

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

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

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

Vorgelegt von

Friederike Pauline Kirchhoff
Aus Rostock

Mainz, 2024

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Hansjörg Schild

Tag der Promotion: 25. November 2024

Mein außerordentlicher Dank geht an alle beteiligten Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Neuroprotektion der anästhesiologischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz und meine Familie.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1.	Einleitung / Ziel der Dissertation	1
2.	Literaturdiskussion.....	3
2.1.	Das menschliche Nervensystem	3
2.1.1.	Makroskopischer Aufbau des Gehirns.....	3
2.1.1.1.	Hippocampus	5
2.2.	Das Schädel-Hirn-Trauma.....	7
2.2.1.	Definition des Schädel-Hirn-Traumas.....	7
2.2.2.	Epidemiologie des Schädel-Hirn-Traumas	7
2.2.3.	Langzeitfolgen des Schädel-Hirn-Traumas.....	8
2.2.4.	Pathophysiologie des Schädel-Hirn-Traumas	9
2.2.4.1.	Primärschaden	9
2.2.4.2.	Sekundärschaden.....	9
2.2.4.3.	Axonale Schädigung	10
2.2.4.4.	Perfusion	11
2.2.4.5.	Hirnödem und erhöhter intrakranieller Druck	12
2.2.4.6.	Neuroinflammation	13
2.2.5.	Gliazellen	15
2.2.5.1.	Mikroglia.....	16
2.2.5.2.	Astrozyten	18
2.2.5.3.	Begrenzung des Läsionsvolumen durch Ausbildung einer Glianarbe	22
2.2.5.4.	Kommunikation zwischen Mikroglia und Astrozyten.....	23
2.2.6.	Periphere Faktoren die ein SHT beeinflussen.....	25
2.2.6.1.	Das enterische Nervensystem	25
2.2.6.2.	Die Darm-Hirn- Achse.....	25
2.2.6.3.	Das Mikrobiom	29
2.2.6.4.	Bedeutung des Mikrobioms	29
2.2.6.5.	Dysbiose	31
2.2.6.6.	Gabe von Antibiotika und Probiotika im Rahmen eines SHT	34
2.2.7.	Geschlechtsspezifische Unterschiede nach SHT	37
3.	Material und Methoden	39
3.1.	Material	39
3.1.1.	Verbrauchsmaterialien	39

3.1.2.	Geräte	40
3.1.3.	Chemikalien	41
3.1.4.	Arzneimittel.....	42
3.1.5.	Lösungen und Puffer	42
3.1.6.	Antikörper	43
3.1.6.1.	Primäre Antikörper	43
3.1.6.2.	Sekundäre Antikörper	43
3.1.7.	Primer.....	44
3.1.8.	Kits.....	44
3.1.9.	Software.....	45
4.	Methoden	46
4.1.	Studiendesign, Randomisierung und Verblindung der Experimentatoren.....	46
4.2.	Haltung der Versuchstiere	47
4.3.	Antibiotika- Gabe	48
4.4.	Präoperative Vorbereitung	49
4.4.1.	Allgemeinstatus	49
4.4.2.	Neuroscore (Neurologischer Defizit Score, NDS).....	49
4.4.3.	Rotarod	51
4.4.4.	Kotprobenentnahme	52
4.5.	Operation.....	52
4.5.1.	Anästhesie.....	52
4.5.2.	Controlled cortical impact (CCI)	53
4.5.3.	Schein (Sham)- Operation	55
4.5.4.	Besonderheiten	55
4.5.5.	Postoperative Versorgung	55
4.5.6.	Operationsprotokoll.....	56
4.6.	Euthanasie/ Postmortale Phase	57
4.6.1.	Vorgehen der Euthanasie	57
4.6.2.	Gehirnentnahme und –Konservierung.....	57
4.6.3.	Darmgewebe- Entnahme	57
4.7.	Gehirnschnitte am Kryostat.....	58
4.7.1.	Verwendetes Gerät und Bedingungen.....	58
4.7.2.	Vorbereitung des Gehirns.....	58
4.8.	Histologie.....	60
4.8.1.	Kresylviolett-Färbung nach Nissl	60

4.8.2.	Volumetrie des histologischen Schadenvolumens	61
4.8.3.	Dickemessung der Granularzellschicht im suprapyramidalen Blatt des Gyrus dentatus.....	62
4.9.	Immunhistochemie.....	63
4.9.1.	Immunfluoreszenz-Färbung von Iba1 und GFAP	63
4.9.2.	Auswertung der Immunfluoreszenz-Färbung	65
4.10.	Proteinanalyse.....	66
4.10.1.	Extraktion und Konzentrationsbestimmung der Proteine	66
4.10.2.	Elektrophorese.....	67
4.10.3.	Western Blot.....	67
4.10.4.	Dot Blot Immunglobulin G (IgG).....	69
4.11.	Molekularbiologie	70
4.11.1.	RNA- Extraktion.....	70
4.11.2.	cDNA Synthese	71
4.11.3.	Polymerasekettenreaktion	72
4.12.	Statistische Auswertung	75
5.	Ergebnisse.....	76
5.1.	Gewicht, Mikrobiologie und neurobehaviorale Untersuchungen.....	76
5.1.1.	Entwicklung des Gewichts	76
5.1.2.	Wasseraufnahme	79
5.1.3.	Caecumgewicht	80
5.1.4.	Mikrobiologische Untersuchung.....	82
5.1.5.	Rotarod	84
5.1.6.	Neuroscore.....	86
5.2.	Volumetrie	87
5.2.1.	Kontusionsvolumen.....	87
5.2.2.	Kontralaterale Hemisphäre	89
5.2.3.	Dickemessung der Granularzellschicht im suprapyramidalen Blatt des Gyrus dentatus in der Nissl-Färbung.....	91
5.3.	Immunhistochemie.....	93
5.3.1.	GFAP ipsilateral.....	93
5.3.2.	GFAP kontralateral	95
5.3.3.	Iba 1- Expression ipsilateral	97
5.3.4.	Iba 1-Expression kontralateral	99
5.4.	Molekularbiologische Ergebnisse der Proteinanalyse	102

5.4.1.	Westernblot	102
5.4.1.1.	GFAP	102
5.4.1.2.	Spectrin	104
5.4.2.	IgG- Dotblot.....	107
5.5.	Ergebnisse der PCR.....	109
5.5.1.	TSPO.....	109
5.5.2.	CD74	111
6.	Diskussion.....	113
6.1.	Diskussion der Methoden	113
6.1.1.	Übertragbarkeit des murinen Experiments auf den Menschen	113
6.1.2.	Beurteilbarkeit der Langzeitfolgen	114
6.1.3.	Trinkmenge	115
6.1.4.	Granularzellschicht	115
6.1.5.	Integrität der BHS.....	116
6.2.	Auswirkungen einer mikrobiellen Dysbiose auf neurobehaviorelle Parameter.....	117
6.3.	Antibiotika Gabe.....	117
6.4.	Mikrobiom und SHT.....	119
6.5.	Geschlechtsabhängige Unterschiede.....	122
7.	Zusammenfassung	124
8.	Literaturverzeichnis	126
9.	Anhang	147
9.1.	Abbildungsverzeichnis.....	147
9.2.	Tabellenverzeichnis.....	149

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
5 HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)
ACh	Acetylcholin
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AK	Antikörper
AMPA	alpha-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure-Rezeptoren
ANGPT1	Angiopoetin 1
ApoE	Apolipoprotein E
AQP	Aquaporin
AQP4	Aquaporin 4
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	Neuronaler Wachstumsfaktor (engl.: <i>brain derived neurotrophic factor</i>)
BHS	Blut-Hirn-Schranke
Ca ²⁺	Kalzium
CBF	Zerebraler Blutfluss (engl.: <i>Cerebral blood fluid</i>)
CCI	Kontrolliertes experimentelles Schädelhirntrauma (engl. <i>controlled cortical impact</i>)
CCL2	Chemokin Ligand 2 (früher Makrophagen Chemoattraktor Protein, MCP1)
CKK	Cholezystokinin
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX-2	Cyclooxygenase 2
CXCL10	C-X-C-Chemokin 10
d	Tag/ Tage (engl.: <i>Day</i>)
DAMPs	Gefahr assoziierte molekulare Muster (engl.: <i>Damage associated molecular pattern</i>)

DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: <i>Desoxyribonuclein acid</i>)
E.coli	Escherichia Coli
EGC	enterische Gliazellen (engl.: <i>enteric glia cells</i>)
FGF	Fibroblasten-Wachstums-Faktor (engl.: <i>Fibroblast growth factor</i>)
g	Gramm
GABA	Gamma-Aminobuttersäure (engl.: <i>gamma-aminobutyric-acid</i>)
GALT	Darmassoziiertes Immunsystem (engl.: <i>Gut/mucosa-associated lymphoid tissue</i>)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCS	Glasgow- Koma-Skala (engl.: <i>Glasgow-Coma-Scale</i>)
GDNF	Glia abgeleiteter neurotropher Faktor (engl.: <i>Glia derived neurotrophic factor</i>)
GFAP	Saures Gliafaserprotein (engl.: <i>glial fibrillary acidic protein</i>)
GI-Trakt	Gastrointestinal Trakt
GLT1	Glutamattransporter 1
Gpc4	Glypican 4
Gpc6	Glypican 6
GPCR43	G-Protein gekoppelter Rezeptor 43 (engl.: <i>G-protein coupled receptor 43</i>)
H ₂ O	Wasser
HMGB1	High-Mobility-Group-Protein 1
Iba1	Kalziumbindendes Adaptermolekül 1 (engl.: <i>Ionized calcium-binding adaptor molecule 1</i>)
ICP	Intrakranieller Druck (engl.: <i>intracranial pressure</i>)
IFN γ	Interferon gamma
IgA	Immunglobulin A
IGF1	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1 (engl.: <i>Insulin-like-Growth-Factor1</i>)
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthetase
IU	Internationale Einheit (engl.: <i>international unit</i>)
kDa	Kilo Dalton

Kg	Kilogramm
LPS	Lipopolysaccharide
mA	Milli Ampere
MAP	Mittlerer arterieller Druck (engl.: <i>mean arterial pressure</i>)
MCP1	Monocyten Chemoattractant Protein 1
MHC2	Haupthistokompatibilitätskomplex 2 (engl.: <i>Major Histocompatibility Complex 2</i>)
Min	Minute
MIP	Entzündliches Makrophagenprotein (engl. <i>Macrophage inflammatory protein</i>)
mL	Milliliter
MLN	mesenterische Lymphknoten (engl.: <i>mesenteric lymph nodes</i>)
mm ²	Quadrat Millimeter
MMP	Matrix-Metalloproteasen
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MRSA	Methycillin resistenter Staphylokokkus aureus
NDS	Neurologischer Defizit Score
NFκB	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NGF	Nervenwachstumsfaktor (engl.: <i>nerve growth factor</i>)
Nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthetasen
PAMP	Pathogenassoziierte molekulare Muster (engl.: <i>Pathogen associated molecular pattern</i>)
PBS	Phosphat gepufferter Salzlösung (engl.: <i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
ICAM	Zelladhäsionsmolekül (engl.: <i>intercellular adhesion molecule 1</i>)
PFA	Paraformaldehyd-Lösung
PI3K/Akt	Phosphoinositid-3-Kinase/Akt
PLVAP	Plasmalemma-Vesikel-assoziierte-Protein
PPIA	Peptidylprolyl Isomerase A
PSA	Polysaccharid A
RhoA	Rho-Kinase A

ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (engl.: <i>reactive oxygen species</i>)
s	Sekunde
SAB	Subarachnoidalraum
SDF1	Stroma-cell-derived Factor 1
SHBG	Sexualhormon- bindendes Globulin
SHT	Schädel-Hirn-Trauma
SIRS	Systemisches -inflammatorisches Antwortsyndrom
SPARC	Osteonectin (engl.: <i>secreted protein acid and rich in cysteine</i>)
SSeCKs	Src-supprimierte-C-Kinase Substrat
TBST	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan gepufferte Salzlösung (engl.: <i>Tris buffered saline with Tween20</i>)
TGFβ	Transformierender Wachstumsfaktor beta (engl.: <i>Transforming growth factor beta</i>)
TNFα	Tumornekrosefaktor alpha
T _{reg} Zellen	Regulatorische T- Zellen
TSP	Thrombospondine
TSPO	Translokatorprotein
VEGF	Endothelwachstumsfaktor (engl.: <i>vascular endothelial growth factor</i>)
VRE	Vancomycin resistente Enterokokken
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZO-1	Zonula occludens 1

1. Einleitung / Ziel der Dissertation

Ein Schädel-Hirn-Trauma (SHT) ist definiert als eine Verletzung oder Funktionsstörung des Gehirns in Folge einer externen Gewalteinwirkung [1].

Das SHT stellt in der Altersgruppe der 29-45-Jährigen die häufigste Todesursache oder Ursache einer lebenslangen Behinderung in Deutschland dar [2]. Weltweit werden die jährlichen Kosten für Schädel-Hirn-Traumata auf 400 Billionen US-Dollar geschätzt [3]. Stumpfe Traumata sind hierbei führend mit 97,5% in Deutschland im Zeitraum von 2013-2017 und die häufigste Ursache für ein SHT in Deutschland ist der Sturz aus niedriger Höhe [2]. Vor allem die Kaskade der weiteren Schädigung, die dem ursächlichen Ereignis folgt, kann den primären Hirnschaden verschlimmern, zu weiterem Untergang von Hirngewebe führen, das Auftreten neurodegenerativer Krankheiten wie der Alzheimer Krankheit fördern oder auch den Tod nach sich ziehen [4, 5]. Der Verlauf des sekundären Hirnschadens kann durch eine Vielzahl von Faktoren wie zum Beispiel gleichzeitig auftretender Frakturen, Infektionen, einer systemischen Entzündungsreaktion und der Dysregulation des autonomen Nervensystems beeinflusst werden. Andererseits kann ein SHT Auswirkungen auf periphere Organe wie unter anderem Herz, Lunge und Magen-Darm-Trakt haben, weshalb das SHT zu einer systemischen Erkrankung gezählt werden kann [6]. In diesem Zusammenhang ist die sogenannte Hirn-Darm-Achse zuletzt in den Fokus der klinischen und Grundlagenforschung gelangt. So wurde eine bidirektionale Interaktion entlang der Hirn-Darm-Mikrobiom- Achse bereits durch einige klinische und auch präklinische Studien gezeigt [7]. Veränderungen der Darm-Hirn-Achse in Folge eines SHT tragen bidirektional zur Krankheitsentwicklung sowie zur zentralen Neuroinflammation und Neurodegeneration bei und können die Mortalität und Morbidität beeinflussen [8, 9]. Das Mikrobiom scheint Einfluss auf die funktionelle Integrität des Gehirns zu nehmen und eine Dysbiose wird mit diversen Krankheitsbildern wie Autismus, Schizophrenie, Depression, chronisch neurodegenerativen Erkrankungen aber auch dem SHT in Verbindung gebracht [10–14].

Da sich bei SHT Patienten ein erhöhtes Risiko für Infektionen wie zum Beispiel der Pneumonie oder einer postoperativen Meningitis zeigt, erhält die Mehrzahl der stationär behandelten SHT Patienten eine antibiotische Therapie, dessen langfristige Effekte auf das neurologische Outcome im Sinne der Darm-Hirn-Homöostase von zunehmendem Interesse sind [6]. Zunehmende Studien untersuchen daher die

Auswirkungen einer antibiotischen Therapie auf das Outcome nach einem SHT. Eine antibiotische Therapie kann zum einen gegen spezifische Erreger antibakteriell wirken, aber auch eine mikrobielle Dysbiose auslösen, welche das Potential hat, eine zerebrale Neuroinflammation zu unterhalten. Aktuelle Studien zeigen jedoch auch, dass bestimmte Antibiotika antiinflammatorische und neuroprotektive Effekte fern ab der antibakteriellen Wirkung zeigen und das neurologische Outcome verbessern können [6, 8, 15].

Die Hirn-Darm-Homöostase bietet daher Potenzial als Ansatz zur therapeutischen Beeinflussung des sekundären Hirnschadens, weshalb in dieser Arbeit der Zusammenhang zwischen einer mikrobiellen Dysbiose durch antibiotische Therapie und dem frühen sekundären Hirnschaden nach SHT behandelt wird [14, 16, 17]. Hierzu wird in den Versuchstieren durch eine zweiwöchige Antibiotika und Antimykotikum-Therapie eine Mikrobiomdepletion hervorgerufen, welcher ein experimentelles kontrolliertes kortikales Hirntrauma folgt. Die folgenden 72 Stunden bis zur Euthanasie wird die antibiotische Therapie fortgesetzt und die Auswirkungen einer Therapie auf die neurobehaviorellen Parameter, das histopathologische Läsionsvolumen und den Gen- und Proteinnachweis bestimmter Marker untersucht.

Da bisher die meisten tierexperimentellen Studien bezüglich des SHT und auch bezüglich des Einflusses einer mikrobiellen Dysbiose auf ein SHT an männlichen Mäusen durchgeführt wurden, wurden in dieser Arbeit weibliche Mäuse untersucht [15, 17–19].

2. Literaturdiskussion

2.1. Das menschliche Nervensystem

Das Nervensystem umfasst zum einen das zentrale Nervensystem (ZNS), bestehend aus dem Gehirn und dem Rückenmark und zum anderen das periphere Nervensystem (PNS), welches aus zahlreichen Neuronen und sensiblen wie auch motorischen Leitungsbahnen besteht. Weiterhin lässt sich das somatische, bestehend aus motorisch willkürlich beeinflussbarer Steuerung und sensibel bewusster Wahrnehmung, von dem vegetativen, autonom agierenden, Nervensystem unterscheiden. Das vegetative Nervensystem lässt sich wiederum in den Parasympathikus und Sympathikus differenzieren [20].

2.1.1. Makroskopischer Aufbau des Gehirns

Das Gehirn befindet sich in der knöchernen Schädelhöhle. Seine Funktion besteht darin, vielfältige Informationen aus der Peripherie zu erhalten und entsprechend zu verarbeiten und in stetiger Kommunikation mit sich selbst und vielen weiteren Organen des menschlichen Körpers zu stehen.

Es lässt sich funktionell wie auch morphologisch in sechs Bereiche teilen (Abb. 1)

Makroskopisch lässt sich das Telencephalon als maßgeblich integrative Struktur des Gehirnes in zwei, jeweils aus sechs Lappen bestehende, Hemisphären teilen, welche zum einen durch die Fissura longitudinalis cerebri fragmentär getrennt und durch das Corpus callosum miteinander verbunden sind [21].

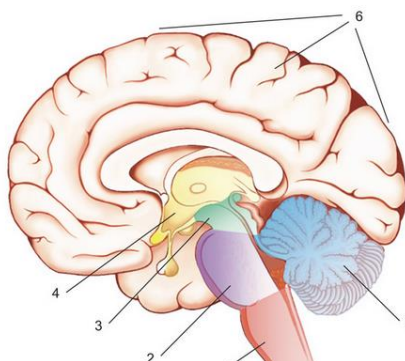


Abbildung 1 Gliederung des Gehirns, aus [20]

Abbildung des Gehirnes mit 1 verlängertes Mark (Medulla oblongata), 2 Brücke (Pons), 3 Mittelhirn (Mesencephalon), 4 Zwischenhirn (Diencephalon), 5 Kleinhirn (Cerebellum), 6 das Großhirn (Telencephalon)

Das Gehirn liegt geschützt im Schädel und wird von drei Hirnhäuten, den Meningen umgeben. Direkt dem Hirn anliegend und den Gyri und Sulci folgend, befindet sich die Leptomeninx Pia mater. Die ebenfalls zur Leptomeninx zählende Arachnoidea befindet sich zwischen dieser Pia mater und der äußersten, harten Hirnhaut, der Dura mater. Zwischen der Pia mater und der Arachnoidea befindet sich der Subarachnoidalraum (SAB), welcher den Liquor cerebrospinalis und arterielle Gefäße wie den Circulus arteriosus Willisii enthält. Die Dura mater ist sowohl Teil des Periosts des Schädelknochens als auch eine Hülle des Gehirns. Eine der Funktionen der Dura mater ist die Fixierung des Gehirns im Schädel, sodass jenes bei Kopfbewegungen nicht allzu frei beweglich und somit verletzlich ist. Venöse Gefäßräume, das Sinus-system, befinden sich zwischen Dura mater und Periost und gewährleisten den Blutabfluss in Richtung Herz. Topographisch wird das Gehirn durch Dura-mater-duplikaturen wie die Falx cerebri, das Tentorium cerebelli, Falx cerebelli und das Diaphragma sellae unterteilt [22].

Der Liquor cerebrospinalis, eine vor allem durch die Ependymzellen des Plexus choroideus mit einer Geschwindigkeit von 0,3-0,4mL/min produzierte zellfreie und klare Flüssigkeit, zirkuliert durch die Liquorräume und befindet sich in den vier Ventrikeln. Die Rückresorption in das venöse System erfolgt überwiegend durch die Granulationes arachnoideae im Sinus sagittalis superior, wobei neue Studien zeigen, dass der Lymphweg als der entscheidende Hauptabflussweg angesehen werden sollte [23]. Der Liquor hat zur Aufgabe, das Hirngewebe vor mechanischer Belastung zu puffern, sowie als Vermittler zwischen Blutkapillaren und Gehirnzellen durch eine Versorgung mit Sauerstoff, Nährstoffen wie Glukose, Laktat, Aminosäuren und durch den Abtransport von Abbauprodukten, wie zum Beispiel Kohlenstoffdioxid (CO₂) und Laktat, eine zuverlässige Zellaktivität zu ermöglichen [24, 25]. Die Ionen-zusammensetzung und das Volumen des Liquors, vor allem in den Ventrikeln und dem SAB-Raum, sowie der extrazellulären Intraspinalflüssigkeit, sind notwendig für eine effiziente Gehirnfunktion. Barrieren wie die Blut-Hirn-Schranke (BHS) und die Blut-Liquor-Schranke haben großen Anteil an der Aufrechterhaltung der zerebralen Homöostase [26]. Einschränkungen der Liquorresorption oder Liquorzirkulation haben einen erhöhten Liquordruck zur Folge, der zur Erweiterung der Liquorräume führt. So kann umliegendes Hirngewebe durch den auf ihn einwirkenden Druck geschädigt werden.

Die funktionelle Grundeinheit des Nervensystems stellt letztendlich das Neuron dar, welches aus einem Soma (Zellkörper), einem Axon und mehreren Dendriten besteht. An bestimmten Stellen des Gehirnes wie zum Beispiel im Hippocampus sind neuronale Stammzellen vorhanden, die in gewissem Maße zur Regeneration befähigt sind [27]. Verletzungen des Somas führen zu einem Untergang des betroffenen Neurons, wohingegen axonale Schäden im Rahmen der Wallerschen-Degeneration nur zum Verlust distaler Bereiche des Axons führen, aber auch durch retrograde axonale Degeneration ein Neuronenuntergang möglich ist [20].

2.1.1.1. Hippocampus

In der Medianwand des Temporallappens findet sich die zum limbischen System gehörende, als Hippocampus bezeichnete, Struktur. Anatomisch lässt er sich unterteilen in das Pes hippocampi, Gyrus dentatus, Crura fornicis, Commissura fornicis, Corpus fornicis, Columnae fornicis und letztlich die Corpora mamillaria. Wichtige Funktionen des Hippocampus bestehen in der Ausbildung des Gedächtnisses, Verhaltens, sowie emotionaler und vegetativer Funktionen. Die als Papez Neuronenkreis bezeichnete Informationsweiterleitung zwischen den verschiedenen Teilen des Hippocampus hat maßgeblichen Anteil an der Überführung von Gedächtnisinhalten (Ereignisse, sachliche Zusammenhänge, räumliche Gegebenheiten) vom Kurzzeit- in das Langzeitgedächtnis. Es resultieren deutliche Merkfähigkeitsdefizite bei Zerstörung auch nur eines der Glieder dieses Neuronenkreises. Weiterhin führt eine Störung der γ -Aminobuttersäure (engl.: *gamma aminobutyric-acid*, GABA)- Interneurone zu einer erhöhten Bereitschaft zur spontanen neuronalen Entladung nach viszerale oder sensorischen Empfindungen, welche sich in komplex fokalen Anfällen zeigen. Auch bei schizophrenen Störungen oder der Alzheimer Erkrankung lässt sich eine Reduktion der glutamatergen Neurone im Hippocampus finden [20].

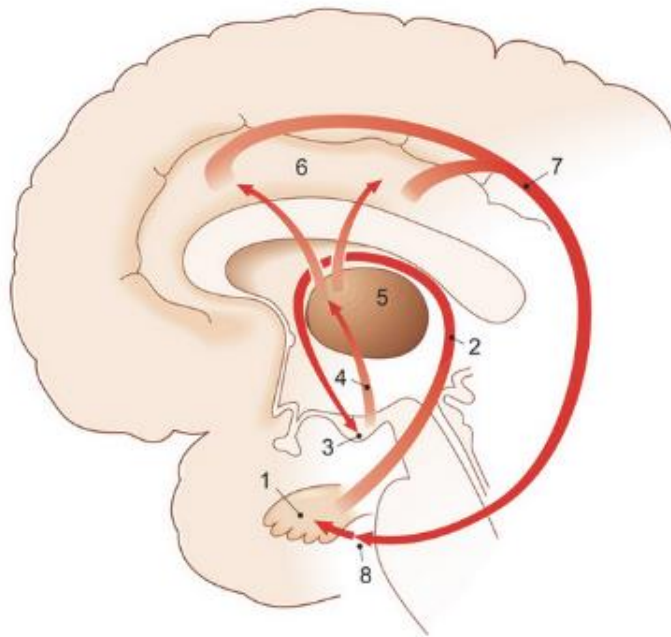


Abbildung 2 Papez Neuronenkreis, aus [20]

Der als Papez Neuronenkreis bezeichnete Neuronenkreis zur Übertragung von Informationen vom Kurzzeit- in das Langzeitgedächtnis (1 Hippocampus → 2 Fornix → 3 Corpora mammillaria → 4 Fasciculus mamillothalamicus → 5 Thalamus (Nucleus anterior) → 6 Gyrus cinguli → 7 Cingulum → 8 Area entorhinalis → 1 Hippocampus), aus [20]

2.2. Das Schädel-Hirn-Trauma

2.2.1. Definition des Schädel-Hirn-Traumas

Ein SHT ist definiert als eine Verletzung oder Funktionsstörung des Gehirns in Folge einer externen Gewalteinwirkung. Abzugrenzen ist hierbei die Schädelprellung, die sich durch eine Verletzung des Kopfes ohne Funktionsstörung des Gehirnes oder dessen Verletzung auszeichnet. Von einem offenen SHT wird gesprochen, sofern die Dura mater eröffnet ist [28]. Klinisch einteilen lässt sich das SHT anhand der nach drei Kriterien bewertenden Glasgow-Coma-Scale (GCS). Bewertet werden hierbei die Kategorien Augen öffnen, beste verbale Antwort und beste motorische Antwort. Je nach erreichter Punktzahl wird das vorliegende Trauma in leicht (GCS 15-13), mittelschwer (GCS 12-9) und schwer (GCS 8-3) eingestuft. Diese Einteilung gibt Hinweise auf die Prognose des Patienten und einzuleitende Maßnahmen wie zum Beispiel die Schutzintubation [29].

Punkte	Augen öffnen	Beste verbale Antwort	Beste motorische Antwort
1	Nicht möglich	Keine	Keine
2	Nach Schmerzreiz	Laute	Strecksynergismen
3	Nach Ansprache	Einzelne Worte	Beugesynergismen
4	Spontan	Desorientiert	Ungezielte Abwehrbewegung
5		Orientiert	Gezielte Abwehrbewegung
6			Nach Aufforderung

Tabelle 1 Glasgow Coma Scale (GCS), modifiziert nach [30]

2.2.2. Epidemiologie des Schädel-Hirn-Traumas

Als häufigste Ursache einer lebenslangen Behinderung oder sogar des Todes in der Altersgruppe der 29 bis 45-Jährigen und auch mit Abstand die häufigste Todesursache bei den unter fünfzehn-Jährigen, ist das SHT ein nicht zu unterschätzendes Trauma. Jedes Jahr erfahren circa 273.000 Menschen in Deutschland ein SHT. Mehr als ein Drittel (39,1%) der Patienten wiesen ein isoliertes SHT auf und in der Mehrheit der Fälle (97,5%) ist ein stumpfes Trauma ursächlich gewesen [2]. In Deutschland erleiden 91% der SHT- Patienten ein Trauma mit leichten Folgen, 4% mit mittelschweren und 5% mit schweren [31]. Hochrechnungen zu Folge verursachen SHT Kosten in Höhe von circa 2,5 Milliarden Euro pro Jahr. Das schwere SHT mit einer GCS von kleiner

gleich 8 am Unfallort zeigt eine Inzidenz von ungefähr 7,3/100.000 Menschen und weist eine Gesamtmortalität von 45,8% auf [2].

2.2.3. Langzeitfolgen des Schädel-Hirn-Traumas

Auf Grund eines mit einem SHT verbundenen Unfalles wird in vielen Fällen abrupt das Leben des meist jungen, aktiven Betroffenen, wie auch seiner Angehörigen maßgeblich beeinträchtigt. Schäden des ZNS sind auf Grund der eingeschränkten Reparaturfähigkeit oft irreversibel [32].

Allein in den USA ergaben Schätzungen, dass 3,2-5,3 Millionen Menschen, beziehungsweise 1,1-1,7% der US-Bevölkerung unter SHT-bedingten Behinderungen und Langzeitkomplikationen leiden, die die tägliche Lebensqualität beeinträchtigen. Bei sinkender Sterblichkeit nach SHT, bleiben die Langzeitkomplikationen nach einem SHT aus finanzieller, individueller und institutioneller Sicht von großer Bedeutung [33, 34]. Betroffene benötigen Hilfe auf mehreren Ebenen und können in einigen Fällen nicht mehr das soziale System mit einkommensabhängigen Zahlungen unterstützen, sondern benötigen im Gegenteil meist kostenschwere Unterstützung. Das SHT ist nicht allein ein akutes Ereignis, sondern vielmehr eine chronische Erkrankung [35]. Nach dem Primärschaden entwickelt sich eine komplexe Gehirnerkrankung, die Ähnlichkeiten mit neuropsychiatrischen Verhaltenspathophysiologien wie in Folge eines Schlaganfalles oder der Alzheimer Krankheit hat. In vielen Fällen wird nach einem SHT eine langfristige Neurodegeneration eingeleitet, weshalb ein Trauma bestehende neurologische Erkrankungen verschlimmern kann und ein wichtiger Risikofaktor für neurologische Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson, Epilepsie, Schlaganfall, chronisch traumatische Enzephalopathie und Depression ist [36, 37]. Diese Krankheitsverläufe führen alle zu einem erhöhten Bedarf an institutioneller und vor allem langfristiger Hilfe oder sogar Pflege [38]. Ein SHT im Kindesalter kann zu Bildungsschwierigkeiten, niedrigeren Beschäftigungsprofilen und psychischen Gesundheitsproblemen führen und wird mit einem für Monate bis Jahre erhöhten Epilepsierisiko in Verbindung gebracht [34, 39].

Ein Schaden im Bereich des Hippocampus kann zu Folgen in der Lern und Gedächtnisleistung führen und die Entwicklung von Depressionen begünstigen [20].

2.2.4. Pathophysiologie des Schädel-Hirn-Traumas

2.2.4.1. Primärschaden

Das SHT lässt sich pathophysiologisch in einen Primär- und Sekundärschaden unterscheiden. Der Primärschaden ist hierbei der mechanisch verursachte, irreversible und nur durch das Trauma an sich beeinflussbare Untergang des Hirngewebes zum einen und zum anderen die Funktionsstörung der an sich regenerationsfähigen Neurone im Augenblick des Traumas [29, 40]. Durch Quetschen, Reißen oder Dehnen von Neuronen, Axonen, Gliazellen und Blutgefäßen kommt es zu einer Beeinträchtigung derer Funktion [41]. Mechanische Verletzungen der Neuronen führen zu vielfältigen Veränderungen in deren Funktion, Verletzungen der Mikroglia verursachen eine Freisetzung von Zytokinen, die potenziell weitere Immunzellen anziehen und aktivieren, sodass eine weitreichende Entzündungskaskade aktiviert wird (siehe Sekundärschaden). Ebenso kann durch das SHT eine unmittelbare Verletzung von Astrozyten und der funktionell assoziierten Bluthirnschranke hervorgerufen werden. Durch Astrozytenverletzung kommt es zur Schwellung derer Endfüße und verletzte Endothelzellen führen zur Disruption oder Lockerung der dazwischenliegenden *Tight junctions*, sodass es zu einer beeinträchtigten Barrierefunktion mit folgendem Ödem, erhöhtem intrakraniellen Druck, verringertem Blutfluss und verstärkter Ischämie und Zelltod kommt [42]. Es kommt zu Änderungen des zerebralen Blutflusses mit folgendem Hypometabolismus, erhöhtem Hirndruck, Ödembildung und Schwellung des Gehirnes, sowie Entzündungen und mehreren Prozessen auf molekularer Ebene wie oxidativem Stress, Exzitotoxizität und Apoptose [43–45].

2.2.4.2. Sekundärschaden

Der Sekundärschaden in Folge eines SHT bezeichnet die sich nach dem Trauma entwickelnden multifaktoriellen Schäden in Folge glialer und neuronaler Dysfunktion, Stoffwechselstörungen, Minderdurchblutung, mitochondrialer Dysfunktion, Inflammation und Ödem, welche alle Einfluss auf das Outcome des Patienten haben und den Primärschaden in seiner Schwere übertreffen können [46]. Durch eine Reihe multifaktorieller Ereignisse wie Glutamatexzitotoxizität, Störung der zellulären Kalziumhomöostase, Membrandepolarisation, mitochondrialer Dysfunktion, Inflammation, erhöhter Freisetzung freier Radikale, Apoptose, wie auch diffuser axonaler Verletzung, einer gestörten Integrität der Blut-Hirn-Schranke und eine durch T und B-Lymphozyten vermittelte adaptive Immunantwort, kommt es zu einem

prolongierten und noch nicht vollständig erklärten Krankheitsprozess der traumainduzierten Neurodegeneration. Fortwährende Neuroinflammation erhöht das Risiko sich entwickelnder neuropsychiatrischer und neurodegenerativer Krankheiten, welche sich erst Jahre nach einem Trauma klinisch präsentieren können [47–49]. Die Entwicklung dieses Sekundärschadens lässt ein Zeitfenster zur Intervention vermuten und ist daher Gegenstand vieler Studien [41, 50, 51].

2.2.4.3. Axonale Schädigung

In gewissem Maße sind Axone dazu in der Lage, Membrandeformationen zu ertragen. Trotzdem sollte man sie eher als starre Strukturen in einer elastischen extrazellulären Umgebung ansehen. Vor allem in den tiefen Gyri an der Grenze der weißen zur grauen Substanz kommt es verstärkt zu einer Scherung der Axone mit folgendem Brechen und Knicken von Mikrotubuli, was zu einer Demontage des Zytoskeletts, plasmalemmalen Instabilität und schließlich Untergang der Substanz führt. Vor allem durch Axolemma-Schäden um die Ranvierschen Knoten herum wird der axonale Transport unterbrochen [52]. Es kommt zu einer Akkumulation transportierten Materials, welche sich als axonale Schwellung präsentiert. Durch Dehnung der Zellmembranen, die einen unkontrollierten, schnellen Natrium- Einstrom und Kalium- Ausstrom zur Folge hat, strömt Kalzium (Ca^{2+}) nun nach intraaxonal und aktiviert zum Beispiel die Protease Calpain, welche zu einer Proteolyse von Zytoskelettproteinen und somit einem irreversiblen axonalen Schaden führt [53]. Weiterhin führt der axonale Ca^{2+} -Einstrom zur Aktivierung von NMDA-Rezeptoren, mit folgendem zytosolischen wie auch mitochondrialen Anstieg von Ca^{2+} , welcher eine neuronale Depolarisation auslöst. Durch folgende Repolarisation werden verstärkt Natrium-Kalium- ATPasen genutzt, die einen erhöhten Glucoseverbrauch bewirken. Es kommt zu einer Erschöpfung der Energiespeicher, einem mitochondrialen Ca^{2+} -Einstrom und somit einem veränderten mitochondrialen Energiestoffwechsel hin zu einer Laktatproduktion mit Azidose und einem sich entwickelnden Hirnödem. In Folge der mitochondrialen Dysfunktion kommt es weiterhin zur ineffizienten oxidativen Phosphorylierung, einer Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies, einer erhöhten Caspase-Aktivierung und neuronaler Apoptose [54]. Ineffiziente oxidative Phosphorylierung hat eine erhöhte Laktatproduktion, Azidose, einen erhöhten zerebralen Blutfluss, Ödeme, Ischämie und neuronale Verletzungen zur Folge [53]. Erhöhte Spiegel reaktiver Sauerstoffspezies fördern die Lipidperoxidation und führen so zu veränderten Membransignalwegen, die für die Homöostase des zerebralen Gewebes unerlässlich sind.

2.2.4.4. Perfusion

Das Gehirn ist seiner zentralen Bedeutung zur Aufrechterhaltung des hohen Stoffwechsels mit adäquatem Nährstofffluss entsprechend sehr gut durchblutet. Es ist auf einen stabilen zerebralen Blutfluss angewiesen. Sobald die zerebrale Perfusion gestoppt wird, kommt es innerhalb von Sekunden zu einer Unterbrechung der Hirnfunktion und innerhalb von Minuten zu einem Untergang neuronaler Zellen [55]. Der zerebrale Blutfluss wird deshalb in Folge eines sich verändernden arteriellen Blutdrucks, intrakraniellen Drucks oder in Abhängigkeit des Metabolismus mittels verschiedener Systeme aufrechterhalten. Zerebrale Blutgefäße haben mittels myogener, neurogener oder metabolischer Mechanismen die Möglichkeit zur Autoregulation. Als Autoregulation wird die Anpassung des zerebrovaskulären Widerstandes als Reaktion auf eine Veränderung des Perfusionsdruckes verstanden. Der Perfusionsdruck (engl.: *cerebral blood flow*- CBF) ist definiert als: Mittlerer arterieller Druck (engl.: *mean arterial pressure*- MAP) – intrakranieller Druck (engl.: *intracranial pressure*- ICP). In Folge eines schweren und mittelschweren SHT, welches mit Frakturen, Blutungen und massiver Störung intrakranieller Strukturen einhergehen kann, kommt es zu Volumenentwicklungen auf Grund von Blutungen oder Ödemen, welche neben der initialen Zerstörung von Blutgefäßen auch zur weiteren Dehnung oder Kompression von umliegenden Gefäßen führen. Dies führt zu einer gestörten zerebralen Perfusion mit folgendem Hypometabolismus und möglicher zerebraler Ischämie, die zu einem progressiven Verlust von Neuronen führen kann [56].

Veränderte Konzentrationen von Endothelin-1, verringerte Spiegel von NO, zyklischem Guanosinmonophosphat und zyklischem Adenosinmonophosphat, sowie Veränderungen in der kaliumabhängigen Kanalaktivierung führen zu einer Beeinflussung des Tonus der zerebralen Gefäße und halten die Autoregulation zunächst aufrecht [57–60]. Stickstoffmonoxid (NO) ist ein bekannter Akteur in der Regulation des Gefäßtonus sowohl in der Peripherie als auch im ZNS. Es wird durch die endotheliale, neuronale oder induzierbare NO-Synthetasen (NOS) aus L-Arginin synthetisiert und führt zu einer Vasodilatation [61, 62]. Nach einem SHT steigt die Aktivität der endothelialen NOS kurz für einige Minuten an und fällt dann für mehrere Tage auf circa 50% der Ausgangsaktivität ab [63, 64]. Im Gegensatz zur endothelialen NOS, steigt die Aktivität der induzierbaren NOS (iNOS) in Neuronen, Makrophagen, Neutrophilen, Astrozyten und auch Oligodendrozyten an. Spitzenwerte ließen sich 4 und 48 Stunden nach Trauma finden, wodurch eine posttraumatische Hyperämie

induziert wird. Diese Hochregulierung der iNOS führt aber auch zu einem schädlichen Anstieg der Gewebe- NO- Konzentration, welche wiederum zu Neuroinflammation, Apoptose, Exzitotoxizität, und einer Entkopplung von NOS mit anschließender Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (engl: *reactive oxygen species*, ROS) beiträgt [65–67]. Endothelin hat vasokonstriktorische Wirkung, kann aber auch mitogen auf Neurone, Gliazellen und Endothelzellen wirken [68]. Es gibt Beobachtungen, dass eine vaskuläre Dysfunktion mit folgender eingeschränkter BHS ein Ausgangspunkt für abnormale Gehirnalterung, Alzheimer und andere neurodegenerative Erkrankungen ist [69]. Die BHS als wichtiger Regulator der Nährstoffversorgung und des zerebralen Blutflusses hat somit großen Anteil der Aufrechterhaltung der Homöostase des Gehirns [70].

2.2.4.5. Hirnödeme und erhöhter intrakranieller Druck

Ein Hirnödem und der damit verbundene erhöhte intrakranielle Druck zählen zu den wichtigsten Folgen nach einer traumatischen Hirnverletzung [71]. In Folge der traumatisch bedingten Beeinträchtigung der BHS kommt es zur Hyperpermeabilität. Die auf Grund der Verletzung reaktiven Endothelzellen der BHS führen zu einer erhöhten Permeabilität der BHS und einer Aktivierung der Hämostase [72]. Der physiologischer Weise stark regulierte Prozess des Transportes durch die BHS ist in Folge des SHT nun gestört [73]. Auch die Anzahl der an der Ausbildung der BHS beteiligten Perizyten nimmt in Folge eines Traumas ab und wird um bis zu 40 % reduziert [74, 75]. Eine durch IL β induzierte astrozytäre Erhöhung der Expression des Endothelwachstumsfaktors (engl.: *vascular endothelial growth factor*, VEGF) wie auch dessen Rezeptors (VEGF-R) und der Matrix-Metalloproteinasen (MMP) 1,2,3 und 9 aggraviert das Geschehen durch eine erhöhte Permeabilität der sich entwickelnden Gefäße. VEGF vermittelt ebenso die Phosphorylierung und Dislokation von Endothelproteinen wie Zonula-occludens 1 (ZO-1) und Cadherin, die wichtig zur Aufrechterhaltung der BHS sind und aktiviert die Caspase1, welche eine Zellapoptose nach sich zieht [76]. Matrix Metalloproteinasen sind als zinkabhängige Proteasen an dem Abbau der Extrazellulärmatrix beteiligt. Sie führen zu einer Zerstörung der *Tight Junction* Proteine Claudin 5 und Occludin und haben dadurch Teil an der Entwicklung einer hyperpermeablen BHS, des vasogenen Ödems und fördern die Leukozytenextravasation [77]. Aquaporin 4 (AQP4), welches sich an der basolateralen Membran der Astrozytenfortsätze, Ependymzellen und Endothelzellen befindet, wird im Zusammenhang mit einem SHT hochreguliert. Es folgt ein verstärkter passiver

Transport von Wasser in das Hirngewebe und die Astrozyten [78]. Normalerweise intravasal befindliche Faktoren wie Plasmin, Thrombin, Fibrin, freies Eisen und Immunzellen treten nun in das Hirngewebe über und akkumulieren extrazellulär. Diese Volumenzunahme führt zu einem Hirnödem mit einer Erhöhung des Hirndruckes, was wiederum den zerebralen Blutfluss vermindert und zu weiterer Gewebeschwellung führt, Herniationen begünstigt und Sekundärverletzungen wie Ischämien fördert [78].

Makrophagen, Leukozyten und Neutrophile passieren durch traumabedingt erhöhte Expression von vaskulären Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen die BHS und führen zu einer weiteren Volumenzunahme [79]. Nach Passage der Endothelschranke durch die Leukozyten passieren diese weiter die Glia limitans, welche durch ein traumatisch bedingtes Zurückziehen der astrozytären Endfüße passager wird [79]. Die Leukozyten sammeln sich nun im perivaskulären Raum, vor allem um Venolen herum, und bewegen sich weiter in das Hirnparenchym [80, 81]. Hier kommt es folglich unter anderem durch Freisetzung von MMP-9, reaktiver Sauerstoffspezies und proinflammatorischer Zytokine als auch durch Aktivierung von Proteasen und Elastasen, zu einer Aggravation des Ödems und der Neuroinflammation [79, 81, 82]. Das als zytotoxische Hirnödem bezeichnete Ödem, unter anderem durch Astrozytenschwellung verursacht, ist vor allem in der frühen Phase nach SHT ein wichtiger Prozess. Durch *Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NFkB)- induzierte Signalübertragung wie auch *High-mobility-Group Protein 1* (HMGB1) -Freisetzung aus nekrotischen Neuronen, welche bei Mikroglia über den TLR4 die Sekretion von Interleukin 6 (IL6) induziert, und in Astrozyten zu einer Hochregulierung des AQP4-Kanals führt, erfahren Astrozyten selbst eine Volumenzunahme und haben so Anteil an dem schädlichen Anstieg des intrakraniellen Druckes nach SHT [71, 83].

2.2.4.6. Neuroinflammation

Neuroinflammation als beeinflussender Faktor der fortschreitenden Neurodegeneration und des Outcomes nach SHT hat sowohl neurotoxische als auch neurotrophe Wirkungen, was sie zu einem wichtigen Angriffspunkt potentieller Therapiestrategien zur Verbesserung des Outcomes macht [41, 84, 85].

Das Ausmaß der andauernden Neuroinflammation und daraus folgender struktureller Veränderungen im Gehirn scheint im Zusammenhang mit der Mikroglia-Aktivierung zu stehen [86]. Auch lässt sich eine Erhöhung der Gliazellzahl in kontralateralen und

entfernten Hirnarealen mehr als eine Woche nach dem Trauma beobachten [87]. Diese Aktivierung, auch „*Priming*“ genannt, führt dazu, dass die Mikroglia sich in einem aktiven Zustand befinden, um auf interne und externe Angriffe reagieren zu können [13, 88]. Es reicht nun in diesem aktivierten Zustand ein kleiner Stimulus aus, um eine proinflammatorische Reaktion auszulösen [89]. Ein dem primären SHT folgendes zweites Trauma, eine Infektion, oder Stressfaktoren führen nun zu einer überproportionalen Entzündungsreaktion [89].

Gliazellaktivierung durch freigesetztes Adenosintriphosphat (ATP) aus zugrunde gegangenen Zellen, Mobilisation von Leukozyten zum Ort der Schädigung und Freisetzung von Entzündungsmediatoren sind wichtige Bestandteile der Neuroinflammation [90]. Die neurotoxische Wirkung der zum Beispiel durch den aktivierten IL1 β -Rezeptor aktivierten Gliazellen besteht in der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie IL1 β , IL6, Tumornekrosefaktor alpha (TNF α), Interferon γ (IFN γ), und ROS [84]. Auch IL-1 vermittelte Aktivierung von MMP9 korreliert mit einem erhöhten Rupturrisiko von Aneurysmen unter anderem durch erhöhte Freisetzung von VEGF und beeinträchtigt somit auch die zerebrale vaskuläre Integrität [91, 92]. ROS wie Superoxidradikale ermöglichen die Peroxidation von Membranlipiden wie Arachidonsäure, Linolensäure, Linolsäure und Docosahexaensäure sowie die Störung der *tight junction* Proteine, womit sie zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Endothelzellen und folglich der Zerstörung der Integrität der BHS führen [93, 94]. Zuvor genannte proinflammatorische Zytokine führen weiterhin zur vermehrten Expression spezifischer Leukozytenadhäsionsfaktoren auf den Endothelzellen wie z.B. ICAM (engl.: *intercellular adhesion molecule 1*) und E-Selektin, die dann die Passage von Leukozyten durch die Gefäßmembran hinein in das Hirngewebe ermöglichen [40, 78, 95]. Unterstützt wird dies durch das von den Astrozyten produzierte CCL 2, welches zu einer verminderten Claudin-5- Expression in Endothelzellen der BHS mit folgender Permeabilitätserhöhung führt [96]. P-Selectin und E-Selectin ermöglichen ein Rollen der Leukozyten entlang des Endothels, Leukozytenadhäsionsmoleküle wie ICAM1 und VCAM1 auf den Endothelzelloberflächen ermöglichen eine Bindung von Leukozyten. ICAM, ein Oberflächenmarker, der auf Mikroglia, Leukozyten, und auch Endothelzellen, vor allem durch proinflammatorische Mediatoren vermehrt exprimiert wird, kann eine mit Integrin LFA-1- wechselwirkende Leukozytenadhäsion an das Endothel unterstützen, wodurch die Leukozyteninfiltration in das Gewebe begünstigt wird. Je stärker die ICAM-

Expression stattfindet, desto durchlässiger ist die BHS [97]. Proteine wie das Plasmalemma-Vesikel-assoziierte-Protein (PLVAP) unterstützen schließlich die Transmigration zwischen den Endothelzellen und führen somit zu deren Eintritt in das Hirngewebe [98, 99]. Im physiologischen Zustand weisen die zerebralen Endothelzellen eine geringere Leukozyten-Adhäsionsmolekülexpression auf als die peripheren Endothelzellen, weshalb im intakten Zustand der BHS nur eine minimale Leukozytenmigration in das Hirngewebe stattfindet [100, 101]. Durch von Leukozyten produzierte Zytokine können ZNS Endothelzellen aktiviert werden und eine Expression von weiteren Leukozyten-Adhäsionsmolekülen induzieren, wodurch es zu einer massiven parenchymalen Infiltration von Immunzellen kommen kann [102].

Auch die Synthese von Chemokinen wie IL8 und entzündlichem Makrophagenprotein (engl. *Macrophage inflammatory protein*, MIP), welche als chemoaktive Substanzen die Migration von Leukozyten aus dem systemischen Blutstrom in das ZNS fördern unterhält die Leukozyteninfiltration des zerebralen Gewebes [95]. Da Leukozyten selbst freie Radikale wie Superoxiddismutase und Stickoxide produzieren können, tragen sie zur Ausbildung oxidativen Stresses und Schädigung der Endothelzellen wie auch gestörter zerebraler Mikrovaskulatur bei. Durch erhöhte Permeabilität der BHS und folglichem unkontrolliertem Strom von Ionen und Proteinen können sie zur Übererregbarkeit des neuronalen Gewebes beitragen und die Entwicklung einer Epilepsie begünstigen [95, 103, 104].

2.2.5. Gliazellen

Gliazellen kommen im Gehirn etwas häufiger als Neuronen vor [105]. Im Zuge der Evolution nahm das Astrozyten-zu-Neuronen Verhältnis stetig zu und beträgt beim *Homo sapiens* circa 1,65:1 [106]. Schätzungen zu Folge würden die Mikroglia 10-15%, die Astrozyten circa 20-40% und die Oligodendrozyten die Mehrzahl der Gesamtgliapopulation ausmachen [107, 108]. Ma et al. zeigten am männlichen Mausmodell, dass nach einem mittelschweren bis schweren, oder wiederholt leichten SHT eine experimentell induzierte andauernde Mikroglia-Aktivierung und erhöhte Astrozyten-Aktivität zu einer Entzündung führt, die langfristige neuropathologische und neurobehaviorale Veränderungen nach sich zieht [16].

2.2.5.1. Mikroglia

Mikroglia sind in der weißen Substanz häufiger nachweisbar als in der grauen Substanz [108]. Als Bestandteile der Monozyten-Makrophagen-Linie lassen sie sich als für das ZNS spezifische Makrophagen bezeichnen und tragen einen maßgeblichen Teil dazu bei, Infektionen und Verletzungen zu bekämpfen [109]. Ursprünglich aus Dottersack-Makrophagen entstammend, wandern sie zeitgleich mit der Synthese der ersten Neuronen um den neunten Tag der Embryonalentwicklung einer Maus vor der Vaskularisation in das Gehirn ein [110]. Sie zeigen eine gewisse Dynamik und sind während des gesamten Lebens zur Teilung und Selbsterneuerung befähigt. Sie sind nicht nur Makrophagen, sondern beeinflussen eine Vielzahl von Prozessen, wie zum Beispiel die Gehirnentwicklung, Homöostase und Funktion, die Angiogenese, Wundheilung, den Abtransport von Zelltrümmern, sowie auf synaptischer Ebene die Signalübertragung, die Bildung und den Zelltod von Synapsen. Sie haben somit einen Anteil an der Ausbildung des neuronalen Netzwerkes [28, 111, 112]. Durch Förderung der Neurogenese, Beseitigung von Ablagerungen und Unterdrückung von Entzündungsreaktionen bei Krankheiten wie beispielsweise Schlaganfall, Autismus und Alzheimer, schützen sie die Physiologie des ZNS [113].

Auf Grund zahlreicher Rezeptoren und Signalmoleküle können Mikroglia kontinuierlich ihre Umgebung wahrnehmen und auf freigesetztes Glutamat, ATP, Wachstumsfaktoren und Zytokine, aber auch auf pathogen assoziierte Muster (engl.: *Pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) und endogen von geschädigten Neuronen oder anderen Zellen des ZNS produzierte Gefahrenstoffe (engl.: *danger associated molecular patterns*, DAMPs) reagieren [41, 114]. Die Gesamtheit dieser Rezeptoren und Signalmoleküle wird als „Sensom“ bezeichnet. Je nach Aktivitätszustand weisen Mikroglia eine bestimmte Morphologie auf und spiegeln auf Grund ihrer morphologischen Diversität und Plastizität den Zustand ihrer Umgebung wider [28, 41]. Mikroglia können bei Aktivierung der proinflammatorischen Kaskade mit Hilfe der freigesetzten Zytokine eingedrungene Pathogene bekämpfen, aber auch umliegendes Gewebe schädigen [28, 38, 40]. Während sie im ruhenden Zustand einen kleinen Zellkörper und viele lang ausgestreckte Ausläufer besitzen, mit denen sie ihre Umgebung kontinuierlich scannen, vollziehen die Mikroglia einen Zustandswechsel, sobald Hirngewebe geschädigt wird und proinflammatorische Mediatoren wie IFN γ , ATP oder Blutbestandteile wie Ferritin und Fibrinogen in Folge einer beeinträchtigten BHS freigesetzt werden [115, 116]. Geschädigte Neuronen setzen unter anderem ATP

frei, welches zu einer Migration der Mikroglia an die Verletzungsstelle führt. Zelltrümmer wie zum Beispiel aus verletzten Neuronen freigesetztes Uridindiphosphat (UDP) binden nun an die purinergen Rezeptoren PTX4 und P2Y6 der Mikroglia, wodurch die Phagozytose eingeleitet wird [117]. Mikroglia ermöglichen so die Phagozytose von fremdem sowie totem Material, wie auch geschädigtem Myelin, dessen Anwesenheit die Remyelinisierung hemmt, oder ermöglichen die Beseitigung von Synapsen beschädigter Axone, wodurch die Reparatur geschädigten Gewebes gefördert wird [38, 118]. In ihrer nun aktiven Form, die auch als M1-Phänotyp bezeichnet wird, weisen sie eine amöboide Form mit vergrößertem Zellkörper und zurückgezogenen Ausläufern auf und führen zu einer Freisetzung weiterer proinflammatorischer Zytokine wie IL6, IL2 und TNF α und anderer neurotoxischer Substanzen wie IFN γ , IL1 β , ROS oder Glutamat in ihre direkte extrazelluläre Umgebung [28, 41, 119]. TNF α führt durch Induktion der Cyclooxygenase2 (COX-2) zu einer Abnahme der ZO-1-Expression in *Tight junctions*, wodurch die BHS geschädigt wird [120]. Auch die Freisetzung von ROS durch aktivierte Mikroglia führt zu einer Störung der BHS durch vorübergehende Aktivierung des PI3K/AKT – Weges über Rho-Kinase A (RhoA), welche eine *Tight-Junction*-Leckage zur Folge hat [94]. Diese Leckage wiederum kann zur Infiltration von Immunzellen führen, was auch Effekte auf umliegendes, bisher unbeschädigtes Gewebe hat [121].

Durch Expression des *major-histocompatibility complex 2* (MHC 2) sind die Mikroglia in der Lage, mit T-Lymphozyten zu interagieren. So kommt es durch IFN γ , ein T-Zell-Zytokin, welches hauptsächlich von Th1-Zellen und natürlichen Killerzellen freigesetzt wird und einen potenten Aktivator der Mikroglia darstellt, zu einer erhöhten Präsentation von Oberflächenmarkern wie MHC 2 und CD40 auf Mikroglia, wodurch eine Interaktion zwischen Mikroglia und anderen Zellen ermöglicht wird [122]. Durch präsentierte CD40 beispielsweise aktivieren und stimulieren Mikroglia T-Lymphozyten, welche wiederum die Freisetzung weiterer Entzündungsmediatoren aus den Mikroglia induzieren. Auch durch die Produktion des Zytokins Chemokin Ligand 2 (CCL2, früher Makrophagen-Chemoattraktor-Protein 1, MCP-1) aktivieren sie weitere Immunzellen wie Granulozyten und Monozyten, wodurch der Entzündungsprozess unterhalten wird [112, 123–125].

Der durch entzündungshemmende Mediatoren aktivierte Phänotyp der Mikroglia, als M2 bezeichnet, begünstigt das Wachstum von Neuriten, fördert die Angiogenese und Gewebereparatur und unterdrückt destruktive Immunantworten, indem sie anti-

inflammatorische Zytokine wie IL4, IL10, IL13, IL1 β , Prostaglandine und den transformierenden Wachstumsfaktor (engl.: *transforming Growth faktor beta*, TGF β) freisetzen [28, 38, 40]. TGF β und IL1 β stimulieren neuroprotektiv die Produktion von Nervenwachstumsfaktoren aus Astrozyten [126]. TGF β kontrolliert weiterhin die Bildung von Astroglia-Narben, wodurch es zu Reparaturprozessen nach einer Verletzung beiträgt [127]. Durch Produktion des insulinähnlichen Wachstumsfaktors-1 (engl. *Insulin-like-growth factor*; IGF1), der die Apoptose unterdrückt und die Proliferation und Differenzierung neuraler Stammzellen erhöht, oder durch Veranlassung von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen, einen neuronalen Phänotyp anzunehmen, fördern Mikroglia aktiv die verletzungsabhängige Neurogenese [128, 129]. Demnach können Mikroglia, je nach auslösendem Reiz, auf Grund ihrer Plastizität sowohl neurotoxische als auch neuroprotektive Zustände annehmen [130]. Auch wenn sich zwei Phänotypen unterscheiden lassen, kann im Rahmen eines SHT sowohl eine Mikroglia-induzierte Entzündungsreaktion als auch Reparatur beobachtet werden [88]. Auch lässt sich nicht streng dichotom zwischen M1 und M2 Phänotyp unterscheiden und jeweils vermutete neuroprotektive oder neurotoxische Wirkung generalisieren [113].

2.2.5.2. Astrozyten

Ein SHT führt neben dem mechanischen Schaden zur sofortigen Freisetzung molekularer Stresssignale durch Astrozyten und andere umgebende verletzte Zellen. Dazu kommt die gestörte Integrität der BHS in Folge des Traumas. Durch Extravasion von Blutbestandteilen wie Serumproteinen in das Hirnparenchym werden Astrozyten und Perizyten aktiviert [131, 132]. Astroglia, auch als Astrozyten bekannt, haben einen großen Anteil an der Gesamtheit der Gliazellen [107]. Zusammen mit den Oligodendrozyten bilden sie ein durch Gap junctions verknüpftes Synzytium [107]. Sie sind neuroepithelialen und ektodermalen Ursprungs und haben die Aufgabe, die Homöostase des Hirngewebes aufrecht zu erhalten und als Abwehrzellen das Hirngewebe vor pathologischen Einflüssen zu schützen [107]. Astrozyten bilden die Zytoarchitektur der grauen Substanz. Sie bestehen aus einem Soma und mehreren Fortsätzen, welche sich verzweigen und eine dichte Baumstruktur ausbilden [133, 134]. Mit ihren Endfüßen berühren Astrozyten in Form perivaskulärer Endfüße zerebrale Gefäße. Sie bilden weiterhin durch subpiale Endfüßen eine an der Hirnoberfläche befindliche Grenzstruktur, die Glia limitans aus [107]. Die glia limitans stellt eine Barriere zwischen Hirnparenchym und vaskulären wie auch arachnoidalen

Kompartimenten dar und bildet ein Passagehindernis für Leukozyten des systemischen Kreislaufes [135, 136]. Durch SPARC (auch Osteonectin; engl.: *secreted protein acid and rich in cysteine*)- einen Antagonist zum synaptogenen Hevin, haben Astrozyten, wie auch Mikroglia, Teil an der Synapsenelimination und Phagozytose. Sie sind sowohl für die Entwicklung funktioneller neuronaler Schaltkreise als auch für die posttraumatische Reorganisation von Synapsen und neuronalen Schaltkreisen essenziell [131, 137, 138]. Das perineuronale Netzwerk, bestehend aus einer Mischung aus extrazellulären Matrix- und Zelladhäsionsproteinen, wie Chondroitinsulfat-Proteoglykanen, Glykoproteinen, Glykosaminoglykanen, Tenascinen und Hyaluronan - welches Synapsen einkapselt und stabilisiert, wird ebenfalls durch astrozytäre (und neuronale) Produktion gebildet und modifiziert, wodurch Astrozyten ein Regulator der zerebralen Plastizität und Stabilität sind [138, 139]. Durch den Transport von Ionen, den Abbau von Neurotransmittern und die Freisetzung von Neurotransmittervorläufern und Radikalfängern halten sie das Milieu des Hirngewebes im Gleichgewicht [107]. Astrozyten sind in der Lage, eine Vielzahl biologisch aktiver Substanzen wie z.B. Wachstums- und Entzündungsfaktoren freizusetzen und können durch die Glykogensynthese Neurone mit Energiesubstraten versorgen [107]. Sie spielen weiterhin eine wichtige Rolle zur Regulation des sich extrazellulär befindlichen neurotoxischen Glutamats, welches zur Neurodegeneration führen kann. Sind die Astrozyten in ihrer Funktion beeinträchtigt, so kommt es zu einer neuronalen Dysfunktion und neuronalem Zelltod [140]. Durch Aufnahme von Glutamat, γ - Aminobuttersäure (engl.: *gamma-aminobutyric-acid*, GABA), Adenosin und Monoaminen haben sie Teil an der Neurotransmitter-Homöostase. Sie exprimieren GLT1- einen Glutamattransporter, der zu einer Reduktion der Glutamatansammlung im synaptischen Spalt durch Metabolisierung von Glutamat zu Glutamin durch die Glutaminsynthetase führt. Während pathologischer Zustände wird dieser Transporter hochreguliert um eine postsynaptische Glutamat- Rezeptor- Überaktivierung zu verhindern [141–143]. Auch neuro- und gliotoxisches beta-Amyloid wird durch Astrozyten eliminiert [144]

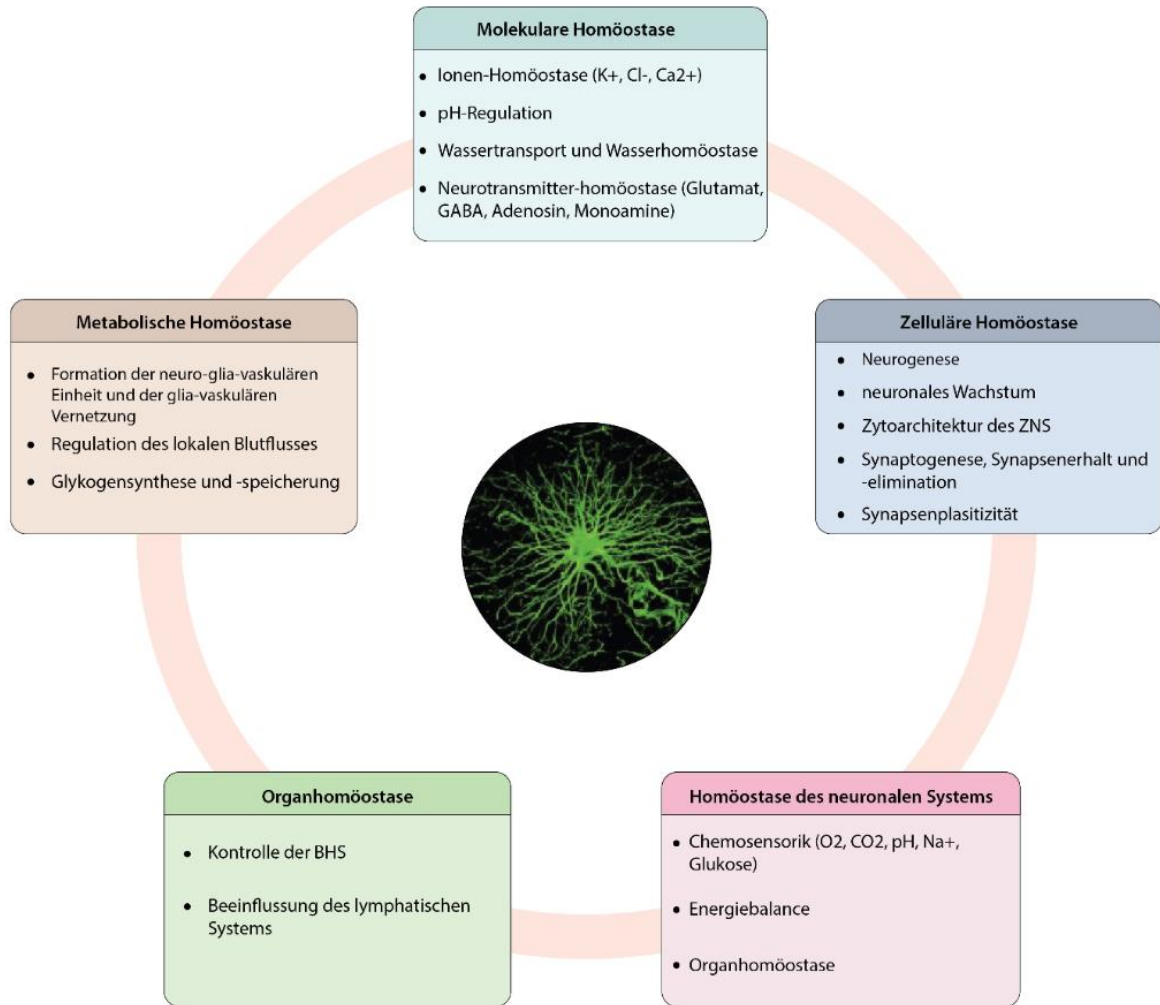


Abbildung 3 Astrozytenfunktion, modifiziert aus [107]

Im Rahmen eines Traumas kann durch NFκB induzierte Signalgebung eine astrozytäre Produktion und Sekretion von neuroprotektiven und glioprotektiven Wachstumsfaktoren, wie dem Neurotrophin BDNF (engl.: *brain derived neurotrophic factor*) und Nervenwachstumsfaktor (engl.: *nerve growth factor*, NGF) induziert werden. In Form von reaktiven Astrozyten haben sie einen entscheidenden Anteil an der Reparatur der BHS nach einer Verletzung [70, 145]. So können Astrozyten durch Freisetzung verschiedener Faktoren wie zum Beispiel Angiopoetin 1 (ANGPT1), Fibroblasten-Wachstums-Faktor (engl.: *fibroblast growth factor*, FGF) und Glia abgeleitetem neurotrophen Faktor (engl.: *glia derived neurotrophic factor*, GDNF) als auch Endothelin die Integrität der BHS beeinflussen. Die Freisetzung von ANGPT1 durch perivaskuläre Astrozyten führt zu dessen Bindung an den Tyrosinkinase-rezeptor Tie-2 der Endothelzellen und fördert die Gefäßstabilität und vermindert die Permeabilität auf Grund einer Hochregulierung von Verbindungsproteinen der BHS [146]. Weiterhin ist ANGPT1 in der Lage, Faktoren wie VEGF, die eine Störung der

BHS induzieren, entgegen zu wirken [147]. Auch das von Astrozyten produzierte Src-supprimierte-C-Kinase Substrat (SSeCKs), ein vorgeschalteter Regulator der Ang1 Expression in Astrozyten, führt zu einer verminderten Expression von VEGF und einer erhöhten Expression von ZO-1 und Claudin 1 sowie 3, wodurch die Integrität der BHS stabilisiert wird [148]. Eine gestörte BHS wird in Zusammenhang mit einer Reihe von neurologischen Erkrankungen wie Multipler Sklerose, Epilepsie, und Schlaganfall sowie neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer aber auch Traumata gebracht [149].

Astrozyten können ebenso DAMPs wie das im Rahmen einer Nekrose freigesetzte HMGB1- Molekül freisetzen, welches zur Angiogenese beiträgt, die BHS- Reparatur nach Trauma fördert und somit Teil an der funktionellen Wiederherstellung hat [150]. HMGB1 kann aber auch, wenn es durch die geschädigte BHS in den systemischen Kreislauf eintritt, systemische Entzündungsreaktionen wie das Systemische Inflammatorische Response Syndrom (SIRS) auslösen, wie in Modellen nach Schlaganfall gezeigt werden konnte [151]. Auch die astrozytäre Sekretion von Apolipoprotein E (ApoE) unterdrückt einen NFκB-MMP-9- Signalweg in Perizyten, der sonst die Durchlässigkeit der BHS erhöht und proinflammatorische Wirkung hat [152]. Astrozyten sind daher zentrale Regulatoren der endothelialen Barriereigenschaften zwischen Blut und Hirngewebe [131].

Traumatisch bedingt kommt es durch Untergang neuronaler Zellen zur Freisetzung von TNFα und zu einem verminderten exzitatorischen Input, wodurch in Astrozyten eine Freisetzung von Glypican 4 (Gpc4) und Glypican 6 (Gpc6), wie auch Thrombospondinen (TSP), und Hevin induziert wird. Dies führt zu einer Rekrutierung von postsynaptischen alpha-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure-Rezeptoren (AMPA- Glutamatrezeptor), sodass eine erhöhte exzitatorische synaptische Aktivität als Reaktion auf die reduzierte präsynaptische Glutamatfreisetzung induziert wird [153]. Die Astrozyten tragen so zur synaptischen Plastizität bei und haben Anteil an der Aufrechterhaltung der neuronalen Erregbarkeit und neuronalen Funktion durch Potenzierung der exzitatorischen Übertragung nach SHT [131, 154]. Es ist aber zu beachten, dass hyperphysiologische oder wiederholte Spiegel von TNFα dazu in der Lage sind, eine dysregulierte synaptische Aktivität zu begünstigen und somit zu einer schädlichen Übererregbarkeit von Synapsen führen und somit eine Epilepsie begünstigen können [131, 155].

Weiterhin sind Astrozyten in der Lage auch neurotoxische Wirkungen zu erzielen. Proinflammatorische Zytokine wie IL1 β , TNF α und IFN γ stimulieren in Astrozyten die Produktion von MCP 1, welches wiederum die Produktion proinflammatorischer Zytokine stimuliert, wodurch ein Entzündungsprozess mit folgender Gewebeschädigung und Neurodegeneration unterhalten wird [156]. Beispiele für weitere neurotoxische Funktionen der Astrozyten sind:

- Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie CXCL10, CCL2, TGF β , TNF α , IL1 β , IL6, COX2, MMP9, high mobility Group box 1 (HMGB1) [157–159]
- Freisetzung neurotoxischer Mengen reaktiver Sauerstoffspezies [158]
- Freisetzung des potenziell neurotoxischen Glutamats [160]
- Produktion von VEGF und damit negativer Einfluss auf die BHS-Funktion [92]
- ausgelöste Aquaporin 4 (AQP4) - Überaktivität mit folgendem zytotoxischem Ödem [161]
- Chronische Zytokinaktivierung welche chronische Schmerzen bedingen kann [162]
- Freisetzung vasoaktiver Substanzen wie vasokonstriktiver Isoprostane und damit Teilhabe an der Reduktion des zerebralen Blutflusses nach einem SHT [163].

2.2.5.3. Begrenzung des Läsionsvolumen durch Ausbildung einer Glianarbe

Astrozyten können auf kleinste Veränderungen des zerebralen Milieus wie Infektionen, Trauma, Ischämie oder frei gewordenen ATP reagieren, was als reaktive Astroglie bezeichnet wird. Extrazelluläres ATP aber auch die durch ein mechanisches Trauma resultierende Membrandeformation mit Aktivierung mechanosensitiver Ionenkanäle induziert einen schnellen Anstieg zytoplasmatischen Kalziums und auch Natriums in Astrozyten, was zu einer Polarisation der Astrozytenfortsätze in Richtung des Schadens und einer Rekrutierung von dynamisch beweglichen Mikroglia und Neutrophilen führt [164, 165]. Im Falle einer Aktivierung im Rahmen eines Traumas können Astrozyten hypertrophieren, Intermediärfilamentproteine wie saures Gliafaserprotein (engl.: *glial fibrillary acidic protein*, GFAP), Vimentin und Nestin vermehrt exprimieren und eine periläsionale Glia-Narbenbildung durch Lagerung extrazellulärer Matrix wie Chondroitinsulfat-Proteoglykanen um die Läsion herum induzieren. Zusammen mit meningealen Fibroblasten, die ebenfalls Proteine der

Extrazellulärmatrix wie Laminin, Kollagen und Fibronectin sezernieren, bilden sie einen Wall um die Läsion herum aus, der die Wunde verschließt [107, 132, 140, 166]. Diese Glianarbe hat die Funktion einer physikalischen und chemischen Barriere, dient aber auch als neuroprotektive Barriere gegenüber Infektionserregern und Immunzellen und schränkt beispielsweise zum Schutz der noch verbliebenen Neurone die Leukozytenmigration in das periläsionale Hirngewebe ein [80, 167, 168]. Sie schützt somit das noch potentiell lebensfähige Nervengewebe vor Entzündungsmediatoren und Neurodegeneration, während das irreversibel geschädigte Gewebe dem entzündlichen Abbau überlassen wird [169, 90]. Durch astrozytäre Hochregulation von CD95 und dessen Rezeptor CD95-R sind Astrozyten in der Lage, T-Zell-Apoptose zu induzieren, um so die Ausbreitung der durch periphere Lymphozyten vermittelten Entzündung zu kontrollieren [170]. Es kommt zu einer verminderten Invasion von Immunzellen über das primär geschädigte Gewebe hinaus, der Gewebeschaden und die Läsionsgröße werden beschränkt und auch der Nervenzellverlust und die Demyelinisierung mit folgender klinischer Symptomatik und beeinträchtigter Funktionserholung werden positiv beeinflusst. Narbenbildende Astrozyten haben so maßgeblichen Einfluss auf den posttraumatischen Schutz und Reparatur von Nervenzellen [145, 166]. Durch die gleichzeitige Freisetzung von S100B, einem Kalzium-bindenden Glykoprotein, welches konzentrationsabhängig entweder neurotroph/neuroprotektiv oder neurotoxisch im ZNS die Zellproliferation und Zelldifferenzierung reguliert und die Apoptose inhibiert, haben Astrozyten Teil an der posttraumatischen Regeneration [171]. Die Glianarbe hemmt aber auch die axonale Regeneration und verhindert die Ausbildung funktioneller Verbindungen zwischen neuronalen Netzwerken, was zu kognitiven Defekten in der Aufmerksamkeit, dem Gedächtnis und exekutiven Funktionen führen kann [41, 52].

2.2.5.4. Kommunikation zwischen Mikroglia und Astrozyten

In aktuellen Studien wird eine Kommunikation zwischen Astrozyten und Gliazellen vermutet, die dazu führt, dass ein spezieller neurotoxischer Phänotyp der Astrozyten aktiviert wird [172]. So setzen zum Beispiel aktivierte Mikrogliazellen das Chemokin *Stromal cell-derived Factor 1* (SDF-1) frei, welches den astrozytären CXCR4-Rezeptor bindet und dort eine TNF α Sekretion in den synaptischen Raum hervorruft [173]. Auch das astrozytär produzierte S100B und die Freisetzung von ATP wirken chemotaktisch und haben positiven Einfluss auf die mikrogliale Aktivierung [174, 175].

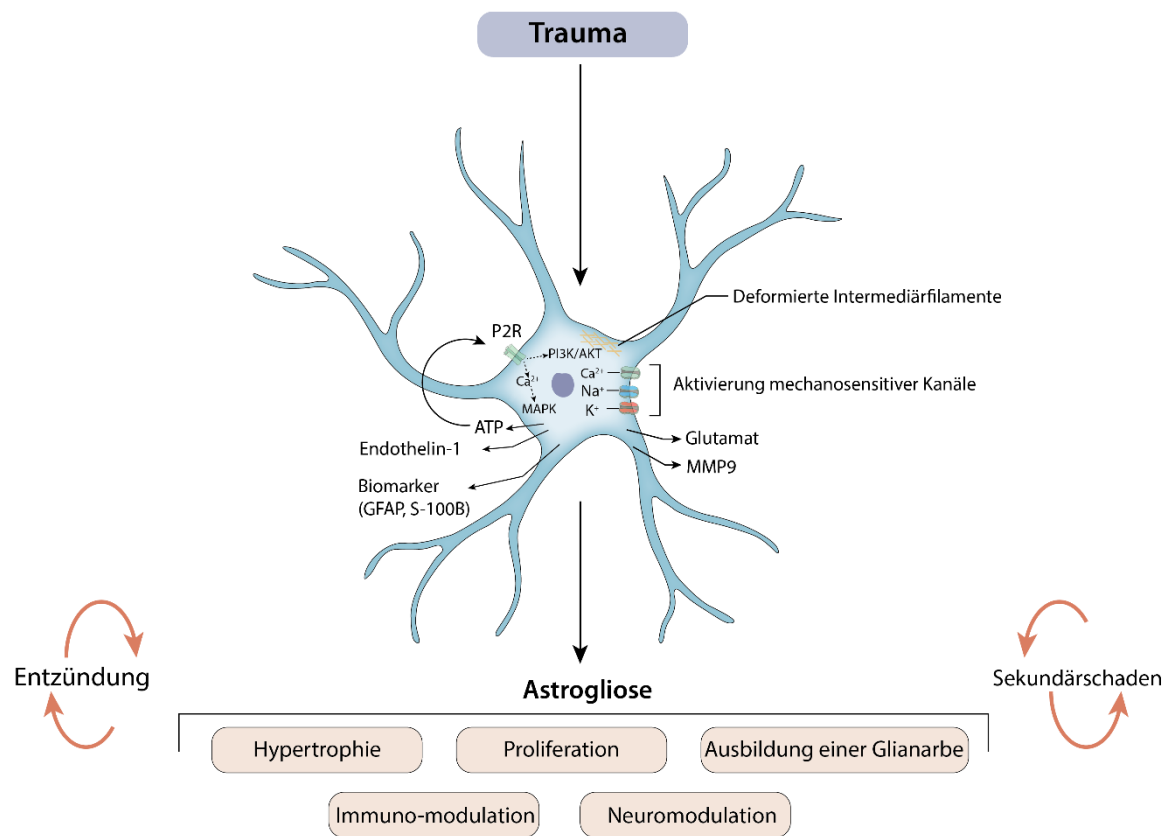


Abbildung 4 Astroglie modifiziert aus [131]

Mechanischer Stress führt zur Deformation der vernetzten Intermediärfilamente innerhalb der Astrozyten und aktiviert einen Ioneneinstrom durch mechanosensitive Ionenkanäle. Intrazellulär ansteigendes Kalzium führt zur Freisetzung von ATP. ATP führt wiederum zur Aktivierung intra und interzellulärer Signalwege, wie zum Beispiel der Freisetzung von MMP 9, Endothelin 1 und Glutamat. Komplexe astrozytäre Reaktivität kann somit neuroinflammatorische Reaktionen im Rahmen des Sekundärschadens beeinflussen. Weiterhin wird im Rahmen eines Traumas GFAP und S100 B freigesetzt, welche als Biomarker für den Schweregrad des SHT genutzt werden können.

2.2.6. Periphere Faktoren die ein SHT beeinflussen

2.2.6.1. Das enterische Nervensystem

Das in Ösophagus, Magen wie auch der Darmwand befindliche enterische Nervensystem, auch als Plexus entericus bezeichnet, besteht aus intramural befindlichen Ganglien und beinhaltet circa 100 Millionen Neurone. Es kann durch sympathische wie auch parasympathische Signale beeinflusst werden, aber auch autonom aktiv sein. Über Rezeptoren der Mukosa und Submukosa gelangen afferente Informationen über die enterischen Nervenzellen, wie den Nervus Vagus oder die Nervi splanchnici zum ZNS. Efferenzen vermitteln die motorische Aktivität und Drüsenfunktion des Magen-Darm Traktes aber auch die Steuerung des darmassoziierten Immunsystems (engl.: *Gut/mucosa-associated lymphoid tissue*; GALT). Neuropeptide wie das vasoaktive intestinale Polypeptid, Substanz P und auch Monoamine wie Serotonin, Noradrenalin, NO und Acetylcholin (ACh) sind hierbei vorkommende Transmitter [20].

2.2.6.2. Die Darm-Hirn- Achse

Die Darmwand bildet mit seiner Schleimhautoberfläche, die größer als die der Epidermis ist, die größte Schnittstelle des menschlichen Körpers zu seiner Umgebung und beinhaltet circa 70% der Immunzellen. Der Gastrointestinaltrakt beherbergt somit das größte Reservoir für Makrophagen und Immunzellen [176, 177]. Der Darm hat mehrere Schutzmechanismen, um sich vor Pathogenen der Umwelt zu schützen. Zum einen weist es eine mechanische Barriere bestehend aus der Epithelschicht mit *Tight junctions*, der Schleimschicht und der Eigenperistaltik auf. Eine Besiedelung des Darmes mit Kommensalen, sowie die Sekretion von Immunglobulin A (IgA), das Vorhandensein von dendritischen Zellen, Makrophagen und Antigenrezeptoren sind Bestandteile der nicht mechanischen Barriere. Dendritische Zellen transportieren Antigene zu den Lymphknoten um sie dort zu präsentieren. Antigenrezeptoren, auch Toll-like-Rezeptoren genannt, aktivieren die angeborene Immunantwort [178]. Die intakte Darm-Hirn-Achse scheint eine Voraussetzung für die Barriere von Zytokinen und Bakterien zwischen äußerem und innerem Milieu zu sein. Eine chronisch beeinträchtigte Barrierefunktion des Colons verhindert den notwendigen Schutz gegenüber hier konzentrierten Mikroorganismen, wodurch es zu einer erhöhten Anfälligkeit für systemische Erkrankungen und lebensbedrohliche Komplikationen kommt. Es ist daher entscheidend, diese Homöostase aufrecht zu erhalten.

Regulierend auf diese Barriere wirken Darmepithelzellen, Immunzellen der Lamina propria und enterische Gliazellen (engl: *enteric glia cells*, EGC) [16]. EGC finden sich im enterischen Nervensystem vor allem im Plexus myentericus wie auch der Mucosa, finden sich im Verhältnis Neurone zu EGC von 1:4 und ähneln den Astrozyten des ZNS bezüglich ihrer Morphologie [179]. Sie haben durch die subepitheliale Lage Einfluss auf die Integrität der Darmbarriere, welche durch vagale Stimulation nach Verletzungen verbessert werden kann [180].

Mehrere Substanzen tragen zur Vernetzung des Darmes mit dem Gehirn auf bidirektionaler Achse bei. Dazu zählen Lipopolysaccharide, Neuropeptide und auch Zytokine wie Cholezystokin (CKK) [181, 182]. Vereinfacht lassen sich zwei Wege der Kommunikation zwischen dem Mikrobiom des Darmes und dem zentralen Nervensystem unterscheiden. Zum einen neuronal über zum Beispiel den Nervus Vagus und zum anderen über das Kreislaufsystem [7].

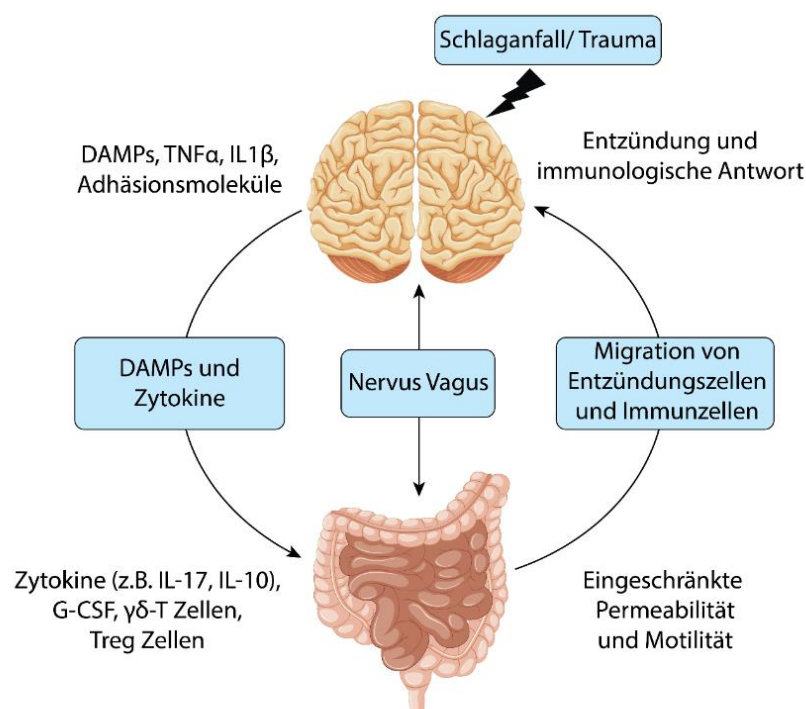


Abbildung 5 Darm- Hirn Achse, modifiziert nach [177]

Allein die räumliche Nähe ermöglicht es, dass Darmmikroben mit dem Nervus Vagus interagieren und diesen beeinflussen können. Die zur Erkennung von viralen und bakteriellen Bestandteilen wichtigen Toll Like Rezeptoren, die zum angeborenen Immunsystem gehören, lassen sich auch auf Neuronen finden, was ermöglicht, dass Neuronen direkt auf Bakterien und Viren reagieren können [183]. Weiterhin werden von Mikroben neuroaktive Substanzen und Metabolite produziert, die wiederum mit

Chemorezeptoren des Nerven interagieren können. Der Vagusnerv der auch so schon mit seinen Afferenzen den Zustand des Darmes an das ZNS weiterleitet, kann dadurch die Neuroinflammation beeinflussen. Es ließ sich außerdem zeigen, dass auch durch efferente Kommunikation, beispielsweise im Falle einer Neuroinflammation, die proinflammatorischen Signale aus dem Darm heruntergeregelt werden [177]. So zeigte sich in Folge einer zentralen inflammatorischen Reaktion im Darmgewebe ein exzitatorischer cholinerg Reflex des Nervus Vagus. Durch ACh- Freisetzung und dessen Bindung an cholinerge nikotinische ACh- $\alpha 7$ -Rezeptoren auf Makrophagen kam es zur reduzierten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine [184].

Auch über den systemischen Kreislauf findet eine gegenseitige Beeinflussung zwischen Mikrobiom und ZNS statt. So hat die Regulation der *tight junctions* und somit das Passieren neuroaktiver, pathogener und immunstimulierender Substanzen durch das Darmepithel und somit der Eintritt in den systemischen Kreislauf Einfluss auf die BHS. Es können proinflammatorische Zytokine, für die die BHS permeabel ist, Mikroglia aktivieren und die Zytokinproduktion im Gehirn initiieren. Es gibt einen Zusammenhang zwischen der Entzündung im Darm und einer proinflammatorischen Reaktion mit Mikroglia-Aktivierung und Neuroinflammation im Gehirn [28].

Die durch ein SHT ausgelöste Kaskade des sekundären Hirnschadens ruft nicht nur in dem primären Schadensgebiet umliegenden Hirngewebe eine Reaktion hervor, sondern betrifft auch periphere Organe wie den Gastrointestinaltrakt [185]. Durch Dysbiose, freigesetzte Zytokine und DAMPs, beeinflusste Darmbarriere und gestörte BHS kommt es dann wiederum auch zu einer Migration von Entzündungs- und Immunzellen aus dem Darm in das Hirngewebe [177].

Speziell die T-Regulator (T_{reg} –Zellen), die sich in der Lamina propria des Darmes finden lassen, tragen zur Aufrechterhaltung der Darmhomöostase bei. Die von kommensalen Mikroben, wie zum Beispiel Clostridien, synthetisierten kurzen Fettsäuren, insbesondere Butyrat und Propionat, regulieren die T_{reg} -Zell-Differenzierung und Expansion. Die Lumenkonzentration kurzkettiger Fettsäuren korreliert hierbei positiv mit der Anzahl der T_{reg} Zellen im Dickdarm [186]. Über den G-Protein gekoppelten Rezeptor GPCR43 (engl. *G-protein coupled receptor 43*) können kurzkettige Fettsäuren direkt mit T-Zellen interagieren und die BHS ohne Transporter passieren. Durch Desoxyribonukleinsäure (engl.: *Desoxyribonuclein acid*, DNA)-Acetylierung wird die FoxP3-Expression induziert und dendritische Zellen werden in die Lage versetzt, die Differenzierung naiver T Zellen in T_{reg} Zellen zu fördern und

entzündliche wie auch allergische Reaktionen zu unterdrücken [186]. Durch T_{reg} ausgelöste Mechanismen sind zum Beispiel die Expression hemmender Zytokine wie IL10, TGFβ, IL35, die Expression des IL2 Rezeptors CD25 und folgende Beeinträchtigung des Zellstoffwechsels, sowie die Zytolyse und gezielte Reifung von dendritischen Zellen durch Oberflächenexpression von Molekülen wie CTLA-4 und LAG-3 [187]. Eine massive lymphoproliferative Erkrankung resultiert aus dem Fehlen des FOXP3 [188]. Das Vorhandensein kurzkettiger Fettsäuren, welche zu einer Induktion immunsuppressiver T_{reg} führen, zeigte in experimentellen Studien einen Schutz vor zum Beispiel T-Zell-Induzierter Kolitis. Weibliche Mäuse zeigten in Studien eine geringere Produktion kurzkettiger Fettsäuren [186].

T_{reg} Zellen weisen außerdem eine IL13 Produktion auf und verbessern die Barrierefunktion, indem sie die Mucinproduktion stimulieren, die Permeabilität der BHS durch Beeinflussung der Junction- Funktionalität einschränken und den IgA Transport stimulieren [178]. Bakteriell Priming von dendritischen Zellen in mesenterialen Lymphknoten führt in zuvor mit Antibiotika behandelten Mäusen zu einer Expansion lokaler T_{reg} -Zellen des Dünndarmes. T_{reg} -Zellen reduzieren IL10 abhängig die Aktivität der in der Lamina propria des Darmes ansässigen γδ-T-Zellen, die normalerweise durch IL17 Produktion und Sezernierung von Chemokinen für Neutrophile und Monozyten mit anschließender Infiltration zytotoxischer Immunzellen die Neuroinflammation nach einer ischämischen Hirnverletzung verschlimmern und eine Ausdehnung des neuronalen Todes in die Penumbra begünstigen [189]. IL17 und IL22 exprimierende Lymphozyten weisen die Fähigkeit auf, die Blut Hirn Schranke zu passieren und leisten so einen Beitrag zur Entstehung zum Beispiel der Läsionen im Rahmen der Multiplen Sklerose. Auf Grund einer Koexpression von IL17 und Granzym B kommt es ebenso zur Zytolyse von Neuronen. Die verminderte Expression von Occludin und Zonula Occludens in Zusammenhang mit einer Zunahme von IL 17 exprimierender Lymphozyten führt zu einer weniger intakten Blut Hirn Schranke [190]. IL10 aus T_{reg} -Zellen des Darmes hat demnach neuroprotektive Funktion [189]. Fehlende T_{reg}-Zell-Aktivierung führte nach experimentellem Schlaganfall zu einer erhöhten Anzahl an residenten und infiltrierenden Entzündungszellen wie Mikroglia und T-Zellen [191].

Mit Amoxicillin-Clavulansäure behandelte Mäuse mit folgender mikrobieller Dysbiose zeigten bei Benakis et al. eine reduzierte Neutrophileninfiltration in das Hirngewebe, bei erhöhter Infiltration der Hirnhäute nach induziertem ischämischen Hirnschaden,

was auf eine gezielte Darm-Hirn-Wanderung hindeutet. Die Hirnhäute scheinen als Schutzbarriere die Invasion in das Hirngewebe und damit die postischämische Entzündung zu begrenzen [189].

2.2.6.3. Das Mikrobiom

Die Gesamtheit jeglicher Mikroorganismen, welche den menschlichen Körper besiedeln, wird als Mikrobiom bezeichnet und umfasst die Gesamtheit der im Darm lebenden Bakterien einschließlich der Protozoen, Archaeen, Viren und Pilze [192]. Innerhalb des menschlichen Körpers ist das Kolon der am meisten kolonisierte Ort [193]. Das bakterielle Mikrobiom besteht hauptsächlich aus vier Arten von Bakterien: den Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteriae und Proteobacteriae [194]. Die Proteobakterien umfassen die Pseudomonaden und *Escherichia coli*, die Firmicutes die Clostridien, Laktobazillen, *Staphylococcus aureus* und Enterokokken. Actinobakterien umfassen unter anderem die Bifidobakterien [195]. Mit einer Mehrheit von bis zu über 90% des Mikrobioms sind die Bakterien entweder den Bacteroidetes oder den Firmicutes zuzuordnen [196].

2.2.6.4. Bedeutung des Mikrobioms

Seit Millionen von Jahren koexistiert das Mikrobiom im menschlichen Körper und hat seitdem eine sich immer weiter entwickelnde und voneinander abhängige Zusammenarbeit mit dem Immunsystem ausgeführt [197].

Die Wirkung des Mikrobioms auf zerebrale Prozesse scheint vielfältig zu sein. So werden Funktionen wie das Verhalten, Lernen, das Gedächtnis aber auch Auswirkungen auf die Mikrogliaaktivität und Integrität der BHS beobachtet [198].

Ein physiologisches Darmmikrobiom verfügt über vielseitige protektive Eigenschaften:

- Hilfe beim Abbau und der Aufnahme von Nährstoffen
- Reglementierung der Ausbreitung pathogener Erreger und somit Vorbeugung von Infektionen, Straffung der Epithelbarriere [199, 200]
- Verbesserung des adaptiven und angeborenen Immunsystems [200]
- Regulierung der Angiogenese [201]
- Produktion essenzieller Proteine welche nicht durch humane Gene kodiert werden [201].

Es stimuliert die Regeneration intestinaler Epithelzellen, produziert Schleim und ernährt die Mukosa durch Produktion von kurzkettigen Fettsäuren, hauptsächlich Acetat, Propionat und Butyrat [199, 202]. Durch Bildung kurzkettiger Fettsäuren, als Endprodukte der mikrobiellen Fermentation von Makronährstoffen, wie zum Beispiel Butyrat durch ein gesundes Mikrobiom, welches als Energiequelle für Epithelzellen des Dickdarmes dient und zusätzlich immunmodulierende und entzündungshemmende Eigenschaften aufweist, ist die Homöostase der Mikrobiota an der Aufrechterhaltung einer intakten Epithelbarriere des Darmes beteiligt [203, 204]. Auch Neurotransmitter wie GABA, Noradrenalin und Dopamin können durch Darmbakterien synthetisiert werden [205]. Es ließ sich zeigen, dass Serotonin, welches als Neurotransmitter im ZNS benötigt wird, zu 90% aus dem GI-Trakt stammt und an 5-Hydroxytryptophan (5-HT)-Rezeptoren an Mikroglia binden, sowie eine Zytokinfreisetzung induzieren kann und somit Einfluss auf die Neuroinflammation hat [28, 206]. Auch bei der Metabolisierung von Nahrungstryptophan als Vorstufe des Serotonins ließ sich beobachten, dass es durch Dämmung der proinflammatorischen Reaktion der Mikroglia auf Astrozyten eine entzündungshemmende Wirkung aufweist [204, 207].

Durch Ausbildung des intestinalen Lymphgewebes und ansässiger Immunzellen kommt es zur ständigen Stimulation des angeborenen Immunsystems, was zur schnellen Abwehr von Krankheitserregern notwendig ist [208, 209]. Die mukosale Barriere des Gastrointestinaltraktes (GI-Trakt) wie auch das Lymphgewebe und Immunzellen schützen den systemischen Kreislauf und auch die Darm-Hirn-Achse vor pathogenen Mikroorganismen und nahrungsmittelassoziierten Antigenen [177]. Das Mikrobiom hat hierbei Anteil an der Ausbildung des GALT. In Studien ließ sich zeigen, dass mikrobiomfreie Tiere erhebliche Defizite in der Ausbildung des GALT mit weniger und kleineren Peyer Plaques sowie mesenterialen Lymphknoten aufwiesen und anfälliger für bakterielle, virale und parasitäre Krankheitserreger sind [210]. Weiterhin besteht die teleologische Vorstellung, dass ansässige Darmbakterien Darmerkrankungen durch infektiöse Mikroorganismen aktiv zu verhindern versuchen, um den Bestand der eigenen Spezies zu stärken, woraus sich die Vermutung einer evolutionären Allianz ergibt, die zwischen Säugetieren und kommensalen Mikroorganismen besteht und ein langfristiges Überleben beider begünstigt [210].

Bacteroides fragilis hat Einfluss auf die lymphatische Organogenese und Aufrechterhaltung einer adäquaten Immunantwort. Durch Produktion von PSA (Polysaccharid A) kommt es durch Induktion IL 10 produzierender CD4⁺ T Zellen zu

einer Reduktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF α , IL17 und IL23, einer reduzierten epithelialen Hyperplasie und Neutrophileninfiltration in den Darm [211].

Durch Produktion von Metaboliten und Signalmolekülen und deren Eindringen in den systemischen Kreislauf haben Darmbakterien daher eine weitaus größere Wirkung als lediglich lokal im Darm. Sie führen zu einer Beeinflussung des gesamten Wirtes und somit auch des Zentralen Nervensystems [28]. Sie haben einen Einfluss auf die Signalübertragung durch Neurotransmitter, die synaptische Plastizität, Myelinisierung, Neurogenese und auf Mikroglia, durch zum Beispiel produzierte Faktoren wie PAMPs [28]. So wurde gezeigt, dass durch Produktion kurzkettiger Fettsäuren durch *Bifidobacterium longum* ein Schutz gegenüber einer *Escherichia coli* (*E. coli*) Infektion erfolgte. Die kurzkettigen Fettsäuren reduzierten die Apoptose intestinaler Epithelzellen, bewahrten so die Integrität des Darmepithels und reduzierten den Übertritt des Stx2-toxins in den Blutkreislauf [212]. Stationär antibiotisch behandelte Patienten zeigen Infektionen mit *Clostridium difficile*, welche leichte Diarrhoe oder auch lebensbedrohliche Erkrankungen wie das toxische Megacolon verursachen können und die Morbidität und Mortalität der Krankenhauspatienten deutlich erhöht [213]. Gesunde Menschen zeigen hingegen eine Kolonisierungsresistenz gegenüber *Clostridium difficile*, welche unter anderem dadurch begründet ist, dass das kommensale Bakterium *Clostridium scindens* durch Bildung der sekundären Gallensäuren Desoxycholsäure und Lithocholsäure zur Wachstumshemmung des *Clostridium difficile* beiträgt [214].

Es wurde beobachtet, dass eine Antibiotikabehandlung durch folgendes Überwachstum des antibiotikaresistenten Stammes des *E. coli* Bakteriums die Entwicklung einer Sepsis fördert. Durch Epithelschädigung und folgende Invasion in den körperlichen Kreislauf wird die IL β 1 Produktion durch Makrophagen induziert [215].

2.2.6.5. Dysbiose

Ursächlich für viele nichtinfektiöse Erkrankungen wie Autoimmunität, Krebs und Allergien ist eine immunologische Dysregulation, welche durch die Interaktion zwischen wirtseigenem Immunsystem und sowohl symbiotischen wie auch pathogenen Mikroorganismen beeinflusst wird. Primärer Ort einer solchen Interaktion ist der Magen Darm Trakt [210]. Durch ein Ungleichgewicht in der bakteriellen Vielfalt, auch Dysbiose genannt, kommt es zu einer gestörten Homöostase mit folgender Entzündungsreaktion und einer das Darmepithel negativ beeinflussenden

Stoffwechsellaage [194, 216]. Außerdem wird das Darmepithel durch Reduktion der Zell-Zell-Verbindung durchlässiger und eine bakterielle Translokation ermöglicht, die dann wiederum eine systemische Entzündung bedingen und Pathologien verschlimmern oder auslösen kann [217, 218]. In einem gesunden Mikrobiom lassen sich ebenfalls als „Pathobionten“ bezeichnete Arten finden, welche pathogene Wirkung haben, sofern sie in ihrer Funktion und Menge nicht durch das gesunde Mikrobiom eingeschränkt werden [215]. Eines der mit pathologischen Zuständen in Zusammenhang stehende Bakterien ist das EO21:H⁺ Escherichia coli, welches sich als vorherrschende systemische Spezies nach antibiotischer Behandlung mit Ampicillin, Vancomycin, Neomycin und Metronidazol nachweisen ließ [215].

Ein aus dem Gleichgewicht gebrachtes Darmmikrobiom, was unter anderem durch antibiotische Therapien oder durch erhöhte Spiegel von Noradrenalin induziert wird, wird derzeit bereits mit einigen pathologischen Zuständen in Verbindung gebracht [219]. So ließen sich vermehrt Infektionen, die intestinal wie auch systemisch auftreten, vor allem auch eine Besiedelung mit antibiotikaresistenten Erregern wie Vancomycin resistenten Enterokokken (VRE) und Methicillin-resistentem Staphylococcus aureus (MRSA), Autoimmunkrankheiten (entzündliche Darmerkrankungen, Diabetes), allergische Erkrankungen, Adipositas wie auch Arteriosklerose mit einem eingeschränkten Darmmikrobiom in Verbindung bringen [200]. Auch neurodegenerative Erkrankungen wie Multiple Sklerose oder Parkinson, neuropsychiatrische Pathologien wie Autismus und Angststörungen werden in Zusammenhang mit einer mikrobiellen Dysbiose gestellt [220]. Bei autistischen Kindern ließ sich im Vergleich zu gesunden Kindern vermehrt das Bakterienspezies Bakteroides im Vergleich zu den Firmicutes nachweisen und Parkinson Patienten zeigten in der Analyse des Mikrobioms vor allem proinflammatorisch wirkende Bakterien wie Roseburia, Coprococcus oder Blautia im Gegensatz zu antiinflammatorisch wirksamen Bakterien wie Faecalibakterien [221, 222]. Gramnegative Bakterien sind durch Bindung der Lipopolysaccharid (LPS)-Komponente ihrer Zellwand an TLRs in der Lage die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL6 und IL1 β durch Monozyten, Makrophagen und Mikroglia zu stimulieren [205]. Breitspektrum antibiotisch (Ampicillin, Vancomycin, Neomycin, Metronidazol) behandelte Mäuse zeigten im Experiment von Ayres et al. signifikant höhere Bakterienzahlen in der Lunge und auch der Leber [215]. Antibiotisch behandelte Mäuse zeigten außerdem nach einer Applikation von Dextransulfat-

Natrium (DSS), welches toxische Wirkung auf die Epithelzellen im Dickdarm hat, weniger eine kolitisähnliche Erkrankung sondern vielmehr systemische Reaktionen wie Hypothermie, Multiorganschäden, sowie erhöhte Serumspiegel proinflammatorischer Zytokine wie TNF α und IL6 [215]. Hayakawa et al. zeigten, dass das Darmmikrobiom einige Stunden nach pathologischen Zuständen wie Schlaganfall oder Herzstillstand bedeutend gestört wurde [223]. Eine Dysbiose des Darmes führt unter anderem zu einem Ungleichgewicht der T-Zell- Populationen, welche Th1, Th2, Th17 sowie T_{reg} Zellen beinhalten, und kann autoimmune und entzündliche Veränderungen hervorrufen [224]. In Versuchen von Singh et al hatte diese mikrobielle Dysbiose eine Translokation von peripheren Th Zellen in das Gehirn zur Folge. Proinflammatorische Zytokine wie IL2, IL12, TNF α , IFN γ , werden von Th1 Zellen sezerniert und können so Einfluss auf zerebrale Prozesse haben [225]. Singh et al zeigten, dass die Th-Zell- Infiltration eine zerebrale Entzündungsreaktion initiierte und letztlich ein erhöhtes Schlaganfallvolumen und ein schlechteres funktionelles Outcome zur Folge hatte [226].

Die durch ein SHT ausgelöste Kaskade des sekundären Hirnschadens ruft ebenso nicht nur in dem den primären Schadensgebiet umliegenden Hirngewebe eine Reaktion hervor, sondern betrifft auch periphere Organe wie den Gastrointestinaltrakt [185]. So kommt es nach einem Trauma zu Veränderungen sowohl der strukturellen als auch der funktionellen Konstitution des Epithelgewebes des Darmes. Funktionell werden die Transitzeiten im Darm auf Grund einer verminderten Kontraktilität nach SHT verlängert [13, 227]. Ein erhöhter Noradrenalin Spiegel als Ausdruck einer Stressreaktion könnte dazu beitragen und ursächlich dafür sein [219]. Hayakawa et al. zeigten, dass das Darmmikrobiom einige Stunden nach pathologischen Zuständen wie Schlaganfall oder Herzstillstand bedeutend gestört wurde [223]. Je größer die Läsion des SHT desto mehr Proteobakterien und desto weniger Bakterien des Firmicutes – Stammes ließen sich finden. Die bakterielle Diversität des Mikrobioms nahm außerdem ab [223]. Auch eine lange Hospitalisierung führt zu einer Veränderung des Mikrobioms. Durch das Wachstum von Erregern geringer Diversität kommt es zu einer erhöhten Virulenz [228]. Eine Veränderung des Mikrobioms, die auf Grund einer Erkrankung zu einer Dysbiose führt, kann zur Folge haben, dass nützliche Mikroben verloren gehen und es zu einer Expansion pathogener Bakterien wie zum Beispiel *Escherichia coli* und *Klebsiella pneumoniae* kommt [229]. Die Bakterien einer bakteriellen Pneumonie, die als häufigste Todesursache in Folge eines ischämischen

Schlaganfalles gesehen werden, stammen womöglich aus dem Darm auf Grund einer erhöhten Permeabilität [230, 231].

Bereits nach einem moderaten bis schweren SHT zeigte sich im Mausmodell ein erhöhter mukosaler Schaden mit veränderter Permeabilität des Dünndarms bis zu 72 Stunden nach Trauma. Im Colon wird durch ein SHT eine chronische Veränderung von Morphologie und Funktion vor allem am 28. Tag nach Trauma beschrieben. Diese Veränderungen korrelieren mit einer Verschlechterung der chronischen Hirnverletzung durch erhöhte intestinale Permeabilität und Endotoxinämie [16]. Eine Störung der Darmbarriere auf Grund gestörter *Tight junctions* mit folgender erhöhter Permeabilität, die auch endogene LPS nicht am Durchtritt hindert, führt auch im Gehirn zu einer Immunantwort, die durch induzierte Neuroinflammation neuropsychiatrische und neurodegenerative Krankheiten auslösen kann [232]. Hierbei korreliert das Ausmaß der LPS Freisetzung mit der Schwere der daraus folgenden neurodegenerativen Erkrankung wie zum Beispiel Morbus Parkinson [233]. Eine verstärkte Endotoxinämie und bakterielle Translokation, löst auch lokal im Darm eine Entzündungsreaktion aus. Es werden folglich vermehrt proinflammatorische Zytokine wie IL6, TNF α , NF κ B freigesetzt und die CD-40 Expression erhöht. Diese proinflammatorische Kaskade ausgelöst durch eine erhöhte Darmpermeabilität in Folge eines SHT führt wiederum auch andersherum zur Beeinflussung extragastrointestinaler Organe, einschließlich des ZNS [13]. Durch Dysbiose, freigesetzte Zytokine und DAMPs, beeinflusste Darmbarriere und gestörte BHS kommt es zu einer Migration von Entzündungs- und Immunzellen aus dem Darm in das Hirngewebe [177].

Gerade bei SHT- Patienten ist die erhöhte Labilität in Folge einer peripheren Immunsuppression gegenüber einer Infektion mit zum Beispiel E.coli eine Zusatzbelastung. Systemische Entzündungen mit Einbezug von Darm, Lunge, Leber und Hirn können die Folge sein, wodurch die Mortalität gesteigert wird [177]. Die Wichtigkeit eines ausgeglichenen Mikrobioms zeigt sich immer wieder, denn Störungen der Homöostase des Darmmikrobioms, die sich nach Verletzungen wie Trauma, Verbrennungen oder Herzstillstand zeigen, sind prädiktiv für die Mortalität, zum Beispiel in Folge einer Sepsis [14].

2.2.6.6. Gabe von Antibiotika und Probiotika im Rahmen eines SHT

Antibiotika haben bekanntlich vielfältige Wirkung, wie die gewollte Bekämpfung pathogener bakterieller Spezies, aber auch negative Auswirkungen wie die

Beeinträchtigung des Mikrobiomes, Förderung der Ausbildung antibiotischer Resistenzen, Förderung eines Überwachstumes anderer pathogener Bakterien, oder Ausbildung bestimmter Krankheitsbilder wie der pseudomembranösen Colitis oder Diarrhoe.

Eine Depletion der physiologischen gesunden Darmflora kann weitreichende Effekte haben. Bereits durch kurzfristige Antibiotikagabe wird die durch LPS induzierte Expression von Reg3-g, einem bakteriziden Lektin, in Darmepithelzellen und Paneth Zellen reduziert. Mäuse sind folglich anfällig für eine Infektion mit Vancomycin resistenten Enterokokken [234]. Eine antibiotische Behandlung führt zu einer Beeinträchtigung des als Kolonisierungsresistenz bezeichneten Schutzes vor Krankheitserregern durch Mikrobiota [235]. Die Kommensalgemeinschaft des Darmes wird geschwächt, die Dicke der protektiven Schleimschicht reduziert und die Expression antimikrobieller Peptide vermindert, sodass Infektionen begünstigt werden [200]. Winek et al zeigten, dass eine Depletion der bakteriellen Flora durch Breitspektrumantibiotika vor einem ischämischen Schlaganfall zu einem schlechteren Outcome führte [236].

Es ließ sich außerdem beobachten, dass sich Mikroglia von Mäusen, die mit Antibiotika zur Dezimierung des Darmmikrobioms behandelt worden sind, wenig in ihrer Dichte aber vielmehr in ihrer morphologischen Ausrichtung ändern. Es sind nach antibiotischer Behandlung vielmehr unreife Mikroglia vorhanden. Mikroglia scheinen auch im Erwachsenenalter empfindlich zu sein für Änderungen in der Konstitution des mikrobiellen Darmmilieus [28]. Bei zuvor mit Antibiotika behandelten Mäusen war die Migration von dendritischen Zellen und IL1 β /IL18 Produktion beeinflusst und die Immunglobulinspiegel, T-Zellzahl und IFN γ Produktion reduziert, sodass erhöhte Virustiter einer folgenden Influenzainfektion resultierten [237]. Auch die Milzmakrophagen scheinen nach erfolgter antibiotischer Therapie beeinträchtigt. Es zeigte sich eine verminderte Aktivierung natürlicher Killerzellen durch sie [238]. Weiterhin werden durch kommensale Mikroben ausgesandte Signale, welche eine reduzierte Aktivität mononukleärer Phagozyten zur Folge haben, durch antibiotische Behandlung reduziert. Bakterielle Antigene werden nun vermehrt zu den mesenterischen Lymphknoten (MLN, engl.: *mesenteric lymph nodes*) transportiert und eine adaptive Immunantwort gegen luminale Antigene ausgelöst [239].

Lim et al zeigten jedoch auch, dass sich nach Gabe von Ceftriaxon, einem Antibiotikum aus der dritten Gruppe der Cephalosporine, einige neuroprotektive Effekte zeigten, die

sich unabhängig der antibakteriellen Wirkung ergaben. Ceftriaxon führte zum Beispiel zu einer verminderten Mikroglia-Aktivierung, TNF α Expression durch Mikroglia und einem Anstieg der Expression des periläsionalen Glutamat1- Transporters (GLT1) in Neuronen und Mikroglia [240]. Die Glutamatexzitotoxizität zeichnet sich durch einen übermäßigen Einstrom von Ca²⁺ im postsynaptischen Neuron mit folgender Calpain und Caspase-Aktivierung aus, welche letztendlich die Apoptose nach sich ziehen [241, 242]. Die vermehrte Expression dieses Transporters führte im Experiment zu einer verminderten Konzentration von Glutamat im synaptischen Spalt und extrasynaptisch. Es folgte eine verringerte Expression der neurodestruktiven Untereinheit des extrasynaptischen NMDA 2B- Rezeptors und letztendlich eine geringer ausgeprägte neuronale Apoptose sowie verbesserte motorische Defizite und funktionelle Ergebnisse im Vergleich zu den Vehikel-CCI (kontrolliertes experimentelles Schädelhirntrauma; engl.: *controlled cortical impact*) - Tieren [240]. Auch andere Studien zeigten, dass die Gabe von Ceftriaxon, wie auch Ampicillin, beides beta-Lactam Antibiotika, oder auch Cefazolin, der Glutamat-induzierten Exzitotoxizität entgegen wirkten [101, 243–245]. Eine Behandlung mit Amoxicillin zeigte jedoch auch neurotoxische Wirkung. So führte es im Mausversuch zu oxidativem Stress und war mit der Ausbildung eines depressiven Verhaltens und einer Reduktion der Krampfschwelle in juvenilen Ratten verbunden [246].

Weiterhin kann auch die Gabe von Probiotika positive Effekte zeigen. Sun et al. kamen zu dem Ergebnis, dass eine Gabe von Probiotika neuroprotektive Wirkung zeigt und zu weniger neuropsychiatrischen Symptomen in Folge eines ischämischen Schlaganfalles auf Grund verminderter Expression von Caspase-3 und Bax und somit antiapoptotischer Wirkung, führt [247]. Probiotika scheinen die Darmpermeabilität auf Grund einer Straffung der *Gap junctions* zu mindern, die IgA und IgG Konzentration zu erhöhen und den LPS Spiegel zu senken [248–250]. Ait-Belgnaoui et al. zeigten in ihrem Maus-Experiment, dass eine zwei-wöchige Einnahme von Probiotika zu einem verminderten Spiegel von adrenocortikotropem Hormon (ACTH) und Kortikosteron als Folge von Stress führte [251]. Vor allem *Lactobacillus farmicis* verhindert die stressinduziert erhöhte Permeabilität des Darmes und vermindert die LPS Translokation und zentrale Zytokinproduktion [251]. Weitere mit neuroprotektiver Wirkung in Zusammenhang gebrachte Probiotika sind das *Clostridium butyricum* sowie *Lactobacillus acidophilus* [247, 252]. Zusammen mit obligaten Anaerobiern wie zum Beispiel *Bifidobacterium*, tragen sie maßgeblich zur Resistenz gegen eine Besiedelung

mit und Invasion von pathogenen Keimen in die Darmepithelzellen durch Hemmung der Anhaftung pathogener Bakterien und Induktion einer erhöhten Muzinproduktion bei. Es folgt eine Wachstumshemmung potenziell pathogener Mikroorganismen, auch durch die Sekretion von Bacteriocinen - antimikrobiellen Substanzen-, die Aufrechterhaltung der Barrierefunktion der Darmmukosa, sowie auch die Beeinflussung der systemischen wie auch lokalen Immunfunktionen [250]. Es könnte demnach sinnvoll sein, Probiotika im Rahmen eines SHT zu verabreichen. Sogar eine frühzeitige enterale Ernährung nach Trauma mit Glutamin, Arginin, Nukleotiden und Omega 3- Fettsäuren, die die Immunzellen stimulieren und die Barrierefunktion des Darmes unterstützen, hat positive Effekte auf das Outcome gezeigt [253].

2.2.7. Geschlechtsspezifische Unterschiede nach SHT

Tierversuchsstudien und auch klinische Studien zeigen immer wieder, dass es unterschiedliche Reaktionen auf bestimmte Ereignisse in Abhängigkeit des Geschlechtes gibt [254, 255]. Es gibt die Annahme, dass weibliche Sexualhormone auf Grund einer geringeren Komplikations- und Komorbiditätsrate bei weiblichen Mäusen nach SHT, eine neuroprotektive Wirkung haben können [18]. Östrogen wird mit einer erhöhten GLT-1- Expression in Verbindung gebracht [256]. So ließ sich unter anderem ein verminderter Hirnschaden nach experimentellem SHT bei männlichen Mäusen zeigen, sofern sie intraperitoneal den Östradiol Metaboliten 2-Methoxyestradiol verabreicht bekamen [257]. Neurologisches Verhalten sowie auch die kognitive Funktion differiert jedoch auch nach verschiedenen Formen einer Verletzung des ZNS in Abhängigkeit des Geschlechtes. So zeigten einige Studien zum Beispiel ein besseres Outcome von weiblichen Versuchstieren gegenüber männlichen nach SHT [255]. Die weiblichen Tiere wiesen eine bessere Integrität der Blut-Hirn-Schranke, einen besseren kortikalen Blutfluss, weniger sensomotorische Defizite, weniger Hirnödem und geringere Kontusionsvolumina als gleichaltrige männliche Tiere nach CCI auf [258–261]. Waren die Weibchen zudem scheinträchtig und wiesen somit einen höheren Progesteron und Östrogen Spiegel auf, ließ sich ein noch kleineres durch SHT bedingtes Ödem messen, was auf eine neuroprotektive Wirkung der weiblichen Geschlechtshormone hinweisen kann [255, 258, 262]. Eine weitere klinische Studie bestätigte diese Hypothese, indem sie zeigte, dass postpubertäre Mädchen eine geringere Mortalität nach mittelschweren bis schweren SHT aufweisen als gleichaltrige Jungen [263]. Kirkness et al. beobachteten eine unterschiedliche Mortalität zwischen männlichen und

weiblichen Versuchstieren trotz ähnlichem zerebralen Perfusionsdruck und intrakraniell Druck [264]. Bemerkenswerterweise zeigten Tucker et al., dass unterschiedliche Verhaltensweisen weiblicher Versuchstiere zu beobachten waren, beispielsweise in Form einer besseren Gehfähigkeit und weniger ausgeprägtem ängstlichem Verhalten, obwohl sie keinen Unterschied im Läsionsvolumen im Vergleich zu den männlichen Versuchsmäusen fanden [265, 266].

Im Bezug auf eine Darm Hirn Achse hat sich gezeigt, dass sowohl das Darmmikrobiom durch Östrogen, als auch andersherum beeinflusst wird [267]. Durch Sekretion von β -Glucuronidase durch das Mikrobiom, wird Östrogen dekonjugiert. Östrogen kann nun an ein von der Leber produziert Glykoprotein, das Sexualhormon- bindende Globulin (SHBG) binden, oder als freies ungebundenes Östrogen biologisch aktiv sein. Weibliche Mäuse wiesen in Experimenten ein gegenüber Verletzungen widerstandsfähigeres Darmepithel als männliche Mäuse auf [268]. Auch wurde gezeigt, dass Östrogen neuronales Wachstum durch Mikrotubuli-stabilisierende Faktoren, die Tau Proteine, stimuliert [269]. Bereits pränatal lässt sich ein Einfluss der Konstitution des Mikrobioms auf die Funktion der Mikroglia erkennen [111].

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Verbrauchsmaterialien

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

3.1.2. Geräte

Gerät	Hersteller/Vertrieb
Gefrierschränke	-20° C: ProfiLine, Liebherr; Ochsenhausen, DE
	-40° C, UPUL 540, Liebherr; Ochsenhausen, DE
	-80° C, Heraeus Sepatech; Osterode, DE
Gestell für Käfige	Ebeco; Castrop-Rauxel, DE
Isofluran (Forene) Verdampfer	Abbott Drägerwerk, Lübeck, DE
Inkubator	IC 8000, Dräger; Lübeck, DE
Kryostat	Microm HM 560 Cryo-Star, Thermo Fisher Scientific; Walldorf, DE
Lasermikroskop LSM 5 Exciter	Zeiss, Jena, DE
Laser Doppler System	Peri Flux 4001 Master, Perimed; Järfälla, SE
Lochzange	Lochzange für Ohrmarkierung, Ebeco; Castrop-Rauxel, DE
Mikroskop	Zeiss, Jena DE
Mikroskopie Kamera Axio Cam 105	Zeiss, Jena DE
Magnetrührer	Ikamag RH, Janke und Kunkel; Staufen, DE
Mikropipetten	Reference, Research, Eppendorf; Hamburg, DE
Gewebehomogenisator Mastermill MM 300	Retsch, Haan, DE
OP-Mikroskop	Technoskop OPMI 1-FC, Zeiss Meditec; Jena, DE
pH-Meter	CG 832, Schott; Mainz, DE
Rotarod	Hugo Sachs; March-Hugstetten, DE
Stereotaxierahmen	Kopf Instruments; Tujunga, USA
Taumler	Rotamax 120, Heidolph; Schwabach, DE
Temperatursonde	TCAT-2DF Controller, Physiotemp; New Jersey, USA
	TCAT-2LV Controller, Physiotemp; New Jersey, USA
CCI Impactor	Leica, Nußloch, DE
Vapor	Vapor 2000, Dräger; Lübeck, DE
Vortex Reax control	Heidolph, Hamburg, DE
Waagen	Sartorius research, Sartorius; Göttingen, DE
	Sartorius laboratory, Sartorius; Göttingen, DE
	CS-series, Ohaus; Kirchheim, DE

Wärmematte	Homeothermic Blanket, Hugo Sachs; March-Hugstetten, DE
	1086, GFL-Gesellschaft für Labortechnik; Burgwedel, DE
Zentrifugen	Rotanta/RP, Hettich; Tuttlingen, DE
Zentrifuge Eppendorf 5804 R	Eppendorf, Hamburg, DE
Infrarot Laser Imaging - Odyssey 9260	Li-Cor Biosciences, Bad Homburg, DE
Photometer NanoVue System	GE Healthcare, DE
Rota-Rod RS232/LE8200	Hugo Sachs; March-Hugstetten, DE
Stickstoffbehälter	

3.1.3. Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Aqua destillata	Braun; Melsungen, DE
Bovines Serum Albumin (BSA)	Roth, Karlsruhe, DE
Chloroform	Sigma, St. Louis, MO, USA
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Sigma, St. Louis, MO, USA
DMSO (Dimethyl Sulfoxid)	Dimethyl sulfoxide, Sigma-Aldrich; München, DE
Ethanol absolut	AppliChem; Darmstadt, DE
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetische Säure Sigma-Aldrich; München, DE
Einbettmedium	NEG 50, Richard Allan Scientific, Thermo scientific; Dreieich, DE,
Eindeckmedium	Immuno Mount Shandon, Thermo Electron; Karlsruhe, DE
	Roti-Histokitt, Roth; Karlsruhe, DE
Flüssigstickstoff	Air Liquide; Düsseldorf, DE
Histoacryl, Gewebekleber	Braun, Melsungen
Glycerol	Sigma-Aldrich; München, DE
Isopropanol	Roth; Karlsruhe, DE
Kresylviolett	Merck; Darmstadt, DE
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich; München, DE
Mayers Hämaunlösung	VWR; Darmstadt, DE
Magermilch (MM)	Roth, Karlsruhe
NaCl	ACS, ISO, Roth; Karlsruhe, DE

Natronlauge 10M	Sigma-Aldrich; Steinheim, DE
Normal Goat Serum (NGS)	Dako, Hamburg
Paraformaldehyd (PFA)	Merck; Darmstadt, DE
PBS Dulbecco Trockensubstanz	Biochrom; Berlin, DE
Protease Inhibitor	Roche, Molecular Biochemicals, Mannheim
Roti-Histol	Roth; Karlsruhe, DE
Tissue Tek	O.C.T Compound, Miles; Elkhart, USA
Triton X-100	Sigma-Aldrich; Steinheim, DE
Salzsäure (1 N)	Merck; Darmstadt, DE
Stickstoff, flüssig	Air Liquide, Düsseldorf, DE

3.1.4. Arzneimittel

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

3.1.5. Lösungen und Puffer

Substanz	Inhaltsstoffe
5% BSA (Bovines Serum Albumin) Lösung	5g (w/v) in 100 mL TBST (Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan gepufferte Salzlösung)
5% Magermilch Lösung	5g (w/v) in 100 mL TBST
Blockierlösung IHC	1% BSA, 5% NGS in PBST
Kresyllösung	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

Transferpuffer (TankBlot)	Tris HCL 25 ml (ph 8,3) Glycin 14,4 g Methanol 200 ml, H2O bis 1000 ml auffüllen
---------------------------	---

3.1.6. Antikörper

3.1.6.1. Primäre Antikörper

Antikörper	Bezeichnung	Spezies	Verdünnung	Hersteller
anti- GFAP	13-0300	Ratte	1:1500	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
anti- Iba1	019-19741	Kaninchen	1:1000	Fujifilm WAKO Pure Chemical Corporation, Japan
Anti-Spectrin	BML FG6090	Maus	1:750	Enzo Life Sciences
Anti-GFAP	ZO 33401-2	Kaninchen	1:1000	DAKO
Anti-GAPDH	ACR 001PS	Maus	1:10.000	Acris Antibody

3.1.6.2. Sekundäre Antikörper

Antikörper	Bezeichnung	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Sek Anti-Kaninchen IgG	IRDye 680LT	Kaninchen	1:15000	Li-Cor, Nebraska, USA
Sek Anti-Maus IgG	IRDye 680RD	Maus	1:15000	Li-Cor, Nebraska, USA
Sek Anti Kaninchen	Alexa Fluor 488 A- 11034	Kaninchen	1:500	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Sek Anti Ratte	Alexa Fluor 568 A- 11077	Ratte	1:500	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

3.1.7. Primer

Target	Basenabfolge 5' nach 3'	Amplikonlänge	Gen-Bank Nummer
Ppia Forward	GCGTCTSCTTCGAGCTGTT	19	NM008907
Ppia Reverse	RAAGTCACCCTGGCA	15	
GFAP-Forward	CGGAGACGCATCACCTCTG	19	NM001131020
GFAP-Reverse	TGGAGGAGTCATTTCGAGACA A	21	
mu IL 1b 670	Cy5-CAG CTG GAG AGT GTG GAT CCC AAG C--PH	25	NM008361
mu IL 1b FL	TAA TGA AAG ACG GCA CAC CCA CCC-FL	24	
mu IL 1b A	CAGGAAGACAGGCTTGTGCT C	21	NM008361
mu IL 1b S	GTGCTGTCGGACCCATATGA G	21	
Tspo-Forward	GCCTACTTTGTACGTGGCGA G	21	NM009775
Tspo-Reverse	CCTCCCAGCTCTTTCCAGAC	20	
IFN γ Forward	GCT CTG AGA CAA TGA ACG CT	20	NM008337
IFN γ Reverse	AAA GAG ATA ATC TGG CTC TGC	21	
MHC2-Forward	CCGCCTAGACAAGCTGACC	19	NM001042605
MHC2-Reverse	AACAGGTTTGGCAGATTTTCG GA	22	

3.1.8. Kits

Kit	Hersteller
Absolute Blue qPCR SybrgreenMix AB-4166	Thermo Scientific
Light Cycler 480 Probes Master 04887301001	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, DE
QuantiTec Reverse Transkription Kit	Qiagen, Hilden, DE
RNeasy Plus Universal Kit	Qiagen, Hilden, DE

3.1.9. Software

Software	Hersteller
GraphPad Prism 9.4.1 für Windows	GraphPad Software, Inc., Boston, Massachusetts, USA
Zen 2 (blue edition)	Zeiss, Jena, DE
Zen 2008, Version 5.0	Zeiss, Jena, DE
ImageJ	NIH Image

4. Methoden

4.1. Studiendesign, Randomisierung und Verblindung der Experimentatoren

Der folgend beschriebene Tierversuch ist durch das Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz nach Stellung des Tierversuchsantrages mit dem Kennzeichen 23 177-07/G 15-1—059 E1 am 06.02.2018 genehmigt worden.

Das Experiment wurde mit 40 adulten weiblichen Mäusen des genetischen Wildtyps C57/Bl6-N durchgeführt (Labor Janvier). Die 40 weiblichen Mäuse wurden in zwei Gruppen verblindet randomisiert. 20 Tiere erhielten eine prä- und postoperative antibiotische-und antimykotische Therapie (AB) beginnend zwei Wochen vor der Operation bis zur Euthanasie 72 Stunden postoperativ, wohingegen die restlichen 20 Tiere als Kontrollgruppe reines Trinkwasser ohne Antibiotika und Antimykotikum erhielten (Veh). Aus beiden Gruppen (AB und Veh) wurden wiederum jeweils zwei Gruppen randomisiert. 24 Tiere erhielten einen operativ gesetzten kontrollierten Hirnschaden (CCI) und 16 Tiere dienten als Kontrollgruppe. Die Kontrollgruppe wurde einem scheinoperativen Eingriff (Sham) unterzogen, der sich dadurch auszeichnete, dass die operativen Abläufe denen der CCI-Gruppe identisch waren, mit dem Unterschied, dass bei der sham-Gruppe keine Kraniotomie erfolgte und kein Hirnschaden mittels Impaktor gesetzt wurde. Alle Tiere überlebten nach dem operativen Eingriff weitere 72 Stunden.

Die Experimentatoren, unter denen einer die Antibiotika und Trinkwassergabe durchführte, die neurologischen Scores erhob und die Bearbeitung der Gewebepräparate vollzog und der andere die operative Schein oder CCI- Behandlung durchführte, waren während der Versuche allzeit bezüglich der Behandlungsgruppen verblindet.

4.2. Haltung der Versuchstiere

Zur Haltung der Versuchstiere wurden Typ 2 Filtertop Käfige genutzt, welche eine Grundfläche von 350 cm² aufwiesen. Die zuvor teilweise mittels Ohrlochung markierten, weiblichen Mäuse wurden zu zweit oder dritt in jene Käfige gesetzt, welche mit entkeimten Holzspänen als Unterlage befüllt worden sind. Jeder Käfig verfügte über einen Einsatz, welcher mit jeweils einer dauerhaft süßwassergefüllten Trinkflasche und getrockneten Futterpellets (Standard Versuchstieralleinfutter) versehen worden ist. Die Umgebungstemperatur betrug konstant 21-22 Grad Celcius (°C), die Luftfeuchtigkeit 55-65%. Die künstliche Beleuchtung des Raumes in dem die Tiere gehalten wurden, sorgte für eine konstante 12/12- Stunden Tag-Nacht-Rhythmik. Wöchentlich erfolgte eine Reinigung der Käfige. Täglich erfolgte eine Beurteilung des Allgemeinzustandes, der Kotbeschaffenheit, des Gewichtes und des Verhaltens jeder Maus. Hätten sich Auffälligkeiten ergeben, ist jederzeit eine veterinärmedizinische Versorgung möglich gewesen, zeigte sich in dieser Versuchsreihe jedoch als nicht erforderlich.

4.3. Antibiotika- Gabe

Für die folgende Antibiotika Gabe galt die Annahme, dass eine Maus täglich 5 mL Flüssigkeit zu sich genommen hat. Täglich wurde jede Flasche eines Käfigs neu mit einem Volumen von insgesamt 100 mL Flüssigkeit befüllt. Es wurde zur Herstellung der Suspensionen Leitungswasser als Trägermedium genutzt.

Für die Mäuse, welche für eine Antibiotika Gabe randomisiert worden sind, bestanden die gegebenen Medikamente aus:

- Amoxicillin- Clavulansäure (Amoxicillin-ratiopharm® comp. 125 TS)
200mg/Kilogramm (kg) Körpergewicht. Es wurden 5 mg für 25 g Maus/ Tag gegeben. Demnach sind 5mg/5mL nötig gewesen. 3,2 mL Suspension entsprechen 100mg auf 100 mL Wasser
- Vancomycin (Vancomycin CP 500mg)
100 mg/kg Körpergewicht. Es sind 2,5 mg für eine 25 g Maus pro Tag gegeben worden, sodass 2,5 mg/ 5 mL nötig waren. 1 mL Suspension entsprechen 50 mg auf 100 mL Wasser
- Nystatin (Nystaderm®- S)
200.000 IU/ kg Körpergewicht. 5.000 IU sind für eine 25 g Maus pro Tag vorgesehen, sodass 5.000 IU auf 5 mL nötig waren. 1 mL Suspension entsprechen 100.000 IU auf 100 mL Wasser

Die Herstellerangaben sind zur Herstellung der Suspension sowie bezüglich der Lagerung und Haltbarkeit befolgt worden.

Sofern eine Antibiotika Gabe vorgesehen war, wurde jene 14 Tage vor der Operation begonnen und täglich neu angesetzt. Die Antibiotikagabe ist bis zum Tag der Euthanasie, welche 72 Stunden nach der Operation stattfand, durchgeführt worden.

Jeder Käfig erhielt täglich neues Trinkwasser, je nach Protokoll mit oder ohne Antibiotika/ Antimykotikum. An vier Käfigen, davon zwei, die lediglich die Vehikel Lösung Wasser erhielten und zwei mit Antibiotika/Antimykotikum- Suspension, wurde täglich die getrunzene Wassermenge gemessen und dokumentiert, um das Trinkverhalten der Tiere einschätzen zu können.

4.4. Präoperative Vorbereitung

4.4.1. Allgemeinstatus

Vor der Operationseinleitung ist jedes Tier auf mögliche Kontraindikationen für eine Operation untersucht und gewogen worden. Kein Tier musste auf Grund physischer Einschränkungen oder Verhaltensauffälligkeiten von der Studie ausgeschlossen werden.

4.4.2. Neuroscore (Neurologischer Defizit Score, NDS)

Der Neuroscore ist für jede Maus einen Tag präoperativ durchgeführt worden. Zusätzlich wurde ebenfalls einen Tag postoperativ und am dritten postoperativen Tag der Neuroscore für jede Maus bestimmt.

Das Neuroscore Protokoll gliederte sich in sechs Kategorien:

- Fliehen aus dem Kreis
- Akustische Reflexe
- Allgemeines Verhalten
- Koordination
- Balance
- Motorisches Defizit

In der Kategorie „Fliehen aus dem Kreis“ ist die Maus in die Mitte eines aufgezeichneten Kreises mit 23,5 cm Durchmesser gesetzt worden und die Zeit gemessen worden, die sie benötigte um die Kreislinie nach Außen mit beiden Vorderbeinen zu übertreten. Hierbei wurden die Punkte je nach Zeitintervall gegeben. Unter 30 Sekunden ist kein Punkt vergeben worden, bei einer Zeit von 30-60 Sekunden ein Punkt, für 61-119 Sekunden 2 Punkte und für über 120 Sekunden drei Punkte. Je schneller die Maus demnach aus dem Kreis floh, desto weniger Punkte erhielt sie.

Die Reflexe wurden durch Schnipsen mit den Fingern circa 20 cm oberhalb der Maus geprüft. Zuckte sie daraufhin zusammen oder lief davon, erhielt sie keinen Punkt. Bei nicht nachweisbaren Reflexen erhielt die Maus für diesen Durchgang einen Punkt.

In Bezug auf das allgemeine Verhalten ist beurteilt worden ob die Maus ein für die Art typisches Such und Erkundungsverhalten zeigte. War das Suchverhalten erkennbar, erhielt die Maus keinen Punkt, bei fehlendem Suchverhalten erhielt sie einen Punkt.

Außerdem erhielt sie für die Fähigkeit, geradeaus zu laufen keinen Punkt, sofern sie dies nicht konnte, erhielt sie einen Punkt.

Die Koordination wurde beim Laufen über einen Holzstab von 50 cm Länge und verschiedener Breite beurteilt. Begonnen wird mit einem Holzstab mit einer Breite von drei Zentimetern. Danach folgte ein Holzstab mit der Breite von 1,5 Zentimetern und abschließend ein Holzstab von einem Zentimeter Breite. Jeder Holzstab ist in einer Höhe von 20 cm über dem Boden platziert worden

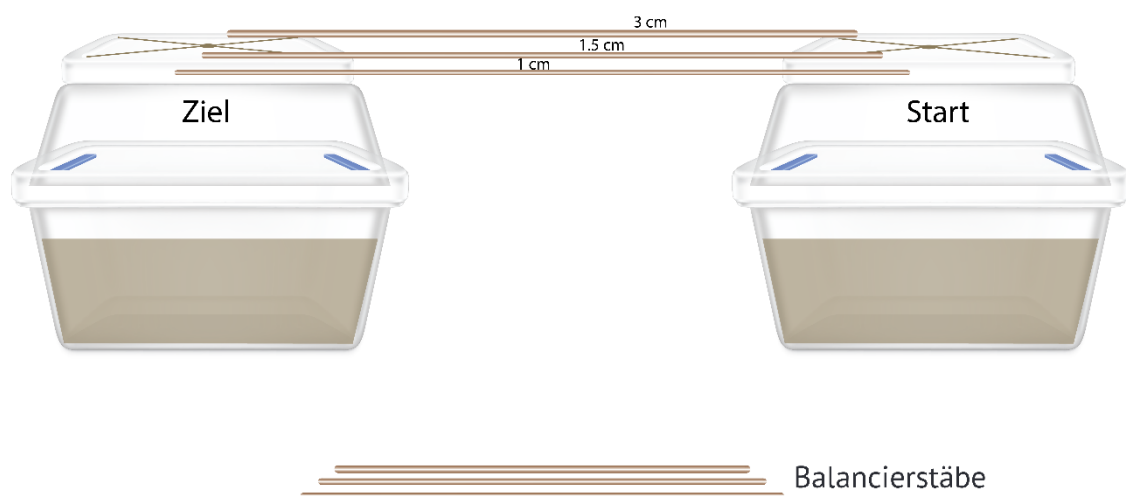


Abbildung 6 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus „Koordination“

Es ist nun beobachtet worden, wie die Maus von rechts nach links über den frei hängenden Holzstab lief. Lief sie ohne Fehler und Herunterfallen über den Stab, erhielt sie hierfür keinen Punkt. Lief sie mit Fehlern, die darin bestanden, dass ein Fuß nicht den Halt am Holz fand, die Maus in die Luft nach unten trat, oder insgesamt ein unsicheres Verhalten zeigte, erhielt sie einen Punkt. Zwei Punkte wurden vergeben, sobald die Maus sich hinsetzte, einstellte sich zu bewegen, oder sogar herunterfiel.

Die Balance wurde beurteilt, indem die Maus auf einen frei gehaltenen Holzstab von jeweils 0,5 cm Durchmesser und 40 cm Länge gesetzt wurde, an dem sie sich entweder erfolgreich festhalten konnte oder herunterfiel. Hierbei wird mit einem quadratischen Holzstab begonnen, der dann von einem runden gefolgt wird. Es wurde

nun untersucht, ob die Maus sich mit allen Vieren für zehn Sekunden an dem Stab halten konnte. Sofern dies erfolgreich war, erhielt sie keinen Punkt.

Ein motorisches Defizit wurde beurteilt, indem nach einer Parese Ausschau gehalten wurde. War jene nicht vorhanden, erhielt die Maus keinen Punkt. Sofern ein Fuß paretisch war, wurde ein Punkt vergeben. Sobald eine Hemiparese sichtbar war, erhielt die Maus in dieser Kategorie zwei Punkte.

4.4.3. Rotarod

Das Rotarod ist ein Gerät bestehend aus einem motorisierten, drehbaren, drei Zentimeter durchmessenden Balken, welcher durch fünf „Laufkammern“ zieht. Der drehbare Balken kann individuell auf 4- bis 40 Umdrehungen pro Minute gestellt werden. Eine Maus wurde in eine Kammer, auf den gummierten, gerippten Balken gesetzt. Sobald sie herunterfiel, wurde eine Bodenplatte, welche vor Testbeginn hochgeklappt worden ist, durch das Gewicht der heruntergefallenen Maus nach unten gedrückt und eine Stoppuhr gestoppt. Die erreichte Zeit bis zum Herunterfallen einer Maus von dem rotierenden Balken wurde notiert.

Jede Maus erhielt präoperativ insgesamt vier Trainingseinheiten auf dem Rotarod. Davon wurden jeweils zwei Trainings direkt hintereinander absolviert. Nach einigen Stunden Pause nach dem ersten Trainingsdurchlauf erfolgten die weiteren zwei direkt aufeinander folgenden Trainingseinheiten. Der Ablauf ist folgend dargestellt.

Die Maus wurde zur Gewöhnung auf den Zylinder gesetzt. Sofern sie stabil erschien und zumindest etwas Zeit auf dem Zylinder ohne Hilfe sitzen konnte, wurde die Rotation gestartet und dabei die Zeit bis zum Herunterfallen gemessen. Danach wurde die Maus direkt erneut auf dem Zylinder platziert und ebenfalls die Rotation gestartet. Die nun hier gemessene Zeit bis zum Herunterfallen entspricht Zeit 1.2. Nach Herunterfallen wird die Maus in ihren Käfig zurückgesetzt. Nachdem alle Mäuse Training eins und zwei durchlaufen haben, wurde mit dem Training drei und vier für Maus 1 begonnen. Dieses wurde für Maus eins bis vierzig fortgeführt nach gleichem Schema wie zuvor. Einen Tag präoperativ ist erneut zweimal die Zeit auf dem Rotarod für jede Maus bestimmt worden. Postoperativ wurden zusätzlich jeweils in zwei Versuchseinheiten einen Tag postoperativ und an Tag drei postoperativ die Rotarod Zeit für jede Maus gemessen.

4.4.4. Kotprobenentnahme

Die Kotprobenentnahme erfolgte sowohl präoperativ jeweils während des Neuroscores und des Rotarods als auch am dritten postoperativen Tag am Tag der Euthanasie. Käfigweise sind die Kotproben gesammelt und vom Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universitätsmedizin Mainz mikrobiologisch ausgewertet worden.

4.5. Operation

Es wurden jeweils 20 Tiere an zwei aufeinanderfolgenden Tagen operiert. Die Mäuse wurden auch bezüglich der Ausschlusskriterien während des gesamten Experimentes beobachtet. Dazu gehörten: ausgeprägter Gewichtsverlust von >15g mit auffälligem neurologischen Verhalten wie eingestellte oder ausgeprägt verminderte Bewegung, Krämpfe, Benommenheit und Zähneknirschen, was auf Stress sowie Schmerzen hingewiesen hätte. Bis zum Ende der Studie überlebten alle Tiere. Kein Tier musste vor Studienende auf Grund gesundheitlicher oder behavioreller Auffälligkeiten ausgeschlossen werden

4.5.1. Anästhesie

Die Maus ist für die Operation auf einer konstant auf 37°C gewärmten Wärmematte gelagert und die Körpertemperatur mittels rektaler Temperatursonde überwacht worden. Um das Austrocknen der Augen zu verhindern wurde das geöffnete Auge mit Bepanthen-Augensalbe bedeckt. Es wurde eine Inhalationsnarkose unter Aufrechterhaltung der Spontanatmung durchgeführt. Die Narkoseeinleitung erfolgte mittels Inhalation von Sauerstoff mit beigemischtem Inhalationsanästhetikum Isofluran in vierprozentiger Konzentration (4%) durch einen der Maus für eine Minute vorgehaltenen Trichter. Während der Operation atmete die Maus spontan, wobei die Narkose mit 2-prozentigem Isofluran (2%), einem Frischluft-Flow von 0,5 Litern pro Min (l/min) und 1,0 l/min Sauerstoff aufrechterhalten wurde. Die Narkosetiefe galt als ausreichend, sofern sich ein Erlöschen des Zwischenzehenreflexes der hinteren Gliedmaße zeigte. Dies ist regelmäßig überprüft worden. Zur sicheren Fixierung der Maus während des weiteren Procedere wurde der Kopf der Maus in einen stereotaktischen Rahmen eingespannt.

4.5.2. Controlled cortical impact (CCI)

Sobald eine ausreichende Narkosetiefe vorlag, wurde die Maus in Bauchlage auf dem Operationstisch gelagert. Ihr Kopf wurde dabei in einem stereotaktischen Rahmen mit auf einem Beißkeil gesicherten Zähnen des Oberkiefers fixiert. Die Augen wurden wie oben beschrieben mit Salbe benetzt. Auch das Operationsgebiet am Schädel wurde vorsorglich zur besseren Separation der Behaarung und für eine bessere Wundversorgung mit Salbe versehen. Vor Eröffnung der Schädelkalotte wurde die Kopfhaut für circa 10 mm median von der vorderen (Bregma) zur hinteren (Lambda) koronaren Schädelnaht mit einer Schere inzisiert. Die Eröffnung der Schädelkalotte in Form eines 4mmx4mm großen, rechteckigen Fensters erfolgte nun rechts paramedian mittels Handbohrer unter Erhalt der Dura mater. Das Periostfragment wurde mit Hilfe eines Wattestäbchens mobilisiert. Auf das nun frei liegende Gehirn der Maus wurde ein pneumatischer Kolben im rechten Winkel zum Hirngewebe positioniert. Durch Knopfdruck durch den Operateur ist nach festgelegten Parametern ein Kolben auf die freigelegte intakte Dura fallengelassen und somit ein vergleichbarer fokaler Schaden des darunter liegenden Cortex bei jedem CCI-Versuchstier verursacht worden. Die voreingestellten Parameter lauteten hierbei:

Kolbenspitzendurchmesser:	3mm
Aufprallgeschwindigkeit:	6m/s
Eindringtiefe:	1,5mm
Kontaktzeit:	200ms

Nach gesetztem Schaden wurde der Kolben entfernt und die körpereigene Blutstillung abgewartet. Das zuvor mobilisierte Periostfragment wurde wieder reponiert und mit Gewebekleber fixiert. Hierbei wurde darauf geachtet, zum einen nicht allzu lange abzuwarten, da durch den Schaden eine zunehmende Schwellung und Einblutung des geschädigten und auch umliegenden Gewebes eine Reposition des Knochenfragmentes erschweren kann oder zur Einklemmung von Gewebe führen kann, und zum anderen, dass keine Gewebsteile wie zum Beispiel Haare die Wunde kontaminieren. Der chirurgische Eingriff wurde mit dem Hautverschluss in Form einer Einzelknopfnahm beendet. Auf eine Analgetika-Gabe wurde verzichtet.

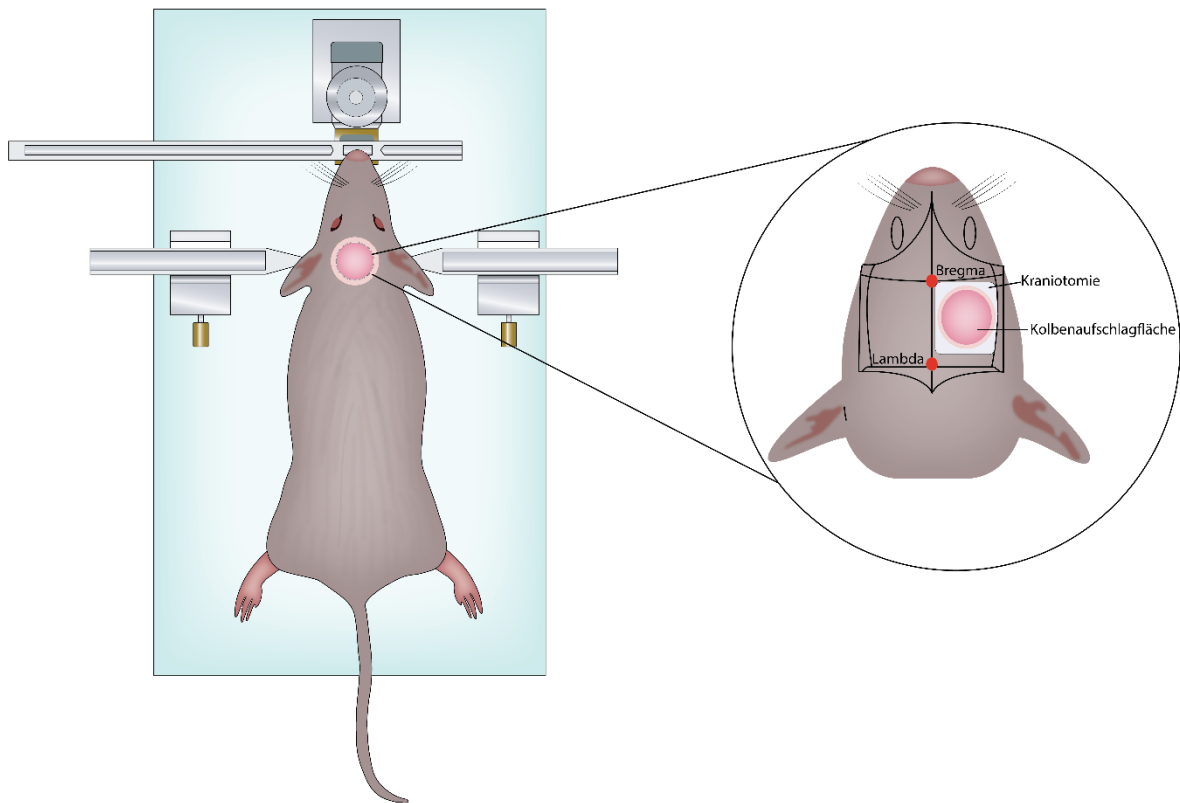


Abbildung 7 Schematische Darstellung des CCI Models, modifiziert nach [270]

4.5.3. Schein (Sham)- Operation

Die bei der Hälfte der Versuchstiere durchgeführte Schein- Operation wurde an einer ebenfalls in Bauchlage auf dem Operationstisch fixierten, narkotisierten Maus durchgeführt. Die Temperaturkontrolle wurde wie bei den CCI Mäusen durchgeführt. Da lediglich ein Hautschnitt durchgeführt wurde, und kein Periostfragment entnommen worden ist, ist hier auf die Fixierung im stereotaktischen Rahmen verzichtet worden. Die Hautinzision an gleicher Stelle wie bei den CCI Mäusen wurde mittels Einzelknopfnähten wieder verschlossen. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurde darauf Augenmerk gelegt, die Narkosezeiten gleich lang zu halten wie bei den CCI operierten Tieren.

4.5.4. Besonderheiten

Es zeigten sich keine Besonderheiten, jedes Tier überstand den jeweiligen Eingriff und es sind keine Abänderungen des OP-Protokolls im Rahmen eines Notfalls oder Zwischenfalls nötig gewesen.

4.5.5. Postoperative Versorgung

Jedes Tier verblieb nach der Operation mindestens 30 min, wenn erforderlich, bis zu 120 min in einem Inkubator. Dieser Inkubator stellte ein Klima mit einer Temperatur von 33 ° C und einer Luftfeuchtigkeit von 35% her. Sofern die Maus wieder ausreichend orientiert erschien, wurde sie in ihren ursprünglichen Käfig zurückgesetzt.

4.5.6. Operationsprotokoll

Protokoll CCI/ Sham -Maus TVA __G 15-1-059_ Operateur: _____

Details zur CCI

OP-Datum: _____

Geschwindigkeit: 6m/s (Leica)

Geplante Überlebensdauer: 72h

Aufprallzeit: 200ms

Tötungsdatum/Uhrzeit: _____

Eindringtiefe: 1,5mm

Versuchs-ID: AB 72h No. _____

Lokalisation: rechts

Tier-ID: s. Randomliste

☐ Sham OP (nur Narkose und Hautschnitt)

Gewicht prä-OP: _____

Rektale Temperatur: prä OP _____

intra OP: _____

Narkosedetails

Beginn	
Ende	
Dauer	
<u>Traumazeitpunkt</u>	

Anästhetikum: Isofluran (Einleitung 1min 4Vol.%) Konzentration: _____ Vol%

Inkubatorzeit: bei 35% Luftfeuchtigkeit, 33°C 0,5 h

Gehirnentnahme: Vollständig

Gehirnkonservierung

Trockeneis

Gehirn gelagert in Box: _____

Sonstige Entnahmen:

Blut, Kot, Darm

Euthanasie:

Anästhetikum: Isofluran (Einleitung 1min 4Vol.%)

Methode: Decapitation

Besonderheiten:

4.6. Euthanasie/ Postmortale Phase

Jede Maus wurde 72 Stunden nach Operation euthanasiert. Die Tiere wurden hierbei mit 4-prozentigem Isofluran für 1 min narkotisiert. Sobald das Tier ausreichend narkotisiert war, erfolgte die Tötung durch Dekapitation.

4.6.1. Vorgehen der Euthanasie

Die Dekapitation erfolgte mittels Schere. Hierbei kam es ebenfalls zu einem Blutaustritt aus den eröffneten Zervikalgefäßen. Das Blut der über einen Falcon gehaltenen Maus wurde für eine Blutprobe gesammelt. Es wurden circa 1-2 mL Blut entnommen und mit 80 µL Heparin versetzt. Zur Separierung des Serums wurde die gewonnene Probe bei 4°C und 3000 Umdrehungen pro Minute (rpm=rounds per minute) acht Minuten zentrifugiert und das Serum bei -82 °C eingefroren.

4.6.2. Gehirnentnahme und –Konservierung

Nach sagittalem Hautschnitt wurde das Foramen Magnum dorsal weiter eröffnet und die Schädelkalotte nach lateral abgehoben. Eine leichte Mobilisierung des Gehirns ermöglichte die Durchtrennung der Hirnnerven, sodass das Gehirn endgültig entnommen werden konnte. Einige Minuten wurde dieses nun in Trockeneis gelagert und danach einzeln im jeweils beschrifteten Probenbeutel bei -27 °C gelagert.

4.6.3. Darmgewebe- Entnahme

Der abdominelle Maus- Situs wurde mit einer Schere median eröffnet und 2 cm proximal des Rektums ein 1-1,5 cm messendes Gewebestück des Colon entnommen. Ebenfalls wurde das Caecum entnommen. Auch dieses Gewebe wurde nun bei -82°C gelagert.

4.7. Gehirnschnitte am Kryostat

4.7.1. Verwendetes Gerät und Bedingungen

Es wurde das Modell Cryostar Nx70 der Firma Thermo Scientifics genutzt. Die Bedienung erfolgte gemäß Herstellerangaben. Es sind folgende Temperaturen für die Herstellung der Schnitte eingestellt worden:

Innenraum: -15°C

Messerklinge: -20°C

Messerblock: -21°C

4.7.2. Vorbereitung des Gehirns

Das Gehirn der jeweils zu untersuchenden Maus wurde aus dem Kühlschrank und dem zugehörigen Probenbeutel entnommen. Der Teller des Kryostats ist mit einem dicken Tropfen Einbettmedium benetzt und das Gehirn der Maus mit seiner okzipitalen Seite darauf aufgesetzt worden. Es erfolgte das Erhärten des Klebers, sodass das Gehirn fixiert war. Der Teller wurde nun in das Kryo Schneidegerät eingesetzt und mit Hilfe des Messers im rechten Winkel zur Fissura longitudinalis cerebri das Schneiden von rostral nach kaudal begonnen. Bis zum Erreichen der Ebene Bregma +3,1mm, als Ebene 1 bezeichnet, wurde das murine Hirngewebe verworfen. Sobald der geforderte Schnitt erreicht wurde, wurden die folgenden Schnitte in 500 µm Intervallen nach aufgeführtem Schnittprotokoll auf einem Gewebeträger fixiert, wobei aus jeder Ebene 6 Schnitte erstellt wurden. Hierbei wurden die anfänglichen 10 Ebenen auf einen Objektträger mit der Bezeichnung A und die restlichen Ebenen auf einem Objektträger mit der Bezeichnung B fixiert. Es entstanden somit für jedes Mausgehirn 12 Objektträger (sechsmal Ebene 1 bis 10 und sechsmal Ebene 11-16), welche nach Fixierung auf dem Objektträger bei -20° C im Kühlschrank gelagert wurden.

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

Aus den mit * bezeichneten Ebenen, welche die maximale Schadensentwicklung beinhalten, wurden zusätzlich Trimmschnitte zur folgenden Ribonucleinsäure (engl. *Ribonucleic acid*, RNA) Extraktion und Proteinanalyse erstellt. Hierbei wurden jeweils sechs 40µm dicke Schnitte der entsprechenden Ebenen übereinander gelegt. Das ventrale Drittel der übereinander gelegten Hirnschnitte wurde verworfen. Die Hemisphären wurden getrennt in bezeichnete Kryoröhrchen ebenfalls nach zuvor aufgestelltem Protokoll sortiert.

Das als „Kryoröhrchen A- gelber Deckel“ bezeichnete Röhrchen enthielt dann die Schnitte der linken Hemisphäre aus der Ebene 2500 µm, 3500 µm, 4500 µm und 5500 µm. Die rechte Hemisphäre dieser Ebenen wurde in „Kryoröhrchen A- roter Deckel“ gesammelt. Im „Kryoröhrchen B- gelber Deckel“ befanden sich dann analog die Schnitte der linken Hemisphäre aus den Ebenen 3000 µm, 4000 µm, 5000 µm, und 6000 µm und im „Kryoröhrchen B- roter Deckel“ die Schnitte derselben Ebenen der rechten Hemisphäre. Auch diese Proben wurden bei -80° C gelagert.

4.8. Histologie

4.8.1. Kresylviolett-Färbung nach Nissl

Die Kresylviolett-Färbung dient der Neuronendarstellung mittels eines basischen Oxazinfarbstoffes, der die Zellkerne und Nissl-Substanz der Neuronen mit hohen Anteilen von Nukleoproteinen anfärbt [271]. Es kommt zu einer blauen Färbung der Nervenzellen.

Zur Herstellung der Färbelösung wurden 5g Kresylviolett in 100 ml 100-prozentigen Ethanol gegeben. Die Lösung ist anschließend 30 Minuten lang mit Hilfe eines Magnetrührers bei 50°C gemischt worden. Anschließend wurde die Mischung auf ein Gesamtvolumen von 500 mL mit destilliertem Wasser aufgefüllt und die Lösung gefiltert.

Vor Durchführung der Färbung mussten die Gefrierschnitte circa eine Stunde lang trocknen. Sofern dies erfolgte, wurden die Schnitte gemäß folgendem Protokoll in insgesamt 8 Tauchbädern gefärbt:

Tauchbad 1:	2 min	70% Ethanol
Tauchbad 2:	10 min	Kresylviolett
Tauchbad 3:	2 mal kurz	destilliertes Wasser
Tauchbad 4:	2 mal kurz	70 % Ethanol
Tauchbad 5:	2 mal kurz	96 % Ethanol
Tauchbad 6:	2 mal kurz	100 % Ethanol
Tauchbad 7:	5 min	Roti Histol
Tauchbad 8:	2 min	Roti Histol

Abschließend erfolgte eine Einbettung mit Roti Histokitt.

4.8.2. Volumetrie des histologischen Schadenvolumens

Die Kresylviolett-Färbung ließ nun unter dem Mikroskop eine Unterscheidung zwischen Kontusionsvolumen und nicht geschädigtem Hirngewebe zu. Während nicht geschädigtes Gewebe blau- violett angefärbt war, ist das Contusionsgewebe deutlich weniger oder ungefärbt und erschien somit auffallend hell. Jeder Hirnschnitt wurde am Mikroskop erfasst und dann digital mit Hilfe der Software ZEN 2 ausgewertet. Hierzu wurde jede Gehirnhälfte für sich umfahren und das Volumen berechnet. Die Kontusionsseite wurde zunächst symmetrisch zur Gegenseite und der anscheinenden Oberfläche vor Schaden entsprechend umfahren, um dann im zweiten Schritt durch Umfahren des tatsächlich noch vorhandenen Hirngewebes die Differenz und somit das Ausmaß des Schadens berechnen zu können. Es wurde hierbei die Fläche des noch vitalen Gewebes von der Gesamtfläche der läSIONalen Gehirnhälfte subtrahiert. Es ergab sich die Schadensfläche A in mm² für jeden Schnitt. Das gesamte Schadenvolumen V_A in mm³ für jede Maus wurde durch Addition der Schadensflächen eines jeden Schnittes und anschließender Multiplikation mit dem vorher festgelegten Abstand der Schnitte von 500 µm (0,5 mm) berechnet:

$$V_A = (A_1 + A_2 + A_3 + \dots + A_{16}) \cdot 0,5 \text{ mm}$$

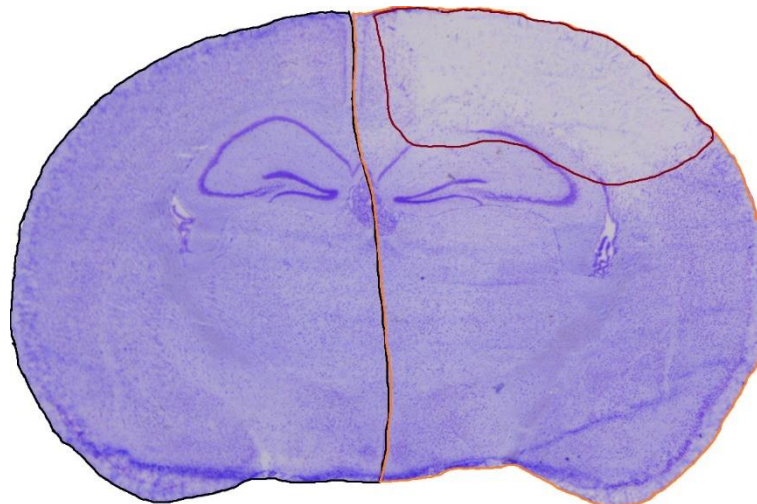


Abbildung 8: Schematische Darstellung der durchgeführten Volumetrie im Koronarschnitt nach Nisslfärbung (Ebene 12, Maus 28)

Dargestellter Nissl-gefärbter Koronarschnitt der Ebene 12. Die schwarz umrandete Fläche stellt die kontralaterale intakte linke Hemisphäre der Maus dar. Die gesamte rechte ipsilaterale Hemisphäre ist orange umrandet. Die Schadensfläche, aus welcher das Kontusionsvolumen berechnet wird, ist rot umrandet dargestellt.

4.8.3. Dickemessung der Granularzellschicht im suprapyramidalen Blatt des Gyrus dentatus

In der vorliegenden Nissl- Färbung wurden für jedes Versuchstier zwei Schnittebenen ausgewählt in denen Bregma circa 1,2 mm bis 2,1 mm misst. Jeweils ipsi- und kontralateral ist senkrecht zur Struktur seitenvergleichbar innen, mittig, außen und an der dünnsten Stelle der Diameter gemessen worden, sodass insgesamt vier verschiedene Messwerte pro Seite erfasst wurden. Die Stelle mit dem dünnsten Diameter entsprach hierbei dem größten Substanzverlust.



Abbildung 9 exemplarische Darstellung der Messung der Dicke der Granularzellschicht des Gyrus dentatus im gefärbten Koronarschnitt

Die gezeigte Abbildung zeigt das Vorgehen der Messung der Granularzellschicht an einer CCI Maus in Schnittebene 12: In den entsprechend ausgesuchten Ebenen jeder Maus werden im Nissl-gefärbten Koronarschnitt die Diameter des suprapyramidalen Blattes der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus an vier Stellen in beiden Hemisphären ausgemessen. A= außen, M= mittig, D= dünnster Diameter, I= Innen.

4.9. Immunhistochemie

4.9.1. Immunfluoreszenz-Färbung von Iba1 und GFAP

In den bisher bei -20°C gelagerten Hirnschnitten der Ebenen 11 und 12 sollten insgesamt zwei Proteine immunhistochemisch angefärbt werden:

- Ionized calcium binding adapter molecule 1 (Iba1)
- Saures Gliafaserprotein (engl.: *glial fibrillary acidic protein*, GFAP)
- Major Histocompatibility Complex 2 (MHC2)

Zur immunfluoreszierenden Visualisierung von Mikroglia wurde ein Iba1 Antikörper genutzt. Iba 1 ist ein ionisiertes Kalzium-bindendes, 17 kilo Dalton (kDa) großes - Adaptermolekül und Marker der Makrophagen Linie, der im gesamten Zytoplasma exprimiert wird und somit eine Darstellung der morphologischen Veränderung erlaubt. [107]

An Tag eins wurden zunächst die zuvor gefrorenen Schnitte für 30 Minuten getrocknet. Es folgte eine Fixierung für 10 Minuten in 4-prozentiger Paraformaldehyd-Lösung (PFA). Die Schnitte wurden nun jeweils drei Mal für drei Minuten in Phosphat gepufferter Salzlösung (engl.: *phosphate buffered saline*, PBS) gewaschen, um Verunreinigungen zu minimieren. Nun wurden die Schnitte für 30 Minuten in fünf-prozentiger NGS und 1 prozentiger BSA (Bovines Serum Albumin) in PBST geblockt. Der Primäre Antikörper wurde in Lösung gelöst hinzugegeben. Es handelte sich hierbei um Rabbit anti Iba1 im Verhältnis 1:1000 und um den Rat anti GFAP im Verhältnis 1:1500. Die Antikörper banden nun über Nacht bei 4° Celsius an die zugehörigen Antigene.

An Tag zwei wurden die zuvor mit Antikörpern kultivierten Schnitte drei Mal für jeweils 10 Minuten in PBS gewaschen. Es folgte das Blocken mit dem gelösten sekundären Antikörper. Dieser soll an den primären Antikörper binden und auf Grund seiner fluoreszierenden Eigenschaft helfen, die gebundenen Iba1-Proteine und GFAP-Proteine zu visualisieren. Hierbei handelte es sich um den goat anti rabbit Alexa 488 A-11034 mit einer Konzentration von 1:500 und um den goat anti rat Alexa 568 A-11077 mit einer Konzentration von 1:500, welche nun für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Daraufhin wurden die Schnitte erneut drei Mal für jeweils zehn Minuten in PBS gewaschen um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Um eine fluoreszierende Darstellung der Zellkerne zu ermöglichen, erfolgte nun eine

Zugabe der Schnitte in DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) mit einer Konzentration von 1: 10000 in PBS.

Um auch hier die Rückstände wieder zu entfernen, wurden die Schnitte einmal für fünf Minuten in PBST gewaschen.

Die Objektträger wurden nun mit Immunomount, einem Eindeckmittel, und zugehörigen Deckgläsern versehen und zum Trocknen über Nacht im Kühlschrank bei 4° Celsius gelagert. Als abschließender Schritt wurden die getrockneten Objektträger am dritten Tag mit Klarlack versiegelt.

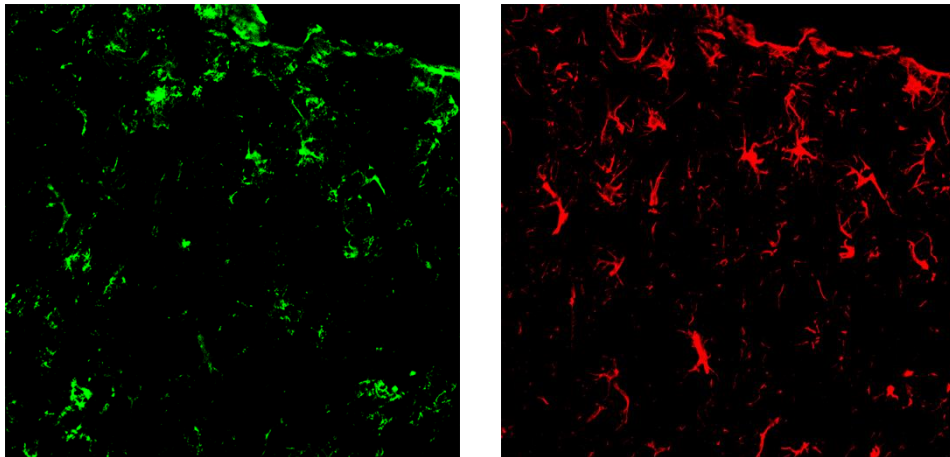


Abbildung 10 exemplarische Darstellung der Iba1 (links) und GFAP- Fluoreszenz (rechts)

4.9.2. Auswertung der Immunfluoreszenz-Färbung

Die Auswertung der Immunfluoreszenz-Färbung erfolgte mit Hilfe der Software ImageJ, nachdem mit Hilfe eines Mikroskops mit 20-facher Vergrößerung und einer Wellenlänge von 488 und 568 nanometern (nm) Aufnahmen erstellt wurden. Die immunreaktiv gefärbten Astrozyten und Mikroglia im Bereich des Schadens perilesional und subkortical oder bei den Sham Tieren im anatomisch analogen Abschnitt wurden ipsi und kontralateral hervorgehoben, sofern sie eine Pixelgröße von 5 bis 2000 Pixel erreichen. Die mittels Software dargestellten Strukturen wurden anschließend ausgezählt und die Zellzahl pro mm^2 sowie durchschnittliche Größe der markierten Strukturen bestimmt.

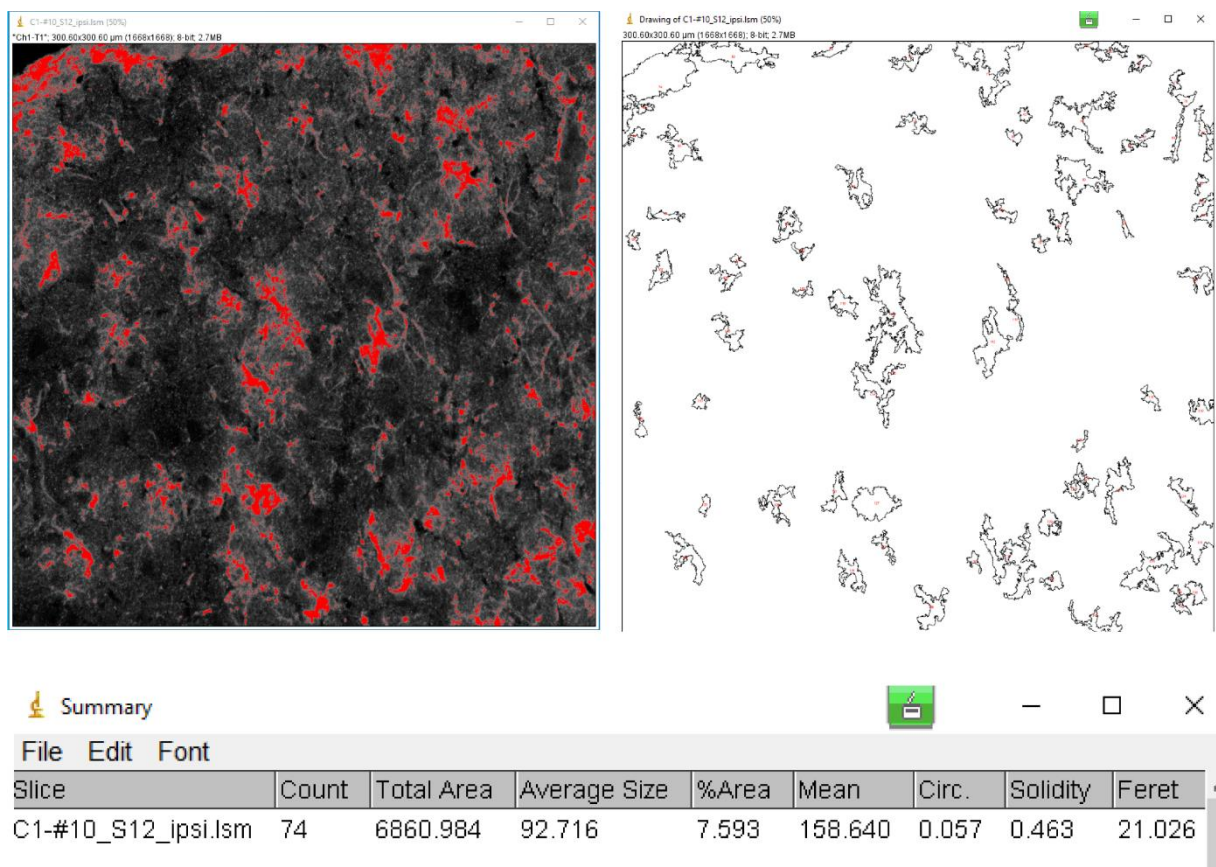


Abbildung 11: Darstellung der mittels ImageJ-Software durchgeführten Quantifizierung der immunopositiven Strukturen

Die Abbildung zeigt exemplarisch die Auswahl der immunopositiven Teilchen im rechten Bildabschnitt. In der unten angeführten Zusammenfassung „Summary“ lassen sich die ausgezählten Strukturen (Count), wie auch die Gesamtfläche (Total Area) und durchschnittliche Größe der immunopositiven Teilchen (Average Size) ablesen.

4.10. Proteinanalyse

4.10.1. Extraktion und Konzentrationsbestimmung der Proteine

Die aus den Trimmschnitten gewonnenen Proben wurden nun zur Proteinanalyse weiter verarbeitet. Es erfolgte die Zugabe von 150 µL RIPA Puffer. Dieser setzte sich wie folgt zusammen:

- 50mM TrisHCL (pH 7,4)
- 150 mM NaCl
- 1mM EDTA (4° Celcius) (Ethylendiamintetraessigsäure)
- 0,1% SDS

Das Verhältnis der zugegebenen Protease/Phosphataseinhibitoren zum Gewebegewicht betrug hierbei 1:5. Die erstellte Mischung wurde nun auf Eis für 30 Minuten unter mehrfachem Mischen inkubiert und anschließend für 20 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Mit Hilfe der zugegebenen Substanzen ist die Quartär und Tertiärstruktur der enthaltenen Proteine aufgebrochen worden. Die zugegebene EDTA diente hierbei als Komplexbildner und der Proteaseinhibitor zum Schutz vor einem ungewollten Proteinabbau. Der Überstand der zentrifugierten Probe ist nun überführt worden. Hiervon wurden 2µL im Verhältnis 1:10 mit destilliertem Wasser zusammengeführt. Es folgte das Pipettieren von 5 µL dieser angefertigten Mischung auf die 96-Well-platte von Lowry DC Protein-Assay von Promega. Zur Kontrolle wurde ebenso eine Standardreihe bekannter Proteinkonzentrationen (0µg/µL; 0,5 µg/µL; 1 µg/µL; 1,5 µg/µL; 2 µg/µL; 2,5 µg/µL; 3 µg/µL) in das Well gegeben. Zu jedem Well wurden 25 µL eines Substanzgemisches hinzugefügt welches aus folgenden Reagenzien bestand:

- 50 Teile Reagent A entsprechend 1700 µL
- 5,8 Teile Reagent B entsprechend 200 µL
- 1 Teil Reagent S entsprechend 34 µL

Es erfolgte eine lichtgeschützte Inkubation der zusammengemischten Substanzen für zwölf Minuten. Anschließend konnte die photometrische Bestimmung bei 750 nm erfolgen, welche mit Hilfe des Glomex® Detektionssystems durchgeführt wurde. Mit Hilfe der Standardkurve konnte die Proteinkonzentration in µg/µL ermittelt werden. Die ermittelten Proteinkonzentrationen wurden ebenso für die folgenden Versuche genutzt.

4.10.2. Elektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat-Polyamidgelelektrophorese (SDS-Page) wurde zur Separation der aufgetragenen Proteine genutzt. Das gewonnene Proteinlysate wird mit einem Probenpuffer versetzt. In diesen Versuchen sind die Proteine GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) mit einem Molekulargewicht von 32kDa, das GFAP (Gliafaserprotein) mit einem Molekulargewicht von 40kDa und das Spectrin mit einem Molekulargewicht von 120kDa von Interesse gewesen.

Die Analyse erfolgte mittels SDS- Gelen. In diese Gele erfolgte das Pipettieren von 5µL des Prestained-Markers in die ersten beiden Taschen. Die folgenden Taschen wurden mit 25 µg Totalprotein, verdünnt mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) auf ein Gesamtvolumen von 100 µL, gefüllt. Es erfolgte das Etablieren eines elektrischen Feldes mit einer Stromstärke von 40mA für 120 Minuten.

4.10.3. Western Blot

Nach erfolgter Elektrophorese wurde die Kompressionskassette für den Transferpuffer vorbereitet. Der Transferpuffer war folgend zusammengesetzt:

- 25mM TrisHCL entsprechend 25 mL
- 192 mM Glycin entsprechend 14,4 g
- 200 mL 20% Methanol
- Auffüllen des Volumens zum Erreichen eines Gesamtvolumens von 1000mL mittels Wasser (H₂O)

Das Elektrophoresegel, eine Nitrozellulosemembran, welche später als Transfermaterial für die Proteine dienen wird, zwei Filterpapiere und zwei Schwämme wurden im RIPA Puffer getränkt. Senkrecht zur Membranoberfläche erfolgte nun das Anlegen eines elektrischen Feldes mit einer Stromstärke von 380mA. Die Proteine wurden nun auf die Nitrozellulosemembran mit einer Porengröße von 0,45 µm überführt. Dieser Vorgang dauerte 80 Minuten. Zur Visualisierung der transferierten Proteinbanden erfolgte eine Anfärbung mittels Ponceau S, einem Proteinfarbstoff.

Die gefärbte Nitrozellulosemembran wurde nun in fünf-prozentiger Magermilchlösung mit TBST (Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan gepufferte Salzlösung) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, wodurch unspezifische Bindungsstellen blockiert wurden.

Die Zugabe des Primärantikörpers erfolgte nun, welcher für 16 Stunden über Nacht bei 4°C binden konnte. Es wurden hierfür der Spectrin-Antikörper in einer Konzentration von 1:750, der GFAP-AK in einer Konzentration von 1:1000 und der GAPDH-AK mit einer Konzentration von 1:10000 genutzt. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran jeweils zwei Mal für fünf Minuten mit TBST gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Es folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper, welcher mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert war. Dieser wurde für eine Stunde lichtgeschützt bei Raumtemperatur im Rüttler inkubiert. Erneut wurden ungebundene Antikörper mittels zweimaligem Waschen in TBST für jeweils fünf Minuten entfernt. Die Detektion des Fluoreszenzsignales erfolgte mit Hilfe des Licor Odyssey® Imaging Systems. Da die Expression des GAPDH über die Proben hinweg konstant war, diente das Fluoreszenzsignal des GAPDH als Kontrollprotein. Eine Auswertung des Proteinsignales erfolgte demnach durch eine Relation zum gegebenen GAPDH Signal. Es wurde der Quotient aus detektiertem Protein/ GAPDH Signal gebildet.

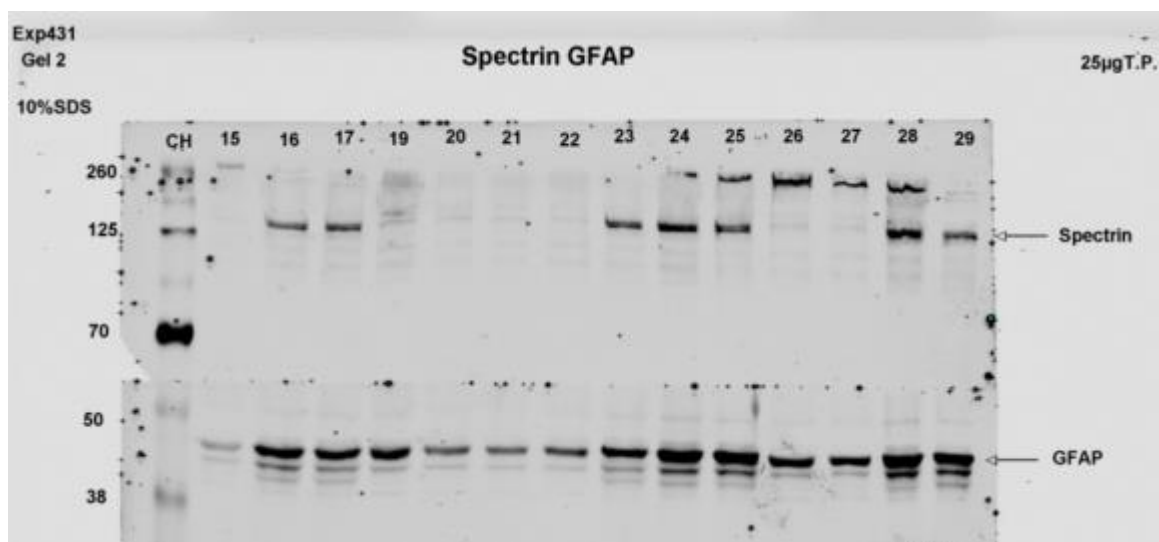


Abbildung 12 exemplarisches Elektrophoresegel des Spectrin GFAP-Westernblots der Proben 15 bis 29

Die gezeigte Abbildung zeigt die Separation der Proteine nach Anlegen eines elektrischen Feldes auf der Nitrozellulosemembran nach Bindung durch die sekundären Antikörper (GFAP und Spectrin). Die GFAP Bande präsentiert sich bei 50 kDa, die Spectrin Bande bei 125 kDa. Es folgte die Messung der Immunfluoreszenz mittels Licor- Odyssey Imaging System.

4.10.4. Dot Blot Immunglobulin G (IgG)

Weiterhin interessierte die Bestimmung der IgG Konzentration, weshalb ein Dot Blot zu dessen Quantifizierung durchgeführt wurde. Es wurden jeweils 2µL der oben genannten Probe, welche 10 µg Protein entsprechen und zwei Negativkontrollen, bestehend aus RIPA auf die Nitrozellulosemembran gegeben. Die Membran trocknete an der Luft und wurde anschließend mit fünf prozentiger Magermilchlösung in einer Reaktionskammer für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einer Rüttelplatte inkubiert, wodurch erneut unspezifische Bindungsstellen blockiert wurden. Der sekundäre, fluoreszierende Antikörper wurde in einer Dunkelkammer hinzu gegeben. Die Inkubation dessen dauerte eine Stunde. Nach erfolgreicher Inkubation erfolgte das Auswaschen zweimal für jeweils fünf Minuten in TBST auf der Rüttelplatte. Die photometrische Ausmessung ist daraufhin mittels Li-COR Odyssey 9260 durchgeführt worden.

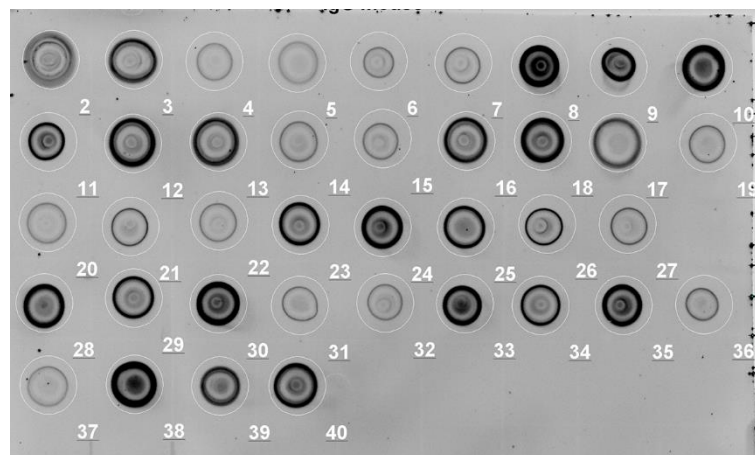


Abbildung 13: Darstellung des IgG-Dotblots vor photometrischer Messung, Proben mit Mausnummer beschriftet

Gezeigtes Bild zeigt die Fluoreszenz der untersuchten Proben nach Hinzugabe des fluoreszierenden sekundären IgG Antikörpers, welche im nächsten Schritt mittels LiCor Odyssey quantifiziert wurde.

4.11. Molekularbiologie

4.11.1. RNA- Extraktion

Zur RNA-Extraktion wurden die ipsiläsionalen Trimmschnitte verwendet. Das RNeasy Plus Universal Kit von Qiagen ist zur Extraktion genutzt worden. In einen Tube wurden 0,9 mL Qiazol Reagenz mit Gewebe und einer Metallkugel gegeben und im Mastermill zweimal für jeweils eine Minute bei 20 Hz gemischt und zerkleinert. Das Qiazol Reagenz diente hierbei bei induzierter Gewebelyse zur RNAsen- Inhibition. Fünf Minuten wurde das Gemisch bei Raumtemperatur ruhen gelassen. Es erfolgte das Zugabe von 100 μ L gDNA- Eliminator und das folgende vortexen für 15 Sekunden. Weiterhin wurden 180 μ L Chloroform hinzugegeben und erneut für 15 Sekunden gevortext. Für 3 Minuten wurde das Gemisch bei Raumtemperatur stehen gelassen. 15 Minuten bei 4°C und 1200x g ist jenes dann zur Phasenauftrennung zentrifugiert worden. Es ergab sich eine dreiphasige Flüssigkeit:

- erste, oberflächliche Phase: wässrig klar, hier sammelte sich die RNA
- mittige Inter-Phase: milchig, bestehend aus DNA
- bodenständige organische Phase: rot, Proteinphase.

Die oberflächlich befindliche RNA wurde pipettiert und mit 600 μ L 70-prozentigem Ethanol vorsichtig vermischt. 700 μ L der Mischung wurden in die beschriftete Säule, welche eine RNA-selektive Silikatmembran enthält, gegeben. Es erfolgte eine 15-sekündige Zentrifugation bei 8000x g (entspricht ca 10.000 rpm). Der entstandene Durchlauf wurde verworfen. Zur restlichen Probe werden 700 μ L RWT Puffer gegeben und erneut 15 Sekunden bei 8000x g zentrifugiert. Auch hier ist der Durchlauf wieder verworfen worden. Nach Hinzugabe von 500 μ L RPE wurde erneut für 2 Minuten bei 8000x g zentrifugiert und auch hier der Durchlauf verworfen. Die gewonnene Probe wurde erneut mit RWT für 2 Minuten ausgewaschen. Es schloss sich das Nachtrocknen an, welches aus einer erneuten Zentrifugation für eine Minute bei maximaler Geschwindigkeit bestand. Es folgte das Eluieren. Das Spin wurde in ein frisches Tube gestellt und 40 μ L RNase- freies Wasser genau auf die Membran pipettiert und erneut bei 8000x g für eine Minute zentrifugiert. Im Eluat befand sich nun die gesuchte RNA. Mittels photometrischer Bestimmung wurde nun die RNA-Konzentration bestimmt. Die optische Dichte (OD) von 2 μ L RNA Eluat wurde nun bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren, bestimmt. Die Substanzen zeigen verschiedene Absorptionsmaxima:

- Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260 nm
- Desoxribonukleinsäure bei einer Wellenlänge von 280 nm
- Kohlenhydrathaltige Verunreinigungen bei einer Wellenlänge von 230 nm,

weshalb sich durch Bildung eines Quotienten der Absorption (A) der Reinheitsgrad der Probe bestimmen ließ:

$$\text{Reinheitsgrad} = \frac{A_{260 \text{ nm}}}{A_{280 \text{ nm}}} \quad \text{Sowie Reinheitsgrad} = \frac{A_{260 \text{ nm}}}{A_{230 \text{ nm}}}$$

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

4.11.2. cDNA Synthese

Zur Durchführung der nachfolgend genannten Polymerasekettenreaktion (PCR, engl.: *Polymerase chain reaction*) ist die Gewinnung der komplementären einzelsträngigen DNA (cDNA, engl.: complementary DNA) aus der zuvor extrahierten RNA notwendig gewesen. Hierfür wurde das Quanti Tec reverse Transkriptions Kit von Qiagen genutzt. Zur Eliminierung genomischer DNA wurde zunächst 0,5µL RNA jeder Probe mit RNase freiem Wasser auf ein Zielvolumen von 12µL aufgefüllt. Basis der weiteren Bestimmung waren die zuvor ermittelten RNA- Konzentrationen jeder Probe. Nach Zugabe von 2µg gDNA Eliminationspuffer wurde das Gemisch bei 42°C acht Minuten lang inkubiert. Es schloss sich nun die reverse Transkription an. Hierzu erfolgte die Zugabe von 6µL Mastermix, bestehend aus reverser Transkriptase, Puffer und einem Primermix im Verhältnis 1:4:1 und das weitere Inkubieren bei 42°C für 30 Minuten. Anschließend wurde die Probe sofort auf Eis gestellt. Bei 95°C für drei Minuten erfolgte die Inaktivierung der reversen Transkriptase. Die Probe wurde bis zu einem Gesamtvolumen von 40µL mit RNase freiem Wasser aufgefüllt. Die so erhaltene cDNA ist nun bei -20°C gelagert worden.

4.11.3. Polymerasekettenreaktion

Die PCR dient der zyklischen Vervielfältigung spezieller doppelsträngiger DNA-Abschnitte mit Hilfe einer thermostabilen Polymerase. Hierfür werden hitzestabile Polymerasen benötigt, sequenzspezifische Primer, die Ausgangs-DNA sowie zusätzliche Substanzen wie $MgCl_2$, Pufferlösung und Desoxyribonukleotide. Die dann durchgeführten Amplifikationszyklen laufen nach einem bestimmten Protokoll ab und bestehen aus folgenden Schritten:

- Denaturierung bei 95 °Celsius : die doppelsträngige DNA wird durch erhöhte Temperatur in Einzelstränge getrennt
- Hybridisierung bei 50-60 °Celsius: Binden der Primer an die komplementäre DNA Sequenz
- Elongation (DNA- Synthese) bei 70°Celsius : Verlängerung der Primer mittels DNA-Polymerase, sodass doppelsträngige DNA entsteht.

Dieser Zyklus wurde je nach Effizienz der Reaktion 20-40-mal durchlaufen. Für die Versuche dieser Arbeit wurde der Thermocycler LightCycler® 480 verwendet, sodass eine automatisierte PCR durchgeführt wurde.

Die quantitative Echtzeit qPCR dient der Bestimmung der Anzahl der vorliegenden DNA-Kopien. Hierbei sind sequenzspezifische Hybridisierungssonden an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, wodurch das gemessene Fluoreszenzsignal graphisch gegenüber der Anzahl der gemessenen PCR Zyklen aufgetragen werden kann. Die entstandene Kurve bestehend aus Anfangsphase, exponentieller Wachstumsphase und Plateauphase wurde nun Software gesteuert mit einer Standardkurve abgeglichen und die individuelle DNA Menge der durchgeführten PCR ermittelt. Aufgrund der doppelt angesetzten Proben wurde das arithmetische Mittel ($x = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$) der berechneten DNA-Menge berechnet. Das sogenannte Housekeeping Gen, in diesem Falle die Peptidylprolyl Isomerase A (PPIA), welche unabhängig der experimentellen Einflüsse stetig in einer konstanten Anzahl an Kopien vorliegt, diente nun zur Normalisierung der gemessenen Proben. In dieser Studie wurden folgende Gene in ihrer Expression untersucht:

- Translokatorprotein (TSPO)
- CD74
- Interferon γ (IFN γ)

Die verschiedenen Versuchsprotokolle, auf Grund unterschiedlicher Annealingtemperaturen der Primer und unterschiedlicher Pipettierschemata je nach Target, sind je nach Target wie folgend dargestellt, durchgeführt worden:

LC 480						
Light-Cycler 480 Probes Master						
IL1b / IL6						
10	µl pro Probe Reaktionsvol.					
	Probenzahl:	86				
	"==> Mastermix (+ 5%) X	90,3				
	(µl)					
	5 µl Probes Master	451,5	µl			
	0,25 XY	22,58	µl			
	0,25 XY	22,58	µl			
	0,5 Probe FL	45,15				
	0,5 Probe Cy5	45,15				
	2,5 µl H2O	225,8				
" + 1	µl cDNA		µl			
	gesamt	812,7	µl			
	pro Probe	9	µl			
	1 µl Std-verd.					
Programm:						
Hybprobe 55°C 10-20-30 45Z Cy5					Cycles	
Präinkubation	95 °C	10 min		1	none	
Denaturierung	95 °C	10 sec			none	
Annealing	55 °C	20 sec		45	single	
Extension	72 °C	30 sec			none	
Denaturierung	95 °C	1 min		1	none	
Annealing	40 °C	1 min			none	
Melting	95°C; Slope = 0,1°C/sec	0 sec			continuous	
Cooling	40 °C	30 sec		1	none	

Abbildung 14 Zyklusablauf PCR IL1beta /IL 6

Absolute Fast Sybr Green						
PPIA						
10	µl pro Probe Reaktionsvol.					
	Probenzahl:	86				
	"==> Mastermix (+ 5%) X	90,3				
	(µl)					
	5 µl Master SYBR Green	451,5	µl			
	0,25 PPIA F	22,58	µl			
	0,25 PPIA R	22,58	µl			
	3,5 H2O	316,1				
" + 1	µl DNA		µl			
	gesamt	812,7	µl			
	pro Probe	9	µl			
Programm:	AbsGreen 58°C-10s-15s -Neu					
					Cycles	
Präinkubation	95 °C	15 min		1	none	
Denaturierung	95 °C	10 sec			none	
Annealing	58 °C	10 sec		50	none	
Extension	72 °C	15 sec			single	
Melting	95 °C	5 sec		1	none	
	55 °C	60 sec			none	
	97°C; Slope =2,2°C/sec	0 sec			continuous	
Cooling	40 °C	10 sec		1	none	

Abbildung 15 Zyklusablauf PCR PPIA

4.12. Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung ist die Software Graph Pad Prism der Version 9.4.1 genutzt worden.

Mit Hilfe des Rout Testes wurden die Daten auf statistisch signifikante Ausreißer getestet. Erkannte Ausreißer werden nun nicht mehr statistisch berücksichtigt und in der graphischen Darstellung nicht mehr aufgeführt.

Daraufhin erfolgte der Test auf Normalverteilung mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Tests. Folgend wurde je nach Design des Vergleiches der entsprechende Test verwendet:

- Mehrgruppenvergleich zu einem Zeitpunkt : One-way-ANOVA
- Mehrgruppenvergleich zu verschiedenen Zeitpunkten: Two-way-ANOVA
- Zwei Gruppenvergleich: Mann Whitney-U- Test oder Student´s-T-Test

In Abhängigkeit des errechneten p-Wertes wird der Vergleich interpretiert:

- $p < 0,1$ = Trend, mit # gekennzeichnet
- $p < 0,05$ = statistisch signifikant, mit * gekennzeichnet
- $p < 0,01$ = statistisch signifikant, mit ** gekennzeichnet
- $p < 0,001$ = statistisch hochsignifikant, mit *** gekennzeichnet

5. Ergebnisse

Die vier vorhandenen Gruppen des Versuches sind weiterhin folgendermaßen abgekürzt:

- Sham + Veh : Scheinoperierte Tiere ohne antibiotische Therapie; n=8
- Sham + AB : Scheinoperierte Tiere unter antibiotischer Therapie; n=8
- CCI + Veh : Kontrollierte kortikale Kontusion ohne antibiotische Therapie; n=12
- CCI + AB : Kontrollierte kortikale Kontusion unter antibiotischer Therapie; n=12

5.1. Gewicht, Mikrobiologie und neurobehaviorelle Untersuchungen

5.1.1. Entwicklung des Gewichts

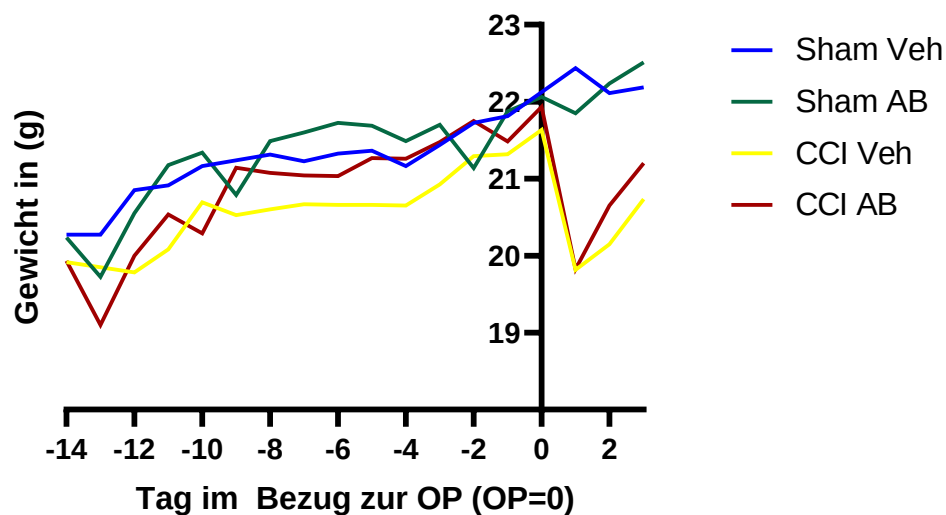


Abbildung 16 Die antibiotische und antimykotische Trinkwassergabe hat keinen Einfluss auf die Gewichtsentwicklung

Der Graph veranschaulicht die Entwicklung des Körpergewichtes der Mäuse während des gesamten Versuches beginnend zwei Wochen präoperativ (d= -14) bis 72 Stunden postoperativ (d=3). Es zeigt sich eine kontinuierliche Gewichtszunahme bis zum Operationszeitpunkt, nach welchem die CCI Tiere einen Gewichtsverlust zeigten und dann wieder an Gewicht zunahmen. Sham Gruppen jeweils n=8, CCI Gruppen jeweils n=12

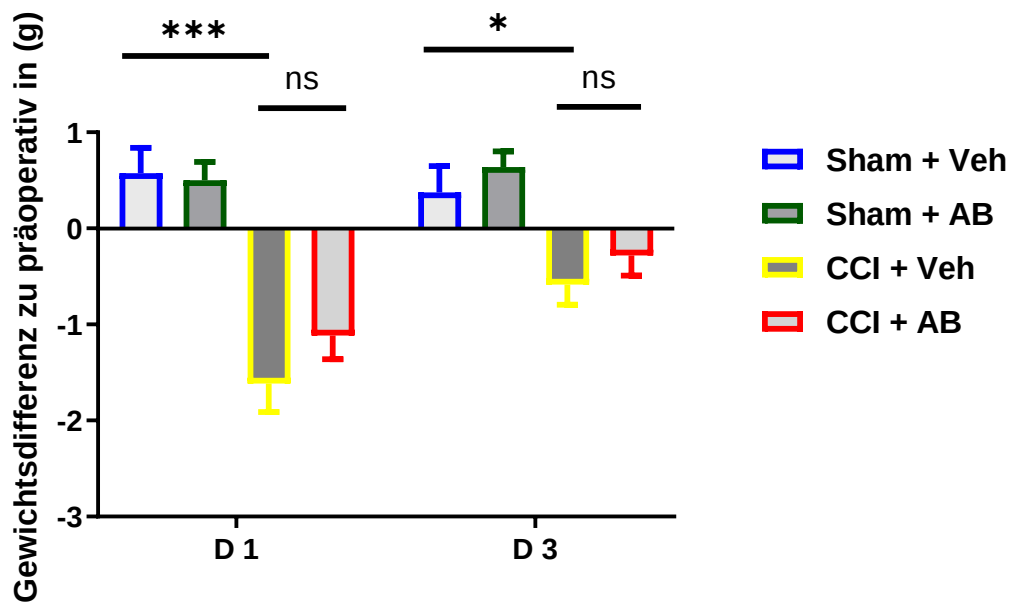


Abbildung 17 postoperativer Gewichtsverlust der CCI Tiere

Das Säulendiagramm veranschaulicht die postoperative Entwicklung des Körpergewichtes an den postoperativen Tagen 1 und 2. Das präoperative Gewicht der Versuchstiere dient hier als Ausgangsgewicht. Signifikante posttraumatische Gewichtsreduktion. Innerhalb der CCI Gruppen keine Signifikanz. Sham Gruppen jeweils n=8, CCI Gruppen jeweils n=12, ns p>0,1, Signifikanz: * p<0,05, *** p<0,001, Two-Way ANOVA nach Rout Test (Q=1%), keine Ausreißer

Das Ausmaß der Gewichtsabnahme lässt Rückschlüsse auf den Allgemeinzustand der Maus zu. Es zeigt sich in den CCI Gruppen eine postoperative Gewichtsabnahme von bis zu 2 g. Die Versuchstiere mit erhaltener Scheinoperation nahmen auch postoperativ noch an Gewicht zu. Innerhalb der CCI Gruppen zeigte sich zwischen den Vehikel- und antibiotikabehandelten Tieren kein signifikanter Unterschied der Gewichtsabnahme. Ein negativer Effekt durch eine antibiotische Therapie ließ sich daher hier nicht zeigen. CCI- Tiere im Vergleich zu Sham Tieren zeigten einen signifikanten Unterschied in der Gewichtsabnahme, mit deutlichem Gewichtsverlust in der CCI Gruppe, was auf den reduzierten Allgemeinzustand nach dem operativen Eingriff zurückzuführen ist.

		Sham Vehikel n=8	Sham AB n=8	CCI Vehikel n=12	CCI AB n=12
prä-OP	MW in (g)	21,81	21,88	21,32	21,48
	SEM	0,4823	0,4651	0,2710	0,2619
OP- Tag	MW in (g)	22,13	22,06	21,63	21,93
	SEM	0,4850	0,4567	0,2484	0,3041
Post-OP Tag 1	MW in (g)	22,44	21,85	19,82	19,83
	SEM	0,4675	0,5568	0,2897	0,2728
Post- OP Tag 2	MW in (g)	22,11	22,24	20,15	20,65
	SEM	0,3815	0,3555	0,3579	0,2723
Post- OP Tag 3	MW in (g)	22,19	22,51	20,73	21,20
	SEM	0,3466	0,4068	0,2698	0,2931

Tabelle 2: deskriptive Statistik der Gewichtsentwicklung, dargestellt mittels Mittelwert (MW) in Gramm (g) und Standardfehler des Mittelwertes (SEM).

5.1.2. Wasseraufnahme

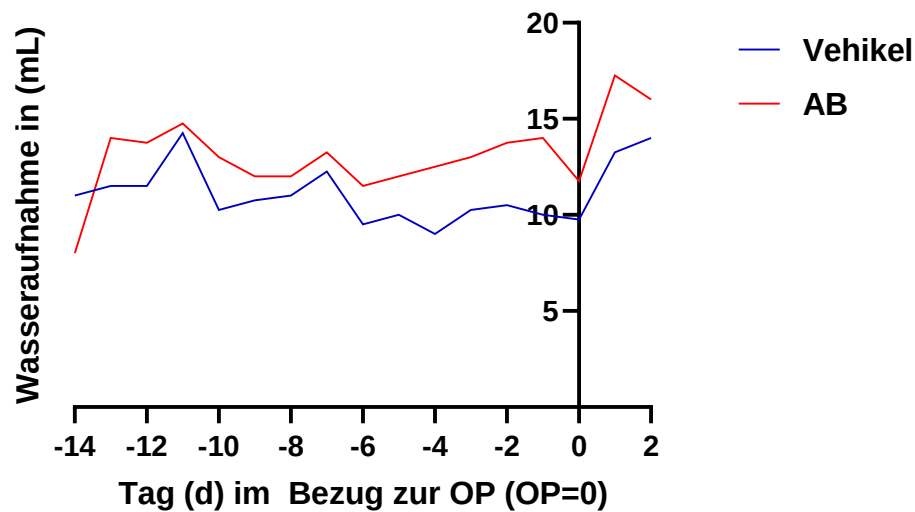


Abbildung 18 nachgewiesene Aufnahme der im Wasser gelösten Antibiotika und des Antimykotikums

Diagramm zur Darstellung der Wasseraufnahme in Millilitern (mL) während des Untersuchungszeitraumes, beginnend bei d= -14 bis d=2, wobei der Tag der operativen Versorgung d=0 war. Signifikanter Unterschied in der Wasseraufnahme ($p=0,0029$) zwischen den Gruppen der antibiotika- und vehikelbehandelten Tiere mit höherer Wasseraufnahme bei den antibiotisch ernährten Tieren. Ungepaarter Student's t-Test für jeden Zeitpunkt (keine Ausreißer nach Rout Test ($Q=1\%$)) Stichprobenumfang: $n=6$ Tiere pro Gruppe

Es zeigte sich, dass die antibiotisch behandelten Tiere hochsignifikant höhere Mengen der Trinklösung tranken als die Vehikeltiere. Es lässt sich somit nachweisen, dass eine enterale Aufnahme der Antibiotika und des Antimykotikums stattfand.

5.1.3. Caecumgewicht

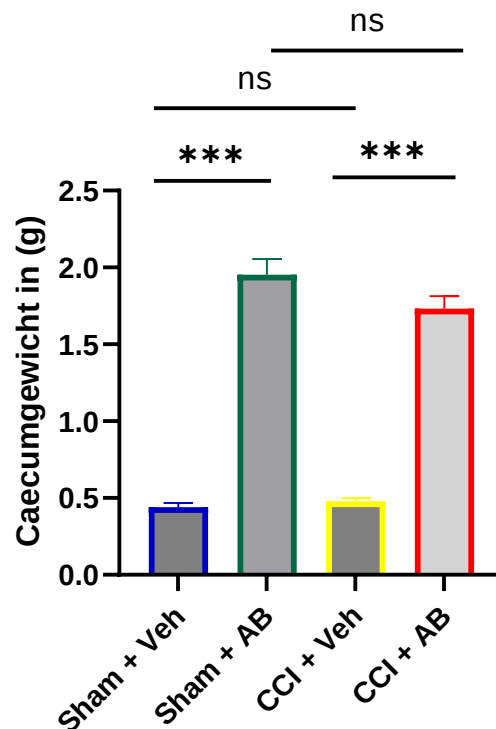


Abbildung 19 Zunahme des Caecumgewichtes nach antibiotischer und antimykotischer Therapie

Das Säulendiagramm stellt das gemessene Gewicht der postmortem entnommen Caeci in Gramm (g) der Mäuse innerhalb der randomisierten Gruppen dar. Es zeigt sich ein signifikant höheres Caecumgewicht in der Gruppe der antibiotisch behandelten Tiere. Sham Gruppen jeweils n=8, CCI Gruppen jeweils n=12, *** $p < 0,001$, ns $p > 0,1$, One-Way ANOVA mit Korrektur nach ROUT ($Q=1\%$); keine Ausreißer

Es zeigte sich, dass die antibiotikatherapierten Tiere ein signifikant höheres Caecumgewicht aufwiesen als die mit Vehikellösung gefütterten Tiere, was eine Dysbiose nach antibiotischer Therapie vermuten lässt.

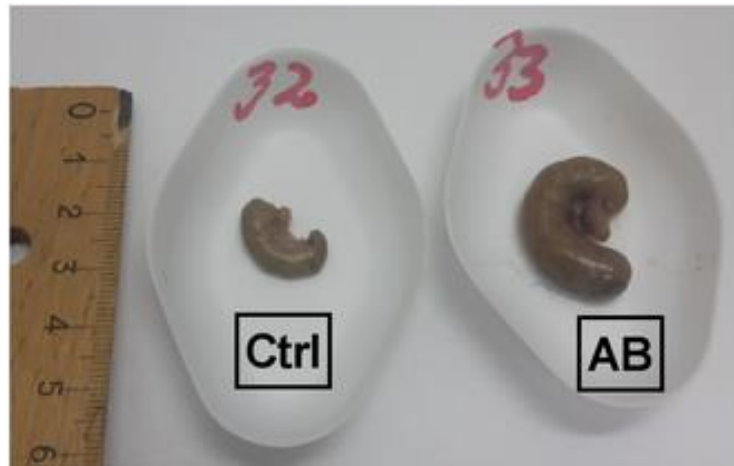


Abbildung 20 Beispielhaftes Foto verdeutlicht die Antibiotika-induzierte Größenzunahme des entnommenen Caecums

Beispielhaftes Foto entnommener Caeci der Kontrollgruppe (Ctrl) und der antibiotisch behandelten Gruppe (AB), Skalierung in cm, Maus Nummer 32 und 33.

Die Abbildung zeigt deutlich den Größenunterschied des Caecums unter Einfluss einer unterschiedlichen Trinklösung. Eine mit Antibiotika und Antimykotikum versetzte Trinklösung führte bei den Mäusen zu einer deutlichen Größenzunahme des Caecums.

	Sham Vehikel n=8	Sham AB n=8	CCI Vehikel n=12	CCI AB n=12
MW in (g)	0,4410	1,952	0,4781	1,733
SEM	0,02638	0,1026	0,02121	0,07998

Tabelle 3 deskriptive Statistik des Caecumgewichtes, Mittelwert (MW) in Gramm (g) und zugehöriger Standardfehler des Mittelwertes (SEM).

5.1.4. Mikrobiologische Untersuchung

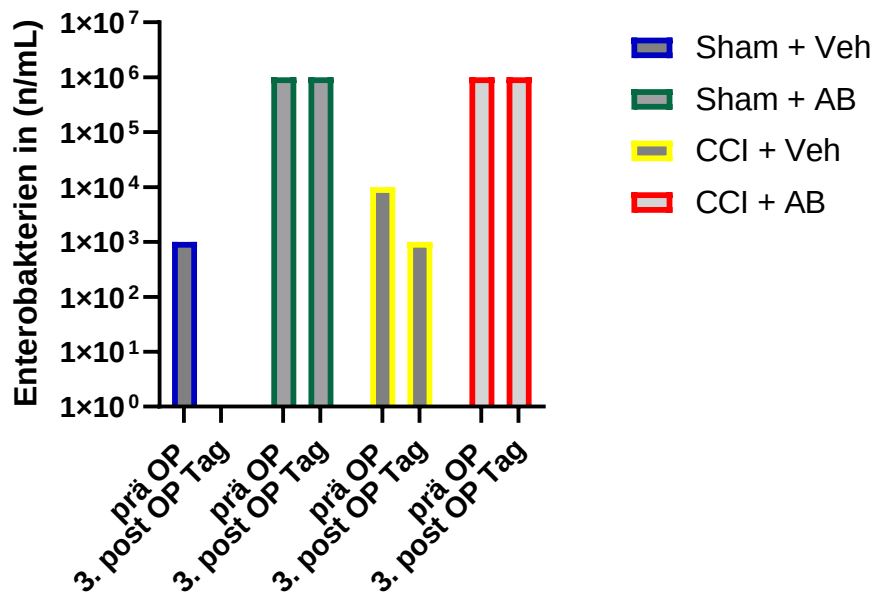


Abbildung 21 Zählung der Enterobakterien pro mL Stuhlprobe in n/mL präoperativ wie auch postoperativ am Tag der Euthanasie durch das Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universitätsmedizin Mainz verdeutlicht eine bis zu 10^3 -fache Zunahme der Enterobakterien unter antibiotischer Therapie

In der mikrobiellen Untersuchung der gewonnenen Stuhlproben der Mäuse zeigte sich durch die antibiotische Therapie im Vergleich zu den Vehikel-ernährten Tieren eine bis zum Faktor 10^3 erhöhte Anzahl von Enterobakterien, was für eine Zunahme gewisser Bakterienspezies auf Grund einer ausgelösten Dysbiose sprechen kann. Durch ein CCI ließ sich lediglich in der Vehikel-ernährten Gruppe eine Abnahme der Enterobakterien- Anzahl um den Faktor 10 nachweisen, was dafür sprechen kann, dass auch ein CCI Auswirkungen auf die mikrobielle Zusammensetzung haben kann.

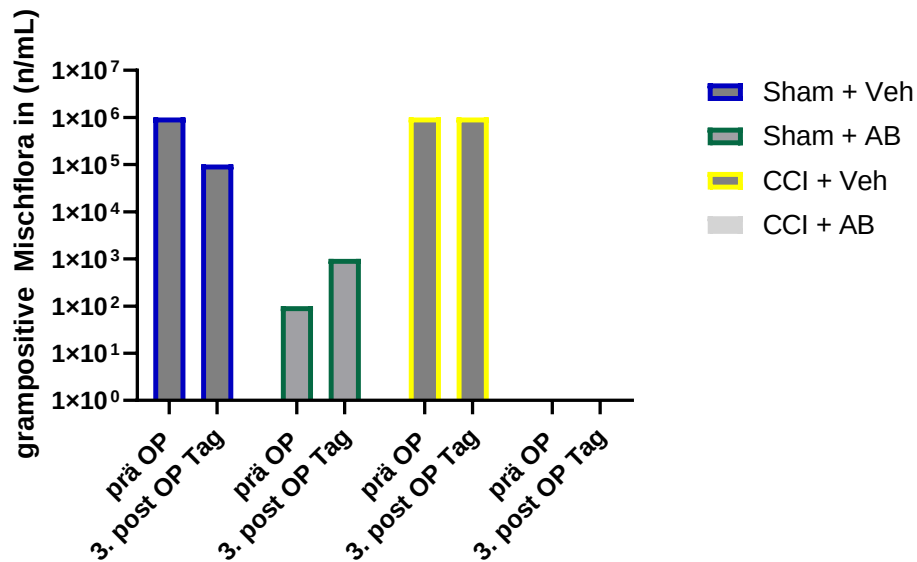


Abbildung 22 Zählung der grampositiven Bakterien pro mL Stuhlprobe in n/mL präoperativ wie auch postoperativ am Tag der Euthanasie durch das Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universitätsmedizin Mainz verdeutlicht eine bis zu 10^4 -fache Abnahme der grampositiven Flora unter antibiotischer Therapie

Im mikrobiologischen Nachweis der grampositiven Mischflora bestätigte sich eine durch die antibiotische Therapie induzierte Abnahme der grampositiven Mischflora durch Vancomycin und Amoxiclavulansäure. Ein Trauma führte zu keiner Beeinflussung der grampositiven Mischflora. Bei der CCI+AB Gruppe ließen sich sowohl prä als auch posttraumatisch keine Bakterien der grampositiven Mischflora nachweisen.

5.1.5. Rotarod

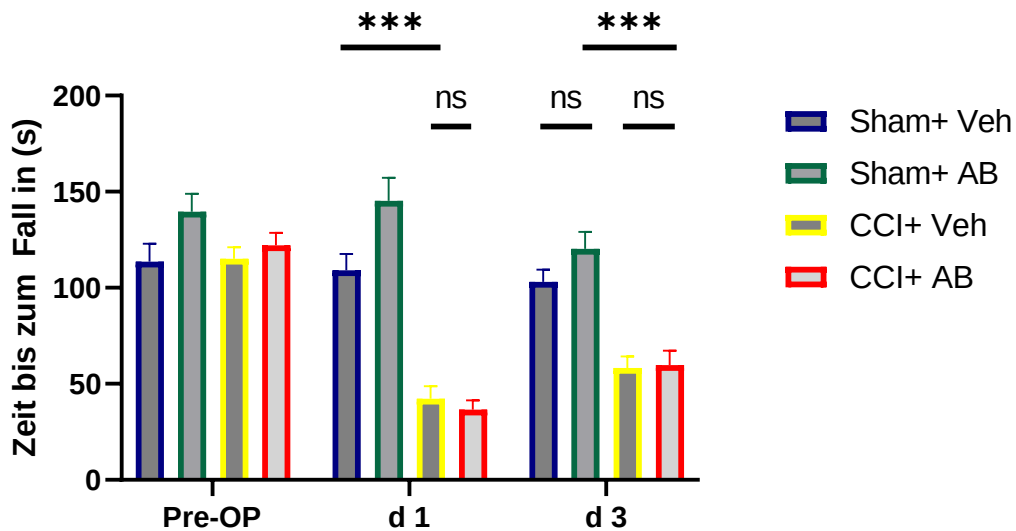


Abbildung 23 Eine Antibiotikagabe hat keinen Einfluss auf die Laufleistung im Rotarod nach CCI

Das Säulendiagramm veranschaulicht die Laufzeit auf dem Rotarod bis zum Herunterfallen in Sekunden (s). Es ist am präoperativen Tag (pre-OP), einen Tag nach Operation (d1) und am Tag der Euthanasie, dem 3. Postoperativen Tag (d3) gemessen worden. Es zeigt sich eine signifikante Reduktion der Laufleistung nach CCI. Innerhalb der CCI Gruppe zeigte eine antibiotische Therapie keinen Effekt. Sham Gruppen jeweils n=8, CCI Gruppen jeweils n=12; ns p>0,1, Signifikanz *** p<0,001, Two-Way ANOVA nach Rout-Test (Q=1%), keine Ausreißer

Im Vergleich der Gruppen in Bezug auf die Zeit bis zum Fall von dem Rotarod zeigten sich signifikante Unterschiede an den postoperativen Tagen zwischen allen Gruppen außer CCI+ Vehikel und CCI+ AB. In der Gruppe der Sham Tiere zeigten die mit Antibiotika behandelten Tiere eine längere Zeit auf dem Rotarod (d1 p= 0,0150, d2 ns). Innerhalb der CCI Gruppen zeigten die antibiotisch behandelten Tiere postoperativ keinen signifikanten Unterschied in der Zeit bis zum Fall vom Rotarod im Vergleich zu den Vehikel-ernährten Tieren. Es zeigt sich weiterhin, dass ein postoperativer deutlicher Abfall der Laufleistung am 3. postoperativen Tag beginnend kompensiert wurde und die Laufleistung wieder zunahm. Dieser nicht signifikante Effekt war in der Gruppe der antibiotikaernährten CCI Tiere größer als bei den CCI Vehikel Tieren. Insgesamt hat die Gabe von Antibiotika und Antimykotika keinen signifikanten Einfluss auf die Laufleistung nach CCI.

		Sham Vehikel n=8	Sham AB n=8	CCI Vehikel n=12	CCI AB n=12
prä-OP	MW in (s)	88,23	106,7	95,05	94,64
	SEM	4,440	6,810	4,460	2,928
Post-OP Tag 1	MW in (s)	101,5	125,0	34,38	28,96
	SEM	9,008	9,276	6,108	3,575
Post- OP Tag 3	MW in (s)	95,13	109,7	50,58	49,96
	SEM	6,116	8,238	5,915	6,524

Tabelle 4 deskriptive Statistik des Zeit bis zum Fall auf dem Rotarod; Mittelwert (MW) in Sekunden (s), und zugehöriger Standardfehler des Mittelwertes (SEM)

5.1.6. Neuroscore

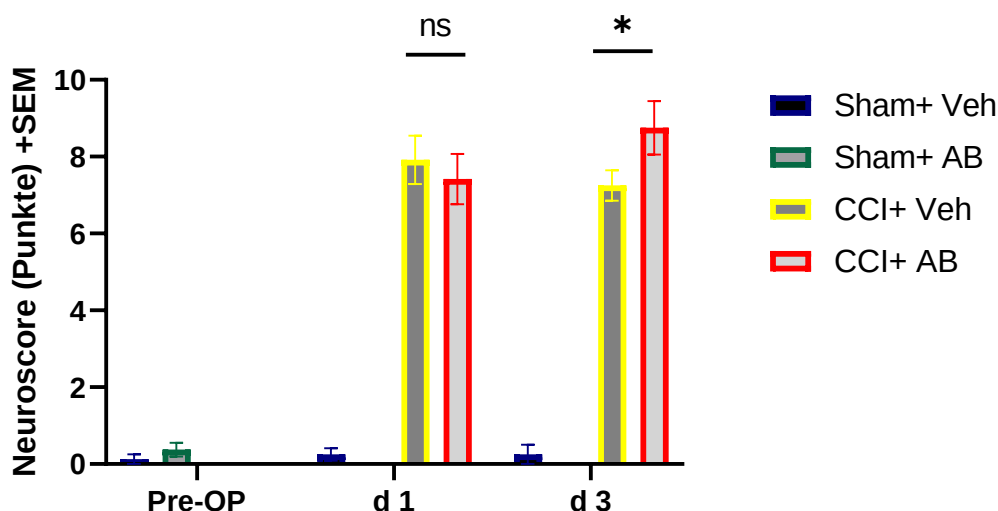


Abbildung 24 Die Antibiotische Therapie zeigt negative Auswirkungen auf das neurologische Defizit am 3. postoperativen Tag nach CCI

Das Säulendiagramm stellt den Neuroscore der Versuchstiere präoperativ und an den Tagen 1 und 3 postoperativ dar. CCI Tiere zeigten eine signifikante Zunahme der Neuroscore Punktzahl, durch eine antibiotische Therapie zeigte sich an Tag 3 ein signifikant schlechterer Neuroscore. Sham Gruppen jeweils n=8, CCI Gruppen jeweils n=12, ns p>0,1 * p<0,05, Two Way-Anova nach Rout Test (Q=1%), keine Ausreißer

Im NDS zeigten die CCI behandelten Tiere nach der Operation ein deutliches neurologisches Defizit. Sie erzielten postoperativ höhere Scores als vor der Operation, was im Zusammenhang mit dem gesetzten kortikalen Schaden steht. Zwischen den CCI Gruppen zeigten die antibiotikabehandelten Tiere keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den vehikelbehandelten Tieren an Tag 1 (p=0,8). An Tag 3 jedoch ließ sich ein signifikanter Unterschied zwischen den CCI behandelten Tieren darstellen. Die antibiotikabehandelten Tiere wiesen an diesem Tag ein signifikant höheres neurologisches Defizit als die Vehikeltiere auf (p=0,04).

		Sham Vehikel n=8	Sham AB n=8	CCI Vehikel n=12	CCI AB n=12
prä-OP	MW	0,125	0,3750	0,0	0,0
	SEM	0,125	0,1830	0,0	0,0
Post-OP Tag 1	MW	0,25	0,0	7,917	7,417
	SEM	0,1637	0,0	0,6332	0,6566
Post- OP Tag 3	MW	0,25	0,0	7,250	8,750
	SEM	0,25	0,0	0,3917	0,6977

Tabelle 5 deskriptive Statistik der Punktezahl im Neuroscore; Mittelwert (MW) in Punkten, und zugehöriger Standardfehler des Mittelwertes (SEM)

5.2. Volumetrie

5.2.1. Kontusionsvolumen

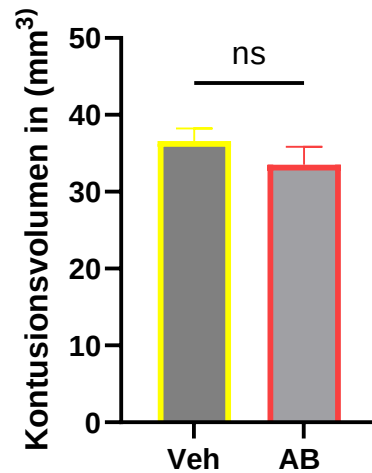


Abbildung 25 Eine antibiotische und antimykotische Therapie hat keinen Einfluss auf das Kontusionsvolumen

Das Säulendiagramm stellt das Kontusionsvolumen beider CCI Gruppen graphisch gegenüber. Es zeigt sich kein signifikanter Einfluss auf das Kontusionsvolumen durch eine antibiotische Therapie. Kontusionsvolumen in Kubikmillimeter (mm³), jeweils n=12, ns $p > 0,1$, ungepaarter t-Test.

Zur Analyse des histopathologischen Hirnschadens ist in jedem Hirnschnitt zunächst das gesamte Hirnvolumen sowie bei den CCI- Gruppen das Schadensvolumen mikroskopisch erfasst worden. Im Vergleich der Kontusionsvolumina der CCI Tiere zeigte sich im ungepaarten t-Test kein signifikanter Unterschied ($p=0,2907$) zwischen den mit Vehikellösung und den antibiotisch behandelten Tieren. Bis zum Zeitpunkt von 72 Stunden nach dem CCI lässt sich in unseren Versuchen zeigen, dass eine antibiotische Therapie keine Auswirkungen auf das Kontusionsvolumen bei weiblichen Mäusen hat.

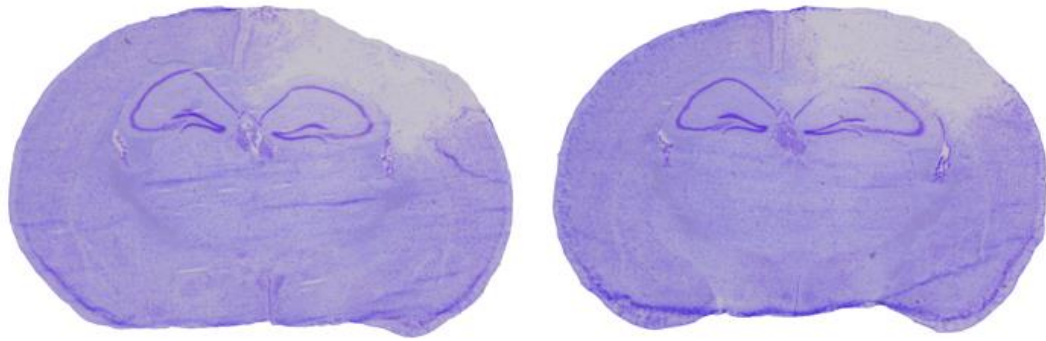


Abbildung 26: Vergleichende Darstellung des Kontusionsvolumens zwischen CCI+ AB (links, Nissl-Färbung des koronaren Hirnschnittes aus der Ebene 11, Maus 16), und CCI+Veh (rechts, Nissl-Färbung des koronaren Hirnschnittes Ebene 12, Maus 28)

	CCI Veh n=12	CCI AB n=12
MW in (mm ³)	36,59	33,51
SEM	1,626	2,342

Tabelle 6 deskriptive Statistik des Kontusionsvolumens Mittelwert (MW) in Kubikmillimetern (mm³) , und zugehöriger Standardfehler des Mittelwertes (SEM)

5.2.2. Kontralaterale Hemisphäre

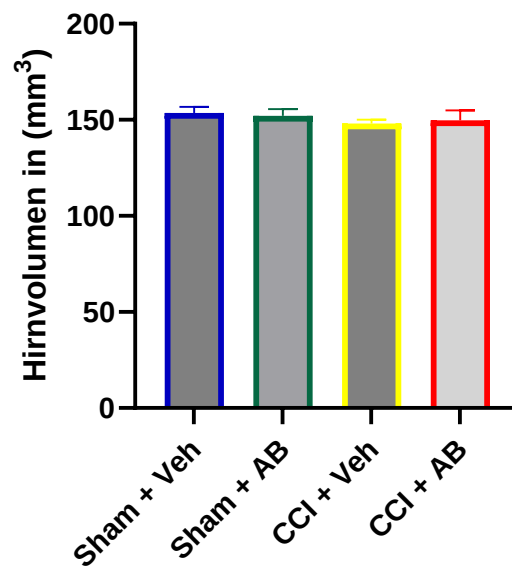


Abbildung 27 Eine antibiotische und antimykotische Therapie hat keinen Einfluss auf die Ausdehnung eines traumatischen Hirnschadens in die kontralaterale Hemisphäre

Das Säulendiagramm stellt das Volumen der kontralateralen Hemisphäre aller Gruppen graphisch gegenüber. Es zeigt sich keine Beeinflussung durch CCI oder antibiotische Therapie im Sinne eines sich ausbreitenden Sekundärschadens. Kontusionsvolumen in Kubikmillimeter (mm³), Sham Gruppen jeweils n=8, CCI Gruppen jeweils n=12, um 2 Ausreißer gereinigte Daten in der CCI+ AB Gruppe nach durchgeführtem ROUT Test (Q=1%), ns p>0,1 im One Way ANOVA.

Zur Analyse eines sich möglicherweise auch peripher des primären Schadensgebiet ausdehnenden Hirnödems ist ebenso die kontralaterale Hemisphäre in jedem Hirnschnitt vermessen worden, wobei sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen zeigte. Posttraumatisch zeigt sich kein Einfluss auf die kontralaterale Hemisphäre und auch durch eine antibiotische Therapie kommt es bei weiblichen Tieren nicht zu einer Zunahme des kontralateralen Hirnvolumens im Sinne eines Hirnödems.

	MW1	MW2	SE Diff	Signifikant	p-Wert
Sham Veh vs Sham AB	153,5	152,1	3,729	Nein	0,9788
Sham Veh vs CCI Veh	153,5	148,0	3,404	Nein	0,3784
Sham Veh vs CCI AB	153,5	148,9	3,537	Nein	0,5639
Sham AB vs CCI Veh	152,1	148,0	3,404	Nein	0,6353
Sham AB vs CCI AB	152,1	148,9	3,537	Nein	0,8086
CCI Veh vs CCI AB	148,0	148,9	3,193	Nein	0,9920

Tabelle 7 deskriptive Statistik des Hirnvolumens der kontralateralen Hemisphäre, Mittelwert (MW) in Kubikmillimetern (mm³) und zugehöriger Standardfehler des Mittelwertes (SEM).
Sham Veh n=8, Sham AB n=8, CCI Veh n=12, CCI AB n=10

5.2.3. Dickemessung der Granularzellschicht im suprapyramidalen Blatt des Gyrus dentatus in der Nissl-Färbung

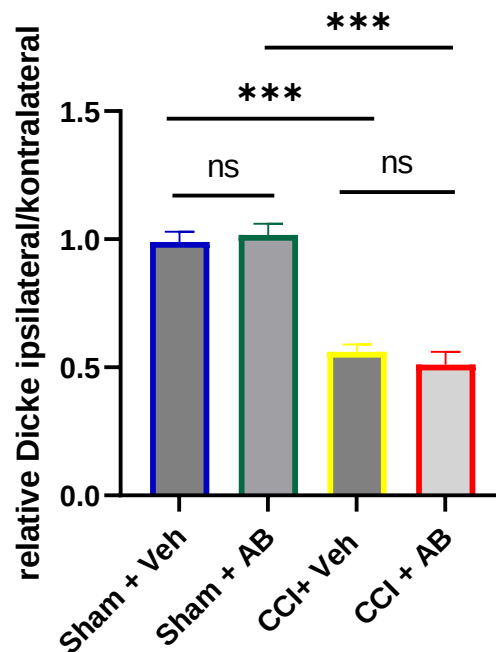


Abbildung 28 Die Gabe von Antibiotika und Antimykotikum hat keinen Einfluss auf die relative Dickenmessung der Granularzellschicht des Gyrus dentatus. Vergleich ipsilateral zu kontralateral.

Dieses Säulendiagramm vergleicht die relative Dicke der Granularzellschicht des Gyrus dentatus im Verhältnis zur kontralateralen Hemisphäre. Signifikante Reduktion der relativen Granularzellschicht im Vergleich Sham zu CCI. Innerhalb der CCI Gruppen zeigt sich keine Beeinflussung durch die antibiotische Therapie. Sham Gruppen jeweils n=8, CCI Gruppen jeweils n=12, ns p>0,1, *** p< 0,001, One Way ANOVA nach Rout- Test (Q=1%), keine Ausreißer

Die Ergebnisse der Gyrus dentatus- Dickenmessung zeigen eine hochsignifikante Reduktion der relativen Dicken im Vergleich zwischen Sham und CCI (Sham + Veh vs. CCI + Veh p< 0,0001; Sham + Veh vs. CCI + AB p< 0,0001; Sham + AB vs. CCI + Veh p< 0,0001; Sham + AB vs. CCI + AB p< 0,0001). Zwischen den Interventionsgruppen zeigt sich kein Unterschied (Sham + Veh vs. Sham + AB p= 0,9741; CCI + Veh vs. CCI + AB p= 0,7836), was bestätigt, dass es im Vergleich zwischen Vehikel und Antibiotika-Therapie im Bezug auf einen sekundären Hirnschaden nach kortikalem Trauma keine Unterschiede bezüglich des hier weiter ins Gewebe ausstrahlenden Schadens gibt.

	MW1	MW2	SE Diff	Signifikant	p-Wert
Sham Veh vs Sham AB	0,9895	1,017	0,06552	Nein	0,9741
Sham Veh vs CCI Veh	0,9895	0,5611	0,05981	Ja***	<0,0001
Sham Veh vs CCI AB	0,9895	0,5108	0,05981	Ja***	<0,0001
Sham AB vs CCI Veh	1,017	0,5611	0,05981	Ja***	<0,0001
Sham AB vs CCI AB	1,017	0,5108	0,05981	Ja***	<0,0001
CCI Veh vs CCI AB	0,5611	0,5108	0,05350	Nein	0,7836

Tabelle 8 deskriptive Statistik der relativen Dicke der Granularzellschicht des Gyrus dentatus, ipsilateral im Verhältnis zu kontralateral. Mittelwert (MW) und zugehöriger Standardfehler des Mittelwertes (SE Diff). Sham Veh n=8, Sham AB n=8, CCI Veh n=12, CCI AB n=12

5.3. Immunhistochemie

5.3.1. GFAP ipsilateral

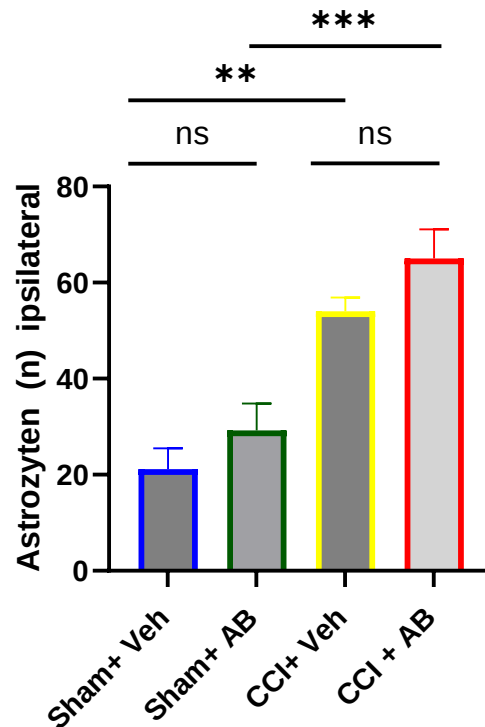


Abbildung 29 Die Gabe von Antibiotika und Antimykotikum beeinflusst die Astrozytenaktivierung nach CCI nicht.

Das Säulendiagramm veranschaulicht die Anzahl GFAP-immunopositiver Teilchen, welche nach immunhistochemischer Färbung im periläsionalen normierten Sichtfeld ausgezählt worden sind. Signifikante Astroglie nach Trauma, innerhalb der CCI Gruppen zeigt sich keine Signifikanz. Sham Gruppen jeweils $n=8$, CCI Gruppen jeweils $n=12$ ns $p>0,1$; ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, One Way ANOVA nach Rout Test ($Q=1\%$), keine Ausreißer.

Um die Astrozytenaktivierung im Sinne einer Astroglie quantifizieren zu können erfolgte die Auszählung von GFAP-Immunopositiven Partikeln im periläsionalen Gebiet nach immunhistochemischer Färbung. Ipsilateral zeigte sich bei den CCI Gruppen eine signifikant gesteigerte Anzahl im Vergleich zu den Sham-Gruppen, welches die posttraumatische Astroglie bestätigt. Im Vergleich der CCI Gruppen untereinander zeigte sich jedoch keine Signifikanz. Es zeigt sich somit keine signifikante Beeinflussung einer Astrozytenaktivierung durch antibiotische Therapie.

	MW1	MW2	SE Diff	Signifikant	p-Wert
Sham Veh vs Sham AB	21,19	29,25	7,751	Nein	0,7272
Sham Veh vs CCI Veh	21,19	54,04	7,076	Ja**	0,003
Sham Veh vs CCI AB	21,19	65,04	7,076	Ja***	<0,0001
Sham AB vs CCI Veh	29,25	54,04	7,076	Ja**	0,0065
Sham AB vs CCI AB	29,25	65,04	7,076	Ja***	<0,0001
CCI Veh vs CCI AB	54,04	65,04	6,329	Nein	0,3195

Tabelle 9 deskriptive Statistik der Auszählung GFAP-immunopositiver Teilchen nach immunhistochemischer Färbung im normierten periläsionalen Gebiet. Mittelwert (MW) und zugehöriger Standardfehler des Mittelwertes (SE Diff). Sham Veh n=8, Sham AB n=8, CCI Veh n=12, CCI AB n=12

5.3.2. GFAP kontralateral

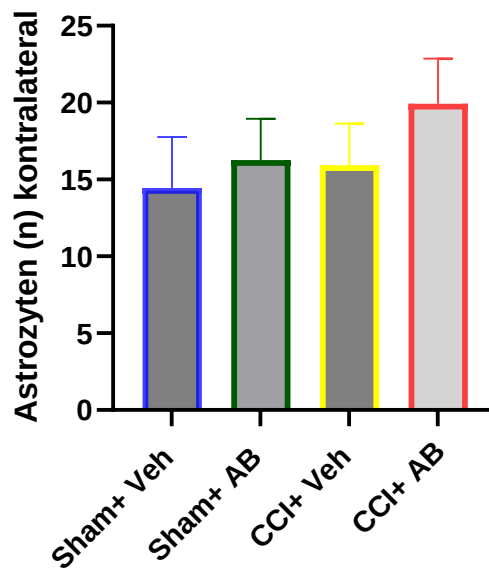


Abbildung 30 Die Gabe von Antibiotika und Antimykotikum beeinflusst die Astrozytenaktivierung in der kontralateralen Hemisphäre nicht.

Das Säulendiagramm veranschaulicht die Anzahl GFAP-immunopositiver Teilchen der kontralateralen Hemisphäre, welche nach immunhistochemischer Färbung im normierten Sichtfeld ausgezählt worden sind. Es zeigt sich keine Signifikanz. Sham Gruppen jeweils $n=8$, CCI Gruppen jeweils $n=12$ ns $p>0,1$, One Way ANOVA nach Rout Test ($Q=1\%$), keine Ausreißer.

In der Analyse der kontralateralen Hemisphäre zeigte sich keine signifikant zunehmende Astroglie nach CCI. Auch die antibiotische Therapie hatte keinen signifikanten Einfluss im Sinne einer reaktiven Astroglie der kontralateralen Astrozyten.

	MW1	MW2	SE Diff	Signifikant	p-Wert
Sham Veh vs Sham AB	14,44	16,25	4,684	Nein	0,9800
Sham Veh vs CCI Veh	14,44	15,92	4,276	Nein	0,9855
Sham Veh vs CCI AB	14,44	19,92	4,276	Nein	0,5804
Sham AB vs CCI Veh	16,25	15,92	4,276	Nein	0,9998
Sham AB vs CCI AB	16,25	19,92	4,276	Nein	0,8265
CCI Veh vs CCI AB	15,92	19,92	3,825	Nein	0,7239

Tabelle 10 deskriptive Statistik der Auszählung GFAP-immunopositiver Teilchen nach immunhistochemischer Färbung im normierten kontralateralen Gebiet. Mittelwert (MW) und zugehöriger Standardfehler des Mittelwertes (SE Diff). Sham Veh n=8, Sham AB n=8, CCI Veh n=12, CCI AB n=12

5.3.3. Iba 1- Expression ipsilateral

In Folge einer neuronalen Verletzung kommt es zur Hochregulation des kalziumbindenden Adaptermoleküls 1 (engl.: Ionized calcium-binding adaptor molecule 1; Iba 1). Dieses kann Zytoskelettproteine der Mikroglia modulieren und somit die phagozytotische Fähigkeit der Mikroglia ermöglichen [272]. Es dient dem Nachweis einer Mikrogliaaktivierung.

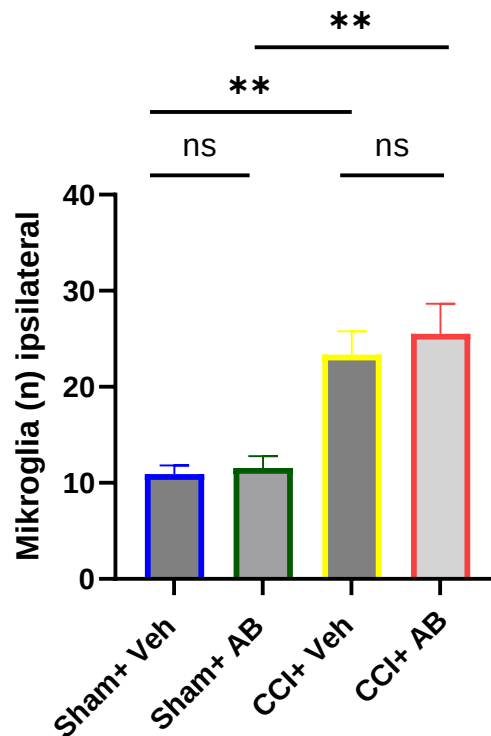


Abbildung 31 Eine antibiotische Therapie hat keinen Einfluss auf die posttraumatische Mikrogliaaktivierung im periläsionalen Gebiet.

Das Säulendiagramm veranschaulicht die Anzahl Iba1-immunopositiver Teilchen, welche nach immunhistochemischer Färbung im periläsionalen normierten Sichtfeld ausgezählt worden sind. Signifikante Mikrogliaaktivierung nach Trauma, innerhalb der CCI und auch der Sham Gruppen zeigt sich keine Signifikanz. Sham Gruppen jeweils n=8, CCI Gruppen jeweils n=12 ns p>0,1, ** p<0,01, One Way ANOVA nach Rout Test (Q=1%), keine Ausreißer

Im Nachweis Iba-1-immunopositiver Partikel ipsilateral zeigte sich zwischen CCI-Tieren und Sham-Tieren ein signifikant höherer Nachweis Iba-1-immunopositiver Partikel bei den CCI Gruppen im Sinne einer posttraumatischen Mikrogliaaktivierung. Durch eine antibiotische und antimykotische Therapie zeigte sich kein signifikanter Effekt auf die posttraumatische Mikrogliaaktivierung

	MW1	MW2	SE Diff	Signifikant	p-Wert
Sham Veh vs Sham AB	10,92	11,56	3,914	Nein	0,9984
Sham Veh vs CCI Veh	10,92	23,33	3,573	Ja**	0,0071
Sham Veh vs CCI AB	10,92	25,53	3,573	Ja**	0,0013
Sham AB vs CCI Veh	11,56	23,33	3,573	Ja*	0,0114
Sham AB vs CCI AB	11,56	25,53	3,573	Ja**	0,0021
CCI Veh vs CCI AB	23,33	25,53	3,196	Nein	0,9015

Tabelle 11 deskriptive Statistik der Auszählung Iba1-immunopositiver Teilchen nach immunhistochemischer Färbung im normierten periläsionalen Gebiet. Mittelwert (MW) und zugehöriger Standardfehler des Mittelwertes (SE Diff). Sham Veh n=8, Sham AB n=8, CCI Veh n=12, CCI AB n=12

5.3.4. Iba 1-Expression kontralateral

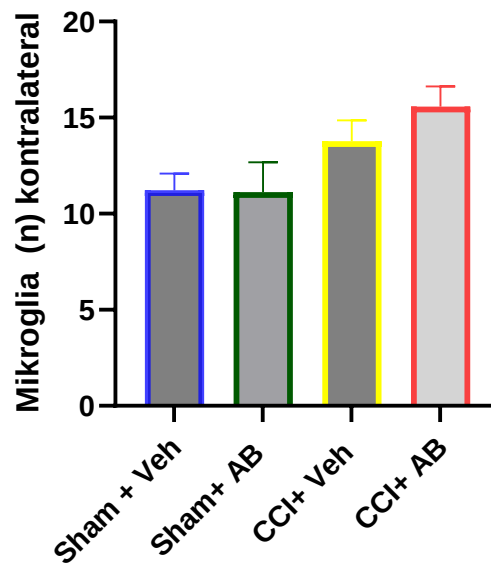


Abbildung 32 Die kontralaterale Mikrogliaaktivierung zeigte weder durch Trauma noch durch Antibiose eine signifikante Zunahme.

Das Säulendiagramm veranschaulicht die Anzahl Iba1-immunopositiver Teilchen, welche nach immunhistochemischer Färbung im kontralateralen normierten Sichtfeld ausgezählt worden sind. Nicht signifikant erhöhte Mikrogliaaktivierung nach Trauma, auch innerhalb der CCI und der Sham Gruppen zeigt sich keine Signifikanz. Sham Gruppen jeweils $n=8$, CCI Gruppen jeweils $n=12$ ns $p>0,1$, One Way ANOVA nach Rout Test ($Q=1\%$), keine Ausreißer

Auch in der kontralateralen Analyse einer erhöhten Mikrogliaaktivierung zeigten sich keine signifikanten Ergebnisse. Eine antibiotische und antimykotische Therapie hat auf die kontralaterale Mikrogliaaktivierung keinen signifikanten Einfluss.

	MW1	MW2	SE Diff	Signifikant	p-Wert
Sham Veh vs Sham AB	11,23	11,13	1,820	Nein	>0,9999
Sham Veh vs CCI Veh	11,23	13,78	1,661	Nein	0,4283
Sham Veh vs CCI AB	11,23	15,57	1,661	Nein	0,0600
Sham AB vs CCI Veh	11,13	13,78	1,661	Nein	0,3931
Sham AB vs CCI AB	11,13	15,57	1,661	Nein	0,0521
CCI Veh vs CCI AB	13,78	15,57	1,486	Nein	0,6272

Tabelle 12 deskriptive Statistik der Auszählung Iba1-immunopositiver Teilchen nach immunhistochemischer Färbung im normierten kontralateralen Feld. Mittelwert (MW) und zugehöriger Standardfehler des Mittelwertes (SE Diff). Sham Veh n=8, Sham AB n=8, CCI Veh n=12, CCI AB n=12

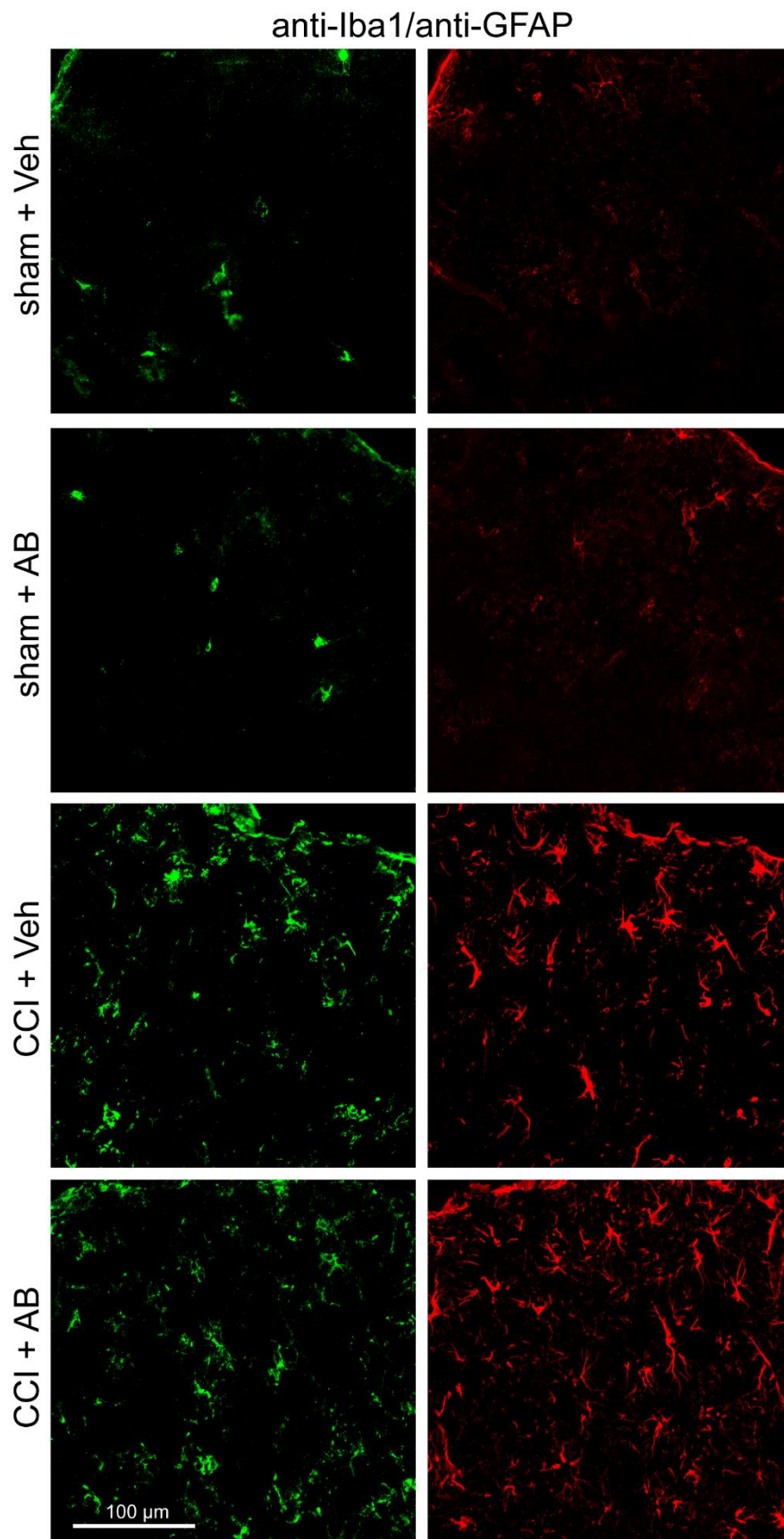


Abbildung 33 exemplarische Bilder der Iba1 (linke Spalte) und GFAP (rechte Spalte)-immunopositiven Teilchen der untersuchten Hirnschnitte. Dargestellt ist das ipsilaterale periläsionale Feld der CCI Tiere und der anatomisch analogen Region der Sham Tiere, Skala 100 μ m. Deutliche Zunahme der GFAP wie auch Iba1-Immunantwort in den CCI Tieren. Keine signifikanten Auswirkungen einer antibiotischen/antimykotischen Therapie

5.4. Molekularbiologische Ergebnisse der Proteinanalyse

5.4.1. Westernblot

5.4.1.1. GFAP

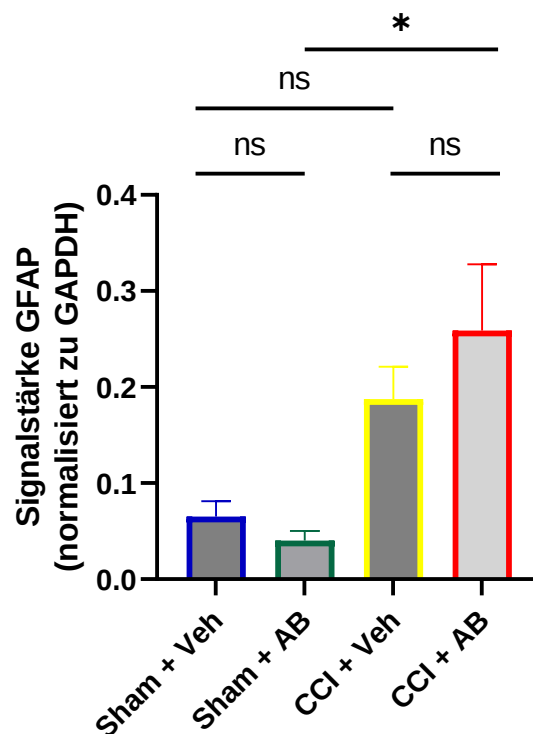


Abbildung 34 Abbildung 35 Die Gabe von Antibiotika und Antimykotikum hat keinen Einfluss auf die Expression von GFAP

Dieses Säulendiagramm stellt die Signalstärke des exprimierten GFAP normalisiert zur GAPDH-Signalstärke am 3. postoperativen Tag nach Euthanasie dar. Signifikant erhöhte GFAP-Expression posttraumatisch. Innerhalb der CCI Gruppe keine Signifikanz. ns $p > 0,1$, * $p < 0,05$, In den Sham Gruppen $n=8$, in den CCI Gruppen $n=12$, One Way ANOVA nach Rout- Test ($Q=1\%$), keine Ausreißer

Im zu GAPDH normalisierten Nachweis von GFAP zeigte sich ein signifikant höherer Nachweis in der CCI AB Gruppe im Vergleich zu Sham Veh wie auch CCI AB im Vergleich zu Sham AB. Es zeigt sich eine traumatisch induzierte Astrozytenaktivität vor allem in der antibiotisch therapierten Gruppe der CCI Tiere. Innerhalb der CCI Gruppen zeigte sich in der AB- Gruppe ein vermehrter Nachweis von GFAP jedoch ohne Signifikanz.

	MW1	MW2	MW Diff	SE Diff	Signifikant	p-Wert
Sham Veh vs Sham AB	0,06504	0,04003	0,02501	0,07412	Nein	0,9865
Sham Veh vs CCI Veh	0,06504	0,1877	-0,1226	0,06888	Nein	0,2997
Sham Veh vs CCI AB	0,06504	0,2589	-0,1939	0,06766	Ja*	0,0337
Sham AB vs CCI Veh	0,04003	0,1877	-0,1476	0,06888	Nein	0,1596
Sham AB vs CCI AB	0,04033	0,2589	-0,2189	0,06766	Ja*	0,0135
CCI Veh vs CCI AB	0,1877	0,2589	-0,07127	0,06188	Nein	0,6606

Tabelle 13 deskriptive Statistik des GFAP-Nachweises normalisiert zur GAPDH. Mittelwert (MW) und zugehöriger Standardfehler des Mittelwertes (SE Diff). Sham Veh n=8, Sham AB n=8, CCI Veh n=11, CCI AB n=12

5.4.1.2. Spectrin

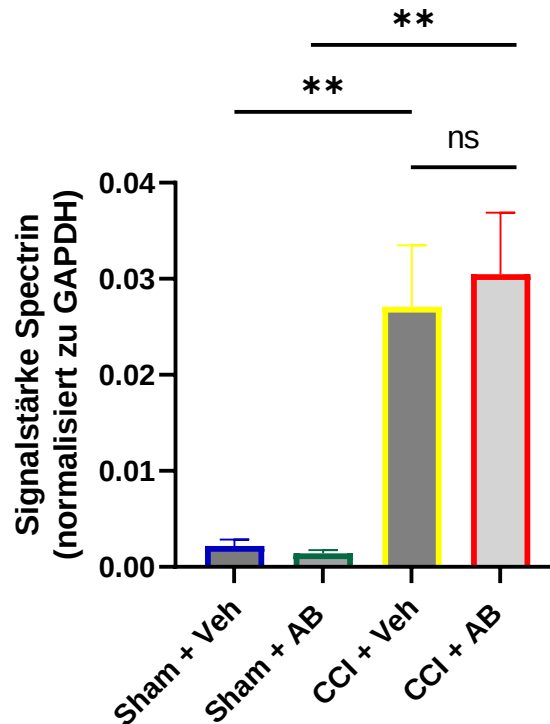


Abbildung 36 Die Gabe von Antibiotika und Antimykotikum hat keinen Einfluss auf die Expression von Spectrin

Dieses Säulendiagramm stellt die Signalstärke des exprimierten Spectrins normalisiert zur GAPDH-Signalstärke am 3. postoperativen Tag nach Euthanasie dar. Signifikant erhöhte Spectrinexpression posttraumatisch. Innerhalb der CCI Gruppe keine Signifikanz. ns $p > 0,1$, ** $p < 0,01$, in den Sham Gruppen $n=8$, in den CCI Gruppen $n=12$, One Way ANOVA nach Rout- Test ($Q=1\%$), keine Ausreißer

Im Nachweis des Spectrins im Verhältnis zum GAPDH zeigten sich zwischen den Sham und CCI Gruppen signifikante Unterschiede im Sinne einer erhöhten Spectrin-Expression in den CCI Gruppen. Innerhalb der CCI Gruppe zeigte die antibiotische Behandlung keinen signifikanten Effekt. Eine antibiotische und antimykotische Therapie hat demnach keinen erhöhten Spectrin-Nachweis im Sinne einer vermehrten Neuronendestruktion zur Folge.

	MW1	MW2	MW Diff	SE Diff	Signifikant	p-Wert
Sham Veh vs Sham AB	0,002198	0,001404	0,0007948	0,008423	Nein	0,9997
Sham Veh vs CCI Veh	0,002198	0,02710	-0,02490	0,007827	Ja*	0,0155
Sham Veh vs CCI AB	0,002198	0,03049	-0,02829	0,007689	Ja**	0,0042
Sham AB vs CCI Veh	0,001404	0,02710	-0,02569	0,007827	Ja*	0,0120
Sham AB vs CCI AB	0,001404	0,03049	-0,02908	0,007689	Ja**	0,0031
CCI Veh vs CCI AB	0,02710	0,03049	-0,003389	0,007032	Nein	0,9626

Tabelle 14 deskriptive Statistik des Spectrin-Nachweises normalisiert zur GAPDH. Mittelwert (MW) und zugehöriger Standardfehler des Mittelwertes (SE Diff). Sham Veh n=8, Sham AB n=8, CCI Veh n=11, CCI AB n=12

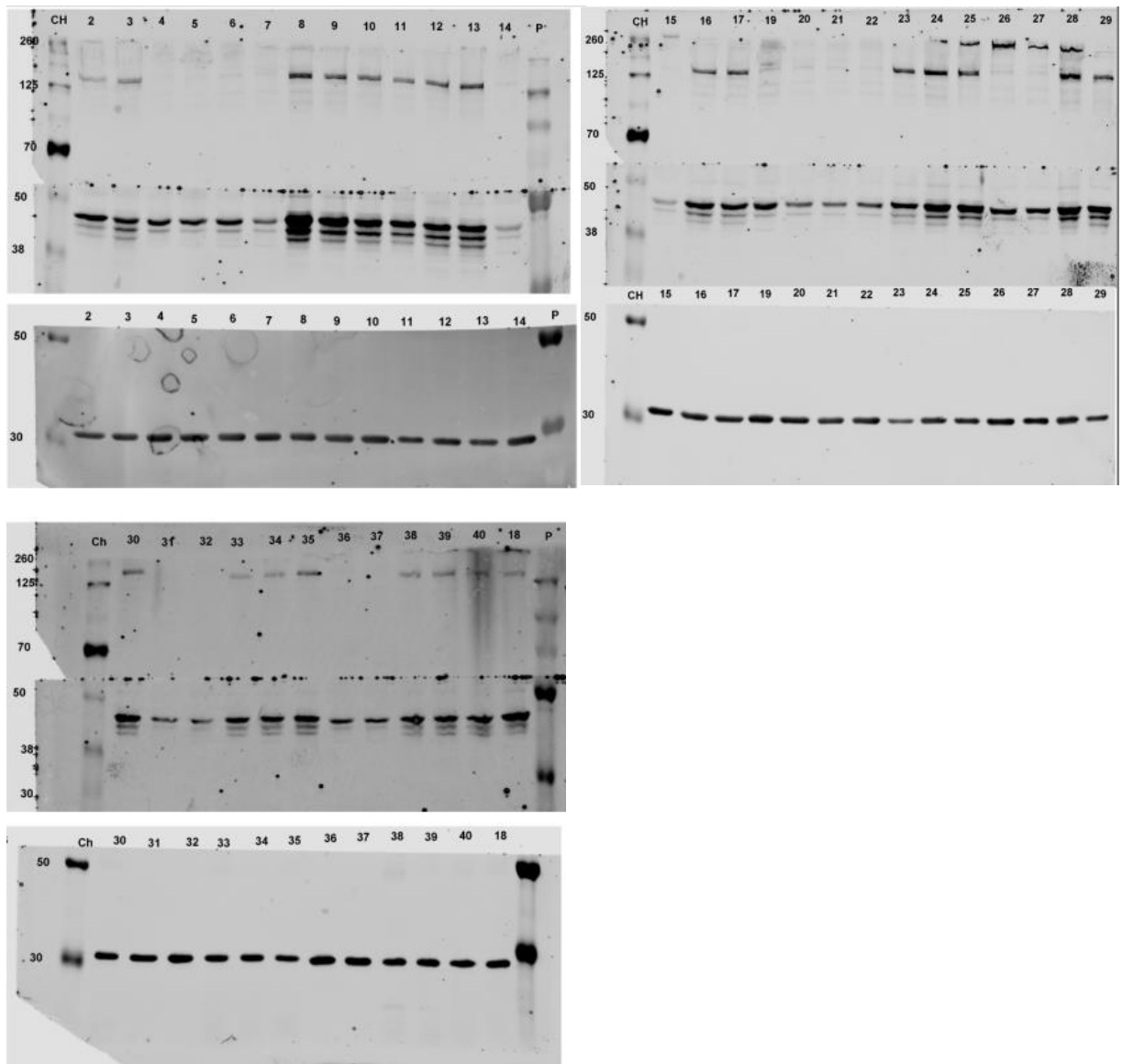


Abbildung 37 Westernblots zur GFAP und Spectrin Quantifizierung, normalisiert zur GAPDH Expression im periläsionalen Feld der CCI Tiere und analogen Feld der Sham Tiere 72 Stunden postinterventionell

Die aufgeführten Bilder zeigen die durchgeführten Westernblots zur Quantifizierung der GFAP und Spectrin Expression im periläsionalen Feld der CCI Gruppen sowie im analogen Feld der Sham Tiere 72 Stunden posttraumatisch. Die GFAP-Bande lässt sich bei 50 kDa finden, die Spectrin-Bande bei 125 kDa und die im jeweiligen Bild unten angeführte GAPDH-Bande bei 30 kDa. Die optische Dichte der Banden wurde zu der der GAPDH-Expression normalisiert.

5.4.2. IgG- Dotblot

Der Nachweis von IgG diente in dieser Arbeit zur Quantifizierung einer gestörten Blut-Hirn-Schranke.

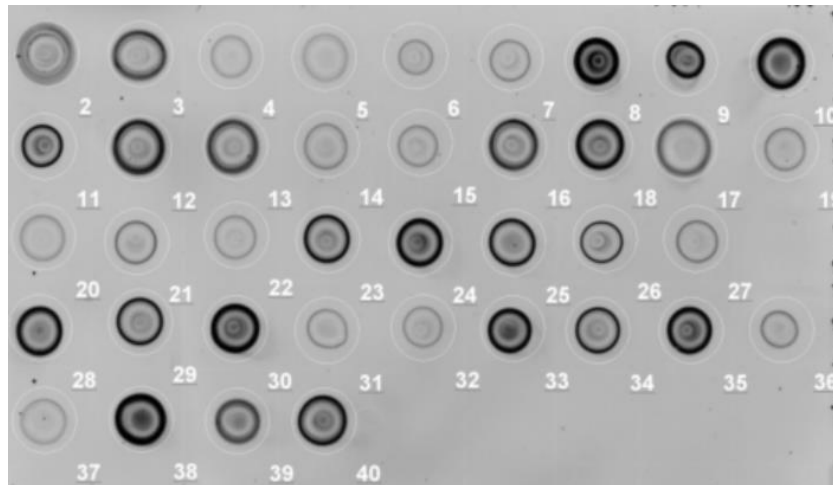


Abbildung 38: Photographie des IgG Dotblots vor photometrischer Quantifizierung der optischen Dichte. Proben mit Maus-Nummer beschriftet (CCI AB Gruppe: Proben Nummer 8,9,10,16,17,18,23,24,25,33,34,35), CCI Veh Gruppe: Proben Nummer 2,3,11,12,13,28,29,30,38,39,40).

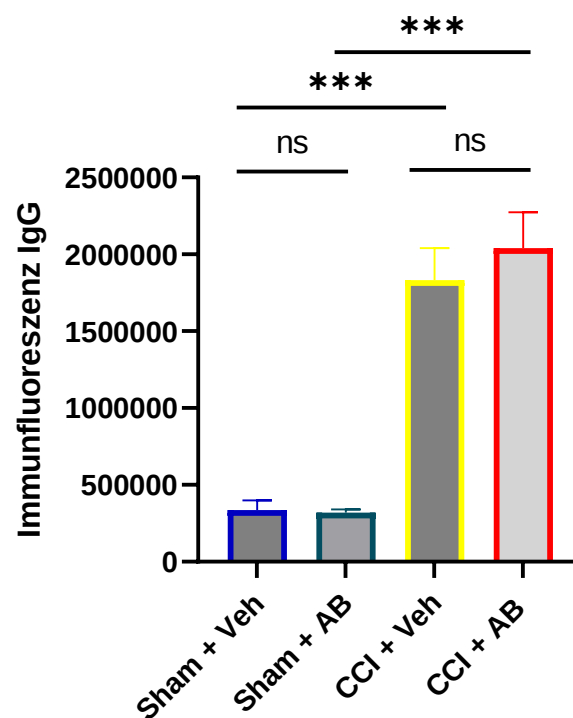


Abbildung 39 Eine antibiotische Therapie zeigt keine signifikanten Auswirkungen auf den posttraumatischen IgG- Nachweis

Das Säulendiagramm stellt den mittels Photometrie gemessenen Nachweis von Immunglobulin G 72 Stunden postoperativ dar. Es zeigt sich ein postoperativ signifikanter Anstieg des IgG Nachweises. Innerhalb der CCI Gruppen zeigte sich keine Signifikanz. ns $p > 0,1$, *** $p < 0,001$, Sham + Vehikel um einen Ausreißer bereinigt auf $n=7$, Sham + AB $n=8$, in den CCI Gruppen $n=12$, One Way ANOVA nach Rout- Test ($Q=1\%$), ein Ausreißer

Im Dotblot ergaben sich für IgG je nach Versuchsgruppe unterschiedliche Signalstärken der Immunfluoreszenz. Es zeigten sich signifikante Unterschiede im Vergleich Sham zu CCI als Nachweis einer posttraumatischen BHS-Störung. Innerhalb der Sham sowie auch innerhalb der CCI Gruppen zeigte sich keine Signifikanz, sodass sich in unseren Experimenten kein Effekt einer antibiotischen oder antimykotischen Therapie auf die Integrität der BHS zeigen ließ.

	MW1	MW2	MW Diff	SE Diff	Signifikant	p-Wert
Sham Veh vs Sham AB	275311	319153	-43842	305855	Nein	0,9989
Sham Veh vs CCI Veh	275311	1833064	-1557753	285729	Ja***	<0,0001
Sham Veh vs CCI AB	275311	2041634	-1766323	281061	Ja***	<0,0001
Sham AB vs CCI Veh	319153	1833064	-1513912	274599	Ja***	<0,0001
Sham AB vs CCI AB	9,500	2041634	-1722481	269739	Ja***	<0,0001
CCI Veh vs CCI AB	1833064	2041634	-208570	246684	Nein	>0,9999

Tabelle 15 deskriptive Statistik des Immunglobulin G Nachweises, Mittelwert (MW) und zugehöriger Standardfehler des Mittelwertes (SE Diff). Sham Veh n=7, Sham AB n=8, CCI Veh n=12, CCI AB n=10

5.5. Ergebnisse der PCR

5.5.1. TSPO

Ein Marker zur Objektivierung der mitochondrialen Dysfunktion ist das Translokatorprotein (TSPO), ein 18 kilo Dalton (kDa) großes Membranprotein der äußeren Mitochondrienmembran, welches in Folge zerebraler Entzündungsreaktionen oder Traumata hochreguliert wird. Mitochondriale Affektion im Rahmen des SHT zeigt sich vor allem durch eine erhöhte mitochondriale Aktivität in proliferierenden Mikroglia, erhöhter mitochondrialer Permeabilität, Freisetzung von Cytochrom C, Aktivierung von Caspasen, erniedrigte ATP Level und schließlich den Zelltod in Neuronen [273].

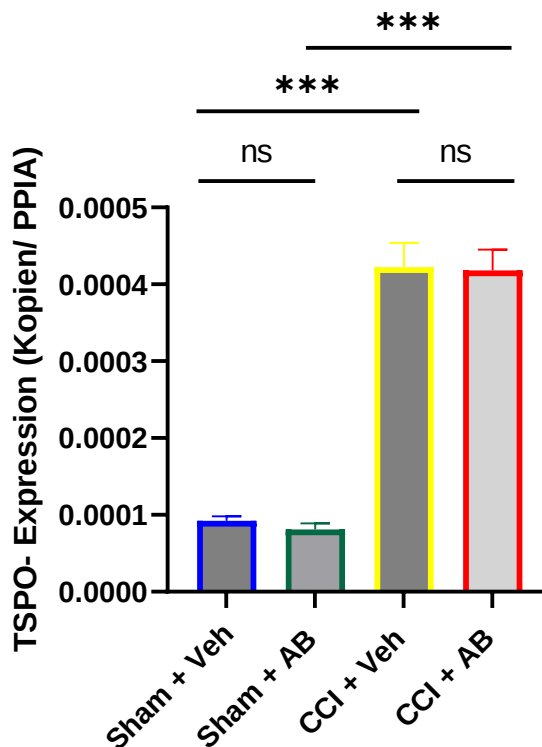


Abbildung 40 Die Gabe von Antibiotika und Antimykotikum hat keinen Einfluss auf die TSPO-Expression

Das Säulendiagramm zeigt die Anzahl der mRNA Kopien der qRT-PCR von TSPO am Tag der Euthanasie, 72 Stunden nach durchgeführter Operation. Es erfolgte eine Normalisierung auf das Housekeeping Gen PPIA. Signifikante posttraumatisch zunehmende TSPO Expression. Innerhalb der CCI Gruppen keine Signifikanz. Sham Gruppen n=8, CCI Gruppen n=12, ns p>0,1, *** p<0,001, One Way ANOVA nach Rout Test (Q=1%), keine Ausreißer

Im Nachweis der TSPO-Expression zeigte sich in den Gruppenvergleichen ein signifikanter Unterschied zwischen CCI und Sham- Gruppen. Innerhalb der CCI Gruppen zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied.

	MW1	MW2	Mw Diff	SE Diff	Signifikant	p-Wert
Sham Veh vs Sham AB	0,00009215	0,00008101	0,00001114	0,00004051	Nein	0,9926
Sham Veh vs CCI Veh	0,00009215	0,0004222	-0,0003300	0,00003698	Ja***	<0,0001
Sham Veh vs CCI AB	0,00009215	0,0004183	-0,0003261	0,00003698	Ja***	<0,0001
Sham AB vs CCI Veh	0,00008101	0,0004222	-0,0003412	0,00003698	Ja***	<0,0001
Sham AB vs CCI AB	0,00008101	0,0004183	-0,0003372	0,00003698	Ja***	<0,0001
CCI Veh vs CCI AB	0,0004222	0,0004183	0,000003917	0,00003308	Nein	0,9994

Tabelle 16 deskriptive Statistik der zu PPIA normalisierten TSPO Expression. Mittelwert (MW) und zugehöriger Standardfehler des Mittelwertes (SE Diff). Sham Veh n=8, Sham AB n=8, CCI Veh n=12, CCI AB n=10

5.5.2. CD74

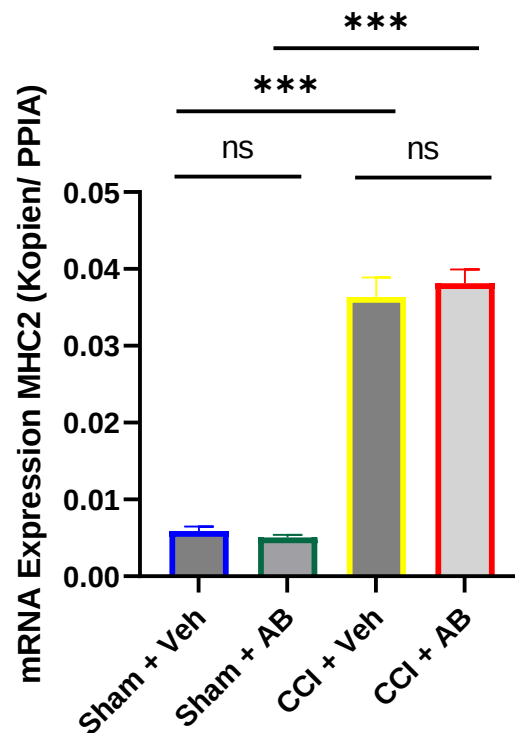


Abbildung 41 Die Gabe von Antibiotika und Antimykotikum hat keinen Einfluss auf die posttraumatische CD74-Expression

Das Säulendiagramm stellt die Anzahl der mRNA Kopien von CD74 normalisiert zur PPIA-Expression 72 Stunden posttraumatisch dar. Es zeigt sich eine signifikant zunehmende MHC 2 Expression nach Trauma. Innerhalb der CCI Gruppen zeigt sich keine Signifikanz. Sham Gruppen n=8, CCI Gruppen n=12, ns p>0,1, *** p<0,001, One Way ANOVA nach Rout Test (Q=1%), keine Ausreißer

CD74 kodiert für ein Chaperon, welches für die Faltung der MHC2-Proteinkomplexe verantwortlich ist und daher zum Nachweis der MHC-2-Aktivität genutzt wird. Der Nachweis der MHC-2- Aktivität wird hier zur Quantifizierung der Mikroglia-Aktivität genutzt. In der Analyse der CD74- Expression zeigte sich erneut zwischen den sham und CCI Gruppen ein signifikanter Unterschied, was der posttraumatischen Mikroglia-Aktivierung entspricht. Durch eine antibiotische und antimykotische Therapie zeigte sich innerhalb der CCI oder Sham Gruppen jedoch kein signifikanter Unterschied der Mikrogliaaktivierung.

	MW1	MW2	MW Diff	SE Diff	Signifikant	p-Wert
Sham Veh vs Sham AB	0,005900	0,005053	0,0008475	0,0005980	Nein	0,5280
Sham Veh vs CCI Veh	0,005900	0,03634	-0,03044	0,002990	Ja***	<0,0001
Sham Veh vs CCI AB	0,005900	0,03816	-0,03226	0,002185	Ja***	<0,0001
Sham AB vs CCI Veh	0,005053	0,03634	-0,03129	0,003302	Ja***	0,0001
Sham AB vs CCI AB	0,005053	0,03816	-0,03311	0,001816	Ja***	<0,0001
CCI Veh vs CCI AB	0,03634	0,03816	-0,001817	0,003945	Nein	0,9661

Tabelle 17 deskriptive Statistik der zu PPIA normalisierten MHC2 Expression. Mittelwert (MW) und zugehöriger Standardfehler des Mittelwertes (SE Diff). Sham Veh n=8, Sham AB n=8, CCI Veh n=12, CCI AB n=10

6. Diskussion

6.1. Diskussion der Methoden

6.1.1. Übertragbarkeit des murinen Experiments auf den Menschen

Fraglich ist, inwieweit sich die Ergebnisse der Studie auf die menschliche Klinik übertragen lassen [274]. Das experimentelle SHT an der Maus dient der pathophysiologischen Grundlagenforschung, ist aber in seinem Transfer auf den menschlichen Organismus limitiert. Zwar zeigen Mausmodelle viele Überschneidungen in Bezug auf die physiologische und anatomisch-strukturelle Beschaffenheit mit dem menschlichen traumatischen Hirnschaden, zeigen sich die beeinflussenden Bedingungen des menschlichen Schädelhirntraumas doch deutlich inhomogener [274]. Die Rahmenbedingungen bei einem Mausmodell sind für jede Maus einheitlich. Sie besitzen die gleiche genetische Ausstattung, erhielten ein standardisiertes Trauma und gleiches Futter beziehungsweise Trinken sowie eine einheitliche posttraumatische Betreuung. Die Verletzungen und die daraus folgenden Schäden sind somit weitestgehend homogen und deshalb vergleichbar. Ein Schädelhirntrauma beim Menschen ist dagegen sehr heterogen. Sowohl die Art, der Ort und die Schwere des Traumas, als auch der Genotyp, die Lebensweise und der gesundheitliche Zustand des jeweiligen Menschen zum Zeitpunkt des Traumas unterscheiden sich sehr. Es ist beeinflussbar durch zum Beispiel Vorerkrankungen, Hämatome, Hypotonie, Ischämie und Medikamentengebrauch [19]. Auch ein fortgeschrittenes Alter, vor allem ein Alter >75 Jahren, ist ein Risikofaktor für auftretende Komorbiditäten und führt zu höheren Raten an Komplikationen, einer längeren Dauer des Krankenhausaufenthalts und eingeschränkten funktionellen Ergebnissen sowie gesteigerter Mortalität [275, 276]. Bei Mäusen ließ sich vor allem bei gealterten Tieren zeigen, dass eine periphere LPS-Applikation zu hyperreaktiven Mikroglia mit erhöhter Expression von IL-1 β , IL10 und TLR-2 führte. Vor allem bei älteren Tieren führte die Gabe peripheren LPS zu einer überproportionalen neuroinflammatorischen Reaktion mit längerem krankheits- und depressionsähnlichem Verhalten [277]. Ältere Mäuse zeigten nach experimentellem CCI eine schlechtere neurologische Funktion und höhere Sterblichkeitsrate als die jungen Tiere, bei gleichen Kontusionsvolumina. Vor allem die jungen Mäuse zeigten jedoch auch eine T-Zell Migration in beiden Hemisphären, während bei den älteren Tieren vornehmlich eine neuroinflammatorische Reaktion der ipsilateralen Hemisphäre zu beobachten war [278].

Weiterhin spielt auch die Erstversorgung wie auch Langzeitversorgung mittels additiver Maßnahmen wie Physiotherapie, Ergotherapie, Logopädie nach Trauma eine große Rolle. Das SHT an sich umfasst heterogene Pathologien fokaler wie auch diffuser Art im Sinne einer andauernden Neuroinflammation, weshalb eine Vereinfachung und Generalisierung auf Grund der Vielfalt des menschlichen SHT schwierig ist [279]. Die kognitiven Schäden, die vor allem zu langfristig nachweisbaren Verhaltensdefiziten führen, und zu den bedeutenden sowohl gesundheitlichen wie auch sozioökonomischen Folgen nach SHT beim Menschen führen, sind im Mausmodell nicht umfassend erkennbar [19].

Auch das Mikrobiom der Maus und des Menschen unterscheiden sich im Sinne der vorherrschenden Gattungen. Aus funktioneller Sicht jedoch scheinen sie sich ähnlich zu sein [280]. Eine Übertragbarkeit der Auswirkungen bestimmter Bakteriengattungen, welche sich im murinen Modell zeigen lassen, auf die menschliche Klinik ist somit limitiert aber möglich. Bei Ratten und noch viel mehr menschlichen Primaten wie den Schimpansen ließ sich im Vergleich zu Mäusen eine dem Menschen ähnlichere mikrobielle Zusammensetzung zeigen. Auch im Hinblick auf ethische Limitationen könnte es sinnvoll sein, weiterhin Ratten-Tier-Modelle zu nutzen. Bezüglich der gastrointestinalen Anatomie zeigen sich ebenso deutliche Unterschiede. So zeigen Mäuse ein kleineres Größenverhältnis des Dünndarmes zum Dickdarm als Menschen. Bei Menschen zeigt sich ein dem Dickdarm um den Faktor sieben längerer Dünndarm, wohingegen bei Mäusen der Dünndarm lediglich 2,5-mal so lang ist wie das Kolon. Weiterhin besitzen Mäuse keinen Appendix, welcher vor allem beim Menschen wichtige immunologische Funktionen abbildet und ein mikrobielles Reservoir darstellt, wohingegen das Caecum bei Mäusen wiederum deutlich ausgeprägter ist als bei Menschen [281].

Einem Tiermodell gelingt es insgesamt nur bedingt, alle möglichen Faktoren, die beim Menschen Einfluss auf den Schaden und das neurologische Outcome nehmen, abzubilden. Die Übertragbarkeit des experimentellen SHT der Maus auf den Menschen ist somit limitiert, dient jedoch der Grundlagenforschung.

6.1.2. Beurteilbarkeit der Langzeitfolgen

Gerade im Hinblick auf das langfristige Outcome und den bedeutenden Einfluss des Sekundärschadens, der sich Stunden bis Monate nach erfolgtem Trauma entwickelt, ist es womöglich sinnvoll, weitere Studien durchzuführen, die länger als 72h nach

Trauma beobachten. In dieser Studie sind demnach nicht die endgültigen Ausprägungen des gesetzten CCI zu sehen. Dennoch lässt sich erkennen, dass nach CCI ein ausgeprägter neuronaler Verlust und Neuroinflammation vorhanden sind. Um weiter zu verstehen, in wie weit die traumatisch induzierte Neuroinflammation durch die Dysbiose im Verlauf aggraviert wird oder die antibiotische Therapie neuroprotektive Effekte zeigt, wäre es sinnvoll, Studien durchzuführen, welche eine längere posttraumatische Phase als 72 h abbilden, vor allem weil Studien zeigten, dass sich Veränderungen der gastrointestinalen Barriereigenschaften und Physiologie bis zu vier Wochen nach erfolgreichem Trauma nachweisen lassen, was weiterhin Einfluss auf den sekundären Hirnschaden und das Outcome nach SHT haben kann. Vor allem auch bei weiblichen Mäusen ist der Höhepunkt der Neurodegeneration 14 Tage nach Trauma zu verzeichnen gewesen [16].

6.1.3. Trinkmenge

Auf Grund der gemeinsamen Haltung mehrerer Versuchstiere in einer gemeinsamen Box ist nicht zu differenzieren welche Maus welche Menge an antibiotischer Trinklösung zu sich genommen hat. Die Gewichtsanalyse zeigte zum einen eine konstante Gewichtszunahme aller Tiere bis zum traumatischen Ereignis, die mikrobiellen Analysen zeigten eine Auswirkung auf die im Stuhl nachgewiesenen Bakterienkulturen. Ob aber durch die aufgenommene Trinkmenge ein ausreichender Wirkspiegel erreicht worden ist, ist so nicht genau zu sagen. Auch trinken die Tiere mit erhaltenem CCI postinterventionell auf Grund des reduzierten Allgemeinzustandes deutlich weniger als die Sham Tiere, wodurch eine Beeinflussung in Folge einer antibiotischen Therapie bei den CCI- Tieren limitiert ist.

6.1.4. Granularzellschicht

Im Rahmen des sekundären Hirnschadens nach traumatischer Hirnverletzung kommt es unter anderem zu kognitiven Funktionsstörungen im Sinne gestörter Lernvorgänge, posttraumatischer Gedächtnisdefizite und Beeinflussung höherer kognitiver Funktionen, welche durch pathophysiologische Vorgänge im Hippocampus zu begründen sind [282]. Nach experimentellem CCI lässt sich auch im Gyrus dentatus des Hippocampus vor allem ein Untergang unreifer Neuronen zeigen, wohingegen reife Neuronen verschont zu bleiben scheinen. Im Gegensatz zur offensichtlichen kortikalen Gewebeschädigung nach CCI ließ sich in Studien im Hippocampus bei weitestgehend intakter Architektur lediglich eine Reduktion der Granularzellschicht des

ipsilateralen Gyrus dentatus mit ausgeprägtem Untergang dendritischer Fortsätze wie auch eine Reduktion der Synapsendichte nachweisen [282]. Weiterhin zeigten sich Hinweise auf eine verminderte Fähigkeit der Synapsenneubildung verschonter Neurone nach CCI sowie eine verminderte neuronale Erregbarkeit der vorhandenen Körnerzellen [282]. Der Rückgang kognitiver Leistungsfähigkeit, welcher bei Epilepsie aber auch alternden Gehirnen oder neurodegenerativen Erkrankungen wie zum Beispiel Alzheimer beobachtet wird, korreliert hierbei mit dem Verlust hippocampaler Synapsen des erwachsenen Gehirnes [283, 284]. Die Messung der Körnerzellschicht im Gyrus dentatus diente in diesen Versuchen zur Einschätzung der Ausbreitung des Sekundärschadens in umliegendes Hirngewebe. In unseren Ergebnissen zeigt sich eine signifikante posttraumatische Reduktion der Granularzellschicht des Gyrus dentatus. Eine signifikante Beeinflussung durch die Gabe von Antibiotika und Anitimykotikum zeigte sich jedoch nicht. Erfolgte Studien zeigten jedoch, dass bereits ein leichtes CCI zu anhaltenden räumlichen Gedächtnisdefiziten führen kann, ohne dass sich neuronaler Zelltod oder eine axonale Schädigung im Hippocampus nachweisen lässt [285]. Es lässt sich demnach vermuten, dass auch noch andere Faktoren außer des neuronalen Zelltodes im Sinne einer reduzierten Körnerzellschicht des suprapyramidalen Blattes des Gyrus dentatus zur Beeinträchtigung des Lernens und des Gedächtnisses beitragen. Interessant wäre hier gegebenenfalls auch die Beobachtung einer posttraumatischen Reorganisation und Rehabilitation männlicher Tiere im Vergleich zu weiblichen.

6.1.5. Integrität der BHS

TSPO als ein mitochondriales Membranprotein, welches in physiologischen Zuständen nur minimal im zerebralen Gewebe nachweisbar ist, sich jedoch nach Trauma oder inflammatorischen Prozessen vermehrt vor allem in Mikroglia exprimiert zeigt, dient hier als Indikator einer erhöhten Permeabilität der BHS [286]. In unseren Versuchen zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Vergleich Sham zu CCI. Ein Trauma führt demnach zu einer Beeinträchtigung der BHS. Dass auch die mikrobielle Dysbiose die BHS beeinflusst, zeigten Studien [287]. So zeigte sich in einer Studie an männlichen Mäusen eine Reduktion der IL1 β , TSPO und MHC2 Expression sowie ein verminderter IgG Nachweis in mikrobiomdepletierten Mäusen nach CCI und wurde in Verbindung mit einer posttraumatisch geringeren Beeinträchtigung der Integrität der BHS durch antibiotische Therapie gebracht [17]. In unseren Ergebnissen zeigte sich die IgG Extravasation sowie die TSPO Expression durch die antibiotische Therapie in

den CCI Gruppen nicht beeinflusst. Ob dies auf geschlechtsspezifische Unterschiede zurückzuführen ist, wäre durch weitere Versuche herauszufinden. Sinnvoll ist hierbei gegebenenfalls die Korrelation mit Östrogen/ Progesteron und gegebenenfalls Testosteron mit der IgG Extravasation sowie der Occludin, Claudin-5 und ZO-1- und TSPO Genexpression.

6.2. Auswirkungen einer mikrobiellen Dysbiose auf neurobehaviorelle Parameter

Die durchgeführten Versuche zeigten eine deutliche posttraumatische Zunahme des neurologischen Defizites, welches mittels NDS quantifiziert worden ist. Bemerkenswerter Weise zeigte sich vor allem am dritten postoperativen Tag ein signifikant höheres neurologisches Defizit in den antibiotisch therapierten CCI Mäusen im Vergleich zu den Vehikel-ernährten CCI Tieren. Auch wenn sich in der Auswertung der volumetrischen Daten wie auch der Expression von GFAP und Iba-1 keine Signifikanz zeigte, kann dies ein Hinweis darauf sein, dass eine mögliche Aggravation oder der Höhepunkt der ausgelösten neurologischen Defizites noch nicht abgebildet worden sind. Auch kann dies für zuvor angeführte Ergebnisse sprechen, welche ein kognitives Defizit nachwiesen obwohl sich keine Unterschiede in der Volumetrie zeigten.

6.3. Antibiotika Gabe

Eine Dysbiose des Mikrobioms lässt sich durch Gabe von Antibiotika und Antimykotika induzieren, wie es in unseren Versuchen gezeigt wurde. Amoxicillin als Teil der Aminopenicillin- Antibiotika weist das Wirkungsspektrum von Penicillin G mit Erweiterung in den gramnegativen Bereich auf. Es ist somit wirksam gegen *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, Listerien, Enterokokken und *Proteus*-Bakterien. [288] Eine ansteigende Konzentration von Proteobakterien wurde im Rahmen eines schlechteren Outcomes nach SHT beobachtet. Proteobakterien gehören zu den gramnegativen Bakterien und umfassen unter anderem die Arten *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*. Eine Gabe von Amoxicillin trägt zu deren Depletion bei, weshalb hier ein möglicher neuroprotektiver Effekt zu erwarten gewesen wäre.

Vancomycin als Glykopeptid-Antibiotikum ist wirksam gegen grampositive Bakterien, wie zum Beispiel Staphylokokken, Streptokokken, Enterokokken, Lactobazillen und Listerien und wird ebenso zur Bekämpfung von MRSA genutzt. [289]

Nystatin, ein Polyen-Antimykotikum hat durch Erhöhung der Zellmembranpermeabilität der Pilze fungizide Wirkung.

Die differenzierte Wirkung der gegebenen Substanzen lässt sich in diesen Versuchen nicht darstellen, da auf Grund der kombinierten Gabe keine Aussage zum Effekt jeden einzelnen Medikamentes möglich ist.

Auch wenn sich in unserer Studie keine Differenzierung der durch antibiotische Therapie veränderten Bakterienstämme zeigen ließ, zeigte sich durch die antibiotische Therapie eine Abnahme der grampositiven Mischflora, was für die Wirksamkeit des Vancomycins wie auch der Amoxiclavulansäure spricht. Vancomycin wie auch Amoxiclavulansäure wirken gegen grampositive Erreger, wobei Vancomycin auf Grund seiner geringen Bioverfügbarkeit vornehmlich lokale Wirkung im GI-Trakt ausübt. Konsekutiv kam es zu einem Zuwachs der Enterobakterien bei den antibiotisch behandelten Tieren im Sinne einer Dysbiose. Im makroskopischen Vergleich der entfernten Caeci der Mäuse fiel im Vergleich der antibiotisch therapierten Tiere zu den mit Vehikellösung versorgten Tieren ein deutlich vergrößertes Caecum auf. Da sich auch bei keimfreien Tieren ein vergrößertes Caecum zeigte, kann die Größenzunahme mit einem überproportionalen Wachstum normalerweise durch die Kommensalgemeinschaft gehemmten möglichen Pathobionten begründet werden [290]. Eine intestinale Dysbiose kann zur erhöhten Expression proinflammatorischer Zytokine und dem Permeabilitätsverlust der Darmepithelbarriere auf Grund einer vermehrten Epithelzellapoptose wie auch des Verlustes von Adhäsionsmolekülen führen. Dies begünstigt die bakterielle Translokation und kann im Sinne einer Darm-Hirn-Kommunikation eine erhöhte Mikrogliaaktivierung, erhöhte Spiegel von TNF α sowie IL1 β auslösen und eine Neuroinflammation unterhalten oder induzieren und eine schlechtere Prognose nach SHT bedingen [291, 292]. Auch wurde beobachtet, dass vor allem die Dominanz gram-negativer Bakterien die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL6 und IL1 β durch Monozyten, Makrophagen und Mikroglia stimuliert [205]. Ein signifikant erhöhter Nachweis von Iba1-immunopositiven Partikeln und GFAP im Sinne einer erhöhten Neuroinflammation zeigte sich in diesem Versuch im Vergleich der antibiotisch therapierten zu den Vehikel- ernährten Tieren jedoch nicht. Auch eine Beeinflussung der Bluthirnschranke im Sinne eines erhöhten IgG Spiegels oder einer erhöhten TSPO - Expression ließen sich nicht nachweisen. Es ist möglich, dass nach einer zwei-wöchigen antibiotischen Behandlung bereits eine Stabilisierung der Kommensalgemeinschaft mit Zunahme der Anzahl der Bakterien der antibiotisch

behandelten Tiere stattgefunden haben könnte, wie sich in den Experimenten mit Gabe von Amoxicillin Clavulansäure zeigen ließ [189]. Hier zeigte sich beispielsweise nach zwei Wochen antibiotischer Therapie eine neuroprotektive Wirkung im Sinne einer vermehrten Expansion IL-10 produzierender T_{reg} Zellen mit folgender IL-10 abhängiger Verringerung der IL17 positiven $\gamma\delta$ T-Zellen [189]. Auch bezüglich Vancomycin gibt es Studien, die diesem eine neuroprotektive und läsionsmindernde Wirkung zuschreiben [189]. Durch die Applikation des Tetracyclins Minocyclin im Rahmen eines SHT ließ sich ein vermindertes Läsionsvolumen, sowie verbessertes neurologisches Outcome vor allem am ersten posttraumatischen Tag zeigen. Der Schutz des Minocyclins wurde hier auf entzündungshemmende Mechanismen zurückgeführt, da sich reduzierte mikrogliale Aktivierung wie auch reduzierte IL1 β Expression zeigen ließ [293]. Zu beachten ist aber, dass eine Kombination von Ampicillin, Ciprofloxacin, Metronidazol, Vancomycin und Imipinem das Überleben nach einem ischämischen Schlaganfall reduzierte [236]. Es ist fraglich, ob die nicht signifikanten Unterschiede des Läsionsvolumens im Hinblick auf eine antibiotische Therapie mit der Tatsache zusammenhängen, dass in dieser Studie weibliche Mäuse verwendet wurden, die Verwendung von Vancomycin hier einen, wenn auch nicht signifikanten, neuroprotektiven Einfluss ausübte, die kombinierte Gabe der Antibiotika sich gegenseitig beeinflusst oder die Folgen einer Dysbiose nur marginalen Einfluss auf den traumatischen Hirnschaden bei weiblichen Mäusen haben. Anhand der aktuellen Studienlage wäre eine Zunahme des Läsionsvolumen und Minderung der kognitiv- motorischen Verhaltensweise der Maus nach antibiotischer Therapie auf Grund der Aktivierung einer proinflammatorischen Zytokinkaskade nach mikrobieller Dysbiose möglich gewesen, wobei neuere Studien in Zusammenhang mit einer antibiotischen Therapie vor und nach einem SHT je nach appliziertem Antibiotikum neuroprotektive Effekte zeigen [294]. Weitere Studien mit detaillierter Differenzierung der mikrobiellen Flora und besserer Differenzierung der Wirkung der gegebenen Antibiotika sind sinnvoll.

6.4. Mikrobiom und SHT

Ein gesundes und ausgeglichenes Mikrobiom ist wichtig für die Aufrechterhaltung der systemischen Homöostase und immunologischen Funktion. Die Aufrechterhaltung einer intakten Darmschleimhaut als mechanische und immunologische Barriere des GI-Traktes zum systemischen Kreislauf durch intestinale Epithelzellen, aber auch der Lamina propria ansässige Immunzellen und enterische Gliazellen, hat zum einen

positiven Effekt auf eine ausgeglichene Kommensalgemeinschaft der mikrobiellen Flora, dient ebenso aber auch der Barriere zwischen Mikrobiom und Wirt. Über lymphatische, neuronale und vaskuläre Wege kann das Mikrobiom mit dem ZNS im Sinne einer bidirektionalen Gehirn-Darm-Achse kommunizieren [13]. Eine intakte Darmschleimhaut ist hierfür essenziell und ermöglicht die Erhaltung eines ausgeglichenen Elektrolythaushaltes, einer kontrollierten Nährstoffaufnahme und Ausbildung einer strukturellen Barriere. Eine gestörte Darmbarriere und ein gestörtes intestinales Mikrobiom mit erhöhter intestinaler Permeabilität und folgender Endotoxämie hingegen werden mit der begünstigten Entstehung entzündlicher Darmerkrankungen, dem metabolischen Syndrom wie auch Diabetes und dem SIRS in Zusammenhang gebracht und beeinflussen die Morbidität und Mortalität nach einem SHT. Auch werden neuropsychiatrische Erkrankungen mit einer Dysbiose in Zusammenhang gebracht [295, 296]. Im Sinne der als „*Bottom-Up*“-Achse bezeichneten Kommunikation können vom Darm ausgehenden Signale das ZNS erreichen und beeinflussen. Zum Beispiel werden über von Mikroben freigesetzte kurzkettige Fettsäuren G-Protein gekoppelte Rezeptoren reguliert, welche zu einer Freisetzung von Neurotransmittern und Hormonen wie Serotonin, Dopamin, Noradrenalin, GABA, ACh und Histamin führen und eine Interaktion mit neutrophilen Granulozyten und Monozyten ermöglichen [297, 298]. Freigesetzte LPS wirken über Toll like Rezeptoren 2 und 9 inflammatorisch und haben auf Grund verminderter Expression von Adhäsionsmolekulan und Apoptose von epithelialen Darmzellen die Möglichkeit durch eine gestörte gastrointestinale Barriere, in das lymphatische Gewebe und den systemischen Kreislauf einzutreten [299]. Neuroinflammatorische Prozesse wie zum Beispiel eine Mikrogliaaktivität im Sinne einer proinflammatorischen Reaktion können nun begünstigt werden. Sie beeinflussen somit inflammatorische Prozesse sowie hirnspezifische Aktivitäten wie ängstliches Verhalten, Lernen, Gedächtnis, aber auch die Mikrogliaaktivität und Integrität der BHS und somit das Ausmaß des sekundären Hirschadens [198, 291, 297].

Als Regulatoren der T_{reg} und $\gamma\delta$ T Zellen können darmbewohnende Mikroben ischämische Hirnverletzungen durch folgende Sekretion von IL-17 und chemotaktischer Signale aus $\gamma\delta$ T-Zellen mit Aktivierung der peripheren myeloischen Zellen wie Neutrophilen und Monozyten verschlimmern [300]. Auch ließ sich in einer Studie zeigen, dass das über die Nahrung aufgenommene Tryptophan durch Darmmikrobiota in Metabolite umgewandelt wird und in Kombination mit Interferon 1

die Aryl- Kohlenwasserstoff- Rezeptor (Ah-R) -Signalübertragung in Astrozyten aktiviert, welche die zerebrale inflammatorische wie auch neurodegenerative Reaktion mindert. Vor allem die Ampicillin- empfindlichen und Vancomycin- resistenten Bakterien scheinen hier von Bedeutung zu sein, da vor allem die Applikation von Ampicillin zu einer beeinträchtigten Genesung im experimentellen Autoimmunenzephalitis-Modell führte [301]. Aber auch im Sinne einer „*Top-Down*“- Achse ist eine entgegengesetzte Kommunikation vom ZNS ausgehend mit dem Darm möglich. Diese wird durch das enterische wie auch autonome Nervensystem, ausgeschüttete Neurotransmitter aber auch durch die Hypothalamus-Hypophysen-Achse ermöglicht. Ein SHT kann hierdurch ebenso zu einer Beeinflussung der mikrobiellen Integrität des Darmes führen [8].

Sogar bei scheinoperierten Mäusen ließ sich bei Houlden et al. eine veränderte mikrobielle Zusammensetzung zeigen, was darauf hindeutet, dass auch eine Schein Operation tiefgreifende Veränderungen des Mikrobioms verursachen kann und für die bidirektionale Kommunikation im Sinne einer Top-Down-Achse spricht [219]. Auch zeigte sich eine posttraumatische Entzündungsreaktion im Darm, welche sich durch eine gestörte Integrität der Schleimhautbarriere auf Grund der zytokingetriggerten Apoptose von Darmepithelzellen darstellen ließ und eine proinflammatorische Reaktion im ZNS begünstigte. [198, 297, 299]. In unseren Ergebnissen können wir diese Untersuchungen nicht bestätigen. Eine Beeinflussung der mikrobiellen Flora ließ sich allein durch die Sham-Operation an weiblichen Mäusen nicht zeigen. Gegebenenfalls lässt sich hier ein resistenteres Mikrobiom bei weiblichen Versuchstieren bestätigen, welches in Versuchen von Homma et al gezeigt worden ist [268].

Zur Quantifizierung einer inflammatorischen intestinalen Reaktion in Form reaktiver enterischer Gliazellen nach SHT kann es sinnvoll sein, auch die proinflammatorische GFAP und antiinflammatorische IL10-Expression der Schleimhaut des Dickdarmes zu bestimmen.

In unseren Versuchen ließ sich durch antibiotische wie auch antimykotische Therapie eine Veränderung der mikrobiellen Zusammensetzung im Sinne einer Depletion der grampositiven Mischflora mit konsekutivem Zuwachs der gramnegativen Enterobakterien beobachten. Eine zusätzliche traumatisch induzierte Dysbiose ließ sich nicht zeigen. Möglich wäre ebenso eine Vermehrung der Proteobakterien und Peptococcaceae (Ordnung Clostridien) und eine Abnahme des Firmicutes wie auch

Prevotellaceae Spiegel, wie es in Studien nach experimentellem Schlaganfall gezeigt wurde [219]. Verminderte Spiegel von Prevotellaceae sind in Verbindung mit Autismus, Morbus Crohn und Typ-1-Diabetes gestellt worden [198, 302, 303]. Gramnegative Firmicutes oder Prevotellaceae oder grampositive Proteobakterien und Peptococcaceae sind in unserer Untersuchung nicht differenziert worden. Firmicutes-Bakterien, zu welchen auch das Lactobazillus zugehörig ist, zeigten neuroprotektive und psychotrope Effekte und führten zu einer Minderung traumatisch bedingter Defizite. Eine mögliche Supplementierung dieser Bakterien kann protektive Effekte haben und im Rahmen eines SHT sinnvoll sein. Ma et al. zeigten dass die durch Laktobazillen induzierte neuroprotektive Wirkung die Infektionsraten und Hospitalisierung reduzierten [252, 304, 305].

Auch die Gabe von Probiotika, welche die Integrität der Darmschleimhaut durch straffung der *gap junctions* unterstützen können und mit Hilfe Butyrat-produzierender Bakterien die Induktion regulatorischer T Zellen unterstützen können, aber auch in Versuchen von Sun et al zu verminderten Spiegeln von Caspase-3 und Bax führten (siehe 1.1.2.6), zeigten in Studien mit induzierten Verletzungen des Rückenmarkes und nach CCI ein besseres Outcome in Form schnellerer Erholung der neurologischen Funktion [291, 306]. Bisher in der Literatur erwähnte protektiv wirkende Spezies sind Lactobazillus acidophilus, Clostridium butyricum und Lactobazillus farmicis. Ob diese Populationen durch unsere antibiotische Therapie in relevanter Form eine Konzentrationsänderung erfuhren ist auf Grund der wenig differenzierten mikrobiellen Analyse nicht zu beantworten, wäre es jedoch eine interessante Fragestellung.

6.5. Geschlechtsabhängige Unterschiede

Wohingegen Tierstudien ein besseres Outcome weiblicher Mäuse nach schwerem CCI zeigen, ergeben einige Studien an weiblichen Menschen ein schlechteres Outcome. In einigen Studien mit Tierversuchen zeigt sich, dass es bei mittelschwerem bis schwerem SHT ein besseres Outcome bei weiblichen Tieren gibt [255]. Auch in retrospektiven Studien am Menschen zeigte sich zum einen ein besseres Überleben und weniger Komplikationen bei weiblichen Menschen nach mittelschwerem bis schwerem SHT. Vor allem post- und perimenopausale Frauen zeigten signifikant niedrigere Risiken [18]. Östrogen scheint eine neuroprotektive Wirkung zu haben, als Antioxidanz zu wirken und entzündungshemmende Wirkung durch verminderte Expression von zum Beispiel TNF α zu zeigen. Weiterhin schütze es vor Glutamat-induzierter Exzitotoxizität und führt durch die Aktivierung der Transkription

antiapoptotischer Gene wie Bcl-2 zu vermindertem Zellverlust [307]. Es trägt dazu bei, dass die Durchlässigkeit der BHS gemindert und das zerebrale Ödem reduziert würde [308]. Auf Grund einer erhöhten endothelialen Stickoxidsynthase-Expression trägt es zudem zu einem verbesserten zerebralen Blutfluss bei [259]. Es ist trotzdem unklar, inwieweit Östrogen die Mortalität und Morbidität nach SHT beeinflusst, sofern man bedenkt, dass sich innerhalb der Gruppe der weiblichen Trauma- Patientinnen vor allem bei den postmenopausalen Frauen eine verminderte Morbidität und Mortalität im Vergleich zu den prämenopausalen Frauen mit höherem Östrogenspiegel zeigte und sich auch in der Gruppe der moderaten SHT bei männlichen Menschen ein besseres Outcome zeigte [18, 255]. Man sollte auch hinzuziehen, dass sich eventuell geschlechtsspezifische Unterschiede in Bezug auf die Größe des Schädels und damit Gehirngröße ergeben und dass es geschlechtsabhängig unterschiedliche Motivationen bei den Tieren geben kann, Verhaltensaufgaben zu bewerkstelligen, die einen Großteil unserer Ergebnisse zur Beurteilung des Sekundärschadens lieferten [255]. Weiterhin zeigten Studien, dass trotz geschlechtsspezifischer Unterschiede in der funktionellen MRT, dem zerebralen Ödem und dem intrakraniellen Druck, welche bei weiblichen SHT-Patientinnen ausgeprägter ausfielen, keine Unterschiede in der Kognition und der Dauer der Genesung vorlagen [309, 310]. Weibliche Mäuse zeigten in einer Studie nach SHT, dass sie besser liefen und weniger Angst hatten als die männlichen Mäuse, trotz gleichem Volumen der Hirnläsion [265, 266]. Für das weitere Verständnis dieser Zusammenhänge sind weitere Studien erforderlich. Die Studie von Kupina et al zeigt weiterhin, dass der Höhepunkt der Neurodegeneration bei weiblichen Versuchstieren nach Aufprallbeschleunigungs-CCI bei circa 14 Tagen lag im Vergleich zu drei Tagen bei männlichen Mäusen. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass bei unserem Versuchsaufbau mit einem Überleben der Tiere von nur 72 Stunden nach CCI der Zeitpunkt des maximalen Schadens bei den weiblichen Versuchstieren nicht erfasst worden ist. Zum anderen ließ sich bei schwerem CCI kein Unterschied in der Schadensgröße zwischen männlichen und weiblichen Tieren erkennen [311, 312]. Hierzu ist es sinnvoll, weitere Studien durchzuführen.

7. Zusammenfassung

Das SHT ist als ein fortschreitendes Krankheitsbild mit ausgeprägten Langzeitfolgen zu sehen. Nach einer primären Verletzung im Sinne eines mechanischen Schadens des Hirngewebes sowie Gefäßdisruption, Blutung, veränderter Perfusion des Gewebes, einer Permeabilitätserhöhung der BHS mit folgender Invasion von Immunzellen wie Leukozyten und einer Stoffwechselstörung kommt es Minuten bis Jahre nach dem Trauma zur Entwicklung des Sekundärschadens. Dieser durch Neuroinflammation und Neurodegeneration gezeichnete Prozess führt zu neurologischen Defiziten. Die Darm Hirn Achse gewährt eine bidirektionale Interaktion zwischen Hirn und Darm und eine mikrobielle Dysbiose sowie gestörte gastrointestinale Homöostase sind in Zusammenhang mit neurologischen Krankheitsbildern gestellt worden. Zunehmende Studien zeigen, dass das intestinale Mikrobiom an der Modulation zellulärer und molekularer Mechanismen beteiligt ist und pathophysiologische Prozesse nach ZNS-Verletzungen beeinflussen kann. Ob eine präventive antibiotische Therapie einen Einfluss auf den posttraumatischen Sekundärschaden in weiblichen Versuchstieren hat, war eine Frage dieser Arbeit.

Auch wenn sich in aktuellen Studien ein neuroprotektiver Effekt durch Hemmung der Neuroinflammation und verminderter Apoptose bei männlichen Versuchstieren zeigt, zeigte sich in der vorliegenden Arbeit kein signifikanter Effekt im Bezug auf das Ausmaß des Hirnschadens oder die Mikroglia- und Astrozytenaktivierung durch die antibiotische Therapie. Die neurobehaviorellen Untersuchungen zeigten jedoch am dritten posttraumatischen Tag eine Aggravation des Schadens im Sinne eines Einflusses auf das neurologische Defizit 72 Stunden nach Trauma, weshalb die ausgelöste Dysbiose, welche sich in den mikrobiologischen Untersuchungen zeigen ließ, möglicherweise temporär einen negativen Effekt ausübte. Da Patienten mit einem SHT jedoch auch eine erhöhte Vulnerabilität für sekundäre Infektionen wie Pneumonie und postinterventionelle Meningitis haben, welche eine erhöhte Mortalität zur Folge hat, kann durch eine frühe antibiotische Therapie, welche in unseren Ergebnissen keine neurodestruktiven Effekte im Sinne eines erhöhten Läsionsvolumens oder reduzierten Körnerzellschicht des suprapyramidalen Blattes des Gyrus dentatus zeigte, möglicherweise die Mortalität, gegebenenfalls auch das Outcome nach SHT durch Gabe bestimmter Antibiotika verbessert werden. Ob hierbei dann auch zusätzliche neuroprotektive Off-target Eigenschaften signifikant zum tragen kommen, oder es vor allem zu späteren posttraumatischen Zeitpunkten eher zu einer

Aggravation des neurobehaviorellen Defizites kommt, werden weitere Studien untersuchen. Weitere Langzeitstudien und Studien zur Differenzierung der Wirkweise bestimmter antibiotischer Präparate auch im Hinblick auf die Vermeidung unnötiger antibiotischer Therapien und konsekutiver Förderung der Entwicklung multiresistenter Keime sowie die weitere Erforschung des antibiotischen Einflusses auf den Sekundärschaden sind unerlässlich um in Zukunft adäquat die posttraumatische Prognose zu verbessern. Eine Identifikation möglicher neuroprotektiv oder mikrobiomstabilisierend wirkender bakterieller Spezies im Zusammenhang mit dem SHT sind sinnvoll, um gegebenenfalls durch Gabe bestimmter Probiotika das Outcome zu verbessern.

Es ist wichtig, bei einem so umfassenden pathologischen Geschehen wie dem SHT, das Geschehen als multifaktoriell zu betrachten und zu versuchen, möglichst viele Parameter, die dieses Geschehen beeinflussen, zu betrachten und zu beachten. Nur so kann eine relevante Übertragbarkeit auf das menschliche SHT gewährleistet werden, um in Zukunft hoffentlich Therapiestrategien für ein besseres Outcome nach dem meist lebensverändernden SHT zu postulieren.

8. Literaturverzeichnis

1. Menon DK, Schwab K, Wright DW et al (2010) Position statement: definition of traumatic brain injury. *Archives of physical medicine and rehabilitation* 91(11): 1637–1640. doi: 10.1016/j.apmr.2010.05.017
2. Maegele M, Lefering R, Sakowitz O et al (2019) The Incidence and Management of Moderate to Severe Head Injury. *Deutsches Arzteblatt international* 116(10): 167–173. doi: 10.3238/arztebl.2019.0167
3. Maas AIR, Menon DK, Adelson PD et al (2017) Traumatic brain injury: integrated approaches to improve prevention, clinical care, and research. *The Lancet Neurology* 16(12): 987–1048. doi: 10.1016/S1474-4422(17)30371-X
4. Prof. Dr. Eckhard Rickels Schädel-Hirnverletzungen (auch Schädelhirntrauma (SHT), Traumatic Brain Injuries (TBI))
5. Fleminger S, Oliver DL, Lovestone S et al (2003) Head injury as a risk factor for Alzheimer's disease: the evidence 10 years on; a partial replication. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 74(7): 857–862. doi: 10.1136/jnnp.74.7.857
6. McDonald SJ, Sharkey JM, Sun M et al (2020) Beyond the Brain: Peripheral Interactions after Traumatic Brain Injury. *Journal of Neurotrauma* 37(5): 770–781. doi: 10.1089/neu.2019.6885
7. Martin CR, Osadchiy V, Kalani A et al (2018) The Brain-Gut-Microbiome Axis. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology* 6(2): 133–148. doi: 10.1016/j.jcmgh.2018.04.003
8. El Baassiri MG, Raouf Z, Badin S et al (2024) Dysregulated brain-gut axis in the setting of traumatic brain injury: review of mechanisms and anti-inflammatory pharmacotherapies. *J Neuroinflammation* 21(1): 124. doi: 10.1186/s12974-024-03118-3
9. Mayer EA, Tillisch K, Gupta A (2015) Gut/brain axis and the microbiota. *The Journal of clinical investigation* 125(3): 926–938. doi: 10.1172/JCI76304
10. Maier L, Goemans CV, Wirbel J et al (2021) Unravelling the collateral damage of antibiotics on gut bacteria. *Nature* 599(7883): 120–124. doi: 10.1038/s41586-021-03986-2
11. Ramirez J, Guarner F, Bustos Fernandez L et al (2020) Antibiotics as Major Disruptors of Gut Microbiota. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 10: 572912. doi: 10.3389/fcimb.2020.572912
12. Sharon G, Sampson TR, Geschwind DH et al (2016) The Central Nervous System and the Gut Microbiome. *Cell* 167(4): 915–932. doi: 10.1016/j.cell.2016.10.027
13. Sundman MH, Chen N-K, Subbian V et al (2017) The bidirectional gut-brain-microbiota axis as a potential nexus between traumatic brain injury, inflammation, and disease. *Brain, behavior, and immunity* 66: 31–44. doi: 10.1016/j.bbi.2017.05.009
14. Zhu CS, Grandhi R, Patterson TT et al (2018) A Review of Traumatic Brain Injury and the Gut Microbiome: Insights into Novel Mechanisms of Secondary Brain Injury and Promising Targets for Neuroprotection. *Brain sciences* 8(6). doi: 10.3390/brainsci8060113

15. Ritter K, Somnuk P, Hu L et al (2024) Current state of neuroprotective therapy using antibiotics in human traumatic brain injury and animal models. *BMC Neurosci* 25(1): 10. doi: 10.1186/s12868-024-00851-6
16. Ma EL, Smith AD, Desai N et al (2017) Bidirectional brain-gut interactions and chronic pathological changes after traumatic brain injury in mice. *Brain, behavior, and immunity* 66: 56–69. doi: 10.1016/j.bbi.2017.06.018
17. Ritter K, Vetter D, Wernersbach I et al (2023) Pre-traumatic antibiotic-induced microbial depletion reduces neuroinflammation in acute murine traumatic brain injury. *Neuropharmacology* 237: 109648. doi: 10.1016/j.neuropharm.2023.109648
18. Berry C, Ley EJ, Tillou A et al (2009) The effect of gender on patients with moderate to severe head injuries. *The Journal of trauma* 67(5): 950–953. doi: 10.1097/TA.0b013e3181ba3354
19. Xiong Y, Mahmood A, Chopp M (2013) Animal models of traumatic brain injury. *Nature Reviews Neuroscience* 14(2): 128–142. doi: 10.1038/nrn3407
20. Martin Trepel (2015) *Neuroanatomie. Struktur und Funktion*, 6.th edn. Elsevier
21. Rhoton AL (2007) The cerebrum. *Anatomy. Neurosurgery* 61(1 Suppl): 37-118; discussion 118-9. doi: 10.1227/01.NEU.0000255490.88321.CE
22. Huggenberger S, Moser N, Schröder H et al (2019) *Neuroanatomie des Menschen*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg
23. Ma Q, Ineichen BV, Detmar M et al (2017) Outflow of cerebrospinal fluid is predominantly through lymphatic vessels and is reduced in aged mice. *Nature Communications* 8(1): 1434. doi: 10.1038/s41467-017-01484-6
24. Shetty AK, Zanirati G (2020) The Interstitial System of the Brain in Health and Disease. *Aging and disease* 11(1): 200–211. doi: 10.14336/AD.2020.0103
25. Kaur J, Fahmy LM, Davoodi-Bojd E et al (2021) Waste Clearance in the Brain. *Front. Neuroanat.* 15: 665803. doi: 10.3389/fnana.2021.665803
26. Hladky SB, Barrand MA (2016) Fluid and ion transfer across the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers; a comparative account of mechanisms and roles. *Fluids and barriers of the CNS* 13(1): 19. doi: 10.1186/s12987-016-0040-3
27. Spalding KL, Bergmann O, Alkass K et al (2013) Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell* 153(6): 1219–1227. doi: 10.1016/j.cell.2013.05.002
28. Abdel-Haq R, Schlachetzki JCM, Glass CK et al (2019) Microbiome-microglia connections via the gut-brain axis. *The Journal of experimental medicine* 216(1): 41–59. doi: 10.1084/jem.20180794
29. DGfN Leitlinie Schädel-Hirn-Trauma im Erwachsenenalter. Update 2015
30. Aschenbrenner I, Prof. Dr. Peter Biberthaler (Redaktionsteam DGU-Website) (2012) Schädel-Hirn-Trauma (= SHT). https://www.dgu-online.de/fileadmin/published_content/6.Patienteninformation/PDF/DGU_Patienteninformation_Schaedel-Hirn-Trauma_f.pdf. Zugegriffen: 03. Mai 2021
31. König A, Spetzger U (2019) *Neurochirurgische Therapie des Schädel-Hirn-Traumas*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg
32. Nash M, Pribiag H, Fournier AE et al (2009) Central nervous system regeneration inhibitors and their intracellular substrates. *Mol Neurobiol* 40(3): 224–235. doi: 10.1007/s12035-009-8083-y
33. Coronado VG, Xu L, Basavaraju SV et al (2011) Surveillance for traumatic brain injury-related deaths--United States, 1997-2007. *Morbidity and mortality weekly report. Surveillance summaries (Washington, D.C. : 2002)* 60(5): 1–32

34. Pop V, Badaut J (2011) A neurovascular perspective for long-term changes after brain trauma. *Transl. Stroke Res.* 2(4): 533–545. doi: 10.1007/s12975-011-0126-9
35. Xiong Y, Mahmood A, Chopp M (2018) Current understanding of neuroinflammation after traumatic brain injury and cell-based therapeutic opportunities. *Chinese Journal of Traumatology* 21(3): 137–151. doi: 10.1016/j.cjtee.2018.02.003
36. Johnson VE, Stewart W, Smith DH (2010) Traumatic brain injury and amyloid- β pathology: a link to Alzheimer's disease? *Nature Reviews Neuroscience* 11(5): 361–370. doi: 10.1038/nrn2808
37. Sundman MH, Hall EE, Chen N-K (2014) Examining the relationship between head trauma and neurodegenerative disease: A review of epidemiology, pathology and neuroimaging techniques. *Journal of Alzheimer's disease & Parkinsonism* 4. doi: 10.4172/2161-0460.1000137
38. Pearn ML, Niesman IR, Egawa J et al (2017) Pathophysiology Associated with Traumatic Brain Injury: Current Treatments and Potential Novel Therapeutics. *Cellular and Molecular Neurobiology* 37(4): 571–585. doi: 10.1007/s10571-016-0400-1
39. Anderson V, Brown S, Newitt H et al (2009) Educational, vocational, psychosocial, and quality-of-life outcomes for adult survivors of childhood traumatic brain injury. *The Journal of head trauma rehabilitation* 24(5): 303–312. doi: 10.1097/HTR.0b013e3181ada830
40. Sulhan S, Lyon KA, Shapiro LA et al (2020) Neuroinflammation and blood-brain barrier disruption following traumatic brain injury: Pathophysiology and potential therapeutic targets. *Journal of neuroscience research* 98(1): 19–28. doi: 10.1002/jnr.24331
41. Kumar A, Loane DJ (2012) Neuroinflammation after traumatic brain injury: opportunities for therapeutic intervention. *Brain, behavior, and immunity* 26(8): 1191–1201. doi: 10.1016/j.bbi.2012.06.008
42. Shetty AK, Mishra V, Kodali M et al (2014) Blood brain barrier dysfunction and delayed neurological deficits in mild traumatic brain injury induced by blast shock waves. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8: 232. doi: 10.3389/fncel.2014.00232
43. Baethmann A, Maier-Hauff K, Kempfski O et al (1988) Mediators of brain edema and secondary brain damage. *Critical Care Medicine* 16(10): 972–978. doi: 10.1097/00003246-198810000-00008
44. Sahuquillo J, Poca MA, Amoros S (2001) Current aspects of pathophysiology and cell dysfunction after severe head injury. *Current Pharmaceutical Design* 7(15): 1475–1503. doi: 10.2174/1381612013397311
45. Gaetz M (2004) The neurophysiology of brain injury. *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology* 115(1): 4–18. doi: 10.1016/s1388-2457(03)00258-x
46. Nikolian VC, Dekker SE, Bambakidis T et al (2018) Improvement of Blood-Brain Barrier Integrity in Traumatic Brain Injury and Hemorrhagic Shock Following Treatment With Valproic Acid and Fresh Frozen Plasma. *Critical Care Medicine* 46(1): e59-e66. doi: 10.1097/CCM.0000000000002800
47. Loane DJ, Faden AI (2010) Neuroprotection for traumatic brain injury: translational challenges and emerging therapeutic strategies. *Trends in pharmacological sciences* 31(12): 596–604. doi: 10.1016/j.tips.2010.09.005

48. Povlishock JT, Christman CW (1995) The pathobiology of traumatically induced axonal injury in animals and humans: a review of current thoughts. *Journal of Neurotrauma* 12(4): 555–564. doi: 10.1089/neu.1995.12.555
49. Smith C (2013) Review: the long-term consequences of microglial activation following acute traumatic brain injury. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 39(1): 35–44. doi: 10.1111/nan.12006
50. Simon DW, McGeachy MJ, Bayir H et al (2017) The far-reaching scope of neuroinflammation after traumatic brain injury. *Nature Reviews Neurology* 13(3): 171–191. doi: 10.1038/nrneurol.2017.13
51. Hall ED, Detloff MR, Johnson K et al (2004) Peroxynitrite-mediated protein nitration and lipid peroxidation in a mouse model of traumatic brain injury. *Journal of Neurotrauma* 21(1): 9–20. doi: 10.1089/089771504772695904
52. Sharp DJ, Scott G, Leech R (2014) Network dysfunction after traumatic brain injury. *Nature Reviews Neurology* 10(3): 156–166. doi: 10.1038/nrneurol.2014.15
53. Zetterberg H, Smith DH, Blennow K (2013) Biomarkers of mild traumatic brain injury in cerebrospinal fluid and blood. *Nature Reviews Neurology* 9(4): 201–210. doi: 10.1038/nrneurol.2013.9
54. Cheng G, Kong R, Zhang L et al (2012) Mitochondria in traumatic brain injury and mitochondrial-targeted multipotential therapeutic strategies. *British Journal of Pharmacology* 167(4): 699–719. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.02025.x
55. Girouard H, Iadecola C (2006) Neurovascular coupling in the normal brain and in hypertension, stroke, and Alzheimer disease. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md. : 1985) 100(1): 328–335. doi: 10.1152/japplphysiol.00966.2005
56. Andreone BJ, Lacoste B, Gu C (2015) Neuronal and vascular interactions. *Annual Review of Neuroscience* 38(1): 25–46. doi: 10.1146/annurev-neuro-071714-033835
57. Armstead WM (1999) Role of endothelin-1 in age-dependent cerebrovascular hypotensive responses after brain injury. *The American journal of physiology* 277(5): H1884–94. doi: 10.1152/ajpheart.1999.277.5.H1884
58. Armstead WM (1999) Age-dependent impairment of K(ATP) channel function following brain injury. *Journal of Neurotrauma* 16(5): 391–402. doi: 10.1089/neu.1999.16.391
59. Armstead WM (1999) Stimulus duration modulates the interaction between opioids and nitric oxide in hypoxic pial artery dilation. *Brain Research* 825(1-2): 68–74. doi: 10.1016/S0006-8993(99)01213-5
60. Graves JC, Kreipke CW (2015) Brain neurotrauma. Molecular, neuropsychological, and rehabilitation aspects. *Frontiers in neuroengineering*. CRC Press, Boca Raton
61. Hamel E (2006) Perivascular nerves and the regulation of cerebrovascular tone. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md. : 1985) 100(3): 1059–1064. doi: 10.1152/japplphysiol.00954.2005
62. Furchgott RF, Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288(5789): 373–376. doi: 10.1038/288373a0
63. Cherian L, Hlatky R, Robertson CS (2004) Nitric oxide in traumatic brain injury. *Brain pathology* (Zurich, Switzerland) 14(2): 195–201. doi: 10.1111/j.1750-3639.2004.tb00053.x

64. Kozlov AV, Bahrami S, Redl H et al (2017) Alterations in nitric oxide homeostasis during traumatic brain injury. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease* 1863(10 Pt B): 2627–2632. doi: 10.1016/j.bbadis.2016.12.020
65. Orihara Y, Ikematsu K, Tsuda R et al (2001) Induction of nitric oxide synthase by traumatic brain injury. *Forensic Science International* 123(2-3): 142–149. doi: 10.1016/S0379-0738(01)00537-0
66. Steiner J, Rafols D, Park HK et al (2004) Attenuation of iNOS mRNA exacerbates hypoperfusion and upregulates endothelin-1 expression in hippocampus and cortex after brain trauma. *Nitric oxide : biology and chemistry* 10(3): 162–169. doi: 10.1016/j.niox.2004.03.005
67. Guix FX, Uribealago I, Coma M et al (2005) The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Progress in Neurobiology* 76(2): 126–152. doi: 10.1016/j.pneurobio.2005.06.001
68. Ostrow LW, Suchyna TM, Sachs F (2011) Stretch induced endothelin-1 secretion by adult rat astrocytes involves calcium influx via stretch-activated ion channels (SACs). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 410(1): 81–86. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.05.109
69. Bell RD, Zlokovic BV (2009) Neurovascular mechanisms and blood-brain barrier disorder in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 118(1): 103–113. doi: 10.1007/s00401-009-0522-3
70. Neuwelt EA, Bauer B, Fahlke C et al (2011) Engaging neuroscience to advance translational research in brain barrier biology. *Nature Reviews Neuroscience* 12(3): 169–182. doi: 10.1038/nrn2995
71. Jayakumar AR, Tong XY, Ruiz-Cordero R et al (2014) Activation of NF-κB mediates astrocyte swelling and brain edema in traumatic brain injury. *Journal of Neurotrauma* 31(14): 1249–1257. doi: 10.1089/neu.2013.3169
72. Balabanov R, Goldman H, Murphy S et al (2001) Endothelial cell activation following moderate traumatic brain injury. *Neurological Research* 23(2-3): 175–182. doi: 10.1179/016164101101198514
73. Castejón OJ (1984) Formation of transendothelial channels in traumatic human brain edema. *Pathology - Research and Practice* 179(1): 7–12. doi: 10.1016/S0344-0338(84)80054-0
74. Dore-Duffy P, Owen C, Balabanov R et al (2000) Pericyte migration from the vascular wall in response to traumatic brain injury. *Microvascular Research* 60(1): 55–69. doi: 10.1006/mvre.2000.2244
75. Kisler K, Nelson AR, Rege SV et al (2017) Pericyte degeneration leads to neurovascular uncoupling and limits oxygen supply to brain. *Nat Neurosci* 20(3): 406–416. doi: 10.1038/nn.4489
76. Morgan R, Kreipke CW, Roberts G et al (2007) Neovascularization following traumatic brain injury: possible evidence for both angiogenesis and vasculogenesis. *Neurological Research* 29(4): 375–381. doi: 10.1179/016164107X204693
77. Argaw AT, Asp L, Zhang J et al (2012) Astrocyte-derived VEGF-A drives blood-brain barrier disruption in CNS inflammatory disease. *The Journal of clinical investigation* 122(7): 2454–2468. doi: 10.1172/JCI60842
78. Winkler EA, Minter D, Yue JK et al (2016) Cerebral Edema in Traumatic Brain Injury: Pathophysiology and Prospective Therapeutic Targets. *Neurosurgery Clinics of North America* 27(4): 473–488. doi: 10.1016/j.nec.2016.05.008

79. Kenne E, Erlandsson A, Lindbom L et al (2012) Neutrophil depletion reduces edema formation and tissue loss following traumatic brain injury in mice. *J Neuroinflammation* 9(1): 17. doi: 10.1186/1742-2094-9-17
80. Sofroniew MV (2015) Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nature Reviews Neuroscience* 16(5): 249–263. doi: 10.1038/nrn3898
81. Schwarzmaier SM, Zimmermann R, McGarry NB et al (2013) In vivo temporal and spatial profile of leukocyte adhesion and migration after experimental traumatic brain injury in mice. *J Neuroinflammation* 10(1): 32. doi: 10.1186/1742-2094-10-32
82. Szmydynger-Chodobska J, Strazielle N, Gandy JR et al (2012) Posttraumatic invasion of monocytes across the blood-cerebrospinal fluid barrier. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 32(1): 93–104. doi: 10.1038/jcbfm.2011.111
83. Laird MD, Shields JS, Sukumari-Ramesh S et al (2014) High mobility group box protein-1 promotes cerebral edema after traumatic brain injury via activation of toll-like receptor 4. *Glia* 62(1): 26–38. doi: 10.1002/glia.22581
84. Pinteaux E, Parker LC, Rothwell NJ et al (2002) Expression of interleukin-1 receptors and their role in interleukin-1 actions in murine microglial cells. *Journal of Neurochemistry* 83(4): 754–763. doi: 10.1046/j.1471-4159.2002.01184.x
85. Kumar RG, Boles JA, Wagner AK (2015) Chronic Inflammation After Severe Traumatic Brain Injury: Characterization and Associations With Outcome at 6 and 12 Months Postinjury. *The Journal of head trauma rehabilitation* 30(6): 369–381. doi: 10.1097/HTR.0000000000000067
86. Coughlin JM, Wang Y, Minn I et al (2017) Imaging of Glial Cell Activation and White Matter Integrity in Brains of Active and Recently Retired National Football League Players. *JAMA Neurology* 74(1): 67–74. doi: 10.1001/jamaneurol.2016.3764
87. Raghavendra Rao VL, Dogan A, Bowen KK et al (2000) Traumatic brain injury leads to increased expression of peripheral-type benzodiazepine receptors, neuronal death, and activation of astrocytes and microglia in rat thalamus. *Experimental Neurology* 161(1): 102–114. doi: 10.1006/exnr.1999.7269
88. Witcher KG, Eiferman DS, Godbout JP (2015) Priming the inflammatory pump of the CNS after traumatic brain injury. *Trends in neurosciences* 38(10): 609–620. doi: 10.1016/j.tins.2015.08.002
89. Norden DM, Muccigrosso MM, Godbout JP (2015) Microglial priming and enhanced reactivity to secondary insult in aging, and traumatic CNS injury, and neurodegenerative disease. *Neuropharmacology* 96(Pt A): 29–41. doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.10.028
90. Davalos D, Grutzendler J, Yang G et al (2005) ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* 8(6): 752–758. doi: 10.1038/nn1472
91. Miyamoto T, Kung DK, Kitazato KT et al (2017) Site-specific elevation of interleukin-1 β and matrix metalloproteinase-9 in the Willis circle by hemodynamic changes is associated with rupture in a novel rat cerebral aneurysm model. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 37(8): 2795–2805. doi: 10.1177/0271678X16675369
92. Argaw AT, Gurfein BT, Zhang Y et al (2009) VEGF-mediated disruption of endothelial CLN-5 promotes blood-brain barrier breakdown. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(6): 1977–1982. doi: 10.1073/pnas.0808698106

93. Hall ED, Vaishnav RA, Mustafa AG (2010) Antioxidant therapies for traumatic brain injury. *Neurotherapeutics* 7(1): 51–61. doi: 10.1016/j.nurt.2009.10.021
94. Schreibelt G, Kooij G, Reijerkerk A et al (2007) Reactive oxygen species alter brain endothelial tight junction dynamics via RhoA, PI3 kinase, and PKB signaling. *The FASEB Journal* 21(13): 3666–3676. doi: 10.1096/fj.07-8329com
95. Rhodes J (2011) Peripheral immune cells in the pathology of traumatic brain injury? *Current Opinion in Critical Care* 17(2): 122–130. doi: 10.1097/MCC.0b013e3283447948
96. Shrestha B, Ge S, Pachter JS (2014) Resolution of central nervous system astrocytic and endothelial sources of CCL2 gene expression during evolving neuroinflammation. *Fluids Barriers CNS* 11(1): 6. doi: 10.1186/2045-8118-11-6
97. Zameer A, Hoffman SA (2003) Increased ICAM-1 and VCAM-1 expression in the brains of autoimmune mice. *Journal of Neuroimmunology* 142(1-2): 67–74. doi: 10.1016/s0165-5728(03)00262-5
98. Bevilacqua MP (1993) Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annual review of immunology* 11: 767–804. doi: 10.1146/annurev.iy.11.040193.004003
99. Engelhardt B, Ransohoff RM (2012) Capture, crawl, cross: the T cell code to breach the blood-brain barriers. *Trends in Immunology* 33(12): 579–589. doi: 10.1016/j.it.2012.07.004
100. Daneman R, Zhou L, Agalliu D et al (2010) The mouse blood-brain barrier transcriptome: a new resource for understanding the development and function of brain endothelial cells. *PloS one* 5(10): e13741. doi: 10.1371/journal.pone.0013741
101. Ransohoff RM, Engelhardt B (2012) The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nature reviews. Immunology* 12(9): 623–635. doi: 10.1038/nri3265
102. Carrithers MD, Visintin I, Kang SJ et al (2000) Differential adhesion molecule requirements for immune surveillance and inflammatory recruitment. *Brain* 123 (Pt 6): 1092–1101. doi: 10.1093/brain/123.6.1092
103. Allan SM, Tyrrell PJ, Rothwell NJ (2005) Interleukin-1 and neuronal injury. *Nature reviews. Immunology* 5(8): 629–640. doi: 10.1038/nri1664
104. Fabene PF, Navarro Mora G, Martinello M et al (2008) A role for leukocyte-endothelial adhesion mechanisms in epilepsy. *Nat Med* 14(12): 1377–1383. doi: 10.1038/nm.1878
105. Pelvig DP, Pakkenberg H, Stark AK et al (2008) Neocortical glial cell numbers in human brains. *Neurobiology of Aging* 29(11): 1754–1762. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2007.04.013
106. Sherwood CC, Stimpson CD, Raghanti MA et al (2006) Evolution of increased glia-neuron ratios in the human frontal cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(37): 13606–13611. doi: 10.1073/pnas.0605843103
107. Sierra A, Encinas JM, Deudero JJP et al (2010) Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell* 7(4): 483–495. doi: 10.1016/j.stem.2010.08.014
108. Mittelbronn M, Dietz K, Schluesener HJ et al (2001) Local distribution of microglia in the normal adult human central nervous system differs by up to one order of magnitude. *Acta Neuropathol* 101(3): 249–255. doi: 10.1007/s004010000284

109. Ajami B, Bennett JL, Krieger C et al (2007) Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci* 10(12): 1538–1543. doi: 10.1038/nn2014
110. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M et al (2010) Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 330(6005): 841–845. doi: 10.1126/science.1194637
111. Thion MS, Low D, Silvin A et al (2018) Microbiome Influences Prenatal and Adult Microglia in a Sex-Specific Manner. *Cell* 172(3): 500-516.e16. doi: 10.1016/j.cell.2017.11.042
112. Kigerl KA, Gensel JC, Ankeny DP et al (2009) Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. *Journal of Neuroscience* 29(43): 13435–13444. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3257-09.2009
113. Chen Z, Trapp BD (2016) Microglia and neuroprotection. *Journal of Neurochemistry* 136 Suppl 1: 10–17. doi: 10.1111/jnc.13062
114. Hanisch U-K, Kettenmann H (2007) Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 10(11): 1387–1394. doi: 10.1038/nn1997
115. Davalos D, Ryu JK, Merlini M et al (2012) Fibrinogen-induced perivascular microglial clustering is required for the development of axonal damage in neuroinflammation. *Nature Communications* 3(1): 1227. doi: 10.1038/ncomms2230
116. Schonberg DL, Goldstein EZ, Sahinkaya FR et al (2012) Ferritin stimulates oligodendrocyte genesis in the adult spinal cord and can be transferred from macrophages to NG2 cells in vivo. *Journal of Neuroscience* 32(16): 5374–5384. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3517-11.2012
117. Inoue K, Koizumi S, Tsuda M (2007) The role of nucleotides in the neuron--glia communication responsible for the brain functions. *Journal of Neurochemistry* 102(5): 1447–1458. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04824.x
118. Yamasaki R, Lu H, Butovsky O et al (2014) Differential roles of microglia and monocytes in the inflamed central nervous system. *The Journal of experimental medicine* 211(8): 1533–1549. doi: 10.1084/jem.20132477
119. Loane DJ, Byrnes KR (2010) Role of microglia in neurotrauma. *Neurotherapeutics* 7(4): 366–377. doi: 10.1016/j.nurt.2010.07.002
120. Wang L, Lim E-J, Toborek M et al (2008) The role of fatty acids and caveolin-1 in tumor necrosis factor alpha-induced endothelial cell activation. *Metabolism: clinical and experimental* 57(10): 1328–1339. doi: 10.1016/j.metabol.2008.01.036
121. Da Fonseca ACC, Matias D, Garcia C et al (2014) The impact of microglial activation on blood-brain barrier in brain diseases. *Front. Cell. Neurosci.* 8: 362. doi: 10.3389/fncel.2014.00362
122. Vass K, Lassmann H (1990) Intrathecal application of interferon gamma. Progressive appearance of MHC antigens within the rat nervous system. *The American Journal of Pathology* 137(4): 789–800
123. Semple BD, Bye N, Rancan M et al (2010) Role of CCL2 (MCP-1) in traumatic brain injury (TBI): evidence from severe TBI patients and CCL2-/- mice. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 30(4): 769–782. doi: 10.1038/jcbfm.2009.262

124. Benveniste EN, Nguyen VT, Wesemann DR (2004) Molecular regulation of CD40 gene expression in macrophages and microglia. *Brain, behavior, and immunity* 18(1): 7–12. doi: 10.1016/j.bbi.2003.09.001
125. Aloisi F (1999) The role of microglia and astrocytes in CNS immune surveillance and immunopathology. *Advances in experimental medicine and biology* 468: 123–133. doi: 10.1007/978-1-4615-4685-6_10
126. Gadiant RA, Cron KC, Otten U (1990) Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha synergistically stimulate nerve growth factor (NGF) release from cultured rat astrocytes. *Neuroscience Letters* 117(3): 335–340. doi: 10.1016/0304-3940(90)90687-5
127. Lindholm D, Castrén E, Kiefer R et al (1992) Transforming growth factor-beta 1 in the rat brain: increase after injury and inhibition of astrocyte proliferation. *The Journal of cell biology* 117(2): 395–400. doi: 10.1083/jcb.117.2.395
128. Nikolakopoulou AM, Dutta R, Chen Z et al (2013) Activated microglia enhance neurogenesis via trypsinogen secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(21): 8714–8719. doi: 10.1073/pnas.1218856110
129. Thored P, Heldmann U, Gomes-Leal W et al (2009) Long-term accumulation of microglia with proneurogenic phenotype concomitant with persistent neurogenesis in adult subventricular zone after stroke. *Glia* 57(8): 835–849. doi: 10.1002/glia.20810
130. Hickman SE, Kingery ND, Ohsumi TK et al (2013) The microglial sensome revealed by direct RNA sequencing. *Nature neuroscience* 16(12): 1896–1905. doi: 10.1038/nn.3554
131. Burda JE, Bernstein AM, Sofroniew MV (2016) Astrocyte roles in traumatic brain injury. *Experimental Neurology* 275 Pt 3: 305–315. doi: 10.1016/j.expneurol.2015.03.020
132. Bodnar CN, Watson JB, Higgins EK et al (2021) Inflammatory Regulation of CNS Barriers After Traumatic Brain Injury: A Tale Directed by Interleukin-1. *Frontiers in immunology* 12: 688254. doi: 10.3389/fimmu.2021.688254
133. Bushong EA, Martone ME, Jones YZ et al (2002) Protoplasmic Astrocytes in CA1 Stratum Radiatum Occupy Separate Anatomical Domains. *Journal of Neuroscience* 22(1): 183–192. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-01-00183.2002
134. Heller JP, Rusakov DA (2015) Morphological plasticity of astroglia: Understanding synaptic microenvironment. *Glia* 63(12): 2133–2151. doi: 10.1002/glia.22821
135. Castro Dias M, Mapunda JA, Vladymyrov M et al (2019) Structure and Junctional Complexes of Endothelial, Epithelial and Glial Brain Barriers. *IJMS* 20(21): 5372. doi: 10.3390/ijms20215372
136. Liu X, Zhang Z, Guo W et al (2013) The superficial glia limitans of mouse and monkey brain and spinal cord. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology* 296(7): 995–1007. doi: 10.1002/ar.22717
137. Kucukdereli H, Allen NJ, Lee AT et al (2011) Control of excitatory CNS synaptogenesis by astrocyte-secreted proteins Hevin and SPARC. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(32): E440-9. doi: 10.1073/pnas.1104977108
138. Chung W-S, Clarke LE, Wang GX et al (2013) Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways. *Nature* 504(7480): 394–400. doi: 10.1038/nature12776

139. Wang D, Fawcett J (2012) The perineuronal net and the control of CNS plasticity. *Cell and Tissue Research* 349(1): 147–160. doi: 10.1007/s00441-012-1375-y
140. Myer DJ, Gurkoff GG, Lee SM et al (2006) Essential protective roles of reactive astrocytes in traumatic brain injury. *Brain* 129(Pt 10): 2761–2772. doi: 10.1093/brain/awl165
141. Maragakis NJ, Dietrich J, Wong V et al (2004) Glutamate transporter expression and function in human glial progenitors. *Glia* 45(2): 133–143. doi: 10.1002/glia.10310
142. Chen W, Mahadomrongkul V, Berger UV et al (2004) The glutamate transporter GLT1a is expressed in excitatory axon terminals of mature hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience* 24(5): 1136–1148. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1586-03.2004
143. Persson M, Rönnbäck L (2012) Microglial self-defence mediated through GLT-1 and glutathione. *Amino Acids* 42(1): 207–219. doi: 10.1007/s00726-011-0865-7
144. Jones RS, Minogue AM, Connor TJ et al (2013) Amyloid- β -induced astrocytic phagocytosis is mediated by CD36, CD47 and RAGE. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology* 8(1): 301–311. doi: 10.1007/s11481-012-9427-3
145. Bush TG, Puvanachandra N, Horner CH et al (1999) Leukocyte Infiltration, Neuronal Degeneration, and Neurite Outgrowth after Ablation of Scar-Forming, Reactive Astrocytes in Adult Transgenic Mice. *Neuron* 23(2): 297–308. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80781-3
146. Pfaff D, Fiedler U, Augustin HG (2006) Emerging roles of the Angiopoietin-Tie and the ephrin-Eph systems as regulators of cell trafficking. *Journal of leukocyte biology* 80(4): 719–726. doi: 10.1189/jlb.1105652
147. Shen F, Walker EJ, Jiang L et al (2011) Coexpression of angiopoietin-1 with VEGF increases the structural integrity of the blood-brain barrier and reduces atrophy volume. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 31(12): 2343–2351. doi: 10.1038/jcbfm.2011.97
148. Lee S-W, Kim WJ, Choi YK et al (2003) SSeCKS regulates angiogenesis and tight junction formation in blood-brain barrier. *Nat Med* 9(7): 900–906. doi: 10.1038/nm889
149. Profaci CP, Munji RN, Pulido RS et al (2020) The blood-brain barrier in health and disease: Important unanswered questions. *The Journal of experimental medicine* 217(4). doi: 10.1084/jem.20190062
150. Hayakawa K, Pham L-DD, Katusic ZS et al (2012) Astrocytic high-mobility group box 1 promotes endothelial progenitor cell-mediated neurovascular remodeling during stroke recovery. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(19): 7505–7510. doi: 10.1073/pnas.1121146109
151. Boehme AK, Kapoor N, Albright KC et al (2014) Predictors of systemic inflammatory response syndrome in ischemic stroke undergoing systemic thrombolysis with intravenous tissue plasminogen activator. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association* 23(4): e271-6. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2013.11.022
152. Bell RD, Winkler EA, Singh I et al (2012) Apolipoprotein E controls cerebrovascular integrity via cyclophilin A. *Nature* 485(7399): 512–516. doi: 10.1038/nature11087

153. Allen NJ, Bennett ML, Foo LC et al (2012) Astrocyte glypicans 4 and 6 promote formation of excitatory synapses via GluA1 AMPA receptors. *Nature* 486(7403): 410–414. doi: 10.1038/nature11059
154. Turrigiano GG (2006) More than a sidekick: glia and homeostatic synaptic plasticity. *Trends in Molecular Medicine* 12(10): 458–460. doi: 10.1016/j.molmed.2006.08.002
155. Akassoglou K, Probert L, Kontogeorgos G et al (1997) Astrocyte-specific but not neuron-specific transmembrane TNF triggers inflammation and degeneration in the central nervous system of transgenic mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 158(1): 438–445
156. Rankine EL, Hughes PM, Botham MS et al (2006) Brain cytokine synthesis induced by an intraparenchymal injection of LPS is reduced in MCP-1-deficient mice prior to leucocyte recruitment. *The European journal of neuroscience* 24(1): 77–86. doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.04891.x
157. Brambilla R, Bracchi-Ricard V, Hu W-H et al (2005) Inhibition of astroglial nuclear factor kappaB reduces inflammation and improves functional recovery after spinal cord injury. *Journal of Experimental Medicine* 202(1): 145–156. doi: 10.1084/jem.20041918
158. Swanson RA, Ying W, Kauppinen TM (2004) Astrocyte influences on ischemic neuronal death. *Current molecular medicine* 4(2): 193–205. doi: 10.2174/1566524043479185
159. Gorina R, Font-Nieves M, Márquez-Kisinousky L et al (2011) Astrocyte TLR4 activation induces a proinflammatory environment through the interplay between MyD88-dependent NFkB signaling, MAPK, and Jak1/Stat1 pathways. *Glia* 59(2): 242–255. doi: 10.1002/glia.21094
160. Takano T, Kang J, Jaiswal JK et al (2005) Receptor-mediated glutamate release from volume sensitive channels in astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(45): 16466–16471. doi: 10.1073/pnas.0506382102
161. Zador Z, Stiver S, Wang V et al (2009) Role of aquaporin-4 in cerebral edema and stroke. *Handbook of experimental pharmacology*(190): 159–170. doi: 10.1007/978-3-540-79885-9_7
162. Milligan ED, Watkins LR (2009) Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nature Reviews Neuroscience* 10(1): 23–36. doi: 10.1038/nrn2533
163. Hoffman SW, Rzigalinski BA, Willoughby KA et al (2000) Astrocytes generate isoprostanes in response to trauma or oxygen radicals. *Journal of Neurotrauma* 17(5): 415–420. doi: 10.1089/neu.2000.17.415
164. Roth TL, Nayak D, Atanasijevic T et al (2014) Transcranial amelioration of inflammation and cell death after brain injury. *Nature* 505(7482): 223–228. doi: 10.1038/nature12808
165. Floyd CL, Gorin FA, Lyeth BG (2005) Mechanical strain injury increases intracellular sodium and reverses Na⁺/Ca²⁺ exchange in cortical astrocytes. *Glia* 51(1): 35–46. doi: 10.1002/glia.20183
166. Sofroniew MV (2009) Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends in neurosciences* 32(12): 638–647. doi: 10.1016/j.tins.2009.08.002
167. Yoshioka N, Hisanaga S-I, Kawano H (2010) Suppression of fibrotic scar formation promotes axonal regeneration without disturbing blood-brain barrier

- repair and withdrawal of leukocytes after traumatic brain injury. *J. Comp. Neurol.* 518(18): 3867–3881. doi: 10.1002/cne.22431
168. Voskuhl RR, Peterson RS, Song B et al (2009) Reactive astrocytes form scar-like perivascular barriers to leukocytes during adaptive immune inflammation of the CNS. *J. Neurosci.* 29(37): 11511–11522. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1514-09.2009
 169. Burda JE, Sofroniew MV (2014) Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron* 81(2): 229–248. doi: 10.1016/j.neuron.2013.12.034
 170. Griffiths MR, Gasque P, Neal JW (2010) The regulation of the CNS innate immune response is vital for the restoration of tissue homeostasis (repair) after acute brain injury: a brief review. *International journal of inflammation* 2010: 151097. doi: 10.4061/2010/151097
 171. Bianchi R, Verzini M, Garbuglia M et al (1994) Mechanism of S100 protein-dependent inhibition of glial fibrillary acidic protein (GFAP) polymerization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1223(3): 354–360. doi: 10.1016/0167-4889(94)90095-7
 172. Witcher KG, Bray CE, Dziabis JE et al (2018) Traumatic brain injury-induced neuronal damage in the somatosensory cortex causes formation of rod-shaped microglia that promote astrogliosis and persistent neuroinflammation. *Glia* 66(12): 2719–2736. doi: 10.1002/glia.23523
 173. Bezzi P, Domercq M, Brambilla L et al (2001) CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNF α : amplification by microglia triggers neurotoxicity. *Nat Neurosci* 4(7): 702–710. doi: 10.1038/89490
 174. Bianchi R, Giambanco I, Donato R (2010) S100B/RAGE-dependent activation of microglia via NF-kappaB and AP-1 Co-regulation of COX-2 expression by S100B, IL-1 β and TNF- α . *Neurobiology of Aging* 31(4): 665–677. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2008.05.017
 175. Guthrie PB, Knappenberger J, Segal M et al (1999) ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19(2): 520–528. doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-02-00520.1999
 176. Turner JR (2009) Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nature reviews. Immunology* 9(11): 799–809. doi: 10.1038/nri2653
 177. Arya AK, Hu B (2018) Brain–gut axis after stroke. *Brain Circulation* 4(4): 165–173. doi: 10.4103/bc.bc_32_18
 178. Caricilli AM, Castoldi A, Câmara NOS (2014) Intestinal barrier: A gentlemen's agreement between microbiota and immunity. *WJGP* 5(1): 18–32. doi: 10.4291/wjgp.v5.i1.18
 179. Gulbransen BD, Sharkey KA (2012) Novel functional roles for enteric glia in the gastrointestinal tract. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 9(11): 625–632. doi: 10.1038/nrgastro.2012.138
 180. Costantini TW, Bansal V, Krzyzaniak M et al (2010) Vagal nerve stimulation protects against burn-induced intestinal injury through activation of enteric glia cells. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 299(6): G1308-18. doi: 10.1152/ajpgi.00156.2010
 181. Shanahan F (1999) Brain-gut axis and mucosal immunity: a perspective on mucosal psychoneuroimmunology. *Seminars in gastrointestinal disease* 10(1): 8–13

182. Giuffrè M, Moretti R, Campisciano G et al (2020) You Talking to Me? Says the Enteric Nervous System (ENS) to the Microbe. How Intestinal Microbes Interact with the ENS. *Journal of clinical medicine* 9(11). doi: 10.3390/jcm9113705
183. McKernan DP, Dennison U, Gaszner G et al (2011) Enhanced peripheral toll-like receptor responses in psychosis: further evidence of a pro-inflammatory phenotype. *Transl Psychiatry* 1(8): e36. doi: 10.1038/tp.2011.37
184. Cailotto C, Gomez-Pinilla PJ, Costes LM et al (2014) Neuro-anatomical evidence indicating indirect modulation of macrophages by vagal efferents in the intestine but not in the spleen. *PloS one* 9(1): e87785. doi: 10.1371/journal.pone.0087785
185. Treangen TJ, Wagner J, Burns MP et al (2018) Traumatic Brain Injury in Mice Induces Acute Bacterial Dysbiosis Within the Fecal Microbiome. *Frontiers in immunology* 9: 2757. doi: 10.3389/fimmu.2018.02757
186. Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S et al (2013) Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* 504(7480): 446–450. doi: 10.1038/nature12721
187. Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ (2008) How regulatory T cells work. *Nature reviews. Immunology* 8(7): 523–532. doi: 10.1038/nri2343
188. Fontenot JD, Rudensky AY (2005) A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nature Immunology* 6(4): 331–337. doi: 10.1038/ni1179
189. Benakis C, Brea D, Caballero S et al (2016) Commensal microbiota affects ischemic stroke outcome by regulating intestinal $\gamma\delta$ T cells. *Nature medicine* 22(5): 516–523. doi: 10.1038/nm.4068
190. Kebir H, Kreymborg K, Ifergan I et al (2007) Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med* 13(10): 1173–1175. doi: 10.1038/nm1651
191. Liesz A, Suri-Payer E, Veltkamp C et al (2009) Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke. *Nat Med* 15(2): 192–199. doi: 10.1038/nm.1927
192. Foster JA, McVey Neufeld K-A (2013) Gut-brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. *Trends in neurosciences* 36(5): 305–312. doi: 10.1016/j.tins.2013.01.005
193. Sender R, Fuchs S, Milo R (2016) Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS biology* 14(8): e1002533. doi: 10.1371/journal.pbio.1002533
194. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA et al (2006) An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444(7122): 1027–1031. doi: 10.1038/nature05414
195. Honda K, Littman DR (2012) The microbiome in infectious disease and inflammation. *Annual review of immunology* 30: 759–795. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-074937
196. Grenham S, Clarke G, Cryan JF et al (2011) Brain-gut-microbe communication in health and disease. *Frontiers in Physiology* 2: 94. doi: 10.3389/fphys.2011.00094
197. Gorjifard S, Goldszmid RS (2016) Microbiota-myeloid cell crosstalk beyond the gut. *Journal of leukocyte biology* 100(5): 865–879. doi: 10.1189/jlb.3RI0516-222R

198. Luczynski P, McVey Neufeld K-A, Oriach CS et al (2016) Growing up in a Bubble: Using Germ-Free Animals to Assess the Influence of the Gut Microbiota on Brain and Behavior. *The international journal of neuropsychopharmacology* 19(8). doi: 10.1093/ijnp/pyw020
199. Lepage P, Leclerc MC, Joossens M et al (2013) A metagenomic insight into our gut's microbiome. *Gut* 62(1): 146–158. doi: 10.1136/gutjnl-2011-301805
200. Becattini S, Taur Y, Pamer EG (2016) Antibiotic-Induced Changes in the Intestinal Microbiota and Disease. *Trends in Molecular Medicine* 22(6): 458–478. doi: 10.1016/j.molmed.2016.04.003
201. D'Argenio V, Salvatore F (2015) The role of the gut microbiome in the healthy adult status. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 451(Pt A): 97–102. doi: 10.1016/j.cca.2015.01.003
202. Burger-van Paassen N, Vincent A, Puiman PJ et al (2009) The regulation of intestinal mucin MUC2 expression by short-chain fatty acids: implications for epithelial protection. *Biochemical Journal* 420(2): 211–219. doi: 10.1042/BJ20082222
203. Kau AL, Ahern PP, Griffin NW et al (2011) Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature* 474(7351): 327–336. doi: 10.1038/nature10213
204. Rivière A, Selak M, Lantin D et al (2016) Bifidobacteria and Butyrate-Producing Colon Bacteria: Importance and Strategies for Their Stimulation in the Human Gut. *Frontiers in microbiology* 7: 979. doi: 10.3389/fmicb.2016.00979
205. Sherwin E, Sandhu KV, Dinan TG et al (2016) May the Force Be With You: The Light and Dark Sides of the Microbiota-Gut-Brain Axis in Neuropsychiatry. *CNS drugs* 30(11): 1019–1041. doi: 10.1007/s40263-016-0370-3
206. Glebov K, Löchner M, Jabs R et al (2015) Serotonin stimulates secretion of exosomes from microglia cells. *Glia* 63(4): 626–634. doi: 10.1002/glia.22772
207. Rothhammer V, Borucki DM, Tjon EC et al (2018) Microglial control of astrocytes in response to microbial metabolites. *Nature* 557(7707): 724–728. doi: 10.1038/s41586-018-0119-x
208. Nell S, Suerbaum S, Josenhans C (2010) The impact of the microbiota on the pathogenesis of IBD: lessons from mouse infection models. *Nat Rev Microbiol* 8(8): 564–577. doi: 10.1038/nrmicro2403
209. Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F et al (2004) Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 118(2): 229–241. doi: 10.1016/j.cell.2004.07.002
210. Round JL, Mazmanian SK (2009) The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature reviews. Immunology* 9(5): 313–323. doi: 10.1038/nri2515
211. Mazmanian SK, Round JL, Kasper DL (2008) A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature* 453(7195): 620–625. doi: 10.1038/nature07008
212. Fukuda S, Toh H, Hase K et al (2011) Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* 469(7331): 543–547. doi: 10.1038/nature09646
213. Rupnik M, Wilcox MH, Gerding DN (2009) *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 7(7): 526–536. doi: 10.1038/nrmicro2164

214. Buffie CG, Bucci V, Stein RR et al (2015) Precision microbiome reconstitution restores bile acid mediated resistance to *Clostridium difficile*. *Nature* 517(7533): 205–208. doi: 10.1038/nature13828
215. Ayres JS, Trinidad NJ, Vance RE (2012) Lethal inflammasome activation by a multidrug-resistant pathobiont upon antibiotic disruption of the microbiota. *Nat Med* 18(5): 799–806. doi: 10.1038/nm.2729
216. Xiao L, Sonne SB, Feng Q et al (2017) High-fat feeding rather than obesity drives taxonomical and functional changes in the gut microbiota in mice. *Microbiome* 5(1): 43. doi: 10.1186/s40168-017-0258-6
217. Schwabe RF, Jobin C (2013) The microbiome and cancer. *Nature reviews. Cancer* 13(11): 800–812. doi: 10.1038/nrc3610
218. Deitch EA (1990) The role of intestinal barrier failure and bacterial translocation in the development of systemic infection and multiple organ failure. *Arch Surg* 125(3): 403–404. doi: 10.1001/archsurg.1990.01410150125024
219. Houlden A, Goldrick M, Brough D et al (2016) Brain injury induces specific changes in the caecal microbiota of mice via altered autonomic activity and mucoprotein production. *Brain, behavior, and immunity* 57: 10–20. doi: 10.1016/j.bbi.2016.04.003
220. Fung TC, Olson CA, Hsiao EY (2017) Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. *Nat Neurosci* 20(2): 145–155. doi: 10.1038/nn.4476
221. Angelis M de, Piccolo M, Vannini L et al (2013) Fecal microbiota and metabolome of children with autism and pervasive developmental disorder not otherwise specified. *PloS one* 8(10): e76993. doi: 10.1371/journal.pone.0076993
222. Keshavarzian A, Green SJ, Engen PA et al (2015) Colonic bacterial composition in Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 30(10): 1351–1360. doi: 10.1002/mds.26307
223. Hayakawa M, Asahara T, Henzan N et al (2011) Dramatic changes of the gut flora immediately after severe and sudden insults. *Dig Dis Sci* 56(8): 2361–2365. doi: 10.1007/s10620-011-1649-3
224. Lee N, Kim W-U (2017) Microbiota in T-cell homeostasis and inflammatory diseases. *Experimental & molecular medicine* 49(5): e340. doi: 10.1038/emm.2017.36
225. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD et al (2012) CD4⁺T cells: differentiation and functions. *Clinical & developmental immunology* 2012: 925135. doi: 10.1155/2012/925135
226. Singh V, Roth S, Llovera G et al (2016) Microbiota Dysbiosis Controls the Neuroinflammatory Response after Stroke. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 36(28): 7428–7440. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1114-16.2016
227. Olsen AB, Hetz RA, Xue H et al (2013) Effects of traumatic brain injury on intestinal contractility. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 25(7): 593-e463. doi: 10.1111/nmo.12121
228. Zaborin A, Smith D, Garfield K et al (2014) Membership and behavior of ultra-low-diversity pathogen communities present in the gut of humans during prolonged critical illness. *mBio* 5(5): e01361-14. doi: 10.1128/mBio.01361-14

229. McDonald D, Ackermann G, Khailova L et al (2016) Extreme Dysbiosis of the Microbiome in Critical Illness. *mSphere* 1(4). doi: 10.1128/mSphere.00199-16
230. Dirnagl U, Klehmet J, Braun JS et al (2007) Stroke-induced immunodepression: experimental evidence and clinical relevance. *Stroke* 38(2 Suppl): 770–773. doi: 10.1161/01.STR.0000251441.89665.bc
231. Stanley D, Mason LJ, Mackin KE et al (2016) Translocation and dissemination of commensal bacteria in post-stroke infection. *Nature medicine* 22(11): 1277–1284. doi: 10.1038/nm.4194
232. Slyepchenko A, Maes M, Jacka FN et al (2017) Gut Microbiota, Bacterial Translocation, and Interactions with Diet: Pathophysiological Links between Major Depressive Disorder and Non-Communicable Medical Comorbidities. *Psychother Psychosom* 86(1): 31–46. doi: 10.1159/000448957
233. Forsyth CB, Shannon KM, Kordower JH et al (2011) Increased intestinal permeability correlates with sigmoid mucosa alpha-synuclein staining and endotoxin exposure markers in early Parkinson's disease. *PloS one* 6(12): e28032. doi: 10.1371/journal.pone.0028032
234. Cash HL, Whitham CV, Behrendt CL et al (2006) Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science* 313(5790): 1126–1130. doi: 10.1126/science.1127119
235. Buffie CG, Pamer EG (2013) Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nature reviews. Immunology* 13(11): 790–801. doi: 10.1038/nri3535
236. Winek K, Engel O, Koduah P et al (2016) Depletion of Cultivable Gut Microbiota by Broad-Spectrum Antibiotic Pretreatment Worsens Outcome After Murine Stroke. *Stroke* 47(5): 1354–1363. doi: 10.1161/STROKEAHA.115.011800
237. Ichinohe T, Pang IK, Kumamoto Y et al (2011) Microbiota regulates immune defense against respiratory tract influenza A virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(13): 5354–5359. doi: 10.1073/pnas.1019378108
238. Ganai SC, Sanos SL, Kalfass C et al (2012) Priming of natural killer cells by nonmucosal mononuclear phagocytes requires instructive signals from commensal microbiota. *Immunity* 37(1): 171–186. doi: 10.1016/j.immuni.2012.05.020
239. Diehl GE, Longman RS, Zhang J-X et al (2013) Microbiota restricts trafficking of bacteria to mesenteric lymph nodes by CX(3)CR1(hi) cells. *Nature* 494(7435): 116–120. doi: 10.1038/nature11809
240. Lim S-W, Su H-C, Nyam T-TE et al (2021) Ceftriaxone therapy attenuates brain trauma in rats by affecting glutamate transporters and neuroinflammation and not by its antibacterial effects. *BMC Neurosci* 22(1): 54. doi: 10.1186/s12868-021-00659-8
241. Zhou J, Sutherland ML (2004) Glutamate transporter cluster formation in astrocytic processes regulates glutamate uptake activity. *J. Neurosci.* 24(28): 6301–6306. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1404-04.2004
242. Pajarillo E, Rizzor A, Lee J et al (2019) The role of astrocytic glutamate transporters GLT-1 and GLAST in neurological disorders: Potential targets for neurotherapeutics. *Neuropharmacology* 161: 107559. doi: 10.1016/j.neuropharm.2019.03.002
243. Goodwani S, Rao PSS, Bell RL et al (2015) Amoxicillin and amoxicillin/clavulanate reduce ethanol intake and increase GLT-1 expression as

- well as AKT phosphorylation in mesocorticolimbic regions. *Brain Research* 1622: 397–408. doi: 10.1016/j.brainres.2015.07.008
244. Lee K-E, Cho K-O, Choi Y-S et al (2016) The neuroprotective mechanism of ampicillin in a mouse model of transient forebrain ischemia. *The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology* 20(2): 185–192. doi: 10.4196/kjpp.2016.20.2.185
 245. Nizzardo M, Nardini M, Ronchi D et al (2011) Beta-lactam antibiotic offers neuroprotection in a spinal muscular atrophy model by multiple mechanisms. *Experimental Neurology* 229(2): 214–225. doi: 10.1016/j.expneurol.2011.01.017
 246. Atli O, Demir-Ozkay U, Ilgin S et al (2016) Evidence for neurotoxicity associated with amoxicillin in juvenile rats. *Human & experimental toxicology* 35(8): 866–876. doi: 10.1177/0960327115607948
 247. Sun J, Wang F, Ling Z et al (2016) *Clostridium butyricum* attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury in diabetic mice via modulation of gut microbiota. *Brain Research* 1642: 180–188. doi: 10.1016/j.brainres.2016.03.042
 248. Hsieh C-Y, Osaka T, Moriyama E et al (2015) Strengthening of the intestinal epithelial tight junction by *Bifidobacterium bifidum*. *Physiol Rep* 3(3): e12327. doi: 10.14814/phy2.12327
 249. Spindler-Vesel A, Bengmark S, Vovk I et al (2007) Synbiotics, prebiotics, glutamine, or peptide in early enteral nutrition: a randomized study in trauma patients. *JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition* 31(2): 119–126. doi: 10.1177/0148607107031002119
 250. Wolvers D, Antoine J-M, Myllyluoma E et al (2010) Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: prevention and management of infections by probiotics. *The Journal of Nutrition* 140(3): 698S–712S. doi: 10.3945/jn.109.113753
 251. Ait-Belgnaoui A, Durand H, Cartier C et al (2012) Prevention of gut leakiness by a probiotic treatment leads to attenuated HPA response to an acute psychological stress in rats. *Psychoneuroendocrinology* 37(11): 1885–1895. doi: 10.1016/j.psyneuen.2012.03.024
 252. Ma Y, Liu T, Fu J et al (2019) *Lactobacillus acidophilus* Exerts Neuroprotective Effects in Mice with Traumatic Brain Injury. *The Journal of Nutrition* 149(9): 1543–1552. doi: 10.1093/jn/nxz105
 253. Todd SR, Gonzalez EA, Turner K et al (2008) Update on postinjury nutrition. *Current Opinion in Critical Care* 14(6): 690–695. doi: 10.1097/MCC.0b013e3283196562
 254. McCarthy MM, Pickett LA, VanRyzin JW et al (2015) Surprising origins of sex differences in the brain. *Hormones and behavior* 76: 3–10. doi: 10.1016/j.yhbeh.2015.04.013
 255. Gupte R, Brooks W, Vukas R et al (2019) Sex Differences in Traumatic Brain Injury: What We Know and What We Should Know. *Journal of Neurotrauma* 36(22): 3063–3091. doi: 10.1089/neu.2018.6171
 256. Liang Z, Valla J, Sefidvash-Hockley S et al (2002) Effects of estrogen treatment on glutamate uptake in cultured human astrocytes derived from cortex of Alzheimer's disease patients. *Journal of Neurochemistry* 80(5): 807–814. doi: 10.1046/j.0022-3042.2002.00779.x

257. Schaible E-V, Windschügl J, Bobkiewicz W et al (2014) 2-Methoxyestradiol confers neuroprotection and inhibits a maladaptive HIF-1 α response after traumatic brain injury in mice. *Journal of Neurochemistry* 129(6): 940–954. doi: 10.1111/jnc.12708
258. Roof RL, Duvdevani R, Stein DG (1993) Gender influences outcome of brain injury: progesterone plays a protective role. *Brain Research* 607(1-2): 333–336. doi: 10.1016/0006-8993(93)91526-X
259. Roof RL, Hall ED (2000) Estrogen-related gender difference in survival rate and cortical blood flow after impact-acceleration head injury in rats. *Journal of Neurotrauma* 17(12): 1155–1169. doi: 10.1089/neu.2000.17.1155
260. Bramlett HM, Dietrich WD (2001) Neuropathological protection after traumatic brain injury in intact female rats versus males or ovariectomized females. *Journal of Neurotrauma* 18(9): 891–900. doi: 10.1089/089771501750451811
261. Clevenger AC, Kim H, Salcedo E et al (2018) Endogenous Sex Steroids Dampen Neuroinflammation and Improve Outcome of Traumatic Brain Injury in Mice. *Journal of molecular neuroscience* : MN 64(3): 410–420. doi: 10.1007/s12031-018-1038-x
262. Maghool F, Khaksari M, Siahposht Khachki A (2013) Differences in brain edema and intracranial pressure following traumatic brain injury across the estrous cycle: involvement of female sex steroid hormones. *Brain Research* 1497: 61–72. doi: 10.1016/j.brainres.2012.12.014
263. Ley EJ, Short SS, Liou DZ et al (2013) Gender impacts mortality after traumatic brain injury in teenagers. *The journal of trauma and acute care surgery* 75(4): 682–686. doi: 10.1097/TA.0b013e31829d024f
264. Kirkness CJ, Burr RL, Mitchell PH et al (2004) Is there a sex difference in the course following traumatic brain injury? *Biological research for nursing* 5(4): 299–310. doi: 10.1177/1099800404263050
265. Tucker LB, Fu AH, McCabe JT (2016) Performance of Male and Female C57BL/6J Mice on Motor and Cognitive Tasks Commonly Used in Pre-Clinical Traumatic Brain Injury Research. *Journal of Neurotrauma* 33(9): 880–894. doi: 10.1089/neu.2015.3977
266. Tucker LB, Burke JF, Fu AH et al (2017) Neuropsychiatric Symptom Modeling in Male and Female C57BL/6J Mice after Experimental Traumatic Brain Injury. *Journal of Neurotrauma* 34(4): 890–905. doi: 10.1089/neu.2016.4508
267. Flores R, Shi J, Fuhrman B et al (2012) Fecal microbial determinants of fecal and systemic estrogens and estrogen metabolites: a cross-sectional study. *Journal of translational medicine* 10: 253. doi: 10.1186/1479-5876-10-253
268. Homma H, Hoy E, Xu D-Z et al (2005) The female intestine is more resistant than the male intestine to gut injury and inflammation when subjected to conditions associated with shock states. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 288(3): G466-72. doi: 10.1152/ajpgi.00036.2004
269. Ferreira A, Caceres A (1991) Estrogen-enhanced neurite growth: evidence for a selective induction of Tau and stable microtubules. *The Journal of neuroscience* : the official journal of the Society for Neuroscience 11(2): 392–400. doi: 10.1523/JNEUROSCI.11-02-00392.1991
270. Campolo M, Esposito E, Cuzzocrea S (2018) A Controlled Cortical Impact Preclinical Model of Traumatic Brain Injury. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1727: 385–391. doi: 10.1007/978-1-4939-7571-6_30

271. DEITCH AD, MOSES MJ (1957) The Nissl substance of living and fixed spinal ganglion cells. II. An ultraviolet absorption study. *The Journal of biophysical and biochemical cytology* 3(3): 449–456. doi: 10.1083/jcb.3.3.449
272. Kanazawa H, Ohsawa K, Sasaki Y et al (2002) Macrophage/microglia-specific protein Iba1 enhances membrane ruffling and Rac activation via phospholipase C-gamma -dependent pathway. *Journal of Biological Chemistry* 277(22): 20026–20032. doi: 10.1074/jbc.M109218200
273. Papadopoulos V, Lecanu L (2009) Translocator protein (18 kDa) TSPO: an emerging therapeutic target in neurotrauma. *Experimental Neurology* 219(1): 53–57. doi: 10.1016/j.expneurol.2009.04.016
274. McGonigle P, Ruggeri B (2014) Animal models of human disease: challenges in enabling translation. *Biochemical pharmacology* 87(1): 162–171. doi: 10.1016/j.bcp.2013.08.006
275. Thompson HJ, McCormick WC, Kagan SH (2006) Traumatic brain injury in older adults: epidemiology, outcomes, and future implications. *Journal of the American Geriatrics Society* 54(10): 1590–1595. doi: 10.1111/j.1532-5415.2006.00894.x
276. Depreitere B, Meyfroidt G, Roosen G et al (2012) Traumatic brain injury in the elderly: a significant phenomenon. *Acta neurochirurgica. Supplement* 114: 289–294. doi: 10.1007/978-3-7091-0956-4_56
277. Henry CJ, Huang Y, Wynne AM et al (2009) Peripheral lipopolysaccharide (LPS) challenge promotes microglial hyperactivity in aged mice that is associated with exaggerated induction of both pro-inflammatory IL-1beta and anti-inflammatory IL-10 cytokines. *Brain, behavior, and immunity* 23(3): 309–317. doi: 10.1016/j.bbi.2008.09.002
278. Timaru-Kast R, Luh C, Gotthardt P et al (2012) Influence of age on brain edema formation, secondary brain damage and inflammatory response after brain trauma in mice. *PloS one* 7(8): e43829. doi: 10.1371/journal.pone.0043829
279. Johnson VE, MEANEY DF, Cullen DK et al (2015) Animal models of traumatic brain injury. In: Grafman J, Salazar AM (eds) *Traumatic brain injury ; Pt. 1*, vol 127. Elsevier, Edinburgh, pp 115–128
280. Xiao L, Feng Q, Liang S et al (2015) A catalog of the mouse gut metagenome. *Nature Biotechnology* 33(10): 1103–1108. doi: 10.1038/nbt.3353
281. Nguyen TLA, Vieira-Silva S, Liston A et al (2015) How informative is the mouse for human gut microbiota research? *Disease models & mechanisms* 8(1): 1–16. doi: 10.1242/dmm.017400
282. Gao X, Deng P, Xu ZC et al (2011) Moderate traumatic brain injury causes acute dendritic and synaptic degeneration in the hippocampal dentate gyrus. *PloS one* 6(9): e24566. doi: 10.1371/journal.pone.0024566
283. Polydoro M, Acker CM, Duff K et al (2009) Age-dependent impairment of cognitive and synaptic function in the htau mouse model of tau pathology. *J. Neurosci.* 29(34): 10741–10749. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1065-09.2009
284. Geula C (1998) Abnormalities of neural circuitry in Alzheimer's disease: hippocampus and cortical cholinergic innervation. *Neurology* 51(1 Suppl 1): S18–29; discussion S65–7. doi: 10.1212/wnl.51.1_suppl_1.s18
285. Lyeth BG, Jenkins LW, Hamm RJ et al (1990) Prolonged memory impairment in the absence of hippocampal cell death following traumatic brain injury in the rat. *Brain Research* 526(2): 249–258. doi: 10.1016/0006-8993(90)91229-a

286. Chen M-K, Guilarte TR (2008) Translocator protein 18 kDa (TSPO): molecular sensor of brain injury and repair. *Pharmacology & therapeutics* 118(1): 1–17. doi: 10.1016/j.pharmthera.2007.12.004
287. Braniste V, Al-Asmakh M, Kowal C et al (2014) The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Science Translational Medicine* 6(263): 263ra158. doi: 10.1126/scitranslmed.3009759
288. Sutherland R, Croydon EA, Rolinson GN (1972) Amoxycillin: a new semi-synthetic penicillin. *British medical journal* 3(5817): 13–16. doi: 10.1136/bmj.3.5817.13
289. Wilhelm MP (1991) Vancomycin. *Mayo Clinic proceedings* 66(11): 1165–1170. doi: 10.1016/s0025-6196(12)65799-1
290. Erny D, Hrabě de Angelis AL, Jaitin D et al (2015) Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nat Neurosci* 18(7): 965–977. doi: 10.1038/nn.4030
291. Yuan B, Lu X-J, Wu Q (2021) Gut Microbiota and Acute Central Nervous System Injury: A New Target for Therapeutic Intervention. *Frontiers in immunology* 12: 800796. doi: 10.3389/fimmu.2021.800796
292. Patterson TT, Nicholson S, Wallace D et al (2019) Complex Feed-Forward and Feedback Mechanisms Underlie the Relationship Between Traumatic Brain Injury and the Gut-Microbiota-Brain Axis. *Shock (Augusta, Ga.)* 52(3): 318–325. doi: 10.1097/SHK.0000000000001278
293. Bye N, Habgood MD, Callaway JK et al (2007) Transient neuroprotection by minocycline following traumatic brain injury is associated with attenuated microglial activation but no changes in cell apoptosis or neutrophil infiltration. *Experimental Neurology* 204(1): 220–233. doi: 10.1016/j.expneurol.2006.10.013
294. Simon DW, Rogers MB, Gao Y et al (2020) Depletion of gut microbiota is associated with improved neurologic outcome following traumatic brain injury. *Brain Research* 1747: 147056. doi: 10.1016/j.brainres.2020.147056
295. César Machado MC, da Silva FP (2016) Intestinal Barrier Dysfunction in Human Pathology and Aging. *Current Pharmaceutical Design* 22(30): 4645–4650. doi: 10.2174/1381612822666160510125331
296. Faries PL, Simon RJ, Martella AT et al (1998) Intestinal permeability correlates with severity of injury in trauma patients. *The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care* 44(6): 1031-5; discussion 1035-6. doi: 10.1097/00005373-199806000-00016
297. Panther EJ, Dodd W, Clark A et al (2022) Gastrointestinal Microbiome and Neurologic Injury. *Biomedicines* 10(2). doi: 10.3390/biomedicines10020500
298. Dalile B, van Oudenhove L, Vervliet B et al (2019) The role of short-chain fatty acids in microbiota-gut-brain communication. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 16(8): 461–478. doi: 10.1038/s41575-019-0157-3
299. Brun P, Giron MC, Qesari M et al (2013) Toll-like receptor 2 regulates intestinal inflammation by controlling integrity of the enteric nervous system. *Gastroenterology* 145(6): 1323–1333. doi: 10.1053/j.gastro.2013.08.047
300. Shichita T, Sugiyama Y, Ooboshi H et al (2009) Pivotal role of cerebral interleukin-17-producing gammadeltaT cells in the delayed phase of ischemic brain injury. *Nat Med* 15(8): 946–950. doi: 10.1038/nm.1999
301. Rothhammer V, Maccanfroni ID, Bunse L et al (2016) Type I interferons and microbial metabolites of tryptophan modulate astrocyte activity and central nervous

- system inflammation via the aryl hydrocarbon receptor. *Nat Med* 22(6): 586–597. doi: 10.1038/nm.4106
302. Prindiville T, Cantrell M, Wilson KH (2004) Ribosomal DNA sequence analysis of mucosa-associated bacteria in Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases* 10(6): 824–833. doi: 10.1097/00054725-200411000-00017
 303. Mejía-León ME, Petrosino JF, Ajami NJ et al (2014) Fecal microbiota imbalance in Mexican children with type 1 diabetes. *Scientific reports* 4: 3814. doi: 10.1038/srep03814
 304. Messaoudi M, Violle N, Bisson J-F et al (2011) Beneficial psychological effects of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in healthy human volunteers. *Gut microbes* 2(4): 256–261. doi: 10.4161/gmic.2.4.16108
 305. Rice MW, Pandya JD, Shear DA (2019) Gut Microbiota as a Therapeutic Target to Ameliorate the Biochemical, Neuroanatomical, and Behavioral Effects of Traumatic Brain Injuries. *Frontiers in neurology* 10: 875. doi: 10.3389/fneur.2019.00875
 306. Kigerl KA, Hall JCE, Wang L et al (2016) Gut dysbiosis impairs recovery after spinal cord injury. *The Journal of experimental medicine* 213(12): 2603–2620. doi: 10.1084/jem.20151345
 307. Amantea D, Russo R, Bagetta G et al (2005) From clinical evidence to molecular mechanisms underlying neuroprotection afforded by estrogens. *Pharmacological research* 52(2): 119–132. doi: 10.1016/j.phrs.2005.03.002
 308. O'Connor CA, Cernak I, Vink R (2005) Both estrogen and progesterone attenuate edema formation following diffuse traumatic brain injury in rats. *Brain Research* 1062(1-2): 171–174. doi: 10.1016/j.brainres.2005.09.011
 309. Farin A, Deutsch R, Biegon A et al (2003) Sex-related differences in patients with severe head injury: greater susceptibility to brain swelling in female patients 50 years of age and younger. *Journal of neurosurgery* 98(1): 32–36. doi: 10.3171/jns.2003.98.1.0032
 310. Hsu H-L, Chen DY-T, Tseng Y-C et al (2015) Sex Differences in Working Memory after Mild Traumatic Brain Injury: A Functional MR Imaging Study. *Radiology* 276(3): 828–835. doi: 10.1148/radiol.2015142549
 311. Kupina NC, Detloff MR, Bobrowski WF et al (2003) Cytoskeletal protein degradation and neurodegeneration evolves differently in males and females following experimental head injury. *Experimental Neurology* 180(1): 55–73. doi: 10.1016/S0014-4886(02)00048-1
 312. Hall ED, Gibson TR, Pavel KM (2005) Lack of a gender difference in post-traumatic neurodegeneration in the mouse controlled cortical impact injury model. *Journal of Neurotrauma* 22(6): 669–679. doi: 10.1089/neu.2005.22.669

9. Anhang

9.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Gliederung des Gehirns, aus [20]	3
Abbildung 2 Papez Neuronenkreis, aus [20]	6
Abbildung 3 Astrozytenfunktion, modifiziert aus [107]	20
Abbildung 4 Astrogliose modifiziert aus [131]	24
Abbildung 5 Darm- Hirn Achse, modifiziert nach [177]	26
Abbildung 6 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus „Koordination“	50
Abbildung 7 Schematische Darstellung des CCI Models, modifiziert nach [270]	54
Abbildung 8: Schematische Darstellung der durchgeführten Volumetrie im Koronarschnitt nach Nisslfärbung (Ebene 12, Maus 28)	61
Abbildung 9 exemplarische Darstellung der Messung der Dicke der Granularzellschicht des Gyrus dentatus im gefärbten Koronarschnitt	62
Abbildung 10 exemplarische Darstellung der Iba1 (links) und GFAP- Fluoreszenz (rechts)	64
Abbildung 11: Darstellung der mittels ImageJ-Software durchgeführten Quantifizierung der immunopositiven Strukturen	65
Abbildung 12 exemplarisches Elektrophoresegelel des Spectrin GFAP-Westernblots der Proben 15 bis 29	68
Abbildung 13: Darstellung des IgG-Dotblots vor photometrischer Messung, Proben mit Mausnummer beschriftet	69
Abbildung 14 Zyklusablauf PCR IL1beta /IL 6	73
Abbildung 15 Zyklusablauf PCR PPIA	74
Abbildung 16 Die antibiotische und antimykotische Trinkwassergabe hat keinen Einfluss auf die Gewichtsentwicklung	76
Abbildung 17 postoperativer Gewichtsverlust der CCI Tiere	77
Abbildung 18 nachgewiesene Aufnahme der im Wasser gelösten Antibiotika und des Antimykotikums	79
Abbildung 19 Zunahme des Caecumgewichtes nach antibiotischer und antimykotischer Therapie	80
Abbildung 20 Beispielhaftes Foto verdeutlicht die Antibiotika-induzierte Größenzunahme des entnommenen Caecums	81
Abbildung 21 Zählung der Enterobakterien pro mL Stuhlprobe in n/mL präoperativ wie auch postoperativ am Tag der Euthanasie durch das Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universitätsmedizin Mainz verdeutlicht eine bis zu 10^3 -fache Zunahme der Enterobakterien unter antibiotischer Therapie	82
Abbildung 22 Zählung der grampositiven Bakterien pro mL Stuhlprobe in n/mL präoperativ wie auch postoperativ am Tag der Euthanasie durch das Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universitätsmedizin Mainz verdeutlicht eine bis zu 10^4 -fache Abnahme der grampositiven Flora unter antibiotischer Therapie	83
Abbildung 23 Eine Antibiotikagabe hat keinen Einfluss auf die Laufleistung im Rotarod nach CCI	84
Abbildung 24 Die Antibiotische Therapie zeigt negative Auswirkungen auf das neurologische Defizit am 3. postoperativen Tag nach CCI	86
Abbildung 25 Eine antibiotische und antimykotische Therapie hat keinen Einfluss auf das Kontusionsvolumen	87
Abbildung 26: Vergleichende Darstellung des Kontusionsvolumens zwischen CCI+ AB (links, Nissl-Färbung des koronaren Hirnschnittes aus der Ebene 11, Maus 16), und CCI+Veh (rechts, Nissl-Färbung des koronaren Hirnschnittes Ebene 12, Maus 28)	88

Abbildung 27 Eine antibiotische und antimykotische Therapie hat keinen Einfluss auf die Ausdehnung eines traumatischen Hirnschadens in die kontralaterale Hemisphäre.....	89
Abbildung 28 Die Gabe von Antibiotika und Antimykotikum hat keinen Einfluss auf die relative Dickenmessung der Granularzellschicht des Gyrus dentatus. Vergleich ipsilateral zu kontralateral.....	91
Abbildung 29 Die Gabe von Antibiotika und Antimykotikum beeinflusst die Astrozytenaktivierung nach CCI nicht.	93
Abbildung 30 Die Gabe von Antibiotika und Antimykotikum beeinflusst die Astrozytenaktivierung in der kontralateralen Hemisphäre nicht.	95
Abbildung 31 Eine antibiotische Therapie hat keinen Einfluss auf die posttraumatische Mikrogliaaktivierung im periläsionalen Gebiet.	97
Abbildung 32 Die kontralaterale Mikrogliaaktivierung zeigte weder durch Trauma noch durch Antibiose eine signifikante Zunahme.....	99
Abbildung 33 exemplarische Bilder der Iba1 (linke Spalte) und GFAP (rechte Spalte)-immunopositiven Teilchen der untersuchten Hirnschnitte. Dargestellt ist das ipsilaterale periläsionale Feld der CCI Tiere und der anatomisch analogen Region der Sham Tiere, Skala 100µm. Deutliche Zunahme der GFAP wie auch Iba1-Immunantwort in den CCI Tieren. Keine signifikanten Auswirkungen einer antibiotischen/antimykotischen Therapie..	101
Abbildung 34 Abbildung 35 Die Gabe von Antibiotika und Antimykotikum hat keinen Einfluss auf die Expression von GFAP	102
Abbildung 36 Die Gabe von Antibiotika und Antimykotikum hat keinen Einfluss auf die Expression von Spectrin.....	104
Abbildung 37 Westernblots zur GFAP und Spectrin Quantifizierung, normalisiert zur GAPDH Expression im periläsionalen Feld der CCI Tiere und analogen Feld der Sham Tiere 72 Stunden postinterventionell.....	106
Abbildung 38: Fotografie des IgG Dotblots vor photometrischer Quantifizierung der optischen Dichte. Proben mit Maus-Nummer beschriftet (CCI AB Gruppe: Proben Nummer 8,9,10,16,17,18,23,24,25,33,34,35), CCI Veh Gruppe: Proben Nummer 2,3,11,12,13,28,29,30,38,39,40).....	107
Abbildung 39 Eine antibiotische Therapie zeigt keine signifikanten Auswirkungen auf den posttraumatischen IgG- Nachweis	107
Abbildung 40 Die Gabe von Antibiotika und Antimykotikum hat keinen Einfluss auf die TSPO-Expression.....	109
Abbildung 41 Die Gabe von Antibiotika und Antimykotikum hat keinen Einfluss auf die posttraumatische CD74-Expression	111

9.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Glasgow Coma Scale (GCS), modifiziert nach [30].....	7
Tabelle 2: deskriptive Statistik der Gewichtsentwicklung, dargestellt mittels Mittelwert (MW) in Gramm (g) und Standardfehler des Mittelwertes (SEM).....	78
Tabelle 3 deskriptive Statistik des Caecumgewichtes, Mittelwert (MW) in Gramm (g) und zugehöriger Standardfehler des Mittelwertes (SEM).....	81
Tabelle 4 deskriptive Statistik des Zeit bis zum Fall auf dem Rotarod; Mittelwert (MW) in Sekunden (s), und zugehöriger Standardfehler des Mittelwertes (SEM)	85
Tabelle 5 deskriptive Statistik der Punktezahl im Neuroscore; Mittelwert (MW) in Punkten, und zugehöriger Standardfehler des Mittelwertes (SEM)	86
Tabelle 6 deskriptive Statistik des Kontusionsvolumens Mittelwert (MW) in Kubikmillimetern (mm ³), und zugehöriger Standardfehler des Mittelwertes (SEM)	88
Tabelle 7 deskriptive Statistik des Hirnvolumens der kontralateralen Hemisphäre, Mittelwert (MW) in Kubikmillimetern (mm ³) und zugehöriger Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Sham Veh n=8, Sham AB n=8, CCI Veh n=12, CCI AB n=10	90
Tabelle 8 deskriptive Statistik der relativen Dicke der Granularzellschicht des Gyrus dentatus, ipsilateral im Verhältnis zu kontralateral. Mittelwert (MW) und zugehöriger Standardfehler des Mittelwertes (SE Diff). Sham Veh n=8, Sham AB n=8, CCI Veh n=12, CCI AB n=12	92
Tabelle 9 deskriptive Statistik der Auszählung GFAP-immunopositiver Teilchen nach immunhistochemischer Färbung im normierten periläsionalen Gebiet. Mittelwert (MW) und zugehöriger Standardfehler des Mittelwertes (SE Diff). Sham Veh n=8, Sham AB n=8, CCI Veh n=12, CCI AB n=12	94
Tabelle 10 deskriptive Statistik der Auszählung GFAP-immunopositiver Teilchen nach immunhistochemischer Färbung im normierten kontralateralen Gebiet. Mittelwert (MW) und zugehöriger Standardfehler des Mittelwertes (SE Diff). Sham Veh n=8, Sham AB n=8, CCI Veh n=12, CCI AB n=12	96
Tabelle 11 deskriptive Statistik der Auszählung Iba1-immunopositiver Teilchen nach immunhistochemischer Färbung im normierten periläsionalen Gebiet. Mittelwert (MW) und zugehöriger Standardfehler des Mittelwertes (SE Diff). Sham Veh n=8, Sham AB n=8, CCI Veh n=12, CCI AB n=12	98
Tabelle 12 deskriptive Statistik der Auszählung Iba1-immunopositiver Teilchen nach immunhistochemischer Färbung im normierten kontralateralen Feld. Mittelwert (MW) und zugehöriger Standardfehler des Mittelwertes (SE Diff). Sham Veh n=8, Sham AB n=8, CCI Veh n=12, CCI AB n=12	100
Tabelle 13 deskriptive Statistik des GFAP-Nachweises normalisiert zur GAPDH. Mittelwert (MW) und zugehöriger Standardfehler des Mittelwertes (SE Diff). Sham Veh n=8, Sham AB n=8, CCI Veh n=11, CCI AB n=12	103
Tabelle 14 deskriptive Statistik des Spectrin-Nachweises normalisiert zur GAPDH. Mittelwert (MW) und zugehöriger Standardfehler des Mittelwertes (SE Diff). Sham Veh n=8, Sham AB n=8, CCI Veh n=11, CCI AB n=12	105
Tabelle 15 deskriptive Statistik des Immunglobulin G Nachweises, Mittelwert (MW) und zugehöriger Standardfehler des Mittelwertes (SE Diff). Sham Veh n=7, Sham AB n=8, CCI Veh n=12, CCI AB n=10	108
Tabelle 16 deskriptive Statistik der zu PPIA normalisierten TSPO Expression. Mittelwert (MW) und zugehöriger Standardfehler des Mittelwertes (SE Diff). Sham Veh n=8, Sham AB n=8, CCI Veh n=12, CCI AB n=10	110
Tabelle 17 deskriptive Statistik der zu PPIA normalisierten MHC2 Expression. Mittelwert (MW) und zugehöriger Standardfehler des Mittelwertes (SE Diff). Sham Veh n=8, Sham AB n=8, CCI Veh n=12, CCI AB n=10	112