial, Stärke 6-0, 45 cm Länge (Ethicon)
- Objektträger, SuperFrost®-Plus: Thermo Scientific GmbH, Menzel, Braunschweig, DE
- Papierhandtücher, ZZ Falz: Schuch Laborhandel und Klinikbedarf, Langgöns, DE
- Parafilm: Laboratory Film, 2 IN x 250 FT. Roll, Menasha, USA
- Pelletiertes Spezialfutter: ssnif Spezialdiät GmbH, Soest, DE
- Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1.000 µl): Sarstedt, Nümbrecht, DE
- Pipettenspitzen (5 ml): Labcon North America, Petaluma, USA
- Reaktionsgefäße: Eppendorf, Hamburg, DE
- Skalpelle: B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
- Superfrost® Plus Slides, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

2.2 Geräte

- BAT-12 Microprobe Thermometer, Physitemp, New Jersey, USA
- CCI-Device, Impact One, Stereotaxic Impactor: Leica Biosystems, Richmond, USA
- CryoStar NX70 Kryostat, Thermo Scientific: Thermo Fischer Scientific, Walldorf, DE
- Faxitron X-ray, Specimen Radiography System with Image Assist™, Hologic© Wiesbaden, DE
- Heizmatte: AccuLux, ThermoLux; Conrad, Hirschau, DE
- Homogenisator, Mastermill MM 300: Retsch Technology GmbH, Haan, DE
- Inkubator, IC8000: Dräger Medical Deutschland GmbH, Lübeck, DE
- Isofluran Vapor, Dräger, Lübeck, DE
- Käfig, Typ 2 L: Bioscape GmbH, Castrop-Rauxel, DE
- Light Cyclor 480 System: F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, CH
- Magnetrührer, MR 3001: Heidolph Instruments, Schwabach, DE
- MRX TC II Microplate Absorbance Reader, Dynex Technologies, Chantilly, VA, USA
- Mikro-Handbohrer, Uni-Drive N Komplettgerät: Paggen, Starnberg, DE
- Mikroskop:
 - Stemi 305 mit AxioCam 105 color: Zeiss Oberkochen, DE
 - Fluoreszenzmikroskop (Imager. M1): Zeiss, Oberkochen, DE
- Mikrozentrifuge, Micro Star 17R: VWR International, Darmstadt
- Odyssey Imaging System: Li-Cor, Lincoln, NE, USA
- MouseScrew, RISystem AG, Davos, CH
- Schüttler, Rotamax 120: Heidolph Instruments, Schwabach, DE
- Spektrophotometer, NanoVue: GE Healthcare, Little Chalfont, UK
- Stereotaxie-Einheit: David Kopf Instruments, Tujunga, USA
- Tierschrank: UniProtect THF 3378-VO2, Zoonlab GmbH, Castrop-Rauxel, DE
- Vortexmischer, Reax Control: Heidolph Instruments, Hamburg, DE
- Waage, DIPSE 2000 g / 0,1 g: Oldenburg, DE
- Zentrifuge, Centrifuge 5804 R/5415 C: Eppendorf AG, Hamburg, DE

2.3 Chemikalien

- 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI); Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- *Aqua destillata* (lat., Aqua dest.): B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
- Chloroform: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
- Einbettmedium Neg-50, Thermo Fisher Scientific, Walldorf, DE
- Ethanol absoluta >99,8 %: PanReac AppliChem GmbH, Darmstadt, DE
- Flüssiger Stickstoff: Air Liquide S.A., Düsseldorf, DE
- HyClone®, Bovines Serumalbumin (BSA) Pulver: GE Healthcare, South Logan, UT, USA
- Isopropylalkohol (GMP): Aug. Heding GmbH & Co. KG, Stuttgart, DE
- Isotone Kochsalzlösung, 0,9 % NaCl: B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
- Kresylviolett Acetat: Merck AG, Darmstadt, DE
- Normal Goat Serum (NGS): Bio Rad, Hercules, CA, USA
- Paraformaldehyd (PFA): Merck AG, Darmstadt, DE
- Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), Dulbecco's: Biochrom GmbH, Berlin, DE
- RDD-Buffer: Qiagen N.V., Venlo, NL
- RLT Puffer: Qiagen N.V., Venlo, NL
- RNase-freies Wasser: Fermentas, St. Leon-Rot, DE
- Roti®-Histokitt: Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
- Xylol, PanReac AppliChem, Darmstadt, DE
- RPE Puffer: Qiagen N.V., Venlo, NL
- RWT Puffer: Qiagen N.V., Venlo, NL
- Triton X-100: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
- Chameleon® Duo Pre-stained Protein Ladder, LI-COR Biosciences Lincoln, Nebraska, USA
- PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, USA

2.4 Lösungen und Puffer

Herstellung von Paraformaldehyd 4 % (PFA):

18,8 g Paraformaldehyd werden in 235 ml *Aqua dest.* gelöst. Im Anschluss wird die Lösung für 30-40 min bei 70 Grad Celsius (°C) erhitzt und mittels Magnetrührers kontinuierlich durchrührt. Anschließend werden 470 Mikroliter (µL) einer 10 molaren (M) Natriumhydroxid-Lösung hinzugegeben und das Gemisch ebenfalls für 5-10 min gut vermengt. Abschließend wird die Lösung durch ein Filterpapier gereinigt und mit 235 ml 0,2 M Phosphatpuffer nachgespült.

Herstellung der phosphatgepufferten Salzlösung (PBS/T):

9,55 g PBS werden in 1 Liter (l) *Aqua dest.* gelöst. PBS/T kann durch weitere Zugabe von 3 ml Triton X-100 erstellt werden.

Herstellung von Kresylviolett-Lösung:

5 g Kresylviolett werden in 100 ml Ethanol (100 %) gelöst und unter ständigem Rühren für 30 min bei 50 °C erhitzt. Es werden anschließend weitere 400 ml *Aqua dest.* hinzugegeben. Mittels Papierfilter wird die entstandene Lösung abschließend gefiltert.

Herstellung der Blockierungslösung:

BSA wird auf 2 % und NGS auf 5 % verdünnt in PBST gelöst.

2.5 Arzneimittel

- Bepanthen®-Augensalbe, Dexpanthenol: Bayer-Vital GmbH, Leverkusen, DE
- Fentanyl: 50 µg/kg KG, Janssen-Cilag NV, Beerse, BE
- Heparin 5000 I.U./ml, Ratiopharm, Ulm, DE
- Tramadol: 100 mg/ml, Ratiopharm, Ulm, DE
- Forene (Isofluran): Baxter, Deenfield, USA

2.6 Kits

- Absolute Blue QPCR-Mix, SYBR-Green, low Rox: Thermo Fisher, Waltham, MA, USA
- Kapa Probe Fast qPCR: PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE
- Light Cycler® 480 Probes Master: F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, CH,
- Quantikine Mouse/Rat OPN Immunoassay, R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA
- QuantiTec® Reverse Transcription Kit: Qiagen N.V., Venlo, NL
- RNeasy R, Plus Universal, Qiagen N.V., Venlo, NL
- RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit: Qiagen N.V., Venlo, NL

2.7 Antikörper

2.7.1 Primäre Antikörper

- Anti-GFAP Rat, Monocl. Antibody Clone 2.2B10, Thermo Fisher Scientific Cat# 13-0300, Life Technologies, Verdünnung: 1:500
- Anti-Iba1 Rabbit, Wako Cat. #019-19741: Wako Chemicals GmbH, Neuss, DE, Verdünnung: 1:1000
- Rabbit anti-GFAP, M0761, Dako Omnis/ Agilent, Santa Clara, US, Verdünnung 1:1000
- Mouse anti-all spectrin/fodrin- α GA60761-2, Dako Omnis/ Agilent, Santa Clara, USA Verdünnung 1:1000
- Mouse anti-GAPDH, ACR001PT, Acris Antibodies GmbH/OriGene Rockville, USA; Verdünnung 1: 000

2.7.2 Sekundäre Antikörper

- Goat anti-Rat IgG (H+L), polyclonal, cross-adsorbed secondary antibody, Alexa Fluor 488, Cat# A-11006; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, Verdünnung: 1:500
- Goat anti-Rabbit IgG (H+L), polyclonal, Alexa Fluor 568, Cat# A-11011; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, Verdünnung: 1:500
- Goat anti-rabbit IRDye antibodies Li-Cor, Nebraska, USA, Verdünnung 1:15000
- Goat anti-mouse IRDye antibodies), Li-Cor, Nebraska, USA, Verdünnung 1:15000

2.8 Primer

Target	Basenabfolge 5' →3'
C3-F	CCAGCTCCCCATTAGCTCTG
C3-R	GCACTTGCTCTTTAGGAAGTC
MHC2-F	CCGCCTAGACAAGCTGACC
MHC2-R	ACAGGTTTGGCAGATTTTCGGA
Serpa3n-F	GCCTCGTCAGGCCAAAAG
Serpa3n-R	TGAACGTGTCAAGAGGGTCAA
SPP1-F	ATGTCATCCCTGTTGCCAG
SPP1-R	GACTGATCGGCACTCTCCTG
PPIA F	5'GCGTCTSCTTCGAGCTGTT
PPIA R	5'RAAGTCACCACCCTGGCA
TSPO-F	GCCTACTTTGTACGTGGCGAG
TSPO-R	CCTCCCAGCTCTTTCCAGAC
Mu IL 1b 610	CY5-CAG CTG GAG AGT GTG GAT CCC AAG C--PH
Mu IL 1b FL	TAA TGA AAG ACG GCA CAC CCA CCC-FL
Mu IL 1b A	CAG GAA GAC AGG CTT GTG CTC
Mu IL 1b S	GTG CTG TCG GAC CCA TAT GAG
GFAP-F	CGGAGACGCATCACCTCTG
GFAP-R	TGGAGGAGTCATTCGAGACAA
vGlut1-F	CCAACAGGGTCTTTGGCTTTG
vGlut1-R	CAGCCGACTCCGTTCTAAGG

Tabelle 1: Verwendete Primer

2.9 Software

- Faxitron x-ray, Specimen Radiography System with Image Assist™, Hologic© Wiesbaden, DE
- EndNote, X9 für Mac: Thomas Reuters Corporation, New York City, USA
- Zen 2 (blue edition): Zeiss, Jena, DE
- Odyssey SA Imaging Systems, Li-COR Biosciences GmbH, Lincoln, LE, USA
- ImageJ, Version 1.47v: National Institutes of Health (NIH), Bethesda, USA
- Prism 9 für Mac OS X Version 9.0c: GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA
- Image Studio, Version 3.1, Acquisition Software, Li-COR Biosciences GmbH, Lincoln, LE, USA
- Microsoft Word für Mac, Version 16.55, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
- Microsoft Excel für Mac: Version 16.55, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
- Light Cycler® 480 Software, Version 4.5: F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, CH
- SigmaPlot 13.0, Systat Software GmbH, Erkrath, DE
- EthoVision XT, Version 14.0, Noldus Information Technology BV, Wageningen, NL

3. Methoden

Die in dieser Arbeit durchgeführten Methoden basieren auf standardisierten und etablierten Laborprotokollen der Forschungsgruppe Neuroprotektion der Universitätsmedizin Mainz. Sie wurden bereits in verschiedenen Dissertationsschriften und Publikationen beschrieben und erläutert. Einige Verfahren wurden entsprechend der Fragestellung angepasst und verbessert (130-135).

3.1 Tierexperiment

3.1.1 Tierversuchsantrag

Die für diese Dissertation durchgeführten Tierversuche wurden allesamt vom Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz nach Paragraphen (§) 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes beantragt und durch die Ethikkommission des Landesuntersuchungsamtes Rheinland-Pfalz mit dem Aktenzeichen 23 177-07/G17-1-062 genehmigt. Die Durchführung dieser Studie fand in den Laboratorien der Klinik für Anästhesiologie in der Universitätsmedizin Mainz statt.

3.1.2 Versuchsplanung

Für diese Promotionsarbeit bildeten Versuche, Beobachtungen und Studien von anderen Forschungsgruppen, sowie der Arbeitsgruppe Neuroprotektion die Basis. Untersucht wurden die Langzeitauswirkungen einer kombinierten Verletzung. Es handelte sich dabei um eine Kombination aus Femurfraktur und SHT (*controlled cortical impact* engl., CCI-Modell). Grundlage für dieses Modell sind Hinweise auf eine histopathologisch veränderte Hirnstruktur bei gleichzeitigem Auftreten eines der beiden Ereignisse (16, 136).

Im Rahmen dieser Dissertationsschrift wird der Fokus auf den sekundären Hirnschaden gelegt. Es handelt sich bei dieser Untersuchung um eine Vergleichsstudie.

Insgesamt wurden 57 Tiere beobachtet, die wiederum in vier Gruppen eingeteilt worden sind. Zwischen jeder Gruppe gab es ein Unterscheidungsmerkmal. Die

Tiere wurden vorab in 4 Gruppen randomisiert. 15 Tiere erhielten einen kontrollierten Hirnschaden, weiteren 15 Tieren wurde eine Fraktur des Femur zugefügt. Des Weiteren erhielten 15 Tiere eine Kombination aus beiden Verletzungen. Als Kontrollgruppe bekamen 12 Tiere eine Scheinoperation (Sham).

Die Überlebenszeit betrug insgesamt 42 Tage (d). An zuvor definierten Zeitpunkten wurden verschiedene Verhaltenstests durchgeführt. Sie erfolgten mithilfe von festgelegten Kriterien und werden im Folgenden genauer erläutert. Sowohl die Untersuchungen als auch die Auswertung erfolgten verblindet.

Operation	Sham	CCI	FF	CCI+FF
Anzahl = n	12	15	15	15

Tabelle 2: Einteilung der Versuchsgruppen

Die Tabelle zeigt die Anzahl der Versuchstiere entsprechend der jeweiligen Gruppenzuordnung.

3.1.3 Tierstamm

Es wurden 57 weibliche C57/BL6-N Mäuse verwendet. Die Tiere stammten aus der Tierzucht Janvier, Saint-Berthevin Cedex in Frankreich. Bei Versuchsbeginn sind die Tiere zwischen 18 und 24 Gramm (g) schwer und 8-9 Wochen alt gewesen.

3.1.4 Haltung und Pflege

Die Haltung der Tiere erfolgt entsprechend den institutionellen Vorgaben der Johannes Gutenberg-Universität Mainz. Die Tiere wurden in Kleingruppen, bestehend aus drei Mäusen, in Filtertop Typ 2 Käfigen mit Enrichment und Nestbaumaterial eingestallt. Es wurde Einstreu aus entkeimten und entstaubten Weichholzeinstreu verwendet und eine Kunststoffröhre für Aktivitäten hinzugelegt. Als Nestbaumaterial diente Zellstoffpapier. Mindestens einmal wöchentlich wurden die Käfige gereinigt und die Bestandteile bei Bedarf ausgetauscht. Durch einen Gittereinsatz wurde Wasser *ad libitum* und pelletiertes Trockenfutter aus der Mäuseaufzucht bereitgestellt. Um die Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme nach den operativen Eingriffen zu erleichtern, wurde das Futter zuvor in Wasser eingeweicht. Die Käfige befanden

sich während des Versuchs in einem Tierhaltungsschrank mit konstanten Einstellungen. Diese orientierten sich an den optimalen Lebensbedingungen. Dies beinhaltet eine Luftfeuchtigkeit von 45 bis 60 Prozent (%) und eine Umgebungstemperatur von 20 bis 24 °C. Es herrschte außerdem ein 12 h wechselnder Tag-Nacht-Rhythmus sowie einer Luftwechselrate von 15-20 pro h. Um die Tiere während des Versuchs innerhalb eines Käfigs unterscheiden zu können, wurden diese durch eine individuelle Lochung der Ohren markiert und konnten so innerhalb ihres Käfigs einer Kennung zugeordnet werden.

Im Versuchsverlauf wurde regelmäßig das Gewicht, die Nahrungs- und die Flüssigkeitsaufnahme beobachtet. So konnte bei Bedarf frühzeitig interveniert und unnötiges Leid der Tiere vermieden werden. Alle Versuche und Beobachtungen für diese Studie fanden im Tag-Rhythmus der Tiere statt.

3.1.5 OP-Vorbereitung und Anästhesie

Präoperativ wurde jede Maus auf ihren allgemeinen Gesundheitszustand hin überprüft. Dies beinhaltet neben der äußerlichen Sichtung (z.B. Fellzustand, keine Wunden) die Gewichtskontrolle. Außerdem wurden die neurologischen Fähigkeiten der Mäuse mithilfe eines standardisierten Verfahrens beurteilt. Hierfür wurde der *Neurological Severity Score* (NSS) herangezogen. Zur Geschmacksgewöhnung und primären Schmerzbehandlung erhielten alle Tiere für 7 Tage postoperativ sowie zwei Tage vor dem Operationstag 1 Milligramm Tramadolhydrochlorid pro Milliliter (mg/ml) Trinkwasser. 15 Minuten vor Narkoseeinleitung wurde den Tieren gewichtsadaptiert 50 Mikrogramm Fentanyl pro Kilogramm ($\mu\text{g}/\text{kg}$) Körpergewicht (KG) intraperitoneal (i.p.) appliziert. Zur Narkoseeinleitung wurde das Inhalationsanästhetikum Isofluran als vierprozentige Konzentration mit Sauerstoff insuffliert. Das Gasgemisch wurde mit einem Trichter, unter dem sich die Maus befand, für die Dauer von einer Minute eingeleitet. Während der Operation lag die Maus in Bauchlage auf einer Wärmeplatte mit einer konstanten Temperatur von 37 °C. Damit Schwankungen der Körpertemperatur direkt identifiziert werden konnten, wurde eine rektale Temperatursonde verwendet. Die Narkose verlief unter Spontanatmung. Über eine Gesichtsmaske wurde Isofluran (2 %) bei einem Flow von 0,5 Liter pro Minute (L/min) Frischluft und 1,0 L/min Sauerstoff verabreicht.

Die ausreichende Narkosetiefe wurde über den ausbleibenden Zwischenzehenreflex der hinteren Gliedmaße geprüft. Durch das Auftragen einer Augensalbe wurde dem Austrocknen der Augen während der Narkose vorgebeugt. Alle Versuchstiere wurden für eine gleichbleibende Zeitdauer narkotisiert. Es waren ca. 50 Minuten dafür vorgesehen. Nach einer Aufwachphase von etwa 2 h in einem Neonatalinkubator wurden die Tiere wieder in ihren Käfig gesetzt. Hierbei wurde insbesondere darauf geachtet, dass die Tiere in ihrer Gruppe nicht mehr durch die Medikation beeinträchtigt waren.

3.1.6 *Controlled cortical impact (CCI)*

Mithilfe eines stereotaktischen Rahmens wurde der Kopf fixiert. Hierdurch konnten unkontrollierte Bewegungen vermieden und ein Verletzungsrisiko minimiert werden. Der gesamte Eingriff fand in Bauchlage statt.

Zur Induktion des Schädelhirntraumas sind weitere Präparationsmaßnahmen erforderlich. Die vordere Koronarnaht (Bregma) diene hierbei der Orientierung. Von dort ausgehend wurde eine ca. 1 Zentimeter (cm) lange Inzision Richtung hinterer Koronarnaht (Lambda) gesetzt. Dieses dient der Freilegung des Schädelknochens von der Kopfhaut. Auf der rechten Hemisphäre konnte mithilfe von einem Bohrloch die Präparation bis zur intakten Dura Mater erfolgen. Es entstand eine viereckige Fläche mit einer Seitenlänge von 5 mm auf jeder Achse. Der Knochen wurde nach medial umgelagert. Die Zielregion war für den CCI-Applikator dadurch zugänglich. Der CCI-Applikator konnte auf dem freiliegenden Gebiet sicher und zielgenau positioniert werden.

Mit dem in dieser Studie verwendeten CCI-Applikator entstand ein reproduzierbarer und somit vergleichbarer Schaden. Dieser entsprach weitestgehend der Definition eines Schädel-Hirn-Traumas (42). Der verwendete Bolzen besitzt eine elektro-magnetische Mechanik und hat einen Durchmesser von 3 Millimeter. Die Wirkung erfolgt mit der einwirkenden Kraft senkrecht auf das Hirngewebe. Da der Cortex nur noch durch die Dura Mater bedeckt ist, kann bei Auslösung des Bolzens direkt und stumpf auf das Gewebe eingewirkt werden. Die Kontaktzeit ist mit 200 Millisekunden (ms) bei einer Tiefe von 1,5 Millimeter und einer Aufprallgeschwindigkeit von 6 Metern pro Sekunde (s) fest definiert.

Nach erfolgter Induktion vom Trauma wurde der zuvor versetzte Schädelknochen repositioniert und das verletzte Areal wieder bedeckt. Für den sicheren Verschluss wurde ein Histoacryl®-Gewebekleber verwendet und die Haut durch Einzelknopfnah mit einem nicht-resorbierbaren Faden der Stärke 6-0 verschlossen. Es folgte die Befreiung vom stereotaktischen Rahmen, die Narkosegaszufuhr wurde beendet und die Temperatursonde entfernt. Nachdem sich die Maus wieder erholt hatte, wurde sie zurück in ihre Käfig-Gruppe überführt und abschließend zurück in den Tierschrank transferiert. Die CCI-Intervention wurde in dieser Studie bei 30 Tieren durchgeführt. Der operative Eingriff dauerte bei allen Tieren in etwa 20 Minuten (Polytrauma n = 15, CCI n = 15).

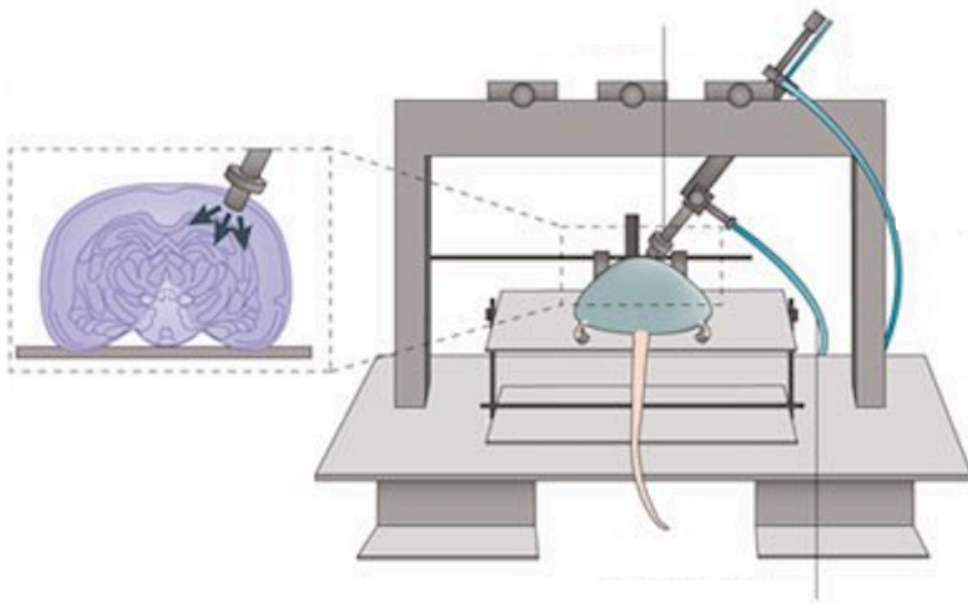


Abbildung 5: Schematischer Aufbau eines CCI-Applikators

Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung des CCI-Applikators. Zudem ist eine Maus in der endgültigen Operationsposition zu sehen. Das Tier ist im stereotaktischen Rahmen fixiert. Links wird das Mäusegehirn mit dem CCI-Bolzen gezeigt. Die Pfeile stellen die Krafteinwirkung im Gewebe dar. Die Zeichnung ist modifiziert nach (137).

3.1.7 Femurfraktur

Bei insgesamt 30 Tieren wurde eine kontrollierte Fraktur am linken Femur vorgenommen. Dies geschah bei 15 Tieren nach erfolgtem CCI und bei 15 Tieren als einzige Intervention (FF n= 15, PT n= 15). Die Narkosezeit und der anästhesiologische Ablauf waren identisch zum Vorgehen beim CCI und unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit. Nach Entfernung der Behaarung im OP-Gebiet durch Rasur und ausreichender Hautdesinfektion erfolgt der Hautschnitt. Medial erfolgte mit einem Skalpell eine 4 mm lange Hautinzision und die Patella wurde nach medial disloziert, wobei die Patellasehne intakt blieb. Mit einer sterilen 23 Gauge (G) Injektionskanüle wurde der Markraum eröffnet und der MousScrew® Nagel mit 17,2 mm Länge hineingeschoben. Dies geschah, ohne die Patella zu verletzen. Dies geschah, ohne die Patella zu verletzen. Mit einem 200 Gramm (g) schweren Gewicht wurde ein gezielter, reproduzierbarer Schaden am Femur verursacht. Dafür wurde das Gewicht von 3 cm Höhe kontrolliert an einem Führungsstab auf den Knochen fallen gelassen. Das Femur wurde so an der vorhergesehenen Stelle fakturiert. Intramedullär wurde durch den Nagel eine Rotationsstabilität mit einhergehender axialer Sicherheit erreicht (138). Die Möglichkeit zur Nachjustierung und Kontrolle des Schadens wurde ermöglicht, indem noch vor Wundverschluss jedoch während der Narkose eine röntgenologische Kontrollbildgebung stattfand. Hierbei wurde sowohl das Ausmaß der Fraktur als auch die korrekte Lage des Nagels überprüft. In unmittelbarer Nähe zum Operationstisch befand sich das mobile Röntgengerät, mit dem alle Tiere der Femurfraktur-Gruppe geröntgt wurden. Mittels Einzelknopfnahnt und des nicht-resorbierbarem Nahtmaterials der Stärke 6-0 wurde die entstandene Weichteilverletzung versorgt. Der operative Eingriff am Femur dauerte etwa 10 Minuten und wurde mit dem kommerziell erhältlichen MouseScrew® System durchgeführt.

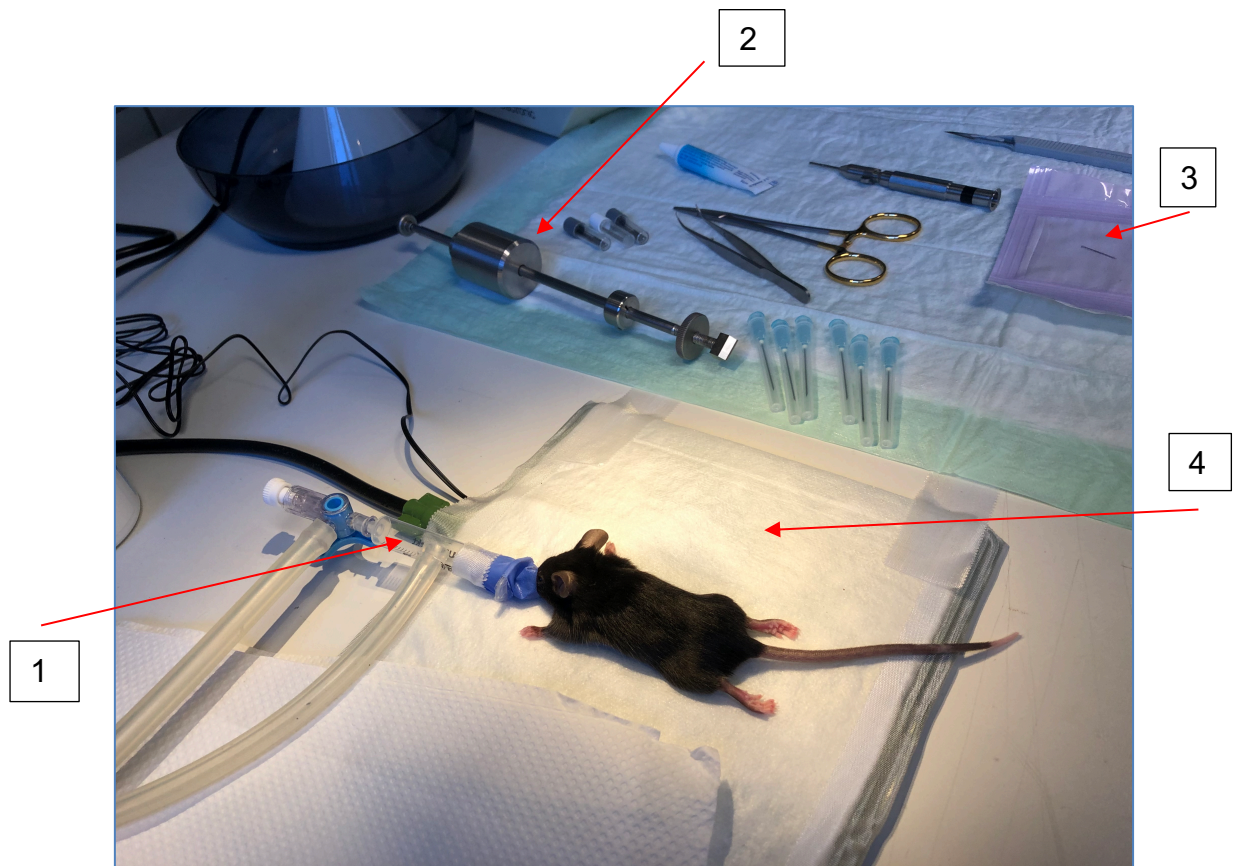


Abbildung 6: Maus in Vorbereitung zur FF-OP

Eine Maus unter Narkose. Die benötigten OP-Instrumente zur Femurfraktur liegen bereit. Auf der Abbildung markiert sind die Narkosegaszufuhr mit einem Trichtersystem [1], das verwendete Gewicht zum Verursachen der Fraktur [2], der MouseScrew®-Nagel [3] und eine Wärmeerhaltende Platte mit Versuchstier [4].

3.1.8 Scheineingriff

Ferner fand eine Scheinoperation (Sham) statt. Zum Ausschluss von Anästhesie bedingten Einflussfaktoren bei der Auswertung wurden die scheinoperierten Tiere ebenfalls narkotisiert und in den Halterungen fixiert. Außerdem wurde ein Hautschnitt mit Blick auf die Kalotte durchgeführt. Statt der Verwendung eines CCI-Applikators wurde mit einem Wattestäbchen die Schädelkalotte angeraut. Es kam hierdurch zu einer mechanischen Reizung am Periost mit anschließender Stressreaktion des Gewebes. Im Anschluss wurde der Hautschnitt entsprechend den CCI-Tieren gleichartig vernäht. Zusätzlich wurde den Tieren am linken Oberschenkel ein Hautschnitt analog zur Durchführung der Femurfraktur durchgeführt und anschließend wieder vernäht. Es kam zu keiner

Fraktur. Die Tiere verblieben gemäß Versuchsaufbau in einer fünfzigminütigen Narkose.

3.1.9 Röntgen

Damit die Lage des Nagels und eine dem Ziel dieser Studie entsprechende Fraktur gesichert werden können, wurden die Tiere, die einen Eingriff erhielten, mehreren Röntgenkontrollen unterzogen.

Dies erfolgte umgehend nach der Intervention durch radiologische Bildgebung. Das Versuchstier war während des gesamten Vorgangs weiterhin narkotisiert. Die Röntgenkontrollen wurden an den Post-OP Tagen d1, d14 und nach Euthanasie am d42 durchgeführt. Verwendet wurde das MX-20 Faxitron Röntgengerät mit einer Röntgenspannung von 35 Kilovolt (kV) und einer Strahlendauer von 5 s.

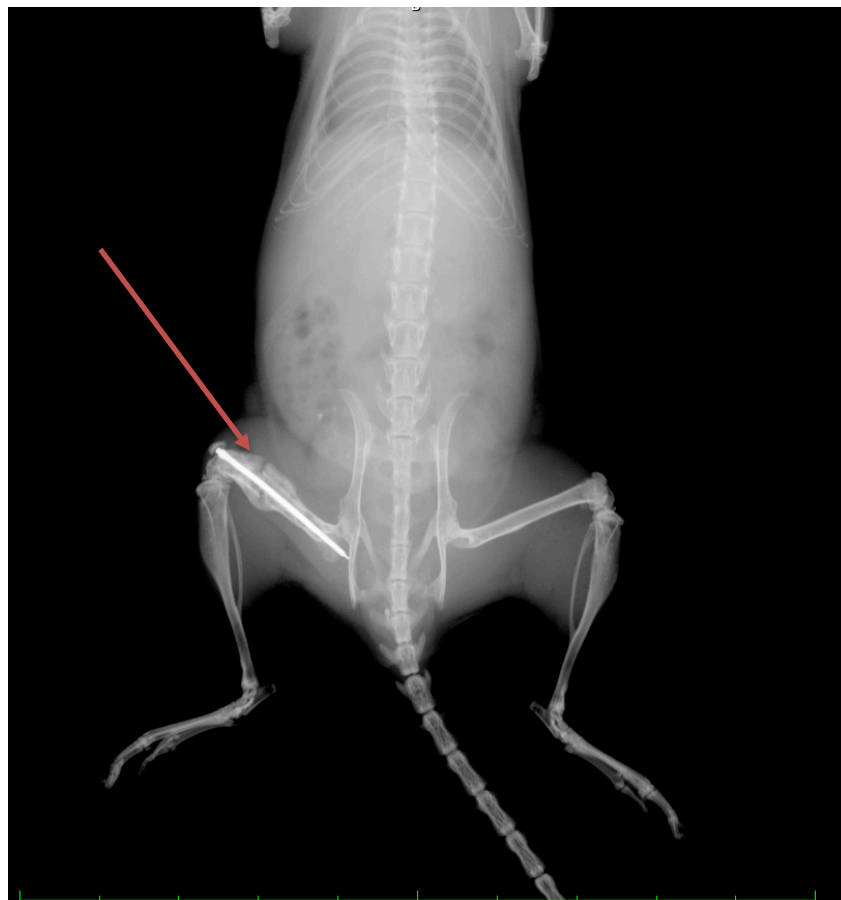


Abbildung 7: Röntgenbild einer Maus mit FF

Röntgenbild nach Femurfraktur am Tag 7 nach der OP. Es zeigt sich am osteosynthetisch versorgten rechten Femur (roter Pfeil) eine Kallusbildung. Maßbandmarkierung am Bildboden mit 1 cm Abständen.

3.1.10 Gewichtsbeurteilung

Zur Bewertung vom allgemeinen Gesundheitszustand sowie dem Trink- und Nahrungsverhalten der Tiere eignet sich neben dem neurologischen Scoring v. a. die Gewichtskontrolle. Diese erfolgte beim Erfassen des NSS auf einer digitalen Waage. Im Sinne der Analogie erfolgte dies stetig zur gleichen Tageszeit.

3.1.11 Abbruchkriterien

Während der täglichen Kontrollen und den Testungen wurde zudem insbesondere auf Verhaltensdefizite in Form von Lokomotionen, Krämpfen oder Stupor geachtet. Zusammen mit auffälligen Schmerzsymptomen, beispielsweise Zähneknirschen und einem starken Gewichtsverlust von mehr als 20 % des Ausgangsgewichts, war die Indikation für eine unmittelbare Euthanasie gestellt. Hierfür wird in tiefer Narkose durch Isofluran das Genick letal disloziert. Grundlage hierfür bildet die allgemein anerkannte „ARRIVE Guideline“ (139). Keines der Versuchstiere erfüllte die Abbruchkriterien. Die Mortalität dieser Studie lag bei 1,75 %, da eine CCI+FF-Maus im postoperativen Verlauf verstorben ist.

3.1.12 Verhaltensbiologische Untersuchungen

Es fanden sowohl Bewertungen mit dem NSS als auch ein Beinbelastungsscore (BBS) Anwendung. Alle Testungen wurden unter gleichen Bedingungen und Tageszeitpunkten gemacht. Der Untersucher war hinsichtlich der Gruppenzugehörigkeit stets verblindet.

3.1.13 Neurological Severity Score

Zur Beurteilung neurologischer und motorischer Beeinträchtigungen hat sich der *Neurological Severity Score* (NSS) etabliert. In verschiedenen Kategorien wurden den Tieren abhängig von ihrer Leistung Punkte gegeben. Die maximal erreichbare Punktzahl lag bei 13. Je höher der Punktwert, desto größer das Defizit. Es wurde zum einen das Schreckverhalten getestet. Hierfür wurde mit

der Hand außerhalb der Sichtweite kräftig geklatscht und auf eine Reaktion geachtet. Im Anschluss wurde das Such- und Gangverhalten beobachtet. Um die Koordination einzuschätzen, musste die Maus auf jeweils unterschiedlich breiten Balken in ca 15 cm Höhe eine Strecke ablaufen. Diese waren 3 cm, 2 cm und 1 cm breit sowie mit einer Länge von 30 cm konstruiert. Beim Überqueren der Balken wurden ängstliches Verhalten und der Fußtritt mitbewertet. Das Balanceverhalten wurde mit zwei unterschiedlichen Stäben getestet. Hierbei wurde bewertet, ob das Tier sich für 10 S mit allen vier Pfoten halten kann. Verwendet wurden ein runder und ein viereckiger Holzstab mit 0,5 cm Durchmesser. Jede Maus wurde einen Tag vor der Operation beurteilt. Im Verlauf wurden die Tiere nach dem Eingriff an den Tagen 1, 3, 7, 14, 21 und 42 kontrolliert.



Abbildung 8: Versuchstier bei der Erhebung vom NSS

Die Abbildung zeigt eine Maus beim Versuch, eine 3 cm breite, 30 cm lange Wegstrecke in 15 cm Höhe zu überqueren.

3.1.14 Beinbelastungstest

Um die Beinbelastung nach erfolgter Femurfraktur zu bewerten, wurden die Tiere mit Fraktur während der neurologischen Untersuchung zusätzlich einem Beinbelastungstest (BBT) unterzogen. Es konnten insgesamt 6 Punkte erreicht werden, was einem maximalen Defizit entspräche. Bei unauffälliger Belastung wurden keine Punkte vergeben. Bewertet wurden die Belastung, die Bewegung und die Beweglichkeit des frakturierten Beines. Es konnten für jede Qualität bis zu 2 Punkte verteilt werden.

3.1.15 Rota-Rod

Hierbei handelt es sich um ein etabliertes Verfahren zur Bewertung der Greifkraft, motorischen Fähigkeiten und Ausdauer der Mäuse.

Ausgangspunkt bildet eine mit Rillen versehene, rotierende Rolle, auf der die Tiere weiterlaufen müssen, um nicht hinunter zu fallen. Der 3 cm breite Zylinder ist nach rechts und links mit einer weißen Wand begrenzt und bietet keine Haltemöglichkeiten. Die Rotationsgeschwindigkeit nimmt kontinuierlich zu. Die Zeit stoppt, sobald die Maus sich nicht mehr halten kann und fällt. Ein technischer Sensor erfasst die abgelaufene Zeit. Da es sich hierbei um eine ungewohnte Herausforderung für die Tiere handelt, mussten die Tiere mit Trainingsdurchläufen geschult werden.

So wurden am Tag 20 zweimalig zwei Trainingsläufe absolviert. Am Tag 21 wurde ein Trainingslauf mit anschließend zwei bewerteten Läufen durchgeführt.

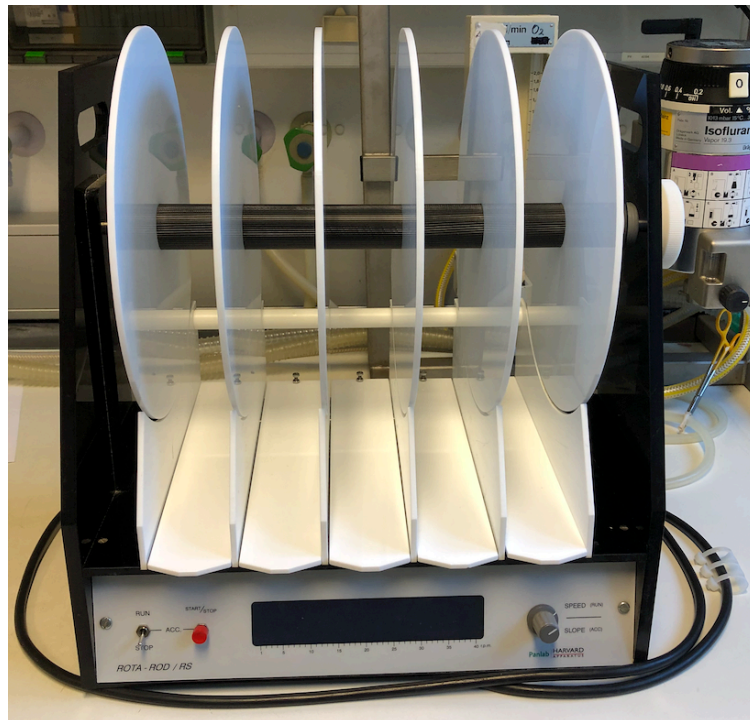


Abbildung 9: Im Versuchsaufbau verwendetes Rota-Rod

Die Abbildung zeigt das in dieser Studie verwendete Rota-Rod. Die Maus befindet sich während des Versuchs auf der rotierenden mittleren Stange.

3.1.16 Exit from the Circle

Ferner zu jedem NSS wurden die Tiere in einer seitlich durch Kunststoffwände begrenzten Arena der Größe 40 x 40 x 40 cm einem weiteren Verhaltenstest unterzogen. Die Mäuse wurden jeweils in die Mitte der sogenannten *Open Field Arena* positioniert. Mithilfe von Videotracking wurde für 3 Minuten das komplette Verhalten der Tiere dokumentiert. Die verwendete Software EthovisionXT erkennt dabei automatisiert anhand eines *Center Points* die Maus und kann darauf aufbauend diverse Parameter erheben. Zusätzlich wurden *Nose-* und *Tail-Point* erfasst, wodurch der Maus weitere Bewegungsmuster wie die Körperausrichtung zugeordnet werden konnten. Innerhalb der Arena vermerkte die Software einen virtuellen Kreis mit 10 cm Durchmesser. Eine Maus verlässt diesen Kreis durchschnittlich innert 30 s aufgrund des angeborenen Fluchtverhaltens. Benötigt das Tier mehr als 30 s, wurde 1 Punkt vergeben. Bei einer Dauer von 61 bis 120 s wurden 2 Punkte vermerkt. Zeiten, die darüber hinausragten, wurden mit der Punktzahl 3 dokumentiert. Für diese Studie wurde die benötigte Zeit einer Maus erfasst, bis sie die *Center Zone* verlassen hat.

Außerdem die Aufenthaltszeit in der *Border-Zone*, ihre durchschnittliche Laufgeschwindigkeit und die zurückgelegte Strecke innerhalb der Testung.

3.1.17 Elevated plus Maze

Mithilfe des *Elevated plus Maze* (EPM) können Rückschlüsse auf das Angstverhalten der Mäuse gefolgert werden. Es handelt sich dabei um eine kreuzförmige Arena mit einer *Center Zone* (5 x 5 cm), gebildet durch zwei offene und zwei geschlossene Arme (jeweils 5 x 30 cm) im Kreuzformat. Die geschlossenen Arme werden durch eine Kunststoffwand begrenzt (20 cm Höhe). Insgesamt befindet sich die Arena 40 cm über dem Boden. Der Beobachtungszeitraum war auf 5 Minuten begrenzt. Die Kamera befindet sich zusammen mit einer Lichtquelle zentral über der Arena, um irritierende Schattierungen zu vermeiden. Wie beim *Exit from the Circle* erfasst die Computersoftware sowohl einen *Nose-* als auch einen *Tail-Point*. Halten sich Tiere häufiger und länger in den offenen Armen auf, so ist von einem geringeren Angstverhalten auszugehen. Verbleiben sie jedoch vermehrt in der *Center Zone* oder ziehen sie sich in die geschlossenen Arme zurück, kann dies als gesteigerte Angst gedeutet werden (140-142). Ferner können Rückschlüsse auf das Angstverhalten gezogen werden, indem die Häufigkeit verfolgt wird, mit der die Maus den Kopf über den befestigten Teil der Arena hinausstreckt. Dies signalisiert ein Suchverhalten und kann bei reduzierter Frequenz auf eine gesteigerte Angst hindeuten (143, 144). Die Erhebung der Daten fand am Tag 20 statt.

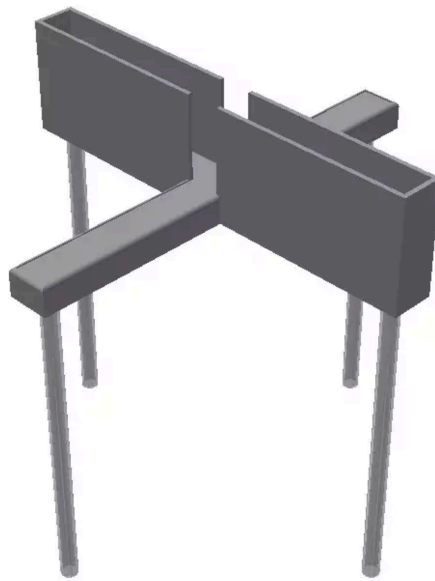


Abbildung 10: Aufbau EPM

Die Abbildung zeigt das EPM. Es lassen sich die offenen Arme erkennen, diagonal die durch Kunststoffwände geschlossenen Arme. Die Arena wird durch Stützfüße in 40 cm Höhe gehalten. Abbildung modifiziert nach (145).

3.1.18 Euthanasie und Probengewinnung

Zur Bestimmung der molekularen Parameter sowie der histologischen Aufbereitung erfolgte am Tag 42 die geplante Euthanasie. Dabei wurden sowohl das Gehirn als auch das Femur entnommen und zusätzlich Serum asserviert. Ein mit vierprozentigem Isofluran getränktes Zellulosepapier wurde in einem Kolbenglas mit Deckel präpariert, um im Anschluss eine Maus dort hinein zu transferieren. Nach ca. einer Minute wurde eine tiefe Narkose mit völliger Schmerzfreiheit erreicht. Direkt nach der Exposition mit dem Narkosegas erfolgte die Dekapitation mit einer Schere. Die Tiere der Polytrauma- und der FF-Gruppe wurden zudem ein letztes Mal geröntgt. Anschließend wurde das frakturierte Femur einer an der Studie beteiligten Arbeitsgruppe für weitere Untersuchungen überreicht. Um das Gehirn unversehrt aus dem Schädel zu entnehmen, wurde die Kopfhaut aufgeschnitten und der Knochen vom Foramen Magnum ausgehend nach rostral aufgebrochen. Das Hirn wurde anschließend vorsichtig mit einem Spatel entnommen und in pulverisiertem Trockeneis

schockgefroren. Im Anschluss wurden diese dann luftdicht und nummeriert in Kunststofftüten eingehüllt. Die Gehirne wurden dann bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung in einem Laborkühlschrank gelagert. Parallel hierzu wurde das Blut aus dem Körperstamm in einem 15 ml Falcon-Röhrchen gesammelt, mit $80\ \mu\text{l}$ Heparin (5000 Units/ml) versetzt und anschließend für 8 Minuten bei 3000 Umdrehungen pro Minute (*rounds per minute* engl., rpm) zentrifugiert. Das Serum konnte aus der entstandenen oberen Phase abpipettiert und bei -80°C sicher deponiert werden.

3.2 Histologie

3.2.1 Kryotomschnitte

Um die Gehirnschnitte für die histopathologische Analyse aufzuarbeiten, müssen diese vorab adaptiert werden. Hierfür wurden definierte Ebenen vom Gehirn bei -20°C in 12 Mikrometer (μm) dünne Schnitte auf einem Objektträger (OT) fixiert. Zuvor wurde das Gehirn mit einem Einbettungsmedium ummantelt. Anschließend wurde die Sagittallinie im 90° -Winkel zur Schneideklinge ausgerichtet. Das Verhältnis von Gewebe zur Klinge wurde so gewählt, dass das Gehirn symmetrisch mit beiden Hemisphären angeschnitten werden kann. Insgesamt wurden fünf Serien auf fünf OT in einer Ebene angefertigt. Für jede Serie wurden zwei OT benötigt. So entstand eine Reihe A (Ebene 1-10) und eine Reihe B (Ebene 11-16). Begonnen wurde bei Bregma $+3,14\text{mm}$, die letzte Ebene wurde bei Bregma $-4,36\ \text{mm}$ erreicht. Der Abstand zwischen den 16 Ebenen beträgt jeweils $500\ \mu\text{m}$. Es entstanden 80 Schnitte auf fünf Objektträgern, die in verschiedenen Färbungen verarbeitet werden können. Die OT wurden anschließend bei -20°C eingelagert, um den Gewebeerfall zu verhindern. Zur Genexpressions- und Proteinanalytik wurde zusätzlich zwischen der Ebene 6 (Bregma $+0,94\text{mm}$) und der Ebene 13 (Bregma $-2,86\ \text{mm}$) Gewebematerial gewonnen. Die Erstellung der Trimmschnitte erfolgte durch vier $60\ \mu\text{m}$ dicke Schnitte, die deckungsgleich übereinandergelegt wurden. So entstand eine Gewebeprobe mit $240\ \mu\text{m}$ dicke. Anschließend wurde das untere Drittel abgetrennt und verworfen, da zur Analyse ausschließlich das Verletzte und das periläsionale Gewebe der Hemisphären verwertet wurde. Beide Hemisphären wurden separiert und jeweils in einem Kryoröhrchen gesichert. Alle weiteren

Ebenen wurden entsprechend ihrer Hemisphäre gleichermaßen dort zugeordnet und vorerst bei -80°C deponiert.



Abbildung 11: Mäusegehirn mit SHT nach 42 Tagen Überlebenszeit

Die Abbildung zeigt ein Gehirn mit rechtshemisphärischem CCI nach 42 Tagen Überlebenszeit.

3.2.2 Färbung der Hirnschnitte nach Nissl

Die als Nissl-Färbung bekannte Kresylviolett-Färbung dient der mikroskopischen Darstellung von Neuronen. Auf Grund der basophilen Eigenschaften von DNA und Ribonukleinsäure (RNA) haftet der Farbstoff an ihren negativ geladenen Phosphaten und führt zu einer blau-violetten Färbung. Das raue endoplasmatische Retikulum (ER) enthält an der Membranoberfläche Ribosomen, die durch die ribosomale Ribonukleinsäure (rRNA) ebenfalls negativ geladen sind. Durch die Anfärbung entstehen Komplexe, die auch als Nissl-Schollen bekannt sind. Axone und Dendriten werden aufgrund ihrer Struktur kaum bis gar nicht angefärbt und werden nur schwach dargestellt.

Die Färbung ist ein etabliertes Verfahren und wurde mit einem standardisierten Laborprotokoll durchgeführt (146).

Die OT wurden zu Beginn für 1 h bei Raumtemperatur in der Umgebungsluft getrocknet. Da das Gewebe mit dem Gefrierschnittmedium ummantelt ist, wurden die OT für 2 min in 70 % Ethanol eingelegt und bereinigt. In einem weiteren Gefäß befand sich die Kresylviolett-Farbe, die OT wurden für 10 Minuten dort hineingetaucht. Nach Ablauf der Zeit wurden die OT zweimal kurz

in destilliertem Wasser eingelegt, um unnötige Farbreste zu lösen. In zwei weiteren Schritten wurden die Gewebeschnitte entwässert. Erreicht wurde dies durch kurzes zweimaliges Eintauchen in einer Ethanollösung mit aufsteigender Konzentration von 70 %, 96 % und abschließend nahezu 100 % Ethanol. Im letzten Schritt wurden die OT erst 5 und dann für 2 min in einem Behälter mit Xylol eingelegt und fixiert. Um die Gewebeschnitte vor Einflüssen aus der Umgebung zu schützen, wurde ein Deckglas über die Schnitte verklebt.

3.2.3 Volumetrie

Durch die kresylviolett gefärbten Hirnschnitte lässt sich das Gewebe farblich abgrenzen. Dies ist für die Volumenbestimmung erforderlich. Sämtliche Schnittebenen wurden mit einem Lichtmikroskop digitalisiert und mit der Software ZEN2 von Zeiss analysiert. Es wurden beide Hemisphären getrennt vermessen, sodass jeweils Werte für die ipsilaterale und die kontralaterale Schadenseite resultieren. Die Gesamtfläche einer Ebene wurde durch Addition bestimmt. Die Berechnung vom Gesamtvolumen erfolgte mit folgender Formel:

$$V = \sum A * 500 \mu\text{m}$$

V: Volumen

\sum : Summe

A: Flächeninhalte der Schnitte

3.2.4 Dickemessung der Körnerzellschicht im Gyrus dentatus

Zur Bestimmung der Veränderungen im Bereich des Hippocampus wurde die Dicke der Körnerzellschicht im suprapyramidalen Blatt des Gyrus dentatus (DG) bestimmt. Hierzu wurden zwei Schnittebenen pro Versuchstier ausgewählt. Dabei handelte es sich um Ebene 11 bis 13 (Bregma -1,2 mm bis Bregma -2,1 mm). Eine Messung der Dicke wurde innerhalb der Schnitte an 4 Stellen, sowohl ipsi- als auch contraläsional durchgeführt. Die vier Stellen sind: innen, außen mittig und die Stelle mit der am dünnsten messbaren Dicke. Die Messlinien wurden jeweils senkrecht zu der gemessenen Struktur gezogen. Als dünnste

Stelle wurde jene auserwählt, bei der ein größtmöglicher Strukturverlust angenommen werden konnte.

3.2.5 Vergleichsmessung der Länge von Femurnagel und Femur

Anhand der erstellten Röntgenaufnahmen wurde eine einheitslose Vergleichsmessung der Länge vom Femurnagel und Femur angefertigt. Aufgrund der Eindimensionalität der Bilder wurde auf eine Skalierung verzichtet. Es sollte methodisch erreicht werden, einen objektiven Parameter zu schaffen, mit dem eine Verkürzung oder Dislokation besser beurteilt werden kann. Zur Längenbestimmung des Knochens wurde die anatomische Femurachse herangezogen.

3.2.6 Immunhistochemie

Als immunhistochemische Färbung wird das Anfärben spezifischer Proteine mithilfe von einer Antigen-Ak-Bindung bezeichnet. Hierfür wurden die entsprechenden Proteine in zwei Schritten fluoreszierend markiert. Ein primärer monoklonaler Ak wurde Antigen-spezifisch ausgewählt und bindet an das Zielprotein. Im Anschluss markiert ein mit Fluoreszenz konjugierter Ak den primären Ak. Nachfolgend kann durch Anregung einer zugeordneten Wellenlänge der Protein-Ak-Komplex sichtbar gemacht werden.

3.2.7 Immunfluoreszenzfärbung

Zur Durchführung der Färbung werden zwei Tage benötigt. Zunächst wurden die Schnitte für 15 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte für 10 Minuten in Paraformaldehyd (PFA, 4 %) fixiert, um sie dann zweimal für jeweils 5 min in phosphatgepufferter Salzlösung (PBST) zu waschen. Dies geschah auf einem Schüttler. Durch das PFA kann eine reversible Vernetzung von Proteinen erreicht werden (147). Im Anschluss wurden die Schnitte auf dem OT mit einem Fettstift umrandet. Auf diese Weise werden Flüssigkeiten mithilfe der Oberflächenspannung auf den Schnitten gehalten. Die Hirnschnitte wurden für 1 h in Blockierungspuffer (s. Tab. 3.5 Puffer und Lösungen) geblockt. Die in Blockierungspuffer verdünnten primären Ak wurden

bei 4 °C über Nacht inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Schnitte in PBS dreimalig für 10 min gewaschen. Alle Waschvorgänge wurden auf dem Schüttler durchgeführt. Bei allen folgenden Schritten wurden die OT lichtundurchlässig bedeckt. Die sekundären Ak wurden in Blockierungslösung verdünnt und für 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die OT dreimalig für 10 Minuten in PBS gewaschen. Zum Anfärben der Kerne wurde 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) in PBS verdünnt und für 5 min inkubiert. DAPI interkaliert mit der Doppelstrang-DNA und färbt so die Zellkerne an (148). Ferner wurden die Hirnschnitte zweimalig für 5 min mit PBS gewaschen. Abschließend wurden die Deckgläser mithilfe von Immunomount auf die OT verklebt und bei 4 °C gelagert. Immunhistochemisch wurden die Proteine GFAP (*glial fibrillary acidic protein*, engl.) und Iba-1 (*ionized calcium binding molecule 1*, engl.) markiert, die Zellkerne wurden mittels DAPI markiert (Siehe 2.7).

3.2.8 Auswertung Immunfärbung

Die Bilder wurden mit einem Axiovert-Fluoreszenzmikroskop erstellt. Dabei wurde das ausgewählte Areal bei allen Schnitten möglichst identisch gewählt. Außerdem wurden die gleiche Vergrößerung und Belichtungszeit und die der Färbung entsprechenden Wellenlänge (488 und 568 Nanometer) verwendet. Bei der Auswertung mit der Software ImageJ wurde über die Funktion Treshold eine Kontrastierung gesetzt, bei der alle immunreaktiven Zellstrukturen als eigenständige Komplexe erkannt werden. Ferner konnte mit dem *Plug-In Partical Count* aus den entstehenden Komplexen eine Zählung erfolgen. Zur vergleichbaren Quantifizierung wird die Zellzahl pro Quadratmillimeter erfasst.

3.3 Molekularbiologische Verfahren

3.3.1 RNA Extraktion

Zur molekularbiologischen Analyse wird zunächst die RNA aus dem Hirngewebe extrahiert. Hierzu wurde das *RNeasy Plus Universal Kit* von Qiagen genutzt. Das untersuchte Gewebe stammt von der ipsiläsionalen Hemisphäre. Zunächst wurden 0,9 ml Qiazol, sowie eine Edelstahlkugel hinzugefügt. Dies diente zum einen der Gewebelyse, zum anderen der RNase-Inhibition. Zur mechanischen Zerkleinerung wurden die Proben für 2 Minuten im Mastermill bei 20 Hertz (Hz) bewegt. Im Anschluss wurde dem Lysat 100 µl gDNA Eliminator hinzu pipettiert und dies dann auf dem Vortexer für 15 S gemischt. Nach fünfminütiger Inkubation wurden 150 µl Chloroform einpipettiert, die Probe 15 s auf dem Vortexer vermengt und für weitere 2 Minuten inkubiert. Für die Auftrennung in drei Phasen wurde das Gemisch bei 4 °C und 12000 x g für 15 Minuten zentrifugiert. Die unteren Phasen bestehen aus einer weißen mittleren und einer rötlichen darunterliegenden Schicht. Die in dieser Schicht befindlichen lysierten Proteine wurden verworfen. In der oberen Phase befindet sich in ca. 600 µl die gelöste RNA. Diese wurde abpipettiert und mit weiteren 600 µl 70 % Ethanol vermengt. Im nächsten Schritt wurde die entstandene Lösung in einer Mini-Spin-Säule pipettiert. In der Mini-Spin-Säule befindet sich eine RNA-selektive Silikatmembran. Die RNA haftet beim Durchlaufen der Membran dort. Hierfür wurde die Mischung bei 800 x g für 15 s zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Anschließend werden 700 µl RWT Puffer hinzugefügt und ebenfalls für 15 sek bei 8000 x g zentrifugiert. Bei zwei folgenden Waschschrritten wurde die RNA mit je 500 µl RPE-Puffer für 2 Minuten bei 8000 x g weiter aufgereinigt. Abschließend wurde die RNA mit 40 µl RNase freiem Wasser von der Membran in der Zentrifuge gelöst. Das dabei entstehende Eluat entspricht der isolierten RNA. Nach der photometrischen Konzentrationsbestimmung wird die RNA bei -80 °C eingelagert.

3.3.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Durch eine photometrische Messung wird in 2 µl aus dem zuvor gewonnenem Eluat die RNA-Konzentration (C_{RNA}) und deren Reinheitsgehalt ermittelt.

Bei einer Wellenlänge von 260 nm wird die optische Dichte (OD) mithilfe von Extinktion bestimmt, diese entspricht dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren. Bei einer OD_{260} mit 1,0 ergibt sich eine Konzentration aus 40 µg pro ml. Zur Berechnung von C_{RNA} wurde entsprechend folgende Formel verwendet:

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

Das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt bei einer optischen Dichte von 280 nm. Wird die OD der RNA durch die OD der Proteine dividiert, lässt sich ein Quotient errechnen, der dem Reinheitsgrad entspricht. Dieser sollte zwischen 1,8 und 2,1 liegen, damit die RNA für die Synthese der dazu komplementären DNA (cDNA) qualifiziert ist.

3.3.3 Reverse Transkriptase

Im Rahmen einer quantitativen Real-Time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) muss zuvor eine komplementäre DNA synthetisiert werden. Als Matrize für das Umschreiben in cDNA dient die aus dem Hirngewebe gewonnene mRNA. Für die Synthese wurde das *QuantiTect Reverse Transcription Kit* von Qiagen verwendet und die Anweisungen des Herstellers strikt umgesetzt. Eine stetige Kühlung auf Eis verhindert bei den einzelnen Arbeitsschritten den RNA-Abbau. Vorab muss jede genomische DNA von der vorhandenen RNA-Probe entfernt werden. Es wurden 2 µl *gDNA Wipeout Puffer* zu 0,5 µg RNA pipettiert und entstandene Reaktionsansatz mit RNase freiem Wasser zu einem Volumen von 14 µl vervollständigt. Die Probe wurde anschließend für 8 min auf 42 °C erwärmt. Im darauffolgenden Schritt fand die reverse Transkription statt, hierbei wurde jeder Probe ein Mastermix hinzugefügt. Dieser bestand aus 1 µl *Quantiscript Reverse Transkriptase*, 1 µl *RT Primer Mix* und 4 µl *Quantiscript RT Puffer*. Die entstandene Mischung wurde für 30 Minuten bei 42 °C inkubiert. Gestoppt wurde die cDNA Synthese durch eine Inaktivierung mittels einer 3 min Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 95 °C. Nach Zugabe von RNase freiem Wasser im

Verhältnis 1:1 kann die gewonnene cDNA bei -80 °C vorübergehend konserviert werden.

3.3.4 Polymerasekettenreaktion

Bei der qRT-PCR wird die Anzahl der Kopien der cDNA quantifiziert. Dies ermöglicht mittels ausgewählter Primer Analysen der Genexpression von Proteinen zum Zeitpunkt der Euthanasie. Grundlage für die qRT-PCR bildet die Polymerasekettenreaktion (PCR). Während der Amplifikation wurde die DNA in 20 – 40 Zyklen exponentiell vermehrt (149). Im Rahmen eines festen Ablaufs wird jeder Zyklus automatisiert umgesetzt. Dabei werden drei Phasen, unterstützt durch *Thermocycler*, durchlaufen. Begonnen wurde mit der Denaturierung (Denaturierungsphase) der DNA-Stränge. Bei 95 °C entstehen durch Lösen von Wasserstoffbrückenbindungen aus einem DNA-Doppelstrang zwei Einzelstränge. Damit diese getrennt bleiben, wurde rasch auf 65 °C hinunter gekühlt. Es schließt sie eine *Annealingphase* an. Hierbei bindet der Primer an *Targets*. Dabei handelt es sich um charakteristische Bindungsstellen, mit denen ein zu amplifizierender DNA-Bereich ermittelt werden kann. Dies geschieht in einem von dem Primer bevorzugten Temperaturbereich zwischen 55 °C und 65 °C. In der letzten Phase, als *Elongationsphase* bezeichnet, binden die zum Einzelstrang komplementären desoxygenierten Nukleotide dATP, dCTO, gGTP und gTTP an den Primer. Damit das korrespondierende Basenpaar optimale Bindungsbedingungen hat, findet dieser Prozess bei 68 bis 72 °C statt. Im Anschluss kommt es abermals zu einer Denaturierungsphase mit anschließendem Zyklus. Parallel wurde im Rahmen der qRT-PCR die Menge der DNA-Replikate detektiert. Dies geschah in Echtzeit und beruht auf der Fluoreszenzemission. Dabei bindet an den DNA-Doppelstrang ein globaler Fluoreszenzfarbstoff. Abhängig von einem Target kann auch eine spezifische, mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte Hybridisierungssonde hinzugefügt werden. Die Signalintensität wird nach Anregung mittels einer Lichtquelle über die Signalemission festgestellt. Mit den hierbei erhobenen Werten können Rückschlüsse auf die Anzahl der Replikationen gemacht werden. Es werden die Signalemission gegen die Anzahl der Zyklen graphisch aufgetragen. Es können drei heterogene Anteile erfasst werden.

Während die Replikationskurve in der Anfangsphase noch flach verläuft, steigt sie mit zunehmender Amplifikation exponentiell, um am Ende in eine Plateau-Phase überzugehen. Die Zykluszahl, bei der das Signal über ein zuvor festgelegtes Hintergrundrauschen hinausgeht, kann mit einem *LightCycler* erfasst werden. Dies findet in der Phase mit exponentieller Steigung statt und wird als *Crossing Point* (CP) bezeichnet. Parallel wurde eine Standardkurve ermittelt. Dafür werden bekannte DNA-Konzentration und eine Standardlösung verwendet. Mithilfe einer Software kann aus der Standardkurve und dem CP die DNA-Menge der Probe berechnet werden. Hierdurch lassen sich Rückschlüsse auf die cDNA-Konzentration schließen. Mit dem doppelten Ansatz der Probe kann ein Mittelwert (MW) der jeweiligen Analyse gebildet werden. Das Vorhandensein der *Housekeeping*-Gene wird sich hier zunutze gemacht. Da *Housekeeping*-Gene konstant im Gewebe unabhängig einer Intervention exprimiert werden, wird der gewonnene MW an ihnen normalisiert. Im Rahmen dieses Versuchs wurde Peptidylprolyl Isomerase A (PPIA) als *Housekeeping*-Gen verwendet. Auf einer Well-Platte wurden die Proben pipettiert und detektiert. Zudem wurden jeweils vier Negativkontrollen mit Wasser durchgeführt.

3.3.5 Proteinextraktion

Die im Kryostat gewonnenen Trimmschnitte wurden zur Proteinbestimmung weiterverarbeitet. Die Trimmschnitte wurden gewogen und ihrem Gewicht entsprechend mit *radioimmunoprecipitation assay buffer* (RIPA) versetzt. RIPA dient der Lyse von Zellbestandteilen und der damit verbundenen Extraktion von Proteinen. Zu 0,01 g der Gewebeprobe wurden 10 Mikroliter RIPA gegeben. Im Anschluss wurden die Proben 30 Minuten auf Eis inkubiert und im Abstand von 10 Minuten mechanisch durchmischt. Die Durchmischung unterstützt die Lyse. Für die weitere Trennung der Bestandteile wurde die Probe 20 min bei 12000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der hierbei gewonnene Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und im Verhältnis 1:10 mit RIPA Buffer verdünnt.

3.3.6 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach Lowry und wird mit einer 96-Wellplatte durchgeführt (150). Nach erfolgter Reaktion entsteht eine Färbung und wird anschließend photometrisch gemessen. Es wird entsprechend eine quantitative Bestimmung des Proteingehalts abgeleitet. Die Proben wurden als Duplikate aufgetragen. Verglichen wurden zwei Standardreihen auf der Wellplatte.

Es wurden 5 Mikroliter der Probe und 5 Mikroliter der Standardlösung in jeweils ein Well pipettiert. Zur Sicherung einer gleichbleibenden Konzentration wurden die zu pipettierenden Lösungen vor jeder Entnahme auf dem Vortexer durchmischt. In jedes Well wurden 25 Mikroliter, bestehend aus Reagent S und Reagent A im Verhältnis 1:50 vermischt. Anschließend wurden zügig 200 Mikroliter von Reagent B in jedes Well hinzugefügt. Während einer 12-minütigen abgedunkelten Inkubation bei Raumtemperatur kommt es zu einer Farbreaktion. Diese wird im Glomax Multidetector System bei 750 Nanometer (nm) analysiert. Die Extinktion gibt Aufschluss über den quantitativen Proteingehalt. Aus der entstandenen Standardreihe wird ein Graph erstellt. Dieser bildet eine Standardkurve ab, auf der die Extinktionswerte die Konzentration in den Proben ergeben.

3.3.7 Gelelektrophorese

Grundlage für die Gelelektrophorese bilden Acrylamidgele in verschiedener Konzentration innerhalb der Elektrophoresekammern. Die Konzentration wird entsprechend der Proteingröße ausgewählt, die untersucht werden soll. Eine starke Quervernetzung des Acrylamid innerhalb des Gels sorgt für eine bessere Auftrennung kleinerer Proteine (151).

Der Aufbau dieser Elektrophoresekammern wurde mit zwei Glasscheiben und Kunststoffplatten begrenzt. Es entsteht nach oben eine geöffnete Kammer. Die Trenngelmischung wurde unter Aussparung von zwei cm in die Kammern gefüllt. Eine gegossene Schicht aus Isopropanol sorgt für eine waagerechte Grenzfläche. Nach einer Aushärtungsphase von etwa 30 Minuten wurde das Isopropanol abgegossen und die Sammel-Gelmischung hinzugefügt. Um Platz für die Proteinproben zu schaffen, wurde mithilfe eines eingelegten Kamms kleine Taschen in das Gel eingefügt. Nach einer weiteren Aushärtungsphase von

30 Minuten konnten die Elektrophoresegele kurzzeitig bei 4 °C eingelagert werden, um sie bis zur Verwendung zu konservieren. Die aus dem Lowry Protein Essay gewonnenen Werte dienen als Maß für das angestrebte Volumen der Probe. Mit phosphatgepufferter Salzlösung wurde die Probe bis zur entsprechenden Gesamtmenge von 60 Mikroliter aufgefüllt. Die Proteine wurden im nächsten Schritt denaturiert. Hierfür wurde Ladungspuffer hinzugefügt und die Probe bei 95 °C 5 min inkubiert. In diesem Schritt kommt es durch das enthaltene SDS und der Temperatur zu einer Denaturierung von Proteinen. Um die Proteine bis zur Primärstruktur aufzubrechen, werden mittels des beigetzten beta-Mercaptoethanol die Disulfidbrücken gespalten. In diesem Zustand lagert sich das SDS entsprechend der Größe an die Primärstruktur an, sodass die polyanionischen Proteine in der Elektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Nachdem die Gele in die Elektrophoresekammer eingesetzt wurden, wurde diese komplett mit Laufpuffer befüllt. Die zuvor eingesetzten Kunststoffkämme wurden entfernt und in die entstandenen Taschen die Probe pipettiert. Mittels eines *Prestrained*-Markers und Chamäleon-Gels können die einzelnen Gele unterschieden werden. Bei der stattfindenden Elektrophorese wandern die Proteine entsprechend ihrer Ladung Richtung Anode. Wenn der *Prestrained*-Marker bei 0,02 Ampere pro Gel komplett aufgetrennt ist, gilt die Phorese als abgeschlossen.

3.3.8 Western Blot

Die Acrylamidgele wurden aus den Halterungen und Glasplatten herausgenommen. Darauffolgend wurden die Gele für wenige Minuten in *blotting-buffer* äquilibriert. Im Anschluss wurden die Acrylamidgele, auf denen sich die Proteine in aufgetrennter Reihe befinden, auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dies gelingt mittels einer Schichtung in folgender Reihenfolge: 1 Schwämmchen, 2 Filterpapiere, Acrylamidgel, 1 Nitrozellulosemembran, 2 Filterpapiere, 1 Schwämmchen. Die dadurch entstandenen Rahmen wurden in die Blotkammer überführt und mit *Blotting-buffer* bedeckt. Mit einer konstanten Stromstärke von 380 mA wurde ein elektrisches Feld erzeugt, auf dessen Wirkung sich die Proteine auf die Nitrozellulosemembran überführen ließen. Die unterschiedliche Bandengröße ist

maßgebend für die Zeit. Für Spektrin mit einem Molekulargewicht von maximal 230 kilodalton (kDa), sind es 2 h. In der Blotkammer befindet sich unterdessen ein Magnetrührer. Die Kammern wurden kontinuierlich durch eine Eisummantelung gekühlt. Im nächsten Schritt wurde die Nitrozellulosemembran zum Schutz vor unspezifischen Proteinbindungen geblockt. Hierzu wurden die Membranen mit 2,5 % Magermilch in TBS für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgt die Inkubation mit dem primären Ak. Dieser markiert das Zielprotein. Die Membranen wurden über Nacht bei 4 °C mit dem AK inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Membranen zweimal für 5 Minuten in TBST gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde mit einer 1:15000 Verdünnung in 2,5 % Magermilch in TBST an der Membran aufgetragen und für 1 h inkubiert. Abschließend folgten 3 Waschgänge in TBST für jeweils 5 Minuten, um die Detektion vorzubereiten. Alle Waschungen wurden unter Lichtschutz auf einem Rotationsschüttler mit 60 rpm durchgeführt.

Der sekundäre Ak ist mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt. Dieser erscheint in der verwendeten Software rot bei einer Wellenlänge von 680 nm und grün bei 800 nm. Das Signal der markierten Proteine kann mit einem computergestützten Detektionsverfahren analysiert werden. Die gemessenen Fluoreszenzsignale können anhand ihrer Intensität quantitativ ausgewertet werden. Um Misch- und Pipettierfehler zu relativieren, wurde zusätzlich ein Normalisierungsprotein gemessen. In dieser Studie wurde GAPDH als Referenz verwendet, da es sich um ein ubiquitär exprimiertes Proteine handelt, das von der Intervention unbeeinflusst blieb. Zur statistischen Auswertung wurde sich dem Verhältnis zwischen Normalisierungsprotein und der in der Fragestellung behandelten Proteine bedient.

3.3.9 Enzyme-linked immunosorbant assay

Für den *Enzyme-linked immunosorbant assay* (ELISA) wird ein Antigen auf einer festen Oberfläche fixiert und mithilfe eines enzymgekoppelten Ak detektiert. Die nach der Euthanasie extrahierten Serum-Proben wurden mit einem *Immunoassay* zur Detektion von Osteopontin untersucht. Dabei wurde das *Quantikin Maus/Ratte Osteopontin Immunoassay* entsprechend der Herstellerangaben verwendet.

Dafür wurde ein Mikroplattenleser mit einer Absorption von 450 nm genutzt. Indem die Platten mit den Ak bestückt wurden, konnten die übrigen unspezifischen Antikörperbindungen blockiert werden. Es folgte ein Waschschrift mit anschließender Inkubation der Probe. Der auf der Platte angebrachte Ak bindet das Protein und die Zugabe von Detektionsantikörper schließt sich an. An dem Detektionsantikörper befindet sich ein Enzym. Nach der Zugabe eines entsprechenden Substrates entsteht eine Umsetzung von diesem durch das gekoppelte Enzym. Das dabei entstehende Signal kann mit der Software Image Studio quantifiziert werden. Die Intensität ist dabei proportional zur Proteinmenge.

3.4 Statistische Auswertung

Die in dieser Arbeit gezeigten Graphen und statistischen Auswertungen wurden mit der Software GraphPad Prism 9 erstellt. Grundlage aller Berechnungen lieferte ein Signifikanzniveau unter 5 %, entsprechend einem p-Wert kleiner als (<) 0,05. Zur Analytik der Daten wurden der Shapiro-Wilk-Normalitätstest und Quantil-Quantil-Diagramme herangezogen. Der Rout-Test kam zum Ausschluss von Ausreißern zum Einsatz. Normalverteilte Daten zweier Gruppen wurden mit dem Student's-t-Test, nicht normalverteilte Daten mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verglichen. Bei normalverteilten Daten mehrerer Gruppen und mehrere Untersuchungszeitpunkte wurde eine einfaktorielle oder eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Holm-Sidak-Test angewandt (*One-way or two-way analysis of variance* engl., ANOVA). Alle in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse werden als MW plus/minus (\pm) Standardfehler des Mittelwerts (*standard error of the mean* engl., SEM) dargelegt. Ein p-Wert bis zu 0,1 wird als statistischer Trend interpretiert und gesondert hervorgehoben. Ein im Versuchsverlauf verstorbenes Tier wurde komplett aus der Auswertung genommen.

4. Ergebnisse

Die folgenden Ergebnisse fokussieren im Sinne der Fragestellung den Vergleich der einzelnen Gruppen miteinander. Bei Blockdiagrammen werden auf der Abszisse die Gruppe und auf der Ordinate die Parameter dargestellt. Alle Darstellungen basieren auf dem MW mit zugehöriger Standardabweichung.

4.1 Verhalten und Gewicht

4.1.1 Gewicht

Als indirekter Maßstab für das Wohlergehen und die ausreichende Nahrungsaufnahme der Tiere wird das Gewicht herangezogen. Bei gesunden Mäusen bleibt das Essverhalten und damit das Gewicht altersentsprechend. Bei körperlichem Stress kommt es zu einem gestörten Essverhalten, was eine Gewichtsveränderung nach sich zieht (152, 153).

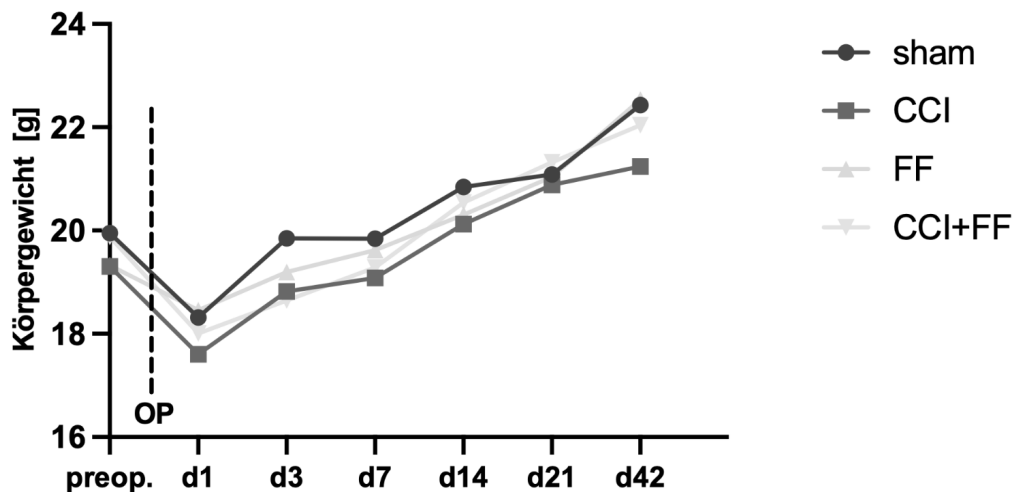


Diagramm 1: Die Entwicklung des KG im Versuchsverlauf

Das Liniendiagramm veranschaulicht die Körpergewichtsveränderung der Mäuse an sieben Zeitpunkten: preop, d1, d3, d7, d14, d21 und d42. Auf der Abszisse wird das KG in g und auf der Ordinate werden die Messtage eingetragen. Erkennbar ist ein verringertes KG am d1 im Vergleich zu preop. in allen Versuchsgruppen (Sham n=12, CCI n=15, FF n=15, CCI + FF n=14). Die Darstellung der erhobenen Werte erfolgt als MW±SEM. Two-way ANOVA und p-Wert Bestimmung mittels Holm-Šidák's multiple comparisons test.

Im Vergleich zum präoperativen Ausgangswert (preop.) ist das KG am ersten postoperativen Tag (d1) in allen Gruppen außer FF signifikant verringert (sham: $p=0,0481$, CCI: $p=0,01$, FF+CCI: $p=0,0049$). Die Tiere kompensierten den Gewichtsverlust innerhalb der ersten 7 Tage postoperativ nahezu. Eine altersentsprechende Gewichtszunahme erfolgt bei allen Tieren bis zum d42. Die Interventionen hatten langfristig keinen signifikanten Einfluss auf das KG. Die aufgeführte Tabelle gibt die relevanten $MW\pm SEM$ an.

Gruppe	Tag	MW \pm SEM
Sham	preop.	19,95 \pm 0,454
FF	preop.	19,33 \pm 0,271
CCI	preop.	19,31 \pm 0,288
FF + CCI	preop.	19,88 \pm 0,255

Gruppe	Tag	MW \pm SEM
Sham	1	18,32 \pm 0,497
FF	1	18,46 \pm 0,219
CCI	1	17,60 \pm 0,244
FF + CCI	1	18,01 \pm 0,323

Tabelle 3: MW \pm SEM vom Körpergewicht

Die in der Tabelle aufgeführten Daten beziehen sich auf das Diagramm 1.

4.1.2 Neurological Severity Score

Um eine standardisierte Bewertung der neuromotorischen Beeinträchtigung vorzunehmen, wird der NSS genutzt. Die Ergebnisse der einzelnen Befunde werden graphisch dargestellt. Je höher der Score, desto stärker die Beeinträchtigung. Es konnten insgesamt zwischen 0 und 13 Punkte in einem Test erreicht werden. Die Werte wurden präoperativ und an den postoperativen Tagen: d1, d3, d7, d14, d21 und d42 erhoben.

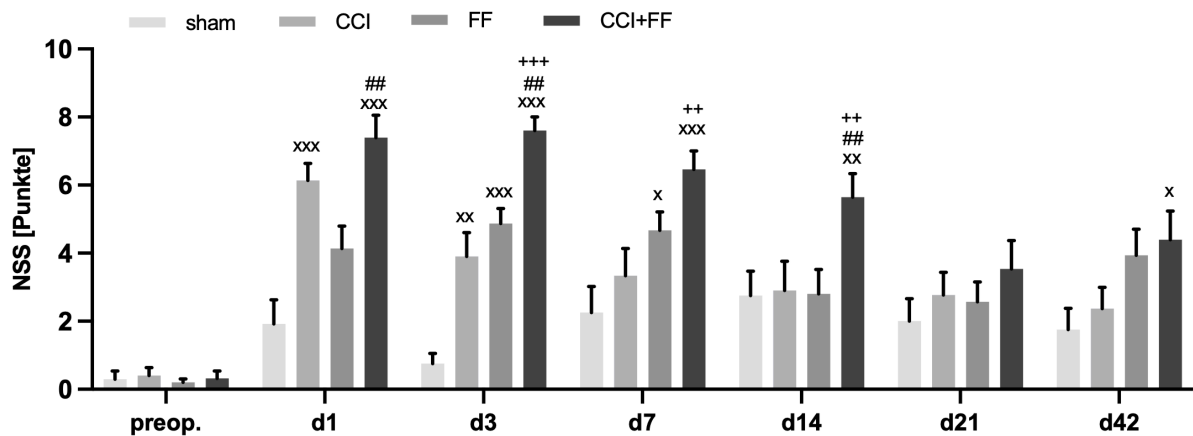


Diagramm 2: NSS der einzelnen Gruppen an den jeweiligen Kontrolltagen

Das Säulendiagramm zeigt die erreichte Punktzahl im NSS an den Zeitpunkten preop. und an den Tagen: d1, d3, d7, d14, d21 und d42 (Sham n=12, CCI n=15, FF n=15, CCI + FF n=14). Die Darstellung der erhobenen Werte erfolgt als MW±SEM. Two-way ANOVA Test und p-Wert Bestimmung mittels Holm-Šidák's multiple comparisons test (+ signifikant zu CCI (++ p<0,01, +++ p<0,0001); x signifikant zu Sham (x p<0,05; xx p<0,01, xxx p<0,0001)); # signifikant zu FF (## p<0,01)).

4.1.2.1 NSS am Tag 1

Der am Tag vor der Intervention durchgeführte NSS zeigte bei allen Versuchstieren einen Wert von unter 2 Punkten. 24 h nach dem Eingriff wurde erneut der NSS erhoben. Hier zeigten die CCI als auch die CCI+FF-Gruppen signifikante Einbußen in den koordinativ-neurologischen Fähigkeiten gegenüber den Sham-Tieren (CCI, CCI+FF: p<0,0001). Zudem zeigte die CCI+FF-Gruppe einen signifikanten Anstieg des NSS gegenüber der reinen FF-Gruppe (p=0,0012). Der NSS in der Sham-Gruppe stieg insgesamt auf einen MW von 1,92±0,71 Punkte. Die CCI-Gruppe zeigte einen MW von 6,13±0,51 Punkten. Bei den Tieren mit reinem FF wurde ein MW von 4,13±0,66 Punkten erreicht. Den stärksten Anstieg lieferte die CCI+FF-Gruppe. Hier kam es zu einem MW von 7,93±0,67 Punkten.

4.1.2.2 NSS am Tag 3

Der dritte Tag ist gekennzeichnet durch signifikante Veränderungen in allen Gruppen gegenüber den Sham-Tieren (gegenüber CCI p<0,001; CCI+FF, FF: 0,0001). Außerdem zeigte sich in der Gruppe der kombinierten Verletzung zusätzlich signifikante Veränderungen gegenüber FF und CCI sowie Sham (CCI+FF gegenüber CCI: p=0,0002; gegen FF p=0,0097; gegen sham p<0,0001).

Der NSS in der Sham-Gruppe lag bei einem MW von $0,75 \pm 0,31$ Punkte. Die CCI-Gruppe zeigte einen MW von $3,9 \pm 0,7$ Punkten. Bei den Tieren mit reinem FF wurde ein MW von $4,87 \pm 0,47$ Punkten erreicht. Die CCI+FF-Gruppe zeigte einen MW von $7,61 \pm 0,39$ Punkten.

4.1.2.3 NSS am Tag 7

Am siebten Tag zeichnet sich nun zunehmend die Schwere der kognitiv-neurologischen Einschränkungen in der CCI+FF-Gruppe gegenüber den anderen Gruppen ab. Die CCI+FF-Gruppe ist sowohl signifikant gegenüber der Sham- als auch der CCI-Gruppe eingeschränkt (CCI+FF gegen CCI: $p=0,0021$; gegen Sham $p<0,0001$). Ebenfalls erhöhte Punkte erreichten die Mäuse mit FF gegenüber den Sham-Tieren ($p=0,0405$). Insgesamt lag der NSS in der Sham-Gruppe bei einem MW von $2,25 \pm 0,77$ Punkte. Die CCI-Gruppe zeigte einen MW von $3,33 \pm 0,8$ Punkten. Bei den Tieren mit reinem FF wurde ein MW von $4,67 \pm 0,54$ Punkten erreicht. Die CCI+FF-Gruppe zeigte einen MW von $6,46 \pm 0,54$ Punkten.

4.1.2.4 NSS am Tag 14

Am Tag 14 imponiert weiterhin die CCI+FF-Gruppe mit der höchsten Punktzahl. Sie ist signifikant gegenüber allen anderen Gruppen (CCI+FF gegen CCI: $p=0,0096$ gegen FF $p=0,0066$; gegen Sham $p=0,01$). Der NSS in der Sham-Gruppe erreicht einen MW von $2,75 \pm 0,72$ Punkte. Die CCI-Gruppe liegt bei einem MW von $2,9 \pm 0,86$ Punkten. Bei den Tieren mit reinem FF sinkt der MW auf $2,8 \pm 0,72$ Punkte. Die CCI+FF-Gruppe bleiben hoch mit einem MW von $5,64 \pm 0,69$ Punkten.

4.1.2.5 NSS am Tag 21

Nach der Hälfte der Versuchszeit konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen festgestellt werden. Der NSS in der Sham-Gruppe liegt bei einem MW von $2 \pm 0,66$ Punkten. Die CCI-Gruppe bei einem MW von $2,77 \pm 0,67$. Die Tiere mit reinem FF erreichen einen MW mit $2,57 \pm 0,59$ Punkten. Die CCI+FF-Gruppe fallen auf einen MW von $3,54 \pm 0,83$ Punkten.

4.1.2.6 NSS am Tag 42

Am letzten Tag und somit unmittelbar vor der Euthanasie zeigen sich nur leichte Unterschiede. So ist die Punktzahl der CCI+FF-Mäusen leicht, aber dennoch signifikant zu den Sham-Tieren erhöht ($p=0,0228$). Abschließend zeigen sich die $MW\pm SEM$ wie folgt: Sham: $1,75\pm 0,63$; CCI: $2,37\pm 0,63$; FF $3,93\pm 0,77$; CCI+FF: $4,39\pm 0,85$.

4.1.3 Beinbelastungstest

Beim Beinbelastungstest wird beobachtet, wie die Maus das verletzte Bein belastet. Erhöhte Werte deuten auf eine geringere Belastung in Folge der Fraktur hin, niedrige Werte zeigen eine gute motorische Funktion. Der Test wurde an den Tagen d1, d3, d7, d14, d21 und d42 zusätzlich zum NSS durchgeführt.

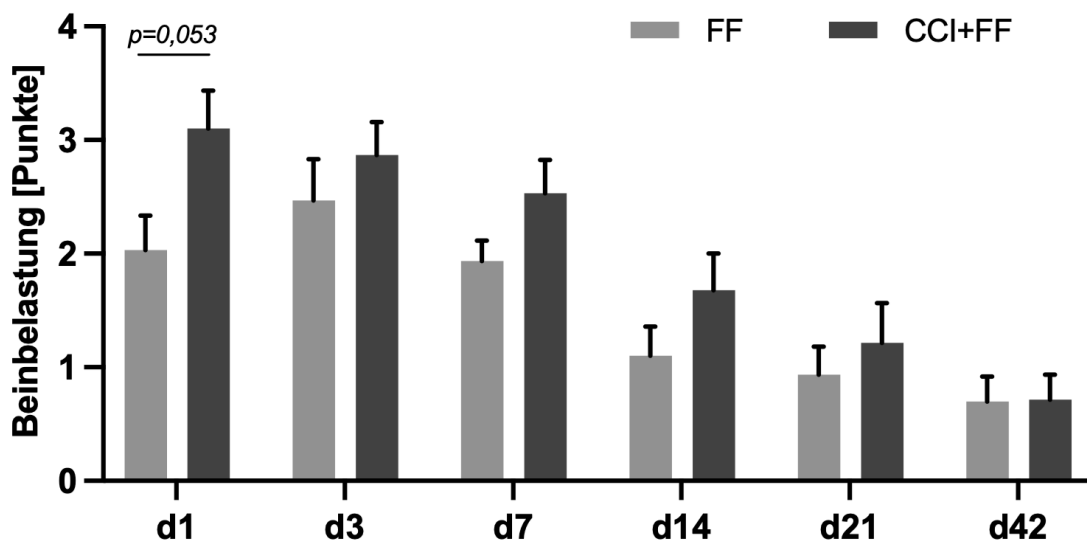


Diagramm 3: Vergleich der Gruppen zum Kontrollzeitpunkt

Das Säulendiagramm zeigt die erreichte Punktzahl im BBT an Tagen: d1, d3, d7, d14, d21 und d42 (FF $n=15$, CCI + FF $n=14$). Die Darstellung der erhobenen Werte erfolgt als $MW\pm SEM$. Two-way ANOVA Test und p-Wert Bestimmung mittels Tukey's und Holm-Sidak's multiple comparison test.

Die Tiere mit Polytrauma zeigten am Tag 1 erhöhte Beeinträchtigungen gegenüber den FF-Tieren ($p = 0,053$). Jedoch sind die Ergebnisse statistisch nicht signifikant und sollten eher als Trend gedeutet werden. Sowohl die Gruppe CCI+FF, als auch die Gruppe mit isolierter FF zeigten signifikant verbesserte

Ergebnisse im Vergleich von d1 mit d42 (d1 mit d42 bei FF: $p=0,014$; bei CCI+FF: $p<0,0001$). Die aufgeführte Tabelle gibt die $MW\pm SEM$ an.

Gruppe	Tag	MW \pm SEM	Gruppe	Tag	MW \pm SEM
FF	1	2,033 \pm 0,30	CCI + FF	1	3,1 \pm 0,34
FF	3	2,47 \pm 0,36	CCI + FF	3	2,87 \pm 0,29
FF	7	1,93 \pm 0,18	CCI + FF	7	2,53 \pm 0,29
FF	14	1,1 \pm 0,26	CCI + FF	14	1,68 \pm 0,32
FF	21	0,93 \pm 0,25	CCI + FF	21	1,21 \pm 0,35
FF	42	0,7 \pm 0,22	CCI + FF	42	0,61 \pm 0,22

Tabelle 4: MW \pm SEM Beinbelastungstest

Die in der Tabelle aufgeführten Daten beziehen sich auf Diagramm 3.

4.1.4 Rota-Rod

Der Rota-Rod Test gibt Auskunft über die Kraft, Ausdauer und Greifkraft der Maus. Außerdem gibt er Hinweise auf die Fähigkeit, die Balance zu halten, sowie die motorische Koordinationsfähigkeit der Maus (154, 155). Durchgeführt wurde der Test am Tag 21 nach der Intervention.

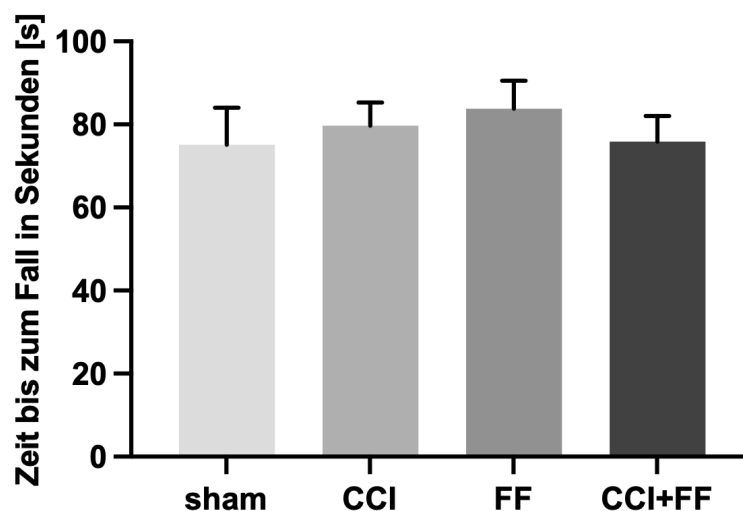


Diagramm 4: Rota-Rod Test am Tag 21. Vergleich der Zeit bis zum Fall

Das Säulendiagramm zeigt die Zeit bis zum Sturz in S auf dem Rota-Rod der einzelnen Gruppen. Getestet wurde an dem Tag 21 (Sham $n=12$, CCI $n=15$, FF $n=15$, CCI + FF $n=14$). Die Darstellung der erhobenen Werte erfolgt als $MW\pm SEM$. One-way ANOVA Test und p-Wert Bestimmung mittels Holm-Sidak's multiple comparison test.

Im Vergleich konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen festgestellt werden. Die Sham-Gruppe zeigte einen $MW \pm SEM$ von $75,08 \pm 8,96s$, die CCI-Gruppe $79,67 \pm 5,64s$, die FF-Gruppe $83,8 \pm 6,7s$ und die CCI+FF-Gruppe $75,86 \pm 6,17s$.

4.1.5 Allgemeine Bewegungsfähigkeit

Mithilfe der Software Ethovision XT 14 wird die allgemeine Bewegungsfähigkeit im *Open-Field-Test* (OFT) analysiert. Die daraus erhobenen Werte zeigen sowohl die gesamte zurückgelegte Strecke in cm als auch die mittlere Geschwindigkeit in cm/s.

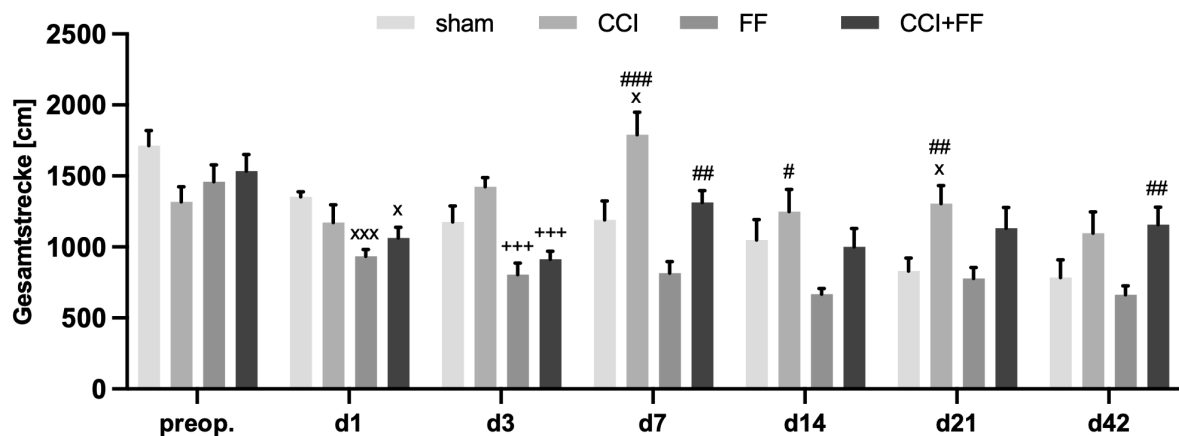


Diagramm 5: Vergleich der Gesamtstrecke in den Gruppen an den Kontrolltagen

Das Säulendiagramm zeigt die erreichte Gesamtgeschwindigkeit im Open-Field Test an den Zeitpunkten preop. und an den Tagen: d1, d3, d7, d14, d21 und d42 (Sham $n=12$, CCI $n=15$, FF $n=15$, CCI + FF $n=14$). Die Darstellung der erhobenen Werte erfolgt als $MW \pm SEM$. Two-way ANOVA Test und p-Wert Bestimmung mittels Holm-Sidak's multiple comparison test (+ signifikant zu CCI (+++ $p < 0,0001$); x signifikant zu Sham (x $p < 0,05$, xxx $p < 0,0001$); # signifikant zu FF (# $p < 0,05$; ## $p < 0,01$, ### $p < 0,0001$)).

Am Tag 1 imponiert die deutlich signifikant verringerte Strecke der FF-Tiere im Vergleich zu den Sham-Mäusen ($p=0,048$). Am Tag 3 legen die Gruppen FF und FF+CCI eine signifikant kürzere Strecke gegenüber den CCI-Mäusen zurück (FF $p=0,0002$; CCI+FF $p=0,004$). Signifikant mehr Strecke legen am siebten Tag die

CCI-Mäuse zurück. Dies jeweils gegenüber den FF-Tieren ($p < 0,0001$) und den Sham-Tieren ($p = 0,0008$). Die Tiere mit kombinierter Verletzung haben an d7 signifikant weniger cm gegenüber den FF-Mäusen an Strecke zurückgelegt ($p = 0,0051$). Am d14 haben die CCI-Mäuse gegenüber den FF-Mäusen besonders viel Gesamtstrecke erreicht ($p = 0,0006$). Ebenso am d21 sind es die CCI-Mäuse, die wieder den FF-Mäusen gegenüber signifikant mehr Strecke erreicht haben ($p = 0,0024$) und auch im Vergleich zu den Sham-Tieren mehr Wegstrecke erreicht haben ($p = 0,0137$). Am letzten Kontrolltag imponieren die FF+CCI-Tiere mit einer signifikant größeren cm Anzahl gegenüber den FF-Mäusen ($p = 0,0073$). Auch die CCI-Tiere erreichen mehr Strecke im Vergleich zu den FF-Tieren ($p = 0,0189$). Die aufgeführte Tabelle gibt die $MW \pm SEM$ an.

Gruppe	Tag	MW±SEM
FF	Preop.	1459±119,2
FF	1	934,2±47,36
FF	3	804,5±82,89
FF	7	816,7±79,96
FF	14	667,2±39,66
FF	21	778,6±77,43
FF	42	664,3±61,48
Sham	preop.	1713±106,2
Sham	1	1352±35,69
Sham	3	1177±112,5
Sham	7	1191±131,8
Sham	14	1049±143,6
Sham	21	830±92,74
Sham	42	783,7±125,2

Gruppe	Tag	MW±SEM
CCI + FF	Preop.	1535±115,9
CCI + FF	1	1063±74,71
CCI + FF	3	913±56,54
CCI + FF	7	1313±84,93
CCI + FF	14	1001±128,7
CCI + FF	21	1133±144,7
CCI + FF	42	1157±122,9
CCI	preop.	1318±106,6
CCI	1	1171±125,2
CCI	3	1424±64,95
CCI	7	1791±158,8
CCI	14	1250±155,1
CCI	21	1305±128,2
CCI	42	1097±149,5

Tabelle 5: MW±SEM Gesamtstrecke

Die in der Tabelle aufgeführten Daten beziehen sich auf das Diagramm 5.

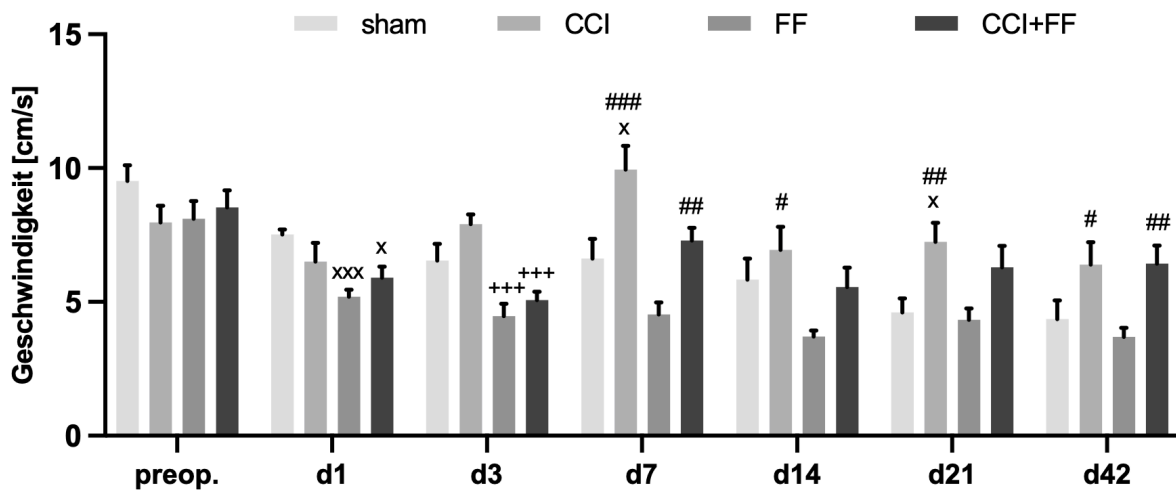


Diagramm 6: Vergleich der mittleren Geschwindigkeit der Gruppen an den Kontrolltagen

Das Säulendiagramm zeigt die erreichte Durchschnittsgeschwindigkeit in cm/s an den Zeitpunkten preop. und an den Tagen: d1, d3, d7, d14, d21 und d42 (Sham n=12, CCI n=15, FF n=15, CCI + FF n=14). Die Darstellung der erhobenen Werte erfolgt als $MW \pm SEM$. Two-way ANOVA Test und p-Wert Bestimmung mittels Holm-Sidak's multiple comparison test (+ signifikant zu CCI (+ $p < 0,05$; ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,0001$); x signifikant zu Sham (x $p < 0,05$; xx $p < 0,01$, xxx $p < 0,0001$)); # signifikant zu FF (# $p < 0,05$; ## $p < 0,01$, ### $p < 0,0001$)).

Hier imponierten am Tag 1 die signifikant verringerte mittlere Geschwindigkeit der FF-Tiere im Vergleich zu den Sham-Mäusen ($p = 0,0492$). Am Tag 3 verkürzten die Gruppen FF und FF+CCI signifikant die Geschwindigkeit gegenüber den CCI-Mäusen zurück (FF $p = 0,0002$; CCI+FF $p = 0,0041$). Signifikant schneller waren am siebten Tag die CCI-Mäuse. Dies jeweils gegenüber den FF-Tieren ($p < 0,0001$) und den Sham-Tieren ($p = 0,0009$). Die Tiere mit kombinierter Verletzung haben an d7 signifikant weniger cm/s gegenüber den FF-Mäusen an Strecke erreicht ($p = 0,0046$). Am d14 haben die CCI-Mäuse gegenüber den FF-Mäusen signifikant schneller ($p = 0,0006$). Ebenso am d21 sind es die CCI-Mäuse, die wieder den FF-Mäusen gegenüber signifikant schneller waren ($p = 0,0027$) und dies auch im Vergleich zu den Sham-Tieren ($p = 0,0139$). Am letzten Kontrolltag imponieren die FF+CCI-Tiere mit signifikant mehr cm/s gegenüber den FF-Mäusen ($p = 0,0070$). Auch die CCI-Tiere erreichen höhere Werte im Vergleich zu den FF-Tieren ($p = 0,0070$). Die aufgeführte Tabelle gibt die $MW \pm SEM$ an.

Gruppe	Tag	MW±SEM	Gruppe	Tag	MW±SEM
FF	preop.	7,971±0,6185	CCI + FF	preop.	8,529±0,6441
FF	1	6,507±0,6956	CCI + FF	1	5,905±0,4152
FF	3	7,909±0,3609	CCI + FF	3	5,072±0,3141
FF	7	9,948±0,882	CCI + FF	7	7,293±0,4718
FF	14	6,942±0,8614	CCI + FF	14	5,562±0,7148
FF	21	7,249±0,7124	CCI + FF	21	6,294±0,8041
FF	42	6,394±0,8325	CCI + FF	42	6,429±0,683
Sham	preop.	9,514±0,5901	CCI	preop.	8,107±0,6624
Sham	1	7,514±0,1983	CCI	1	5,19±0,2631
Sham	3	6,538±0,6254	CCI	3	4,47±0,4605
Sham	7	6,619±0,7322	CCI	7	4,537±0,4442
Sham	14	5,825±0,798	CCI	14	3,706±0,2203
Sham	21	4,611±0,5152	CCI	21	4,326±0,4302
Sham	42	4,356±0,696	CCI	42	3,691±0,3416

Tabelle 6: MW±SEM mittlere Geschwindigkeit

Die in der Tabelle aufgeführten Daten beziehen sich auf das Diagramm 6.

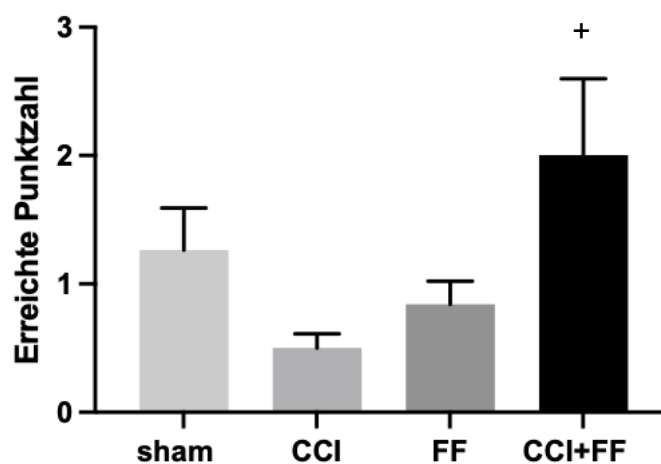


Diagramm 7: Exit from the Circle am Tag 42

Das Säulendiagramm zeigt die erreichte Punktzahl der einzelnen Gruppe. Getestet wurde an dem Tag d42 (Sham n=12, CCI n=15, FF n=15, CCI + FF n=14). Die Darstellung der erhobenen Werte erfolgt als MW±SEM. Two-way ANOVA Test und p-Wert Bestimmung mittels Holm-Sidak's multiple comparison test (+ signifikant zu CCI (+ p<0,05)).

Am Tag 42 konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen CCI+FF und der CCI-Gruppe festgestellt werden. Die Tiere mit kombinierter Verletzung hielten sich deutlich länger im Kreis auf ($p=0,0374$). Die Sham-Gruppe zeigte einen $MW \pm SEM$ in Punkten von $1,274 \pm 0,33$, die CCI-Gruppe $0,5 \pm 0,11$, die FF-Gruppe $0,84 \pm 0,18$ und die CCI+FF-Gruppe $2 \pm 0,59$.

4.1.6 Elevated Plus Maze

Im *Elevated Plus Maze* (EPM) wird sowohl das Angstverhalten als auch weitere Parameter wie die mittlere Geschwindigkeit durch die Software Ethovision XT 14 detektiert (141). Ebenso soll das Erkundungs- und Suchverhalten mittels der Häufigkeit bewertet werden, mit der die Maus den Kopf zum Erkunden hinausstreckt (141, 143).

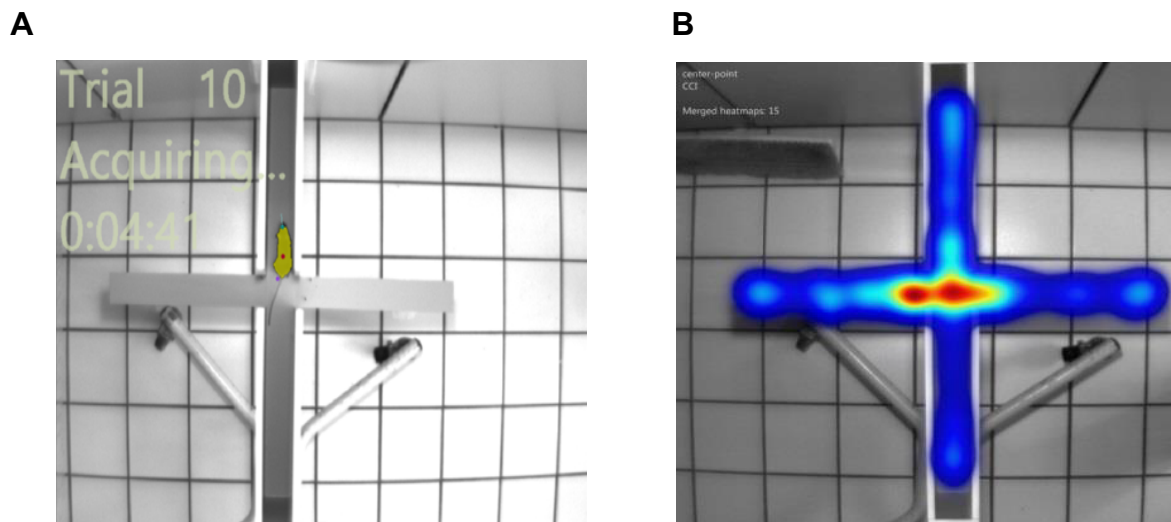


Abbildung 12: A) Darstellung einer Maus im EPM B) Beispiele einer Heatmap einer Maus im EPM
Die Abbildung A) zeigt eine Maus in der Mitte. Sie ist durch die Software gelb gefärbt, ihr Zentrum ist mit einem roten Punkt markiert. Zusätzlich hat sie einen grünen Punkt am an der Schnauzenspitze (*Nose-Point*) und eine lilafarbene Markierung an der Schwanzbasis (*Tail-Point*). Die Abbildung B) zeigt die Perspektive der eingesetzten Kamera zur Erfassung von Geschwindigkeit zurückgelegter Strecke sowie Aufenthaltsparameter der Versuchstiere. Orte mit erhöhtem Aufenthalt werden farblich abgestuft als intensives Rot, bei wenig Aufenthalt in Blau dargestellt.

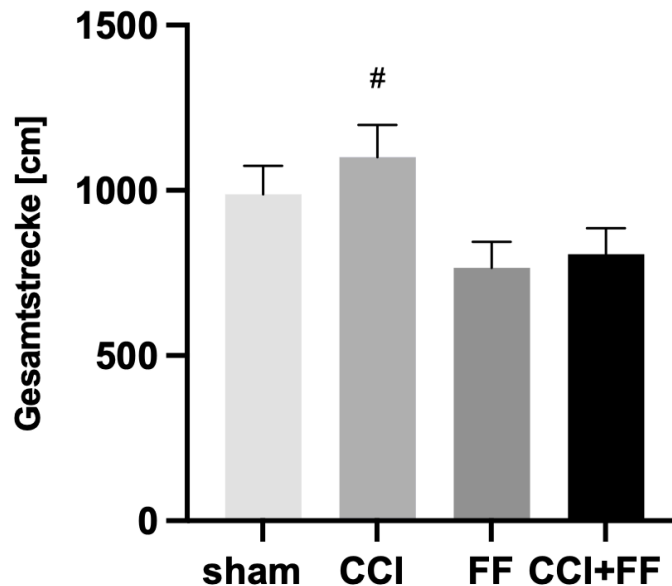


Diagramm 8: Zurückgelegte Gesamtstrecke im EPM

Das Säulendiagramm zeigt die Zeit Gesamtstrecke in cm auf dem EPM der einzelnen Gruppen. Getestet wurde an dem Tag d20 (Sham n=12, CCI n=15, FF n=15, CCI + FF n=14). Die Darstellung der erhobenen Werte erfolgt als MW±SEM. One-way ANOVA Test und p-Wert Bestimmung mittels Holm-Sidak's multiple comparison test (# signifikant zu FF (# p<0,05)).

Am Tag 20 zeigten die CCI-Mäuse eine signifikant erhöhte Gesamtstrecke gegenüber den FF-Tieren (p=0,0391). Nicht signifikant, aber als statistischer Trend kann die erhöhte Gesamtstrecke der CCI-Tiere gegenüber den CCI+FF-Mäusen gewertet werden (p=0,0874). Die Sham-Gruppe zeigte eine Gesamtstrecke MW±SEM in cm von 987,6±86,39, die CCI-Gruppe 1100±98,32, die FF-Gruppe 765,7±78,85 und die CCI+FF-Gruppe 806,6±78,76.

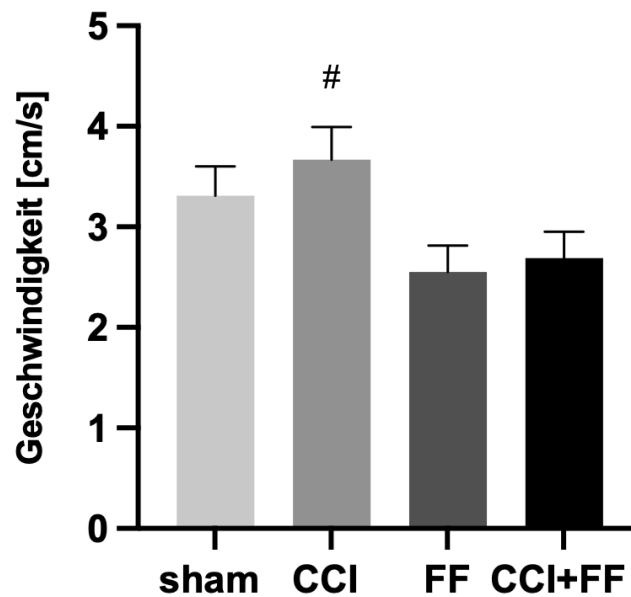


Diagramm 8: Mittelwert der zurückgelegten Geschwindigkeit im EPM

Das Säulendiagramm zeigt die Durchschnittsgeschwindigkeit in cm/s auf dem EPM der einzelnen Gruppen. Getestet wurde an dem Tag d20 (Sham n=12, CCI n=15, FF n=15, CCI + FF n=14). Die Darstellung der erhobenen Werte erfolgt als MW ± SEM. One-way ANOVA Test und p-Wert Bestimmung mittels Holm-Sidak's multiple comparison test (# signifikant zu FF (# p<0,05;)).

Am Tag 20 zeigten die CCI-Tiere eine signifikant erhöhte durchschnittliche Geschwindigkeit gegenüber den Tieren mit FF (p=0,0394). Des Weiteren zeigen die CCI-Mäuse gegenüber den CCI+FF-Tieren einen statistischen Trend in der Geschwindigkeit (p=0,0879). Die Sham-Gruppe zeigte eine durchschnittliche Geschwindigkeit MW±SEM in cm/s von 3,31±0,29, die CCI-Gruppe 3,67±0,33, die FF-Gruppe 2,55±0,26 und die CCI+FF-Gruppe 2,69±0,26.

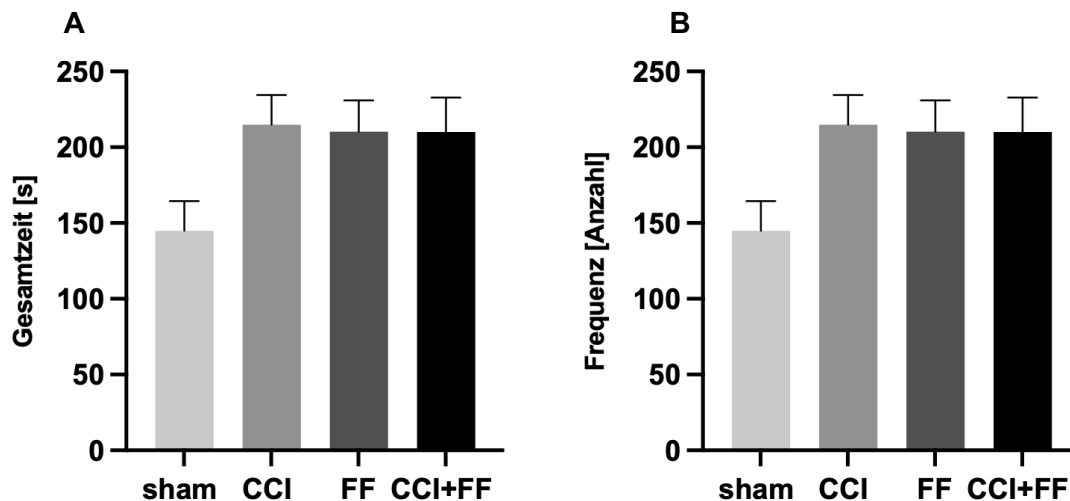


Diagramme 9: A) Gesamtzeit, B) die Frequenz der Tiere in den offenen Armen und *Center Zone* des EPM

Das Säulendiagramm zeigt oben den Aufenthalt der Tiere als Gesamtzeit in s in den offenen Armen. Das Untere zeigt die Frequenz, in der sich die Tiere in den offenen Armen inklusive *Center Zone* aufgehalten haben. Getestet wurde an dem Tag d20 (Sham n=12, CCI n=15, FF n=15, CCI + FF n=14). Die Darstellung der erhobenen Werte erfolgt als $MW \pm SEM$. One-way ANOVA Test und p-Wert Bestimmung mittels Holm-Sidak's multiple comparison test.

Am Tag 20 zeigten die Gruppen keinen signifikanten Unterschied in der Gesamtzeit untereinander. Die Sham-Gruppe zeigte eine durchschnittliche Gesamtzeit $MW \pm SEM$ in s von $144,9 \pm 19,51$, die CCI-Gruppe $214,9 \pm 19,69$, die FF-Gruppe $210,3 \pm 20,62$ und die CCI+FF-Gruppe $210,2 \pm 22,54$. Die Frequenz in den offenen Armen ergibt keine statistisch signifikanten Werte. Die Sham-Gruppe zeigte eine durchschnittliche Frequenz $MW \pm SEM$ als Anzahl von $33,92 \pm 8,22$, die CCI-Gruppe $55,27 \pm 7,12$, die FF-Gruppe $51,6 \pm 6,82$ und die CCI+FF-Gruppe $49,14 \pm 11,57$.

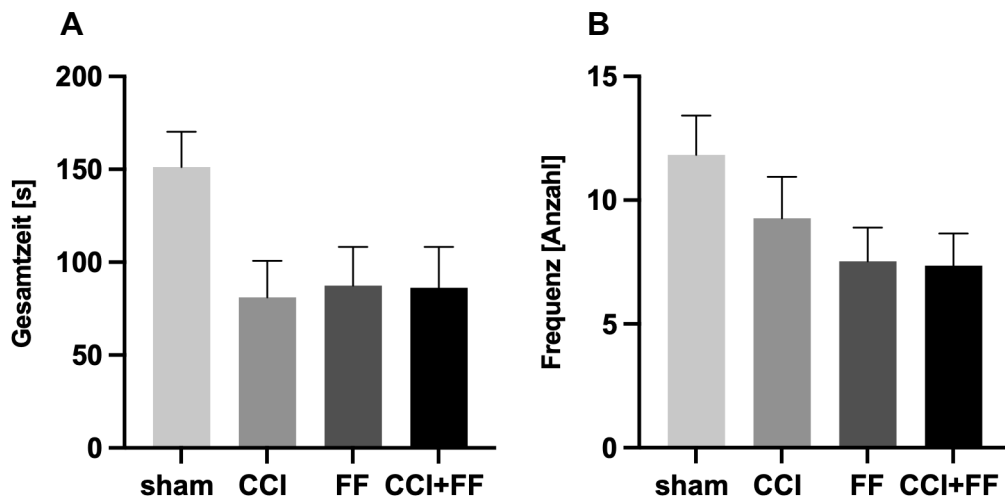


Diagramm 10: A) Gesamtzeit, B) die Frequenz der Tiere in den geschlossenen Armen des EPM

Das Säulendiagramm A zeigt den Aufenthalt der Tiere als Gesamtzeit in s in den geschlossenen Armen. Das Diagramm B zeigt die Frequenz, in der sich die Tiere in den geschlossenen Armen aufgehalten haben. Getestet wurde an dem Tag d20 (Sham n=12, CCI n=15, FF n=15, CCI + FF n=14). Die Darstellung der erhobenen Werte erfolgt als $MW \pm SEM$. One-way ANOVA Test und p-Wert Bestimmung mittels Holm-Sidak's multiple comparison test (x signifikant zu Sham (x $p < 0,05$)).

Am Tag 20 zeigten die Gruppen Sham, CCI, FF und CCI+FF-Gruppen keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Gesamtzeit in den geschlossenen Armen untereinander. Die Sham-Gruppe zeigte eine durchschnittliche Gesamtzeit $MW \pm SEM$ in s von $151,3 \pm 18,96$ die CCI-Gruppe $81,11 \pm 19,62$ die FF-Gruppe $87,43 \pm 20,81$ und die CCI+FF-Gruppe $86,32 \pm 22$. Bei der Frequenz in den geschlossenen Armen zeigte keine Gruppe signifikant statistische Unterschiede zueinander. Die Sham-Gruppe zeigte eine durchschnittliche Frequenz $MW \pm SEM$ als Anzahl von $11,83 \pm 1,58$, die CCI-Gruppe $9,27 \pm 1,68$, die FF-Gruppe $7,53 \pm 1,36$ und die CCI+FF-Gruppe $7,36 \pm 1,3$.

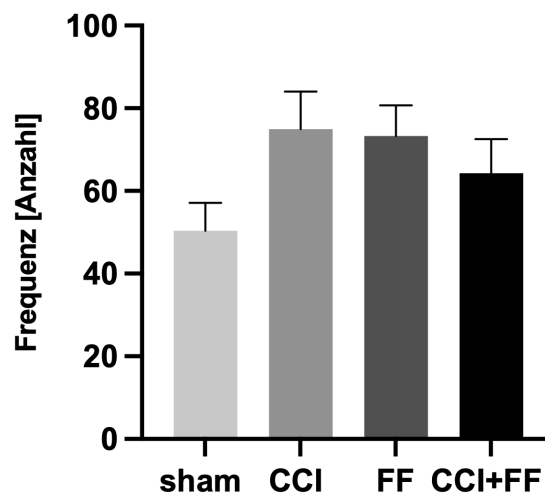


Diagramm 11: Erkundungsverhalten im EPM

Das Säulendiagramm zeigt das Erkundungsverhalten der Tiere im EPM. Hierfür wurde die Anzahl bestimmt, an denen die Maus den Kopf außerhalb der befestigten Arena gehalten hatte. Getestet wurde an dem Tag d20 (Sham n=12, CCI n=15, FF n=15, CCI + FF n=14). Die Darstellung der erhobenen Werte erfolgt als MW±SEM. One-way ANOVA Test und p-Wert Bestimmung mittels Holm-Sidak's multiple comparison test.

Das Such- und Erkundungsverhalten gemessen an dem Herausstrecken des Kopfes über den Rand der offenen Arme, zeigte bei keiner Gruppe signifikante Unterschiede zueinander. Die Gruppe mit der kombinierten Verletzung zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede. Die Sham-Gruppe zeigte eine durchschnittliche Frequenz in MW±SEM von 50,33±6,80, die CCI-Gruppe 74,93±9,12, die FF-Gruppe 73,27±7,44 und die CCI+FF-Gruppe 64,29±8,22.

4.2 Histologische Datenerhebung

4.2.1 Volumetrie

Zur Erfassung des Hirnschadens wird nach erfolgter histologischer Färbung das Hirnvolumen ausgemessen und im Seitenvergleich der Hemisphären betrachtet.

Verglichen wird das Volumen der rechten und linken Gehirnhälfte mit dem Gesamtvolumen (*total brain volume* engl., TBV). Außerdem wird das Verhältnis der rechten und linken Hemisphäre und dem TBV mit der rechten Hemisphäre zwischen den Gruppen mit einem Hirnschaden (CCI+FF, CCI) betrachtet.

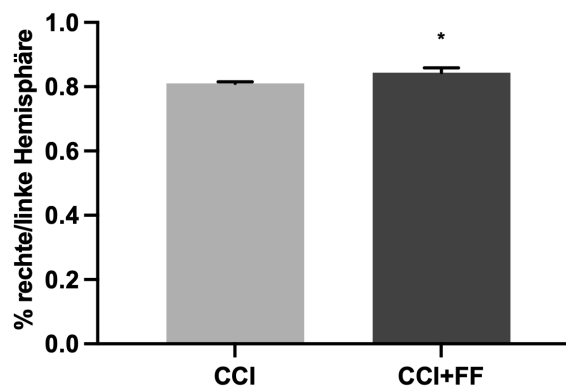


Diagramm 12: Prozentuales Verhältnis rechte und linke Hirnhälfte der Gruppen CCI und CCI+FF

Das Säulendiagramm zeigt das Volumen als prozentuales Verhältnis zwischen rechter und linker Hemisphäre der Gruppen CCI und CCI+FF (CCI n=15, CCI + FF n=14). Die Darstellung der erhobenen Werte erfolgt als $MW \pm SEM$, (* $p < 0,05$) p Wert ermittelt mit ungepaarter t-test.

Wird das Volumen der rechten und linken Hemisphäre zueinander in Relation gesetzt, zeigt sich ein Unterschied zwischen den Gruppen CCI und CCI+FF. Die CCI+FF-Gruppe erreicht gegenüber den CCI-Tieren signifikant ausgeglichene Volumenverhältnisse der Hirnhälften zueinander ($p = 0,0316$). Die CCI-Tiere erreichten einen $MW \pm SEM$ in %-Punkten von $0,81 \pm 0,005$, die CCI+FF-Gruppe $0,843 \pm 0,015$.

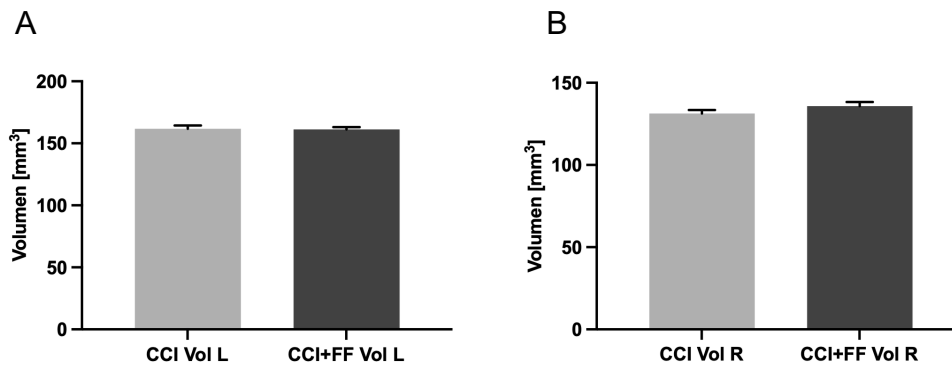


Diagramm 13: Volumen der Hirnhälften A) linke Hemisphäre B) rechte Hemisphäre

Die Säulendiagramme zeigen jeweils das Volumen der rechten und linken Hemisphäre der Gruppen CCI und CCI+FF in mm³ (CCI n=15, CCI + FF n=14). Die Darstellung der erhobenen Werte erfolgt als MW±SEM, p Wert ermittelt mit ungepaarter t-test.

Sowohl im Vergleich der rechten Hirnhälften als auch der linken Hirnhälften der Versuchsgruppen CCI und CCI+FF zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Der MW±SEM in mm³ lag in der linken Hemisphäre bei den CCI-Tieren bei 161,7±2,73, der CCI+FF-Gruppe bei 161,3 ±1,73. In der rechten Hemisphäre lag der MW±SEM in mm³ bei den CCI-Tieren bei 131,4±2,04, der CCI+FF-Gruppe bei 135,8±2,45.

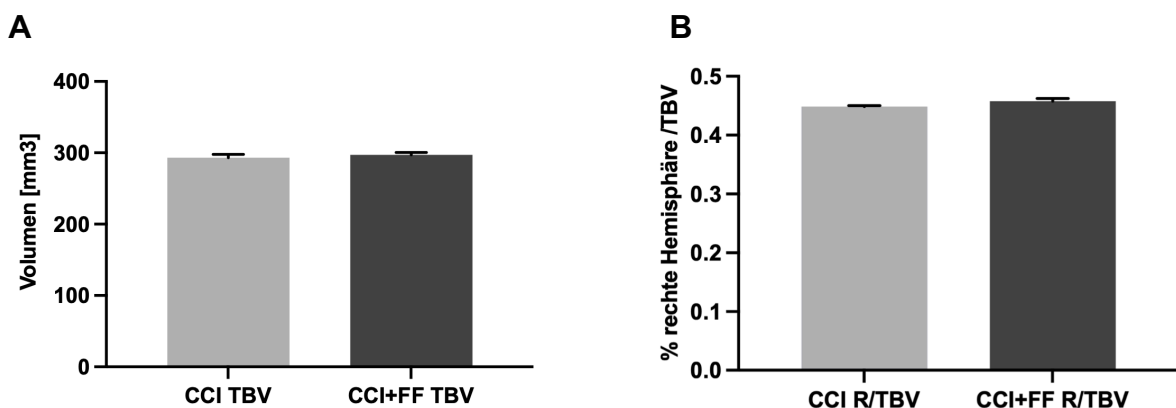


Diagramm 14: A) Gesamtvolumen der Gruppen CCI und CCI+FF. B) Verhältnis rechte Hirnhälfte zum TBV

Das Säulendiagramm A zeigt das Gesamtvolumen vom Gehirn der Gruppen CCI und CCI+FF in mm³. Das Säulendiagramm B zeigt das Verhältnis von der rechten Hemisphäre am TBV der Gruppen CCI und CCI+FF (CCI n=15, CCI + FF n=14). Die Darstellung der erhobenen Werte erfolgt als MW±SEM, p Wert ermittelt mit Mann-Whitney test.

Am Gesamthirnvolumen der Gruppen CCI und CCI+FF konnte im Vergleich untereinander kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Der $MW \pm SEM$ in mm^3 bei den CCI-Tieren lag bei $293,1 \pm 4,69$, der CCI+FF-Gruppe bei $297,1 \pm 3,48$. Der prozentuale Anteil der rechten Hemisphäre, gemessen am TBV, zeigte im Vergleich beider Gruppen keinen signifikanten Unterschied. Der $MW \pm SEM$ in Prozentpunkten bei den CCI-Tieren lag bei $0,449 \pm 0,002$ der CCI+FF-Gruppe bei $0,457 \pm 0,004$.

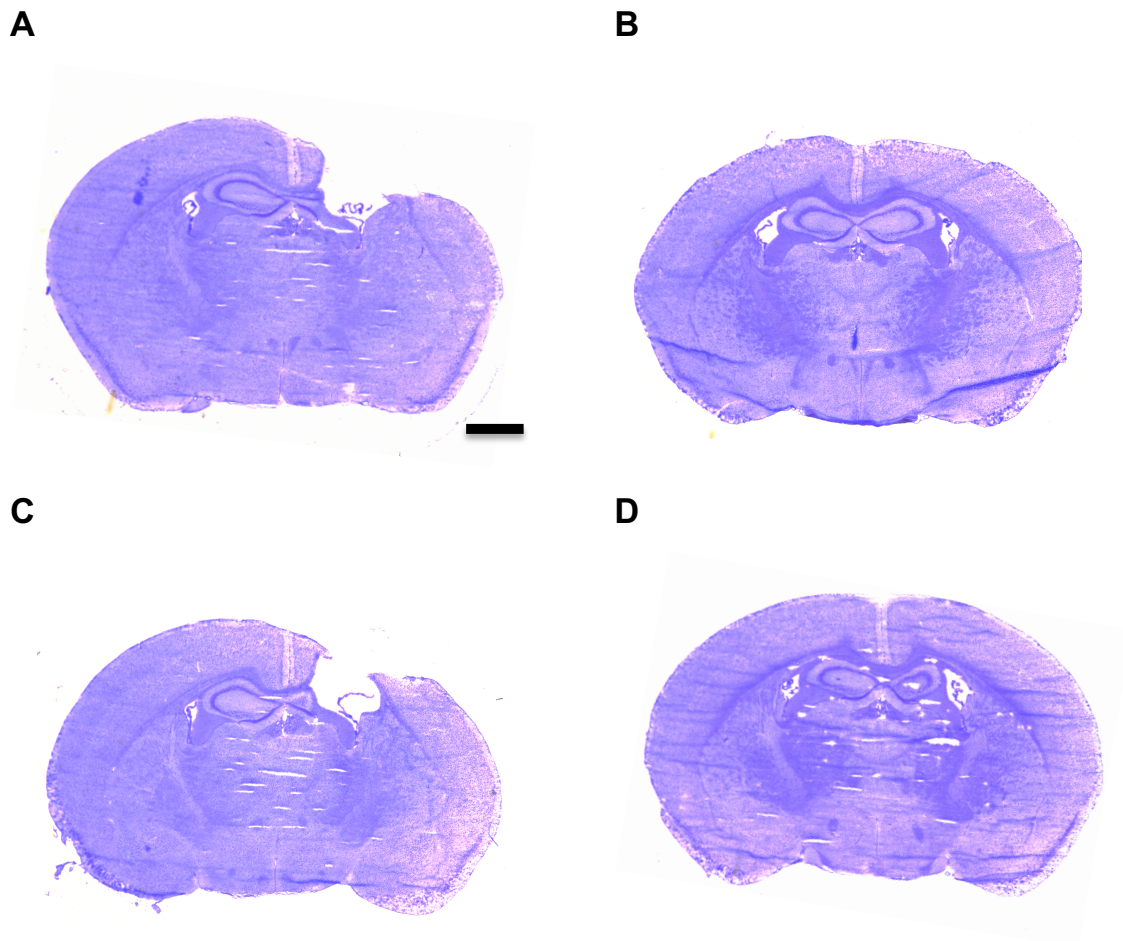


Abbildung 13: Histologischer Hirnschnitt mit Nisslfärbung

Die Abbildung zeigt exemplarisch Gehirnschnitte einer Maus nach erfolgtem CCI+FF (A), einer Sham-Maus (B), einer CCI-Maus (C) und einer Maus mit FF (D). Jeweils mit 42 Tagen Überlebenszeit. Skala: 1 mm.

4.2.2 Dickemessung der Körnerzellschicht im Gyrus Dentatus

Zur Quantifizierung von Veränderungen im Bereich des Hippocampus wurde die Dicke der Körnerzellschicht im suprapyramidalen Blatt des DG im Hippocampus (*granular cell layer* eng., GCL) bestimmt.

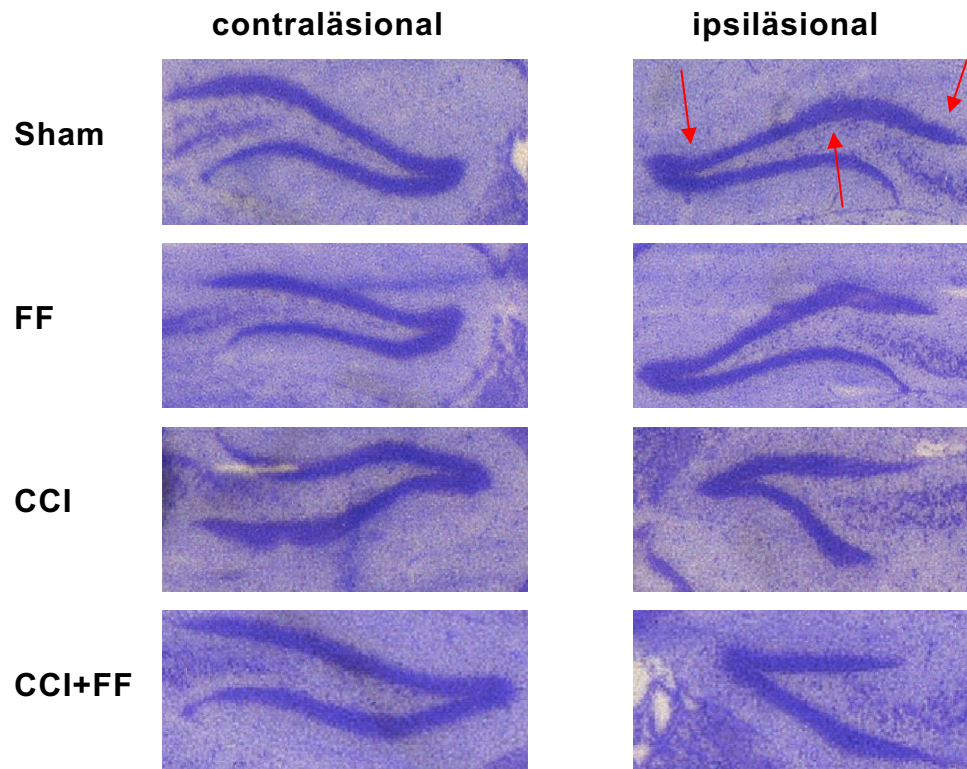


Abbildung 14: Exemplarische Darstellung der Körnerzellschicht im Gyrus Dentatus

Die Abbildung zeigt exemplarisch die jeweilige Körnerzellschicht im Gyrus Dentatus der unterschiedlichen Gruppen. Gezeigt ist sowohl die contra- als auch die ipsiläsionale Seite. Die roten Pfeile markieren die Messpunkte.

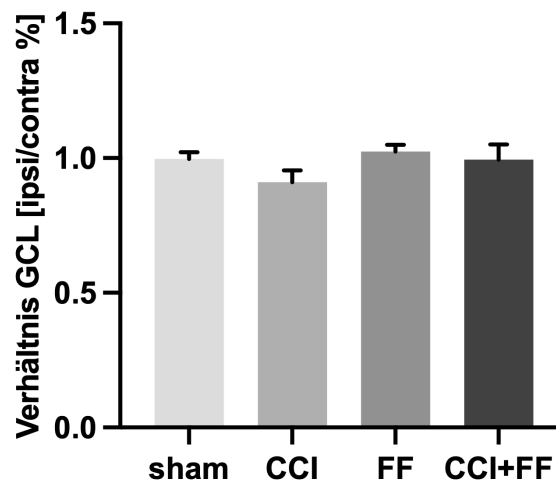


Diagramm 15: Dickemessung GCL im Verhältnis ipsi zu contraläsional

Das Säulendiagramm zeigt das Verhältnis von GCL der ipsi mit der contraläsionalen-Hemisphäre in Prozentpunkten. Gezeigt sind alle Gruppen Sham, FF, CCI und CCI+FF (Sham n=12, CCI n=15, FF n=15, CCI + FF n=14). Die Darstellung der erhobenen Werte erfolgt als $MW \pm SEM$. One-way ANOVA Test und p-Wert Bestimmung mittels Holm-Sidak's multiple comparison test.

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Gruppen untereinander. Die Sham-Gruppe zeigte einen $MW \pm SEM$ in Prozentpunkten von $1 \pm 0,026$, die CCI-Gruppe $0,91 \pm 0,045$, die FF-Gruppe $1,02 \pm 0,026$ und die CCI+FF-Gruppe $0,99 \pm 0,056$.

4.3 Immunhistochemie

Mittels immunhistochemischer Färbeverfahren können spezifische Antigene im Zielgewebe dargestellt und quantifiziert werden. In der vorliegenden Arbeit werden GFAP und Iba-1 im Hirngewebe dargestellt und semiquantitativ ausgewertet.

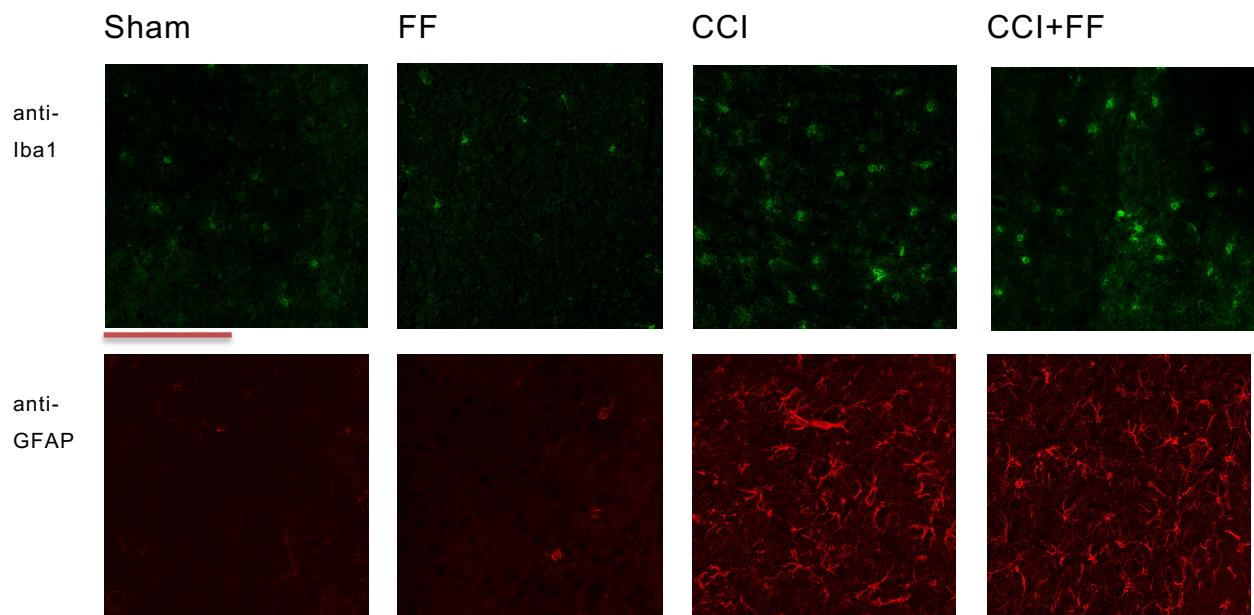


Abbildung 15: Die IHC-Färbungen Iba-1 und GFAP

Exemplarische Abbildung der vier Studiengruppen, 42 Tage nach Intervention. Sichtbar ist die perilläsionale Hochregulation von GFAP und Iba-1 in CCI und CCI+FF verglichen mit den entsprechenden Regionen in FF und Sham. 20-fache Vergrößerung, Bregma: -2.00 mm. Maßstab: 150 μ m, Referenzbalken (rot) unterhalb anti-Iba1 Sham.

4.3.1 GFAP

Astrozyten reagieren auf Veränderungen in ihrem Umfeld sensibel. Auf äußere Einwirkungen, beispielsweise Verletzungen, folgt eine reaktive Astrogliose. Die hat Veränderungen an Morphologie, Genexpression, Proliferation und Funktion zur Folge. Diese heterogene Reaktion kann sich bei der Veranschaulichung des Ausmaßes zunutze gemacht werden. Als Marker für die Größe und Anzahl der Astrozyten dient hier GFAP (86). Es wurden sowohl die perilläsionalen als auch die contraläsionalen immunopositiven Partikel anhand der fluoreszierenden Intensität detektiert und mittels standardisierte Schwellenwerte normalisiert ausgewertet.

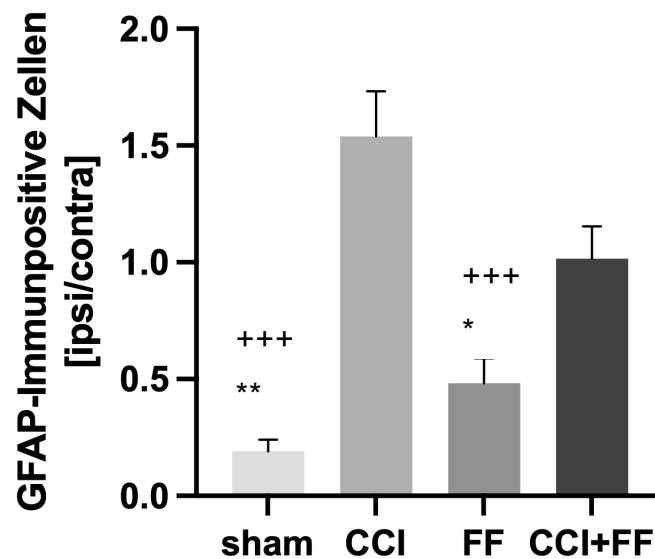


Diagramm 16: Anzahl GFAP-Immunpositive Zellen im Verhältnis ipsi/contraläsional

Das Säulendiagramm zeigt das Verhältnis von GFAP-Immunpositiven Zellen der ipsi mit der contraläsionalen-Hemisphäre in Prozentpunkten. Gezeigt sind alle Gruppen Sham, FF, CCI und CCI+FF (Sham n=12, CCI n=15, FF n=15, CCI + FF n=14). Die Darstellung der erhobenen Werte erfolgt als MW±SEM. One-way ANOVA Test und p-Wert Bestimmung mittels Holm-Sidak's multiple comparison test (+ signifikant zu CCI (+++ p<0,0001); * signifikant zu CCI+FF (* p<0,05; ** p<0,01)).

Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Sham-Tieren und den CCI und CCI+FF Tieren (CCI p<0,0001; CCI+FF p=0,0019). Außerdem zeigte sich zwischen den Gruppen mit FF und CCI und CCI+FF ebenfalls ein signifikanter Unterschied (CCI p<0,0001; CCI+FF p=0,0248). Zwischen FF und Sham wurde keine signifikante Abweichung festgestellt. Die Sham-Gruppe zeigte einen MW±SEM in Prozentpunkten von 0,2±0,17, die CCI-Gruppe 1,54±0,19, die FF-Gruppe 0,48±0,11 und die CCI+FF-Gruppe 1,02±0,137. Bei isolierter Betrachtung der contraläsionalen GFAP-Immunopositiven Zellen zeigt sich hingegen eine signifikante Erhöhung der CCI+FF-Gruppe gegenüber FF und Sham-Gruppe (FF p<0,0019; Sham p<0,0002). Der CCI-Gruppe hingegen nur den Sham-Tieren (p<0,0371). Ipsiläsional sind sowohl die CCI als auch CCI+FF-Tiere gegenüber FF und Sham signifikant erhöht (p<0,0001).

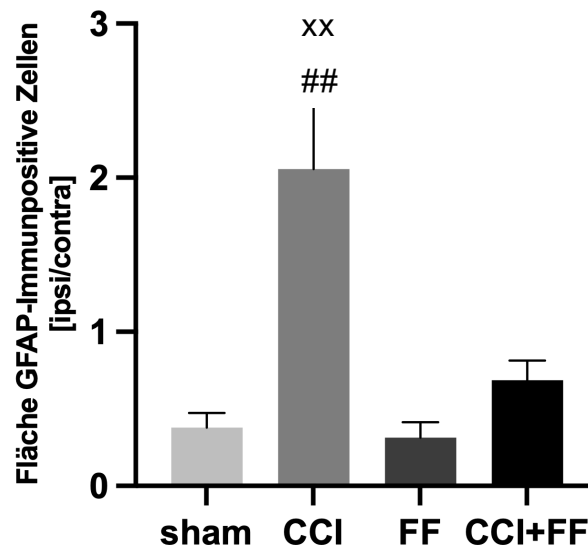


Diagramm 17: Fläche GFAP-Immunpositive Zellen im Verhältnis ipsi/contraläsional

Das Säulendiagramm zeigt die Fläche von GFAP-Immunpositiven Zellen als Verhältnis der ipsi mit der contraläsionalen-Hemisphäre in Prozentpunkten. Gezeigt sind alle Gruppen Sham, FF, CCI und CCI+FF (Sham n=12, CCI n=15, FF n=15, CCI + FF n=14). Die Darstellung der erhobenen Werte erfolgt als MW±SEM. One-way ANOVA Test und p-Wert Bestimmung mittels Holm-Sidak's multiple comparison test (x signifikant zu Sham (xx p<0,01); # signifikant zu FF (## p<0,01)).

Es zeigte sich eine signifikant größere Fläche im Vergleich der CCI-Tiere mit den Sham und den FF-Mäusen (Sham p=0,0003; FF p=0,0002). Keine Unterschiede gab es zwischen den CCI+FF-Mäusen mit der Sham-Gruppe sowie den FF-Tieren. Hingegen mit den CCI-Tieren zeigte sich ein signifikanter Unterschied (p=0,0023). Die Sham-Gruppe zeigte einen MW±SEM in Prozentpunkten von 0,38±0,1, die CCI-Gruppe 2,06±0,45, die FF-Gruppe 0,31±0,1 und die CCI+FF-Gruppe 0,69±0,13. Wird die contraläsionale Hemisphäre isoliert betrachtet, so zeigt sich eine signifikante Erhöhung der Werte für die CCI+FF-Tiere gegenüber den weiteren Gruppen (Sham, FF p<0,0001, CCI p<0,0461). Hingegen ist ipsiläsional die CCI-Gruppe gegenüber den Sham und FF-Tieren signifikant verändert (Sham, FF p<0,0001). Die Tiere mit kombinierter Verletzung sind gegenüber den Tieren ohne CCI ebenfalls signifikant (Sham, FF p<0,0011).

4.3.2 Iba1

Iba-1 ist ein ionisiertes Kalziumbindungsadaptermolekül. Es findet sich in verzweigter Mikroglia und kann immunhistochemisch nachgewiesen werden. Mikroglia wird durch Umweltreize aktiviert. Iba-1 dient der Quantifizierung von Mikrogliazellen in den jeweiligen Hemisphären (77).

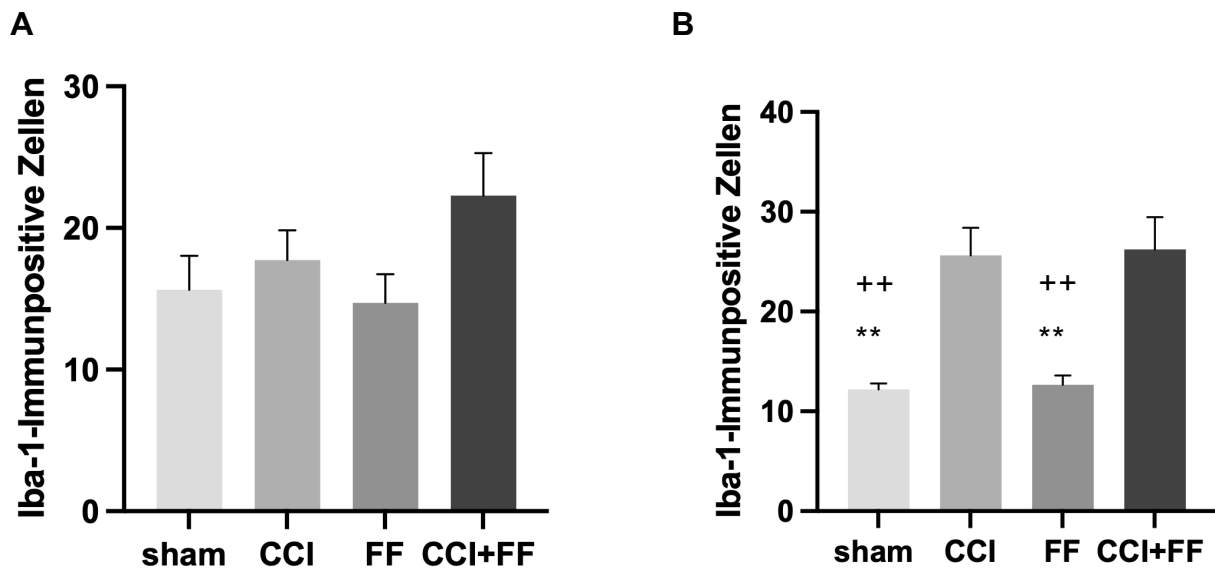


Diagramm: A) Iba-1-Immunpositive Zellen kontralateral B) Iba-1-Immunpositive Zellen ipsilateral
 Das Säulendiagramm A zeigt die Iba-1-Immunpositive Zellen kontralateral pro Gesichtsfeld. Das Säulendiagramm B zeigt die Iba-1-Immunpositive Zellen ipsilateral pro Gesichtsfeld (Sham n=12, CCI n=15, FF n=15, CCI + FF n=14). Die Darstellung der erhobenen Werte erfolgt als MW±SEM. One-way ANOVA, p Wert ermittelt mit Dunn's multiple comparisons test und Holm-Šidák's multiple comparisons test (+ signifikant zu CCI (++ p<0,01); * signifikant zu CCI+FF (* p<0,05; ** p<0,01)).

Bei Betrachtung der kontralateralen Iba-1-Immunpositiven Zellen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen festgemacht werden. Die Sham-Gruppe zeigte eine Zellzahl MW±SEM von 15,64±2,4, die CCI-Gruppe 17,73±2,11, die FF-Gruppe 14,71±2,03 und die CCI+FF-Gruppe 22,29±2,99. Hingegen zeigt die ipsilaterale Erfassung der Zellzahl signifikante Unterschiede zwischen der Sham-Gruppe und den CCI und CCI+FF-Tieren (CCI: p=0,0009; CCI+FF p=0,0009). Ebenso zeigte sich das Verhältnis der FF-Tiere gegenüber den CCI+FF und CCI-Tieren signifikant verringert (CCI: p=0,0009; CCI+FF p=0,0007). Die Sham-Gruppe zeigte eine Zellzahl MW±SEM von 12,18±0,6 die CCI-Gruppe 25,6±2,79, die FF-Gruppe 12,64±0,95 und die CCI+FF-Gruppe 26,21±3,22.

4.4 Molekularbiologische Analyse

4.4.1 Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion

Mithilfe der qRT-PCR kann ein Blick auf die mRNA-Expression der Zielgene Aufschluss geben. Die gewonnenen Werte werden in Relation zu dem Housekeeping-Gen PPIA gesetzt.

4.4.2 Analyse der Genexpression

Astrozyten bilden im glialen Narbengewebe die führende Domäne. Als Hauptbestandteil der glialen Zwischenfilamente in differenzierten, faserigen und protoplasmatischen Astrozyten des zentralen Nervensystems wurde für diese Studie GFAP als Marker verwendet (85). Zur Abbildung der Komplementfaktoren wird hier der Komplementfaktor C3 gewählt (156). Der Serinprotease-Inhibitor SerpinA3n wird im Hippocampus im frühen Stadium einer Verletzung hochreguliert und dient hier als Marker für reaktive Astrozyten (88, 89). Zelloberflächenmarker wie MHC2 dienen der Kommunikation mit Immunzellen und können als Maß für die Aktivität der Mikroglia dienen (75). VGLUT1 kann Hinweise über die exzitatorisch-hemmenden Verhältnisse im ZNS geben (99). Interleukin-1 β ist ein proinflammatorisches Zytokin, sezerniert durch Mikroglia. Es nimmt zusätzlich Einfluss auf die Zellproliferation und Differenzierung und hat somit eine erhebliche Funktion bei der Neuroimmunreaktion (76). *Tspo* dient als Biomarker für die reaktive Gliose (87). Osteopontin ist ein Blutbiomarker für Hirnverletzungen und Bestandteil von Knochen (126-128).

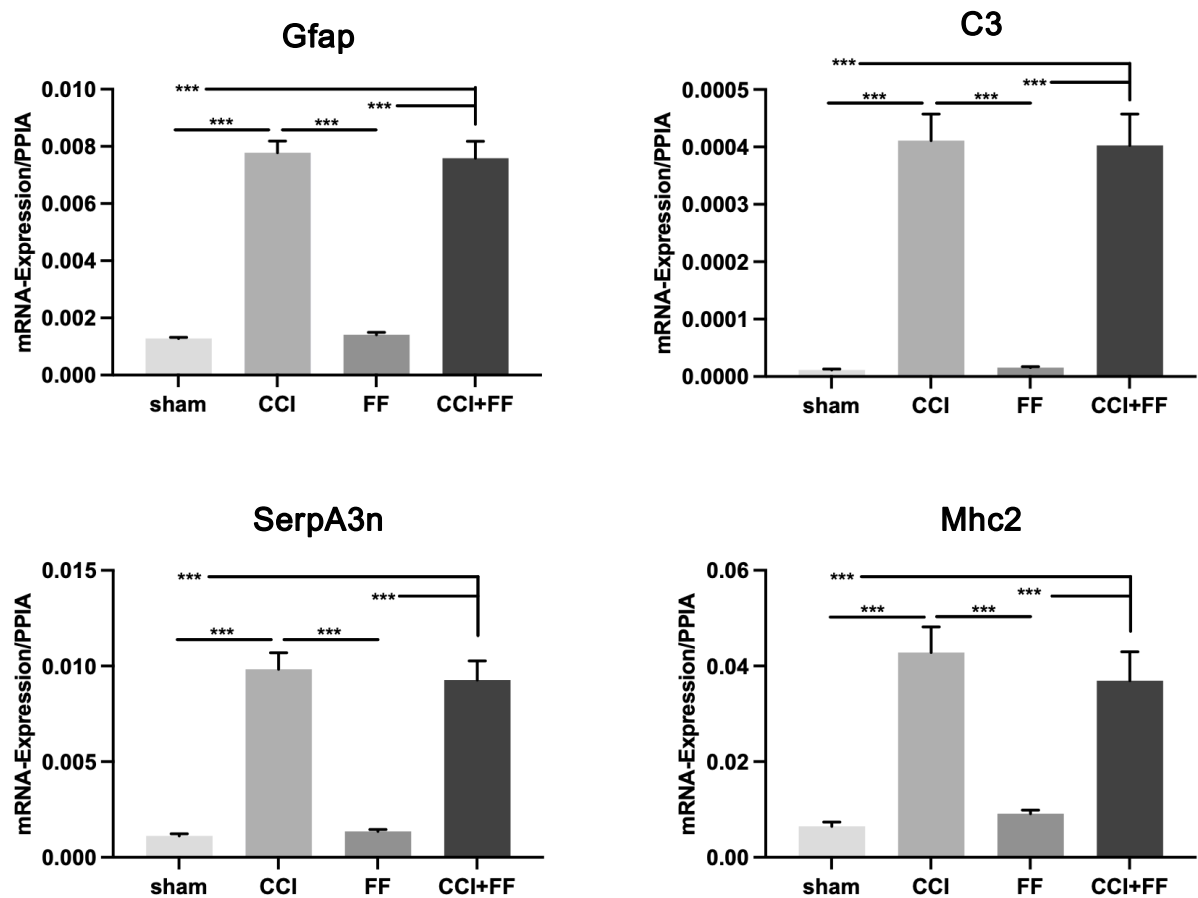


Diagramm 18: Darstellung Genexpression *Gfap*, *SerpA3n*, *Mhc2* und *C3*

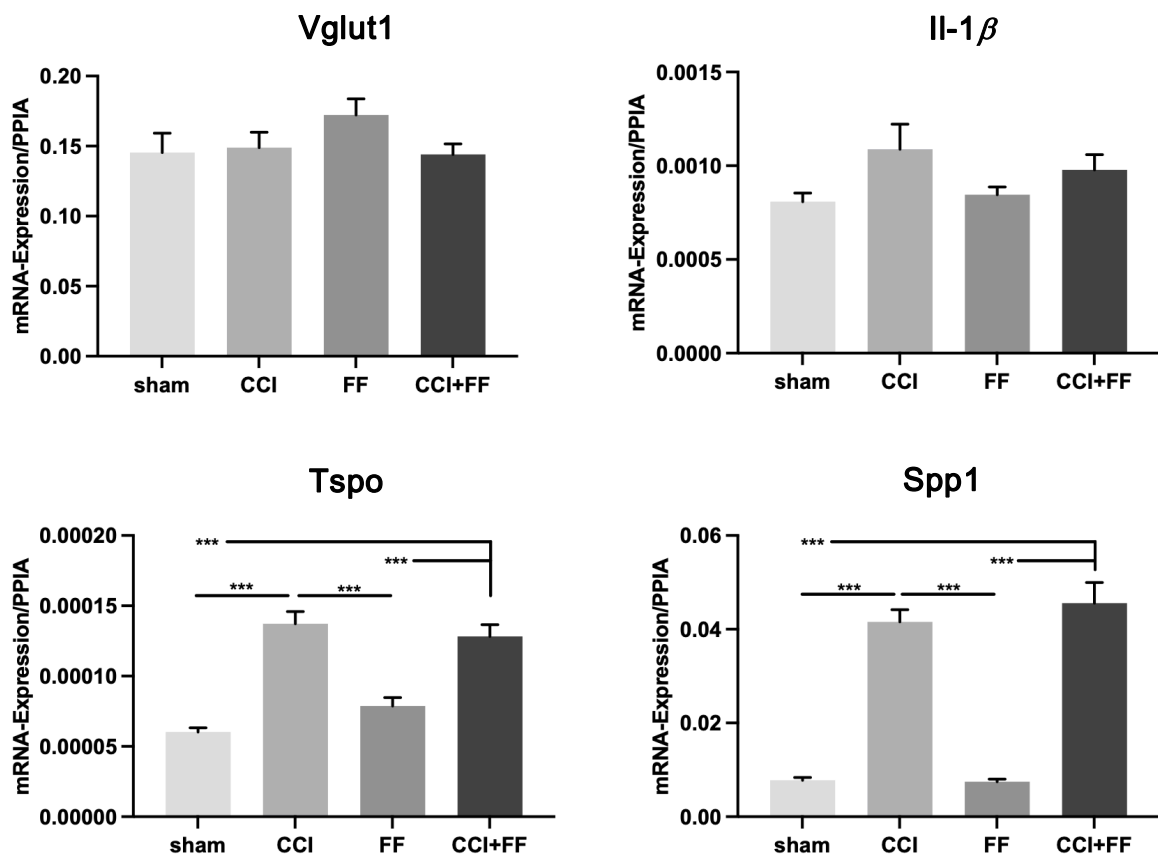
Die Säulendiagramme stellen die mRNA-Expression normalisiert auf PPIA aus perilesionalem Hirngewebe dar (Sham n=12, CCI n=15, FF n=15, CCI + FF n=14). Die Darstellung der erhobenen Werte erfolgt als MW±SEM. One-way ANOVA Test und p-Wert Bestimmung mittels Holm-Sidak's multiple comparison test (***) p<0,0001).

Es zeigte sich bei den erhobenen Werten eine signifikante Hochregulation der mRNA für *Gfap*, *C3*, *SerpA3n* und *Mhc2* in den Gruppen mit CCI gegenüber den Sham und FF-Tieren (p<0,0001). Ein Unterschied zwischen CCI und CCI+FF, sowie zwischen Sham und FF-Tieren konnte nicht festgestellt werden. Die aufgeführte Tabelle gibt die MW±SEM an.

Gruppe	Marker	MW±SEM	Gruppe	Marker	MW±SEM
Sham	Gfap	0,001277±4,74x10 ⁻⁰⁵	Sham	SerpA3n	0,001116±0,000112
CCI	Gfap	0,007779±0,000405	CCI	SerpA3n	0,009832±0,000856
FF	Gfap	0,001413±8,7x10 ⁻⁰⁵	FF	SerpA3n	0,001358±9,73x10 ⁻⁰⁵
CCI+FF	Gfap	0,007584±0,000599	CCI+FF	SerpA3n	0,009269±0,000998
Sham	C3	1,12x10 ⁻⁰⁵ ±1,71x10 ⁻⁰⁶	Sham	Mhc2	0,006483±0,000905
CCI	C3	0,000411±4,63x10 ⁻⁰⁵	CCI	Mhc2	0,05603±0,01411
FF	C3	1,55x10 ⁻⁰⁵ ±1,69x10 ⁻⁰⁶	FF	Mhc2	0,009125±0,000772
CCI+FF	C3	0,000477±8,97x10 ⁻⁰⁵	CCI+FF	Mhc2	0,05378±0,01776

Tabelle 7: MW±SEM der Biomarker

Die in der Tabelle aufgeführten Daten beziehen sich auf das Diagramm 18.

Diagramm 19: Darstellung der Genexpression *Vglut1*, *Il1β*, *Tspo* und *Spp1*

Die Säulendiagramme stellen die mRNA-Expression normalisiert auf PPIA aus perilesionalem Hirngewebe dar (Sham n=12, CCI n=15, FF n=15, CCI + FF n=14). Die Darstellung der erhobenen Werte erfolgt als MW±SEM. One-way ANOVA Test und p-Wert Bestimmung mittels Holm-Sidak's multiple comparison test (***) p<0,0001).

Sowohl *Tspo* als auch *Spp1* zeigen eine signifikante Hochregulation der mRNA-Expression in den Gruppen CCI und CCI+FF gegenüber den Gruppen Sham und FF ($p > 0,0001$). Ein Unterschied zwischen CCI und CCI+FF, sowie zwischen Sham und FF-Tieren konnte nicht festgestellt werden. Bei Betrachtung der Biomarker VGLUT1 und IL-1 β kann zwischen den Gruppen keine signifikante Veränderung der Expression festgestellt werden. Die aufgeführte Tabelle gibt die MW \pm SEM an.

Gruppe	Marker	MW \pm SEM	Gruppe	Marker	MW \pm SEM
Sham	Vglut1	0,1454 \pm 0,01391	Sham	Tspo	6,02 $\times 10^{-05}$ \pm 3,09 $\times 10^{-06}$
CCI	Vglut1	0,149 \pm 0,01092	CCI	Tspo	0,000137 \pm 8,67 $\times 10^{-06}$
FF	Vglut1	0,1722 \pm 0,0115	FF	Tspo	7,87 $\times 10^{-05}$ \pm 6,06 $\times 10^{-06}$
CCI+FF	Vglut1	0,1366 \pm 0,01014	CCI+FF	Tspo	0,000128 \pm 8,25 $\times 10^{-06}$
Sham	Il-1 β	0,000808 \pm 4,66 $\times 10^{-05}$	Sham	Spp1	0,007794 \pm 0,000576
CCI	Il-1 β	0,001088 \pm 0,000134	CCI	Spp1	0,04155 \pm 0,002563
FF	Il-1 β	0,000846 \pm 4,11 $\times 10^{-05}$	FF	Spp1	0,007484 \pm 0,000536
CCI+FF	Il-1 β	0,001281 \pm 0,000311	CCI+FF	Spp1	0,04556 \pm 0,004386

Tabelle 8: MW \pm SEM der Biomarker

Die in der Tabelle aufgeführten Daten beziehen sich auf das Diagramm 19.

4.5 Proteinanalyse

4.5.1 Immunoblot

Mit dem Immunoblot können Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt und quantifiziert werden. Im Rahmen dieser Studie wurde das Protein GFAP und Spaltprodukte des Zytoskelettprotein Spektrin zu GAPDH normalisiert und im ipsiläsionalen Hirngewebe quantifiziert.

4.5.1.1 GFAP

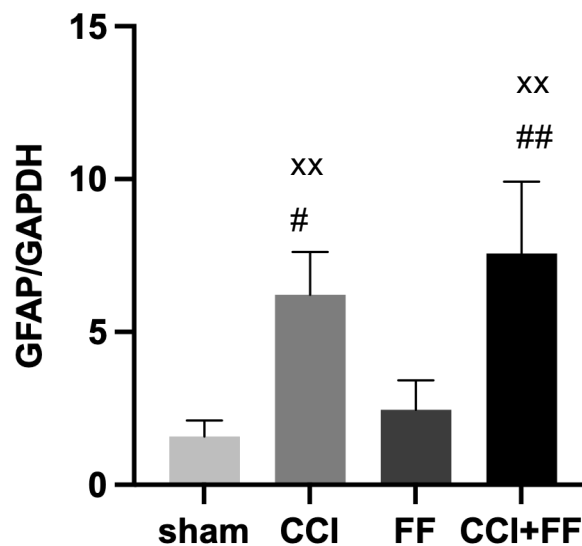


Diagramm 20: Proteinexpression von GFAP

Das Säulendiagramm zeigt die GFAP-Proteinexpression der einzelnen Gruppen im ipsiläsionalen Hirngewebe normalisiert auf GAPDH (Sham n=12, CCI n=15, FF n=15, CCI + FF n=14). Die Darstellung der Ergebnisse bzw. den gemessenen Parametern erfolgt als MW±SEM. One-way ANOVA, p-Werte wurden mit Dunn's multiple comparisons test ermittelt (x signifikant zu Sham (x p<0,05, xx p<0,01)); # signifikant zu FF (# p<0,05; ## p<0,01)).

Im Vergleich der einzelnen Gruppen zeigen die CCI-Tiere eine signifikante Erhöhung der GFAP-Werte gegenüber Sham und FF-Tieren (Sham p=0,0009; FF p=0,0039). Ebenso verhielt es sich mit den CCI+FF-Tieren. Auch dort fanden sich signifikant erhöhte GFAP-Werte gegenüber FF und Sham-Mäusen (Gegenüber Sham p=0,0021; FF p=0,0086). Die Sham-Gruppe zeigte Werte als MW±SEM von 1,58±0,53, die CCI-Gruppe 6,22±1,4, die FF-Gruppe 2,46±0,96 und die CCI+FF-Gruppe 7,57±2,36.

4.5.1.2 Alpha-2-Spektrin

Bei Spektrin handelt es sich um ein Membranprotein vom Zytoskelett, das durch Proteasen wie Caspase 3 und Calpain gespalten wird. Im zentralen Nervensystem dient die physiologische Spaltung der Aufrechterhaltung von neuronaler Plastizität. Ist der Signalweg beispielsweise durch traumatische oder ischämische Hirnverletzungen gestört, können die entstandenen Spektrinfragmente als Biomarker genutzt werden. Die entstandene Menge 140 kDa und 150 kDa Spektrin wird hier als Parameter für die Apoptose genutzt (157, 158).

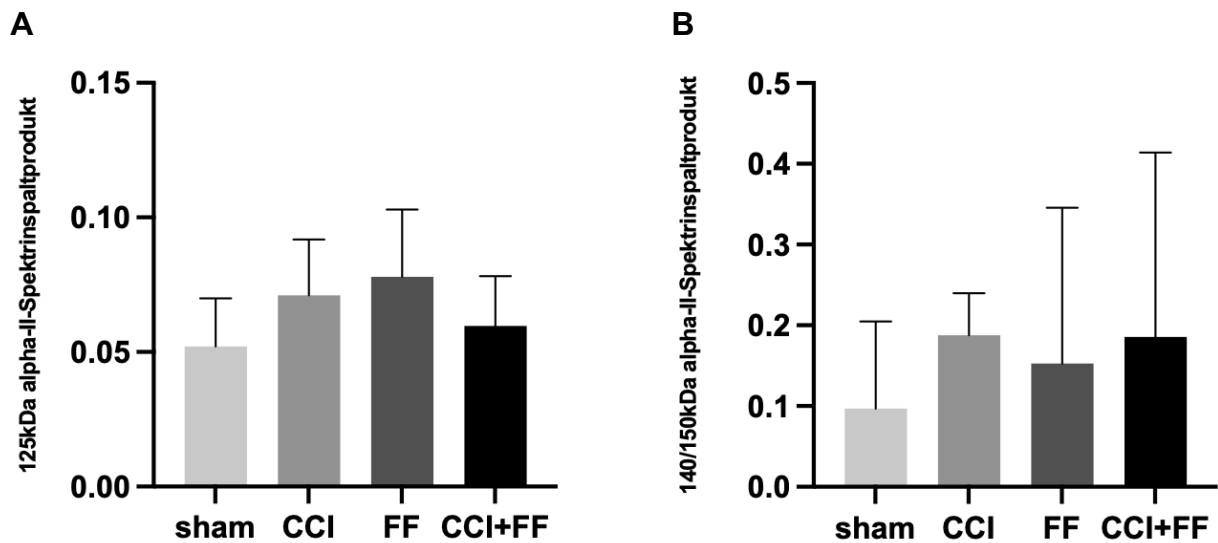


Diagramm 21: Proteinexpression von alpha-II-Spektrinspaltprodukten

Das Säulendiagramm A zeigt 140/150 kDa alpha-II-Spektrinspaltprodukte der einzelnen Gruppen im ipsiläsionalen Hirngewebe normalisiert auf GAPDH. B die Werte für 125 kDa alpha-II-Spektrinspaltprodukte (Sham n=12, CCI n=15, FF n=15, CCI + FF n=14). Die Darstellung der Ergebnisse bzw. den gemessenen Parametern erfolgt als MW±SEM. One-way ANOVA, p-Werte wurden mit Dunn's multiple comparisons test ermittelt.

Es konnte zwischen den Versuchsgruppen 42 Tage nach der Intervention keine signifikant erhöhte Proteinexpression dargestellt werden. Für die 140/150 kDa alpha-II-Spektrinspaltprodukte der Sham-Gruppe zeigten sich Werte als MW±SEM von $0,097\pm 0,03$, die CCI-Gruppe $0,188\pm 0,05$, die FF-Gruppe $0,152\pm 0,05$ und die CCI+FF-Gruppe $0,186\pm 0,06$. Die 125 kDa alpha-II-Spektrinspaltprodukte der Sham-Gruppe imponierten als MW±SEM von $0,052\pm 0,02$ die CCI-Gruppe $0,071\pm 0,02$, die FF-Gruppe $0,078\pm 0,02$ und die CCI+FF-Gruppe $0,06\pm 0,02$.

4.5.2 ELISA

Bei dem ELISA wird ein Antigen auf einer festen Oberfläche fixiert und mithilfe eines enzymgekoppelten Ak detektiert. Im Rahmen dieser Studie wurde das Protein Osteopontin im Serum untersucht.

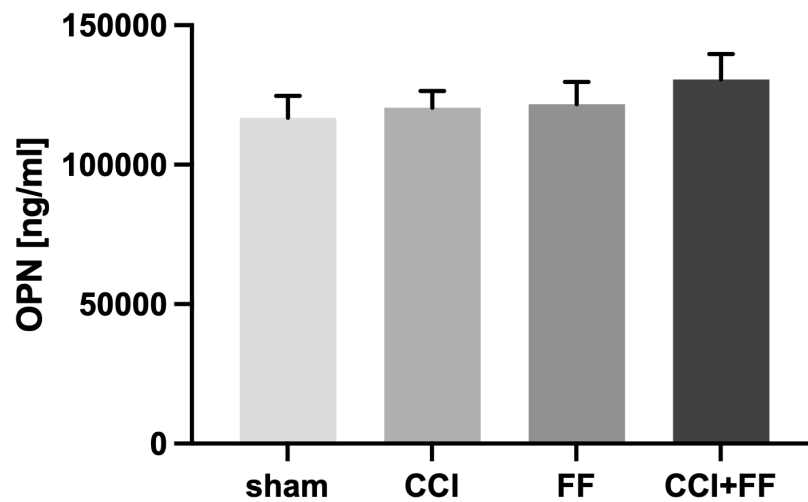


Diagramm 22: Plasmaspiegel von Osteopontin

Das Säulendiagramm zeigt den OPN-Plasmaspiegel in Nanogram pro ml (ng/ml) der einzelnen Versuchsgruppen (Sham n=12, CCI n=15, FF n=15, CCI + FF n=14). Die Darstellung der erhobenen Werte erfolgt als MW±SEM. One-way ANOVA Test und p-Wert Bestimmung mittels Holm-Sidak's multiple comparison test.

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der OPN-Konzentration im Serum der Gruppen untereinander. Die Sham-Gruppe zeigte einen MW±SEM in der Konzentration von 116767±7968 ng/ml die CCI-Gruppe 120333±6013, die FF-Gruppe 121700±7987 und die CCI+FF-Gruppe 130607±9024.

5. Diskussion

Die Wechselwirkungen und Zusammenhänge eines Hirnschadens sowie großer Begleitverletzungen, die *per definitionem* zu einem Polytrauma führen, sind kaum verstanden. Neuronale Veränderungen und neurologische Verhaltensbeeinträchtigungen sowie die Bewertung der verwendeten Methoden sollen hier im Folgenden erläutert werden (159, 160). Nachstehend soll in diesem Teil der Arbeit eine Aufarbeitung der erhobenen Werte sowie die Einordnung in die aktuelle wissenschaftliche Literatur und Bewertung erfolgen.

5.1 Evaluation der Methoden

Ein Vergleich vom menschlichen Organismus in seiner Komplexität mit dem eines anderen Säugetiers führt zu unverhandelbaren Limitationen. Tierversuche können nicht vollständig auf menschliche Pathophysiologie oder klinische Behandlungsstrategien extrapoliert werden (17, 161). Trotz dieser Hindernisse bieten sie dennoch Möglichkeit zur Grundlagenforschung und wissenschaftlichem Erkenntnisgewinn. Murinmodelle sind zur experimentellen Forschung von Fraktur- und Polytrauma-Studien von zunehmendem Interesse (138). Sie bieten die Möglichkeit, zwischen *in vitro*-Forschung und klinischen Studien am Menschen zu vermitteln. Die Maus gehört zu den am häufigsten verwendeten Nagern der translationalen Forschung (162). Die in dieser Arbeit verwendete Methodik bietet den Vorteil der Reproduzierbarkeit und wurde bereits in einer vorausgegangenen Studie in dieser Arbeitsgruppe etabliert (134). Die Nutzung vom *Mousescrew* ermöglicht ein geschlossenes Frakturmodell mit Nagelungsosteosynthese. Zusätzlich führt dieses Verfahren zu einer Rotations- und Axialstabilität des frakturierten Knochens (138). Es konnte bereits gezeigt werden, dass durch diese Stabilisierung der Heilungsprozess begünstigt wird (163, 164). Beim Menschen ist die Marknagelosteosynthese einer extraartikulären Femurfraktur ebenfalls ein etabliertes Behandlungskonzept (165). Des Weiteren haben sich Methoden und Verfahren am Model der Maus weltweit zur Erforschung des SHT etabliert (166). Das menschliche SHT ist eine komplexe und heterogene Verletzung, entsprechend kann ein Tiermodell nur näherungsweise Aufschluss über die Vorgänge geben. Das CCI ist eine invasive

Impact-Methode aus den Forschungslabors von General Motors. Der größte Vorteil dieser Methode besteht in der Befähigung, die Verformungsparameter, Aufprallgeschwindigkeit und die Einschlagtiefe kontrollieren zu können. Zum einen kann so der fokale Schaden, zum anderen die diffusen axonalen Schäden nachgebildet werden (167, 168). Das CCI-Modell wird in dieser Arbeitsgruppe als etabliertes Verfahren angewandt. Das standardisierte Vorgehen ermöglicht die qualitativ erforderliche Reproduzierbarkeit. Signifikante Unterschiede in beispielsweise Neuroscore sowie molekularer Biomarker der CCI und Polytrauma-Tiere gegenüber Sham-Mäusen konnten in dieser Studie erneut die Effektivität dokumentieren. Vereinzelt Abweichungen sind mit Bezug auf die jeweilige Fragestellung zu werten (89, 134, 169-172). Einerseits bietet die Forschung am Mausmodell die Möglichkeit der Grundlagenforschung, andererseits muss dies stetig unter ethischen Gesichtspunkten abgewogen werden. Es gibt derzeit verschiedene Methoden und Herangehensweisen zum Induzieren eines Polytraumas und unterschiedliche Arten von Verletzungskombinationen (18, 173-175). Allerdings sind körperhafte Verletzungen nicht als alleinige Einflussfaktoren zu werten, ein hämorrhagischer Schock wie in zuvor publizierten Polytrauma-Studien führte ebenfalls zu systemisch inflammatorischen Effekten (176). Es gilt zu beachten, dass abgesehen vom Mausmodell beispielsweise Schweine oder andere Nagetiere verwendet werden (177). Die Größe des ausgewählten Versuchstiers stellt auch die Untersucher vor anspruchsvolle Herausforderungen und sollte entsprechend bedacht werden. Je kleiner das Tier, desto filigraner und vorsichtiger muss die Operation stattfinden. Bei größeren Tieren müssen die Haltung und auch die Testarena entsprechend räumlich und personell umsetzbar sein. Eine wesentliche Herausforderung dieser Arbeit war es, ein möglichst reales Unfallgeschehen abzubilden. Im Gegensatz zu beispielsweise Mehrfachverletzungen im Rahmen eines Verkehrsunfalls erfolgte bei den Tieren der operative Eingriff respektive das Trauma in einem narkotisierten Zustand. Die Scheinoperation mit analogem anästhetischem Vorgehen bei den Sham-Tieren diente der Vergleichbarkeit der Gruppen. Ein Einfluss der Medikamente auf pathophysiologische und biochemische Prozesse lässt sich dennoch nicht vollends ausschließen. Am naheliegendsten scheint es, komplett auf die Anästhesie zu verzichten. Dies ist jedoch unter geltenden ethischen Maßstäben

äußerst kritisch zu werten. Eine weitere Möglichkeit bietet die Modulation der Anästhesie während der OP respektive beim direkten Zufügen eines Traumas. Beispielsweise kann zu diesem Zeitpunkt die Zufuhr der Narkosegase auf ein minimales Niveau herabgesenkt oder gar kurzfristig komplett gestoppt werden (178). In dieser Studie wurde die osteosynthetische Versorgung bereits vor der Fraktur durchgeführt. Dieses Vorgehen dient zwar der Reproduzierbarkeit und sichert die Qualität der Verletzung, sorgt allerdings für eine praxisferne zeitliche Konstellation. Ferner hat das Alter der Versuchstiere maßgeblich Einfluss auf die Knochenheilung. Beispielsweise wirkt senile Osteopenie direkt stabilitätsmindernd auf die Knochenstruktur und beeinflusst zudem die Knochenregeneration und Kallusreifung (179). In Anbetracht der Altersstruktur von Patienten mit Mehrfachverletzungen und dem demographischen Wandel bietet dieser Aspekt gesondert Möglichkeit zur weiteren Forschung (180). Zudem unterscheiden sich die Gehirne der Nagetiere u. a. in Bezug auf die Anatomie, dem Verhältnis zwischen grauer und weißer Substanz und in der Schädelgeometrie stark von dem des Menschen. Emotionale und sprachliche Komponenten unterliegen natürlichen Barrieren, welche im Mausmodell schwer überwunden werden können und ihr Informationsgehalt somit nicht erfasst wird. Dagegen korrelieren einige Aspekte der Durchblutungsdynamik und Stoffwechselstörungen nach einer Verletzung mit dem menschlichen Organismus. Dies begründet u. a., dass Nagetiere weiterhin die dominierende Tierart in der Schädelhirntrauma-Forschung bilden (181). Erwähnenswert ist zudem, dass im Tierversuch die Resilienz schwer darstellbar und beurteilbar ist. Gleichwohl sie bei der Trauma-Verarbeitung und dem Einfluss auf Regenerationsprozesse sowie Neurorehabilitation beim Menschen von zunehmendem Interesse ist (182-184).

Das Kernproblem bedingt einen Kompromiss aus ethischen, zeitlichen und räumlichen Komponenten. Diesem Kompromiss steht der Vorteil von Reproduzierbarkeit, wissenschaftlichem Erkenntnisgewinn sowie dem Verständnis pathophysiologischer Vorgänge zur Behandlung polytraumatisierter Patienten mit SHT gegenüber.

5.2 Verhaltensbiologische Untersuchung

Kommt es zu traumatischen Ereignissen im Bereich des zentralen Nervensystems, ist nahezu immer mit neurologischen Defiziten zu rechnen. Die dabei entstandenen Funktionseinschränkungen werden in der allgemein anerkannten Definition eines SHT berücksichtigt (42). Durch ein geeignetes *Assessment* (engl.: Beurteilung) können diese Einschränkungen erfasst und infolgedessen prognostisch wertvoll sein (41). Im Rahmen dieser Studie wurden die Versuchstiere durch mehrere Tests auf ihre verhaltensbiologischen Fertigkeiten hin untersucht. Die Tiere, die sowohl ein CCI als auch eine FF erhielten, erreichten im NSS durchgehend die höchsten Punktwerte. Sie zeigten somit die schlechtesten neurologisch-kognitiven Fähigkeiten. An den Tagen d1, d3, d7 und d14 war dies gegenüber den reinen FF-Tieren signifikant. Dies bestätigt die besondere Beeinträchtigung der Tiere mit kombinierter Intervention. Im Vergleich zur Sham-Gruppe erreichten die Mäuse mit isolierter FF ausschließlich an den Tagen d3 und d7 signifikant erhöhte Werte und die Versuchstiere mit einem CCI nur an den Tagen d1 und d3. Aus den erhobenen Daten ließe sich ableiten, dass zwar die jeweiligen Interventionen für sich genommen v. a. in den ersten Tagen verstärkten Einfluss haben, jedoch die Kombination auch noch nach 6 Wochen zu neurologischen Einbußen führt. Lediglich die CCI-Gruppe konnte sich signifikant verbessern. Mutmaßlich könnte hier die FF entscheidend an den erhöhten Werten beteiligt sein. Zur umfassenden Klärung sollten die Bestandteile des Tests Beachtung finden, die sich in der Trennschärfe nicht eindeutig in neurologische oder motorische Fertigkeiten differenzieren lassen. So könnte beispielsweise das Festhalten an einem Holzstab durch zusätzliche Schmerzen und funktionelle Bewegungseinschränkungen im Frakturbereich beschränkt sein. Der NSS hat sich bei der Bewertung von neurologischen Beeinträchtigungen am Mausmodell nach SHT zwar etabliert, jedoch sollte seine Aussagekraft im Zusammenhang mit extrakraniellen Verletzungen neu beurteilt werden (137). Einerseits wird mit dem NSS versucht, eine äquivalente Beurteilung in Bezug zur GCS zu ermöglichen, andererseits kann dieser nur als Indiz für Fertigkeiten betrachtet werden, da die jeweiligen Bewertungskriterien zwischen Mensch und Tier stark auseinanderweichen (185). Das KG entwickelte sich bei allen Gruppen altersentsprechend und hatte daher keinen Einfluss auf die Fähigkeiten der Tiere

oder umgekehrt. Die Messung erfolgte stets vor der Erfassung vom NSS. So konnte weitestgehend eine verzerrte Darstellung vom Körpergewicht durch stressbedingte Defäkation und Miktion vermieden werden. Ein kurzfristiger Gewichtsverlust am Folgetag nach der Intervention war zu erwarten und wurde bereits in vorherigen Studien beschrieben (134, 186). Bei allen Tieren konnte eine im Verlauf regelrechte Gewichtszunahme beobachtet werden. Dies kann als Indikator für eine gute postoperative Versorgung im Versuchsverlauf bewertet werden. Um die Beinverletzung zu evaluieren, wurden die Tiere mit einer FF besonders auf ihre artikulierende Beweglichkeit, Belastung und Bewegung hin beobachtet. In dieser Studie lag das Augenmerk auf den Vergleich zwischen den FF und den FF+CCI-Tieren. Dabei zeigten die Tiere mit einer Kombination aus CCI und FF tendenziell höhere Beeinträchtigungen als mit isolierter FF, diese sind jedoch nicht als statistisch signifikant, sondern als Trend zu werten. Beide Gruppen zeigten im Vergleich zum Tag 1 verbesserte Ergebnisse. Anhand der gemessenen Parameter konnten demzufolge keine Rückschlüsse auf das ursächliche Verletzungsmuster gezogen werden, was auf einen ähnlichen Zustand der Frakturheilung respektive deren Einfluss auf die Motorik nach 6 Wochen schließen lässt. Der Rota-Rod Test komplementiert das Bild und gibt Auskunft über die Kraft, Ausdauer und Greifkraft der Maus. Ebenso wird die Fähigkeit, Balance zu halten sowie die motorische Koordinationsfähigkeit getestet (155). Alle Gruppen zeigten keine statistischen Auffälligkeiten im Vergleich zueinander. Da motorisches Lernen ein komplexer Ablauf ist, der von verschiedenen Hirnarealen mitgesteuert wird, scheint es hier keine motorischen oder lernassoziierten Benachteiligungen gegeben zu haben (187). Die Deutung der Ergebnisse sollten jedoch in Anbetracht der Knochenverletzung unter Vorbehalt geschehen. Alternative Testverfahren zur differenzierten Beurteilung der motorischen und kognitiven Leistungen sollten bei einem auf diese Studie aufbauenden Versuchsaufbau geprüft werden. Mithilfe der Software Ethovision XT14 wurde der Open Field Test durchgeführt. Durch Aufzeichnungen einer Kamera und anschließender Berechnungen aus den erfassten Bilddaten können Aussagen über die allgemeine Bewegungsfähigkeit getroffen werden (188). So demonstrierte sich bei den Tieren mit isolierter FF ab dem Tag 1 eine signifikant geringere zurückgelegte Strecke. Zudem ebenfalls mit den FF+CCI-Mäusen am Tag 3. Gegenüber Sham und FF-Tieren zeigten die CCI-Tiere erhöhte

Mobilitätswerte am Tag 7. Hingegen haben die Polytrauma-Tiere deutlich weniger Wegstrecke zurückgelegt. An den Tagen 14 und 21 haben die CCI-Mäuse ihr Streckenmaximum erreicht. Am Tag 42 sind es die FF+CCI-Tiere und CCI-Tiere mit der längsten Strecke. Deuten ließe sich dies als Gewöhnung an die Umgebung sowie das redundante Vorgehen beim Testen. Bei den FF-Mäusen sollte die beeinträchtigende Verletzung nicht gänzlich unberücksichtigt gelassen werden (188). Das hyperaktive Verhalten zeigte sich bei den Mäusen mit CCI und in abgeschwächter Form bei den Polytrauma-Tieren. Ein solches Verhalten konnte bereits in anderen Studien mit CCI bei Mäusen beobachtet werden (9, 169, 189). Am Tag 42 hielten sich die Tiere deutlich ausgiebiger während des *Exit from the Circle*-Test im Inneren eines virtuellen Kreises auf. Dies kann als verringertes Angstempfinden gedeutet werden. Da zu diesem Zeitpunkt auch keine wesentliche motorische Einschränkung festgestellt werden konnte, kommt dies nicht als Erklärung in Betracht. Andere Polytrauma-Forschungen an Nagetieren kommen zu ähnlichen Ergebnissen. Ein vergleichbares Verhalten war bereits bei CCI-Tieren bekannt (16, 190, 191). Eine solche Beobachtung kann vorsichtig als Ausblick auf das menschliche Verhalten dienen sowie die Relevanz von Grundlagenforschung darlegen. Ein frühkindliches SHT ist stark mit erhöhtem Risiko assoziiert, eine Störung in der Aufmerksamkeit und eine Hyperaktivität zu entwickeln. Innerhalb eines Jahres nach SHT entwickeln bis zu 15 % der betroffenen Kinder ein sekundäres Hyperaktivitätssyndrom (192, 193). Mit dem *Elevated Plus Maze* kann eine Einschätzung vom Angstverhalten der Mäuse ausgearbeitet werden (140). Wie auch schon beim Open Field Test konnte eine erhöhte Aktivität der CCI-Tiere, gemessen an der Geschwindigkeit, am Tag 20 beobachtet werden. Dies bestätigt das hyperaktive Verhalten auch unter fremdartigen räumlichen Bedingungen. Die Tiere verweilten weder flüchtiger noch niederfrequenter in den geschlossenen Armen der Testarena. Einen Einfluss durch die traumatischen Verletzungen gab es am Tag 20 demnach nicht. In anderen Studien ließ sich ein sogenanntes Umkehrverhalten der Angst bei den Tieren erkennen. Nach CCI verhielten sich die Tiere in den ersten zwei Wochen deutlich verängstigter gegenüber der Referenzgruppe. Einen Monat darauffolgend imponierte ein reziprokes Angstverhalten (9). Ein solches Angstverhalten wurde bereits zuvor bei Mäusen mit verschiedenartigen Verletzungen beschrieben (194, 195). Die

auseinandergelungende Beurteilung bezüglich des Angstverhaltens könnte beispielsweise in der Versorgung des Frakturmodells liegen. So wurde in dieser Studie die osteosynthetische Nagelung durchgeführt, welche im Studienvergleich eine nicht zu vernachlässigende Stabilität mit entsprechender Rehabilitation erreicht haben könnte. Andere Studien nutzten hingegen eine Schienung des Unterschenkels zur Versorgung der Fraktur (195). Dagegen muss berücksichtigt werden, dass bei der vorliegenden Studie zusätzlich ein Hirnschaden mit erheblichem Einfluss auf neuronale Strukturen stattfand. Erwähnenswert ist die räumliche Nähe des Hippocampus. Dieser ist wesentlich am Angstempfinden der Tiere beteiligt, demzufolge kann eine Störung des neuronalen Netzwerks dieses maßgeblich beeinflussen oder gar beeinträchtigen (196). Eine abschließende Klärung, welche Umstände für die unterschiedlichen Erkenntnisse verantwortlich sind, bietet gesondert Möglichkeiten zur weiteren Erforschung. Grundsätzlich charakterisiert sich das Verhalten der Tiere mit CCI und FF insbesondere durch die persistierenden Einschränkungen im NSS. Dies kann als Beleg für die Wirksamkeit der Methoden herangezogen werden. Unklar bleibt, ob die Einschränkungen vorwiegend der Fraktur oder dem Hirnschaden zuzuschreiben sind. Die tendenzielle stärkere Beeinträchtigung der Tiere mit kombinierter Verletzung beim Beinbelastungstest fügt sich passend in das Gesamtbild. Allerdings konnte der Rota-Rod Test in der punktuellen Messung kein Defizit feststellen, eine Verlaufstestung an mehreren Zeitpunkten in Folgestudien sollte angestrebt werden. Das gesteigerte Angstverhalten konnte bei CCI-Tieren durch videoassistierte Auswertungen belegt werden, konform hiermit präsentierten sich die Mobilitätswerte. Ein Einfluss durch die FF ließ sich jedoch nicht erkennen.

In der Zusammenschau können Angstverhalten, persistierende Einschränkungen und erhöhte Mobilitätswerte für Tiere mit CCI angeführt werden. Insbesondere imponieren die erhöhten Mobilitätswerte am Tag 42 bei bestehender Einschränkung im NSS und sollten verhaltensbiologisch weiter untersucht werden. Gegenwärtig bleibt offen, wie zielgerichtet die Bewegung waren. Der Einfluss auf das Kurzzeitgedächtnis darf hierbei nicht außer Acht gelassen werden. Mit Blick auf die Fragestellung dieser Arbeit verhält sich der Einfluss der FF auf das Verhalten der Tiere eher diskret und konzentriert sich auf die Einschränkung im NSS.

5.3 Histologische Prozesse und neuronaler Verlust

Bereits makroskopisch ließ sich nach der Entnahme der Gehirne das Schadensgebiet identifizieren. Mit Hilfe von Färbungsprozessen kann das Hirnvolumen mikroskopisch noch präziser evaluiert werden (146). Verglichen wurde das Volumen der rechten und linken Gehirnhälfte mit dem Gesamtvolumen der Tiere mit einem CCI und FF und einem isoliertem CCI. Hierbei imponierte, dass die Tiere mit Mehrfachverletzungen eine signifikant höhere Relation innerhalb der Gehirnhälften hatten als Tiere mit isoliertem CCI. Bei Betrachtung der Volumina jeder einzelnen Hemisphäre zeigte sich hingegen kein Unterschied. Unklar bleibt, ob die FF einen Einfluss auf die Gehirnregeneration ipsiläsional hatte oder das Gehirn auf die Fraktur mit einem Volumenausgleich reagiert. Beim Bestimmen der Körnerzellschichtdicke im Gyrus dentatus konnte im Verhältnis der ipsi- zur contraläsionalen-Hemisphäre kein signifikanter Unterschied aufgezeigt werden. Von einer quantifizierbaren Veränderung der Hippocampi in der Lichtmikroskopie ist damit im Rahmen dieser Untersuchungsmodalität nicht auszugehen, respektive fand dies möglicherweise zu einem vorherigen Zeitpunkt statt. In dieser Arbeitsgruppe durchgeführte Studien konnten einen Substanzverlust in der periläsionalen Körnerzellschicht bei Mäusen mit CCI nach wenigen Tagen Überlebenszeit darstellen (89, 134). Die in der vorliegenden Studie erhobenen Daten deuten auf eine Kompensation der neuronalen Strukturen hin. Diese sind am ehesten mit einer Neurogenese vereinbar. Die adulte Neurogenese findet in besonderem Maße in Stammzellen der subgranularen Zone des DG im Hippocampus statt (197, 198). Die Neurogenese ist ein äußerst komplexer Vorgang, welcher vielfältigen Einflüssen unterworfen ist. Entsprechend hoch ist die Relevanz für die Aufrechterhaltung der neuronalen Integrität (199). Es konnte in dieser Studie demonstriert werden, dass bei den Tieren mit CCI ein Kompensationsmechanismus stattgefunden hat, um den neuronalen Verlust auszugleichen. Ein Einfluss der FF zeigte sich allerdings nicht. In dieser Studie wurden periläsionale Stellen und korrespondierend kontralaterale Bereiche immunhistochemisch quantifiziert. Bei der Verletzung von Strukturen im ZNS folgt die Aktivierung von Mikroglia (75). In diesem Zusammenhang bietet sich das Molekül Iba-1 zur Quantifizierung an. Es handelt sich um ein ionisiertes Kalziumbindungsadaptermolekül in verzweigter Mikroglia. Verschiedene Reize ziehen die Aktivierung nach sich (77). In den

jeweiligen Gruppen mit CCI-Intervention kam es nachweislich zu einer Mikrogliose. Allerdings imponierte kein Unterschied zwischen diesen Gruppen. Jedoch ist die Zellzahl ipsilateral signifikant erhöht. Dies ist vereinbar mit den bisherigen Erkenntnissen über reaktive Mikroglia nach CCI (200). Es lässt sich schlussfolgern, dass die FF in diesem Versuch nach 6 Wochen keinen nachweisbaren Einfluss auf die Mikroglia-Aktivierung hatte. Eine chronische Aktivierung kann über Monate oder Jahre anhalten und löst biochemische Prozesse aus, die eine sekundäre Neurodegeneration nach sich ziehen (201). Es konnte bereits in anderen Studien gezeigt werden, dass eine TSPO-Genexpression 30 Tage nach einem CCI hinweisend für eine chronische Mikroglia-Aktivierung war (89). Ferner kommt es wie bereits beschrieben nach einem traumatischen Ereignis im ZNS zu einer reaktiven Astroglie mit Einfluss auf Morphologie, Genexpression, Proliferation sowie Funktion der Astrozyten (79). Derartige heterogene Reaktionen sollten bei der Beschreibung des Gewebeschadens beachtet werden. Mit Hilfe von GFAP können die Astrozyten immunhistochemisch sichtbar gemacht werden (86). Im Verhältnis ipsi- zu contraläsional konnte eine erhöhte Anzahl aktivierter Astrozyten bei beiden Gruppen mit CCI demonstriert werden. Die Zellen waren im Verhältnis ebenfalls tendenziell vergrößert. Die erhobenen Werte sind mit dem etablierten CCI-Modell vereinbar und konnten auch in anderen Studien bestätigt werden (105, 202). Allerdings zeigt sich bei isolierter Betrachtung der contraläsionalen Hemisphäre eine signifikant erhöhte Zellzahl der CCI+FF-Tiere gegenüber den CCI-Tieren. Respektive lässt sich ableiten, dass die FF einen Einfluss auf die immunhistochemische Darstellung hatte. Folglich besteht der dringende Verdacht, dass es im Rahmen des Traumas zu einer gesteigerten inflammatorischen Reaktion bei den FF-Tieren gekommen ist, welche sich jedoch in den molekularbiologisch erhobenen Werten nach 6 Wochen nicht mehr darstellen ließ. Erwähnenswert ist hier, dass eine zur Untersuchung des komplexen regionalen Schmerzsyndroms publizierte Studie bilaterale neuronale Veränderungen im Rahmen einer Neuroinflammation feststellen konnten. In der benannten Studie wurde ebenfalls ein Mausmodell verwendet, jedoch handelte es sich bei der angewandten Methodik um eine Tibiafraktur (203).

Mit Blick auf die Fragestellung dieser Arbeit präsentierte sich der Einfluss der FF durch die erhöhte Relation der Hemisphären, bei gleichzeitig unauffälligem

Vergleich der Volumina zueinander. Ungeachtet dessen ließ die Körnerzellschicht keinen Einfluss der FF erkennen. Passend zu den Ergebnissen der Volumetrie ist von einer kompensatorischen Neurogenese bei Tieren mit CCI auszugehen. Die ipsiläsionale Mikrogliose komplementiert das Gesamtbild entsprechend. Schlussfolgernd kann von einer chronischen Mikroglia-Aktivierung ausgegangen werden. Ferner kann der Einfluss der FF durch die contraläsionale Darstellung der Astrozyten als Folge einer gesteigerten neuroinflammatorische Reaktion gewertet werden.

5.4 Molekulare Neuroinflammation

Astrozyten reagieren empfindlich auf traumatische Hirnverletzungen, ferner bilden sie die dominierende Domäne im glialen Narbengewebe. Da sie im reaktiven Zustand durch eine veränderte Genexpression gekennzeichnet sind, kann dies als Indikator für die Schwere der Verletzung dienen. GFAP bildet einen zentralen Bestandteil der Intermediärfilamente. Kommt es folglich zu veränderter Proliferation und Hypertrophie, führt dies konsekutiv zu entsprechender GFAP-Expression (85, 86, 204). Es zeigte sich in dieser Studie eine durch qPCR quantifizierte signifikante Steigerung der GFAP-Expression in den Interventionsgruppen mit CCI. Beide Gruppen hatten ein ähnliches Niveau und waren zueinander nicht signifikant divergent. Es kann davon ausgegangen werden, dass die FF nach 42 Tagen keinen Einfluss auf die gemessenen Parameter der Astrozyten hat. Möglicherweise war das Verletzungsmuster für derart weitreichende Folgen zu sanft. In vergleichbaren Studien mit anders gepaarten Verletzungen konnten leichte Unterschiede zwischen Mehrfachverletzungen und reinem CCI gefunden werden (16). Es lässt sich jedoch nicht vollends ableiten, ob dabei Kombination und Schwere der Verletzungstypen oder der jeweilige Anteil in folgenden Studien moduliert werden sollte. C3 ist ein Komplementfaktor, der bereits in vorherigen Studien als Marker für einen sekundären Hirnschaden nach traumatischer Verletzung erfasst wurde (205). Die Aktivierung von C3 wird ferner als einer der erheblichen Faktoren benannt, die zum sekundären Hirnschaden beitragen respektive involviert sind. Alle drei Hauptwege der Komplementaktivierung führen zur Aktivierung von C3 (156). Im Rahmen dieser Untersuchung zeigte sich eine

deutliche Erhöhung der C3-Genexpression in den Interventionsgruppen mit CCI. Allerdings hatten CCI+FF und isoliertes CCI keinen Unterschied zueinander. Dies bestätigt C3 als Marker für einen sekundären Hirnschaden. Jedoch ist der Faktor nicht durch eine gleichzeitige Femurfraktur beeinflusst. In einigen Studien wird auf den Zusammenhang des Komplementsystems mit einer Frakturheilung hingewiesen (206). Ferner konnte in weiteren Studien eine systemische Reaktion durch Marker der humoralen Inflammation festgestellt werden (17). Inwiefern dies auch mit einer erhöhten Zirkulation einhergeht, kann nur durch weitere Analysen im Serum geklärt werden. Bei entsprechender Fragestellung kann in folgenden Studien beispielsweise ein ELISA als Testverfahren Anwendung finden. Wechselwirkungen mit Fokus auf die Knochenheilung sollte nachgegangen werden. Besonders die Interaktionen mit den Osteoblasten können hier von erheblichem Interesse sein. Zudem kommen weitere Studien zu dem Schluss, dass sich akute und langfristige Folgen für das knöchernen Skelett bei gleichzeitigem Schädel-Hirn-Trauma ergeben. Insbesondere die Osteogenese werde durch Stimulation der Osteoblasten angeregt (102). Ein Modell mit Ratten verdeutlichte den Zusammenhang zwischen Knochenheilung und induziertem Hirnschaden, die Resultate bestätigten negative Auswirkungen auf die Knochenstruktur (207). Als weiterer Marker für reaktive Astrozyten dient der Serinprotease-Inhibitor SerpinA3n. Die Expression wird v. a. in der frühen Phase einer Verletzung hochreguliert. Die exakte Funktion bei einem Hirnschaden ist nicht umfassend geklärt (88, 208). In der hier vorliegenden Studie kam es in den Gruppen mit CCI zu signifikant erhöhten Werten. Allerdings konnten keine Unterschiede zueinander gezeigt werden. Daraus geht hervor, dass die FF keinen nachweisbaren Einfluss hatte. Neuere Studien vermuten, dass SerpinA3n bei Hirnverletzungen Neurone vor der Apoptose schützen soll (88, 209). Im Rahmen dieser Studie konnte zumindest keine durch die FF beeinflusste Veränderung der Expression gefunden werden. Die Genexpression von MHC1 und MHC2 ist nach traumatischen Hirnverletzungen erhöht. Näher betrachtet lässt sich mit MHC2 v. a. die aktivierte Mikroglia feststellen (210). Entsprechend der Erwartung zeigten hier die MHC2 Werte in beiden CCI-Interventionsgruppen eine erhöhte Genexpression. Beide Gruppen erreichten ein annähernd gleiches Niveau. Demgemäß ließe sich ableiten, dass nach 42 Tagen eine Mikrogliose vorhanden ist. Wenngleich sie nicht dem Einfluss einer

FF unterliegt. Andere Studien kamen hier zu einem vergleichbaren Ergebnis (16). In diesem Zusammenhang können die erhobenen Ergebnisse als Bestätigung des Hirnschadens angesehen werden. Die Veränderung von exzitatorisch-hemmenden Verhältnissen im ZNS ist mit depressivem Verhalten assoziiert. Wesentlich hierfür sind Glutamat-durchlässige Transportproteine. Eine verminderte Expression von VGLUT1 hat entsprechend einen Einfluss (99, 211). Zur Klärung, ob und wie sich Verletzungen auf die Genexpression auswirken, wurde das ipsiläsionale Hirngewebe untersucht. Wenngleich sich dort kein signifikanter Anstieg aufzeigen ließ. Folgernd hatte VGLUT1 am Tag 42 keinen nachweisbaren Einfluss mehr auf den Hirnschaden in dieser Studie. Mit Interleukin-1 β handelt es sich um ein pro-inflammatorisches Zytokin. Als Mediator ist es an einer Vielzahl von Prozessen beteiligt und gilt als Vermittler im peripheren sowie im zentralen Nervensystem. Es nimmt weiterhin eine entscheidende Position bei neuronalen Verletzungen ein, wie beispielsweise nach traumatischen Ereignissen. Im ZNS wird Il-1 β vorwiegend von Mikroglia sezerniert (76, 212). Weiterhin wird Il-1 β als wesentlicher Faktor zur Regulierung und Freisetzung weiterer Zytokine beschrieben. Es dient als Biomarker für die frühe Neuroinflammation und dem damit einhergehenden Gewebeschaden (213). In dieser Studie konnten nach 42 Tagen keine unterschiedlich erhöhten *Il-1 β* Werte innerhalb der Gruppen dargestellt werden. Die für diese Arbeit vorrangig betrachteten Zusammenhänge mit der FF hat folglich auf die *Il-1 β* Genexpression keinen messbaren Einfluss gehabt. Interessanterweise wurde in weiteren Studien ein Anstieg der Konzentration und die damit verstärkte neuroinflammatorische Reaktion bei induzierten Knochenfrakturen nach ischämischen Hirnschaden im Mausmodell festgestellt (214). Eine experimentell herbeigeführte Fraktur vor einem ischämischen Schlaganfall führte in Studien zur Inflammation im Hippocampus und verursachte lang anhaltende Gedächtnisstörungen (215). Des Weiteren beschreiben Studien mit polytraumatisierten Mäusen ebenfalls eine Einschränkung des Gedächtnisses (159). Mit der Bestimmung von TSPO wurde ein Translokator Protein gewählt, das als Biomarker für reaktive Gliose und Inflammation Verwendung findet. Unter physiologischen Bedingungen sind die TSPO-Spiegel im Gehirn niedrig und lassen sich vornehmlich in Gliazellen und in besonders geringer Konzentration in Neuronen finden. Wenngleich sie dort unter anderem nach Verletzungen oder

Entzündungen ansteigen. Die vermehrte Genexpression von TSPO durch Gliazellen und die damit verstärkte Mikroglia proliferation etablieren TSPO als Progressionsindex nach SHT. TSPO-Liganden dienen weiterhin als Bindungsstelle für radioaktiv markierte Substanzen. Folglich kann die räumliche Verteilung im Zeitverlauf mit Hilfe von radiographischer Darstellung erfolgen. Eine erhöhte Radioligandenbindung zeigt demzufolge neuroinflammatorische Prozesse. Dies kann hinweisend für eine Hirnverletzung sein (87, 216-218). Diese Studie bestätigt die bisherige Erkenntnis. Beide Gruppen mit einer CCI-Intervention erreichten signifikant erhöhte Werte gegenüber Sham und reiner FF. Zwischen der Polytrauma- und isolierten CCI-Gruppe gab es keine Divergenz. Es kann konkludiert werden, dass die FF keinen Einfluss auf die TSPO-Expression hatte. Ferner sind die gewonnenen Werte mit der immunhistochemischen Darstellung von Iba-1 kohärent. Zur Vorhersage der Schwere von traumatischen Hirnverletzungen kann der Biomarker Osteopontin im Serum eingesetzt werden. Bei Osteopontin handelt es sich um ein multifunktionales, extrazelluläres Matrixprotein. Während es unter physiologischen Bedingungen nicht erhöht ist, kommt es beispielsweise bei Hirnverletzungen durch aktivierte Mikroglia zu einem Anstieg der Serumkonzentration. Es ist zudem an der mineralisierten Extrazellulärmatrix von Knochen und Zähnen beteiligt (126-128). Nach 42 Tagen konnte in dieser Studie keine Osteopontinerhöhung im Serum der Mäuse festgestellt werden. Es ist zu diesem Zeitpunkt davon auszugehen, dass weder die FF noch das CCI oder die kombinierte Verletzung Auswirkungen auf die Serumosteopontinkonzentration hatte. Die Genexpression im Hirngewebe war hingegen erwartungsgemäß erhöht. Dies ist in der hier vorliegenden Studie von besonderem Interesse, da Osteopontin ferner Einfluss auf die Knochenheilung hat (219). Als Parameter bei gleichzeitiger Knochenfraktur und Hirnverletzung konnte OPN hier nicht dienen. Hingegen konnte eine in dieser Arbeitsgruppe durchgeführte Polytrauma-Studie mit deutlich kürzeren Beobachtungszeitraum signifikante Unterschiede der Osteopontinkonzentration feststellen (134). In weiteren Studien sollte eine analytische Erhebung der Konzentrationsdynamik in Betracht gezogen werden. Die Konzentration kann beispielsweise an mehreren Zeitpunkten in Bezug zu den verhaltensbiologischen Erkenntnissen gesetzt werden. Als neuronales Zytokin hat Osteopontin das Potenzial, die Regeneration der Axone zu

unterstützen. In weiteren Studien mit Nagern konnte ein positiver Einfluss auf die Synapsenorganisation gezeigt werden. Osteopontin vermittelt zwischen Degeneration und Regeneration, korrespondierend dazu wird es als pleiotropes Zytokin bezeichnet (220, 221).

In der Zusammenschau konnte kein molekularbiologisches Korrelat zum Zeitpunkt der Euthanasie mit Bezug zur immunhistochemischen Darstellung in der qPCR gefunden werden. Möglicherweise hat die FF zu diesem Zeitpunkt keine zentral wirksamen Zytokine freigesetzt oder die protektive Wirkung der BHS kam zu tragen. Die erhöhte Expression des Komplementfaktors C3 bestätigte den sekundären Hirnschaden. Ebenfalls konstatierte sich anhand der erfassten Werten die Mikrogliose. Entsprechend der Fragestellung dieser Arbeit konnte kein Einfluss der FF festgestellt werden. Im Serum konnte keine gesteigerte Osteopontinkonzentration konstatiert werden. Somit ist nach 6 Wochen Überlebenszeit kein Einfluss der FF auf die Serumkonzentration feststellbar respektive anhand der Konzentration kann keine Aussage über die Qualität des Traumas getroffen werden.

6. Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation behandelt die Langzeitauswirkungen einer kombinierten Verletzung bestehend aus einem Schädelhirntrauma und einer Femurfraktur am Mausmodell. Sie dient der Grundlagenforschung und somit dem besseren Verständnis der molekularbiologischen Prozesse sowie ihrer Wechselwirkungen bei Mehrfachverletzungen. Grundlage für den Versuchsaufbau bildete der Vergleich von vier Gruppen mit unterschiedlichen Merkmalen. Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich über sechs Wochen. Durch Anwendung eines standardisierten Vorgehens konnte eine reproduzierbare Femurfraktur zugefügt und ein direkter und stumpfer Schaden im Gehirn verursacht werden. Entsprechend der Kombination dieser Interventionen konnte die Gruppenzusammenstellung erfolgen. Während des Beobachtungszeitraums wurden die Tiere in unterschiedlichen Tests beurteilt sowie in ihrer Verhaltensweise beobachtet und entsprechend analysiert. Letztlich endete der Beobachtungszeitraum mit der Euthanasie und der Entnahme von Gehirn und Femur. Es folgte die weitere histopathologische Aufbereitung. Überdies wurden zur nachfolgenden Analytik Gewebeproben entnommen. Die anschließenden histologischen Prozesse wurden entsprechend der lichtmikroskopischen respektive immunhistochemischen Fragestellung ausgerichtet. Lichtmikroskopisch gelang die Quantifizierung der Hirnvolumina sowie der Körnerzellschichtdicke. Immunhistochemisch gelang die Darstellung von Astrozyten und Mikroglia durch Antikörperbindungen. Die molekularbiologische Differenzierung wurde durch laborchemische Aufarbeitungsprozesse erreicht. Die quantitative Polymerasekettenreaktion bildete die labortechnische Grundlage. Als Basis der Proteinanalytik diente der Western Blot. Komplementiert wurde das analytische Vorgehen durch einen *enzyme-linked immunosorbent assay*. Die Auswertung vom NSS beurteilten Fähigkeiten zeigte eine durchgehende, wenn auch im Verlauf deutlich rückläufige Einschränkung bei kombiniertem Verletzungsmuster. Die untersuchte Beinbelastung ergab lediglich eine Einschränkung der CCI+FF-Tieren als statistischen Trend. Motorisch-koordinative Einschränkungen konnten mithilfe des Rota-Rod nicht identifiziert werden. Die Interventionsgruppen mit

CCI und kombinierter Verletzung präsentierten im *Open Field*-Test eine erhöhte Mobilität. Die Beobachtung im *Elevated Plus Maze* führte zur Bekräftigung der Ergebnisse. Polytrauma-Tiere verweilten am Tag 42 deutlich länger im virtuellen Kreis des *Exit from the circle*-Test. Volumetrisch zeigten die Hirnhälften der CCI+FF-Tiere eine höhere Relation als reine CCI-Tiere zueinander. Jedoch konnte im isolierten Vergleich der Hemisphären keine Abweichung abgebildet werden. Contraläsional imponierte bei den Polytrauma-Tieren der Nachweis einer Flächenvergrößerung von GFAP-immunopositiven Zellen gegenüber den CCI-Tieren. Gegenüber den FF-Tieren war zusätzlich auch die Zellzahl erhöht. Die Körnerzellschicht im Gyrus dentatus präsentierte sich bei allen Gruppen regelrecht. Eine Divergenz der Mikroglia konnte zwischen den Interventionsgruppen mit Hirnschaden nicht erfasst werden.

In Zusammenschau der Ergebnisse imponieren die verhaltensbiologischen Abweichungen der Tiere mit kombinierter Verletzung. Der strukturell am Hirngewebe feststellbare Schaden offenbarte hierbei keine zielführenden Hinweise, jedoch zeigte sich eine contraläsionale Astrogliose. Divergierende Prozesse der Genexpression konstatierten sich zum Zeitpunkt der Hirnentnahme nicht. Das Schädelhirntrauma ist im Rahmen eines Polytrauma als komplexe Verkettung aus Neurobiologie, Neuropsychologie und Immunologie zu verstehen. Zur weiteren Differenzierung und Verifizierung der Ergebnisse sollten weitere Studien durchgeführt sowie die Anwendung differenzierter Testverfahren angestrebt werden.

7. Literaturverzeichnis

1. Wilharm A, Pflug A, Loos F, Sommerfeld O, Hofmann GO, Sauer S. Causes of death in the seriously injured—why do severely injured patients die today? *Zeitschrift für Orthopädie und Unfallchirurgie*. 2021.
2. Pfeifer R, Tarkin IS, Rocos B, Pape H-C. Patterns of mortality and causes of death in polytrauma patients—has anything changed? *Injury*. 2009;40(9):907-11.
3. Badhiwala JH, Wilson JR, Fehlings MG. Global burden of traumatic brain and spinal cord injury. *The Lancet Neurology*. 2019;18(1):24-5.
4. Maegele M, Lefering R, Sakowitz O, Kopp MA, Schwab JM, Steudel W-I, et al. The Incidence and Management of Moderate to Severe Head Injury: A Retrospective Analysis of Data From the Trauma Register of the German Trauma Society. *Deutsches Ärzteblatt International*. 2019;116(10):167.
5. Maas AI, Menon DK, Adelson PD, Andelic N, Bell MJ, Belli A, et al. Traumatic brain injury: integrated approaches to improve prevention, clinical care, and research. *The Lancet Neurology*. 2017;16(12):987-1048.
6. Frink M, Lechler P, Debus F, Ruchholtz S. Multiple trauma and emergency room management. *Deutsches Ärzteblatt International*. 2017;114(29-30):497.
7. Debus F, Lefering R, Frink M, Kühne CA, Mand C, Bücking B, et al. Anzahl der Schwerverletzten in Deutschland. *Dtsch Arztebl Int*. 2015;112(49):823-9.
8. Draper K, Ponsford J. Cognitive functioning ten years following traumatic brain injury and rehabilitation. *Neuropsychology*. 2008;22(5):618.
9. Popovitz J, Mysore SP, Adwanikar H. Long-term effects of traumatic brain injury on anxiety-like behaviors in mice: behavioral and neural correlates. *Frontiers in behavioral neuroscience*. 2019;13:6.
10. Ponsford J, Draper K, Schönberger M. Functional outcome 10 years after traumatic brain injury: its relationship with demographic, injury severity, and cognitive and emotional status. *Journal of the International Neuropsychological Society*. 2008;14(2):233-42.
11. Kempuraj D, Ahmed ME, Selvakumar GP, Thangavel R, Raikwar SP, Zaheer SA, et al. Acute traumatic brain injury-induced neuroinflammatory response and neurovascular disorders in the brain. *Neurotoxicity research*. 2021;39(2):359-68.
12. Albert-Weissenberger C, Várrallyay C, Raslan F, Kleinschnitz C, Sirén A-L. An experimental protocol for mimicking pathomechanisms of traumatic brain injury in mice. *Experimental & translational stroke medicine*. 2012;4(1):1-5.
13. Chodobski A, Zink BJ, Szmydynger-Chodobska J. Blood–brain barrier pathophysiology in traumatic brain injury. *Translational stroke research*. 2011;2(4):492-516.
14. Crupi R, Cordaro M, Cuzzocrea S, Impellizzeri D. Management of traumatic brain injury: from present to future. *Antioxidants*. 2020;9(4):297.
15. Ladak AA, Enam SA, Ibrahim MT. A review of the molecular mechanisms of traumatic brain injury. *World neurosurgery*. 2019;131:126-32.
16. Shultz SR, Sun M, Wright DK, Brady RD, Liu S, Beynon S, et al. Tibial fracture exacerbates traumatic brain injury outcomes and neuroinflammation in a novel mouse model of multitrauma. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2015;35(8):1339-47.
17. Probst C, Mirzayan M, Mommsen P, Zeckey C, Tegeder T, Geerken L, et al. Systemic inflammatory effects of traumatic brain injury, femur fracture, and

- shock: an experimental murine polytrauma model. *Mediators of inflammation*. 2012;2012.
18. Mira JC, Nacionales DC, Loftus TJ, Ungaro R, Mathias B, Mohr AM, et al. Mouse injury model of polytrauma and shock. *Traumatic and Ischemic Injury*. 2018;1-15.
 19. Maegele M, Sauerland S, Bouillon B, Schäfer U, Trübel H, Riess P, et al. Differential immunoresponses following experimental traumatic brain injury, bone fracture and “two-hit”-combined neurotrauma. *Inflammation Research*. 2007;56(8):318-23.
 20. Butcher N, Balogh ZJ. The definition of polytrauma: the need for international consensus. *Injury*. 2009;40:S12-S22.
 21. Harrasser N, Biberthaler P. Polytrauma und Komplikationsmanagement. *Facharztwissen Orthopädie Unfallchirurgie*: Springer; 2016. p. 185-203.
 22. Trentz O, Oestern H, Hempelmann G, Kolbow H, Sturm J, Trentz O, et al. Kriterien für die Operabilität von Polytraumatisierten. *Unfallheilkd*. 1978;81(6).
 23. Pape H-C, Lefering R, Butcher N, Peitzman A, Leenen L, Marzi I, et al. The definition of polytrauma revisited: an international consensus process and proposal of the new ‘Berlin definition’. *Journal of trauma and acute care surgery*. 2014;77(5):780-6.
 24. COPEs WS, Champion HR, Sacco WJ, Lawnick MM, KEAST SL, BAIN LW. The injury severity score revisited. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*. 1988;28(1):69-77.
 25. Helm M, Bitzl A, Klinger S, Lefering R, Lampl L, Kulla M. Das TraumaRegister DGU® als Basis eines medizinischen Qualitätsmanagements. *Der Unfallchirurg*. 2013;116(7):624-32.
 26. raTraumaRegister D. Jahresbericht 2019. Sektion NIS der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie (DGU/AUC-Akademie der Unfallchirurgie GmbH). 2019.
 27. Ruchholtz S, Lefering R, Debus F, Mand C, Kühne C, Siebert H. TraumaNetzwerk DGU® und TraumaRegister DGU®. *Der Chirurg*. 2013;84(9):730-8.
 28. Gebhard F, Huber-Lang M. Polytrauma—pathophysiology and management principles. *Langenbeck's archives of surgery*. 2008;393(6):825.
 29. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*. 2002;420(6917):885-91.
 30. Campbell DJ. The kallikrein–kinin system in humans. *Clinical and experimental pharmacology and physiology*. 2001;28(12):1060-5.
 31. Köhl J. The role of complement in danger sensing and transmission. *Immunologic research*. 2006;34(2):157-76.
 32. Huber-Lang M, Sarma JV, Zetoune FS, Rittirsch D, Neff TA, McGuire SR, et al. Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nature medicine*. 2006;12(6):682-7.
 33. Chang R, Cardenas JC, Wade CE, Holcomb JB. Advances in the understanding of trauma-induced coagulopathy. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2016;128(8):1043-9.
 34. Davenport RA, Brohi K. Cause of trauma-induced coagulopathy. *Current Opinion in Anesthesiology*. 2016;29(2):212-9.
 35. Keel M, Trentz O. Pathophysiology of polytrauma. *Injury*. 2005;36(6):691-709.

36. Land WG. DAMP-Controlled and Uncontrolled Responses to Trauma: Wound Healing and Polytrauma. *Damage-Associated Molecular Patterns in Human Diseases*: Springer; 2020. p. 279-335.
37. Karasu E, Nilsson B, Köhl J, Lambris JD, Huber-Lang M. Targeting complement pathways in polytrauma-and sepsis-induced multiple-organ dysfunction. *Frontiers in immunology*. 2019;10:543.
38. Stahel P, Heyde C, Wyrwich W, Ertel W. Current concepts of polytrauma management: from ATLS to "damage control". *Der Orthopäde*. 2005;34(9):823-36.
39. Freude G, Mauer UM, Gässler H, Datzmann T. Prähospitaler Versorgung des Schädel-Hirn-Traumas. *Der Notarzt*. 2017;33(06):300-9.
40. Firsching R, Rickels E, Mauer U, Sakowitz O, Messing-Jünger M, Engelhard K. AWMF-Leitlinie Schädel-Hirn-Trauma im Erwachsenenalter. AWMF, Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie eV (DGNC). 2015;2016.
41. Teasdale G, Jennett B. Assessment of coma and impaired consciousness: a practical scale. *The Lancet*. 1974;304(7872):81-4.
42. Piek J. Schädel-Hirn-Trauma–Einteilung und Klassifikation. *Neurotraumatologie*. 2005;1:34-8.
43. Moecke H, Dirks B, Friedrich H, Hennes H, Lackner CK, Messelken M, et al. DIVI-Notarzteinsatzprotokoll, Version 4.0. *Intensivmedizin und Notfallmedizin*. 2000;37(1):78-81.
44. Rickels E, von Wild K, Wenzlaff P. Head injury in Germany: A population-based prospective study on epidemiology, causes, treatment and outcome of all degrees of head-injury severity in two distinct areas. *Brain injury*. 2010;24(12):1491-504.
45. Hackenberg K, Unterberg A. Schädel-Hirn-Trauma. *Der Nervenarzt*. 2016;87(2):203-16.
46. Roozenbeek B, Maas AI, Menon DK. Changing patterns in the epidemiology of traumatic brain injury. *Nature Reviews Neurology*. 2013;9(4):231.
47. Maas AI, Stocchetti N, Bullock R. Moderate and severe traumatic brain injury in adults. *The Lancet Neurology*. 2008;7(8):728-41.
48. Rosenfeld JV, Maas AI, Bragge P, Morganti-Kossmann MC, Manley GT, Gruen RL. Early management of severe traumatic brain injury. *The Lancet*. 2012;380(9847):1088-98.
49. Cole TB. Global road safety crisis remedy sought. *Jama*. 2004;291(21):2531-2.
50. Feigin VL, Theadom A, Barker-Collo S, Starkey NJ, McPherson K, Kahan M, et al. Incidence of traumatic brain injury in New Zealand: a population-based study. *The Lancet Neurology*. 2013;12(1):53-64.
51. Li M, Zhao Z, Yu G, Zhang J. Epidemiology of traumatic brain injury over the world: a systematic review. *General medicine: open access*. 2016;4(5):e275-e.
52. Langlois JA, Rutland-Brown W, Wald MM. The epidemiology and impact of traumatic brain injury: a brief overview. *The Journal of head trauma rehabilitation*. 2006;21(5):375-8.
53. Baugh CM, Kiernan PT, Kroshus E, Daneshvar DH, Montenigro PH, McKee AC, et al. Frequency of head-impact–related outcomes by position in NCAA division I collegiate football players. *Journal of Neurotrauma*. 2015;32(5):314-26.

54. Rickels E, Wild K von, Wenzlaff P, Bock WJ (Hrsg)(2006) Schädel-Hirn-Verletzung. Epidemiologie und Versorgung Ergebnisse einer prospektiven Studie Zuckschwerdt, München.
55. Schunke M, Schulte E, Schumacher U. Prometheus Lernatlas der Anatomie. Kopf, Hals, und Neuroanatomie Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG. 2015.
56. Trepel M. Neuroanatomie: Struktur und Funktion (6. Aufl. ed.). München: Elsevier, Urban & Fischer; 2015.
57. Engelhard K, Müller-Forell W, Werner C. Therapie des schweren Schädel-Hirn-Traumas. *Der Anaesthesist*. 2008;57(12):1219-31.
58. Reilly P, Bullock R. Head Injury 2Ed: Pathophysiology & Management: CRC Press; 2005.
59. Meythaler JM, Peduzzi JD, Eleftheriou E, Novack TA. Current concepts: diffuse axonal injury-associated traumatic brain injury. *Archives of physical medicine and rehabilitation*. 2001;82(10):1461-71.
60. Smith DH. Neuromechanics and pathophysiology of diffuse axonal injury in concussion. *Bridge* (Washington, DC: 1969). 2016;46(1):79.
61. Baas T-SMPA, PW Smith DH Mechanical breaking of microtubules in axons during dynamic stretch injury underlies delayed elasticity, microtubule disassembly, and axon degeneration. *FASEB J*. 2010;24:1401-10.
62. Smith DH, Meaney DF, Shull WH. Diffuse axonal injury in head trauma. *The Journal of head trauma rehabilitation*. 2003;18(4):307-16.
63. Irfan B, Nayil M, Kaiser K, Altaf R, Hilal S, Abrar W, et al. Burden of Moderate and Severe Head Injury in Kashmir Valley. *Indian Journal of Neurotrauma*. 2020.
64. LEE AYW, Ng SY. Traumatic brain injuries: pathophysiology and potential therapeutic targets. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2019;13:528.
65. Hinson HE, Rowell S, Schreiber M. Clinical evidence of inflammation driving secondary brain injury: a systematic review. *The journal of trauma and acute care surgery*. 2015;78(1):184.
66. Chesnut RM, Marshall LF, Klauber MR, Blunt BA, Baldwin N, Eisenberg HM, et al. The role of secondary brain injury in determining outcome from severe head injury. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*. 1993;34(2):216-22.
67. Katsura K-i, Kristián T, Siesjö BK. Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain. Portland Press Ltd.; 1994.
68. Werner C, Engelhard K. Pathophysiology of traumatic brain injury. *BJA: British Journal of Anaesthesia*. 2007;99(1):4-9.
69. Blennow K, Hardy J, Zetterberg H. The neuropathology and neurobiology of traumatic brain injury. *Neuron*. 2012;76(5):886-99.
70. Khatri N, Thakur M, Pareek V, Kumar S, Sharma S, Datusalia AK. Oxidative stress: major threat in traumatic brain injury. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)*. 2018;17(9):689-95.
71. Prins M, Greco T, Alexander D, Giza CC. The pathophysiology of traumatic brain injury at a glance. *Disease models & mechanisms*. 2013;6(6):1307-15.
72. Hiebert JB, Shen Q, Thimmesch AR, Pierce JD. Traumatic brain injury and mitochondrial dysfunction. *The American journal of the medical sciences*. 2015;350(2):132-8.
73. Loane DJ, Byrnes KR. Role of microglia in neurotrauma. *Neurotherapeutics*. 2010;7(4):366-77.

74. Vilhardt F. Microglia: phagocyte and glia cell. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2005;37(1):17-21.
75. Loane DJ, Kumar A. Microglia in the TBI brain: the good, the bad, and the dysregulated. *Experimental neurology*. 2016;275:316-27.
76. Allan SM, Tyrrell PJ, Rothwell NJ. Interleukin-1 and neuronal injury. *Nature Reviews Immunology*. 2005;5(8):629-40.
77. Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Molecular brain research*. 1998;57(1):1-9.
78. Wang G, Zhang J, Hu X, Zhang L, Mao L, Jiang X, et al. Microglia/macrophage polarization dynamics in white matter after traumatic brain injury. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2013;33(12):1864-74.
79. Myer D, Gurkoff GG, Lee S, Hovda D, Sofroniew MV. Essential protective roles of reactive astrocytes in traumatic brain injury. *Brain*. 2006;129(10):2761-72.
80. Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nature neuroscience*. 2005;8(6):752-8.
81. Chio C-C, Lin M-T, Chang C-P. Microglial activation as a compelling target for treating acute traumatic brain injury. *Current medicinal chemistry*. 2015;22(6):759-70.
82. Shields DC, Haque A, Banik NL. Neuroinflammatory responses of microglia in central nervous system trauma. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2020;40(1_suppl):S25-S33.
83. Early AN, Gorman AA, Van Eldik LJ, Bachstetter AD, Morganti JM. Effects of advanced age upon astrocyte-specific responses to acute traumatic brain injury in mice. *Journal of neuroinflammation*. 2020;17(1):1-16.
84. Burda JE, Sofroniew MV. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron*. 2014;81(2):229-48.
85. Eng LF. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *Journal of neuroimmunology*. 1985;8:203-14.
86. Burda JE, Bernstein AM, Sofroniew MV. Astrocyte roles in traumatic brain injury. *Experimental neurology*. 2016;275:305-15.
87. Chen M-K, Guilarte TR. Translocator protein 18 kDa (TSPO): molecular sensor of brain injury and repair. *Pharmacology & therapeutics*. 2008;118(1):1-17.
88. Wang Z-M, Liu C, Wang Y-Y, Deng Y-S, He X-C, Du H-Z, et al. SerpinA3N deficiency deteriorates impairments of learning and memory in mice following hippocampal stab injury. *Cell Death Discovery*. 2020;6(1):1-11.
89. Hummel R, Ulbrich S, Appel D, Li S, Hirnet T, Zander S, et al. Administration of all-trans retinoic acid after experimental traumatic brain injury is brain protective. *British Journal of Pharmacology*.
90. Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of disease*. 2010;37(1):13-25.
91. Palpagama TH, Waldvogel HJ, Faull RL, Kwakowsky A. The role of microglia and astrocytes in Huntington's disease. *Frontiers in molecular neuroscience*. 2019;12:258.
92. Masek BE, DeWitt DS. Traumatic brain injury: a disease process, not an event. *Journal of neurotrauma*. 2010;27(8):1529-40.

93. Annegers JF, Hauser WA, Coan SP, Rocca WA. A population-based study of seizures after traumatic brain injuries. *New England Journal of Medicine*. 1998;338(1):20-4.
94. Tomkins O, Feintuch A, Benifla M, Cohen A, Friedman A, Shelef I. Blood-brain barrier breakdown following traumatic brain injury: a possible role in posttraumatic epilepsy. *Cardiovascular psychiatry and neurology*. 2011;2011.
95. Algattas H, Huang JH. Traumatic brain injury pathophysiology and treatments: early, intermediate, and late phases post-injury. *International journal of molecular sciences*. 2014;15(1):309-41.
96. Bramlett HM, Dietrich WD. Long-term consequences of traumatic brain injury: current status of potential mechanisms of injury and neurological outcomes. *Journal of neurotrauma*. 2015;32(23):1834-48.
97. Bramlett HM, Dietrich DW. Quantitative structural changes in white and gray matter 1 year following traumatic brain injury in rats. *Acta neuropathologica*. 2002;103(6):607-14.
98. Azouvi P, Arnould A, Dromer E, Vallat-Azouvi C. Neuropsychology of traumatic brain injury: An expert overview. *Revue neurologique*. 2017;173(7-8):461-72.
99. Elizalde N, Pastor PM, Garcia-García ÁL, Serres F, Venzala E, Huarte J, et al. Regulation of markers of synaptic function in mouse models of depression: chronic mild stress and decreased expression of VGLUT1. *Journal of neurochemistry*. 2010;114(5):1302-14.
100. Tordera RM, Totterdell S, Wojcik SM, Brose N, Elizalde N, Lasheras B, et al. Enhanced anxiety, depressive-like behaviour and impaired recognition memory in mice with reduced expression of the vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1). *European Journal of Neuroscience*. 2007;25(1):281-90.
101. Ling H, Hardy J, Zetterberg H. Neurological consequences of traumatic brain injuries in sports. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2015;66:114-22.
102. Bajwa NM, Kesavan C, Mohan S. Long-term consequences of traumatic brain injury in bone metabolism. *Frontiers in neurology*. 2018;9:115.
103. McDonald SJ, Sun M, Agoston DV, Shultz SR. The effect of concomitant peripheral injury on traumatic brain injury pathobiology and outcome. *Journal of neuroinflammation*. 2016;13(1):90.
104. Pape H-C, Marcucio R, Humphrey C, Colnot C, Knobe M, Harvey EJ. Trauma-induced inflammation and fracture healing. *Journal of orthopaedic trauma*. 2010;24(9):522-5.
105. Morioka K, Marmor Y, Sacramento JA, Lin A, Shao T, Miclau KR, et al. Differential fracture response to traumatic brain injury suggests dominance of neuroinflammatory response in polytrauma. *Scientific reports*. 2019;9(1):1-16.
106. McDonald SJ, Sharkey JM, Sun M, Kaukas LM, Shultz SR, Turner RJ, et al. Beyond the Brain: Peripheral Interactions after Traumatic Brain Injury. *Journal of Neurotrauma*. 2020;37(5):770-81.
107. Hau R, Martini U. PONS Wörterbuch für Schule und Studium Latein-Deutsch: PONS; 2012.
108. Meinberg EG, Agel J, Roberts CS, Karam MD, Kellam JF. Fracture and dislocation classification compendium—2018. *Journal of orthopaedic trauma*. 2018;32:S1-S10.
109. Baierlein SA. *Frakturklassifikationen*: Georg Thieme Verlag; 2010.
110. Raschke M, Haas N, Stöckle U. *Unfallchirurgie. Basiswissen Chirurgie*: Springer; 2010. p. 353-419.

111. Müller-Mai CM, Ekkernkamp A. Frakturen. Klassifikation und Behandlungsoptionen© Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2010.
112. Müller ME, Nazarian S, Koch P, Schatzker J. The comprehensive classification of fractures of long bones: Springer Science & Business Media; 2012.
113. Müller-Mai CM, Frank M. Klassifikationen in der Unfallchirurgie. Frakturen: Springer; 2010. p. 1-11.
114. Ghiasi MS, Chen J, Vaziri A, Rodriguez EK, Nazarian A. Bone fracture healing in mechanobiological modeling: A review of principles and methods. Bone reports. 2017;6:87-100.
115. Kalfas IH. Principles of bone healing. Neurosurgical focus. 2001;10(4):1-4.
116. Fazzalari N. Bone fracture and bone fracture repair. Osteoporosis international. 2011;22(6):2003-6.
117. Pivonka P, Dunstan CR. Role of mathematical modeling in bone fracture healing. BoneKEY reports. 2012;1.
118. Meyer Jr RA, Tsahakis PJ, Martin DF, Banks DM, Harrow ME, Kiebzak GM. Age and ovariectomy impair both the normalization of mechanical properties and the accretion of mineral by the fracture callus in rats. Journal of Orthopaedic Research. 2001;19(3):428-35.
119. Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG, editors. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. Seminars in cell & developmental biology; 2008: Elsevier.
120. Kon T, Cho TJ, Aizawa T, Yamazaki M, Nooh N, Graves D, et al. Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF- κ B ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. Journal of Bone and Mineral Research. 2001;16(6):1004-14.
121. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. Injury. 2011;42(6):551-5.
122. Newman RJ, Stone MH, Mukherjee SK. Accelerated fracture union in association with severe head injury. Injury. 1987;18(4):241-6.
123. Citta-Pietrolungo TJ, Alexander MA, Steg NL. Early detection of heterotopic ossification in young patients with traumatic brain injury. Archives of physical medicine and rehabilitation. 1992;73(3):258-62.
124. Morley J, Marsh S, Drakoulakis E, Pape H-C, Giannoudis PV. Does traumatic brain injury result in accelerated fracture healing? Injury. 2005;36(3):363-8.
125. Huang H, Cheng W-X, Hu Y-P, Chen J-H, Zheng Z-T, Zhang P. Relationship between heterotopic ossification and traumatic brain injury: why severe traumatic brain injury increases the risk of heterotopic ossification. Journal of orthopaedic translation. 2018;12:16-25.
126. Suzuki H, Hasegawa Y, Kanamaru K, Zhang JH. Mechanisms of osteopontin-induced stabilization of blood-brain barrier disruption after subarachnoid hemorrhage in rats. Stroke. 2010;41(8):1783-90.
127. Gao N, Zhang-Brotzge X, Wali B, Sayeed I, Chern JJ, Blackwell LS, et al. Plasma osteopontin may predict neuroinflammation and the severity of pediatric traumatic brain injury. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. 2020;40(1):35-43.
128. Sodek J, Ganss B, McKee M. Osteopontin. Critical Reviews in Oral Biology & Medicine. 2000;11(3):279-303.

129. Kesavan C, Rundle C, Mohan S. Repeated mild traumatic brain injury impairs fracture healing in male mice. *BMC Research Notes*. 2022;15(1):1-6.
130. Weidemeier ME. Inhibition der Metalloproteinase ADAM10 nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma in der Maus: Johannes Gutenberg-Universität Mainz; 2018.
131. Troß TC. Der Einfluss verschiedener inspiratorischer Sauerstoffkonzentrationen auf den sekundären Hirnschaden nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma in der Maus: Johannes Gutenberg-Universität Mainz; 2018.
132. Kleber LM. Die Funktion von Progranulin für die Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten in vitro und nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma in der Maus: Johannes Gutenberg-Universität Mainz; 2018.
133. Treiber MSH. Auswirkungen eines experimentellen Schädel-Hirn-Traumas in transgenen Mäusen mit neuronaler Expression einer dominant-negativen Form von ADAM10: Johannes Gutenberg-Universität Mainz; 2018.
134. Ritter K, Jung K, Dolderer C, Appel D, Oswald CC, Ritz U, et al. Early reciprocal effects in a murine model of traumatic brain injury and femoral fracture. *Mediators of inflammation*. 2021;2021.
135. Garcia Bardon A. Der Einfluss des Angiotensin-II-Typ-2-Agonisten Compound 21 auf den neuronalen Schaden bei der Maus nach traumatischer Hirnläsion mittels Controlled Cortical Impact: Mainz, Univ., Diss., 2013; 2013.
136. Yang L, Guo Y, Wen D, Yang L, Chen Y, Zhang G, et al. Bone fracture enhances trauma brain injury. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2016;83(1):26-32.
137. Xiong Y, Mahmood A, Chopp M. Animal models of traumatic brain injury. *Nature Reviews Neuroscience*. 2013;14(2):128-42.
138. Holstein JH, Matthys R, Histing T, Becker SC, Fiedler M, Garcia P, et al. Development of a stable closed femoral fracture model in mice. *J Surg Res*. 2009;153(1):71-5.
139. Kilkeny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol*. 2010;8(6):e1000412.
140. Graeff FG, Netto CF, Zangrossi Jr H. The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 1998;23(2):237-46.
141. Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature protocols*. 2007;2(2):322-8.
142. Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*. 1987;92(2):180-5.
143. Takeda H, Tsuji M, Matsumiya T. Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. *European journal of pharmacology*. 1998;350(1):21-9.
144. Rodgers R, Cole J. Anxiety enhancement in the murine elevated plus maze by immediate prior exposure to social stressors. *Physiology & behavior*. 1993;53(2):383-8.
145. Technology NI. Elevated plus maze. 2021
146. Kádár A, Wittmann G, Liposits Z, Fekete C. Improved method for combination of immunocytochemistry and Nissl staining. *Journal of neuroscience methods*. 2009;184(1):115-8.

147. Stanly TA, Fritzsche M, Banerji S, Garcia E, Bernardino de la Serna J, Jackson DG, et al. Critical importance of appropriate fixation conditions for faithful imaging of receptor microclusters. *Biol Open*. 2016;5(9):1343-50.
148. Lin MS, Comings DE, Alfi OS. Optical Studies of the interaction of 4'-6'-diamidino-2-phenylindole with DNA and metaphase chromosomes. *Chromosoma*. 1977;60(1):15-25.
149. Krause G, Scherer, G., Müller, M. and Weiß, T. Grundlagen der Polymerasekettenreaktion (PCR) [Biomonitoring Methods in German language, 2004]. The MAK-Collection for Occupational Health and Safety 2004. p. 321-55.
150. Bensadoun A, Weinstein D. Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Analytical biochemistry*. 1976;70(1):241-50.
151. Hames BD. Gel electrophoresis of proteins: a practical approach: OUP Oxford; 1998.
152. Burkholder T, Foltz C, Karlsson E, Linton CG, Smith JM. Health evaluation of experimental laboratory mice. *Current protocols in mouse biology*. 2012;2(2):145-65.
153. Jeong JY, Lee DH, Kang SS. Effects of chronic restraint stress on body weight, food intake, and hypothalamic gene expressions in mice. *Endocrinology and metabolism*. 2013;28(4):288-96.
154. Jones B, Roberts D. The quantitative measurement of motor incoordination in naive mice using an accelerating rotarod. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1968;20(4):302-4.
155. Hamm RJ, Pike BR, O'DELL DM, Lyeth BG, Jenkins LW. The rotarod test: an evaluation of its effectiveness in assessing motor deficits following traumatic brain injury. *Journal of neurotrauma*. 1994;11(2):187-96.
156. Wei L, Zhang J, Zhang B, Geng J, Tan Q, Wang L, et al. Complement C3 participates in the function and mechanism of traumatic brain injury at simulated high altitude. *Brain Research*. 2020;1726:146423.
157. Pike BR, Zhao X, Newcomb JK, Posmantur RM, Wang KK, Hayes RL. Regional calpain and caspase-3 proteolysis of α -spectrin after traumatic brain injury. *Neuroreport*. 1998;9(11):2437-42.
158. Yan X-X, Jeromin A. Spectrin breakdown products (SBDPs) as potential biomarkers for neurodegenerative diseases. *Current translational geriatrics and experimental gerontology reports*. 2012;1(2):85-93.
159. Sahbaie P, Tajerian M, Yang P, Irvine KA, Huang T-T, Luo J, et al. Nociceptive and cognitive changes in a murine model of polytrauma. *The Journal of Pain*. 2018;19(12):1392-405.
160. Gentile LF, Nacionales DC, Cuenca AG, Armbruster M, Ungaro RF, Abouhamze AS, et al. Identification and description of a novel murine model for polytrauma and shock. *Critical care medicine*. 2013;41(4):1075.
161. Mestas J, Hughes CC. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *The Journal of Immunology*. 2004;172(5):2731-8.
162. Gunderson ZJ, Campbell ZR, McKinley TO, Natoli RM, Kacena MA. A comprehensive review of mouse diaphyseal femur fracture models. *Injury*. 2020;51(7):1439-47.
163. Augat P, Margevicius K, Simon J, Wolf S, Suger G, Claes L. Local tissue properties in bone healing: influence of size and stability of the osteotomy gap. *Journal of Orthopaedic Research*. 1998;16(4):475-81.
164. Goodship A, Kenwright J. The influence of induced micromovement upon the healing of experimental tibial fractures. *The Journal of bone and joint surgery British volume*. 1985;67(4):650-5.

-
165. Suckel A, Müntst P, Mocke U. Die rotationsstabile intramedulläre Osteosynthese von proximalen extraartikulären Femurfrakturen. *Zeitschrift für Orthopädie und ihre Grenzgebiete*. 2006;144(05):532-8.
166. Chen Y, Mao H, Yang KH, Abel T, Meaney DF. A modified controlled cortical impact technique to model mild traumatic brain injury mechanics in mice. *Frontiers in neurology*. 2014;5:100.
167. O'Connor WT, Smyth A, Gilchrist MD. Animal models of traumatic brain injury: a critical evaluation. *Pharmacology & therapeutics*. 2011;130(2):106-13.
168. Gilchrist MD. Experimental device for simulating traumatic brain injury resulting from linear accelerations. *Strain*. 2004;40(4):180-92.
169. Vogel A, Wilken-Schmitz A, Hummel R, Lang M, Gurke R, Schreiber Y, et al. Low brain endocannabinoids associated with persistent non-goal directed nighttime hyperactivity after traumatic brain injury in mice. *Scientific Reports*. 2020;10(1):1-22.
170. Menzel L, Kleber L, Friedrich C, Hummel R, Dangel L, Winter J, et al. Progranulin protects against exaggerated axonal injury and astrogliosis following traumatic brain injury. *Glia*. 2017;65(2):278-92.
171. Sebastiani A, Gölz C, Werner C, Schäfer MK, Engelhard K, Thal SC. Proneurotrophin binding to P75 neurotrophin receptor (P75ntr) is essential for brain lesion formation and functional impairment after experimental traumatic brain injury. *Journal of neurotrauma*. 2015;32(20):1599-607.
172. Bachmann B. Untersuchungen zur neuroprotektiven Potenz des Matrix-Metalloprotease-Inhibitors Batimastat nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma im Mausmodell: Johannes Gutenberg-Universität Mainz; 2019.
173. Weckbach S, Hohmann C, Braumueller S, Denk S, Klohs B, Stahel PF, et al. Inflammatory and apoptotic alterations in serum and injured tissue after experimental polytrauma in mice: distinct early response compared with single trauma or "double-hit" injury. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*. 2013;74(2):489-98.
174. Simon DW, Vagni VM, Kochanek PM, Clark RS. Combined neurotrauma models: experimental models combining traumatic brain injury and secondary insults. *Injury Models of the Central Nervous System*: Springer; 2016. p. 393-411.
175. Sun M, Brady RD, Poel Cvd, Apted D, Semple BD, Church JE, et al. A concomitant muscle injury does not worsen traumatic brain injury outcomes in mice. *Frontiers in Neurology*. 2018:1089.
176. Denk S, Weckbach S, Eisele P, Braun CK, Wiegner R, Ohmann JJ, et al. Role of hemorrhagic shock in experimental polytrauma. *Shock: Injury, Inflammation, and Sepsis: Laboratory and Clinical Approaches*. 2018;49(2):154-63.
177. Frink M, Andruszkow H, Zeckey C, Krettek C, Hildebrand F. Experimental trauma models: an update. *Journal of biomedicine and biotechnology*. 2011;2011.
178. Osier ND, Dixon CE. The controlled cortical impact model: applications, considerations for researchers, and future directions. *Frontiers in neurology*. 2016;7:134.
179. Haffner-Luntzer M, Kovtun A, Rapp AE, Ignatius A. Mouse models in bone fracture healing research. *Current Molecular Biology Reports*. 2016;2(2):101-11.
180. Neuerburg C, Stumpf U, Mutschler W. Osteoporose. *Der Unfallchirurg*. 2015;118(11):904-.

181. Marklund N, Hillered L. Animal modelling of traumatic brain injury in preclinical drug development: where do we go from here? *British journal of pharmacology*. 2011;164(4):1207-29.
182. Shavit-Stein E, Gerasimov A, Aharoni S, Gofrit SG, Pikus E, Pick CG, et al. Unexpected role of stress as a possible resilience mechanism upon mild traumatic brain injury (mTBI) in mice. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2021;111:103586.
183. Neils-Strunjas J, Paul D, Clark AN, Mudar R, Duff MC, Waldron-Perrine B, et al. Role of resilience in the rehabilitation of adults with acquired brain injury. *Brain Injury*. 2017;31(2):131-9.
184. Sullivan KA, Kempe CB, Edmed SL, Bonanno GA. Resilience and other possible outcomes after mild traumatic brain injury: a systematic review. *Neuropsychology review*. 2016;26(2):173-85.
185. Foreman BP, Caesar RR, Parks J, Madden C, Gentilello LM, Shafi S, et al. Usefulness of the abbreviated injury score and the injury severity score in comparison to the Glasgow Coma Scale in predicting outcome after traumatic brain injury. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*. 2007;62(4):946-50.
186. Fitschen-Oestern S, Lippross S, Klueter T, Weuster M, Varoga D, Tohidnezhad M, et al. A new multiple trauma model of the mouse. *BMC musculoskeletal disorders*. 2017;18(1):1-12.
187. Rustay NR, Wahlsten D, Crabbe JC. Influence of task parameters on rotarod performance and sensitivity to ethanol in mice. *Behavioural brain research*. 2003;141(2):237-49.
188. Bolivar VJ, Caldarone BJ, Reilly AA, Flaherty L. Habituation of activity in an open field: a survey of inbred strains and F1 hybrids. *Behavior genetics*. 2000;30(4):285-93.
189. Pullela R, Raber J, Pfankuch T, Ferriero DM, Claus CP, Koh S-E, et al. Traumatic injury to the immature brain results in progressive neuronal loss, hyperactivity and delayed cognitive impairments. *Developmental neuroscience*. 2006;28(4-5):396-409.
190. Shultz SR, Tan XL, Wright DK, Liu SJ, Semple BD, Johnston L, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is neuroprotective in experimental traumatic brain injury. *Journal of neurotrauma*. 2014;31(10):976-83.
191. Shultz SR, Cardamone L, Liu YR, Hogan RE, Maccotta L, Wright DK, et al. Can structural or functional changes following traumatic brain injury in the rat predict epileptic outcome? *Epilepsia*. 2013;54(7):1240-50.
192. Max JE, Schachar RJ, Levin HS, Ewing-Cobbs L, Chapman SB, Dennis M, et al. Predictors of secondary attention-deficit/hyperactivity disorder in children and adolescents 6 to 24 months after traumatic brain injury. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*. 2005;44(10):1041-9.
193. Narad ME, Kennelly M, Zhang N, Wade SL, Yeates KO, Taylor HG, et al. Secondary attention-deficit/hyperactivity disorder in children and adolescents 5 to 10 years after traumatic brain injury. *JAMA pediatrics*. 2018;172(5):437-43.
194. Tajerian M, Leu D, Zou Y, Sahbaie P, Li W, Khan H, et al. Brain neuroplastic changes accompany anxiety and memory deficits in a model of complex regional pain syndrome. *Anesthesiology*. 2014;121(4):852-65.
195. Shi X, Guo T-z, Li W, Sahbaie P, Rice KC, Sulima A, et al. Exercise reverses nociceptive sensitization, upregulated neuropeptide signaling, inflammatory changes, anxiety, and memory impairment in a mouse tibia fracture

- model. *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists*. 2018;129(3):557-75.
196. Deacon RM, Rawlins JNP. Hippocampal lesions, species-typical behaviours and anxiety in mice. *Behavioural brain research*. 2005;156(2):241-9.
197. Åberg E, Perlmann T, Olson L, Brené S. Running increases neurogenesis without retinoic acid receptor activation in the adult mouse dentate gyrus. *Hippocampus*. 2008;18(8):785-92.
198. Wang X, Gao X, Michalski S, Zhao S, Chen J. Traumatic brain injury severity affects neurogenesis in adult mouse hippocampus. *Journal of neurotrauma*. 2016;33(8):721-33.
199. Balu DT, Lucki I. Adult hippocampal neurogenesis: regulation, functional implications, and contribution to disease pathology. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2009;33(3):232-52.
200. Krukowski K, Chou A, Feng X, Tired B, Paladini M-S, Riparip L-K, et al. Traumatic brain injury in aged mice induces chronic microglia activation, synapse loss, and complement-dependent memory deficits. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(12):3753.
201. Byrnes KR, Loane DJ, Stoica BA, Zhang J, Faden AI. Delayed mGluR5 activation limits neuroinflammation and neurodegeneration after traumatic brain injury. *Journal of neuroinflammation*. 2012;9(1):1-15.
202. Witcher KG, Bray CE, Dziabis JE, McKim DB, Benner BN, Rowe RK, et al. Traumatic brain injury-induced neuronal damage in the somatosensory cortex causes formation of rod-shaped microglia that promote astrogliosis and persistent neuroinflammation. *Glia*. 2018;66(12):2719-36.
203. Hirsch S, Ibrahim A, Krämer L, Escolano-Lozano F, Schlereth T, Birklein F. Bone trauma causes massive but reversible changes in spinal circuitry. *The Journal of Pain*. 2017;18(4):468-76.
204. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica*. 2010;119(1):7-35.
205. Hammad A, Westacott L, Zaben M. The role of the complement system in traumatic brain injury: a review. *Journal of neuroinflammation*. 2018;15(1):24.
206. Ehrnthaller C, Huber-Lang M, Nilsson P, Bindl R, Redeker S, Recknagel S, et al. Complement C3 and C5 deficiency affects fracture healing. *PloS one*. 2013;8(11):e81341.
207. Brady RD, Shultz SR, Sun M, Romano T, Van Der Poel C, Wright DK, et al. Experimental traumatic brain injury induces bone loss in rats. *Journal of Neurotrauma*. 2016;33(23):2154-60.
208. Zamanian JL, Xu L, Foo LC, Nouri N, Zhou L, Giffard RG, et al. Genomic analysis of reactive astrogliosis. *Journal of neuroscience*. 2012;32(18):6391-410.
209. Aslam MS, Yuan L. Serpina3n: potential drug and challenges, mini review. *Journal of drug targeting*. 2020;28(4):368-78.
210. Al Nimer F, Beyeen AD, Lindblom R, Ström M, Aeinehband S, Lidman O, et al. Both MHC and non-MHC genes regulate inflammation and T-cell response after traumatic brain injury. *Brain, behavior, and immunity*. 2011;25(5):981-90.
211. Sears SM, Hewett SJ. Influence of glutamate and GABA transport on brain excitatory/inhibitory balance. *Experimental Biology and Medicine*. 2021;246(9):1069-83.
212. Lu K-T, Wang Y-W, Yang J-T, Yang Y-L, Chen H-I. Effect of interleukin-1 on traumatic brain injury-induced damage to hippocampal neurons. *Journal of neurotrauma*. 2005;22(8):885-95.

-
213. Woodcock T, Morganti-Kossmann C. The role of markers of inflammation in traumatic brain injury. *Frontiers in neurology*. 2013;4:18.
 214. Degos V, Maze M, Vacas S, Hirsch J, Guo Y, Shen F, et al. Bone fracture exacerbates murine ischemic cerebral injury. *Anesthesiology*. 2013;118(6):1362-72.
 215. Li Z, Wei M, Lyu H, Huo K, Wang L, Zhang M, et al. Fracture shortly before stroke in mice leads to hippocampus inflammation and long-lasting memory dysfunction. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2020;40(2):446-55.
 216. McNeela AM, Bernick C, Hines RM, Hines DJ. TSPO regulation in reactive gliotic diseases. *Journal of neuroscience research*. 2018;96(6):978-88.
 217. Papadopoulos V, Lecanu L. Translocator protein (18 kDa) TSPO: an emerging therapeutic target in neurotrauma. *Experimental neurology*. 2009;219(1):53-7.
 218. Donat CK, Scott G, Gentleman SM, Sastre M. Microglial activation in traumatic brain injury. *Frontiers in aging neuroscience*. 2017;9:208.
 219. McKee MD, Pedraza CE, Kaartinen MT. Osteopontin and wound healing in bone. *Cells Tissues Organs*. 2011;194(2-4):313-9.
 220. Chan JL, Reeves TM, Phillips LL. Osteopontin expression in acute immune response mediates hippocampal synaptogenesis and adaptive outcome following cortical brain injury. *Experimental neurology*. 2014;261:757-71.
 221. Jiang R, Prell C, Lönnerdal B. Milk osteopontin promotes brain development by up-regulating osteopontin in the brain in early life. *The FASEB Journal*. 2019;33(2):1681-94.

Danksagung

Herzlich danken möchte ich ..., Leiter der Arbeitsgruppe Neuroprotektion der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, für die Möglichkeit an diesem spannenden Projekt teilhaben zu dürfen. Vielen Dank für die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe Neuroprotektion sowie für die angenehme und unkomplizierte Kommunikation und die Ratschläge während der ganzen Zeit.

Besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Sie hatte immer die passenden Ratschläge und half mir bei all meinen Fragen. Sie führte mich durch Testverfahren und die statistische Auswertung und gab mir neue Sichtweisen auf so manche Sachverhalte, wodurch jede von ihren durchgeführten Korrekturen ein großer Gewinn für mich und diese Arbeit waren.

Außerdem gebührt mein Dank den großartigen Menschen der Forschungsgruppe Neuroprotektion mit denen ich für dieses Projekt zusammenarbeiten durfte, von ihnen lernen durfte, mit ihnen lachen durfte und ohne deren Hilfe viele Schritte nicht umsetzbar gewesen wären. Vielen Dank an euch: ..., ..., ... und

Ebenso gilt mein Dank ... für die gegenseitige Unterstützung und dem ständigen Austausch, der maßgeblich für die nötige Motivation war.

Weiterhin gilt mein Dank den großen und wichtigen Unterstützern in meinem Leben. Vor allem meiner Großmutter, die mir die Gelassenheit, den Mut sowie den Blick nach vorne mitgegeben hat, um meinen Weg zu gehen. Meinem Vater sowie meinen „Nachbarn“ ... und ..., welche zu den tragenden Säulen in meinem Leben gehören. Sowie allen Menschen, die mich in meinem Leben bisher begleitet haben und mir die vielen Erfahrungen des Lebens geschenkt haben.

Lebenslauf

