

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

Auswirkungen einer postoperativen
Antibiose-Therapie nach
experimentellem Schädel-Hirn-Trauma

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

Vorgelegt von

Julian Jonas Denninger
aus Ermershausen

Mainz, 2023

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Ulrich Förstermann

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Michael Schäfer

Tag der Promotion: 06.10.2023

Die Dissertation widme ich meinen Großeltern.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	IV
Abbildungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis.....	IX
1 Einleitung.....	1
2 Literaturdiskussion.....	3
2.1 Anatomie des zentralen Nervensystems.....	3
2.1.1 Makroskopische Anatomie.....	3
2.1.2 Mikroskopische Anatomie.....	4
2.2 Physiologische Grundlagen neuronaler Verschaltung.....	5
2.3 Schädel-Hirn-Trauma.....	7
2.3.1 Definition, Klinik und Einteilung.....	7
2.3.2 Epidemiologische Daten und Relevanz.....	8
2.3.3 Schädel-Hirn-Trauma im Tiermodell.....	9
2.3.4 Pathophysiologie.....	10
2.3.5 Bisherige Therapiemöglichkeiten.....	21
2.4 Antibiotika.....	22
2.4.1 Grundlagen.....	22
2.4.2 Aufbau von Bakterien.....	22
2.4.3 Pharmakodynamik.....	23
2.4.4 Bisherige Einsatzgebiete der Antibiose Therapie.....	27
2.4.5 Neuronale und antiinflammatorische Auswirkungen im Gehirn.....	27
2.5 Mikrobiom.....	30
2.5.1 Grundlagen.....	30
2.5.2 Einflüsse auf das Mikrobiom.....	32
2.5.3 Mikrobiom-Hirn-Achse.....	34
2.5.4 Mikrobiom als therapeutisches Ziel bei Schädel-Hirn-Trauma.....	35
3 Material.....	37
3.1 Verbrauchsmaterialien.....	37
3.2 Geräte.....	38
3.3 Chemikalien.....	39
3.4 Arzneimittel.....	39
3.5 Antikörper.....	40
3.6 Kits.....	40
3.7 Puffer und Lösungen.....	40
3.8 Primer.....	41
3.8.1 Gehirn.....	41
3.8.2 Kolon.....	42
3.9 Software.....	42
3.10 Mikrobiologische Analyse.....	42
4 Methoden.....	43

4.1	Tierexperiment.....	43
4.1.1	Versuchstiere und Haltung.....	43
4.1.2	Genehmigung und Studiendesign.....	43
4.1.3	Invasive Maßnahmen.....	44
4.1.4	Erheben des Körpergewichts und Score-Sheet.....	46
4.1.5	Stuhlprobenentnahme und mikrobiologische Analyse.....	47
4.1.6	Medikamentengabe.....	47
4.1.7	Verhaltensbiologische Untersuchung.....	48
4.2	Histologische Datenerhebung.....	51
4.2.1	Kryosektion und Probengewinnung.....	51
4.2.2	Kresylviolett-Färbung nach Nissel.....	52
4.2.3	Bestimmung Kontusionsvolumen.....	53
4.2.4	Dickemessung Körnerzellschicht des Gyrus dentatus.....	53
4.2.5	Immunhistochemische Färbung.....	54
4.2.6	Quantifizierung der Immunhistochemie.....	55
4.3	Molekularbiologische Methode.....	56
4.3.1	Extraktion Ribonukleinsäure aus Hirn und Colon.....	56
4.3.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung.....	57
4.3.3	Synthese der komplementären Desoxyribonukleinsäure.....	57
4.3.4	Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR).....	58
4.3.5	Zielstrukturen im Gehirngewebe.....	59
4.3.6	Zielstrukturen im Colon.....	61
4.4	Proteinanalyse.....	62
4.4.1	Proteinextraktion und Proteinkonzentrationsbestimmung.....	62
4.4.2	Western-Blot.....	62
4.4.3	Immunglobulin G Dot Blot.....	63
4.5	Statistische Auswertung.....	63
5	Ergebnisse.....	64
5.1	Klinische und verhaltensbiologische Daten.....	64
5.1.1	Gewicht.....	64
5.1.2	Neurological Severity Score (NSS).....	66
5.1.3	Rota Rod.....	67
5.1.4	Allgemeine Bewegungsverhalten.....	68
5.2	Histologische Datenerhebung.....	72
5.2.1	Volumetrie.....	72
5.2.2	Dickemessung Körnerzellschicht des Gyrus Dentatus.....	73
5.2.3	Immunhistochemie.....	74
5.3	Molekularbiologische Daten.....	76
5.3.1	Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion der cerebralen Trimmschnitte.....	76
5.3.2	Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion des Kolongewebes.....	87

5.4	Proteinanalytik	90
5.4.1	Western Blot.....	90
5.4.2	IgG-Dotblot.....	92
5.5	Mikrobiologische Auswertung	93
6	Diskussion	96
6.1	Applikationswege und Wirkspiegel	96
6.2	Alternative Möglichkeiten das Mikrobiom zu verändern.....	97
6.3	Auswirkungen der traumatischen Hirnverletzung	99
6.4	Auswirkungen der Dysbiose	104
6.5	Das murine Tiermodell.....	110
6.5.1	Anatomische Besonderheiten des Magen-Darmtraktes.....	110
6.5.2	Vergleich des murinen und humanen Mikrobioms	111
6.5.3	Alternative Tiermodelle	111
7	Zusammenfassung	112
8	Literaturverzeichnis.....	114
9	Lebenslauf	126

Abkürzungsverzeichnis

A

AMP Antimikrobielle Peptide
ATP Adenosintri-phosphat

B

BHS Blut-Hirn-Schranke

C

CBF zerebrale Blutfluss eng. cerebral blood flow
CCI kontrollierte kortikale Einschlag eng. controlled cortical impact
cDNA komplementären Desoxyribonukleinsäure
CED chronisch entzündliche Darmerkrankungen
cm Zentimeter
CP Kreuzpunkt eng. Crossingpoint
CPP zerebrale Perfusionsdruck eng. cerebral perfusion pressure
cRNA RNA-Konzentration
CT Computertomograph
CTE chronisch traumatische Encephalopathie

D

DAI diffuse axonale Schädigung eng. diffuse axonal injury
DAMP damage associated molecular patterns
DHFS Dihydrofolsäure
DNS Desoxyribonucleinsäure

E

EAAT2 exzitatorischer Aminosäuretransporter 2 eng. excitatory amino acid transporter 2
EDTA Ethylendiamintetraessigsäure eng ethylendiamintetraacid
ER Endoplasmatisches Retikulum
EVD externe Ventrikeldrainage

F

FFAR freie Fettsäure Rezeptor eng. free fatacid receptor
FMT Fäkale mikrobiotische Transplantation eng. faecal microbiota transplant
FPI Flüssigkeitsschlagverletzung eng. fluid percussion injury

G

g g-Kraft
GABA Gamma-Aminobuttersäure
GAPDH Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase
GCS Glasgow-Coma-Scale
gDNA genomische DNA
GFAP saure Gliafaserprotein, eng. glial fibrillary acidic protein
GIT Gastrointestinaltrakt
GLT-1 Glutamat-Transporter-1
Glu Glutamat
Gly Glycin

H

HSP Hitzeschockprotein eng. heat shock protein

I

IbA1 ionisierendes calciumbindendes Adaptermolekül 1
ICAM-1 interzelluläre Adhäsionsmolekül 1 eng. intercellularadhesion molecule-1
ICP intrakranieller Druck, engl. intracranial pressure
IgG Immunglobulin G
IL Interleukin
INF Interferon

J

JGU Johannes-Gutenberg-Universität

K

KBE koloniebildende Einheit
kg Kilogramm
kgKG Kilogramm Körpergewicht

L

LA *Lactobacillus acidophilus*
LPS Lipopolysaccharid

M

M Mittelwert
m/s Meter pro Sekunde
MGBA Mikrobiom Hirn Achse eng. microbiota gut brain axis
MHC eng. Major histocompatibility complex
mm Milimeter
MMP Matrix-Metalloprotease
MRT Magnetresonanztomograph
ms Millisekunden

N

NF-κB Nuclearfaktor Kappa B
NMDA N-Methyl-d-Aspartat
NORT Novel object recognition test
NSS Neurological severity score

O

OD optische Dichte
OT Objektträger

P

PABS p-Aminobenzoessäure
PBS Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR Polymerasekettenreaktion
PFA Paraformaldehyd
PGE2 Prostaglandin E2
PNS periphere Nervensystem
PSA Polysaccharid A
PTGS Prostaglandin-Endoperoxidase Synthase

Q

qPCR quantitative Echtzeit-PCR
qRT-PCR quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion

R

RIPA Radioimmunoprecipitationassaypuffer

S

SCFA kurzkettige Fettsäuren eng. *short chained fatty acids*

SD Standardabweichung

SHT Schädel-Hirn-Trauma

T

TDM therapeutisches Medikamentenmonitoring eng. *therapeutic drug monitoring*

THFS Tetrahydrofolsäure, Tetrahydrofolsäure

TJP Tight-junction Protein

TLR Toll-Like-Receptor

TNF Tumornekrosefaktor

TR-DGU TraumaRegister der deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie

Treg regulatorische T-Zellen

TSPO Translokator Protein

U

U/m Umdrehungen pro Minute

V

VGLUT Vesikuläre Glutamattransporter

W

WD Gewicht fallen lassen eng. *weight drop*

WHO Weltgesundheitsorganisation eng. *world health organization*

Z

ZNS zentrale Nervensystem

μ

μm Mikrometer

μg Mikrogramm

μl Mikroliter

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Funktionsweise einer Synapse (modifiziert nach Südhof (18))	6
Abbildung 2 Verteilung der Verletzungsursachen (modifiziert nach DESTATIS (31))	9
Abbildung 3 ATP-induzierte Antwort der Mikroglia (modifiziert nach Davalos et al. (80))	15
Abbildung 4 Funktionelle Antwort der M1 - und M2 Mikroglia nach SHT(modifiziert nach Loane et Kumar(100))	18
Abbildung 5 Astrozyten Reaktion auf mechanische Belastung bei SHT (modifiziert nach Burda (86))	20
Abbildung 6 Strukturformel der Aminopenicilline (modifiziert nach Lüllmann,Pharmakologie und Toxikologie(136))	25
Abbildung 7 Strukturformel Vancomycin nach Lüllmann (modifiziert nach Lüllmann, Pharmakologie und Toxikologie(136))	26
Abbildung 8 Gelatinase Aktivität im Hippocampus nach induzierter Ischämie (modifiziert nach Lee et al.(149))	27
Abbildung 9 Darstellung einer neuronalen Synapse während Glutamat induzierter Exzitoxizität (modifiziert nach Fontana (166))	28
Abbildung 10 Zeichnung eines CCI Impactors mit Fixierungseinrichtung und Darstellung der freigelegten Dura mater nach Kraniotomie (modifiziert nach Onyszchuk(198))	45
Abbildung 11 Operationsarbeitsplatz	46
Abbildung 12 Versuchsaufbau Neuroscore	48
Abbildung 13 Rota-Rod	49
Abbildung 14 Versuchsaufbau "Exit from the Circle"	50
Abbildung 15 Versuchsschema NORT (modifiziert nach Lueptow (200))	51
Abbildung 16 Kryostat	52
Abbildung 17 Ermittlung Schadensvolumen (Ebene 7, #20)	53
Abbildung 18 Messung der Granularzellschicht des Gyrus dentatus an vier verschiedenen Stellen	54
Abbildung 19 Darstellung der GFAP(links)- und Iba1(rechts) Fluoreszenz	55
Abbildung 20 Zu analysierendes Areale der Immunfluoreszenzfärbung	55
Abbildung 21 Antibiose hat keine Auswirkungen auf das Körpergewicht nach CCI	65
Abbildung 22 Die Antibiose Gabe zeigt positive Auswirkungen auf den Neuro-Score nach CCI	66
Abbildung 23 Antibiotikagabe ohne Einfluss auf die Laufleistung im Rotarod-Test nach CCI	67
Abbildung 24 Antibiosegabe ohne Auswirkungen auf die Distanz nach CCI	68
Abbildung 25 Antibiotikatherapie nach CCI hat keine Auswirkungen auf die mittlere Laufgeschwindigkeit	69
Abbildung 26 Antibiosegabe nach CCI hat keinen Einfluss auf die Explorationszeit am unbekanntem Objekt	70
Abbildung 27 Die Gabe von Antibiotika hat keinen Einfluss auf den Recognition-Index am neuen Objekt	71
Abbildung 28 Die Gabe von Antibiotika hat keinen Einfluss auf das Kontusionsvolumen	72
Abbildung 29 Die Gabe von Antibiose hat keine Auswirkungen auf die Dicke der Granularzellschicht des Gyrus dentatus	73
Abbildung 30 Die Gabe von Antibiotika vermindert die periläsionale Astrozytenzahl	74
Abbildung 31 Die Verabreichung einer Antibiose hat eine verminderte Migration von Mikroglia ins Läsionsgebiet zur Folge	75
Abbildung 32 Die Gabe von Antibiotika nach CCI erhöht die Expression von GFAP	76
Abbildung 33 Die Verabreichung von Antibiotika nach CCI hat keinen Einfluss auf die Genexpression des TSPO	77
Abbildung 34 Die Antibiosegabe hat keinen Effekt auf die Genregulation von Serpina3n	78
Abbildung 35 Die Gabe von Antibiotika hat keinen Effekt auf die Genexpression des Inflammationsmediators Interleukin 1 β	79
Abbildung 36 Die Gabe von Antibiotika hat keinen Effekt auf den Aktivitätszustand der Mikroglia und die Expression des Inflammationsmarker Iba1	80

Abbildung 37 Die Gabe von Antibiotika hat keinen Effekt auf die Genexpression des pro-inflammatorischen Zytokin $TNF\alpha$	81
Abbildung 38 Die Gabe von Antibiotika nach CCI hat keinen Effekt auf die Genexpression von MHC2	82
Abbildung 39 Die Gabe von Antibiotika nach CCI hat keinen Effekt auf die Genexpression von GLUT1	83
Abbildung 40 Die Antibiotikagabe zeigt keinen Effekt auf die Expression von GLUT1	84
Abbildung 41 Die Gabe von Antibiotika hat postoperativ keine Auswirkungen auf die Expression von $IFN\gamma$, erhöht jedoch initial die Expression in der Sham-Gruppe	85
Abbildung 42 Die Antibiotikagabe hat nach CCI keinen Einfluss auf die Genexpression von VGLUT1 und VGLUT2	86
Abbildung 43 Die Genexpression der Cyclooxygenase 2 wird durch eine Antibiotikatherapie nicht beeinflusst.	87
Abbildung 44 Die Gabe von Antibiotika beeinflusst die Genexpression von TJP-1 nicht.	88
Abbildung 45 Die Antibiotikagabe hat keinen Einfluss auf die Occludin-Expression im Kolon.	89
Abbildung 46 Die Gabe von Antibiotika hat keinen Einfluss auf die Expression des Spaltproduktes Spektrin (145kDa).	90
Abbildung 47 Die Antibiotikagabe hat keine Auswirkungen auf die GFAP-Expression	91
Abbildung 48 Die Verabreichung von Antibiotika nach CCI zeigt keine Auswirkungen auf die Menge von Immunglobulin G.	92
Abbildung 49 Die postoperative Gabe von Antibiotika führt zu einer Veränderung der Mikrobiozusammensetzung zu Gunsten von Gram-negativen Erregern	94
Abbildung 50 In Folge der posttraumatischen Antibiotikagabe kommt es zu einer Reduktion der KBE und der Mikrobiomvielfalt in den beiden AB-Gruppen	95
Abbildung 51 Makroskopische Unterschiede der Anatomie des Magen-Darmtraktes (modifiziert nach Nguyen (257)).....	110

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Kriterien der GCS (nach Memorix Neurologie (26))	8
Tabelle 2 Indikationen und Einsatzgebiete einzelner Antibiotikagruppen	27
Tabelle 3 Verbrauchsmaterialien.....	37
Tabelle 4 Geräte.....	38
Tabelle 5 Chemikalien.....	39
Tabelle 6 Arzneimittel.....	39
Tabelle 7 Antikörper	40
Tabelle 8 Kits.....	40
Tabelle 9 Puffer und Lösungen	40
Tabelle 10 Primer-Gehirn	41
Tabelle 11 Primer-Kolon.....	42
Tabelle 12 Software	42
Tabelle 13 Mikrobiologische Analyse.....	42
Tabelle 14 Übersicht Versuchsgruppen	44
Tabelle 15 Pipettierungsschema.....	47
Tabelle 16 Deskriptive Statistik Körpergewicht: Mittelwerte (M) ± Standardabweichung (SD) in Gramm.....	65
Tabelle 17 Deskriptive Statistik NSS: Mittelwert (M) ± Standardabweichung (SD) in Punkten	66
Tabelle 18 Deskriptive Statistik Rotarod: Mittelwert ± Standardabweichung in Sekunden	67
Tabelle 19 Deskriptive Statistik Distanz (Noldus): Mittelwert(M) ± Standardabweichung (SD) in Zentimeter	68
Tabelle 20 Deskriptive Statistik mittlere Geschwindigkeit (Noldus): Mittelwert(M) ± Standard- abweichung (SD) in Zentimeter pro Sekunde	69
Tabelle 21 Deskriptive Statistik Explorationszeit: Mittelwerte (M) ± Standardabweichung (SD) in Sekunden	70
Tabelle 22 Deskriptive Statistik Recognition Index (A): Mittelwert(M) ± Standardabweichung (SD).....	71
Tabelle 23 Deskriptive Statistik der periläsionalen Astrozytenzahl: Mittelwert (M) ± Standardabweichung (SD)	74
Tabelle 24 Deskriptive Statistik der Mikrogliazahl im Läsionsgebiet: Mittelwert (M) ± Standardabweichung (SD)	75
Tabelle 25: Deskriptive Statistik Expression GFAP : Mittelwert (M) ± Standardabweichung (SD) in Kopienanzahl GFAP pro Kopienanzahl PPIA	76
Tabelle 26: Deskriptive Statistik Expression TSPO: Mittelwert (M) ± Standardabweichung (SD) in Kopienanzahl TSPO pro Kopienanzahl PPIA	77
Tabelle 27: Deskriptive Statistik Expression Serpina3n: Mittelwert (M) ± Standardabweichung (SD) in Kopienanzahl Serpina3n pro Kopienanzahl PPIA.....	78
Tabelle 28: Deskriptive Statistik Expression IL1β : Mittelwert (M) ± Standardabweichung (SD) in Kopienanzahl IL1β pro Kopienanzahl PPIA.....	79
Tabelle 29: Deskriptive Statistik Expression Iba1: Mittelwert (M) ± Standardabweichung (SD) in Kopienanzahl Iba1 pro Kopienanzahl PPIA.....	80
Tabelle 31 Deskriptive Statistik Expression TNFα : Mittelwert (M) ± Standardabweichung (SD) in Kopienanzahl TNFα pro Kopienanzahl PPIA.....	81
Tabelle 32 Deskriptive Statistik Expression MHC2: Mittelwert (M) ± Standardabweichung (SD) in Kopienanzahl MHC2 pro Kopienanzahl PPIA	82
Tabelle 33 Deskriptive Statistik Expression GLUT1: Mittelwert (M) ± Standardabweichung (SD) in Kopienanzahl GLUT1 pro Kopienanzahl PPIA.....	83
Tabelle 34 Deskriptive Statistik Expression GLT1: Mittelwert (M) ± Standardabweichung (SD) in Kopienanzahl GLT1 pro Kopienanzahl PPIA.....	84
Tabelle 35 Deskriptive Statistik Expression IFNγ : Mittelwert (M) ± Standardabweichung (SD) in Kopienanzahl IFNγ pro Kopienanzahl PPI.....	85

Tabelle 36 Deskriptive Statistik Expression VGLUT1 und VGLUT2: Mittelwert (M) Standardabweichung (SD) in Kopienanzahl VGLUT1/VGLUT2 pro Kopienanzahl PPIA	86
Tabelle 37 Deskriptive Statistik Expression PTGS2-Gen: Mittelwert (M) \pm Standardabweichung (SD) in Kopienanzahl PTGS2-Gen pro Kopienanzahl PPIA	87
Tabelle 38 Deskriptive Statistik Expression TJP-1: Mittelwert (M) \pm Standardabweichung (SD) in Kopienanzahl TJP-1 pro Kopienanzahl PPIA.....	88
Tabelle 39 Deskriptive Statistik Expression Occludin: Mittelwert (M) \pm Standardabweichung (SD) in Kopienanzahl Occludin pro Kopienanzahl PPIA	89
Tabelle 40 Deskriptive Statistik Proteinexpression Spectrin: Mittelwert (M) \pm Standardabweichung (SD) von Spectrin (145kDa) normiert auf G3PDH.....	90
Tabelle 41 Deskriptive Statistik Proteinexpression GFAP: Mittelwert (M) \pm Standardabweichung (SD) von GFAP normiert auf G3PDH.....	91
Tabelle 42 Deskriptive Statistik Immunglobulin G Menge: Mittelwert (M) \pm Standardabweichung (SD) von IgG.....	92

1 Einleitung

Ein Schädel-Hirn-Trauma (SHT) ist definiert als eine Störung der Hirnfunktion oder andere Hinweise auf eine Gehirnpathologie, verursacht durch eine externe Gewalteinwirkung (1). Die Schwere variiert von leicht bis hin zu mittelschweren und schweren Traumata. Die Mortalität schwerer Hirnverletzungen beträgt bis zu 40%. Weltweit erleiden ungefähr 50 Millionen Menschen jährlich ein Schädel-Hirn-Trauma. Es ist die häufigste Todesursache junger Menschen und in allen Altersgruppen eine der Hauptgründe für physische und psychische Behinderung (2). Auch aus gesundheitsökonomischer Sicht spielt das SHT eine wichtige Rolle. Die wirtschaftlichen Folgen traumatischer Hirnverletzungen sind enorm. Im Jahr 2010 betragen in Europa die Kosten im Zusammenhang mit einem SHT etwa 33 Milliarden Euro. Neben Investitionen in die Erforschung neuer Therapien, sollten demnach auch präventive Maßnahmen Gegenstand zukünftiger Forschung sein (3, 4). Klinisch manifestiert sich das SHT aufgrund der großen Komplexität des Gehirnes und unterschiedlichen Ausmaßes der Krafteinwirkung sehr variabel. Pathophysiologisch ist es wichtig zwischen einer primärer und sekundärer Hirnschädigungen zu unterscheiden. Letztere kann sich über Stunden und Tage bis hin zu Jahre hinweg entwickeln und nachhaltige Beeinträchtigungen verursachen. Der klinische Fortschritt ein SHT suffizient zu behandeln konnte trotz der steigenden globalen Relevanz nicht Schritt halten (5, 6). Die Einführung der Computertomographie (CT) vor 40 Jahren markierte einst den größten Durchbruch im klinischen Management der letzten Jahre. Seither wurden sowohl in Diagnostik als auch in der Therapie traumatischer Hirnverletzungen keine größeren Verbesserungen mehr erzielt. Das bisherige Management basiert derzeit auf einer Kombination von intensivmedizinischen bzw. chirurgischen Strategien mit anschließender Rehabilitation. Hauptziel aktueller Interventionen ist die Aufrechterhaltung des zerebralen Blutflusses (CBF), durch Senkung des intrakraniellen Druckes (ICP) und Erhöhung des zerebralen Perfusionsdruckes (CPP) (4, 7). Aktuelle Forschung in Bezug auf traumatische Verletzungen des zentralen Nervensystems (ZNS) hat das Verständnis der pathophysiologisch ablaufenden Prozesse immens erweitert. Während die Primärverletzungen nach SHT als irreversibel zu betrachten sind, bieten die Erkenntnisse über sekundär ablaufende Prozesse neue therapeutische Angriffspunkte. Dazu zählen u.a. die Minimierung der traumatisch verursachten Exzitotoxizität durch Glutamat, die Reduktion des posttraumatischen Zelltod durch Apoptose, die Verbesserung axonaler Regeneration und eine Reduktion inflammatorischer Prozesse (8).

Das Darmmikrobiom könnte ein neuer Ansatzpunkt sein, die Pathophysiologie sekundärer Hirnschädigung besser zu verstehen und so den Ablauf neurodegenerativer Prozesse entgegenwirken zu können. Über die in zahlreichen Studien beschriebene Mikrobiom-Darm-Hirnachse ist das Mikrobiom an einer Vielzahl zellulärer und molekularer Prozesse im Gehirn

beteiligt. Diese sind für das Fortschreiten SHT-induzierter Verletzungen potenziell von großer Bedeutung (9). Um die Forschung neuer therapeutischer Interventionen zu intensivieren und so in Zukunft das Outcome traumatischer Verletzungen des ZNS zu verbessern, sollte zunächst die genaue Beziehung zwischen dem Mikrobiom und dem im Gehirn ablaufenden inflammatorischen Prozessen untersucht werden. Zahlreiche Studien konnten den Einfluss eines veränderten Mikrobioms auf unterschiedliche neurologische bzw. neurodegenerativer Erkrankungen, wie beispielsweise Morbus Alzheimer und Parkinson, nachweisen und bilden so die Grundlage neuroprotektiver Forschung nach SHT durch ein verändertes Mikrobiom (10). Die Intention der vorliegenden Arbeit ist es, die verschiedenen Wechselbeziehungen zwischen veränderten Mikrobiom und Gehirn zu analysieren. Im Mittelpunkt steht hierbei die durch Antibiotika induzierte Dysbiose. Interessant ist zum einen, wie das SHT das Mikrobiom der Versuchstiere beeinflusst und andererseits, wie sich eine durch Antibiotika induzierte Dysbiose auf die Versuchstiere mit und ohne experimentellem Hirntrauma auswirkt. So können Aussagen über diese Wechselbeziehungen getroffen werden. Kern der Arbeit ist daher die bidirektionale Verbindung zwischen dem Mikrobiom und Gehirn weiter zu erforschen und so die Grundlage neuer therapeutischer Ansätze zu schaffen. Methodisch kamen neben verhaltensbiologischer Testung der Tiere und der mikrobiologischen Analyse des Mikrobioms auch zahlreiche histologische und molekularbiologische Untersuchungen zum Einsatz. Das Darmmikrobiom gezielt zu verändern und so neuroinflammatorische Prozesse nach SHT zu beeinflussen, könnte die postakute Behandlung wegweisend verändern (8).

2 Literaturdiskussion

2.1 Anatomie des zentralen Nervensystems

Das Nervensystem kann auf verschiedene Weise gegliedert werden. So unterscheidet man in erster Linie das ZNS vom peripheren Nervensystem (PNS) (11). Im Folgenden wird besonders auf anatomische Grundlagen des ZNS eingegangen.

Das aus Rückenmark und Gehirn bestehende ZNS erfüllt komplexe Funktionen wie die Speicherung von Erfahrungen, komplexe Denkabläufe, gezielte Bewegungen und vieles mehr. Bei der Kommunikation zwischen der Peripherie, wie beispielsweise den Organen des Gastrointestinaltraktes (GIT), und dem ZNS ist das PNS entscheidend beteiligt. So durchzieht beispielsweise das enterische Nervensystem als Teil des PNS den gesamten GIT und spielt eine wichtige Rolle für die Darmmotilität, den Blutfluss und der Kommunikation mit dem ZNS (12).

2.1.1 Makroskopische Anatomie

Betrachtet man das Gehirn nach morphologischen, entwicklungsgeschichtlichen und funktionellen Gesichtspunkten, so lässt es sich in sechs Abschnitte unterteilen: das verlängerte Rückenmark (medulla oblongata), die Brücke (Pons), das Mittelhirn (Mesencephalon), das Zwischenhirn (Diencephalon), das Kleinhirn (Cerebellum) und dem Groß- bzw. Endhirn (Telencephalon) (12). Das Großhirn gliedert sich in zwei Hemisphären, welche durch die von rostral nach occipital laufende Fissura longitudinalis cerebri getrennt werden.

Umgeben wird das ZNS von bindegewebigen Hüllen, den Meningen. Hierbei unterscheidet man die weiche Hirnhaut (Leptomeninx) von der harten Hirnhaut (Pachymeninx). Die Pachymeninx bildet die äußere Haut und besteht hauptsächlich aus der straffen Dura mater. Die Leptomeninx ist dem Gehirn anliegend und unterteilt sich in die direkt aufliegende Pia Mater und der spinnwebartigen Arachnoidea mater (13). Die Meningen sind im Gegensatz zum Gehirn gut innerviert und demzufolge auch schmerzempfindlich.

Vor äußere Gewalteinwirkungen ist das Gehirn durch verschiedene anatomische Gegebenheiten und Mechanismen geschützt. Der knöcherne Schädel (Cranium) umgibt das Gehirn. Dieser wird in einen Hirnschädel (Neurocranium) und einen Gesichtsschädel (Viscerocranium) unterteilt. Zudem ist das Gehirn vor kleinen Erschütterungen durch den inneren und äußeren Liquorraum geschützt, der verhindert, dass die Hirnsubstanz bei Bewegung direkt an die Innenseite des Schädels stößt. Gebildet wird der Liquor cerebrospinalis (Hirnwasser) im Plexus choroideus der inneren Liquorräume. Diese bestehen aus den vier Ventrikeln. Funktional können die inneren Liquorräume als Reserveräume bei raumfordernden Prozessen, wie bspw. einer Blutung, dienen. Der äußere Liquorraum hingegen befindet sich zwischen der Pia mater und der Arachnoidea mater im

Subarachnoidalraum und verhindert so einen direkten Aufprall gegen den Schädel bei kleinen Erschütterungen (12).

Das Großhirn ist nicht nur der am weitesten entwickelte Teil des ZNS, sondern auch flächenmäßig der größte und macht etwa 80 % der Hirnmasse aus(14). Dazu kommt der direkte Kontakt zum umgebenden Schädel, was zur Folge hat, dass es bei einem Schädel-Hirn-Trauma (SHT) sehr anfällig für primäre Verletzungen und daraus folgende Schäden ist. Anteile des Großhirns, die im Rahmen eines experimentellen SHT besonders beeinträchtigt werden, sind die Großhirnrinde (Cortex cerebri) und der in der Tiefe gelegene Hippocampus.

Der Cortex ist die äußerste Schicht des Großhirns. Durch Furchen (Sulci) und Windungen (Gyri) wird eine maximale Oberflächenvergrößerung bei minimalen Raumverbrauch erzielt (11). Funktionell und anatomisch wird die Großhirnrinde in vier Lappen unterteilt: der Frontallappen (Lobus frontalis), der Parietallappen (Lobus parietalis), der Temporallappen (Lobus temporalis) und der Okzipitallappen (Lobus occipitalis). In den verschiedenen Teilen des Cortex befinden sich wichtige Hirnfunktionen, wie bspw. die Somatomotorik im Gyrus praecentralis des Frontallappens, die Somatosensorik im Gyrus postcentralis des Parietallappens und die Sehrinde im Okzipitallappen.

Der Hippocampus dagegen wird makroskopisch aus dem Gyrus dentatus und dem Ammonshorn gebildet. Dieser befindet sich zum Großteil im Lobus temporalis. Neben der Gedächtnisbildung ist der Hippocampus Teil des limbischen Systems, sodass er auch Einfluss auf vegetative und endokrine Vorgänge nimmt (11). Die Neuronen im Hippocampus weisen eine geringe Toleranz gegenüber hypoxischen Zuständen auf und sind somit unter traumatischen Bedingungen besonders anfällig.

2.1.2 Mikroskopische Anatomie

Das Nervengewebe ist die mikroskopische Grundlage des ZNS und PNS (15). Es lässt sich vereinfacht in Nervenzellen (Neurone) und Gliazellen (Neuroglia) unterteilen.

Nervenzellen dienen zur Erregungsausbreitung und Informationsverarbeitung. Folgende strukturellen Eigenschaften sind typisch für Neurone: sie bestehen aus dem Zellkörper (Soma, Perikaryon) und Zellfortsätzen. Hierbei unterscheidet man zwischen Fortsätzen zur Reizaufnahme, den Dendriten, und zur Erregungsleitung, dem Axon. Im Bereich der dendritischen Boutons bilden Axone mit anderen Nervenzellen spezialisierte Kontakte, die man als Synapsen bezeichnet. Das trophische Zentrum eines Neurons bildet das Perikaryon. Es versorgt alle Ausläufer mit wichtigen Substanzen und enthält den Zellkern. Zudem beinhaltet das Soma folgende Zellorganellen: zahlreiche Nissl-Schollen, welche aus rauem Endoplasmatischem Retikulum (ER) bestehen, freie Ribosome, Golgi-Felder, Lysosome und Mitochondrien (16).

Die Anzahl der Gliazellen im Gehirn ist um den Faktor zehn höher im Vergleich zu den Neuronen. Man unterscheidet grundsätzlich die Gliazellen im ZNS (zentrale Glia) von den Zellen im PNS (periphere Glia) (15). Im Folgenden wird genauer auf die zentrale Glia eingegangen. Wichtige Zelltypen der zentralen Glia sind die Astrozyten, die Oligodendrozyten, die Ependymzellen und die Mikrogliazellen.

Die häufigsten Gliazellen im ZNS sind die Astrozyten. Diese Zellen füllen die Bereiche zwischen den Neuronen aus. Das saure Gliafaserprotein (GFAP) ist ein spezifisches Protein dieser Zellen und dient daher dem immunhistochemischen Nachweis von Astrozyten und deren Aktivität. Neben der Ausbildung von Barriereeigenschaften, wie die Blut-Hirn-Schranke, übernehmen Astrozyten mechanische und metabolische Aufgaben. Die Myelinscheide des ZNS wird von den Oligodendrozyten gebildet. Ependymzellen hingegen kleiden die inneren Liquorräume aus. Eine besondere Stellung im Zusammenhang mit Verletzungs- und Entzündungsprozessen nehmen die Mikrogliazellen ein. Man bezeichnet sie als residente Makrophagen des ZNS. Sie befinden sich gleichmäßig im gesamten Nervensystem und bilden ein lückenloses Überwachungsnetz (16). Im Rahmen von Verletzungen des Gehirns wandeln sich ruhende Gliazellen schnell in aktivierte und proliferierende Mikroglia um. Durch Sezernierung von Zytokinen oder anderer Substanzen und der Phagozytose sind sie entscheidend an den entzündlichen Prozessen im Gehirn beteiligt (15).

2.2 Physiologische Grundlagen neuronaler Verschaltung

Die Informationsübertragung von einem Neuron auf ein anderes erfolgt an spezialisierten Kontaktstellen. Diese bezeichnet man als Synapsen. Den gesamten Vorgang der Erregungsweiterleitung an einer Synapse nennt man synaptische Übertragung. Der Informationsfluss findet hierbei nur in eine Richtung statt. Die Präsynapse ist Teil des primären Neurons und die Postsynapse der Zielzelle. Der Großteil der Synapsen im Gehirn sind chemische Synapsen. Die Übertragung bei Gliazellen findet teilweise durch elektrische Synapsen mittels GAP-Junctions statt (17).

Die Komponenten und der vereinfachte Ablauf der Signalübertragung einer chemischen Synapse sind in Abbildung 1 dargestellt. Bei einer chemischen Synapse befindet sich der Transmitter in präsynaptischen Vesikeln. Das eintreffende Aktionspotential sorgt für einen Calcium-Einstrom in die Präsynapse und dadurch fusioniert das Vesikel mit der präsynaptischen Membran. Darauf kommt es zur Freisetzung von Transmitter, wie bspw. Glutamat, welche in den synaptischen Spalt diffundieren und Rezeptoren an der postsynaptischen Membran aktivieren (18). Diese Rezeptoren können ionotrop (Ligandengesteuert) oder metabotrop (G-Protein gekoppelt) sein und bewirken eine Signaltransduktion.

Der Transmitter oder dessen Spaltprodukte werden im Anschluss durch spezifische Transporter zurück in die Präsynapse oder in umliegende Gliazellen aufgenommen (19). Die freigesetzten Neurotransmitter lassen sich in die drei chemischen Klassen unterteilen: Aminosäuren, Amine und Peptide. Die wichtigsten Neurotransmitter im Gehirn sind die drei Aminosäuren Glutamat(Glu), Gamma-Aminobuttersäure(GABA) und Glycin(Gly). Glutamat ist der primär exzitatorische Neurotransmitter im ZNS. Dort induziert es eine schnelle Signalübertragung und ist wesentlich an Lern-, Gedächtnisprozessen und synaptischer Plastizität ausschlaggebend beteiligt (20).

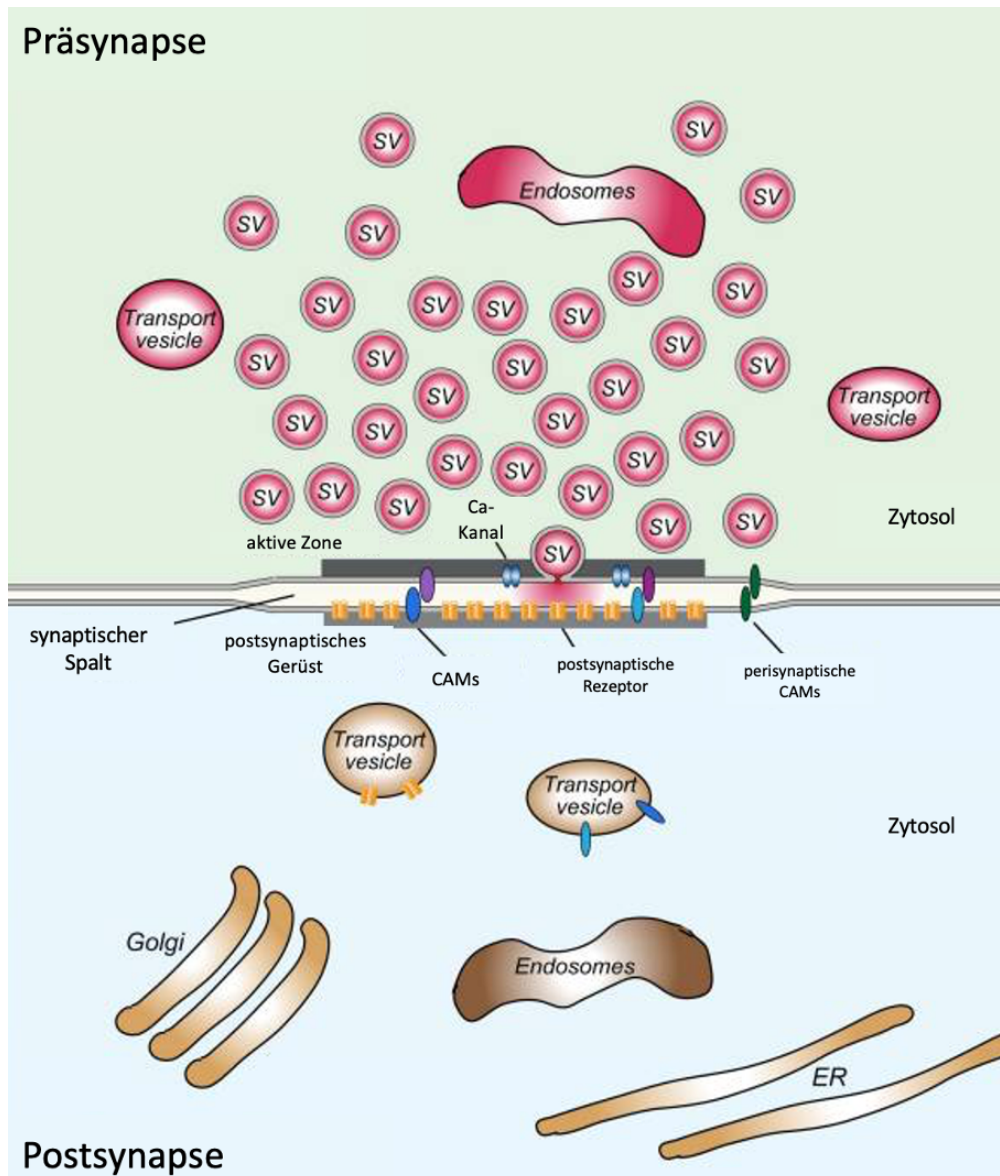


Abbildung 1 Funktionsweise einer Synapse (modifiziert nach Südhof (18))

Eine synaptische Verbindung wird hier mit zahlreichen synaptischen Vesikeln (SV) auf der präsynaptischen Seite schematisch dargestellt. Postsynaptisch finden sich zahlreiche Rezeptoren, an denen präsynaptisch freigesetzte Transmitter binden. Des Weiteren werden präsynaptisch die Endosomen und postsynaptischen die Zellorganellen Golgi-Apparat und endoplasmatisches Retikulum (ER) visualisiert. Der synaptische Spalt eines Neurons ist für gewöhnlich breiter als der umgebende interstitielle Raum.

2.3 Schädel-Hirn-Trauma

2.3.1 Definition, Klinik und Einteilung

Das Schädel-Hirn-Trauma ist eine durch externe Krafteinwirkung verursachte Verletzung des Schädels mit möglicher Hirn-, Knochen- oder Weichteilbeteiligung. Hierbei unterscheidet man zwischen einem geschlossenen, bei dem die Dura mater intakt ist, von einem offenem SHT. Bei einem offenen SHT kommt es durch Verletzungen von Kopfhaut, dem knöchernen Schädel und Eröffnung der Dura Mater zu einer Freilegung des Gehirns mit Liquoraustritt (21). Das offene Trauma hat ein erhöhtes Infektionsrisiko für das Gehirn zur Folge. Häufigste Ursachen für ein SHT sind das Einwirken von stumpfer oder spitzer Gewalt auf den Schädel (22).

An klinischen Zeichen imponiert bei einem SHT neben den äußerlich sichtbaren Verletzungen des Schädels besonders die Bewusstseinsinetrübung. Je nach Schweregrad des Traumas und in Abhängigkeit des intrakraniellen Druckanstiegs können folgende Symptome auftreten: Übelkeit, Erbrechen, Bradykardie, Kopfschmerzen, Sehstörung und eine Stauungspapille. Insbesondere Pupillenerweiterung, Parästhesien und Streckkrämpfe können Anzeichen einer Einklemmung des Gehirns mit zunehmender Steigerung des Hirndrucks sein. Die sogenannte „Cushing Trias“ bestehend aus Hypertonie, Bradykardie und pathologischem Atemmuster ist hierbei pathognomonisch (23, 24). Die Kardinalsymptomatik bei einer Hirnbeteiligung sind Bewusstseinsstörungen und amnestische Lücken. Die Bewusstseinsstörungen können nach einem SHT von quantitativer und qualitativer Natur sein. Bei leichter Benommenheit, über Somnolenz, Sopor bis hin zum Koma reichenden Störungen des Bewusstseins spricht man von quantitativen Störungen. Psychomotorische Unruhe, Verwirrheitszustände und eine anhaltende bzw. transiente Amnesien gehören zu den qualitativen Beeinträchtigungen (25).

Frühere Einteilungen des SHT wie *Commotio cerebri*, *Contusio cerebri* oder *Compressio cerebri* sind mittlerweile aufgrund der Ungenauigkeit und der geringen klinischen Relevanz obsolet. Wie beschrieben ist die Störung des Bewusstseins eines der Hauptsymptome beim SHT, sodass man die Schweregrade des SHT nach der Glasgow-Coma-Scale(GCS) einteilt. Teasdale und Jennett stellten im Jahr 1974 die GCS zur einheitlichen Evaluation bei SHT-Patienten vor. Die drei Hauptkategorien, Augenöffnen, beste verbale Reaktion und beste motorische Reaktion, werden mit unterschiedlichen Punkten bewertet (s. Tabelle1). In der präklinischen Notfallmedizin hat sich das Einsatzgebiet der GCS über die Trauma Versorgung von SHT Patienten hinaus etabliert (21, 26).

Punkte	Augenöffnen	Beste verbale Reaktion	Beste motorische Reaktion
1	fehlt	fehlt	fehlt
2	auf Schmerzreiz	Laute	Streckmechanismen
3	auf Ansprache	einzelne Worte	atypische Beugereaktionen
4	spontan	verwirrt	Beugemechanismen
5		orientiert	gezielte Schmerzreaktion
6			folgt Aufforderungen
maximale Punktzahl		15	
minimale Punktzahl		3	

Tabelle 1 Kriterien der GCS (nach Memorix Neurologie (26))

Anhand der Punktzahl teilt man das SHT in leichtes (GCS 13-15), mittelschweres (GCS 9-12) und in das intubationspflichtige schwere SHT (<9) ein (27). Die Bestimmung des GCS-Werts und die Einteilung sollte wegen der prognostischen und therapeutischen Relevanz obligat erhoben, reevaluiert und dokumentiert werden. Scheinverbesserungen und Befunderhebung nach Intubationen sind Limitationen der GCS und müssen berücksichtigt werden (28).

2.3.2 Epidemiologische Daten und Relevanz

Die klinische Relevanz des SHT zeigt sich in den epidemiologischen Daten. So erleiden in Deutschland deutlich mehr Menschen ein SHT als bspw. einen Apoplex (29). In der Bevölkerung wird dies jedoch kaum als ernsthafte Erkrankung wahrgenommen, trotz der Tatsache, dass schwere Störungen des Bewusstseins und der Motorik auch langfristig die Patienten beeinträchtigen können.

Eine Metastudie aus dem Jahr 2005 von Steudel et alii (et al.) zeigte in Deutschland eine Inzidenz des SHT von 337 pro 100 000 Einwohner pro Jahr. Der Großteil der Traumata wird hierbei als leicht klassifiziert. Schwere SHT mit einem GCS von kleiner 8 haben eine Inzidenz von 33,5/100 000, was einer Patientenzahl von circa 30 000 entspricht (23, 30). Laut dem statistischen Bundesamt der Bundesrepublik Deutschland starben im Jahr 2015 insgesamt 7953 Menschen an Verletzungen des Kopfes (ICD10 S00-S09). 63,5% sind hierbei auf das männliche und 36,5% auf das weibliche Geschlecht zurück zu führen, sodass vermehrt Männer ein SHT erleiden (31). Nur bei ungefähr 40% der Patienten wurde ein isoliertes SHT dokumentiert. Häufig treten Begleitverletzungen zusätzlicher Körperregionen auf bis hin zum Polytrauma. Der Thorax ist hierbei am meisten betroffen. Bei mittelschweren bis schweren SHT wurde nach dem Trauma-Register der deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie (TR-DGU) eine altersabhängige Zunahme der Inzidenz mit zunehmenden Alter erfasst (32). Nicht nur in Deutschland, sondern auch in den vereinigten Staaten Amerikas ist das SHT die häufigste Ursache für Tod und chronischer Behinderung in der Altersgruppe bis zum 45.

Lebensjahr. Auch aus sozioökonomischer Sicht ist das SHT nicht zu vernachlässigen. 76,5 Milliarden US \$ war die ökonomische Belastung der USA durch direkte medizinische und indirekte sekundär anfallende Kosten wie zum Beispiel Verdienstauffälle und die wirtschaftlichen Folgeschäden bei der Versorgung von SHT-Patienten (33). Aus Abbildung 2 lässt sich die Verteilung der häufigsten Verletzungsursachen vom mittelschwerem bis schwerem SHT ablesen. Stürze aus geringerer und größerer Höhe waren für etwa die Hälfte der dokumentierten Fälle im TR-DGU verantwortlich.

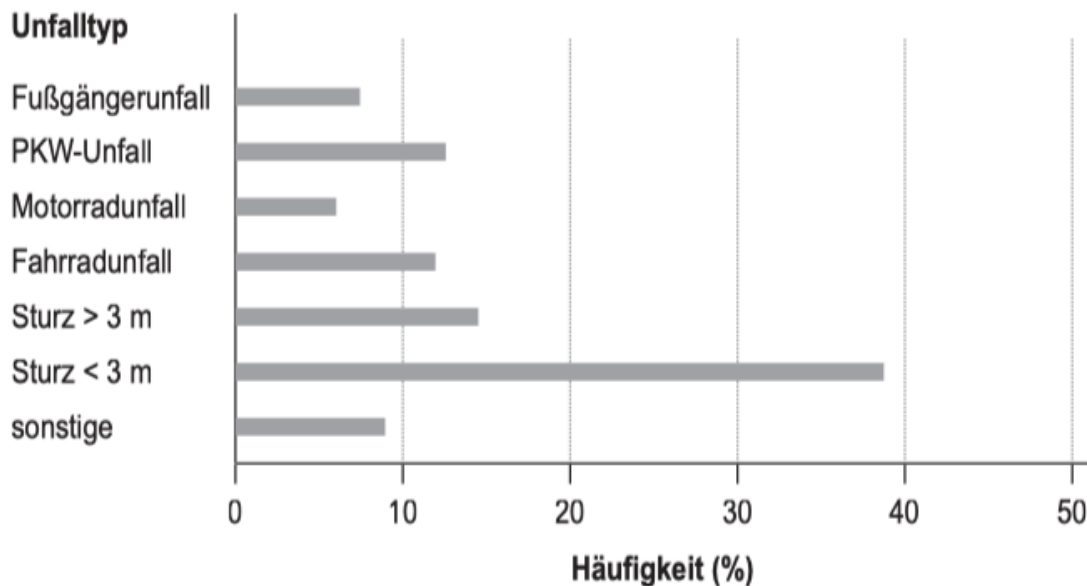


Abbildung 2 Verteilung der Verletzungsursachen (modifiziert nach DESTATIS (31))

Die Entwicklung der Fallzahlen in Abhängigkeit vom Alter und der Verletzungsursachen weist eine unterschiedliche Entwicklung auf. Während es im Zeitraum von 2007 bis 2013 zu einer Abnahme der absoluten Zahl von Zweiradunfällen jüngerer Menschen in den USA gekommen ist, nehmen die altersbedingten Stürze stetig zu (34). In den unterschiedlichen Altersgruppen bestehen posttraumatisch in den ersten Wochen deutliche Unterschiede in der Mortalität. Diese beträgt in der Altersgruppe über 65 nahezu 50%, wohingegen bei den unter 65-jährigen die Mortalität bei ca. 30% liegt (35). Ursächlich hierfür sind auftretende Komorbiditäten im Alter. Aufgrund des demographischen Wandels und der dadurch älter werdenden Gesellschaft, wird das SHT daher weiter an Relevanz zunehmen.

2.3.3 Schädel-Hirn-Trauma im Tiermodell

Durch die beschriebene epidemiologische Relevanz des SHT, ist es obligat die Forschung in diesem Gebiet weiter zu intensivieren. Die Forschung bedient sich hierbei an Experimenten mit Tiermodellen. Wie auch in der folgenden Arbeit ist die Maus eine häufig genutzte Spezies. Jedoch werden auch Ratten und Schweine eingesetzt um verschiedene Aspekte des SHT beim Menschen zu replizieren und verschiedene Interventionen zu testen (36). Grundsätzliche

Vorteile des Mausmodells sind der geringere Kostenaufwand, vereinfachte Tierhaltung und mögliche genetische Veränderung der Desoxyribonucleinsäure (DNS) mittels transgener Techniken (37). Um zerebrale Kontusionen und somit ein SHT zu simulieren, sind in der Literatur drei Modelle besonders verbreitet.

Weight-drop-Model (WD-Modell)

Das WD-Modell ist ein klinisch relevantes Modell, bei dem ein festgelegtes Gewicht aus einer vorgegebenen Höhe auf den Schädel einer Maus fällt. Als Variation kann das Gewicht entweder auf den eröffneten oder intakten Schädel auftreffen. Um Schädelfrakturen zu verhindern, wird eine Metallscheibe auf den Schädel gelegt, sodass sich die Energie des Aufpralls auf eine größere Fläche verteilt (38). Durch Veränderung von Gewicht und Höhe kann die Intensität des Traumas einfach verändert werden, jedoch geht dieses Modell mit einer erhöhten Mortalität einher (37, 39, 40).

Fluid-Percussion-Injury-Modell (FPI-Modell)

Nach einer mikrochirurgischen Öffnung des Schädels im Bereich des os parietale wird durch einen Flüssigkeitsstrahl auf das Gehirn eine Verletzung induziert. So entstehen diffuse Schäden an Gefäßen und den Axonen der Nervenzellen, die meist nicht lokal begrenzt sind. Das ursprünglich bei Ratten angewandte Modell wurde für Mäuse modifiziert um ähnliche Verletzungsmuster zu erreichen. Die genaue Konfiguration während der Durchführung gestaltet sich jedoch häufig schwierig, weshalb die Reproduzierbarkeit nicht immer gegeben ist (37, 41-43).

Controlled-Cortical-Impact (CCI)

Das CCI-Modell wird auch in der vorliegenden Arbeit angewendet. Der genaue Ablauf des CCI-Modells wird im Abschnitt Methoden erläutert. Beim CCI-Modell wird pneumatisch oder elektromagnetisch ein definierter Einschlag mit einem Bolzen direkt auf das Gehirn erzeugt(36). Vorher findet eine unilaterale Kraniotomie statt, die nach Durchführung des erzeugten Traumas wieder verschlossen wird. In Folge des CCI entstehen Blutungen, Kontusionen und Störungen der Blut-Hirn-Schranke. Der Vorteil bei dieser Methode ist die genaue Steuerung des Einschlags durch Änderungen folgender Parameter: Geschwindigkeit des Bolzens, Auftreffzeit und Tiefe des Einschlags (37, 44-48).

2.3.4 Pathophysiologie

Bei einem SHT muss man zwischen der akuten bzw. primären Hirnschädigung und der im Verlauf auftretenden sekundären Schädigung unterscheiden. Meist im Bereich der Gewalteinwirkung auf den Schädel (Coup) kommt es primär zu einer irreversiblen fokalen Schädigung des Hirngewebes. Durch die Eigenbewegung des Gehirns und den dadurch entstehenden Aufprall an der gegenüberliegenden Schädelseite (Contre-coup) sind auch dort

primäre Läsionen nachweisbar. Beschleunigungsunterschiede, Zugkräfte und Scherkräfte verursachen zudem Gefäßrupturen und diffuse axonale Schädigungen (DAI) (24). Das gesamte primäre Verletzungsmuster ist meist inhomogen und abhängig von der Intensität des Aufpralls. Die zeitverzögerte sekundäre Hirnschädigung besteht aus verschiedenen pathophysiologischen Prozessen, die kaskadenförmig ablaufen. Dazu zählen bspw. Entzündungsprozesse, nach einer Latenz auftretende sekundäre Blutungen, Hirnödem, Exzitotoxizität und oxidativer Stress neuronaler Zellen (6, 49, 50). Die Ursachen sekundärer Hirnschädigung können extrakraniellen und intrakraniellen Ursprungs sein. Unter extrakraniellen Ursachen versteht man eine globale Mangelversorgung wie Anämie, Hypoxie und Hypotension. Diese treten gehäuft bei polytraumatisch bedingten instabilen Patienten auf. Intrakraniell hingegen beschreibt die pathophysiologischen und biochemischen Abläufe im Gehirnparenchym. Primäre Hirnschädigungen sind therapeutisch nicht zu beeinflussen. Lediglich durch das Tragen von Schutzkleidung (51), Airbags oder Gurtpflicht im Sinne der primären Prävention lässt sich Einfluss darauf nehmen. Aktuell gilt das gesamte therapeutische Bemühen dem Versuch die Kettenreaktion der sekundären Hirnschädigung zu stoppen und den Schaden des Gehirns so zu minimieren (6, 23, 52).

2.3.4.1 Primäre Schäden

Direkt nach dem Trauma werden zwei neuropathophysiologische Abläufe unterteilt. Es werden die fokalen Schäden von den diffusen Verletzungen differenziert. An der Stelle der direkten Krafteinwirkung und deren Gegenseite im Gehirn kommt es zu einer fokalen Schädigung der Hirnmasse. Kortikale und subkortikale Kontusionen sind die Folge. Neben der primären Zerstörung von neuronalen Zellen können auch Blutungen durch verletzte Hirngefäße auftreten. Diese pathologischen Prozesse sind häufig mit schweren Traumata assoziiert(53). Diffuse Verletzungen hingegen treten nicht lokal, sondern disseminiert im gesamten Gehirn auf. Die Hauptform dieses Verletzungsmusters wird als DAI bezeichnet. Direkt aufeinanderfolgende Beschleunigung und Abbremsung der Hirnmasse in Folge des Traumas sind Ursache dieses Pathomechanismus (54). Daraus ergeben sich Abrisse fragiler Axone, welche früh histopathologisch nachweisbar sind. Auch schon bei milden SHTs treten DAIs gehäuft auf(55, 56). Die Patienten sind klinisch trotz geringen bildmorphologischen Korrelats auffällig. Dies kann einen Hinweis auf DAI geben. Diagnostiziert werden diese Verletzungsmuster u.a. mittels eines Computertomographen (CT), jedoch ist der Magnetresonanztomograph (MRT) deutlich sensitiver (57).

Direkt nach dem Trauma treten neben der Destruktion von Neuronen im Rahmen der fokalen und diffusen Verletzungen auch Schäden an zerebralen Gefäßen auf. Mechanische Scherkräfte wirken auf Endothelzellen kleiner Blutgefäße. Dies hat eine Störung der Blut-Hirn-Schranke (BHS) zur Folge und eine Verminderung des zerebralen Blutflusses (CBF). Fällt der CBF dabei unter $15\text{ml}/(100\text{g}\cdot\text{min}^{-1})$ kommt es zu irreversiblen Schäden im Gehirn, die

bleibende neurologische Defizite mit sich bringen können(58). Die daraus resultierende Ischämie führt zu neuronalen Funktionsstörungen und zum Untergang von Neuronen, Astrozyten und Mikrogliazellen (59). Ein weiterer primärer Pathomechanismus resultiert durch die mechanische Dehnung und Erschütterung der Axone. Infolgedessen kommt es an der axonalen Plasmamembran zu nicht physiologischen Ionenströmen und einer direkten Zerstörung des Zytoskeletts der Neuronen. Hierbei werden die Mikrotubuli, die intrazellulär Transportfunktionen einnehmen, zerstört, sodass es zu neuronalen Transportstörungen kommen kann. Der vermehrte Einstrom von Calcium aktiviert proteolytische Enzyme, die neurofilamentäre Proteine spalten. Der axonale Transport entlang des Zytoskeletts ist massiv eingeschränkt und insuffizient. Das Ungleichgewicht der Ionen wird durch eine erhöhte Aktivität von Ionenpumpen versucht zu kompensieren, was einen stark erhöhten Energieaufwand mit sich bringt. Um diesem gerecht zu werden, stellen die ischämischen Zellen den Stoffwechsel auf anaerobe Glykolyse mit erhöhter Laktatproduktion um, was ebenfalls zu Zelluntergang durch Azidose führt. Alle beschriebenen Pathomechanismen haben die neuronale Funktionsstörung und Gewebeuntergang mit einer Vielfalt neurologischer Symptome als gemeinsame Endstrecke (6, 53).

Eine Studie von Adams et al bestätigt die Pathologien histologisch bei autopsierten Patienten, die ein stumpfes Trauma erlitten haben. Man konnte bei 58% der Traumaopfer DAIs nachweisen und bei etwa 2/3 ein ischämisch verändertes Gehirn mit den daraus resultierenden Folgen (60).

2.3.4.2 Sekundäre Schäden

Nach Ablauf der primären Hirnschädigung folgen kaskadenartig die sekundären Prozesse, die in der Neuroinflammation enden. Bei wiederkehrenden Traumata kann der Pathomechanismus chronifizieren. Dies bezeichnet man als chronische traumatische Enzephalopathie (CTE) (61).

Die primäre Schädigung tritt unmittelbar nach dem Aufprall auf und verursacht direkte Schäden im Gehirn (1). Wohingegen die sekundären Abläufe sich über Stunden bis hin zu Monaten in Folge des mechanischen Insultes entwickeln können. Studien haben gezeigt, dass die Dysfunktion der BHS und der primär neuronale Zelltod während eines SHTs eine übermäßige Freisetzung von Neurotransmittern, wie Glutamat, induzieren. Der Anstieg des Neurotransmitters Glutamat führt zu Exzitotoxizität (62). Die Glutamat induzierte Exzitotoxizität entsteht durch eine erhöhte extrazelluläre Konzentration von Glutamat und basiert auf neuronale Dysfunktion mit daraus entstehender neuronalen Zelltod. Dies spielt nicht nur bei akuten, sondern insbesondere auch bei chronischen Prozessen eine entscheidende Rolle. Die empfindlichste Region für Glutamat-Exzitotoxizität ist der Hippocampus. Die exzitatorische Aminosäure Glutamat aktiviert sowohl ionotrope Glutamatrezeptoren als auch metabotrope

Glutamatrezeptoren. Der wichtigste Vertreter der ionotropen Rezeptoren ist der N-Methyl-d-Aspartat-(NMDA)Rezeptor. Nach Bindung von Glutamat an den Rezeptor öffnen sich Ionenkanäle und es kommt zum Einstrom von Natrium, Kalium und Calcium. Dies führt zu einer Membrandepolarisation in Neuronen. Der NMDA-Rezeptor ist insofern besonders, als dass er auch spannungsabhängig gesteuert werden kann und für Calcium-Ionen durchlässig ist. Die hohe Glutamatkonzentration führt zu einer überschießenden Glutamatrezeptoraktivierung mit Depolarisation. Darauf kommt es zusätzlich zu spannungsabhängigem Calcium-Einstrom in die Nervenzelle. Die Ionenhomöostase zwischen dem intra- und extrazellulären Raum wird somit gestört. Die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren durch Glutamat fördert zudem die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und Stickoxid, was den sekundären Zelluntergang beschleunigt. Das übermäßige intrazelluläre Calcium im Zytosol aktiviert eine Reihe von Enzymen und Proteinen, die einen apoptotischen Zelltod initiieren. Die zunehmende Akkumulation von Calcium und reaktiver Sauerstoffspezies haben eine starke Progression des neuronalen Zelluntergangs zur Folge(63-65). Begünstigt werden die ablaufenden Prozesse durch die Entstehung von freien Radikalen, die neuronale Proteine und Membranstrukturen der Nervenzellen angreifen (66). Zusammenfassend führt eine übermäßige Stimulation der Glutamatrezeptoren aufgrund der massiven Freisetzung des exzitatorischen Neurotransmitters über einen längeren Zeitraum zu posttraumatischem oxidativem Stress und exzitatorischem Zelltod, was mit einer erhöhten Mortalität und einer deutlichen Verschlechterung des neurologischen Outcomes korreliert. Um interventionell in diese sekundäre Kaskade eingreifen zu können bedarf es beispielsweise einer pharmakologischen Antagonisierung der Glutamatrezeptoren oder die vermehrte Expression inhibitorischer Glutamatrezeptoren (19, 67-69). Die einsetzende neuroinflammatorische Antwort enthält hierbei sowohl lokal auf das Gehirn beschränkte als auch systemische Komponenten (70). Das Immunsystem spielt beim Verständnis der Pathogenese und Therapie des SHTs eine zunehmende Rolle. Die pro- und antiinflammatorischen Einflüsse dessen auf die ablaufenden Prozesse können sich auch vorteilhaft auf den Heilungsprozess auswirken. Daher scheint eine komplette Unterbrechung der Entzündungskaskade nicht sinnvoll (71).

Angeborene und adaptive Immunsystem

Das Immunsystem ist für die Abwehr unterschiedlicher Pathogene verantwortlich. Man unterscheidet zwischen der angeborenen, nicht spezifischen, und adaptiven Immunantwort, die Erreger gezielt eliminiert. Die Grundlagen der Immunantwort werden im Folgenden kurz erläutert.

Neben anatomischer (z.B. die Haut) und physiologischer (z.B. die Körpertemperatur) Barrieren ist auch die zelluläre Antwort bei der angeborenen Immunantwort entscheidend. Phagozyten,

zu denen auch die Mikroglia gehören, und Granulozyten können pathogene Muster erkennen. Die Effektorzellen nutzen hierbei die Toll-Like-Rezeptoren (TLR), welche Pathogene erkennen und über verschiedene Mechanismen das Immunsystem so aktivieren können (72, 73). Dies geschieht unter anderem durch die Freisetzung von Zytokinen, die Wachstum und Proliferation von Zellen regulieren, und so die Immunreaktion amplifizieren und steuern. Weitere Immunzellen werden aktiviert, indem interzelluläre Signalübertragungen zytokingesteuert Nachbarzellen stimulieren und so die Immunantwort auch über das Gebiet der Läsion hinaus stattfindet. Hinzu kommt die Aktivierung des Komplementsystems, bei dem aktivierte Plasmaproteine einen sogenannten Membran-Angriff-Komplex bilden und pathogene Strukturen eliminieren (72, 74).

Die adaptive Immunantwort basiert auf der Aktivierung der B- und T-Zellen, denen spezifische Antigene über den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) präsentiert werden. Zu den antigenpräsentierenden Zellen gehören bspw. Makrophagen und dendritische Zellen. Nach Aktivierung wirken T-Zellen entweder zytotoxisch oder regulatorisch. Sie spielen auch eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung von B-Zellen, welche die Produzenten der Immunglobuline bzw. der Antikörper darstellen. Das adaptive Immunsystem besitzt zudem die Fähigkeit durch Gedächtniszellen Erreger bei erneuter Infektion früher zu identifizieren und rasch zu eliminieren (75).

Aktivierung der Signalkaskade

Schon früh nach einem SHT kommt es zur Expression inflammatorischer Stimuli, die lokale und periphere Immunzellen in einen Aktivitätszustand bringen. Durch die traumabedingte, mechanische Zerstörung zellulärer Membranen von Nervenzellen kommt es zur Freisetzung verschiedener Mediatoren, die zu einer Initiierung von Signalkaskaden im Rahmen einer sekundären Hirnschädigung führen. Begünstigt wird dieser Prozess durch die Schädigung der BHS (76, 77). Die freigesetzten Stoffe werden als schädigungsassoziierte molekulare Muster (DAMPs) bezeichnet, welche die Fähigkeit besitzen neuronale Inflammation zu triggern und zu amplifizieren. DAMPs interagieren mit Rezeptoren der Immunzellen und können diese so aktivieren. Die Rezeptoren werden als toll-like-Rezeptoren (TLR) bezeichnet. TLR fungieren somit als eine Art „Sensor“ für die Immunzellen und können so pathologisch ablaufende Prozesse erkennen (73, 78). Neben den DAMPs gibt es weitere Mediatoren, die zu einer Aktivierung der Signalkaskade beitragen. Durch zellulären Stress im Rahmen der Gewebeschädigung und später im Laufe der Heilungsprozesse entstehende Hitzeschockproteine (HSP) führen ebenfalls zu einer immunologischen Antwort, die sowohl pro- als auch antiinflammatorische Aspekte enthalten kann (79). In Folge einer zentralnervösen Schädigung und der damit verbundenen mechanischen Zerstörung von Zellen, gelangt das Energieäquivalent Adenosintriphosphat (ATP) aus dem Intrazellularraum

nach extrazellulär. Dies stellt ebenfalls ein Alarmsignal für das Immunsystem dar. So werden bspw. purinerge Rezeptoren von Gliazellen stimuliert und infolgedessen die Mikroglia aktiviert. Die Antwort der Mikroglia auf freies ATP wird in Abbildung 3 deutlich (80).

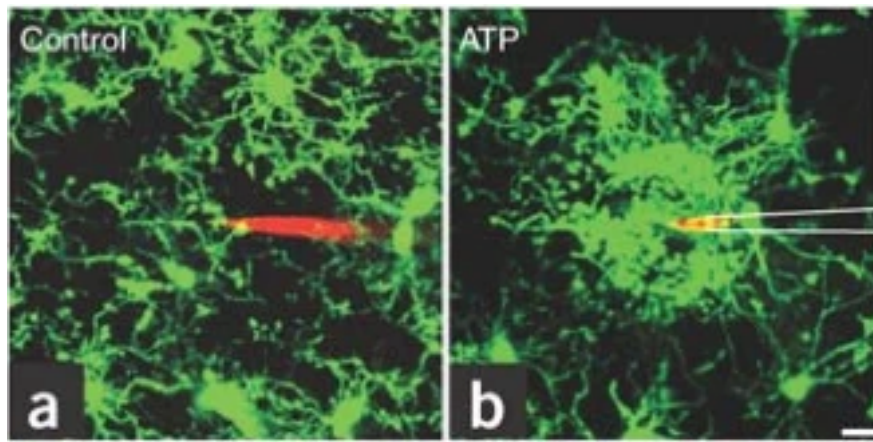


Abbildung 3 ATP-induzierte Antwort der Mikroglia (modifiziert nach Davalos et al. (80))

In Bild a) sieht man die mit Rhodamine-Dextran versehene Kontrollgruppe ohne morphologische Reaktion der Mikrogliazellen. Wohingegen in Bild b) die Aktivierung der Zellen nach Exposition mit ATP durch die morphologischen Veränderungen deutlich sichtbar und messbar ist.

Neben der Mikroglia aktiviert das purinerge System auch neutrophile Granulozyten und Astrozyten. ATP wirkt somit auch im Gebiet des Gewebeschadens chemotaktisch und aktivierend auf Immunzellen (81). Nach der Aktivierung und Infiltration der Immunzellen sezernieren diese weitere Entzündungsmediatoren, die als frühe Effektoren der posttraumatischen Inflammation fungieren. Wichtige Vertreter sind Tumornekrosefaktor α ($\text{TNF}\alpha$), Interleukin (IL) 1 und IL 6. Diese spielen nicht nur bei traumatisch bedingten Entzündungen im Gehirn eine große Rolle, sondern bei jeglicher Art von Inflammation im Körper (82).

Zelluläre Antwort

Die zelluläre Antwort und die Infiltration der Immunzellen im Gehirn nach einem Trauma ist sehr dynamisch. In Versuchen mit Mäusen und Ratten sind in Abhängigkeit der Zeit nach erfolgtem Trauma unterschiedlich Konzentrationen an Immunzellen nachweisbar (70). Nach erfolgtem Trauma zirkulieren zu Beginn vor allem neutrophile Granulozyten zum geschädigten Hirnareal und gelangen mittels Diapedese aus der Blutbahn zum verletzten Gewebe. Das Maximum der Zellzahl wird nach 24 bis 46 Stunden erreicht. Begünstigt wird dies durch Defekte der BHS, sodass Immunzellen direkt in das Läsionsgebiet gelangen. Die Zellzahl ist jedoch schnell rückläufig. Als Aktivitätsmarker für neutrophile Granulozyten wurde in einer Veröffentlichung von Robert et al. (1994) die Aktivität der Myeloperoxidase gemessen. Nach

dem Erreichen des Maximums war die Enzymaktivität nach 168 Stunden nur noch kaum messbar (83). Die Infiltration der Monozyten in das Schadensgebiet zeigte posttraumatisch nach drei Tagen einen deutlichen Anstieg. In geringerer Zahl, jedoch im ähnlichen Zeitraum, sind dendritische Zellen, T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen nachweisbar (84, 85). Zur gleichen Zeit kommt es zu einer reaktiven Gliose durch Astrozyten. Eine Astrogliose bezeichnet die erhöhte Anzahl von Gliazellen in diesem Bereich des Gehirns, der eine Schädigung bzw. pathologische Umbauprozesse aufweist. Aktivierte Astrozyten durchlaufen eine morphologische und funktionelle Anpassung. Im Zuge dieser Reaktion kommt es zu einer Hochregulierung des GFAP, welches als molekularer Marker für die Aktivität von Astrozyten dient, und zu einer Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen (86).

Mikroglia

Als Teileinheit des zellulären Immunsystems gehören die Mikroglia zur Familie der Gliazellen und befinden sich ausschließlich im ZNS. Nach einer Schädigung in Folge des Traumas gehört die Mikroglia zu den Zellen, die anfangs aktiv sind. Hierbei screenen die Zellen ständig ihre Umgebung und können durch verschiedene Faktoren aktiviert werden. Zudem betreiben Gliazellen Umbauprozesse an Synapsen, fördern das Überleben von Neuronen und phagozytieren beschädigte Zellen (61, 87, 88). Betrachtet man das Ganze unter dem zeitlichen Aspekt kann die Aktivierung der Mikroglia Minuten nach erfolgtem Trauma stattfinden (89, 90). Jedoch auch Jahre später können nachhaltige Auswirkungen nachgewiesen werden. 17 Jahre nach dem Trauma waren in einer *in vivo* Untersuchung chronisch aktivierte Mikroglia per Positronen-Emissions-Tomografie (PET)-Scan nachweisbar (91). Somit spielen sie nicht nur in der Frühphase eine entscheidende Rolle. Nach Aktivierung kommt es zu morphologischen Veränderungen der Mikroglia. Im Ruhezustand weisen sie einen kleinen Zellkörper auf und dynamisch wirkende Arme scannen ständig ihre extrazelluläre Umgebung. Nach Aktivierung der Zellen nimmt die Motilität zu und der Zellkörper gewinnt deutlich an Größe. Aktivierte Mikroglia wirken auf benachbarte Zellen chemotaktisch und führen zu einer Amplifikation der Immunantwort. Neben ATP hat auch Uridindiphosphat (UDP) eine entscheidende Rolle. UDP tritt ebenfalls aus den zerstörten Nervenzellen aus und bindet an P2Y6-Rezeptoren der Mikroglia. Dies bewirkt eine Initiierung der Phagozytose (89, 92). Weitere aus geschädigten Neuronen freigesetzte Faktoren, die Mikroglia über zelleigene Rezeptoren aktivieren, sind u.a. Glutamat, Wachstumsfaktoren und zahlreiche Zytokine. Nach erfolgtem SHT akkumulieren die Zellen auch an der beschädigten *glia limitans*. Die *glia limitans* ist eine aus Astrozyten bestehende Schicht an der Hirnoberfläche und stellt eine äußere Grenzfläche dar. Diese Gewebeschicht wird durch die mikrogliale Phagozytose der abgestorbenen Zellen gereinigt. Die Integrität des ZNS wird somit aufrechterhalten, indem tote Zellen aus dem Parenchym phagozytiert werden (93).

Im Rahmen der posttraumatischen Neuroinflammation können die Mikroglia sich sowohl vorteilhaft als auch schädlich auf den Heilungsprozess auswirken (70, 94). Abhängig von den Stimuli ihrer Mikroumgebung können sie so aktiviert werden, dass sie unterschiedliche molekulare Phänotypen und Effektorfunktionen aufweisen (95). Die Mikroglia können somit entlang ihres Aktivierungsspektrums polarisiert werden. Die Polarisierung umfasst das klassische M1- bis hin zum M2 Spektrum (95). Der M1 Phänotyp setzt nach seiner Aktivierung hohe Mengen an proinflammatorischen Zytokinen und oxidativen Metaboliten frei. Diese sind essenziell für die phagozytische Aktivität und die Erregerabwehr, verursachen jedoch auch an gesunden Zellen und nativen Gewebe irreversible Schäden (96, 97). M2-Mikroglia hingegen haben einen positiven Einfluss auf den Heilungsprozess. Es wird angenommen, dass diese die Angiogenese, Wundheilung und Gewebereparatur fördern und zudem die destruktive Immunantwort unterdrücken. Durch die Freisetzung von DAMPs, freier Radikale und der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, wie bspw. Interferon (INF)-gamma, werden M1 Mikroglia aktiviert. Diese produzieren dann pro-inflammatorische Zytokine, Chemokine und radikale Sauerstoff-Spezies. Wichtiger Vertreter hierbei sind IL1 und TNF. Trotz der Tatsache, dass der M1 Phänotyp häufig als schädlich angesehen wird, kann eine M1-Reaktion nach SHT dennoch neuroprotektiv sein, sobald diese kontrolliert reguliert wird. Eine überschießende oder verlängerte Reaktion kann jedoch zu sekundären Hirnschädigungen führen. Man spricht dann von einem hyperinflammatorischen Zustand (96, 98, 99). IL4 und IL12 hingegen stimulieren den M2-Phänotyp. Dieser produziert anti-inflammatorische Zytokine und steigert die Phagozytose. Die unterschiedliche funktionelle Antwort der Mikroglia Phänotypen ist in Abbildung 4 zusammengefasst und übersichtlich dargestellt (100).

Nach einer traumatischen Verletzung des Gehirns durch ein SHT ist es wahrscheinlich, dass sich M1- und M2 Mikroglia in einem Zustand des dynamischen Gleichgewichts innerhalb der Mikroumgebung der Läsion befinden. Ob sich die Zellen in einen M1-Phänotyp differenzieren, der die Gewebsverletzung verschlimmert, oder in einen M2-Phänotyp, der die ZNS-Reparatur fördert, hängt wahrscheinlich von den lokalen Signalen der Mikroumgebung ab. Mehrere Studien versuchten im Tiermodell therapeutisch Einfluss auf die Mikroglia zu nehmen. U.a. wurde Minozyklin als Breitband-Antibiotikum verwendet. Die anti-inflammatorische Potenz dieser Medikamentengruppe sollte die Mikrogliaaktivität unterdrücken und so die Entzündung eindämmen. Es konnten dabei Unterschiede im neurologischen Outcome nachgewiesen werden, die sich auf die Zeit, unmittelbar nach dem Trauma beziehen. Nachhaltige Verbesserung im Outcome über mehrere Tage waren nicht nachweisbar (101-103). Jedoch bietet die Antibiotikatherapie in diesem Zusammenhang interessante Ansatzpunkte.

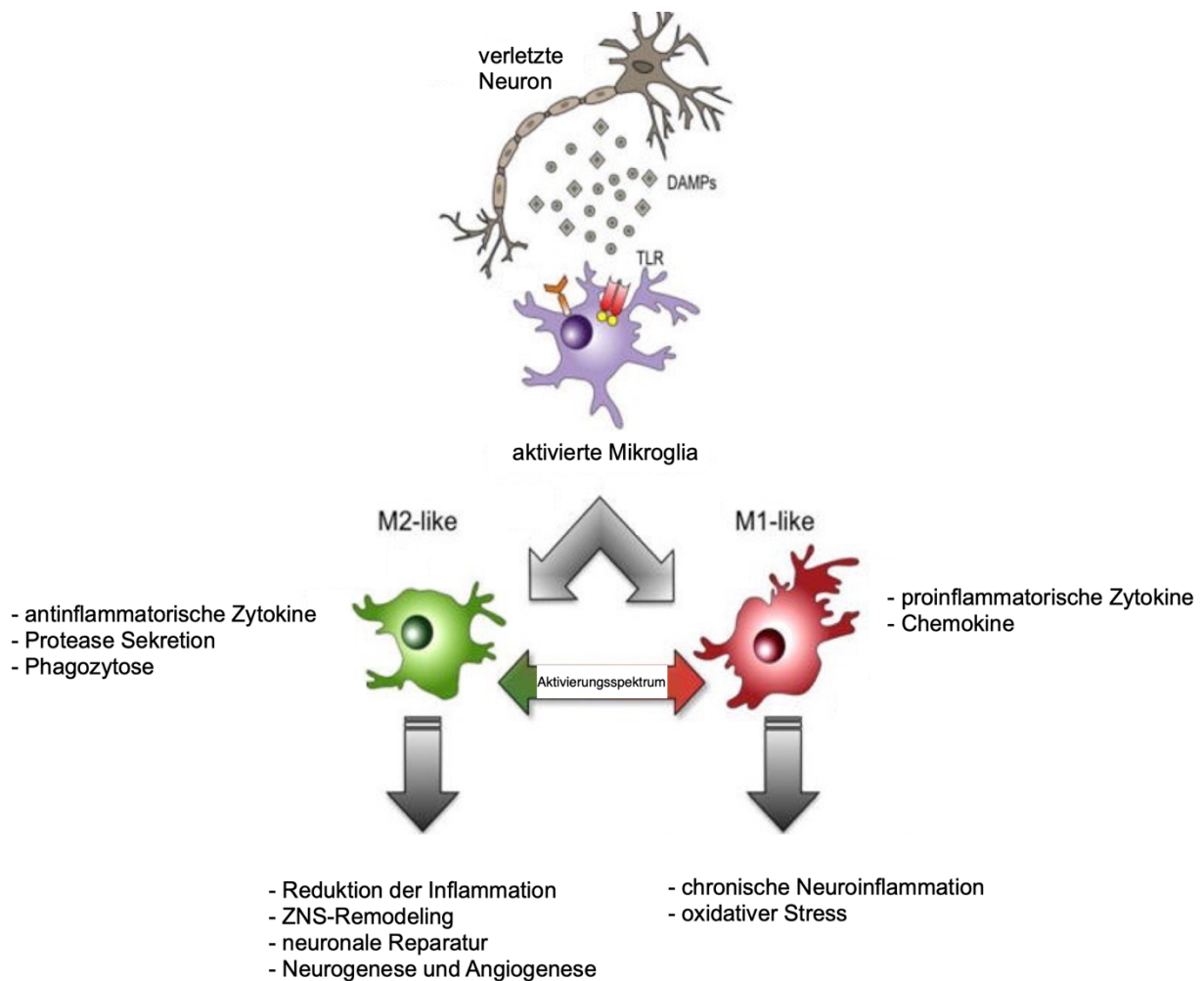


Abbildung 4 Funktionelle Antwort der M1 - und M2 Mikroglia nach SHT(modifiziert nach Loane et Kumar(100))

Astrozyten

Astrozyten übernehmen im Gehirn eine Vielzahl komplexer Funktionen. Dies bezieht sich sowohl auf physiologische Prozesse als auch den Zustand nach einer Hirnverletzung. Sie sind spezialisierte Gliazellen und übertreffen die Anzahl der Neuronen um das Fünffache. Auf jegliche Art einer ZNS-Schädigung folgt im Anschluss eine reaktive Gliose als gemeinsame Endstrecke. Als Gliose wird eine Ansammlung von Astrozyten im Gehirn bezeichnet und diese fungiert als unspezifische Reaktion der Gliazellen auf neuropathologische Prozesse jeglicher Art. Die daraus entstehende „Narbe“ führt zu einer Eindämmung der Entzündungsreaktion im verletzten Bereich. Somit wird die Ausbreitung auf das gesunde Gewebe verhindert. Des Weiteren kontrollieren Astrozyten als Teil der BHS den zerebralen Blutfluss (61, 104, 105). Ihre Fortsätze treten in Wechselwirkung mit der *glia limitans*. Diese Barriere trennt das ZNS von perivaskulären Räumen, Meningen und den Blutgefäßen. Dadurch wird ein Kontrollpunkt

für den Übertritt von Immunzellen bei neuroinflammatorischen Prozessen geschaffen. Astrozyten bilden so eine funktionelle Barriere (106).

Im Folgenden wird die Rolle von SHT-induzierten mechanischen Kräften bei der Initiierung der Astrozytenaktivität und der Astrozyten-Mikroglia-Wechselwirkung genauer erläutert. Die Gliazellen nehmen hierbei eine Schlüsselrolle bei den Entzündungsprozessen Trauma-bedingter Gewebeschäden ein. Grundlage für die Entwicklung therapeutischer Strategien ist das Verständnis mechanisch einwirkender Kräfte im Rahmen eines Traumas, die zu zellulären Dysfunktionen führen.

Astrozyten exprimieren zahlreiche mechanotransduzierende Ionenkanäle. Während des Traumas wirken vermehrt Scherkräfte auf Neuronen und Gliazellen. Diese Kräfte bewirken bei den Astrozyten die Öffnung mechanosensitiver Ionenkanäle und den darauffolgenden transmembranösen Ionenfluss (107, 108). Auch eine Streckung der Plasmamembran führt intrazellulär zu einer Konzentrationsänderung und zur Freisetzung verschiedener Stoffe (109). Der mechanische Stress durch einwirkende Scherkräfte in Folge des Traumas führt zu einem Ionenfluss mit intrazellulärem Anstieg von Calcium, Natrium und Kalium. Die erhöhte Calciumkonzentration intrazellulär bewirkt die Freisetzung verschiedener Mediatoren. Dazu gehören u.a. ATP, Endothelin-1 und GFAP. Die Freisetzung von ATP erfolgt über Connexin-Hemikanäle, was elektrophysiologisch in Studien belegt wurde (110). Die Expression von Endothelin-Rezeptoren steigt im geschädigten Gewebe. Endothelin ist ein potenter Vasokonstriktor und wirkt mitogen auf Gliazellen, Neurone und Endothelzellen der Blutgefäße (111). Ebenfalls kann es nach mechanischer Belastung zur Freisetzung von Matrix-Metalloprotease (MMP)9 kommen, welche die Spaltung von Proteinen katalysiert (112). GFAP und andere Zwischenfilamente, wie bspw. Vimentin und Nestin, sind nach Hirntrauma deutlich hochreguliert. SHT-induziert werden GFAP und andere Biomarker freigesetzt und dienen somit als thekale Marker für die Astrozytenaktivität (113-115). Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass eine primäre Verletzung durch SHT zu einer sofortigen Freisetzung molekularer Stressoren führt. Häufig damit verbunden ist eine Extravasation flüchtiger Moleküle aus den Gefäßen ins Gehirn aufgrund einer gestörten BHS. Die veränderte Genexpression, Morphologie sowie das Sekretions- und Proliferationsverhalten der Astrozyten in Folge der primär wirkenden Kräfte stellen einen wichtigen Aspekt der sekundären Hirnschädigung dar (86, 105).

Abbildung 5 stellt die oben beschriebene Reaktivität und Antwort der Astrozyten durch mechanischen Stress graphisch dar.

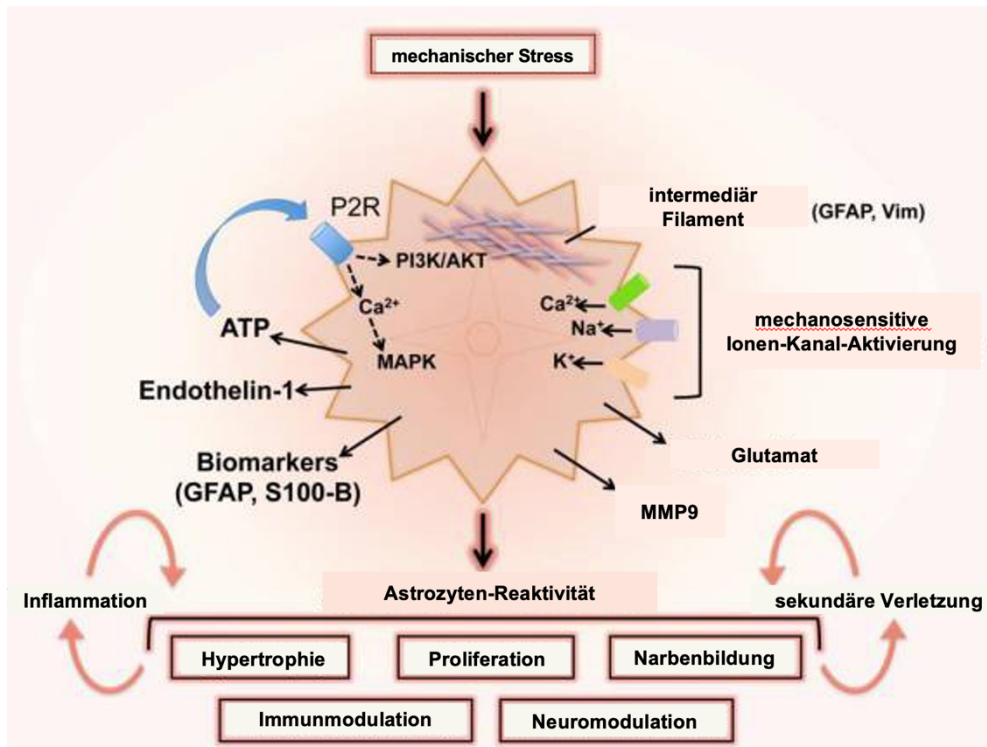


Abbildung 5 Astrozyten Reaktion auf mechanische Belastung bei SHT (modifiziert nach Burda (86))

Die Belastung durch physikalisch wirkende Scherkräfte auf das ZNS verformen flexible Netzwerke der Zwischenfilamente von Astrozyten. Der Anstieg von intrazellulärem Calcium führt über mehrere Signalwege zur Freisetzung von Endothelin-1, MMP 9 und Glutamat. Diese Signalmoleküle beeinflussen die neuroinflammatorische Reaktion auf Verletzungen, sowie Mechanismen der sekundären Pathogenese. Die Freisetzung von GFAP und Calcium-bindendes S100B dient als Biomarker für den Schweregrad des SHT.

Das über Connexin-Hemikanäle freigesetzte ATP induziert ebenfalls über P2 Purin-Rezeptoren der Astrozyten einen intrazellulären Calciumanstieg. Durch diese Autoreaktion potenzieren Astrozyten ihre Aktivierung mit Hilfe der Selbststimulation. Zudem führt extrazelluläres ATP zur Rekrutierung dynamisch beweglicher Mikroglia und neutrophiler Granulozyten. ATP fungiert somit als Transmitter für die Interaktion von Mikroglia und Astrozyten (80, 89). Verschiedene *in vitro* Studien haben gezeigt, dass die calciumabhängige Freisetzung von ATP aus Astrozyten und die Aktivierung der Mikroglia in einem zeitlichen Zusammenhang stehen (116). Dies wurde nicht nur bei SHT Modellen nachgewiesen, sondern auch bei Verletzungen des Rückenmarks (117). Diese Beobachtungen stützen somit die Vermutung, dass nach SHT-induzierter primärer Hirnschädigungen es zur Freisetzung großer ATP Mengen aus Astrozyten und anderen Zelltypen kommt. Dies führt zur Aktivierung der Astrozyten und chemotaktischer Wirkung auf die Mikroglia. Die beschriebenen Prozesse markieren somit den Beginn der sekundären Hirnschädigung. Die am Anfang ablaufenden sekundären inflammatorischen Prozesse haben durch die Aktivierung von Immunzellen zunächst neuroprotektive Wirkung. Kommt es jedoch zu einer Amplifikation der Immunantwort

und einem unkontrollierten Ausweiten der Reaktion können auch längerfristige und sich chronifizierende Abläufe bis hin zu einer reaktiven Gliose entstehen (89, 118).

Das Verständnis über die Mechanismen, welche die Reaktivität der Astrozyten und Mikroglia bei SHT triggern und die damit verbundenen vorteilhaften und nachteiligen Auswirkungen auf die sekundären pathologischen Prozesse, haben großes Potenzial neue Angriffspunkte für Therapien zur Verbesserung des Outcomes posttraumatischer Hirnverletzungen zu erforschen.

2.3.5 Bisherige Therapiemöglichkeiten

Die bisherige Therapie beim SHT besteht fast ausschließlich aus einer Akuttherapie. Ganz allgemein soll der cerebrale Perfusionsdruck aufrechterhalten und ausreichende Oxygenierung sichergestellt werden. Bei einem GCS <9 muss frühzeitig intubiert werden. Sowohl Hypotension als auch eine Hypovolämie sollten forciert korrigiert werden. Bei stark blutenden Skalpierungsverletzungen sollte eine zeitnahe Blutstillung mit antiseptischer Wundreinigung erfolgen. Raumfordernde intrakranielle Hämatoome müssen schnellstmöglich dekomprimiert werden, um eine Einklemmung zu verhindern (23).

Man unterscheidet in der weiteren Behandlung die nicht-invasiven von den invasiven Maßnahmen. Zu den erwähnten Basismaßnahmen gehört die Oberkörperhochlagerung um 30°. Ziel ist es den venösen Abfluss zu fördern und infolgedessen den intrakraniellen Druck (ICP) zu senken (119). Die Gabe von hypertoner Kochsalzlösung wird in der Leitlinie der Brain Trauma Foundation 2016 nicht genauer kommentiert, führt jedoch zu einer Verringerung des ICP und einer Verbesserung bzw. dem Entgegenwirken der Einklemmung (120). Mannitol senkt nachweislich als osmotisch wirkende Substanz den ICP und wird daher als Therapieoption beim SHT mit erhöhtem Hirndruck eingesetzt. Wegen der diuretischen Wirkung sollte Mannitol nicht bei Patienten mit Schocksymptomatik oder großen Blutverlusten eingesetzt werden. Die Therapie ist daher im Rahmen eines Polytraumas stark limitiert (121). Wichtigster Bestandteil der invasiven nicht-operativen Interventionen stellt die ICP-Messung via ICP-Sonde dar. Der Zieldruck sollte hierbei unter 22 mmHg bleiben, um die Mortalität signifikant zu senken. Eine externen Ventrikel Drainage (EVD), die mittels eines Katheters in den Seitenventrikel eingeführt wird, stellt den Goldstandard der ICP-Messung dar. Über den Drainagemechanismus kann es durch Ablassen von Liquor zu einer Hirndrucksenkung kommen. Insbesondere bei einem schweren SHT ist eine kontinuierliche Messung indiziert, um den Hirndruck streng zu kontrollieren. Das Infektionsrisiko der EVD wird durch mit Antibiose beschichtete Katheter minimiert (120, 122, 123).

Tritt in Folge eines schweren SHTs ein massives Hirnödem mit drohender Ischämie auf ist die Hemikraniektomie eine mögliche Therapieoption. Als chirurgische Intervention stellt sie die letzte Möglichkeit der Hirndrucksenkung dar. Die Leitlinien empfehlen eine

frontotemporoparietale Hemikraniektomie mit einem Durchmesser von ca. 15cm. Durch diese dekompressive Maßnahme kann sich das ödematöse Gehirn entfalten. Physikalisch lassen sich diese Phänome durch die Monro-Kellie Doktrin beschreiben. Diese besagt, dass das Cranium ein festgelegter Hohlraum mit einem bestimmten Volumen ist. Es besteht in der Summe aus den drei Komponenten Hirngewebe (80%), Blut (12%) und Liquor (8%). Durch die Zunahme einer Komponente kommt es kompensatorisch zur Abnahme der anderen. Diese Volumenverschiebung in einem begrenzten Bereich kann zu einer exponentiellen Hirndrucksteigerung führen. Mit einer operativen Schädelöffnung kann dem effektiv entgegen gewirkt werden (124-128).

2.4 Antibiotika

2.4.1 Grundlagen

Antibiotika sind Substanzen, die meist schon in geringen Konzentrationen das Wachstum von Mikroorganismen, wie beispielsweise Bakterien, hemmen. Ursprünglich reiner biologischer Herkunft wurden Antibiotika im Laufe der Zeit chemisch und synthetisch modifiziert, um so eine Verbesserung der Wirkung zu erzielen. Rein synthetisch hergestellte Pharmaka mit einer antibakteriellen Wirkung werden als Chemotherapeutika bezeichnet. Mikroorganismen werden dadurch bekämpft oder ihre Ausbreitung verhindert. Die Geschichte der antibiotischen Therapie beginnt im 20. Jahrhundert. Im Jahr 1928 gelang es A. Fleming mit Hilfe der Pilzkolonie *Penicillium notatum* das Wachstum von Staphylokokken nachweislich zu hemmen. In den 1950er Jahren hatte die Entdeckung weiterer Antibiotika ihren Höhepunkt. Die Einführung der Antibiotika in die klinische Anwendung war zweifellos der größte medizinische Durchbruch des 20. Jahrhunderts. Neben der Behandlung von Infektionskrankheiten ermöglichen Antibiotika viele neue medizinische Verfahren. Dazu gehören vielseitige Einsatzgebiete wie Krebstherapie, Organtransplantationen und Operationen. Bei einer bakteriellen Infektion kommt es zum Eindringen von Bakterien in den menschlichen Organismus. Dies ist nicht obligat pathologisch. Die Kolonisation von Darm-, Haut- und Schleimhautoberflächen durch Bakterien ist physiologisch und stellt die reguläre Funktion der Organe sicher (129-133). Der zunehmende Missbrauch von Antibiotikum, vor allem in der Massentierhaltung, führte zuletzt zu einem raschen Anstieg der Resistenzentwicklung gegen zahlreiche Antibiotika. Verschiedene Studien zeigten, dass etwa 50% aller Antibiotika Verschreibungen unnötig sind. Dies hat zur Folge, dass einige Infektionskrankheiten nur noch sehr schwer zu therapieren sind. Besonders ausgeprägt ist die Resistenzentwicklung beim Krankheitsbild der Tuberkulose (134-136).

2.4.2 Aufbau von Bakterien

Bisher gibt es kein Antibiotikum, das gegen alle Bakterien wirkt. Ob ein Antibiotikum auf ein Bakterium wirkt, ist zum einen von dessen Wirkungsweise und zum anderen vom Aufbau des

Erregers abhängig. Bakterien sind Einzeller und zählen zu den kleinsten Mikroorganismen. Das Gramverhalten der Bakterien stellt den wichtigsten Faktor zur Beschreibung des Spektrums eines Antibiotikums dar. Während gramnegative Bakterien eine dünne Zellwand besitzen, die von einer inneren und äußeren Membran umgeben ist, weisen grampositive Erreger eine dicke Zellwand als äußerste Barriere auf. Im Inneren der Zelle befinden sich Zellorganellen, wie bspw. Ribosomen, Enzyme und das freiliegende Erbgut. Da Bakterien keinen Zellkern besitzen, werden sie als Prokaryonten bezeichnet. Nicht obligat bei allen Bakterien können Haft- und Schutzmechanismen wie Pili, Fimbrien, Geißeln und Kapseln vorhanden sein (137-139).

2.4.3 Pharmakodynamik

Bei der Wirkung antibakterieller Stoffe werden grundsätzlich bakteriostatische und bakterizide Wirkungen differenziert. In Folge einer bakteriostatischen Behandlung durch ein Pharmakon wird die weitere Vermehrung der Erreger gehemmt. Bakterizid hingegen führt zu einer Abtötung. Ob eine bakteriostatische oder bakterizide Wirkung vorliegt, hängt entscheidend vom Wirkmechanismus ab. Man unterscheidet verschiedene antibakterielle Wirkprinzipien (130, 133, 136):

- Hemmung der Zellwandsynthese
- Schädigung der Zellmembran
- Interferenz mit der Synthese von Tetrahydrofolsäure (THFS)
- Interferenz mit der bakteriellen DNA
- Hemmung der RNA-Synthese
- Hemmung der Proteinbiosynthese

Hemmung der Zellwandsynthese

Ein wichtiger Vertreter sind die β -Lactam-Antibiotika. Sie zählen zu den am häufigsten eingesetzten Antibiotika. Bei normaler antibakterieller Dosierung zeigen sie keine toxische ZNS-Wirkung (140). Zu dieser Antibiotikagruppe zählen zahlreiche Vertreter, die einen viergliedrigen β -Laktam-Ring als gemeinsame chemische Struktur aufweisen. Dieses Strukturmerkmal sorgt für die antibakterielle Wirkung. Infolgedessen haben alle β -Laktam-Antibiotika den gleichen Wirkmechanismus. Die bakterielle Zellwand besteht aus einem Peptidoglykangerüst (Murein). Die Quervernetzung dieses Mureingerüsts wird enzymatisch durch die bakterielle Transpeptidase katalysiert. Nach Öffnung des β -Laktam Rings bindet dieser kovalent mit dem aktiven Zentrum der Transpeptidase. Es kommt zu einer irreversiblen Enzymhemmung mit bakterizider Wirkung. Man unterscheidet fünf Wirkstoffgruppen der β -

Lactam-Antibiotika, die durch ihre chemische Struktur und in ihrem antibakteriellen Wirkspektrum weiter unterteilt werden können (129-131, 133):

- Penicilline
 - Penicillin G
 - Phenoxypenicilline
 - Aminopenicilline
 - Acylaminopenicilline
 - Isoxozazympenicilline
- Cephalosporine
 - Gruppe 1-5
- Carapeneme
- Monobactame
- Hemmstoffe der β -Laktamase

Der Ring spielt auch eine wichtige Rolle bei der Resistenzentwicklung. Er fungiert nämlich als Zielstruktur bakterieller Enzyme, den β -Laktamasen. Diese Enzyme können den Ring öffnen und so die antibiotische Wirkung herabsetzen. Um diesen „Escape“ Mechanismus der Bakterien entgegenzuwirken, werden β -Laktamase-Inhibitoren eingesetzt. Wichtige Vertreter sind Clavulansäure, Sulbactam und Tazobactam. Durch eine kovalente Bindung der Stoffe wird die enzymatische Aktivität der β -Laktamase herabgesetzt (141). Die Wirkung ist jedoch limitiert und wirkt nicht gegen alle β -Laktamasen. Sie werden meist zusammen mit einem β -Lactam-Antibiotikum kombiniert und erhöhen so die Potenz und erweitern das antibakterielle Spektrum des Antibiotikums.

Eine weitere Hemmstoffgruppe der bakteriellen Zellwand sind die Glykopeptide. Diese stören den regulären Aufbau der Zellwand grampositiver Bakterien. Aufgrund ihrer chemischen Grundstruktur können sie an den Oligopeptiden der bakteriellen Zellwand binden. Die daraus entstehenden Komplexe verhindern die Quervernetzung und Polymerisation und wirken so bakterizid. Der Unterschied zu den β -Lactam Antibiotika ist die Blockierung des Substrates, nicht des Enzyms (129, 131, 136, 142).

Im Rahmen der Dissertation wurden die beiden Antibiotika Amoxicillin(β -Lactam-Antibiotika) und Vancomycin (Glykopeptid) verabreicht. Amoxicilin wird zusammen mit dem β -Laktamase

Inhibitor Clavulansäure verabreicht. Im Folgenden werden die Eigenschaften dieser Medikamente ausführlicher besprochen.

Amoxicillin

Amoxicillin gehört neben Ampicillin zu den Aminopenicillinen. Durch chemische Veränderungen im Vergleich zu den Benzylpenicillinen wird das antibakterielle Spektrum in den gramnegativen Bereich erweitert. Amoxicillin ist besonders für die orale Applikation geeignet. Als unerwünschten Arzneimittelwirkungen können gastrointestinale Störungen, allergische Reaktionen und Hämostasestörungen auftreten. Auch Mechanismen der Hepatotoxizität sind mit einer β -Laktam-Antibiotika Einnahme assoziiert (143). Das Wirkspektrum umfasst neben grampositive Kokken und Stäbchen auch gramnegative Erreger wie Haemophilus Influenza, Escherichia coli und Helicobacter pylori. Die BHS ist für alle Penicilline eine unüberwindbare Barriere und daher nicht ZNS gängig. Dies gilt auch für Zellmembranen und ist somit bei obligat intrazellulären Erregern unwirksam (131, 136, 144, 145).

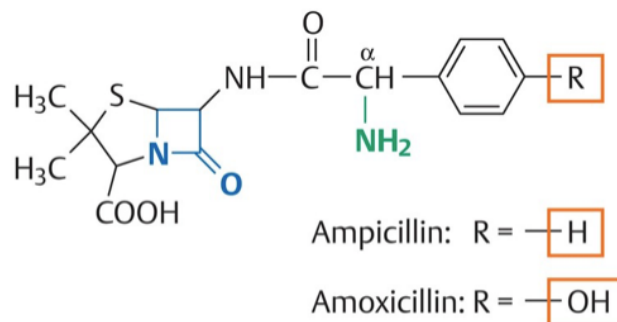


Abbildung 6 Strukturformel der Aminopenicilline (modifiziert nach Lüllmann, Pharmakologie und Toxikologie(136))

Vancomycin

Vancomycin gehört zur Gruppe der Glykopeptide. Das Wirkspektrum beschränkt sich auf den grampositiven Bereich. Es handelt sich hierbei, wie Abbildung 9 zeigt, um eine polyzyklische Verbindung. Es besteht keine systemische Verfügbarkeit nach oraler Gabe, sodass es mit den Fäzes wieder ausgeschieden wird und nur im Gastrointestinaltrakt wirkt. Bei der parenteralen Gabe können neben Übelkeit und allergischen Reaktionen auch eine reversible Neutropenie auftreten. In Folge einer raschen intravenösen Infusion steigt das Risiko einer unkontrollierten Freisetzung von Histamin. Diese verursacht das sogenannte Red-Man-Syndrom mit Blutdruckabfall und massiven Hautrötungen am Oberkörper. Im Rahmen einer längeren Anwendung ist der Wirkstoffspiegel im Blut mittels therapeutischen Drug Monitorings (TDM)

zu kontrollieren. Des Weiteren besteht ein Risiko für ototoxische und nephrotoxische Wirkungen (130, 133, 136, 146).

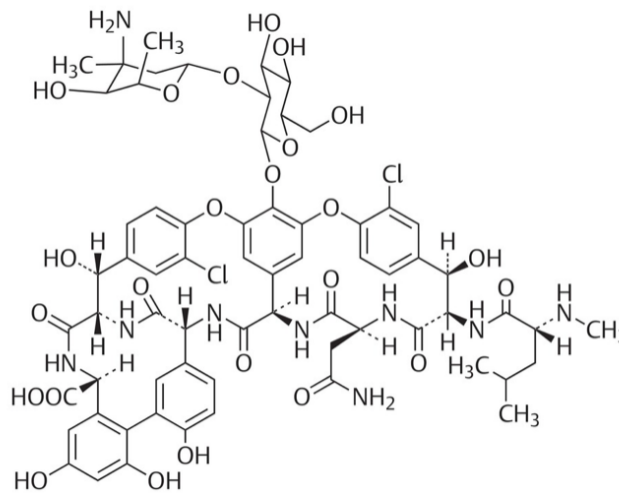


Abbildung 7 Strukturformel Vancomycin nach Lüllmann (modifiziert nach Lüllmann, Pharmakologie und Toxikologie(136))

Weitere Angriffspunkte

Die Schädigung der Zellmembran erfolgt über die Bildung von Poren. Der Ionengradient kann dadurch nicht aufrechterhalten werden. Wichtige Vertreter der Porenbildner ist Daptomycin. Sulfonamide, wie bspw. Sulfadiazin, hemmen die Synthese von Dihydrofolsäure(DHFS) und Tetrahydrofolsäure (THFS) aus p-Aminopenoensäure(PABS). Das Bakterium ist dadurch nicht in der Lage wichtige Bausteine für RNA und DNA zu produzieren. Somit wirken Sulfonamide bakteriostatisch auf grampositive und gramnegative Erreger. Fluorchinolone, Nitrimidazole und Rifampicin haben als gemeinsamen Angriffspunkt die DNA oder RNA. Während Fluorchinolone das Enzym Gyrase hemmen und so die Replikation der DNA gestört ist, binden Nitroimidazole nach der Umwandlung zu Hydroxylamin kovalent an die DNA anaerober Bakterien und verursachen so Strangbrüche. Rifampicin inhibieren die Translation durch Hemmung der DNA-abhängigen-RNA Polymerase. Sie sind ebenfalls zur oralen Applikation geeignet. Für die Hemmung der bakteriellen Proteinsynthese sind eine Vielzahl von Antibiotika zuständig. Man unterscheidet fünf Gruppen, die unterschiedliche Wirkspektren aufweisen. Sie interferieren fast ausnahmslos mit Vorgängen an Ribosomen. Ribosomen besitzen zwei Untereinheiten, welche hierbei als Angriffspunkte fungieren (131, 136).

- Makrolide (Vertreter: Erythromycin)
- Tetracyclin(Doxycyclin)
- Aminoglykoside(Gentamicin)
- Linezolid

2.4.4 Bisherige Einsatzgebiete der Antibiose Therapie

Folgende Tabelle zeigt verschiedene Antibiotika bzw. Antibiotikagruppen und beispielsweise deren Indikationen bzw. Einsatzgebiete. Dies stellt einen groben Überblick über die bisherigen Einsatzgebiete von einzelnen Antibiotika dar. Die Bekämpfung von Infektionskrankheiten durch verschiedenste Erreger steht hierbei im Vordergrund (136, 147).

Antibiotikagruppe/Wirkstoff	Indikationen/Einsatzgebiete
Penicillin G	Endokarditis, Syphilis, Erysipel
Aminopenicillin	Sinusitis, Harnwegsinfekte, Otitis media
Carbapeneme	Reserve Antibiotika bei schweren Infektionen im Krankenhaus
Glykopeptide	Pneumonie, Osteomyelitis, Endokarditis
Makrolide	Pneumonie verursacht durch atypische Erreger, Urethritis
Tetrazykline	Borreliose, Akne vulgaris, Chlamydien-Infektionen
Fluorchinolone	Harnwegsinfekt, Gastroenteritis, Gallenwegsinfektionen

Tabelle 2 Indikationen und Einsatzgebiete einzelner Antibiotikagruppen

2.4.5 Neuronale und antiinflammatorische Auswirkungen im Gehirn

Studien haben gezeigt, dass die Gabe von β -Laktam Antibiotika sich neuroprotektiv auf durch Hypoxie verursachte Schäden im Gehirn auswirkt. Nun stellt sich die Frage, welche Mechanismen insbesondere β -Laktam-Antibiotika induzieren, um diesen neuroprotektiven Effekt zu bewirken.

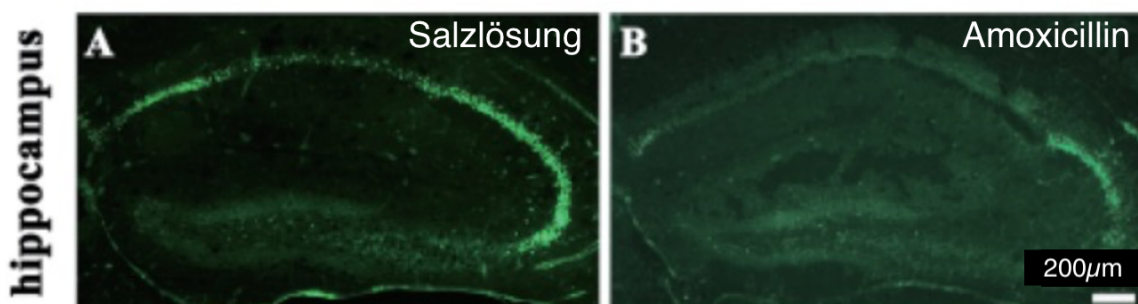


Abbildung 8 Gelatinase Aktivität im Hippocampus nach induzierter Ischämie (modifiziert nach Lee et al.(149))

Gelatinase ist ein Enzym zum Abbau von Kollagen. Die Aktivität dessen wird als Fluoreszenz Signal dargestellt. In der mit Kochsalz behandelten Gruppe in Bild A induziert eine Ischämie des Hippocampus eine deutliche Aktivierung des abbauenden Enzyms. Die antibiotische Behandlung in Bild B zeigt eine Umkehrung mit deutlicher Reduktion der Aktivität. Amoxicillin zeigt in diesem Versuchsaufbau einen neuroprotektiven Effekt.

Es deutet viel darauf hin, dass es sich hier nicht um einen isoliert ablaufenden Mechanismus handelt, sondern um ein multifaktorielles Geschehen (148-150). Im Folgenden werden einzelne Erklärungsmodelle bzw. Wirkmechanismen der β -Laktam-Antibiotika genauer behandelt.

2.4.5.1 Glutamatransporterexpression

Eine Ischämie des Gehirns, die in Folge eines SHT auftritt, führt zum Untergang neuronaler Zellen. Einzelne pathophysiologische Prozesse, die im Rahmen dessen ablaufen, wurden schon genauer erläutert. Die Glutamat-Exzitotoxizität spielt hierbei jedoch eine entscheidende Rolle. In Folge des Traumas wird eine hohe Menge an Glutamat in den synaptischen Spalt freigesetzt und bindet an postsynaptischen Glutamatrezeptoren. Dies bewirkt einen massiven Einstrom an Calcium. Calcium erhöht die Aktivität calciumabhängiger Proteasen, wie Calpain. Die Protease attackiert zahlreiche Proteine des Zytoskeletts und triggert somit den neuronalen Untergang (68, 151, 152).

Die Glutamatkonzentration im synaptischen Spalt kann durch Glutamattransporter moduliert werden, indem sie Glutamat aus dem extrazellulärem Raum eliminieren (153). Es wurden fünf verschiedene Isoformen dieser Transporter identifiziert. Das Hauptaugenmerk liegt auf Glutamat-Transporter-1 (GLT-1, EAAT2). GLT-1 ist auch ein Natrium abhängiger Transmembransymporter (154) und wird vom SLC1A2-Gen kodiert (155). 80% der im Hippocampus exprimierten Glutamattransporter stellt dieser Subtyp dar. GLT-1 wird überwiegend in

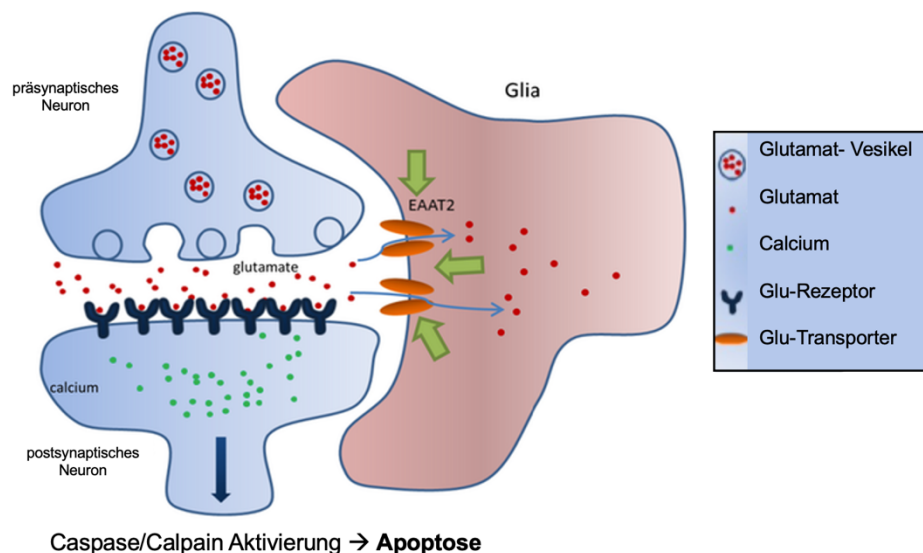


Abbildung 9 Darstellung einer neuronalen Synapse während Glutamat induzierter Exzitotoxizität (modifiziert nach Fontana (166))

Astrozyten exprimiert, findet sich jedoch auch an neuronalen Axonen. Er spielt eine entscheidende Rolle bei der Glutamataufnahme aus dem synaptischen Spalt und wirkt so der glutamatinduzierten Exzitotoxizität entgegen (149, 156). Das Vorhandensein von erhöhten Glutamatkonzentrationen nach SHT wird auch durch ein Versagen der Glutamat-

Wiederaufnahme verursacht. Es gibt Hinweise darauf, dass die Expression der astrozytären GLT-1 innerhalb von 24 Stunden nach erfolgtem SHT um 40% abgenommen haben (8, 157). Abbildung 11 zeigt die Wichtigkeit der Glutamattransporter. Wird das Glutamat nicht aus dem synaptischen Spalt entfernt, kommt es zur calciumabhängigen Aktivierung von Caspasen und Calpain, was die Apoptose der Nervenzellen induziert. Unterstützt wird diese Annahme dadurch, dass GLT-1 Knock-out Mäuse nach einer kortikalen Verletzung eine erhöhte Anfälligkeit für neuronale Degeneration im Hippocampus und vasogenes Hirnödem aufweisen (158).

Studien zeigten nach der Gabe von β -laktam-Antibiotika eine erhöhte Expression von GLT-1. Im Tierversuch wurde Mäusen fünf Tage über längeren Zeitraum entweder mit Ampicillin oder Kochsalzlösung behandelt und anschließend die Hippocampi isoliert. Das Expressionsniveau von GLT-1 stieg nach der Verabreichung von Ampicillin signifikant an. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Ampicillin mittels Steigerung der GLT-1-Expression und damit einhergehend der Glutamat-Clearance über neuroprotektive Eigenschaften nach SHT verfügen könnte. Ähnliche Effekte zeigte die Abbildung 8 mit einer verminderten Gelatinase Aktivität(149).

Die Mechanismen der pharmakologisch-induzierten Hochregulation der GLT-1 Expression auf Transkriptions- und Translationsebene sind noch nicht abschließend verstanden. Östrogen beispielsweise erhöht ebenfalls die Expression, wohingegen Mangan eine Reduktion induziert (159, 160). Es wurde jedoch experimentell nachgewiesen, dass mehrere β -Laktam-Antibiotika die GLT-1 mRNA-Expression erhöhen. Ceftriaxon erhöhte sowohl in vitro als auch in vivo den GLT-1 Protein Spiegel und konnte so nachweislich einen Neuroprotektionsschutz nach Ischämie aufweisen. Die GLT-1 Promotoraktivität und die damit verbundene Expression des Transporters wird durch den nf-kb-Signalweg erhöht. Weitere β -Lactam-Antibiotika wie Ampicillin und Cefazolin bewirkten ähnliche Effekte und führten ebenfalls zu einer Erhöhung der GLT-1 Expression. Neben der Expression kommt es auch zu einer Erhöhung der funktionellen Aktivität des GLT-1. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass mehrere β -Laktam-Antibiotika neuropathologischen Dysfunktionen über die Hochregulation von GLT-1 verbessern könnten (20, 148-150, 161). Hierzu zählen auch neuropathologische Konsequenzen nach SHT. β -Laktam-Antibiotika können neben ihrer antibakteriellen Wirkung auch gezielt auf sekundäre Prozesse Einfluss nehmen. Somit stellen β -Laktam Antibiotika eine spannende und interessante Möglichkeit der pharmakologischen Intervention akuter und chronischer Neurodegeneration dar.

2.4.5.2 Neurotoxische Wirkung

Neben der protektiven Wirkung können β -laktam-Antibiotika auch neurotoxisch wirken. Dies wird am Beispiel von Amoxicillin deutlich und betrifft überwiegend Kinder. Bei Kindern ist

Amoxicillin das meistverschriebene Antibiotikum (162). Besonders in dieser Altersgruppe besteht ein erhöhtes Risiko für arzneimittelinduzierte Nebenwirkungen. Zu den neurologischen Nebenwirkungen gehören Angstzustände, Hyperaktivität, Verwirrtheit und Krämpfe. Die neurotoxische Wirkung wurde in einem Tierversuch mit juvenilen Ratten genauer untersucht. Zusammenfassend wurde gezeigt, dass die Behandlung mit Amoxicillin bei juvenilen Ratten eine Depression auslöste und die Latenz zu einem Krampfanfall herabsetzte. Zudem induzierte das Antibiotikum oxidativen Stress (163) neben der zunehmenden Zahl an Resistenzen könnte die Neurotoxizität zu einer weiteren Gefahr unkontrollierter Antibiotikaeinnahme werden.

2.5 Mikrobiom

2.5.1 Grundlagen

Interesse und Wissen über das Darmmikrobiom haben in den letzten Jahren rasant zugenommen. Das menschliche Darmmikrobiom stellt ein komplexes Ökosystem dar. Mehr als eine Billionen Mikroben leben in unserem Magen-Darm-Trakt und sind für lebenswichtige Stoffwechsel-, Immun- und Ernährungsfunktionen verantwortlich. Zum Darmmikrobiom gehören Bakterien, Archaeen, Viren und eukaryotische Mikroben. Ein Großteil befindet sich im Dickdarm, aber auch im Magen und Dünndarm. Unter physiologischen Bedingungen sind ungefähr 99% der der bakteriellen Normalflora Anaerobier, 0,9% hingegen gramnegative Enterobakterien und 0,1% grampositive Enterokokken. Diese kommensale Gemeinschaft macht bis zu einem Kilogramm (kg) des Körpergewichts eines Erwachsenen aus. Die Zusammensetzung des Darmmikrobiom ist von Mensch zu Mensch unterschiedlich und wird durch Faktoren wie Ernährung, Alter, Geschlecht, Umwelt und Genetik beeinflusst. Gerät das sich in Homöostase befindende Ökosystem in ein schlecht angepasstes Ungleichgewicht spricht man von einer Dysbiose. Dieser Zustand ist mit zahlreichen Krankheiten assoziiert (10, 164, 165). Nicht nur Magen-Darm-Erkrankungen werden damit in Verbindung gebracht, sondern auch Stoffwechselerkrankungen, Autoimmunerkrankungen, allergische Reaktionen und neuropsychiatrische Erkrankungen. Die Wiederherstellung einer gesunden mikrobiellen Zusammensetzung ist daher eine vielversprechende therapeutische Strategie für Erkrankungen, die in Zusammenhang mit einer Darmdysbiose stehen (166). Das Gehirn interagiert über ein riesiges Netzwerk mit dem Darmmikrobiom. Es wurde festgestellt, dass ein SHT dieses Netzwerk stört, einschließlich der mikrobiellen Besiedelung. Die Ursachen und Folgen dieser Störung werden zunehmend untersucht. Nicht nur therapeutische, sondern auch diagnostische Möglichkeiten eröffnet das Mikrobiom auch bei neurologischen Erkrankungen und in Folge von Traumata. Das Ausmaß der Darmdysbiose kann bspw. beim SHT als diagnostischer Marker für den Schweregrad der Hirnverletzung dienen (165). Bei M. Crohn und dem kolorektalem Karzinom kommt dies bereits zum Einsatz (167).

Entwicklung des Mikrobiom

In den Anfängen der embryonalen Entwicklung wird der Darm intrauterin als sterile Umgebung angesehen. Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass die mikrobiologische Vielfalt im Verlauf der Geburt durch vaginale Mikroben der Mutter, wie bspw. den Lactobacillen, entsteht. Kommt es zu einer Kaiserschnittgeburt kann die Besiedelung auch von Hautbakterien und nosokomialen Keimen erfolgen. Staphylokokken und Acinetobacter wären typische Beispiele in diesem Fall. Die Vielfalt des Mikrobiom wird dadurch reduziert und erhöht so die Anfälligkeit der Säuglinge für Asthma, allergische Rhinitis, Diabetes und Zöliakie. Die Reifung des Mikrobiom etabliert sich im Alter zwischen dem ersten und dritten Lebensjahr. Danach bleibt kommt es zu einer Stabilisierung dessen. Den Großteil stellen hierbei anaerobe Bakterien dar. Das Mikrobiom besteht derweil aus 50 Phyla (Stämme) und 1000 Arten. Trotz dieser Vielfalt stammt die Mehrzahl der Mikroben aus zwei Phyla: Bacteroidetes und Firmicutes. Der häufigste Erreger ist hierbei *Bacteroides fragilis* (10, 168, 169).

Mikrobiom und Immunsystem

Unser physiologisches und natürliches Mikrobiom ist die erste Verteidigungslinie gegen Toxine und Krankheitserreger im Magen-Darm-Trakt. Somit schützt es seinen Wirt gemeinsam mit dem Immunsystem vor Krankheiten. Die Hauptaufgabe des gesunden Mikrobiom stellt die Verhinderung der Besiedlung mit Krankheitserregern dar. Beispielsweise kommt es durch Produktion von Bakteriocin, einem von Bakterienstämmen abgesonderte Toxin, zu einer Hemmung des Wachstums anderer Mikroben (170, 171). Auch Stoffwechselfunktionen übernehmen die Mikrobiota durch Fermentation großer Polysaccharide, nicht absorbierbarer Zucker und mucosaler Glykoproteine des Wirts. Die Hauptmetabolite des Kohlenhydratstoffwechsels sind Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff, Ethanol und kurzkettige Fettsäuren (SCFA). Letztere nehmen eine entscheidende Aufgabe als Energiequellen für Kolonozyten. Zudem sind Dickdarmbakterien an der Vitaminsynthese und der Absorption verschiedener Elektrolyte beteiligt (172, 173).

Ein interessanter Aspekt ist der Beitrag der Darmbakterien an der Entwicklung der mucosalen Immunantwort. Dies geschieht durch direkte Wechselwirkungen mit Darmepithelzellen. Kommt es schon sehr früh zu einer hohen Expositionsrate gegenüber zahlreichen Bakterien wird das Immunsystem stark beeinflusst, sodass bei Kontakten mit Krankheitserregern das Immunsystem suffizienter arbeitet. Eine erhöhte Anfälligkeit für Autoimmunreaktionen und atopischer Krankheitsbilder tritt gehäuft bei Lebewesen mit verringerter mikrobieller Vielfalt auf (10, 174). Die physiologische Darmbesiedlung bildet eine stabile Gemeinschaft, die der Besiedlung nicht heimischer Bakterien und der Expansion von Pathobionten entgegenwirkt. Dieser Mechanismus wird als Kolonisationsresistenz bezeichnet. Wie bereits erwähnt kann eine unreife Besiedlung, wie zum Beispiel bei Säuglingen, oder die Gabe von Antibiotika diese

Fähigkeit herabsetzen. Die Mechanismen, mit denen Bakterien im Darm konkurrieren, lassen sich in die direkte und indirekte Kategorie einteilen. Unter der direkten Kolonisationsresistenz versteht man die gegenseitige Abtötung unter den Bakterien und die Konkurrenz um Ressourcen. Diese beiden Abläufe beziehen sich meist auf Bakterien ähnlicher Abstammung, da sie dazu neigen, ähnliche Nährstoffe zu nutzen. In Folge indirekter Mechanismen kommt es zur Stimulation des angeborenen Immunsystems des Wirts durch mikrobeassoziierte Muster, die von Bakterien und Viren produziert werden. Die Produktion von Antikörper durch B-Zellen, Sekretion von Interleukinen und Produktion antimikrobieller Peptide (AMPs) aus den Darmepithelzellen führen gemeinsam mit einer vermehrten Schleimproduktion zu einer Unterdrückung von Krankheitserregern. Diese auf den Darm begrenzte Immunreaktion bleibt jedoch nicht lokal, sondern kann auf weitere Prozesse Einfluss nehmen (171, 175).

Der Einfluss des Mikrobioms auf das Immunsystem beschränkt sich nicht nur die mucosalen Immunzellen der Darmwand. Myeloide Immunzellen, wie bspw. neutrophile Granulozyten und Makrophagen, stellen bei einer Infektion häufig die erste Verteidigungslinie. Der Ursprung dieser Zellen befindet sich wie der Name schon sagt im Knochenmark. Trotz dieser Tatsache wurde eine Einflussnahme des Mikrobioms auf die Myelopoese im Knochenmark nachgewiesen. Am Beispiel der neutrophilen Granulozyten wird dies genauer erläutert. Wurden Mäuse mit einem Breitbandantibiotikum behandelt, kommt es zu einer Abnahme der Vorläufer Zellen im Knochenmark. Eine durch veränderte Darmmikrobiota induzierte intestinale Produktion von Interleukinen hingegen kann einerseits zu einer Steigerung der Granulopoese im Knochenmark führen und andererseits Aktivierung von neutrophilen Granulozyten triggern. So kann durch die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine das Gewebe geschädigt werden und die Krankheit verschlimmern. Mikrobielle Moleküle, die durch Bakterien freigesetzt werden, bzw. sich an deren Oberfläche befinden, können auch direkt neutrophile Granulozyten beeinflussen. Somit lässt sich abschließend sagen, dass das Mikrobiom sowohl auf die Granulopoese myeloischer Vorläufer im Knochenmark als auch auf die Aktivität reifer neutrophiler Granulozyten Einfluss nehmen kann (175-177).

2.5.2 Einflüsse auf das Mikrobiom

Bisher wurde beschrieben, wie das Mikrobiom andere Komponenten und Krankheitserreger direkt und indirekt beeinflussen kann. Nun stellt sich die Frage, inwiefern die Mikrobiota selbst moduliert werden kann. Im Folgenden werden drei Möglichkeiten genauer besprochen: Stuhltransplantation, Verabreichung von Probiotika und Antibiosegabe.

Stuhltransplantation

Die fäkale mikrobiotische Transplantation (FMT) wurde therapeutisch schon in den späten 50iger Jahren bei Patienten mit pseudomembranöser Kolitis angewendet (178). Der Spender wird im Voraus auf jegliche Erkrankungen untersucht. Im Rahmen einer Koloskopie wird der

Stuhl entfernt und bei minus 80°C bis zu neun Monaten verwendbar. Die Fäkalsuspension kann durch eine Magensonde, einen Nasoduodenalschlauch oder in Form einer Kapsel verabreicht werden. Neben der pseudomembranösen Kolitis kann eine FMT auch bei Patienten mit *Clostridium difficile* Infektion angewandt werden. Neueste Erkenntnisse zeigen, dass auch bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen die FMT positive Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf birgt. Auch bei Erkrankungen außerhalb des Gastrointestinaltraktes wurden positive Einflüsse beschrieben. Dazu zählen neurologischen Erkrankungen, wie bspw. Parkinson und Multiple Sklerose (10, 179).

Probiotika

Nach einer Definition der Weltgesundheitsorganisation (WHO) sind Probiotika lebende Bakterien oder Hefen, die dem Konsumenten in angemessenen Mengen einen gesundheitlichen Nutzen bringen können. Bisher werden Probiotika bei Antibiotika induzierten Durchfall eingesetzt. Hierbei werden sehr häufig die Arten *Lactobacillus* und *Lactococcus* verwendet (10, 173). Durch die vorübergehende Besiedlung der Darmflora nach Einnahme führen sie zu einer Verbesserung der natürlichen Darmbarriere. Des Weiteren kommt es zur Stimulierung der Interleukinsekretion, dem Herunterregulieren entzündlicher Zytokine und der direkten Bekämpfung von pathogenen Erregern. Probiotika regulieren zudem die Homöostase des Darmepithels, indem sie das Überleben von Darmepithelzellen fördern und so die Barrierefunktion aufrechterhalten (180).

Antibiotika

Antibiotika können durch ihre antibakterielle Wirkung Einfluss auf das Mikrobiom nehmen. Die Veränderung der Darmbakterienzusammensetzung durch β -Laktam-Antibiotika-Gabe wird therapeutisch bei der Behandlung von Morbus Crohn eingesetzt. Einerseits kommt es zur Reduktion pathogener Keime, andererseits reduziert sich infolgedessen die Bakterienvielfalt. Die Veränderung der enterischen mikrobiellen Flora mittels Antibiotika stellt somit eine therapeutische Option dar. Nachteile der Antibiotikabehandlung sind das Auftreten von Nebenwirkungen, Resistenzen und Superinfektionen mit *Clostridium difficile* (173, 181). Eine Studie von Palleja et al. aus dem Jahr 2018 zeigte, dass es nach der oralen Gabe von Antibiotika (u.a. Vancomycin) über einen Zeitraum von vier Tagen zu einem Anstieg von Enterobakterien und Fusobakterien gekommen ist. Die Butyrat-Produzenten *Faecalibacterium prausnitzii* und *Roseburia hominis* hingegen haben abgenommen. Nach sechs Monaten konnte sich das Mikrobiom erholen und das Ausgangsniveau wieder hergestellt (182). Durch die Gabe von Antibiotika und der daraus resultierenden Veränderung der Mikrobiota verändert sich die Expression von Neuropeptiden und deren Rezeptoren im Gehirn. Am ausgeprägtesten findet sich dieser Effekt im frontalen Cortex. Da dieser Bereich des Gehirns mit dem Verhalten assoziiert ist, zeigten Tiere nach Antibiotikagabe vermehrt Verhaltensauffälligkeiten. Das

Mikrobiom könnte somit in enger Relation mit neuropsychiatrischen Erkrankungen wie Autismus, Depression und Angstzuständen stehen (183).

2.5.3 Mikrobiom-Hirn-Achse

Es hat sich zunehmend gezeigt, dass eine Kommunikation zwischen Gehirn und Darmmikrobiom besteht. Die Beziehung wird als Mikrobiota-Darm-Hirn-Achse (MGBA) bezeichnet. Zahlreiche Studien haben den Zusammenhang zwischen einer Veränderung des Darmmikrobioms und funktionellen Veränderungen im Gehirn nachgewiesen. Dies bietet neue therapeutische Ansatzpunkte bei pathologisch ablaufenden Prozessen im Gehirn. Im Folgenden werden die einzelnen Kommunikationsmechanismen genauer erläutert (184). An der Kommunikation sind mehrere Systeme beteiligt: Das ZNS, einschließlich sympathischer und parasympathischer Nerven, das enterische Nervensystem, sowie neuroendokrine Komponenten. Der gegenseitige Informationsaustausch erfolgt durch afferente und efferente Nerven. Von den Darmmikrobiota produzierte neuroaktive Verbindungen beeinflussen die Aktivität sensorischer Neuronen des enterischen Nervensystems, welche wiederum die Afferenz der Nervus vagus modulieren. Das ZNS einerseits reguliert sowohl sensorische als auch sekretorische Funktionen, sowie Motilität und Peristaltik im Gastrointestinaltrakt. Das Mikrobiom andererseits kann direkt bzw. indirekt mittels Vitamine, Neurotransmittern und neuroaktiven mikrobiellen Metaboliten, z.B. kurzkettige Fettsäuren Einfluss auf die Aktivität des Magendarmtraktes nehmen. Diese Signale des Mikrobioms können durch das Vorhandensein der BHS zwar nicht direkt mit dem ZNS kommunizieren, jedoch wurden indirekte Signalwege nachgewiesen. Dies erfolgt u.a. über afferente sensorische Neuronen des Vagusnervs und über neuroimmune bzw. neuroendokrine Signalwege (184, 185). Eine Studie von Desbonnet et al. aus dem Jahr 2015 zeigte nach einer Depletion des Mikrobioms in jungen Tieren eine abnormale Hirnentwicklung (186). Ein wichtiger Aspekt, auch in Bezug auf traumatisch assoziierte Erkrankungen des ZNS, ist der Einfluss der Mikrobiota auf die Aktivierung von Mikrogliazellen. Bakterielle Produkte und Metabolite der Darmmikrobiota können die Funktion der Mikroglia beeinträchtigen (187). Eine Schlüsselfunktion hierbei nehmen SCFAs ein. SCFA sind Fettsäuren mit zwei bis fünf Kohlenstoff Atome und sind der Hauptmetabolit bei der Fermentation von Ballaststoffen durch Darmbakterien. Durch passive Diffusion oder im Austausch mit Bicarbonat gelangen SCFAs in die Kolonzellen. Über die basolaterale Membran verlassen die Fettsäuren die Zellen und gelangen in den Pfortaderkreislauf. In der Leber fungieren sie als Energielieferanten für Hepatozyten. Geringe Mengen gelangen darauf in die systemische Zirkulation. Über sogenannte freie-Fettsäure Rezeptoren (FFAR) können SCFA mit verschiedenen Zellen interagieren (188). Vor allem die Kommunikation mit neutrophilen Granulozyten und Monozyten beeinflussen das Immunsystem. SCFAs verbessern zudem die Barriereintegrität der BHS indem die Expression von Zell-Zell Kontakten, wie Tight-junctions hochreguliert wird (188). SCFA selbst passieren

die BHS ohne Transporter. Nach der BHS-Passage konnten direkte Einflüsse auf zerebrale Endothelzellen nachgewiesen werden (189). Die Proliferation und Mitose neuronaler Vorläuferzellen kann durch SCFAs erhöht werden. Darüber hinaus hat das Mikrobiom auch indirekte Auswirkungen auf das angeborene Immunsystem. Durch Veränderungen der zirkulierenden Spiegel von entzündungsfördernden und entzündungshemmenden Zytokinen wird auch die Mikrogliafunktion beeinflusst (187, 190).

2.5.4 Mikrobiom als therapeutisches Ziel bei Schädel-Hirn-Trauma

Der Einfluss des Darmmikrobioms auf Patienten mit SHT ist von großer klinischer Relevanz, da SHT-Patienten aufgrund langer Krankenhausaufenthalte und Gabe von Antibiotika prädisponiert sind für eine mikrobielle Dysbiose. Zwischen traumatischen Hirnverletzungen und dem Darmmikrobiom besteht eine bidirektionale Verbindung. Auf der einen Seite hat eine ZNS-Verletzung die Permeabilitätserhöhung der Darmwand zur Folge. Dies führt zu einer Störung der mikrobiellen Zusammensetzung. Andererseits beeinflusst die Dysbiose pathophysiologische Prozesse nach erfolgtem SHT. Bereits im Zeitraum von zwei Stunden bis zu sieben Tagen nach Trauma findet man bakterielle Veränderungen, die mit dem Läsionsvolumen korrelieren (165, 191). Die Reduktion der sekundären Hirnverletzung nach SHT bietet einen erheblichen Nutzen zur Verringerung von Mortalität und v.a. Morbidität. Aufgrund der Komplexität der MGBA bestehen zahlreiche Angriffspunkte (192).

Lactobacillus acidophilus (LA)

Einige Bakteriengattungen des Mikrobiom haben neuroprotektive Wirkungen auf SHT-Patienten. Am Beispiel des LA wird dies genauer erläutert. Studien haben gezeigt, dass LA traumabedingte Dysfunktionen nachhaltig verbessern kann. Sensomotorische Defizite und Leistungsabfall in Verhaltenstestungen wurden deutlich abgeschwächt. Neuronales Überleben wurde erhöht und degenerative neuronale Prozesse im periläsionären Kortex verringert. Auch hierbei wurde eine erhöhte Expression von Tight-junction-Proteinen nachgewiesen. Die Integrität der BHS wird dadurch sichergestellt und Ödeme deutlich verringert. Zudem führt die Unterdrückung der Entzündungsreaktion durch Reduktion entzündlicher Zytokine zu neuroprotektiven Effekten. Auch auf die systemische Inflammation kann LA positiv Einfluss nehmen. Die Dysbiose und den damit verbundenen Abfall der LA nach SHT stellt somit einen interessanten therapeutischen Ansatzpunkt dar. Die Manipulation der Darmmikrobioms durch laktobazillenreiche probiotische Supplementierung innerhalb der ersten 48 Stunden nach Trauma kann im Tiermodell sowohl die Darmfunktionsstörungen als auch neurologische Defizite nach SHT abschwächen (193).

Stimulation von regulatorischen T-Zellen (Treg)

Ein wichtiger Mechanismus für die Interaktion der Darmmikrobiota mit dem Immunsystem nach experimentellem SHT ist die Stimulation von Treg. In erster Linie dienen Treg zur Unterdrückung von Entzündungsreaktionen, sodass ein Mangel die Induktion von Autoimmunerkrankungen fördert. Die Wirkung der Zellen beruht auf inhibitorische Einflüsse auf proinflammatorische Zellen und Zytokine. Die Freisetzung von IL10 inhibiert entzündungsfördernde Zelllinien, wie z.B. Th1- und Th17-Zellen. Der Kommensalorganismus *Bacterioides fragilis* produziert Polysaccharid A (PSA). PSA triggert die Aktivierung von Treg und somit nimmt das Mikrobiom direkt Einfluss auf das Immunsystem. Das freigesetzte IL-10 hat neuroprotektive Wirkung, indem es die Mikrogliaaktivierung suprimiert (194, 195). Dieser Mechanismus spielt auch eine wichtige Rolle bei der MGBA. Eine Studie von Benakis et al. (2016) zeigte, dass antibiotikainduzierte Veränderungen des Mikrobioms nach ischämischer Hirnverletzung durch die Hochregulation von Treg-Zellpopulationen zu einer Neuroprotektion führen können (196).

Negative Auswirkungen durch Dysbiose

Neben potenziell neuroprotektiven Effekten können Antibiotika nach SHT auch negativen Einfluss auf den Heilungsprozess primärer und sekundärer Hirnschädigungen nehmen. Dies geschieht durch Erhöhung neuronaler Verluste, Suppression posttraumatischer hippocampaler Neurogenese und Modulation der Mikroglia-Antwort (9). Neuronen in der CA3-Region des Hippocampus sind nach SHT besonders anfällig für neuronale Verluste und chronische Neurodegeneration. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass im ipsilateralen Hippocampus nach SHT ein erhöhter neuronaler Verlust durch die Dysbiose induziert wurde. Wenige Tage nach dem Trauma erfolgte durch die mikrobielle Dysbiose eine akute Suppression der Monozytenzirkulation. Die traumainduzierte hämatogene Rekrutierung von Immunzellen kann einerseits als schädlicher Prozess angesehen werden, jedoch auch neuroprotektive Wirkung haben (9, 197). Die Marker für Mikroglia-Aktivierung steigen nach der Gabe von Antibiotika signifikant. Die ruhenden Mikroglia werden durch die Aktivierung zunehmend zum proinflammatorischen Phänotyp. Diese durch Dysbiose bedingte mikrogliale Aktivierung hat chronische Neuroinflammation und neurodegenerative Prozesse zur Folge. Auch die Integrität der BHS steht in Verbindung mit der antibiotikainduzierten Dysbiose. Die BHS wird somit durch das Trauma und die entstandene Dysbiose gestört, sodass Immunzellen und proinflammatorische Zytokine ins ZNS gelangen und die neuropathologischen Abläufe triggern (165).

3 Material

3.1 Verbrauchsmaterialien

Material	Nähere Bezeichnung	Hersteller
96-well Platte	Zellkultur Microplatte 96 Well	Biozym Scientific HmbH, Oldendorf, DE
96-well Platte	Zellkultur Microplatte 96 Well	Greiner Bio One; Frickenhausen, DE
Chirurgisches Nahtmaterial	Prolene 6-0	Ethicon, Norderstedt, BEL
Deckgläser	24x50 Milimeter	Diagonal GmbH, Münster, DE
Einstreu	Lignocel® FS14	J.Rettenmaier & Söhne GmbH&Co. KG, Rosenberg, DE
Einwegkanüle	Sterican® 19G, 26G	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Einwegpipetten	5ml,10ml,25ml (Mili-/Liter)	Falcon,Becton Dickinson, Heidelberg,DE
Einwegspritze	BD Discardit™ II	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Einwegspritze	Injekt®-F	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Falconröhrchen	15ml,50ml	Becton, Dickinson, New Jersey, USA
Faltenfilter		Whatsman HmbH, Neuenkirchen, DE
Filterpapier		Schleicher & SchuellBioscience HmbH, Dassel, DE
Käfige	Filtertopkäftig Typ II, lang	Bioscape GmbH, Castrop-Rauxel, DE
Klingen	Apollo	Herkenrath GmbH & Co. KG, Solingen, DE
Kryoröhrchen	Plain skirted tube 0.5ml	StarLab, Ahrensburg, DE
Membranen	PVDF Membran (0,45µm)	Millipore, Billerica, USA
Mikropipettenspitzen	1000µl, 200µl, 100µl, 10µl	StarLab, Ahrensburg
Nagellack	Jolifin Spezial-Versiegeler 14ml	Jolifin, Baberhausen, DE
Objektträger	Superfrost®plus	Thermo Scientific, Braunschweig, DE
Objektträgerkasten		VWR, Darmstadt, DE
Papierhandtücher	grau, 1-lagig	Schuch Laborhandel und Klinikbedarf, Langgöns, DE
Reaktionsgefäße	0.5, 1.5, 2.0 ml	Eppendorf, Hamburg, DE
Reaktionsgefäße	Falcon® 15ml, 50ml	Greiner Bio One; Frickenhausen, DE
Saugtupfer	Sugi® Sponge Points	Kettenbach, Eschenburg, DE
Skalpelle	Feather disposable scaple, No.11, No.23	Feather Safety Razor Co., Ltd., Osaka, JPN
Tierfutter	ssniff	Ssniff, Soest, DE

Tabelle 3 Verbrauchsmaterialien

3.2 Geräte

Gerät	Hersteller
CCI-Impactor	Leica, Nußloch, DE
Elektrophoresekammer	BioRad, Hercules, USA
Gewebehomogenisator Mastermill MM 300	Retsch, Haan, DE
Glomax multi + detection System	Promega, Mannheim, DE
Handbohrer, Uni-Drive N Komplettgerät	Paggen, Starnberg, DE
Infrarot Laser Imaging - Odyssey 9260	Li-Cor Biosciences, Bad Homburg, DE
Inkubator Babytherm IC8000	Dräger, Lübeck, DE
Isofluran (Forene) Verdampfer	Abbott, Drägerwerk, Lübeck, DE
Kryostat Microm Cryostar NX 70	Thermo Fisher Scientific, Walldorf, DE
Lasermikroskop LSM 5 Exciter	Zeiss, Jena, DE
Laserquelle Lasos LGK 7812 ML-1/LGN 7812	Lasos Lasertechnik, Jena, DE
LightCycler LC 480	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, DE
Magnetrührer MR 3001	Heidolph, Schwabach, DE
Mikroskop Stemi 305	Zeiss, Jena, DE
Mikroskopiekamera Axio Cam 105	Zeiss, Jena, DE
Mini Trans Blot System	BioRad, Hercules, USA
pH-Meter, CG 832	Schott, Mainz, DE
Photometer NanoVue System	GE Healthcare, DE
Photometer NanoVue™	GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK
Rota-Rod RS232/LE8200	Hugo Sachs; March-Hugstetten, DE
Schüttler Rotamax 120	Heidolph, Schwabach, DE
Stereotaktischer Rahmen	Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA
Stromversorgung, PowernPAC™	BioRad, Hercules, USA
Temperaturhomöostasegerät (Wärmeplatte)	Hugo Sachs, March-Hugstetten, DE
Temperatursonde TCAT-2DF	Harvard, New Jersey, USA
Tiefkühlschrank -20 Grad Celsius (°C)	Liebherr, Ochsenhausen, DE
Tiefkühlschrank -80 °C	Sanyo Electric Co., Osaka, J
Tierhaltungsschrank	Bioscape, Castrop-Rauxel, DE
Vortex Reax control (Laborschüttler)	Heidolph, Hamburg, DE
Waage CS 200	Ohaus Corporation, Pine Brook, NJ, USA
Zentrifuge Eppendorf 5804 R	Eppendorf, Hamburg, DE
Zentrifuge Micro Star 17 R	VWR, Radnor, PA, USA

Tabelle 4 Geräte

3.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Aqua Spüllösung, sterile	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)	Sigma Aldrich, Steinheim, DE
EDTA	Roth, Karlsruhe, DE
Einbettmedium-Gehirn, NEG 50	Thermo Fisher Scientific, Walldorf, DE
Ethanol	Applichem, Darmstadt, DE
Frekaderm Spray farblos	Dr. Schumacher GmbH, Melsungen, DE
Glycerin	Roth, Karlsruhe, DE
Histoacryl, Gewebekleber	Braun, Melsungen, DE
Isopropanol	Sigma, St. Louis, MO, USA
Kresylviolett (Acetat)	Merck, Darmstadt, DE
Magermilch (MM)	Roth, Karlsruhe, DE
Natriumcarbonat	Fluka, Buchs, CH
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Normal Goat Serum (NGS)	Dako, Hamburg, DE
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt, DE
PBS, Dulbecco Trockensubstanz	Biochrom, Berlin, DE
Protease Inhibitor	Roche, Molecular Biochemicals, Mannheim, DE
Roti-Histokitt	Roth, Karlsruhe, DE
Roti-Histol	Roth, Karlsruhe, DE
RPE Puffer	Qiagen N.V., Venlo, NL
RWT Puffer	Qiagen N.V., Venlo, NL
Stickstoff, flüssig	Air Liquide, Düsseldorf, DE
Triton X-100	Sigma Aldrich, Steinheim, DE

Tabelle 5 Chemikalien

3.4 Arzneimittel

Handelsname	Wirkstoff	Hersteller
Amoxicillin-ratiopharm® comp 125 TS	125mg/5ml Amoxicillin, 31,25/5ml Clavulansäure	ratiopharm GmbH, Ulm, DE
Bepanthen-Augensalbe®		Bayer Vital, Leverkusen, DE
Forene®	Isofluran	Baxter, Unterschleißheim, DE
Nystaderm®-S	100.000 I.E. / ml Nystatin	Dermatopharm, Grünwald, DE
Vanco-Saar®	500mg Vancomycin	MIP Pharma GmbH, Blieskastel, DE
Rimadyl®	Carprofen	Zoetis, Inc, USA
Lidocain	Lidocainhydrochlorid	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE

Tabelle 6 Arzneimittel

3.5 Antikörper

Primär			
Target	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Anti-GFAP	Kaninchen	1:500	Dako, Hamburg, DE
Anti-Iba1	Kaninchen	1:500	Wako Chemicals, neuss, DE
Sekundär			
Target	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Anti-Kaninchen Alexa Fluor 568	Ziege	1:500	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Anti-Maus Alexa Fluor 488	Ziege	1:500	

Tabelle 7 Antikörper

3.6 Kits

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

Tabelle 8 Kits

3.7 Puffer und Lösungen

Lösung	Rezept
0,1% Triton-X und 0,1% Natrium-Citrat-Lösung	0,1 g (w/v) Natrium-Citrat + 0,1% (v/v) Triton-X in 100 ml H ₂ O
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	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
Vehikel (-lösung)	25 % DMSO (v/v) in 0,1 M Na ₂ CO ₃ in Aqua

Tabelle 9 Puffer und Lösungen

3.8 Primer

3.8.1 Gehirn

Primer	5' ---->3'	Kit
Ppia F	GCGTCTSCTTCGAGCTGTT	Absolute Blue qPCR SybrgreenMix AB-4166
Ppia R	RAAGTCACCACCCTGGCA	
TNFa F	TCT CAT CAG TTC TAT GGC CC	
TNFa R	GGG AGT AGA CAA GGT ACA AC	
mu IL 1b Cy5	CY5-CAG CTG GAG AGT GTG GAT CCC AAG C--PH	Light Cyclor 480 Probes Master 04887301001
mu IL 1b FL	TAA TGA AAG ACG GCA CAC CCA CCC-FL	
muL 1b A	CAG GAA GAC AGG CTT GTG CTC	
muL 1b S	GTG CTG TCG GAC CCA TAT GAG	
Iba1-F	ATCAACAAGCAATTCCTCGATGA	Absolute Blue qPCR SybrgreenMix AB-4166
Iba1-R	CAGCATTTCGCTTCAAGGACATA	
GFAP-F	CGGAGACGCATCACCTCTG	
GFAP-R	TGGAGGAGTCATTTCGAGACAA	
Tspo-F	GCCTACTTTGTACGTGGCGAG	
Tspo-R	CCTCCCAGCTCTTCCAGAC	
Serpa3n-F	GCCTCGTCAGGCCAAAAAG	
Serpa3n-R	TGAACGTGTCAAGAGGGTCAA	
mSlc1a2 F	GTTTCCAGCAGATTCAGACAG	
mSlc1a2-R	GCAATAAAGAATCCGATCAGACC	
Slc2a1 S	CCCAGAAGGTTATTGAGGAGTT	Maxima ProbeqPCR Master Mix K0262
Slc2a1-A	GGAGAGAGACCAAAGCGTG	
MHC2-F	CCGCCTAGACAAGCTGACC	Absolute Blue qPCR SybrgreenMix AB-4166
MHC2-R	ACAGGTTTGGCAGATTTGGA	
IFNg F	GCT CTG AGA CAA TGA ACG CT	
IFNg R	AAA GAG ATA ATC TGG CTC TGC	
VGlut1-F	CCAACAGGGTCTTTGGCTTTG	
VGlut1-R	CAGCCGACTCCGTTCTAAGG	
VGlut2-F	ACTATGCGCAGAATCCGTCT	
VGlut2-R	GCTTCTTCTCCAGCACCTGTA	

Tabelle 10 Primer-Gehirn

3.8.2 Kolon

Primer	5' --->3'	Kit
Ptgs2- S	TCTTTGCCCAGCACTTC	Absolute Blue qPCR SybrgreenMix AB-4166
Ptgs2- R	CCTCTCCACCRATGACCTGA	
Ocln Cy5	CY5-AGATGCCAGTTGCGGGAGAA-PH	Light Cyclor 480 Probes Master 04887301001
Ocln F	GCAAATTATCGCACATCAAGAG	
Ocln FL	GGGAGATTATGACAGACGGAAACCTTAG-FL	
Ocln R	TGTTTCAGCCCAGTCAATTATC	Light Cyclor 480 Probes Master 04887301001
TJP1_FL	CTCAACACACCACCATTGCTGTT(--FL)	
TJP1_LC	L640-ATGCCACGAGCTGTAGCCACTACA(PH)	
TJP1-V1 - 1x25/26 S	TGTCCCTGTGAGTCCTTCAG	
TJP1-V1 - var1-R	CCAGGTTTTAGGGTCACAGT	

Tabelle 11 Primer-Kolon

3.9 Software

Software	Hersteller
EndNote X9	Thomson Reuters Corporation, New York, USA
ImageJ, Version 1.47v	National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA
Image Studio, Version 3.1	Li-Cor Biosciences, Bad Homburg, DE
Prism	GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA
Word 2019	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Excel 2019	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Zen 2 (blue edition)	Zeiss, Jena, DE
Zen 2008, Version 5.0	Zeiss, Jena, DE

Tabelle 12 Software

3.10 Mikrobiologische Analyse

Agar	Hersteller
Blut	BD Franklin Lakes, New Jersey USA
CAN	
Mc Conkey	
Sabourad	Oxoid, Wesel Deutschland
Schaedler	Mast Group, Bootle UK
Geräte	Hersteller
Massenspektrometer MALDI -TOF Bruker Maldi Biotyper	Bruker Billerica, Massachusetts USA

Tabelle 13 Mikrobiologische Analyse

4 Methoden

4.1 Tierexperiment

4.1.1 Versuchstiere und Haltung

Das Tierexperiment wird mit 40 männlichen C57Bl6/J Mäusen (*Mus musculus*) durchgeführt. Sie stammen aus dem Janvier Labor, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich und sind am 20.08.2019 geboren worden.

Die Mäuse erreichen eine Woche vor Beginn des Tierversuches das Gebäude 505 und die Haltung erfolgt gemäß den Richtlinien der Johannes-Gutenberg-Universität (JGU) Mainz. Zwei bis drei Mäuse werden in einen Typ II Filtertopkäfig gesetzt. Diese sind mit entkeimten Holzspänen als Einlage, je einer wassergefüllten Trinkflasche und getrockneten Futterpellets ausgestattet. Sowohl Flüssigkeits- als auch Nahrungsaufnahme erfolgt ad libitum. Erleichtert wurde die Nahrungsaufnahme gegebenenfalls an den ersten Post-OP Tagen durch Aufweichen der Futterpellets mit Wasser. Als Unterstützung zum Nestbau wurde ein Zellstoff-Papierhandtuch und ein Polyvinylchloridrohr als Rückzugsoption beigelegt.

Bei einer Umgebungstemperatur von 22°C und einer konstanten Luftfeuchtigkeit bei 55% sorgt eine adaptierte Beleuchtung für einen 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus. Alle Versuche, Eingriffe und Beobachtungen wurden in der Tagphase (6-18Uhr) durchgeführt.

Vor Start des Tierexperiments wurde am Translational Animal Research Center der JGU ein Ausbildungsprogramm erfolgreich absolviert, um den sicheren Umgang mit den Tieren zu gewährleisten. Modul 1 umfasste Grundkenntnisse in Pflege, Betreuung und tierschutzgerechter Tötung von Versuchstieren. Modul 2 hingegen beinhaltet die Probenentnahme, Applikation von Medikamenten und Anästhesie bei Versuchstieren.

4.1.2 Genehmigung und Studiendesign

Der Tierversuchsantrag zur Durchführung der experimentellen Studie wurde nach §8 des deutschen Tierschutzgesetz (Fassung vom 18.05.2006) gestellt. Das Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz genehmigte den Antrag mit dem Aktenzeichen G 19-1-027.

Im Rahmen der durchgeführten Studie wurden die 40 Versuchstiere in zwei Gruppen mit dem Unterscheidungsmerkmal der Art des Operationsverfahren randomisiert. 24 Mäuse erhielten einen operativen Eingriff mit einem kontrollierten Hirnschaden. Im Laufe des fünftägigen postoperativen Beobachtungszeitraums wurde bei 12 Versuchstieren die Medikamente Amoxicillin/Clavulansäure, Vancomycin und Nystatin p.o. appliziert. Dies wurde täglich frisch in 100 ml Trinkwasser angesetzt und ab dem ersten postoperativen Tag bereitgestellt (Gruppe D: CCI/AB, n=12). Den anderen Mäusen mit kontrolliert zugeführtem Hirnschaden wurde

weiterhin normales Trinkwasser verabreicht (Gruppe C: CCI/Vehikel, n=12). Bei den übrigen 16 Mäusen erfolgte ein Scheineingriff (Sham). Die Abläufe unterscheiden sich hierbei durch das Fehlen der Kraniotomie und der erfolgten Hirnschädigung durch den Impactor. Auch hier wurde der einen Hälfte der Gruppe die Medikamente in 100m Wasser täglich frisch angesetzt (Gruppe B: SHAM/AB, n=8), wohingegen die andere Gruppe Wasser erhielt (Gruppe A: SHAM/Vehikel, n=8).

Gruppe	OP	Substanz	Anzahl(n)
A	sham	Vehikel	8
B	sham	AB	8
C	CCI	Vehikel	12
D	CCI	AB	12

Tabelle 14 Übersicht Versuchsgruppen

4.1.3 Invasive Maßnahmen

Die Basis des Tierversuchs und der Datenerhebung bildet die Operation, bei der ein kontrollierter Schaden des Hirngewebes entsteht, respektive der Scheineingriff in der Gruppe SHAM, bei dem die Schädeldecke unversehrt bleibt. Die präoperativen Maßnahmen sind bei beiden Gruppen identisch.

4.1.3.1 Anästhesiologische Operationsvorbereitung

Den Versuchstieren wurden zunächst 30 Minuten präoperativ Carprofen (4mg/Kilogramm Körpergewicht (kgKG)) subcutan (s.c.) appliziert. Zunächst werden alle Geräte auf Funktion überprüft. Es erfolgt darauf die Narkoseeinleitung mit Sauerstoff und Beimischung des Inhalationsanästhetikum Isofluran mit einer Konzentration von 4Vol% über 60 Sekunden. Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgt mit 1-2 Vol %. Um einer Hypothermie entgegenzuwirken, befinden sich die Mäuse auf einer Wärmematte mit konstanter Temperatur von 37°C. Vor der Platzierung im Stereotakt erfolgt die s.c. Injektion von 5 mg pro kgKG Lidocain 0,5% temporal. Der stereotaktische Rahmen dient der festen Fixierung während des Eingriffs. Um die Narkosetiefe zu prüfen, wird der Zwischenzehenreflex der hinteren Gliedmaße versucht auszulösen. Ist dieser erloschen kann man von einer ausreichenden Tiefe der Narkose unter erhaltener Spontanatmung ausgehen. Durch das Auftragen einer Augensalbe verhindert man das Austrocknen der Augen.

4.1.3.2 Controlled Cortical Impact

Der operative Eingriff beginnt mit der Eröffnung der Schädelkalotte median auf einer Länge von etwa 1 Zentimeter (cm). Der Schnitt erfolgt von der vorderen (Bregma) bis zur hinteren (Lambda) koronaren Schädelnaht. Danach wird die rechte Schädelkalotte paramedian frei präpariert. Das freigelegte Periost wird durch ein Wattestäbchen an den Rand des Präparationsgebiet geschoben. Mittels eines Mikrobohrers erfolgt die Kraniotomie entlang der vorderen Schädelnaht, dem lateralen Arcus zygomaticus und der hinteren Lambdanaht. Die mediane Seite des gefrästen Rechtecks bleibt unberührt, da diese Stelle als Scharnier zum Aufklappen benötigt wird. Während des bisherigen Eingriffs sollen die nun zum Vorschein kommende Dura mater und darunter liegende Strukturen unverletzt bleiben.

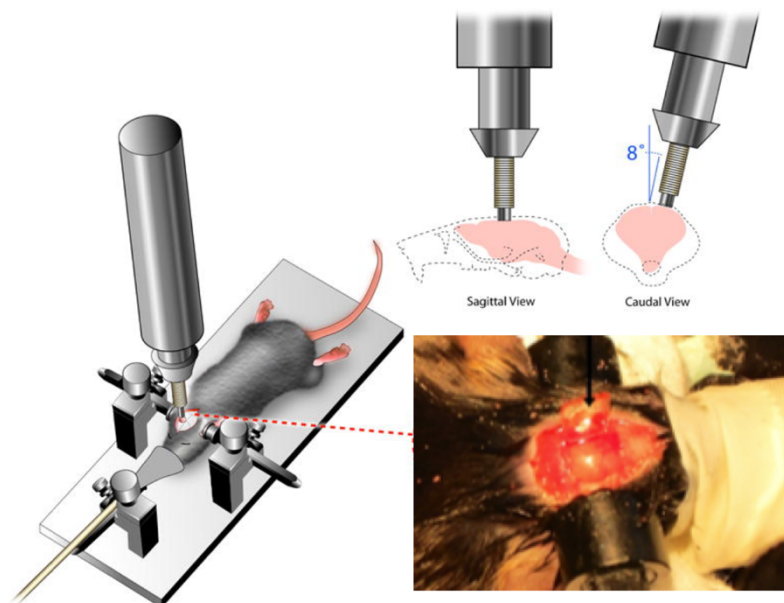


Abbildung 10 Zeichnung eines CCI Impactors mit Fixierungseinrichtung und Darstellung der freigelegten Dura mater nach Kraniotomie (modifiziert nach Onyszchuk(198))

Das SHT und der damit verbundene Schaden am Hirngewebe entsteht durch einen CCI-Impactor. Dieser wird senkrecht über die freigelegte Hirnoberfläche ausgerichtet. Das Gerät besteht aus einem elektromagnetischen Bolzen mit einem Durchmesser von etwa 3 Millimeter (mm). Nach Auslösung des Impactors dringt der Bolzen stumpf in das freigelegte Hirngewebe mit einer Geschwindigkeit von 6 Meter pro Sekunde(m/s) und einer Impacttiefe von 1,5mm ein. Die Aufpralldauer beträgt 200 Millisekunden(ms). Abbildung 12 zeigt den gesamten Versuchsaufbau (198).

Nach erfolgtem Impact wird die aufgeklappte Kalotte in ihre ursprüngliche Position gebracht und mit Histo-Acryl Kleber versiegelt. Der Vorgang sollte möglichst zügig erfolgen, da es in Folge des Traumas zu einem Anschwellen der Hirnmasse kommt. Der angebrachte stereotaktische Rahmen zur Fixierung des Schädels wird gelöst und die Haut mit einer Einzelknopfnahmt verschlossen. Zur postoperativen Überwachung werden die Versuchstiere für 2 Stunden in einen Inkubator bei 35°C verbracht. Die Mäuse können sich so unter optimalen Bedingungen erholen, bevor sie zurück in die Käfige gelangen.

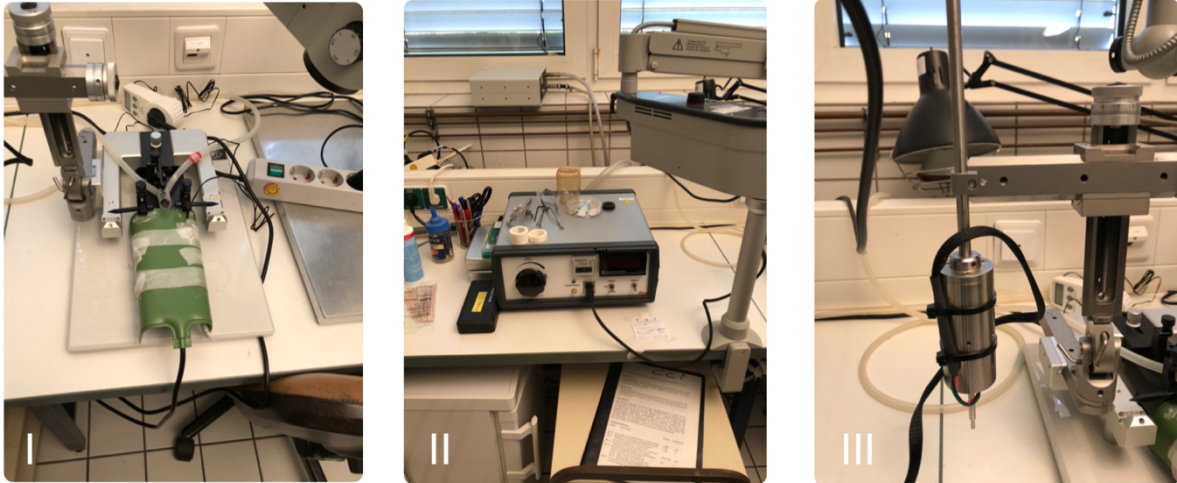


Abbildung 11 Operationsarbeitsplatz

I Stereotaxierahmen und Heizplatte

II Bedienelement des CCI-Impactor, bei der Geschwindigkeit und Applikationszeit eingestellt werden

III Impactormodul mit Spitze und Haltevorrichtung

4.1.3.3 Scheineingriff

Die SHAM-Tiere durchliefen alle präoperativen, postoperativen und anästhesiologischen Teilschritte inklusive der Kalottenpräparation, jedoch ohne Kraniotomie und Setzen eines CCI. Das Periost wurde mit einer Pinzette angeraut. Wundverschluss erfolgte ebenfalls durch Einzelknopfnahmt.

4.1.4 Erheben des Körpergewichts und Score-Sheet

Ein wichtiger Marker für den Ernährungszustand und dem Wohlergehen der Mäuse ist das Körpergewicht. Dieses wurde mittels eines Punktesystems bewertet („Score Sheet“). Das Score Sheet dient zur prospektiven Festlegung von versuchsbedingt zu erwartenden Symptomen und damit verbundenen Belastungen für das Einzeltier. Darüber hinaus definiert es den Versuchsabbruch, wenn die Belastung für das Tier eine festgelegte Höchstgrenze überschreitet. Es besteht aus den 4 Kategorien: Körpergewicht, Allgemeinzustand, Spontanverhalten und versuchsspezifische Kriterien. Die Kategorien werden mit unterschiedlichen Punkten bewertet. Steigt der Score über 20 Punkte an, muss das

Versuchstier sofort getötet werden. In diesem Experiment betrug der Score durchgehend 0-5, sodass kein Intervenieren erfolgte.

4.1.5 Stuhlprobenentnahme und mikrobiologische Analyse

Bei zufällig ausgewählten Mäusen erfolgte aus jeder Versuchsgruppe präoperativ und an Tag 5, den Tag der Euthanasie, die Asservierung einer Stuhlprobe, um stichprobenartig das Mikrobiom der Mäuse zu untersuchen. Während die Mäuse ihren Neuroscore erhalten oder sich in der Ethovision-Arena aufhalten, wurde der Kot gesammelt und je 200 mg Kot in einem Eppendorf Gefäß gesammelt. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurde dies unter hygienischen Bedingungen durchgeführt. Diese gelangen anschließend umgehend in das mikrobiologische Labor der JGU zur differenzierten Stuhlanalyse. Die entnommenen Proben wurden mit einer Natriumchloridlösung homogenisiert und auf unterschiedliche Agarplatten übertragen. Aerobe Platten wurden für zwei Tage und anaerobe Platten für vier Tage bei einer Temperatur von 37 °C inkubiert und im Anschluss die kultivierten Bakterienkolonien mittels Massenspektrometrie quantifiziert. Ziel dieser Analyse der Stuhlproben war es die mikrobielle Vielfalt vor und nach der Intervention zu vergleichen.

4.1.6 Medikamentengabe

Die Medikamente wurden täglich in 100 ml frischem Wasser angesetzt und in die Trinkflasche der Antibiosegruppen nach Pipettierschema gefüllt. Die Applikation erfolgte somit per os und ad libitum. Die Trinkmengenanalyse je Käfig wurde täglich durchgeführt. Das Pipettierungsschema für die Medikamentenapplikation wird in Tabelle 13 dargestellt. Der Vehikelgruppe wurden 100ml reines Trinkwasser in einer Flasche zur Verfügung gestellt.

Medikament/Wasser	Medikamentengruppe	Menge auf 100ml Wasser	fertige Suspension
Amoxicillin- Clavulansäure	Antibiotikum + Beta-Laktamase-Inhibitor	100mg	3,2ml
Vancomycin	Antibiotikum	50mg	1,0ml
Nystatin	Antimykotikum	100000 IU	1,0ml
Wasser		94,5ml	
		Gesamt	99,7ml ≈ 100ml

Tabelle 15 Pipettierungsschema

4.1.7 Verhaltensbiologische Untersuchung

4.1.7.1 Neuro-Score

Der Neurological severity score (NSS) dient zur Beurteilung neuromotorischer Fähigkeiten. Er wird modifiziert nach Tsenter et al. durchgeführt (199). Durch Erhebung des Scores kann die durch Hirnschädigung hervorgerufene Beeinträchtigung und deren Progression objektiv quantifiziert werden. Je nach Schwere des Defizits erhält die Maus ein bis zwei Punkte. Daraus ergibt sich ein Maximalscore von 15. Dies entspricht einer maximal neurologischen Beeinträchtigung. Erhält die Maus den Minimalscore von null, ist sie symptomfrei und ohne Einschränkungen. Der Neuroscore wird präoperativ (preop), sowie am ersten (d1), dritten (d3) und fünften (d5) postoperativen Tag erhoben. Er beinhaltet folgende klinische Testungen:

- Reflexe: Zusammenzucken der Maus bei lautem Geräusch (Händeklatschen)
- Generelles Verhalten: Neugier, Gehfähigkeit und Erkundungsverhalten der Maus
- Koordination: Zurücklegen einer Strecke von 40 cm mit abnehmender Breite des Stegs (3 cm, 2 cm, 1 cm)
- Balance: Festhalten der Maus für mindestens 10 Sekunden an einem eckigen und runden Stab
- Motorisches Defizit: Achten auf mögliche fokale bzw. hemiparetische Defizite



Abbildung 12 Versuchsaufbau Neuroscore

I Koordinations- und Gangüberprüfung auf schmal werdende Balken (3cm > 2cm > 1cm) über 40cm

II Festklammern an Balancestäbe (rund und eckig) über mind. 10 Sekunden

III Waage zur Gewichtsbestimmung

4.1.7.2 Rota-Rod

Um die Ausdauer, die Greifkraft und motorische Fähigkeit der Versuchstiere zu testen, kommt die Methode des Rota-Rod zum Einsatz. Die Maus wird hierbei auf einen geriffelten, sich drehenden Zylinder gesetzt. Der Durchmesser des Zylinders beträgt ca. 3 cm. Die Rotationsgeschwindigkeit steigt im Laufe des Durchgangs von 4 Umdrehungen pro Minute (U/m) auf 40 U/m konstant an. Dokumentiert werden die Zeit und die letzte Rotationsgeschwindigkeit, bei der die Maus sich nicht mehr halten kann und fällt. Da dieser

Bewegungsablauf für die Mäuse sehr ungewohnt ist, werden am ersten präoperativen Tag vier Trainingsdurchgänge durchgeführt und im Anschluss die ersten beiden Testläufe für den präoperativen Tag. Dies wird an Tag(d)1, d3 und d5 mit jeweils zwei Durchgängen wiederholt.

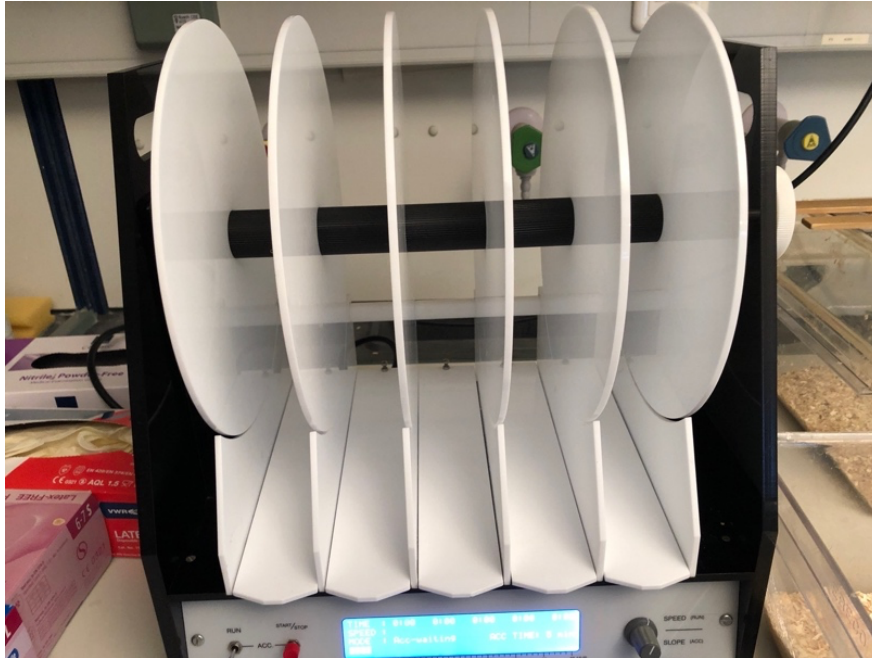


Abbildung 13 Rota-Rod

4.1.7.3 Exit from the circle

Dies wurde im Rahmen des Neuroscores durchgeführt. Die Maus wird hierbei in die Mitte der Ethovision Arena gesetzt. Das Programm setzt in die Mitte der Arena einen virtuellen Kreis und detektiert die Maus. So wird quantifiziert, wie oft die Maus den virtuellen Kreis verlässt, insbesondere die Latenzzeit bis zum ersten Verlassen der frei liegenden Mitte der Arena, die für die Maus als Beutetiersicht ein gefährliches Areal darstellt. Zudem kann die zurückgelegte Strecke und Geschwindigkeit der Versuchstiere gemessen werden. Eine Maus ohne neurologisches Defizit ist sehr aktiv und es kommt gehäuft zu Durchquerungen des Kreises. So werden Aktivität und Motorik der Maus objektiviert. Nach Ablassen der Maus in die Mitte, möglichst sanft und ohne Stress, startet die Aufnahmedauer von drei Minuten. Dies wird für jede Maus einzeln durchgeführt. Es findet an den Tagen gemeinsam mit dem Neuroscore statt. Im Anschluss wird die Maus entnommen und die Arena gereinigt.

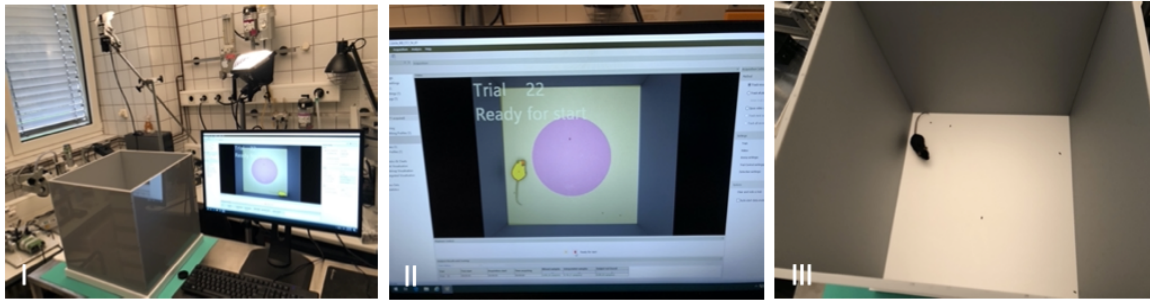


Abbildung 14 Versuchsaufbau "Exit from the Circle"

- I Gesamter Versuchsaufbau mit Arena, Kamera und PC
- II PC Monitor mit detektierter Maus und virtuellem Kreis in der Mitte der Arena
- III Innere Teil der Arena während eines Durchgangs mit einem Versuchstier

4.1.7.4 Novel object recognition test (NORT)

Der NORT ist ein häufig verwendeter Verhaltenstest zur Untersuchung verschiedener Aspekte des Lernens und Gedächtnisses bei Mäusen. Allgemein ist der NORT ein stressarmer und effizienter Gedächtnistest. Es können so neuropsychologische Veränderungen detektiert werden (200). Eine wichtige Rolle für Funktion und Aufbau des Gedächtnisses spielt der Hippocampus. Somit könnte im Rahmen des NORT auch die Funktionsfähigkeit des Hippocampus untersucht werden (201).

Der Test wird postoperativ an d4 durchgeführt und besteht aus drei Phasen. In Phase I (Habituerungsphase) werden alle Tiere aus einem Käfig für 15 Minuten in die Arena gesetzt, um sich so an die Umgebung zu gewöhnen. Dies geschieht mit allen Käfigen nacheinander. In Phase II (familiar object) werden zwei identische Objekte in der Arena platziert. In diesem Versuch wurden zwei unterschiedliche Gegenstände aus Plastik verwendet. Jede Maus wird nun fünf Minuten in die Arena gesetzt. Das Programm erkennt, wie oft das Versuchstier mit dem Objekt interagiert. Bei Phase II (novel object) wird nun ein bekanntes Objekt gegen ein neues ersetzt. Welches bekannte Objekt ersetzt wird erfolgt randomisiert. Dies geschieht zwei Stunden nach Phase I. Die Maus wird erneut für fünf Minuten in die Arena gesetzt. Nach jeder Maus wird die Arena gereinigt.

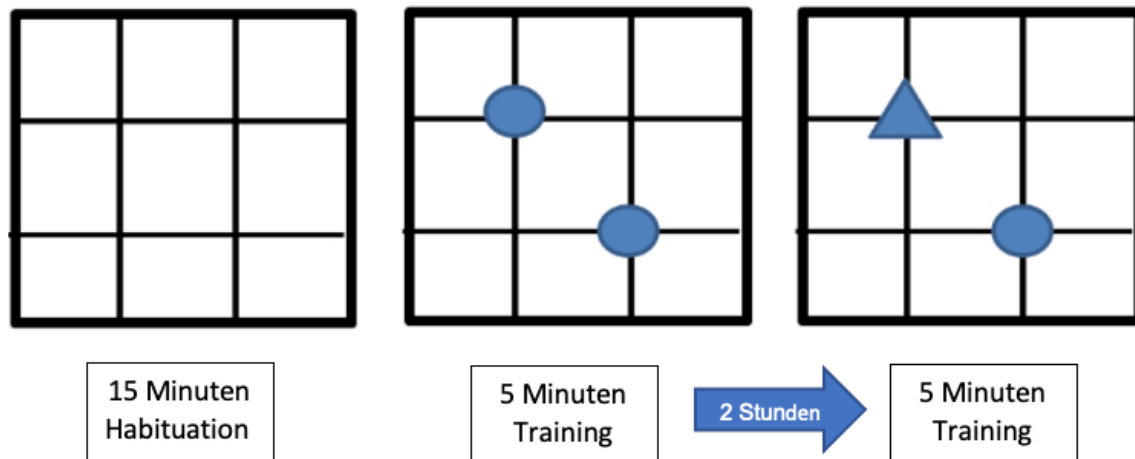


Abbildung 15 Versuchsschema NORT (modifiziert nach Lueptow (200))

4.1.7.5 Euthanasie

Am fünften postoperativen Tag erfolgt die Euthanasie der Versuchstiere. Hierbei kommt es zu einer Blutentnahme und Gehirnentnahme zur weiteren histologischen Untersuchung. Die Tiere werden zunächst 90 Sekunden mit Isofluran (4Vol%) anästhesiert, sodass ein Zustand tiefer Bewusst- und Schmerzlosigkeit entsteht. Es folgt die Dekapitation mithilfe einer Schere. Nach der Dekapitation wird das Blut aus dem restlichen Corpus in einem 50ml Falcon-Röhrchen aufgefangen und anschließend zentrifugiert. Das Plasma wird abpipettiert und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit einem Heparin-Zusatz von 80ul (5000IE/ml) gelagert. Um das Gehirn möglichst behutsam zu entfernen, wird im ersten Schritt die Kopfhaut in sagittaler Richtung aufgeschnitten. Daraufhin wird das Cranium vom Foramen magnum aus von occipital nach rostral aufgebrochen, bis das Hirn freiliegt. Bevor das Hirn entnommen wird, müssen die ventralen Hirnnerven durchtrennt werden. Im Anschluss wird das Gehirn auf Trockeneis schockgefroren und bei $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Eisschrank gelagert. Des Weiteren werden den Versuchstieren Kolon, terminales Ileum und Caecum entnommen, um eventuelle histologische und expressionsanalytische Untersuchungen anstellen zu können.

4.2 Histologische Datenerhebung

4.2.1 Kryosektion und Probengewinnung

Um das entnommene Gehirngewebe genauer zu analysieren, werden diese im Kryostat bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ geschnitten. Dies erfolgt in koronarer Schnittführung. Nach schneller Entnahme des Gehirns aus dem Kühlschrank wird dieses mit einem Einbettungsmedium (Tissue Tek) in der Mitte des Objekthalter positioniert. Nach Einspannung des Objekthalter wird das Gehirn senkrecht zum Messer ausgerichtet. Um im weiteren Verlauf verschiedene histologische Färbungen durchführen zu können, werden je Versuchstier sechs Serien von $12\text{ }\mu\text{m}$ Schnitten auf die Objektträger (OT) aufgenommen. Insgesamt werden pro Gehirn 16 koronare Ebenen im Abstand von $500\text{ }\mu\text{m}$ aufgenommen. Den Beginn markiert die Ebene bei Bregma + 3,14

mm. Ebene 1 bis 10 werden auf OT A aufgenommen und 11 bis 16 auf OT B. Bis zur Färbung werden die Objektträger bei -20°C weggefroren und in einer OT-Box beschriftet aufbewahrt.

Die Gewebe für die Proteinanalyse und der molekularbiologischen Untersuchung werden als sogenannte Trimschnitte entnommen. Zwischen Ebene 6 und Ebene 13 werden $6 \times 40 \mu\text{m}$ Schnitte direkt hintereinander geschnitten und in gleicher Ausrichtung aufeinandergestapelt. Dies ergibt insgesamt eine Schnittdicke von $240 \mu\text{m}$. Das untere Drittel wird mittels eines Skalpell abgetrennt und das übrige Gewebe in eine ipsiläsionale und kontraläsionale Seite geteilt. Diese werden seitengetrent in einem Kryoröhrchen aufbewahrt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

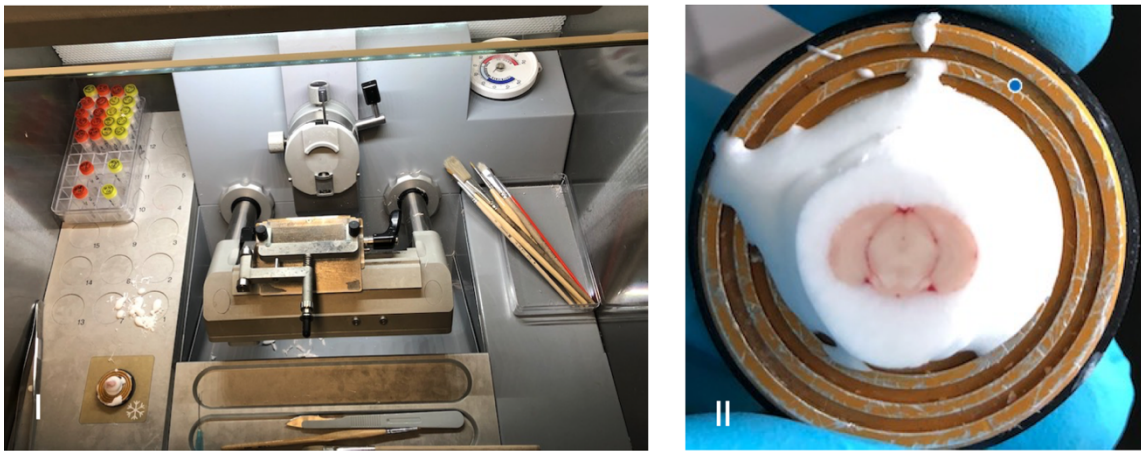


Abbildung 16 Kryostat

I Kryostat mit Messer und verstellbare Halterung für den Gehirnträger
II Gefrorenes Gehirn während des Schneidens mit Tissue Tag umgeben

4.2.2 Kresylviolett-Färbung nach Nissel

Um das Läsionsvolumen ermitteln zu können werden die angefertigten Gehirnschnitte mittels Kresylviolett angefärbt. Dieser Vorgang wird auch als Nissl-Färbung bezeichnet. Hierbei werden intakte Neuronen violett eingefärbt, indem es zu einer Anlagerung an basophile Substanzen kommt. Zu den basophilen Substanzen zählen u.a. Ribosomen, RNA und DNA.

Die gefrorenen Hirnschnitte werden eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet und mit Ethanol (70%) von überschüssigen Gewebekleber gesäubert. Im Anschluss gelangen die OT für 5min in die Kresylviolett-Färbelösung. Darauf folgt die Reinigung durch zweimaliges Eintauchen in destilliertes Wasser. Es folgt das Entwässern der Hirnschnitte durch jeweils zweimaliges Eintauchen in Lösungen von 70%, 96% und 100% Ethanol. Fixiert werden die Schnitte durch ein fünfminütiges und zweiminütiges Eintauchen in jeweils einen neuen Behälter Roti-Histol. Abschließend werden die OT mittels Deckglases und Roti-Histokitt eingebettet, um die gefärbten Schnitte zu schützen.

4.2.3 Bestimmung Kontusionsvolumen

Vor der Flächenbestimmung werden die gefärbten Hirnschnitte mikroskopisch dargestellt und fotografiert. Die zu bestimmenden Flächen der Schnitte werden mithilfe der Software *Zen 3.0* (blue edition) ermittelt. Im ersten Schritt wird die Gesamtfläche der kontraläsionalen Seite

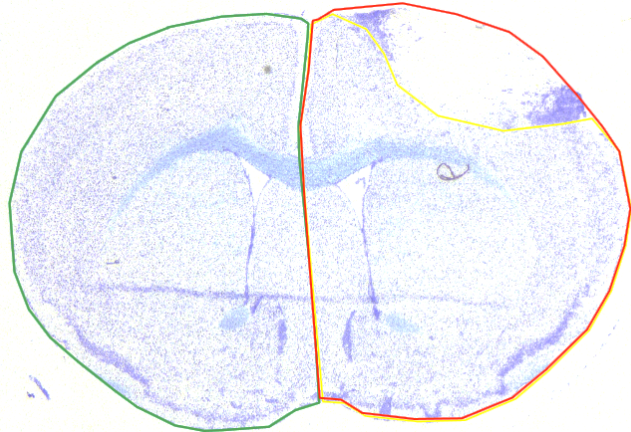


Abbildung 17 Ermittlung Schadensvolumen (Ebene 7, #20)

Dieses Bild zeigt den Coronarschnitt der Ebene 7. Die grüne Fläche zeigt die kontraläsionale intakte linke Hemisphäre. Die gesamte ipsiläsionale Hemisphäre ist rot umrandet und die intakte ipsiläsionale Fläche gelb.

bestimmt. Die Kontusionsfläche einer Ebene (A_x) wird folgendermaßen berechnet. Auf der ipsiläsionalen Seite wird die Differenz aus der gesamten rechten Hemisphäre (rot) und dem intakten Teil des Gehirngewebes (gelb) gebildet. Abgestorbenes Gewebe erscheint hierbei hell, vitales hingegen violett. Die Schadensflächen jeder Ebene werden addiert und anschließend mit dem Abstand der Schnitte ($500\mu\text{m}$) multipliziert. Das gesamte Kontusionsvolumen V_A berechnet sich somit durch folgende Formel:

$$V_A = \sum_1^{16} A_x \times 500\mu\text{m}$$

4.2.4 Dickemessung Körnerzellschicht des Gyrus dentatus

Ebenfalls in der Nissl-Färbung wird die Dicke der Körnerzellschicht im suprapyramidalen Blatt des Gyrus dentatus gemessen. SHT induziert den Zelluntergang in der Granularzellschicht des Gyrus Dentatus und reduziert die elektrophysiologische Aktivität der Neuronen(9). Der Zelluntergang kann durch die Dickemessung des Gyrus Dentatus quantifiziert werden. In zwei Schnittebenen pro Versuchstier, meist zwischen Ebene 11 und 13, werden ipsi (rot)- und

kontraläsional (grün) an vier verschiedenen Stellen die Dicke gemessen: Innen (I), Mittig (M), Außen (A) und dünnste Stelle (D). Die Messlinie wird hierbei senkrecht zur Struktur angesetzt.

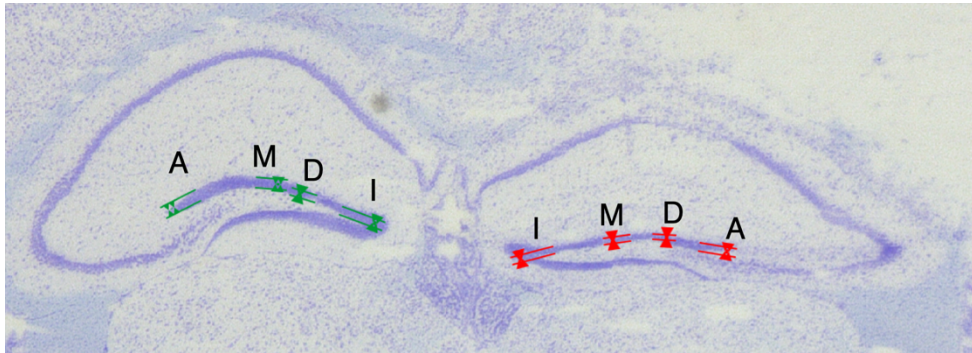


Abbildung 18 Messung der Granularzellschicht des Gyrus dentatus an vier verschiedenen Stellen

4.2.5 Immunhistochemische Färbung

Das grundlegende Prinzip der Immunhistochemie beruht auf dem Prinzip der indirekten Fluoreszenzmarkierung von nachzuweisenden Proteinen. Das Binden des primären Antikörpers an bestimmte Epitope von Proteinen markiert den ersten Arbeitsschritt. Sekundäre AK, konjugiert mit Fluoreszenzfarbstoff, binden an den primären AK und werden nach Anregung durch Licht bestimmter Wellenlänge sichtbar.

In der vorliegenden Studie werden zwei immunhistochemische Färbungen als Doppelfärbung durchgeführt. Das saure Gliafaserprotein (GFAP) als Marker für aktivierte Astrozyten und das ionisierende calciumbindendes Adaptermolekül 1 (IbA1) als spezifischer AK für Makrophagen und Mikroglia, der zudem nicht kreuzreagibel mit Neuronen und Astrozyten ist. Das Procedere findet an zwei aufeinanderfolgenden Tagen statt.

Tag 1

Zunächst werden die zu färbenden Schnitte 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet, bevor sie 10 Minuten mit Paraformaldehyd (PFA,4%) fixiert werden. Darauf werden die OT 3x3 Minuten in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Anschließend werden die Schnitte 30 Minuten in einer Feuchtkammer mit einer Blockierlösung (5% NGS, 1% BSA in PBST) inkubiert. Dies verhindert eine unspezifische Proteinbindung im weiteren Verlauf. Nun erfolgt die Zugabe des primären AK. Dieser inkubiert über die Nacht bei 4°C.

Tag 2

Erster Schritt am zweiten Arbeitstag ist das Entfernen der ungebundenen AK durch 3x zehnmütiges Waschen in PBS. Nun werden die sekundären AK dazugegeben und inkubieren zwei Stunden bei Raumtemperatur. Erneut werden die ungebundenen AK durch dreimal zehnmütiges Waschen mit PBS entfernt, bevor sie für fünf Minuten mit DAPI (1:100.000) inkubiert werden. Abschließend wird fünf Minuten mit PBST gewaschen, um

überschüssige Fluoreszenz zu entfernen. Mit Immunmount werden die OT eingedeckelt und über Nacht im Kühlschrank bei 4°C getrocknet, bevor sie am Folgetag mit Nagellack versiegelt werden. Weitere Lagerung hat zum Schutz der Fluoreszenzmarkierung im Dunkeln zu erfolgen.

4.2.6 Quantifizierung der Immunhistochemie

Mithilfe eines konfokalen Mikroskops wird das gefärbte Gewebe mit unterschiedlichen Wellenlängen sowohl auf der ipsiläsionalen als auch auf der kontraläsionalen Seite in 20-facher Vergrößerung untersucht. Dafür werden die Ebenen zwischen 11 und 13 ausgewählt, jedoch nur zwei fließen in die Auswertung ein., abhängig von der Färbequalität und der größtmöglichen Läsionsdarstellung.

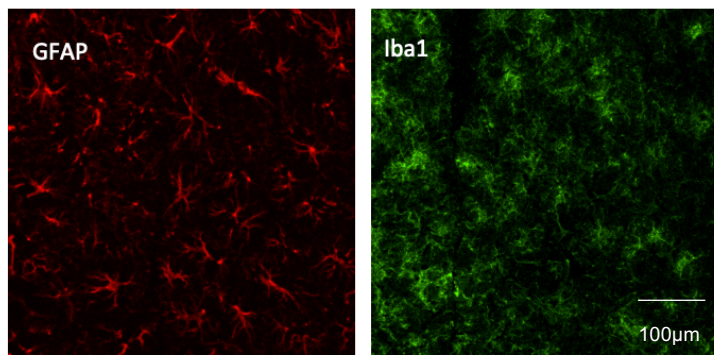


Abbildung 19 Darstellung der GFAP(links)- und Iba1(rechts) Fluoreszenz

Wie Abbildung 20 zeigt, ist die zu untersuchende Region periläsional und im zerebralen Kortex gelegen (rotes Rechteck). An der Hemisphärengrenze gespiegelt findet sich die Region der kontraläsionalen Seite (grüne Rechteck). Bei den Sham-Mäusen fehlt die Läsion, sodass

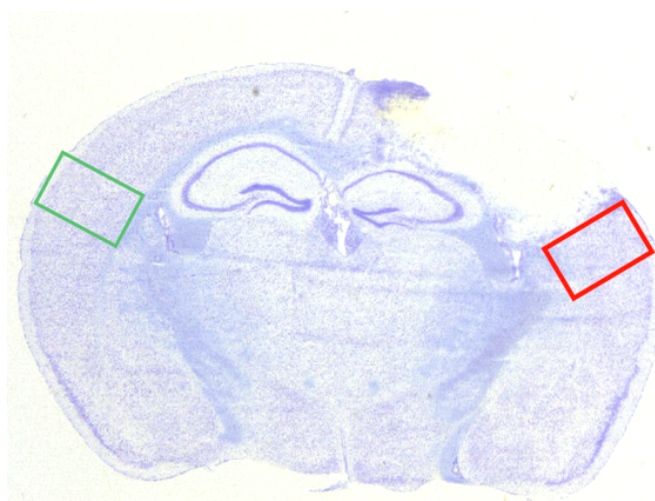


Abbildung 20 Zu analysierendes Areale der Immunfluoreszenzfärbung

analoge Regionen ohne Läsion untersucht werden. Die Auswertung der Zellen erfolgt mittels ImageJ. Positiv markierte Zellen können so ausgezählt werden. Eine immunreaktive Struktur

wird von der Software bei einer Größe von 20 bis 1000 Pixel in die Auswertung inkludiert und mittels Partikel-count Plug-in ausgezählt. Die Hemisphären werden bei der Auswertung getrennt betrachtet. Für eine quantitative Vergleichsanalyse wird u.a. die Zellzahl pro mm² oder der Anteil positiv markierter Flächen zur Gesamtfläche bestimmt.

4.3 Molekularbiologische Methode

Ein Schädeltrauma hat zahlreiche Veränderungen in der Expression verschiedener Gene zur Folge. Für die weiteren molekularbiologischen Analysen wird die Genexpression im Hirngewebe aus den ipsiläsionalen Trimmchnitten untersucht. Neben der Analyse des Hirngewebes, wird auch das entnommene Kolon der Mäuse auf veränderte Genexpressionen untersucht, um die Antibiotika- und Trauma Auswirkungen zu detektieren.

4.3.1 Extraktion Ribonukleinsäure aus Hirn und Colon

Der erste Schritt ist die Extraktion der RNA aus dem Hirn- und Kolongewebe. Die unterschiedlichen Arbeitsschritte sind bei beiden Gewebetypen gleich. Folgende Arbeitsschritte erfolgen unter einem Laborabzug. Die Extraktion findet mithilfe des RNeasy Plus Universal Kit von Qiagen statt. Das tiefgefrorene Gewebe wird in ein 2 ml Tube gegeben und mit einer Metallkugel versehen. Zusätzlich werden 0,9 ml Qiazol Reagenz dazugegeben. Das Gewebe wird darauf im Mastermill 2x1 Minute bei 20 Hz zerkleinert. Es folgt ein fünfminütiges Stehenlassen bei Raumtemperatur. Anschließend werden 100µl gDNA Eliminator dazugegeben und 15 Sekunden gevortext, dies wird mit 180µl Chloroform wiederholt und 2 bis 3 Minuten inkubiert. Zur Phasenauftrennung wird das Gemisch 15 Minuten bei 4°C und 12000 x g-Kraft (g) zentrifugiert. Danach sind drei Phasen sichtbar. Die untere rötliche organische Phase mit lysierten Proteinen und die mittlere milchige Interphase mit DNA werden für die weiteren Arbeitsschritte nicht benötigt. Die wässrige und farblose Phase wird ab pipettiert (ca. 600 µl) und zu 600µl Ethanol (70%) in ein neues Eppendorf-Gefäß gegeben und kurz gemischt. Die entstandene Lösung wird in eine Mini-Spin-Säule mit einer RNA-selektiven Silikatmembran pipettiert. Durch die Zugabe von Ethanol (70%) wird das Anheften der RNA an der Membran begünstigt. Dies geschieht durch eine Zentrifugation bei Raumtemperatur für 15 Sekunden mit 8000 x g. und dem Verwerfen des Durchlaufs. Die RNA wird nun weiter aufgereinigt, indem 700 µl RWT Puffer mit Zentrifugation (15 Sekunden bei 8000 x g) dazugegeben werden und anschließend wird dies zweimalig mit 500 µl RPE und Zentrifugation (15 Sekunden bzw. 2 Minuten, 8000 x g) wiederholt. Nach einem Wechsel des Auffangröhrchens werden die Membranen eine Minute bei maximaler Geschwindigkeit in der Zentrifuge getrocknet. Der letzte Schritt der Extraktion beinhaltet den erneuten Wechsel des Auffangröhrchens und die Zugabe von 30 µl Wasser, welches vorsichtig möglichst kontaktlos auf die Membran pipettiert wird. Abschließend wird die Lösung eine Minute bei 10000 x g

zentrifugiert. Das entstandene Eluat enthält die isolierte RNA und wird nach der Konzentrationsbestimmung bei -80°C gelagert.

4.3.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Bei der photometrischen Konzentrationsbestimmung wird das RNA-Eluat auf seine RNA-Konzentration (c_{RNA}) und den Reinheitsgrad geprüft. Dafür werden 2MI des Eluats auf ein Photometer gegeben und die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260nm gemessen. Dies entspricht dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren. Bei einer OD_{260} von 1,0 entspricht die Konzentration 40 Mikrogramm (μg) pro ml ($\mu\text{g/ml}$). Daraus ergibt sich folgende Formel zur Berechnung der c_{RNA} .

$$c_{\text{RNA}} = OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$$

Die Reinheit des Eluats wird durch Division der optischen Dichten bei 260nm durch die Optische Dichte bei 280nm für die Kontamination mit Proteinen und durch die optische Dichte bei 230nm für die Kontamination mit DNA bestimmt. Die Quotienten aller Gewebeproben befanden sich in einer Range von 1,8 bis 2,2 und sind somit für die Synthese der komplementären DNA (cDNA) ausnahmslos geeignet. Für die photometrische Bestimmung des Kolongewebes muss das Eluat vorher mehrmals mit Wasser individuell verdünnt werden, da sonst die Konzentration den Messbereich des Photometers überschreitet.

4.3.3 Synthese der komplementären Desoxyribonukleinsäure

Durch den Vorgang der reversen Transkription werden jeweils 1 μg der extrahierten RNA in cDNA umgeschrieben. Diese dient als Vorlage für die quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR). Die extrahierte RNA hat somit die Funktion einer Matrize. Für die Synthese der DNA wird das QuantiTect Reverse Transcription Kit von Qiagen benutzt. Um den RNA-Abbau entgegenzuwirken, werden alle Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt.

Zunächst wird die genomische DNA (gDNA) von der extrahierten RNA getrennt und eliminiert. Dafür werden zu den 1 μg der Probe jeweils 2 μl gDNA Wipeout Puffer gegeben, das Gemisch mit RNase freiem Wasser auf 14 μl Volumen aufgefüllt und im Anschluss für 8 Minuten bei 42°C erwärmt. Der folgende Schritt ist die reverse Transkription, für die je Probe ein Amstermix angesetzt wird, mit jeweils 1 μl Quantiscript Reverse Transkriptase, 1 μl RT Primer Mix und 4 μl Quantiscript RT Puffer. Darauf wird der Mastermix zur gDNA- freien RNA-Lösung hinzugegeben und das Gemisch bei 42°C für 30 Minuten inkubiert. Die cDNA-Synthese wird durch das Inaktivieren der reversen Transkriptase gestoppt, indem das Gemisch auf 95°C erhitzt wird. Abschließend wird die synthetisierte cDNA im Verhältnis von 1:1 mit Wasser verdünnt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

4.3.4 Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Die qRT-PCR wird benutzt, um die Kopienanzahl der cDNA zu quantifizieren. Mithilfe dieser Methode können mittels spezifischer Primer Rückschlüsse über die Genexpression einzelner Proteine zum Todeszeitpunkt der Maus gezogen werden. Sie basiert auf dem Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR). Hierbei werden in 20 – 40 PCR-Zyklen DNA-Fragmente amplifiziert. Ein Zyklus wird in drei Teilabschnitte unterteilt. Der Ablauf findet nach einem festen Schema statt und wird mithilfe von Thermocyclern durchgeführt. Zu Beginn werden in der s.g. Denaturierungsphase die intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen der DNA-Stränge bei 95°C getrennt. Damit die daraus entstehenden Einzelstränge sich nicht wieder Zusammenlagern erfolgt ein schnelles Abkühlen auf 65°C. In der zweiten Phase (Annealingphase) binden Primer an spezifische Bindungsstellen, die im Folgenden als Targets bezeichnet werden, und identifizieren dadurch den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt. Die hierbei angewandte Temperatur ist primerspezifisch und liegt etwa bei 60°C. Die Elongationsphase markiert den letzten Schritt. Dabei bindet die DNA-Polymerase bei ihrer spezifischen Temperatur von 68 – 72°C an die Primer. Währenddessen werden die DNA-Bestandteile, desoxygenierte Nukleotide, komplementär zum abgelesenen Einzelstrang eingefügt. Im Anschluss schließt sich eine erneute Denaturierungsphase an und markiert so den Beginn eines neuen Zyklus.

Die qRT-PCR misst in Echtzeit die Menge der jeweiligen DNA-Kopien. Dies basiert auf dem Prinzip der fluoreszenzemittierten Detektion. Es wird zunächst ein an der DNA bindender fluoreszierender Farbstoff hinzugegeben. Zudem auch sequenz-spezifische Hybridisierungssonden. Das Gemisch wird mittels einer Lichtquelle angeregt und das emittierte Signal gemessen. Es besteht eine Korrelation zwischen Signalintensität und der DNA – Kopien. Um das Ganze graphisch darzustellen, wird die Signalemission gegen die Anzahl der PCR – Zyklen aufgetragen. Es entsteht hierbei ein typischer Kurvenverlauf mit drei Abschnitten. In der Anfangsphase steigt der Graph nur minimal aufgrund der langsamen DNA – Amplifikation. Die darauffolgende Wachstumsphase ist durch einen exponentiellen Anstieg gekennzeichnet mit maximaler Amplifikationsrate. Abschließend geht die Wachstumsphase in eine Plateauphase über, in der das Wachstum stagniert. Während der Phase des exponentiellen Wachstums wird mittels des LightCyclers der Crossingpoint (CP) ermittelt. Dieser entspricht der Zyklusanzahl, bei der das Fluoreszenzsignal deutlich ein vorher definiertes Hintergrundrauschen überschreitet. Zudem wird durch selbiges Verfahren eine Standardlösung mit bekannter DNA – Konzentration analysiert und eine Standardkurve generiert. Nach Abgleich mit der Standardkurve errechnet die Software aus dem CP schließlich die DNA – Menge, aus der indirekt die ursprüngliche cDNA – Konzentration der analysierenden Probe ermittelt wird. Die Ansetzung der Proben erfolgt doppelt und im Anschluss wird der arithmetische Mittelwert der Proben bestimmt. Im letzten Schritt wird der

Mittelwert auf das Referenzgen *Ppia* (Cyclophilin A) normiert. Dies ist ein Gen, welches konstant und unabhängig von der zugrundeliegenden Intervention exprimiert wird.

4.3.5 Zielstrukturen im Gehirngewebe

4.3.5.1 GFAP

Das saure Gliafaserprotein ist ein intermediäres Filamentprotein des astrozytären Zytoskeletts. Es ist spezifisch für das Nervensystem und eine erhöhte Expression dient als Indikator für eine Hirnschädigung (202). In Folge einer traumatischen Hirnverletzung wird GFAP hochreguliert. Erhöhte Spiegel des astrozytären Filamentproteins scheinen mit der Schwere des zellulären Untergangs zu korrelieren. Periläsional ist die Hochregulation am höchstem, während sie mit zunehmendem Abstand von der Läsion abnimmt. GFAP fungiert so als Aktivitätsmarker für Astrozyten und Verlaufsmarker reaktiver Astroglie (86, 113, 203).

4.3.5.2 Translokator Protein (TSPO)

TSPO ist ein Protein mit fünf Transmembrandomänen und ist in der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert. Es spielt eine wichtige Rolle bei dem Transport von Cholesterin in den inneren mitochondrialen Raum (204). Nach einer traumatischen Hirnschädigung kommt es ubiquitär im Gehirn zu einer Zunahme der Expression von TSPO. Wahrscheinlich gilt TSPO als Biomarker für die Aktivierung der Mikroglia, die mit mitochondrialen Veränderungen durch den erhöhten Energiebedarf infolge der Zellaktivierung und Zellproliferation einhergeht (205, 206).

4.3.5.3 Serpina3n

Serpina3n ist ein sezernierter Peptidase-Inhibitor, dessen Expression durch Entzündung und Nervenverletzungen induziert wird (207). Im gesunden Hirngewebe ist Serpina3n normalerweise nicht nachweisbar. Die Geninduktion gibt in der frühen Phase Hinweise auf eine astrozytenreaktive Gliose (208).

4.3.5.4 Interleukin 1 β

IL1 β ist ein entzündungsförderndes Zytokin mit zahlreichen biologischen Funktionen, das von unterschiedlichen Zelltypen sezerniert wird. Hierzu zählen beispielsweise zirkulierende Monozyten sowie dendritische Zellen. Nachweislich ist IL1 β an zahlreichen akuten neuronalen Schädigungen und chronischen degenerativen Abläufen nach traumatischer Hirnschädigung beteiligt. Es dient somit als pro-inflammatorischer Marker (209)

4.3.5.5 Ionisierte Calcium-bindende Adaptermolekül 1 (Iba1)

Die mikrogliale Aktivität nach SHT ist eine dynamische Reaktion. Das Iba1 dient als Aktivitätsmarker der Mikroglia. Es wird von Mikrogliazellen und Makrophagen exprimiert. Im gesunden Hirngewebe findet kaum Expression statt. Nach CCI kommt es zu einem Anstieg

der Expression des mikroglialen Markers. Neben Mikrogliaaktivität fungiert Iba1 auch als allgemeiner Inflammationsmarker (210, 211).

4.3.5.6 Tumornekrosefaktor α . (TNF α)

TNF α ist ein proinflammatorisches Zytokin, das bei der Entzündungsregulation im Körper von zentraler Bedeutung ist. Auch bei zahlreichen Pathologien im Gehirn wird es exprimiert und ist am Untergang von neuronalen Zellen beteiligt. Zudem erhöht TNF α in der akuten Entzündungsphase die Mikroglia Proliferation und Phagozytose von Neuronen. Im gesunden Gehirn wird es in sehr geringen Mengen von einer Vielzahl der Gehirnzellen exprimiert, darunter Neuronen, Astrozyten und Mikroglia (212, 213).

4.3.5.7 Major histocompatibility complex II (MHCII)

Beim MHC handelt es sich um Proteine an der Zelloberfläche von Immunzellen, die eine wichtige Rolle bei der Präsentation und Erkennung von Antigenen spielen. Im Gehirn exprimieren Mikroglia MHC der Klasse II, welche entscheidend für die Aktivierung der Mikroglia sind. Ein deutlicher Anstieg von MHC II exprimierenden Mikroglia konnte bei vielen neuropathologischen Erkrankungen nachgewiesen werden. In folgender Arbeit fungiert der MHC II als Biomarker für den Aktivitätszustand der Mikroglia (99, 214).

4.3.5.8 Glucosetransporter 1

Der Glucosetransporter spielt eine wichtige Rolle beim Glucosestoffwechsel und ist daher unverzichtbar für die Energieversorgung, insbesondere nach traumatischen Hirnverletzungen. Bei Säugetieren wurden bisher 14 verschiedene Isoformen gefunden, von denen GLUT1 und GLUT3 vor allem im Gehirn exprimiert werden. Die physiologische Aufgabe des GLUT1 besteht hauptsächlich darin, Glukose durch die Endothelzellen der BHS zu passieren. Posttraumatisch zeigen sich eine erhöhte Expression von GLUT1, da wie Studien zeigten nach SHT ein erhöhter Glucose Bedarf im betroffenen Hirnareal vorhanden ist. Durch die erhöhte Dichte von GLUT1 kann so vermehrt Glucose für die energiegewinnende Glycolyse passieren (215-217).

4.3.5.9 Glutamat Transporter (GLT 1)

Glutamat fungiert im Gehirn als wichtiger exzitatorischer Neurotransmitter. Jedoch schon bei niedrigen extrazellulären Konzentrationen oberhalb des physiologischen Bereichs hat Glutamat eine neurotoxische Wirkung. Der GLT 1 sorgt für die Clearance von extrazellulärem Glutamat und findet sich hauptsächlich bei Astrozyten und Oligodendrozyten. Da in Folge eines SHTs die Glutamat-Konzentration im extrazellulären Raum ansteigt, spielt er eine wichtige Rolle neurotoxische Sekundärschäden zu minimieren. Studien zeigten, dass die Expressionsrate durch Antibiotika gesteigert werden konnte und das Outcome nach SHT verbessert wurde. Es wird im Rahmen der Arbeit u.a. untersucht, ob Antibiotikagabe und

Trauma im Rahmen des CCI die Expression des GLUT 1 am fünften postoperativen Tag beeinflussen (218-220).

4.3.5.10 Interferon γ (IFN γ)

IFN γ ist ein proinflammatorisches Zytokin, das antivirale, antimikrobielle, immunmodulatorische und antitumorale Wirkung zeigt. Die Produktion erfolgt überwiegend von aktivierten T-Zellen und natürliche Killerzellen. In Folge einer traumatischen Hirnschädigung kommt es zur Aktivierung von Astrozyten. Unter Einfluss von IFN γ kann die durch Astrozyten induzierte reaktive Gliose potenziert werden. Zudem wurde in vitro Versuchen gezeigt, dass mit IFN γ stimulierte Astrozyten eine progrediente Neurotoxizität induzieren (221, 222).

4.3.5.11 Vesikuläre Glutamattransporter (VGLUT) I und II

Die Speicherung und Freisetzung von Glutamat im Gehirn wird teilweise durch die VGLUT reguliert. VGLUT I und II sind hierbei die wichtigsten Isoformen (223). Da die extrazelluläre Glutamatkonzentration neurotoxisch wirkt und die beiden VGLUT diese beeinflussen, wird der Einfluss einer Antibiotikatherapie und einer traumatischen Hirnverletzung auf die Expression des VGLUT untersucht.

4.3.6 Zielstrukturen im Colon

4.3.6.1 Prostaglandin-Endoperoxidase Synthase (PTGS) 2

Das PTGS 2 – Gen kodiert für die Cyclooxygenase 2 (Cox 2). Cyclooxygenasen sind hämhaltige Enzyme, die die Umwandlung von Arachidonsäure in bioaktive Prostaglandine induzieren. Es gibt zwei verschiedene Isoformen, die sich in ihrer Struktur unterscheiden. Cox2 ist mitogen induzierbar, wird jedoch in verschiedenen Geweben, wie Niere, Gehirn und dem Magendarmtrakt konstitutiv exprimiert (224). Das entstehende Prostaglandin E2 (PGE2) spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Integrität der Darmbarriere. Niedrige Spiegel von PGE2 spielen eine Schlüsselrolle bei der Darmhomöostase, wohingegen hohe Spiegel nach Hochregulation von Cox2 während einer Entzündung zum Zusammenbruch der Darmbarriere führen. Eine gestörte Darmbarriere mit daraus folgender Inflammation führt zu einer systemische Immunantwort und beeinflusst das Mikrobiom nachhaltig (225).

4.3.6.2 Tight-junction Protein (TJP) 1 und Occludin

Die beiden Strukturen sind wichtige Bestandteile der Darmbarriere. Die Proteine sind Teile der Zell-Zell-Kontakte der Enterozyten und spielen daher eine wichtige Rolle zur Aufrechterhaltung der Darmschleimhautintegrität (226).

4.4 Proteinanalyse

4.4.1 Proteinextraktion und Proteinkonzentrationsbestimmung

In einem ersten Schritt müssen die Proteine aus den ipsiläsionalen Trimmschnitten extrahiert werden. Das Hirngewebe wird dazu zunächst gewogen und das Gewebelysat mit 150 µl Radioimmunoprecipitationassaypuffer (RIPA) versetzt. Das Gemisch wird anschließend 30 Minuten auf Eis inkubiert. Der im RIPA enthaltene Protease-Inhibitor verhindert den Proteinverdau. Die Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) dient als Komplexbildner und die Detergenzien lösen die Tertiär- und Quartärstruktur der Proteine auf. Jede Probe wird im Anschluss zur besseren Durchsetzung in zehnminütigen Abständen insgesamt dreimal mittels Vortexer gemischt. Es folgt die Zentrifugation bei 4°C und 140000 x g für 20 Minuten. Der Überstand wird abpipettiert und bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Die Messung der enthaltenen Proteinkonzentration erfolgt mithilfe des Lowry DC Protein Assay von Promega. Dazu werden 2µl des Überstands entnommen und im Verhältnis von 1:10 mit Wasser versetzt und in ein gekühltes Reagenzglas gegeben. Im doppelten Ansatz werden auf eine 96-well-Platte 5µl jeder Probe pipettiert sowie eine Standardreihe bekannter Proteinkonzentration (0; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; µg/µl). Im Anschluss werden in jedes Well 25 µl eines Gemisches hinzugefügt. Dieses besteht aus 50 Teilen Reagenz A und einem Teil Reagenz S sowie 200µl Reagenz B. Die anschließende zwölfminütige Inkubationszeit erfolgt lichtgeschützt, da sich bei diesem Vorgang abhängig von den jeweiligen Konzentrationen der Proteine ein Farbstoff bildet, dessen Lichtabsorptionsfähigkeit im letzten Schritt bei 750nm mit dem Glomax – Detektionssystem photometrisch gemessen wird. Unter Berücksichtigung der Standardkurve und der verwendeten Verdünnung wird abschließend die Proteinkonzentration berechnet.

4.4.2 Western-Blot

Das Proteingemisch wird anfangs auf ein Natrium-Sulfat-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und wandert anschließend im elektrischen Feld. Die Proteine werden dadurch aufgetrennt bzw. sortiert. Diese werden anschließend über ein senkrecht stehendes elektrisches Feld auf eine Membran übertragen und binden dort als Proteinbanden. Zum Nachweis des Zytoskeletts Bestandteil Spectrin und GFAP werden die jeweiligen primären Antikörper verdünnt auf die Membran gegeben. Jedoch erst nachdem alle freien Bindungsstellen blockiert wurden. Das Housekeeping Protein Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase(GAPDH) hat sich als Referenztarget bewährt. Der Nachweis erfolgt, indem ebenfalls die Membran mit einem primären AK (1:2000) versehen wird. Darauf folgt die Inkubation mit einem IRDye®-konjugierten sekundären AK, nachdem die unspezifisch bindenden AK durch Waschen entfernt wurden. Das Signal der Membran wird mittels Odyssey® detektiert und die Intensität der Proteinbanden per Densitometrie bestimmt und ausgewertet.

4.4.3 Immunglobulin G Dot Blot

Der Dot Blot dient dem quantitativen Nachweis von markierten Proteinen, der durch Detektion von Fluoreszenzsignal gelingt. Auf Grundlage der jeweiligen Proteinkonzentration werden je Probe 10µg Protein untersucht und mit RIPA bis zum Gesamtvolumen von 10µl aufgefüllt. In der vorliegenden Arbeit erfolgt die Untersuchung des Immunglobulin G (IgG). Anfangs werden von einer zweimaligen Negativkontrolle mit RIPA und jeder Probe 2 µl, was 10 µg Protein entspricht, auf vormarkierte Stellen einer Nitrozellulose Membran gegeben. Nach dem Trocknen werden unspezifische Bindungsstellen blockiert, indem die Membran mittels einer fünfprozentigen Magermilch Suspension inkubiert wird. Dies geschieht auf einer Rüttelplatte für etwa eine Stunde. Das Gewebe und folglich das Lysat enthält durch das Vorliegen des endogenen IgG bereits den primären AK. Daher wird der mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte sekundäre AK zum Puffer hinzugegeben. Erneut folgt eine einstündige Inkubation bei RT. Unter abgedunkelten Bedingungen erfolgen drei Waschgänge je 10 Minuten auf der Rüttelplatte in TBST. Im letzten Schritt kommt es zur photometrischen Messung im Li-Cor Odyssey 9260.

4.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und graphische Darstellung der erhobenen Ergebnisse erfolgt mittels der Software GraphPad Prism9 für Mac. Das Signifikanzniveau liegt bei $\alpha = 0,05$. Somit werden alle Werte mit $p < 0,05$ als statistisch signifikant angenommen. Die unterschiedlichen Signifikanzniveaus werden graphisch folgendermaßen mit Sternen dargestellt: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$. Von einem statistischen Trend spricht man bei einem p-Wert von $< 0,1$. Die standardisierte Auswertung erfolgt nach folgendem Schema. Zunächst werden die Daten mit dem ROUT-Test (Q = 1%) auf Ausreißer untersucht und vorhandene Ausreißer exkludiert. Die verbleibenden Werte können dann mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung untersucht werden. Zweigruppenvergleiche normalverteilter Daten können anschließend mit dem zweiseitigen t-test auf Signifikanz geprüft werden. Sollte die Normalverteilung der Daten nicht gegeben sein, werden Daten eines gemeinsamen Zeitpunktes mit dem Mann-Whitney-U-Test auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ausgewertet. Werden statistische Vergleiche mehrerer Gruppen zu verschiedenen Zeitpunkten angestrebt, wird der One-way ANOVA -bzw. Two-way ANOVA-Test verwendet und anschließend mittels Tukey oder Holm-Sidak-Test auf Signifikanz geprüft. Die graphische Darstellung erfolgt durch Säulendiagramme und unter Verwendung des Mittelwerts (M) und Standardabweichung (SD).

Das Hauptaugenmerk der Auswertung liegt auf dem Vergleich zwischen den Gruppen CCI/Vehikel und CCI/AB.

5 Ergebnisse

5.1 Klinische und verhaltensbiologische Daten

Die Daten folgender Ergebnisse wurden während des Tierexperiments und vor der Euthanasie erhoben.

5.1.1 Gewicht

Das Gewicht der Tiere gibt Aufschluss über den Ernährungszustand, sowie über das Ess- und Trinkverhalten. Es fungiert somit als indirekter Marker für den Allgemeinzustand der Mäuse. So können anhand des Gewichts Rückschlüsse auf Beeinträchtigungen des Wohlbefindens der Tiere durch den Vergleich der verschiedenen Gruppen gezogen werden.

Vergleicht man das Körpergewicht zum präoperativen Ausgangswert (preop) mit dem ersten postoperativen Tag (d1), kommt es, ausgenommen bei der Sham/Veh-Gruppe, überall zu einem Abfall des Gewichts. Die CCI/AB-Gruppe verzeichnet den höchsten Gewichtsverlust am ersten Tag. Dieser wird jedoch zwischen dem ersten und fünften Tag fast vollständig kompensiert. Es besteht zu keinem Messzeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen der CCI/Veh-Gruppe und der CCI/AB-Gruppe. Am ersten postoperativen Tag ist lediglich ein Trend zu verzeichnen. (preop: $p > 0,999$, d1: $p = 0,0533$, d3 = $0,839$, d5 $> 0,999$, CCI/AB vs. CCI/Veh). Die Antibiose Gabe hat an d5 keinen Einfluss auf das Körpergewicht.

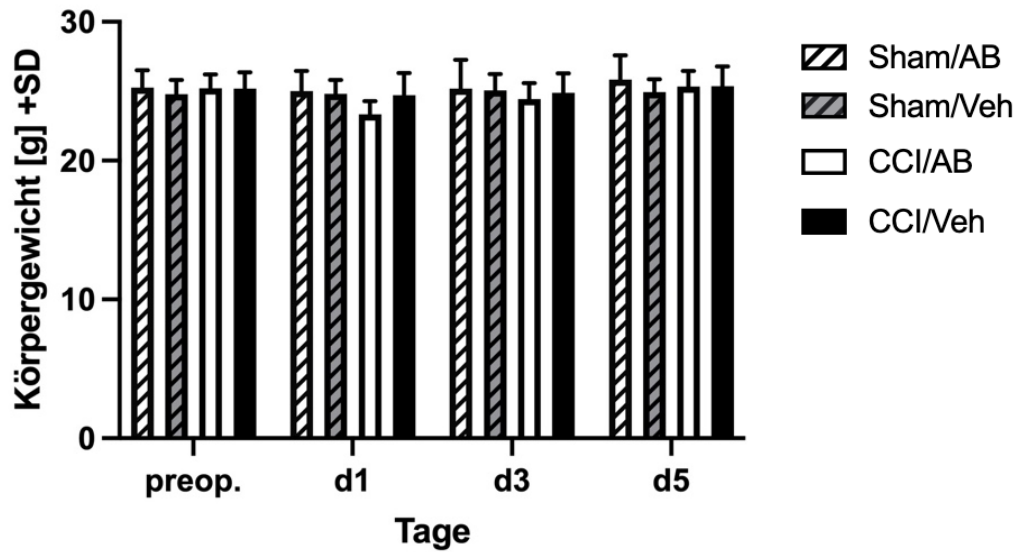


Abbildung 21 Antibiose hat keine Auswirkungen auf das Körpergewicht nach CCI

Das Säulendiagramm veranschaulicht die postoperative Entwicklung des Körpergewichts an den Tagen d1, d3 und d5. Als Ausgangswert wurde das präoperative Gewicht der Versuchstiere erfasst.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, Two-Way ANOVA mit Korrektur nach Tukey.

Gruppe(Größe)	preop	d1	d3	d5
Sham/AB(n=8)	25,25 ± 1,262	25,01 ± 1,441	25,19 ± 2,080	25,84 ± 1,738
Sham/Veh(n=8)	24,79 ± 1,019	24,83 ± 0,999	25,05 ± 1,192	24,95 ± 0,902
CCI/AB(n=12)	25,23 ± 0,992	23,35 ± 0,937	24,43 ± 1,155	25,35 ± 1,22
CCI/Veh(n=12)	25,19 ± 1,174	24,72 ± 1,607	24,88 ± 1,404	25,36 ± 1,424

Tabelle 16 Deskriptive Statistik Körpergewicht: Mittelwerte (M) ± Standardabweichung (SD) in Gramm

5.1.2 Neurological Severity Score (NSS)

Der NSS dient zur standardisierten Quantifizierung des neuromotorischen Status. Je höher der Score, desto schwerwiegender das neurologische Defizit.

Die Ergebnisse der Erhebung des NSS zu den Zeitpunkten präoperativer, erster, dritter und fünfter postoperativer Tag sind in Abbildung 24 graphisch dargestellt. Zwischen der CCI/Veh und der CCI/AB-Gruppe zeigt sich am fünften postoperativen Tag ein signifikanter Unterschied. Die Antibiose-Gabe wirkt sich somit positiv auf die neuromotorischen Fähigkeiten nach CCI aus. So erzielte die CCI/AB- Gruppe am fünften postoperativen Tag einen um 58% geringeren NSS als die Vergleichsgruppe (CC/Veh). (preop: $p > 0,999$, d1: $p = 0,610$, d3 = $0,125$, d5 $< 0,0001$, CCI/AB vs. CCI/Veh).

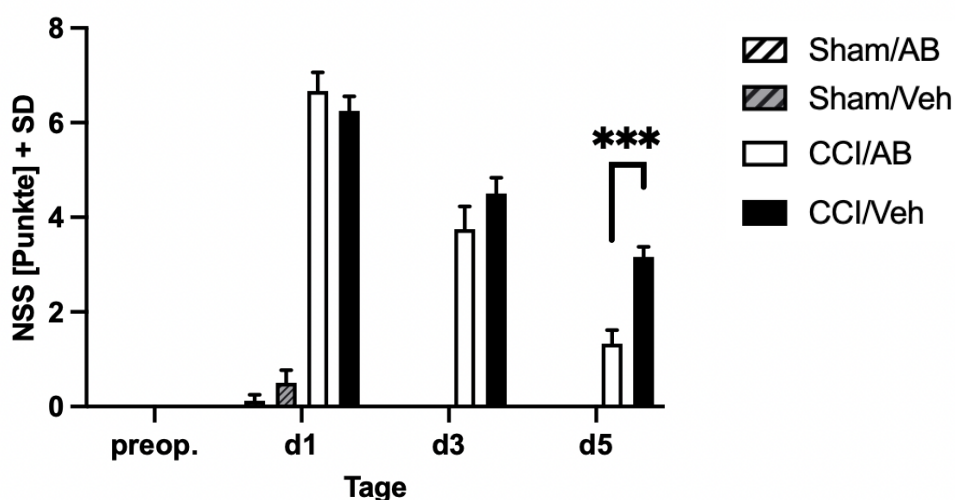


Abbildung 22 Die Antibiose Gabe zeigt positive Auswirkungen auf den Neuro-Score nach CCI

Das Säulendiagramm zeigt die Punktzahl des NSS zu den Zeitpunkten präoperativer Tag (preop), erster (d1), dritter (d3), fünfter (d5) postoperativer Tag. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, Two-Way ANOVA mit Korrektur nach Tukey

Gruppe(Größe)	preop	d1	d3	d5
Sham/AB(n=8)	0 ± 0	0,125 ± 0,354	0 ± 0	0 ± 0
Sham/Veh(n=8)	0 ± 0	0,5 ± 0,756	0 ± 0	0 ± 0
CCI/AB(n=12)	0 ± 0	6,667 ± 1,371	3,750 ± 1,658	1,33 ± 0,985
CCI/Veh(n=12)	0 ± 0	6,25 ± 1,055	4,5 ± 1,168	3,167 ± 0,718

Tabelle 17 Deskriptive Statistik NSS: Mittelwert (M) ± Standardabweichung (SD) in Punkten

5.1.3 Rota Rod

Das Rota Rod testet neben Kraft und Ausdauer auch die motorische Koordination der Versuchstiere.

Vergleicht man die Leistungen der Mäuse mit den präoperativ erhobenen Werten, zeigt sich in den CCI-Gruppen ein erwarteter Abfall am ersten postoperativen Tag. Dieser wird bis zum Ende des Beobachtungszeitraum (d5) vollständig kompensiert. Vergleicht man die Sham-Gruppen mit den korrelierten CCI-Gruppen bestehen am ersten und zweiten postoperativen Tag signifikante Unterschiede, die sich am fünften Tag relativieren (preop: $p=0,9911$, d1: $p=0,0044$, d3: $p=0,5564$, d5: $p=0,1854$, Sham/Veh vs. CCI/Veh; preop: $p=0,911$, d1: $p=0,0404$, d3: $p=0,0201$, d5: $p=0,7341$, Sham/AB vs. CCI/AB)

Im Vergleich der beiden CCI-Gruppen besteht zu keinem Zeitpunkt ein Unterschied (preop: $p=0,9911$, d1: $p=0,8208$, d3: $p=0,5564$, d5: $p=0,7341$, CCI/AB vs. CCI/Veh). Somit scheint die Gabe von Antibiotika keinen Einfluss auf die Laufleistung nach CCI in der Rota Rod-Testung zu haben.

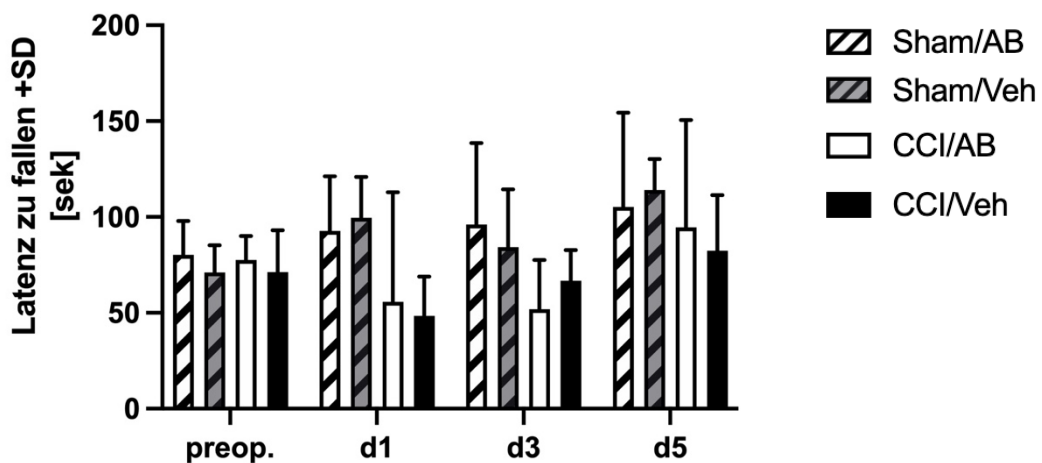


Abbildung 23 Antibiotikagabe ohne Einfluss auf die Laufleistung im Rota Rod-Test nach CCI

Das Säulendiagramm veranschaulicht die Laufzeit auf dem Rota Rod bis zum Herunterfallen der Versuchstiere. Die unterschiedlichen Gruppen werden zu verschiedenen Zeitpunkten gegenübergestellt; präoperative Tag (preop), erster (d1), dritter (d3) und fünfter (d5) postoperativer Tag.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, Two-Way ANOVA mit Korrektur nach Holm-Sidak

Gruppe(Größe)	preop	d1	d3	d5
Sham/AB(n=8)	80 ± 17,42	92,75 ± 28,47	96 ± 42,6	105,3 ± 49,24
Sham/Veh(n=8)	71 ± 14,18	99,50 ± 21,35	84,25 ± 30,18	114,1 ± 16,17
CCI/AB(n=12)	77,5 ± 12,54	55,75 ± 57,11	51,83 ± 25,72	94,58 ± 21,78
CCI/Veh(n=12)	71,25 ± 21,78	48,33 ± 20,65	66,67 ± 16,04	82,33 ± 29,1

Tabelle 18 Deskriptive Statistik Rotarod: Mittelwert ± Standardabweichung in Sekunden

5.1.4 Allgemeine Bewegungsverhalten

5.1.4.1 Distanz

Die zurückgelegte Distanz der Mäuse in der Arena dient dem Untersucher als Aktivitätsmarker. Es werden so die Auswirkungen von CCI und Intervention auf motorische Fähigkeiten objektiviert. Zudem können Rückschlüsse auf Veränderungen im Verhalten der Tiere gezogen werden.

Die zurückgelegte Strecke der Versuchstiere innerhalb aller Gruppen nimmt nach der OP ab und bleibt bis zum fünften postoperativen Tag auf einem niedrigeren Niveau. Zwischen den beiden CCI-Gruppen findet sich zu keinem Messzeitpunkt ein signifikanter Unterschied. (preop: $p=0,9146$, d1: $p=0,2037$, d3: $p=0,995$, d5: $p=0,8684$, CCI/AB vs. CCI/Veh). Die Gabe von Antibiotika nach CCI hat demnach keinen Einfluss auf die zurückgelegte Distanz der Versuchstiere. Vergleicht man die CCI/Veh-Gruppe am fünften postoperativen Tag mit der Sham/Veh-Gruppe am präoperativen Tag zeigt sich kein signifikanter Unterschied. Das CCI hat somit keinerlei Einfluss auf die zurückgelegte Strecke der Versuchstiere ($p=0,4506$, Sham/Veh (präop) vs. CCI/Veh(d5)).

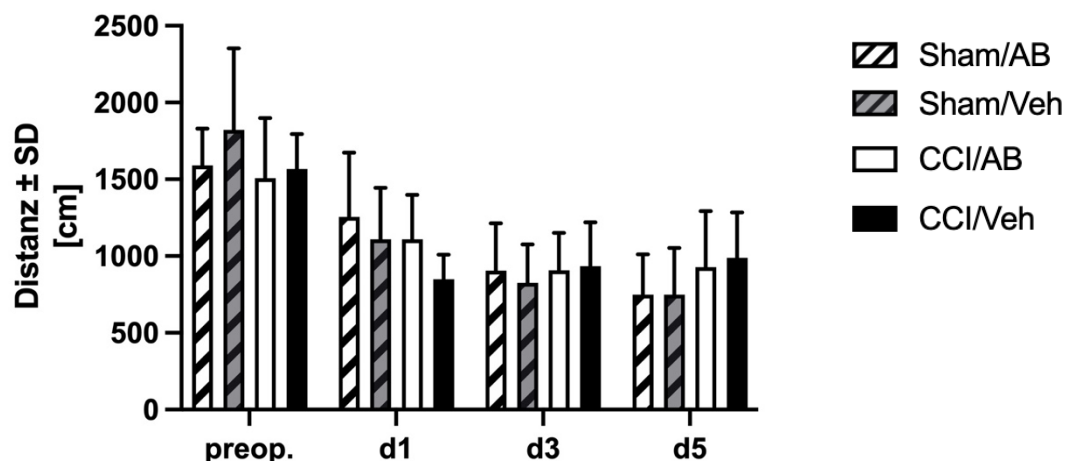


Abbildung 24 Antibiosegabe ohne Auswirkungen auf die Distanz nach CCI

Das Säulendiagramm zeigt die zurückgelegte Strecke der einzelnen Gruppen in Zentimeter zu den Zeitpunkten präoperativer Tag(preop), erster (d1), dritter(d3), fünfter(d5) postoperativer Tag.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, Two-Way ANOVA mit Korrektur nach Holm-Sidak

Gruppe(Größe)	preop	d1	d3	d5
Sham/AB(n=8)	1590 ± 240	1255 ± 419	906 ± 307	746 ± 262
Sham/Veh(n=8)	1821 ± 531	1110 ± 336	825 ± 251	7749 ± 303
CCI/AB(n=12)	1506 ± 393	1109 ± 290	907 ± 245	928 ± 363
CCI/Veh(n=12)	1567 ± 228	850 ± 160	934 ± 286	989 ± 267

Tabelle 19 Deskriptive Statistik Distanz (Noldus): Mittelwert(M) ± Standardabweichung (SD) in Zentimeter

5.1.4.2 Mittlere Laufgeschwindigkeit

Leidet die Maus unter zerebralbedingten motorischen Defiziten, kann es zu einem Abfall der mittleren Laufgeschwindigkeit kommen, sodass dies ein guter Parameter ist, die Motorik und Koordination der Versuchstiere zu objektivieren.

Die mittlere Geschwindigkeit nimmt erwartungsgemäß in allen Gruppen am ersten postoperativen Tag deutlich im Vergleich zum präoperativen Tag ab. Auch hier erreichen die Mäuse am fünften postoperativen Tag nicht das präoperative Ausgangsniveau. Zwischen den beiden CCI-Gruppen besteht zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied, sodass die Gabe von Antibiotika die mittlere Laufgeschwindigkeit nach CCI nicht beeinflusst. Lediglich am ersten postoperativen Tag ist ein Trend zugunsten der CCI/AB-Gruppe zu verzeichnen (Preop: $p=0,9754$, d1: $p=0,066$, d3: $p=0,9940$, d5: $p=0,9653$, CCI/AB vs. CCI/Veh).

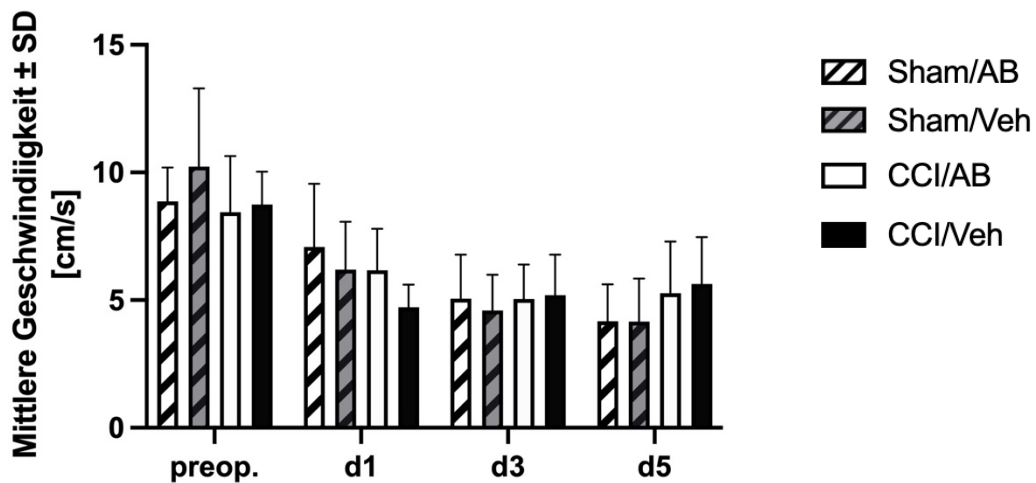


Abbildung 25 Antibiotikatherapie nach CCI hat keine Auswirkungen auf die mittlere Laufgeschwindigkeit

Das Säulendiagramm zeigt die mittlere Laufgeschwindigkeit zu den Zeitpunkten präoperativer Tag(preop), erster (d1), zweiter (d2), fünfter(d5) postoperativer Tag. Es wurden die vier unterschiedlichen Interventionsgruppen dargestellt

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, Two-Way ANOVA mit Korrektur nach Tukey

Gruppe(Größe)	preop	d1	d3	d5
Sham/AB(n=8)	8,875 ± 1,317	7,084 ± 2,469	5,056 ± 1,719	4,165 ± 1,453
Sham/Veh(n=8)	10,236 ± 3,054	6,199 ± 1,874	4,595 ± 1,402	4,161 ± 1,684
CCI/AB(n=12)	8,438 ± 2,206	6,167 ± 1,625	5,039 ± 1,359	5,268 ± 2,03
CCI/Veh(n=12)	8,743 ± 1,293	4,724 ± 0,887	5,193 ± 1,588	5,637 ± 1,837

Tabelle 20 Deskriptive Statistik mittlere Geschwindigkeit (Noldus): Mittelwert(M) ± Standardabweichung (SD) in Zentimeter pro Sekunde

5.1.4.3 Open Field Test

5.1.4.3.1 Novel object recognition Test (NORT)

Nach der zwölfminütigen Habituerungsphase und der fünfminütigen Phase 1 (familiar object) kommt in Phase II ein neues Objekt hinzu. Folgender Graph zeigt, wie viel Zeit die Versuchstiere der einzelnen Gruppen mit der Exploration des „novel Object“ verbringen, indem sie das unbekannte Objekt mit der Nasenspitze touchieren. Die Gesamtzeit in Phase II beträgt ebenfalls 5 Minuten. Es kann so die Gedächtnisleistung der Mäuse objektiviert und in den Gruppen verglichen werden, da eine gesunde Maus für gewöhnlich das neue Objekt erkennt und daher dieses von den Versuchstieren verstärkt exploriert wird.

Zwischen keinen der Gruppen besteht für die Explorationszeit am unbekanntem Objekt ein signifikanter Unterschied ($p=0,993$, CCI/AB vs. CCI/Veh). Weder die CCI-OP, noch die Gabe von Antibiose beeinflussen die Explorationszeit der Versuchstiere. Die beiden CCI-Gruppen erreichen daher ein ähnliches Wertenniveau wie die Sham/Gruppen, somit kann ein negativer Einfluss durch das CCI ausgeschlossen werden.

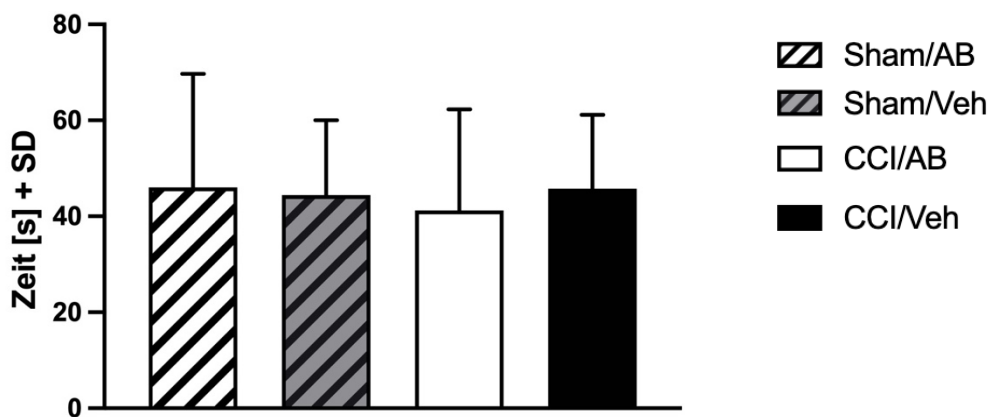


Abbildung 26 Antibiosegabe nach CCI hat keinen Einfluss auf die Explorationszeit am unbekanntem Objekt

Das Säulendiagramm stellt isoliert die Explorationszeit der einzelnen Gruppen in Sekunden am neuen Objekt dar.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, Two-Way ANOVA mit Korrektur nach Tukey

Gruppe(Größe)	M ± SD
Sham/AB(n=8)	46,03 ± 23,69
Sham/Veh(n=8)	44,47 ± 15,56
CCI/AB(n=12)	41,25 ± 21,06
CCI/Veh(n=12)	45,76 ± 15,40

Tabelle 21 Deskriptive Statistik Explorationszeit: Mittelwerte (M) ± Standardabweichung (SD) in Sekunden

5.1.4.3.2 Recognition Index (RI)

Um das Interesse am neuen Objekt darzustellen, wird der Recognition Index (RI, Abb. 29A) gebildet. Dieser wird aus den Explorationszeiten (T) mit dem neuen (T_{Novel}) und dem bekannten ($T_{familiar}$) Objekt gebildet.

$$RI = \frac{T_{Novel}}{T_{Novel} + T_{Familiar}}$$

Im Anschluss werden die Indices innerhalb der Interventionsgruppen (AB vs. Vehikel) ins Verhältnis gesetzt und die Ratio gebildet (Abb. 29B). Der relative RI am neuen Objekt ist in der CCI/AB Gruppe am niedrigsten. Die CCI/AB-Gruppe zeigt somit ein reduziertes Interesse am neuen Objekt, jedoch sind die Ergebnisse nicht statistisch signifikant ($p = 0,712$, CCI/AB vs. CCI/Veh). Die niedrigere Ratio in der AB-Gruppe lässt auf stärker reduzierte Indices schließen als in der Vehikel-Gruppe. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen ist nicht statistisch signifikant, weist jedoch einen Trend auf ($p = 0.053$, AB vs. Vehikel).

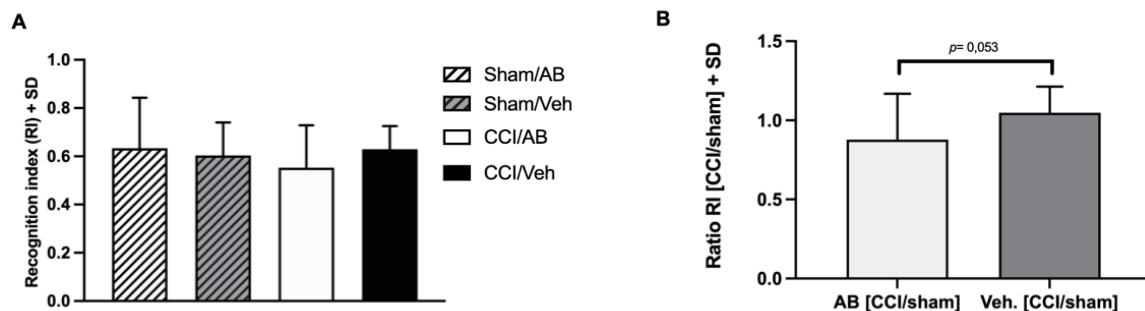


Abbildung 27 Die Gabe von Antibiotika hat keinen Einfluss auf den Recognition-Index am neuen Objekt

(A) Das Säulendiagramm zeigt die verschiedenen Recognition-Indices des unbekanntes Objekts der einzelnen Gruppen.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, One-way ANOVA mit Korrektur nach Holm-Sidak

(B) Das Säulendiagramm stellt die beiden Ratios der AB-Gruppe [CCI/sham] und der Vehikel-Gruppe [CCI/sham] gegenüber. Mittelwerte und Standardabweichung: $0,878 \pm 0,29$, $n=11$, AB [CCI/sham]; $1,048 \pm 0,165$, $n=11$, Veh.[CCI/sham];* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ungepaarter t-Test.

Gruppe(Größe)	M ± SD
Sham/AB(n=8)	$0,633 \pm 0,209$
Sham/Veh(n=7)	$0,648 \pm 0,061$
CCI/AB(n=12)	$0,553 \pm 0,175$
CCI/Veh(n=12)	$0,63 \pm 0,096$

Tabelle 22 Deskriptive Statistik Recognition Index (A): Mittelwert(M) ± Standardabweichung (SD)

5.2 Histologische Datenerhebung

5.2.1 Volumetrie

Um den histopathologischen Hirnschaden genauer zu untersuchen, wurden zunächst die Hirnvolumina sowie das Schadensvolumen beider CCI – Gruppen mikroskopisch erfasst. Im Vergleich zeigt sich kein signifikanter Unterschied im Kontusionsvolumen zwischen der CCI/AB - und CCI/Veh – Gruppe ($p=0,2034$, AB/CCI vs. AB/Veh). Das Ergebnis lässt darauf schließen, dass bis zum fünften postoperativen Tag die Antibiosegabe keine Auswirkungen auf das Kontusionsvolumen hat.

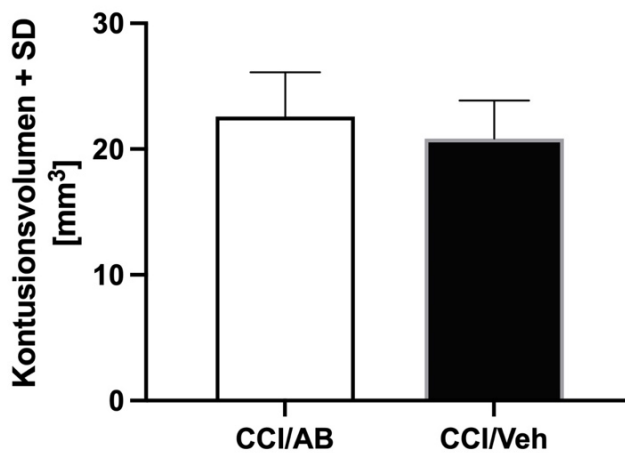


Abbildung 28 Die Gabe von Antibiotika hat keinen Einfluss auf das Kontusionsvolumen

Das Säulendiagramm stellt das Schadensvolumen zwischen den beiden CCI-Gruppen graphisch gegenüber. Mittelwert und Standardabweichung in Kubikmillimeter (mm^3): $22,59 \pm 3,516$, $n=12$, CCI/AB; $20,84 \pm 3,023$, $n=12$, CCI/Veh; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ungepaarter t-Test.

5.2.2 Dickemessung Körnerzellschicht des Gyrus Dentatus

Um den histopathologischen Schaden des Hippocampus genauer zu untersuchen, wurde die Dicke der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus an drei Stellen gemessen und der Mittelwert gebildet. Dieser Vorgang wird an einem zweiten Schnitt je Versuchstier wiederholt. Vergleicht man die Dicke der ipsiläsionalen Seite zwischen der CCI/AB und der CCI/Veh-Gruppe, so zeigt sich kein signifikanter Unterschied. Demnach hat die Gabe von Antibiose keinen Einfluss auf die Dicke der Granularzellschicht am fünften postoperativen Tag ($p=0,4803$, CCI/AB vs. CCI/Veh). Auf der kontraläsionalen Seite zeigt sich zwischen den beiden Gruppenebenfalls kein signifikanter Unterschied, sodass eine Schädigung durch die Antibiosegabe ausgeschlossen werden kann ($p=0,09$, CCI/AB vs. CCI/Veh). Der Nachweis, dass das CCI eine Dickenabnahme der Granularzellschicht bewirkt und es so zu einer hippocampalen Schädigung führt zeigt der Vergleich zwischen den beiden CCI/Veh-Gruppen der ipsi- und kontraläsionalen Seite. Im Mittel nimmt die Zellschicht auf der ipsiläsionalen Seite um $25 \mu\text{m}$ ab ($p<0,0001$, CCI/Veh[ipsi] vs. CCI/Veh[contra])

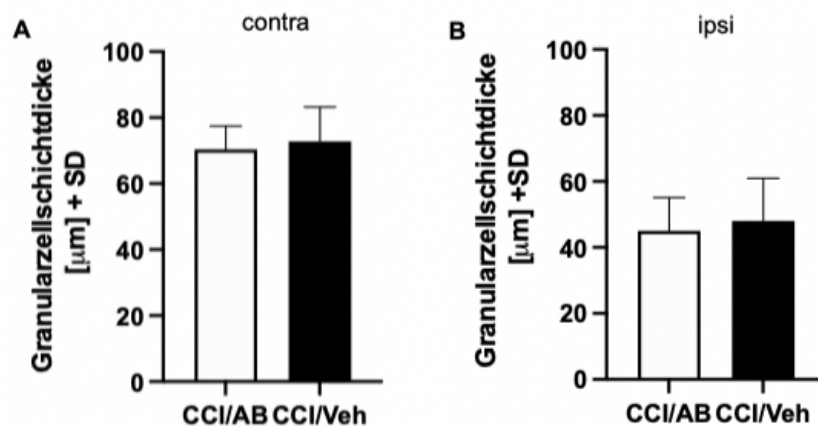


Abbildung 29 Die Gabe von Antibiose hat keine Auswirkungen auf die Dicke der Granularzellschicht des Gyrus dentatus

(A) Das Säulendiagramm stellt die mittlere Dicke des gyrus dentatus der beiden CCI-Gruppen auf der kontraläsionalen Seite gegenüber. Mittelwert und Standardabweichung in Mikrometer (μm): $70,36 \pm 7,067$, $n=24$, CCI/AB; $74,18 \pm 7,999$, $n=23$, CCI/Veh;

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ungepaarter t-Test.

(B) Das Säulendiagramm zeigt die mittlere Dicke der Granularzellschicht der beiden CCI-Gruppen auf der ipsiläsionalen Seite. Mittelwert und Standardabweichung in Mikrometer (μm): $45,01 \pm 10,13$, $n=24$, CCI/AB; $48,04 \pm 12,92$, $n=24$, CCI/Veh;

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, Mann Whitney test.

5.2.3 Immunhistochemie

5.2.3.1 Astrozyten

Um die Zellzahl der Astrozyten im Läsionsgebiet genauer zu quantifizieren, wurden die Astrozyten mit Antikörper markiert und per Immunhistochemie nachgewiesen. Im Folgenden wird die absolute ipsiläsionale Astrozytenzahl pro Gesichtsfeld zwischen den einzelnen Gruppen verglichen.

Vergleicht man die beiden CCI-Gruppen hinsichtlich der absoluten Anzahl der Astrozyten im Randgebiet der Läsion, zeigen sich in der CCI/AB-Gruppe eine signifikant niedrigere Anzahl an Astrozyten. ($p=0,03$, CCI/AB vs. CCI/Veh) Die Induktion einer Dysbiose könnte daher eine verminderte Astrogliose im periläsionalen Bereich zu Folge haben.

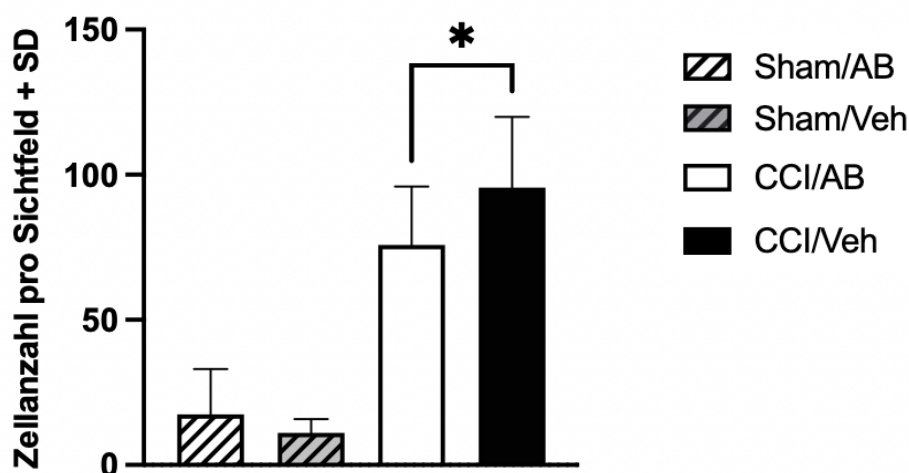


Abbildung 30 Die Gabe von Antibiotika vermindert die periläsionale Astrozytenzahl

Die periläsionale Zellzahl der Astrozyten in einem normierten Sichtfeld wird hier in einem Säulendiagramm dargestellt. Vergleicht man die Ergebnisse zwischen den Sham- und CCI-Gruppen zeigen sich signifikant erhöhte Werte in der CCI-Gruppe. Die Signifikanz der traumabedingt erhöhten Werte wird graphisch nicht dargestellt, da das Hauptaugenmerk auf den Vergleich innerhalb der CCI-Gruppe liegt.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, One-Way ANOVA mit Korrektur nach Holm-Sidak.

Gruppe(Größe)	M \pm SD
Sham/AB(n=8)	17,44 \pm 15,65
Sham/Veh(n=8)	11,06 \pm 4,72
CCI/AB(n=12)	75,75 \pm 20,20
CCI/Veh(n=12)	95,50 \pm 24,48

Tabelle 23 Deskriptive Statistik der periläsionalen Astrozytenzahl: Mittelwert (M) \pm Standardabweichung (SD)

5.2.3.2 Mikroglia

Um die Aktivierung und Einwanderung der Mikroglia im Läsionsgebiet genauer zu analysieren, wurde mittels Immunhistochemie und anschließender Mikroskopie die absolute Zahl der Mikroglia in einem normierten Sichtfeld untersucht. Anschließend erfolgt der Vergleich zwischen den Versuchsgruppen.

Die Mikrogliazahl zeigt in den Gruppen Sham/Veh, Sham/Ab und CCI/AB ein konstant niedriges Niveau. In der CCI/Veh jedoch konnte ein deutlich signifikanter Anstieg der Mikrogliaanzahl beobachtet werden ($p=0,00$, CCI/AB vs. CCI/Veh). Die Antibiosegabe könnte daher mit einer verminderten Aktivierung mikroglialer Zellen in Verbindung stehen.

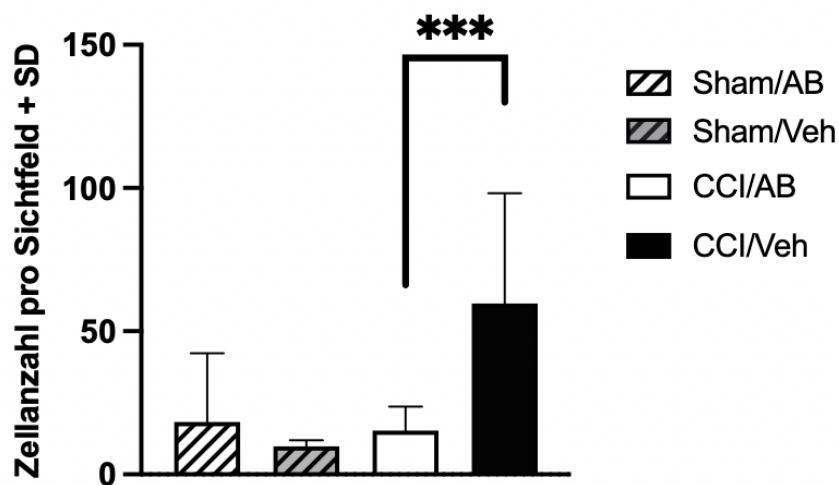


Abbildung 31 Die Verabreichung einer Antibiose hat eine verminderte Migration von Mikroglia ins Läsionsgebiet zur Folge

Die Zellzahl der Mikroglia innerhalb eines normierten Sichtfelds hier in einem Säulendiagramm dargestellt.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, One-Way ANOVA mit Korrektur nach Holm-Sidak.

Gruppe(Größe)	M ± SD
Sham/AB(n=7)	10,21 ± 8,67
Sham/Veh(n=8)	9,81 ± 2,2
CCI/AB(n=12)	15,25 ± 8,49
CCI/Veh(n=12)	59,67 ± 38,49

Tabelle 24 Deskriptive Statistik der Mikrogliazahl im Läsionsgebiet: Mittelwert (M) ± Standardabweichung (SD)

5.3 Molekularbiologische Daten

5.3.1 Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion der cerebralen Trimmsschnitte

5.3.1.1 GFAP

Das saure Gliafaserprotein dient als Aktivitätsmarker der Astrozyten.

Am fünften postoperativen Tag zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden CCI-Gruppen. Die Expression ist in der Interventionsgruppe mit Antibiotika erhöht ($p=0,0326$, CCI/AB vs. CCI/Veh). Somit zeigt sich, dass die Gabe von Antibiotika die GFAP-Expression am fünften Tag nach CCI erhöht und die Astrozytenaktivität initial gesteigert ist. Zwischen den beiden Sham-Gruppen zeigt sich kein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0,9741$, Sham/AB vs. Sham/AB). Die Gabe von Antibiotika hat somit ohne vorangegangenes CCI keinen Einfluss auf die GFAP-Expression.

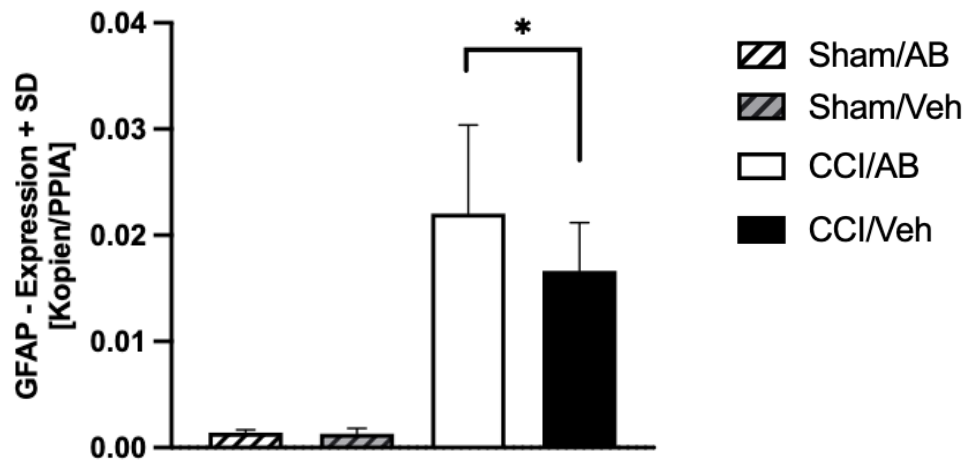


Abbildung 32 Die Gabe von Antibiotika nach CCI erhöht die Expression von GFAP

Die Anzahl der mRNA-Kopien der qRT-PCR von GFAP am fünften postoperativen Tag in den vier Untersuchungsgruppen wird hier im Säulendiagramm dargestellt. Die angegebenen Werte sind auf das Referenzgen PPIA normalisiert. Vergleicht man die Ergebnisse zwischen den Sham -und CCI-Gruppen zeigen sich signifikant erhöhte Werte in der CCI-Gruppe. Die Signifikanz der traumabedingt erhöhten Werte wird graphisch nicht dargestellt, da das Hauptaugenmerk auf den Vergleich innerhalb der CCI-Gruppe liegt.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, One-Way ANOVA mit Korrektur nach Holm-Sidak.

Gruppe(Größe)	M ± SD
Sham/AB(n=8)	0,001416± 0,00027
Sham/Veh(n=8)	0,00133 ± 0,00048
CCI/AB(n=12)	0,022± 0,0083
CCI/Veh(n=12)	0,0166 ± 0,004532

Tabelle 25: Deskriptive Statistik Expression GFAP : Mittelwert (M) ± Standardabweichung (SD) in Kopienanzahl GFAP pro Kopienanzahl PPIA

5.3.1.2 TSPO

Das Translokatorprotein (TSPO) fungiert als Biomarker für die Aktivierung der Mikroglia.

Vergleicht man die beiden CCI-Gruppen hinsichtlich der der Genregulation von TSPO zeigt sich kein statistisch relevanter Unterschied ($p=0,1219$, CCI/AB vs. CCI/Veh). Die Gabe von Antibiotika nach CCI hat somit keinen Einfluss auf die Expression des TSPO.

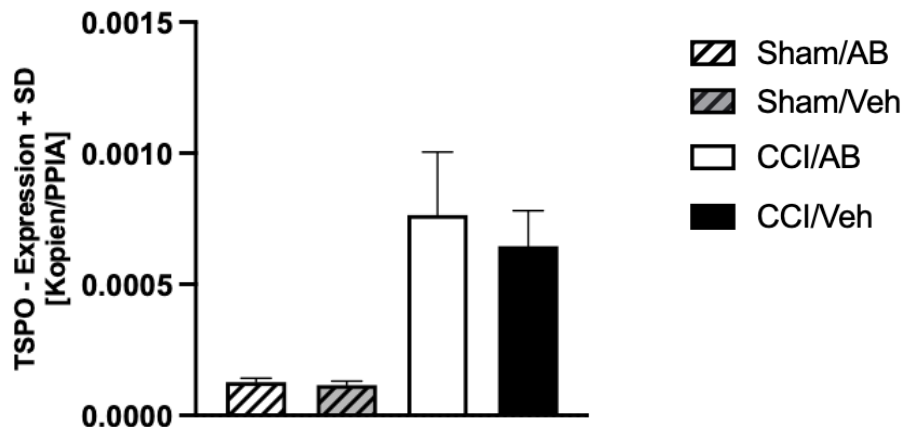


Abbildung 33 Die Verabreichung von Antibiotika nach CCI hat keinen Einfluss auf die Genexpression des TSPO

Das Säulendiagramm zeigt in den vier Untersuchungsgruppen die Anzahl der mRNA-Kopien der qRT-PCR von TSPO am fünften postoperativen Tag. Die angegebenen Werte sind auf das Housekeeping-Gen PPIA normalisiert. Vergleicht man die Ergebnisse zwischen den Sham -und CCI-Gruppen zeigen sich signifikant erhöhte Werte in der CCI-Gruppe. Die Signifikanz der traumabedingt erhöhten Werte wird graphisch nicht dargestellt, da das Hauptaugenmerk auf den Vergleich innerhalb der CCI-Gruppe liegt.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, One-Way ANOVA mit Korrektur nach Holm-Sidak

Gruppe(Größe)	M \pm SD
Sham/AB(n=8)	0,00013 \pm 1,473*10 ⁻⁵
Sham/Veh(n=8)	0,00012 \pm 1,519*10 ⁻⁵
CCI/AB(n=12)	0,00076 \pm 0,00024
CCI/Veh(n=12)	0,00065 \pm 0,00014

Tabelle 26: Deskriptive Statistik Expression TSPO: Mittelwert (M) \pm Standardabweichung (SD) in Kopienanzahl TSPO pro Kopienanzahl PPIA

5.3.1.3 Serpina3n

Serpina3n dient als Marker für eine reaktive Gliose.

Zwischen den beiden CCI-Gruppen besteht in der genetischen Expression von Serpina3n kein signifikanter Unterschied ($p=0,174$, CCI/AB vs. CCI/Veh). Am fünften postoperativen Tag hat die Antibiosegabe nach CCI demzufolge keinen Effekt auf die Genexpression von Serpina3n.

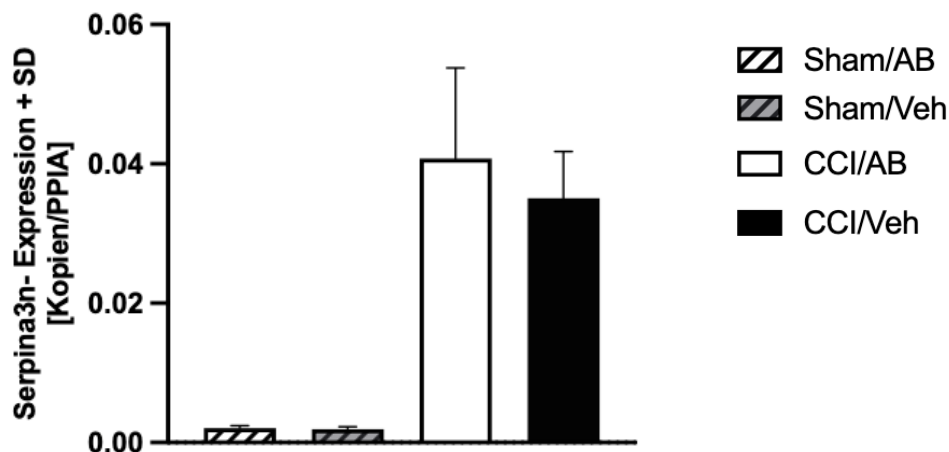


Abbildung 34 Die Antibiosegabe hat keinen Effekt auf die Genregulation von Serpina3n

Die Anzahl der mRNA-Kopien der qRT-PCR von Serpina3n am fünften postoperativen Tag in den vier Untersuchungsgruppen wird hier im Säulendiagramm dargestellt. Die angegebenen Werte sind auf das Housekeeping-Gen PPIA normalisiert. Vergleicht man die Ergebnisse zwischen den Sham -und CCI-Gruppen zeigen sich signifikant erhöhte Werte in der CCI-Gruppe. Die Signifikanz der traumabedingt erhöhten Werte wird graphisch nicht dargestellt, da das Hauptaugenmerk auf den Vergleich innerhalb der CCI-Gruppe liegt.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, One-Way ANOVA mit Korrektur nach Holm-Sidak

Gruppe(Größe)	M \pm SD
Sham/AB(n=8)	0,0021 \pm 0,00031
Sham/Veh(n=8)	0,0019 \pm 0,00035
CCI/AB(n=12)	0,041 \pm 0,013
CCI/Veh(n=12)	0,035 \pm 0,0067

Tabelle 27: Deskriptive Statistik Expression Serpina3n: Mittelwert (M) \pm Standardabweichung (SD) in Kopienanzahl Serpina3n pro Kopienanzahl PPIA

5.3.1.4 Interleukin1 β

Interleukin 1 β ist ein von Mikroglia sezerniertes Zytokin und dient als pro-inflammatorischer Marker. In der genetischen Expression von IL1 β besteht zwischen den beiden CCI-Gruppen kein Unterschied ($p=0,856$, CCI/AB vs. CCI/Veh). Auch zwischen den beiden Sham-Gruppen zeigt sie nach der statistischen Auswertung kein Unterschied ($p=0,944$, Sham/AB vs. Sham/Veh). Die Applikation von Antibiotika hat demzufolge keinen Einfluss auf die Genregulation von IL1 β am fünften postoperativen Tag.

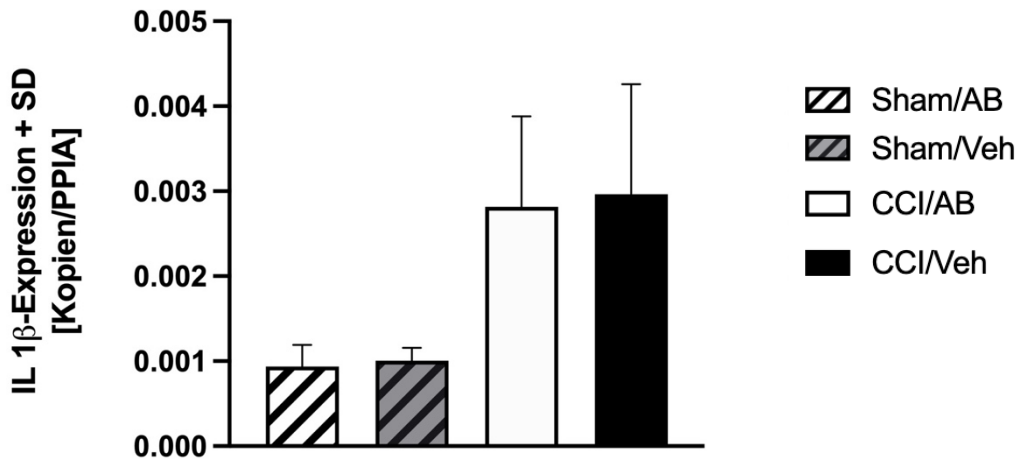


Abbildung 35 Die Gabe von Antibiotika hat keinen Effekt auf die Genexpression des Inflammationsmediators Interleukin 1 β

Das Säulendiagramm zeigt in den vier Untersuchungsgruppen die Anzahl der mRNA-Kopien der qRT-PCR von IL1 β am fünften postoperativen Tag. Die angegebenen Werte sind auf das Housekeeping-Gen PPIA normalisiert. Vergleicht man die Ergebnisse zwischen den Sham -und CCI-Gruppen zeigen sich signifikant erhöhte Werte in der CCI-Gruppe. Die Signifikanz der traumabedingt erhöhten Werte wird graphisch nicht dargestellt, da das Hauptaugenmerk auf den Vergleich innerhalb der CCI-Gruppe liegt. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, One-Way ANOVA mit Korrektur nach Holm-Sidak.

Gruppe(Größe)	M \pm SD
Sham/AB(n=8)	0,00093 \pm 0,0003
Sham/Veh(n=7)	0,00096 \pm 0, 0001
CCI/AB(n=12)	0,0028 \pm 0,001
CCI/Veh(n=11)	0,0026 \pm 0,0008

Tabelle 28: Deskriptive Statistik Expression IL1 β : Mittelwert (M) \pm Standardabweichung (SD) in Kopienanzahl IL1 β pro Kopienanzahl PPIA

5.3.1.5 Iba1

Iba1 dient als Aktivitätsgradmesser der Mikroglia und Inflammationsmarker.

Im Vergleich der beiden CCI-Gruppen zeigt sich hinsichtlich der Expression von Iba1 kein statistisch relevanter Unterschied ($p=0,538$, AB/CCI vs. CCI/Veh). Die Gabe von Antibiotika hat somit keinen Effekt auf die genetische Expression von Iba. Am fünften postoperativen Tag beeinflusst demzufolge die Antibiosegabe nach CCI den Aktivitätszustand der Mikroglia nicht.

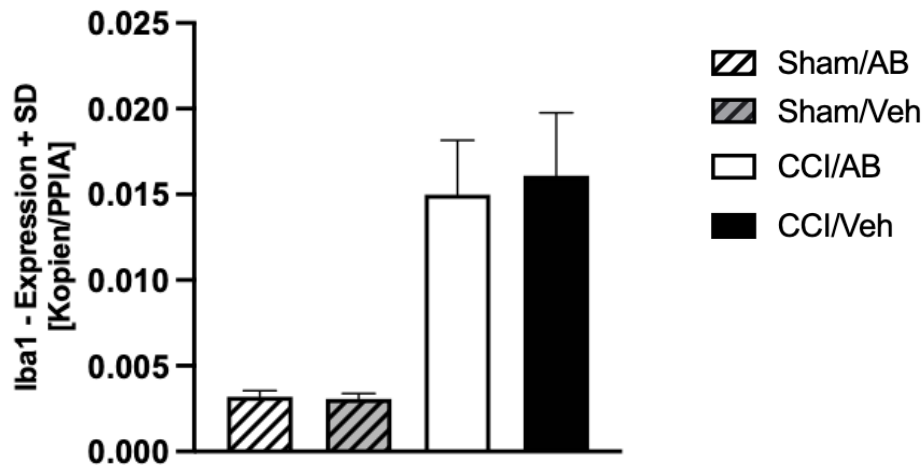


Abbildung 36 Die Gabe von Antibiotika hat keinen Effekt auf den Aktivitätszustand der Mikroglia und die Expression des Inflammationsmarker Iba1

Die Anzahl der mRNA-Kopien der qRT-PCR von Iba1 am fünften postoperativen Tag in den vier Untersuchungsgruppen wird hier im Säulendiagramm dargestellt. Die angegebenen Werte sind auf das Housekeeping-Gen PPIA normalisiert. Vergleicht man die Ergebnisse zwischen den Sham -und CCI-Gruppen zeigen sich signifikant erhöhte Werte in der CCI-Gruppe. Die Signifikanz der trauma-bedingt erhöhten Werte wird graphisch nicht dargestellt, da das Hauptaugenmerk auf den Vergleich innerhalb der CCI-Gruppe liegt.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, One-Way ANOVA mit Korrektur nach Holm-Sidak

Gruppe(Größe)	M ± SD
Sham/AB(n=8)	0,0032± 0,0003
Sham/Veh(n=8)	0,0031± 0,0003
CCI/AB(n=12)	0,0015 ± 0,003
CCI/Veh(n=12)	0,0016 ± 0,003

Tabelle 29: Deskriptive Statistik Expression Iba1: Mittelwert (M) ± Standardabweichung (SD) in Kopienanzahl Iba1 pro Kopienanzahl PPIA

5.3.1.6 TNF α

Das proinflammatorische Zytokin ist am Untergang neuronaler Zellen beteiligt.

In der posttraumatischen Expression von TNF α gibt es zwischen den beiden CCI-Gruppen keinen signifikanten Unterschied. Die Gabe von Antibiotika hat demnach keine Auswirkungen auf die Genexpression von TNF α am fünften postoperativen Tag.

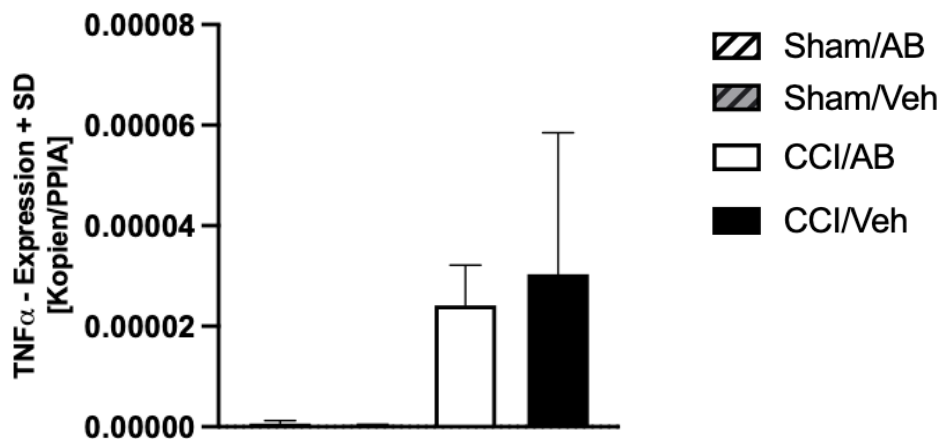


Abbildung 37 Die Gabe von Antibiotika hat keinen Effekt auf die Genexpression des pro-inflammatorischen Zytokin TNF α

Das Säulendiagramm zeigt in den vier Untersuchungsgruppen die Anzahl der mRNA-Kopien der qRT-PCR von TNF α am fünften postoperativen Tag. Die angegebenen Werte sind auf das Housekeeping-Gen PPIA normalisiert. Vergleicht man die Ergebnisse zwischen den Sham -und CCI-Gruppen zeigen sich signifikant erhöhte Werte in der CCI-Gruppe. Die Signifikanz, der durch das Trauma bedingt erhöhten Werte wird graphisch nicht dargestellt, da das Hauptaugenmerk auf den Vergleich innerhalb der CCI-Gruppe liegt.

* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, One-Way ANOVA mit Korrektur nach Holm-Sidak

Gruppe(Größe)	M \pm SD
Sham/AB(n=8)	7,136*10 ⁻⁷ \pm 5,302*10 ⁻⁷
Sham/Veh(n=8)	3,49*10 ⁻⁷ \pm 1,694*10 ⁻⁷
CCI/AB(n=12)	2,417*10 ⁻⁵ \pm 7,988*10 ⁻⁶
CCI/Veh(n=12)	3,35*10 ⁻⁵ \pm 2,812*10 ⁻⁶

Tabelle 30 Deskriptive Statistik Expression TNF α : Mittelwert (M) \pm Standardabweichung (SD) in Kopienanzahl TNF α pro Kopienanzahl PPIA

5.3.1.7 MHC2

MHC2 spielt als Oberflächenprotein eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von Mikrogliazellen.

Im Vergleich aller vier Versuchsgruppen findet sich kein signifikanter Unterschied der MHC2-Expression ($p=0,8224$, CCI/AB vs. CCI/Veh; $p=0,8839$, Sham/AB vs. CCI/AB). Am fünften postoperativen Tag hat demzufolge sowohl das CCI als auch die Gabe von Antibiotika keinen Einfluss auf die Genexpression des Oberflächenproteins. Die Gabe von Antibiose nach CCI hat am fünften postoperativen Tag keinen Einfluss auf die Genregulation von MHC2 und somit dem Aktivitätszustand der Mikroglia. Lediglich zwischen den beiden Sham-Gruppen zeigt sich ein statistischer Trend zugunsten der Sham/AB-Gruppe ($p=0,0784$, Sham/AB vs. CCI/AB).

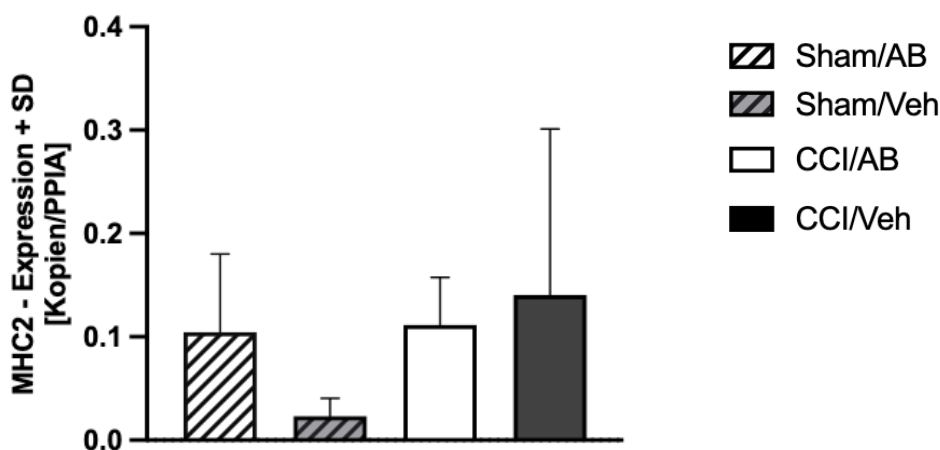


Abbildung 38 Die Gabe von Antibiotika nach CCI hat keinen Effekt auf die Genexpression von MHC2

Die Anzahl der mRNA-Kopien der qRT-PCR von MHC2 am fünften postoperativen Tag in den vier Untersuchungsgruppen wird hier im Säulendiagramm dargestellt. Die angegebenen Werte sind auf das Housekeeping-Gen PPIA normalisiert.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, One-Way ANOVA mit Korrektur nach Holm-Sidak

Gruppe(Größe)	M ± SD
Sham/AB(n=8)	0,1047± 0,07554
Sham/Veh(n=8)	0,0228± 0,0173
CCI/AB(n=12)	0,114± 0,0463
CCI/Veh(n=12)	0,1404± 0,1609

Tabelle 31 Deskriptive Statistik Expression MHC2: Mittelwert (M) ± Standardabweichung (SD) in Kopienanzahl MHC2 pro Kopienanzahl PPIA

5.3.1.8 GLUT1

Da GLUT1 auch unter physiologischen Bedingungen im Gehirn exprimiert wird, um den Energiestoffwechsel aufrecht zu halten, finden sich auch in der Sham Gruppe eine nachweisbare Expressionsrate. Vergleicht man jedoch alle vier Untersuchungsgruppen untereinander findet sich kein statistisch relevanter Unterschied in der Expression des GLUT1-Transporters ($p=0,9825$, CCI/AB vs. CCI/Sham; $p=0,9825$, Sham/Veh vs. CCI/Veh). Demnach hat weder die Gabe von Antibiotika noch das CCI einen Effekt auf die GLUT1 Expression am fünften postoperativen Tag.

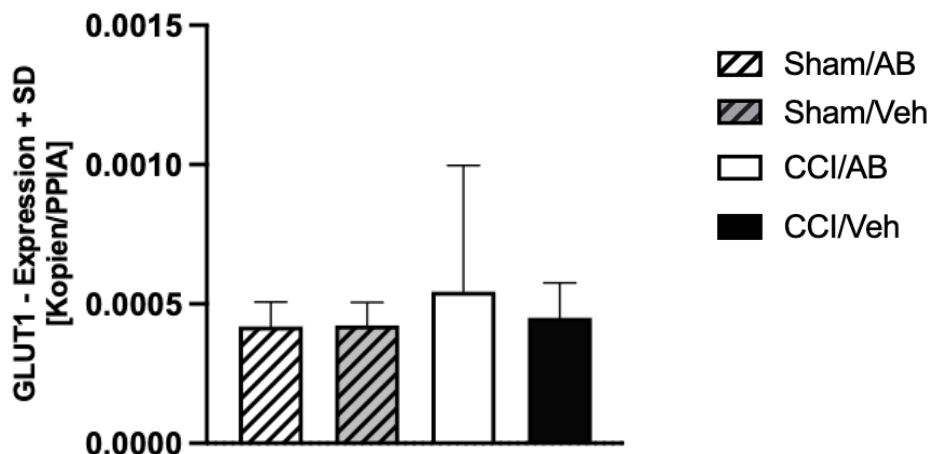


Abbildung 39 Die Gabe von Antibiotika nach CCI hat keinen Effekt auf die Genexpression von GLUT1

Das Säulendiagramm zeigt in den vier Untersuchungsgruppen die Anzahl der mRNA-Kopien der qRT-PCR von GLUT1 am fünften postoperativen Tag. Die angegebenen Werte sind auf das Housekeeping-Gen PPIA normalisiert.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, One-Way ANOVA mit Korrektur nach Holm-Sidak

Gruppe(Größe)	M \pm SD
Sham/AB(n=8)	0,00042 \pm 8,8 * 10 ⁻⁵
Sham/Veh(n=8)	0,00042 \pm 8,2*10 ⁻⁵
CCI/AB(n=12)	0,00054 \pm 0,00045
CCI/Veh(n=12)	0,00045 \pm 0,00013

Tabelle 32 Deskriptive Statistik Expression GLUT1: Mittelwert (M) \pm Standardabweichung (SD) in Kopienanzahl GLUT1 pro Kopienanzahl PPIA

5.3.1.9 Slc1A2/GLT1

Der GLT1 sorgt für die Aufrechterhaltung der extrazellulären Glutamat-Clearance, um so neurotoxische Schäden zu minimieren.

Ein signifikanter Unterschied in der Expression des GLT1 ist in keinen der Untersuchungsgruppen festzustellen ($p=0,4847$, CCI/AB vs. CCI/Veh; $p=0,6029$, Sham/AB vs. Sham/Veh). Die Genexpression am fünften postoperativen Tag wird durch die Antibiotikagabe nach CCI nicht beeinflusst. Aufgrund der Tatsache, dass auch zu den beiden Sham-Gruppen kein statistisch relevanter Unterschied nachweisbar ist, hat am fünften postoperativen Tag sowohl das Trauma als auch die Antibiotikagabe keinen Einfluss auf die Genexpression.

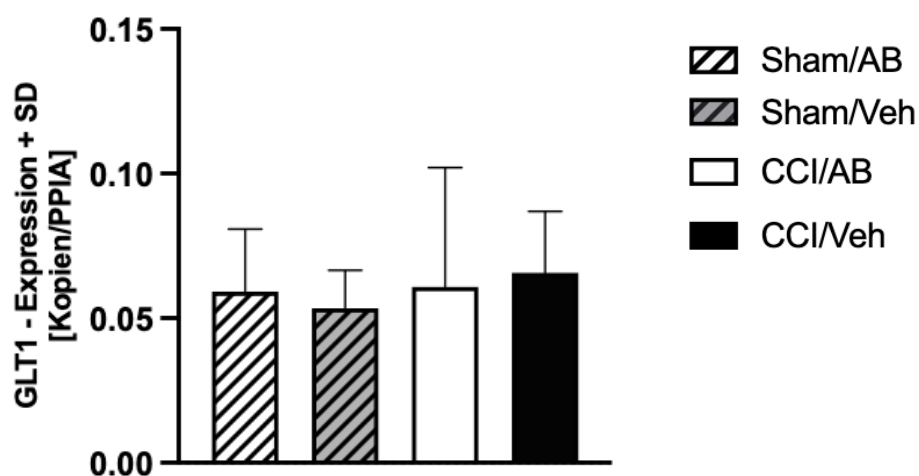


Abbildung 40 Die Antibiotikagabe zeigt keinen Effekt auf die Expression von GLT1

Die Anzahl der mRNA-Kopien der qRT-PCR von GLT12 am fünften postoperativen Tag in den vier Untersuchungsgruppen wird hier im Säulendiagramm dargestellt. Die angegebenen Werte sind auf das Housekeeping-Gen PPIA normalisiert.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, One-Way ANOVA mit Korrektur nach Holm-Sidak

Gruppe(Größe)	M ± SD
Sham/AB(n=8)	0,0592± 0,02154
Sham/Veh(n=8)	0,05348± 0,01313
CCI/AB(n=12)	0,0608± 0,04131
CCI/Veh(n=12)	0,06566± 0,02128

Tabelle 33 Deskriptive Statistik Expression GLT1: Mittelwert (M) ± Standardabweichung (SD) in Kopienanzahl GLT1 pro Kopienanzahl PPIA

5.3.1.10 IFN γ

Das IFN γ fungiert als proinflammatorisches Zytokin und dient daher ebenfalls als Inflammationsmarker.

In der posttraumatischen Expression von IFN γ zeigt sich zwischen den beiden CCI-Gruppen kein signifikanter Unterschied ($p > 0,87$, CCI/AB vs. CCI/Veh). Auffällig jedoch ist der Vergleich zwischen den beiden Sham-Gruppen. Dort ist die Expression von IFN γ in der Interventionsgruppe im Vergleich zur Vehikel-Gruppe signifikant erhöht ($p = 0,0161$, Sham/AB vs. Sham/Veh). Daraus lässt sich schließen, dass die Antibiosegabe am fünften Tag bei den Versuchstieren ohne traumatisches Ereignis zu einer Erhöhung der IFN γ -Expression führt.

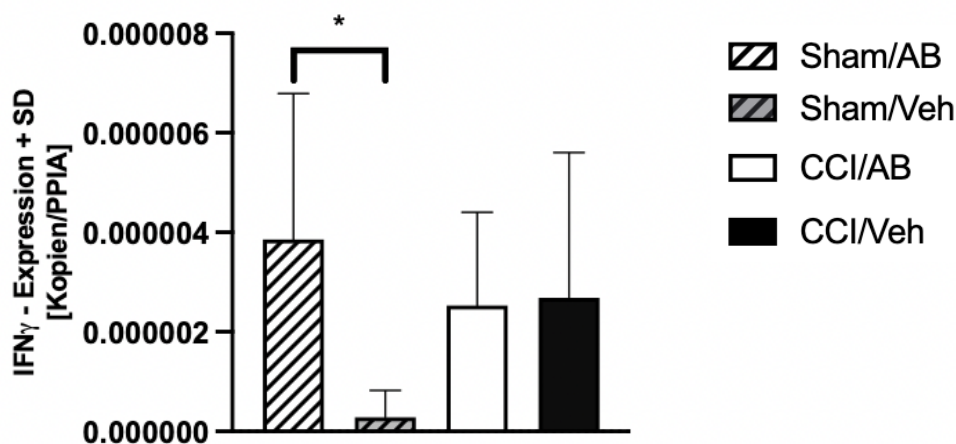


Abbildung 41 Die Gabe von Antibiotika hat postoperativ keine Auswirkungen auf die Expression von IFN γ , erhöht jedoch initial die Expression in der Sham-Gruppe

Das Säulendiagramm zeigt in den vier Untersuchungsgruppen die Anzahl der mRNA-Kopien der qRT-PCR von INF γ am fünften postoperativen Tag.

Die angegebenen Werte sind auf das Housekeeping-Gen PPIA normalisiert.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, One-Way ANOVA mit Korrektur nach Holm-Sidak

Gruppe(Größe)	M \pm SD
Sham/AB(n=8)	3,858 * 10 ⁻⁶ \pm 2,93*10 ⁻⁶
Sham/Veh(n=8)	2,861*10 ⁻⁷ \pm 5,362*10 ⁻⁷
CCI/AB(n=12)	2,629*10 ⁻⁶ \pm 1,873*10 ⁻⁶
CCI/Veh(n=12)	2,683*10 ⁻⁶ \pm 2,924*10 ⁻⁶

Tabelle 34 Deskriptive Statistik Expression IFN γ : Mittelwert (M) \pm Standardabweichung (SD) in Kopienanzahl IFN γ pro Kopienanzahl PPI

5.3.1.11 VGLUT1 und VGLUT2

Die beiden vesikulären Glutamat Transporter spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der extrazellulären Glutamatkonzentration.

In der Expression von VGLUT1 zeigt sich zwischen den beiden CCI-Gruppen kein statistisch relevanter Unterschied ($p=0,4991$, CCI/AB vs. CCI/Veh). Bei den beiden CCI-Gruppen zeigen sich signifikant niedrigere Expressionswerte des VGLUT1 als in der Sham Gruppen ($p=0,0038$, Veh/AB vs. CCI/AB). Demnach kommt es posttraumatisch zu einem Abfall der VGLUT1 Expression. Die Antibiotikagabe hat jedoch keinen Effekt auf die Genregulation von VGLUT1 nach CCI.

Zwischen den beiden CCI-Gruppen besteht hinsichtlich der Genregulation von VGLUT2 kein Unterschied ($p=0,8614$, CCI/AB vs. CCI/Veh). In allen vier Untersuchungsgruppen ist das Expressionsniveau auf einem ähnlichen Level, sodass weder das CCI noch die Antibiosegabe am fünften postoperativen Tag Einfluss auf die Genexpression von VGLUT2 nimmt.

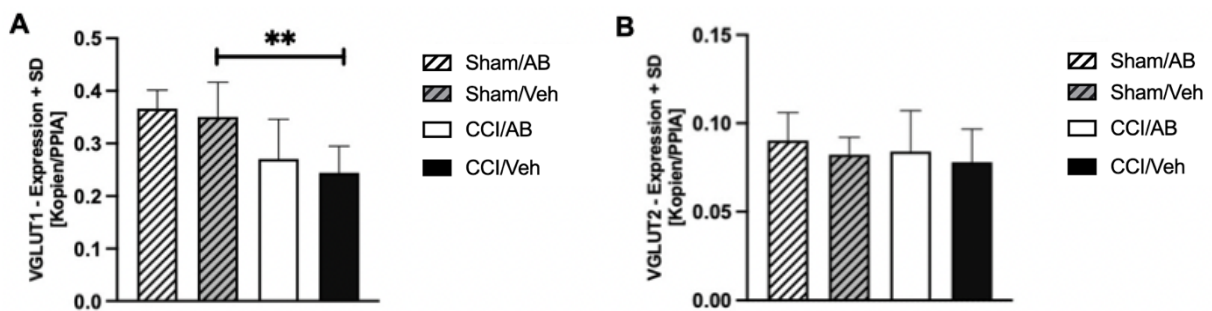


Abbildung 42 Die Antibiotikagabe hat nach CCI keinen Einfluss auf die Genexpression von VGLUT1 und VGLUT2

(A) Die Anzahl der mRNA-Kopien der qRT-PCR von VGLUT1 am fünften postoperativen Tag in den vier Untersuchungsgruppen wird hier im Säulendiagramm dargestellt. Die angegebenen Werte sind auf das Housekeeping-Gen PPIA normalisiert.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, One-Way ANOVA mit Korrektur nach Holm-Sidak

(B) Das Säulendiagramm zeigt in den vier Untersuchungsgruppen die Anzahl der mRNA-Kopien der qRT-PCR von VGLUT2 am fünften postoperativen Tag. Die angegebenen Werte sind auf das Housekeeping-Gen PPIA normalisiert.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, One-Way ANOVA mit Korrektur nach Holm-Sidak

Gruppen VGLUT 1(Größe)	M ± SD	Gruppen VGLUT 2 (Größe)	M ± SD
Sham/AB(n=8)	0,3663 ± 0,0352	Sham/AB(n=8)	0,09018 ± 0,01571
Sham/Veh(n=8)	0,3507± 0,0656	Sham/Veh(n=8)	0,08216± 0,0097
CCI/AB(n=12)	0,2706± 0,0754	CCI/AB(n=12)	0,08391± 0,02321
CCI/Veh(n=12)	0,2445± 0,0504	CCI/Veh(n=12)	0,00779± 0,01879

Tabelle 35 Deskriptive Statistik Expression VGLUT1 und VGLUT2: Mittelwert (M) Standardabweichung (SD) in Kopienanzahl VGLUT1/VGLUT2 pro Kopienanzahl PPIA

5.3.2 Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion des Kolongewebes

5.3.2.1 PTGS2

Es bestehen keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression von PTGS2 zwischen den beiden CCI-Gruppen ($p=0,8189$, CCI/AB vs. CCI/Veh). Die Genexpression aller vier Untersuchungsgruppen zeigen keine relevanten Unterschiede untereinander, sodass auch das Trauma die Expressionsrate am fünften postoperativen Tag von PTGS2 im Colon nicht verändert.

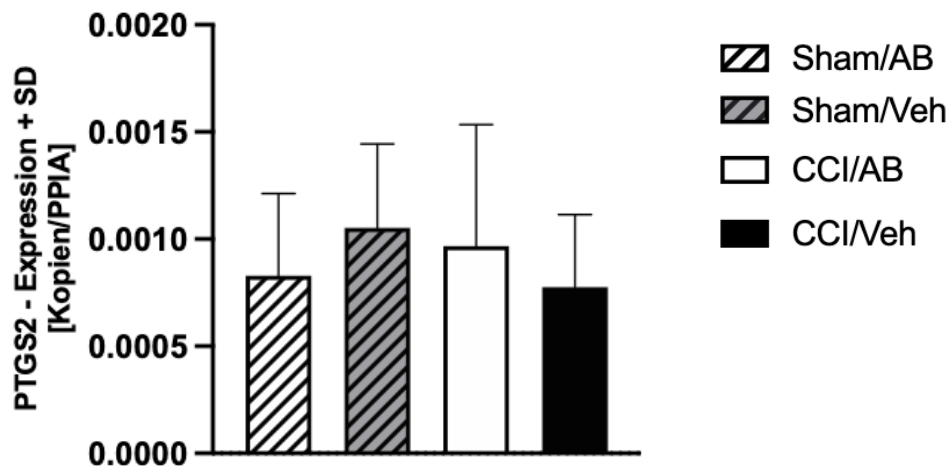


Abbildung 43 Die Genexpression der Cyclooxygenase 2 wird durch eine Antibiotikatherapie nicht beeinflusst.

Das Säulendiagramm zeigt in den vier Untersuchungsgruppen die Anzahl der mRNA-Kopien der qRT-PCR des PTGS2-Gens am fünften postoperativen Tag. Die angegebenen Werte sind auf das Housekeeping-Gen PPIA normalisiert.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, One-Way ANOVA mit Korrektur nach Holm-Sidak

Gruppe(Größe)	M \pm SD
Sham/AB(n=8)	0.00083 \pm 0,00038
Sham/Veh(n=8)	0,00105 \pm 0,0004
CCI/AB(n=12)	0,00097 \pm 0,000567
CCI/Veh(n=12)	0,00076 \pm 0,00034

Tabelle 36 Deskriptive Statistik Expression PTGS2-Gen: Mittelwert (M) \pm Standardabweichung (SD) in Kopienanzahl PTGS2-Gen pro Kopienanzahl PPIA

5.3.2.2 TJP 1

Einen signifikanten Unterschied zwischen beiden CCI-Gruppen in Bezug auf die Genexpression von TJP-1 gibt es nicht ($p=0,751$, CCI/AB vs. CCI/Veh). Demnach hat die Antibiotikagabe keinen Einfluss auf die Expression von TJP-1 im Kolon am fünften postoperativen Tag.

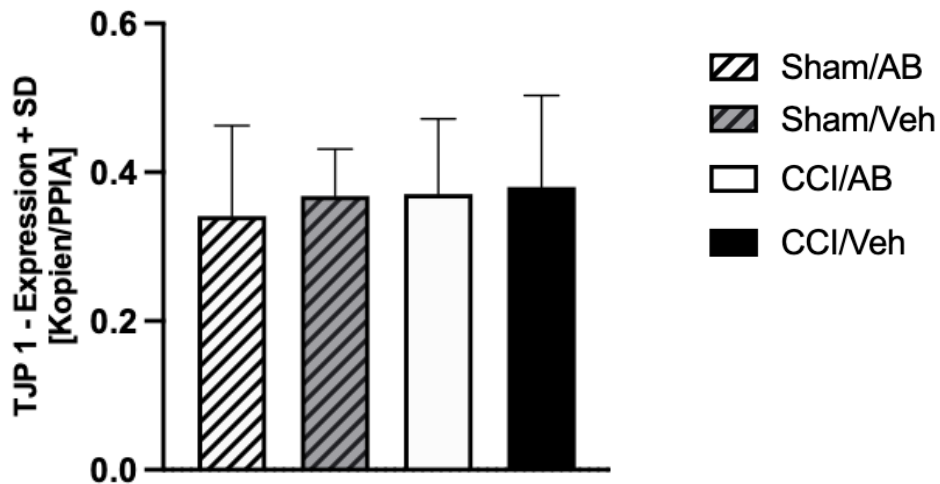


Abbildung 44 Die Gabe von Antibiotika beeinflusst die Genexpression von TJP-1 nicht.

Die Anzahl der mRNA-Kopien der qRT-PCR von TJP-1 am fünften postoperativen Tag in den vier Untersuchungsgruppen wird hier im Säulendiagramm dargestellt. Die angegebenen Werte sind auf das Housekeeping-Gen PPIA normalisiert.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, One-Way ANOVA mit Korrektur nach Holm-Sidak

Gruppe(Größe)	M \pm SD
Sham/AB(n=8)	0,3414 \pm 0,1214
Sham/Veh(n=8)	0,3680 \pm 0,0632
CCI/AB(n=12)	0,3707 \pm 0,1010
CCI/Veh(n=12)	0,3463 \pm 0,037

Tabelle 37 Deskriptive Statistik Expression TJP-1: Mittelwert (M) \pm Standardabweichung (SD) in Kopienanzahl TJP-1 pro Kopienanzahl PPIA

5.3.2.3 Occludin

Ein signifikanter Unterschied in der Expression des Transmembranprotein Occludin des Kolongewebes ist in keinen der Untersuchungsgruppen festzustellen ($p=0,9963$, CCI/AB vs. CCI/Veh). Die Genexpression von Occludin am fünften postoperativen Tag wird durch die Antibiotikagabe nach CCI somit nicht beeinflusst.

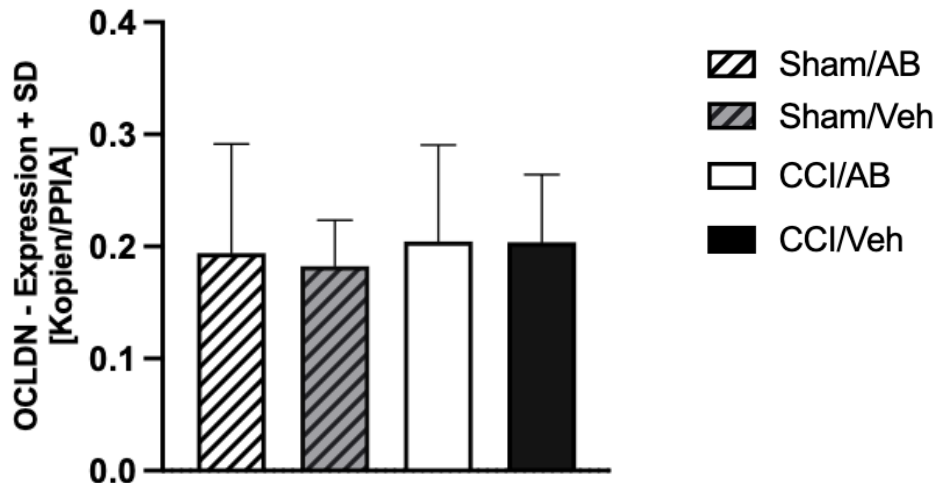


Abbildung 45 Die Antibiotikagabe hat keinen Einfluss auf die Occludin-Expression im Kolon.

Das Säulendiagramm zeigt in den vier Untersuchungsgruppen die Anzahl der mRNA-Kopien der qRT-PCR von Occludin am fünften postoperativen Tag.

Die angegebenen Werte sind auf das Housekeeping-Gen PPIA normalisiert.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, One-Way ANOVA mit Korrektur nach Holm-Sidak

Gruppe(Größe)	M \pm SD
Sham/AB(n=8)	0,1942 \pm 0,0973
Sham/Veh(n=8)	0,1824 \pm 0,04096
CCI/AB(n=12)	0,2046 \pm 0,0858
CCI/Veh(n=12)	0,2039 \pm 0,0604

Tabelle 38 Deskriptive Statistik Expression Occludin: Mittelwert (M) \pm Standardabweichung (SD) in Kopienanzahl Occludin pro Kopienanzahl PPIA

5.4 Proteinanalytik

5.4.1 Western Blot

5.4.1.1 Spektrin

Das Spaltprodukt Spektrin (145kDa) dient im Folgenden Experiment als Zelltodmarker.

Am fünften postoperativen Tag zeigen sich in den beiden CCI-Gruppen erhöhte Expressionswerte des Spaltproduktes, da posttraumatisch vermehrt Zellen untergehen. Die Expression des Zelltodmarkers ist in der CCI/AB-Gruppe im Vergleich zur CCI/Veh-Gruppe leicht vermindert, jedoch ohne statistische Relevanz ($p=0,2427$, CCI/Ab vs. CCI/Veh).

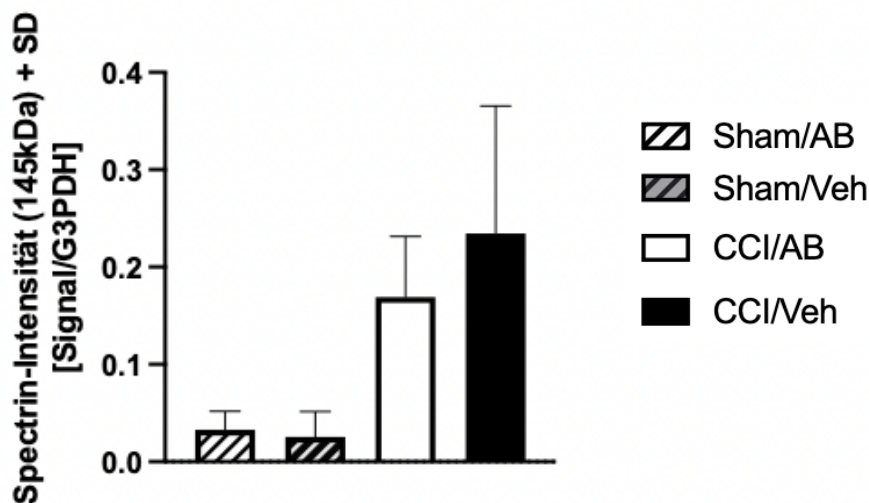


Abbildung 46 Die Gabe von Antibiotika hat keinen Einfluss auf die Expression des Spaltproduktes Spektrin (145kDa).

Das Säulendiagramm zeigt in den vier Untersuchungsgruppen die Proteinexpression von Spektrin (145kDa) am fünften postoperativen Tag.

Die angegebenen Werte sind auf G3PDH normalisiert. Vergleicht man die Ergebnisse zwischen den Sham -und CCI-Gruppen zeigen sich signifikant erhöhte Werte in der CCI-Gruppe. Die Signifikanz der traumabedingt erhöhten Werte wird graphisch nicht dargestellt, da das Hauptaugenmerk auf den Vergleich innerhalb der CCI-Gruppe liegt.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, One-Way ANOVA mit Korrektur nach Tukey

Gruppe(Größe)	M \pm SD
Sham/AB(n=8)	0,0327 \pm 0,0192
Sham/Veh(n=8)	0,0255 \pm 0,02603
CCI/AB(n=11)	0,1690 \pm 0,0624
CCI/Veh(n=12)	0,2344 \pm 0,131

Tabelle 39 Deskriptive Statistik Proteinexpression Spektrin: Mittelwert (M) \pm Standardabweichung (SD) von Spektrin (145kDa) normiert auf G3PDH.

5.4.1.2 GFAP

Um die Aktivität der Astrozyten zu quantifizieren, wurde die Intensität des sauren Gliafaserprotein (GFAP) bestimmt.

Hierbei kommt es zu einem deutlichen Anstieg der GFAP-Intensität in den beiden CCI-Gruppen. Vergleicht man jedoch die CCI/AB -und CCI/Veh-Gruppe untereinander zeigen sich keine statistisch relevanten Unterschiede ($p=0,853$, CCI/AB vs. CCI/Veh). Demnach hat die Gabe von Antibiotika keinen Einfluss auf die Proteinexpression des GFAP am fünften postoperativen Tag.

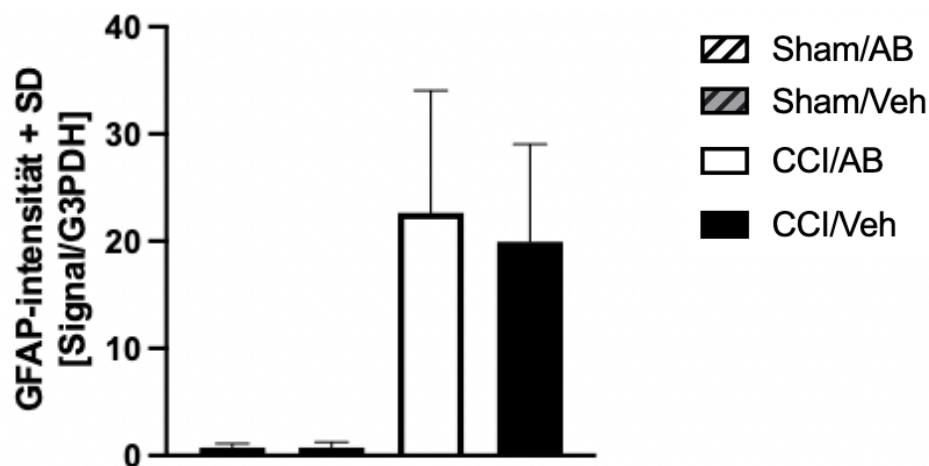


Abbildung 47 Die Antibiotikagabe hat keine Auswirkungen auf die GFAP-Expression

Das Säulendiagramm zeigt in den vier Untersuchungsgruppen die Proteinexpression von GFAP am fünften postoperativen Tag.

Die angegebenen Werte sind auf G3PDH normalisiert. Vergleicht man die Ergebnisse zwischen den Sham -und CCI-Gruppen zeigen sich signifikant erhöhte Werte in der CCI-Gruppe. Die Signifikanz der traumabedingt erhöhten Werte wird graphisch nicht dargestellt, da das Hauptaugenmerk auf den Vergleich innerhalb der CCI-Gruppe liegt.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, One-Way ANOVA mit Korrektur nach Tukey

Gruppe(Größe)	M ± SD
Sham/AB(n=8)	0,7626± 0,3520
Sham/Veh(n=8)	0,7433± 0,51853
CCI/AB(n=12)	22,65± 11,39
CCI/Veh(n=11)	19,97± 9,07

Tabelle 40 Deskriptive Statistik Proteinexpression GFAP: Mittelwert (M) ± Standardabweichung (SD) von GFAP normiert auf G3PDH.

5.4.2 IgG-Dotblot

Im vorliegenden Experiment dient das IgG als Marker für eine gestörte Blut-Hirn-Schranke.

Nach der densitometrischen Bestimmung von IgG zeigt sich zwischen den beiden CCI-Gruppen kein signifikanter Unterschied ($p=0,8078$, CCI/AB vs. CCI/Veh). Die posttraumatische Verabreichung von Antibiotika hat demnach keinen Einfluss auf die IgG-Konzentration am fünften postoperativen Tag.

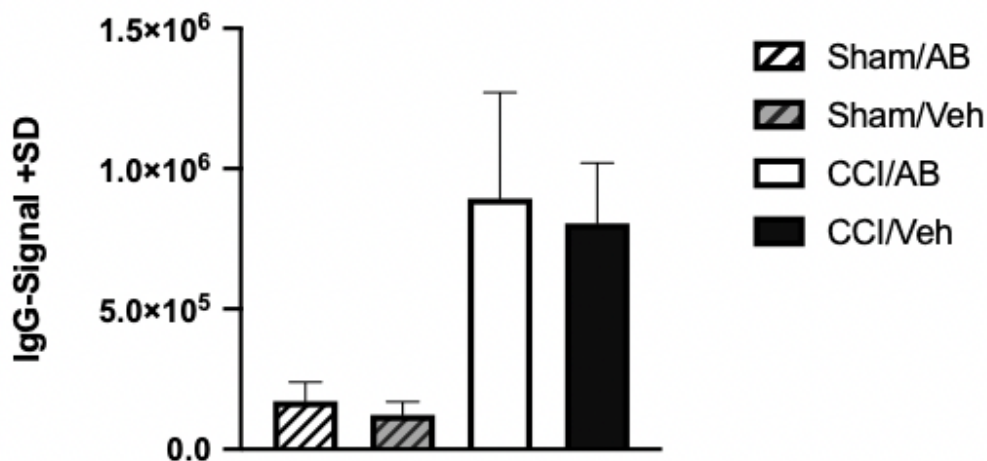


Abbildung 48 Die Verabreichung von Antibiotika nach CCI zeigt keine Auswirkungen auf die Menge von Immunglobulin G.

Das Säulendiagramm zeigt in den vier Untersuchungsgruppen das photometrisch gemessene Fluoreszenzsignal von Immunglobulin G am fünften postoperativen Tag. Vergleicht man die Ergebnisse zwischen den Sham -und CCI-Gruppen zeigen sich signifikant erhöhte Werte in der CCI-Gruppe. Die Signifikanz der traumabedingt erhöhten Werte wird graphisch nicht dargestellt, da das Hauptaugenmerk auf den Vergleich innerhalb der CCI-Gruppe liegt.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, One-Way ANOVA mit Korrektur nach Tukey

Gruppe(Größe)	M \pm SD
Sham/AB(n=8)	171526 \pm 68227
Sham/Veh(n=8)	122883 \pm 47013
CCI/AB(n=12)	894420 \pm 377746
CCI/Veh(n=12)	805732 \pm 21462

Tabelle 41 Deskriptive Statistik Immunglobulin G Menge: Mittelwert (M) \pm Standardabweichung (SD) von IgG.

5.5 Mikrobiologische Auswertung

Nachdem am präoperativen und fünften postoperativen Tag stichprobenartig 200mg Faeces der Versuchstiere mikrobiologisch untersucht wurden, können die Auswirkungen der Intervention auf das Mikrobiom dargestellt werden. Bei der mikrobiologischen Untersuchung wurden Gram-positiven Bakterien, Gram-negative Erreger und Pilzen untersucht. Die Ergebnisse werden in koloniebildenden Einheiten (KBE) pro 200mg Faeces angegeben.

Vergleicht man zunächst die absoluten KBE zwischen beiden Zeitpunkten, fallen besonders in den beiden Antibiotikagruppen deutliche Veränderungen auf. Sowohl in der Sham/AB Gruppe, als auch in der CCI/AB Gruppe finden sich eine deutliche Reduktion der KBE und der Erregervielfalt. Während in den präoperativen Stuhlproben der Antibiotikagruppen eine Vielfalt an grampositiven und gramnegativen Erregern vorherrschte, zeigen nach der Gabe von Antibiotika eine deutliche Reduktion der Vielfalt. Über 90% der KBE führen post-interventionell auf das Gram-negative Bakterium *Enterobacter cloacae* zurück. Dies beruht auf einer Resistenz des *Enterobacterium cloacae* gegen die eingesetzten Antibiotika. Wohingegen die anderen Erreger aufgrund der Sensitivität zum Antibiotikum eradiziert wurden. Neben dem Verlust der Vielfalt des Mikrobioms kommt es zudem zu einer absoluten Reduktion der KBE. In der Sham/AB-Gruppe beträgt die Reduktion im Mittel ca. 40.000 KBE und in der CCI/AB Gruppe 60.000 KBE. In den beiden Vehikel-Gruppen bleibt die Mikrobiomvielfalt weitestgehend erhalten. Absolut kommt es innerhalb der Vehikel-Gruppen nur bei der CCI/Veh Gruppe posttraumatisch zu einem Abfall KBE.

Die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung zeigen eindrücklich die Auswirkungen der Antibiosegabe auf das Mikrobiom. Dadurch wurde nachgewiesen, dass die oral über das Trinkwasser verabreichten Antibiotika in ausreichenden Mengen von den Versuchstieren aufgenommen werden und ihre Wirkung entfalten konnten. Ob und in welcher Weise das SHT isoliert die Mikrobiota der Versuchstiere beeinflusst lässt sich durch die im Versuch gewonnen Ergebnisse nicht abschließend klären. In der Sham/Veh-Gruppe mit der geringsten Manipulation bestehen sowohl in der relativen als auch in der absoluten Zusammensetzung des Mikrobioms die geringsten Unterschiede zwischen dem präoperativen und fünften postoperativen Tag.

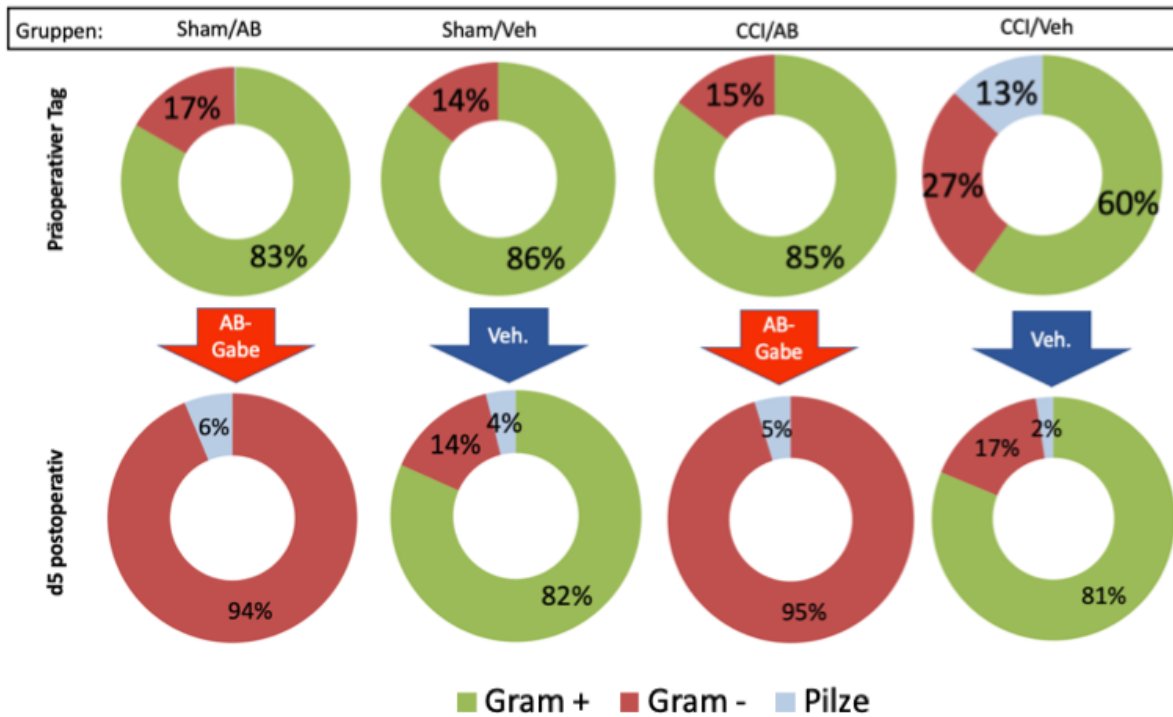


Abbildung 49 Die postoperative Gabe von Antibiotika führt zu einer Veränderung der Mikrobiozusammensetzung zu Gunsten von Gram-negativen Erregern

In folgenden Kreisdiagrammen wurden die Mittelwerte der KBE von Gram positiven Bakterien, Gram negativen Bakterien und Pilzen in den vier Untersuchungsgruppen in Prozent dargestellt. Die erste Zeile zeigt hierbei die relative Verteilung der Mittelwerte zwischen den Versuchsgruppen am präoperativen Tag und in der zweiten Zeile am fünften postoperativen Tag.

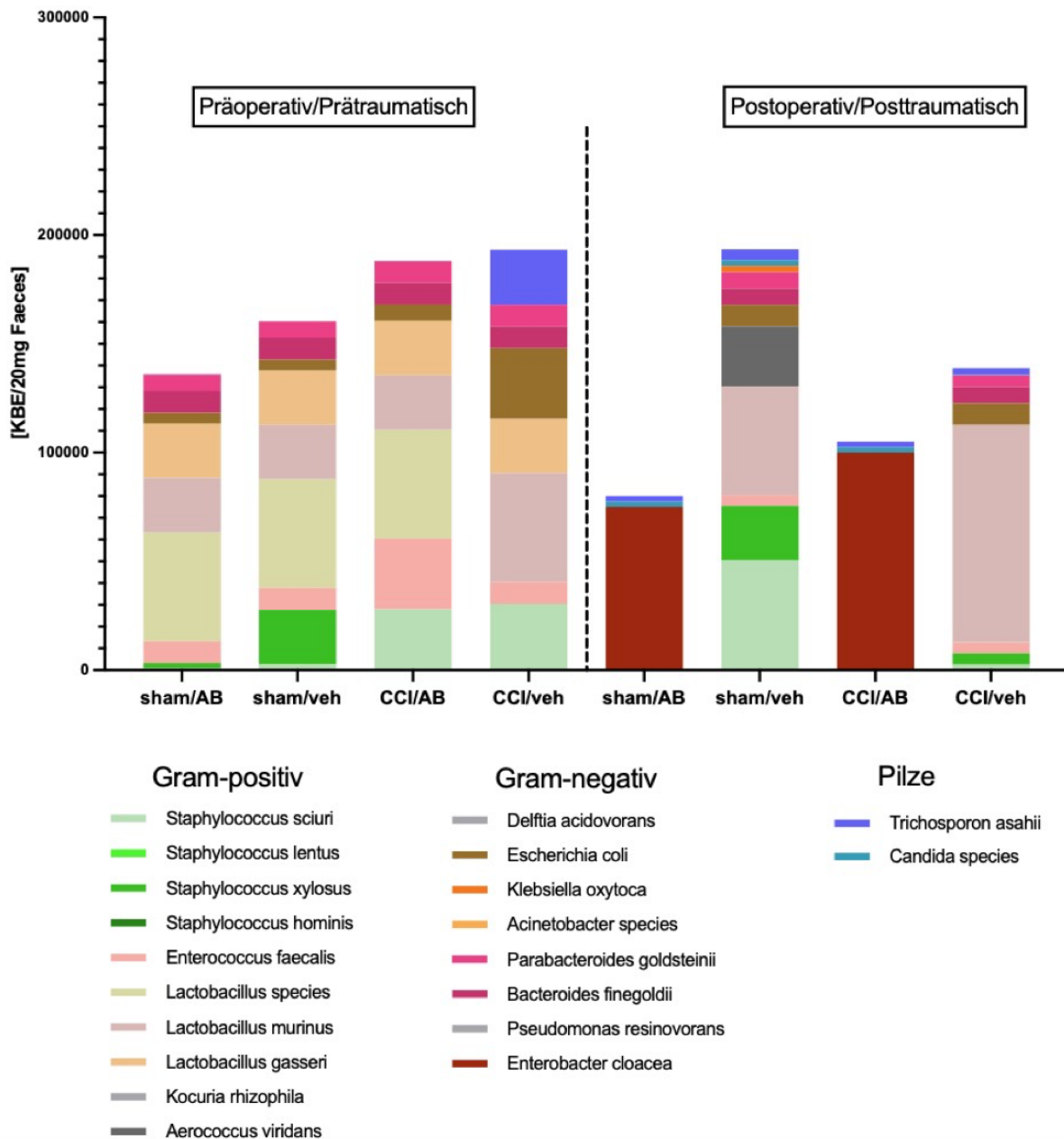


Abbildung 50 In Folge der Antibiotikagabe kommt es zu einer Reduktion der KBE und der Mikrobiomvielfalt in den beiden AB-Gruppen

Das gestapelte Balkendiagramm zeigt die KBE pro 200 mg Faeces der einzelnen Versuchsgruppen. Diese werden zwischen den beiden Zeitpunkten präoperativ und fünften postoperativen Tag gegenübergestellt. Die KBE der unterschiedlichen Bakterien- und Pilzarten können farblich kodiert unterschieden werden, sodass neben der Gesamtzahl der KBE einer Versuchsgruppe auch die KBE der einzelnen Spezies dargestellt werden.

6 Diskussion

6.1 Applikationswege und Wirkspiegel

Die Antibiotika Amoxicillin/Clavulansäure und Vancomycin sowie das Antimykotikum Nystatin wurden nach dem Schema in Tabelle 13 (4.1.6) zusammen in ca. 100ml Wasser angesetzt. Den Versuchstieren der AB/CCI -und AB/Veh-Gruppen wurde täglich eine 100ml Trinkflasche mit den Medikamenten bereitgestellt. Die Mäuse regulieren somit ihre Trinkmenge selbst und hatten immer ausreichend Flüssigkeit zur Verfügung.

Aus diesem Versuchsaufbau ergeben sich mögliche Fehlerquellen und es stellt sich die Frage, ob die Wirkspiegel ausgereicht haben, eine Dysbiose zu induzieren. Die zu erwartenden Effekte auf das Mikrobiom setzen eine ausreichende Aufnahme der Wirkstoffe voraus. Aufgrund der Tatsache, dass die Versuchstiere die in Wasser gelösten Medikamente per os und eigeninitiativ aufnehmen, gestaltet sich dies problematisch. In jedem Käfig befinden sich zwei bis drei Versuchstiere. Es wird angenommen, dass der Anteil der aufgenommenen Trinkmenge sich anteilig auf die Tiere im Käfig gleichmäßig verteilt. Somit kann lediglich über die Differenz des Füllvolumens der Trinkflasche von d_x und d_{x+1} auf die aufgenommene Trinkmenge und somit die verabreichte Medikamentendosis geschlussfolgert werden. Zudem nehmen die Versuchstiere vor allem in den ersten Stunden nach der CCI -oder SHAM-Operation nachweislich weniger Flüssigkeit auf. Dies lässt sich durch den postnarkotisch reduzierten Allgemeinzustand begründen. Der Wirkspiegel der Antibiotika kann in diesem Versuchsaufbau nicht direkt bestimmt werden, sodass keine genaue Aussage über die exakt aufgenommene Menge an Medikamenten getroffen werden kann, zumal die Medikamente auch als Gemisch in Wasser gelöst werden. Es stellt sich somit die Frage, ob die per os Gabe ausreicht, das Mikrobiom zu verändern und eine Dysbiose zu induzieren. Schaut man sich dazu die mikrobiologische Auswertung in Abbildung 49 an ist in beiden Antibiotikagruppen eine deutliche Veränderung des Mikrobioms zu Gunsten Gram negativer Erreger, insbesondere *Enterobacter cloacae* zu erkennen. Die quantitativen und qualitativen Veränderungen des Mikrobioms bringen somit den Nachweis einer Dysbiose durch die verabreichten Antinfektiva. Die Fragestellung, ob die Versuchstiere eine ausreichende Menge an Antibiotika aufnehmen, um eine Dysbiose zu induzieren, kann hierdurch bejaht werden. Die exakten aufgenommenen Mengen und Wirkspiegel der Medikamente konnten im Rahmen dieses Versuchsaufbaus nicht ermittelt werden, jedoch dient das Mikrobiom als indirekter Marker und beweist eine ausreichende Aufnahme der Wirkstoffe. Die per os Gabe nach beschriebenen Schema in diesem Experiment reicht aus die Dysbiose im Gastrointestinaltrakt zu erzielen. Um die applizierte Medikamentendosis in zukünftigen Arbeiten exakt zu quantifizieren, können auf alternative Applikationsformen bei den Versuchstieren zurückgegriffen werden. Mögliche Alternativen wären hierbei die intravenöse Gabe oder die intraperitoneale Applikation der

Wirkstoffe. Um den Wirkspiegel in den Mäusen zu bestimmen, wäre das therapeutische Drug-Monitoring (TDM) eine Option. Diese Methode ist jedoch mit einem großen Kosten- und Zeitaufwand verbunden. Ziel dieser Arbeit war jedoch die Auswirkungen der Dysbiose zu untersuchen, sodass die Off-Target Wirkung einzelner Antibiotika in weiteren Studien untersucht werden könnte.

6.2 Alternative Möglichkeiten das Mikrobiom zu verändern

Das Mikrobiom im Darm ist ein komplexer und wesentlicher Teil unseres Körpers. Die Darmmikrobiota fungiert als eine intestinale biologische Barriere gegen Krankheitserreger und spielt eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase und der Modulation des Immunsystems des Wirts. Die spezifischen Veränderungen in der Zusammensetzung der Darmmikrobiota, die als Dysbiose bezeichnet werden, wurden nicht nur mit vielen gastrointestinalen Erkrankungen, sondern auch mit Stoffwechselerkrankungen, Autoimmunerkrankungen und neuropsychiatrischen Erkrankungen in Verbindung gebracht. Jedoch kann eine Dysbiose nicht nur krankheitsbedingt entstehen, sondern auch induziert werden. Eine entstehende Dysbiose kann positive und negative Effekte auf die ablaufenden Prozesse des Immunsystems nehmen(10, 166). In diesem Experiment wurde das Mikrobiom durch die Gabe von Antibiotika verändert. Die Effekte der einzelnen Antibiotika können hierbei nicht differenziert betrachtet werden, da wie bereits erwähnt keine ausreichende Aussage über Wirkspiegel gemacht werden kann und die einzelnen Antiinfektiva zusammen appliziert wurden. Abhängig von der Bioverfügbarkeit der Wirkstoffe können die Medikamente einerseits nach enteraler Absorption über die Blutbahn ihre Effekte erzielen. Das verabreichte Vancomycin hingegen besitzt eine sehr geringe Bioverfügbarkeit, sodass das Antibiotikum hochkonzentriert im Magen-Darm-Trakt vorliegt. Durch den hohen intraluminalen Wirkspiegel nimmt es direkt Einfluss auf das Mikrobiom und verändert dies. Vancomycin ist daher aktuell auch Mittel der Wahl bei Antibiotika induzierter Fehlbesiedlungen im Darm, wie beispielsweise der Fehlbesiedelung mit dem Bakterium *C. difficile*(227). Daraus lässt sich schließen, dass einzelne Antibiotika das Mikrobiom unterschiedlich verändern. Es stellt sich nun die Frage, ob neben den Antibiotika weitere Möglichkeiten existieren das Mikrobiom nachhaltig zu verändern. Der Einsatz von Antibiotika muss aufgrund von zunehmenden Resistenzlagen weltweit und dem Nebenwirkungsprofil einzelner Wirkstoffe immer kritisch betrachtet werden. Daher werden im Folgenden zwei alternative Möglichkeiten erläutert das Mikrobiom zu beeinflussen.

Zunächst wird die fäkale mikrobiotische Stuhltransplantation (FMT) beschrieben. Das bisherige Einsatzgebiet beschränkt sich bisher eher darauf Dysbiosen zu korrigieren und weniger diese zu induzieren. Die FMT ist eine Technik, bei der Darmmikrobiota von einem gesunden Spender auf den Patienten übertragen werden, mit dem Ziel, eine stabiles

Mikrobiom im Darm zu schaffen oder wiederherzustellen(179). Die Verabreichung von Spenderkot kann sowohl über den unteren mittels Koloskopie als auch den oberen GI-Trakt durch Gastroduodenoskopie stattfinden. Die Durchführung per Koloskopie ist in der Regel sicherer, gut verträglich und leichter durchzuführen. Zudem kann nebenbei der gesamte Dickdarm untersucht werden(228). Komplikationen bei diesem Verfahren können beispielsweise Bauchschmerzen, Blähungen, Durchfälle und Fieber sein. Zu den schweren Komplikationen zählen die Übertragung nicht diagnostizierter Infektionserreger, die Jahre später Infektionskrankheiten wie HIV und Hepatitis verursachen können(229). Somit ist diese Möglichkeit auch nicht frei von Risiko ein Mikrobiom zu verändern und kommt eher zur Wiederherstellung eines eubiotischen Mikrobioms zum Einsatz. Ziel dieses Experimentes war es eine Dysbiose zu induzieren, was sich mit dieser Methode eher schwierig darstellen lässt.

Eine weitere Möglichkeit auf das Mikrobiom Einfluss zu nehmen sind Probiotika. Dies sind lebende Mikroorganismen und kommen bisher bei zahlreichen Darmerkrankungen als adjuvante Behandlungsoption zum Einsatz. Neben der ernährungsphysiologischen Wirkung haben Probiotika auch Einfluss auf das Immunsystem. Studien zeigten entzündungshemmende Wirkungen bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED). Je nach Grunderkrankung werden die Probiotika mit unterschiedlichen Mikroorganismen zusammengesetzt. Diese Bakterien können die Infiltration und das Wachstum pathogener Keime beispielweise durch Konkurrenz um Nährstoffe und Raum hemmen. Sie können so das mikrobielle Darmgleichgewicht wieder herstellen(230, 231). Das bisherige Einsatzgebiet der Probiotika beschränkt sich auf Mikrobiom-assoziierte Erkrankungen. Aufgrund der Mikrobiom-Darm-Hirnachse besteht die Möglichkeit, dass Probiotika auch auf immunmodulatorische Effekte im Gehirn über die Veränderung des Mikrobioms Einfluss nehmen können. Studien zeigten bei Rückenmarksverletzungen im Tiermodell ein besseres Outcome der Versuchstiere nach einer therapeutischen Probiotika-Gabe. Die positiven Auswirkungen von kurzkettigen Fettsäuren, wie beispielsweise Butyrat, spielen hierbei eine entscheidende Rolle. Die nach einem Rückenmarktrauma entstehende Dysbiose zeigte einen Verlust von Butyrat-produzierenden Darmbakterien. Dies konnte auch bei Studien mit Menschen beobachtet werden. Es erklärt, warum die Applikation eines medizinischen Probiotikum, das sich aus verschiedenen Milchsäurebakterien zusammensetzt, als Therapeutikum bei Mäusen mit einer traumatischen Verletzung des Rückenmarks eingesetzt werden könnte. Die dadurch entstehenden Neurometabolite, die lokal im Darm produziert werden, gelangen über den Blutkreislauf direkt ins ZNS und können so inflammatorische Prozesse nachhaltig beeinflussen. Zudem kommt es auch zu einer Induktion von regulatorischen T-Lymphozyten, die eine entscheidende Rolle zur Aufrechterhaltung der Immunhomöostase spielen. Pathologische Entzündungen können so innerhalb und außerhalb des ZNS nachhaltig reduziert werden(232-235). Da das Rückenmark Bestandteil des ZNS ist,

könnten diese Beobachtungen auch in Folgestudien auf traumatische Hirnverletzungen übertragen werden. Die Induktion einer Dysbiose mittels Probiotika stellt sich jedoch schwierig dar. Grund dafür ist die deutliche Diskrepanz der Anzahl lebender Mikroorganismen. Während die Gesamtzahl der im Darm lebenden Mikroorganismen etwa 10^{14} KBE beträgt, werden bei einer Probiotikagabe nur etwa 10^9 verabreicht. Dadurch ist nahezu unmöglich das gesamte Mikrobiom in eine Dysbiose zu versetzen. Die Substitution einzelner Mikroorganismen bzw. Gruppen, um das Mikrobiom gezielt auszugleichen, ist jedoch möglich(236). Probiotika könnten daher in zukünftigen Versuchsreihen als Therapeutikum verwendet werden, neurologische Dysfunktionen, die durch traumatische Schädel-Hirn-Verletzungen induziert wurden, zu reduzieren.

Ein interessanter Aspekt wäre auch, Probiotika adjuvant oder additiv zu einer Antibiotikatherapie zu geben. Es könnten so Nebenwirkungen wie beispielsweise antibiotikaassoziierte Durchfälle durch eine prophylaktische Gabe verhindert werden oder im Anschluss einer Antibiotikatherapie zur Wiederherstellung des Mikrobioms beitragen, sodass die zunächst bewusst induzierte Dysbiose nicht dauerhaft den Organismus schadet. Dies kann Darmerkrankungen infolgedessen reduzieren und Symptome lindern(237, 238). Es besteht daher nachweislich ein Zusammenhang zwischen Probiotika, dem Mikrobiom und dem Immunsystem, sodass auch Auswirkungen auf immunmodulatorische Prozesse im Gehirn denkbar sind und so alternativ zu Antibiotika eingesetzt werden können um neuroprotektive Effekte zu bewirken und unerwünschte Nebenwirkungen zu reduzieren.

6.3 Auswirkungen der traumatischen Hirnverletzung

Die Rolle des Darmmikrobioms spielt bei der Immunmodulation des ZNS eine wichtige Rolle. Präklinische und klinische Studien lieferten Beweise dafür, dass das Mikrobiom an zahlreichen zellulären und molekularen Mechanismen beteiligt ist, die das Fortschreiten akuter, verletzungsbedingter und pathophysiologischer Prozesse beeinflussen(239). Grundvoraussetzung für diese Annahme ist die bereits beschriebene bidirektionale Verbindung der Darm-Hirn-Achse. Beim „Top-Down“ Signalweg kommt es zur Beeinflussung des Mikrobioms durch Einflüsse des ZNS. Die Signalwege bestehen aus dem autonomen Nervensystem, enterischen Nervensystem, der Hypothalamus-Hypophysen-Achse und den Neurotransmittern(240). Daneben existiert auch die „Bottom-Up“- Achse, die das bidirektionale System komplettiert. Hierbei werden neuronale und nicht neuronale Signalwege unterschieden. Zu den neuronalen Achsen zählen die afferenten Nervenfasern des Nervus vagus, welche durch enteroendokrine Neuropeptide und mikrobielle Metabolite stimuliert werden. Über nicht neuronale Signalwege können mikrobielle Metabolite auch direkt Einfluss auf neuroinflammatorische Prozesse nehmen(241). Veränderungen des Mikrobioms in Folge

eines SHT können nachweislich diese Homöostase der bidirektionalen Verbindung verändern und so die Immunantwort in der Peripherie und im ZNS zu beeinflussen.

Im Folgenden werden nun die Ergebnisse dieser Arbeit den aktuellen Forschungshypothesen gegenübergestellt. Dies erfolgt aus verschiedenen Blickwinkeln. Neben den Auswirkungen einer traumatischen Hirnverletzung auf die Darm-Mikrobiom-Hirn-Achse, werden auch die direkten Einflüsse des veränderten Mikrobioms auf die Versuchstiere analysiert, die durch die traumatischen Schädelverletzungen entstehen. Schwerpunkt hierbei wird das Ausmaß der induzierten Dysbiose sein. Die daraus entstehende veränderte Zusammensetzung des Mikrobioms bietet sowohl therapeutische als auch diagnostische Ansatzpunkte. Andererseits kann das durch Antibiotika veränderte Mikrobiom auch Einfluss auf Entzündungsprozesse nehmen, die durch das Trauma induziert wurden. Somit werden beide Aspekte der bidirektionalen Verbindung, unter Berücksichtigung der erhobenen Daten, untersucht.

Auswirkungen des SHT auf die Darmschleimhautintegrität

Grundvoraussetzung für eine funktionierende Verbindung zwischen Darm und dem ZNS ist die Integrität der Darmschleimhaut. Die strukturelle und funktionelle Integrität wirkt supportiv bei Absorption von Nährstoffen und zur Aufrechterhaltung des Elektrolythaushaltes. Zudem wirkt sich eine funktionierende Darmschleimhaut positiv auf die Homöostase des Mikrobioms aus. Darmepithelzellen und die Zell-Zell-Verbindungen wie Tight-junctions oder Occludin bilden die primäre strukturelle Barriere der Darmschleimhaut. Sie fungiert somit als mechanische Barriere zwischen dem Mikrobiom und seinem Wirt. Die Interaktion erfolgt über Rezeptoren der Epithelzellen oder dem Immunsystem. Das SHT kann auf diese Integrität Einfluss nehmen mit weitreichenden Folgen für die Darm-Mikrobiom-Hirn-Achse. Nach traumatischen Hirnverletzungen konnte in Studien eine akute Entzündungsreaktion im Darm nachgewiesen werden. Neben einer traumatischen Hirnverletzung kann auch die Dysbiose auf den Darm proinflammatorisch wirken. Die Hochregulation proinflammatorischer Zytokine im Darm kann demnach zu einer Zerstörung der Darmschleimhaut führen. Pathophysiologisch liegt eine verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen zugrunde. Dazu kommt eine vermehrte Apoptose von Darmepithelzellen, die durch Zytokine getriggert wird(194). Es folgt so eine Zunahme der Translokation von Bakterien und deren Lipopolysacchariden (LPS) aus dem Darm in das lymphatische Schleimhautgewebe. Dies führt über die Darm-Hirn-Achse zu einer Zunahme neuroinflammatorischer Prozesse, die durch eine erhöhte Mikrogliaaktivität entstehen können. Die aktivierten Mikroglia werden hierbei vermehrt in den proinflammatorischen M1 Zustand überführt und können so die sekundäre Hirnschädigung begünstigen (242). In diesem Experiment wurde die Genexpression der Proteine Occludin und dem Tight-Junction-Protein untersucht, die als Teil der Zell-Zell-Verbindungen als mechanische Barriere der Darmschleimhaut fungieren. In allen vier Versuchsgruppen zeigen

sich bei beiden Targets keine signifikanten Unterschiede. Am fünften postoperativen Tag findet demnach keine Beeinflussung der Genexpression dieser Proteine statt. Die Integrität der Darmschleimhaut wurde demnach auf dieser Ebene durch das SHT nicht beeinträchtigt. Eine weitere interessante Erkenntnis ist, dass auch in der Sham/AB-Gruppe es zu keiner verminderten Expression von Adhäsionsproteinen kommt. Somit hat auch zu diesem Zeitpunkt eine induzierte Dysbiose keine negativen Einflüsse auf die Mukosaintegrität. Die Genexpression bezieht sich jedoch ausschließlich auf den Euthanasietag(d5). In Folgestudien könnten dies zu späteren Zeitpunkten untersucht werden, um mögliche Integritätsstörungen zu späteren Zeitpunkten zu detektieren. Ein weiteres Target in diesem Zusammenhang könnte der Nuclearfaktor Kappa B(NF- κ B) sein. Dies ist ein spezifischer Transkriptionsfaktor, der eine wichtige Rolle bei der Immunantwort spielt und zu einer erhöhten Expression des interzellulären Adhäsionsmolekül-1(ICAM-1) führt. ICAM-1 fungiert als Ligand für Immunzellen, die so die Darmwand leichter passieren können. In Studien wurde nach SHT eine erhöhte Aktivität bzw. eine Hochregulation dieser Targets nachgewiesen (243). Deshalb könnte neben den in diesem Experiment untersuchten Zielstrukturen in zukünftigen Versuchsreihen auch die Bindungsaktivität von NF- κ B und die Genexpression von ICAM-1 bestimmt werden, um so die Untersuchung der Integrität und Immunmodulation der Darmschleimhaut nach einem traumatischen Ereignis zu erweitern.

Auswirkungen des SHT auf die Zusammensetzung des Darmmikrobioms

Die mikrobiologischen Ergebnisse zeigten eindeutig die Auswirkungen der Antibiotikagabe auf das Mikrobiom. Die induzierte Dysbiose charakterisiert sich zum einen durch die Reduktion der absoluten Zahl der KBE und auch durch die Mikrobiom-Zusammensetzung. Die Vielfalt des Mikrobioms wurde deutlich reduziert. Über 90% der KBE führen auf den gramnegativen Erreger *Enterobacter cloacae* zurück, der durch Resistenzbildung gegenüber den eingesetzten Antibiotika einen Selektionsvorteil hat und daher dominiert. Der fakultativ anaerobe, stäbchenförmige Erreger gehört zur Darmflora des Menschen und kann nosokomiale Infektionen wie neugeborenen Sepsis, Pneumonie, Meningitis und Harnwegsinfektionen verursachen (244). Die Auswirkungen der Antibiose auf das Mikrobiom konnten eindrücklich dargestellt werden. Es stellt sich nun die Frage, inwiefern traumatische Hirnverletzungen, in diesem Versuch durch ein CCI geschehen, die Darmmikrobiota nachhaltig beeinflussen. Vergleicht man in diesem Experiment das Mikrobiom der CCI/Veh-Gruppe zum prae- und posttraumatischen Zeitpunkt können einige Veränderungen beobachtet werden. Die quantitative Erfassung des Mikrobioms erfolgt über die KBE. In der CCI/Veh-Gruppe wurden prätraumatisch insgesamt 195000 KBE pro 20mg Faeces nachgewiesen. Nach Trauma reduzierte sich das Gesamtmikrobiom auf 135000 KBE pro 20mg Faeces. Dies entspricht einer Reduktion um mehr als 30%. Vergleicht man die Werte innerhalb der CCI/AB-Gruppe zeigt sich eine deutlichere Reduktion der KBE. Es ist daher anzunehmen, dass

traumatische Hirnverletzungen auf das Mikrobiom quantitativ Einfluss nehmen können. Verstärkt wird diese Annahme beim Blick auf die Sham/Veh-Gruppe. Dies ist die Gruppe mit der geringsten Intervention und Manipulation. Sie ist die einzige Gruppe, bei der postoperativ kein Abfall der KBE zu beobachten ist.

Neben den quantitativen Veränderungen wurden auch Verschiebungen der Diversität des Mikrobioms beobachtet. Um die Auswirkungen der Hirnverletzung isoliert beschreiben zu können, werden die mikrobiologischen Analysen der CCI/Veh-Gruppe genauer analysiert. Vergleicht man die Vielfalt des Mikrobioms vor und nach dem Trauma kommt es bei einigen Bakterienarten zu signifikanten Veränderungen. Die relative Verteilung der drei Erregergruppen Pilze, grampositive -und gramnegative Erreger zeigt posttraumatisch eine relative Zunahme grampositiver Erreger, während gramnegative Arten und Pilze abnehmen. Es wird beobachtet, dass es bei einigen Bakterienarten fünf Tage nach dem traumatischen Ereignis zu einer Abnahme einzelner Bakterienarten kommt. Hierzu zählen beispielsweise folgende Erreger: *Lactobacillus gasseri*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylokokkus xylosus* und *Enterococcus faecilis*. Das SHT verursacht somit eine Veränderung der Vielfalt des Mikrobioms. Im Folgenden werden die Veränderungen der *Lactobacillus* Familie genauer analysiert. Bakterien der *Lactobacillus* Gattung zeigten in vorherigen Studien neuroprotektive Effekte. Sie besitzen die Fähigkeit Trauma bedingte Dysfunktionen zu verbessern und sensomotorische Defizite zu reduzieren. Auch eine psychotrope Wirkung ist bekannt, indem chronisch psychischer Stress mikrobiell vermindert werden kann. Zudem konnte die Apoptose in mehreren Hirnregionen reduziert werden (193, 245). Die Reduktion dieser Bakteriengattung in Folge des Traumas könnte sich daher negativ auf das neurologische und psychologische Outcome der Versuchstiere auswirken. Es stellt daher einen interessanten therapeutischen Ansatzpunkt dar. Seltsamerweise kam es auch in der Sham/Veh-Gruppe zu einer Reduktion des *L. gasseri* am fünften postoperativen Tag. Da die Bakterienstämme auch sensibel auf Stress reagieren, könnte die Ursache dafür in der Durchführung der Schein-OP liegen, auch die möglichen Effekte der Narkose sind nicht zu vernachlässigen. Zwar sorgt eine Narkose initial für eine Schmerzausschaltung bei einer OP und somit zu einer Stressminderung. Andererseits könnte auch die Verabreichung der Narkotika vor allem in der Einleitung der Narkose zu einem erhöhtem Stresslevel führen. Eine Studie von Marin et al. zeigte, dass es bei gestressten Mäusen eine Reduktion des *Lactobacillus*-Spiegels beobachtet wurde, nachdem die Mäuse wiederholtem Stress ausgesetzt waren (246). Da die Versuchstiere alle prä- und postoperativen anästhesiologischen Teilschritte inklusive einer Manipulation an der Kalotte durchlaufen haben, kann infolgedessen auch für die Sham-Gruppe von einem erhöhten Stresslevel ausgegangen werden. Dazu kommen auch die durchgeführten Testungen der Versuchstiere, bei der die Tiere aus dem Käfig einerseits in eine ungewohnte Umgebung gebracht wurde und andererseits direkten Kontakt zu Menschen hatten. Das

erhöhte Stresslevel konnte anhand von erhöhtem Stuhl -und Urinabgang bei den Mäusen während der Testung beobachtet werden. Dies könnte die Reduktion der Lactobacillus-Gattung auch in den Gruppen mit Schein-OP erklären. Da sich in allen vier Gruppen die Diversität des Mikrobioms zwischen dem prä- und postoperativen Zeitpunkt unterscheidet kann von grundlegender Beeinflussung des Mikrobioms im Experiment durch äußere Einflüsse, wie beispielsweise hinzugefügten Stress, ausgegangen werden. Daraus folgt, dass Veränderungen des Mikrobioms nicht allein auf die durchgeführten Interventionen und Applikationen von Antibiotika zurückzuführen sind, sondern multifaktoriellen Einflüssen ausgesetzt sind.

Auch präklinische Studien beim Menschen zeigten signifikante Veränderungen des Darmmikrobioms nach einer traumatischen Hirnverletzung. Patienten, die nach stattgehabten SHT innerhalb von 48 Stunden auf eine Intensivstation befanden, wurde an den Tagen null, drei und sieben mittels rektalen Abstriches das mikrobielle Wachstum untersucht. Die isolierten Organismen zu allen drei Zeitpunkten wiesen deutliche Veränderungen auf. Die dominierenden posttraumatischen Erreger gehörten zu den Proteobakterien, wobei die Enterobacteriaceae die größte Gruppe bildeten (247). Manipulation des Darmmikrobioms durch eubiotische Therapien könnten so zukünftig ein spannendes Behandlungsziel für SHT darstellen. Wie bereits beschrieben, können Mikrobiom-Transplantationen und die Applikation von Probiotika Trauma induzierte Pathologien abschwächen und so das Outcome verbessern, indem beispielsweise durch Substitution der Lactobazillen-Stämme das entstandene Defizit ausgeglichen und die potenziell neuroprotektiven Effekte dieser Bakteriengattung greifen können. Die ersten Veränderungen des Mikrobioms treten schon etwa 24 bis 72 Stunden nach Trauma auf. In diesem Zeitraum finden auch die pathophysiologischen Prozesse der sekundären Hirnschädigung statt und stellen daher ein optimales Behandlungsfenster dar. Durch eine rechtzeitige Veränderung des Mikrobioms in einen eubiotischen Zustand könnten so die SHT-assoziierten Sekundärverletzungen reduziert werden. Präklinische Studien beim Menschen verstärken diese These. Bei Patienten mit mittelschweren bis schweren SHT konnte durch eine Laktobazillenreiche Supplementierung innerhalb der ersten 48 Stunden nach Trauma über 21 Tage nosokomiale Infektionsraten, gastrointestinale Dysfunktionen und die Verweildauer auf Intensivstation reduziert werden. Zurückgeführt wurden diese Beobachtungen auf neuroprotektive Eigenschaften der Probiotika (165, 248).

Die Auswirkungen auf das Mikrobiom durch eine traumatische Hirnverletzung können neben neuen therapeutischen Angriffspunkten auch zu diagnostischen Zwecken genutzt werden. Das Ausmaß der Darmdysbiose könnte als diagnostisches Mittel eingesetzt werden, den Schweregrad des SHT zu identifizieren. Bisher kommen mikrobielle Erreger als Biomarker für Krankheiten wie M. Crohn oder dem kolorektalem Karzinom zum Einsatz (167, 249). Nach einer Studie von Houlden et al. korreliert der Grad der Dysbiose mit dem Ausmaß der Schwere

eines Schädeltraumas beim Nagetier, unter anderem mit dem Läsionsvolumen im MRT. Beim Vergleich des veränderten Mikrobioms zwischen SHT und einem ischämischen Schlaganfall gab es deutliche Unterschiede. Dies deutet drauf hin, dass verschiedene Arten von Hirnschädigungen das Darmmikrobiom unterschiedlich beeinflussen (240).

6.4 Auswirkungen der Dysbiose

Wie bereits beschrieben konnte in beiden Antibiosegruppen im Verlauf des Experimentes aufgrund der mikrobiologischen Untersuchungen am fünften postoperativen Tag eine Dysbiose durch die per os Gabe von verschiedenen Antibiotika und Antimykotika induziert werden. In beiden Gruppen konnte eine ähnliche dysbiotische Zusammensetzung des Mikrobioms nachgewiesen werden. Im Folgenden werden die unterschiedlichen Auswirkungen der Dysbiose des Mikrobioms genauer analysiert. Zunächst wird sich mit den Auswirkungen auf die Versuchstiere beschäftigt, die kein zusätzliches Trauma erlitten haben, sodass Effekte eines veränderten Mikrobioms isoliert analysiert werden. Sehr interessant und damit das Hauptaugenmerk dieser Diskussion sind die Folgen der Dysbiose auf die Versuchstiere mit stattgehabten SHT. So könne mögliche neuroprotektive Effekte oder eine Zunahme neuroinflammatorischer Prozesse nach Trauma genauer untersucht werden. Bisher wurde beschrieben, wie sich in Folge des Traumas verändert und welche Folgen dies für den Patienten beziehungsweise auf die Versuchstiere hat. Im Folgenden wird der Einfluss der Dysbiose genauer analysiert und die im Versuch erhobenen Ergebnisse und Beobachtungen mit der aktuellen Literatur verglichen.

Auswirkungen einer Dysbiose auf Versuchstiere der SHAM-Gruppe

Zunächst werden die Effekte einer Dysbiose ohne vorausgegangenes Trauma genauer untersucht. So können Grundkenntnisse der Mikrobiom-Hirn-Achse erlangt werden und auch unerwünschte Wirkungen einer induzierten Dysbiose auf die Versuchstiere dargestellt werden. In der Literatur findet man zahlreiche Studien zu den Auswirkungen einer Dysbiose. Im Folgenden werden jedoch nur die im Experiment erhobenen Ergebnisse dargestellt und interpretiert. Im Vergleich der beiden Sham-Gruppen zeigten die Versuchstiere mit Antibiotikagabe einen Trend, der mit einer erhöhten Expression des mikroglialen Aktivitätsmarker, MHC-2, einher geht. Das proinflammatorische Zytokin $INF\gamma$ zeigte signifikant erhöhte Expression in der Sham/AB-Gruppe gegenüber der Sham/Veh-Gruppe. Diese beiden Beobachtungen können die These einer Mikrobiom-Darm-Hirn-Achse bestätigen. Bei genauer Betrachtung des Datensatzes für das Zytokin $INF\gamma$ fällt auf, dass in der Sham/Veh bei 5/8 Messungen keinerlei Expression nachweisbar war. Dies könnte aufgrund methodischer Ungenauigkeit entstanden sein, sodass die signifikant erhöhten Werte in der Sham/AB durch diese Fehlerquelle entstanden sein könnten. Sollte dies nicht der Fall sein könnte eine Dysbiose ursächlich für eine erhöhten Mikroglia Antwort und einer Zunahme des

Inflammtionsgeschehen intrazerebral ohne äußere Verletzungen sein. Dies ist ein weiterer Grund, die Indikation für Antibiotika sehr streng zu stellen, da es neben der Resistenzbildung auch weitreichende Auswirkungen auf das Nervensystem mit sich bringen könnte. Darmdysbiosen können somit einen Faktor darstellen, Erkrankungen und Verletzungen, die mit neuroinflammatorischen Prozessen einher gehen, zu verstärken (250). Auf klinische und verhaltensbiologische Daten, wie beispielsweise dem Gewicht, hatte die induzierte Dysbiose in den ersten fünf Tagen nach der Operation in beiden Sham-Gruppen keine negativen Auswirkungen. Somit haben die erhöhten Inflammationsmarker zunächst keine Auswirkungen auf den Allgemeinzustand der Tiere. Interessant wäre dies in zukünftigen Studien über einen längeren Zeitraum zu untersuchen.

Auswirkungen einer Dysbiose und Antibiotikagabe nach experimentellem SHT

Der Einfluss des Darmmikrobioms auf Entzündungsreaktionen und Reparaturmechanismen bei SHT-Patienten ist von großer klinischer Bedeutung. Da Patienten mit SHT aufgrund häufiger Antibiotikaeinnahmen, langen Krankenhausaufenthalten, autonomer Dysfunktion und dem Trauma selbst sehr anfällig für Veränderungen des Mikrobioms sind (9). Neben der Charakterisierung und Quantifizierung von Mikroglia und Astrozyten wurden post mortem zahlreiche Inflammationsmarker im Gehirn untersucht, um so die Auswirkungen einer Dysbiose auf die sekundäre Hirnschädigung genauer zu untersuchen. Ergänzt wurde dies durch zahlreiche Testungen mit den lebenden Versuchstieren. Es stellt sich die Frage, ob eine induzierte Dysbiose zu einer Verschlechterung oder zu einer Verbesserung der neuroinflammatorischen Abläufe führt und welche Auswirkungen dies auf das Verhalten bzw. der Klinik der Versuchstiere hat. Sowohl in der aktuellen Literatur als auch in diesem Experiment konnte für beide Thesen Nachweise gefunden werden.

Zunächst werden die negativen Auswirkungen einer antibiotikainduzierten Modulation des Mikrobioms genauer analysiert. Einige Studien zeigten, dass Mäuse, denen zwei Wochen vor und eine Woche nach der Verletzung ein Breitbandantibiotika verabreicht wurde, einen erhöhten neuronalen Verlust erlitten haben. Besonders anfällig für akute und chronische Neurodegeneration sind Neuronen der CA3 Region des Hippocampus. Studien zeigten ipsilateral bei den Versuchstieren mit Antibiotikagabe einen erhöhten neuronalen Verlust, der jedoch nicht mit einem verminderten Volumen des Hippocampus einher geht. Daraus lässt sich schließen, dass erhöhte neuronale Verlust in den Antibiotikagruppen nicht durch eine Ausdehnung des Läsionsvolumen begründet werden können (9). Diese Beobachtung, dass der neuronale Untergang nicht mit einer Ausdehnung des Läsionsvolumens einher geht, konnte in diesem Experiment methodisch auf eine andere Weise bestätigt werden. Die Berechnung der ipsilateralen Läsionsvolumina beider CCI-Gruppen zeigte keine signifikanten Unterschiede. Bei diesem Versuch wurde zudem die Dicke der Granularzellschicht der ipsi- und kontralateralen Seite beider Hippocampi untersucht. Während die ipsilaterale Seite der

CCI/AB-Gruppe im Vergleich zur CCI/Veh zwar eine nicht signifikante erniedrigte Granularzellschicht darbot, konnte auf der kontralateralen Seite zumindest ein Trend beobachtet werden, bei dem in der CCI/AB-Gruppe ein erhöhter Verlust der Granularzellschicht nachgewiesen wurde. Dies verstärkt die Annahme, dass das Trauma nicht alleinig für den neuronalen Untergang verantwortlich ist, sondern die Dysbiose dies verstärken könnte. Der erhöhte Verlust in der CCI/AB Gruppe kann durch die beschriebene bidirektionale Verbindung zwischen Gehirn und Mikrobiom erklärt werden und unterstützt die Behauptung, dass eine Dysbiose die Hirnschädigung verschlimmern könnte, da auch kontralateral ein neuronaler Verlust nachgewiesen wurde. Methodisch bietet die Messung der Dicke in diesem Experiment jedoch Fehlerquellen. Durch Ermittlung des Mittelwertes aus drei Messungen können neuronale Verluste in bestimmten Regionen des Hippocampus kaschiert werden. Die Messung erfolgte auch rein subjektiv und durch mangelnde Auflösung bei Vergrößerung des Bildausschnittes, besteht die Gefahr von Ungenauigkeiten. Alternativ zur Dicke Messung könnte in zukünftigen Versuchen die Zelldichte unterschiedlicher hippocampaler Regionen gemessen werden, um dadurch eine erhöhte Objektivität zu gewährleisten. Da die Messungen eine Punktmessung am fünften postoperativen Tag darstellen, wäre in zukünftigen Studien eine Beobachtung mit mehreren Messungen über längere Zeiträume interessant, da sich Veränderung des Läsionsvolumen erst im Laufe der Zeit demaskieren könnten.

Im Rahmen des „Novel object recognition Tests“ deuteten die erhobenen Ergebnisse darauf hin, dass in der CCI/AB Gruppe mögliche Gedächtnisstörungen verstärkt auftreten. Da die Bereiche Neugier, Angst und Gedächtnis eng mit dem Hippocampus verbunden sind (9, 251), können die erhobenen Daten ein Zeichen für hippocampale Dysfunktion sein und würde somit indirekt die Annahme eines neuronalen Untergangs stützen. Desweiteren konnten auch Einflüsse auf neuroinflammatorische Prozesse beobachtet werden. Studien zeigten beispielsweise sieben Tage nach erfolgtem Trauma eine erhöhte Aktivität bei Markern für Mikroglia. Als Reaktion auf spezifische Reize besitzen Mikroglia die Fähigkeit Neuronen zu schaden und spielen daher eine wichtige Rolle. Es wird angenommen, dass eine erhöhte Mikroglia-Aktivität mit einem erhöhten Zelltod einhergeht (252, 253). Besonders bei den Versuchstieren mit antibiotikainduzierter Dysbiose wurde in Studien eine erhöhte Mikrogliaaktivierung nachgewiesen. Auch morphologisch zeigten sich Veränderungen. Diese Daten deuten auf eine mikrogliale Veränderung zugunsten des entzündungsfördernden Phänotyps hin, die in Folge der Dysbiose verstärkt wurden (254). Marker für mikrogliale Aktivierung waren in diesem Versuchsaufbau TSPO, Iba1 und MHC2. Diese wurden per PCR aus ipsilateralen Trimmchnitten untersucht. Erwartungsgemäß war die Expression dieser Marker in beiden CCI-Gruppen signifikant erhöht, da durch das Trauma die pathophysiologische Neuroinflammation induziert wurde. Jedoch konnte kein signifikanter Unterschied bei den Versuchstieren mit Antibiotika induzierter Dysbiose beobachtet werden.

Dies unterstützt zunächst die These, dass eine Dysbiose die Mikroglia Antwort am fünften postoperativen Tag nicht verstärkt. Gründe für diese Diskrepanz zur Literatur könnten die angewandten Methoden liefern. In Studien wurden die Gewebeproben erst zu einem deutlich späteren Zeitpunkt nach erfolgreichem Trauma entnommen. Es könnte sein, dass ein Zeitraum von fünf Tagen zu kurz ist, um signifikante Unterschiede ausarbeiten und erkennen zu können. Colerrio et al. untersuchte die mikrogliale Aktivität explizit in Regionen mit geringer Hypoxie-Toleranz, wie beispielsweise im Hippocampus. Da diese Regionen sensibler auf traumatische Einflüsse und auch auf die Dysbiose reagieren, können dort eine gesteigerte Antwort von Mikroglia frühzeitiger und deutlicher nachgewiesen werden. Untersucht man hingegen Trimschnitte einer ganzen Hemisphäre, wie in diesem Versuchsaufbau, werden Unterschiede erst deutlich später signifikant, obwohl vielleicht in manchen Regionen schon eindeutige Unterschiede vorhanden und nachweisbar wären. Diese Anmerkung lässt sich auf alle molekularbiologischen Untersuchungen der ipsilateralen Trimschnitte übertragen, sodass eine zytologische Untersuchung kleinerer Hirnareale angestrebt werden könnte.. Dies ist jedoch mit einem deutlich größeren Kosten -und Zeitaufwand verbunden. Neben der Mikroglia spielen auch Astrozyten eine wichtige Rolle.

Die Aktivierung von Astrozyten kann einerseits chemotaktisch auf Mikrogliazellen wirken und andererseits direkt durch die Freisetzung von Bodenstoffen um so die Neuroinflammation zu triggern (118). GFAP dient in diesem Versuch als Aktivitätsmarker für Astrozyten. Beide CCI-Gruppen zeigen eine deutlich erhöhte Expression. Jedoch konnte bei der CCI/AB Gruppe eine signifikant höhere Expression im Vergleich zur CCI/Veh Gruppe nachgewiesen werden. Dies könnte durch die induzierte Dysbiose begründet werden. Diese führt über die Mikrobiom-GIT-Hirn-Achse zu einem erhöhten Aktivitätszustand der Astrozyten. Demnach würden die Veränderungen des Mikrobioms eine erhöhte Aktivität der Astrozyten nach Trauma zur Folge haben, was einen neuronalen Untergang, beispielsweise über die Bildung reaktiver Gliosen, begünstigen könnte. Verstärkt wird diese Annahme auch durch die Ergebnisse des Western-Blots. Dort zeigten sich ähnliche Ergebnisse. Auch hier waren GFAP-Intensität in der CCI/AB-Gruppe erhöht, jedoch ohne Signifikanz.

Widersprüchlich zu diesen Beobachtungen sind jedoch die Ergebnisse der Immunhistochemie in diesem Versuch. Diese zeigen sowohl für Astrozyten als auch für die Mikroglia im unmittelbaren Läsionsgebiet beider CCI/AB Gruppen eine signifikant verminderte Zelldichte im Vergleich zur CCI/Veh-Gruppe. Dies lässt vermuten, dass eine Dysbiose die periläsionale Migration von Astrozyten und Mikroglia reduzieren könnte und somit auch positive und somit neuroprotektive Effekte der Dysbiose in Bezug auf traumatische Hirnverletzungen beobachtet werden können. Die erhöhte Expression von GFAP in der CCI/AB Gruppe hingegen zeigt eine erhöhte Aktivität der Astrozyten. In der CCI/AB steht somit eine erhöhte Aktivität, einer erniedrigten absoluten Zellzahl gegenüber. Ursächlich hierfür könnten methodische

Unterschiede der Messorte sein. Während bei der Expression von GFAP das gesamte ipsiläsionale Gewebe der Hirnschnitte untersucht wird, werden die Zellzahlen der Astrozyten nur in einem kleinen periläsionalen Feld quantifiziert. Zudem könnte die Immunmodulation durch die Dysbiose einerseits die Chemotaxis und Migration von Zellen ins Läsionsgebiet reduzieren und andererseits über andere Mechanismen den Aktivitätszustand der Astrozyten erhöhen, sodass man die quantitativen Aspekte differenziert zum Aktivitätszustand betrachten sollte. Auch Ungenauigkeiten und mangelnde Objektivität bei der Erhebung der immunhistochemischen Daten können ursächlich für die Diskrepanz beider Beobachtungen sein. Der zu analysierende Ausschnitt bei der immunhistochemischen Untersuchung war sehr klein und die Aufnahmen sind sehr untersucherabhängig. Kleine Veränderungen des Ausschnittes können die ausgezählte Zellzahl deutlich beeinflussen. Somit ist die Objektivität dieser Testverfahren im Vergleich deutlich reduziert und weist eine erhöhte Fehleranfälligkeit auf. Die PCR und Western-Blot Analyse sind jedoch deutlich objektiver, sodass diese Ergebnisse eine erhöhte Validität aufzeigen. Des Weiteren konnte Simon et al. 72 Stunden nach CCI bei Mäusen eine signifikante Reduktion aktivierter Mikroglia in Antibiotika-Gruppen beobachten. Über die Mikrobiom-Darm-Hirn-Achse könnte dies einen Mechanismus für Neuroprotektion erklären (255). Diese These wird im Experiment durch die immunhistochemische Auswertung der Mikrogliazellzahl im periläsionalen Randgebiet verstärkt. Dies zeigte eine signifikante Verringerung der Mikrogliazahl in der CCI/AB-Gruppe. Weiter Studien konnten jedoch bei einer verringerten Immunantwort auch negative Auswirkungen nachweisen (70). Wie bereits beschrieben konnte in diesem Versuch kein signifikanter Anstieg oder Abfall der mikroglialen Aktivitätsmarker beobachtet werden. Jedoch auch in der Studie von Simon et al. wurden die Mikroglia nur im dorsalen Hippocampus und nicht in der gesamten ipsilateralen Hälfte untersucht. Somit können nachweislich neben den negativen Folgen auch positive Auswirkungen einer Antibiotikatherapie bestehen. Bezieht man sich isoliert auf die Dysbiose und deren Folgen, ist der Großteil der aktuellen Literatur der Meinung, dass dies mit einem erhöhten neuronalen Verlust und einer dysregulatorischen Immunantwort einher geht, was das posttraumatische Outcome eher verschlechtert. Die Dysbiose stellt daher interessante therapeutische Ansätze dar. Jedoch stellt sich die Frage, warum wie bei Simon et al. und auch in diesem Experiment bei einigen Ergebnissen eine deutliche Verbesserung bei Verhaltenstests der Versuchstiere unter Antibiotikagabe beobachtet werden konnten, obwohl eine Dysbiose nachweislich bestanden hat. Bei Erhebung des Neurological severity Score (NSS), der zur Quantifizierung des neuromotorischen Status verwendet wird, zeigte die CCI/AB Gruppe am fünften postoperativen Tag signifikant niedrigere Werte als die CCI/Veh-Gruppe, was mit einem geringeren neurologischen Defizit einhergeht. Der NSS kann so das Outcome und Wohlbefinden der Versuchstiere darstellen und die Ergebnisse zeigen signifikant bessere Werte in der CCI/AB-Gruppe. Ein Kritikpunkt

des NSS ist trotz Verblindung die subjektive Erhebung des Scores, sodass die Ergebnisse auch durch eine fehlerhafte Einschätzung des Untersuchers zustande kommen könnten. Trotz Dysbiose kommt es also zu einer Verbesserung des neurologischen Outcomes. Eine Erklärung hierfür könnte der nachgewiesene erhöhte Aktivierungszustand von Astrozyten bieten. Neben den erwähnten negativen Auswirkungen haben aktive Astrozyten auch eine Schutzfunktion, die für das Überleben von Neuronen ein wichtiger Bestandteil ist. Nach mittelschweren fokalen Hirnverletzungen konnte eine verringerte Entzündung und vermehrte Erhaltung neuronalen Gewebes nachgewiesen werden, die mit einer erhöhten Aktivität der Astrozyten in Verbindung gebracht wurde (256). Die signifikant erhöhte GFAP-Expression im Hirngewebe der CCI/AB-Gruppe in diesem Versuch könnte diese These festigen und das bessere Abschneiden beim NSS erklären.

Die neuroprotektive Wirkung kann auch durch die Off-Target-Wirkung der Antibiotika erklärt werden und weniger durch die Mikrobiom-Darm-Hirn-Achse. Hierzu gehört zum Beispiel die erhöhte Glutamattransporter-Expression unter der Gabe von β -Laktam-Antibiotika. Dies führt zu einer geringeren Glutamat-vermittelten Exzitotoxizität und verhindert so neuronalen Untergang (150, 157). Bei der Analyse in diesem Experiment konnte kein signifikanter Anstieg der GLUT1-Expression im Hirngewebe nachgewiesen werden. Es bestünde die Möglichkeit, dass dies zu einem späteren Zeitpunkt erst nachweisbar ist. Der Nachweis der OFF-Target Effekte in diesem Experiment lässt sich schwer darstellen. Grund dafür ist zum einen der Applikationsweg. Durch die per os Gabe aller Medikamente in einer Trinkflasche und der fehlenden Messung des Wirkspiegels ist es nicht möglich zwischen den Effekten einzelner Substanzen zu unterscheiden. Zukünftige Studien müssten daher die Medikamente einzeln applizieren und so die Effekte genauer beurteilen zu können. In dieser Arbeit liegt das Hauptaugenmerk jedoch auf den Auswirkungen der Dysbiose. Die Dysbiose geht daher vermehrt mit einer Progression und Hochregulation neuroinflammatorischer Prozesse einher, jedoch können einzelne Antibiotikagruppen direkt neuroprotektiv wirken. Dies könnte einen Erklärungsversuch sein, warum in dieses Experiment nach erfolgtem Trauma positive und negative Beobachtungen nebeneinander vorkommen.

Dysbiose ist nicht gleich Dysbiose

Die unterschiedlichen Auswirkungen und Beobachtungen nach einer Dysbiose, die meistens eine Zunahme des neuronalen Untergangs als gemeinsame Endstrecke haben, lassen sich dadurch erklären, dass nicht jede Dysbiose gleich ist. Da in den einzelnen Studien und auch in diesem Experiment neben der Applikationsdauer und den Dosierungen der Antiinfektiva auch die verwendeten Substanzen bzw. Kombinationen variierten, hat dies zur Folge, dass der Einfluss auf das Mikrobioms unterschiedlich ist. Demnach können die Dysbiosen zwar nachgewiesen werden, unterscheiden sich jedoch in der mikrobiellen Zusammensetzung. Dies

könnte ursächlich für die unterschiedlichen Effekte der einzelnen Studien sein und die teilweise unterschiedlichen Beobachtungen in früheren Studien im Vergleich zu diesem Experiment erklären. Es ist daher anzunehmen, dass unterschiedliche Dysbiosen auch unterschiedlich Einfluss nehmen. Somit könnten die Vergleichbarkeit und Übertragbarkeit einzelner Studien, die sich mit dieser Thematik auseinandersetzen, eingeschränkt sein.

6.5 Das murine Tiermodell

In der Erforschung des Mikrobioms spielt das Mausmodell eine wichtige Rolle. Umfangreiche Ähnlichkeiten in Genetik, Physiologie und Anatomie haben es ermöglicht zahlreiche Rückschlüsse auf die Humanbiologie zu ziehen. Die hohen Reproduktionsraten und kurze Lebenszyklen sind deutliche Vorteile des Mausmodells. Dazu kommen die niedrigen Kosten im Vergleich zu anderen Versuchsmodellen mit Säugetieren (257). Jedoch zeigt das murine Tiermodell auch einige Limitationen.

6.5.1 Anatomische Besonderheiten des Magen-Darmtraktes

Die Physiologie und Anatomie des Magen-Darmtraktes von Mäusen und Menschen ist sehr ähnlich. Es gibt jedoch einige Unterschiede, die durch unterschiedliche Körpergröße, Ernährung und Stoffwechselforgänge erklärbar sind. Obwohl das Verhältnis zwischen der Darm- und Körperoberfläche beider Arten sehr ähnlich ist, unterscheidet sich das Verhältnis einzelner Darmabschnitte sich deutlich. Ein Beispiel ist das Verhältnis zwischen Dünndarm und Kolon. Dies beträgt bei Mäusen 2,5 gegenüber 7 beim Menschen (257, 258). Das murine

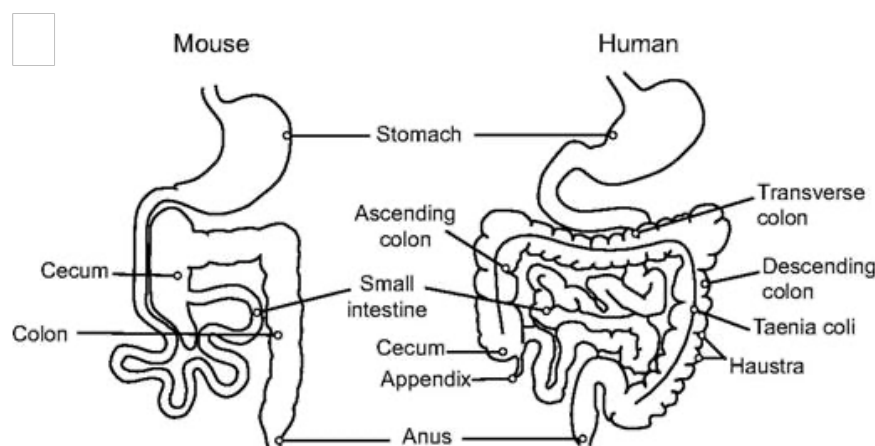


Abbildung 51 Makroskopische Unterschiede der Anatomie des Magen-Darmtraktes (modifiziert nach Nguyen (257))

Coecum ist deutlich größer und erfüllt weitreichendere Aufgaben als beim Menschen. Dazu kommt das Fehlen des Appendix bei Mäusen. Studien zeigten, dass der Appendix als Reservoir für das Mikrobiom fungiert, um so Störungen der Mikrobiota entgegenzuwirken (259). Sodass bei diesem Versuch die Übertragbarkeit auf den Menschen eingeschränkt sein könnte. Histologische Unterschiede wären beispielsweise die deutlich größeren Villi bei den

Mäusen. Dies vergrößert die Resorptionsoberfläche als Kompensationsmechanismus für den Mangel an Schleimhautfalten. Zudem befinden sich im murinen Darm kaum Haustrien. Es kommt so zu einer veränderten Fermentation (257). Dies hat Auswirkungen auf die Produktion von Vitaminen und kurzkettigen Fettsäuren, die nachweislich ein Bestandteil der Mikrobiom-Hirn-Achse darstellen.

6.5.2 Vergleich des murinen und humanen Mikrobioms

Bei Untersuchungen des Darmmikrobioms beider Gattungen zeigten sich deutliche Unterschiede. Beide Mikrobiota werden von zwei großen Phyla dominiert. Untersuchungen zeigten, dass etwa 85% der Bakteriengattungen beim Menschen im Vergleich zum Mausmodell nicht vorhanden sind. Es können demnach Unterschiede in der Mikrobiomzusammensetzung zwischen den beiden Gattungen beobachtet werden. Ursächlich hierfür sind neben den erwähnten anatomischen Unterschieden auch die Exposition unterschiedlicher Störfaktoren. Diese können von der Ernährung bis zum Kontakt mit unterschiedlichen Krankheitserregern reichen. Trotz zahlreicher Unterschiede zeigen der Vergleich der beiden Mikrobiota auch Gemeinsamkeiten auf. Ein Beispiel hierfür ist, dass bei einer Reduktion der Mikrobiomvielfalt in beiden Modellen das Risiko entzündlich ablaufender Prozesse im Darmtrakt erhöht. Die Dysbiose wurde in diesem Versuch durch die Antibiose induziert. Die Auswirkung einer Dysbiose im Mausmodell könne daher auf neuroinflammatorische Prozesse beim Menschen teilweise übertragen werden (257, 260). Der absolute Vergleich zwischen beiden Spezies erscheint schwierig. Jedoch ist das Mausmodell geeignet Variationen oder Veränderungen des Mikrobioms und deren Auswirkungen primär zu untersuchen. Durch das Mausmodell können Versuche durchgeführt werden, die für menschliche Probanden zu invasiv wären. Es bietet somit Möglichkeiten Manipulationen am Mikrobiom durchzuführen und deren Kausalität auf neuroinflammatorische Prozesse über die Mikrobiom-Hirn-Achse zu untersuchen.

6.5.3 Alternative Tiermodelle

Die Vor- und Nachteile des Mausmodells wurden bisher gegenübergestellt. Es stellt sich nun die Frage, ob für die Darmmikrobiomforschung in Zusammenhang mit einem SHT alternative Tiermodelle für zukünftige Experimente in Frage kommen. Zahlreiche Studien haben das Mikrobiom verschiedenster Tiermodelle untersucht und mit dem des Menschen verglichen. Ratten sollen in Bezug auf das menschliche Mikrobiom deutlich repräsentativer sein als Mäuse (261). Eine weitere Möglichkeit ist das Meerschweinchen-Modell. Aufgrund der Homologie in Bezug auf das Transmembran Protein E-Cadherin kam es bisher vor allem bei Untersuchungen mit Infektionen durch den Erreger *Listeria monocytigenes* zum Einsatz (262). Die größte Ähnlichkeit in der mikrobiellen Zusammensetzung weisen nicht-menschliche Primaten, wie beispielsweise Schimpansen, auf. Trotz des Vorteils einer engen evolutionären Verwandtschaft, was neben der Ähnlichkeit des Mikrobioms auch große Ähnlichkeiten in

Anatomie und Physiologie garantiert, haben Primatenmodelle eine sehr strenge ethische Limitierung für Experimente und für die Aufzucht der Tiere im Vergleich zu Mäusen (257).

7 Zusammenfassung

In dieser Dissertation wurden die Auswirkungen einer Antibiotikatherapie bei experimentellem Schädel-Hirn-Trauma untersucht. Besonderes Augenmerk lag auf Veränderungen des Mikrobioms, um so potenziell schädliche oder neuroprotektive Effekte der Dysbiose zu analysieren. Hierfür wurden 40 männliche Mäuse des Stammes C57Bl6/J in die Gruppen CCI/AB, CCI/Veh, Sham/AB und Sham/Veh randomisiert. Den beiden CCI-Gruppen wurde mittels Operation eine rechtsparietale Läsion gesetzt, wohingegen die Sham-Gruppen eine Schein-OP erhielten. Beiden Interventionsgruppen erhielten im Anschluss p.o entweder ein Gemisch aus Antibiotika und Antimykotika oder aus Trinkwasser. Die Versuchstiere wurden 5 Tage lang neurologisch-koordinativ und verhaltensbiologisch getestet. Nach der Dekapitation wurden die Gehirne entnommen und für bereits etablierte Untersuchungen vorbereitet. Neben der histologischen Aufarbeitung des Läsionsvolumens, erfolgten unter anderem auch eine immunhistochemische Aufarbeitung zur Quantifizierung von Astrozyten und Mikroglia. Das entnommene Gehirngewebe wurde zudem molekularbiologisch untersucht. Dies trifft auch auf entnommenes Darmgewebe zu. Das Mikrobiom wurde stichprobenartige mittels Stuhlproben der Versuchstiere mikrobiologisch analysiert.

Die Ergebnisse zeigten, dass es zu deutlichen Veränderungen in der Zusammensetzung des Mikrobioms kam. Nicht nur durch die Applikation von Antibiotika und Antimykotika, sondern auch das Trauma allein zeigte nachweislich Einfluss. Dies war zwar geringer als nach Medikamentengabe, aber konnte durch mikrobielle Untersuchungen nachgewiesen werden. Somit konnte primär durch das experimentelle SHT eine mögliche Verbindung zwischen dem Gehirn und Mikrobiom nachgewiesen werden. Die entstehende Dysbiose hatte mehrere Auswirkungen auf den Organismus der Versuchstiere, insbesondere auf neuroinflammatorische Prozesse. In der Literatur und in diesem Experiment gehen Dysbiosen überwiegend mit erhöhten neuronalen Verlusten einher. Insbesondere in Regionen mit geringer Sauerstoffdefizittoleranz, wie bspw. dem Hippocampus. Die Aktivität der Astrozyten war in der CCI/AB-Gruppe signifikant erhöht und spricht daher eher für eine Zunahme der Neuroinflammation. Zudem zeigten Studien eine erhöhte Mikrogliaaktivität in Folge einer Dysbiose, die in diesem Versuch jedoch nicht bestätigt wurde. Neben den negativen Auswirkungen auf ablaufende Prozesse im Gehirn, können Dysbiosen auch bestehende Darmkrankheiten in ihrem Verlauf negativ beeinflussen und induzieren. Dies wurde auch für nicht traumatische neurodegenerative Erkrankungen beobachtet. Verhaltensbiologisch zeigte sich jedoch in der CCI/AB Gruppe eine signifikante Verbesserung. Auch die periläsionale Anzahl von Mikroglia und Astrozyten war bei den Versuchstieren mit Dysbiose verringert.

Diese eher widersprüchlichen Beobachtungen könnten auf die Off-Target Effekte der Antibiotika zurückgeführt werden. Diese können über verschiedene Mechanismen ein Herunterregulieren der Immunantwort bewirken. Ein Beispiel hierfür wäre die verminderte Glutamat-induzierte Exzitotoxizität durch eine erhöhte Expression des Glutamattransporters. In diesem Experiment konnte dies durch die fehlende Differenzierung der Effekte einzelner Wirkstoffe nicht untersucht und nachgewiesen werden. Es stellt sich somit abschließend die Frage, wie die positiven Off-Target Effekte einzelner Antibiotika genutzt werden können, unter der Voraussetzung, die negativen Folgen einer Dysbiose zu verhindern bzw. abzuschwächen. Der adjuvante Einsatz von Probiotika stellt einen interessanten Lösungsansatz dar. Somit können neben den möglichen neuroprotektiven Effekten der Antibiotika auch gezielt Probiotika eingesetzt werden, die zum einen die Dysbiose abschwächen und durch eine gezielte Zusammensetzung mit bestimmten Bakteriengattungen, wie bspw. Lactobacillen, zudem neuroprotektive Auswirkungen auf den Organismus haben. Man würde so zwar die unerwünschten Nebenwirkungen reduzieren, aber nicht verhindern. Der Einsatz von Antibiotika sollte daher immer äußerst kritisch erfolgen, neben der aktuellen Resistenzlage weltweit besonders unter dem Aspekt, dass auch in der Sham/AB-Gruppe eine Zunahme neuroinflammatorischer Marker beobachtet wurde.

Der nachweisliche Einfluss des Mikrobioms auf neuroinflammatorische Prozesse und die Off-Target Effekte einzelner Antibiotika stellen daher zukünftig interessante Ansatzpunkte dar, die sekundäre Hirnschädigung zu minimieren. Die Optimierung positiver Effekte und Reduktion unerwünschter Nebenwirkungen sollte Gegenstand zukünftiger Forschung sein. Diese Arbeit konnte grundlegende Erkenntnisse dazu liefern.

8 Literaturverzeichnis

1. Maas AI, Stocchetti N, Bullock R. Moderate and severe traumatic brain injury in adults. *Lancet Neurol.* 2008;7(8):728-41.
2. Rosenfeld JV, Maas AI, Bragge P, Morganti-Kossmann MC, Manley GT, Gruen RL. Early management of severe traumatic brain injury. *Lancet.* 2012;380(9847):1088-98.
3. Gustavsson A, Svensson M, Jacobi F, Allgulander C, Alonso J, Beghi E, et al. Cost of disorders of the brain in Europe 2010. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2011;21(10):718-79.
4. Maas AIR, Menon DK, Adelson PD, Andelic N, Bell MJ, Belli A, et al. Traumatic brain injury: integrated approaches to improve prevention, clinical care, and research. *Lancet Neurol.* 2017;16(12):987-1048.
5. Chesnut RM, Marshall LF, Klauber MR, Blunt BA, Baldwin N, Eisenberg HM, et al. The role of secondary brain injury in determining outcome from severe head injury. *J Trauma.* 1993;34(2):216-22.
6. Werner C, Engelhard K. Pathophysiology of traumatic brain injury. *Br J Anaesth.* 2007;99(1):4-9.
7. Engelhard K, Müller-Forell W, Werner C. [Therapy of head trauma]. *Anaesthesist.* 2008;57(12):1219-31.
8. Ng SY, Lee AYW. Traumatic Brain Injuries: Pathophysiology and Potential Therapeutic Targets. *Front Cell Neurosci.* 2019;13:528.
9. Celorrio M, Abellanas MA, Rhodes J, Goodwin V, Moritz J, Vadivelu S, et al. Gut microbial dysbiosis after traumatic brain injury modulates the immune response and impairs neurogenesis. *Acta neuropathologica communications.* 2021;9(1):40.
10. Sidhu M, van der Poorten D. The gut microbiome. *Aust Fam Physician.* 2017;46(4):206-11.
11. Trepel M. *Neuroanatomie: Urban&Fischer;2017.*
12. Friedrich Paulsen JW. *Sobotta Kopf, Hals und Neuroanatomie: Urban&Fischer; 2017.*
13. Waschke B, Paulsen. *Anatomie - Das Lehrbuch (Sobotta): Urban und Fischer; 2015.*
14. Schmeißer M. SS. *Kurzlehrbuch Neuroanatomie: Thieme Verlag Stuttgart; 2020.*
15. Ulfing N. *Kurzlehrbuch Histologie: Thieme; 2019.*
16. Rauch RL. *Taschenlehrbuch Histologie: Thieme; 2015.*
17. Mark F. Bear BWC, Michael A. Paradiso. *Neurowissenschaft2018.*
18. Südhof TC. Towards an Understanding of Synapse Formation. *Neuron.* 2018;100(2):276-93.
19. Robert F. Schmidt FL, Manfred Heckmann. *Physiologie des Menschen2017.*
20. Pajarillo E, Rizor A, Lee J, Aschner M, Lee E. The role of astrocytic glutamate transporters GLT-1 and GLAST in neurological disorders: Potential targets for neurotherapeutics. *Neuropharmacology.* 2019;161:107559.
21. Wetsch W HJ, Spöhr F,. *Kurzlehrbuch Anästhesie, Intensivmedizin, Notfallmedizin und Schmerztherapie: Stuttgart: Thieme; 2018.*
22. Schirmer M. *Neurochirurgie: Urban&Fischer; 2015.*
23. Bernd M. Hölper MKE. *KOMPENDIUM Neuro-und Wirbelsäulen Chirurgie: proINN-Verlag Rosenheim; 2012.*
24. Striebel HW. *Anästhesie Intensivmedizin Notfallmedizin: Schattauer; 2013.*
25. Wallesch C KH. *Schädel-Hirn-Trauma Neurologische Rehabilitation und Neuropsychologie: Kollhamer Verlag Stuttgart; 2017.*
26. P B. *Memorix Neurologie: Stuttgart:Thieme; 2015.*
27. Hufschmidt A LC, Rauer S et al. *Neurologie compact: Stuttgart: Thieme; 2020.*
28. R. Firsching ER, U.M. Mauer, O.W. Sakowitz, M. Messing-Jünger, K. Engelhard für DGAI, P. Schwenkreis für DGN, J. Linn für DGNR, P. Biberthaler für DGU und K. Schwerdtfeger. **S2e LEITLINIE SCHÄDEL-HIRN-TRAUMA IM ERWACHSENENALTER.** Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC). 2015.
29. Heyn G. Schädel-Hirn-Trauma:Stürze mit gravierenden Folgen. *Pharmazeutische Zeitung.* 2006;Ausgabe 27/2006.

30. Steudel WI, Cortbus F, Schwerdtfeger K. Epidemiology and prevention of fatal head injuries in Germany--trends and the impact of the reunification. *Acta Neurochir (Wien)*. 2005;147(3):231-42; discussion 42.
31. DESTATIS SB. Sterbefälle nach Unfallkategorie im Jahr 2019 2019 [Available from: <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/sterbefaelle-unfaelle.html>]
32. Marc Maegele RL, Oliver Sakowitz, Marcel A. Kopp, Jan M. Schwab, Wolf-Ingo Steudel, Andreas Unterberg, Reinhard Hoffmann, Eberhard Uhl, Ingo Marzi. Inzidenz und Versorgung des mittelschweren bis schweren Schädel-Hirn-Traumas
Deutsche Ärzteblatt. 2019;116,87-73.
33. Nguyen R, Fiest KM, McChesney J, Kwon CS, Jette N, Frolkis AD, et al. The International Incidence of Traumatic Brain Injury: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Can J Neurol Sci*. 2016;43(6):774-85.
34. Taylor CA, Bell JM, Breiding MJ, Xu L. Traumatic Brain Injury-Related Emergency Department Visits, Hospitalizations, and Deaths - United States, 2007 and 2013. *MMWR Surveill Summ*. 2017;66(9):1-16.
35. Walder B, Haller G, Rebetz MM, Delhumeau C, Bottequin E, Schoettker P, et al. Severe traumatic brain injury in a high-income country: an epidemiological study. *J Neurotrauma*. 2013;30(23):1934-42.
36. Xiong Y, Mahmood A, Chopp M. Animal models of traumatic brain injury. *Nat Rev Neurosci*. 2013;14(2):128-42.
37. Zhang YP, Cai J, Shields LB, Liu N, Xu XM, Shields CB. Traumatic brain injury using mouse models. *Transl Stroke Res*. 2014;5(4):454-71.
38. Gomes PS, Fernandes MH. Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. *Lab Anim*. 2011;45(1):14-24.
39. Foda MA, Marmarou A. A new model of diffuse brain injury in rats. Part II: Morphological characterization. *J Neurosurg*. 1994;80(2):301-13.
40. Marmarou A, Foda MA, van den Brink W, Campbell J, Kita H, Demetriadou K. A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics. *J Neurosurg*. 1994;80(2):291-300.
41. Spain A, Daumas S, Lifshitz J, Rhodes J, Andrews PJ, Horsburgh K, et al. Mild fluid percussion injury in mice produces evolving selective axonal pathology and cognitive deficits relevant to human brain injury. *J Neurotrauma*. 2010;27(8):1429-38.
42. Carbonell WS, Maris DO, McCall T, Grady MS. Adaptation of the fluid percussion injury model to the mouse. *J Neurotrauma*. 1998;15(3):217-29.
43. Alder J, Fujioka W, Lifshitz J, Crockett DP, Thakker-Varia S. Lateral fluid percussion: model of traumatic brain injury in mice. *J Vis Exp*. 2011(54).
44. Dixon CE, Clifton GL, Lighthall JW, Yaghmai AA, Hayes RL. A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat. *J Neurosci Methods*. 1991;39(3):253-62.
45. Lighthall JW. Controlled cortical impact: a new experimental brain injury model. *J Neurotrauma*. 1988;5(1):1-15.
46. Lighthall JW, Goshgarian HG, Pinderski CR. Characterization of axonal injury produced by controlled cortical impact. *J Neurotrauma*. 1990;7(2):65-76.
47. Smith DH, Soares HD, Pierce JS, Perlman KG, Saatman KE, Meaney DF, et al. A model of parasagittal controlled cortical impact in the mouse: cognitive and histopathologic effects. *J Neurotrauma*. 1995;12(2):169-78.
48. Hall ED, Sullivan PG, Gibson TR, Pavel KM, Thompson BM, Scheff SW. Spatial and temporal characteristics of neurodegeneration after controlled cortical impact in mice: more than a focal brain injury. *J Neurotrauma*. 2005;22(2):252-65.
49. Pearn ML, Niesman IR, Egawa J, Sawada A, Almenar-Queralt A, Shah SB, et al. Pathophysiology Associated with Traumatic Brain Injury: Current Treatments and Potential Novel Therapeutics. *Cell Mol Neurobiol*. 2017;37(4):571-85.

50. Shetty AK, Mishra V, Kodali M, Hattiangady B. Blood brain barrier dysfunction and delayed neurological deficits in mild traumatic brain injury induced by blast shock waves. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2014;8(232).
51. Daverio M, Babl FE, Barker R, Gregori D, Da Dalt L, Bressan S. Helmet use in preventing acute concussive symptoms in recreational vehicle related head trauma. *Brain Inj*. 2018;32(3):335-41.
52. Topka H EO. *Neurologische Notfälle*: Stuttgart: Thiem; 2017.
53. Blennow K, Hardy J, Zetterberg H. The neuropathology and neurobiology of traumatic brain injury. *Neuron*. 2012;76(5):886-99.
54. Johnson VE, Stewart W, Trojanowski JQ, Smith DH. Acute and chronically increased immunoreactivity to phosphorylation-independent but not pathological TDP-43 after a single traumatic brain injury in humans. *Acta Neuropathol*. 2011;122(6):715-26.
55. Adams JH, Doyle D, Ford I, Gennarelli TA, Graham DI, McLellan DR. Diffuse axonal injury in head injury: definition, diagnosis and grading. *Histopathology*. 1989;15(1):49-59.
56. Oppenheimer DR. Microscopic lesions in the brain following head injury. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1968;31(4):299-306.
57. Kim JJ, Gean AD. Imaging for the diagnosis and management of traumatic brain injury. *Neurotherapeutics*. 2011;8(1):39-53.
58. Cunningham AS, Salvador R, Coles JP, Chatfield DA, Bradley PG, Johnston AJ, et al. Physiological thresholds for irreversible tissue damage in contusional regions following traumatic brain injury. *Brain*. 2005;128(Pt 8):1931-42.
59. DeWitt DS, Prough DS. Traumatic cerebral vascular injury: the effects of concussive brain injury on the cerebral vasculature. *J Neurotrauma*. 2003;20(9):795-825.
60. Adams JH, Jennett B, Murray LS, Teasdale GM, Gennarelli TA, Graham DI. Neuropathological findings in disabled survivors of a head injury. *J Neurotrauma*. 2011;28(5):701-9.
61. 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.
62. Dorsett CR, McGuire JL, DePasquale EA, Gardner AE, Floyd CL, McCullumsmith RE. Glutamate Neurotransmission in Rodent Models of Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma*. 2017;34(2):263-72.
63. Chamoun R, Suki D, Gopinath SP, Goodman JC, Robertson C. Role of extracellular glutamate measured by cerebral microdialysis in severe traumatic brain injury. *J Neurosurg*. 2010;113(3):564-70.
64. Meldrum BS. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr*. 2000;130(4S Suppl):1007s-15s.
65. Brustovetsky T, Bolshakov A, Brustovetsky N. Calpain activation and Na⁺/Ca²⁺ exchanger degradation occur downstream of calcium deregulation in hippocampal neurons exposed to excitotoxic glutamate. *J Neurosci Res*. 2010;88(6):1317-28.
66. Anthonymuthu TS, Kenny EM, Bayir H. Therapies targeting lipid peroxidation in traumatic brain injury. *Brain Res*. 2016;1640(Pt A):57-76.
67. Lau A, Tymianski M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Arch*. 2010;460(2):525-42.
68. Choi DW. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. *Neurosci Lett*. 1985;58(3):293-7.
69. Choi DW. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci*. 1987;7(2):369-79.
70. Simon DW, McGeachy MJ, Bayir H, Clark RS, Loane DJ, Kochanek PM. The far-reaching scope of neuroinflammation after traumatic brain injury. *Nat Rev Neurol*. 2017;13(3):171-91.
71. Edwards P, Arango M, Balica L, Cottingham R, El-Sayed H, Farrell B, et al. Final results of MRC CRASH, a randomised placebo-controlled trial of intravenous corticosteroid in adults with head injury-outcomes at 6 months. *Lancet*. 2005;365(9475):1957-9.
72. Chaplin DD. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(2 Suppl 2):S3-23.

73. PrabhuDas MR, Baldwin CL, Bollyky PL, Bowdish DME, Drickamer K, Febbraio M, et al. A Consensus Definitive Classification of Scavenger Receptors and Their Roles in Health and Disease. *J Immunol.* 2017;198(10):3775-89.
74. Noris M, Remuzzi G. Overview of complement activation and regulation. *Semin Nephrol.* 2013;33(6):479-92.
75. Warrington R, Watson W, Kim HL, Antonetti FR. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2011;7 Suppl 1(Suppl 1):S1.
76. Corps KN, Roth TL, McGavern DB. Inflammation and neuroprotection in traumatic brain injury. *JAMA Neurol.* 2015;72(3):355-62.
77. Sheikh AM, Nagai A, Ryu JK, McLarnon JG, Kim SU, Masuda J. Lysophosphatidylcholine induces glial cell activation: role of rho kinase. *Glia.* 2009;57(8):898-907.
78. Jounai N, Kobiyama K, Takeshita F, Ishii KJ. Recognition of damage-associated molecular patterns related to nucleic acids during inflammation and vaccination. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012;2:168.
79. Binder RJ. Functions of heat shock proteins in pathways of the innate and adaptive immune system. *J Immunol.* 2014;193(12):5765-71.
80. Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci.* 2005;8(6):752-8.
81. McDonald B, Pittman K, Menezes GB, Hirota SA, Slaba I, Waterhouse CC, et al. Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science.* 2010;330(6002):362-6.
82. Ransohoff RM, Brown MA. Innate immunity in the central nervous system. *J Clin Invest.* 2012;122(4):1164-71.
83. Clark RS, Schiding JK, Kaczorowski SL, Marion DW, Kochanek PM. Neutrophil accumulation after traumatic brain injury in rats: comparison of weight drop and controlled cortical impact models. *J Neurotrauma.* 1994;11(5):499-506.
84. Hsieh CL, Kim CC, Ryba BE, Niemi EC, Bando JK, Locksley RM, et al. Traumatic brain injury induces macrophage subsets in the brain. *Eur J Immunol.* 2013;43(8):2010-22.
85. Jin X, Ishii H, Bai Z, Itokazu T, Yamashita T. Temporal changes in cell marker expression and cellular infiltration in a controlled cortical impact model in adult male C57BL/6 mice. *PLoS One.* 2012;7(7):e41892.
86. Burda JE, Bernstein AM, Sofroniew MV. Astrocyte roles in traumatic brain injury. *Exp Neurol.* 2016;275 Pt 3(0 3):305-15.
87. Nayak D, Roth TL, McGavern DB. Microglia development and function. *Annu Rev Immunol.* 2014;32:367-402.
88. Tremblay M, Stevens B, Sierra A, Wake H, Bessis A, Nimmerjahn A. The role of microglia in the healthy brain. *J Neurosci.* 2011;31(45):16064-9.
89. Roth TL, Nayak D, Atanasijevic T, Koretsky AP, Latour LL, McGavern DB. Transcranial amelioration of inflammation and cell death after brain injury. *Nature.* 2014;505(7482):223-8.
90. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science.* 2005;308(5726):1314-8.
91. Ramlackhansingh AF, Brooks DJ, Greenwood RJ, Bose SK, Turkheimer FE, Kinnunen KM, et al. Inflammation after trauma: microglial activation and traumatic brain injury. *Annals of neurology.* 2011;70(3):374-83.
92. Koizumi S, Shigemoto-Mogami Y, Nasu-Tada K, Shinozaki Y, Ohsawa K, Tsuda M, et al. UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis. *Nature.* 2007;446(7139):1091-5.
93. Lou N, Takano T, Pei Y, Xavier AL, Goldman SA, Nedergaard M. Purinergic receptor P2RY12-dependent microglial closure of the injured blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(4):1074-9.
94. Kumar A, Loane DJ. Neuroinflammation after traumatic brain injury: opportunities for therapeutic intervention. *Brain Behav Immun.* 2012;26(8):1191-201.
95. Colton CA. Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2009;4(4):399-418.

96. Colton CA, Mott RT, Sharpe H, Xu Q, Van Nostrand WE, Vitek MP. Expression profiles for macrophage alternative activation genes in AD and in mouse models of AD. *J Neuroinflammation*. 2006;3:27.
97. Ponomarev ED, Maresz K, Tan Y, Dittel BN. CNS-derived interleukin-4 is essential for the regulation of autoimmune inflammation and induces a state of alternative activation in microglial cells. *J Neurosci*. 2007;27(40):10714-21.
98. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest*. 2012;122(3):787-95.
99. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(1):23-35.
100. Loane DJ, Kumar A. Microglia in the TBI brain: The good, the bad, and the dysregulated. *Exp Neurol*. 2016;275 Pt 3(0 3):316-27.
101. Zemke D, Majid A. The potential of minocycline for neuroprotection in human neurologic disease. *Clin Neuropharmacol*. 2004;27(6):293-8.
102. 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.
103. Morganti-Kossmann MC, Semple BD, Hellewell SC, Bye N, Ziebell JM. The complexity of neuroinflammation consequent to traumatic brain injury: from research evidence to potential treatments. *Acta neuropathologica*. 2019;137(5):731-55.
104. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010;119(1):7-35.
105. Burda JE, Sofroniew MV. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron*. 2014;81(2):229-48.
106. Sonnenberg GF, Artis D. Innate lymphoid cells in the initiation, regulation and resolution of inflammation. *Nat Med*. 2015;21(7):698-708.
107. Bowman CL, Ding JP, Sachs F, Sokabe M. Mechanotransducing ion channels in astrocytes. *Brain Res*. 1992;584(1-2):272-86.
108. Islas L, Pasantés-Morales H, Sánchez JA. Characterization of stretch-activated ion channels in cultured astrocytes. *Glia*. 1993;8(2):87-96.
109. Ahmed SM, Rzigalinski BA, Willoughby KA, Sitterding HA, Ellis EF. Stretch-induced injury alters mitochondrial membrane potential and cellular ATP in cultured astrocytes and neurons. *J Neurochem*. 2000;74(5):1951-60.
110. Stout CE, Costantin JL, Naus CC, Charles AC. Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *J Biol Chem*. 2002;277(12):10482-8.
111. Ostrow LW, Suchyna TM, Sachs F. Stretch induced endothelin-1 secretion by adult rat astrocytes involves calcium influx via stretch-activated ion channels (SACs). *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;410(1):81-6.
112. Pan H, Wang H, Wang X, Zhu L, Mao L. The absence of Nrf2 enhances NF- κ B-dependent inflammation following scratch injury in mouse primary cultured astrocytes. *Mediators Inflamm*. 2012;2012:217580.
113. Liu Z, Li Y, Cui Y, Roberts C, Lu M, Wilhelmsson U, et al. Beneficial effects of gfap/vimentin reactive astrocytes for axonal remodeling and motor behavioral recovery in mice after stroke. *Glia*. 2014;62(12):2022-33.
114. Plog BA, Dashnaw ML, Hitomi E, Peng W, Liao Y, Lou N, et al. Biomarkers of traumatic injury are transported from brain to blood via the glymphatic system. *J Neurosci*. 2015;35(2):518-26.
115. 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.
116. Guthrie PB, Knappenberger J, Segal M, Bennett MV, Charles AC, Kater SB. ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *J Neurosci*. 1999;19(2):520-8.
117. Huang C, Han X, Li X, Lam E, Peng W, Lou N, et al. Critical role of connexin 43 in secondary expansion of traumatic spinal cord injury. *J Neurosci*. 2012;32(10):3333-8.
118. Verderio C, Matteoli M. ATP mediates calcium signaling between astrocytes and microglial cells: modulation by IFN- γ . *J Immunol*. 2001;166(10):6383-91.

119. Abdelmalik PA, Draghic N, Ling GSF. Management of moderate and severe traumatic brain injury. *Transfusion*. 2019;59(S2):1529-38.
120. Carney N, Totten AM, O'Reilly C, Ullman JS, Hawryluk GW, Bell MJ, et al. Guidelines for the Management of Severe Traumatic Brain Injury, Fourth Edition. *Neurosurgery*. 2017;80(1):6-15.
121. Marshall LF, RW SM, Rauscher LA, Shapiro HM. Mannitol dose requirements in brain-injured patients. *J Neurosurg*. 1978;48(2):169-72.
122. Chesnut R, Videtta W, Vespa P, Le Roux P. Intracranial pressure monitoring: fundamental considerations and rationale for monitoring. *Neurocrit Care*. 2014;21 Suppl 2:S64-84.
123. Talving P, Karamanos E, Teixeira PG, Skiada D, Lam L, Belzberg H, et al. Intracranial pressure monitoring in severe head injury: compliance with Brain Trauma Foundation guidelines and effect on outcomes: a prospective study. *Journal of neurosurgery*. 2013;119(5):1248-54.
124. Kolias AG, Kirkpatrick PJ, Hutchinson PJ. Decompressive craniectomy: past, present and future. *Nat Rev Neurol*. 2013;9(7):405-15.
125. Hutchinson PJ, Kolias AG, Timofeev IS, Corteen EA, Czosnyka M, Timothy J, et al. Trial of Decompressive Craniectomy for Traumatic Intracranial Hypertension. *N Engl J Med*. 2016;375(12):1119-30.
126. Cooper DJ, Rosenfeld JV, Murray L, Arabi YM, Davies AR, D'Urso P, et al. Decompressive craniectomy in diffuse traumatic brain injury. *N Engl J Med*. 2011;364(16):1493-502.
127. Wilson MH. Monro-Kellie 2.0: The dynamic vascular and venous pathophysiological components of intracranial pressure. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2016;36(8):1338-50.
128. Jha RM, Kochanek PM. A Precision Medicine Approach to Cerebral Edema and Intracranial Hypertension after Severe Traumatic Brain Injury: Quo Vadis? *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2018;18(12):105.
129. Schink B. Antibiotika. In: Fuchs G HAM, unveränderte Auflage. Stuttgart: Thieme; 2017.
130. Wätzig V. Pharmakologische Grundbegriffe der Antibiose. In: Herdegen T HKPuT, vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Thieme; 2019.
131. Aktories F, Hofmann, Starke. Allgemeine ud spezielle Pharmakologie und Toxikologie: Elsevier; 2017.
132. Hutchings MI, Truman AW, Wilkinson B. Antibiotics: past, present and future. *Curr Opin Microbiol*. 2019;51:72-80.
133. Graefe K. Antibakterielle Wirkstoffe. In: Graefe K LW, Bönisch H, Hrsg. Duale Reihe Pharmakologie und Toxikologie. 2., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Thieme; 2016.
134. Yoneyama H, Katsumata R. Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2006;70(5):1060-75.
135. Prescott JF. The resistance tsunami, antimicrobial stewardship, and the golden age of microbiology. *Vet Microbiol*. 2014;171(3-4):273-8.
136. Lüllmann H MK, Wehling M et al. Grundlagen. In: Lüllmann H, Mohr K, Wehling M et al., Hrsg. Pharmakologie und Toxikologie. 18., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Thieme; 2016.
137. Schwarzkopf A. Antibiotika. In: Jassoy C SA, Hrsg. Hygiene, Infektiologie, Mikrobiologie. 3., aktualisierte Auflage. Stuttgart: Thieme; 2018.
138. Hof H GG, Reischl U. Grundlagen. In: Hof H, Schlüter D, Dörries R, Hrsg. Duale Reihe Medizinische Mikrobiologie. 7., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart: Thieme; 2019.
139. Jassoy C SA, Schubert S. Mikrobiologie. In: Jassoy C, Schwarzkopf A, Hrsg. Hygiene, Infektiologie, Mikrobiologie. vollständig überarbeitete 2. Auflage. Stuttgart: Thieme; 2013.
140. Goodman LS, Hardman, J. G., Limbird, L. E. & Gilman, A. G. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics (McGraw-Hill Medical Pub. Division, New York, 2001).

141. Sandanayaka VP, Prashad AS. Resistance to beta-lactam antibiotics: structure and mechanism based design of beta-lactamase inhibitors. *Curr Med Chem.* 2002;9(12):1145-65.
142. Zeng D, Debabov D, Hartsell TL, Cano RJ, Adams S, Schuyler JA, et al. Approved Glycopeptide Antibacterial Drugs: Mechanism of Action and Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016;6(12).
143. Paech F, Messner S, Spickermann J, Wind M, Schmitt-Hoffmann AH, Witschi AT, et al. Mechanisms of hepatotoxicity associated with the monocyclic β -lactam antibiotic BAL30072. *Arch Toxicol.* 2017;91(11):3647-62.
144. Huttner A, Bielicki J, Clements MN, Fridmodt-Møller N, Muller AE, Paccaud JP, et al. Oral amoxicillin and amoxicillin-clavulanic acid: properties, indications and usage. *Clin Microbiol Infect.* 2020;26(7):871-9.
145. Arteagoitia MI, Barbier L, Santamaría J, Santamaría G, Ramos E. Efficacy of amoxicillin and amoxicillin/clavulanic acid in the prevention of infection and dry socket after third molar extraction. A systematic review and meta-analysis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2016;21(4):e494-504.
146. Rybak MJ. The pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of vancomycin. *Clin Infect Dis.* 2006;42 Suppl 1:S35-9.
147. MacGowan A, Albur M. Frontline antibiotic therapy. *Clin Med (Lond).* 2013;13(3):263-8.
148. Goodwani S, Rao PS, Bell RL, Sari Y. Amoxicillin and amoxicillin/clavulanate reduce ethanol intake and increase GLT-1 expression as well as AKT phosphorylation in mesocorticolimbic regions. *Brain Res.* 2015;1622:397-408.
149. Lee KE, Cho KO, Choi YS, Kim SY. The neuroprotective mechanism of ampicillin in a mouse model of transient forebrain ischemia. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2016;20(2):185-92.
150. Rothstein JD, Patel S, Regan MR, Haenggeli C, Huang YH, Bergles DE, et al. β -Lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature.* 2005;433(7021):73-7.
151. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev.* 1999;79(4):1431-568.
152. Pettigrew LC, Holtz ML, Craddock SD, Minger SL, Hall N, Geddes JW. Microtubular proteolysis in focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996;16(6):1189-202.
153. Fontana AC. Current approaches to enhance glutamate transporter function and expression. *J Neurochem.* 2015;134(6):982-1007.
154. Kim K, Lee SG, Kegelman TP, Su ZZ, Das SK, Dash R, et al. Role of excitatory amino acid transporter-2 (EAAT2) and glutamate in neurodegeneration: opportunities for developing novel therapeutics. *J Cell Physiol.* 2011;226(10):2484-93.
155. Lehre KP, Danbolt NC. The number of glutamate transporter subtype molecules at glutamatergic synapses: chemical and stereological quantification in young adult rat brain. *J Neurosci.* 1998;18(21):8751-7.
156. Zhou J, Sutherland ML. Glutamate transporter cluster formation in astrocytic processes regulates glutamate uptake activity. *J Neurosci.* 2004;24(28):6301-6.
157. van Landeghem FK, Weiss T, Oehmichen M, von Deimling A. Decreased expression of glutamate transporters in astrocytes after human traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 2006;23(10):1518-28.
158. Tanaka K, Watase K, Manabe T, Yamada K, Watanabe M, Takahashi K, et al. Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science.* 1997;276(5319):1699-702.
159. Liang Z, Valla J, Sefidvash-Hockley S, Rogers J, Li R. Effects of estrogen treatment on glutamate uptake in cultured human astrocytes derived from cortex of Alzheimer's disease patients. *J Neurochem.* 2002;80(5):807-14.
160. Pajarillo E, Johnson J, Jr., Kim J, Karki P, Son DS, Aschner M, et al. 17 β -estradiol and tamoxifen protect mice from manganese-induced dopaminergic neurotoxicity. *Neurotoxicology.* 2018;65:280-8.

161. Rao PS, Saternos H, Goodwani S, Sari Y. Effects of ceftriaxone on GLUT1 isoforms, xCT and associated signaling pathways in P rats exposed to ethanol. *Psychopharmacology (Berl)*. 2015;232(13):2333-42.
162. Chai G, Governale L, McMahon AW, Trinidad JP, Staffa J, Murphy D. Trends of outpatient prescription drug utilization in US children, 2002-2010. *Pediatrics*. 2012;130(1):23-31.
163. Atli O, Demir-Ozkay U, Ilgin S, Aydin TH, Akbulut EN, Sener E. Evidence for neurotoxicity associated with amoxicillin in juvenile rats. *Hum Exp Toxicol*. 2016;35(8):866-76.
164. Cresci GA, Bawden E. Gut Microbiome: What We Do and Don't Know. *Nutr Clin Pract*. 2015;30(6):734-46.
165. Rice MW, Pandya JD, Shear DA. Gut Microbiota as a Therapeutic Target to Ameliorate the Biochemical, Neuroanatomical, and Behavioral Effects of Traumatic Brain Injuries. *Front Neurol*. 2019;10:875.
166. Xu MQ, Cao HL, Wang WQ, Wang S, Cao XC, Yan F, et al. Fecal microbiota transplantation broadening its application beyond intestinal disorders. *World J Gastroenterol*. 2015;21(1):102-11.
167. Zackular JP, Rogers MA, Ruffin MT, Schloss PD. The human gut microbiome as a screening tool for colorectal cancer. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2014;7(11):1112-21.
168. Collado MC, Rautava S, Isolauri E, Salminen S. Gut microbiota: a source of novel tools to reduce the risk of human disease? *Pediatr Res*. 2015;77(1-2):182-8.
169. Huurre A, Kalliomäki M, Rautava S, Rinne M, Salminen S, Isolauri E. Mode of delivery - effects on gut microbiota and humoral immunity. *Neonatology*. 2008;93(4):236-40.
170. Bull MJ, Plummer NT. Part 1: The Human Gut Microbiome in Health and Disease. *Integr Med (Encinitas)*. 2014;13(6):17-22.
171. Corr SC, Li Y, Riedel CU, O'Toole PW, Hill C, Gahan CG. Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(18):7617-21.
172. Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet*. 2003;361(9356):512-9.
173. Gallo A, Passaro G, Gasbarrini A, Landolfi R, Montalto M. Modulation of microbiota as treatment for intestinal inflammatory disorders: An update. *World J Gastroenterol*. 2016;22(32):7186-202.
174. Björkstén B, Sepp E, Julge K, Voor T, Mikelsaar M. Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;108(4):516-20.
175. Pickard JM, Zeng MY, Caruso R, Núñez G. Gut microbiota: Role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease. *Immunol Rev*. 2017;279(1):70-89.
176. Josefsson KS, Baldrige MT, Kadmon CS, King KY. Antibiotics impair murine hematopoiesis by depleting the intestinal microbiota. *Blood*. 2017;129(6):729-39.
177. Zhang D, Chen G, Manwani D, Mortha A, Xu C, Faith JJ, et al. Neutrophil ageing is regulated by the microbiome. *Nature*. 2015;525(7570):528-32.
178. Eiseman B, Silen W, Bascom GS, Kauvar AJ. Fecal enema as an adjunct in the treatment of pseudomembranous enterocolitis. *Surgery*. 1958;44(5):854-9.
179. Choi HH, Cho YS. Fecal Microbiota Transplantation: Current Applications, Effectiveness, and Future Perspectives. *Clin Endosc*. 2016;49(3):257-65.
180. Vanderpool C, Yan F, Polk DB. Mechanisms of probiotic action: Implications for therapeutic applications in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*. 2008;14(11):1585-96.
181. Scribano ML, Prantera C. Antibiotics and inflammatory bowel diseases. *Dig Dis*. 2013;31(3-4):379-84.
182. Palleja A, Mikkelsen KH, Forslund SK, Kashani A, Allin KH, Nielsen T, et al. Recovery of gut microbiota of healthy adults following antibiotic exposure. *Nat Microbiol*. 2018;3(11):1255-65.

183. Johnson KVA, Burnet PWJ. Opposing effects of antibiotics and germ-free status on neuropeptide systems involved in social behaviour and pain regulation. *BMC Neurosci.* 2020;21(1):32.
184. Mohajeri MH, La Fata G, Steinert RE, Weber P. Relationship between the gut microbiome and brain function. *Nutr Rev.* 2018;76(7):481-96.
185. Erny D, Hrabě 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.
186. Desbonnet L, Clarke G, Traplin A, O'Sullivan O, Crispie F, Moloney RD, et al. Gut microbiota depletion from early adolescence in mice: Implications for brain and behaviour. *Brain Behav Immun.* 2015;48:165-73.
187. Rhee SH, Pothoulakis C, Mayer EA. Principles and clinical implications of the brain-gut-enteric microbiota axis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2009;6(5):306-14.
188. Dalile B, Van Oudenhove L, Vervliet B, Verbeke K. The role of short-chain fatty acids in microbiota-gut-brain communication. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019;16(8):461-78.
189. Braniste V, Al-Asmakh M, Kowal C, Anuar F, Abbaspour A, Tóth M, et al. The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Sci Transl Med.* 2014;6(263):263ra158.
190. Yang LL, Millischer V, Rodin S, MacFabe DF, Villaescusa JC, Lavebratt C. Enteric short-chain fatty acids promote proliferation of human neural progenitor cells. *J Neurochem.* 2020;154(6):635-46.
191. 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.
192. Treangen TJ, Wagner J, Burns MP, Villapol S. Traumatic Brain Injury in Mice Induces Acute Bacterial Dysbiosis Within the Fecal Microbiome. *Front Immunol.* 2018;9:2757.
193. 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.
194. Patterson TT, Nicholson S, Wallace D, Hawryluk GWJ, Grandhi R. Complex Feed-Forward and Feedback Mechanisms Underlie the Relationship Between Traumatic Brain Injury and the Gut-Microbiota-Brain Axis. *Shock.* 2019;52(3):318-25.
195. Kremlev SG, Palmer C. Interleukin-10 inhibits endotoxin-induced pro-inflammatory cytokines in microglial cell cultures. *J Neuroimmunol.* 2005;162(1-2):71-80.
196. Benakis C, Brea D, Caballero S, Faraco G, Moore J, Murphy M, et al. Commensal microbiota affects ischemic stroke outcome by regulating intestinal $\gamma\delta$ T cells. *Nat Med.* 2016;22(5):516-23.
197. Garcia-Bonilla L, Brea D, Benakis C, Lane DA, Murphy M, Moore J, et al. Endogenous Protection from Ischemic Brain Injury by Preconditioned Monocytes. *J Neurosci.* 2018;38(30):6722-36.
198. 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.
199. Tsenter J, Beni-Adani L, Assaf Y, Alexandrovich AG, Trembovler V, Shohami E. Dynamic changes in the recovery after traumatic brain injury in mice: effect of injury severity on T2-weighted MRI abnormalities, and motor and cognitive functions. *J Neurotrauma.* 2008;25(4):324-33.
200. Lueptow LM. Novel Object Recognition Test for the Investigation of Learning and Memory in Mice. *J Vis Exp.* 2017(126).
201. Antunes M, Biala G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn Process.* 2012;13(2):93-110.
202. Kulbe JR, Geddes JW. Current status of fluid biomarkers in mild traumatic brain injury. *Exp Neurol.* 2016;275 Pt 3(0 3):334-52.

203. Li Y, Chopp M. Temporal profile of nestin expression after focal cerebral ischemia in adult rat. *Brain Res.* 1999;838(1-2):1-10.
204. Jaremko L, Jaremko M, Giller K, Becker S, Zweckstetter M. Structure of the mitochondrial translocator protein in complex with a diagnostic ligand. *Science.* 2014;343(6177):1363-6.
205. Donat CK, Scott G, Gentleman SM, Sastre M. Microglial Activation in Traumatic Brain Injury. *Front Aging Neurosci.* 2017;9:208.
206. Liu GJ, Middleton RJ, Hatty CR, Kam WW, Chan R, Pham T, et al. The 18 kDa translocator protein, microglia and neuroinflammation. *Brain Pathol.* 2014;24(6):631-53.
207. Takamiya A, Takeda M, Yoshida A, Kiyama H. Inflammation induces serine protease inhibitor 3 expression in the rat pineal gland. *Neuroscience.* 2002;113(2):387-94.
208. Zamanian JL, Xu L, Foo LC, Nouri N, Zhou L, Giffard RG, et al. Genomic analysis of reactive astrogliosis. *J Neurosci.* 2012;32(18):6391-410.
209. Allan SM, Tyrrell PJ, Rothwell NJ. Interleukin-1 and neuronal injury. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(8):629-40.
210. Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain Res Mol Brain Res.* 1998;57(1):1-9.
211. Mao M, Xu Y, Zhang XY, Yang L, An XB, Qu Y, et al. MicroRNA-195 prevents hippocampal microglial/macrophage polarization towards the M1 phenotype induced by chronic brain hypoperfusion through regulating CX3CL1/CX3CR1 signaling. *J Neuroinflammation.* 2020;17(1):244.
212. Neniskyte U, Vilalta A, Brown GC. Tumour necrosis factor alpha-induced neuronal loss is mediated by microglial phagocytosis. *FEBS Lett.* 2014;588(17):2952-6.
213. Santello M, Volterra A. TNF α in synaptic function: switching gears. *Trends Neurosci.* 2012;35(10):638-47.
214. Perlmutter LS, Scott SA, Barrón E, Chui HC. MHC class II-positive microglia in human brain: association with Alzheimer lesions. *J Neurosci Res.* 1992;33(4):549-58.
215. Wu X, Wang C, Wang J, Zhu M, Yao Y, Liu J. Hypoxia preconditioning protects neuronal cells against traumatic brain injury through stimulation of glucose transport mediated by HIF-1 α /GLUTs signaling pathway in rat. *Neurosurg Rev.* 2021;44(1):411-22.
216. Wood IS, Trayhurn P. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br J Nutr.* 2003;89(1):3-9.
217. Jalloh I, Carpenter KL, Helmy A, Carpenter TA, Menon DK, Hutchinson PJ. Glucose metabolism following human traumatic brain injury: methods of assessment and pathophysiological findings. *Metab Brain Dis.* 2015;30(3):615-32.
218. Chen H, Richard M, Sandler DP, Umbach DM, Kamel F. Head injury and amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Epidemiol.* 2007;166(7):810-6.
219. DeSilva TM, Kabakov AY, Goldhoff PE, Volpe JJ, Rosenberg PA. Regulation of glutamate transport in developing rat oligodendrocytes. *J Neurosci.* 2009;29(24):7898-908.
220. Goodrich GS, Kabakov AY, Hameed MQ, Dhamne SC, Rosenberg PA, Rotenberg A. Ceftriaxone treatment after traumatic brain injury restores expression of the glutamate transporter, GLT-1, reduces regional gliosis, and reduces post-traumatic seizures in the rat. *J Neurotrauma.* 2013;30(16):1434-41.
221. Hashioka S, Klegeris A, Schwab C, McGeer PL. Interferon-gamma-dependent cytotoxic activation of human astrocytes and astrocytoma cells. *Neurobiol Aging.* 2009;30(12):1924-35.
222. Hashioka S, McGeer EG, Miyaoka T, Wake R, Horiguchi J, McGeer PL. Interferon- γ -induced neurotoxicity of human astrocytes. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2015;14(2):251-6.
223. Hackett TA, Takahata T, Balaram P. VGLUT1 and VGLUT2 mRNA expression in the primate auditory pathway. *Hear Res.* 2011;274(1-2):129-41.

224. López DE, Ballaz SJ. The Role of Brain Cyclooxygenase-2 (Cox-2) Beyond Neuroinflammation: Neuronal Homeostasis in Memory and Anxiety. *Mol Neurobiol.* 2020;57(12):5167-76.
225. Golden J, Illingworth L, Kavarian P, Escobar O, Delaplain P, Isani M, et al. EP2 Receptor Blockade Attenuates COX-2 Upregulation During Intestinal Inflammation. *Shock.* 2020;54(3):394-401.
226. Hans-Christian Pape AK, Stefan Silbernagel. *Physiologie*: Georg Thieme Verlag; 2014.
227. Brown CC, Manis MM, Bohm NM, Curry SR. Oral Vancomycin for Secondary Prophylaxis of Clostridium difficile Infection. *Ann Pharmacother.* 2019;53(4):396-401.
228. Wang ZK, Yang YS, Chen Y, Yuan J, Sun G, Peng LH. Intestinal microbiota pathogenesis and fecal microbiota transplantation for inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2014;20(40):14805-20.
229. El-Matary W. Fecal microbiota transplantation: long-term safety issues. *Am J Gastroenterol.* 2013;108(9):1537-8.
230. Kim SK, Guevarra RB, Kim YT, Kwon J, Kim H, Cho JH, et al. Role of Probiotics in Human Gut Microbiome-Associated Diseases. *J Microbiol Biotechnol.* 2019;29(9):1335-40.
231. Marteau P, Seksik P, Jian R. Probiotics and intestinal health effects: a clinical perspective. *Br J Nutr.* 2002;88 Suppl 1:S51-7.
232. Kigerl KA, Hall JC, Wang L, Mo X, Yu Z, Popovich PG. Gut dysbiosis impairs recovery after spinal cord injury. *J Exp Med.* 2016;213(12):2603-20.
233. Lavasani S, Dzhabazov B, Nouri M, Fåk F, Buske S, Molin G, et al. A novel probiotic mixture exerts a therapeutic effect on experimental autoimmune encephalomyelitis mediated by IL-10 producing regulatory T cells. *PLoS One.* 2010;5(2):e9009.
234. 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.
235. Rothhammer V, Mascanfroni 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.
236. Schulze J: *Humanes Mikrobiom – Wie Mensch und Mikrobe zusammenwirken*. DHZ – Deutsche Heilpraktiker Zeitschrift S.
237. Conway S, Hart A, Clark A, Harvey I. Does eating yogurt prevent antibiotic-associated diarrhoea? A placebo-controlled randomised controlled trial in general practice. *Br J Gen Pract.* 2007;57(545):953-9.
238. Vanderhoof JA, Whitney DB, Antonson DL, Hanner TL, Lupo JV, Young RJ. Lactobacillus GG in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children. *J Pediatr.* 1999;135(5):564-8.
239. Yuan B, Lu XJ, Wu Q. Gut Microbiota and Acute Central Nervous System Injury: A New Target for Therapeutic Intervention. *Front Immunol.* 2021;12:800796.
240. Houlden A, Goldrick M, Brough D, Vizi ES, Lénárt 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.
241. Singh V, Sadler R, Heindl S, Llovera G, Roth S, Benakis C, et al. The gut microbiome primes a cerebroprotective immune response after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2018;38(8):1293-8.
242. Qin L, Wu X, Block ML, Liu Y, Breese GR, Hong JS, et al. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia.* 2007;55(5):453-62.
243. Hang CH, Shi JX, Li JS, Li WQ, Yin HX. Up-regulation of intestinal nuclear factor kappa B and intercellular adhesion molecule-1 following traumatic brain injury in rats. *World J Gastroenterol.* 2005;11(8):1149-54.
244. Mezzatesta ML, Gona F, Stefani S. Enterobacter cloacae complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Future Microbiol.* 2012;7(7):887-902.
245. Messaoudi M, Violle N, Bisson JF, Desor D, Javelot H, Rougeot C. Beneficial psychological effects of a probiotic formulation (Lactobacillus helveticus R0052 and

- Bifidobacterium longum R0175) in healthy human volunteers. *Gut Microbes*. 2011;2(4):256-61.
246. Marin IA, Goertz JE, Ren T, Rich SS, Onengut-Gumuscu S, Farber E, et al. Microbiota alteration is associated with the development of stress-induced despair behavior. *Sci Rep*. 2017;7:43859.
247. Mahajan C, Khurana S, Kapoor I, Sokhal S, Kumar S, Prabhakar H, et al. Characteristics of Gut Microbiome After Traumatic Brain Injury. *J Neurosurg Anesthesiol*. 2021.
248. Brenner LA, Stearns-Yoder KA, Hoffberg AS, Penzenik ME, Starosta AJ, Hernández 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.
249. Bennike T, Birkelund S, Stensballe A, Andersen V. Biomarkers in inflammatory bowel diseases: current status and proteomics identification strategies. *World J Gastroenterol*. 2014;20(12):3231-44.
250. Panther EJ, Dodd W, Clark A, Lucke-Wold B. Gastrointestinal Microbiome and Neurologic Injury. *Biomedicines*. 2022;10(2).
251. Desmedt A, Marighetto A, Piazza PV. Abnormal Fear Memory as a Model for Posttraumatic Stress Disorder. *Biol Psychiatry*. 2015;78(5):290-7.
252. Colonna M, Butovsky O. Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annu Rev Immunol*. 2017;35:441-68.
253. Matcovitch-Natan O, Winter DR, Giladi A, Vargas Aguilar S, Spinrad A, Sarrazin S, et al. Microglia development follows a stepwise program to regulate brain homeostasis. *Science*. 2016;353(6301):aad8670.
254. Younger D, Murugan M, Rama Rao KV, Wu LJ, Chandra N. Microglia Receptors in Animal Models of Traumatic Brain Injury. *Mol Neurobiol*. 2019;56(7):5202-28.
255. Simon DW, Rogers MB, Gao Y, Vincent G, Firek BA, Janesko-Feldman K, et al. Depletion of gut microbiota is associated with improved neurologic outcome following traumatic brain injury. *Brain Res*. 2020;1747:147056.
256. Myer DJ, Gurkoff GG, Lee SM, Hovda DA, Sofroniew MV. Essential protective roles of reactive astrocytes in traumatic brain injury. *Brain*. 2006;129(Pt 10):2761-72.
257. Nguyen TLA, Vieira-Silva S, Liston A, Raes J. How informative is the mouse for human gut microbiota research? *Disease Models & Mechanisms*. 2015;8(1):1-16.
258. Treuting PM, Arends MJ, Dintzis SM. Lower gastrointestinal tract. *Comparative Anatomy and Histology: Elsevier*; 2018. p. 213-28.
259. Smith HF, Parker W, Kotzé SH, Laurin M. Multiple independent appearances of the cecal appendix in mammalian evolution and an investigation of related ecological and anatomical factors. *Comptes Rendus Palevol*. 2013;12(6):339-54.
260. Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature*. 2013;500(7464):541-6.
261. Alpert C, Sczesny S, Gruhl B, Blaut M. Long-term stability of the human gut microbiota in two different rat strains. *Current issues in molecular biology*. 2008;10(1-2):17-24.
262. Hildebrand F, Ebersbach T, Nielsen HB, Li X, Sonne SB, Bertalan M, et al. A comparative analysis of the intestinal metagenomes present in guinea pigs (*Cavia porcellus*) and humans (*Homo sapiens*). *BMC genomics*. 2012;13(1):1-11.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Julian Jonas Denninger
Adresse	Bingerwiesen 11 D-96126 Ermershausen
E-Mail	denninger.julian@gmail.com
Geburtsdatum / -ort	29.06.1993 / Haßfurt
Familiäres Umfeld	Vater: Denninger Norbert Mutter: Denninger Ulrike Bruder: Denninger Laurin
Familienstand	Ledig

Schulischer Werdegang

09/2000 – 07/2004	Grundschule Ermershausen
09/2004 – 06/2012	Gymnasium Bad Königshofen

Abitur

29.06.2012	Allgemeine Hochschulreife
------------	---------------------------

Ausbildung/berufliche Werdegang

10/2012 bis 03/2014	Bundesfreiwilligendienst als Rettungshelfer im BRK-Kreisverband Haßberge
04/2014 bis 12/2016	Hauptamtliche Tätigkeit im Rettungsdienst des BRK-Kreisverband Haßberge
08/2014 bis 02/2015	Rettungsassistentenausbildung an der DAA Meiningen Erfolgreicher Abschluss 24.02.2015
Seit 01.01.2017	Eintritt in die Sanitätsoffizierlaufbahn der Bundeswehr als Sanitätsoffizieranwärter (SanOA) Studiengang: Humanmedizin
01-03/2017	Ableistung der allgemeinen Grundausbildung im Sanitätslehrregiment Feldkirchen
13.12.2019	Beförderung zum Leutnant SanOA
30.05.2023	Beförderung zum Stabsarzt

Studium: Humanmedizin

Studienbeginn	Sommersemester April 2017
Studienort	JGU Mainz
1. Staatsexamen	März 2019
2. Staatsexamen	April 2022
Praktische Jahr	Mai 2022 – April 2023
	1.Tertial: Innere BWZK Koblenz
	2.Tertial: Neurochirurgie Universitätsklinikum Mainz
	3.Tertial: Chirurgie
	3.1: University of Cape Town Groote Schuur Hospital
	3.2: BWZK Koblenz
3. Staatsexamen	Mai 2023
Approbation	Mai 2023
Promotion:	Oktober 2019 – Oktober 2023
	Anästhesiologie Universitätsmedizin Mainz
	Arbeitsgruppe Neuroprotektion unter der Leitung von
	Prof. Dr. rer. nat. Michael Schäfer