

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

Auswirkungen einer Antibiotika-induzierten Dysbiose auf den sekundären
Hirnschaden nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma in der Maus

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Universitätsmedizin der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz
vorgelegt von

Diana Vetter
aus Kaiserslautern

Mainz, 2023

Tag der Promotion: 19.05.2023

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	V
1. Einführung.....	1
2 Literaturdiskussion.....	3
2.1 Das zentrale Nervensystem des Menschen	3
2.1.1 Neurone und Gliazellen	5
2.2 Das enterische Nervensystem des Menschen	7
2.3 Das Schädel-Hirn-Trauma (SHT)	8
2.3.1 Allgemeines und Einteilung.....	8
2.3.2 Epidemiologie des SHT	10
2.3.3 Pathophysiologie des SHT.....	11
2.3.4 Prävention und Therapie.....	12
2.4 Entzündungsmediatoren/ Interleukine	14
2.5 Interaktion des zentralen und enterischen Nervensystems nach SHT	17
2.5.1 Das Mikrobiom	17
2.5.2 Reaktion des Gastrointestinaltrakt nach SHT	19
2.6 Antibiotika	21
2.7 Tiermodel Diskussion	22
3 Methoden	23
3.1 Genehmigung der Tierversuche	23
3.2 Tiere	23
3.2.1 Versuchstiere für Vorstudie (Antibiotikatrinkversuch).....	23
3.2.2 Versuchstiere für Antibiotikastudie.....	23
3.2.3 Haltung und Pflege der Versuchstiere	23
3.3 Operation.....	25
3.3.1 Inhalationsanästhesie	25
3.3.2 CCI Model (Controlled cortical impact)	26
3.3.3 Verfahren Scheinoperation	27
3.3.4 Postoperative Versorgung.....	28
3.3.5 Operationsprotokoll	29
3.4 Antibiotikagabe	30
3.5 Analyse der motorischen Funktion	31
3.5.1 Neurological Severity Score (NSS).....	31
3.6 Rotarod Test (RR)	34
3.7 Kotprobenentnahme	35
3.8 Euthanasie und Gewebeentnahme	35

3.8.1	Gehirnentnahme	35
3.8.2	Entnahme des Darmgewebes.....	36
3.9	Anfertigung der Hirnschnitte	37
3.9.1	Kryostat.....	37
3.9.2	Vorbereitung Gehirn.....	37
3.9.3	Das Schneiden.....	38
3.10	Histologische Färbung.....	39
3.10.1	Kresylviolett	39
3.11	Kontusionsvolumen.....	41
3.12	Proteinanalysen	42
3.12.1	Proteinextraktion und Konzentrationsbestimmung	42
3.12.2	Elektrophorese	43
3.12.3	Western Blot	44
3.12.4	Dot Blot Immunglobulin G.....	45
3.13	mRNA-Extraktion.....	46
3.14	cDNA Synthese.....	47
3.15	PCR.....	48
3.16	Immunhistochemische Färbung	51
3.17	Quantifizierung der Immunhistochemie.....	52
3.18	Statistische Auswertung.....	53
4	Material.....	54
4.1	Geräte	54
4.2	Chemikalien.....	55
4.3	Medikamente	56
4.4	Antikörper	57
4.5	Lösungen und Puffer	58
4.6	Kits	59
4.7	Primer.....	59
4.8	Software	60
4.9	Verbrauchsmaterialien.....	61
5	Ergebnisse	62
5.1	Gewicht	63
5.2	Rotarod.....	65
5.3	Neurological Severity Score (NSS).....	66
5.4	Caecum Gewicht	68
5.5	Kontusionsvolumen	70
5.5.1	Gesamtes Gehirnvolumen	71
5.5.2	Volumen der contralateralen Hemisphäre.....	72

5.5.3	Volumen der ipsilateralen Hemisphäre	73
5.5.4	Kontusionsvolumen der ipsilateralen Hemisphäre in Prozent	74
5.6	IgG Dot Blot.....	75
5.7	Proteinanalyse.....	77
5.7.1	GFAP	77
5.7.2	Spectrin.....	78
5.8	PCR.....	79
5.8.1	IL-1 β	79
5.8.2	IL-6.....	81
5.8.3	HMGB1	83
5.8.4	GFAP	84
5.8.5	TNF α	86
5.8.6	IFN γ	88
5.8.7	TSPO	90
5.8.8	MHC 2.....	92
5.8.9	CD3+ Zellen.....	94
5.9	Immunhistochemie	96
5.9.1	Iba1.....	96
5.9.2	GFAP	98
7	Ergebnisdiskussion.....	102
7.1	Veränderungen des Gastrointestinaltraktes	102
7.1.1	Caecumveränderungen	102
7.1.2	Veränderungen des Mikrobioms	103
7.1.3	Einfluss von Lactobacillus acidophilus	103
7.2	Stabilisierung der Blut-Hirn-Schranke durch Antibiotika	105
7.3	GFAP und Spectrin.....	106
7.4	Interleukin 1 β vermittelte Mikroglia Aktivierung	107
7.5	IL-6 und erhöhter intrakranieller Druck (ICP).....	108
7.6	Regulatorische T-Zellen (T-reg.) als prognostischer Parameter.....	108
7.7	Immunhistochemie	110
7.7.1	Iba1.....	110
7.7.2	GFAP	110
7.7.3	MHC2 und CD3 positive Zellen.....	110
7.	Zusammenfassung.....	112
8.	Literaturverzeichnis	114
9	Danksagung	126
10	Tabellarischer Lebenslauf.....	127

Abkürzungsverzeichnis

(CCI)	Controlled Cortical Impact
(SHT)	Schädel-Hirn-Trauma
AHR	aryl hydrocarbon receptor
AK	Antikörper
CT	Computertomografie
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DDIT4	DNA-damage-inducible transcript 4
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GALT/MALT	gut-/mucosa-associated lymphoid tissue
GAPDH	Glycerinaldehyd-3- phosphat-Dehydrogenase
GCS	Glasgow Coma Scale
GF	Germ free (Mäuse ohne eigenes Mikrobiom)
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GIT	Gastrointestinaltrakt
GV-SOLAS	Gesellschaft für Versuchstierkunde, Society für Laboratory Animal Science
HMGB1	High-mobility group protein 1
Iba 1	Ionized Calcium Binding Adapter Molecule 1
ICP	Intrakranieller Druck
IFN γ	Inetrferon alpha
IgG	Immunglobulin G
IL-1I	Interleukin 1
IL-10	Interleukin 10
IL-13	Siehe, Interleukin 13
IL-1 β	Interleukin 1 beta
IL-4	Interleukin 4
IL-6	Interleukin 6
LCMV	lymphocytic choriomeningitis virus
LPS	Lipopolysaccharid
MBP	myelin basic protein
MHC 2	major-histocompatibility-complex 2
MRT	Magnetresonanztomografie
mTOR	mechanistisc mechanistic target of rapamycin
NMDA	N-methyl-d-aspartat
NSE	Neuronenspezifische Enolase
NSS	Neurological Serverity Score
OD	Optische Dichte
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PNS	Periphere Nervensystem
PPIA	Peptidylprolyl Isomerase A
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer
RR	Rotarod
RT	Raumtemperatur
SDS -PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SPF	specific-pathogen-free

TARC..... Translational Animal Research Center
TBST Tris-Hydroximethyl-Aminomethan gepufferte Salzlösung
TNBS 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure
TNF α Tumornekrosefaktor alpha
TR-DGU..... Trauma Register der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie
T-reg.....Regulatorische T-Zellen
TSPO.....Translokatorprotein
ZNSZentrale Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Aufbau des menschlichen Gehirns aus Prometheus Lernatlas	4
Abbildung 2 Die Gehirn-Darm-Achse.....	20
Abbildung 3 CCI Methode, modifiziert nach Onyszchuk.....	27
Abbildung 4 Inkubator.....	28
Abbildung 5 Koordinationsprüfung	32
Abbildung 6 Rotarod	34
Abbildung 7 entnommenes Mausgehirn in Probenbeutel.....	36
Abbildung 9 Mausgehirn in Einbettmedium auf Objektträger, Markierung am Oberrand	37
Abbildung 8 Mausgehirn in Einbettmedium auf Objektträger	37
Abbildung 10 Screenshot ZEN 2 Software eines Hirnschnittes. Läsionsvolumen rot umrandet markiert	41
Abbildung 11 Zyklusphasen PCR GFAP/HMGB1	49
Abbildung 12 Zyklusphasen PCR IL1b/IL6	50
Abbildung 13 Entwicklung Gewicht	63
Abbildung 14 Rotarod	65
Abbildung 15 NSS	66
Abbildung 16 Caecumgewicht.....	68
Abbildung 17 Caecumgewicht Graph	69
Abbildung 18 Kontusionsvolumen CCI AB- CCI Veh	70
Abbildung 19 gesamtes Gehirnvolumen CCI AB- CCI Veh	71
Abbildung 20 contralaterale Hemisphäre CCI AB - CCI Veh.....	72
Abbildung 21 ipsilaterale Hemisphäre CCI AB- CCI Veh.....	73
Abbildung 22 Kontusionsvolumen der ipsilateralen Hemisphäre CCI AB - CCI Veh	74
Abbildung 23 IgG Dot Blot Fluoreszenzsignal	75
Abbildung 24 IgG Immunfluoreszenz.....	76
Abbildung 25 Proteinanalyse GFAP	77
Abbildung 26 Proteinanalyse Spectrin	78
Abbildung 27 PCR IL-1 β	79
Abbildung 28 PCR IL-6	81
Abbildung 29 PCR HMGB1	83
Abbildung 30 PCR GFAP	84
Abbildung 31 PCR TNF α	86
Abbildung 32 PCR IFN γ	88
Abbildung 33 PCR TSPO.....	90
Abbildung 34 PCR MHC 2	92
Abbildung 35 PCR CD3+ Zellen.....	94
Abbildung 36 IHC Iba 1.....	96
Abbildung 37 IHC GFAP.....	98
Abbildung 38 IHC Färbung Anti-Iba 1	100
Abbildung 39 IHC Färbung Anti GFAP.....	101
Abbildung 40 Vergrößertes Caecum bei antibiotisch behandelten Mäusen Erny et.al. 2015	102
Abbildung 41 Vergrößertes Caecum antibiotisch behandelte Tiere in dieser Arbeit	102

Abbildung 42 Läsionsvolumina nach Stroke unter Antibiotikatherapie bei unterschiedlicher Resistenzlage	106
Abbildung 43 Schaubild Interaktion Entzündungsmediatoren.....	109

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 RIPA Puffer	42
Tabelle 2 Lowry DC Protein Assay Progema	43
Tabelle 3 Primärantikörper	44
Tabelle 4 TankBlot	45
Tabelle 5 Primärantikörper IHC	51
Tabelle 6 Sekundärantikörper IHC	52
Tabelle 7 Geräteliste	54
Tabelle 8 Chemikalien	55
Tabelle 9 Medikamente	56
Tabelle 10 Antikörper 1	57
Tabelle 11 Antikörper 2	57
Tabelle 12 Lösungen und Puffer	58
Tabelle 13 Kits	59
Tabelle 14 Primer	59
Tabelle 15 Software	60
Tabelle 16 Verbrauchsmaterialien	61
Tabelle 17 Gewichtsentwicklung	64
Tabelle 18 Rotarod	65
Tabelle 19 NSS Punktezahl	67
Tabelle 20 IL-1β	80
Tabelle 21 IL 6	82
Tabelle 22 HMGB 1	83
Tabelle 23 GFAP	85
Tabelle 24 TNFα	87
Tabelle 25 IFNγ	89
Tabelle 26 TSPO	91
Tabelle 27 MHC II	93
Tabelle 28 CD 3+	95
Tabelle 29 IHC Iba 1	97
Tabelle 30 IHC GFAP	99

1. Einführung

Das Schädel-Hirn-Trauma (SHT) ist eine der häufigsten Todesursachen im jungen Erwachsenenalter und spielt auch im Rahmen von banalen Stolperstürzen im Alter eine wesentliche Rolle.(1, 2). Die Wahrscheinlichkeit an den Folgen des Traumas zu versterben verdoppelt sich mit zunehmendem Alter. Weiterhin ist die gesamte Lebenserwartung nach SHT um 7 Jahre verkürzt (3). Wenn das initiale Trauma überlebt wurde, stellen einhergehende Komorbiditäten eine Herausforderung dar. Bei 35-65% aller SHT Patienten kommt es innerhalb einer Woche zu Krampfanfällen, 9% müssen auch 20 Jahre nach Trauma noch antiepileptisch dauertherapiert werden(4). Die Liste der Komorbiditäten nach einem Schädel-Hirn-Trauma ist lang und kann den Betroffenen und sein Umfeld sehr stark beeinträchtigen. Neben bleibenden neurologischen Beeinträchtigungen durch die direkte traumatische Hirnschädigung und den erwähnten Krampfanfällen sind Schlafstörungen(5), neurodegenerative Erkrankungen wie Alzheimer(6) und chronisch- traumatische Enzephalopathie (7) aber auch metabolische und muskuloskelettale Störungen (8, 9), sexuelle Dysregulationsstörungen und psychische Erkrankungen zu erwähnen(10, 11). Nach SHT kommt es gehäuft zu Infektionen bis hin zur Sepsis(12). Durch die Schädigung des Gehirns kommt es zu vermehrter Cortisol- und Katecholaminausschüttung- daraufhin folgt die Immunsuppression. Diese Tatsache, sowie die Beobachtung der Translokation von Bakterien aus dem Gastrointestinaltrakt in andere Organe, wie beispielsweise der Lunge, sind ein Erklärungsmodell für die infektiösen Geschehen und sollten weiter erforscht werden(12-14).

Seit geraumer Zeit ist das Mikrobiom Bestandteil vieler Forschungsarbeiten. Es hat sich herausgestellt, dass seine Vielfalt und Zusammensetzung in verschiedenster Art und Weise Auswirkungen auf die Gesundheit des Menschen haben.(15-17). Des Weiteren trägt eine Verbindung zwischen zentralem und enterischem Nervensystem- die sogenannte Gehirn-Darm-Achse zu diesen Prozessen bei(18). Mit dem Wissen um die Bedeutung der Gehirn -Darm-Achse und der Tatsache, dass das Schädel-Hirn-Trauma mit seinen oben beschriebenen pathophysiologischen Mechanismen, nicht als isoliertes Ereignis betrachtet werden sollte,(19) sondern als ein über die Zeit fortschreitender Prozess, lohnt es sich weitere wissenschaftliche Untersuchungen anzustreben.

Zielsetzung dieser Arbeit ist es, die Auswirkungen einer induzierten intestinalen Dysbiose, mit Hilfe einer prätraumatischen Antibiotikagabe, auf den Sekundärschaden nach experimentellem SHT mittels kontrollierter kortikaler Kontusion im Mausmodell, zu untersuchen. Zunächst wird den Versuchstieren über zwei Wochen eine Kombination aus Antibiotika im Trinkwasser verabreicht. Nach CCI wird mit Hilfe verhaltensbiologischer Tests, biochemischer und histologischer Untersuchungen ermittelt, inwiefern die Antibiose eine Auswirkung auf den Sekundärschaden hat.

2 Literaturdiskussion

2.1 Das zentrale Nervensystem des Menschen

Das Nervensystem des Menschen kann auf diverse Art und Weise eingeteilt werden, nach seiner Grundfunktion (Signalaufnahme, Signalabgabe), den Funktionsorten (somatisch, vegetativ), der Lage im Körper (zentral, peripher), der Richtung der Signalleitung (afferent, efferent) sowie makroskopischen Strukturen (graue, weiße Substanz). Im Vergleich zu dem Nervensystem von Tieren, verfügt das menschliche Nervensystem über komplexere Fähigkeiten wie die gedankliche Zukunftsprojektion, Selbsterkenntnis, Sprache sowie Lernen und Erinnern (20). Gehirn und Rückenmark bilden das zentrale Nervensystem (ZNS), während das periphere Nervensystem (PNS) die den Körper durchziehenden Nerven und Ganglien umfasst. Das Gehirn kann aufgrund morphologischer, entwicklungsgeschichtlicher und funktioneller Aspekte wie folgt gegliedert werden:

- Medulla oblongata (verlängertes Rückenmark)
- Pons (Brücke)
- Mesencephalon (Mittelhirn)
- Diencephalon (Zwischenhirn)
- Telencephalon (Großhirn)
- Cerebellum (Kleinhirn)

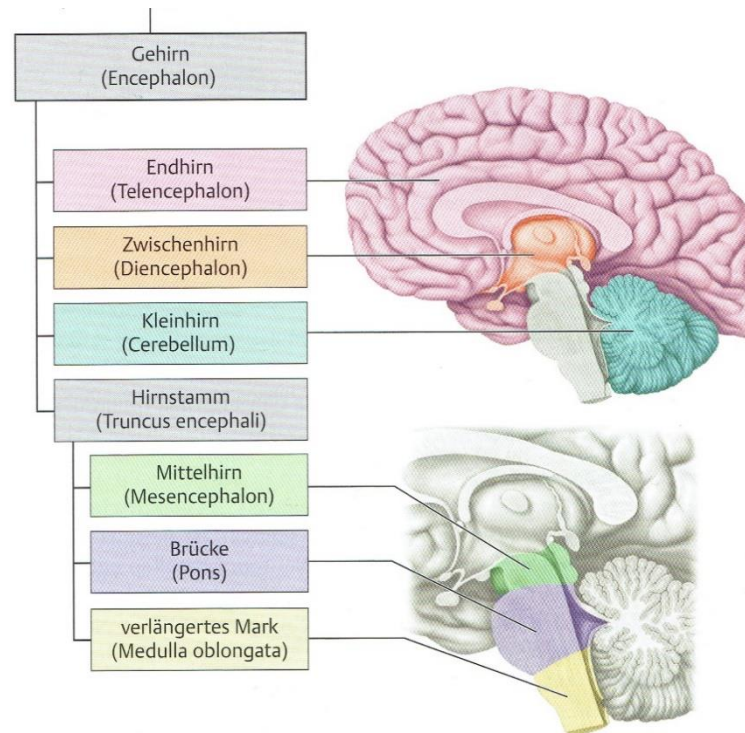


Abbildung 1 Aufbau des menschlichen Gehirns aus Prometheus Lernatlas

(20)

Im Folgenden soll nun das Telencephalon näher betrachtet werden da es, den am weitesten differenzierten Teil des menschlichen Gehirnes darstellt. Äußerlich lassen sich eine linke sowie eine rechte Hemisphäre unterscheiden, die Fissura longitudinalis cerebri trennt diese voneinander. Die beiden Hirnhälften lassen sich in vier Lappen einteilen, den Frontallappen (Lobus frontalis) als wesentlicher Sitz der Persönlichkeit sowie Zentrum motorischer Funktionen. Der Parietallappen (Lobus parietalis) zur Wahrnehmung sensorischer Reize. Der Temporallappen (Lobus temporalis), hier befindet sich das auditorische System sowie die Sprachregulation. Der Okzipitallappen (Lobus occipitalis) als Sehzentrum. Durch Bildung von Furchen (Sulci) und Windungen (Gyri) erreicht das Großhirn eine Oberflächenvergrößerung. Weiterhin gibt es Strukturen, die in der Tiefe gelegen sind und von den vier Lappen überdeckt werden. Hierzu zählen der Gyrus cinguli, die Inselrinde (auch als Lobus insularis bezeichnet), der Hippocampus, der Gyrus parahippocampalis und das corpus amygdaloideum. Diese Strukturen gehören zum sogenannten limbischen System, welches ein komplexes Netzwerk u.a. zur Verarbeitung von Emotionen darstellt. Auch das Speichern von Erinnerungen und Gedächtnisinhalten findet in diesen Strukturen statt (21).

Der Hippocampus sei an dieser Stelle gesondert hervorgehoben. Hier befinden sich neuronale Zellverbände, die reich an glutaminergen Neuronen sind und deshalb besonders vulnerabel auf Ischämie und oxidativen Stress reagieren (22).

2.1.1 Neurone und Gliazellen

Das Nervensystem des Menschen umfasst ca. hundert Milliarden Neurone. Sie stellen die funktionelle Grundeinheit da. Ein Neuron besteht aus einem Zellkörper, dem Soma oder auch Perikaryon genannt, einem Axon und mehreren Dendriten. Man unterscheidet vier Neuronentypen: multipolare, bipolare, unipolare und pseudounipolare Neurone. Mittlerweile ist bekannt, dass nach einer Schädigung, beispielsweise im Rahmen eines Schlaganfalls oder auch Schädel-Hirn-Traumas, neuronale Regeneration möglich ist. Nahe der Hirnventrikel sowie im Hippocampus existieren neurale Stammzellen, die nicht nur eine Regeneration ermöglichen, sondern auch an Lernprozessen beteiligt sind (23). Inwiefern, nach Schädigung, eine Beeinflussung bzgl. Neubildung und Proliferation möglich ist, ist noch nicht ausreichend geklärt. Zu erwähnen ist, dass eine Schädigung im Bereich des Somas dazu führt, dass das gesamte Neuron zugrunde geht, während eine Schädigung im Bereich des Axons nur zum Absterben des distal abgetrennten Teiles führt (Waller-Degeneration) (21).

Die im peripheren Nervensystem vorkommenden Gliazellen kann man in zwei Typen aufteilen: die Schwann-Zellen und die Mantelzellen. Diese seien hier nur der Vollständigkeit halber genannt. Im zentralen Nervensystem existieren vier unterschiedliche Gliazelltypen, die im Folgenden näher erläutert werden sollen:

2.1.1.1 Astrozyten

Astrozyten kommen im Gehirn zahlenmäßig am häufigsten vor. Sie muten, mit ihren Fortsätzen, sternförmig an. In der grauen Substanz sind diese Fortsätze dicker und verzweigter, man spricht von protoplasmatischen Astrozyten. Während in der weißen Substanz die Fortsätze weniger verzweigt und schlank sind, diese werden als fibrilläre Astrozyten bezeichnet. Die wesentliche Aufgabe der Astrozyten ist die strukturgebende Stützfunktion für die Neurone. Kommt es zur Schädigung von neuronalem Gewebe, bilden die Astrozyten eine sogenannte „Glianarbe“ aus, was im Folgenden auch als Astrogliose bezeichnet wird. Sie sind beteiligt an der Differenzierung von embryonalen und adulten neuronalen Stammzellen sowie an der Ausbildung der Blut-Hin-Schranke. Weitere Aufgaben sind die Modulation des

intrazellulären Ionenmilieus, die Aufnahme von Transmittern, die Synthese antioxidativer Substanzen und die Förderung des Axonwachstums durch Ausschüttung von Wachstumsfaktoren (21). In diesem Zusammenhang sei die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren erwähnt, die eine wesentliche Rolle im Rahmen des sekundären Schadens nach Schädel-Hirn-Trauma, einnimmt. Astrozyten stellen mit ihren vielfältigen Aufgaben einen unverzichtbaren Bestandteil des ZNS da, und bedürfen besonderer Beachtung im Rahmen der SHT- Forschung.

2.1.1.2 Oligodendrozyten

Sie bilden die Markscheiden des zentralen Nervensystems. Hierbei kann ein Oligodendrozyt mehrere Axone oder auch Dendriten gleichzeitig mit seinen Fortsätzen umhüllen.

2.1.1.3 Mikroglia (Hortega Zellen)

Mikroglia sind während der Embryonalentwicklung ins ZNS eingewanderte Makrophagen, sie entstammen nicht, wie die anderen Zellen des ZNS, dem Neuralrohr. Dementsprechend gehören immunologische Abwehrvorgänge zu ihren Aufgaben. Ihr Aussehen kann hierbei verschiedene Formen annehmen.(21) 5-20 % der Gliazellen im Gehirn sind Mikroglia. Im Rahmen ihrer immunologischen Aufgabe produzieren sie Chemokine und Zytokine, welche zur neuronalen Differenzierung beitragen (24).

2.1.1.4 Ependymzellen

Dies sind im Wesentlichen Epithelzellen, welche die Ventrikelräume auskleiden und für die Produktion des Liquor cerebrospinalis zuständig sind.

2.2 Das enterische Nervensystem des Menschen

Das enterische Nervensystem besteht aus ca. 100 Millionen Nervenzellen, das sind annähernd so viele wie im Rückenmark. Stark miteinander verknüpfte Ganglien bilden das Nervenzellnetzwerk des Gastrointestinaltraktes. Hierbei befinden sich in der Wand des Ösophagus, des Magens und des gesamten Darmes im Wesentlichen zwei Nervengeflechte:

- Plexus submucosus (Meissner Plexus) in der Tela submucosa
- Plexus myentericus (Auerbach Plexus) in der Tunica muscularis, zwischen innerer und äußerer Schicht

Die Struktur der Gliazellen ähnelt hier, obwohl peripher gelegen, eher der von Astrozyten anstelle der von Schwann-Zellen. Der viszerosensible Anteil vermittelt Informationen wie Völlegefühl und Schmerz. Die viszeromotorische Funktion besteht in der Magen-Darmperistaltik sowie der Drüsentätigkeit und Schleimhautdurchblutung. Aber auch das Darmassoziierte Immunsystem (GALT/MALT = *gut-/mucosa-associated lymphoid tissue*) wird durch die integrative Funktion des enterischen Nervensystems gesteuert. Dies ist eine Fähigkeit die sonst nur Gehirn und Rückenmark vorbehalten ist (21).

2.3 Das Schädel-Hirn-Trauma (SHT)

2.3.1 Allgemeines und Einteilung

Das Schädel-Hirn-Trauma ist die Folge einer Gewalteinwirkung auf den Schädel. Hierbei kann es zu Verletzungen des Gehirnes und Störung seiner Funktionsweisen kommen. Man unterscheidet ein offenes vom geschlossenen SHT, maßgeblich für diese Unterscheidung ist die Intaktheit der Dura mater. Kommt es zum Einreißen der Dura mater, liegt ein offenes SHT vor. Je nach Gewalteinwirkung kann es zu diversen Weichteilschäden und knöchernen Verletzungen, im Bereich des Schädels, kommen (25). Die Einteilung des SHT erfolgt zumeist anhand der Glasgow Coma Scale (GCS). Die GCS wurde 1978 von Tesdale und Jenette entwickelt und beinhaltet die drei wesentlichen Beurteilungskriterien Augenöffnen, beste motorische Reaktion sowie der Fähigkeit sich verbal zu äußern (25). Von einem leichten Trauma spricht man bei 14-15 Punkten, ein mittleres Trauma liegt bei 9-13 Punkten vor und ein schweres Trauma bei 3-8 Punkten (26).

GCS

Punkte:

Augen öffnen:

sofort	4
auf Ansprache	3
auf Schmerzreiz	2
kein	1

beste verbale Reaktion:

orientiert	5
verwirrt	4
inadäquate Worte	3
unverständliche Laute	2
keine	1

beste motorische Reaktion:

gezielt auf Aufforderung	6
gezielt auf Schmerzreiz	5
ungezielt auf Schmerzreiz	4
Beugesynergismen	3
Strecksynergismen	2
keine	1

Die genannten Kriterien erlauben, unter Berücksichtigung gewisser Voraussetzungen, eine orientierende Einschätzung der Schwere des Schädelhirntraumas. Um eine verlässliche Einschätzung zu ergeben, sollte der Score von medizinischem Fachpersonal erhoben werden. Dies sollte so früh wie möglich, nach dem Ereignis erfolgen (27). Weiterhin stellt eine beschreibende Dokumentation, eine nützliche

Ergänzung zum eigentlichen Score da. Die individuellen Gegebenheiten eines jeden Patienten, erlauben nicht immer eine einfache Erhebung der GCS. Sprachbarrieren, Verletzungen der Extremitäten bei polytraumatisierten Patienten, Intoxikationen, neurologische Vorerkrankungen wie beispielsweise bestehende Demenz, limitieren eine objektive Bewertung und sollten demnach ausreichend dokumentiert werden (28, 29). Nicht zuletzt verhindern auch Analgosedierung und die Intubationsnarkose eine aussagekräftige Wiedererhebung des Scores. Um dieser Problematik entgegenzuwirken, gewinnt die Bestimmung diverser Biomarker immer mehr an Bedeutung.

2.3.2 Epidemiologie des SHT

Mit Einführung des *TraumaRegister* DGU der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie (TR-DGU) im Jahr 1993 erfolgte die Sicherung der Qualität bezüglich der flächendeckenden Datenerhebung von Schädel-Hirn-Traumata (30). Somit ist gewährleistet, dass die angegebenen Daten anhand definierter Ein- und Ausschlusskriterien gesammelt wurden, und eine geringere Variabilität der einzelnen Traumata besteht. Es handelt sich bei den folgenden Daten um mittlere bis schwere Schädel-Hirn-Traumata. In den Jahren 2013 bis 2017 wurden 41.101 Patienten in den beteiligten Kliniken der TR- DGU erfasst. Das entspricht 8.220 Fällen pro Jahr in Deutschland und einer Inzidenz von 10,1/100 000 Einwohnern/Jahr. Da nicht alle Kliniken in Deutschland an dem Programm beteiligt sind, und die präklinisch verstorbenen Patienten ebenfalls nicht berücksichtigt werden, ist von einem Wert von 13,6/100 000 Einwohner/Jahr auszugehen (31). Das stumpfe Trauma bei Stürzen unter drei Metern Höhe, stellt hier die häufigste Ursache da. Das Verhältnis Männer zu Frauen beträgt 2:1 und das Alter der Patienten liegt im Median bei 60 Jahren (30). In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass der demographische Wandel sowie die Polypharmazie des älteren Patienten das Sturzrisiko steigen lässt (2). Dennoch sind die Verkehrsunfälle als Ursache für ein mittleres bis schweres SHT nicht zu vernachlässigen, insbesondere bei den Patienten unter 60 Jahren (32). In Anbetracht der Tatsache, dass das SHT die Haupttodesursache oder Ursache einer lebenslangen Behinderung für die 29-45 Jährigen darstellt, wird deutlich, dass es nicht nur medizinisch sondern auch sozioökonomisch eine Herausforderung darstellt (32-34). In einer Analyse von 16 Ländern in der Europäischen Union konnte gezeigt werden, dass 374 636 verlorenen Lebensjahre allein auf das SHT zurückzuführen sind. Dies bedeutet einen Lebenszeitverlust von 24,3 Jahren pro SHT-Patient (35).

2.3.3 Pathophysiologie des SHT

Grundlegend kann es bei einem SHT sowohl zu lokalen als auch, zu diffusen Schädigungen kommen. Gehäuft liegt beides vor. Zur lokalen Schädigung gehören Frakturen des knöchernen Schädels, Kontusionen durch Anprallen des Gehirngewebes am Schädel und epidurale, subdurale oder subarachnoidale Hämatomate. Diffuse Schädigungen entstehen zum Beispiel durch das Wirken von Scherkräften auf die Gefäße, es kommt zu Mikroblutungen und zur Ausprägung eines Hirnödems (36).

2.3.3.1 Primärschaden

Der Primärschaden bei einem Schädel-Hirn-Trauma entsteht als Folge jeglicher, direkter Gewalteinwirkung auf den Schädel und das Gehirn. Hierbei werden neuronale Strukturen, Blutgefäße und Weichteilgewebe verletzt. Diese Schädigung führt zu einer dynamischen, entzündlichen zellulären Reaktion, welche wesentlich zum Sekundärschaden beiträgt. Grundsätzlich ist der Primärschaden im Nachhinein nicht mehr beeinflussbar. Nur durch präventive Maßnahmen beispielsweise das Tragen eines Helmes, kann die primäre Schädigung abgeschwächt oder verhindert werden (36).

2.3.3.2 Sekundärschaden

Nach dem Primärschaden kommt es durch neuroinflammatorische Prozesse, mitochondriale Dysfunktion, oxidativen Stress und Exzytotoxizität zur Ausbildung der sogenannten traumatischen Penumbra (37, 38). Die sekundär entstehende Schädigung, ist die Komponente, an der es möglich ist Schadensbegrenzung vorzunehmen, und soll deshalb näher betrachtet werden. Zunächst kommt es durch Zerstörung der Zellmembran zur Verschiebung des Ionengleichgewichtes. Insbesondere eine vermehrte Ansammlung von Kalzium intrazellulär führt zur Aktivierung von Proteasen, welche zum Abbau von Proteinen führen, die für die Struktur des Zytoskelettes maßgeblich sind (39, 40). Im Mitochondrium führen die erhöhten Kalziumkonzentrationen zu Dysfunktionen, in Form ineffektiver oxidativer Phosphorylierungsprozesse. Die gebildeten freien Radikale begünstigen apoptotische Vorgänge. Es kommt zu einer azidotischen Stoffwechsellage woraufhin die Perfusion des Gehirns gesteigert wird, was wiederum die Bildung eines Hirnödems begünstigt. Die aufgezählten Vorgänge führen nicht nur zur Störung der Bluthirnschranke, sondern auch zur vermehrten Ausschüttung von Zytokinen und Glutamat. Vor allem letzteres

wirkt neurotoxisch (41). Schon in den ersten 10 Minuten nach Trauma sind erhöhte Glutamatkonzentrationen im Gewebe nachweisbar (42). Der neuroinflammatorische Prozess wird durch die durchlässigere Bluthirnschranke verstärkt, und kann jahrelang persistieren. Insbesondere die Aktivierung von Mikroglia hat eine Auswirkung auf die Ausweitung des Sekundärschadens. Diverse proinflammatorischen Mediatoren wie Interleukin-1 β (IL-1 β), der Tumornekrosefaktor α (TNF α) oder Interferon γ (IFN γ) führen dazu, dass sich Mikroglia zum Typ M1 differenzieren. Dieser Typ dient der Phagozytose von körpereigenem wie aber auch fremdem Material, gesundes Gewebe kann hierbei geschädigt werden (43, 44). Anti-inflammatorische Mediatoren, wie Interleukin-4 (IL-4) und Interleukin-13 (IL-13), führen zur Bildung des M2 Subtyps. Dieser Mikroglia Typ repariert geschädigtes Gewebe, unterstützt die Angiogenese und hemmt über Bildung von Interleukin-10 (IL-10) die Immunantwort (44, 45). Die Subtypen wirken auf Astrozyten, die wiederum die bereits oben erläuterten Prozesse begünstigen. Somit ist davon auszugehen, dass ein Ungleichgewicht in der Aktivierung der Mikroglia wesentlich zum Sekundärschaden beiträgt. Auch das Einwandern von Leukozyten in die ischämische Gehirnregion begünstigt das Ausbilden des Sekundärschadens (46).

Die nekrotischen Vorgänge können dazu führen, dass sich der eigentliche Primärschaden um bis zu 400% vergrößert (47). Das verdeutlicht, wie wichtig es ist, therapeutische Ansätze zu entwickeln, die an der Minimierung des Sekundärschadens ansetzen. Jüngere Erwachsene und Kinder haben ein erhöhtes Risiko einen Sekundärschaden auszubilden, welcher drastische kognitive Einbußen, Lernschwächen und Konzentrationsprobleme nach sich ziehen kann (48, 49).

2.3.4 Prävention und Therapie

Bezüglich des Primärschadens sind präventive Maßnahmen die einzige Möglichkeit gegenzusteuern. Es gibt mehrere Ansätze, sowohl im Rahmen der Erhöhung der Maßnahmen zur Verkehrssicherheit bei Fahrzeugen als auch das Tragen von Helmen bei Zweiradfahrern. Generell ist die Weiterentwicklung von Fahrzeugen, als auch der schützenden Bekleidung zielführend. Allein das Einführen der Helmpflicht für Motorradfahrer 1997, hat das Auftreten von Kopfverletzungen bei Motorradunfällen um 33 % vermindert (50). Doch dies allein reicht nicht, besonders bei jüngeren Menschen muss ein Verständnis dafür geschaffen werden, dass risikobereites Verhalten im Straßenverkehr, worunter auch das alkoholisierte Fahren zu zählen ist,

schwerwiegende Folgen haben kann. Bei älteren, gebrechlicheren Menschen ist der Hauptrisikofaktor für ein SHT vor allem der Sturz im häuslichen Umfeld. Das Sturzrisiko durch eine angepasste geriatrische Betreuung zu minimieren, stellt hierbei die beste Form der Prävention da. Verhältnismäßig geringfügige Veränderungen im häuslichen Umfeld zur Sturzprophylaxe, wie das Entfernen von Stolperfallen, beispielsweise Teppichen, aber auch die Anpassung der Dauermedikation, haben sich als effizient erwiesen (51). Für die präklinische Phase der Versorgung gilt im Falle eines SHT, wie in jedem anderen Fall auch, dass eine koordinierte, schnellstmögliche Rettung und Transport in ein geeignetes Zielkrankenhaus obligat sind (52).

2.4 Entzündungsmediatoren/ Interleukine

Um die pathophysiologischen Mechanismen der sekundären Hirnschädigung zu analysieren und u.a. Aussagen über das Ausmaß der Schädigung, neurologische Defizite aber auch die Prognose treffen zu können, wird im Rahmen der SHT-Forschung der Fokus auf diverse Biomarker gelegt. Man erhofft sich von der Kombination dieser Biomarker und der aktuell traditionellen klinischen Diagnostik, wie beispielsweise Computertomografie (CT) und Magnetresonanztomografie (MRT) eine Verbesserung des Outcomes von SHT-Patienten (53). Als prognostische Marker bezüglich des Langzeitüberlebens haben sich die Neuronenspezifische Enolase (NSE), das myelin basic protein (MBP) sowie S100 B herausgestellt (54). Im Bereich der Forschung finden weiterhin standardmäßig das saure Gliafaserprotein (GFAP), α -II-Spectrin und diverse Zytokine Verwendung (55). Im Folgenden soll auf diese genauer eingegangen werden.

Interleukin 1 (IL-1)

Interleukin 1 ist ein Zytokin und kann in den Subtyp IL-1 β und in IL-1 α aufgeteilt werden. IL-1 spielt eine wesentliche Rolle während dem inflammatorischen Geschehen nach Schädel-Hirn-Trauma. Bereits eine Stunde nach dem Trauma sind erhöhte Level der Isoform des Interleukin 1 β -Rezeptors nachweisbar (53). Dies geschieht hauptsächlich über die Aktivierung der Cyclooxygenase Typ 2 sowie der Phospholipase A (56). IL-1 β entstammt überwiegend Astrozyten. In der Arbeit von Lu et. al. in der die Effekte von IL-1 auf den neuronalen Schaden nach experimentellem SHT in der Maus untersucht wurden, konnte mittels Western Blot nachgewiesen werden, dass IL-1 β 12 h nach dem Trauma den höchsten Wert erreicht und bis zu 48 h erhöht nachweisbar ist (22). IL-1 α wird hauptsächlich von Neuronen ausgeschüttet und erreicht 3 h nach dem Trauma erhöhte Werte (22). Die genaue Wirkung von IL-1 α im Rahmen des SHT ist noch nicht ausreichend geklärt, es bewirkt jedoch eine Erhöhung des TNF α -Rezeptors und trägt zur Gefäßneubildung bei (57, 58). In Zellkulturen von Mikroglia kommt es bei Aktivierung des IL-1 β Rezeptors zur intrazellulären Erhöhung der Kalziumkonzentration (59). Durch die Gabe von Antikörpern gegen IL-1 α und IL-1 β bei Versuchstieren, denen ein SHT zugefügt wurde, konnte gezeigt werden, dass die neuronale Schädigung bei den Tieren, die die Antikörper erhielten geringer war, als bei den Tieren deren Interleukine volle Wirkung

entfalten konnten. Für IL-1 β kann angenommen werden, dass es im Bereich des Sekundärschadens zur neuronalen Schädigung führt (22).

Interleukin 6 (IL-6)

IL-6 ist ein Zytokin, welches im Rahmen der unspezifischen Immunantwort ausgeschüttet wird. Es wird von Neuronen als auch von Gliazellen, insbesondere von Astrozyten exprimiert (60). Aber auch T- und B- Zellen, glatte Muskelzellen, Keratinozyten und Fibroblasten sind in der Lage IL-6 zu bilden. Die Konzentrationen von IL-6 bei Patienten mit SHT ist jedoch signifikant höher als bei Patienten mit anderen orthopädischen Verletzungen. Weiterhin gibt es eine Korrelation zwischen erhöhtem intrakraniell Druck und der Konzentration von IL-6 im Plasma (61-63). IL-6 scheint im ZNS bezüglich des inflammatorischen Geschehens eine zwiespältige Rolle einzunehmen. Während eine Überproduktion des Zytokins eher neuroprotektiv wirkt, scheint es gleichsam die Exzitotoxizität von Glutamat zu begünstigen (64, 65).

Die verschiedenen Effekte, die dieses Zytokin im Rahmen der Neuroinflammation bewirkt, sind noch nicht abschließend geklärt. Insbesondere bezüglich der prognostischen Aussagekraft sind weitere Studien notwendig.

Tumor-necrosis factor α (TNF α)

TNF α ist eines der ausschlaggebendsten proinflammatorischen Zytokine. Durch die Aktivierung von Mikroglia und die Minderung der Expression von Glutamatrezeptoren, trägt er zum Ausbreiten des Sekundärschadens bei. Er wirkt synergistisch mit IL-6. Über Inhibition von glutamatergen Transportern der Astrozyten, einer Erhöhung der Transmission von AMPA-Rezeptoren an Synapsen und Verstärkung der glutamatergen Exzitotoxizität, führt TNF α zur Steigerung der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke (66-68). Somit wird ein dauerhafter neuroinflammatorischer Prozess begünstigt. Bezüglich der gastrointestinalen Membran führt TNF α , über Regulierung der tight junctions, zu einer Erhöhung der Permeabilität (69).

Glial fibrillary acidic protein (GFAP)

GFAP ist ein Protein, welches als Intermediärfilament Bestandteil des Zytoskeletts von Astrozyten darstellt. Im Rahmen von neurodegenerativen Erkrankungen, Traumata, Infektionen oder ähnlichem reagieren Astrozyten und es kommt zur reaktiven Astroglie. Hiermit verbunden sind Umbauprozesse des Gewebes, bei denen vermehrt GFAP in Astrozyten exprimiert wird (70). Eine Stunde nach dem Trauma kann GFAP im Blut nachgewiesen werden und erreicht ein Maximum nach 20-24 Stunden (71).

Da es spezifisch im Gehirn vorkommt (72, 73), und eine lange Halbwertszeit besitzt (74) bietet sich die Verwendung als Biomarker im Rahmen des SHTs an. Vor allem da es eine hohe Sensitivität zum Nachweis neuronaler Schädigung aufweist (71, 75).

Ionized Calcium Binding Adapter Molecule 1 (Iba 1)

Iba 1 kommt insbesondere in Mikroglia des ZNS vor und ist ein Aktin- assoziiertes und Kalzium bindendes Molekül (76). Des Weiteren trägt es zur Phagozytose und Zellbeweglichkeit bei (77). Es kommt jedoch nicht nur in Mikroglia vor, sondern auch in Monozyten, welche ins Gehirn nach Schädigung eingewandert sind. Diese Zellen finden sich zumeist in den Bereichen nahe dem geschädigten ischämischen Gewebe (76, 78).

Interferon γ (IFN γ)

Interferon γ ist eines der Zytokine welches mit am meisten zur Aktivierung von Mikroglia führt. Nach SHT kommt es zur Hochregulation der Expression von IFN γ , dies unterhält den neuroinflammatorischen Prozess (79). Weiterhin scheint IFN γ eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zu spielen, jedoch ist seine genaue Bedeutung diesbezüglich noch nicht abschließend geklärt (80). Für die Expression von major-histocompatibility-complex 2 (MHC 2) Molekülen stellt IFN γ den stärksten Induktor da. Ebenso ist IFN γ für die Infiltration von T-Zellen in das Gehirn notwendig (81).

Translokatorprotein (TSPO)

Das Translokatorprotein ist ein Transportprotein, welches in der äußeren Membran der Mitochondrien sitzt. Es ist demnach in vielen verschiedenen Geweben des Organismus vorhanden und trägt sowohl zu proliferativen als auch zu apoptotischen Prozessen der Zellen bei (82). Normalerweise ist das Vorkommen von TSPO im Gehirn gering, bei neuroinflammatorischen Prozessen, beispielsweise nach Trauma oder neurodegenerativen Erkrankungen wird jedoch die Expression von TSPO vorrangig in Mikroglia hochreguliert (82, 83).

2.5 Interaktion des zentralen und enterischen Nervensystems nach SHT

Zunächst seien einige Fakten zur Blut-Hirn-Schranke genannt, da ihre Integrität, für das eingeschränkt regenerationsfähige Nervengewebe, von hoher Bedeutung ist. Drei Schichten bilden den wesentlichen Anteil der Schranke:

- Die Endothelien der Kapillaren
- Die Basalmembran
- Die Fortsätze der Astrozyten

Dieser Aufbau ermöglicht es potentiell neurotoxische Stoffe zurückzuhalten oder das Gehirn vor Veränderungen der Plasmazusammensetzung zu schützen (21).

Neuste Studien zeigen, dass die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke durch eine Störung des Mikrobioms verändert wird (84). Man beobachtet, dass in sogenannten Germ-free (GF) Mäusen dh. Versuchstiere die keinerlei Bakterienflora besitzen, es zu einer veränderten Mikrogliastruktur kommt, und folgend zu einer Veränderung der Permeabilität der Blut-Hirnschranke (85, 86). Die Mikroglia dieser Versuchstiere sind deutlich verzweigter und respektieren die Zellgrenzen benachbarter Strukturen weniger (87). Stoffwechselprodukte von Bakterien aktivieren den sogenannten AHR von Mikroglia. An diesen Rezeptor können Indol-3-Aldehyd sowie Indol-3-Propionsäure binden. Diese werden ebenfalls von Bakterien des Darmes produziert und werden durch die Einnahme von beispielsweise Ampicillin vermindert (88).

2.5.1 Das Mikrobiom

Das menschliche Mikrobiom ist die Zusammensetzung aller Mikroorganismen, die den menschlichen Körper besiedeln. Hierbei kann es sich um Bakterien, Viren, Eukaryoten und Archaeen handeln, die an verschiedenen Körperstellen (von Hautoberfläche bis Gastrointestinaltrakt) vorkommen. Bis zu über 500 Spezies bzw. Arten umfasst das

Mikrobiom. 1-3 % unseres Körpergewichtes besteht aus Bakterien, somit sind diese in ihrer Anzahl ca. zehn Mal so zahlreich, als menschliche Zellen. Ihre Aufgaben sind vielfältig, Anregung des Immunsystems, Mitwirken bei der Verdauung und der Schutz vor pathogenen Keimen, sind nur einige wenige Aufgaben. Mittlerweile weiß man, dass es Zusammenhänge gibt zwischen der Zusammensetzung des Mikrobioms und dem Entstehen von Krankheit (15-17, 89) Einige Studien zeigen, dass sich die Zusammensetzung des Mikrobioms auch auf physiologische Vorgänge des zentralen Nervensystems auswirkt (90). Es wird ein Zusammenhang berichtet zwischen Veränderungen des Mikrobioms und neurodegenerativen Erkrankungen wie beispielsweise Parkinson oder Multiple Sklerose, aber auch Angststörungen oder Autismus (91). Bei Parkinson Patienten weist man in Stuhlproben mehr Bakterien nach, die proinflammatorische Prozesse begünstigen (z.B. aus der Gattung der Roseburia, Coprococcus oder Blautia) während antiinflammatorische Gattungen wie Faecalibakterien eher vermindert vorkommen (92). Ähnliche Beobachtungen macht man bei Kindern mit Autismus, die Zusammensetzung der Bakterienvielfalt unterscheidet sich von der gesunder Kinder. So tritt Bakterioides deutlich häufiger auf als Firmicutes (93). Auch bei Verletzungen des Rückenmarks lässt sich eine Veränderung der Darmflora beobachten, während Klebsiellen, Escherichia und Enterokokken häufiger vorkommen, sinkt der Anteil an Laktobazillen, Corynebakterien und Staphylokokken (94). Vergleicht man die mRNA Profile von GF- Mäusen mit denen einer Kontrollgruppe, so stellt man fest, dass es zur verminderten Expression einiger Gene kommt, die mit der Zellaktivierung, der Bildung des MHC I Moleküls sowie der Signalgebung über den IFN-1 Rezeptor zusammenhängen, wohingegen die hochregulierten Gene, eher zur Hemmung der Transkription führen. *DNA-damage-inducible transcript 4* (DDIT4) ist das Gen, welches bei GF- Tieren am meisten verstärkt exprimiert wird. DDIT 4 fördert das Zellwachstum über eine Hemmung des Rapamycin Komplex 1 (mechanistic target of rapamycin = mTOR). Vor allem bei Hypoxie kommt es zu seiner Hochregulation (95). Während sich histopathologisch die Hirnregionen der GF-Tiere nicht von der Kontrollgruppe unterscheiden, stellt man jedoch verstärktes Vorhandensein von Iba1 in den Mikroglia der GF- Mäuse fest. Infiziert man eine GF- Maus mit dem lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) so fällt die Immunantwort geringer aus als bei Mäusen der Kontrollgruppe (87).

2.5.2 Reaktion des Gastrointestinaltrakt nach SHT

Es ist hinlänglich bekannt, dass es im Rahmen von Verletzungen und Erkrankungen zu gastrointestinalen Störungen kommen kann (96, 97). Man beobachtet, dass nach SHT eine Minderperfusion des Darmes, Störung der Darmmotilität und Störungen der Darm-Blut-Schranke, auftreten können. Das Stress-Ulcus liegt mit einer Inzidenz von 74-100% an der Spitze der Komplikationen bei SHT (98, 99).

Bei Ratten konnte nach experimentellem SHT gezeigt werden, dass es zu schwerer Schädigung der gastrointestinalen Schleimhaut kommt. Es zeigten sich Atrophie, Nekrose des Epithels, Abbrechen der Mikrovilli, Erosionen und Ödeme. Bereits drei Stunden nach CCI, bis über sieben Tage kann man diese Veränderungen beobachten (100).

Durch Zytokine, Endotoxine, und Störung der Bakterienflora wird die Integrität des Darmes gestört und die Permeabilität der Mukosa erhöht (101). Es kommt somit leichter zur Translokation von Bakterien (102). Dies setzt eine systemische Immunreaktion in Gang, die sich wiederum auf die Aktivierung von Mikroglia auswirkt und somit die Permeabilität der Blut-Hirnschranke herabsetzt (100).

Mikroglia reagieren nicht nur auf lokale Botenstoffe, sondern auch, auf Signale, die aus der Peripherie kommen. Es findet also ein bidirektionaler Austausch von Gastrointestinaltrakt (GIT) und Gehirn statt. Es existieren verschiedene Wege, über die dieser Austausch stattfinden kann, z.B. über den Nervus Vagus. Nicht nur die Darmmotilität, die Drüsentätigkeit sowie die Durchblutung der Schleimhaut werden über diesen gesteuert, sondern auch die Ausschüttung von Zytokinen im GIT (103). Auf dem afferenten Weg führt eine Stimulation des Nervus vagus und zusätzliche Gabe von Lipopolysaccharid (LPS), im Gehirn zu einer vermehrten Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen. Durchtrennt man den Vagusnerv, sind diese Effekte rückläufig (104). Zum anderen findet die Kommunikation über die Aktivierung von Immunzellen statt. T-Zellen und Makrophagen werden durch immunmodulierende Substanzen, welche über den Darm aufgenommen werden, aktiviert. Weiterhin gelangen die immunmodulierenden Mediatoren ins Gehirn, aktivieren Mikroglia, die Permeabilität der Blut-Hirnschranke wird vermindert und erleichtert somit den aktivierten T-Zellen ins Gehirn einzuwandern (105-107). Ein dritter Weg, über den eine Kommunikation zwischen GIT und ZNS möglich ist, sind von Bakterien ausgeschüttete Metabolite. Vor allem Neurotransmitter wie Acetylcholin, Serotonin und Gamm-Aminobuttersäure (GABA) spielen hier eine Rolle. Lactobacillen können sowohl GABA als auch Acetylcholin ausschütten,

während das Serotonin von Enterokokken und Streptokokken gebildet wird (108, 109). Infiziert man Versuchstiere nach CCI mit *Citrobacter Rodentium*, so stellt man fest, dass diese ein größeres Läsionsvolumen aufweisen als die Kontroll-CCI Gruppe. Während die Permeabilität des Colons in beiden Gruppen steigt, ist bei den infizierten Tieren mehr GFAP in der ipsilateralen Hemisphäre nachweisbar. Die Erhöhung der Permeabilität lässt sich auf eine verminderte Expression von Claudin 1 zurückführen (110).

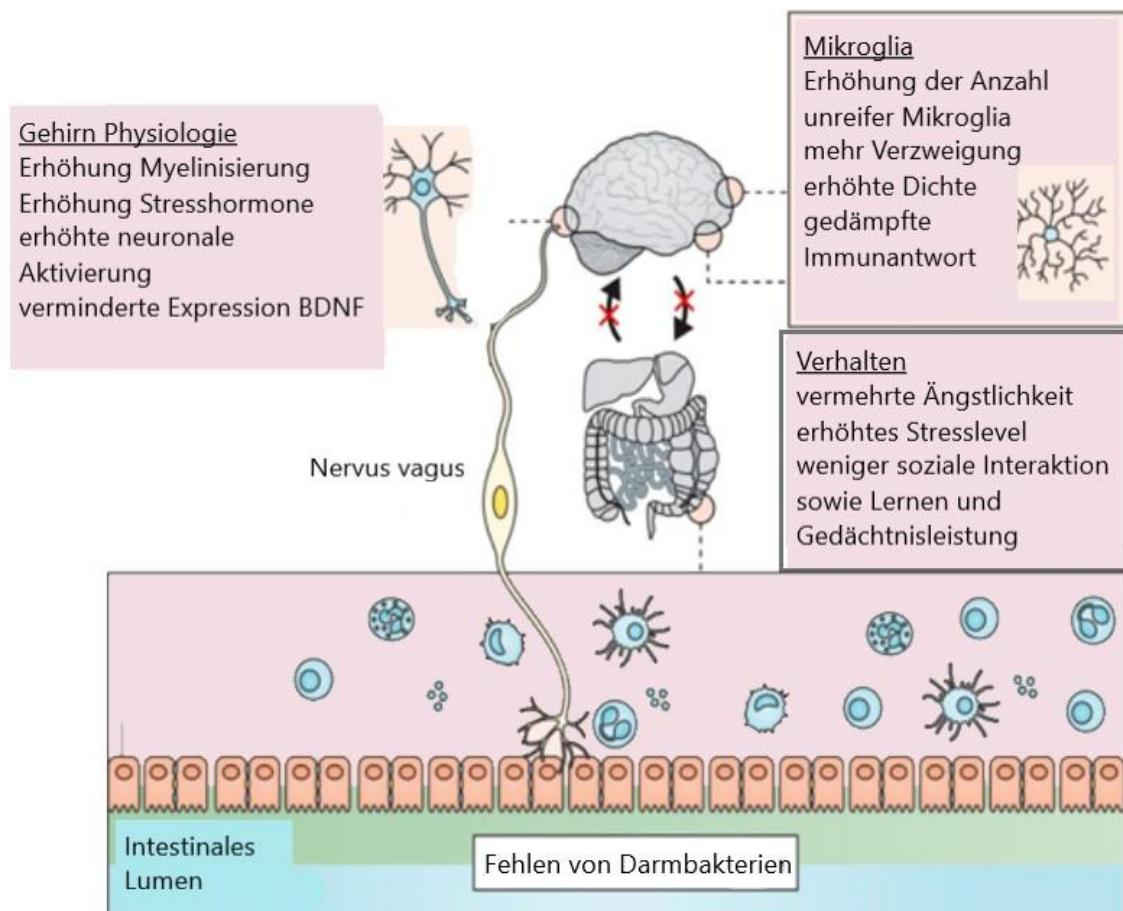


Abbildung 2 Die Gehirn-Darm-Achse

Die Abbildung 2 zeigt die Kommunikation zwischen Gehirn und Darm- die sogenannte Hin-Darm-Achse. Das Fehlen eines Mikrobioms führt zu diversen Veränderungen der Mikrogliastruktur, Ausschüttung neuroaktiver Substanzen und letztlich auch zu Verhaltensänderungen der Versuchstiere. Die Abbildung wurde modifiziert und auf Deutsch übersetzt, die Originalabbildung entstammt der Arbeit von Abdel-Haq et.al (111).

2.6 Antibiotika

Es kann als allgemein bekannt betrachtet werden, dass die Einnahme von Antibiotika, je nach Substanzgruppe relevante Auswirkungen auf den menschlichen Organismus zeigt, und somit auch auf das Mikrobiom. Es kann zu Diarrhoe bis hin zur pseudomembranösen Colitis kommen. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass Tiere mit einer geringeren Vielfalt an Bakterien im Darm, eine schwerere Entzündung des Gastrointestinaltraktes aufwiesen, nachdem man sie mit dem Erreger *S. Typhimurium* infiziert hatte. Genauso erging es Versuchstieren, welche zwar initial eine physiologisch reiche Bakterienflora besaßen, jedoch 24 Stunden vor Infektion mit Streptomycin behandelt wurden (112). Um zu beurteilen, wie sich eine Antibiotikagabe auf die Mikrogliastruktur auswirkt werden *specific-pathogen-free* (SPF) Mäusen Breitbandantibiotika (Kombination aus Metronidazol, Vancomycin und Gentamycin) verabreicht. Hierbei kommt es zu einer Vergrößerung des Caecums bei den Antibiotika behandelten Tieren (113). Weiterhin ist im Gehirn eine vermehrte Expression von Iba-1, in der Immunfluoreszenz zu sehen. Die Ausläufer der Mikroglia erscheinen kürzer und weniger stark verzweigt (87). Das Einbringen von *Bacteroides distasonis* (strain ASF 519), *Lactobacillus salivarius* (strain ASF 361) und *Clostridium cluster XIV* (ASF 356) in GF Mäuse zeigt, im Vergleich zu der Kontrollgruppe ebenfalls erhöhtes Vorkommen von Iba-1 und DDIT4. Nach Zusammenführen von Mäusen, die mit diesen drei Stämmen kolonisiert wurden, und SPF-Mäusen, zeigt sich nach sechs Wochen, eine identische Mikrogliareifung. Die Bakterienflora der Versuchstiere, die zunächst nur mit den drei Stämmen kolonisiert wurde, gleicht sich in ihrer Vielfalt ebenfalls an. Dies lässt vermuten, dass die Auswahl in der Zusammensetzung der Bakterien, Auswirkungen auf das ZNS hat (87). Im Rahmen der Erforschung von neurodegenerativen Erkrankungen der Retina konnte beobachtet werden, dass die Aktivierung der Mikroglia, durch das bakterielle Endotoxin LPS, im Gehirn von Ratten, nach zusätzlicher Gabe von Minocyclin vermindert wurde. Minocyclin ist ein Tetracyclin Antibiotikum welches die Expression von proinflammatorischen Mediatoren, wie TNF α oder IL-1 β inhibiert (114). Folglich ist eine Aktivierung der Mikroglia in ihren M1 Subtyp vermindert, was eine geringere inflammatorische Reaktion bedeutet. Weiterhin werden die N-methyl-D-aspartat (NMDA) gesteuerten Ionenkanäle inhibiert sodass u.a. die exzitotoxische Wirkung von Glutamat abgeschwächt wird (115).

2.7 Tiermodel Diskussion

Der Pathomechanismus des SHT beim Menschen ist von verschiedenen Faktoren abhängig, beispielsweise dem Alter, dem Geschlecht und der Schwere des Traumas an sich. Demnach fällt es in klinischen Studien am Menschen die Mechanismen des primären und sekundären Schadens differenziert zu untersuchen (116). Das Tiermodell erlaubt zum einen die Schwere des Schadens durch etablierte Methoden, wie dem CCI Model, zu bestimmen und auch andere Störfaktoren zu eliminieren (117). Trotz aller Bemühungen wird es dennoch nicht vollständig möglich sein, ein Tiermodell zu finden, welches dem des Menschen, in all seiner Komplexität, vollständig gerecht wird (116).

3 Methoden

3.1 Genehmigung der Tierversuche

Die Tierversuche wurden im Vorfeld dieser Dissertation durch das Landesuntersuchungsamt Rheinland -Pfalz genehmigt (Tierversuchsantrag TVA23177-07/G15-1-059). Ebenfalls vor Beginn der Tierversuche ist der Besuch eines versuchstierkundlichen Kurses (Modul 1) des Translational Animal Research Centers (TARC) der Universitätsmedizin Mainz vorgesehen. Hierbei wird unter anderem der fachgerechte Umgang mit Mäusen, sowie die Fähigkeit zum fachgerechten Töten der Tiere vermittelt. Alle Tierversuche wurden gemäß Tierschutz-Versuchstierverordnung, Tierschutzgesetz und den Richtlinien der Johannes-Gutenberg -Universität Mainz durchgeführt.

3.2 Tiere

3.2.1 Versuchstiere für Vorstudie (Antibiotikatrinkversuch)

Um das Trinkverhalten der Mäuse im Voraus besser abzuschätzen, wird eine Vorstudie (Antibiotikagabe) mit 4 männlichen C57BL/6/N Mäusen aus Eigenzucht.

3.2.2 Versuchstiere für Antibiotikastudie

Bei den Versuchstieren handelt es sich um 40 männliche C57BL/6/N Mäuse, im Alter von 9 Wochen und einem Gewicht zwischen 23,2g und 28,8 g. Bezogen wurden die Tiere von Janvier Labs Le Genest-Saint-Isle aus Frankreich.

3.2.3 Haltung und Pflege der Versuchstiere

Die Tiere werden in den ersten 18 Tagen im Tierstall der Universitätsmedizin Mainz eingestallt. Die restlichen sieben bzw. acht Tage werden die Tiere im Labor der Klinik für Anästhesiologie in einem Tierhaltungsschrank gehalten (gemäß Vorgaben der GV-SOLAS Gesellschaft für Versuchstierkunde, Society für Laboratory Animal Science). In beiden Fällen werden standardisierte klimatische Haltungsbedingungen gewährleistet: Temperatur zwischen 21-22 ° Celsius, Luftfeuchtigkeit 55-65% und ein Tag-Nachtrhythmus im 12 Stunden Takt, sowie im Tierhaltungsschrank ein Luftstrom

von 43 m³/h und einen daraus resultierenden Luftwechsel von 25 LW/h. Standardmäßig werden Typ 2 Filtertop-Käfige mit einer Grundfläche von 350 cm² verwendet. Als Einstreu dienen Holzspäne. Zum Nestbau steht Zellstoffmaterial zur Verfügung. Weiterhin befindet sich eine Plastikröhre in jedem Käfig. Die Käfige werden wöchentlich gereinigt, sowie nach Umstallung vom Tierstall in die Labore der Klinik für Anästhesiologie und am Tag vor der Kotprobenentnahme. Die Gitterabdeckung des Käfigs beherbergt nicht nur das Futter, hierbei handelt es sich um Standard-Versuchstieralleinfutter, sondern dient den Tieren zusätzlich zum Klettern. Das Trinkwasser wird in Trinkflaschen ad libitum angeboten, die Flasche wird ebenfalls in den Gittereinsatz des Käfigs eingebracht. Durch diese Art der Fütterung wird einer Verunreinigung vorgebeugt. Der Käfig mit Gittereinsatz wird mit einem Luftfilterversehenen Plastikdeckel abgedeckt. Am Tag der Operation, sowie am Folgetag, erhalten die Tiere zusätzlich eingeweichtes Futter in einer Plastikschaale am Käfigboden. Somit wird ihnen die Nahrungs- und Wasseraufnahme erleichtert. Es werden zwei bis maximal drei Tiere in einem Käfig gehalten. Teilweise müssen Tiere separiert werden, bei männlichen Tieren ist bekannt, dass es häufiger zu Rangordnungskämpfen kommt, insbesondere nach dem Säubern der Käfige. So auch im Rahmen dieser Arbeit- drei Tiere wurden wegen Rangordnungskämpfen, bei denen es zu Verletzungen im Bereich der Schwanzwurzel und Genitalregion kommt, in Einzelkäfigen gehalten. Die verletzten Tiere wurden veterinärmedizinisch begutachtet und erholten sich vor Durchführung der Operation ausreichend. Es findet täglich eine Beurteilung des Allgemeinzustandes, des Verhaltens, der Kotbeschaffenheit sowie Gewichtsmessung der Mäuse statt. Sollten sich hierbei Auffälligkeiten ergeben werden die Mäuse veterinärmedizinisch versorgt. Damit eine Unterscheidung der Mäuse gewährleistet ist, werden die Tiere am ersten Tag vor Aufteilung in die Käfige mittels Ohrlochung markiert.

3.3 Operation

Aufgrund der Anzahl von 40 Versuchstieren werden die Operationen auf zwei aufeinanderfolgende Tage, mit je 20 Tieren, verteilt.

3.3.1 Inhalationsanästhesie

Sämtliche Abschnitte, der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche, die mit chirurgischen Eingriffen einhergehen werden in Inhalationsnarkose unter Aufrechterhaltung der Spontanatmung durchgeführt. Bei dem Inhalationsanästhetikum handelt es sich um Isofluran. Zur Narkoseeinleitung wird das Tier unter einen Trichter gesetzt, mit Hilfe eines am Trichter konnektierten Schlauches wird das Isofluran über die konstante Zufuhr eines Sauerstoff-Luft-Gemisches mit einer Konzentration von 4 Volumenprozent (Vol.%) in den Trichter geleitet. Die Maus verbleibt eine Minute unter dem Trichter.

Zur Aufrechterhaltung der Narkose wird eine 1,8-2,8 Vol% Isoflurankonzentration benötigt, dies wird über eine Atemmaske gewährleistet.

Zur Überprüfung der Narkosetiefe wird der Zwischenzehenreflex am Hinterbein der Tiere in regelmäßigen Abständen geprüft.

3.3.2 CCI Model (Controlled cortical impact)

Um das experimentelle SHT zu induzieren, kommt das CCI Model zur Anwendung. Nachdem sich die Maus in ausreichend tiefer Narkose befindet, wird sie auf dem Operationstisch in Bauchlage gelagert. Von besonderer Bedeutung ist hierbei die Positionierung des Kopfes im stereotaktischen Rahmen. Dazu werden die Zähne des Oberkiefers auf einen Beißkeil aufgesetzt, somit ist eine stabile Fixierung des Kopfes gewährleistet. Da ein Schließen der Augen während der Narkose nicht möglich ist werden diese mit Salbe benetzt. Es erfolgt eine rektale Kontrolle der Körpertemperatur. Um einem Abfallen der Körpertemperatur entgegenzuwirken, wird die Maus auf einer Wärmematte mit einer Temperatur von 38°C gelagert, die Kontrolle der Körpertemperatur erfolgt kontinuierlich über eine rektale Sonde. Bevor eine ca. 10 mm lange Hautinzision der Kopfhaut, in Mediansagittallinie, mittels Schere gemacht wird, wird auf den Bereich des Kopfes eine kleine Menge Salbe gegeben. Dies dient zum einen, die Behaarung des Mauskopfes scheitelartig zur Seite zu legen, und zum anderen, der vorbeugenden Wundversorgung. Nach Freilegung des Schädeldaches wird zwischen Bregma und Lambda, mit einem Handbohrer, ein 4x4 mm großes rechteckiges Fenster gebohrt. Anschließend wird das Schädelstück nach medial aufgeklappt. Es ist unbedingt darauf zu achten, dass die Dura mater nicht beschädigt wird. Nun wird der pneumatische Kolben (Impaktor) im Schädelfenster, in rechtem Winkel auf dem Gehirngewebe positioniert. Nach Auslösen des Impaktors mit Knopfdruck, durch den Operateur, kommt es zur Penetration des Hirngewebes. Folgende Parameter werden hierbei erreicht und gewährleistet so, neben der korrekten Positionierung, eine vergleichbare Schädigung bei jedem einzelnen Versuchstier:

Durchmesser Kolbenspitze	3 mm
Aufprallgeschwindigkeit	6 m/s
Eindringtiefe	1,5 mm
Kontaktzeit	200 ms

Im Anschluss wird der Impaktor entfernt. Das Knochenstück wird nach Blutstillung zurückgeklappt und mit Gewebekleber fixiert. Da es durch die traumatische Schädigung zur Anschwellung und Einblutung kommt ist zügiges, aber dennoch sauberes Arbeiten obligat, es sollten keine Haare oder anderes Weichteilgewebe

eingeklemmt werden. Am Ende wird die Kopfhaut mit einer Einzelknopfnahnt verschlossen.

Während der Operation wird in regelmäßigen Abständen durch den Operateur die Atemfrequenz visuell überprüft.

3.3.3 Verfahren Scheinoperation

Bei der Scheinoperation wird die Maus ebenfalls in Bauchlage auf dem Operationstisch positioniert. Die Temperaturkontrolle wird, wie oben beschrieben, durchgeführt. Auf das Fixieren des Kopfes im stereotaktischen Rahmen wird verzichtet. Im Rahmen der Scheinoperation wird lediglich der Hautschnitt wie oben beschrieben durchgeführt und ebenfalls wieder durch eine Einzelknopfnahnt verschlossen. Da die Scheinoperation weniger Zeit in Anspruch nimmt als das CCI-Verfahren, wird hier darauf geachtet, dass die Tiere in den beiden Gruppen ähnlich lange in Narkose verbleiben. Dies soll Ergebnisverzerrung durch unterschiedliche Narkosezeiten vorbeugen.

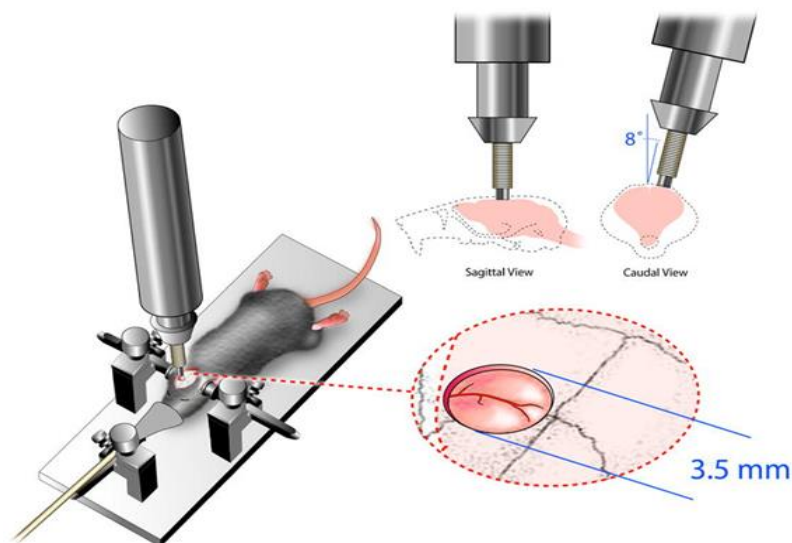


Abbildung 3 CCI-Methode, modifiziert nach Onyszchuk

Die Abbildung 3 zeigt die CCI-Methode, welche auch in dieser Arbeit Anwendung gefunden hat. Illustriert ist die Lagerung des Versuchstieres im stereotaktischen Rahmen sowie die Positionierung des Impaktors (118).

3.3.4 Postoperative Versorgung

Nach der Operation verbleiben die Tiere noch mindestens 30 min bis zu 120 min in einem Inkubator, welcher eine Temperatur von 33° Celsius und eine Luftfeuchtigkeit von 35% gewährleistet.



Abbildung 4 Inkubator

3.3.5 Operationsprotokoll

Protokoll Sham Maus/ CCI Maus TVA G15-1059 Operateur: _____

Details zur CCI:

OP Datum:

Geschwindigkeit: m/s

Geplante Überlebensdauer: 72h

Aufprallzeit:

Tötungsdatum/Uhrzeit:

Eindringtiefe:

Versuchs-ID: AB72h #

Lokalisation: rechts

Tier- ID s. Randomliste

Sham-OP (NUR NARKOSE)

Gewicht prä-OP: _____

Gewicht prä-mortem: _____

Rektale Temperatur prä-OP: _____

intra-OP: _____

Narkosedetails:

Beginn	
Ende	
Dauer	

Anästhetikum: Isofluran (Einleitung 1 min 4 Vol%)

Konzentration: _____ Vol%

Inkubatorzeit: 35% Luftfeuchtigkeit, 33° Celsius

0,5 h

Gehirnentnahme: vollständig

Gehirnkonservierung: Trockeneis

Gehirn gelagert in Box: _____

Sonstige Entnahmen: Kot, Blut, Darm

Euthanasie:

Anästhetikum: Isofluran (Einleitung 1 min 4 Vol%)

Methode: Decapitation

Besonderheiten:

3.4 Antibiotikagabe

Die Antibiotika werden in das Trinkwasser der Tiere gegeben.

Unter der Annahme, dass eine Maus ca. 5 ml Flüssigkeit am Tag zu sich nimmt und dem durchschnittlichen Gewicht von 25 g, wurden die Menge der Antibiotika und die Menge des Trinkwassers errechnet. Die Trinkflaschen wurden täglich auf 100 ml befüllt.

Folgende Antibiotika, sowie ein Antimykotikum, wurden wie angegeben, verwendet:

- Amoxicillin- Clavulansäure (*Amoxicillin-ratiopharm r comp. 125TS*)
5 mg für 25 g Maus pro Tag- 5 mg/5ml notwendig, 3,2 ml fertige Suspension entsprechen 100mg auf 100 ml Wasser (= 0,2 mg/gKG)
- Vancomycin (*Vancomycin CP 500 mg*)
2,5 mg für 25 g Maus pro Tag- 2,5 mg/5ml notwendig, 1 ml fertige Suspension entsprechen 50 mg auf 100 ml Wasser
- Nystatin (*Nystaderm – S*)
5.000 IU für 25 g Maus pro Tag- 5.000 IU/5 ml notwendig, 1 ml fertige Suspension entsprechen 100.000 IU auf 100 ml Wasser

Die Herstellung der jeweiligen Suspension, Dosierung sowie Aufbewahrung wurden gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die Antibiotikagabe erfolgte ab 14 Tage vor der Operation bis zum Tag der Operation, danach erhielten die Tiere normales Trinkwasser.

Des Weiteren findet eine tägliche Messung der Wassermenge, zur Kontrolle des Trinkverhaltens der Tiere, an vier Käfigen, statt. Es handelt sich hierbei um zwei Käfige mit Antibiotika im Trinkwasser, und zwei Käfigen ohne Antibiotika.

3.5 Analyse der motorischen Funktion

3.5.1 Neurological Severity Score (NSS)

Dieses Bewertungssystem, bestehend aus sechs Kategorien, baut sich folgendermaßen auf:

1. Verlassen einer Kreislinie mit 23,5 cm Durchmesser.

Die Maus wird in der Mitte des Kreises platziert, die Zeitmessung startet und sobald das Tier mit beiden Vorderbeinen die Linie überschreitet, wird die Zeit gestoppt. Auf eine immer gleichbleibende Ausrichtung der Maus sollte beim Platzieren, in der Kreismitte, geachtet werden. Je nachdem wie lange die Maus im Kreis verbleibt, erhält sie mehr oder weniger Punkte:

<30 sec	0 Punkte
30 - 60 sec	1 Punkt
61 – 119 sec	2 Punkte
> 120 sec	3 Punkte

2. Akustischer Reflextest

Hierbei wird direkt im Anschluss an das Verlassen des Kreises, circa 20 cm oberhalb des Versuchstieres, mit den Fingern geschnipst. Dies löst gewöhnlich ein schreckartiges Zusammenzucken aus. Ist das Zusammenzucken vorhanden erhält die Maus 0 Punkte, ist es nicht auslösbar erhält das Tier einen Punkt.

3. Verhaltensauffälligkeit

Hierbei erfolgt eine Beurteilung darüber, ob das Tier ein artspezifisches Such- und Erkundungsverhalten zeigt. Außerdem wird das Bewegungsmuster auf jetzt schon erkennbare Defizite analysiert, beispielsweise ob das Tier gerade auslaufen kann oder hin und her schwankt.

Suchverhalten vorhanden	0 Punkte
Suchverhalten nicht vorhanden	1 Punkt
Gerade aus laufen	0 Punkte
Schwanken	1 Punkt

4. Koordination

Wie in der Abbildung dargestellt werden drei Holzbalken unterschiedlicher Breite (3 cm, 1,5 cm, 1 cm), einer Länge von 50 cm, in einer Höhe von 20 cm, von rechts nach links, von der Maus überquert. Das Gangbild wird beurteilt und die Fehlritte gezählt. (Abbildung 5)

Normales Gangbild, ohne Fehlritte	0 Punkte
Instabiles Gangbild mit Fehlritten	1 Punkt
Keine Bewegung, Herunterfallen	2 Punkte

Die Fehlritte werden jeweils zu der gegebenen Punktzahl notiert

Aufgrund der Tatsache, dass die Verletzung auf der rechten parietalen Hemisphäre verursacht wird, sind vornehmlich linksseitige Beeinträchtigungen bei den Tieren zu erwarten. Dementsprechend wird der Versuchsaufbau so gewählt, dass die Maus von rechts nach links läuft, um die linke Seite besser beurteilen zu können.

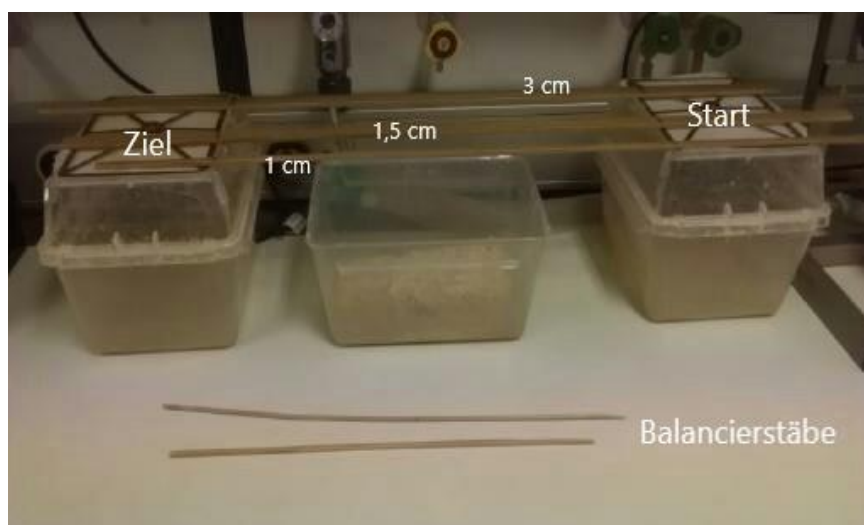


Abbildung 5 Koordinationstest

5. Balanciertest

Bei diesem Abschnitt wird das Greifen und Halten des Versuchstieres an zwei unterschiedlichen Holzstäben beurteilt s. Abb. 5 Balancierstäbe. Es handelt sich jeweils um einen quadratischen und einen runden Stab mit 0,5 cm Durchmesser und 40 cm Länge. Die Maus wird auf den frei gehaltenen Stab gesetzt, leichtes Schräghalten motiviert die Tiere am Holz hinaufzuklettern. Das Halten am runden Stab stellt für die Maus eine größere Herausforderung dar als das Halten des quadratischen Stäbchens. Demnach wird immer mit dem quadratisch geformten begonnen. Zu analysieren ist, ob alle vier Pfoten zum Greifen benutzt werden und ob die Maus fähig ist sich für 10 Sekunden festzuhalten. Sind die Kriterien erfüllt werden 0 Punkte vergeben, bei nicht erfüllen erhält das Tier einen Punkt.

6. Beurteilung des motorischen Defizites

Hierbei wird beurteilt, ob das Tier Lähmungserscheinungen zeigt. Sind keinerlei Beeinträchtigungen erkennbar werden 0 Punkte vergeben, ist eine Pfote gelähmt- 1 Punkt, wenn eine Hemiparese vorliegt, 2 Punkte. Diese letzte Kategorie ist als abschließender Gesamteindruck, welcher sich während des gesamten Scores ergeben hat zu betrachten.

Vor Erhebung des Neuroscore wird jedes Tier gewogen. Der Test wird am Tag vor Operation, am ersten Tag sowie am dritten Tag nach der Operation durchgeführt.

3.6 Rotarod Test (RR)



Abbildung 6 Rotarod

Es stehen fünf, durch Hartplastikscheiben, voneinander getrennte Kammern für die Versuchstiere zur Verfügung. In ca. 15 cm Höhe befindet sich ein drehbarer Balken mit einem Durchmesser von 3 cm. Der Balken ist mit gummiertem, geripptem Material umhüllt, dies erleichtert den Mäusen den Halt. Die Drehgeschwindigkeit des Zylinders ist von 4 bis 40 Drehungen pro Minute regulierbar, weiterhin besteht eine Kopplung zwischen Zylinder und Bodenplatte der Testkammer, sodass bei Herabfallen der Maus, vom Balken, die vorher manuell hochgeklappte Bodenplatte, wieder nach unten klappt und die Zeit gestoppt wird. Es wird nicht nur die Dauer des Laufens auf dem rotierenden Zylinder gemessen, sondern auch die Endgeschwindigkeit, die das Versuchstier erreicht hat.

Die Tiere müssen zunächst zwei Tage vor der Operation ein Training auf dem Rotarod absolvieren, damit zuverlässige Werte ermittelbar sind. Hierbei wird im ersten Durchgang (Training 1.1) die Maus auf dem Zylinder platziert und abgewartet bis das Tier sich ausbalanciert hat und sicher auf dem Zylinder sitzt, erst dann wird der Drehzylinder gestartet. Nachdem Herunterfallen wird Zeit und Geschwindigkeit notiert und die Maus erneut auf den Balken gesetzt (Training 1.2). Nachdem Herunterfallen ist das erste Training beendet und die Maus wird zurück in den Käfig gesetzt. So wird mit allen restlichen Versuchstieren, die an diesem Tag das Rotarod absolvieren müssen, verfahren. Sind alle Tiere einmal an der Reihe gewesen, startet Training 2 ebenfalls mit 2 Versuchen (Training 2.1/2.2), hier wird genauso verfahren wie oben beschrieben, jedoch kann auf die Gewöhnungsphase zu Beginn verzichtet werden.

Am Tag vor der Operation sowie am ersten und am dritten Tag nach der Operation wird der Rotarod Test erneut angewendet, hierbei wird je ein Durchgang mit zwei Versuchen pro Tier ausgeführt.

3.7 Kotprobenentnahme

Die Kotprobenentnahme erfolgt bei den Tieren 21-40 am prä-OP Tag während des Neuroscores und des Rotarod Tests. Bei den Tieren 1-20 am dritten Tag postoperativ ebenfalls während der Tests. Somit ist gewährleistet, dass von jedem Tier eine frische Kotprobe vorliegt. Die Proben wurden käfigweise in einem Probenröhrchen gesammelt und vom Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Mainz ausgewertet.

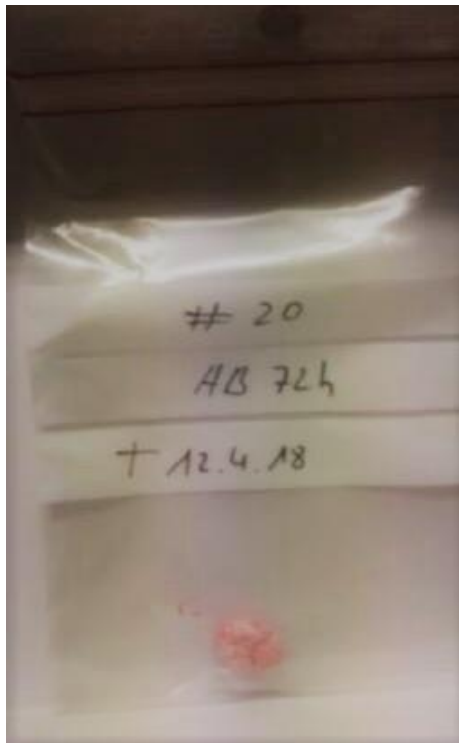
3.8 Euthanasie und Gewebeentnahme

72 Stunden nach der Operation werden die Tiere euthanasiert. Zunächst wird eine Inhalationsnarkose mit Isofluran 1 min 4 Vol% eingeleitet, wenn das Tier ausreichend narkotisiert ist, erfolgt die Dekapitation mit einer Schere.

Das somit herbeigeführte Eröffnen der Cervicalgefäße wird genutzt, um eine Blutprobe zu gewinnen. Der Mausekörper wird hierzu über ein 50 ml Falcon gehalten und ca.1-2 ml Blut aufgefangen und mit 80 µl Heparin versetzt. Das Blut wird im Anschluss zentrifugiert, der Plasmaüberstand abpipettiert und bei – 80°Celsius eingefroren.

3.8.1 Gehirnentnahme

Zur Gehirnentnahme wird zunächst ein sagittaler Hautschnitt gemacht. Danach wird mit der Schere in das Foramen Magnum dorsal eingeschnitten und die Schädelkalotte nach lateral aufgebrochen. Jetzt wird das Gehirn leicht an gelupft und vorsichtig die Hirnnerven durchtrennt, jetzt kann es aus der Schädelgrube genommen, auf zerkleinertes Trockeneis gelegt, und damit bedeckt werden. Nach wenigen Minuten im Trockeneis wird das Gehirn in einen vorbereiteten Probenbeutel verpackt und bei – 27° Celsius gelagert.



**Abbildung 7 entnommenes
Mausgehirn in Probenbeutel**

3.8.2 Entnahme des Darmgewebes

Zum Gewinnen von Colongewebe wird mit einer Schere die abdominelle Körperhöhle eröffnet. Nach Aufsuchen des Colon descendens wird 2 cm proximal des Rektums, mit einer Schere ein ca. 1- 1,5 cm großes Gewebestück abgetrennt und in einem Probenröhrchen, zunächst in Flüssigstickstoff konserviert und anschließend bei -82° Celsius eingefroren wird.

Bei der Inspektion des Abdomens für die Entnahme des Colongewebes, fiel bei einigen Tieren ein stark vergrößertes Caecum auf. Von den Tieren: #1/3/7/8/9/11/12/13/14/15/16/17/19 wird der Blinddarm entnommen, abgewogen und ebenfalls bei -82° Celsius eingelagert.

3.9 Anfertigung der Hirnschnitte

3.9.1 Kryostat

Bei dem verwendeten Kryostaten handelt es sich um das Modell Cryostar Nx70 von der Firma *Thermo Scientific*. Die Bedienung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Unter folgenden Temperaturen wird das Gewebe zugeschnitten:

Im Innenraum - 15° Celsius

Messerklinge - 20° Celsius

Messerblock - 21° Celsius

3.9.2 Vorbereitung Gehirn

Der Objektträger des Kryostats wird mit einer wallnussgroßen Menge Einbettmedium versehen, das Gehirn wird mittig, mit der kaudalen Seite hierauf fixiert. Eine Markierung mit Hilfe des Einbettmediums, auf dem Objektträger im Bereich der Fissura longitudinalis cerebri, hilft nach dem vollständigen Umhüllen mit Einbettmedium, bei der Orientierung. Nun erfolgt die Einstellung im rechten Winkel zur Messerklinge. Im Anschluss kann das Gehirn in seiner Gänze mit Einbettmedium umhüllt werden. Sobald das Gewebe komplett fixiert ist, wird der Objektträger eingespannt und es kann mit dem Schneiden begonnen werden.



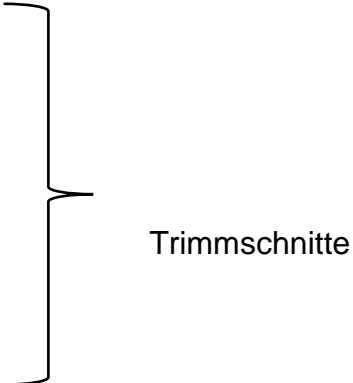
Abbildung 9 Mausehirn in Einbettmedium auf Objektträger



Abbildung 8 Mausehirn in Einbettmedium auf Objektträger, Markierung am Oberrand

3.9.3 Das Schneiden

Es steht ein Schnittprotokoll zur Anleitung zur Verfügung. Nach der oben erläuterten Vorbereitung wird das Gewebe von rostral nach kaudal geschnitten. Beginnend bei Bregma + 3,1 mm entsteht Ebene 1 entsprechend 0 μm . Es werden insgesamt 16 Ebenen angefertigt mit je 500 μm Differenz zueinander:

Ebene 1	0 μm		
Ebene 2	500 μm		
Ebene 3	1000 μm		
Ebene 4	1500 μm		
Ebene 5	2000 μm		
Ebene 6	2500 μm		
Ebene 7	3000 μm		
Ebene 8	3500 μm		
Ebene 9	4000 μm		
Ebene 10	4500 μm		
Ebene 11	5000 μm		
Ebene 12	5500 μm		
Ebene 13	6000 μm		
Ebene 14	6500 μm		
Ebene 15	7000 μm		
Ebene 16	7500 μm		

Die ersten 10 Ebenen werden auf einen Objektträger mit der Bezeichnung A und die restlichen 6 Ebenen auf einen Objektträger mit der Bezeichnung B fixiert. Von jeder Ebene werden sechs Duplikate angefertigt, das heißt, dass von jedem Gehirnschlussschnitt 12 Objektträger vorhanden sind. (6x Ebene 1 bis 10 und 6x Ebene 11 bis 16)

Von Ebene 6 bis Ebene 12 werden Trimmschnitte errichtet. Diese dienen als Gewebeproben für die RNA Extraktion und Proteinanalysen. Hierzu werden 6 x 40 µm dicke Schnitte übereinandergelegt, das ventrale Drittel wird mit einem Skalpell abgetrennt und verworfen. Die Hemisphären werden ebenfalls mit einem Skalpell voneinander getrennt und in ein separates Kryoröhrchen überführt. Dies geschieht abwechselnd in zwei Paare Kryoröhrchen, sodass folgende Aufteilung entsteht:

Kryoröhrchen A: links (gelber Deckel) / rechts (roter Deckel)

Ebene je: 2500 µm, 3500 µm, 4500 µm, 5500 µm

Kryoröhrchen B: links (gelber Deckel) / rechts (roter Deckel)

Ebene je: 3000 µm, 4000 µm, 5000 µm, 6000 µm

Dieses Vorgehen gewährleistet, dass sich in jedem Röhrchen eine ähnliche Menge Gehirngewebe befindet. Der farbliche Unterschied der Deckel mindert das Verwechslungsrisiko. Die Ebenen 6 bis 12 werden gezielt gewählt, da sich hier der Schaden bei den CCI Versuchstieren am deutlichsten zeigt. Die somit gewonnenen Proben werden bei – 80° Celsius gelagert, während die Objektträger bis zur Färbung im – 20° Celsius Kühlschrank verbleiben.

3.10 Histologische Färbung

3.10.1 Kresylviolett

Bei der Kresylviolett oder auch Nissl- Färbung handelt es sich um einen basischen Oxazinfarbstoff. Er dient dazu negativ geladene Zellbestandteile, wie beispielsweise RNA, anzufärben.(119)

Zunächst werden 5 g Kresylviolett in 100 ml Ethanol (100 %) gegeben und 30 min mit einem Magnetrührer bei 50 ° Celsius gemischt. Nun wird auf 500 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt und die Lösung anschließend filtriert.

Die angefertigten Gefrierschnitte müssen zunächst ca. 1 Stunde bei Raumtemperatur getrocknet werden, in dieser Zeit erfolgt das Vorbereiten von acht Tauchbädern, in die die Gefrierschnitte, nachfolgendem Schema, eingetaucht werden:

2 min	70% Ethanol
10 min	Kresylviolett
2x kurz	destilliertes Wasser
2x kurz	70% Ethanol
2x kurz	96% Ethanol
2x kurz	100% Ethanol
5 min	Roti Histol
2min	Roti Histol

Abschließend erfolgt das Einbetten.

3.11 Kontusionsvolumen

Aufgrund der Kreyslviolett- Färbung stellt sich das gesunde Gewebe blau bis violett da. Somit lässt es sich vom geschädigten Gewebe, welches deutlich heller erscheint, gut unterscheiden (Abb.10). Zur Bestimmung des Kontusionsvolumens werden die gefärbten Hirnschnitte mit Hilfe eines Mikroskops und dem *ZEN 2 (blue edition)* Computerprogrammes digitalisiert und ausgewertet (Abb. 10). Mit Hilfe des Programmes wird die Kontur der linken und rechten Hemisphäre umfahren. Danach wird die Konturlinie der geschädigten Hemisphäre so angepasst, dass die Schadensfläche ausgespart bleibt. Man erhält somit die Fläche A gesamt und die Fläche A gesund. Durch Subtraktion dieser Werte lässt sich das Kontusionsvolumen eines einzelnen Hirnschnittes bestimmen. Mit folgender Formel wird demnach das Schadensvolumen (V) in mm³ bestimmt:

$$V = \sum_{1-16} A \times 500 \mu\text{m}$$

A= Schadensfläche= Ipsi gesamt- Ipsi gesund

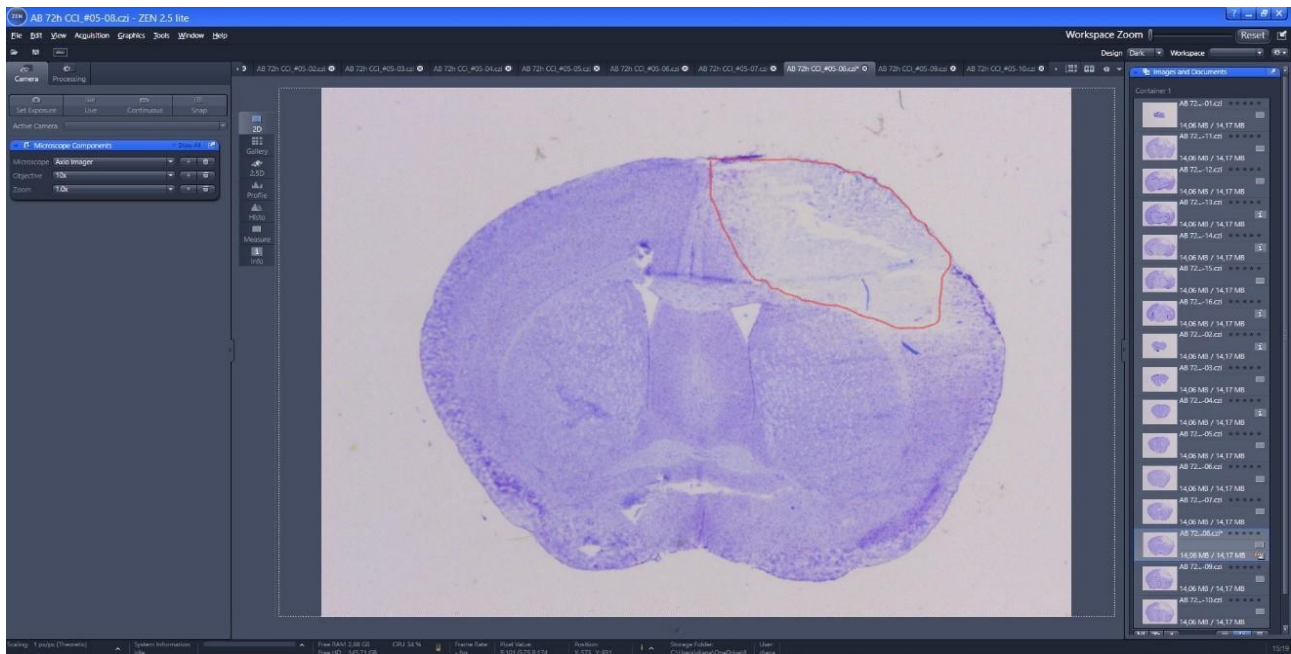


Abbildung 10 Screenshot ZEN 2 Software eines Hirnschnittes. Läsionsvolumen rot umrandet markiert

3.12 Proteinanalysen

3.12.1 Proteinextraktion und Konzentrationsbestimmung

Die gewonnenen Proben, wie unter 3.8 erläutert, werden zunächst zur Proteinanalyse aufbereitet. Hierzu finden 150 µl Radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA) Verwendung (Zusammensetzung s. Tabelle 1). Die enthaltenen Detergenzien brechen die Tertiär- und Quartärstruktur der Proteine auf, die Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) dient als Komplexbildner, während der Protease-Inhibitor die Proteine vor dem Abbau schützt. Nach mehrmaligem Mischen und einer 30-minütigen Inkubation auf Eis, wird die Probe 20 min zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues 1,5 ml Eppendorfer Reaktionsgefäß überführt. Von dem gewonnenen Lysat werden 2 µl 1:10 mit destilliertem Wasser versetzt. 5µl dieser Mischung werden auf eine 96-well- Platte des *Lowry DC Protein Assays* von Progema pipettiert. Des Weiteren wird eine Standardreihe bekannter Proteinkonzentrationen ebenfalls in das Well pipettiert (0; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 µg/µl). Anschließend werden in jedes Well, 25 µl eines Gemisches aus drei verschiedenen Reagenzien (s. Tabelle 2) hinzugefügt. Nach 12 min lichtgeschützter Inkubation, kann die photometrische Bestimmung, bei 750 nm erfolgen. Hierfür wird das Glomex® Detektionssystem verwendet. Abschließend kann anhand einer Standardkurve die Proteinkonzentration in µg/µl erfolgen. Das beschriebene Vorgehen ist notwendig, da sich in den entnommenen Proben eine unterschiedliche Konzentration an Proteinen befindet. Für weitere Analysen, wie beispielsweise den Western Blot, ist die hier gewonnenen Kenntnis über die Proteinkonzentration, notwendig.

Tabelle 1 RIPA Puffer

50 mM	TrisHCl	ph 7,4
150 mM	NaCl	
1 mM	EDTA	4° Celsius
0,1 %	SDS	

Verhältnis Protease-/ Phosphataseinhibitor: 1:5 mit Gewebegewicht

1:10

Lowry DC Protein Assay von Progema

Mix aus:

Tabelle 2 Lowry DC Protein Assay Progema

Reagent A	1700 μ l= 50 Teile
Reagent B	200 μ l
Reagent S	34 μ l= 1 Teil

3.12.2 Elektrophorese

Zum Auftrennen der Proteine wird die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS -PAGE) genutzt. Natriumdodecylsulfat dient als Ladepuffer und β -Mercaptoethanol als Reduktionsmittel. In dieser Arbeit sind die Proteine α II Spectrin, Glycerinaldehyd-3- phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und das Gliafaserprotein (GFAP) von Interesse:

α II Spectrin 120 kDa

GFAP 40 kDa

GAPDH 32 kDa

Anhand dieser Größen bietet sich die Verwendung von selbstgegossenen SDS- Gelen an. Zunächst werden in die ersten beiden Taschen des Gels 5 μ l des *Prestained*-Markers pipettiert. In die folgenden Taschen werden die Proben aus 3.11.1 pipettiert. Da mit Hilfe des Lowry Protein Assays die Proteinkonzentration jeder Probe bekannt ist, wird hierbei eine Masse von 20 μ l Protein pro Probe verwendet und jeweils mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) auf ein identisches Probenvolumen von 100 μ l aufgefüllt. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes mit einer Stromstärke von 40 mA wird die Elektrophorese gestartet, der Vorgang dauert 120 min.

3.12.3 Western Blot

Nach der Elektrophorese wird zunächst eine Kompressionskassette für den TankBlot vorbereitet. Das Gel aus der Elektrophorese, die Nitrozellulosemembran, auf die die Proteine transferiert werden sollen, zwei Filterpapiere sowie zwei Schwämme werden im Blotpuffer (gem. Tabelle 1) getränkt und kompakt in der Kassette zusammengeführt. Durch Anlegen des elektrischen Feldes, senkrecht zur Oberfläche der Membran, mit einer Stromstärke von 380 mA, werden die Proteine auf die Nitrozellulosemembran transferiert. Dieser Vorgang dauert, je nachdem welche Proteine transferiert werden sollen, unterschiedlich lange. Für die Proteine GAPDH, GFAP und α II Spectrin dauert das Überführen 90 min. Als nächste wird die Membran mit Ponceau S, einem speziellen Proteinfarbstoff, angefärbt. Die Proteinbanden sind nun sichtbar, was der Kontrolle dient. Im weiteren Schritt wird die Nitrozellulosemembran in einer 5% Magermilchlösung mit Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan gepufferter Salzlösung (TBST), für 1 Stunde, bei Raumtemperatur (RT), inkubiert. Dies dient der Blockierung unspezifischer Bindungsstellen. Es folgt die Inkubation mit dem Primärantikörper (s. Tabelle 3) 16 Stunden über Nacht, bei 4°Celsius. Am nächsten Tag wird die Membran dreimal für 5 min in TBST gewaschen, um dann die Inkubation mit dem Sekundärantikörper, welcher mit einem Fluoreszenz Farbstoff markiert ist, 1 Stunde bei RT durchgeführt. Im Anschluss hieran wird noch zweimal für 5 min mit TBST ausgewaschen. Zum Schluss wird mit Hilfe eines computergestützten Detektionsverfahrens, dem Licor Odyssey® Imaging System, das Fluoreszenzsignal detektiert. GAPDH dient als Kontrollprotein, da seine Expression unabhängig von verschiedenen Einflüssen, konstant bleibt. Zur Auswertung wird der Quotient aus der Bande des jeweilig detektierten Proteins und dem Kontrollprotein genutzt.

Primärantikörper

Tabelle 3 Primärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Herkunft
anti- α II Spectrin,	1: 5000	mouse AB
anti- GFAP	1: 1000	rabbit AB
anti- GAPDH	1: 10000	mouse AB

Transferpuffer (TankBlot)

Tabelle 4 TankBlot

25 mM	Tris HCL 25 ml (ph 8,3)
192 mM	Glycin 14,4 g
20 %	Methanol 200 ml
	H2O bis 1000 ml auffüllen

3.12.4 Dot Blot Immunglobulin G

In dieser Arbeit wird mittels Dot Blot der Gehalt an Immunglobulin G (IgG) bestimmt. Der quantitative Nachweis erfolgt durch Detektion von Fluoreszenzsignal, des vorher markierten Proteins. Es werden 10 µg Protein untersucht. Die in 3.11.1 erwähnte Konzentrationsbestimmung stellt die Basis da. Es werden je 2 µl der Proben (entsprechen 10µg Protein) sowie zwei Negativkontrollen RIPA, auf eine Nitrozellulosemembran mit sogenannten Spots gegeben. Als Spots werden die vorgefertigten Bereiche auf der Membran bezeichnet. Nachdem die Membran an der Luft getrocknet ist, wird sie in eine Reaktionskammer mit 5 % Magermilchlösung gelegt, und eine Stunde auf der Rüttelplatte bei RT inkubiert. Dies dient dazu, dass die unspezifischen Bindungsstellen blockiert werden. Danach wird in einer abgedunkelten Kammer, der mit Fluoreszenzfarbstoff markierte, sekundäre Antikörper (AK) dazugegeben und erneut für eine Stunde bei RT inkubiert. Im Anschluss hieran erfolgt zweimaliges Auswaschen, je 5 min in TBST, auf der Rüttelplatte. Zuletzt kann die photometrische Messung im Li-Cor Odyssey 9260 erfolgen.

3.13 mRNA-Extraktion

Aus den gewonnenen Proben, wie unter 3.11 erläutert, wird nun die RNA extrahiert, es werden die ispsiläsionalen Trimmschnitte verwendet. Das RNeasy Plus Universal Kit von Qiagen wird für die Extraktion genutzt.

Das Gewebe wird zusammen mit einer Metallkugel und 0,9 ml Qiazol in ein Reaktionsgefäß gegeben und 2min im Mastermill (20 Hz) zerkleinert. Das Qiazol dient, bei der stattfindenden Gewebelyse, zur RNasen- Inhibition. Nach 5 min Ruhe bei RT werden 100 µl gDNA Eliminator beigegeben und 15 sec. auf dem Vortexer vermischt. Es folgen 180 µl Chloroform abermals 15 sec. auf dem Vortexer und 3 min Ruhe bei RT. Zur Phasenaufftrennung wird nun 15 min, bei 4°Celcius und 1200 x g, zentrifugiert. Es zeigen sich 3 Phasen, die untere Phase (rot) enthält Proteine, die mittlere (milchig) enthält DNA und in der oberen Phase (klar) befindet sich die begehrte RNA. Sie wird abpipettiert und zu 600 µl 70 % Ethanol gegeben. Das Gemisch wird nun in eine Mini-Spin Säule mit RNA-selektiver Silikatmembran gegeben und 15 sec. bei 8000 x g zentrifugiert. Der Durchlauf wird verworfen. Zur weiteren Aufbereitung kommen 700µl RWT Puffer zum Einsatz und anschließender Zentrifugation (15 sek bei 8000 x g). 500 µl RPE Puffer dienen dann dem Auswaschen, auch hier wird zentrifugiert (15 sek bzw. 2 min bei 8000 x g). Das Auswaschen wird noch einmal wiederholt. Es folgt das Nachtrocken in einem neuen Behälter, hierbei wird die Probe 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Das Auffangröhrchen wird ein zweites Mal gewechselt und nun 40 µl RNase- freies Wasser auf die Membran pipettiert und alles ein letztes Mal 1 min bei 8000 x g zentrifugiert. Die isolierte RNA befindet sich nun im Auffangröhrchen.

Abschließend erfolgt die photometrische Bestimmung der RNA- Konzentration. Das Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren liegt bei einer Wellenlänge von 260 nm. In 2 µl RNA Eluat wird nun die optische Dichte (OD) bei dieser Wellenlänge bestimmt. Des Weiteren wird der Reinheitsgrad des Eluates bestimmt. Das Absorptionsmaximum von DNA liegt bei 280 nm, während beispielsweise kohlenhydrathaltige Verunreinigungen ein Maximum bei 230 nm zeigen würden. Somit lässt sich durch Bildung der Quotienten der Reinheitsgrad bestimmen:

$$\text{Reinheitsgrad} = \frac{A_{260 \text{ nm}}}{A_{280 \text{ nm}}}$$

sowie

$$\text{Reinheitsgrad} = \frac{A_{260 \text{ nm}}}{A_{230 \text{ nm}}}$$

A= Absorption

Die Quotienten sollten zwischen 1,8 und 2,1 liegen.

3.14 cDNA Synthese

Um die Polymerasekettenreaktion (PCR) durchzuführen, muss die RNA zunächst in die komplementäre cDNA umgeschrieben werden. Dieser Schritt wird mit Hilfe des *QuantiTect reverse Transcription Kit* von *Qiagen* vollzogen. Zunächst werden 0,5 µg RNA jeder Probe mit RNase freiem Wasser auf ein Volumen von 12 µl aufgefüllt. Die unter 3.12 ermittelte RNA Konzentration in jeder Probe, stellt hierfür die Basis da. Nun werden 2 µl gDNA Eliminationspuffer hinzugegeben und für 8 min bei 42° Celsius inkubiert. Danach werden 6 µl eines Mastermix, bestehend aus Reverser Transkriptase, Puffer sowie dem Primermix im Verhältnis 1:4:1 zu jeder Probe hinzugegeben und dies dann bei 95° Celsius für weitere 3 min inkubiert. Abschließend wird mit RNase freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 40 µl aufgefüllt. Die Lagerung der somit gebildeten cDNA erfolgt bei – 80° Celsius.

3.15 PCR

Die PCR dient dazu einen spezifischen DNA- Abschnitt, der als Template bezeichnet wird, zu kopieren. Hierbei laufen folgende drei Schritte im Wesentlichen bei jeder PCR gleich ab:

1. Denaturierung der DNA bei 95° Celsius
2. Annealing der Primer
3. Elongation

Gewöhnlich wird dieser Zyklus 20 – 40-mal durchlaufen. In dieser Arbeit wird der Thermocycler *LightCycler® 480* verwendet. Die Zyklusphasen der PCR- Reaktion werden somit automatisch reguliert.

Um die tatsächlich vorliegende Anzahl an DNA- Kopien zu bestimmen, kommt die Methode der quantitativen Echtzeit PCR zum Einsatz. Dies gelingt mit Hilfe von sequenzspezifischen Hybridisierungssonden, welche an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind. Die Anzahl der PCR- Zyklen und die gemessene Signalemission durch den Fluoreszenzfarbstoff, werden graphisch gegeneinander aufgetragen. Die entstehende Kurve lässt sich in drei Abschnitte unterteilen: Anfangsphase, exponentielle Wachstumsphase und Plateauphase. Die Software gleicht diese, mit einer vorher festgelegte Standardkurve ab und errechnet so die DNA -Menge. Da jede Probe doppelt angesetzt wird, wird schlussendlich, der arithmetische Mittelwert errechnet. Abschließend wird dieser Wert, für jede einzelne Probe, auf das sogenannte *Houskeeping Gen hin* normalisiert. Bei diesem Gen handelt es sich um ein Gen, welches immer in einer bestimmten Anzahl an Kopien vorliegt, unabhängig von experimentellen Einflüssen. Hierfür dient die Peptidylprolyl Isomerase A (PPIA)

Folgende Gene wird die Expression untersucht:

Interleukin 1 β (IL-1 β), High-mobility group protein 1 (HMGB1), saures Gliafaserprotein (GFAP), Tumornekrosefaktor α (TNF α), Translokatorprotein (TSPO), Interleukin 6 (IL-6), Interferon γ (IFN γ)

Da sich die Primer in ihrer Annealingtemperatur unterscheiden und auch das Pipettierschema je nach Target und Programm variiert, sind diese in folgenden Grafiken aufgeführt:

Absolute Fast Sybr Green			19.10.2018	
PPIA/ GFAP/ HMGB1				
10	µl pro Probe Reaktionsvol.			
	Probenzahl:	86		
	"==> Mastermix (+ 5%) X	90,3		
	(µl)			
	5 µl Master SYBR Green	452 µl		
	0,25 PPIA F	22,6 µl		
	0,25 PPIA R	22,6 µl		
	3,5 H2O	316		
"+ 1	µl DNA		µl	
	gesamt	813 µl		
	pro Probe	9 µl		
Programm:	AbsGreen 58°C-10s-15s -Neu			
				Cycles
Präinkubation	95 °C	15 min		1 none
Denaturierung	95 °C	10 sec		none
Annealing	58 °C	10 sec		50 none
Extension	72 °C	15 sec		single
Melting	95 °C	5 sec		1 none
	55 °C	60 sec		none
	97°C; Slope =2,2°C/sec	0 sec		continuous
Cooling	40 °C	10 sec		1 none

Abbildung 11 Zyklusphasen PCR GFAP/HMGB1

LC 480					19.10.2018
Light-Cycler 480 Probes Master					
IL1b / IL6					
10	µl pro Probe Reaktionsvol.				
	Probenzahl:	86			
	"==> Mastermix (+ 5%) X	90,3			
	(µl)				
	5 µl Probes Master	452	µl		
	0,25 XY	22,6	µl		
	0,25 XY	22,6	µl		
	0,5 Probe FL	45,2			
	0,5 Probe Cy5	45,2			
	2,5 µl H2O	226			
"+ 1	µl cDNA		µl		
	gesamt	813	µl		
	pro Probe	9	µl		
	1 µl Std-verd.				
Programm:					
	Hybprobe 55°C 10-20-30 45Z Cy5			Cycles	
Präinkubation	95 °C	10	min	1	none
Denaturierung	95 °C	10	sec		none
Annealing	55 °C	20	sec	45	single
Extension	72 °C	30	sec		none
Denaturierung	95 °C	1	min	1	none
Annealing	40 °C	1	min		none
Melting	95°C; Slope = 0,1°C/sec	0	sec		continuous
Cooling	40 °C	30	sec	1	none

Abbildung 12 Zyklusphasen PCR IL1b/IL6

3.16 Immunhistochemische Färbung

Es erfolgt eine Doppelfärbung der Proteine Ionized calcium binding adapter molecule 1 (**Iba1**) und dem sauren Gliafaserprotein (**GFAP**).

Von den, bei – 20° Celsius gefroren gelagerten Hirnschnitten, wird der mit „5A“ beschriftete Objektträger für die Immunhistologie verwendet.

Zunächst werden die Schnitte bei Raumtemperatur für 30 min getrocknet und danach für 10 min mit 5% PFA fixiert und anschließend dreimal, je 3 min in PBS gewaschen. Folgendes Gemisch dient dem Blocken von unspezifischen Bindestellen. Dieser Vorgang dauert eine Stunde.

100 % NGS 750 µl

20% BSA 375 µl

PBS 13875 µl

Danach werden die Primärantikörper, wie folgend aufgeführt, hinzugegeben:

Tabelle 5 Primärantikörper IHC

Primärer Antikörper	Spezies	Verdünnung mit PBST	Hersteller
anti GFAP (anti Maus)	Kaninchen	1:500	Dako, Hamburg, DE
anti MHC-2 (anti Maus)	Ratte	1:250	Biomol, Hamburg, DE
anti Iba1 (anti Maus)	Meerschweinchen	1:500	Wako Chemicals, Neuss DE

Die Objektträger werden in einer Feuchtkammer über Nacht bei 4°Celsius inkubiert.

Am Folgetag wird zunächst 3mal für 10 min in PBS gewaschen, anschließend die Sekundärantikörper aufgetragen und bei Raumtemperatur, in der Feuchtkammer, für 2 h inkubiert.

Tabelle 6 Sekundärantikörper IHC

Sekundärer Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
anti Kaninchen Alexa Fluor 568	Ziege	1:500	Abcam, Cambridge, USA
anti Kaninchen Alexa Fluor 633	Ziege	1:500	Abcam, Cambridge, USA
anti Meerschweinchen Alexa Fluor 488	Ziege	1:500	Abcam, Cambridge, USA

Es erfolgt erneut 3 mal 10-minütiges Auswaschen in PBS.

Nun werden 3 µl von dem Fluoreszenzfarbstoff, 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) hinzugegeben. Nach 5 min Inkubation wird für ebenfalls 5 min in PBST gewaschen. Abschließend werden die Objektträger mit Immunomount eingedeckelt und über Nacht, bei 4° Celsius, getrocknet.

Am dritten Tag in Folge, wird das Deckglas mit Nagellack versiegelt.

3.17 Quantifizierung der Immunhistochemie

Die immunhistochemisch gefärbten Hirnschnitte werden hinsichtlich Astrogliose (anti-GFAP) und Mikrogliose (anti-Iba1) untersucht. Hierzu wird bei allen Schnittbildern ipsilateral die Region periläsional und subcortikal analysiert. Auf der kontralateralen Hemisphäre wird genau dieselbe Region spiegelbildlich untersucht. Zur Anwendung kommt ein Mikroskop mit der Wellenlänge von 488 und 568 Nanometern und einer 20-fachen Vergrößerung. Mit Hilfe der Software Image J werden immunreaktive Strukturen erkannt sofern sie eine Größe von 5 -2000 Pixel aufweisen. Die positiv markierten Zellen werden anschließend ausgezählt.

3.18 Statistische Auswertung

Zur Auswertung der Daten wird die Software GraphPad Prism Version 7.0 verwendet. Zuerst werden mit Hilfe des ROUT-Test, eventuell vorhandene Ausreißer entfernt, und folgend mittels Shapiro Wilk Test auf Normalverteilung hin geprüft. Beim Mehrgruppenvergleich zu einem Zeitpunkt kommt der One-way-ANOVA Test zum Einsatz. Bei Mehrgruppenvergleich zu verschiedenen Zeitpunkten wird der Two-way-ANOVA Test verwendet. Bei allen anderen zwei Gruppen Vergleichen der Mann-Whitney-U- Test sowie der Student's t-Test in Abhängigkeit der Verteilung.

Bei einem p- Wert von $< 0,05$ wird von statistischer Signifikanz ausgegangen und diese in den folgenden Diagrammen mit * gekennzeichnet, p-Wert $< 0,01$ mit ** und p-Werte $< 0,001$ mit *** dargestellt. Bei einem p-Wert von $< 0,1$ wird von einem Trend gesprochen und dies mit # ausgewiesen.

4 Material

4.1 Geräte

Tabelle 7 Geräteliste

Gerät	Hersteller/Vertrieb
Gefrierschränke	-20° C: ProfiLine, Liebherr; Ochsenhausen, DE
	-40° C, UPUL 540, Liebherr; Ochsenhausen, DE
	-80° C, Heraeus Sepatech; Osterode, DE
Gestell für Käfige	Ebeco;Castrop-Rauxel, DE
Isofluran (Forene) Verdampfer	Abbott Drägerwerk, Lübeck, DE
Inkubator	IC 8000, Dräger; Lübeck, DE
Kryostat	Microm HM 560 Cryo-Star, Thermo Fisher Scientific; Walldorf, DE
Laserquelle Lasos LGK 7812 ML-1/LGN 7812	Lasos Lasertechnik, Jena, DE
Lasermikroskop LSM 5 Exciter	Zeiss, Jena, DE
Laser Doppler System	Peri Flux 4001 Master, Perimed; Järfälla,SE
Lochzange	Lochzange für Ohrmarkierung, Ebeco; Castrop-Raxel, DE
Mikroskop	Zeiss, Jena DE
Mikroskopie Kamera Axio Cam 105	Zeiss, Jena DE
Magnetrührer	Ikamag RH, Janke und Kunkel; Staufen, DE
Mikropipetten	Reference, Research, Eppendorf; Hamburg, DE
Gewebehomogenisator Mastermill MM 300	Retsch, Haan, DE
OP-Mikroskop	Technoskop OPMI 1-FC, Zeiss Meditec; Jena, DE
P _H -Meter	CG 832, Schott; Mainz, DE
Rotarod	Hugo Sachs; March-Hugstetten, DE
Stereotaxierahmen	Kopf Instruments; Tujunga, USA
Taumler	Rotamax 120, Heidolph; Schwabach, DE
Temperatursonde	TCAT-2DF Controller, Physiotemp; New Jersey, USA

	TCAT-2LV Controller, Physiotemp; New Jersey, USA
CCI Impactor	Leica, Nußloch, DE
Vapor	Vapor 2000, Dräger; Lübeck, DE
Vortex Reax control	Heidolph, Hamburg, DE
Waagen	Sartorius research, Sartorius; Göttingen, DE
	Sartorius laboratory, Sartorius; Göttingen, DE
	CS-series, Ohaus; Kirchheim, DE
Wärmematte	Homeothermic Blanket, Hugo Sachs; March-Hugstetten, DE
	1086, GFL-Gesellschaft für Labortechnik; Burgwedel, DE
Zentrifugen	Rotanta/RP, Hettich; Tuttlingen, DE
Zentrifuge Eppendorf 5804 R	Eppendorf, Hamburg, DE
Glomax multi + detection System	Promega, Mannheim
Infrarot Laser Imaging - Odyssey 9260	Li-Cor Biosciences, Bad Homburg, DE
Photometer NanoVue System	GE Healthcare, DE
Rota-Rod RS232/LE8200	Hugo Sachs; March-Hugstetten, DE
Stickstoffbehälter	

4.2 Chemikalien

Tabelle 8 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Aqua destillata	Braun; Melsungen, DE
Bovines Serum Albumin (BSA)	Roth, Karlsruhe, DE
Chloroform	Sigma, St. Louis, MO, USA
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Sigma, St. Louis, MO, USA
DMSO (Dimethyl Sulfoxid)	Dimethyl sulfoxide, Sigma-Aldrich; München, DE
Ethanol absolut	Roth; Karlsruhe, DE
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetische Säure Sigma-Aldrich; München, DE
Einbettmedium	NEG 50, Richard Allan Scientific, Thermo scientific; Dreieich, DE,

Eindeckmedium	Immuno Mount Shandon, Thermo Electron; Karlsruhe, DE
	Roti-Histokitt, Roth; Karlsruhe, DE
Flüssigstickstoff	Air Liquide; Düsseldorf, DE
Histoacryl, Gewebekleber	Braun, Melsungen
Glycerol	Sigma-Aldrich; München, DE
Isopropanol	Roth; Karlsruhe, DE
Kresylviolett	Merck; Darmstadt, DE
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich; München, DE
Mayers Hämalaulösung	VWR; Darmstadt, DE
Magermilch (MM)	Roth, Karlsruhe
NaCl	ACS, ISO, Roth; Karlsruhe, DE
Natronlauge 10M	Sigma-Aldrich; Steinheim, DE
Normal Goat Serum (NGS)	Dako, Hamburg
Paraformaldehyd (PFA)	Merck; Darmstadt, DE
PBS Dulbecco Trockensubstanz	Biochrom; Berlin, DE
Protease Inhibitor	Roche, Molecular Biochemicals, Mannheim
Roti-Histol	Roth; Karlsruhe, DE
Tissue Tek	O.C.T Compound, Miles; Elkhart, USA
Triton X-100	Sigma-Aldrich; Steinheim, DE
Salzsäure (1 N)	Merck; Darmstadt, DE
Stickstoff flüssig	Air Liquide, Düsseldorf, DE

4.3 Medikamente

Tabelle 9 Medikamente

Medikament	Hersteller
Bepanthen-Augensalbe®	Bayer Vital, Leverkusen, DE
Forene® (Wirkstoff: Isofluran)	Baxter, Unterschleißheim, DE
Amoxicillin-ratiopharm comp. TS	Ratiopharm
Vancomycin CP 500 mg	Hikma Pharma GmbH
Nystatin, <i>Nystaderm – S</i>	Holsten Pharma GmbH, DE

4.4 Antikörper

Tabelle 10 Antikörper 1

Primärer Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
anti- alpha 2 Spectrin	Maus	1: 5000	Dako, Hamburg,DE
anti- GFAP	Kaninchen	1: 1000	Dako, Hamburg, DE
anti- GAPDH	Maus	1: 10000	Dako, Hamburg, DE

Tabelle 11 Antikörper 2

Primärer Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
anti GFAP (anti Maus)	Kaninchen	1:500	Dako, Hamburg, DE
anti MHC-2 (anti Maus)	Ratte	1:250	Biomol, Hamburg, DE
anti Iba1 (anti Maus)	Meerschweinchen	1:500	Wako Chemicals, Neuss DE
Sekundärer Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
anti Kaninchen Alexa Fluor	Ziege	1:500	Abcam, Cambridge, USA
anti Kaninchen Alexa Fluor	Ziege	1:500	Abcam, Cambridge, USA
anti Meerschweinchen Alexa Fluor	Ziege	1:500	Abcam, Cambridge, USA

4.5 Lösungen und Puffer

Tabelle 12 Lösungen und Puffer

Chemiekalien	Zusammensetzung
5% BSA Lösung	5 g (w/v) in 100 ml TBST
5% Magermilch Lösung	5 g (w/v) in 100 ml TBST
Blockierlösung Immunhistochemie	0,5% BSA, 5% NGS in 0,1% PBST
Kresyl Lösung	0,031 mM Kresylviolett, 20% (v/v) Ethanol
PBS DMSO (v/v) in 0,1 M Na ₂ CO ₃ in Aqua	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 6,5 mM Na ₂ PO ₄ , 1,5 mM, KH ₂ PO ₄ , pH 7,5
PFA 4%	4 g (w/v) in 100 ml PBS
RIPA Puffer	50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1% NP-40, 0,1% SDS
Transferpuffer (TankBlot)	Tris HCL 25 ml (ph 8,3) Glycin 14,4 g Methanol 200 ml, H ₂ O bis 1000 ml befüllen

4.6 Kits

Tabelle 13 Kits

Kit	Hersteller
Light Cycler 480 Probes Master	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, DE
Absolute Blue qPCR SybrgreenMix AB-4166	Thermo Scientific
RNase-free DNase Kit	Qiagen, Hilden, DE
RNeasy Plus Universal Kit	Qiagen, Hilden, DE
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden, DE
QIAzol Lysis Reagent	Qiagen, Hilden, DE

4.7 Primer

Tabelle 14 Primer

Target	Basenabfolge 5' → 3'
Ppia F	5'GCGTCTSCTTCGAGCTGTT
Ppia R	5'RAAGTCACCACCCTGGCA
GFAP-F	CGGAGACGCATCACCTCTG
GFAP-R	TGGAGGAGTCATTCGAGACAA
HMGB1 S	AGAGGTGGAAGACCATGTCTG
HMGB1 R	GCCTCTTGGGTGCATTG
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
mulL 1b A	CAG GAA GAC AGG CTT GTG CTC
mulL 1b S	GTG CTG TCG GAC CCA TAT GAG
TNFa F	TCT CAT CAG TTC TAT GGC CC

TNFa R	GGG AGT AGA CAA GGT ACA AC
Tspo-F	GCCTACTTTGTACGTGGCGAG
Tspo-R	CCTCCCAGCTCTTTCCAGAC
mIL6 Cy5	Cy5--TGC TCT CCT AAC AGA TAA GCT GGA GTC AC--PH
mIL6 F(ex2,3)	TCG TGG AAA TGA GAA AAG AGT TG
mIL6 FL	CAT AAA ATA GTC CTT CCT ACC CCA ATT TCC-FL
mIL6 R(ex5,6)	TAT GCT TAG GCA TAA CGC ACT AG

4.8 Software

Tabelle 15 Software

Software	Hersteller
Prism 7 for Mac OS X, Version 7.0a	GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA
Zen 2 (blue edition)	Zeiss, Jena, DE
Zen 2008, Version 5.0	Zeiss, Jena, DE

4.9 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 16 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Deckgläser	Diagonal; Münster, DE
Einweg-Handschuhe	Safe Ex, SafeMed; Zimmerwald, CH
Einwegpipetten	Pasteur Pipette, VWR; Darmstadt, DE
Faden	MCAO Suture 6/0,20mm, Docol Corp.; Redlands, CA, USA
Falcon Röhrchen	Greiner; Solingen, DE
Faltenfilter	Macherey-Nagel, Düren, DE
Gewebekleber	Histoacryl, Braun; Melsungen, DE
Kosmetiktücher	Hegro; Büttelborn, DE
Kryo-Boxen	Karton, weiß, Ratiolab GmbH; Dreieich, DE
Markierstift (Fettstift)	Dako Pen, Dako Denmark; Glostrup, DK
MCAO suture (Fäden)	Docol Corporation; Sharon, USA
Mikropipettenspitzen	TipOne, Starlab; Ahrensburg, DE
Molinea plus	Hartmann; Heidenheim, DE
Nahtmaterial	Prolene 6-0, Ethicon; Norderstedt, BEL
Objektträger	SuperFrost-Plus, Menzel-Gläser; Braunschweig, DE
Objektträgerkasten	Mit Deckel, blau, VWR; Darmstadt, DE
Parafilm	Parafilm M, Brand; Wertheim, DE
Pipettenspitzen	Gelb, blau, farblos, Sarstedt; Nümbrecht, DE
Probengefäße	Certified Tube (0,5 ml), Starlab; Ahrensburg, DE
	Citrat (0,5 ml), Sarstedt; Nümbrecht, DE
Reaktionsgefäße	Safe-Lock (1,5 ml, 0,5 ml, 2,0 ml), Eppendorf; Hamburg, DE
Sugi Saugtupfer	Kettenbach; Eschenburg, DE
Schmalbandklinge	Sec 35, Microm, Thermo Fisher Scientific; Walldorf, DE
Schnittstreckerplättchen	Microm, Thermo Fisher Scientific; Walldorf, DE
Tierfutter	EF R/M Ssniff; Soest, DE

5 Ergebnisse

Im Folgenden sind die Ergebnisse als Mittelwert (MW) +/- Standardfehler des Mittelwertes (SEM), Standardabweichung (SD), sowie die Differenz der Mittelwerte (MW Diff) angegeben.

Bei einem p- Wert von **< 0,05 wird von statistischer Signifikanz** ausgegangen und diese in den folgenden Diagrammen **mit *** gekennzeichnet, **p-Wert < 0,01 mit **** und **p-Werte <0,001 mit ***** dargestellt. Bei einem **p-Wert von <0,1 wird von einem Trend** gesprochen und dies **mit #** ausgewiesen.

Da insbesondere die Unterschiede in den beiden Gruppen CCI AB und CCI Veh von Bedeutung sind, werden in den graphischen Abbildungen primär signifikante Unterschiede zwischen diesen beiden Behandlungsgruppen hervorgehoben. In den beigefügten Tabellen sind die Mittelwerte inklusive der p-Werte aller Gruppenvergleiche aufgeführt.

Es folgt eine Übersicht für die Bezeichnung der Gruppen:

sham Veh: scheinoperierte Tiere ohne Antibiotikatherapie

sham AB: scheinoperierte Tiere mit Antibiotikatherapie

CCI Veh: kontrollierte kortikale Kontusion ohne Antibiotikatherapie

CCI AB: kontrollierte kortikale Kontusion mit Antibiotikatherapie

5.1 Gewicht

Anhand der Gewichtsentwicklung lassen sich Aussagen über den gesundheitlichen Zustand und das Wohlbefinden der Versuchstiere treffen.

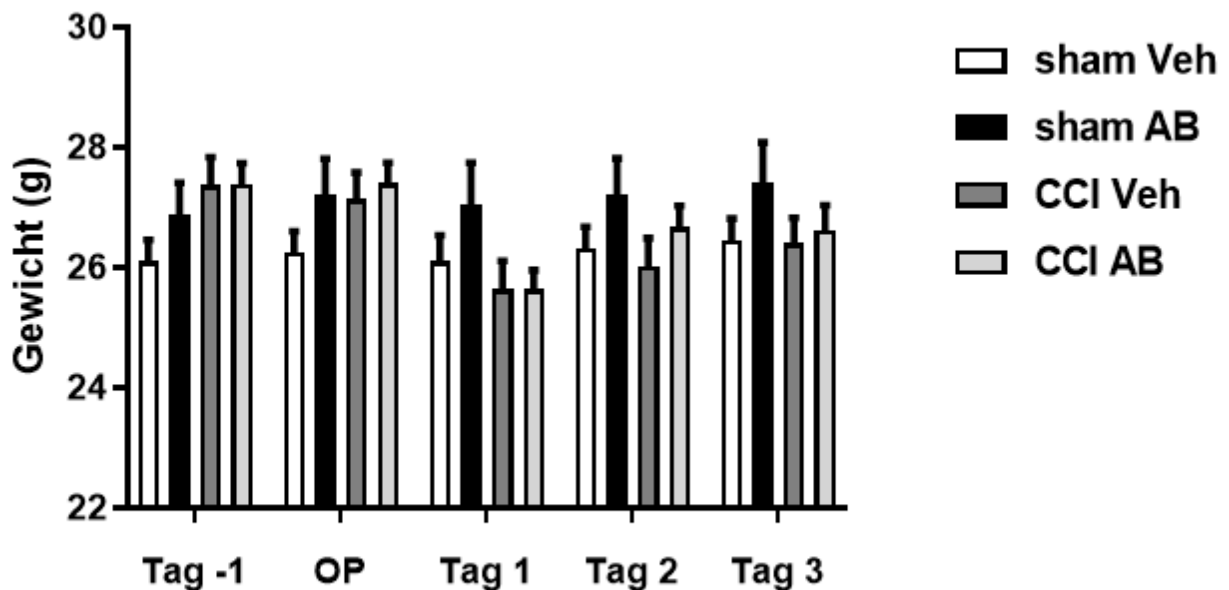


Abbildung 13 Entwicklung Gewicht

Die Abbildung zeigt die prozentuale Gewichtszunahme bzw. Gewichtsabnahme der Tiere von Beginn der Antibiotikagabe bis zur Euthanasie. Innerhalb der ersten 13 Tage bis zur Intervention ist eine kontinuierliche Gewichtszunahme in allen vier Gruppen zu beobachten. Postoperativ kommt es in beiden CCI Gruppen zu einer Gewichtsreduktion um im Mittel 2 g, während die beiden sham Gruppen ihr Gewicht auch postoperativ halten. Am zweiten Tag nach dem Eingriff stabilisiert sich das Gewicht in beiden CCI Gruppen. Zwischen den beiden CCI Gruppen Veh und AB gibt es keinen statistisch signifikanten Unterschied.

(sham Veh: n= 8, sham AB: n= 8, CCI Veh: n= 12, CCI AB: n= 12)

Tabelle 17 Gewichtsentwicklung

	sham-Veh	sham-AB	CCI-Veh	CCI-AB
prä OP MW (g)	26,11	26,88	27,38	27,38
SEM	0,99	1,51	1,606	1,21
OP Tag MW (g)	26,26	27,21	27,13	27,41
SEM	1,00	1,69	1,55	1,71
Tag 1 post OP MW (g)	26,11	27,04	25,63	25,63
SEM	1,19	1,98	1,64	1,10
Tag 2 post OP MW (g)	26,33	27,21	26,03	26,67
SEM	0,99	1,70	1,61	1,26
Tag 3 post OP MW (g)	26,45	27,43	26,41	26,36
SEM	1,03	1,86	1,45	1,43

5.2 Rotarod

Der Rotarod Test gibt Auskunft über die motorischen Funktionen und die Ausdauer der Versuchstiere.

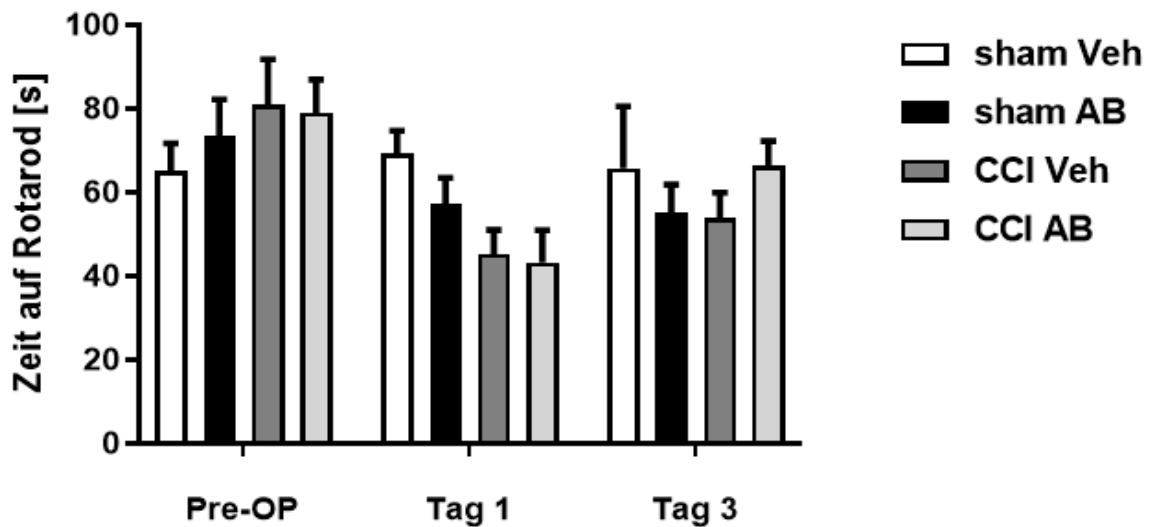


Abbildung 14 Rotarod

Die Abbildung zeigt die Verweildauer der einzelnen Gruppen auf dem Rotarod am Tag vor der Operation sowie am Tag 1 und Tag 3 postoperativ. Hierbei zeigt sich eine kürzere Verweildauer in den beiden CCI Gruppen im Vergleich zu den beiden Sham Gruppen an Tag 1 und Tag 3 postoperativ, diese ist jedoch nicht statistisch signifikant.

(sham Veh: n= 8, sham AB: n= 8, CCI Veh: n= 12, CCI AB: n= 12)

Tabelle 18 Rotarod

		sham Veh	sham AB	CCI Veh	CCI AB
Tag 1	MW	69,25	57,25	45,17	43,25
	SD	15,52	17,52	20,43	26,70
Tag 3	MW	65,75	55,25	53,75	66,33
	SD	41,85	18,68	21,60	20,76

(Mittelwert der Zeit, in Sekunden, bis zum Herunterfallen und Standardabweichung)

5.3 Neurological Severity Score (NSS)

Der NSS erlaubt Aussagen über die neuromotorischen Funktionen der Versuchstiere. Je höher die Punktzahl umso schlechter sind die neuromotorischen Funktionen der Tiere zu werten.

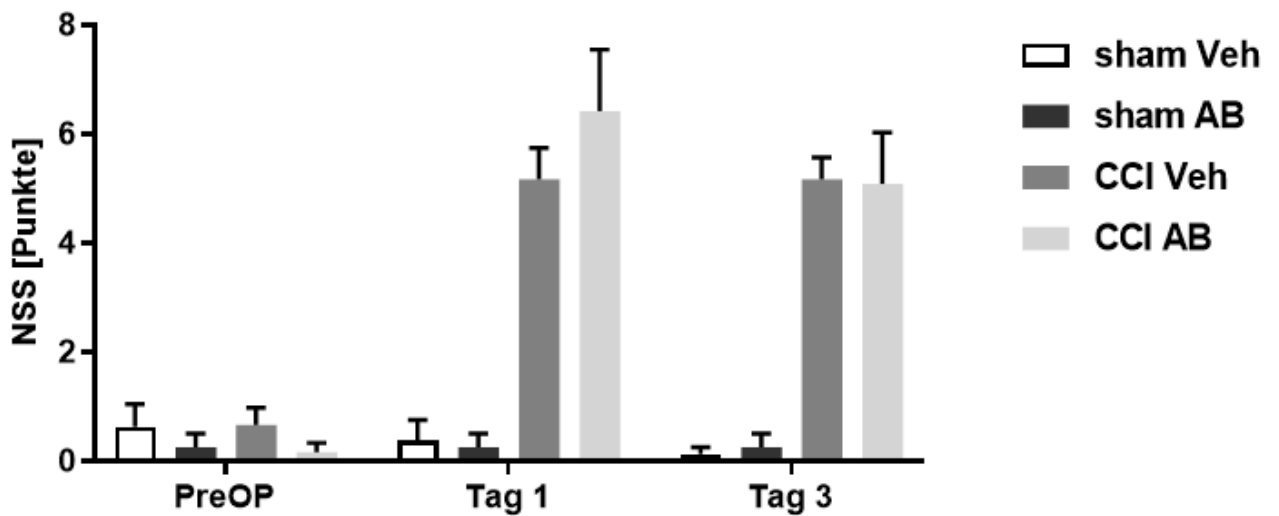


Abbildung 15 NSS

Die Abbildung zeigt die erreichten Punkte der vier Gruppen an dem Tag vor der Operation sowie am Tag 1 und Tag 3 postoperativ.

Tabelle 19 NSS Punktezahl

	sham Veh	sham AB	CCI Veh	CCI AB
PreOP	MW: 0,625	0,25	0,66	0,16
	SEM: 1,18	0,70	1,07	0,57
Tag 1	MW: 0,37	0,25	5,16	6,41
	SEM: 1,06	0,70	1,99	3,91
Tag 3	MW: 0,125	0,25	5,16	5,08
	SEM: 0,35	0,70	1,40	3,28

Die Tabelle 19 zeigt die mittlere Punktezahl der einzelnen Gruppen zu den verschiedenen Zeitpunkten. Zusammengefasst ist im Vergleich der CCI Tiere zu den sham Tieren, an Tag 1 und Tag 3, ein signifikanter Unterschied zu erkennen (p - Wert $< 0,0001$). Im Vergleich CCI-Veh und CCI-AB gibt es jedoch keinen signifikanten Unterschied, weder an Tag 1 (MW Differenz: - 1,032/ 1,269 SEM) noch an Tag 3 (MW Differenz: 0,0833/ SE:1,032).

(sham Veh: $n= 8$, sham AB: $n= 8$, CCI Veh: $n= 12$, CCI AB: $n= 12$)

5.4 Caecum Gewicht

Bei der Entnahme der Gewebeproben des Darmes, imponierte ein vergrößertes Caecum, bei den, mit Antibiotika behandelten Tieren (113).

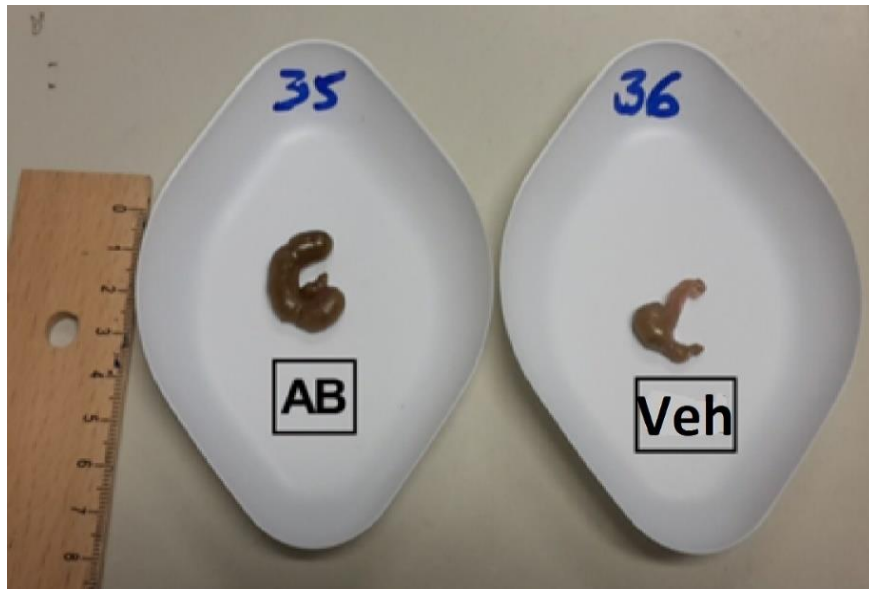


Abbildung 16 Caecumgewicht

Die Abbildung 16 zeigt das Caecum, in der Schale mit der Nummer 35, eines mit Antibiotikum behandelten Tieres; und das Caecum eines Tieres, welches kein Antibiotikum erhielt, in der mit der Nummer 36 beschrifteten Schale.

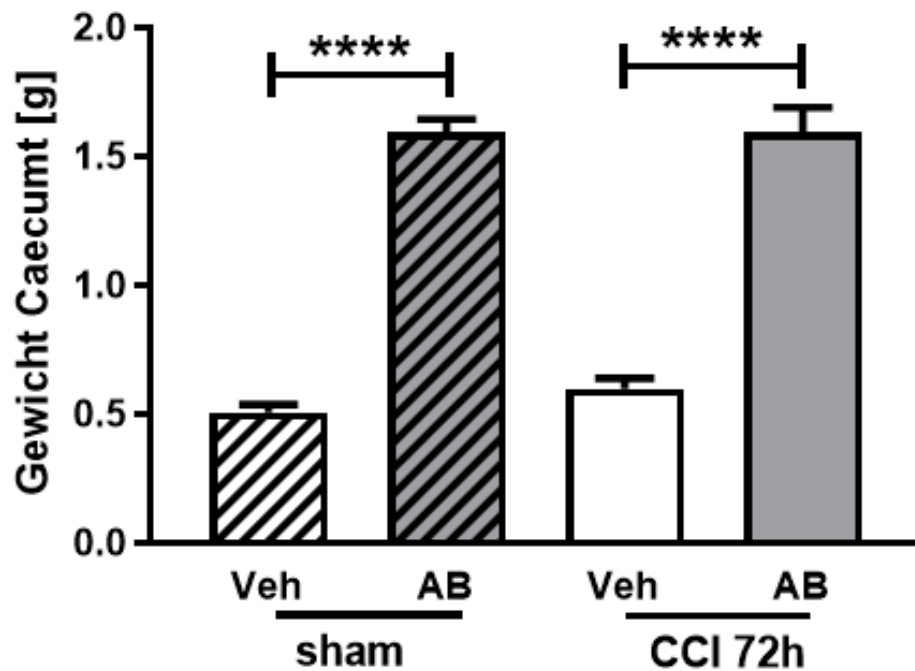


Abbildung 17 Caecumgewicht Graph

Die Abbildung 17 zeigt das Gewicht des Caecums der vier Gruppen. Im Mittel betrug dieses bei den mit Antibiotika behandelten Tieren CCI- AB 1,59 g (SEM: 0,243) und sham AB ebenfalls 1,59 (SEM: 0,096) während die sham- Veh Gruppe bei 0,507 g lag, und die CCI- Veh Gruppe bei 0,6 g. Somit ergibt sich mit einem p-Wert von < 0,0001 ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. (Veh: n=4, CCI: n=6)

5.5 Kontusionsvolumen

Zur Bestimmung des Kontusionsvolumens werden die 16 Schnittebenen, der mit Kresylviolett gefärbten Hirnschnitte, verwendet.

Die aufgeführten Ergebnisse vergleichen jeweils die beiden CCI Gruppen.

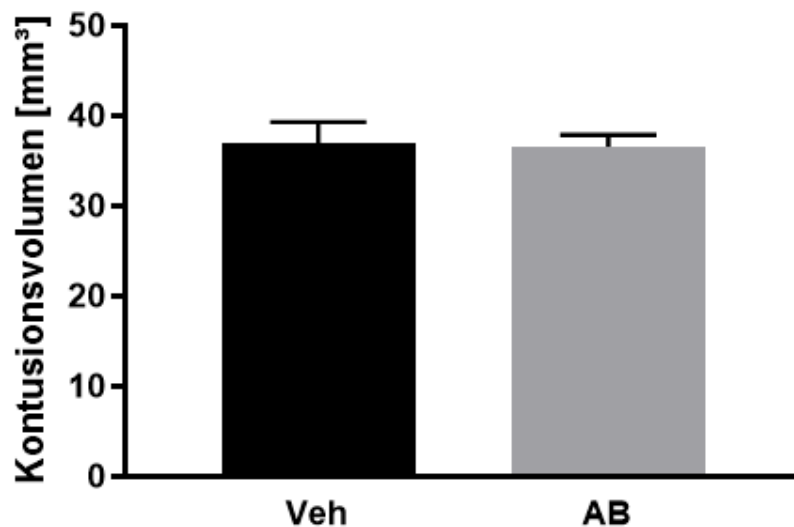


Abbildung 18 Kontusionsvolumen CCI AB- CCI Veh

Die Abbildung zeigt das Läsionsvolumen der beiden antibiotisch behandelten Gruppen CCI-AB und CCI-Veh. Mit einem p Wert von 0,9024 zeigt sich kein statistisch signifikanter Unterschied (MW AB: 36,90, MW Veh.:36,56, Differenz der MW 0,3442 +/- SEM 2,773)

(sham Veh: n= 8, sham AB: n= 8, CCI Veh: n= 12, CCI AB: n= 12)

5.5.1 Gesamtes Gehirnvolumen

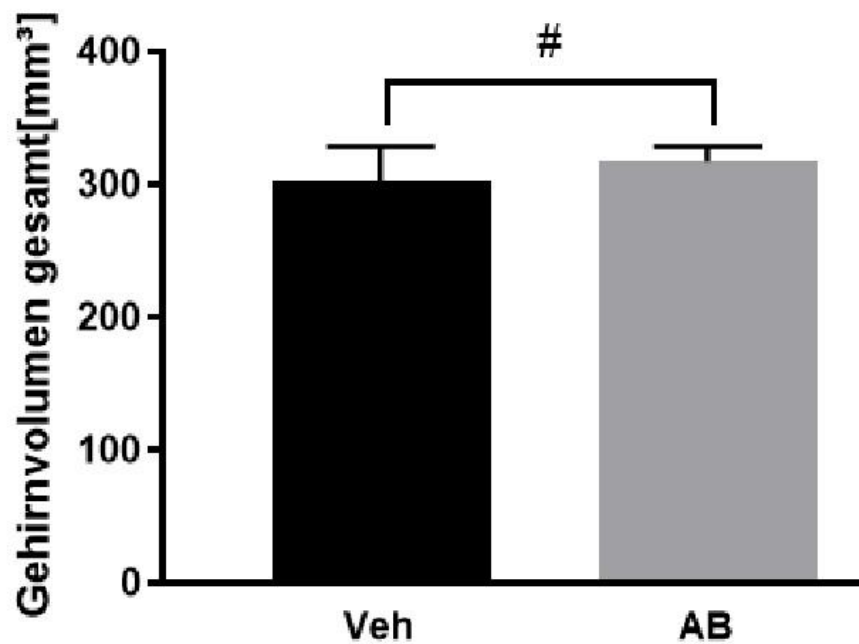


Abbildung 19 gesamtes Gehirnvolumen CCI AB- CCI Veh

Die Abbildung zeigt das gesamte Gehirnvolumen der beiden CCI Gruppen. Im Vergleich zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen der CCI- Veh (MW:317,3) und CCI-AB (MW:302,7) mit einer Mittelwertdifferenz von 14,65 +/- SEM 8,170. Es ergibt sich ein p-Wert von 0,0866, somit ein Trend hin zu mehr Gesamthirnvolumen bei den antibiotisch behandelten Tieren.

(sham Veh: n= 8, sham AB: n= 8, CCI Veh: n= 12, CCI AB: n= 12)

5.5.2 Volumen der kontralateralen Hemisphäre

Die kontralaterale Hemisphäre ist bei den Mäusen die Antibiotika erhielten größer.

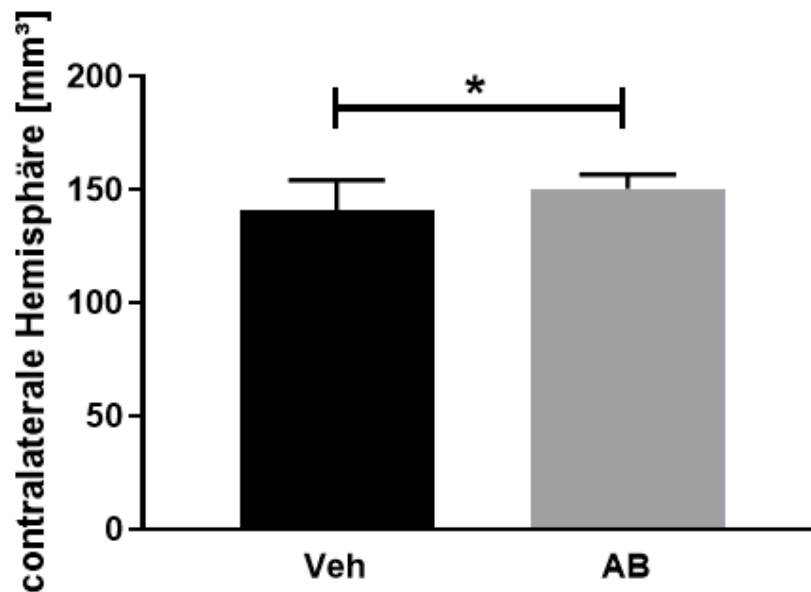


Abbildung 20 kontralaterale Hemisphäre CCI AB - CCI Veh

Die Abbildung zeigt das Volumen der kontralateralen Hemisphäre der beiden CCI Gruppen antibiotikabehandelte Tiere (AB) und Kontrollgruppe (Veh). Es zeigt sich eine statistische Signifikanz mit einem p-Wert von 0,0339 *, Differenz der Mittelwerte AB-Veh +/- SEM 9,328 +/- 4,124 (Mittelwert AB: 150,5 und Mittelwert Veh.: 141,2)

(sham Veh: n= 8, sham AB: n= 8, CCI Veh: n= 12, CCI AB: n= 12)

5.5.3 Volumen der ipsilateralen Hemisphäre

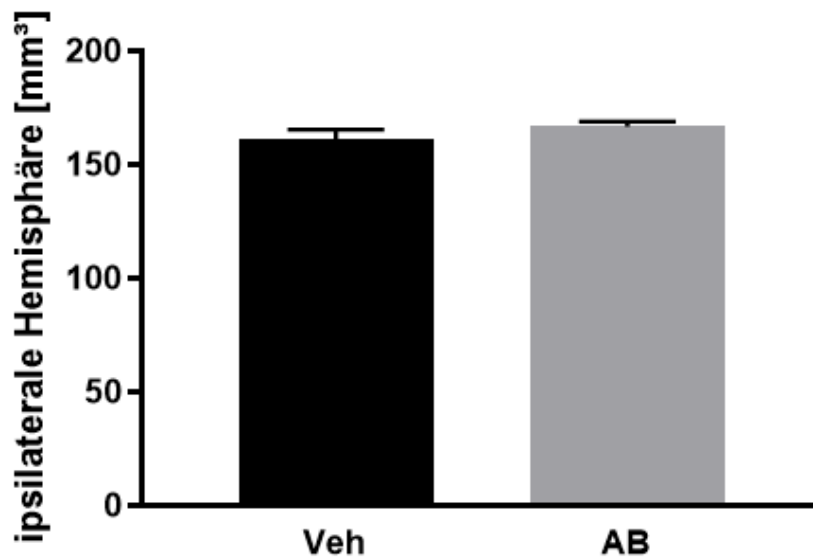


Abbildung 21 ipsilaterale Hemisphäre CCI AB- CCI Veh

Die Abbildung zeigt das Volumen der ipsilateralen Hemisphäre der beiden CCI Gruppen antibiotikabehandelte Tiere (AB) und Kontrollgruppe (Veh). Mit einem p-Wert von 0,2443 gibt es keinen statistisch signifikanten Unterschied. Differenz der Mittelwerte 5,325 +/- 4,452 (MW AB: 166,8 und MW Veh.:161, 5)

(sham Ctrl: n= 8, sham AB: n= 8, CCI Veh: n= 12, CCI AB: n= 12)

5.5.4 Kontusionsvolumen der ipsilateralen Hemisphäre in Prozent

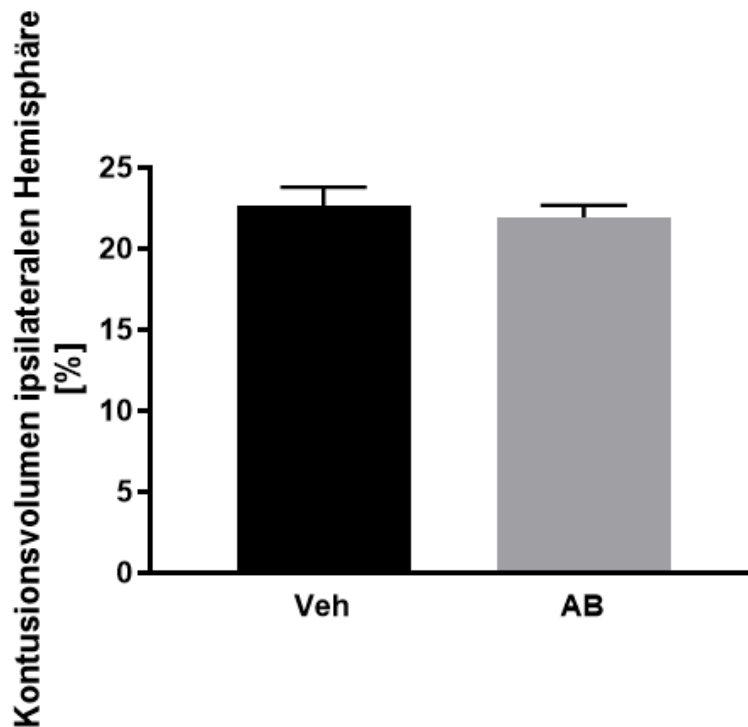


Abbildung 22 Kontusionsvolumen der ipsilateralen Hemisphäre CCI AB - CCI Veh

Die Abbildung zeigt das Kontusionsvolumen der ipsilateralen Hemisphäre in Prozent. Im Vergleich die beiden Gruppen Antibiotika- (AB) und Kontrollgruppe (keine Antibiotika= Veh). Mit einem p-Wert von 0,5878 zeigt sich kein signifikanter Unterschied. Differenz der MW AB-Veh +/- SEM 0,7492 +/- 1,362 (MW AB: 21,92 und MW Veh.: 22,67

(sham Veh: n= 8, sham AB: n= 8, CCI Veh: n= 12, CCI AB: n= 12)

5.6 IgG Dot Blot

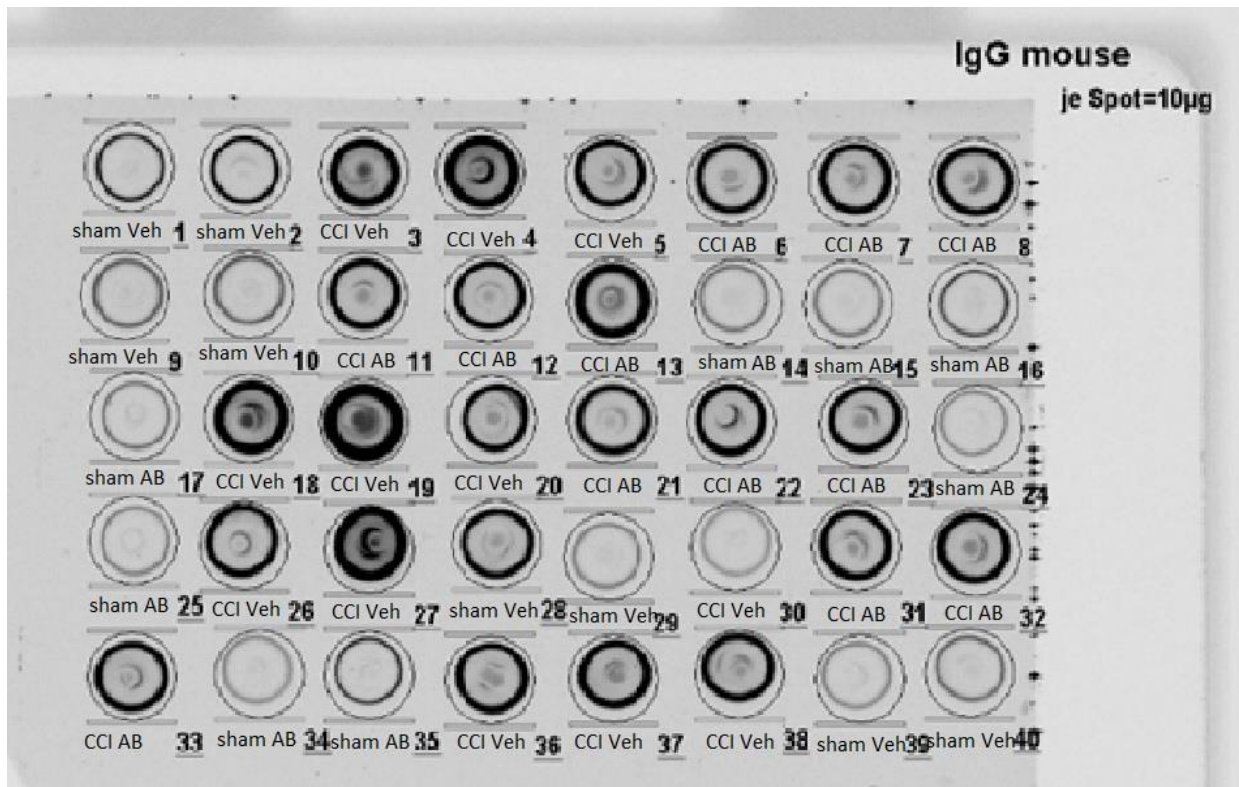


Abbildung 23 IgG Dot Blot Fluoreszenzsignal

Abbildung 23 zeigt das mittels Li-Cor Odyssey 9260 dargestellte Fluoreszenzsignal, der Spots, welche Immunglobulin G enthalten. Je schwärzer die Darstellung im Bild, umso stärker ist das Signal durch den Fluoreszenzfarbstoff und folglich besitzt die Probe mehr Gehalt an Immunglobulin G als vergleichsweise die im Bild helleren (weißen) Proben.

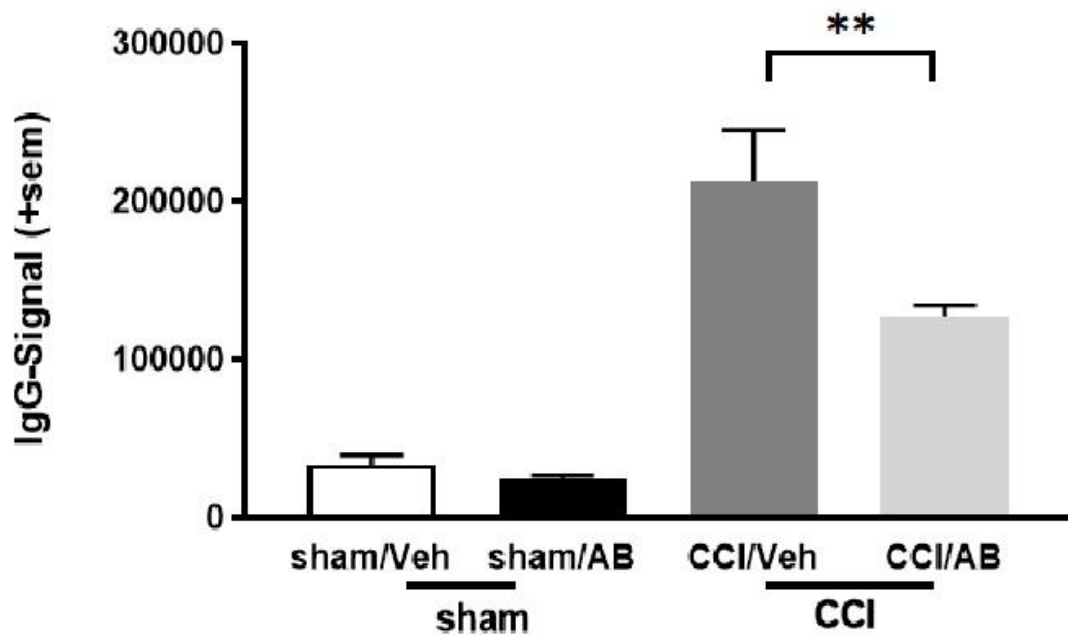


Abbildung 24 IgG Immunfluoreszenz

Abbildung 24 zeigt einen signifikanten Unterschied mit einem p-Wert von $< 0,0001$ zwischen den Gruppen sham-Veh (MW:33175) zu CCI-Veh (MW 213250) SEM: 28536. Weiterhin zwischen den Gruppen sham-AB (MW:24475) zu CCI-AB (MW: 127058) SEM: 28536, einen signifikanten Unterschied mit einem p-Wert von 0,0039. Und ebenfalls einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen CCI-Veh (MW: 213250) und CCI-AB (MW: 127058) SEM: 25523, mit einem p-Wert von 0,0053 **. Zwischen den beiden sham-Gruppen gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied.

(sham Veh: n= 8, sham AB: n= 8, CCI Veh: n= 12, CCI AB: n= 12)

5.7 Proteinanalyse

5.7.1 GFAP

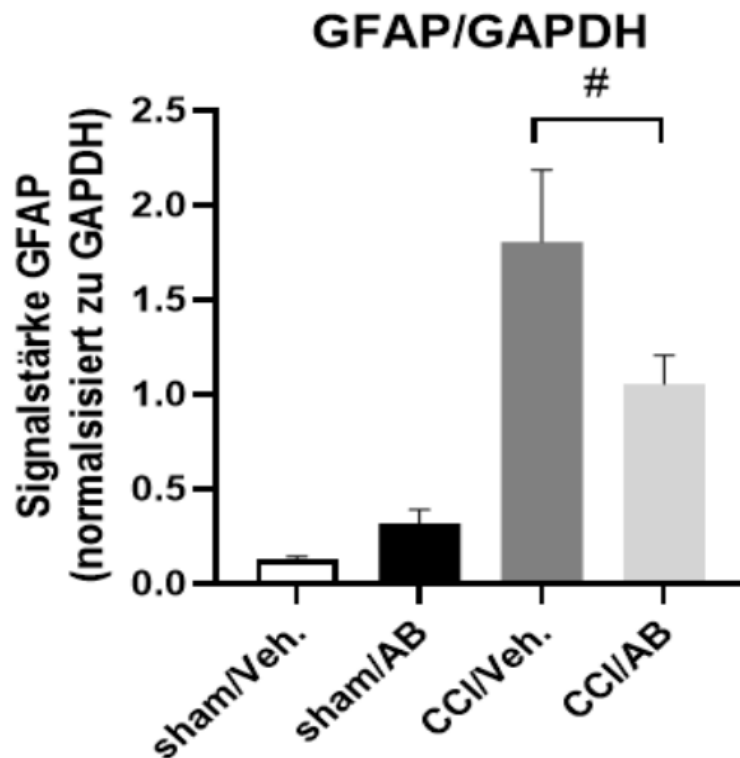


Abbildung 25 Proteinanalyse GFAP

Die Abbildung zeigt den Nachweis der GFAP Proteinexpression im Western Blot im Verhältnis zu dem Kontrollprotein GAPDH, in den vier Gruppen. Es zeigt sich im Zweigruppenvergleich mit einem p-Wert von 0,0825 im ungepaarten t-Test der beiden Gruppen CCI-AB (MW: 1,056) und CCI-Veh (MW: 1,804) ein Trend hin zu weniger GFAP in der CCI-AB Gruppe. Differenz der MW: -0,7486 +/- SEM 0,4115

(sham Veh: n= 8, sham AB: n= 8, CCI Veh: n= 12, CCI AB: n= 12)

5.7.2 Spectrin

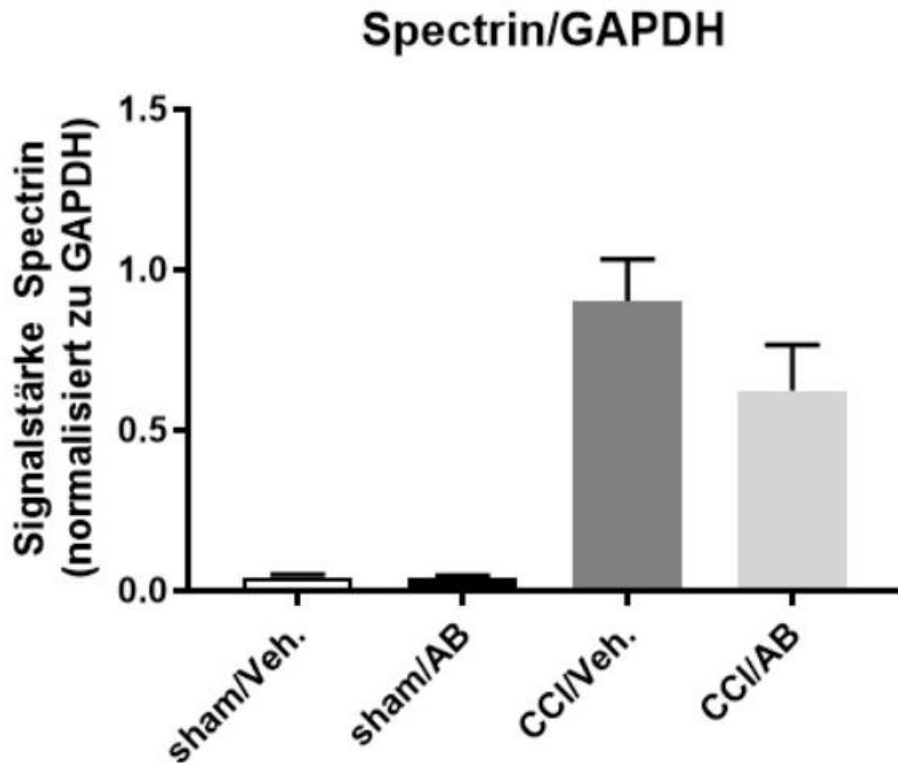


Abbildung 26 Proteinanalyse Spectrin

Die Abbildung zeigt den Nachweis von Spectrin in den vier Gruppen im Verhältnis zum Kontrollprotein GAPDH. Im Vergleich der beiden Gruppen sham-Veh (MW 0,0424) zu sham-AB (MW 0,0385) gibt es mit einem p-Wert von 0,7606 im ungepaarten t-Test keinen signifikanten Unterschied. Die Differenz der Mittelwerte +/- SEM beträgt -0,003871 +/- 0,01246. MW CCI-AB 0,6236 und MW CCI-Veh. 0,903. Die Differenz der Mittelwerte +/- SEM beträgt 0,2795 +/- 0,1509, p-Wert:0,1392.

Die beiden Gruppen CCI-AB (0,453) und CCI-Veh (0,9344) weisen im Mann Whitney Test mit einem p-Wert von 0,1005 keinen signifikanten Unterschied auf.

(sham Ctrl: n= 8, sham AB: n= 8, CCI Ctrl: n= 12, CCI AB: n= 12)

5.8 PCR

5.8.1 IL-1 β

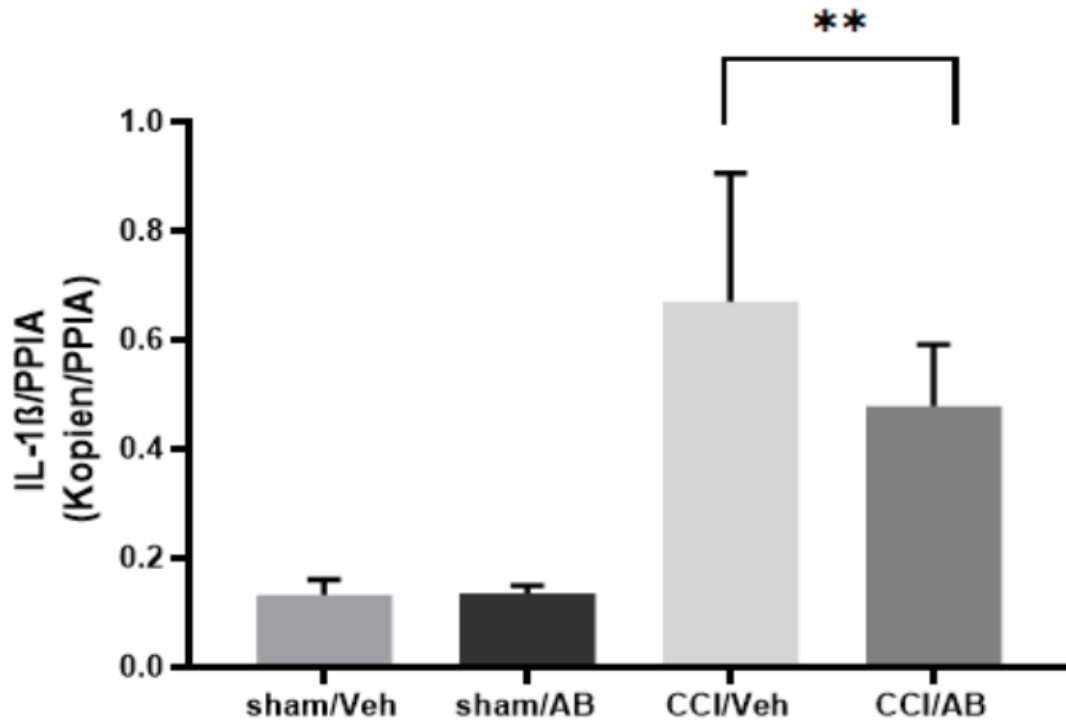


Abbildung 27 PCR IL-1 β

Die Abbildung 27 zeigt den Nachweis der mRNA Expression von IL-1 β im periläsionalen Hirngewebe im Vergleich zu PPIA. Es zeigt sich im Vergleich der sham Gruppen zu den CCI Gruppen stets ein statistisch signifikanter Unterschied. (Siehe Tabelle 20). Des Weiteren ist ein statistisch signifikanter Unterschied mit einem p-Wert von 0,0082 im Vergleich CCI-Veh (MW: 0,67) und CCI-AB (MW:0,47) zu erkennen. (SEM MW Diff: 0,062)

(sham Veh: n= 8, sham AB: n= 8, CCI Veh: n= 12, CCI AB: n= 12)

Tabelle 20 IL-1 β

Gruppen	MW1	MW2	MW Diff	SEM Diff	Signifikant?	p -Wert
sham/Veh vs.sham/AB	0,1328	0.1352	-0.002463	0.07309	nein	0.9733
sham/Veh vs. CCI/Veh	0,1328	0.6707	-0.5380	0.06673	ja	<0.0001
sham/Veh vs. CCI/AB	0,1328	0.4782	-0.3454	0.06934	ja	<0.0001
sham/AB vs. CCI/Veh	0,1352	0.6707	-0.5355	0.06673	ja	<0.0001
sham/AB vs. CCI/AB	0,1352	0.4782	-0.3429	0.06934	ja	<0.0001
CCI/Veh vs. CCI/AB	0,6702	0.4782	0.1926	0.06259	ja	0.0082

5.8.2 IL-6

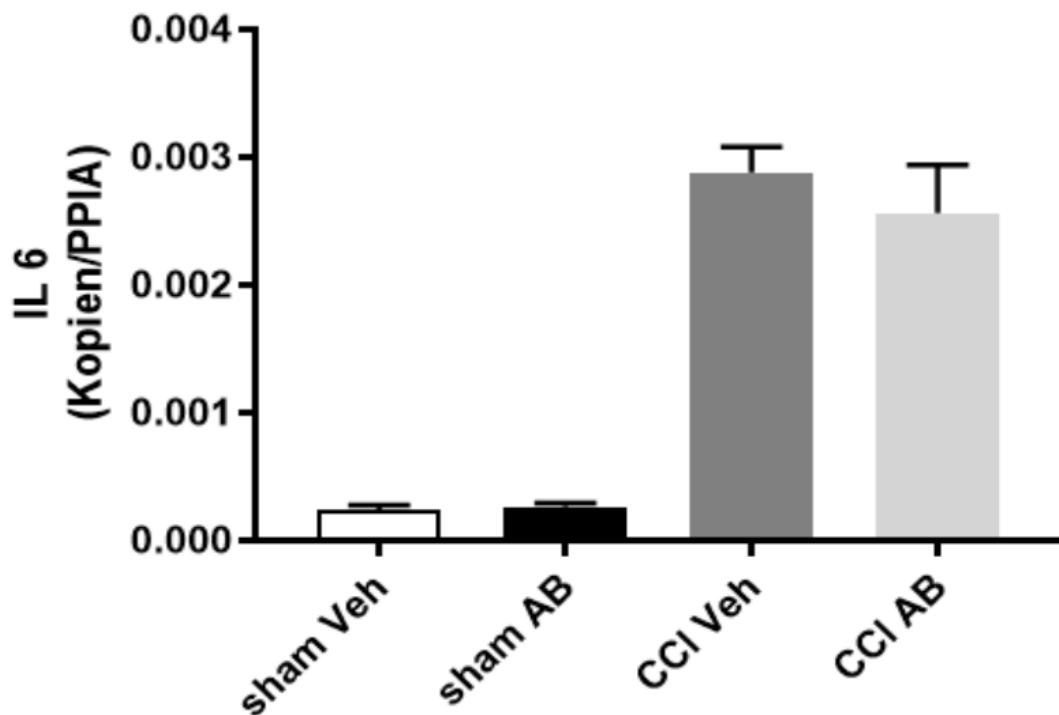


Abbildung 28 PCR IL-6

Die Abbildung 28 zeigt den Nachweis von IL6. Beim Vergleich aller vier Gruppen zeigt sich bei den sham Gruppen zu den CCI Gruppen stets ein statistisch signifikanter Unterschied. (Siehe Tabelle 21). Es gibt keinen statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich sham-Veh (MW 0,00024) zu sham-AB (MW 0,0026) p-Wert 0,9551. Ebenfalls kein signifikanter Unterschied in den Gruppen CCI-Veh (MW: 0,0028) und CCI-AB (MW:0,0025), p-Wert 0,574

(sham Veh: n= 8, sham AB: n= 8, CCI Veh: n= 12, CCI AB: n= 12)

Tabelle 21 IL 6

Gruppen	MW1	MW2	MW Diff	SEM Diff	Signifikant?	p -Wert
sham/Veh vs.sham/AB	0.0002433	0.0002651	-2.188005	0.0003852	nein	0.9551
sham/Veh vs. CCI/Veh	0.0002433	0.002877	-0.002634	0.0003580	ja	<0.0001
sham/Veh vs. CCI/AB	0.0002433	0.002565	-0.002321	0.0003580	ja	<0.0001
sham/AB vs. CCI/Veh	0.0002651	0.002877	-0.002612	0.0003580	ja	<0.0001
sham/AB vs. CCI/AB	0.0002651	0.002565	-0.002299	0.0003580	ja	<0.0001
CCI/Veh vs. CCI/AB	0.002877	0.002565	0.0003127	0.0003285	nein	0.5747

5.8.3 HMGB1

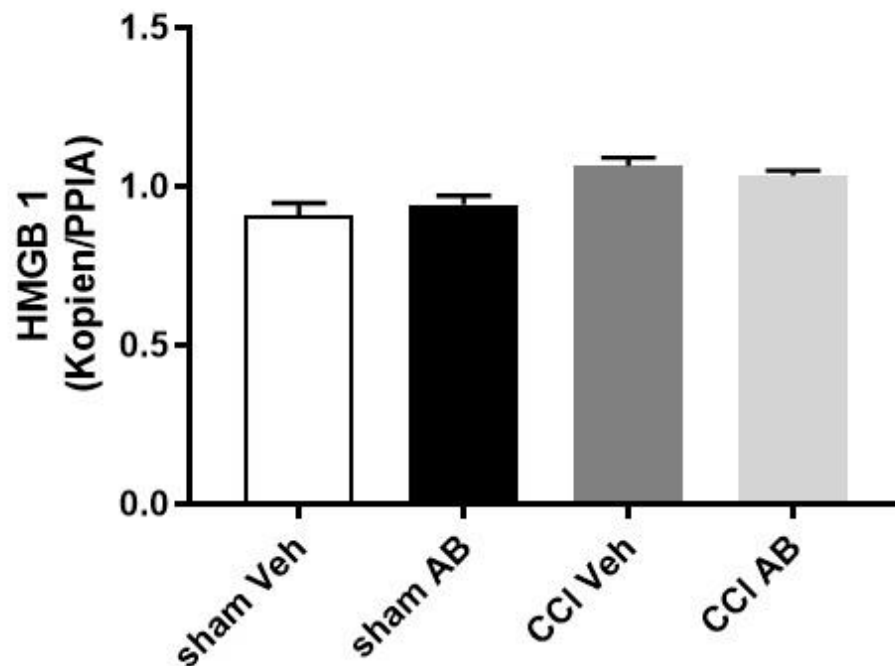


Abbildung 29 PCR HMGB1

Die Abbildung 29 zeigt den Nachweis von HMGB1 in den vier Gruppen. Zwischen den Gruppen CCI Veh und CCI AB gibt es keinen statistisch signifikanten Unterschied

(sham Veh: n= 8, sham AB: n= 8, CCI Veh: n= 12, CCI AB: n= 12)

Tabelle 22 HMGB 1

Gruppen	MW1	MW2	MW Diff	SEM Diff	Signifikant?	p -Wert
sham/Veh vs.sham/AB	0.9099	0.9434	-0.03353	0.04108	nein	0.5866
sham/Veh vs. CCI/Veh	0.9099	1.065	-0.1548	0.03750	ja	0.0012
sham/Veh vs. CCI/AB	0.9099	1.033	-0.1235	0.03750	ja	0.0111
Sham/AB vs. CCI/Veh	0.9434	1.065	-0.1213	0.03750	ja	0.0111
sham/AB vs. CCI/AB	0.9434	1.033	-0.08998	0.03750	nein	0.0637
CCI/Veh vs. CCI/AB	1.065	1.033	0.03129	0.03354	nein	0.5866

5.8.4 GFAP

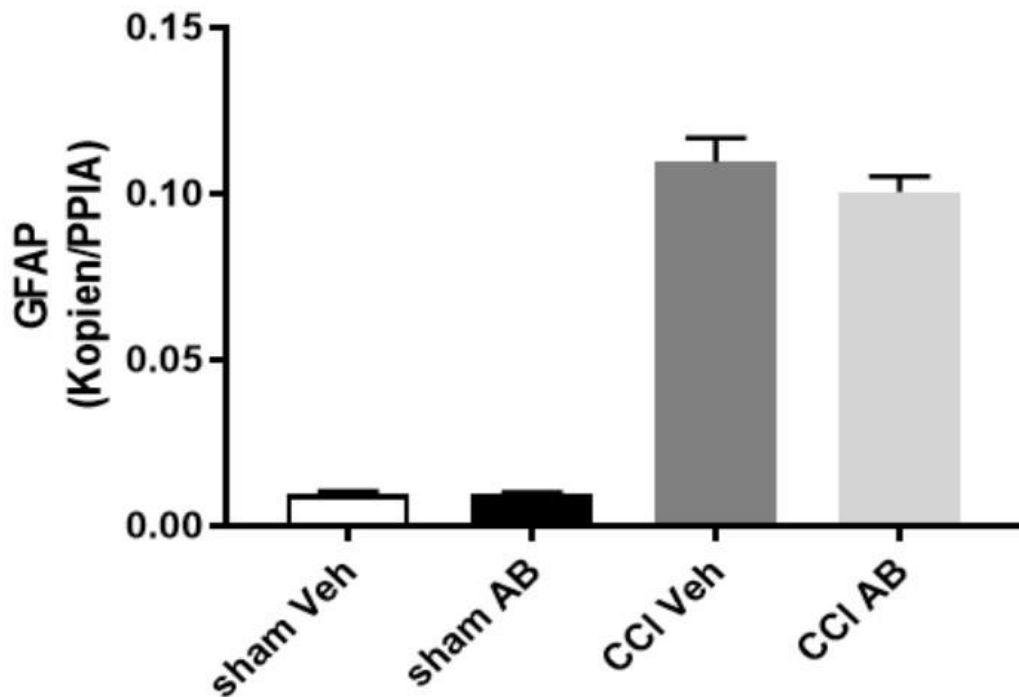


Abbildung 30 PCR GFAP

Die Abbildung 30 zeigt den Nachweis von GFAP. Beim Vergleich aller vier Gruppen zeigt sich bei den sham Gruppen zu den CCI Gruppen stets ein statistisch signifikanter Unterschied. (Siehe Tabelle 23). Es gibt keinen statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich sham-Veh (MW 0,0093) zu sham-AB (MW 0,0094) p-Wert 0,991. Ebenfalls kein signifikanter Unterschied in den Gruppen CCI-Veh (MW: 0,109) und CCI-AB (MW:0,100), p-Wert 0,343

(sham Veh: n= 8, sham AB: n= 8, CCI Veh: n= 12, CCI AB: n= 12)

Tabelle 23 GFAP

Gruppen	MW1	MW2	MW Diff	SEM Diff	Signifikant?	p -Wert
sham/Veh vs.sham/AB	0.009393	0.009480	- 8.750005	SE of diff.	nein	0.9916
sham/Veh vs. CCI/Veh	0.009393	0.1096	-0.1002	0.008243	ja	<0.0001
sham/Veh vs. CCI/AB	0.009393	0.1006	-0.09122	0.007525	ja	<0.0001
sham/AB vs. CCI/Veh	0.009480	0.1096	-0.1001	0.007525	ja	<0.0001
sham/AB vs. CCI/AB	0.009480	0.1006	-0.09113	0.007525	ja	<0.0001
CCI/Veh vs. CCI/AB	0.1096	0.1006	0.008992	0.007525	nein	0.3438

5.8.5 TNF α

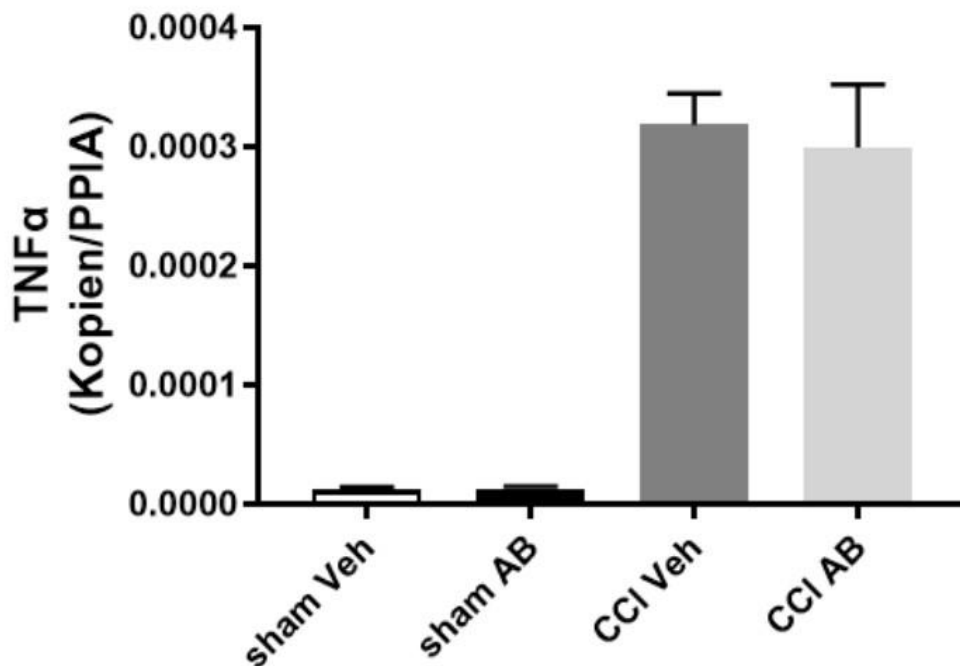


Abbildung 31 PCR TNF α

Die Abbildung 31 zeigt den Nachweis von TNF α . Beim Vergleich aller vier Gruppen zeigt sich bei den sham Gruppen zu den CCI Gruppen stets ein statistisch signifikanter Unterschied. (Siehe Tabelle 24). Es gibt keinen statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich sham-Veh (MW 1,227) zu sham-AB (MW 1,301) p-Wert 0,989 Ebenfalls kein signifikanter Unterschied in den Gruppen CCI-Veh (MW: 0,00031) und CCI-AB (MW: 0,00029), p-Wert: 0,8929

(sham Veh: n= 8, sham AB: n= 8, CCI Veh: n= 12, CCI AB: n= 12)

Tabelle 24 TNF α

Gruppen	MW1	MW2	MW Diff	SEM Diff	Signifikant?	p -Wert
sham/Veh vs.sham/AB	1,227	1,301	-7,400	5,330	nein	0.989
sham/Veh vs. CCI/Veh	1,227	0,00031	0,00030	4,865	ja	<0.0001
sham/Veh vs. CCI/AB	1,227	0,00029	0,00028	4,953	ja	<0.0001
sham/AB vs. CCI/Veh	1,301	0,00031	0,00030	4,865	ja	<0,0001
sham/AB vs. CCI/AB	1,301	0,00029	0,00028	4,953	ja	0.0090
CCI/Veh vs. CCI/AB	0,00031	0,00029	1,895	4,449	nein	0,8929

5.8.6 IFN γ

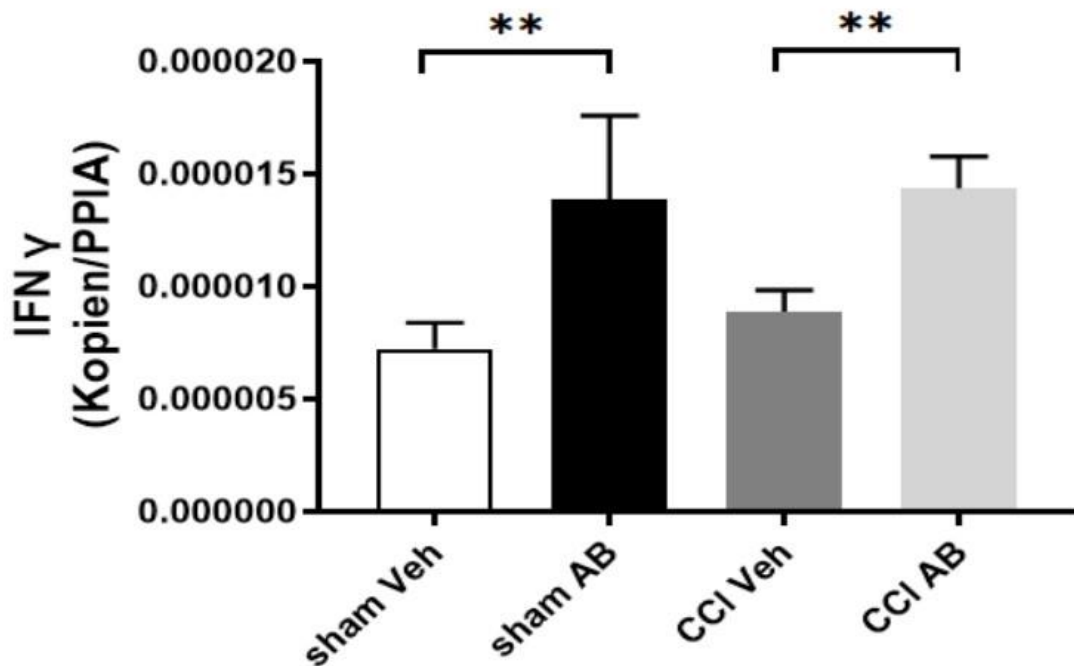


Abbildung 32 PCR IFN γ

Die Abbildung 32 zeigt den Nachweis von IFN γ . Im zwei Gruppen Vergleich von CCI-Veh (MW 8,882) und CCI-AB (MW 1,435) Differenz der MW 5,469 SEM 1,666 lässt sich ein statistisch signifikanter Unterschied mit einem p-Wert von 0,0047 im ungepaarten T-Test nachweisen.

(sham Veh: n= 8, sham AB: n= 8, CCI Veh: n= 12, CCI AB: n= 12)

Tabelle 25 IFNy

Gruppen	MW1	MW2	MW Diff	SEM Diff	Signifikant?	p -Wert
sham/Veh vs.sham/AB	7.223	1.386	-6.640	3.102	nein	0.1617
sham/Veh vs. CCI/Veh	7.223	8.882	-1.660	2.736	nein	0.7975
sham/Veh vs. CCI/AB	7.223	1.435	-7.129	2.832	nein	0.1100
sham/AB vs. CCI/Veh	1.386	8.882	4.980	2.533	nein	0.1732
sham/AB vs. CCI/AB	1.386	1.435	-4.892	2.636	nein	0.8544
CCI/Veh vs. CCI/AB	8.882	1.435	-5.469	2.193	nein	0.1100

5.8.7 TSPO

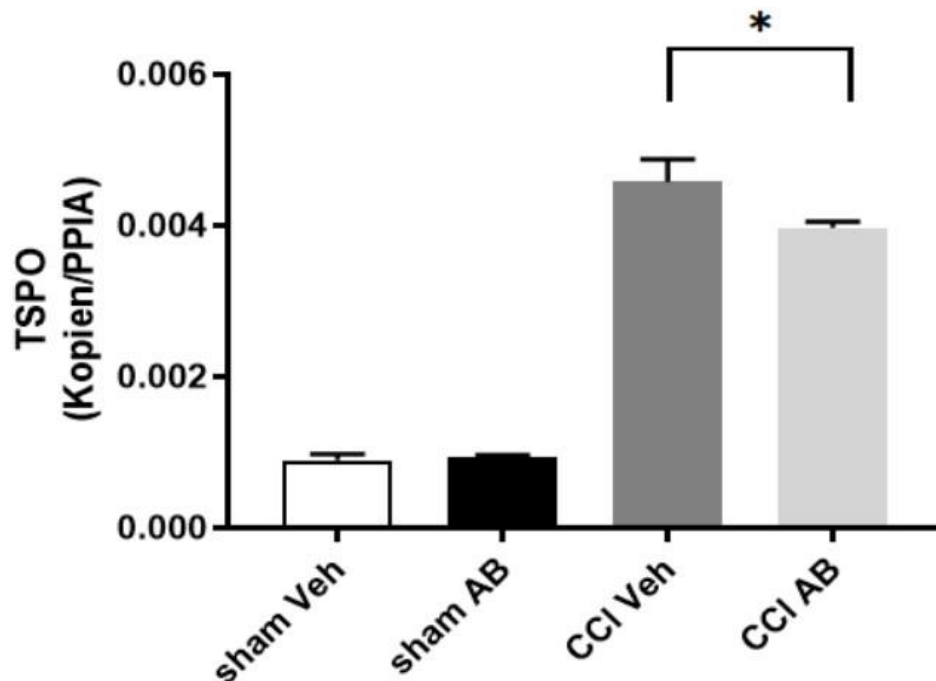


Abbildung 33 PCR TSPO

Die Abbildung 33 zeigt den Nachweis von TSPO. In allen vier Gruppenvergleichen mit Ausnahme sham-Veh zu sham-AB lässt sich ein signifikanter Unterschied erkennen (s. Tabelle 26) Ebenfalls lässt sich mittels ungepaartem t-Test, im zwei Gruppen Vergleich der Gruppen CCI-AB (MW:0,00457) und CCI-Veh (MW: 0,00397, Differenz der MW +/- SEM: -0,00060 ± 0,00032) mit einem p-Wert von 0,045 ein statistisch signifikanter Unterschied nachweisen.

(sham Veh: n= 8, sham AB: n= 8, CCI Veh: n= 12, CCI AB: n= 12)

Tabelle 26 TSPO

Gruppen	MW1	MW2	MW Diff	SEM Diff	Signifikant?	p -Wert
sham/Veh vs.sham/AB	0.0008959	0.00092	-3.113	0.0003	nein	0.9193
sham/Veh vs. CCI/Veh	0.0008959	0.00457	-0.003	0.00027	ja	<0.0001
sham/Veh vs. CCI/AB	0.0008959	0.003973	-0.003	0.00028	ja	<0.0001
sham/AB vs. CCI/Veh	0.0009270	0.004579	-0.003	0.00027	ja	<0.0001
sham/AB vs. CCI/AB	0.0009270	0.003973	-0.003	0.00028	ja	<0.0001
CCI/Veh vs. CCI/AB	0.004579	0.003973	0.0006	0.00025	ja	0.0451

5.8.8 MHC 2

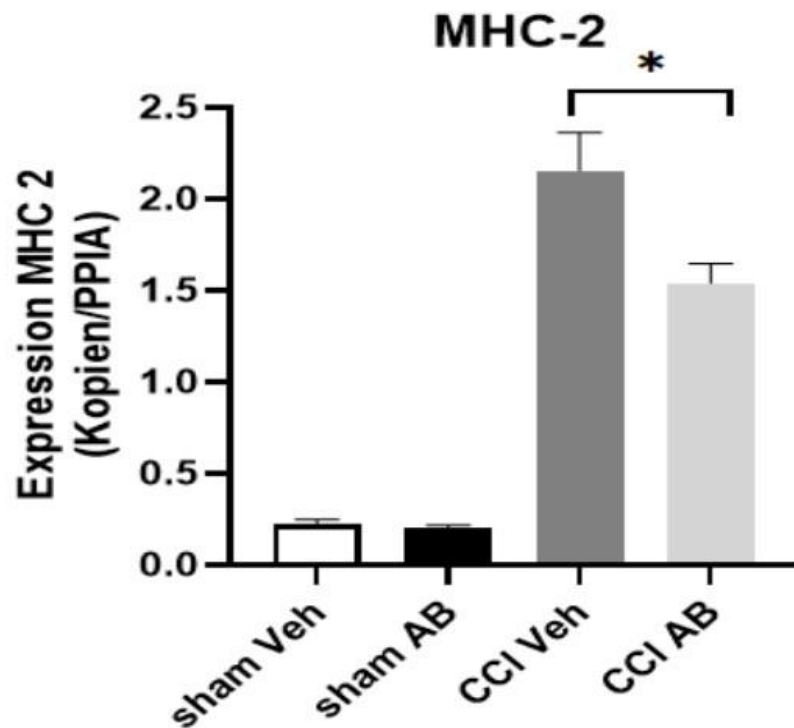


Abbildung 34 PCR MHC 2

Die Abbildung 34 zeigt die Expression von MHC 2. In allen vier Gruppenvergleichen mit Ausnahme sham-Veh zu sham-AB lässt sich ein signifikanter Unterschied erkennen (s. Tabelle 27) Im zwei Gruppen Vergleich von CCI-Veh (MW 2,155) und CCI-AB (MW 1,541, Differenz der MW +/- SEM: $0,6138 \pm 0,2338$) lässt sich ein statistisch signifikanter Unterschied mit einem p-Wert von 0,0154 nachweisen.

(sham Veh: n= 8, sham AB: n= 8, CCI Veh: n= 12, CCI AB: n= 12)

Table 27 MHC II

Gruppen	MW1	MW2	MW Diff	SEM Diff	Signifikant?	p -Wert
sham/Veh vs.sham/AB	0.2207	0.2061	0.01454	0.2245	nein	0.9487
sham/Veh vs. CCI/Veh	0.2207	2.155	-1.934	0.2050	ja	<0.0001
sham/Veh vs. CCI/AB	0.2207	1.541	-1.321	0.2050	ja	<0.0001
sham/AB vs. CCI/Veh	0.2061	2.155	-1.949	0.2050	ja	<0.0001
sham/AB vs. CCI/AB	0.2061	1.541	-1.335	0.2050	ja	<0.0001
CCI/Veh vs. CCI/AB	2.155	1.541	0.6138	0.1833	ja	0.0038

5.8.9 CD3+ Zellen

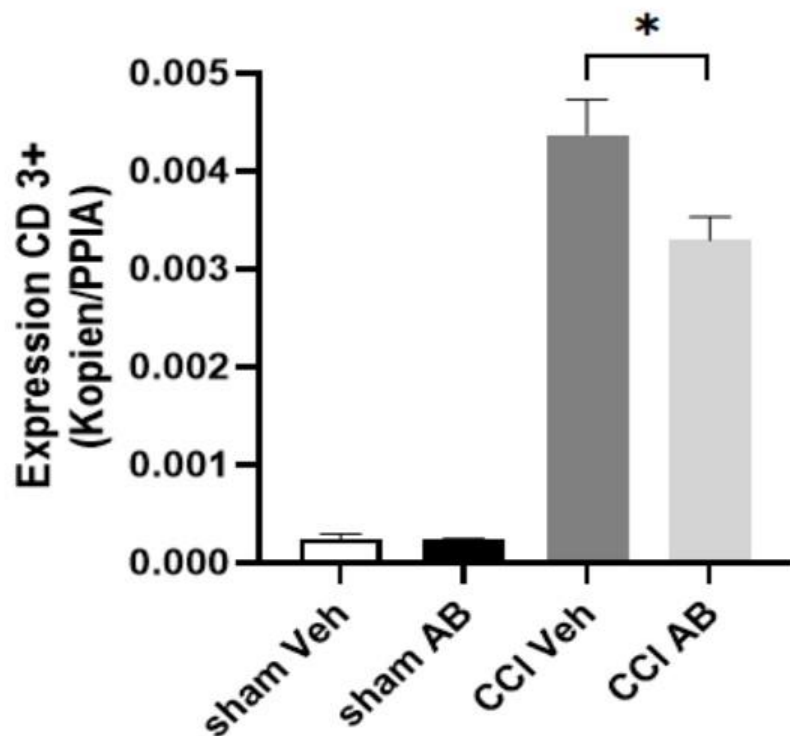


Abbildung 35 PCR CD3+ Zellen

Die Abbildung 35 zeigt die Expression von CD3+ Zellen. In allen vier Gruppenvergleichen mit Ausnahme sham-Veh zu sham-AB lässt sich ein signifikanter Unterschied erkennen (s. Tabelle 28) Im zwei Gruppen Vergleich von CCI-Veh (MW 0,0041) und CCI-AB (MW 0,0031) lässt sich ein statistisch signifikanter Unterschied mit einem p-Wert von 0,0449 nachweisen.

(sham Veh: n= 8, sham AB: n= 8, CCI Veh: n= 12, CCI AB: n= 12)

Tabelle 28 CD 3+

Gruppen	MW1	MW2	MW Diff	SEM Diff	Signifikant?	p -Wert
sham/Veh vs.sham/AB	0.0002411	0.0002398	1.375e- 006	0.0004163	nein	0.9974
sham/Veh vs. CCI/Veh	0.0002411	0.004371	- 0.004130	0.0003800	ja	<0.0001
sham/Veh vs. CCI/AB	0.0002411	0.003293	- 0.003051	0.0003800	ja	<0.0001
sham/AB vs. CCI/Veh	0.0002398	0.004371	- 0.004131	0.0003800	ja	<0.0001
sham/AB vs. CCI/AB	0.0002398	0.003293	- 0.003053	0.0003800	ja	<0.0001
CCI/Veh vs. CCI/AB	0.004371	0.003293	0.001078	0.0003399	ja	0.0062

5.9 Immunhistochemie

5.9.1 Iba1

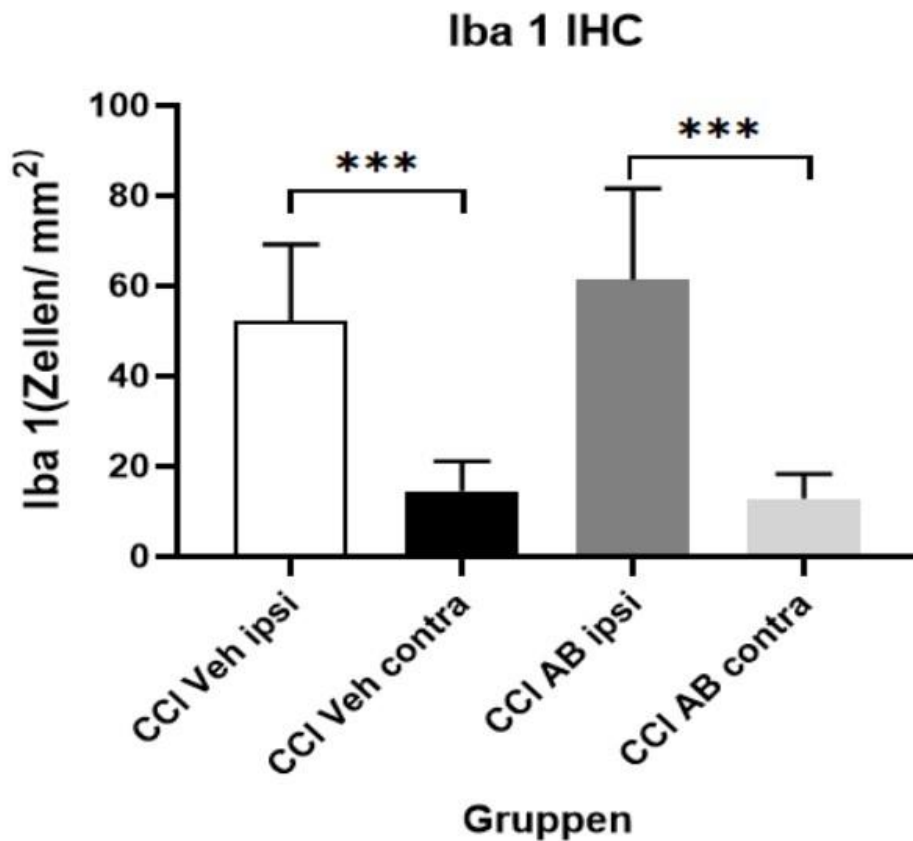


Abbildung 36 IHC Iba 1

Die Abbildung 36 zeigt den immunhistochemischen Nachweis von Iba1 positiven Zellen in der periläsionalen Region der CCI Tiere, jeweils in der ipsilateralen und kontralateralen Hemisphäre, wobei kontralateral, in Ermangelung einer Läsion die spiegelbildlich gleiche Region untersucht wird. Im Vergleich der beiden Hemisphären ipsi und contra ist in beiden Gruppen CCI und Vehicle ein signifikanter Unterschied zu erkennen. Im Vergleich CCI -Veh contra zu CCI-AB contra ist kein signifikanter Unterschied zu erkennen. Im Vergleich CCI-AB ipsi zu CCI-Veh ipsi gibt es keinen statistisch signifikanten Unterschied. (s. Tabelle 29)

(sham Veh: n= 8, sham AB: n= 8, CCI Veh: n= 12, CCI AB: n= 12)

Tabelle 29 IHC Iba 1

Gruppen	MW1	MW2	MW Diff	SEM Diff	Signifikant?	p -Wert
CCI Veh ipsi vs. CCI VEH contra	52,25	14,42	37,83	5,672	ja	<0,0001
CCI Veh ipsi vs. CCI AB ipsi	52,25	61,38	-9,125	5,672	nein	0,2164
CCI Veh contra vs. CCI AB contra	14,42	12,75	1,667	5,672	nein	0,7703
CCI AB ipsi vs. CCI AB contra	61,38	12,75	48,63	5,672	ja	<0,0001

5.9.2 GFAP

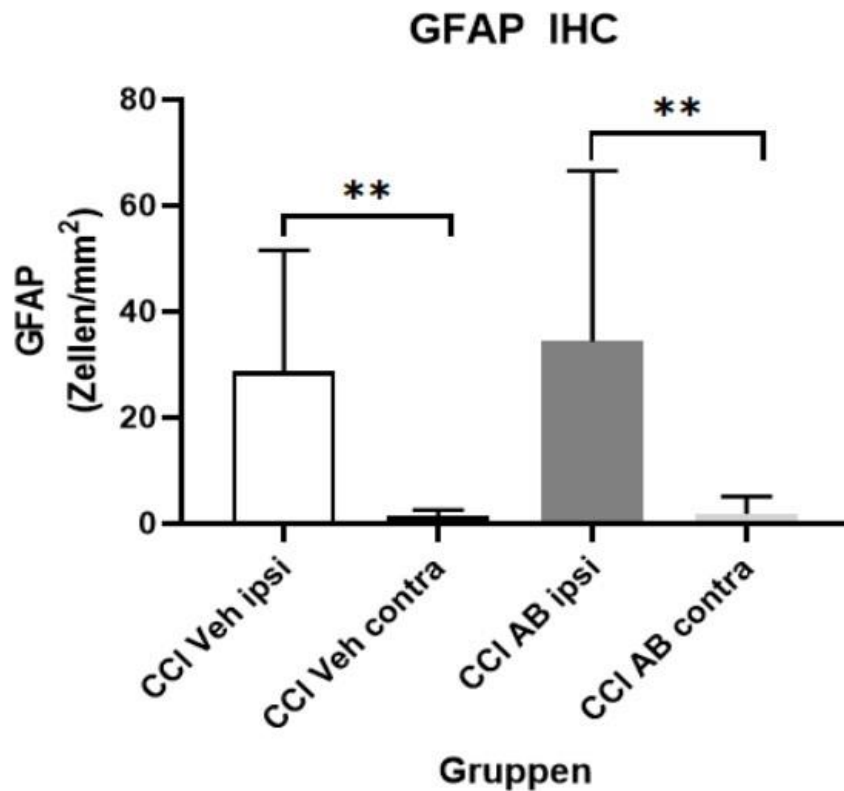


Abbildung 37 IHC GFAP

Die Abbildung 37 zeigt den immunhistochemischen Nachweis von GFAP im Gehirn der CCI Tiere, jeweils in der ipsilateralen und kontralateralen Hemisphäre. Im Vergleich der beiden Hemisphären ipsi und contra ist in beiden Gruppen CCI und Vehicle ein signifikanter Unterschied zu erkennen. Im Vergleich CCI-AB ipsi zu CCI-Veh ipsi gibt es keinen statistisch signifikanten Unterschied.

(sham Veh: n= 8, sham AB: n= 8, CCI Veh: n= 12, CCI AB: n= 12)

Tabelle 30 IHC GFAP

Gruppen	MW1	MW2	MW Diff	SEM Diff	Signifikant?	p -Wert
CCI Veh ipsi vs. CCI Veh contra	28,67	1,333	27,33	8,097	ja	0,0046
CCI Veh ipsi vs. CCI AB ipsi	28,67	34,33	-5,667	8,097	nein	0,7376
CCI AB ipsi vs. CCI AB contra	34,33	1,833	32,50	8,097	ja	0,0009
CCI Veh contra vs. CCI AB contra	1,333	1,833	-0,5000	8,097	nein	0,0046

Anti-Iba 1

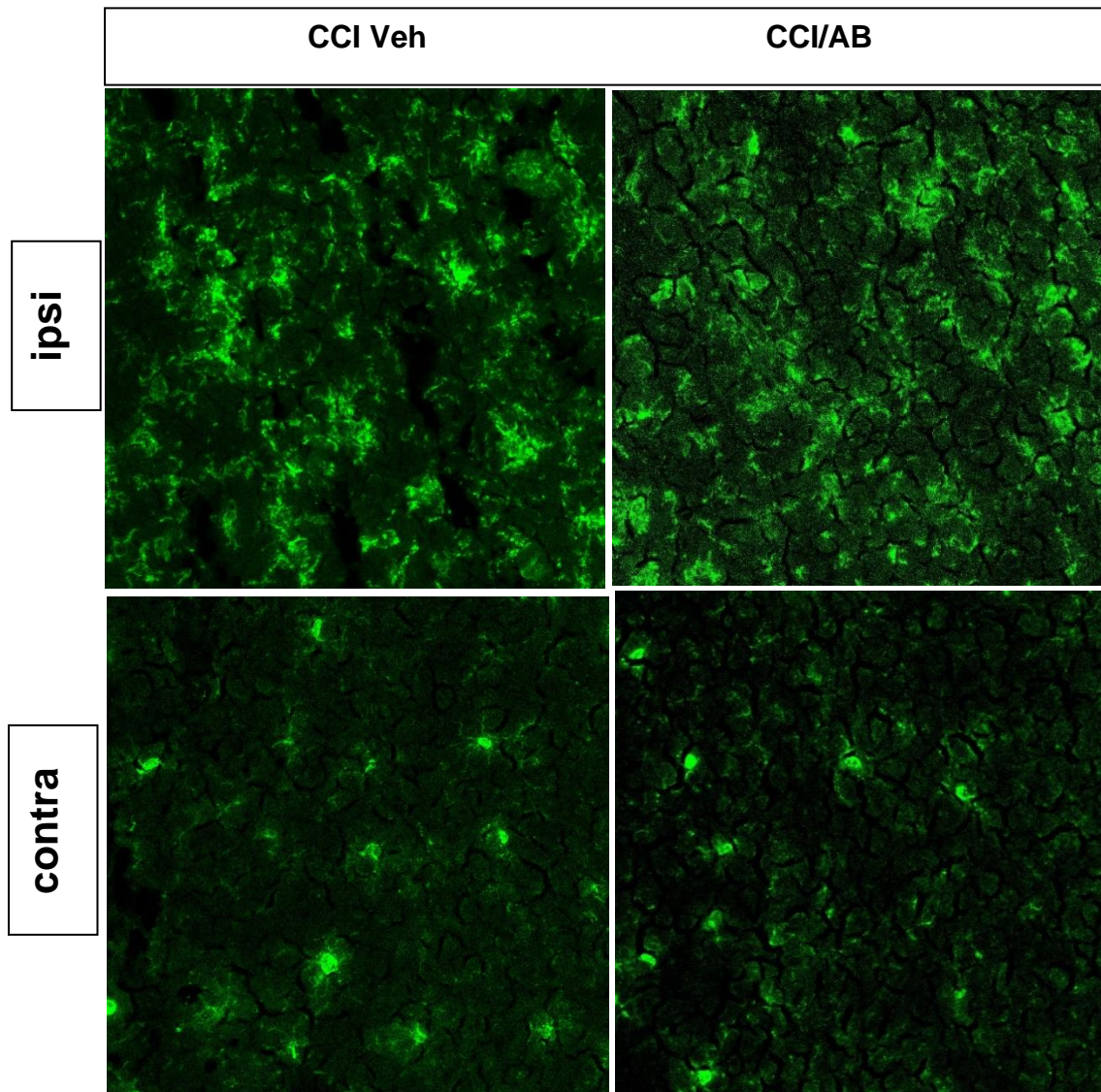


Abbildung 38 IHC Färbung Anti-Iba 1

Die Abbildung 38 zeigt eine Immunfluoreszenz- Doppelfärbung gegen Iba 1 eines Versuchstieres der CCI Kontrollgruppe Veh sowie der CCI AB Gruppe, jeweils von der periläsionalen Region der ipsilateralen Seite sowie der spiegelbildlich liegenden contralateralen Region. Maßstab 200µm. Wie bereits zuvor graphisch und tabellarisch aufgezeigt, ist ein deutlicher Unterschied im Vorkommen Iba 1 zwischen der ipsi- und contralateralen Seite zu erkennen. Zwischen den beiden Gruppen CCI AB und CCI Veh der ipsilateralen Seite gibt es keinen signifikanten Unterschied.

Anti-GFAP

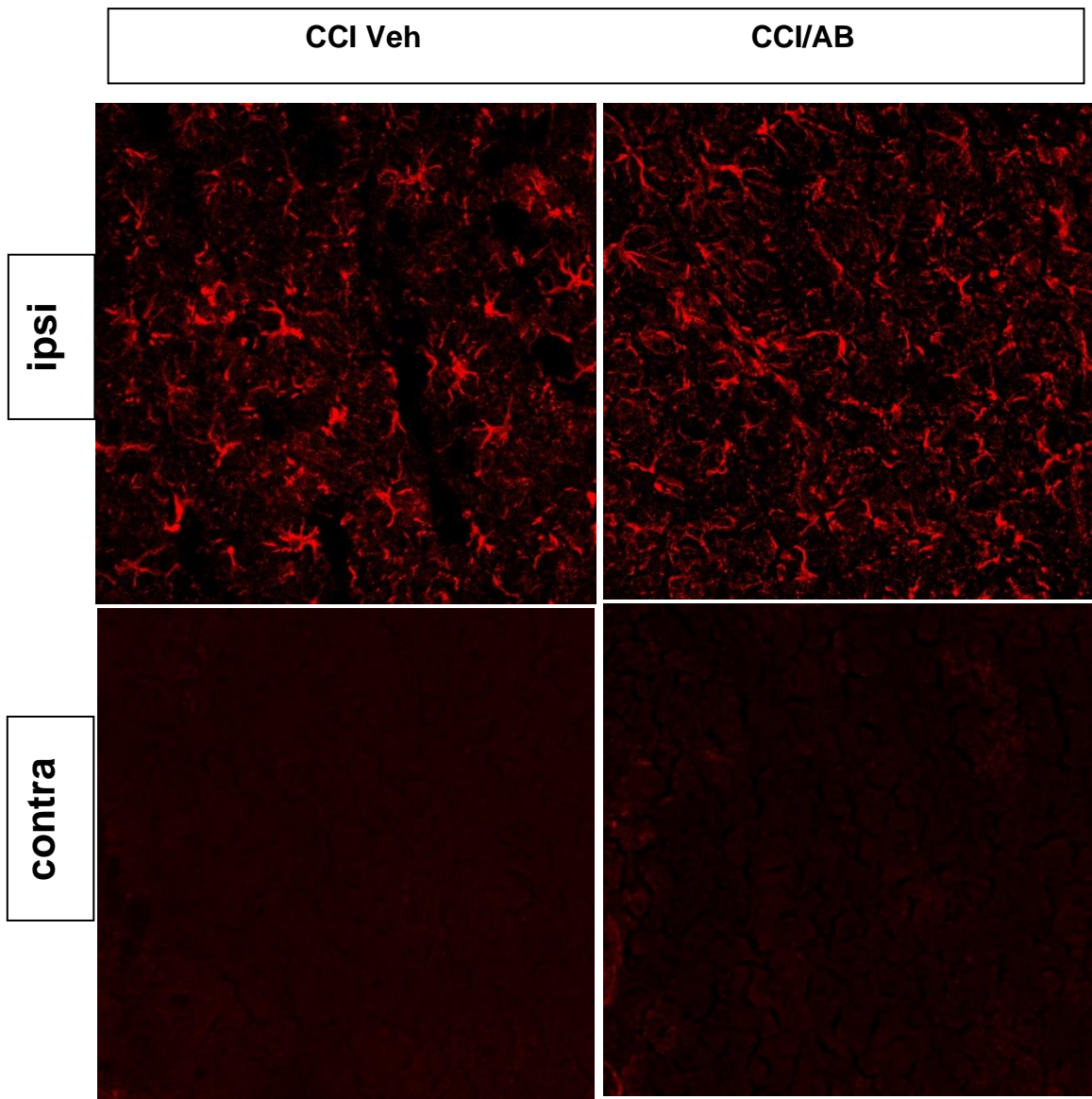


Abbildung 39 IHC Färbung Anti GFAP

Die Abbildung 39 zeigt eine Immunfluoreszenz- Doppelfärbung gegen GFAP eines Versuchstieres der CCI Kontrollgruppe Veh sowie der CCI AB Gruppe, jeweils von der periläsionalen Region der ipsilateralen Seite sowie der spiegelbildlich liegenden contralateralen Region. Maßstab 200µm. Wie bereits zuvor graphisch und tabellarisch aufgezeigt, ist ein deutlicher Unterschied im Vorkommen GFAP zwischen der ipsi- und contralateralen Seite zu erkennen. Zwischen den beiden Gruppen CCI AB und CCI Veh der ipsilateralen Seite gibt es keinen signifikanten Unterschied.

7 Ergebnisdiskussion

7.1 Veränderungen des Gastrointestinaltraktes

7.1.1 Caecumveränderungen

Bei der Entnahme des Darmgewebes imponierte ein deutlich vergrößertes Caecum bei den antibiotisch behandelten Tieren. Dies wird in weiteren Arbeiten ebenfalls beschrieben (113). Bei keimfreien Mäusen(120) und auch bei Tieren welche gezielt nur eine bestimmte Auswahl an Bakterienstämmen enthalten (Bacteroides distasonis strain ASF 519, Lactobacillus salivarius strain ASF 361 und Clostridium cluster XIV ASF 356) beobachtet man im Vergleich zu konventionellen SPF Mäusen ein vergrößertes Caecum (87). Dies lässt vermuten, dass die Limitierung der Bakterien im Darm auf verschiedene Spezies, der Grund für die Größenzunahme des Caecum ist.

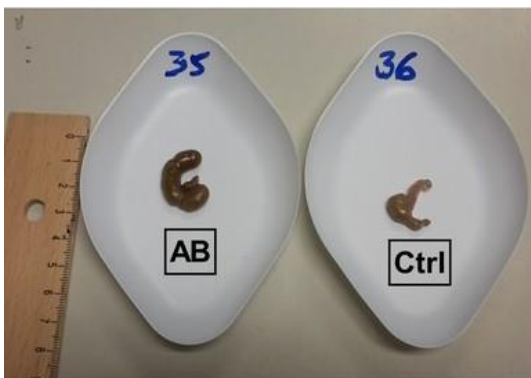


Abbildung 41 Vergrößertes Caecum antibiotisch behandelter Tiere in dieser Arbeit

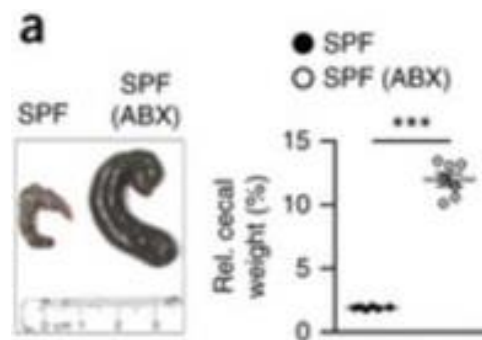


Abbildung 40 Vergrößertes Caecum bei antibiotisch behandelten Mäusen Erny et.al. 2015

In der Abbildung 41 ist das Caecum der Tiere aus dieser Arbeit zu sehen. Es imponiert ebenfalls ein vergrößertes Caecum bei den antibiotisch behandelten Tieren.

Die Abbildung 40 zeigt das vergrößerte Caecum bei Versuchstieren nach vierwöchiger Therapie mit Breitbandantibiotika (87).

7.1.2 Veränderungen des Mikrobioms

In Untersuchungen des Mikrobioms bei polytraumatisierten Patienten konnte eine Verminderung der Anzahl an Fusobakterien, Bakterioidales und Verucomikrobiales festgestellt werden. Die Zahl an Clostridien und Enterokokken stieg jedoch an (121). Im Mausmodell nach CCI lassen sich ebenfalls spezifische Veränderungen der Bakterienflora beobachten, beispielsweise steigt die Anzahl an *Eubacterium sulci*, wohingegen das Vorkommen von *Lactobacillus gasseri* oder *Eubacterium ventriosum* sinken. Generell scheint *Lactobacillus gasseri* eine entscheidende Rolle in der Homöostase des tierischen Mikrobioms zu spielen (122, 123). Im Tierversuch kann demonstriert werden, dass es bei Mäusen bereits drei Stunden nach CCI zu einer veränderten Mukosa Struktur des Darmes kommt, mit erhöhter Permeabilität der Darmschleimhaut. Außerdem zeigen sich erhöhte Endotoxin-Konzentrationen im Serum der Tiere. Die Mikrovilli der CCI Gruppe sind spärlicher vorhanden und wirken in ihrer Struktur ausgedünnt (100). Nach Verschluss der A. cerebri media bei Versuchstieren, zeigte sich das Mikrobiom im Caecum der Tiere 72 Stunden nach dem Eingriff verändert. Die Familie der Prevotellaceae ist im Vergleich zur Kontrollgruppe vermindert während Peptokokken vermehrt vorkommen (123). Interessanterweise weißt man auch bei Kindern mit Autismus vermehrt Prevotellaceae nach (124).

Beim Menschen werden Veränderungen der Darmmotilität und der Darm-Blut-Schranke beobachtet. Das Stress-Ulcus ist ein prominenter Beweis für die gastrointestinalen Komplikationen nach Trauma (98, 99). Die Therapie mit Probiotika stellt eine Option da, um hemmend auf inflammatorische Prozesse einzuwirken (125). In dieser Hinsicht erscheint es ratsam, spezifische Untersuchungen bezüglich der Zusammensetzung der Bakterienvielfalt durchzuführen, um genauere Aussagen über die jeweiligen Auswirkungen treffen zu können.

7.1.3 Einfluss von *Lactobacillus acidophilus*

In Versuchen, bei denen den Tieren nach CCI das probiotische Bakterium *Lactobacillus acidophilus* verabreicht wurde, konnte gezeigt werden, dass dieses scheinbar neuroprotektive Effekte hat. So wiesen die Mäuse am dritten sowie siebten postoperativen Tag eine vermehrte Occludin Expression im Bereich der Blut-Hirn-Schranke auf, was zu einer Stabilisierung der Schranke führt. Außerdem zeigte sich eine verminderte Mikrogliaaktivierung, nachgewiesen durch Iba1 und GFAP. Des Weiteren war der Anstieg von TNF α und IL-1 β bei den Tieren, die die Laktobazillen

erhielten, geringer als in der Kontrollgruppe (126). In dieser Arbeit zeigt sich ebenfalls eine signifikant verminderte mRNA-Expression von IL-1 β und weiterhin ein Trend hin zu einer verminderten Proteinexpression von GFAP im Western Blot bei den antibiotisch behandelten Tieren. Folglich scheint die Zusammensetzung der Bakterien einen wesentlichen Einfluss auf die Ausschüttung von Zytokinen und der Aktivierung von Astrozyten zu haben. In zukünftigen Untersuchungen sollte fokussierter auf die Veränderungen der Bakterienstämme geachtet werden, um eventuelle Zusammenhänge zu erkennen.

7.2 Stabilisierung der Blut-Hirn-Schranke durch Antibiotika

Zusammenschau Läsionsvolumina, IgG Dotblot und TSPO

Zunächst sei darauf hingewiesen, dass die Infektion des Darmes bei Versuchstieren zur Begünstigung neuroinflammatorischer Prozesse führt. Hierzu konnte in einem Versuchsaufbau demonstriert werden, dass es im Vergleich von zwei CCI Gruppen, bei denen eine Gruppe posttraumatisch mit Citrobakter Rodentium infiziert wurde, zu vergrößerten Läsionsvolumina in dieser Gruppe kommt. Außerdem sind im Periläsionsbereich vermehrt immunreaktive Zellen zu erkennen und eine erhöhte Expression des Astrozyten-Aktivierungsmarkers an GFAP (110).

In dieser Arbeit zeigt sich im IgG DotBlot in der CCI Gruppe ein erhöhter Nachweis an Immunglobulin G, bei den nicht antibiotisch behandelten Tieren. Dies deutet auf eine durchlässigere Blut-Hin-Schranke in dieser Gruppe hin. Da es jedoch bezüglich der Läsionsvolumina und der Volumina der Hemisphären zu keinem signifikanten Unterschied in den Gruppen kam, mit Ausnahme einer größeren Hemisphäre kontralateral in der Antibiotikagruppe, sind weitere Untersuchungen notwendig, um Aussagen zur Permeabilität der Blut-Hin-Schranke oder dem Entstehen eines Hirnödems zu treffen.

Es zeigt sich auch eine signifikant geringere Expression von TSPO bei den CCI -AB Tieren im Vergleich zu den unbehandelten CCI Tieren. Da das Translokatorprotein im Gehirn nur sehr geringfügig vorkommt, deutet der Nachweis auf eine erhöhte Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke hin (82, 83). Dies gibt Grund zur Vermutung, dass die Antibiose zur Stabilisierung der Blut-Hirn-Schranke beitragen könnte. Von Vancomycin wird berichtet, dass es unter der Gabe zu verminderten Läsionsvolumina kommt (127). In dieser Arbeit zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Läsionsvolumina.

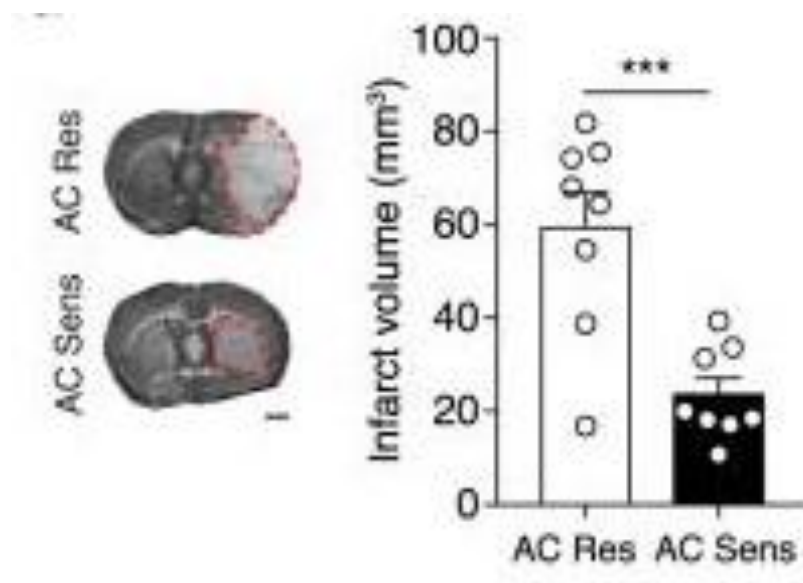


Abbildung 42 Läsionsvolumina nach Stroke unter Antibiotikatherapie bei unterschiedlicher Resistenzlage

Die Abbildung 42 zeigt das Läsionsvolumen bei Versuchstieren nach Okklusion der A. cerebri media. Beide Gruppen wurden zwei Wochen mit Amoxicillin und Clavulansäure therapiert. Die Gruppe „AC Res“ war resistent gegenüber dem Antibiotikum, während die Gruppe „AC Sens“ sensibel war. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied in den Läsionsvolumina bei der antibiotika-sensiblen Gruppe (127).

7.3 GFAP und Spectrin

GFAP ist Bestandteil des Zytoskeletts von Astrozyten. Kommt es im Rahmen von Traumata oder neurodegenerativen Prozessen zu Umbauprozessen im Gewebe wird vermehrt GFAP gebildet. Während es durch die Hochregulation der Expression von GFAP zur Astrogliose also einer „Narbenbildung“ im Gehirn kommt, kann umgekehrt das Ausschalten von GFAP in Knock-out-Mäusen zu einer Schädigung der Blut-Hirn-Schranke führen (70, 128). In dieser Arbeit zeigt sich ein Trend bei den antibiotisch behandelten Tieren mit einer verminderten Expression von GFAP und Spectrin. Fügt man Ratten mittels 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS) eine entzündliche Reaktion des Darmes zu, misst man am vierten Tag nach Intervention erhöhte TNF α Level im Gehirn dieser Tiere. Ebenso zeigt sich eine erhöhte Mikroglia Aktivität (129). Diese unterstreicht erneut den bidirektionalen Austausch zwischen enterischem und

zentralem Nervensystem sowie den wechselseitigen Einfluss der Botenstoffe und Biomarker als Aktivatoren und Inhibitoren bzgl. neurodegenerativer Prozesse.

7.4 Interleukin 1 β vermittelte Mikroglia Aktivierung

IL1 kann zu den frühen Biomarkern nach SHT gezählt werden. Durch die Regulierung der Ausschüttung weiterer Zytokine und die Beeinflussung apoptotischer Vorgänge trägt es maßgeblich zum proinflammatorischen Geschehen bei (22, 53). Es ist zu erwähnen, dass IL-1 β eines der Zytokine ist welches bei reiner Scheinoperation (Kraniotomie) im Rahmen der experimentellen SHT Forschung, nicht vermehrt gebildet wird (130). Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es zu einem signifikanten Unterschied bei den CCI Tieren gegenüber der Kontrollgruppe gibt, zum anderen aber auch, dass die Antibiotika behandelten Tiere signifikant weniger IL1 β exprimierten als die unbehandelten Tiere. Dies deutet daraufhin, dass die Behandlung mit Antibiotika, der IL1 β Ausschüttung entgegenwirkt und somit proinflammatorische Prozesse abschwächt. Minocyclin als Antibiotikum aus der Gruppe der Tetrazykline zeigt neuroprotektive Eigenschaften im experimentellen Setting. Im Tierversuch, bei dem eine postoperative Gabe Minocyclin intraperitoneal erfolgte, konnte am ersten postoperativen Tag ein vermindertes perikontusionales Läsionsvolumen der Tiere festgestellt werden, am vierten postoperativen Tag ist diese Beobachtung jedoch nicht mehr zu machen. Nach vier Tagen zeigt sich eine um 43 % verringerte Aktivierung von Mikroglia in der mit Minocyclin behandelten Gruppe. Bezüglich der Zytokinkonzentrationen im Kortex lässt sich eine 50 % verminderte Konzentration von IL-1, vier Stunden postoperativ bei der Minocyclin Gruppe beobachten. Weiterhin zeigt sich, dass die Einwanderung von neutrophilen Zellen in das verletzte Gehirn nicht von einer Minocyclingabe beeinflusst wird. Dies könnte eine Erklärung sein für den auf die Frühphase begrenzten, neuroprotektiven Effekt des Tetrazyklins (131). In diesem Zusammenhang sei die Mikroglia aktivierende Wirkung von IL-1 nochmals aufgegriffen. In mehreren Studien führt eine Hemmung von IL-1 beispielsweise durch IL-1 Rezeptorantagonisten, zu neuroprotektiven Resultaten. Genannt seien hier verminderte Ödembildung oder weniger Infarktgröße (132-134).

7.5 IL-6 und erhöhter intrakranieller Druck (ICP)

In dieser Arbeit gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen der antibiotisch behandelten CCI Gruppe und der CCI-Veh Gruppe. Auch in den Sham-Gruppen ließ sich kein Unterschied zwischen den antibiotisch behandelten und unbehandelten Gruppe darstellen. Obwohl es sich bei IL-6 um einen Parameter handelt, der bei jeglicher Entzündung erhöht ist, gibt es trotzdem eine positive Korrelation mit der Höhe des ICPs. Somit hat IL-6 großes Potential bei isoliertem SHT als Verlaufsparemeter Anwendung zu finden (62). In einer Arbeit mit IL-6 defizienten Versuchstieren, sind weniger GFAP positive Astrozyten nachweisbar und es kommt zu weniger Mikroglia Aktivierung (135).

7.6 Regulatorische T-Zellen (T-reg.) als prognostischer Parameter

Das MHC 2 Antigen ist maßgeblich, um eine Immunantwort zu generieren. Im geschädigten Gehirn bilden Gliazellen MHC 2 aus, um CD4 positive T-Zellen zu aktivieren, was folgend den inflammatorischen Prozess begünstigt (81). Allerdings gibt es gleichermaßen Berichte, dass MHC 2 positive Astrozyten apoptotische Signale an CD4 positive T-Zellen senden (136). Es herrscht demnach ein ständiges Wechselspiel zwischen Inhibition und Aktivierung. Eine Aktivierung der Mikroglia, vor allem MHC 2 positiver Mikroglia, findet insbesondere durch IL1 β Ausschüttung statt und ist korreliert mit einer geringeren Konzentration von IL-10 (137). IL-10 wird ebenfalls von regulatorischen T-Zellen gebildet. Generell scheinen regulatorische T-Zellen, bei SHT in Zusammenhang mit IFN γ , eine Rolle zu spielen. Bei Untersuchungen zur Rolle regulatorischer T-Zellen im Rahmen von experimentellem SHT, zeigt sich ebenfalls eine erhöhte Expression von IFN γ in der Gruppe der T-reg-Zell defizienten Versuchstiere. Dies ist korreliert mit einer erhöhten Konzentration des Proteins GFAP in der ipsilateralen Hemisphäre. Die Depletion der regulatorischen T-Zellen scheint demnach zu vermehrter Astroglie und erhöhter Expression von IFN γ zu führen (138). Die Erhöhung von GFAP ist in diesem Versuchsaufbau nicht nachzuweisen, der Trend geht hin zur verminderten Expression von GFAP. IFN γ aktiviert Astrozyten und führt so zum Ausbilden einer Astroglie (139) allerdings kommt es bei Depletierung von IFN γ in Versuchstieren nach experimentellem SHT trotzdem zur Ausbildung der Astroglie (140). Dieser Mechanismus ist demnach nicht ausschließlich von IFN γ abhängig. Weiterhin muss gesagt werden, dass die komplexe Interaktion von

Immunzellen, Zytokinen und auch der Bakterienflora so umfangreich ist, dass es weiterer Forschung bedarf um alle Zusammenhänge ausreichend darzustellen. So zum Beispiel die Produktion von IL-10 durch regulatorische T-Zellen. Das Polysaccharid A, welches von Bakterioides fragilis produziert wird, regt die T-Zellen an mehr IL-10 zu bilden und IL-10 hat neuroprotektive Effekte (141, 142). In einer klinischen Studie, bei der es darum ging, die Rolle von regulatorischen T-Zellen in Bezug auf das Schädel-Hirn-Trauma zu erforschen, wurden die zirkulierenden T-reg-Zellen im Blut von SHT-Patienten an mehreren Tagen nach dem Trauma gemessen. Bis zum 14 posttraumatischen Tag kam es zu einem Anstieg der T-Zellen, welcher sich erst ab Tag 21 wieder normalisiert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass höhere Konzentrationen von zirkulierenden T-reg. Zellen mit einem schlechteren Outcome assoziiert waren (143). Es wäre somit möglich regulatorische T-Zellen als prognostischen Parameter im Rahmen von Schädel-Hirn-Traumata zu nutzen.

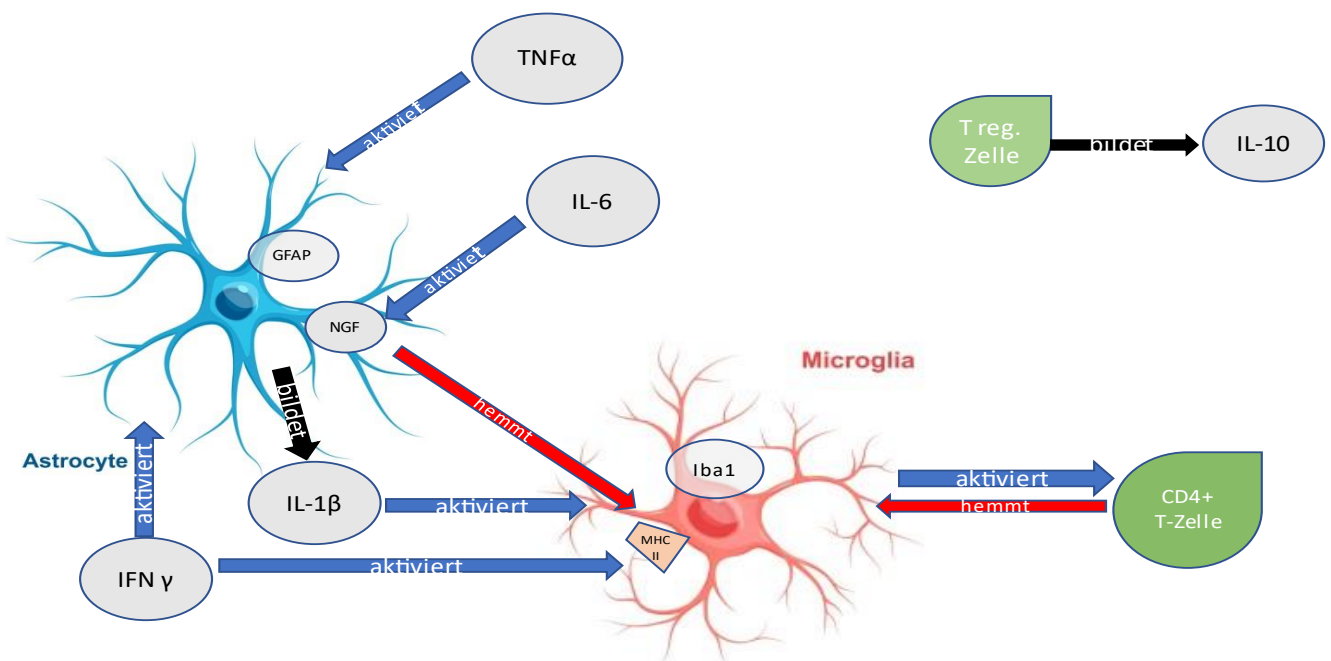


Abbildung 43 Schaubild Interaktion Entzündungsmediatoren

Die Abbildung 43 zeigt die komplexe Interaktion zwischen Astrozyten, Mikroglia und T-Zellen durch Interleukine und Zytokine.

7.7 Immunhistochemie

7.7.1 Iba1

Iba 1 dient der Bindung von Kalzium, welches intrazellulär, in hoher Konzentration, neurotoxische Effekt hat (76). In GF Mäusen beobachtet man signifikant mehr Iba-1 positive Mikroglia (87). Auch hier spiegelt sich der Einfluss des Darmmilieus auf die Vorgänge im ZNS wider. In dieser Arbeit gibt es keinen Unterschied zwischen der Antibiotikagruppe und der Kontrollgruppe. Mutmaßlich könnte hier erneut der Faktor Zeit eine Rolle spielen.

7.7.2 GFAP

Bei Untersuchungen, in denen die Auswirkungen von einer reinen Kraniotomie bei Mäusen, der CCI Methode gegenübergestellt wurde, stellte sich heraus, dass auch die bloße Kraniotomie zu Veränderungen bzgl. proinflammatorischer Prozesse führt. So zeigt sich in der Immunfluoreszenz am dritten postinterventionellen Tag bei kraniotomierten Tieren, vermehrtes Vorkommen von GFAP, ähnlich zu den CCI Tieren (130). Demnach ist GFAP kritisch zu betrachten wenn es darum geht differenzierte Aussagen zu Unterschieden innerhalb CCI Gruppen treffen zu können. In dieser Arbeit gab es keinen signifikanten Unterschied in den beiden Gruppen Antibiotika- zu Kontrollgruppe.

7.7.3 MHC2 und CD3 positive Zellen

In der Expression von MHC 2 positiven Zellen gibt es in dieser Arbeit keinen Hinweis auf Unterschiede zwischen der Antibiotikagruppe und der Kontrollgruppe. Es wäre denkbar, dass 72 Stunden posttraumatisch noch zu früh ist um ausreichend MHC 2 immunhistochemisch nachzuweisen, denn auch in anderen Arbeiten kommt es teilweise erst 30 Tage nach Trauma zur Expression von MHC 2 in Mikroglia (144). Weiterhin wäre denkbar, dass das Alter der Versuchstiere hierbei eine Rolle spielt. In einem Versuchsaufbau zur Untersuchung von altersabhängigen Unterschieden bezüglich des neuroinflammatorischen Prozesses, nach peritonealer LPS Gabe vor CCI bei Mäusen, stellt sich heraus, dass es zu mehr Ausschüttung von IL-1 β und folglich auch mehr MHC 2 positiven Mikroglia, bei älteren Tieren, kommt (137).

In Untersuchungen zur Einwanderung von T-Zellen nach experimentellem SHT bei Mäusen, zeigen sich in den Gehirnen von jüngeren Tieren (2 Monate) perikontusional, 72 h posttraumatisch mehr CD3+ Zellen als in den Gehirnen von älteren (21 Monate) Tieren. Nach 72h ist bei den jüngeren Mäusen ein Maximum der migrierenden T-Zellen zu beobachten (145). Die Entnahme von Gehirnbiopsien von SHT-Patienten zeigen, dass erst nach drei Tagen CD3 positive Zellen im Gehirn nachgewiesen werden können. CD8 und CD4 positive T-Zellen sind erst am dritten bis fünften Tag posttraumatisch nachzuweisen (146). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Infiltration durch T-Zellen frühestens nach 72 Stunden stattfindet. Da es in dieser Arbeit zu keinem signifikanten Unterschied in der Expression von CD3 positiven T-Zellen zwischen der Antibiotikagruppe und der Kontrollgruppe kommt, wäre ein späterer Untersuchungszeitpunkt zielführend, um einen Unterschied dazustellen.

7. Zusammenfassung

Das Schädel-Hirn-Trauma stellt die moderne Medizin vor Herausforderungen. Insbesondere die folgeschweren Komplikationen, die nach Erleiden eines SHT auftreten können, gilt es zu verhindern. Da der Primärschaden nur durch präventive Maßnahmen eingedämmt werden kann ist der Sekundärschaden Dreh- und Angelpunkt der Forschung. Nur hier kann Schadensminimierung im klinischen Setting erfolgen. Die Therapie eines SHT-Patienten umfasst viele Aspekte und nicht zuletzt auch eine antibiotische Therapie. Somit ist es von Bedeutung die Zusammenhänge einer Antibiotikatherapie auf den Sekundärschaden des Gehirns zu evaluieren. Diese Arbeit soll einen kleinen Beitrag hierzu leisten. Insbesondere Entzündungsmediatoren und Interleukine welche in Kombination mit bildgebenden Verfahren, immer mehr an Bedeutung gewinnen, um eine Prognose und Therapieentscheidung herbeizuführen, werden in dieser Arbeit untersucht. So sind in der Antibiotikagruppe die Biomarker TSPO und IL-1 β vermindert nachweisbar. Es können weniger IgG Antikörper in den Gehirnen der antibiotisch behandelten Tiere gefunden werden und auch bezüglich des Nachweises von Spectrin und GFAP gibt es einen Trend hin zu weniger Expression der beiden Proteine in der Antibiotikagruppe. Trotz der Tatsache, dass im Vergleich der Läsionsvolumina kein Unterschied in den Gruppen erkennbar ist, sind die Unterschiede in den Biomarkern doch Grund genug anzunehmen, dass die antibiotische Therapie einen Einfluss auf neuroprotektive Prozesse hat. Es sollte in jedem Fall weitere Forschungsarbeit investiert werden, um diese Zusammenhänge in vollem Umfang verstehen zu können.

Das Schädel-Hirn-Trauma ist weit mehr als ein einzelnes Ereignis, und darf wie eingangs erwähnt keinesfalls als isolierter Schaden betrachtet werden. Die beschriebenen Prozesse greifen ineinander, potenzieren sich, aktivieren andere Mechanismen und sind deshalb von großem wissenschaftlichem Interesse. Im Rahmen der Literaturdiskussion dieser Arbeit kommt der Gehirn-Darm -Achse besondere Bedeutung zu, sie ist ein Kommunikationssystem basierend auf neuronaler, immunologischer und hormoneller Signalübertragung zwischen Darm und Gehirn. Ihre Funktionsweise ist aktuell Bestandteil vieler Forschungsarbeiten. Eine gezielte Antibiotikatherapie ist gängige medizinische Praxis und Bestandteil vieler Leitlinien, unter Antibiose kommt es zu maßgeblicher Dysbalance der Gehirn-Darm Achse, was

mutmaßlich auch Auswirkungen auf die Behandlung von SHT-Patienten hat. In welcher Hinsicht auch immer das gastrointestinale System des Menschen gestört wird, es führt zu vielfältigen Beeinträchtigungen der Funktionsweise anderer Organsysteme speziell der des Gehirns. Demnach sollte unbedingt mehr Forschung in diesen Bereich investiert werden. Diese Arbeit gibt nur einen kleinen Ausblick auf die Zusammenhänge, die bezüglich der Gehirn-Darm-Achse und dem Schädel-Hirn-Trauma noch zu ergründen sind. Nicht zuletzt der Möglichkeit das Mikrobiom als diagnostisches Werkzeug zu nutzen. Abschließend ist zu sagen, dass der Mensch als Ganzes betrachtet werden sollte, Heilungsprozesse können nur dann effektiv voranschreiten, wenn der gesamte Organismus mit seinen Vorgängen wahrgenommen und behandelt wird. Anhand der Interaktion der Gehirn-Darm-Mikrobiom Achse wird dies umso deutlicher. Stoffwechselprozesse und diverse physiologische, aber auch pathologische Vorgänge im menschlichen Körper, sollten nicht isoliert voneinander betrachtet werden, sondern als Ganzes einheitliches, miteinander verknüpftes System gesehen werden.

8. Literaturverzeichnis

1. R. Firsching ER, U.M. Ma, uer OWS, M. Messing-Jünger,, K. Engelhard für DGAI PSfD, J. Linn für DGNR, P. Biberthaler für, Schwerdtfeger. DuK. LEITLINIE SCHÄDEL-HIRN-TRAUMA

IM ERWACHSENENALTER [PDF]. Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie

Autorisiert für elektronische Publikation: AWMF online; 2016 [Available from: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/008-001l_S2e_Schaedelhirntrauma_SHT_Erwachsene_2016-06.pdf].

2. Peeters W, van den Brande R, Polinder S, Brazinova A, Steyerberg EW, Lingsma HF, et al. Epidemiology of traumatic brain injury in Europe. *Acta Neurochir (Wien)*. 2015;157(10):1683-96.

3. Harrison-Felix C, Whiteneck G, DeVivo M, Hammond FM, Jha A. Mortality following rehabilitation in the Traumatic Brain Injury Model Systems of Care. *NeuroRehabilitation*. 2004;19(1):45-54.

4. Yasseen B, Colantonio A, Ratcliff G. Prescription medication use in persons many years following traumatic brain injury. *Brain Inj*. 2008;22(10):752-7.

5. McLean A, Jr., Dikmen S, Temkin N, Wyler AR, Gale JL. Psychosocial functioning at 1 month after head injury. *Neurosurgery*. 1984;14(4):393-9.

6. Jellinger KA, Paulus W, Wrocklage C, Litvan I. Traumatic brain injury as a risk factor for Alzheimer disease. Comparison of two retrospective autopsy cohorts with evaluation of ApoE genotype. *BMC Neurol*. 2001;1:3.

7. McCrory P, Zazryn T, Cameron P. The evidence for chronic traumatic encephalopathy in boxing. *Sports Med*. 2007;37(6):467-76.

8. Aquilani R, Iadarola P, Boschi F, Pistarini C, Arcidiaco P, Contardi A. Reduced plasma levels of tyrosine, precursor of brain catecholamines, and of essential amino acids in patients with severe traumatic brain injury after rehabilitation. *Arch Phys Med Rehabil*. 2003;84(9):1258-65.

9. Elovic EP, Simone LK, Zafonte R. Outcome assessment for spasticity management in the patient with traumatic brain injury: the state of the art. *J Head Trauma Rehabil*. 2004;19(2):155-77.

10. Kishi Y, Robinson RG, Kosier JT. Suicidal ideation among patients during the rehabilitation period after life-threatening physical illness. *J Nerv Ment Dis*. 2001;189(9):623-8.

11. Kim E, Lauterbach EC, Reeve A, Arciniegas DB, Coburn KL, Mendez MF, et al. Neuropsychiatric complications of traumatic brain injury: a critical review of the literature (a report by the ANPA Committee on Research). *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 2007;19(2):106-27.

12. Griffin GD. The injured brain: TBI, mTBI, the immune system, and infection: connecting the dots. *Mil Med.* 2011;176(4):364-8.
13. O'Boyle CJ, MacFie J, Mitchell CJ, Johnstone D, Sagar PM, Sedman PC. Microbiology of bacterial translocation in humans. *Gut.* 1998;42(1):29-35.
14. Brathwaite CE, Ross SE, Nagele R, Mure AJ, O'Malley KF, Garcia-Perez FA. Bacterial translocation occurs in humans after traumatic injury: evidence using immunofluorescence. *J Trauma.* 1993;34(4):586-9; discussion 9-90.
15. Human Microbiome Project C. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature.* 2012;486(7402):207-14.
16. Human Microbiome Project C. A framework for human microbiome research. *Nature.* 2012;486(7402):215-21.
17. Human Microbiome Project C. Das integrative Human-Mikrobiom-Projekt: Dynamische Analyse von Mikrobiom-Wirt-Omik-Profilen in Zeiten menschlicher Gesundheit und Krankheit. The Integrative HMP (iHMP) Research Network Consortium, *Cell Host & Microbe*, 16 (2014), S. 276–289 2019 [Available from: <https://www.hmpdacc.org/hmp/overview/>].
18. Montiel-Castro AJ, Gonzalez-Cervantes RM, Bravo-Ruiseco G, Pacheco-Lopez G. The microbiota-gut-brain axis: neurobehavioral correlates, health and sociality. *Front Integr Neurosci.* 2013;7:70.
19. Dashnaw ML, Petraglia AL, Bailes JE. An overview of the basic science of concussion and subconcussion: where we are and where we are going. *Neurosurg Focus.* 2012;33(6):E5: 1-9.
20. Schünke, Schulte, Schumacher, Voll, Wesker. Prometheus Lernatlas der Anatomie. Stuttgart, New York: Thieme Verlag; 2015.
21. Martin T. Neuroanatomie, Struktur und Funktion. München: ELSEVIER Urban&Fischer; 2015.
22. Lu KT, Wang YW, Yang JT, Yang YL, Chen HI. Effect of interleukin-1 on traumatic brain injury-induced damage to hippocampal neurons. *J Neurotrauma.* 2005;22(8):885-95.
23. Spalding KL, Bergmann O, Alkass K, Bernard S, Salehpour M, Huttner HB, et al. Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell.* 2013;153(6):1219-27.
24. Nayak D, Roth TL, McGavern DB. Microglia development and function. *Annu Rev Immunol.* 2014;32:367-402.
25. Teasdale G, Jennett B. Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. *Lancet (London, England).* 1974;2(7872):81-4.
26. Chierigato A, Martino C, Pransani V, Nori G, Russo E, Noto A, et al. Classification of a traumatic brain injury: the Glasgow Coma scale is not enough. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2010;54(6):696-702.

27. Bullinger M, Azouvi P, Brooks N, Basso A, Christensen AL, Gobiet W, et al. Quality of life in patients with traumatic brain injury-basic issues, assessment and recommendations. *Restor Neurol Neurosci*. 2002;20(3-4):111-24.
28. Teoh LS, Gowardman JR, Larsen PD, Green R, Galletly DC. Glasgow Coma Scale: variation in mortality among permutations of specific total scores. *Intensive Care Med*. 2000;26(2):157-61.
29. Barlow K. Weight gain after childhood traumatic brain injury. *Dev Med Child Neurol*. 2012;54(7):583.
30. TraumaRegister DGU. 20 years TraumaRegister DGU((R)): development, aims and structure. *Injury*. 2014;45 Suppl 3:S6-S13.
31. Brazinova A, Rehorcikova V, Taylor MS, Buckova V, Majdan M, Psota M, et al. Epidemiology of Traumatic Brain Injury in Europe: A Living Systematic Review. *J Neurotrauma*. 2018.
32. Maas AI, Stocchetti N, Bullock R. Moderate and severe traumatic brain injury in adults. *Lancet Neurol*. 2008;7(8):728-41.
33. Rosenfeld JV, Maas AI, Bragge P, Morganti-Kossmann MC, Manley GT, Gruen RL. Early management of severe traumatic brain injury. *Lancet (London, England)*. 2012;380(9847):1088-98.
34. Kuo CY, Liou TH, Chang KH, Chi WC, Escorpizo R, Yen CF, et al. Functioning and disability analysis of patients with traumatic brain injury and spinal cord injury by using the world health organization disability assessment schedule 2.0. *Int J Environ Res Public Health*. 2015;12(4):4116-27.
35. Majdan M, Plancikova D, Maas A, Polinder S, Feigin V, Theadom A, et al. Years of life lost due to traumatic brain injury in Europe: A cross-sectional analysis of 16 countries. *PLoS Med*. 2017;14(7):e1002331.
36. McKee AC, Daneshvar DH. The neuropathology of traumatic brain injury. *Handb Clin Neurol*. 2015;127:45-66.
37. McGinn MJ, Povlishock JT. Pathophysiology of Traumatic Brain Injury. *Neurosurg Clin N Am*. 2016;27(4):397-407.
38. Regner A, Alves LB, Chemale I, Costa MS, Friedman G, Achaval M, et al. Neurochemical characterization of traumatic brain injury in humans. *J Neurotrauma*. 2001;18(8):783-92.
39. Zetterberg H, Smith DH, Blennow K. Biomarkers of mild traumatic brain injury in cerebrospinal fluid and blood. *Nat Rev Neurol*. 2013;9(4):201-10.
40. Saatman KE, Creed J, Raghupathi R. Calpain as a therapeutic target in traumatic brain injury. *Neurotherapeutics*. 2010;7(1):31-42.
41. Radomski MV, Davidson L, Voydetich D, Erickson MW. Occupational therapy for service members with mild traumatic brain injury. *Am J Occup Ther*. 2009;63(5):646-55.

42. Koura SS, Doppenberg EM, Marmarou A, Choi S, Young HF, Bullock R. Relationship between excitatory amino acid release and outcome after severe human head injury. *Acta Neurochir Suppl.* 1998;71:244-6.
43. Loane DJ, Kumar A, Stoica BA, Cabatbat R, Faden AI. Progressive neurodegeneration after experimental brain trauma: association with chronic microglial activation. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2014;73(1):14-29.
44. Toklu HZ, Tumer N. Oxidative Stress, Brain Edema, Blood-Brain Barrier Permeability, and Autonomic Dysfunction from Traumatic Brain Injury. In: Kobeissy FH, editor. *Brain Neurotrauma: Molecular, Neuropsychological, and Rehabilitation Aspects.* Frontiers in Neuroengineering. Boca Raton (FL)2015.
45. Kigerl KA, Popovich PG. Toll-like receptors in spinal cord injury. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2009;336:121-36.
46. Kochanek PM, Hallenbeck JM. Polymorphonuclear leukocytes and monocytes/macrophages in the pathogenesis of cerebral ischemia and stroke. *Stroke.* 1992;23(9):1367-79.
47. Stoffel M, Rinecker M, Graf R, Baethmann A, Plesnila N. Nitric oxide in the penumbra of a focal cortical necrosis in rats. *Neurosci Lett.* 2002;324(3):201-4.
48. Cantu RC. Second-impact syndrome. *Clin Sports Med.* 1998;17(1):37-44.
49. Bey T, Ostick B. Second impact syndrome. *West J Emerg Med.* 2009;10(1):6-10.
50. Liu BC, Ivers R, Norton R, Boufous S, Blows S, Lo SK. Helmets for preventing injury in motorcycle riders. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008(1):CD004333.
51. Baldwin G, Breiding M, Sleet D. Using the public health model to address unintentional injuries and TBI: A perspective from the Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *NeuroRehabilitation.* 2016;39(3):345-9.
52. Piper LC, Zogg CK, Schneider EB, Orman JA, Rasmussen TE, Blackburne LH, et al. Guidelines for the Treatment of Severe Traumatic Brain Injury: Are They Used? *JAMA Surg.* 2015;150(10):1013-5.
53. Woodcock T, Morganti-Kossmann MC. The role of markers of inflammation in traumatic brain injury. *Front Neurol.* 2013;4:18.
54. Thomas DG, Palfreyman JW, Ratcliffe JG. Serum-myelin-basic-protein assay in diagnosis and prognosis of patients with head injury. *Lancet (London, England).* 1978;1(8056):113-5.
55. Jeter CB, Hergenroeder GW, Ward NH, 3rd, Moore AN, Dash PK. Human traumatic brain injury alters circulating L-arginine and its

- metabolite levels: possible link to cerebral blood flow, extracellular matrix remodeling, and energy status. *J Neurotrauma*. 2012;29(1):119-27.
56. Dinarello CA. The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clinical and experimental rheumatology*. 2002;20(5 Suppl 27):S1-13.
57. Caldwell J, Emerson SG. Interleukin-1 alpha upregulates tumor necrosis factor receptors expressed by a human bone marrow stromal cell strain: implications for cytokine redundancy and synergy. *Blood*. 1995;86(9):3364-72.
58. Salven P, Hattori K, Heissig B, Rafii S. Interleukin-1alpha promotes angiogenesis in vivo via VEGFR-2 pathway by inducing inflammatory cell VEGF synthesis and secretion. *FASEB J*. 2002;16(11):1471-3.
59. Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiol Rev*. 2011;91(2):461-553.
60. Basu A, Krady JK, O'Malley M, Styren SD, DeKosky ST, Levison SW. The type 1 interleukin-1 receptor is essential for the efficient activation of microglia and the induction of multiple proinflammatory mediators in response to brain injury. *J Neurosci*. 2002;22(14):6071-82.
61. Cavillon JM. Cytokines and macrophages. *Biomed Pharmacother*. 1994;48(10):445-53.
62. Hergenroeder GW, Moore AN, McCoy JP, Jr., Samsel L, Ward NH, 3rd, Clifton GL, et al. Serum IL-6: a candidate biomarker for intracranial pressure elevation following isolated traumatic brain injury. *Journal of neuroinflammation*. 2010;7:19.
63. Zhang Y, Lin JX, Vilcek J. Synthesis of interleukin 6 (interferon-beta 2/B cell stimulatory factor 2) in human fibroblasts is triggered by an increase in intracellular cyclic AMP. *J Biol Chem*. 1988;263(13):6177-82.
64. Jung JE, Kim GS, Chan PH. Neuroprotection by interleukin-6 is mediated by signal transducer and activator of transcription 3 and antioxidative signaling in ischemic stroke. *Stroke*. 2011;42(12):3574-9.
65. Liu Z, Qiu YH, Li B, Ma SH, Peng YP. Neuroprotection of interleukin-6 against NMDA-induced apoptosis and its signal-transduction mechanisms. *Neurotox Res*. 2011;19(3):484-95.
66. Merrill JE. Effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha on astrocytes, microglia, oligodendrocytes, and glial precursors in vitro. *Dev Neurosci*. 1991;13(3):130-7.
67. Pickering M, Cumiskey D, O'Connor JJ. Actions of TNF-alpha on glutamatergic synaptic transmission in the central nervous system. *Exp Physiol*. 2005;90(5):663-70.
68. Belarbi K, Jopson T, Tweedie D, Arellano C, Luo W, Greig NH, et al. TNF-alpha protein synthesis inhibitor restores neuronal function and reverses cognitive deficits induced by chronic neuroinflammation. *Journal of neuroinflammation*. 2012;9:23.

69. Bansal V, Ryu SY, Blow C, Costantini T, Loomis W, Eliceiri B, et al. The hormone ghrelin prevents traumatic brain injury induced intestinal dysfunction. *J Neurotrauma*. 2010;27(12):2255-60.
70. Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res*. 2000;25(9-10):1439-51.
71. Papa L, Brophy GM, Welch RD, Lewis LM, Braga CF, Tan CN, et al. Time Course and Diagnostic Accuracy of Glial and Neuronal Blood Biomarkers GFAP and UCH-L1 in a Large Cohort of Trauma Patients With and Without Mild Traumatic Brain Injury. *JAMA Neurol*. 2016;73(5):551-60.
72. Missler U, Wiesmann M, Friedrich C, Kaps M. S-100 protein and neuron-specific enolase concentrations in blood as indicators of infarction volume and prognosis in acute ischemic stroke. *Stroke*. 1997;28(10):1956-60.
73. Pelinka LE, Kroepfl A, Leixnering M, Buchinger W, Raabe A, Redl H. GFAP versus S100B in serum after traumatic brain injury: relationship to brain damage and outcome. *J Neurotrauma*. 2004;21(11):1553-61.
74. Thelin EP, Zeiler FA, Ercole A, Mondello S, Buki A, Bellander BM, et al. Serial Sampling of Serum Protein Biomarkers for Monitoring Human Traumatic Brain Injury Dynamics: A Systematic Review. *Front Neurol*. 2017;8:300.
75. Papa L, Lewis LM, Falk JL, Zhang Z, Silvestri S, Giordano P, et al. Elevated levels of serum glial fibrillary acidic protein breakdown products in mild and moderate traumatic brain injury are associated with intracranial lesions and neurosurgical intervention. *Ann Emerg Med*. 2012;59(6):471-83.
76. Daisuke Ito MKT, MD; Shigeaki Suzuki, MD; Tomohisa Dembo MYF, MD. Enhanced Expression of Iba1, Ionized Calcium-Binding Adapter Molecule 1, After Transient Focal Cerebral Ischemia In Rat Brain. American Heart Association Inc. 2001.
77. Ohsawa K, Imai Y, Kanazawa H, Sasaki Y, Kohsaka S. Involvement of Iba1 in membrane ruffling and phagocytosis of macrophages/microglia. *J Cell Sci*. 2000;113 (Pt 17):3073-84.
78. Imai Y, Ibata I, Ito D, Ohsawa K, Kohsaka S. A novel gene Iba1 in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;224(3):855-62.
79. Moritz KE, McCormack NM, Abera MB, Viollet C, Yauger YJ, Sukumar G, et al. The role of the immunoproteasome in interferon-gamma-mediated microglial activation. *Sci Rep*. 2017;7(1):9365.
80. Bresseit J, Kwong Chung CKC, Noti M, Zysset D, Hoheisel-Dickgreber N, Genitsch V, et al. Divergent Roles of Interferon-gamma

- and Innate Lymphoid Cells in Innate and Adaptive Immune Cell-Mediated Intestinal Inflammation. *Front Immunol.* 2018;9:23.
81. Benveniste EN. Cytokine actions in the central nervous system. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1998;9(3-4):259-75.
 82. Papadopoulos V, Lecanu L. Translocator protein (18 kDa) TSPO: an emerging therapeutic target in neurotrauma. *Exp Neurol.* 2009;219(1):53-7.
 83. Chen MK, Guilarte TR. Translocator protein 18 kDa (TSPO): molecular sensor of brain injury and repair. *Pharmacol Ther.* 2008;118(1):1-17.
 84. Braniste V, Al-Asmakh M, Kowal C, Anuar F, Abbaspour A, Toth M, et al. The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Sci Transl Med.* 2014;6(263):263ra158.
 85. Katzenberger RJ, Ganetzky B, Wassarman DA. The gut reaction to traumatic brain injury. *Fly (Austin).* 2015;9(2):68-74.
 86. Thion MS, Garel S. [Microbiome and microglia: prenatal and postnatal interactions diverge according to sex]. *Med Sci (Paris).* 2018;34(6-7):527-9.
 87. Erny D, Hrabé de Angelis AL, Jaitin D, Wieghofer P, Staszewski O, David E, et al. Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nat Neurosci.* 2015;18(7):965-77.
 88. Rothhammer V, Manciasfroni ID, Bunse L, Takenaka MC, Kenison JE, Mayo L, et al. Type I interferons and microbial metabolites of tryptophan modulate astrocyte activity and central nervous system inflammation via the aryl hydrocarbon receptor. *Nat Med.* 2016;22(6):586-97.
 89. Dethlefsen L, Huse S, Sogin ML, Relman DA. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biol.* 2008;6(11):e280.
 90. Sanmiguel C, Gupta A, Mayer EA. Gut Microbiome and Obesity: A Plausible Explanation for Obesity. *Curr Obes Rep.* 2015;4(2):250-61.
 91. Fung TC, Olson CA, Hsiao EY. Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. *Nature Neuroscience.* 2017;20(2):145-55.
 92. Keshavarzian A, Green SJ, Engen PA, Voigt RM, Naqib A, Forsyth CB, et al. Colonic bacterial composition in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2015;30(10):1351-60.
 93. De Angelis M, Piccolo M, Vannini L, Siragusa S, De Giacomo A, Serrazanetti DI, et al. Fecal microbiota and metabolome of children with autism and pervasive developmental disorder not otherwise specified. *PLoS One.* 2013;8(10):e76993.
 94. Fouts DE, Pieper R, Szpakowski S, Pohl H, Knobloch S, Suh MJ, et al. Integrated next-generation sequencing of 16S rDNA and

- metaproteomics differentiate the healthy urine microbiome from asymptomatic bacteriuria in neuropathic bladder associated with spinal cord injury. *J Transl Med.* 2012;10:174.
95. Shoshani T, Faerman A, Mett I, Zelin E, Tenne T, Gorodin S, et al. Identification of a novel hypoxia-inducible factor 1-responsive gene, RTP801, involved in apoptosis. *Mol Cell Biol.* 2002;22(7):2283-93.
96. Doig CJ, Sutherland LR, Sandham JD, Fick GH, Verhoef M, Meddings JB. Increased intestinal permeability is associated with the development of multiple organ dysfunction syndrome in critically ill ICU patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;158(2):444-51.
97. Swank GM, Deitch EA. Role of the gut in multiple organ failure: bacterial translocation and permeability changes. *World J Surg.* 1996;20(4):411-7.
98. Brown TH, Davidson PF, Larson GM. Acute gastritis occurring within 24 hours of severe head injury. *Gastrointest Endosc.* 1989;35(1):37-40.
99. Kamada T, Fusamoto H, Kawano S, Noguchi M, Hiramatsu K. Gastrointestinal bleeding following head injury: a clinical study of 433 cases. *J Trauma.* 1977;17(1):44-7.
100. Hang CH, Shi JX, Li JS, Wu W, Yin HX. Alterations of intestinal mucosa structure and barrier function following traumatic brain injury in rats. *World J Gastroenterol.* 2003;9(12):2776-81.
101. Faries PL, Simon RJ, Martella AT, Lee MJ, Machiedo GW. Intestinal permeability correlates with severity of injury in trauma patients. *J Trauma.* 1998;44(6):1031-5; discussion 5-6.
102. Grotz MR, Deitch EA, Ding J, Xu D, Huang Q, Regel G. Intestinal cytokine response after gut ischemia: role of gut barrier failure. *Ann Surg.* 1999;229(4):478-86.
103. Miao FJ, Green PG, Levine JD. Mechanosensitive duodenal afferents contribute to vagal modulation of inflammation in the rat. *J Physiol.* 2004;554(Pt 1):227-35.
104. Meneses G, Bautista M, Florentino A, Diaz G, Acero G, Besedovsky H, et al. Electric stimulation of the vagus nerve reduced mouse neuroinflammation induced by lipopolysaccharide. *J Inflamm (Lond).* 2016;13:33.
105. Qin SL, Li TS, Kubo M, Ohshima M, Furutani A, Hamano K. Transient increase of cytokines in the acute ischemic tissue is beneficial to cell-based therapeutic angiogenesis. *Circ J.* 2008;72(12):2075-80.
106. Rochfort KD, Collins LE, Murphy RP, Cummins PM. Downregulation of blood-brain barrier phenotype by proinflammatory cytokines involves NADPH oxidase-dependent ROS generation: consequences for interendothelial adherens and tight junctions. *PLoS One.* 2014;9(7):e101815.

107. Vighi G, Marcucci F, Sensi L, Di Cara G, Frati F. Allergy and the gastrointestinal system. *Clin Exp Immunol.* 2008;153 Suppl 1:3-6.
108. Pokusaeva K, Johnson C, Luk B, Uribe G, Fu Y, Oezguen N, et al. GABA-producing *Bifidobacterium dentium* modulates visceral sensitivity in the intestine. *Neurogastroenterol Motil.* 2017;29(1).
109. Yano JM, Yu K, Donaldson GP, Shastri GG, Ann P, Ma L, et al. Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis. *Cell.* 2015;161(2):264-76.
110. Ma EL, Smith AD, Desai N, Cheung L, Hanscom M, Stoica BA, et al. Bidirectional brain-gut interactions and chronic pathological changes after traumatic brain injury in mice. *Brain Behav Immun.* 2017;66:56-69.
111. Abdel-Haq R, Schlachetzki JCM, Glass CK, Mazmanian SK. Microbiome-microglia connections via the gut-brain axis. *J Exp Med.* 2019;216(1):41-59.
112. Stecher B, Chaffron S, Kappeli R, Hapfelmeier S, Friedrich S, Weber TC, et al. Like will to like: abundances of closely related species can predict susceptibility to intestinal colonization by pathogenic and commensal bacteria. *PLoS Pathog.* 2010;6(1):e1000711.
113. Reikvam DH, Erofeev A, Sandvik A, Grcic V, Jahnsen FL, Gaustad P, et al. Depletion of murine intestinal microbiota: effects on gut mucosa and epithelial gene expression. *PLoS One.* 2011;6(3):e17996.
114. Wang AL, Yu AC, Lau LT, Lee C, Wu le M, Zhu X, et al. Minocycline inhibits LPS-induced retinal microglia activation. *Neurochemistry international.* 2005;47(1-2):152-8.
115. Tikka TM, Koistinaho JE. Minocycline provides neuroprotection against N-methyl-D-aspartate neurotoxicity by inhibiting microglia. *J Immunol.* 2001;166(12):7527-33.
116. Jassam YN, Izzy S, Whalen M, McGavern DB, El Khoury J. Neuroimmunology of Traumatic Brain Injury: Time for a Paradigm Shift. *Neuron.* 2017;95(6):1246-65.
117. Xiong Y, Mahmood A, Chopp M. Animal models of traumatic brain injury. *Nat Rev Neurosci.* 2013;14(2):128-42.
118. Onyszchuk G, Al-Hafez B, He YY, Bilgen M, Berman NE, Brooks WM. A mouse model of sensorimotor controlled cortical impact: characterization using longitudinal magnetic resonance imaging, behavioral assessments and histology. *J Neurosci Methods.* 2007;160(2):187-96.
119. Deitch AD, Moses MJ. The Nissl substance of living and fixed spinal ganglion cells. II. An ultraviolet absorption study. *J Biophys Biochem Cytol.* 1957;3(3):449-56.
120. Haller D, Hörmannspurger G. Darmgesundheit und Mikrobiota. In: Haller D, Rimbach G, Grune T, editors. *Biofunktionalität der*

Lebensmittelinhaltsstoffe. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013. p. 67-83.

121. Howard BM, Kornblith LZ, Christie SA, Conroy AS, Nelson MF, Champion EM, et al. Characterizing the gut microbiome in trauma: significant changes in microbial diversity occur early after severe injury. *Trauma Surg Acute Care Open*. 2017;2(1):e000108.

122. Lepage P, Leclerc MC, Joossens M, Mondot S, Blottiere HM, Raes J, et al. A metagenomic insight into our gut's microbiome. *Gut*. 2013;62(1):146-58.

123. Houlden A, Goldrick M, Brough D, Vizi ES, Lenart N, Martinecz B, et al. Brain injury induces specific changes in the caecal microbiota of mice via altered autonomic activity and mucoprotein production. *Brain Behav Immun*. 2016;57:10-20.

124. Luczynski P, McVey Neufeld KA, Oriach CS, Clarke G, Dinan TG, Cryan JF. Growing up in a Bubble: Using Germ-Free Animals to Assess the Influence of the Gut Microbiota on Brain and Behavior. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2016;19(8).

125. Brenner LA, Stearns-Yoder KA, Hoffberg AS, Penzenik ME, Starosta AJ, Hernandez TD, et al. Growing literature but limited evidence: A systematic review regarding prebiotic and probiotic interventions for those with traumatic brain injury and/or posttraumatic stress disorder. *Brain Behav Immun*. 2017;65:57-67.

126. Ma Y, Liu T, Fu J, Fu S, Hu C, Sun B, et al. *Lactobacillus acidophilus* Exerts Neuroprotective Effects in Mice with Traumatic Brain Injury. *J Nutr*. 2019;149(9):1543-52.

127. Benakis C, Brea D, Caballero S, Faraco G, Moore J, Murphy M, et al. Commensal microbiota affects ischemic stroke outcome by regulating intestinal γ T cells. *Nat Med*. 2016;22(5):516-23.

128. Liedtke W, Edelmann W, Bieri PL, Chiu FC, Cowan NJ, Kucherlapati R, et al. GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination. *Neuron*. 1996;17(4):607-15.

129. Riazi K, Galic MA, Kuzmiski JB, Ho W, Sharkey KA, Pittman QJ. Microglial activation and TNF α production mediate altered CNS excitability following peripheral inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(44):17151-6.

130. Lagraoui M, Latoche JR, Cartwright NG, Sukumar G, Dalgard CL, Schaefer BC. Controlled cortical impact and craniotomy induce strikingly similar profiles of inflammatory gene expression, but with distinct kinetics. *Front Neurol*. 2012;3:155.

131. Bye N, Habgood MD, Callaway JK, Malakooti N, Potter A, Kossmann T, et al. Transient neuroprotection by minocycline following traumatic brain injury is associated with attenuated microglial activation

- but no changes in cell apoptosis or neutrophil infiltration. *Exp Neurol.* 2007;204(1):220-33.
132. Garcia JH, Liu KF, Relton JK. Interleukin-1 receptor antagonist decreases the number of necrotic neurons in rats with middle cerebral artery occlusion. *Am J Pathol.* 1995;147(5):1477-86.
133. Loddick SA, Rothwell NJ. Neuroprotective effects of human recombinant interleukin-1 receptor antagonist in focal cerebral ischaemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996;16(5):932-40.
134. Lawrence CB, Allan SM, Rothwell NJ. Interleukin-1beta and the interleukin-1 receptor antagonist act in the striatum to modify excitotoxic brain damage in the rat. *The European journal of neuroscience.* 1998;10(3):1188-95.
135. Klein MA, Moller JC, Jones LL, Bluethmann H, Kreutzberg GW, Raivich G. Impaired neuroglial activation in interleukin-6 deficient mice. *Glia.* 1997;19(3):227-33.
136. Gold R, Schmied M, Tontsch U, Hartung HP, Wekerle H, Toyka KV, et al. Antigen presentation by astrocytes primes rat T lymphocytes for apoptotic cell death. A model for T-cell apoptosis in vivo. *Brain.* 1996;119 (Pt 2):651-9.
137. Henry CJ, Huang Y, Wynne AM, Godbout JP. Peripheral lipopolysaccharide (LPS) challenge promotes microglial hyperactivity in aged mice that is associated with exaggerated induction of both pro-inflammatory IL-1beta and anti-inflammatory IL-10 cytokines. *Brain Behav Immun.* 2009;23(3):309-17.
138. Kramer TJ, Hack N, Bruhl TJ, Menzel L, Hummel R, Griemert EV, et al. Depletion of regulatory T cells increases T cell brain infiltration, reactive astrogliosis, and interferon-gamma gene expression in acute experimental traumatic brain injury. *Journal of neuroinflammation.* 2019;16(1):163.
139. Corbin JG, Kelly D, Rath EM, Baerwald KD, Suzuki K, Popko B. Targeted CNS expression of interferon-gamma in transgenic mice leads to hypomyelination, reactive gliosis, and abnormal cerebellar development. *Mol Cell Neurosci.* 1996;7(5):354-70.
140. Rostworowski M, Balasingam V, Chabot S, Owens T, Yong VW. Astrogliosis in the neonatal and adult murine brain post-trauma: elevation of inflammatory cytokines and the lack of requirement for endogenous interferon-gamma. *J Neurosci.* 1997;17(10):3664-74.
141. Kremlev SG, Palmer C. Interleukin-10 inhibits endotoxin-induced pro-inflammatory cytokines in microglial cell cultures. *J Neuroimmunol.* 2005;162(1-2):71-80.
142. Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(5):313-23.

143. Li M, Lin YP, Chen JL, Li H, Jiang RC, Zhang JN. Role of regulatory T cell in clinical outcome of traumatic brain injury. *Chin Med J (Engl)*. 2015;128(8):1072-8.
144. Loane DJ, Kumar A. Microglia in the TBI brain: The good, the bad, and the dysregulated. *Exp Neurol*. 2016;275 Pt 3:316-27.
145. Timaru-Kast R, Luh C, Gotthardt P, Huang C, Schafer MK, Engelhard K, et al. Influence of age on brain edema formation, secondary brain damage and inflammatory response after brain trauma in mice. *PLoS One*. 2012;7(8):e43829.
146. Holmin S, Soderlund J, Biberfeld P, Mathiesen T. Intracerebral inflammation after human brain contusion. *Neurosurgery*. 1998;42(2):291-8; discussion 8-9.

9 Danksagung

Mein Dank gilt dem gesamten Team der Arbeitsgruppe Neuroprotektion der Universitätsmedizin der Johannes-Gutenberg -Universität Mainz.

10 Tabellarischer Lebenslauf

Diana Vetter

Persönliches

Geboren: 02.05.1989 in Kaiserslautern
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig
Eltern: Karsten Vetter, technischer Fernmeldehauptsekretär, verstorben 2009
Eva Vetter, geb. Ohliger, Hausfrau
Geschwister: zwei jüngere Brüder, drei ältere Halbschwestern

Schulische Ausbildung

1995-2004 Grund-Hauptschule der Glantalschule in Glan-Münchweiler
2004-2005 Freiwilliges 10.Schuljahr auf der Glantalschule in Glan-Münchweiler mit Erwerb des qualifizierten Sekundarabschluss I
2005-2007 Fachoberschule der Paul-Weber Schule im Bereich Wirtschaft in Homburg/Saar mit Erwerb des Fachabiturs

Ausbildung und Beruf

September 2007-
Januar 2008 Als Aushilfe in Bäckerei tätig sowie als Zeitungszusteller
Januar 2008 Einstellung in die Laufbahn der Feldwebel bei der Bundeswehr, Zeitsoldat auf 12 Jahr mit Ausbildung zum Rettungsassistenten, Allgemeine Grundausbildung im 4.Lazarettregiment 21 in Rennerod
März-Dezember 2008 Stammeinheit 2.Lazarettregiment 21 in Rennerod, hier Laufbahnlehrgänge: Feldwebellehrgang, militärischer Führerschein Kl. B/C
Januar-Dezember 2009 Theoretischer Teil der Ausbildung zum Rettungsassistenten, medizinisches Bildungszentrum Nord in Wilhelmshaven
Januar-Dezember 2010 Anerkennungsjahr für die Ausbildung zum Rettungsassistenten auf der Lehrrettungswache Homburg/Saar

Januar 2011-April 2013	Stammeinheit Sanitätszentrum Zweibrücken als Sanitätsfeldwebel Rettungsassistent, hier im Jahr 2011 Schwerpunkt: einsatzvorbereitende Ausbildung, Ausbildung Strategic Aeromedical Evacuation, Februar-August 2012: Auslandseinsatz Afghanistan ISAF, Kompanie bewegliche Sanitätskräfte
April 2013-Oktober 2014	Stammeinheit 1.Fallschirmjägerbataillon 263 Zweibrücken Sanitätszug, hier Ausbildung zum Fallschirmspringer sowie beauftragte Person für Luftfahrtsicherheit
Oktober 2014	Laufbahnwechsel in die Laufbahn der Sanitätsoffiziere mit Beginn des Humanmedizinstudiums an der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz
März 2017	1.Staatsexamen Humanmedizin
April 2020	2.Staatsexamen Humanmedizin
Mai 2021	3.Staatsexamen Humanmedizin
Seit Mai 2021	Stammeinheit Bundeswehrkrankenhaus Ulm, hier im ersten klinischen Weiterbildungsabschnitt in der Anästhesie-/Intensivmedizin Juli-September 2022 Auslandseinsatz Mali MINUSMA in der Sanitätseinsatzstaffel Gao, Notfall-/Schockraumversorgung als Weiterbildungsassistent Anästhesie

Weitere Interessen und Tätigkeiten

CrossFit, Reiten, Bouldern