

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

Der zeitabhängige Einfluss einer inflammatorischen pulmonalen Komplikation auf die
Hirnpathologie nach Schädel-Hirn-Trauma im Mausmodell

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

Vorgelegt von

Timon Matthias Troß
aus Brückrachedorf

Mainz, 2025

Nachnutzungsrechte: Namensnennung, Weitergabe unter gleichen Bedingungen
(CC-BY-SA-4.0)

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

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 05. September 2025

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VII
TABELLENVERZEICHNIS	IX
1 EINLEITUNG	1
2 LITERATURDISKUSSION	3
2.1 SHT	3
2.1.1 <i>Definition</i>	3
2.1.2 <i>Epidemiologie</i>	5
2.1.3 <i>Pathophysiologie</i>	6
2.1.4 <i>Therapie</i>	17
2.1.5 <i>Komplikationen</i>	18
2.2 PULMONALE INFLAMMATION	20
2.2.1 <i>Lipopolysaccharide</i>	20
2.2.2 <i>LPS-Signalwege</i>	21
2.2.3 <i>Akute Lungenschädigung und SHT</i>	25
2.3 TIEREXPERIMENTE ALS MODELL	29
3 MATERIAL	31
3.1 GERÄTE.....	31
3.2 VERBRAUCHSMATERIAL	33
3.3 ARZNEISTOFFE.....	34
3.4 CHEMIKALIEN	34
3.5 PUFFER UND LÖSUNGEN.....	36
3.5.1 <i>Puffer</i>	36
3.5.2 <i>Lösungen</i>	36
3.6 ANTIKÖRPER	37
3.6.1 <i>Primäre</i>	37
3.6.2 <i>Sekundäre</i>	37
3.7 KITS	38
3.8 PRIMER.....	38
3.9 SOFTWARE	39
4 METHODEN	40
4.1 PLANUNG	40
4.1.1 <i>Genehmigung des Tierversuchs</i>	41

4.1.2	Versuchstiere.....	41
4.1.3	Versuchsaufbau.....	43
4.2	DURCHFÜHRUNG.....	44
4.2.1	Verhaltensbiologische Untersuchungen.....	44
4.2.2	Controlled Cortical Impact und LPS-Inhalation.....	49
4.3	DATENERHEBUNG.....	58
4.3.1	Histologie.....	58
4.3.2	Molekularbiologie.....	65
4.3.3	Statistik.....	73
5	ERGEBNISSE.....	74
5.1	VERHALTENS BIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN.....	74
5.1.1	NSS – LPS-Inhalation zeigt keinen Einfluss auf das neuromotorische Defizit nach CCI oder Sham	74
5.1.2	Rota-Rod – CCI verkürzt die Laufzeit; eine nachfolgende LPS-Inhalation hat keinen Einfluss auf die Leistung im Rota-Rod Test.....	76
5.1.3	OFT – CCI und LPS-Inhalation zeigen keinen signifikanten Einfluss auf das Angstverhalten der Versuchstiere.....	78
5.1.4	EPM – CCI und LPS-Inhalation nach 24 Stunden beeinträchtigen das Angstverhalten an Tag 6 postoperativ.....	80
5.1.5	Gewicht – CCI und LPS-Inhalation zeigen keinen konstant signifikanten Einfluss auf das Körpergewicht.....	84
5.2	HISTOLOGIE UND IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG.....	86
5.2.1	Schadensvolumen – LPS-Inhalation hat keinen signifikanten Einfluss auf die Größe der Läsion nach CCI	86
5.2.2	Immunfluoreszenzfärbung.....	87
5.3	MOLEKULARBIOLOGIE.....	93
5.3.1	Genexpressionsanalyse.....	93
5.3.2	Dot Blot – CCI erhöht die IgG-Konzentration im Hirngewebe, LPS-Inhalation hat keinen signifikanten Einfluss.....	98
6	DISKUSSION.....	100
6.1	KOMBINIERTES CCI- UND LPS-MODELL AN DER MAUS.....	100
6.2	NEUROMOTORISCHE UND KOGNITIVE DEFIZITE.....	102
6.3	POSTTRAUMATISCHES LÄSIONSVOLUMEN.....	104
6.4	AKTIVIERUNG VON GLIAZELLEN IM HIPPOCAMPUS.....	106
6.5	NEURO- UND PULMONALE INFLAMMATION.....	108
6.6	SCHLUSSFOLGERUNGEN.....	111
7	ZUSAMMENFASSUNG.....	114
	LITERATURVERZEICHNIS.....	116

DANKSAGUNG	131
TABELLARISCHER LEBENSLAUF.....	132

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl / g	Mikroliter pro Gramm
µm	Mikrometer
AECC	American European Consensus Conference
AG	Antigen
AK	Antikörper
ALI	Acute Lung Injury / Akute Lungenschädigung
AMV	Atemminutenvolumen
ANOVA	analysis of variance / Varianzanalyse
Arg-1	Arginase
Art.	Arteriell
ATP	Adenosintriphosphat
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
C1q	Komplement Komponent 1 Subkomponent q
ca.	circa
CCI	Controlled Cortical Impact
cCT	kraniale Computertomographie
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CP	Crossing-Point

CPP	Zerebraler Perfusionsdruck
C _{RNA}	RNA-Konzentration
CSD	Cortical Spreading Depression
CVR	Zerebrovaskulärer Widerstand
d	Tag
DAMP	damage-associated molecular pattern
DC	detergent compatible
DGAI	Deutsche Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin
DIC	disseminierte intravasale Gerinnung
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPM	Elevated Plus Maze
EV	extrazelluläre Vesikel
EZM	extrazelluläre Matrix
FPI	Fluid Percussion Model
g	g-Kraft (Erdbeschleunigung)
g	Gramm
GABA	γ-Aminobuttersäure
GBP2	Guanin Nucleotid Bindungsprotein 2
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GIT	Gastrointestinal Trakt
H ₂ O	Wasser
Hz	Hertz
HZV	Herzzeitvolumen
i.p.	intraperitoneal
ICP	Intrakranieller Druck

IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie/Immunhistochemisch
IKK ϵ	I κ B kinase ϵ
IL-1 β	Interleukin 1 beta
IL-6	Interleukin 6
IRAK	IL-1 receptor-associated kinase
IRF3	Interferon-regulatorischen Faktor 3
K ⁺	Kaliumionen
Kg KG	Kilogramm Körpergewicht
kg	Kilogramm
KR	Kryoröhrchen
l / min	Liter pro Minute
LBP	LPS binding protein
LPS	Lipopolysaccharide
m / s	Meter pro Sekunde
MAP	Mittlerer arterieller Blutdruck
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MD-2	myeloid-differentiation factor 2
MHC-II	major histocompatibility complex Klasse II
min	Minuten
MM	Magermilch
mm	Millimeter
MMP	Matrix Metalloproteasen
MRC1/CD206	mannose receptor C1
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
ms	Millisekunden
Na ⁺	Natriumionen

NaCl	Natrium-Chlorid-Salz
NADPH	Nicotinamid Adenin Dinukleotid Phosphat
NGS	Normal Goat Serum
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	nitric oxidative species
NSS	Neurological Severity Score
OD	Optische Dichte
OFT	open field Test
OP	Operation
OT	Objekträger
PAF	platelet activating factor
PAMP	pathogen-associated molecular patterns
PBS	Proteinbiosynthese
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PPIA	Peptidylpropyl Isomerase A
PRR	pattern recognition receptor
PVC	Polyvinylchlorid
qRT-PCR	quantitative real-time Polymerasekettenreaktion
rER	raues Endoplasmatisches Retikulum
RIP1	receptor-interacting protein 1
RIPA-Puffer	Radio-Immunpräzipitationsassay-Puffer
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	Region of interest
ROS	reactive oxygen species
RR	Rota Rod

RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
s	Sekunden
SAB	Subarachnoidalblutung
SAE	Sepsis-assoziierte Enzephalopathie
SDS	Sodium dodecyl sulfat
Sham	Scheinoperation
SHT	Schädel-Hirn-Trauma
SIRS	Systemic Inflammation Response Syndrom
SLPI	Secretory Leukocyte Protease Inhibitor
TBK1	TANK-binding kinase 1
TBS	TRIS-buffered saline
TBST	TRIS-buffered saline + Tween®20
TGFβ	Transforming Growth Factor beta
TIR	Toll-interleukin-1 receptor
TIRAP	TIR domain-containing adaptor protein
TLR	Toll-Like-Rezeptoren
TLR4	Toll-like Rezeptor 4
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor alpha
TRAF6	TNF receptor-associated factor 6
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β
TRIS	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
TRPA1	transient receptor potential ankyrin 1
VNS	vegetatives Nervensystem
WBB	Wasserstoffbrückenbindungen
WD	Weight Drop Model
WHO	World Health Organisation

ZNS

Zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung eines primären und sekundären Hirnschadens über die Zeit	6
Abbildung 2: Druck-Volumen-Kurve des intrakraniellen Systems.	10
Abbildung 3: Mikrogliamarker in Abhängigkeit der Zeit nach CCI. Modifiziert aus (112).....	15
Abbildung 4: Überblick über die LPS-Signaltransduktion vermittelt durch TLR4	22
Abbildung 5: Mechanismen der molekularen Reaktion auf LPS.....	24
Abbildung 6: Darstellung des Walking Beam Test	45
Abbildung 7: Darstellung des RR.....	46
Abbildung 8: Darstellung des Open Field Tests	48
Abbildung 9: Darstellung EPM von vorne (links) und von oben über PC-Software (rechts)...	49
Abbildung 10: CCI-Arbeitsplatz.....	51
Abbildung 11: Versuchsaufbau eines CCI	52
Abbildung 12: Mausbox mit Inhalator.....	54
Abbildung 13: Beschriftung der OT.....	56
Abbildung 14: Trimschnittebenen	57
Abbildung 15: Exemplarische Gehirnschnitte nach Nissl-Färbung.....	59
Abbildung 16: Beispielhafte Messung der Schadensfläche.....	60
Abbildung 17: Immunfluoreszenzfärbung CCI und Sham	63
Abbildung 18: Beispielhafte Darstellung der Größe eines ipsilateralen Hippocampus.....	64
Abbildung 19: Exemplarische Amplifikationskurven einer qPCR.....	69
Abbildung 20: Exemplarische Darstellung eines Dot-Blots auf Nitrocellulose-Membran	72
Abbildung 21: Ergebnisse des Neurological Severity Scores.....	74
Abbildung 22: Ergebnisse des Rota-Rod.....	77
Abbildung 23: Ergebnisse des OFT	79
Abbildung 24: Ergebnisse des EPM an Tag 6 postoperativ - Gesamtdistanz und mittlere Geschwindigkeit	81
Abbildung 25: Ergebnisse des EPM an Tag 6 postoperativ – Zeit in offenen Armen und Kopfstöße.....	83
Abbildung 26: Ergebnisse der Körpergewichtsmessung.....	85
Abbildung 27: Ergebnisse der Auswertung des Läsionsvolumens	86
Abbildung 28: Ergebnisse der Auswertung der Hippocampusgröße	88
Abbildung 29: Ergebnisse der IHC-Auswertung von CD68	90
Abbildung 30: Ergebnisse der IHC-Auswertung von GFAP	92

Abbildung 31: Ergebnisse der qRT-PCR der Targets CD68, MRC1, IL-6, Lyz2 und SLPI aus Lungengewebe.....	95
Abbildung 32: Ergebnisse der qRT-PCR der Targets CD68, MRC1, IL-6 und GFAP (A-D) aus Hirngewebe. Außerdem der gleichen Targets normalisiert zu sham (E-H).....	97

Tabellenverzeichnis

Tabelle I: Glasgow Coma Scale, maximal 15 Punkte, minimal 3 Punkte.....	4
Tabelle II: Schweregradeinteilung des SHT über GCS-Punktwerte	4
Tabelle III: Verwendete Puffer und deren Inhaltsstoffe	36
Tabelle IV: Gruppeneinteilung	42
Tabelle V: Physiologische Lungenparameter einer adulten Maus.....	53
Tabelle VI: Pipettierschema für qPCR	70

1 Einleitung

Obwohl Lebenserwartung und medizinische Versorgung stetig verbessert werden, ist das Schädel-Hirn-Trauma (SHT) noch immer eine der Hauptursachen für Tod und dauerhafte Behinderung im jungen Erwachsenenalter (1-3). Während in den Industrienationen ein Sturzereignis den Verkehrsunfall als Hauptursache abgelöst hat (2-4), steigt weltweit die Inzidenz und Rate schwerer SHT, vor allem in jungen Bevölkerungsgruppen laut WHO, an (5). Aufgrund des demografischen Wandels ist jedoch auch in Industrienationen zukünftig mit steigenden Inzidenzen des SHTs zu rechnen (4). Zusammengenommen offenbart dies die erhebliche medizinische und sozioökonomische Relevanz des Krankheitsbildes. Es ist daher von entscheidendem Interesse, die Entwicklung geeigneter und neuer Therapiestrategien voranzutreiben.

Der primäre Hirnschaden jedoch, bleibt als direkte Folge der Krafteinwirkung des Unfallmechanismus jeder Therapie unzugänglich. Schutz bieten lediglich Präventionsmaßnahmen. Somit liegt das Hauptaugenmerk jedes bisher etablierten Therapieregimes auf der Reduktion des Voranschreitens des reversiblen sekundären Hirnschadens (6-8). Pathophysiologisch kommt es unter anderem (u.a.) zu Blut-Hirn-Schranken-Störungen (BHS), Exzitotoxizität, Ödembildung mit gesteigertem intrakraniell Druck (ICP) und massiver Neuroinflammation. Wobei diese Inflammation mitunter noch Jahre nach dem eigentlichen Trauma nachgewiesen werden kann und als Auslöser für viele mögliche Folgeerkrankungen wie Epilepsie, Depressionen oder posttraumatische Belastungsstörungen (PTBS) verantwortlich gemacht werden kann (6-10). Leider ist es bis heute nicht gelungen, eine geeignete Therapie, die direkt in die pathophysiologischen Kaskaden des sekundären Hirnschadens eingreift, zu entwickeln. Daher besteht das Ziel der gegenwärtigen Grundlagenforschung, zu der auch diese Arbeit zählt, neue Erkenntnisse über die pathophysiologischen Vorgänge bei SHT zu gewinnen.

Die intensivmedizinische Behandlung von vor allem schweren SHT gestaltet sich in vielen Fällen als herausfordernd und prolongierend. Während dieser Zeit ist die Entwicklung sekundärer Organschäden keine Seltenheit (11). Dabei nehmen pulmonale Komplikationen eine herausragende Rolle ein (12-15). Das mögliche Spektrum reicht von einer einfachen, durch maschinelle Beatmung ausgelösten Pneumonie über eine akute Lungenschädigung (*engl. acute lung injury, ALI*), bis hin zu seiner schwersten Komplikation, dem *Acute Respiratory Distress Syndrome (engl. ARDS)*. Allein das ARDS tritt mit einer Inzidenz von 20 % nach SHT auf, ist mit massiver Verschlechterung der Prognose für die Patienten und mit weiteren Folgeerkrankungen wie Sepsis, kognitiven Dysfunktionen und affektiven Störungen

vergesellschaftet (16-18). In den meisten Fällen wird das ARDS hauptsächlich durch eine bakterielle Pneumonie oder eine extrapulmonale Sepsis verursacht, gefolgt von systemischen Inflammationsreaktionen nach Trauma oder direkter mechanischer Schädigung (19, 20).

Lipopolysaccharide (LPS) ermöglichen als gängigstes pathogenassoziiertes molekulares Muster (*engl. pathogen-associated molecular patterns*, PAMP) durch inhalative Exposition eine akute pulmonale Inflammationsreaktion zu verursachen (21, 22). LPS sind Membranbestandteile gramnegativer Bakterien und werden üblicherweise in verschiedenen murinen Modellen zur Induktion einer Sepsis oder pulmonaler Komplikationen wie einer ALI verwendet (21, 23). Dabei unterscheiden sich die Applikationswege. Während in der überwiegenden Anzahl eine intraperitoneale (i.p.) Injektion oder direkte intratracheale Installation vorgenommen wird, ist die inhalative Darbietungsform bisher nur wenig untersucht. Unabhängig vom Applikationsweg deuten aktuelle Publikationen auf eine LPS-induzierte neuroinflammatorische Reaktion des gesunden Hirnparenchyms hin. Diese Reaktion wird durch Aktivierung von Gliazellen über den nukleären Faktor Kappa B (*engl. nuclear factor kappa B*, NF- κ B) Signalweg und der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β , IL-6 und TNF- α getragen (24-28).

Da auch der sekundäre Hirnschaden wesentlich durch lokale und systemische Inflammationsreaktionen vorangetrieben wird, ist die Beeinflussung eines solchen inhalativen LPS-Stimulus auf die stattfindenden inflammatorischen Reaktionen nach SHT nicht nur möglich, sondern vielmehr wahrscheinlich. Aus diesem Grund ist es essenziell, die bisher kaum untersuchten pathophysiologischen Effekte einer posttraumatischen pulmonalen Schädigung auf das Hirnparenchym und das neurologische Outcome zu erforschen. Dazu wird dem murinen Controlled Cortical Impact-Modell (CCI) die neuartige inhalative LPS-Exposition zu zwei verschiedenen posttraumatischen Zeitpunkten hinzugefügt, um so den zeitabhängigen Einfluss einer LPS-induzierten pulmonalen Komplikation auf die hirnpathologischen Prozesse, insbesondere der Neuroinflammation, zu untersuchen.

2 Literaturdiskussion

2.1 SHT

2.1.1 Definition

Das SHT ist Folge einer äußeren Krafteinwirkung mit Verletzung des Schädels und einhergehender Funktionseinschränkung, eventuell bleibender Schädigung des Gehirns und Bruch des knöchernen Schädels. Oft liegen zusätzlich weitere Blessuren knöcherner Art wie beispielsweise Schädelbasisfrakturen oder Verletzungen des Weichgewebes im Kopfbereich vor. Allgemein werden zwei Formen des SHT ausgehend vom Zustand der Dura mater unterschieden: das geschlossene und das offene SHT. Beim geschlossenen (oder gedeckten) SHT bleibt die Dura mater intakt. Das Offene wird durch die Durchtrennung der Dura mater und der Herstellung einer Verbindung zwischen dem intrakraniellen Raum und der Außenwelt definiert. Hier kann es zum Austritt von Rhinoliqorrhö und im Extremfall auch von Hirnsubstanz kommen. Sobald Letzteres auftritt, gilt das Vorliegen eines offenen SHT als bewiesen.

Zur Abschätzung des Schweregrades eines SHT wird die sogenannten Glasgow-Koma-Skala (*engl. Glasgow Coma Scale, GCS*) herangezogen. Diese Skala wird 1974 von Teasdale und Jennett erstmalig für die Verlaufsbeobachtung verwendet (29) und im weiteren Entwicklungsprozess zur Beurteilung und Ersteinschätzung des Ausmaßes einer Bewusstseinsstörung bei allen Akut- und Traumapatienten als den geltenden Standard etabliert. Der Patient wird auf die Teilaspekte des Bewusstseins, seine Fähigkeiten des Augenöffnens, der verbalen Kommunikation und der motorischen Koordination hin beurteilt. Je nach Ausmaß der Fähigkeiten werden entsprechende Punkte vergeben (**Tabelle I**).

Tabelle I: Glasgow Coma Scale, maximal 15 Punkte, minimal 3 Punkte

Punkte	Augenöffnen	Verbale Antwort	Motorische Antwort
6			Aufforderung
5		Adäquat	Gezielt auf Schmerz
4	Spontan	Verwirrt	Ungezielt auf Schmerz
3	Aufforderung	Inadäquat	Beugereaktion
2	Schmerzreiz	Unverständlich	Streckreaktion
1	Keine	Keine	Keine

Durch Bilden der Summe der Punktwerte können drei verschiedene Schweregrade unterschieden werden:

Tabelle II: Schweregradeinteilung des SHT über GCS-Punktwerte

Schweregrad SHT	GCS-Punkte
Leichtes	15-13
Mittelschweres	12-9
Schweres	> 9

Auch wenn die GCS bis heute wohl die am weitesten verbreitete und am einfachsten anwendbare Skala zur Beurteilung von Bewusstseinsstörungen darstellt (30), muss darauf hingewiesen werden, dass die Skala Limitationen hat und damit auch die mit ihr einhergehende Einteilung des Schweregrades eines SHTs. Wie bei jeder anderen medizinischen Skala wird ein komplexes Krankheitsbild mit seinen Symptomen auf einzelne Faktoren in Verbindung mit Nummern reduziert. Deswegen sollte die GCS nicht isoliert betrachtet und eine Diagnose nicht nur auf ihr beruhend gestellt werden (30, 31). Außerdem besteht eine fragliche prognostische Relevanz und diese ist aufgrund der individuellen Erhebung in immer unterschiedlichen Settings durch den Untersucher auch nur bedingt reproduzierbar (32). Eine weitere Einschränkung besteht darin, dass der Einfluss von Sedativa, die beispielsweise für eine erforderliche Schutzintubation verwendet wurden, nicht

ausreichend geklärt ist (33). Gleiches gilt auch für die nur indirekt mögliche Bewertung von Hirnstammfunktionen (34).

Unabhängig von der GCS hat die Weltgesundheitsorganisation (*engl. World Health Organisation, WHO*) klinische Kriterien eines leichten SHT definiert (35, 36). Neben einem kurzen Bewusstseinsverlust von unter 30 Minuten, kann eine posttraumatische Amnesie von unter 24 Stunden oder eine qualitative Bewusstseinsstörung, wie z.B. Desorientiertheit, als klinische Manifestation eines Schlages oder Erschütterung des Kopfes auftreten. Darüber hinaus dürfen keine weiteren neurologischen Symptome auftreten.

2.1.2 Epidemiologie

Zu den Hauptursachen des SHT zählen Haus- und Verkehrsunfälle (1, 2), sowie Sport- und Gewaltverletzungen. Nach Daten der Gesundheitsberichterstattung des Bundes haben im Jahr 2021 347.275 Menschen in Deutschland ein SHT jedweden Schweregrades (ICD-10 S00-S09: Verletzungen des Kopfes), das zu einer vollstationären Behandlung führte, erlitten. Von diesen sind 7.000 Patienten verstorben (37). Auch in den vorherigen Jahren beläuft sich die Inzidenz pro 100.000 Einwohner auf ungefähr 350 bis 450 pro Jahr (Gemittelte, altersstandardisierte Fallzahl je 100.000 Einwohner zwischen den Jahren 2010 bis 2021: 456). Den allergrößten Anteil hieran stellen die leichten SHT mit ungefähr 80 % dar (38), wobei auffällig ist, dass Männer im Vergleich zu Frauen mit circa (ca.) 60 % zu 40 % in der Vergangenheit häufiger betroffen waren (39). Jüngere Daten legen jedoch neben einem Angleichen der Fallzahlen von weiblichen und männlichen Patienten, auch ein wechselndes epidemiologisches Muster nahe, wonach vermehrt Patienten, die das 65. Lebensjahr überschritten haben, im Rahmen von häuslichen Stürzen von einem SHT betroffen sind (4, 37, 40). Im Gegensatz dazu erleiden junge Männer mit einem Häufigkeitsgipfel zwischen 15 und 24 Jahren überwiegend ein schweres SHT, wobei dessen Mortalität zwischen 30 und 50 % liegt (41). Weltweit kommt es zu einem Anstieg von Inzidenz und Rate schwerer SHT vor allem in jungen Bevölkerungsgruppen. Vermutlich ist dies durch eine steigende Motorisierung von einkommensschwächeren Ländern zu erklären (5). Die zweite größere Gruppe stellen, neben den Hochbetagten, Patienten unter 15 Jahren dar. Die überwiegende Anzahl an Patienten mit SHT haben ein stumpfes Trauma mit relevanten Verletzungen anderer Körperregionen (3). Aber das SHT stellt bei polytraumatisierten Patienten die Einzelverletzung mit der größten prognostischen Relevanz dar.

2.1.3 Pathophysiologie

2.1.3.1 Primärer und sekundärer Hirnschaden

Prinzipiell kann man bei einem SHT zwei grundlegende Mechanismen unterscheiden: I) Eine fokale Schädigung des Gehirngewebes, aufgrund der direkten Gewalteinwirkung von außen und II) ein diffuser Schaden, der multifokal auftritt und im Zusammenhang mit der Beschleunigung beziehungsweise (bzw.) dem dadurch bedingten Abbremsen des Hirngewebes steht. Darüber hinaus ist das Outcome der Patienten von der sogenannten primären (mechanisch) und sekundären (verzögert, nicht-mechanisch) Hirnschädigung abhängig. Therapeutisch zugänglich ist nur der sekundäre Hirnschaden, nicht aber der primäre, der zeitlich im Moment der Krafteinwirkung entsteht. Der sekundäre Hirnschaden präsentiert sich verzögert (**Abbildung 1**). Die grundlegenden pathophysiologischen Prozesse werden jedoch im Moment der Krafteinwirkung gestartet. Eine strikte Trennung der im folgenden beschriebenen Prozesse ist nicht möglich und sie müssen als parallel ablaufende Vorgänge betrachtet werden (7, 8).

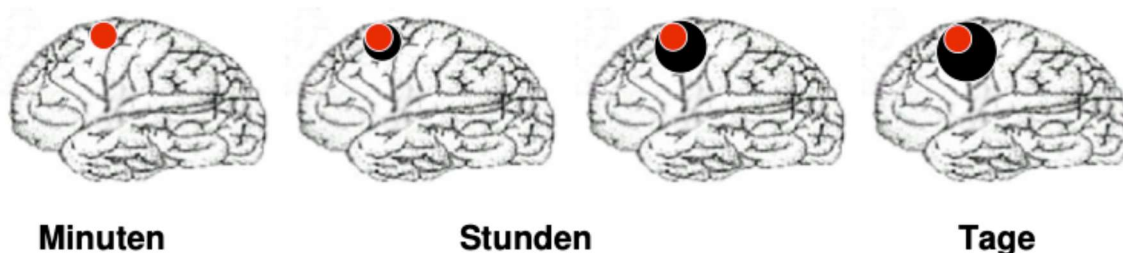


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines primären und sekundären Hirnschadens über die Zeit

Primärer Hirnschaden (dargestellt als roter Punkt) breitet sich als sekundärer Hirnschaden (schwarzer Bereich) in das umliegende Gewebe in Abhängigkeit der Zeit aus (42).

2.1.3.1.1 Primärer Hirnschaden

Der primäre Hirnschaden tritt unmittelbar zum Zeitpunkt des Traumas auf. Er entsteht durch eine äußere Krafteinwirkung auf den Schädel, wodurch das darunter liegende Hirngewebe unverzüglich irreversibel geschädigt wird. Dieser Primärschaden kann lediglich durch

präventive Maßnahmen, wie das Anlegen von Sicherheitsgurten im Straßenverkehr oder das Aufsetzen von Helmen beim Motorradfahren, gemindert werden. Entsprechend der Lokalisation der Verletzung, können fokale neurologische Ausfälle auftreten. Ihre Ausprägung ist abhängig davon welche Strukturen des Gehirns geschädigt werden. Über die lokale Gewalteinwirkung (Coup) hinaus, breitet sich eine Stoßwelle im Hirngewebe aus und kann an der gegenüberliegenden Schädelseite durch Erzeugung von Druck und Unterdruck eine weitere Kontusion (Contrecoup) auslösen. Hierbei kommt es aber nicht nur zu Quetschungen des Hirngewebes, sondern auch zu Gefäßzerreißen, Lacerationen und intrazerebralen Blutungen, die ihrerseits das Hirngewebe zusätzlich schädigen können (38). Diese Verletzungen werden überwiegend durch lineare Bewegungen verursacht. Rotationsbewegungen hingegen führen eher zu Hirnödemen und diffusen Axonschäden (*engl. diffuse axonal injury, DAI*) (43). DAI ist für die initiale Bewusstlosigkeit bei einem SHT von entscheidender Bedeutung und spielt womöglich eine große Rolle bei der Morbidität und Mortalität nach SHT (44, 45).

2.1.3.1.2 Sekundärer Hirnschaden

Die pathophysiologischen Kaskaden des sekundären Hirnschaden, die durch die mechanisch induzierte Zell- und Gewebeschädigung gestartet werden, lassen sich in verschiedene Kategorien einteilen. Zuerst wird die generelle Pathophysiologie nach dem fokalen Primärschaden beschrieben. Danach folgt eine genauere Betrachtung der speziellen Mechanismen, die am Ende zusammengefasst, zu dem sich ausbreitenden sekundären Schadensvolumen führen. Zeitlich gesehen entwickelt sich dieses Schadensareal Stunden bis Tage nach der primären Verletzung. Essenziell ist dabei die Tatsache, dass die menschlichen Neurone, diejenigen Zellen sind, die am meisten auf eine konstante Sauerstoffversorgung angewiesen sind (7).

Die Verbindung zwischen primärem und sekundärem Hirnschaden

Auf zellulärer Ebene verursachen mechanische Kräfte Schäden am axonalen Zytoskelett, was sekundär zu einer Beeinträchtigung des Transports neuronaler Komponenten und folglich zu einem Verlust der Elastizität der Axone führt. Dadurch kommt es zu einem Anschwellen der Axone und zur Ansammlung von Proteinen am Axonhügel. Die Schwellung ermöglicht folglich das Abreißen der Axone, sobald ein kritischer Punkt überschritten wird. Die neuronale

Schädigung ist daher überwiegend in den tiefen Gyri, am Übergang zwischen weißer und grauer Substanz, zu verorten (46). Darüber hinaus werden durch die schnelle Streckung der Axone vermehrt Ionen unreguliert in den interzellulären Raum freigesetzt. Es resultiert ein Kalium (K^+) Aus- und Natrium (Na^+) Einstrom. Im nächsten Schritt folgt der Depolarisation der Zelle ein stark gesteigerter Calcium- (Ca^{2+}) Einstrom, was wiederum in einer erhöhten Freisetzung der exzitatorischen Neurotransmitter, wie Aspartat und Glutamat, resultiert. Gleichzeitig werden Ionen-Membran-Transporter aktiviert, um das steigende Ungleichgewicht der Ionenkonzentrationen zu verhindern.

All diese Mechanismen führen zu einem erhöhtem intrazellulärer Energieverbrauch, einem gestörten oxidativen Stoffwechsel und kompensatorisch gesteigerter Glykolyse und Laktatproduktion. Diese Kompensationsmechanismen reichen aber nicht aus, um den Energiebedarf der Zelle zu decken und es kommt zum Ausfall der Ionenpumpen, allen voran der Na^+K^+ -ATPase. Die steigende intrazelluläre Na^+ - und Ca^{2+} -Konzentration führt zu katabolen intrazellulären Prozessen, wie die Aktivierung von Lipidperoxidasen, Proteasen und Phospholipasen. Es kommt zur Akkumulation von freien Fettsäuren und Sauerstoffradikalen. Daneben induziert die dysregulierte Ca^{2+} -Homöostase, je nach Schweregrad, entweder Nekrose oder Apoptose der Zelle (47). Gleichzeitig werden durch Schädigung der Mitochondrien proapoptotische Proteine freigesetzt und unter anderem (u.a.) eine Fragmentierung der DNA vorangetrieben. Letztendlich kommt es im Rahmen der Apoptose oder Nekrosenbildung zu strukturellen Veränderungen in der Zellmembran. Durch die Emission der oben genannten Stoffwechselprodukte erhöht sich die Azidose und begünstigt die Ödembildung im umgebenen Hirngewebe (7, 8, 48, 49).

Pathophysiologische Kaskaden des sekundären Hirnschadens

Die Blut-Hirn-Schranke

Definitionsgemäß werden als Blut-Hirn-Schranke (BHS) solche Strukturen zusammengefasst, die eine Trennung zwischen Hirngewebe und Blut darstellen. Sie bestehen histologisch im Wesentlichen aus einem Kapillarendothel, einer Basalmembran, Perizyten und Astrozytenpseudopodien (50). Zusammen ergeben diese vier Bestandteile eine hochgradig undurchdringliche Diffusionsbarriere, die ca. 100-mal weniger durchlässig ist als Endothelien in anderen Körperregionen.

Das Kapillarendothel wird im Vergleich zu normalem Endothel durch besonders viele Tight Junctions (Fasciae occludentes) gebildet und stellt durch diese Eigenschaft die eigentliche Diffusionsbarriere der BHS dar. Diese Barriere ist für die meisten Stoffe, Medikamente, Toxine und Bakterien nicht überwindbar (50). Ausschlaggebend für die passive Passage der BHS

sind Größe und Ionenladung einer Substanz bzw. eines Stoffes. Es gilt: Je lipophiler und kleiner ein Stoff ist, desto besser und leichter kann er die BHS überwinden und ins Gehirn gelangen. Daneben können nur diejenigen Moleküle und Stoffe über transzelluläre Passage die BHS überwinden, für die es entweder Ionenkanäle, Carrier oder bestimmte Rezeptoren gibt. Glukose gelangt z.B. über den GLUT1-Transporter ins Gehirn (51). Die Durchlässigkeit wird außerdem von einem sehr dicht liegenden Teppich aus Perizyten, die hier ungefähr 20 % des Endothels bedecken, beeinflusst. Perizyten umgeben jegliches Endothel. Jedoch ist eine gehirneigene Besonderheit, dass sie hier die Fähigkeit zur Phagozytose besitzen und so ein wichtiger Bestandteil der Immunabwehr im zentralen Nervensystem (ZNS) sind (52). Die Pseudopodien der Astrozyten bilden eine geschlossene Schicht um die Kapillarwand der Hirngefäße. Früher wurde angenommen, dass diese auch zur BHS gehören, mittlerweile jedoch ist diese Ansicht überholt. Ihre Funktion ist dennoch essenziell, da sie die Ausbildung der Tight Junctions zwischen den Endothelzellen induzieren (53).

Zusammengenommen kann also gesagt werden, dass die BHS zur Aufrechterhaltung der Homöostase im Gehirn essenziell ist (54). Wird diese Barriere gestört oder geschädigt, resultiert ein gesteigerter Fluss geladener Ionen, größerer Stoffe, Proteine, Immunzellen und sonstiger Substanzen in das Hirnparenchym, die unter normalen physiologischen Umständen die BHS nicht überwinden würden. Ein SHT kann die BHS schädigen und so, vor allem in der Frühphase nach dem Trauma eine erhöhte Durchlässigkeit dieser, hervorrufen. Es ist allerdings auch möglich, dass die Störung der BHS für mehrere Jahre anhält. In beiden Fällen ist eine Dysfunktion der BHS mit einem schlechten Outcome nach SHT und erhöhter Mortalität und Morbidität assoziiert (55).

Das vasogene und zytotoxische Hirnödem

Ein Hirnödem ist als zerebrale Wasservermehrung anzusehen. Dabei kann diese Zunahme des Wassergehalts inter- (vasogen) oder intrazellulär (zytotoxisch) vorliegen. Durch die fokale Krafteinwirkung und die daraus resultierende mechanische Störung der BHS nach SHT gelangen stark osmotisch wirksame Makromoleküle und Stoffe, wie z.B. Albumin und andere Proteine, in das Hirnparenchym. Daraus resultiert ein osmotisches Gefälle in intrazerebrale Richtung und diesem Shift folgen dann Wasser und weitere Ionen (50, 56). Zusätzlich wird die osmotische Potenz durch die zentrale Nekrose unterhalb der Krafteinwirkung verstärkt, da nekrotisches Gewebe eine hohe Osmolarität hat (57, 58). Dies stellt die vasogene Komponente des Hirnödems dar.

Daneben führt der Ausfall von Ionenpumpen der Zellmembran und die Öffnung selektiver Ionenkanäle zu einem Verlust des Ionengradienten der Zelle. Es resultiert ein intrazellulärer Wassereinstrom und ein damit verbundenes Anschwellen der Zellen (59, 60). Dies wird als

zytotoxisches Hirnödem bezeichnet. Es tritt bereits eine Stunde nach dem SHT auf und kann in jeglichen Zellen des ZNS auftreten (61). Die so entstandene isolierte zelluläre Schwellung durch Wasseraufnahme aus dem Interstitium führt jedoch nicht zu einer Volumenzunahme des Hirnparenchyms. Hierfür braucht es einen externen Flüssigkeitszustrom, der durch die Schädigung der BHS in der Frühphase nach dem SHT gegeben ist. Kombiniert ergeben vasogenes und zytotoxisches Hirnödem so eine massive Zunahme des Hirnvolumens (41).

Der Hirndruck

Die beiden schottischen Ärzte Alexander Monro und George Kellie haben bereits im 19. Jahrhundert festgestellt, dass es eine direkte Abhängigkeit zwischen dem intrakraniellen Volumen und dem dort herrschenden Druck gibt. Denn die Schädelhöhle ist knöchern und somit starr, also lässt sich das Volumen des Schädelinhalts nicht vergrößern. Die Aussage der bis heute geltenden Monro-Kellie-Doktrin ist, dass die Summe der drei Volumen-Kompartimente Gehirnparenchym, Blut und Liquor innerhalb des Kraniums immer gleichbleiben muss, damit der intrakranielle Druck (*engl. intracranial pressure, ICP*) konstant bleibt (62, 63).

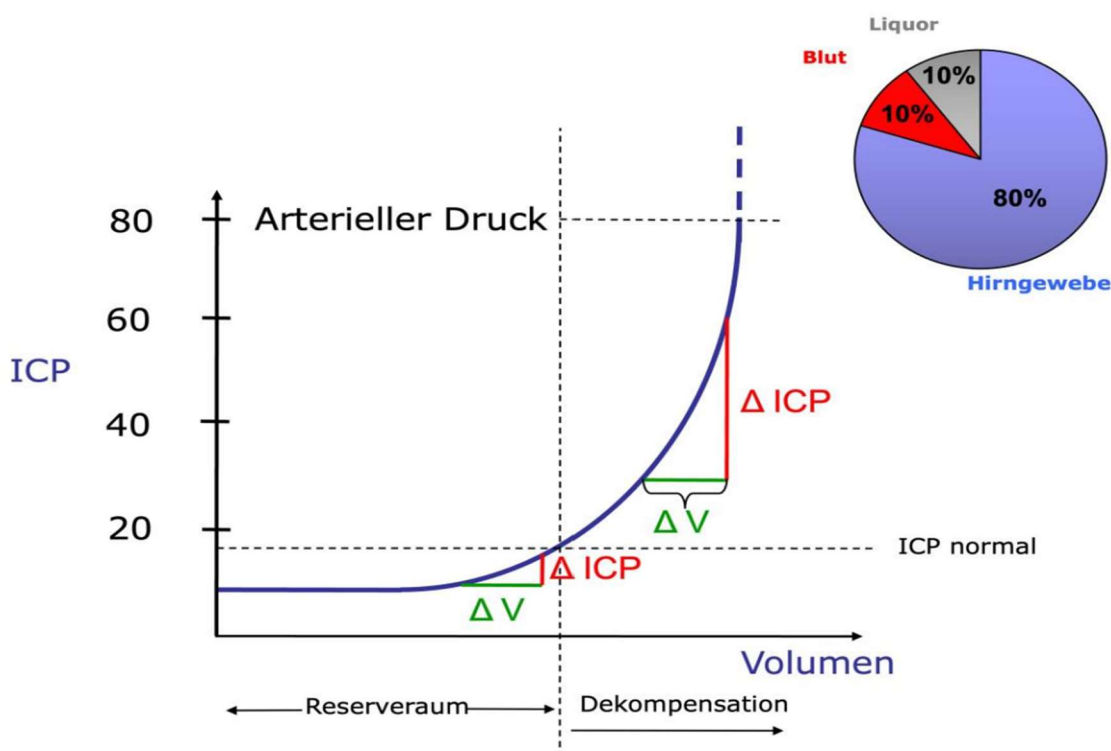


Abbildung 2: Druck-Volumen-Kurve des intrakraniellen Systems.

Dargestellt sind die Druck- und Volumenverhältnisse in Anlehnung an die Monro-Kellie-Doktrin. Aus (42). Im Bereich des Reserveraums bewirken größere Volumenänderungen lediglich eine kleine Zunahme des ICP. Wird jedoch ein kritischer Punkt überschritten, folgt eine Dekompensation und der ICP kann nicht normal gehalten werden. In diesem Bereich bewirken schon kleine Volumenänderungen starke Druckschwankungen.

Steigt nun der Anteil eines dieser Kompartimente am Gesamten, kann durch Ausnutzung der sogenannten Reserveräume eines anderen, die Summe trotzdem konstant gehalten werden. Als Beispiel kann die Umverteilung des Blutes oder Liquors nach extrakraniell genannt werden. Sind die Reserveräume jedoch ausgelastet, ist damit eine Grenze überschritten und das gesamte System bricht zusammen. Es resultiert ein schneller und steiler Anstieg des ICP (**Abb. 2**) (64). Ursachen in Folge eines SHT können Blutungen im Hirngewebe, Hirnödeme, wie zuvor beschrieben, oder Störungen im Liquorabfluss sein. Gleichzeitig sinkt der zerebrale Perfusionsdruck (*engl. cerebral perfusion pressure, CPP*) und die Gefahr einer Ischämie, vor allem im Bereich der Läsion, nimmt rasant zu. Es ist jedoch zu beachten, dass es nach neuerer Datenlage nicht nur auf die Höhe des ICPs ankommt, sondern auch auf die Zeitspanne, in der der erhöhte Druck fortbesteht. Dies wird als sogenannte ICP-Dosis bezeichnet. Das heißt, ein kurzes Zeitintervall eines gesteigerten ICPs muss nicht zwangsläufig mit einem schlechteren Outcome der Patienten verbunden sein (65, 66).

Der zerebrale Blutfluss

Der zerebrale Blutfluss (*engl. cerebral blood flow, CBF*) ist entscheidend für die Aufrechterhaltung einer konstanten Sauerstoff- und Nährstoffversorgung des Hirngewebes. Aufgrund der hohen Stoffwechselaktivität des Hirngewebes erhält es 15 bis 20 % des Herzzeitvolumens (HZV). Durch mangelnde Speicherkapazitäten von Glucose und Glykogen führt eine vollständige Unterbrechung des CBF bereits nach fünf Minuten zum irreversiblen Zelluntergang im Hirnparenchym (67). Um einen kritischen Abfall des CBF zu verhindern, unterliegen die intrakraniellen Gefäßen daher einer Autoregulation, die durch verschiedene Mechanismen und Mediatoren den CBF in gewissen Druckbereichen konstant halten kann. Diese Druckbereiche liegen ca. zwischen 50 - 60 und 150 - 160 mmHg des mittleren arteriellen Blutdrucks (*engl. Mean arteriell pressure, MAP*) (68, 69). Bei Patienten mit einem SHT kommt es aber zur vorübergehenden Beeinträchtigung, bis hin zum Ausfall der Autoregulation (70-72). Fällt der CBF auf unter 20 ml / 100 g Hirngewebe / min beginnen reversible Funktionsverluste des Gehirns. Im weiteren Verlauf treten irreversible Hirnschäden, erhöhter metabolischer Stress und Störungen der Ionengradienten auf. Dies begünstigt die Entwicklung eines Ödems (8, 73). Ferner fördern Verschiebungen der Kaliumionengradienten die Verringerung der Aktivität membranständiger Kaliumkanäle, was die Entwicklung von Gefäßspasmen unterstützt. Weitere Mediatoren wie Stickstoffmonoxid (NO), die Steigerung von Prostaglandin-induzierter Vasokonstriktion und dem Vorhandensein vieler freier Radikale (8) führen in Kombination zu einer erhöhten Inzidenz von Vasospasmen mit einem Höhepunkt

zwischen dem zweiten und 15. Tag (74). Vasospasmen wiederum führen zur Hypoperfusion des Hirnparenchyms und zur Stase. Es bilden sich Mikrothromben auf der Ebene der Venolen und Arteriolen (7, 75, 76). Letztendlich resultiert ein verminderter CBF, wodurch der neuronale Zelltod in der Penumbra vorangetrieben und pathologische Prozesse des sekundären Hirnschadens aggraviert werden (7, 75, 76).

Daneben kann es u.a. durch Sauerstoffmangel zur Einschränkung der Atmungskette und somit zur Reduktion der Adenosintriphosphat (ATP)-Produktion kommen. Verstärkt wird dies durch den Mangel an notwendigen Coenzymen wie Nikotin, die aufgrund der CBF-Einschränkungen nicht in ausreichender Menge zur Verfügung gestellt werden können (77, 78). Eine metabolische Dysfunktion und reduzierte zerebrale Stoffwechselraten sind mit ungünstigeren neurologischen Ergebnissen nach einem SHT assoziiert (79).

Die Exzitotoxizität

Primär und sekundär ist das SHT mit einer massiven Freisetzung von erregenden Neurotransmittern, insbesondere Glutamat, verbunden (80, 81). Die Aktivierung von iono- und metabotropen Glutamatrezeptoren führt nachfolgend zu gesteigerten Ca^{2+} -, Na^+ - und K^+ -Flüssen (82). Die gehäuften intrazellulären Ionenkonzentrationen triggern katabole Prozesse. Hierunter fällt z.B. der Zusammenbruch der BHS, aber auch die Entkopplung der Atmungskette. Der Versuch der Zelle durch Erhöhung des Umsatzes der Na^+ - / K^+ -ATPase die Ionenkonzentrationen auf ihr Ursprungsverhältnis zurückzusetzen, bleibt erfolglos und resultiert nur in einem massiv höheren Energiebedarf (s. *0 Sekundärer Hirnschaden - Die metabolische Dysfunktion*). Es entsteht ein circulus vitiosus, wobei die zelluläre Homöostase nicht mehr aufrechterhalten werden kann (83). Im gesunden Zustand steht dem Glutamat die γ -Aminobuttersäure (GABA), produziert in Interneuronen, als inhibitorischer Neurotransmitter gegenüber. Dieses empfindliche Gleichgewicht wird durch den Verlust von GABA-produzierenden Zellen während des Primärschadens gestört. Es führt zu einem Ausbleiben einer angemessenen Antwort inhibitorischer Signale auf die einsetzende Freisetzung von Glutamat. Letztendlich kommt es zur Verstärkung der Exzitotoxizität (84).

Die Neuroinflammation

Neuroinflammation tritt getriggert durch den primären Impact unmittelbar auf, kann jedoch auch bis zu 17 Jahren nach SHT präsent sein (85-87). Nach dem aktuellen Stand der Forschung wird davon ausgegangen, dass überschießende intrakranielle Inflammation der entscheidende Prozess beim Voranschreiten des sekundären Hirnschadens ist (88). Außerdem steht sie im Verdacht für das Auftreten von weiteren neurodegenerativen

Erkrankungen wie Morbus Parkinson, Multiple Sklerose oder die Alzheimer Erkrankung (89, 90) verantwortlich zu sein. Früher wurde davon ausgegangen, dass das Gehirn durch die BHS ein vom Immunsystem isolierter Bereich ist. Diese Annahme wurde durch das Fehlen von lymphatischen Abflüssen und die Immuninkompetenz von Mikroglia, die die im ZNS ansässigen Makrophagen darstellen, gestützt. Neuere Erkenntnisse lassen vermuten, dass dieser Standpunkt so keinen weiteren Bestand haben kann. Denn weder ist das ZNS isoliert noch passiv in seiner Interaktion mit dem Immunsystem. Periphere Immunzellen können die intakte BHS überwinden (91). ZNS-Neurone und -Glia können diese und Makrophagen in ihrer Aktivität modulieren und Mikroglia sind definitiv immunkompetent, unterscheiden sich allerdings in ihrer immunmodulatorischer Funktion von den Phagozyten und dendritischen Zellen in der Peripherie (92). Es ist ihnen möglich alle Mediatoren des angeborenen Immunsystems zu synthetisieren und auch deren Rezeptoren zu exprimieren (93-96).

Als Reaktion auf eine traumatische oder toxische Schädigung des Gehirns kommt es zur Gliose, eine neuropathologische Reaktion, die in kürzester Zeit durch die Aktivierung des Komplementsystems stattfindet. Interessanterweise kann diese Gliose, abhängig von der Stärke ihrer Aktivierung, entweder neuroprotektiv oder -destruktiv sein (92, 97). Dafür entscheidend sind endogene Mediatoren wie sauerstoff- und stickstoffvermittelte Radikale (ROS und NOS), proinflammatorische Zytokine (u.a. Interleukin 1 Beta (IL-1 β), Interleukin 6 (IL-6) (98), Tumor Nekrose Faktor Alpha (TNF- α)), Chemokine und Komplementfaktoren. Entweder führen diese Mediatoren im weiteren Verlauf zur direkten Schädigung des Gehirns und / oder zur Rekrutierung immigrierter, peripherer Immunzellen, die ihrerseits die Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten vermitteln (99-102). Die Entzündung wird aufrechterhalten bei gleichzeitigem Voranschreiten der lokalen Inflammation (100, 103).

Die Gliazellen des Gehirns lassen sich im Wesentlichen in drei Gruppen aufteilen: Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia. Alle haben unterschiedliche Aufgaben, zu denen u.a. Stütz- und Haltefunktionen, Isolierung von Nervenfasern, sowie Stoffwechsel- und Transportprozesse gehören. Neuere Studien weisen aber zunehmend darauf hin, dass Gliazellen eine untrennbare funktionelle Einheit mit Neuronen bilden und ohne eine der beiden Partner eine neuronale Reizweiterleitung nicht aufrechterhalten werden könnte (104-106). Außerdem spielen Mikroglia und Astrozyten eine entscheidende Rolle im Prozess der Neuroinflammation, weswegen an dieser Stelle besonders auf sie eingegangen wird.

Mikroglia stellen die hirnansässigen Makrophagen dar. Sie haben die Möglichkeit sich in verschiedene Subtypen zu transformieren. Im gesunden Fall liegen die Mikroglia in einem passiven, sogenannten M0-Stadium, vor. Kommt es nun zu einer von außen hervorgerufener Schädigung, transformieren sich die Makrophagen, abhängig von ihrer Mikroumgebung, entweder in einen proinflammatorischen M1-Phänotyp oder in einen antiinflammatorischen

M2-Phänotyp (107-109). Aktiviert werden die Mikroglia durch freigesetzte intrazelluläre Bestandteile, den sogenannten Gefahr-assoziierten molekularen Mustern (*engl. damage associated molecular patterns*, DAMPs) (87, 102). In diesem Zustand migrieren die Mikroglia zum Schadensort und übernehmen dort die Phagozytose von zerstörten Zellen und toxischen Nebenprodukten oder sezernieren antiinflammatorische Faktoren (z.B. Transforming Growth Factor beta (TGF β) oder IL-10) (97, 98, 110). Diese Zytokine vermitteln u.a. Angiogenese, extrazelluläre Matrix (EZM) Um- und Neugestaltung, Gewebe Reparatur und Regeneration (111). Bedingen aber gleichzeitig die weitere Aktivierung von Mikroglia.

Durch die massive Kraffteinwirkung und der damit verbundenen Schädigung des Gehirns bei SHT herrschen viele verschiedene Mikroumgebungen gleichzeitig vor. Das bedeutet, es kann nicht davon ausgegangen werden, dass entweder nur der eine oder der andere Phänotyp vorliegt, sondern vielmehr werden beide Phänotypen parallel zueinander vorliegen (112). Nach einem Trauma überwiegt initial der M1-Phänotyp (112), im weiteren Verlauf eher der M2-Phänotyp, der auch in der chronischen Phase dominierend bleibt und vermutlich ausschlaggebend für die anhaltende Neuroinflammation ist. Welcher von beiden zur Zeit der prominentere ist, hängt aber vom Stadium und der Schwere des Traumas ab (108).

Es wurden über die Zeit viele verschiedene Marker entdeckt, die spezifisch für den einen oder anderen Phänotyp sind (**Abb. 3**). Z.B. kann CD206 (auch: mannose receptor C1 (MRC1)) (113, 114) oder Arginase (Arg-1) zur Identifikation von M2-Phänotypen und CD16 oder CD86 (113) für M1 aktivierte Mikroglia/Makrophagen genutzt werden. Die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen bewirkt neben der Verstärkung der bereits eingetretenen Entzündungsreaktion, eine Schwächung der BHS. Weitere Migrationen von peripheren Leukozyten, die ihrerseits am Ort der Entzündung Mikroglia aktivieren, resultieren. Es folgt eine gesteigerte Expression von major histocompatibility complex Klasse II (MHC-II), neurotoxischen Moleküle, ROS und Chemokinen, die zur Erleichterung der Überwindung der BHS von Leukozyten führen und die Immunantwort weiter intensivieren (100, 115, 116). Gleichzeitig folgt die Induktion einiger Signalkaskaden, die u.a. mit der Ausschüttung von TNF α zur Aktivierung von NF- κ B und Caspase-8 zur Induktion der Apoptose führen (112). Alle beschriebenen Prozesse tragen zur chronischen Neuroinflammation bei. Zudem scheinen Mikroglia mit einer erhöhten Inzidenz von Morbus Alzheimer nach SHT in Verbindung stehen (117).

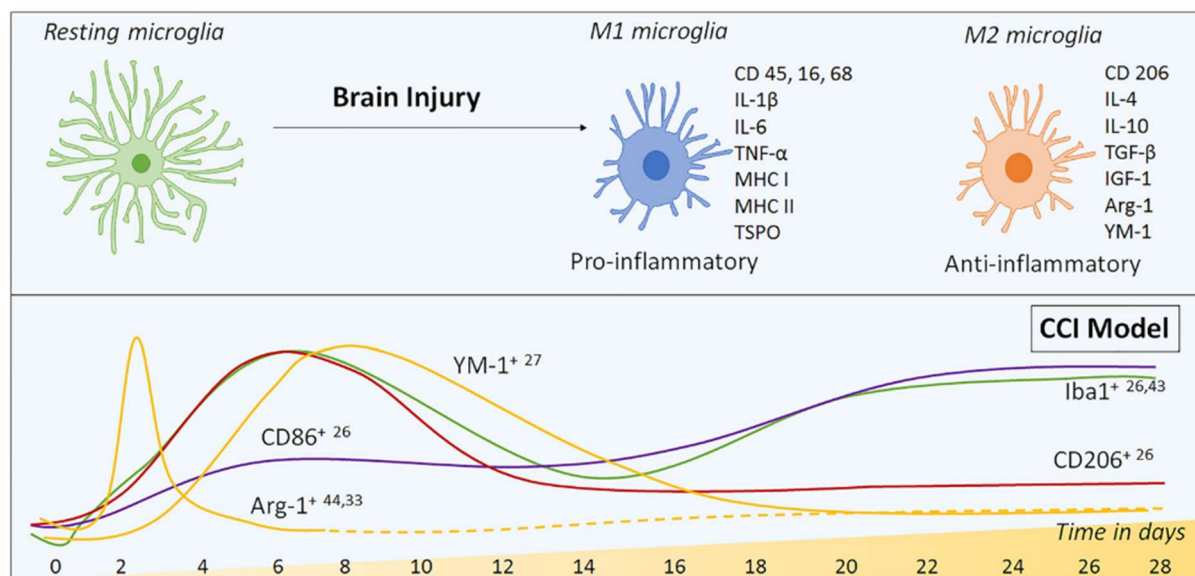


Abbildung 3: Mikrogliamarker in Abhängigkeit der Zeit nach CCI. Modifiziert aus (112).

Dargestellt ist der Einfluss der Zeit auf die Expression verschiedener Marker aktivierter Mikroglia. Dabei sind im oberen Feld die zwei Aktivierungszustände von Mikroglia - M1 und M2 -, sowie ihre Identifikationsmarker, dargestellt. Das untere Feld zeigt auf der X-Achse die Zeit und die nicht dargestellte Y-Achse zeigt die Expressionslevel der einzelnen Marker. Je höher die Kurve, desto mehr werden die gezeigten Marker zu diesem Zeitpunkt exprimiert.

Astrozyten sind ebenso wichtig wie Mikroglia in der Modulation der SHT folgende Inflammation. Innerhalb des ZNS kommen ihnen vielfältige Aufgaben zu und sie bilden dabei ein riesiges Netzwerk (Syncytium). Essenziell ist hierbei auch die Beteiligung der Astrozyten an der Ausbildung der BHS und somit an ihrer Permeabilität (104, 118). Dass diese maßgeblich am Prozess des sekundären Hirnschadens beteiligt ist, wurde in dieser Arbeit bereits ausreichend erläutert (s. 2.1.3.1.2

Sekundärer – Die BHS). Nach einer Verletzung kommt es zur Aktivierung von Astrozyten mit deren Anschwellen in Volumen und Produktivität zu sogenannten reaktiven Astrozyten. In diesem Kontext wird auch von Astrogliose gesprochen (119). Sie setzen neutrophe Faktoren frei, die bei axonalen Reparaturprozessen, Zellproliferationen und Inhibition von Apoptose unterstützen (120-122). Daneben spielen Astrozyten eine essenzielle Rolle in der Wiederaufnahme von emittierten Neurotransmittern wie z.B. Glutamat und ermöglichen eine Reduktion der Exzitotoxizität (103, 123). Verletzte Astrozyten können ihrer physiologischen Aufgabe nicht mehr nachkommen, wodurch der Glutamat-Stoffwechsel eingeschränkt wird und dessen Konsequenz, die Exzitotoxizität, voran getrieben wird (124). Neben den vielen positiven, neuroprotektiven Mechanismen, kommt es nach einer Hirnverletzung am Läsionsrand zur Ausbildung einer Glianarbe (glial scar) durch die Astrogliose. In ihrer Funktion soll diese gliäre Narbe eine Ausbreitung der inflammatorischen Reaktion verhindern und das

(noch) gesunde Hirnparenchym von toxischen Metaboliten und DAMPs abgrenzen. Gleichzeitig bewirkt die Narbenformation jedoch eine Inhibition der axonalen Regeneration und Neubildung (104, 123, 125). Die Astrogliose steigert neben der Ausschüttung von neutrophen Faktoren auch die Expression von Intermediärfilamenten, wie dem sauren Gliafaserprotein (*engl. Glial fibrillary acidic protein*, GFAP). Es kann beobachtet werden, dass unmittelbar nach SHT eine massive Steigerung dieser Expression erfolgt (103, 126). Zusätzlich scheint eine starke Korrelation zwischen Zellstörungen und der gesteigerten Expression von Intermediärfilamenten zu bestehen. Da in den Übergangszonen zwischen Läsion und nicht geschädigtem Hirngewebe sehr hohe GFAP-Konzentrationen gemessen werden können (127). Funktionell wird das GFAP für die Bildung der BHS und Aufrechterhaltung des Zytoskeletts benötigt (125, 128). Mittlerweile wird davon ausgegangen, dass Astrozyten, genau wie Mikroglia, in verschiedene Phänotypen, abhängig von ihrer Mikroumgebung, differenzieren können (123). Nach Neuroinflammation und Ischämie können, analog zu Mikroglia, zwei Phänotypen von Astrozyten auftreten. Den eher proinflammatorischen A1-Phänotypen und antiinflammatorischen A2-Phänotypen (129). Induziert wird die Differenzierung zur proinflammatorischen Untergruppe durch IL-1 α , TNF α und C1q sezernierende M1-Mikroglia (130). In A1 Astrozyten sind einige Gene, die für klassische Komplementfaktoren codieren, in ihrer Expressivität stark erhöht, wodurch die toxische Wirkung auf Synapsen erklärt werden kann. Darüber hinaus verliert dieser A1-Typ seine normale Funktion, das neuronale Überleben und Wachstum zu gewährleisten und führt so zur massiven Schädigung von Neuronen und verschiedenen Oligodendrozyten. Hieraus könnte, wie für Mikroglia, ebenso ein Einfluss auf die Entstehung von Alzheimer, Parkinson und andere neurodegenerative Krankheiten abgeleitet werden (130, 131).

Zelltod

Es können zwei unterschiedliche Arten des Zelluntergangs beschrieben werden: Die Nekrose und der programmierte Zelltod, die Apoptose. Die initiale mechanische und / oder ischämische Schädigung durch ein vorangegangenes SHT initiiert den nekrotischen Zelltod und aktiviert das angeborene Immunsystem. Hierbei kommt es zur konsekutiven Zunahme des Zell- und Organellvolumens bis schließlich eine Membranruptur resultiert. In diesem Zusammenhang wird auch von Onkose gesprochen (132). Durch die Ruptur der Zellmembran werden intrazelluläre Bestandteile wie DAMPs ausgeschieden, die als Triggerfaktoren für Makrophagen und Immunzellen dienen (14).

Die Apoptose hingegen wird im Gegensatz zur Onkose, erst Stunden bis Tage nach primärer Schädigung, verzögert eingeleitet. Sie geht mit einem Schrumpfen der Zelle einher und ist

energieabhängig. Viele verschiedene Prozesse nach SHT resultieren in der Einleitung der Apoptose. Hier können zwei Aktivierungswege (intrinsischer und extrinsischer) unterschieden werden. Der intrinsische Weg ist ein Caspasen-abhängiger Zelluntergang, der durch mitochondriale Schädigung (u.a. Calciumüberladung) induziert wird (47). Aus der sich anschließenden Freisetzung von Zytocrom C resultierend werden weitere Caspasen (vor allem Caspase 9) aktiviert. Es bilden sich Komplexe aus Proteinen und Caspasen, den sogenannten Apoptosomen, die ihrerseits weitere Effektor-Caspasen (vor allem Caspase 3 und 7) aktivieren (133).

Der extrinsische Weg wird durch die Bindung eines Fas-Liganden an seinen Rezeptor aktiviert. Dieser Bindung folgend formiert sich ein Multiproteinkomplex, der über eine Caspase-8 vermittelte Spaltung, in einer gemeinsamen Endstrecke beider Wege resultiert: der Aktivierung von Effektor-Caspasen (133). Daneben führen oxidativer Stress mit Bildung freier Radikale und Steigerung von exzitatorischer Aminosäuren und Neurotransmitter ebenfalls zur Induktion der Apoptose im neuronalen Gewebe (134). Letztendlich kommt es zur systematischen Schädigung der DNA und deren Fragmentierung. Dies führt zum Untergang weiterer nukleärer Strukturen (124), welche in Form von apoptotischen Körperchen von Mikroglia und anderen bereits immigrierten peripheren Makrophagen phagozytiert werden (8, 135).

Folglich sind die pathophysiologischen Kaskaden der sekundären Hirnverletzung hoch komplex und noch immer Gegenstand aktueller Forschung und Diskussion (7, 136-138). Die Störung der BHS-Integrität mit konsekutiver Permeabilitätserhöhung führt zu Ödembildung und erleichtert Inflammationsreaktionen durch Migration peripherer Leukozyten. Gleichzeitig bedingen gestörter CBF, metabolische Dysfunktion und Vasospasmen eine zerebrale Hypoxie mit Zelluntergängen. Hierdurch gelangen proinflammatorische Mediatoren, Zytokine und Stoffe ins Interstitium, verstärken die Neuroexzitation und steigern die BHS-Schädigung. Ultimativ resultiert ein sich selbst erhaltender Kreislauf, der in zunehmender Neuroinflammation und Verlust von potenziell rettbarem Hirngewebe führt.

2.1.4 Therapie

Aus den zuvor genannten pathophysiologischen Kaskaden resultierend, zielt die aktuelle Therapie des SHT fast ausschließlich auf die Vermeidung und Reduktion des sekundären Hirnschadens ab. Präklinisch ist die starke Empfehlung zur engmaschigen Kontrolle der Vigilanz, Pupillen und Erhebung der GCS in der Leitlinie verankert. Entscheidend ist darüber hinaus, dass eine Intubation bei schwerem SHT früh zur Sicherung der Vitalparameter

angestrebt wird. Bei Patienten mit leichtem SHT und / oder isolierten Kopfverletzungen kann bei, sonstiger Symptomfreiheit, auf eine Klinikeinweisung verzichtet werden. Bei allen anderen Patienten ist, abhängig von Verletzungsmuster, -art und -ursache, ein geeignetes Traumazentrum mit Möglichkeit einer kranialen Computertomographie (cCT) und Vorhandensein einer Neurochirurgischen Abteilung, zu wählen (139). Die stationäre, intensivmedizinische Behandlung zielt auf den Erhalt der zerebralen Homöostase ab. Dabei soll eine Normoxämie, Normokapnie, Normoglykämie und Normothermie angestrebt werden. Jede Abweichung von diesen Parametern kann den sekundären Hirnschaden voranschreiten lassen (140). Sollte nach Transport in die Klinik durch eine eingeleitete cCT Diagnostik raumfordernde Hämatoome, Impressionsfrakturen oder offene SHT auffallen, ist eine neurochirurgische Intervention (z.B. Kraniektomie) dringend erforderlich (139, 140). Eine wirksame medikamentöse, neuroprotektive Therapie ist zurzeit nicht verfügbar, ist aber Gegenstand intensiver medizinischer Forschung (46, 116, 139, 140).

2.1.5 Komplikationen

Das SHT lässt sich aber nicht nur als akutes Ereignis, sondern durchaus auch als chronische Erkrankung verstehen, die bereits als Folge eines leichten SHT auftreten kann (z.B. postkommotionelles Syndrom oder chronisch-traumatische Enzephalopathie). Gerade nach schwerem SHT bleiben häufig motorische, kognitive, verhaltensbiologische Defizite oder psychiatrische Erkrankungen wie beispielsweise Persönlichkeitsveränderungen oder kognitive Leistungsschwächen mit Konzentrationsstörungen, noch lange nach abgeschlossener Therapie bestehen (6, 141). Gleichzeitig besteht eine Korrelation zwischen wiederholten SHT (leichte SHT sind ausreichend) und dem Auftreten einer Depression (10, 142). Auch eine verbleibende Neigung zu epileptischen Anfällen ist durch die vermehrte Narbenbildung im Gehirn häufig (9). Induziert durch die pathophysiologischen Kaskaden des sekundären Hirnschadens kommt es u.a. zur Permeabilitätssteigerung der BHS, Neuroinflammation und Migration von Leukozyten ins Hirnparenchym. Durch diese Mechanismen kommt es auf der einen Seite zu einer frühen Immunsuppression, die vor allem durch Suppression zirkulierender Monozyten in einer erhöhten Anfälligkeit für nosokomiale Infektionen resultiert (143, 144). Auf der anderen Seite werden proinflammatorische Zytokine ins Plasma abgegeben und führen zu einer späteren systemischen Aktivierung des humoralen und erworbenen Immunsystems. Dies kann im Systemischen inflammatorischen Response-Syndrom (*engl. Systemic Inflammation Response Syndrom*, SIRS) enden (145). Dies ist eine unspezifische Entzündungsreaktion des Körpers auf infektiöse und nicht-infektiöse Ursachen, unter die auch ein Trauma bzw. Polytrauma fällt (146). Das SIRS geht mit einer Erhöhung

proinflammatorischer Mediatoren einher. Hieraus kann eine Schädigung der Organe resultieren. Weitere schwerwiegende u.a. auch durch das SIRS bedingte Komplikationen sind in Niere, Leber, Herz, Gastrointestinalem Trakt (GIT) und in der Lunge zu finden.

Die Datenlage bezüglich des negativen Einflusses eines SHT auf Leber und Niere ist begrenzt (11). In einer Studie wird darüber berichtet, dass gewonnenes Plasma aus Patienten mit schwerem SHT und Anzeichen einer subklinischen Nierenschädigung zelluläre Dysfunktion und Apoptose in zuvor kultivierten menschlichen proximalen Tubuluszellen auslösen kann (147). In Nagern ist diffuser Hirnschaden mit renaler Hypoxie assoziiert (148) und kann einen weiteren Hinweis auf den schädlichen Einfluss des SHT auf die Niere liefern.

Die Frühphase eines SHT kann eine akute Phase Reaktion in der Leber auslösen, die ihrerseits mit einem Leberschaden einhergeht (149).

Relativ häufig auftretend sind kardiale Probleme, die nachweislich mit einer schlechteren Prognose und erhöhter Mortalität einhergehen (150). Zum einen kommt es durch Inflammation zum Untergang von Myokard Zellen (151, 152). Zum anderen können durch massive Ausschüttung von Katecholaminen Tachyarrhythmien, linksventrikuläre Dysfunktionen und hypertensive Phasen ausgelöst werden (11, 153).

Ebenfalls kann bei SHT-Patienten beobachtet werden, dass es zu funktionalen Veränderungen im GIT kommt. Hier sind erhöhte intestinale Permeabilität, reduzierte Motilität und Veränderungen im Mikrobiom zu nennen (11, 149). Kommt es zu erhöhter Permeabilität vor allem im Bereich der Kolonmukosa, erleichtert dies das Eindringen von pathogenen Bakterien und / oder bakteriellen Toxinen in den systemischen Kreislauf, was seinerseits eine systemische Aktivierung des Immunsystems bis zum SIRS bedingen kann (154). Interessanterweise verweisen neuere Studien darauf, dass das gastrointestinale Mikrobiom eine Rolle in der Induktion früher Neuroinflammation nach SHT spielt (155, 156).

Die intensivmedizinische Beatmung und Therapie nach schwerem SHT sind unerlässlich. Treten nun auch pulmonale Komplikationen auf, werden die Therapeuten vor die Herausforderung gestellt eine respiratorische Insuffizienz zu verhindern bei gleichzeitigem Weiterführen neuroprotektiver Beatmung. Dennoch ist die Inzidenz einer akuten pulmonalen Inflamationsreaktion und ALI nach schwerem SHT, bis hin zu seiner schwersten klinischen Manifestation, dem ARDS, steigend (17). Ursächlich führen, neben der auf das SHT folgenden systemischen Entzündungsreaktion, gesteigerte pulmonalvaskuläre Widerstände und erhöhte alveolo-kapilläre Permeabilität zur Verletzung des Lungengewebes (12, 13, 18, 149).

2.2 Pulmonale Inflammation

Eine Entzündung in der Lunge kann viele Ursachen haben und zu den verschiedensten Erkrankungen, nicht nur der Lunge, sondern den ganzen Körper betreffend, führen. Getriggert durch einen pathogenen Schadstoff oder ein Toxin werden lokal proinflammatorische Zytokine und Mediatoren freigesetzt, Immunzellen rekrutiert und eine erste Immunantwort im pulmonalen Gewebe hervorgerufen. Ein solches pathogenes Toxin stellen die Lipopolysaccharide (LPS) von gram-negativen Bakterien dar. Werden die Atemwege und das nachfolgende Lungengewebe diesem Endotoxin ausgesetzt, können über verschiedenste Mechanismen Erkrankungen wie die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (*engl. Chronic Obstructive Pulmonary Disease, COPD*), Exazerbationen und Entwicklung von Asthma bronchiale oder eine Pneumonie folgen (157-159). Kommt es zur überschießenden Inflamationsreaktion, kann auch eine Sepsis mit potenziellem Multiorganversagen auftreten (160). Die Inzidenz und Mortalität einer Pneumonie ist weltweit erheblich (161) und ist eine der häufigsten Ursachen für akute Lungenschädigungen, gefolgt von einer Sepsis (162). Die zugrunde liegenden pathophysiologischen Vorgänge der durch LPS induzierten Inflammation im pulmonalen Gewebe werden im Folgenden erläutert.

2.2.1 Lipopolysaccharide

LPS sind Bestandteile der Zellwand gramnegativer Bakterien und sind in der äußeren Membran der Wand verankert. Sie bestehen aus einem Polysaccharid-Anteil und einem Lipid-Anteil. Dabei beherbergt der Polysaccharid-Anteil das O-Antigen und den Kern. Das O-Antigen besteht aus bis zu 50 sich wiederholenden Oligosacchariden und ist hochspezifisch. Durch seine hohe Variabilität kann es dazu genutzt werden, den Serotyp von Bakterien zu bestimmen. Nicht alle Bakterienstämme müssen zwangsläufig das O-Antigen exprimieren. Was jedoch essenzieller Bestandteil eines jeden LPS ist, ist die Lipidgruppe, das sogenannte Lipid A (163, 164). Es ist für den größten Anteil der Endotoxizität verantwortlich und fungiert als PAMP. Außerdem variiert das Lipid A bei verschiedenen Bakterienstämmen, was zu unterschiedlicher immunologischer Potenz und Toxizität des LPS des entsprechenden Bakterienstammes führt. Als Beispiel sind hier LPS von *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) zu nennen. Sie sind signifikant weniger toxisch als LPS von *Enterobacteriaceae* (165). Zusammenfassend ist LPS das wichtigste, am besten untersuchte und größte PAMP gram-

negativer Bakterien und wird regelhaft in Modellen zur Inflammationsinduktion verwendet (164).

2.2.2 LPS-Signalwege

Die durch LPS stimulierte Immunreaktion wird durch mehrere komplexe Signalkaskaden vermittelt und endet in der Stimulation von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, glatten Muskelzellen und Endothelzellen. Dies führt zur Ausschüttung von u.a. Thromboxan A₂, Plättchen aktivierendem Faktor (*engl. platelet activating factor*, PAF), IL-1, IL-6, TNF- α , ROS und NO (164, 166). Resultierend sind Permeabilitätserhöhung in den Lungenkapillaren, alveoläres und interstitielles Ödem und Gewebeschäden (167).

Im angeborenen Immunsystem des menschlichen Körpers können durch intensive Forschung in diesem Bereich mittlerweile unzählige Mustererkennungsrezeptoren (*engl. pattern recognition receptors*, PRR), die verschiedenste PAMPs erkennen können, unterschieden werden. Für die Erkennung von LPS ist der Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4) als PRR auf der Oberfläche von phagozytierenden Zellen wie Makrophagen, Neutrophilen und dendritischen, aber auch Endothelzellen, essenziell (168). Insgesamt können beim Menschen zehn TLRs unterschieden werden (169). Sie alle haben eine extrazelluläre Domäne, die sich durch einen hohen Anteil an Leucin zur Erkennung von bakteriellen PAMPs eignet (170). Zusammen mit dem LPS-Bindungsprotein (*engl. LPS binding protein*, LBP), CD14 und dem myeloiden Differenzierungsfaktor zwei (*engl. myeloid-differentiation factor 2*, MD-2) bilden diese vier Proteine die Bindungsdomäne auf der Zelloberfläche (164, 167, 171, 172). Dabei fungiert LBP über eine direkte Bindung an LPS als Transferprotein und erleichtert die Interaktion zwischen LPS und CD14 (164). CD14 kann entweder als mCD14 an die Zelloberfläche gebunden oder als sCD14 lose im Serum vorliegen (173). Auch LBP kann als ungebundenes Protein im Serum vorliegen und bereits dort eine Bindung mit LPS eingehen (164). Durch CD14 und LBP kommt es über die Interaktion der Fettsäuren des Lipid A des LPS mit einem hydrophilen Areal des membranständigen MD-2 zur Bindung dieses Komplexes. Diese Bindung führt zur Multimerbildung, bestehend aus zwei TLR4- / MD-2-Komplexen, verbunden über eine LPS-Brücke im Zentrum und den beiden Transfer- und Hilfsproteinen CD14 und LBP (174). Im Anschluss folgt die Rekrutierung von Adapterproteinen durch die intrazelluläre Domäne des TLR4 (*engl. Toll-interleukin-1 receptor*, TIR) und endet in der Aktivierung eines Myeloid Differentiation Primary Response Protein 88 (*engl. myeloid differentiation primary response protein 88*, MyD88) abhängigen- und MyD88-unabhängigen-Signalweg (171, 175) (**Abb. 4**).

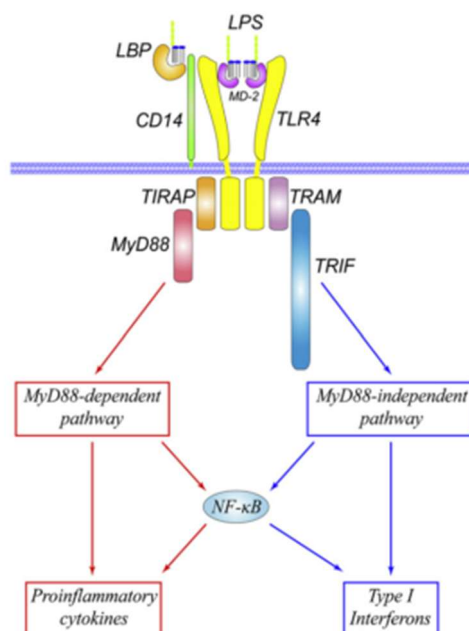


Abbildung 4: Überblick über die LPS-Signaltransduktion vermittelt durch TLR4

Dargestellt ist der MyD88-abhängige und -unabhängige Signalweg von TLR4. Die Erkennung von LPS über TLR4 wird durch LBP und CD14 erleichtert und über TLR4 / MD-2 Rezeptor Komplexe vermittelt. Im Anschluss folgt die intrazelluläre Rekrutierung weiterer Proteine, die schlussendlich mit der Aktivierung von Genen, die entweder für proinflammatorische Zytokine oder Typ-1-Interferone codieren, zum Erliegen kommt. Aus (190).

Der MyD88-abhängige-Signalweg

Dieser Signalweg resultiert in der Expression proinflammatorischer Zytokine nach TLR4-Aktivierung durch LPS.

Nach der Bindung des Liganden LPS an TLR4 folgt unter Mitwirkung des Adapterproteins TIR domain-containing adaptor protein (*engl.* TIRAP) die Bindung von MyD88 an die intrazelluläre Domäne von TLR4, TIR. Dies führt zur Aktivierung der IL-1R-assoziierter Kinase (*engl.* *IL-1 receptor-associated kinase*, IRAK) Familie, insbesondere von IRAK4 und IRAK1. Durch Phosphorylierung von IRAK1 kann TNF-Rezeptor-assoziierter Faktor 6 (*engl.* *TNF receptor-associated factor 6*, TRAF6) rekrutiert werden, wodurch dieser seinerseits eine Reihe nachgeschalteter Signalmoleküle aktiviert und zur Freisetzung der Transkriptionsfaktoren NF-κB und AP-1 führt. Die Translokation dieser beiden in den Zellkern ermöglicht dort die Expression proinflammatorischer Zytokine wie TNF-α, IL-6 und IL-1β (164, 171, 174-176).

Der MyD88-unabhängige Signalweg

Ähnlich dem MyD88-abhängigen Signalweg kommt es über die Induktion verschiedener Signalkaskaden letztendlich zur Produktion von u.a. Typ-1-Interferonen, die eine Schlüsselrolle in der Abwehr von viralen und bakteriellen Infektionen spielen (177).

Anstelle des MyD88-Adapters wird die Aktivierung der Kaskade über TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β (*engl.* TRIF) induziert. Im Verlauf kommt es zur Phosphorylierung und Aktivierung der TANK-bindenden Kinase 1 (*engl.* TANK-binding kinase 1, TBK1), sowie der κ B-Kinase ϵ (IKK ϵ). Diese beiden Kinasen sind essenziell für die Dimerisierung und Translokation des interferonregulatorischen Faktors drei (IRF3). Im Zellkern stimuliert dieser die Expression von Typ-1-Interferonen, wie z.B. IFN- β und IFN-stimulierten Genen. Zusätzlich ist über das Rezeptor-interagierende Protein 1 (*engl.* receptor-interacting protein 1, RIP1) eine Aktivierung von NF- κ B und AP-1 und somit die Produktion proinflammatorischer Zytokine möglich, jedoch in einem geringeren Maß als der MyD88-abhängige Signalweg (171, 178, 179).

Der TRPA1-Rezeptor

Neben der Bindung an TLR4 können LPS über einen weiteren Rezeptor an Lungenepithelzellen eine Immunantwort hervorrufen. Der TRPA1-Rezeptor (*engl.* transient receptor potential ankyrin 1) ist ein membrangebundener Ca^{2+} -Kanal, bei dem gezeigt werden kann, dass eine Bindung von LPS an diesen eine Signalkaskade auslöst, die in erhöhten intrazellulären Kalziumspiegeln resultiert. Es folgt eine Aktivierung der Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH)-Oxidase, die ihrerseits ROS produziert. Dies führt zur Aktivierung des mitogenaktivierten Proteinkinase- (*engl.* mitogen-activated protein kinase, MAPK) / NF- κ B-Signalwegs und endet in der Produktion proinflammatorischer Mediatoren, insbesondere der Induktion von IL-8 (166, 180).

Caspase-4/-5 bzw. -11

Gelangen LPS durch Endozytose oder durch direkte Produktion intrazellulärer Bakterien in das Zytoplasma, ist es möglich, dass ein weiterer Signalweg unabhängig von TLR4 aktiviert wird. Intrazelluläre LPS können Caspasen aktivieren, die zur Inflammasomaktivierung führen, begleitet von der Produktion von IL-1 β und Pyroptose (181, 182).

Die Bindung von LPS an Caspase-11 in der Maus und ihre homologen Vertreter im Menschen, Caspase-4 und -5, erfolgt ebenfalls über Lipid A. Nach Bindung der Caspasen an Lipid A folgt die Oligomerisierung und Aktivierung dieser, wodurch die Pyroptose eingeleitet wird.

Außerdem wird die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-1 β und IL-18, induziert. Durch Lyse der Zellmembran können diese und DAMPs in das umliegende Gewebe gelangen und so die bereits eingetretene Entzündungsreaktion weiter verstärken (180, 183).

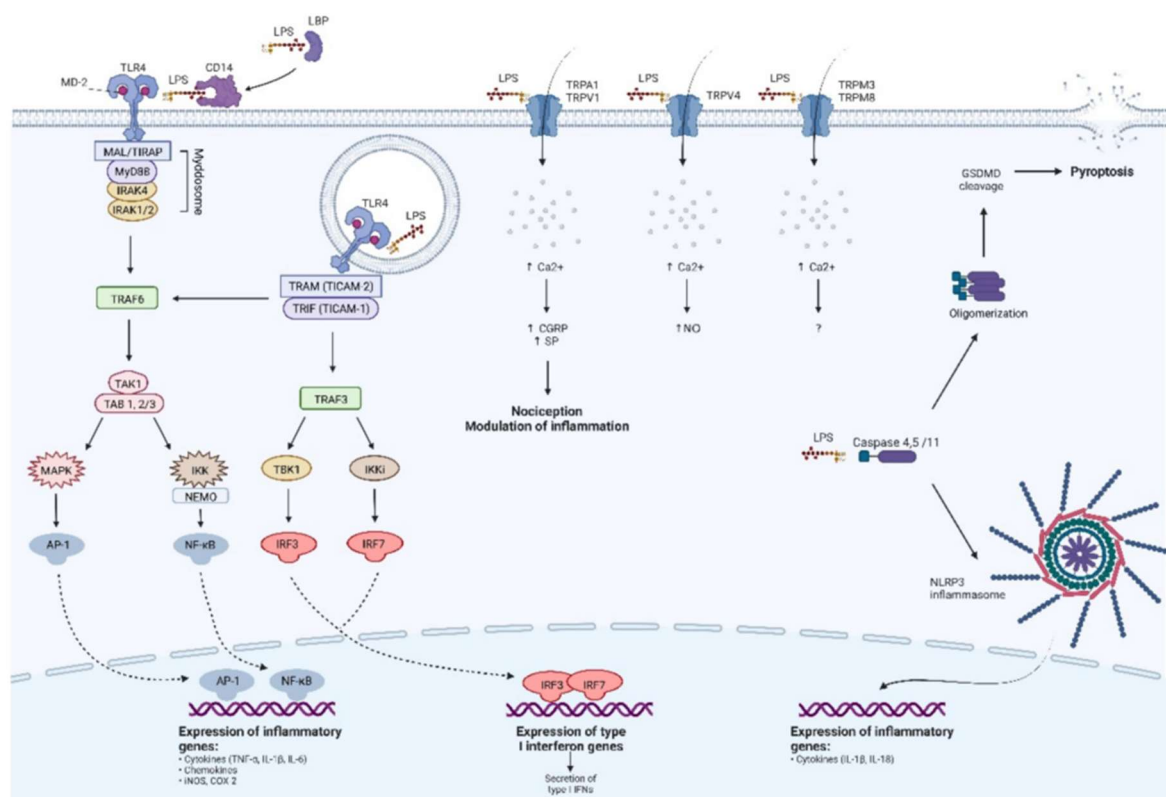


Abbildung 5: Mechanismen der molekularen Reaktion auf LPS

Vollständige Darstellung der verschiedenen zellmolekularen Reaktionsmechanismen auf LPS. Eine detaillierte Beschreibung kann in „2.2.2 LPS-Signalwege“ gefunden werden. Aus (184).

Zusammenfassend (**Abb. 5**) existieren mehrere Erkennungssysteme für LPS im menschlichen Körper. Gerade das Lungengewebe muss durch seine hohe Exposition zu potenziell mit Keimen und Schadstoffen belasteter Luft, besonders durch eine frühe Immunantwort über das angeborene Immunsystem, geschützt sein. Dazu können vor allem phagozytierende Zellen LPS durch TLR4-abhängige Signalkaskaden erkennen und resultierend proinflammatorische Zytokine und Typ-1-Interferone ausschütten.

Simultan werden TLR4-unabhängig weitere Signalkaskaden aktiviert. Über TRPA1 auf Lungenepithelzellen werden neben weiteren proinflammatorischen Zytokinen ROS produziert und freigesetzt. Intrazelluläre Caspasen leiten bei Erkennung von LPS die Pyroptose der Zelle ein. Hierdurch werden weitere proinflammatorische Zytokine in das Interstitium freigesetzt. Die Inflammation im umliegenden Gewebe wird weiter verstärkt. Die aus den Signalkaskaden resultierenden Mediatoren beeinflussen und verstärken sich teilweise gegenseitig in ihrer

Wirksamkeit und führen dazu, dass bereits wenige LPS-Moleküle ausreichen, um eine exponentiell stark gesteigerte Immunreaktion mit Überexpression weiterer proinflammatorischer Mediatoren, die den Beginn einer akuten Lungenschädigung oder einer Sepsis definieren (183) und ultimativ in einem ARDS enden können (19, 20).

2.2.3 Akute Lungenschädigung und SHT

Rincon et al. können in einer 2012 publizierten Studie mit einem Beobachtungszeitraum von 20 Jahren (1988 – 2008) zeigen, dass die Inzidenz eines ALI / ARDS nach SHT in den USA um 20 % zugenommen hat (17). Aktuellere Daten beziffern die weltweite Inzidenz einer pulmonalen Inflammation nach einem schweren SHT auf ca. 20 bis 30 % (14). In ca. 80 % der schweren SHT weißt die Lunge eine relevante Schädigung auf (14), was die Relevanz dieser Komorbidität unterstreicht. Neben kritischen systemischen Dysfunktionen, wie der Sepsis und anderer Organsystemen, sind die häufigsten, zu respiratorischer Insuffizienz führenden pulmonalen Komplikationen nach SHT die (Aspirations-) Pneumonie, Ödembildung und das ALI / ARDS (149). Gleichzeitig kann eine isolierte akute Lungeninflammation durch bakterielle LPS auch sekundär eine Sepsis auslösen. Die Sepsis kann ihrerseits akute Neuroinflammation mit zerebraler Dysfunktion triggern (185). Die bidirektionale Beziehung zwischen dem respiratorischen System und dem ZNS ist wie beide Erkrankungen hochkomplex. Dennoch soll im Folgenden der Versuch unternommen werden mögliche Wechselwirkungen darzustellen.

2.2.3.1 Lungeninflammation nach SHT

Die Entwicklung der pulmonalen Komplikationen nach einem SHT kann in vielen klinischen und experimentellen Studien beobachtet werden. Die Daten der Studien suggerieren zwar eine starke Interaktion zwischen Gehirn und Lunge, dennoch ist die zugrunde liegende Pathophysiologie Gegenstand aktueller Diskussionen. Darin führend sind u.a. Aktivierung des angeborenen Immunsystems, Aktivierung des vegetativen Nervensystems (VNS) und Nebenwirkungen des therapeutischen Managements (13, 14, 149, 186).

Durch das SHT ausgelöste Neuroinflammation, die zu größten Teilen durch Mikroglia und Astrozyten im Gehirn getragen wird, kommt es zur Aktivierung von Neutrophilen und deren Adhäsion an die BHS. Im folgenden Verlauf steigert sich die Permeabilität dieser massiv und

ihre Funktion wird stark eingeschränkt. Hierdurch gelangen proinflammatorische Mediatoren in den systemischen Kreislauf. Es können u.a. DAMPs, Zytokine, Chemokine, prokoagulatorische Faktoren und NO im systemischen Blutfluss isoliert werden. Von diesen Mediatoren stellen die Zytokine die größte Gruppe dar. Hier können, wie auch intrakraniell, erhöhte Spiegel von u.a. TNF α , IL-1 β , IL-6 und IL-10 gefunden werden (187). Daneben werden vermehrt extrazelluläre Vesikel (EV), die u.a. proinflammatorische Zytokine enthalten, freigesetzt. Diese EVs können von nahezu allen Körperzellen freigesetzt werden und enthalten die verschiedensten prokoagulatorischen Faktoren und Proteine, können aber auch DAMPs, PAMPs und Inflammasomproteine transportieren (14). Nach SHT kann ein Anstieg dieser EVs im systemischen Blutkreislauf gemessen werden (188). Werden diese EVs nun von Lungenzellen durch Endozytose aufgenommen, aktivieren sie Signalkaskaden, die über Inflammasomaktivierung zur Pyroptose von Lungenzellen führen und in massiver Inflammation enden (16). Gleichzeitig scheint das Immunsystem nach SHT in seiner Wirksamkeit gegen Pathogene eingeschränkt. Zwar ist die Anzahl an neutrophilen Granulozyten im systemischen Kreislauf erhöht, aber ihre Funktion ist beeinträchtigt (13). Zusätzlich sind die Anzahl der Monozyten, der natürlichen Killerzellen und der T-Lymphozyten erniedrigt. Dies gilt ganz besonders für Patienten mit einem schweren SHT (11). Beide Effekte resultieren in erhöhter Infektanfälligkeit und das Risiko für Pneumonien und sonstige infektiologische Erkrankungen steigt.

Wie bereits dargelegt kommt es im Verlauf nach einem SHT zu massiven ICP-Schwankungen (s. 2.1.3.1.2 *Sekundärer Hirnschaden – Der Hirndruck*), wobei in den meisten Fällen ein erhöhter ICP auftritt. Dies hat zur Folge, dass es zur Stimulation des Sympathikus mit massiver Katecholaminfreisetzung kommt. Die Katecholamine wirken stark vasokonstriktiv und erhöhen den systemischen Gefäßwiderstand. Resultierend verlagert sich vermehrt Blut aus dem systemischen in den Lungenkreislauf und erhöht dort den hydrostatischen Druck. Es bildet sich ein Transsudat im Lungeninterstitium, wodurch die alveolo-kapilläre Barriere gestört und geschädigt wird. Vermehrte Atemarbeit, reduzierter Gasaustausch und Inflammation sind die Folge (149).

Durch die beschriebenen Prozesse kann sich sekundär eine respiratorische Insuffizienz bis hin zum ARDS entwickeln. Sollten die Patienten bis zu diesem Zeitpunkt noch keine Beatmungstherapie erhalten haben, wird diese mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit etabliert werden müssen. Genau diese mechanische Beatmung kann jedoch durch die Notwendigkeit eines hohen PEEPs zu einem reduzierten CPP und CBF führen (149), was in zerebraler Gewebhypoxie und verstärkter Neuroexzitation enden kann.

2.2.3.2 SAE

Wie bereits dargelegt ist die Reaktion des Körpers auf ein SHT nicht nur lokaler Natur, sondern betrifft den ganzen Organismus. Durch systemische Inflammation können Erkrankungen wie eine Sepsis, eine Pneumonie oder ein ALI / ARDS ausgelöst werden. Ebenso ist es möglich, dass eine Sepsis, bedingt durch Endotoxine wie LPS, eine Inflammation im Gehirn hervorruft und somit eine Dysfunktion des ZNS auslöst, die Sepsis-assoziierte Enzephalopathie (SAE). Eine Neuroinflammation im Kontext solch einer Sepsis ist nicht mit einer Infektion des ZNS assoziiert und korreliert mit einer erhöhten Letalität (185). Außerdem kann sie zu massiven kognitiven Behinderungen der Patienten führen. Die neurologischen Probleme sind führend durch zerebrale Ischämie, metabolische Dysfunktion und Neuroinflammation zu erklären (189).

Pathophysiologisch kommt es durch Interaktion von LPS mit TLR4 auf den Endothelzellen der BHS zur Induktion der TLR4-Signalkaskaden mit nachfolgender Expression von NF- κ B und Aktivierung von MAPK. Dies führt zur Schädigung der Tight und Adherens Junctions der BHS. Zusätzlich spielt MAPK vermutlich eine regulierende Rolle in der Expression von Matrix Metalloproteasen (MMP) (190), die zum einen für die Funktion der Tight Junctions wichtig sind und zum anderen die Basalmembran und EZM abbauen können (191). Durch Funktionsverlust der wichtigen Zellverbindungsproteine droht ein Integritätsverlust und eine Permeabilitätserhöhung der BHS. NF- κ B induziert u.a. die Genexpression der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF- α . Es resultiert eine gesteigerte Inflammationsantwort (192). Gleichzeitig führt die TLR4-Signalkaskade zur Aktivierung der NADPH-Oxidase und somit zur Produktion von ROS (s. 2.2.2 *LPS-Signalwege*). Die Dysbalance zwischen oxidativen und antioxidativen Mechanismen schädigt die Strukturproteine der BHS weiter und erhöht ihre Durchlässigkeit.

Neben der TLR4-Aktivierung induzieren LPS auch direkt die Apoptose von Endothelzellen der BHS (193). Es können vermehrt neurotoxische Substanzen und periphere Immunzellen ins Gehirnparenchym einschweben (194). Hieraus resultieren Neuroinflammation und oxidativer Stress, was wiederum zur Rekrutierung und Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten führt, wodurch die Inflammation aggraviert und die BHS-Integrität weiter beeinträchtigt wird (s. *Pathophysiologie SHT – Die BHS*). Daneben kommt es durch TLR4-vermittelte Stimulation auch zur direkten Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia (192, 195). Die freigesetzten Entzündungsmediatoren können darüber hinaus zu zerebraler Vasokonstriktion mit reduziertem CBF führen. Unterstützt wird die Störung des CBF durch verminderte Reaktion der zerebralen Blutgefäße auf Kohlenstoffdioxid und extrazellulären pH-Wert in Verbindung mit einer gestörten zerebralen Autoregulation (196).

Des Weiteren trägt die endotheliale Dysfunktion der BHS mit dazu bei, dass die zerebrale Mikrozirkulation eingeschränkt wird. Das Resultat ist eine metabolische Entkopplung mit anaerobem Stoffwechsel und Gewebehypoxie, die durch mitochondriale Dysfunktion und oxidativen Stress, u.a. durch ROS-Produktion von aktivierten Astrozyten, massiv verstärkt wird (193, 196). Diese Mechanismen induzieren weitere Zelluntergänge und die beeinträchtigte zerebrale Autoregulation kann das Hirngewebe nicht vor unzureichendem CBF durch z.B. Hypotension im Rahmen des septischen Geschehens schützen. Es kommt zur Zunahme von Gewebehypoxie und Ischämie. Zusammengenommen ist die Pathogenese der SAE komplex und multifaktoriell, was sie zu einer klinisch herausfordernden Komplikation werden lässt.

Durch die Darlegung der pathophysiologischen Vorgänge der sekundären Inflamationsinduktion im pulmonalen Gewebe nach primärer zerebraler Verletzung und der Vorgänge nach vorherigem Lungenschaden und folgender zerebraler Schädigung kann die Komplexität dieser Interaktionen gezeigt werden. Herauszuheben ist an dieser Stelle die systemische Inflammation als Bindeglied, die sowohl auf das SHT durch Beeinträchtigung der BHS-Integrität als auch auf die akute Lungeninflammation folgt.

2.3 Tierexperimente als Modell

Bis heute stehen die schnelle Vermehrung in Verbindung mit kurzer Generationszeit und die ökonomische Haltung im Vordergrund der Argumentation für die Durchführung von Tierversuchen mit Nagetieren wie Ratten und Mäusen. Hierdurch kann experimentelle Grundlagenforschung kostengünstig mit großen Fallzahlen durchgeführt und, sofern von Nöten, schnell reproduziert werden. Ein weiterer Vorteil besteht in der genetischen Manipulation der Nager, wie z.B. der Züchtung von Knock-out-Mäusen. Alternative Forschungsmodelle, die auf einem Ansatz ohne Tierexperimente basieren, haben bisher nicht den gewünschten Entwicklungsstandard erreicht, um die Komplexität eines SHT zuverlässig abbilden zu können. Als vielversprechendes Modell ist an dieser Stelle das Blue-Brain-Projekt zu nennen. Die Idee ist, dass in Zukunft die Funktion eines Nagergehirns durch eine computerbasierte Simulation eines neuronalen Netzes ersetzt wird (197). Der aktuelle Standard ist jedoch die tierexperimentelle Erforschung des SHT an der Spezies der Mäuse. Forschung und Untersuchung an Schweinen und Wiederkäuern stellen die absolute Ausnahme dar (198).

Zur Auslösung eines SHT bei Mäusen stehen mehrere etablierte, gleichrangige Modelle zur Verfügung (13).

Das in dieser Arbeit gewählte CCI-Modell wird erstmals 1988 von Lighthall et al. an Frettchen beschrieben (199). Bis es im Jahr 1995 an Mäusen angewendet wird, erfährt das ursprüngliche Modell einige Modifikationen. Es ist hervorragend reproduzierbar und vergleichbar mit einem offenen SHT, wie es durch mechanische Krafteinwirkung eines festen Körpers oder Gegenstandes ausgelöst wird (200). Ferner kann dieses Modell nicht nur bei Mäusen angewendet werden, sondern bei einer Vielzahl von Spezies. Die flexible Einstellung der Einschlagtiefe bzw. -kraft und die Wahl der Geschwindigkeit bieten zusätzlich eine hohe Variabilität, sofern dies gewünscht ist (201). Zuletzt ist herauszuheben, dass die intrakraniellen Verletzungen in der Maus, verursacht durch CCI, histopathologisch Kontusionsverletzungen in menschlichen SHT-Patienten ähneln (202).

Dem CCI gegenüber stehen das Fluid Percussion Model (*engl.* FPI) oder das Weight-Drop Model (*engl.* WD). Das FPI-Modell zeichnet sich durch die Erzeugung einer mechanischen Verletzung des Gehirns durch einen kurzen, hydraulisch induzierten Druckimpuls aus. Dieser wird über eine Flüssigkeit auf die intakte Dura mater übertragen eine unmittelbar einsetzende Bewusstlosigkeit aufgrund von lokalem und diffusem Hirnschaden (203, 204). Dieses SHT-Modell wird häufig bei Ratten angewendet (204). Es ist ebenfalls gut reproduzierbar und ermöglicht die Untersuchung verschiedener Schweregrade eines SHT. Zu beachten gilt

jedoch, dass je höher der induzierte Druckimpuls gewählt wird, desto höher ist die Morbidität der Nager (202). Dies liegt an der unverhältnismäßigen Beteiligung des Hirnstamms und der Entwicklung eines neurogenen Lungenödems (202). Außerdem ermöglicht dieses Modell nicht die Abbildung eines offenen SHT, da die Dura mater intakt bleibt.

Das WD-Modell wird vor allem zur Erforschung repetitiver, geschlossener, milder bis moderater SHT genutzt (205). Bei diesem einfachen und kostengünstigen Modell wird ein Gewicht aus einer definierten Höhe auf den Kopf des Tieres fallen gelassen. Durch Anpassen der Fallhöhe kann auch hier die Verletzungsschwere variiert werden. Durch seine eingeschränkte biomechanische Modulationsfähigkeit können die Verletzungsparameter weniger präzise gesteuert werden und eine hohe Variabilität in der Schwere der Verletzung resultiert (204, 206).

Wie bereits dargestellt sind die pathophysiologischen Kaskaden der LPS-induzierten pulmonalen Inflammation hoch komplex und selbst im Menschen nicht immer eindeutig zu erklären. Daher ist es nicht verwunderlich, dass kein existierendes Tiermodell dieser Komplexität gerecht wird (207). Zur Induktion einer Inflammation, die im weiteren Verlauf durch histologische Veränderungen und / oder inflammatorische Infiltrate charakterisiert ist, werden bei Mausmodellen hauptsächlich LPS oder Oleinsäure verwendet. Wobei auch beide zusammen verabreicht werden können (208). Die Applikation von LPS erzeugt eine starke, von Neutrophilen getragene inflammatorische Immunantwort. Gleichzeitig ist die Beeinflussung der alveolo-kapillären Permeabilität und Integrität eher gering ausgeprägt. Ein weiterer positiver Aspekt dieses Modells ist die hervorragende Reproduzierbarkeit und der verhältnismäßig geringe Aufwand der Applikation in Verbindung mit geringem Stress für die Versuchstiere (207).

3 Material

3.1 Geräte

- CCI-Device, Benchmark TM, Stereotaxic Impactor: Leica Biosystems; Wetzlar, DE
- CryoStar NX70 Kryostat, Thermo Scientific: Thermo Fischer Scientific; Walldorf, DE
- Fluoreszenzmikroskop, Imer M1: Carl Zeiss; Oberkochen, DE
- Gestell für Mäusekäfige: Ebeco; Castrop-Raxel, DE
- Gefrierschränke
 - -20 °C: ProfiLine: Liebherr; Ochsenhause, DE
 - -40 °C: UPUL 540: Liebherr; Ochsenhause, DE
 - -80 °C: Heraeus: Sepatech; Osterode, DE
- Handbohrer Uni-Drive N Komplettgerät: Paggen Werkzeugtechnik GmbH; Starnberg DE
- Heizmatte AccuLux, ThermoLux; Conrad; Murrhardt, DE
- Homogenisator, Mastermill MM 300: Retsch Technology GmbH; Haan, DE
- Inhalator IH50 Beurer medical: Beurer GmbH; Ulm, DE
- Inkubator, Babytherm IC8000: Dräger Medical Deutschland GmbH; Lübeck, DE
- Isofluran Vapor 2000: Dräger Medical Deutschland GmbH; Lübeck, DE
- Käfig, Typ 2 L: Bioscape GmbH; Castrop-Rauxel, DE
- Kühlschrank CNeI 4213 Index 21E / 001: Liebherr; Ochsenhause, DE
- Light Cycler® 480 System: F. Hoffmann-La Roche AG; Basel, CH
- Lochzange für Mäuseohrmarkierung: Ebeco; Castrop-Raxel, DE
- Luftstromschrank (Mausschrank), UniProtect THF 3378-V02: Zoonlab GmbH; Castrop-Rauxel, DE
- Magnetrührer MR 3001: Heidolph Instruments; Schwabach, DE
- Magnetrührer, Ikamag RH: Janke und Kunkel; Staufen, DE
- Mastercycler® Nexus Thermal Cyclers: Eppendorf AG; Hamburg, DE
- Microprobe Thermometer, BAT-12: Physitemp Instruments; New Jersey, USA
- Mikroskop, Stemi 305 mit AxioCam 105 Color: Carl Zeiss; Oberkochen, DE
- Mikroskopie Kamera, AxioCam MRc 5 farbig: Carl Zeiss; Jena, DE
- Odyssey 9260 Imaging System: Li-Cor; Lincoln, NE, USA
- OP-Mikroskop, Technoskop OPMI 1-FC: Carl Zeiss; Jena DE
- Pipetten:
 - Reference®, Research®

- 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl
- Plate Fuge™ Microplate Mikrozentrifuge: Benchmark Scientific; New Jersey, USA
- Plattformschüttler Orbital shaker, Rotamax 120: Heidolph Instruments; Schwabach, DE
- Rosenbohrer D1,0MM/ISO 010 2,35x51MM: B. BRAUN; Tuttlingen, DE
- Rota-Rod RS232/LE8200: Hugo Sachs; March-Hugstetten, DE
- Sartorius Picus® Electronic Pipette 10-300 µl: Sartorius; Göttingen, DE
- Spektrophotometer, NanoVue®: GE Healthcare; Little Chalfont, UK
- Stereotaxie-Einheit: David Kopf Instruments; Tujunga, USA
- Temperatursonde TCAT-2DF Controller: Physitemp; New Jersey, USA
- Vakuum-Zentrifuge; Univapo 100H: Uni Equip; Martinsried bei München, DE
- Vortex; VF2, IKA-Labortechnik: Janke und Kunkel; Staufen, DE
- Vortexer (Reagenzglasschüttler), Reax Control: Heidolph Instruments; Hamburg, DE
- Wärmematte Homeothermic Blanket: Hugo Sachs; March-Hugstetten, DE
- Waagen:
 - Präzisionswaage; Scaltec SBA 32: Denver Instruments; Bohemia, NY, USA
 - CS 200: Ohaus; Kirchheim, DE
 - Sartorius Research: Sartorius; Göttingen, DE
 - DIPSE 2000g/0,1g: Oldenburg, DE
- Zentrifugen:
 - Micro Star 17R: VWR; Osterode am Harz, DE
 - 5804 R Eppendorf, Eppendorf AG, 22331 Hamburg, DE
 - Universal 16 R, Hettich; Tuttlingen, DE
 - Galaxy Mini Star silverline, VWR international; Radnor, USA

3.2 Verbrauchsmaterial

- A-PEP PEN, Liquid-repellent slide Marker (Fettmarker): Daido Sangyo Co.Ltd; Tokyo, JPN
- Bevelled Filter Tips (sterilisiert), Filterspritzen: Starlab GmbH; Ahrensburg, DE
- Chirurgisches Nahtmaterial, Perma-Hand™ Seide Nahtmaterial, Stärke 6-0, 45 cm Länge: Ethicon; Piscataway, USA
- Collection Tubes (2 ml): Qiagen GmbH; Hilden, DE
- Deckgläser: Diagonal GmbH & Co KG, Münster, DE
- Disposable wipers, Kimwipes®: Sigma-Aldrich: St. Louis, MO, USA
- Einstreu, Lignocel® FS14: J.Rettenmaier & Söhne GmbH+CoKG; Rosenberg, DE
- Einweg-Handschuhe: Safe Ex, SafeMed; Zimmerwald, CH
- Einwegpipetten (5 ml, 10 ml): Sarstedt; Nürnberg, DE
- Faden, MCAO Suture 6/0, 20mm: Docol Corp.; Redlands, CA, USA
- Faltenfilter: Whatman GmbH; Dassel, DE
- Fixierpflaster, Leukosilk®: BSN medical GmbH; Hamburg, DE
- Injektionskanüle, Microlance™ 21G x 1 1/2“ – 0,8 x 40 mm, BD; Heidelberg, DE
- Microm Blades, Feather® C35: B. Braun Melsungen AG; Melsungen, DE
- Mikropipettenspitzen, TipOne: Starlab GmbH; Ahrensburg, DE
- Mikroplatte, 96-well Platte: Greiner Bio-one; Kremsmünster, A
- Nagellack, Item-No: 21360005: KTN Dr. Neuberger GmbH; Hahnstätten, DE
- Natural Flat Cap Microcentrifuge Tubes (1,5 ml, 2 ml): Starlab GmbH; Ahrensburg, DE
- Objektträger, SuperFrost®Plus, Menzel-Gläser: Thermo Scientific; Braunschweig, DE
- Objektträgerkasten mit Deckel, blau: VWR; Darmstadt, DE
- Papierhandtücher, ZZ Falz: Schuch Laborhandel und Klinikbedarf; Langgöns, DE
- Parafilm: Laboratory Film, 2 IN x 250 FT. Roll, Menasha, USA
- Pelletiertes Spezialfutter: Ssnif Spezialdiät GmbH; Soest, DE
- Pipettenspitzen (5 ml): Labcon North America; Petaluma, USA
- Pipettenspitzen SafeSeal® SurPhob® (10 µl, 10 µl extra lang, 100 µl, 200 µl, 300 µl 1.000 µl): Biozym Scientific GmbH; Hessisch Oldendorf, DE
- Plain Skirted Tube (0,5 ml), natural: Starlab International GmbH; Hamburg, DE
- Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml): Eppendorf; Hamburg, DE
- SafeSeal Filterspritzen 10 µl, SurPhob® Spitzen, steril, Biozym.com
- Sammelbehälter spitze Gegenstände 4L, Sharpsafe®: P.J. Dahlhausen & Co. GmbH; Köln, DE
- Schnittstrecker Plättchen, Microm: Thermo Fisher Scientific; Walldorf, DE

- Skalpelle, Feather® No.23: B. Braun Melsungen AG; Melsungen, DE
- Spritzen, Injekt® (1 ml, 2 ml, 5 ml): B. Braun Melsungen AG; Melsungen, DE
- Standard Screw Cap, gelb: Starlab International GmbH; Hamburg, DE
- Standard Screw Cap, rot: Starlab International GmbH; Hamburg, DE
- Sterile Saugtupfer, Sugi® Sponge Points: Kettenanhänger GmbH & Co. KG; Eschenburg, DE
- Vlieskompressen, non-sterile, 10 x 10 cm: MaiMed GmbH; Neuenkirchen, DE
- Wattestäbchen: Centramed Medizintechnik; Koblenz, DE
- Zentrifugenröhrchen, Falcon® (15ml, 50ml): Sarstedt; Nümbrecht, DE

3.3 Arzneistoffe

- Bepanthen®-Augensalbe, Dexpanthenol: Bayer-Vital GmbH, Leverkusen, DE
- Forene® (Isofluran): Baxter, Deenfield, USA
- Escherichia coli Lipopolysaccharide (LPS): Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
- Histoacryl® Gewebekleber: B. Braun; Melsungen, DE
- Lidocain-Hydrochlorid 2 %: B. Braun Melsungen AG; Melsungen, DE
- Octeniderm® alkoholisches Hautantiseptikum: Schülke & Mayr GmbH; Norderstedt, DE
- Rimadyl® (Carprofen): Zoetis Österreich GmbH, Wien, AUT
- Terralin® liquid disinfection: Schülke & Mayr GmbH; Norderstedt, DE

3.4 Chemikalien

- 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI): Sigma-Aldrich: St. Louis, MO, USA
- Aqua destillata (lat., Aqua dest.): B. Braun Melsungen AG; Melsungen, DE
- Bovines Serum Albumin (BSA) (0,5%): Carl Roth GmbH; Karlsruhe, DE
- Chloroform: Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA
- Dimethylsulfoxid (DMSO): Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA
- Einbettmedium, Neg 50™-Gefrierschnittmedium: Thermo Scientific, Thermo Fisher; Waltham, MA, USA
- Eindeckmedium:

Material

- Immu-Mount™: Thermo Scientific, Thermo Fisher; Waltham, MA, USA
- Roti®-Histokitt: Carl Roth GmbH; Karlsruhe, DE
- Roti® histofix 4% Formaldehyd: Carl Roth GmbH; Karlsruhe, DE
- Ethanol absoluta > 99,8 %: AppliChem; Darmstadt DE
- Ethylendiamintetraacetat (EDTA): Carl Roth GmbH; Karlsruhe, DE
- Flüssiger Stickstoff: Air Liquide S.A.; Düsseldorf, DE
- Glycerol: Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA
- Isopropanol: Carl Roth GmbH; Karlsruhe, DE
- Isotone Kochsalzlösung, 0,9 % NaCl: B. Braun Melsungen AG; Melsungen, DE
- Kresylviolett (Acetat): Merck AG; Darmstadt, DE
- Magermilchpulver (MM): Carl Roth GmbH; Karlsruhe, DE
- Natriumdodecylsulfat (SDS): BioRad; Hercules, USA
- Normal Goat Serum (NGS) (5%): Carl Roth GmbH; Karlsruhe, DE
- Paraformaldehyd (PFA): Merck AG; Darmstadt, DE
- PBS Dulbecco: Biochrom; Berlin, DE
- Phosphatase Inhibitor (PhosSTOP™): Roche; Mannheim, DE
- Protease Inhibitor (complete™ Mini, EDTA-free): Roche; Mannheim, DE
- RNase-freies Wasser: Fermentas; St. Leon-Rot, DE
- Roti®-Histol: Carl Roth GmbH; Karlsruhe, DE
- Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan (TRIS): Carl Roth GmbH; Karlsruhe, DE
- Triton X-100 (0,1%): Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA
- Tween-20: Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA
- Tween-80: Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA

3.5 Puffer und Lösungen

3.5.1 Puffer

Tabelle III: Verwendete Puffer und deren Inhaltsstoffe

Puffer	Zusammensetzung / Hersteller
Radioimmunoprecipitation Assay (RIPA)-Puffer	50 mM TRIS-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % NP-40, 0,1 % SDS
Paraformaldehyd 4 % (PFA)	4 g PFA in 100 ml PBS
PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 6,6 mM Na ₂ PO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,5
PBST	0,1 % Triton X-100 in PBS
RPE-Puffer	Qiagen GmbH; Hilden, DE
RWE-Puffer	Qiagen GmbH; Hilden, DE
TRIS-buffered saline +/- Tween (TBS / TBST)	15 mM NaCl, 5 MM TRIS, 0,2 mM HCl, pH 7,4 / + 0,05 % Tween-20

3.5.2 Lösungen

Herstellung von phosphatgepufferter Salzlösung (PBS/T):

In 1 l Aqua dest. werden 9,55 g PBS hinzugegeben und gut durchmischt. Um nun PBS/T zu erhalten gibt man weitere 3 ml Triton X-100 hinzu.

Herstellung einer Kresylviolett-Lösung:

5 g Kresylviolett werden in 100 ml 100 %-igem Ethanol gegeben und anschließend für 30 min. bei 50 °C mithilfe eines Magnetrührers durchmischt. Die nun entstandene Lösung wird durch die Zugabe von 400 ml Aqua dest. auf 500 ml Gesamtvolum ergänzt und über die Dauer von 4 Stunden durch einen Faltenfilter filtriert.

Herstellung der Blockierlösung für die Immunhistochemie:

Die Lösung setzt sich aus 5 % normal goat serum (*engl.* NGS), 0,5 % BSA und 0,1 % Triton X-100 gelöst in PBS oder PBST zusammen.

Herstellung einer 5 %-igen Magermilch (MM)-Lösung:

Es werden 5 g MM-Pulver in 100 ml TBST gelöst.

3.6 Antikörper

3.6.1 Primäre

- Rat, monoclonal anti-CD68 antibody; MCA1957GA: BioRad; Hercules, USA
 - Verdünnung: 1:1000
- Guinea Pig, polyglonal anti-GFAP antibody; Cat.No. 173 004: Synaptic Systems GmbH; Göttingen, DE
 - Verdünnung: 1:1000
- Rabbit, polyglonal Anti-NeuN antibody - Neuronal Marker; AB104225: Abcam; Cambridge, UK
 - Verdünnung: 1:1000

3.6.2 Sekundäre

- Goat, anti-Rat IgG (H+L), highly cross-adsorbed secondary antibody, Alexa Fluor™488, Catalog # A48262; Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, MA, USA
 - Verdünnung: 1:500
- Goat, anti-Guinea Pig IgG (H+L), highly cross-adsorbed secondary antibody, Alexa Fluor™568; Catalog # A-11075; Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, MA, USA
 - Verdünnung: 1:500
- Goat, anti-Rabbit IgG Antibody; DyLight™405 Conjugation, ABIN-6699094; Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, MA, USA
 - Verdünnung: 1:500
- Goat, anti-Mouse, IRDye® 680RD, 926-68070; Lot No. D01014-04: Li-Cor; Lincoln, NE, USA

3.7 Kits

- DC™ Protein Assay: BioRad; München, DE
- Light Cycler® 480 Probes Master: Roche Diagnostics GmbH; Mannheim, DE
- PrimaQuant, Blue qPCR SYBR® Green Master Mix, SL-9902B-10ML: Steinbrenner Laborsysteme GmbH; Wiesbaden, DE
- QIAzol Lysis Regent: Qiagen GmbH.; Hilden, DE
- QuantiTect Reverse Transcription Kit: Qiagen GmbH.; Hilden, DE
- RNeasy R Plus Universal: Qiagen GmbH.; Hilden, DE
- RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit: Qiagen GmbH.; Hilden, DE

3.8 Primer

Auflistung der genutzten Primer mit ihren Basenabfolgen in 5'-3'-Richtung:

- CD68-F CCC ACC TGT CTC TCT CAT TTC
- CD68-R CAC ATT GTA TTC CAC CGC C
- GFAP-F CGG AGA CGC ATC ACC TCT G
- GFAP-R TGG AGG AGT CAT TCG AGA CAA
- mL6 F(ex2,3) TCG TGG AAA TGA GAA AAG AGT TG
- mL6 R(ex5,6) TAT GCT TAG GCA TAA CGC ACT AG
- mL6 FL CAT AAA ATA GTC CTT CCT ACC CCA ATT TCC-FL
- mL6 Cy5 Cy5--TGC TCT CCT AAC AGA TAA GCT GGA GTC AC--PH
- Mrc1-F GGC TGA TTA CGA GCA GTG GA
- Mrc1-R ATG CCA GGG TCA CCT TTC AG
- PPIA F GCG TCT SCT TCG AGC TGT T
- PPIA R RAA GTC ACC ACC CTG GCA
- PPIA FL GCT CTG AGC ACT GGR GAG AAA GGA-FL
- PPIA Cy5 Cy5--TTG GCT ATA AGG GTT CCT CCT TTC ACA G--PH

3.9 Software

- EndNote™ X20: Clarivate Analytics; Philadelphia, USA
- EthoVision XT, Version 14.0: Noldus Information Technology BV; Wageningen, NL
- GraphPad Prism, Version 10.4.1: GraphPad Software Inc.; Boston MA, USA
- GIMP 2.10.24 (Revision 3), GNU Image Manipulation Program: open source
- ImageJ, Version 1.47v: National Institutes of Health; Bethesda, USA
- Image-Studio Version 3.1: Acquisition Software, Li-COR Biosciences GmbH; Lincoln, LE, USA
- LightCycler 480 Software Release 1.5.0: Roche Molecular Biochemicals; Mannheim, DE
- Microsoft 365 Apps for Enterprise, Excel, Version 2307: Microsoft Corporation; Redmond, USA
- Microsoft 365 Apps for Enterprise, Word, Version 2307: Microsoft Corporation; Redmond, USA
- Odyssey® SA Imaging Systems: Li-Cor Biosciences GmbH; Lincoln, LE, USA
- ZEN (blue edition) Version 3.4.91.00000: Carl Zeiss Microscopy GmbH; Jena, DE

4 Methoden

4.1 Planung

Das Promotionsvorhaben lässt sich grob in drei wesentliche Hauptschritte gliedern: (I) Induktion eines SHT, (II) Beobachtungs- und Interventionsphase für sieben und (III) Kryosektion mit histologischen, immunhistochemischen und molekulargenetischen Untersuchungen im Anschluss.

Bevor ein operatives SHT induziert werden kann, müssen die Versuchstiere gewogen und auf neurologische Auffälligkeiten untersucht werden. Sollten hier bereits gravierende Defizite auftreten, müssen die Tiere von dem Experiment ausgeschlossen werden.

Das SHT wird mittels CCI an zwei aufeinander folgenden Tagen durchgeführt. Dazu werden die Versuchstiere in zwei Gruppen zu je $n = 24$ aufgeteilt. Dies erfolgt aufgrund der Durchführbarkeit. Für die Operation werden die Tiere hypnotisiert und analgisiert. Die Narkose wird ca. für 20 Minuten aufrechterhalten und im Anschluss folgt eine postoperative Aufwachphase, in der die Mäuse in Einzelkäfigen untergebracht sind.

Die Beobachtungsphase beginnt für die erste Gruppe am Operationstag (OP) der zweiten Gruppe. Hier werden, wie vor der OP, die Versuchstiere auf neurologische Auffälligkeiten untersucht. Dazu wird an Tag eins (d1), Tag drei (d3), Tag fünf (d5) und Tag sieben (d7) jeweils das Gewicht erhoben. Im Anschluss folgt die Prüfung des Neurologischen Defizit Scores (*engl. Neurological Severity Score, NSS*), die Durchführung des Rota Rod (RR) und des offenen Feld Tests (*engl. Open field test, OFT*). Der Elevated Plus Maze (*engl. EPM*) wird nur einmal an Tag sechs (d6) durchgeführt. Außerdem werden die Versuchstiere nach den „ARRIVE-Guidelines“ (209) begutachtet, um eventuelle Abbruchkriterien zu identifizieren, die, bei einer Fortführung des Versuchs, ethisch nicht vertretbar wären.

Parallel zur Beobachtungsphase beginnt auch die Interventionsphase. Hier werden die Tiere einem inhalatorischen Stimulus zur Induktion einer pulmonalen Komplikation ausgesetzt. Die Durchführung erfolgt nach der neurologischen Begutachtung an den Tagen d1 und d3.

Am siebten Tag erfolgt die Euthanasie durch Dekapitation. Hierdurch kann ausreichend Blut der Nager für die folgenden Untersuchungen gewonnen werden. Außerdem werden das Gehirn und die Lungen präpariert, entnommen und direkt in flüssigem Stickstoff (ca. -80 °C) schockgefrostet.

Nun folgt die Verarbeitung der Gehirne am Kryotom. Hier werden serielle, 12 Mikrometer (μm) dicke Hirnschnitte von rostral nach kaudal angefertigt. Im Anschluss werden diese direkt auf Objektträger (OT) zur weiteren Verwendung fixiert. Außerdem wird durch Anfertigung von vier sogenannten Trimmschnitten Material für eine sich zu einem späteren Zeitpunkt

anschließende Ribonukleinsäuren (RNA)-Extraktion gewonnen. Ein Teil der Hirnschnitte auf dem OT wird verwendet, um das Volumen des Schadens, verursacht durch das SHT, zu bestimmen. Zusätzlich wird ein Teil der OT für eine immunhistochemische Färbung mit primären und sekundären Antikörpern (AK) genutzt. So wird eine Beurteilung von Astrozyten und Gliazellen unter dem Fluoreszenzmikroskop möglich. Die RNA-Extraktion und deren photometrische Bestimmung sind der erste Schritt der molekulargenetischen Untersuchungen, die am entnommenen Hirnmaterial durchgeführt werden. Es folgt eine Erstellung von komplementärer DNA (cDNA) und die anschließende Quantifizierung von Zielgenen (CD68, MRC1, IL6) mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Diese Untersuchungen werden ebenfalls am Lungengewebe durchgeführt. Zum Schluss des experimentellen Abschnitts erfolgt eine Auswertung von Immunglobulin G-Proteinen (IgG) im vorliegenden Gehirngewebematerial. Die gewählte Methode ist der IgG-Dot-Blot.

4.1.1 Genehmigung des Tierversuchs

Der Tierversuch ist nach Paragraphen (§) 8 des deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG) von der Ethikkommission des Landesuntersuchungsamtes Rheinland-Pfalz genehmigt. Die Bezeichnung lautet G 20-1-120. Das Experiment wird in den Laboren der Abteilung für Anästhesiologie an der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt.

4.1.2 Versuchstiere

Die Studie umfasst insgesamt $n = 50$ adulte, weibliche Mäuse des Zuchtstamms C57BL/6JRj. Die Versuchstiere stammen aus Janvier Labs, Route du Genest, 53940 Le Genest-Saint-Isle, Frankreich. In das Versuchsvorhaben integrierte Mäuse sind eine Anzahl von $n = 48 + 1$, da ein Tier nach CCI verstorben ist. Diese Maus konnte durch eines der beiden vorher eingeplanten Ersatztiere ersetzt werden.

4.1.2.1 Haltungsbedingungen

Bei der Ankunft im Labor werden die Tiere in kleinen Gruppen von maximal drei Tieren pro Käfig des Typs Filtertop 2 gesetzt, um die Auswirkungen von Stress zu vermeiden. Der freie Zugang zu frischem Trinkwasser und speziellem Granulatfutter (pelletiertem Spezialfutter) für Mäuse ist auch vor der Operation jederzeit gewährleistet, um die Mikroflora und die Darmperistaltik nicht zu beeinträchtigen. Als Einstreu dienen desinfizierte und entstaubte Weichholzspäne. Zu den weiteren Merkmalen der Käfige gehören ein Polyvinylchlorid (PVC) Rohr als Unterschlupf und Papierhandtücher, um den Nisttrieb der Tiere zu befriedigen.

Die Tiere wurden während des Experiments in einem 12-stündigen Tag-Nacht-Zyklus unter Kunstlicht gehalten. Alle Untersuchungen und Manipulationen werden in der Lichtphase durchgeführt. Die Käfige werden in einem Luftstromschrank der Firma Zoonlab untergebracht. Der Tierschrank ist nach § 11 (1) Nr. 1 TierSchVersV als Tierhaltung genehmigt. In diesem ist es durch eine Automatik möglich, eine Luftfeuchtigkeit von ca. 55 % und eine konstante Temperatur von 22-23 °C aufrechtzuerhalten.

4.1.2.2 Gruppendesign

Insgesamt werden die Tiere in sechs Gruppen nach folgendem Schema randomisiert:

Tabelle IV: Gruppeneinteilung

	1 x LPS Tag 1	1 x LPS Tag 3	1 x NaCl Tag 1+3
CCI	n = 10; CCI/LPS 24h	n = 10; CCI/LPS 72h	n = 10; CCI/Veh
Sham	n = 6; Sham/LPS 24h	n = 6; Sham/LPS 72h	n = 6; Sham/Veh

Die Sham-Tiere erhalten lediglich die Präparation bis zur exponierten Schädeldecke. Dies bezieht sich ausschließlich auf die Kraniotomie ohne anschließenden CCI und fungiert als technische Kontrollgruppe. Alle Maßnahmen finden streng unter Anästhesie statt. Gruppe eins bzw. zwei erhält am ersten Tag nach CCI / Sham die Inhalationsbehandlung mit LPS. Drei und vier am dritten Tag und die Gruppen fünf und sechs werden jeweils am ersten und am

dritten Tag behandelt. Jedoch erfolgt hier nur eine Inhalation mit Kochsalz (NaCl) zur Kontrolle.

4.1.3 Versuchsaufbau

In diesem Experiment wird den Mäusen ein SHT nach dem von J. W. Lighthall erstmals 1988 beschriebenen CCI-Modell (199) zugefügt. Der Beobachtungszeitraum beginnt unmittelbar nach CCI und dauert sieben Tage. Vor und nach CCI werden die Versuchstiere neurologisch begutachtet.

Zur Erzeugung einer pulmonalen Komplikation werden die Mäuse an Tag eins und drei nach CCI einem Gemisch aus Lipopolysacchariden (LPS) und Wasser (H₂O), vernebelt durch einen Inhalator, ausgesetzt. In Gruppen fünf und sechs erfolgt zur Kontrolle außerdem eine Applikation von reinem NaCl, gelöst in H₂O, anstatt des Gemischs von LPS und H₂O.

Nach Ablauf der Zeit zur Beobachtung werden die Mäuse euthanisiert, um im Anschluss die Organe – Gehirn und Lunge – auf nennenswerte Veränderungen zu untersuchen. Der Schwerpunkt liegt hier auf der Betrachtung der Hirnpathologie und der Auswirkungen der pulmonalen Komplikation auf diese.

4.2 Durchführung

4.2.1 Verhaltensbiologische Untersuchungen

Um feststellen zu können, ob alle zuvor für den Versuch ausgewählten Tiere auch gesund und geeignet sind, muss ein neurologisches Prescoring erfolgen. Außerdem ist dies essenziell, um das Ausmaß des neurologischen Defizites nach SHT zu beurteilen.

Hierbei werden alle Tiere durch einen verblindeten Untersucher verhaltensbiologisch eingeschätzt. Der gleiche Untersucher beurteilt die Mäuse auch nach der Operation, um die Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Gruppen im Scoring-System zu gewährleisten. Die Untersuchungen finden jeweils prä-op, an d1, d3 und d5 nach der OP statt.

4.2.1.1 Neurological Severity Score

Die vorliegende Studie verwendet den etablierten NSS, um die neuromotorischen Fähigkeiten von Mäusen zu objektivieren. Hierbei werden die Tiere hinsichtlich Suchverhalten, Schreckreflex, Gehverhalten mit Koordination, Gleichgewicht und motorischen Lähmungserscheinungen untersucht. Jede Maus kann in den einzelnen Kategorien Punkte erhalten, die am Ende addiert werden. Ein gesundes Testtier soll eine Gesamtpunktzahl von null haben. Sofern ein Tier 13 Punkte erreicht, ist dies die maximale Verhaltensbeeinträchtigung. Nachfolgend werden die klinischen Untersuchungen kurz erläutert:

Zunächst werden die Reflexe getestet. Dazu wird die Maus aus dem Käfig genommen und auf den Tisch gesetzt. Anschließend klatscht der Untersucher kräftig in die Hände. Löst dieses Klatschen eine Schreckreaktion der Maus aus, ist das ein erwartetes Verhalten und die Maus bekommt dafür keine Punkte. Bleibt eine Reaktion aus, wird dies mit einem Punkt bewertet. Ein solches Verhalten kann Anzeichen für eine Störung der vestibulocochlearen Hirnnerven oder des Allgemeinbefindens sein. Darüber hinaus kann es auch für ein Defizit der Reflexbögen sprechen.

Anschließend beobachtet der Untersucher das Erkundungsverhalten („seeking Behaviour“) des Tieres. Wenn das Versuchstier schnüffelt, seine Umgebung erkundet und sich auf die Hinterbeine stellt, erhält es null Punkte. Außerdem wird der Gang des Tieres beobachtet, also ob es geradeaus gehen kann. Wird eines dieser Verhaltensweisen nicht beobachtet, erhält

die Maus dafür einen Punkt. Dies spricht für ein Aufmerksamkeitsdefizit oder eine eingeschränkte Wahrnehmung oder ein mögliches depressives Verhalten der Mäuse.

Daran schließt sich der „walking beam“-Test an (nach Soblosky et al. (210)). Hier werden Gleichgewicht und Feinmotorik getestet: Das Versuchstier wird auf einen von drei unterschiedlich breiten Stöcken gesetzt. Die Dicke beträgt entweder ein, zwei oder drei cm. Die Stangen werden in einer Höhe von ca. 30 cm eingebaut. Die Maus wurde zuerst auf den größten der drei Stäbe gelegt. Sie muss also die Stangen in absteigender Reihenfolge überqueren, ohne zu fallen oder zu versagen. Wenn mehr als drei Beine falsch platziert werden oder die Maus unsicher geht, bekommt sie einen Punkt. Fällt die Maus, bleibt sie stehen oder bewegt sie sich nicht weiter, erhält sie zwei Punkte.



Abbildung 6: Darstellung des Walking Beam Test

Die Abbildung zeigt drei Holzplanken verschiedener Breite in der Höhe von 30 cm auf zwei Mauskäfige aufgelegt.

Anschließend werden die Tiere auf Rund- und Vierkantstöcke gestellt oder aufgehängt. Diese Stäbchen haben einen Durchmesser von 0,5 cm. Wenn sich das Tier daran festhält, wird es vorsichtig umgedreht. Kann die Maus den Stock länger als zehn Sekunden (s) mit allen vier Pfoten halten, ist der Test bestanden und sie erhält dafür keine Punkte. Wenn sich ein oder mehrere Beine vom Stab lösen oder die Maus sich nicht festhalten kann, deutet dies auf eine mögliche Hemiparese hin. Hierfür wird ein Punkt verteilt.

Abschließend wird das Versuchstier daraufhin untersucht, ob während der Fortbewegung eine vollständige Hemiparese, eine Monoparese oder gar keine Lähmungserscheinungen auftreten. Hier kann die Maus wieder null bis zwei Punkte erhalten.

4.2.1.2 Rota Rod

Zusätzlich zu den Methoden des NSS zur Testung der motorischen Funktionalität und Koordination wird im Anschluss an denselben Tagen eine weitere Untersuchung bei den Tieren durchgeführt. Das sogenannte Rota Rod (RR) besteht aus einer gerillten Stange, einem Motor, um diese Stange in Drehung zu versetzen, und auf der Stange sind runde Scheiben befestigt (211). Diese sollen dem Nager seinen Instinkt zur Erkundung seiner Umgebung einschränken. Unterhalb der Stange befinden sich Sensoren, die den Motor stoppen lassen, sobald darauf gedrückt wird.



Abbildung 7: Darstellung des RR

Gezeigt wird hier die gerillte Stange, der Motor und die in definierten Abstand befestigte runde Scheiben.

Zur Durchführung der Untersuchung wird eine Maus auf die Stange zwischen zwei Scheiben gesetzt. Daraufhin wird der Motor gestartet. Am Anfang dreht sich die Stange noch langsam und wird mit verstreichender Zeit immer schneller. Gemessen wird die Zeit, bis das

Versuchstier von der sich drehenden Stange fällt. Diese einfache Methode deckt zuverlässig Störungen in der motorischen Funktion oder Koordination auf. Ferner können Rückschlüsse auf die Gedächtnisleistung und Lernfähigkeit der Nager gezogen werden.

Das RR wird an jedem Untersuchungstag d1, d3, d5 und d7 einmal durchgeführt. Zusätzlich erfolgt eine zweimalige Durchführung prä-op, um den Versuchstieren die Möglichkeit zu geben, die Aufgabe zu lernen.

4.2.1.3 Open Field Test

Ein weiterer Teil der Beobachtungen besteht aus dem Verlassen eines Kreises (*engl. exit from the circle*) im OFT (212). Dieser ca. 30 cm große Kreis wird innerhalb einer ca. 40 x 40 x 40 cm großen quadratischen Box virtuell durch die EthoVision-XT-Software abgebildet. Oberhalb der Box wird eine Kamera und eine Lichtquelle fest installiert. Die Lichtquelle dient der gleichmäßigen Ausleuchtung der Box.

Sobald die Maus in der Mitte der Box, damit auch in der Mitte des Kreises, ausgesetzt wird, startet die Software für drei Minuten die Analyse. Aufgrund ihres intrinsischen Fluchtverhaltens würde eine gesunde Maus normalerweise die Kreisformation (border zone) möglichst schnell verlassen und eine der Ecken aufsuchen. Als normal wird das Verlassen der Borderzone innerhalb von 30 Sekunden angesehen. Über 30 Sekunden erhält die Maus einen Punkt. Zwischen 61 und 120 s wird die Maus mit zwei Punkten und das Verweilen von mehr als zwei Minuten innerhalb des Kreises mit drei Punkten bewertet. Durch diese Methode können Störungen oder Fehlfunktionen im Angstempfinden aufgedeckt werden. Darüber hinaus werden die mittlere Geschwindigkeit und die gesamt zurückgelegte Strecke der Mäuse innerhalb des Beobachtungszeitraums aufgezeichnet. Der Test wird an d1, d3, d5 und d7 durchgeführt.



Abbildung 8: Darstellung des Open Field Tests

Es wird eine quadratische Box (40 x 40 x 40 cm) im linken Bild gezeigt. Darüber befindet sich eine Kamera, die die Bewegungen einer Maus detektiert. Diese Kamera ist mit dem zu sehenden Computer verbunden, auf diesem die Software EthoVision XT einen Kreis simuliert.

4.2.1.4 Elevated Plus Maze

Der Elevated Plus Maze (EPM) nach Lister et al. 1987 (213) ist einer der am häufigsten verwendeten Tests zur Messung von ängstlichem und explorativem Verhalten bei Nagetieren (214, 215). Daneben kann das Monitoring der durchschnittlichen Geschwindigkeit und zurückgelegten Gesamtdistanz Rückschlüsse auf die Aktivität der Versuchstiere geben (216). Grundlage zur Entwicklung dieser Testmethode ist die natürliche Abneigung von gesunden Mäusen gegenüber offenen und erhöhten Gebieten, sowie das natürliche spontane Erkundungsverhalten in neuartigen Umgebungen. Bestehend aus zwei offenen, gekreuzt mit zwei geschlossenen Armen und einer Region im Zentrum des Kreuzes, zu denen die Versuchstiere uneingeschränkter Zugang haben, wird den Mäusen die Wahlmöglichkeit gegeben, in welchem Bereich sie sich aufhalten möchten. Gemessen werden sowohl die Zeit in den offenen Bereichen als auch die Anzahl der durchgeführten Kopfsenkungen nach vorherigem Aufrichten auf die Hinterbeine (vereinfacht wird in dieser Arbeit nur von Kopfsenkungen gesprochen, da die Durchführung eines Kopfabnehmens ein vorheriges Aufrichten voraussetzt) über den Versuchszeitraum. Sowohl ein längerer Aufenthalt in den offenen Armen als auch häufige Kopfsenkungen werden als Indikator für exploratives

Verhalten bei Mäusen gesehen und können so als Maß für eine Reduktion von Angst interpretiert werden (215, 217). Die Untersuchung wird am sechsten postoperativen Tag durchgeführt. Der Beobachtungszeitraum beträgt fünf Minuten. Innerhalb dieser Zeit werden neben der verbrachten Zeit in den offenen Armen, die mittlere Geschwindigkeit, die zurückgelegte Gesamtdistanz und die Anzahl an Kopfsenkungen der Mäuse aufgezeichnet. Diese weiteren Parameter können Aufschluss über eine mögliche neurokognitive Beeinträchtigung der Versuchstiere geben.



Abbildung 9: Darstellung EPM von vorne (links) und von oben über PC-Software (rechts)

Gezeigt wird der Aufbau eines EPM mit zwei geschlossenen und zwei offenen Armen. Über eine Kamera wird die Bewegung der Mäuse aufgenommen und anschließend analysiert.

4.2.2 Controlled Cortical Impact und LPS-Inhalation

4.2.2.1 Anästhesie und Vorbereitungen

Bevor die Mäuse narkotisiert werden können, muss von jeder Maus das Gewicht erfasst und eine grob orientierende Inspektion des Tieres durchgeführt werden. Dies dient dazu potenzielle Krankheiten oder präoperative neurologische Defizite zu identifizieren und solche Mäuse von vorneherein auszuschließen. Nach der Begutachtung erhalten die Mäuse 39 Minuten vor dem Eingriff das Analgetikum Rimadyl® (Wirkstoff: Carprofen) in der Dosierung 4 Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht (mg / kgKG) und einem Injektionsvolumen von 10 Mikroliter pro Gramm ($\mu\text{l} / \text{g}$) in subkutaner Applikation.

Nachdem die für die Narkose notwendigen Geräte auf ihre richtige Funktionsfähigkeit überprüft worden sind, erfolgt eine inhalative Narkoseeinleitung mit vierprozentigem (4 %) Isofluran. Zur stressfreien Einleitung werden die Mäuse in eine Vorfluterkammer gesetzt, die nach luftdichtem Verschließen mit dem Narkosegas angeflutet wird. Die Versuchstiere verbleiben dort, bis sämtliche motorischen Reaktionen erloschen sind. Die Überprüfung der Tiefe der Narkosetiefe erfolgt durch Auslösung des Zwischenzehenreflexes der hinteren Extremität. Aufrechterhalten wird die Narkose durch 1 – 2 % Isofluran, das mit einem Flow von 0,5 Liter pro Minute (l / min) Frischluft kombiniert mit 1,0 l / min Sauerstoff durch eine angepasste Gesichtsmaske kontinuierlich appliziert wird. Die Körpertemperatur von 37 Grad Celsius (°C) wird durch eine Wärmeplatte gehalten und mittels rektaler Temperatursonde überwacht, damit ein unerwünschtes Absinken der Körpertemperatur frühzeitig auffallen kann. Außerdem wird eine Bepanthen®-Augensalbe verwendet, um ein eventuelles Austrocknen der Augen zu verhindern. Die Narkosedauer für alle Versuchstiere, unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit, beläuft sich von Einleitung bis Aufwachen auf etwa 20 Minuten. Im Einvernehmen mit dem Tierversuchsantrag G 20-1-120 werden die Dauer und die Körpertemperatur für jede Narkose dokumentiert und archiviert. Es werden keine Auffälligkeiten beobachtet. Während der gesamten Narkose zeigen alle Mäuse eine suffiziente Spontanatmung.

4.2.2.2 Kraniotomie

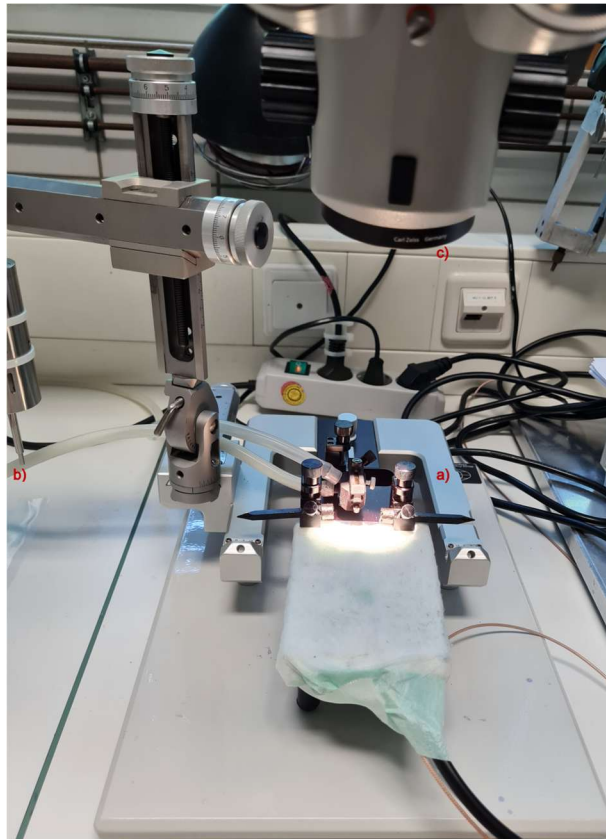


Abbildung 10: CCI-Arbeitsplatz

Darstellung des Arbeitsplatzes zur Applikation eines CCI. Zu sehen sind u.a. der Implicator (b), das Mikroskop (c) und der Stereotaktische Rahmen (a) zur Fixierung der narkotisierten Maus.

Nach Eintritt der Bewusstlosigkeit und dessen Überprüfung zuvor werden die auf dem Bauch liegenden Mäuse in einen stereotaktischen Rahmen an deren Oberkiefer eingespannt. Eine ungewollte intraoperative Positionsänderung des Kopfes kann so verhindert werden. Zur intraoperativen Analgesie wird eine Lidocain-Hydrochlorid-(2 %) Lösung mit 0,9 % NaCl auf 0,5 % verdünnt und eine Dosis von 5 mg / kgKG subkutan injiziert. Für eine Maus mit einem Gewicht von ungefähr 20 g wird eine Injektion seitlich rechts und links unter den Ohren (an den Stellen der Shore Bars) mit jeweils 10 µl verabreicht.

Die Operation beginnt mit einem ca. 1 bis 1,5 cm langen Hautschnitt an der Kopfschwarte, lokalisiert über der Medianlinie von der vorderen (Bregma) bis zur hinteren (Lambda) koronaren Schädelnaht. Anschließend erfolgt die stumpfe Präparation des Schädelknochens mithilfe eines Wattestäbchens. Hierbei wird das freigelegte Periost vom Knochen gelöst und an den Rand des Operationsfeldes geschoben. Für die eigentliche Kraniotomie bedarf es eines Mikrobohrers, mit dessen Hilfe ein rechteckiges Stück Knochen aus der Kalotte entlang

der zuvor genannten Schädelnähte und dem rechtsseitigen Arcus zygomaticus gelöst werden kann. Dieses Stück Knochen bleibt am medialen Rand (an der Medianlinie) mit der restlichen Schädeldecke verbunden. Der Anteil fungiert als Scharnier. Bei Erstellung des Knochenfensters wird auf den vollständigen Erhalt der Dura mater geachtet.

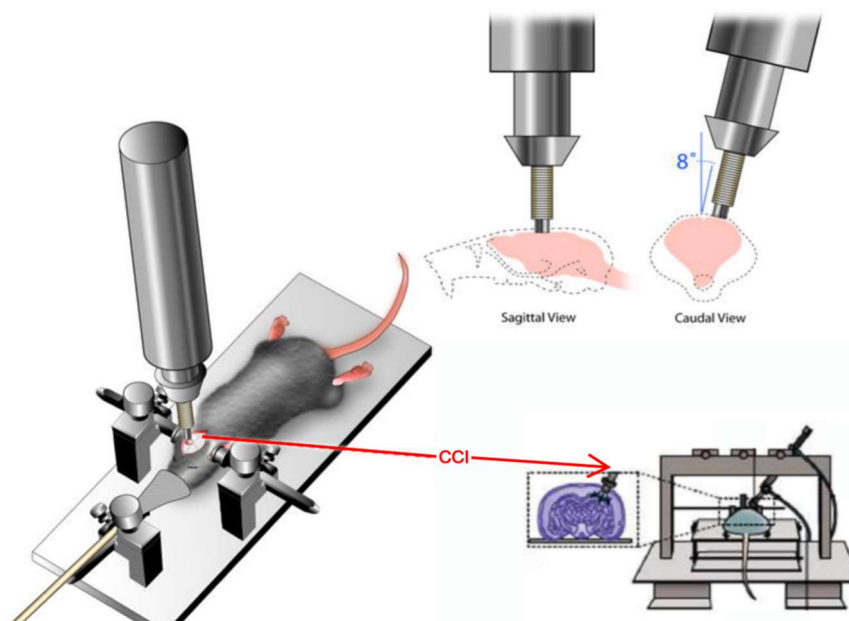


Abbildung 11: Versuchsaufbau eines CCI

Modifiziert nach Onyszchuk et al. (218) und Xiong et al. (204). Dargestellt ist eine narkotisierte Maus, die in im stereotaktischen Rahmen des Impactors zwischen zwei Bolzen eingespannt ist. Es ist der intraoperative Aufbau mit freigelegter und eröffneter Kalotte zu sehen.

Für die folgende Induktion des CCI wird der Schädelknochen nach medial weggeklappt, wodurch sich eine auf der rechten Hemisphäre befindende Öffnung zeigt. Über dieser Öffnung wird der Benchmark™ Stereotaxic Impactor vertikal positioniert. Dieser CCI-Applikator verfügt über einen elektromagnetisch betriebenen starren Bolzen, der computergesteuert separat ausgelöst werden kann. Das SHT wird mit Hilfe eines Stempels (Durchmesser 3,0 Millimeter (mm)) mit einer Geschwindigkeit von 6 Metern pro Sekunde (m / s), einer Eindringtiefe von 1,5 mm und einer Aufpralldauer von 150 Millisekunden (ms) verursacht. Hierdurch wird ein moderater bis schwerer Gehirnschaden erzeugt, den die überwiegende Anzahl an Mäusen überleben kann.

Im Anschluss wird die zuvor aufgeklappte Schädeldecke wieder an ihren anatomisch richtigen Platz mit Histoacryl®-Gewebekleber fixiert. Die Naht der Haut erfolgt mit nichtresorbierbarem Prolene®-Nahtmaterial der Stärke 6,0 mit Einzelknopf-Technik. Die rektale Sonde wird entfernt und die Mäuse werden aus dem stereotaktischen Rahmen gelöst. Anschließend kommen die Versuchstiere zur postoperativen Überwachung in einen Säuglingsinkubator mit

definierter Temperatur von 33 °C und 35 % Luftfeuchtigkeit. Hier liegen die Mäuse allein in einem Käfig, bis diese ca. zwei Stunden nach der Operation das erste Mal Nahrung und Wasser zu sich nehmen dürfen.

4.2.2.3 Scheinoperation (Sham)

Die Tiere der Kontrollgruppe erhalten eine sogenannte Scheinoperation (Sham). Dazu durchlaufen sie anfänglich dieselben Operationsschritte wie die CCI-Mäuse, mit Ausnahme der Kraniotomie und des Einsatzes des CCI-Applikators. An dessen Stelle wird die Kalotte im geöffneten knöchernen Fenster mithilfe eines Wattestäbchens leicht angeraut und daraufhin wieder verschlossen. Die folgenden Schritte verlaufen wieder analog zu der CCI-Gruppe.

4.2.2.4 LPS-Inhalation

Nach erfolgreicher Operation werden die Mäuse je nach Gruppenzugehörigkeit (NaCl d1 + d3, LPS d1 und LPS d3, jeweils nach CCI) zusätzlich einer Inhalation von 15 mg LPS von *E. coli* auf 5 ml NaCl 0,9 % bzw. 5 ml NaCl 0,9 % als Kontrolle ausgesetzt. Diese Maßnahme erfolgt durch den verblindeten Untersucher. Dazu wird ein Inhalator IH50 der Firma Beurer genutzt. Dieser wird zusammen mit den Mäusen in eine leere Mausbox gesetzt, gestartet und der Deckel luftdicht verschlossen. Laut Herstellerangaben beträgt die Verneblungsleistung 0,25 ml / min. Tatsächlich benötigte der Inhalator für die Verneblung von 15 ml Lösung nur zwischen 10 und 15 Minuten und keine errechneten 20 Minuten. Nach erfolgter kompletter Verneblung verbleiben die Versuchstiere für weitere 10 bis 15 Minuten in der mit LPS- bzw. veh-Lösung angereicherten Luft der Box. So ergibt sich im Durchschnitt eine Versuchsdauer von ca. 30 Minuten. Die Box hat ein Volumen von 8,5 l. Bei beendeter Verneblung der Lösung ist das gesamte Volumen der Mausbox mit 15 mg LPS geflutet. Dies entspricht 1,76 µg LPS / ml Luft. Das Atemminutenvolumen (AMV) einer Maus ist stark von Faktoren wie Alter, genetischem Hintergrund und experimentellen Bedingungen abhängig. Es erfolgt keine Messung des AMV in diesem Versuch. Daher werden folgende Annahmen basierend auf (219, 220) vorausgesetzt:

Tabelle V: Physiologische Lungenparameter einer adulten Maus

	Atemfrequenz [/ min]	Tidalvolumen [ml]	AMV [ml / min]
Adulte Maus	100 – 350	0,1 – 0,2	10 - 70

Somit werden die Mäuse nach vollständiger Verneblung der Lösung, abhängig von ihrem Stresslevel 17,6 bis 123,2 μg LPS / min für den restlichen, verbleibenden Zeitraum in der Box inhalativ aufnehmen.

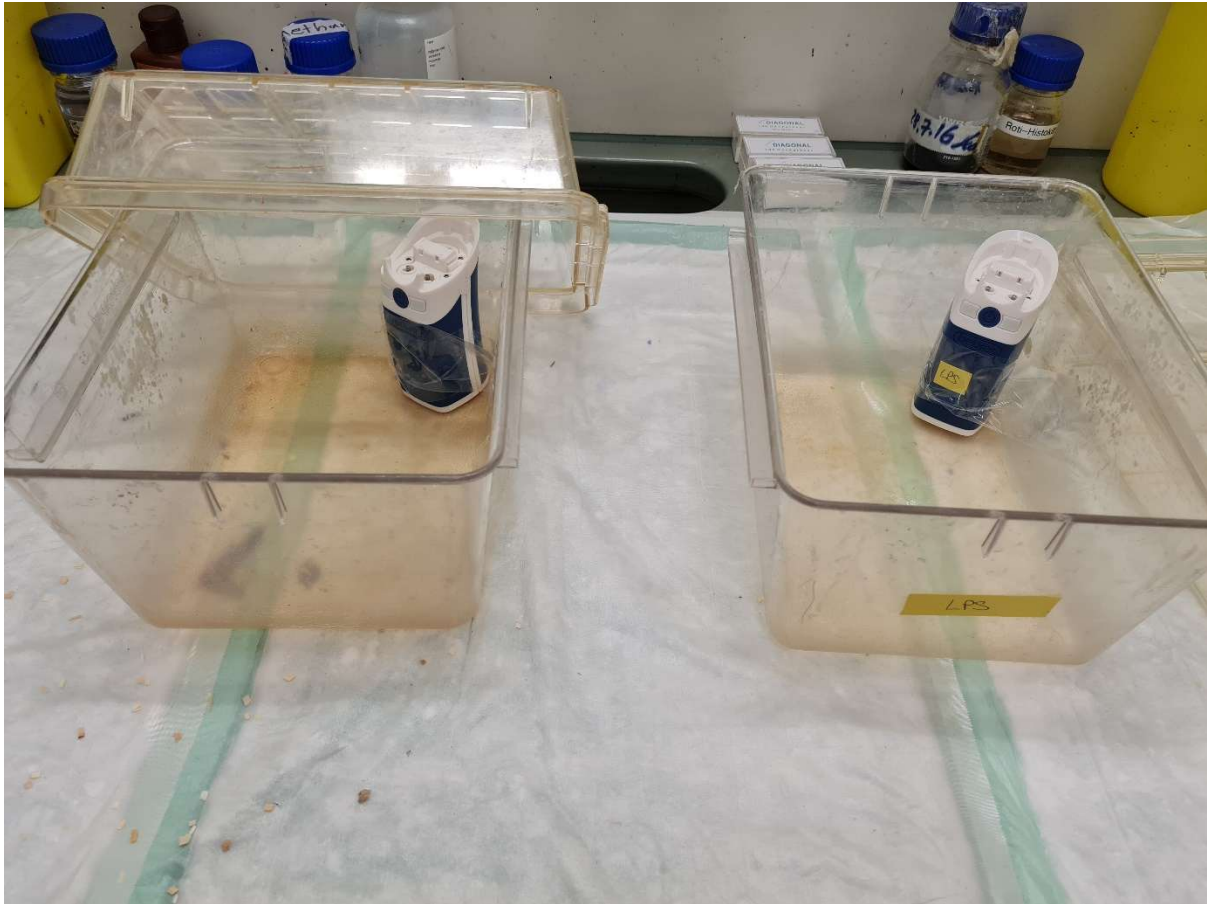


Abbildung 12: Mausbox mit Inhalator

Darstellung zweier Mausboxen mit Deckel mit eingefügten Inhalatoren. Bestückt mit LPS auf der rechten Seite, mit NaCl auf der linken Seite.

4.2.2.5 Euthanasie und Präparation

Nachdem am siebten postoperativen Tag das letzte Mal der neurologische Status erhoben wird, werden die Tiere euthanisiert und die Gehirne sowie die Lungen zur histologischen Weiterverarbeitung entnommen. Dazu bekommen die Versuchstiere wieder eine Narkose mit Isofluran. Die Einleitung erfolgt wie bei der Kraniotomie, indem über ca. 60 bis 90 Sekunden das inhalative Anästhetikum in einer luftdichten Box angeflutet wird. Es wird wieder ein Zustand der tiefen Bewusst- und Schmerzlosigkeit herbeigeführt, kontrolliert durch ein

Ausbleiben der Reflexe und Atmung. Anschließend erfolgt die Dekapitation mit einer chirurgischen Schere. Das daraufhin aus den Tieren austretende Blut wird in einem Röhrchen mit 80 µl Heparin aufgefangen, danach zentrifugiert und zur späteren Verwendung tiefgefroren. Die Entnahme der Gehirne wird durch die mediale Inzision der Haut entlang der Schädelnähte eingeleitet. Nach der Präparation des knöchernen Schädels und dessen Eröffnung müssen zuerst noch die Hirnnerven vorsichtig mithilfe eines kleinen Spatels gelöst werden. Im Anschluss können die Gehirne aus der Schädelhöhle entnommen und in pulverisiertem Trockeneis schockgefroren werden. Die Lagerung der Hirne erfolgt bei -20 °C in beschrifteten Tütchen. Während der Prozedur wird bestmöglich auf die Unversehrtheit der Gehirne geachtet.

Gleichzeitig wird von einem weiteren Untersucher die obere Körperhöhle des Körperstamms mit einer chirurgischen Schere eröffnet. Dazu wird die weiche Haut über der Bauchdecke bis zum Xiphoid aufgeschnitten. Das nun sichtbare Diaphragma und im Anschluss das knöcherne Sternum durchtrennt. Dies ermöglicht das seitliche Wegklappen der Rippenbögen und die darauffolgende Entnahme der Lunge. Diese wird in beschriftete Tubes transferiert und für die spätere Verwendung sogleich in flüssigem Stickstoff schockgefrostet. Die Aufbewahrung erfolgt bei -80 °C.

4.2.2.6 Kryosektion und Probengewinnung

Bevor eine histologische und im Anschluss eine mikrobiologische Analyse des Hirngewebes stattfinden kann, muss dieses im Kryostat bei -20 °C in 12 bzw. 240 µm messende Schnitte geschnitten werden. Dafür werden die Gehirne in Neg 50™-Gefrierschnittmedium mit dem occipitalen Pol voran auf einer Metallscheibe fixiert und eingebettet. Es wird dabei darauf geachtet, dass die gesamten Hirne mit einer möglichst gleichmäßigen Schicht des Mediums überzogen werden. Außerdem ist es unerlässlich, auf eine korrekte Ausrichtung in der vertikalen und horizontalen Achse zur Klinge des Kryostats zu achten. Bei Bregma + 3,14 mm beginnend werden nun, von rostral nach kaudal, in jeder Schnittebene jeweils sechs, die 12 µm dicken Schnitte erstellt. Jeder der sechs Schnitte wird auf einen gesonderten Objektträger (OT) aufgetragen. Eine Schnittebene umfasste 500 µm und es gibt insgesamt 16 koronare Schnittebenen von 0 – 7500 µm. Für die ersten zehn Ebenen wird einer (Beschriftung mit A) und für die nächsten sechs ein zweiter (Beschriftung mit B) OT verwendet, sodass zusammengenommen 12 OT pro Gehirn gebraucht werden. Diese werden nachfolgend getrocknet und in OT-Kästen bei -20 °C gelagert.

CCI/1 x LPS 7d		CCI/1 x LPS 7d	
Maus	Objektträger	Maus	Objektträger
Datum	Initialien	Datum	Initialien
1	0 µm	11	5000 µm
	2	500 µm	12
3	1000 µm		5500 µm
	4	13	6000 µm
5	2000 µm		
	6		14
7	3000 µm		6500 µm
	8	15	7000 µm
9	4000 µm		
	10		16
	4500 µm		7500 µm

Abbildung 13: Beschriftung der OT

Darstellung der Anordnung der Gehirnschnitte auf den einzelnen OT.

Der in diesem Experiment erzeugte Schadensbereich liegt ca. zwischen Ebene sechs (Bregma + 0,64 mm) und Ebene 14 (Bregma – 3,36 mm). Hier wird das Material in sogenannte Trimmschnitten gewonnen, welches später für die Ribonukleinsäure (RNA)- und Proteinanalyse benötigt wird. Die Trimmschnitte werden ab Ebene sechs (2500 µm) bis 13 (6000 µm) in 6 x 40 µm dicken, jeweils nach den Schnitten für die OT, generiert. Die sechs einzelnen Schnitte werden vorsichtig übereinandergelegt und mit einem gekühlten Pinsel festgedrückt, sodass man insgesamt eine 240 µm Schicht erhält. Nun kann mit einem ebenfalls gekühlten Skalpell das basale Drittel inklusive Riechkolben abgetrennt werden. Außerdem erfolgt eine Teilung der beiden Hemisphären in ipsilateral (rechts) und kontralateral (links) sowie in Gruppe A und B, wobei alle zwei Ebenen das Material jeweils einer Gruppe zugehörig ist. Diese zwei Hälften werden vorsichtig mittels Nadel in ein jeweils beschriftetes Kryoröhrchen (KR) transferiert und im Anschluss in flüssigem Stickstoff schockgefrosten. Die Aufbewahrung bis zur Weiterverarbeitung findet bei -80 °C statt.

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

Abbildung 14: Trimmschnittebenen

Darstellung der Zuordnung der erstellten Trimmschnitte auf vier Probengefäße (l = links, r = rechts).

4.3 Datenerhebung

4.3.1 Histologie

4.3.1.1 Färbung nach Nissl (Kresylviolett-Färbung)

Die klassische Färbemethode nach Nissl wird in der Histologie zur Darstellung und besseren Beurteilung von Nervenzellen, insbesondere der Zellkörper, verwendet. So wird eine Differenzierung innerhalb der verschiedenen Bereiche des Hirnparenchyms möglich. Der basische Farbstoff, bei dem es sich in den meisten Fällen entweder um Kresylviolett, Thionin oder Toulidinblau handelt, bindet an basophile Gruppen, wie sie beispielsweise in RNA und in Desoxyribonukleinsäure (DNA) vorkommen. Dabei handelt es sich um negativ geladene Phosphatgruppen. Mit diesen geht der Farbstoff Ionenverbindungen ein und färbt so vor allem Ribosomen, Nucleoli (RNA) und Nuclei (DNA) ein. Da Zellkörper von Nervenzellen naturgemäß reich an Ribosomen sind und diese wiederum in überwiegender Anzahl am rauen endoplasmatischen Retikulum (rER) sitzen, spricht man in der Färbung auch von sogenannten Nissl-Schollen. Sie entsprechen Ansammlungen von Ribosomen und rER und sind Ausdruck von intensiver Proteinbiosynthese (PBS). Axone und Dendriten werden aufgrund der fehlenden Zellorganellen nicht eingefärbt, da folglich der Farbstoff dort keine Bindung eingeht (221). Außerdem enthalten sie auch kaum DNA oder RNA.

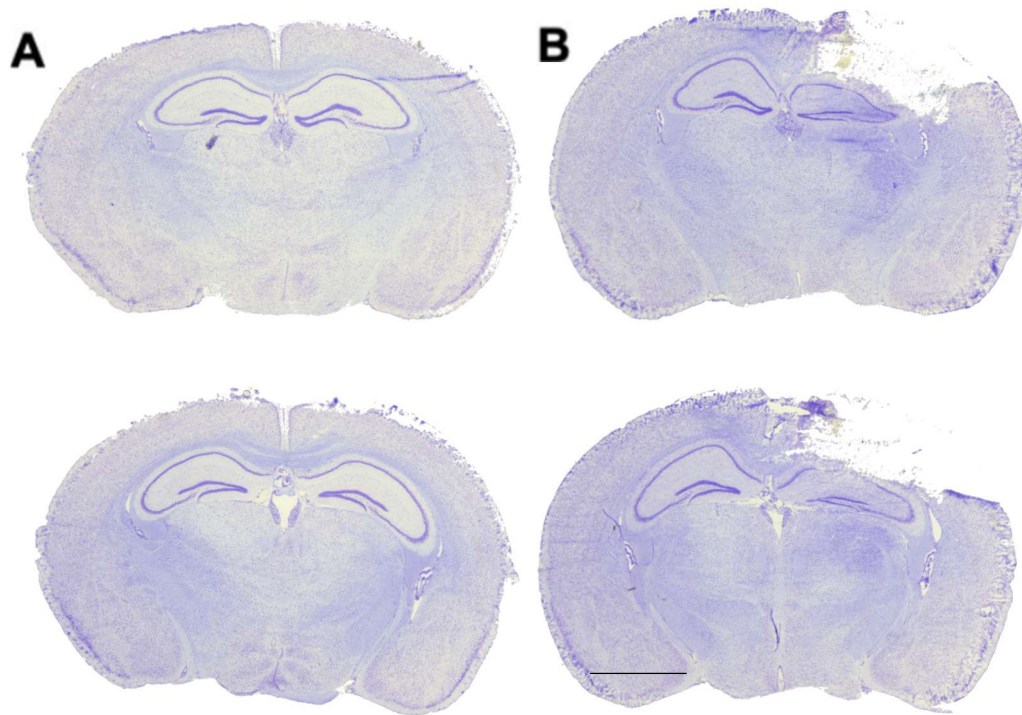


Abbildung 15: Exemplarische Gehirnschnitte nach Nissl-Färbung

Darstellung von jeweils zwei exemplarischen Frontalschnittebenen (Ebene 11 und 12) von je einem Mausgehirn nach Sham-Operation (A) und nach CCI (B). Maßstabsbalken: 2 mm.

Die Färbung der Schnitte auf den OT erfolgt nach standardisiertem Laborprotokoll. Nach Herausholen der OT aus dem Gefrierschrank folgt eine einstündige Trocknungsperiode bei Raumtemperatur (RT) und eine anschließende zweiminütige Spülung mit 70%igem Ethanol. Hierbei werden überflüssige Reste von dem zuvor verwendeten Neg 50™-Gefrierschnittmedium entfernt. Danach werden die OT für zehn Minuten in Kresylviolettlösung getunkt. Zur Reinigung der Schnitte und Entfernung von überschüssiger Farbe wird destilliertes Wasser genutzt. Dieser Schritt wird zweimal ausgeführt bevor die OT in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit 70%-, 96%- und 99,9%igem Ethanol jeweils zweimal kurz gewaschen wird. Abschließend muss die Färbung für fünf und danach für zwei Minuten in Roti-Histol fixiert werden. Zum Schutz der Hirnschnitte wird ein Deckglas mit Roti-Histokitt® auf die OT aufgebracht und über Nacht getrocknet.

4.3.1.1.1 Histologisches Schadensvolumen

Nach Trocknung der OT wird jede Schnittebene unter einem Lichtmikroskop, das die Fähigkeit zur Digitalisierung des sichtbaren Bildes hat, dargestellt und vermessen. Genutzt wird hierfür die Software Zen 2 (blue edition). So können das gesamte kontra- und ipsilaterale Hirnvolumen sowie der Schadensanteil bestimmt werden. Nach Digitalisierung der Schnittebenen wird in jeder Ebene die gesamte linke Hemisphäre (kontralateral), die gesamte rechte Hemisphäre (ipsilateral), einmal unter Aussparung der Fläche des Schadens und in einem zweiten Schritt unter Einbezug der Schadensfläche, mithilfe der Software umfahren. Die Berechnung des Läsionsvolumens erfolgt nach standardisiertem Laborprotokoll: Durch Bildung der Differenz aus den beiden ipsilateralen Flächen erhält man die Schadensfläche (A) in mm². Das Schadensvolumen (V) erhält man folglich durch Addition der Schadensflächen aller Ebenen multipliziert mit dem Abstand zwischen den einzelnen Schnittebenen. Dieser beträgt 500 µm (= 0,5 mm). Es ergibt sich folgende Formel:

$$V = \sum_{i=1}^{16} A_i * mm^2 * 0,5 mm$$

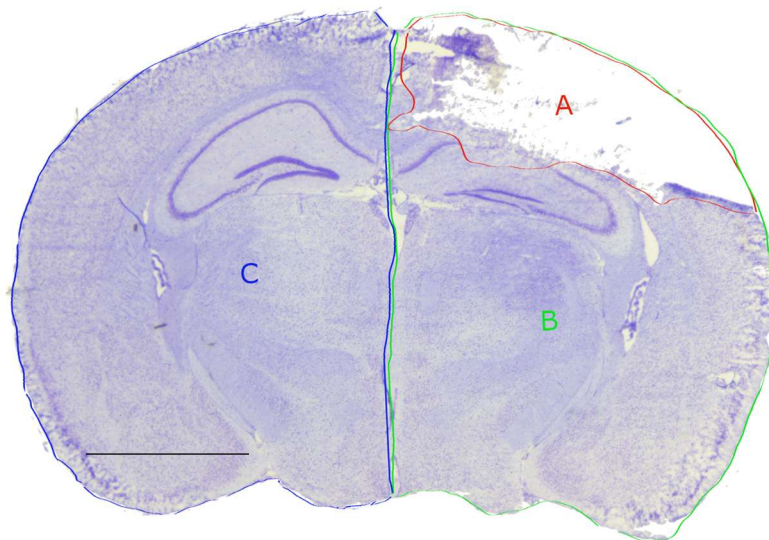


Abbildung 16: Beispielhafte Messung der Schadensfläche

Darstellung einer Hirnschnittebene mit der beispielhaft ausgemessenen Schadensfläche (A), der ipsi- (B) und kontralateralen Fläche (C). Maßstabsbalken: 2 mm.

4.3.1.2 Immunhistochemische Färbungen

Die Immunhistochemie basiert darauf, mit in einer Lösung enthaltenen Antikörpern (AK) bestimmte Antigene (AG), wie z.B. Proteine, nachzuweisen. Hierbei unterscheidet man die direkte und die indirekte Immunhistochemie. Bei der direkten ist der sogenannte primäre AK mit einem Enzym, das eine Nachweisreaktion herbeiführt, oder einem fluoreszenten Farbstoff (Fluorochrom) markiert. Die indirekte Methode nutzt zwei AK. Den primären AK, der selektiv an das AG bindet und den sogenannten sekundären AK, der wiederum an den primären bindet. (222). Bei der hier verwendeten indirekten Immunfluoreszenz ist der sekundäre AK mit einem Fluorochrom, der durch Anregung mit einer bestimmten Wellenlänge sichtbar gemacht werden kann, markiert.

In der hier durchgeführten Studie kommen drei primäre AK zum Einsatz. Der Erste dient dem Nachweis von reaktiven Astrozyten mittels Färbung des GFAP (223). Der Zweite ist gegen CD68 gerichtet. Dies ist ein lysosomales Protein, das vor allem in Makrophagen und aktivierten Mikrogliazellen in hohen Konzentrationen exprimiert wird (224). Der letzte Marker, neuronales nukleäres Protein (*engl. neuronal nuclear protein*, NeuN), wird zur Färbung von neuronalen Zellkernen verwendet, da dieses Protein ausschließlich im Nervensystem zu finden ist. Darüber hinaus ist auch bisher kein Nachweis von NeuN in Gliazellen erfolgt, weshalb sich dieses Protein im besonderen Maße als Marker für Neurone eignet (225). Als Folge eines SHT erfolgt eine reaktive Astroglie, was bedeutet, dass Astrozyten und Gliazellen in einen aktivierten Zustand übergehen. Sie verändern u.a. ihre Morphologie und ihre Proteinexpression wird verstärkt. Hieraus resultiert auch eine verstärkte GFAP-Expression, was zu einer intensiveren Immunfluoreszenz-Färbung führt (125). Es ist wünschenswert, sowohl aktivierte Astrozyten als auch aktivierte Mikrogliazellen/Makrophagen immunhistochemisch darzustellen, um das Ausmaß des neuronalen Schadens visuell und quantitativ bewerten zu können. Die Immunfluoreszenz-Färbung erfolgt mit standardisiertem Laborprotokoll.

Dazu werden die angefertigten Schnitte auf den OT aus der Kühlung geholt und für mindestens 30 Minuten luftgetrocknet. Ist die Trocknung abgeschlossen, wird ein Fettstift genutzt, um eine Ausbreitung der im nachfolgenden Schritt hergestellten Blockierlösung (s. 3.5.2 *Puffer und Lösungen - Lösungen*) zu verhindern. Hierzu sind diejenigen Schnitte zu identifizieren, auf denen der Gyrus dentatus möglichst gut und vollständig zu sehen ist. Es folgt ein Bad in 4%iger PFA-Lösung für zehn Minuten. Im Anschluss müssen die OT für weitere zehn Minuten in PBS auf einem Magnetrührer gewaschen werden. Dieser Schritt wird zwei Mal durchgeführt. Nun wird die zuvor hergestellte Blockierlösung in den umrandeten Bereich des OT pipettiert und für eine Stunde unter RT inkubiert. Währenddessen wird der

primäre AK (s. 3.6.1 *Antikörper - Primäre*) in der Verdünnung 1 : 1000 der Blockierlösung beigefügt. Ist die Inkubation abgeschlossen wird der primäre AK auf die zu färbenden Schnitte gegeben. Nun müssen die OT in einer Nasskammer bei 4 °C über Nacht inkubieren. Am darauffolgenden Tag werden die OT dreimal mit PBS für zehn Minuten auf dem Magnetrührer gewaschen. Danach wird der passende sekundäre AK, der in der Blockierlösung mit der Verdünnung 1 : 500 gelöst wird, auf die OT gegeben und eine Stunde bei RT und Lichtausschluss in der Nasskammer inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit folgt wieder eine dreimalige Waschung mit PBS für zehn Minuten. Als letzter Schritt wird auf den behandelten OT ein Einbettmedium aufgetragen und ein weiterer OT als Deckel verwendet. Als Abschluss müssen die OT bei 4 °C über Nacht inkubiert und am nächsten Tag die Ränder des OT mit Nagellack versiegelt werden, bevor diese im Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden können.

Abb. 14 zeigt eine exemplarische Multifluoreszenzfärbung eines Gehirnschnittes einer Maus mit CCI und einer ohne. Wobei die grüngefärbten Bereiche CD68, die roten GFAP und die blauen NeuN repräsentieren. Die Auswertung erfolgt als Größe der gefärbten Fläche des Hippocampus ipsi- und kontralateral des CCI.

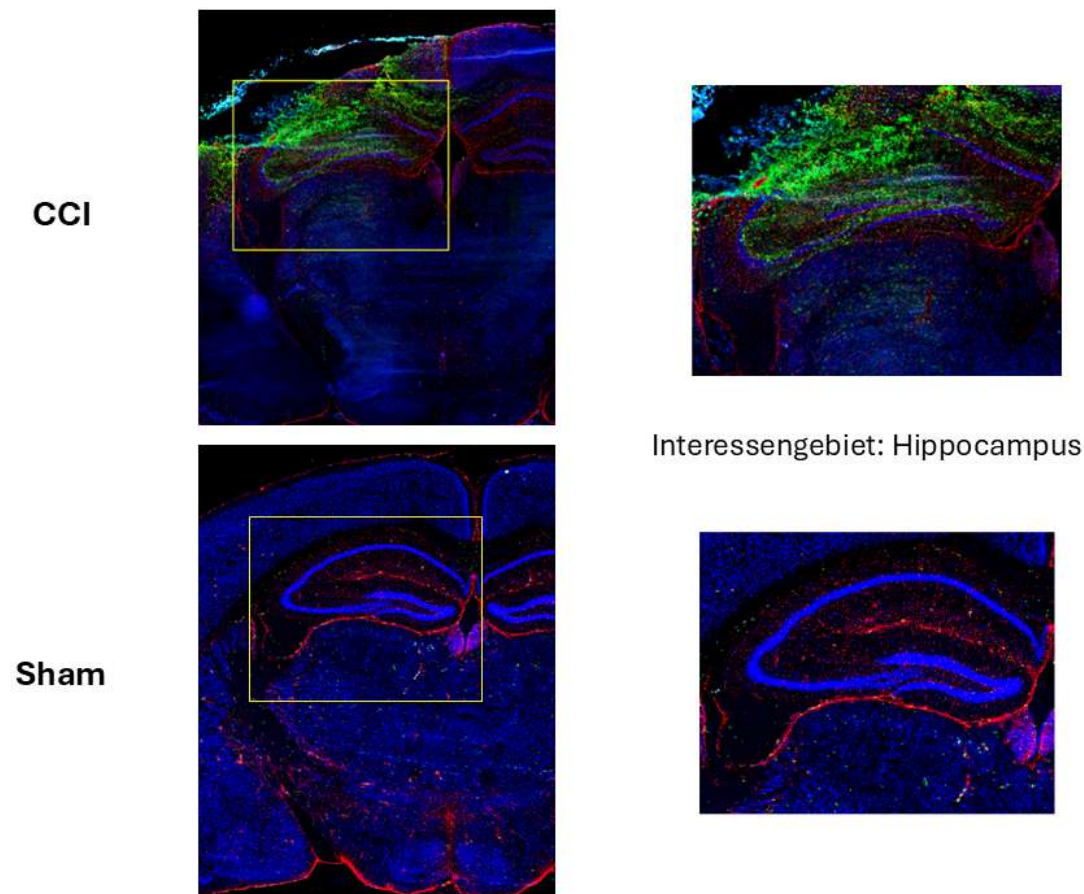


Abbildung 17: Immunfluoreszenzfärbung CCI und Sham

Dargestellt ist jeweils ein Hirnschnitt eines Versuchstieres mit CCI und eines mit Scheinoperation. Der vergrößerte Bildausschnitt zeigt das Interessengebiet Hippocampus. Die grünen Bereiche stellen CD68, als Marker für Mikroglia dar. GFAP ist rot und repräsentiert aktivierte Astrozyten. Die blauen Bereiche sind mit NeuN eingefärbt. Dieser gilt als Marker für Neurone.

4.3.1.2.1 Quantifizierung

Die Quantifizierung der Immunfluoreszenzfärbung fokussiert in der vorliegenden Arbeit aus Gründen der Färbequalität auf Astrozyten und Mikroglia im Hippocampus. Initial werden die Größen der ipsi- oder kontralateral zur Läsion bzw. Sham-Operation liegenden Hippocampi anhand von anatomischen Landmarkern (Corpus Callosum, Fimbria, Hirnventrikel) ermittelt. Dazu werden die digitalisierten Fluoreszenzbilder in das Bildbearbeitungsprogramm Gimp geladen und dort die Hippocampi ausgeschnitten und in ein neues Dokument mit standardisierter Pixelgröße 960 x 914 px eingefügt. Der gesamte ausgeschnittene

Methoden

Hippocampus wird in einer hellgrünen Farbe eingefärbt. Anschließend wird bei der Analyse-Software ImageJ die Größe des eingefärbten Hippocampus bestimmt. Dazu folgt eine Konvertierung in ein 8-Bit-Grauwert-Bild und anschließend die Analyse mit einem Upper-Threshold von null und einem Lower-Threshold von 252. Ist diese Auswertung abgeschlossen, folgt die Messung der Größe der Hippocampi der CCI-Tiere nach dem gleichen Vorgehen. Dabei wird die Größe des noch erhaltenen Hippocampus auf der ipsilateralen Seite nach **Abb. 15** durch den Untersucher festgelegt. In einem nächsten Schritt werden die Hippocampi in ImageJ (960 x 914 px) eingefügt, die Farbkanäle separiert und ein 8-Bit-Grauwert-Bild erstellt. Zur Analyse der immunfluoreszenzgefärbten Bereiche werden folgende Einstellungen genutzt:

	Threshold		Analyse	
	Lower	Upper	Size	Circularity
Grün – CD68	100	252	0 – 100	0,9 – 1,0
Rot – GFAP	100	251	0 – 100	0,5 – 1,0

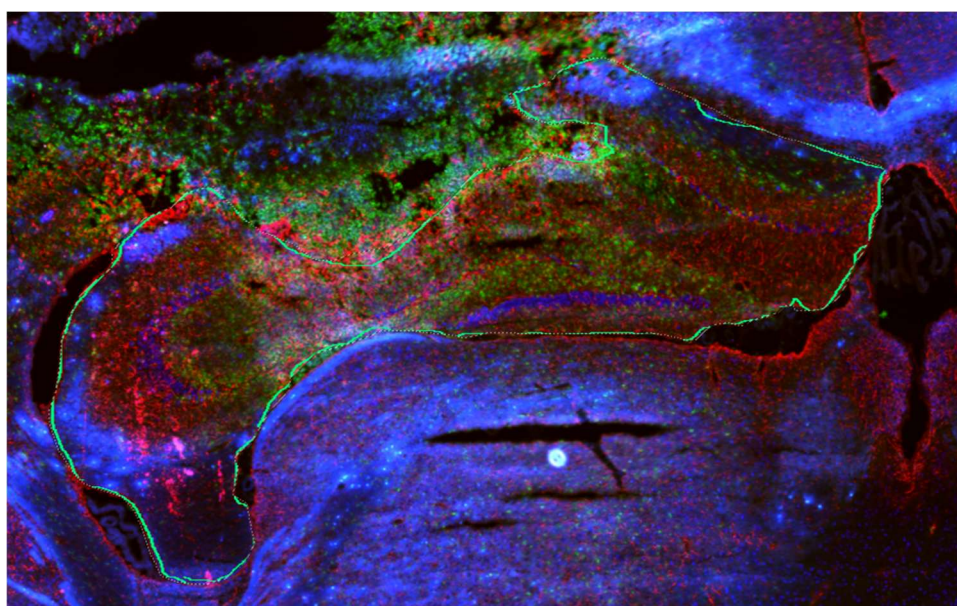


Abbildung 18: Beispielhafte Darstellung der Größe eines ipsilateralen Hippocampus

Zu sehen ist hier die angenommene Größe des noch erhaltenen Hippocampus auf der ipsilateralen Seite (grüne Linie).

Nach diesem Vorgehen können Größe und Fläche der gefärbten Bereiche zwischen ipsi- und kontralateral sowie zwischen CCI und Sham verglichen werden. Außerdem erlaubt es, einen Größenvergleich der Hippocampi vorzunehmen.

4.3.2 Molekularbiologie

4.3.2.1 Ribonukleinsäuren-Extraktion

Das Material zur Synthese der RNA wird bereits bei der Kryotomie der Hirnschnitte gewonnen. Es handelt sich um die zwischen Ebene sechs bis 14 (Bregma + 0,64 bis -2,86 mm) angefertigten Trimmstücke (s. *Kapitel 4.2.2.6 Kryosektion und Probengewinnung*) der Dicke von 6 x 40 µm. Zur Extraktion der RNA wird das RNeasy Kit von Qiagen verwendet.

Die Extraktion wird nach standardisiertem Laborprotokoll, das auf einer im Jahre 2006 beschriebenen Methode basiert, durchgeführt (226). Zunächst müssen die Proben in den Tubes aus dem -80 °C kalten Gefrierschrank genommen und aufgetaut werden. Nach dem Auftauen werden 0,9 ml Qiazol zusammen mit einer Edelstahlkugel in das Tube gegeben und für zwei Minuten mit einer Frequenz von 20 Hertz (Hz) im Mastermill homogenisiert. Im Anschluss folgt eine Inkubation bei Raumtemperatur (RT) für fünf Minuten. Dieser Vorgang führt zur Lyse des Hirnmaterials, zur Denaturierung der Proteine und somit zur Inaktivierung von RNAsen oder anderen Enzymen. Zu dem nun entstandenen Gemisch wird 100 µl gDNA-Eliminator gegeben und für 15 Sekunden auf einem Vortexer bei 2000 rpm geschüttelt. Dieser Vorgang wird nach Zugabe von 180 µl Chloroform wiederholt. Es folgt eine erneute dreiminütige Inkubation bei RT. Durch eine Zentrifugation für 15 Minuten bei 4 °C und 12.000 x g-Kraft (g) lässt sich das Gemisch in drei unterschiedliche Phasen, von oben nach unten, aufteilen: Eine wässrige Phase, in der die gewünschte RNA enthalten ist, eine milchig-trübe mit enthaltener DNA und eine rötliche Phase. In dieser setzen sich die Proteine ab. Die oberen zur wässrigen Phase gehörenden ca. 600 µl werden mithilfe einer Pipette zu weiteren 600 µl 70%igem Ethanol gegeben, kurz gemischt und dann in eine Minispinsäule (*engl. mini spin column*) transferiert. Diese Spinsäule besitzt eine RNA-selektive Silikatmembran. Durch das Zentrifugieren für 15 Sekunden mit 8000 x g bei RT bindet die RNA an die Membran und die überschüssige Flüssigkeit setzt sich am Boden des Gefäßes ab. Dieser Durchlauf wird verworfen. Für die weitere Aufbereitung der RNA folgen zwei weitere Waschschrte mit 700 µl RWT-Puffer und 500 µl RPE-Puffer. Beide Waschungen werden jeweils für 15 Sekunden mit 8000 x g bei RT zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Zur Elimination möglicher Puffer- und/oder Ethanolreste wird nochmals 500 µl RPE-Puffer hinzugegeben, nun aber für zwei Minuten bei 8000 x g bei RT zentrifugiert. Nachdem die Minispinsäulen in neue Tubes gestellt worden sind, erfolgt eine letzte Zentrifugation bei maximaler Zentrifugalkraft von 13.000 x g für eine Minute bei RT. Abschließend wird 30 µl destilliertes, RNase-freies Wasser auf die Silikatmembran pipettiert und nochmals für eine Minute mit 8000 x g bei RT zentrifugiert, was zur Elution der RNA aus der Membran führt. Die Lagerung der RNA-haltigen Lösung erfolgt wieder bei -80 °C.

Die RNA-Konzentration (c_{RNA}) sowie den RNA-Reinheitsgrad in der Lösung wird photometrisch bestimmt. Die optische Dichte (OD) wird bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm gemessen. Diese beiden Wellenlängen entsprechen den Absorptionsmaxima von Aminosäuren (260 nm) und Proteinen (280 nm). Zunächst muss hierfür ein Nullabgleich mit RNase-freiem Wasser erfolgen. Anschließend kann ein μl der RNA-Lösung auf das Photometer aufgetragen werden und so deren Konzentration bestimmt werden. Der Reinheitsgrad der Lösung lässt sich zum einen durch Bildung des Quotienten der OD von Aminosäuren und Proteinen und zum anderen durch Bildung des Quotienten der OD von Aminosäuren und dem Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 230 nm. Dies entspricht der OD von Salzen, Trizol und anderen organischen Verbindungen, die bei der Elution der RNA verwendet werden (227). Somit ergeben sich folgende Formeln:

$$\text{Reinheitsgrad} = \frac{OD(260)}{OD(280)}$$

$$\frac{OD(260)}{OD(230)} > 1,8$$

Reinheitsgrad-Werte zwischen 1,8 und 2,1 weisen auf eine geringe Kontamination durch Proteine hin und können weiterverwendet werden. Des Weiteren ist es erwünscht, dass der Wert des Quotienten der OD (260) und OD (230) oberhalb von 1,8 liegt, da geringere Werte auf eine signifikante Präsenz von organischen Verunreinigungen hinweisen. Diese Verunreinigungen können dazu führen, dass die später durchzuführende qRT-PCR in ihrer Effizienz gemindert wird (227).

Außerdem kann durch Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes die RNA-Konzentration in einer Lösung bestimmt werden. Wenn bei einer OD (260) der Wert 1,0 gemessen wird, entspricht dies einer RNA-Konzentration von $40 \mu\text{g} / \mu\text{l}$. Somit kann die c_{RNA} eines Eluats mit folgender Formel bestimmt werden:

$$c(\text{RNA}) = OD(260) \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40 \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

4.3.2.2 Komplementäre-DNA-Synthese

Bevor eine PCR durchgeführt werden kann, muss die hergestellte mRNA in DNA umgeschrieben werden, da ein Nachweis von mRNA durch eine PCR nicht möglich ist. Dieser Prozess erfolgt mithilfe eines Enzyms, der reversen Transkriptase. Dieses Enzym ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die RNA in DNA umschreibt und so entgegengesetzt des klassischen Synthese-Weges arbeitet.

Das Erstellen von sogenannter cDNA erfolgt mithilfe des QuantiTect Reverse Transcription Kit von Qiagen. Alle Teilschritte orientieren sich an den Herstellerangaben. Außerdem muss darauf geachtet werden, dass kein frühzeitiger RNA-Abbau stattfindet, weswegen ausschließlich auf Eis gearbeitet wird.

Im ersten Schritt müssen mögliche Reste genomischer DNA (gDNA) eliminiert werden. Dazu werden 2 µl eines gDNA Wipeout-Buffers genutzt, der zusammen mit 1 µg der extrahierten RNA in ein beschriftetes Tube gegeben und bis zu einem Gesamtvolumen von 14 µl mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt wird. Nach einer kurzen Zentrifugation müssen die Proben für acht Minuten bei 42 °C inkubiert werden. Um im zweiten Schritt die reverse Transkription zu starten, muss zuerst ein Mastermix, bestehend aus 1 µl Quantiscript RTranskriptase, 4 µl Quantiscript RT-Buffer und 1 µl RT-Primermix, hergestellt und zu der gDNA-freien RNA-Lösung hinzugegeben werden.

Im Anschluss erfolgt zuerst eine Inkubation für 30 Minuten bei 42 °C und danach eine erneute Erwärmung der Lösung für drei Minuten auf 95 °C. Dies dient zur Inaktivierung der zuvor hinzugegebenen reversen Transkriptase. Somit führt das Erhitzen zum Stopp der cDNA-Synthese. Bevor die Probe bei -80 °C gelagert wird, muss noch eine Verdünnung im Verhältnis 1 : 1 mit RNase-freiem Wasser erfolgen.

4.3.2.3 Polymerase-Kettenreaktion

Seit in den 90er Jahren erstmals die PCR von Kary Mullis entwickelt worden ist (228), ist sie die Methode der Wahl zur Vervielfältigung von spezifischen DNA-Sequenzen, wobei die Ausgangs-DNA in der Regel nur in sehr kleinen Mengen vorliegt. Das Prinzip der PCR beruht auf einer zyklenbasierten Vervielfältigung eines zwingend bekannten DNA-Abschnittes zwischen zwei sogenannten Primern (bestehend aus Oligonukleotiden, ca. 20 - 30 Nukleotideinheiten), wobei jedes neu synthetisierte DNA-Amplifikat als Vorlage für eine weitere komplementäre DNA-Kopie dient. Essenziell für die Durchführung einer PCR ist eine

thermostabile Polymerase wie z.B. Taq (aus dem *Bakterium Thermus aquaticus*) oder Pfu (aus dem *Bakterium Pyrococcus furiosus*) und zwei sequenzspezifische Oligonukleotid-Primer, durch deren Auswahl die Expression unterschiedlicher Gene untersucht werden kann. Eine normale PCR umfasst ca. 20 bis 50 Wiederholungen.

Ein Zyklus wird in drei Abschnitte eingeteilt: Denaturierung, Annealing (Hybridisierung) und Elongation (DNA-Synthese). Während der Denaturierung wird das Gemisch aus hitzestabiler DNA-Polymerase, den Primern, der DNA-Vorlage, Desoxyribonukleotiden (dNTPs), einer Pufferlösung und $MgCl_2$ auf ca. 95 °C erhitzt. Dies führt zur Auflösung der Wasserstoffbrückenbindungen (WBB) zwischen der doppelsträngigen zu amplifizierenden DNA-Sequenz. Das Annealing kann auch als Hybridisierung der Primer bezeichnet werden. Hier lagern sich die Primer entsprechend ihres komplementären Bereichs an den DNA-Einzelsträngen an. Die erforderliche Annealing-Temperatur liegt in der Regel zwischen 40 und 70 °C, ist aber stark abhängig von der Sequenz der Oligonukleotid-Primer. Je mehr Basenpaarungen von Guanin mit Cytosin vorliegen, desto höher liegt das Temperaturoptimum für die Hybridisierung der Primer. Dies ist durch den höheren Gehalt an WBB zu erklären. Das heißt für jedes Primerpaar herrschen unterschiedliche optimale Temperaturbedingungen. Der letzte Schritt, die Elongation, benötigt wiederum eine höhere Temperatur von ca. 70 – 72 °C, da die DNA-Polymerasen aus thermophilen Bakterien stammen und von Natur aus höhere Temperaturen gewöhnt sind. Bei Erreichen der optimalen Temperatur im Thermocycler bindet die DNA-Polymerase an das 3'-Ende des Primers und verlängert diesen mithilfe der dNTPs dATP, dGTP, dCTP und dTTP. Nachdem durch Verlängerung neue DNA-Doppelstränge entstanden sind, schließt sich ein weiterer Zyklus an. So kann eine exponentielle Vermehrung 2^n , wobei n hier für die Anzahl an Wiederholungen steht, erreicht werden (229).

4.3.2.3.1 Quantitative Polymerasekettenreaktion

Die quantitative real-time-PCR (qRT-PCR) wurde als Ergänzung der zuvor beschriebenen PCR entwickelt (230). Diese Methode ermöglicht es, die Kopienanzahl der zu amplifizierenden DNA in Echtzeit zu messen und somit die Genexpression bestimmter Proteine zu untersuchen. Hierzu werden fluoreszierende Sonden und Farbstoffe in Verbindung mit genspezifischen Primern genutzt, die mit Hilfe des LightCyclers® 480 Systems und der LightCycler® 480 Software detektiert werden können. Als Farbstoff kommt das mit doppelsträngiger DNA interagierende SYBR-Green zum Einsatz. Durch das Interkalieren von SYBR-Green in die dsDNA, wird der Farbstoff weniger mobil und durch zusätzliche

Lichtanregung fluoreszierend. Hierdurch wird jedes neu entstehende dsDNA-Fragment detektiert. Der Punkt, an dem das Fluoreszenzsignal der DNA über eine sogenannte Schwellenwertlinie (Threshold) ansteigt, das heißt messbar bzw. detektierbar wird, wird als Crossing-Point (CP) oder C_t -Wert bezeichnet. Die durch die Software dargestellte logarithmische Kurve wird durch das Auftragen des Fluoreszenzsignals gegen die Anzahl an PCR-Zyklen erstellt.

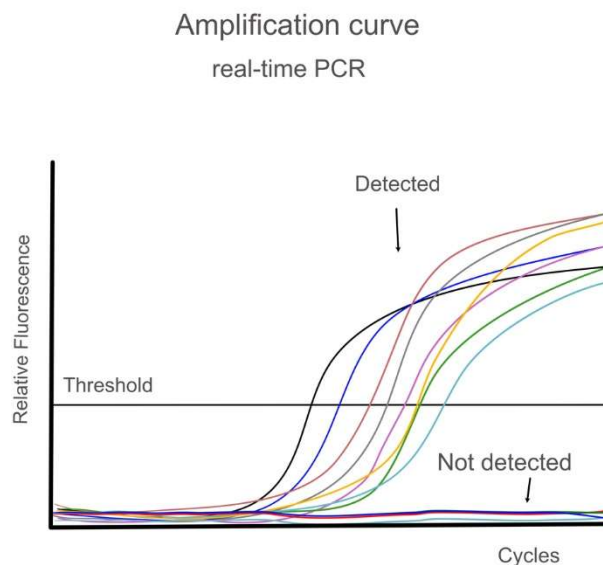


Abbildung 19: Exemplarische Amplifikationskurven einer qPCR

Gezeigt wird der gemessene Anstieg des Fluoreszenzsignals mit steigender Anzahl der Zyklen der qPCR. Der CP signalisiert den Umschlag der langsamen Anfangsphase zur schnell verlaufenden Log-Phase und ist derjenige Punkt, an dem die Kurven den Threshold kreuzen. Er ist ein relatives Maß für die Konzentration des Ziels der PCR-Reaktion.

In der Anfangsphase (Baseline) existierten noch wenige Exemplare der nachzuweisenden cDNA, somit auch wenig Material, das als Matrize für die Polymerasen dienen kann. Das heißt die Wahrscheinlichkeit ist sehr gering, dass sich einzelne Templates, Polymerasen und Primer treffen. Deshalb verläuft die Kurve während dieser Zeit flach, bevor in der mittleren Phase der CP erreicht wird und es zu einem schnelleren, exponentiellen Anstieg der Templates kommt. In der Plateauphase hat die Reaktion bereits ihr Arbeitsoptimum überschritten und es liegt nicht mehr genug freies Enzym vor, um die Amplifikation fortzusetzen. Die maximale Ausbeute ist erreicht und es wird ein konstant hohes Fluoreszenzsignal gemessen.

Außerdem wird eine Standardkurve mit bekannter DNA-Konzentration durch das Anfertigen einer Verdünnungsreihe ermittelt. Mithilfe der Standardkurve lassen sich Rückschlüsse auf die cDNA-Konzentration der Proben ziehen. Zusätzlich wird unter Verwendung eines

Referenzgens Peptidylpropyl Isomerase A (PPIA, auch Cyclophilin A) eine relative Quantifizierung ermöglicht. PPIA wird in Folge eines CCI in seiner Expression sehr wenig bis gar nicht verändert (231), weswegen es sich als Referenz zu den zu untersuchenden Genen eignet. Es gilt also als konstant und wird unabhängig von der Intervention exprimiert. Im Zusammenspiel mit den zuvor ausgewählten spezifischen Primern der Gene Mrc1, IL-6, CD68 und GFAP, lässt sich so deren mRNA-Expression im Schadensareal des Cortex feststellen. Jede Probe wird anhand des Pipettierschemas (*Tabelle VI*) in zweifacher Ausfertigung in eine 96-well-Platte transferiert. Zusätzlich zu dem Probenansatz in dieser, wird auch eine Positiv- und Negativkontrolle (H₂O) mitangesetzt. Im Anschluss folgt eine kurze Zentrifugation, bevor die Messung im LightCyclers® 480 starten kann.

Tabelle VI: Pipettierschema für qPCR

SYBR-Green	Hybridisierungssonde
5 µl	5 µl Kit-spez. Mastermix
0,25 µl Primer F	0,25 µl Primer F
0,25 µl Primer R	0,25 µl Primer R
4,5 µl H ₂ O	0,5 µl FL-Sonde
1 µl Target DNA	0,5 µl Cy5-Sonde
	3,5 µl H ₂ O
	1 µl Target DNA

4.3.2.4 Proteinanalyse

Proteinextraktion

Um eine Analyse, der in den Trimmschnitten des Schadensareals enthaltenen Proteine durchführen zu können, müssen diese zuerst aus dem Gewebematerial isoliert werden. Hierzu wird der Radio-Immunpräzipitationsassay-Puffer (RIPA-Puffer) genutzt. Der Puffer enthält ionische (*engl. sodium dodecyl sulfat*, SDS), als auch nicht-ionische Anteile. Die Detergenzien führen zur Zellyse und so zur Freisetzung der Membran-gebundenen und auch zytoplasmatischen Proteine (232). Darüber hinaus werden dem RIPA-Puffer Phosphatase- und Proteaseinhibitoren hinzugefügt, die den enzymatischen Abbau der Proteine, während

der Zellyse, verhindern sollen. Zunächst werden die Trimmschnitte in ein gekühltes Eppendorfggefäß überführt und gewogen. Entsprechend des Gewichts der jeweiligen Trimmschnitte wird der RIPA-Puffer hinzugegeben, das Gefäß in Trockeneis gestellt und für insgesamt 40 Minuten in der Box inkubiert. Alle zehn Minuten wird jedes Röhrchen über einen Eppendorfggefäß-Ständer geratscht, um eine Durchmischung der Proben zu gewährleisten. Dieser Vorgang wird dreimal wiederholt. Nach Ablauf der Inkubationszeit folgt eine Zentrifugation für 20 Minuten mit 14.000 x g bei 4 °C. Der gebildete Überstand enthält die extrahierten Proteine. Für spätere Wiederverwendung wird der Überstand in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt und bei -80 °C gelagert.

Konzentrationsbestimmung nach Lowry

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wird nach der im Jahre 1951 von O. H. Lowry beschriebenen Methode (233) durchgeführt. Genutzt wird das Detergens kompatible (*engl. detergent compatible*, DC) Protein Assay Kit der Firma BIO-RAD und deren Microplate-Assay-Protokoll

Zur photometrischen Konzentrationsbestimmung wird der hochkonzentrierte Proteinüberstand von zuvor im Verhältnis 1:10 verdünnt. Es werden jeweils 5 µl der Proteinlösung mit 45 µl PBS in ein neues Eppendorfggefäß pipettiert. Hiervon werden von jedem Probenlysat zweimal 5 µl in eine 96-well-Platte transferiert. Zusätzlich wird mit dem gleichen Volumen eine Standardreihe mit acht definierten Proteinkonzentrationen (0; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 µg / µl) in zweifacher Ausfertigung ergänzt. Im nächsten Schritt werden 25 µl eines Mixes aus 49 Teilen Reagenz A zu einem Teil Reagenz S zu jeder Probe hinzugegeben. Reagenz S überführt Reagenz A in einen aktiven Zustand. Außerdem werden weitere 200 µl Reagenz B in jede Vertiefung mit Ansatz pipettiert. Es folgt eine Inkubation für zwölf Minuten bei RT in einem abgedunkelten Bereich. Die OD kann am Photometer bei 750 nm bestimmt und mit Hilfe der erstellten Standardkurve die Proteinkonzentrationen im Ansatz berechnet werden.

4.3.2.4.1 Immunglobulin G Dot-Blot

Der Nachweis von Proteinen durch einen Dot-Blot bedarf, wie bei einem Western Blot, der Nutzung von Antikörpern (234). Während ein Western Blot dafür eine Elektrophorese benötigt, kann mithilfe des Dot-Blots das Protein direkt auf dem Trägermaterial nachgewiesen werden

(235). In dieser Studie soll Immunglobulin G (IgG) im Hirngewebe nachgewiesen werden. Zur Detektion wird ein fluoreszierender sekundärer AK verwendet, wodurch sich die Proteine quantitativ analysieren lassen. Zunächst wird jede Probe des Proteinlysats mit Zugabe von PBS auf eine Gesamtkonzentration von $4 \mu\text{g} / \mu\text{l}$ ergänzt. Nach kurzem Vortexen auf dem Reagenzglasschüttler wird von dieser Suspension $2,5 \mu\text{l}$ ($\approx 10 \mu\text{g}$ Protein) auf eine Nitrocellulose-Membran in vorgezeichnete Kreise aufgetragen. Als Negativkontrolle werden zwei Felder mit $2 \mu\text{l}$ RIPA-Puffer betropft. Es folgt eine Trocknungsperiode von 45 Minuten bei RT. Damit unspezifische Bindungsstellen für den genutzten AK blockiert werden, folgt auf einen Plattformschüttler eine 60-minütige Inkubation bei RT mit einem 2,5%igen Gemisch aus Magermilch (MM) und Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan (TRIS)-buffered saline (TBS) (s. 3.5.1 *Puffer und Lösungen*). Nun wird die Suspension, das den mit IRDye® 680-konjugierten sekundären AK Goat-anti-mouse-IgG 680 enthält, hinzugegeben und in einem abgedunkelten Raum erneut auf dem Schüttler für 60 Minuten bei RT inkubiert. Die Suspension wird im Verhältnis ein Teil sekundärer AK zu 15.000 Teilen 2,5%iges Gemisch aus MM / TBS hergestellt. Der letzte Schritt besteht aus dreimaligem Waschen für jeweils fünf Minuten mit TBST (TBS + Tween®20). Im Anschluss kann mithilfe der Nahinfrarotfluoreszenzdetektion des LI-COR Odyssey 9260 Fluorescence Imagers die Auswertung der Dot-Blots beginnen.

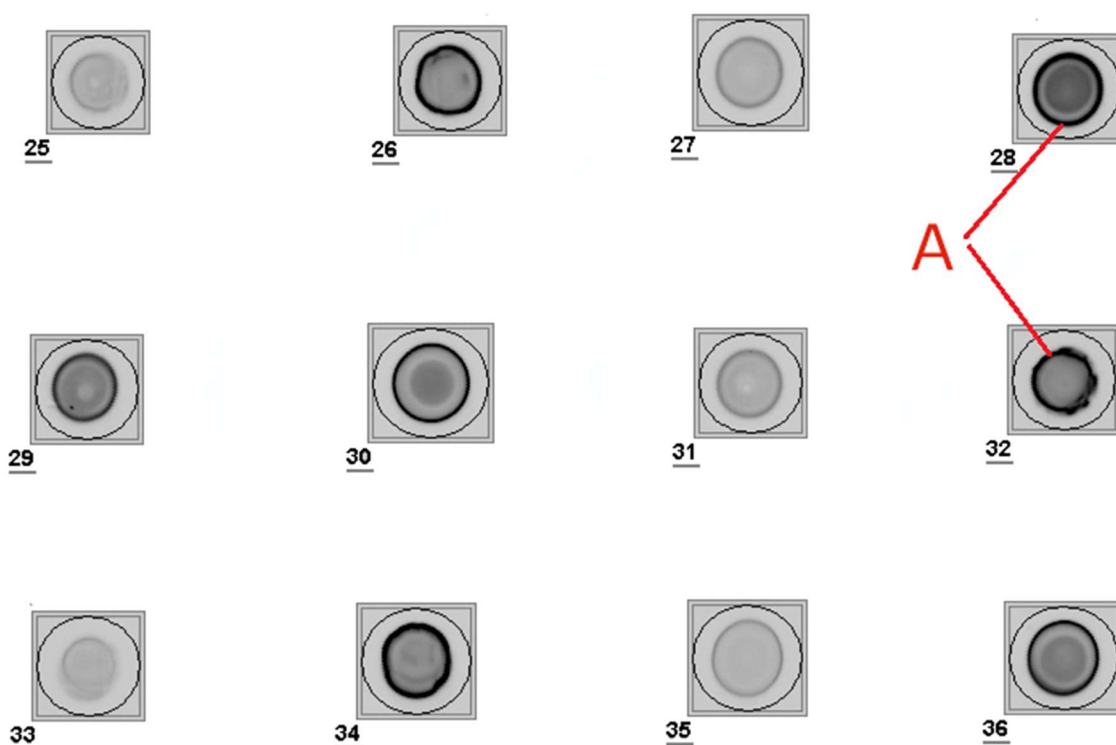


Abbildung 20: Exemplarische Darstellung eines Dot-Blots auf Nitrocellulose-Membran

Zu sehen sind hier insg. zwölf Dot-Blots von jeweils verschiedenem Hirnmateriale von Mäusen. Durch Nahinfrarotfluoreszenz können die gebundenen sekundären Antikörper nachgewiesen werden. Je intensiver die Graustufe (A) bei den einzelnen Blots, desto höher die Konzentration an sekundärem Antikörper bzw. IgG.

4.3.3 Statistik

Die Dokumentation der Rohdaten erfolgt in Microsoft Excel, die folgende Auswertung und grafische Darstellung in GraphPad Prism 10.3.1. Das Betriebssystem ist Windows 11.

Die auszuwertenden und darzustellenden Daten entstammen der Gruppen Sham/Veh (n = 6), CCI/Veh (n = 10), Sham/LPS 24h (n = 6), CCI/LPS 24h (n = 10), Sham/LPS 72h (n = 6) und CCI/LPS 72h (n = 10). Bevor die Analyse der Daten stattfindet, werden diese, sofern möglich, auf Normalität überprüft. Das bedeutet, der jeweilige Datensatz wird darauf überprüft, ob dieser einer Gauß'schen Normalverteilung folgt oder nicht. Die Normalitätsprüfung erfolgt durch D'Agostino- und Person-, Anderson-Darling-, Shapiro-Wilk- und Kolmogorov-Smirnov-Test. Wenn die Mehrheit dieser Tests eine Normalverteilung bestätigt, dann werden die Daten auf Ausreißer bzw. potenziell nicht normalverteilte Werte mittels ROUT- (Q = 1%) oder Grubbs' ($\alpha = 0,05$) Methode geprüft. Finden sich hier solche, werden diese Werte von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Das Signifikanzniveau wird auf kleiner als fünf Prozent (p -Wert $< 0,05$) festgelegt. Zur Analyse wird für normalverteilte Datensätze die ein- oder zweifaktorielle Varianzanalyse (*engl. one-way or two-way analysis of variance*, ANOVA) mit Korrektur des Signifikanzniveaus nach Holm-Šídák durchgeführt. Two-way-ANOVA wird zum Vergleich mehrerer Gruppen zu verschiedenen Zeitpunkten genutzt. Sollten die Datensätze nicht normalverteilt sein, wird der Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's-Korrektur angewendet. Darstellung der Daten erfolgt grundsätzlich als Säulendiagramm unter Angabe der Mittelwerte (MW) plus / minus (\pm) Standardfehler (SEM). Wenn nicht anders angegeben, werden folgende Signifikanzniveaus berücksichtigt und dargestellt: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$.

5 Ergebnisse

5.1 Verhaltensbiologische Untersuchungen

5.1.1 NSS – LPS-Inhalation zeigt keinen Einfluss auf das neuromotorische Defizit nach CCI oder Sham

Die Ergebnisse des NSS geben über die neuromotorischen Fähigkeiten und deren Defizit Aufschluss. Die graphische Darstellung umfasst die erhobenen Daten der Untersuchungen zu den Zeitpunkten präoperativ (prä-op) erster postoperativer Tag (d1), dritter postoperativer Tag (d3), fünfter postoperativer (d5) und siebter postoperativer Tag (d7). Die maximal zu erreichende Gesamtpunktzahl beziffert sich auf 13 Punkte. Bei null erreichten Punkten, hat ein Tier keinerlei neurologischen Beeinträchtigungen nach dem NSS.

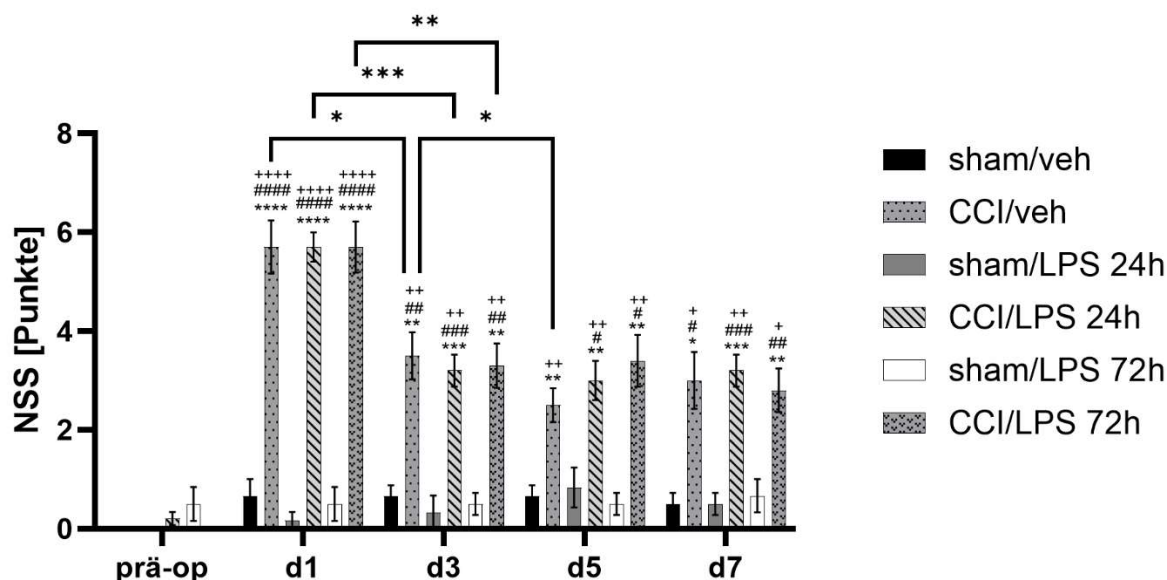


Abbildung 21: Ergebnisse des Neurological Severity Scores

Ein CCI hat einen Einfluss auf die neuromotorische Beeinträchtigung der Versuchstiere. Die nachfolgende Inhalation von LPS hat dagegen keinen Einfluss darauf. Das hier dargestellte Säulendiagramm zeigt die Punktzahl des NSS zu verschiedenen Zeitpunkten nach CCI und Inhalation mit LPS: prä-op., 24 h (d1), 72h (d3), 120 h (d5) und 168 h (d7). CCI-Mäuse zeigen einen signifikant erhöhten NSS im Vergleich zu Sham-Tieren über den gesamten Beobachtungszeitraum. Es kann eine Erholung der Versuchstiere mit CCI von d1 zu d3 beobachtet werden. Daneben erholen sich die CCI-Mäuse der Gruppe ohne LPS-Inhalation von d3 auf d5 weiter, wohingegen die Gruppen mit LPS-Inhalation dies nicht zeigen. Diese Beobachtung ist jedoch nicht konstant, da die vermeintliche Erholung nicht bis zum Ende des Beobachtungszeitraums anhält. Die Darstellung der gemessenen Parameter erfolgt als MW \pm SEM; p-Werte werden durch Two-way-ANOVA, gefolgt von Holm-Šidák multiple comparisons test, kalkuliert (* = signifikant zu Sham/Veh; # = signifikant zu Sham/LPS 24h; + = signifikant zu Sham/LPS 72h).

5.1.1.1 NSS nach 24 Stunden

Die prä-op Beurteilung der Versuchstiere zeigt wie erwartet im Gruppenvergleich keine statistisch signifikante neuromotorische Beeinträchtigung. Nach der Operation ist ein signifikanter Anstieg des NSS in den CCI-Gruppen (CCI/Veh $5,7 \pm 0,54$ Punkte; CCI/LPS 24h $5,7 \pm 0,3$ Punkte; CCI/LPS 72h $5,7 \pm 0,52$ Punkte) im Vergleich zu den Scheinoperationen (Sham/Veh $0,67 \pm 0,33$ Punkten, Sham/LPS 24h $0,17 \pm 0,17$ Punkte; Sham/LPS 72h $0,5 \pm 0,34$ Punkte) zu verzeichnen. Das neurologische Defizit ist bei den Versuchstieren deutlich zu sehen.

5.1.1.2 NSS nach 72 Stunden

In den CCI-Gruppen kann an d3 eine signifikante Abnahme des NSS und damit eine Verbesserung ihres Zustandes beobachtet werden (CCI/Veh $3,5 \pm 0,48$ Punkte; CCI/LPS 24h $3,2 \pm 0,33$ Punkte; CCI/LPS 72h $3,3 \pm 0,45$ Punkte). Die Mittelwerte der Sham-Gruppen bleiben hier auf konstant niedrigem Niveau (Sham/Veh $0,67 \pm 0,21$ Punkte; Sham/LPS 24h $0,33 \pm 0,33$ Punkte; Sham/LPS 72h $0,5 \pm 0,24$ Punkte). Das CCI bleibt weiterhin als signifikanter Einfluss gegenüber der Sham-OP über die gesamte Zeit bestehen.

5.1.1.3 NSS über den gesamten Beobachtungszeitraum

Zusammenfassend zeigt die Auswertung des NSS über den gesamten Beobachtungszeitraum, dass ein CCI eine signifikante neuromotorische Beeinträchtigung bei den Versuchstieren verursacht. Eine LPS-Inhalation hat keinen signifikanten Einfluss auf das durch das Trauma hervorgerufenes Defizit. Alle CCI-Gruppen weisen im Vergleich zu Sham zu allen untersuchten Zeitpunkten (d1, d3, d5 und d7) signifikant erhöhte NSS-Werte auf. Gleichzeitig ist eine Erholung aller CCI-Tiere vom ersten Tag nach dem Trauma auf die darauffolgenden zu beobachten. Wobei es scheint, dass eine posttraumatische LPS-Exposition den Verlauf der Erholung negativ beeinflusst. Dabei spielt es keine Rolle zu welchem Zeitpunkt (24 oder 72 Stunden posttraumatisch) die LPS-Exposition stattfindet.

5.1.2 Rota-Rod – CCI verkürzt die Laufzeit; eine nachfolgende LPS-Inhalation hat keinen Einfluss auf die Leistung im Rota-Rod Test

Die Ergebnisse des Rota-Rod können zur Beurteilung der Koordination, Motorik und motorischen Lernfähigkeit genutzt werden (211). Dabei gilt: je länger ein Versuchstier es schafft auf dem Rota Rod zu bleiben, desto besser wird seine motorische Koordination sein. Die Grafik zeigt die Latenz bis zum Herunterfallen der Mäuse an den verschiedenen Untersuchungstagen prä-op., d1, d3, d5 und d7. Insgesamt zeigen die Versuchsgruppen mit einem CCI eine verkürzte Verweildauer auf dem sich drehenden Steg (CCI/Veh $30,8 \pm 5,98$ s; CCI/LPS 24h $32,2 \pm 2,57$ s; CCI/LPS 72h $29,0 \pm 2,47$ s) im Vergleich zu den Sham-Gruppen (Sham/Veh $52,27 \pm 7,51$ s; Sham/LPS 24h $51,3 \pm 4,43$ s; Sham/LPS 72h $58,5 \pm 5,4$ s) an d1. Die Gruppe CCI/LPS 72h hat dabei als einzige eine signifikant kürzere Laufzeit gegenüber Sham/LPS 72h ($p < 0,05$), wobei beachtet werden muss, dass die LPS-Applikation zum Zeitpunkt d1 noch nicht erfolgt ist. CCI/Veh und CCI/LPS 24h zeigen lediglich einen statistischen Trend gegenüber ihrer Sham-Gruppe ($p = 0,28$ bzw. $p = 0,057$). Der Vergleich der CCI-Gruppen prä-op mit d1, zeigt bis auf eine signifikant kürzere Laufzeit der Mäuse in CCI/LPS 72h (prä-op $52,4 \pm 1,96$ s vs. d1 $29,0 \pm 2,44$ s; $p < 0,001$), keine signifikante Verkürzung der Laufzeit. Ausgehend von d1, zeigen die Versuchsgruppen mit CCI eine Erholung über die sieben Tage. Die Gruppe CCI/Veh kann von d3 auf d5 und d7 eine signifikante Zunahme der Laufzeit verbuchen (d3 $28,5 \pm 3,73$ s vs. d5 $42,6 \pm 3,1$ s; $p < 0,01$ bzw. d7 $45,6 \pm 4,06$ s; $p < 0,05$). Die Gruppe CCI/LPS 24h kann sich komplett erholen (d1 $32,2 \pm 2,57$ s vs. d7 $2,8 \pm 4,89$ s; $p < 0,001$). Auch die Laufzeiten der Gruppe CCI/LPS 72h können sich im statistischen Trend erholen (d1 $29,0 \pm 2,44$ s vs. d7 $41,2 \pm 3,59$ s; $p = 0,0503$), bleiben aber im Vergleich zu den Laufzeiten vor der Operation im statistischen Trend reduziert (prä-op $52,4 \pm 1,96$ s vs. d7 $41,2 \pm 3,59$ s; $p = 0,097$).

Zusammenfassend zeigt sich, dass die alleinige Inhalation mit LPS keinen Unterschied in der Latenz bis zum Herunterfallen der Mäuse verursacht. Ein CCI hingegen verschlechtert die Laufzeiten, wobei eine Erholung über die Zeit zu beobachten ist. Die Kombination aus vorangegangenem CCI und postoperativer LPS-Exposition nach 72 Stunden führt zu einer im statistischen Trend eingeschränkten Erholung gegenüber den präoperativen Laufzeiten.

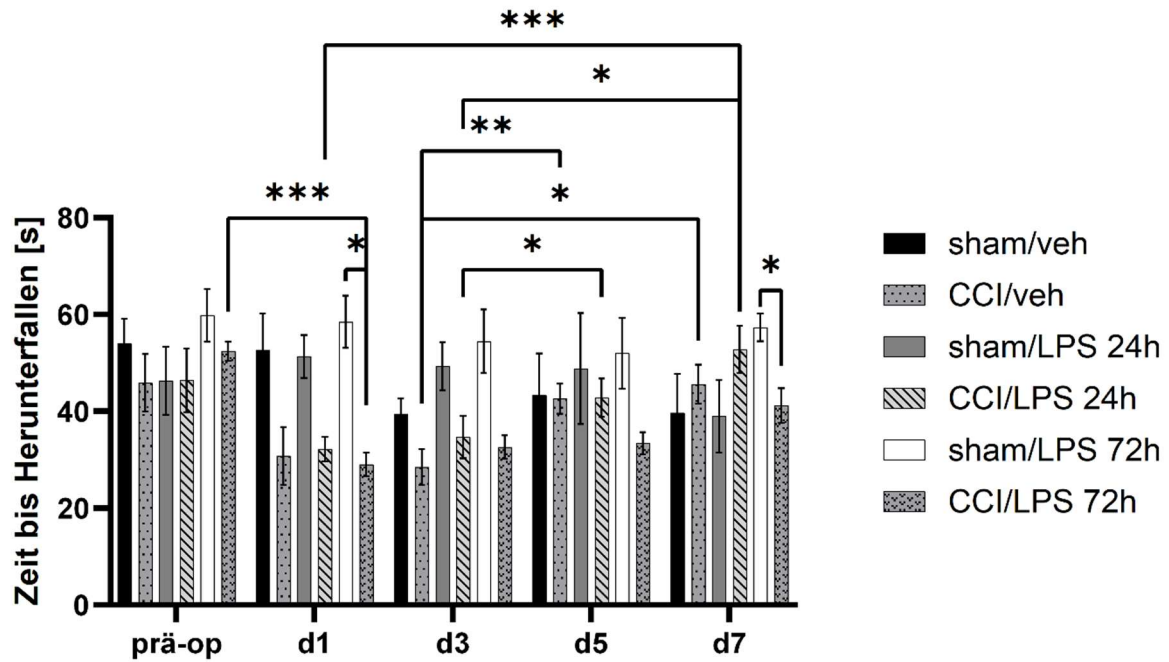


Abbildung 22: Ergebnisse des Rota-Rod

Ein CCI scheint die motorische Koordination der Nager zu verschlechtern. Im Vergleich zu den Sham-Operationen sind diese Beobachtungen außer bei CCI/LPS 72h gegenüber Sham/LPS 72h nicht signifikant. LPS-Inhalation führt zu keiner Beeinträchtigung im Durchführen der Untersuchung. Das hier dargestellte Diagramm zeigt die Latenz bis zum Herunterfallen der Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten nach CCI und Inhalation mit LPS: prä-op., d1, d3, d5 und d7. In den CCI-Gruppen (CCI/Veh und CCI/LPS 24 h) ist ausgehend von d1 eine signifikante Verbesserung der Ergebnisse über den Beobachtungszeitraum bis d7 zu sehen. Die Mäuse der Gruppe CCI/LPS 72h zeigen eine nahezu signifikante Erholung von d1 zu d7 ($p = 0,0503$), sind in ihrer Performance jedoch noch immer eingeschränkt im Vergleich prä-op zu d7 ($p = 0,097$). Die Darstellung der gemessenen Parameter erfolgt als $MW \pm SEM$; p-Werte werden durch Two-way-ANOVA, gefolgt von Holm-Šidák multiple comparisons test, kalkuliert.

5.1.3 OFT – CCI und LPS-Inhalation zeigen keinen signifikanten Einfluss auf das Angstverhalten der Versuchstiere

Der OFT dient zur Identifikation möglicher Störungen oder Fehlfunktionen des Angstverhaltens und lokomotorischer Aktivität bei Nagern. In der hier durchgeführten Studie wird der OFT im Anschluss an NSS und RR an den Tagen prä-op, d1, d3, d5 und d7 durchgeführt. Die Versuchstiere zeigen ein normales ängstliches Verhalten, in dem sie im Durchschnitt über 150 Sekunden des insgesamt 180 Sekunden andauernden Untersuchungszeitraums in den Randzonen der Untersuchungsbox verbringen (Abb. **18C**). Diese Beobachtung ist in allen Untersuchungsgruppen gleich. Ein Einfluss durch CCI und / oder nachfolgender LPS-Exposition auf das Angstverhalten kann hier nicht beobachtet werden. Die zurückgelegte Distanz (Abb. **18A**) und die mittlere Geschwindigkeit (Abb. **18B**) scheinen beide an d3 in allen Gruppen am niedrigsten zu sein. Wobei es nach dem dritten Tag so aussieht, als ob die Mäuse bis zu d7 eine leicht erhöhte Lokomotion zeigen. Dies gilt auch für die Sham/Veh-Gruppe. Interessanterweise führt die Normalisierung der Daten der Geschwindigkeit zur jeweiligen Sham-Gruppe (Abb. **18D**) zu einem signifikanten Mobilitätsanstieg der CCI/Veh-Gruppe von d1 auf d3 ($0,93 \pm 0,1$ vs. $1,49 \pm 0,049$). Außerdem kann an diesem Tag eine signifikant höhere Geschwindigkeit der Mäuse aus CCI/Veh gegenüber denen, die nach 72h eine LPS-Behandlung erhalten haben, festgestellt werden ($1,49 \pm 0,049$ vs. $0,92 \pm 0,069$). Bei den Versuchstieren, die ein CCI und eine LPS-Inhalation nach 72h erhalten, kann darüber hinaus eine signifikante Erhöhung der Geschwindigkeit von d1 zu d5 und zu d7 beobachtet werden ($0,79 \pm 0,075$ vs. $1,24 \pm 0,13$ bzw. $1,34 \pm 0,094$). Die Normalisierung der Gesamtdistanz zu Sham (Abb. **18E**) zeigt dagegen, außer einer signifikanten Abnahme der Gesamtdistanz der CCI/Veh-Gruppe nach dem CCI ($1,16 \pm 0,026$ vs. $0,99 \pm 0,026$), keine neuen Erkenntnisse.

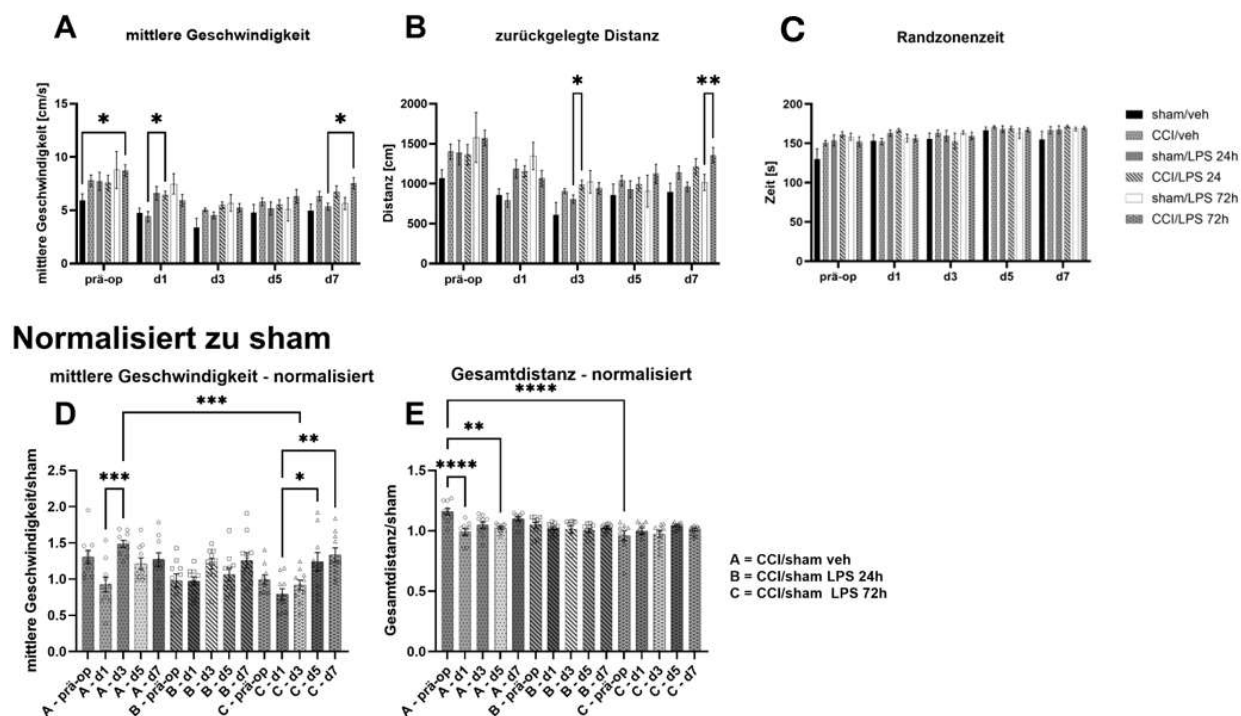


Abbildung 23: Ergebnisse des OFT

Sowohl ein singuläres CCI als auch die zusätzliche Inhalation mit LPS zeigen keinen Einfluss auf das Verhalten der Mäuse im OFT (C). (A) zeigt die mittlere Geschwindigkeit der Mäuse, wobei (B) die zurückgelegte Gesamtstrecke darstellt. Die mittlere Geschwindigkeit und die Gesamtstrecke sind an d3 am geringsten und steigen danach wieder an. Werden die Daten gegen die jeweilige Sham-Gruppe normalisiert, kann eine signifikante Zunahme der Geschwindigkeit (D) der CCI/Veh-Gruppe von d1 zu d3, als auch gegenüber CCI/LPS 72h an d3 gezeigt werden. Darüber hinaus kann ein stetiger Zuwachs der Geschwindigkeit von CCI/LPS 72h über den Beobachtungszeitraum bis zur Euthanasie beobachtet werden. (E) stellt die Gesamtdistanz normalisiert zu Sham dar. Die Säulendiagramme zeigen die erhobenen Werte an verschiedenen Untersuchungszeitpunkten: prä-op, d1, d3, d5 und d7. Die Normalisierung zu den Sham-Gruppen erfolgt durch Division der Werte der jeweiligen CCI-Gruppe mit dem MW der zugehörigen Sham-Gruppe. Diese Ergebnisse werden auf eine Normalverteilung mittels D'Agostino & Person, Anderson-Darling, Shapiro-Wilk und Kolmogorov-Smirnov Test überprüft und im Anschluss mit dem ROUT-Test ($Q = 1\%$) auf Ausreißer kontrolliert. Es werden drei Werte von (E) ausgeschlossen (jeweils einer aus CCI/Sham Veh d7, CCI/Sham LPS 24h d3, CCI/Sham LPS 72h d5). Die Darstellung aller gemessenen Parameter erfolgt als MW \pm SEM; p-Werte werden entweder durch Two-way-ANOVA (A bis C) oder One-way-ANOVA (D und E), gefolgt von Holm-Šídák multiple comparisons test, kalkuliert.

5.1.4 EPM – CCI und LPS-Inhalation nach 24 Stunden beeinträchtigen das Angstverhalten an Tag 6 postoperativ

Diese Verhaltensuntersuchung lässt Rückschlüsse auf eine Beeinträchtigung des natürlichen Angstverhaltens von Nagern zu. Gesunde Tiere werden aus Schutzgründen vermehrt die geschlossenen Arme explorieren. Also sprechen ein erhöhtes Aufkommen von Kopfsenkungen und lange Zeiten in den offenen Armen für eine Beeinträchtigung dieses Angstverhaltens. Veränderungen in der Geschwindigkeit und zurückgelegten Gesamtdistanz innerhalb der untersuchten fünf Minuten geben Rückschlüsse auf noch bestehende neurologische Defizite. Da der Effekt eines CCI in Verbindung mit LPS-Inhalation betrachtet werden soll und eine Inhalation mit LPS allein bereits eine relevante Veränderung im Verhalten der Tiere verursachen kann, werden zusätzlich die Daten zur jeweiligen Sham-Gruppe ins Verhältnis gesetzt. Die Untersuchung wird an d6 durchgeführt.

5.1.4.1 Distanz und Geschwindigkeit – CCI und LPS-Inhalation zeigen keinen Effekt

Die Versuchstiere zeigen sowohl in der zurückgelegten Gesamtdistanz (Abb. 19A) als auch in ihrer Geschwindigkeit (Abb. 19B) keine signifikanten Unterschiede in allen Gruppen. Auch eine Normalisierung zu Sham ändert daran nichts (Abb. 19C und 19D).

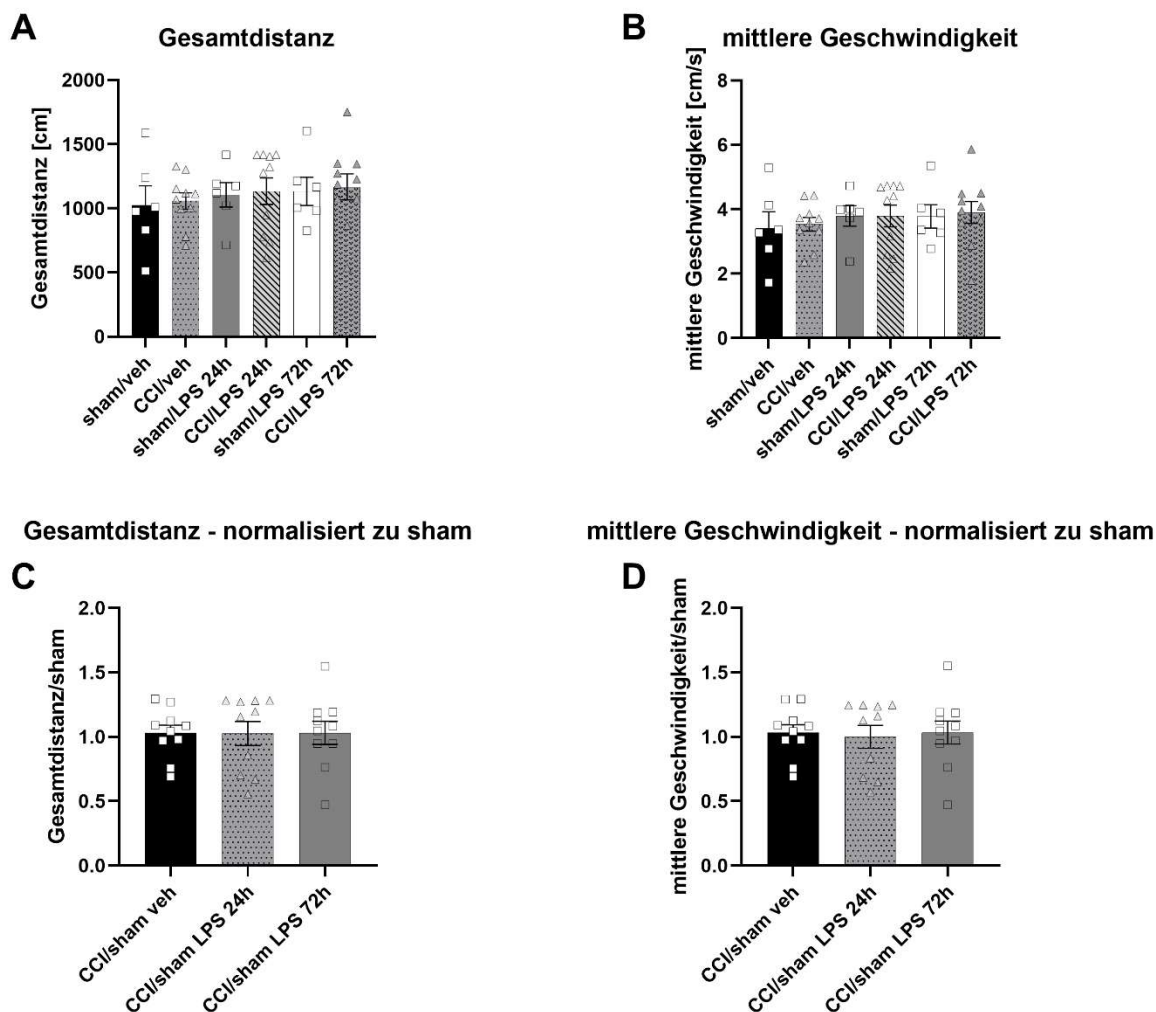


Abbildung 24: Ergebnisse des EPM an Tag 6 postoperativ - Gesamtdistanz und mittlere Geschwindigkeit

CCI und LPS-Inhalation führen zu keinen Änderungen in der zurückgelegten Gesamtdistanz und mittleren Geschwindigkeit. Die Säulendiagramme zeigen sowohl die Gesamtdistanz (A) und die normalisierten Werte (C), als auch die mittlere Geschwindigkeit (B) mit ihrer Normalisierung zu Sham (D). Die Normalisierung zu den Sham-Gruppen erfolgt durch Division der Werte der jeweiligen CCI-Gruppe mit dem MW der zugehörigen Sham-Gruppe. Alle Ergebnisse werden auf eine Normalverteilung mittels D'Agostino & Person, Anderson-Darling, Shapiro-Wilk und Kolmogorov-Smirnov Test überprüft und im Anschluss mit dem Grubbs-Test ($\alpha = 0,05$) auf Ausreißer kontrolliert. Es werden keine Werte ausgeschlossen. Die Darstellung der Parameter erfolgt als MW \pm SEM; p-Werte werden durch One-way-ANOVA, gefolgt von Holm-Šidák multiple comparisons test, kalkuliert.

5.1.4.2 Zeit in offenen Armen und Kopfsenkungen – CCI und LPS-Inhalation nach 24 Stunden beeinträchtigen das Angstverhalten an Tag 6 postoperativ

Die Versuchstiere dieser Arbeit zeigen sowohl in der verbrachten Zeit in den offenen Armen (Abb. **20A**), als auch in der Anzahl der Kopfsenkungen (Abb. **20B**) in allen Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Erwähnenswert ist trotzdem die Tendenz der Gruppe CCI/LPS 24h gegenüber CCI/Veh und CCI/LPS 72h, längere Zeit in den offenen Armen zu verbringen und vermehrt ihren Kopf zu senken (**A**: CCI/LPS 24h $84,93 \pm 19,95$ s vs. CCI/Veh $56,12 \pm 12,44$ s bzw. CCI/LPS 72h $42,91 \pm 11,02$ s; **B**: $52,3 \pm 9,79$ (24h) vs. $34,4 \pm 6,03$ (Veh.) bzw. $39,6 \pm 8,97$ (72h)). Durch Normalisierung der Daten zu Sham wird die zuvor beschriebene Tendenz der Gruppe CCI/LPS 24h mehr Zeit als die anderen Versuchsgruppen in den offenen Armen zu verbringen, deutlicher (Abb. **20C**). Die Versuchstiere der Gruppe CCI/LPS 24h haben einen signifikant längeren Aufenthalt in den offenen Armen als die Tiere der Gruppe CCI/LPS 72h ($3,33 \pm 0,78$ vs. $1,001 \pm 0,26$). Gegenüber CCI/Veh ist diese Beobachtung zwar nicht signifikant, aber es kann zumindest eine Tendenz gezeigt werden ($3,33 \pm 0,78$ vs. $1,68 \pm 0,37$; $p = 0,0709$). Auch in der Anzahl der Kopfsenkungen nach Normalisierung zur jeweiligen Sham-Gruppe (Abb. **20D**) hat ein CCI mit LPS-Inhalation nach 24h die schlechtesten Ergebnisse, jedoch ohne statistische Signifikanz ($2,0 \pm 0,37$ vs. CCI/Sham Veh $1,22 \pm 0,21$; $p = 0,13$ bzw. CCI/Sham LPS 72h $1,12 \pm 0,25$; $p = 0,11$).

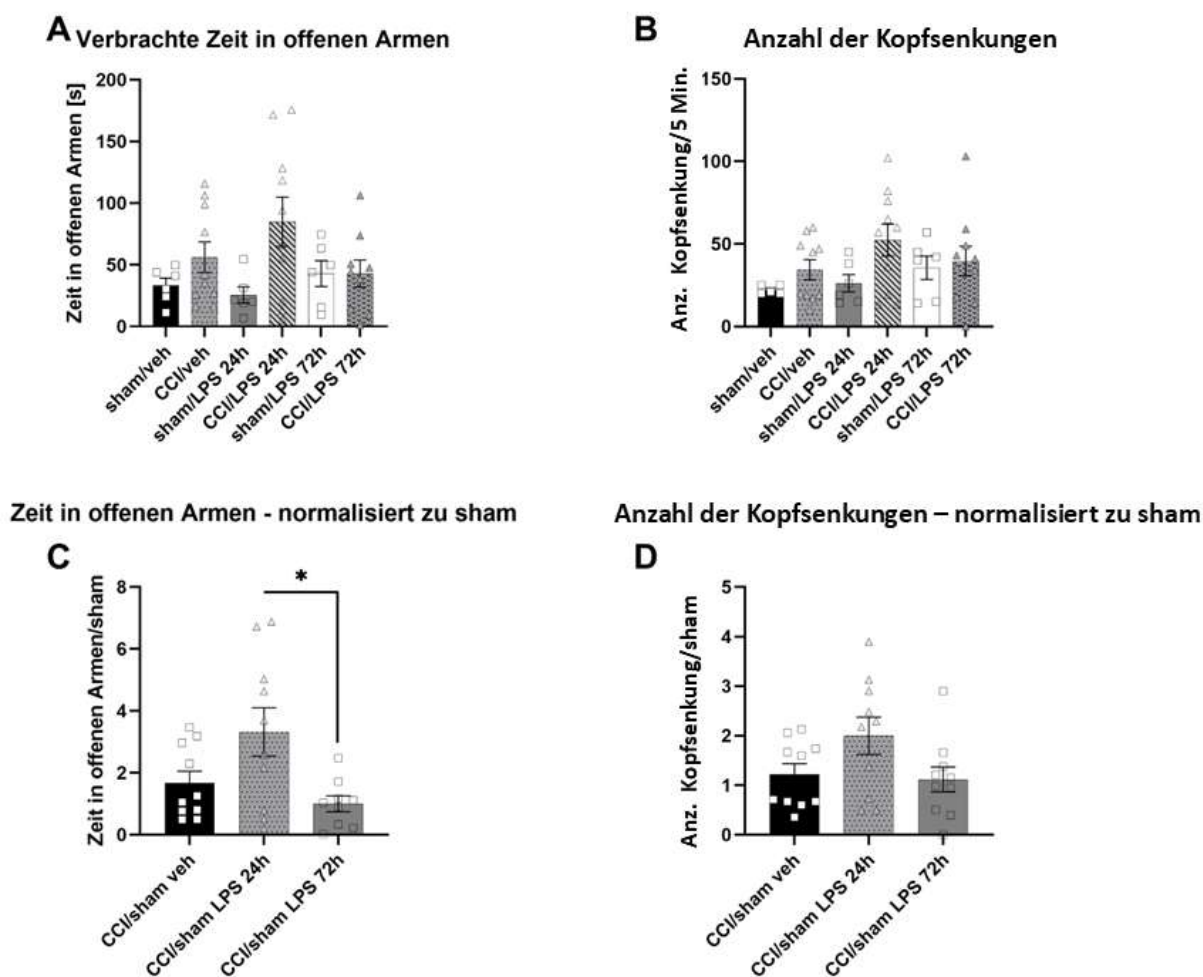


Abbildung 25: Ergebnisse des EPM an Tag 6 postoperativ – Zeit in offenen Armen und Kopfsenkungen

Die Kombination aus LPS-Inhalation nach 24 Stunden und vorangegangenem CCI führt zur signifikanten Beeinträchtigung des Angstverhaltens gegenüber den Tieren mit LPS-Inhalation nach 72 Stunden. Ein singuläres CCI hat keinen signifikanten Einfluss auf die verbrachte Zeit in den offenen Armen (**A**) des EPMS oder auf die Anzahl der Kopfsenkungen (**B**). Gleiches gilt für die alleinige Inhalation von LPS. Doch kann eine verlängerte Aufenthaltsdauer der Mäuse in den offenen Armen für die Gruppe CCI/LPS 24h im Vergleich zu den anderen Gruppen beobachtet werden. Nach Normalisierung (**C**) zeigt sich eine Signifikanz gegenüber CCI/LPS 72h und zumindest ein statistischer Trend gegenüber CCI/Veh. Auch die Anzahl an Kopfsenkungen ist in der CCI/LPS 24h-Gruppe höher. In (**D**) kann diese Beobachtung besser zur Geltung gebracht werden. Zu sehen sind Säulendiagramme mit der zugebrachten Zeit in den offenen Armen und mit der Anzahl an Kopfsenkungen. Die unteren beiden Säulendiagramme zeigen die jeweiligen Daten ins Verhältnis zur jeweiligen Sham-Gruppe gesetzt. Dabei repräsentiert jede Säule eine der Untersuchungsgruppen. Die Normalisierung zu den Sham-Gruppen erfolgt durch Division der Werte der jeweiligen CCI-Gruppe mit dem MW der zugehörigen Sham-Gruppe. Alle Ergebnisse werden auf eine Normalverteilung mittels D'Agostino & Person, Anderson-Darling, Shapiro-Wilk und Kolmogorov-Smirnov Test überprüft und mit dem Grubbs-Test ($\alpha = 0,05$) auf Ausreißer kontrolliert. Es wird jeweils ein Wert in (**A**; Gruppe: CCI/LPS 72h), (**B**; Gruppe: Sham/Veh) und (**C**; Gruppe: CCI/Sham LPS 72h) ausgeschlossen. Die Darstellung aller Parameter erfolgt als MW \pm SEM; p-Werte werden durch One-way-ANOVA, gefolgt von Holm-Šidák multiple comparisons test, kalkuliert.

5.1.5 Gewicht – CCI und LPS-Inhalation zeigen keinen konstant signifikanten Einfluss auf das Körpergewicht

Die Nahrungsaufnahme und das Monitoring des Körpergewichts der Versuchstiere lässt Rückschlüsse auf die Schwere der Erkrankung bzw. Verletzung zu. Gesunde Mäuse zeigen keine Veränderungen in ihren Gewohnheiten der Nahrungsaufnahme, wohingegen solche mit erhöhtem körperlichem Stress weniger fressen und gleichzeitig an Gewicht verlieren. Es kann zwar gezeigt werden, dass alle CCI-Gruppen an Gewicht nach Operation (CCI/Veh: prä-op $19,83 \pm 0,32$ g vs. d1 $19,17 \pm 0,37$ g, $p = 0,23$; CCI/LPS 24h: prä-op $20,65 \pm 0,37$ g vs. d1 $19,98 \pm 0,46$ g, $p = 0,22$; CCI/LPS 72h: prä-op $19,91 \pm 0,35$ g vs. d1 $19,16 \pm 0,37$ g, $p = 0,17$) verlieren, diese Ergebnisse jedoch nicht statistisch signifikant sind. Die statistische Analyse innerhalb einzelner Gruppen über den Beobachtungszeitraum zeigt in der CCI/Veh-Gruppe eine signifikante Erholung des Gewichts von d1 auf d3 ($19,84 \pm 0,37$ g, $p < 0,05$). CCI/LPS 72h kann sich von d1 auf d3 erholen ($19,72 \pm 0,32$ g, $p = 0,078$) und verliert nach LPS-Inhalation an d3 nochmals signifikant Gewicht auf d5 ($19,21 \pm 0,32$ g, $p < 0,05$). Die Analyse zwischen den Gruppen an einzelnen Tagen liefert keine signifikanten Ergebnisse. In dieser Studie ist eine nicht signifikante Abnahme des Körpergewichts nach CCI und nachfolgend eine signifikante Erholung des Gewichts auf d3 (in CCI/Veh und CCI/LPS 72h) zu beobachten. Eine LPS-Inhalation nach 72h führt zu einer signifikanten Gewichtsabnahme bei vorangegangenem CCI. Es ist kein Einfluss der LPS-Inhalation ohne CCI auf das Gewicht zu beobachten.

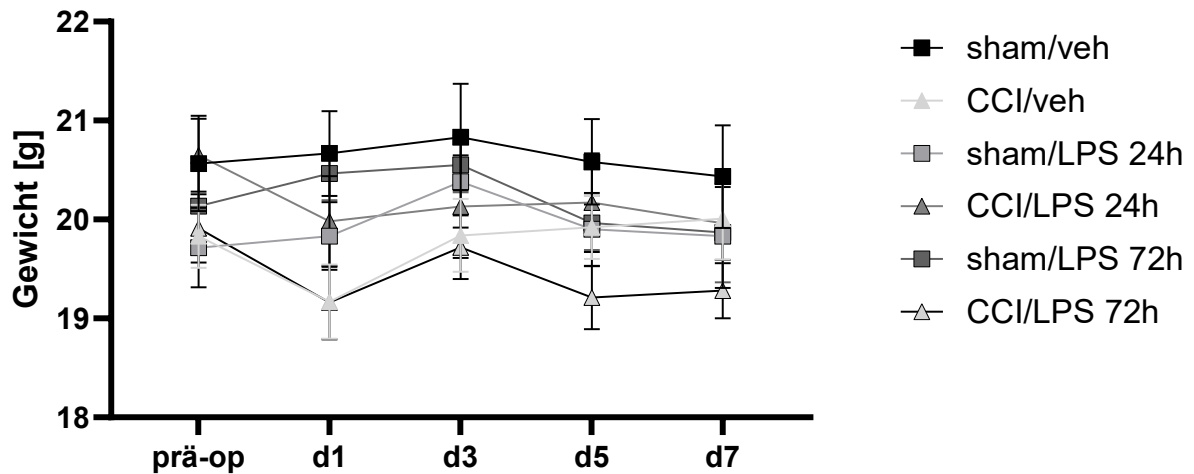


Abbildung 26: Ergebnisse der Körpergewichtsmessung

Es ist kein konstant signifikanter Einfluss des CCI oder der Inhalation mit LPS auf das Körpergewicht zu sehen. Die Abbildung zeigt das gemessene Körpergewicht zu verschiedenen Zeitpunkten nach CCI und Inhalation mit LPS: prä-op, 24 h (d1), 72h (d3), 120 h (d5) und 168 h (d7). Alle CCI-Gruppen verlieren nach der Operation zwar an Gewicht, diese Daten sind aber nicht signifikant. In der Gruppe CCI/Veh erfolgt eine signifikante Erholung von d1 auf d3 ($p < 0,05$) und CCI/LPS 72h verliert nach erfolgter Erholung im statistischen Trend von d1 auf d3 ($p = 0,078$), auf d5 signifikant an Gewicht ($p < 0,05$). Die Darstellung der Parameter erfolgt als $MW \pm SEM$; p-Werte werden durch Mixed-effects model (REML), gefolgt von Tukey's multiple comparisons test, kalkuliert.

5.2 Histologie und Immunfluoreszenzfärbung

5.2.1 Schadensvolumen – LPS-Inhalation hat keinen signifikanten Einfluss auf die Größe der Läsion nach CCI

Die Auswertung des Läsionsvolumen erfolgt anhand der histologischen Schnitte nach Nisslfärbung nach beschriebener Methode (s. 4.3.1.1.1 *Histologisches Schadensvolumen*). nach Euthanasie der Versuchstiere zum Zeitpunkt d7. Dabei kann kein signifikanter Unterschied im absoluten Läsionsvolumen (Abb. **22A**) zwischen den Gruppen mit CCI und LPS nach 24h bzw. 72h und ihrer Kontrolle CCI/Veh festgestellt werden (CCI/veh $20,75 \pm 1,45 \text{ mm}^3$; CCI/LPS 24 h $21,89 \pm 1,17 \text{ mm}^3$; CCI/LPS 72h $19,38 \pm 1,6 \text{ mm}^3$). Erfolgt die Darstellung als Läsionsvolumen in Anteil der ipsilateralen Hirnhälfte (Abb. **22B**) kann im Mittel ein geringeres prozentuales Läsionsvolumen der Gruppe CCI/LPS 72h beobachtet werden ($11,87 \pm 0,91 \%$ vs. CCI/Veh $13,56 \pm 0,58 \%$, $p = 0,29$ bzw. CCI/LPS 24h $13,58 \pm 0,72 \%$, $p = 0,26$). Dieser Unterschied ist jedoch nicht statistisch signifikant. Die Versuchsgruppen mit Sham-Operationen haben keine Läsion und werden nicht in den Vergleich eingeschlossen.

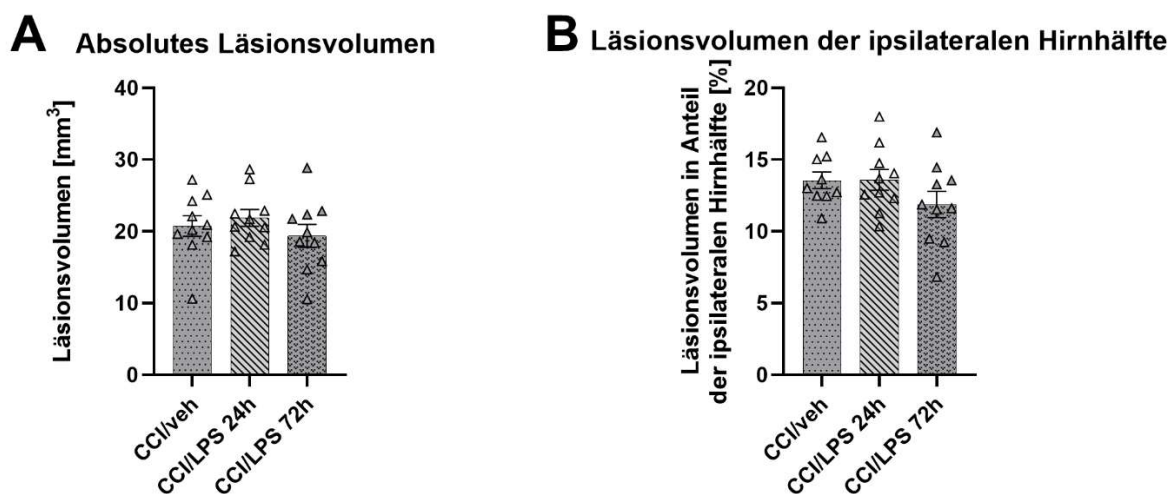


Abbildung 27: Ergebnisse der Auswertung des Läsionsvolumens

Die Inhalation mit LPS zeigt keinen Unterschied im absoluten Läsionsvolumen (**A**). Im prozentualen Anteil der ipsilateralen Hirnhälfte (**B**) kann ein leicht verringerter Anteil in der Gruppe CCI/LPS 72h beobachtet werden. Wobei hier keine statistische Signifikanz vorliegt (vs. CCI/Veh $p = 0,29$; vs. CCI/LPS 24h $p = 0,26$). Dargestellt im Säulendiagramm sind nur die Gruppen mit CCI, wobei jede Säule eine unterschiedliche Gruppe repräsentiert. Zuvor werden die Ergebnisse auf eine Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk und Kolmogorov-Smirnov Test überprüft und mit dem Grubbs-Test ($\alpha = 0,05$) auf Ausreißer kontrolliert. Es wird ein Wert in (**B**; Gruppe: CCI/Veh) ausgeschlossen. Die Darstellung der gemessenen Parameter erfolgt als MW \pm SEM; p-Werte werden durch One-way-ANOVA, gefolgt von Tukey's multiple comparisons test, kalkuliert.

5.2.2 Immunfluoreszenzfärbung

Eine Immunfluoreszenzfärbung wird mittels primärer AK gegen GFAP, CD68 und NeuN durchgeführt, um Astrozyten, Mikroglia bzw. Neurone darzustellen. Die Auswertung erfolgt für Astrozyten und Mikroglia anhand mikroskopischer Aufnahmen und Quantifizierung der Fluoreszenzsignale. Zusätzlich erfolgt eine Normalisierung der Daten der CCI-Gruppen zu ihren jeweiligen Sham-Gruppen, da eine LPS-Inhalation allein bereits eine Astrozyten- und Mikroglia-Aktivierung verursachen kann (22, 236).

5.2.2.1 Hippocampusgröße – CCI verursacht eine signifikante Verletzung des Hippocampus. LPS-Inhalation hat keinen signifikanten Effekt

Die Auswertung der Hippocampusgröße erfolgt nach der in Kapitel 4.3.1.2.1 beschriebenen Methode. Es kann gezeigt werden, dass die Größe des Hippocampus ipsi- vs. kontralateral in allen Sham-Tieren nahezu identisch ist und somit eine Vergleichbarkeit gegeben ist (Abb. **24A**; 210.469 ± 4321 Px vs. 211.601 ± 5068 Px). CCI bewirkt eine Schädigung des Hippocampus, die sich in einem signifikanten Größenunterschied der intakten Fläche zwischen ipsi- und kontralateraler Hemisphäre widerspiegelt (Abb. **24B**, CCI/Veh 145.561 ± 12.080 Px vs. 200.588 ± 6137 Px; CCI/LPS 24h 151.968 ± 7752 Px vs. 204871 ± 6815 Px; CCI/LPS 72h 169.117 ± 15.105 Px vs. 199.566 ± 6960 Px). Wird nur die ipsilaterale Größe des Hippocampus betrachtet fällt eine Größenzunahme von CCI/Veh über CCI/LPS 24h zu CCI/LPS 72h auf. Diese Beobachtung ist nicht statistisch signifikant, deutet aber auf einem geringen ausgeprägten Schaden des Hippocampus bei den Tieren mit CCI und LPS-Inhalation nach 72 Stunden hin.

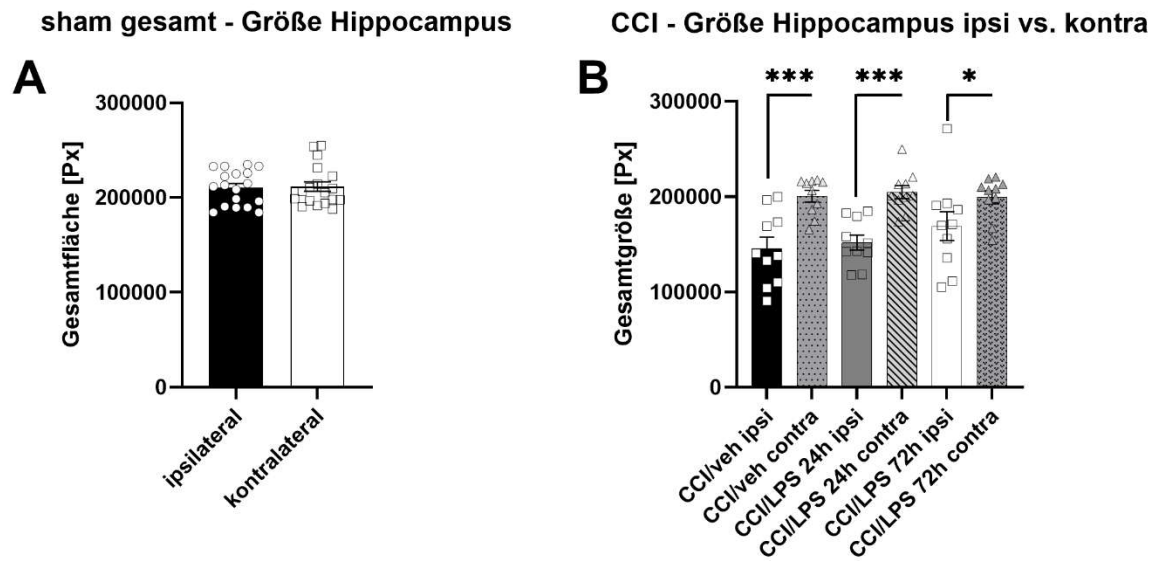


Abbildung 28: Ergebnisse der Auswertung der Hippocampusgröße

Die Größe des ipsi- und kontralateralen Hippocampus ist vergleichbar (**A**). CCI verursacht eine signifikante Schädigung des Hippocampus (**B**). Die Säulendiagramme zeigen die jeweiligen Gruppen aufgetragen gegen die Gesamtfläche in Px. Zuvor werden die Ergebnisse auf eine Normalverteilung mittels D'Agostino & Person, Anderson-Darling, Shapiro-Wilk und Kolmogrov-Smirnov Test überprüft und mit dem Grubbs-Test ($\alpha = 0,05$) auf Ausreißer kontrolliert. Es wird kein Wert ausgeschlossen. Die Darstellung der gemessenen Parameter erfolgt als $MW \pm SEM$; p-Werte werden durch One-way-ANOVA, gefolgt von Holm-Šidák multiple comparisons test, kalkuliert.

5.2.2.2 CD68 – CCI in Kombination mit LPS-Inhalation nach 24 Stunden führt zu ipsi- und kontraläsional signifikant vergrößerten Fläche von CD68 im Hippocampus gegenüber der LPS-Inhalation nach 72 Stunden

Durch ein CCI folgt eine Aktivierung von Mikroglia die durch eine Immunfluoreszenzmarkierung von CD68 quantifiziert werden kann (237). In Abb. **25** dargestellt sind die Auswertungen der CD68-Fläche im Hippocampus ipsi- und kontralateral. Die CD68-Fläche ipsiläsional in der Gruppe CCI/LPS 24h (Abb. **25A**) ist am größten ($525,1 \pm 136,2$ Px), wobei diese Beobachtung gegenüber Sham/LPS 24h ($95,0 \pm 37,36$ Px) und Sham/veh ($83,0 \pm 36,04$ Px) signifikant ist. Darüber hinaus besteht hier ein statistischer Trend im Flächenvergleich zwischen CCI/LPS 72h ($429,9 \pm 76,91$ Px) sowohl zu Sham/Veh ($p = 0,078$) als auch gegenüber Sham/LPS 24h ($p = 0,093$). Folgt eine Normalisierung der Daten zur Sham-Gruppe (Abb. **25D**), kann gezeigt werden, dass diese Beobachtung gegenüber CCI/LPS 72h signifikant ($5,53 \pm 1,43$ Px vs. $2,13 \pm 0,38$ Px) und deutlich größer als die Fläche der CCI/Veh-Gruppe ($5,53 \pm 1,43$ Px vs. $3,4 \pm 0,35$ Px, $p = 0,19$) ist. Im kontralateralen Hippocampus kann keine vergrößerte CD68-Fläche beobachtet werden (Abb. **25B**). Jedoch kann hier nach Normalisierung (Abb. **25E**) eine Signifikanz der Gruppe CCI/Sham LPS 24h gegenüber CCI/Sham Veh und CCI/Sham LPS 72h ($1,58 \pm 0,38$ Px vs. $0,58 \pm 0,12$ Px bzw. $0,42 \pm 0,14$ Px) gezeigt werden. Werden die CD68-Flächen in den CCI-Gruppen ipsi- gegen kontralateral verglichen (Abb. **25C**) kann eine signifikant größere Fläche an CD68 in der Gruppe CCI/LPS 24h gezeigt werden ($525,1 \pm 136,2$ Px vs. $115,7 \pm 27,87$ Px). Festzuhalten ist also die Kombination von CCI mit LPS-Inhalation nach 24 Stunden führt zu signifikant größeren CD68-Flächen gegenüber der Inhalation nach 72 Stunden, sowohl ipsi-, als auch kontraläsional. Wobei der Flächenvergleich ipsi- zu kontralateral eine signifikant größere CD68-Fläche ipsiläsional in der Gruppe LPS-Inhalation nach 24 Stunden zeigt. Die Größe der CD68-Fläche ist also abhängig vom Zeitpunkt der LPS-Inhalation. Hierbei gilt zu beachten, dass die Gruppe CCI/LPS 72h wenigstens im statistischen Trend größere Flächen als Sham/Veh und Sham/LPS 24h zeigt.

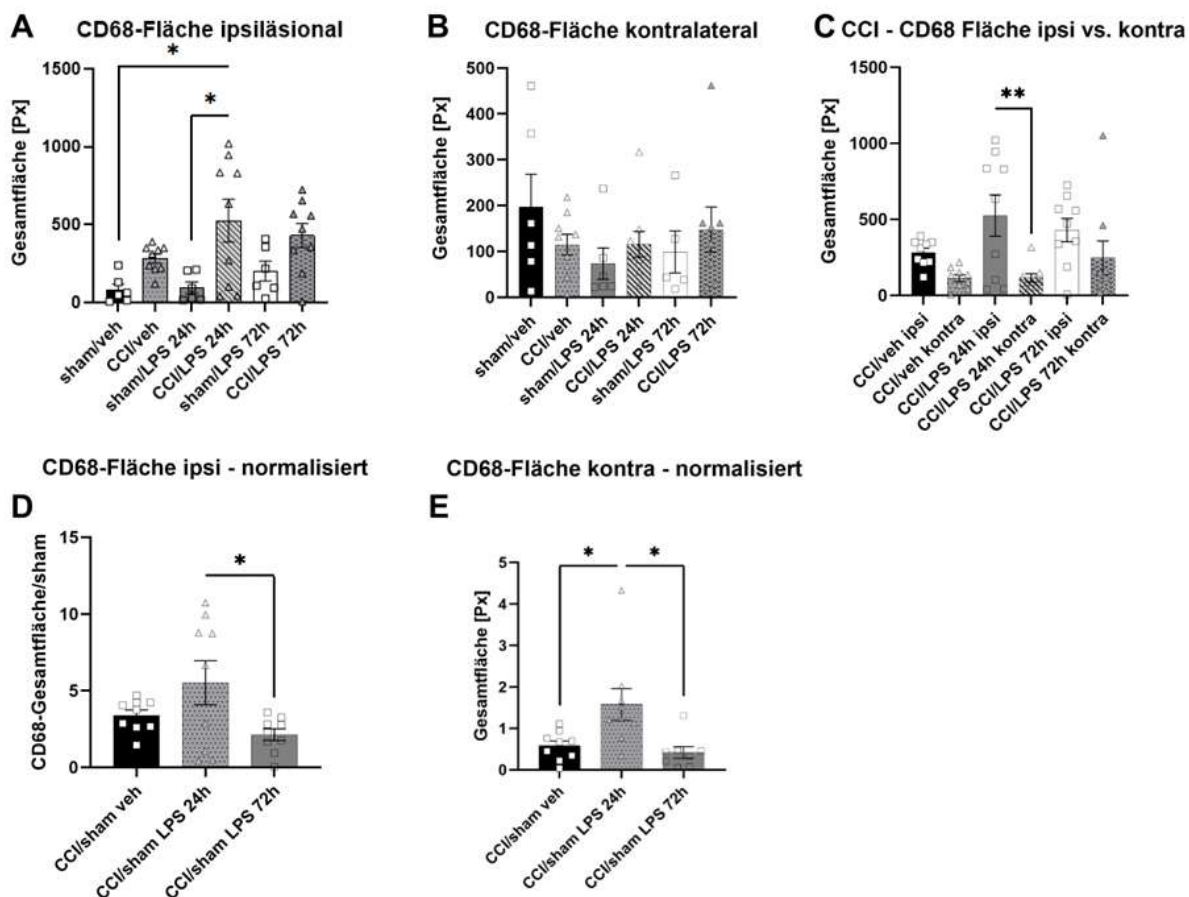


Abbildung 29: Ergebnisse der IHC-Auswertung von CD68

Die Größe der CD68-Fläche ist abhängig vom Zeitpunkt der LPS-Inhalation, wobei die Kombination CCI mit LPS-Inhalation nach 24 Stunden zu signifikant größeren Flächen gegenüber Sham/Veh und Sham/LPS 24h (**A**) führt. Die Gruppe CCI/LPS 24h zeigt auch signifikant größere CD68-Flächen im Vergleich ipsi- vs. kontraläsional (**C**). Die Kombination CCI mit LPS-Inhalation nach 72 Stunden führt ipsilateral zu signifikant kleineren CD68 eingefärbten Flächen als die Inhalation nach 24 Stunden (**D**). Außerdem ist in CCI/Sham LPS 24h (**E**) die CD68-Fläche kontralateral signifikant größer als CCI/Sham Veh und CCI/Sham LPS 72h. Darüber hinaus ist als Säulendiagramm dargestellt in (**B**) die kontralaterale CD68-Fläche. Die Normalisierung zu den Sham-Gruppen erfolgt durch Division der Werte der jeweiligen CCI-Gruppe mit dem MW der zugehörigen Sham-Gruppe. Alle Ergebnisse werden auf eine Normalverteilung mittels D'Agostino & Person, Anderson-Darling, Shapiro-Wilk und Kolmogrov-Smirnov Test überprüft und mit dem Grubbs- ($\alpha = 0,05$) oder ROUT-Test ($Q = 1\%$) auf Ausreißer kontrolliert. Es werden drei Werte in (**A**; 1 in CCI/Veh, 1 in CCI/LPS 24h, 1 in CCI/LPS 72h), fünf in (**B**; 1 in CCI/Veh, 1 in CCI/LPS 24h, 1 in Sham/LPS 24h, 2 in CCI/LPS 72h), sechs in (**C**; jeweils 1 in jeder Gruppe), drei in (**D**; jeweils 1 in jeder Gruppe) und vier in (**E**; jeweils 1 in CCI/Sham Veh und CCI/Sham LPS 24h, 2 in CCI/Sham LPS 72h) ausgeschlossen. Die Darstellung aller Parameter erfolgt als MW \pm SEM; p-Werte werden durch One-way-ANOVA, gefolgt von Holm-Šidák multiple comparisons test, kalkuliert.

5.2.2.3 GFAP – CCI in Kombination mit LPS-Inhalation nach 72 Stunden führt zu signifikant kleineren GFAP-Flächen im ipsi- und kontraläsionalen Hippocampus

Wie auch Mikroglia werden Astrozyten nach CCI aktiviert. Es folgt einer Proliferation und Hypertrophie mit einhergehender erhöhter Expression von GFAP. Dies kann mittels IHC-Färbung dargestellt werden (Abb. **26**). Die Auswertung umfasst die GFAP-Flächen ipsi- und kontraläsional (Abb. **26A**, **26B** und **26C**), sowie ihre Normalisierung zur jeweiligen Sham-Gruppe (Abb. **26D** und **26E**). Dadurch kann gezeigt werden, dass die Kombination von CCI und LPS-Inhalation nach 72 Stunden zu signifikant kleineren GFAP-Flächen sowohl ipsi- als auch kontraläsional führt (Abb. **26D**: $0,82 \pm 0,16$ vs. CCI/Sham Veh $1,66 \pm 0,17$ bzw. CCI/Sham LPS 24h $2,058 \pm 0,33$; Abb. **26E**: $0,93 \pm 0,15$ vs. CCI/sham veh $2,26 \pm 0,28$ bzw. CCI/Sham LPS 24h $2,007 \pm 0,29$). Werden nur die CCI-Gruppen betrachtet ist die GFAP-Fläche auch hier ipsi- und kontraläsional in der CCI/LPS 72h-Gruppe am kleinsten (Abb. **26C**: ipsi. 5138 ± 1015 Px, kontra. $5311 \pm 865,9$ Px). Doch ohne statistische Signifikanz. Darüber hinaus kann wiederum die größte GFAP-Fläche ipsiläsional in der CCI/LPS 24h-Gruppe (7288 ± 1051 Px) festgestellt werden. Die Normalisierung zu Sham ändert an dieser Beobachtung nichts ($2,058 \pm 0,33$). Es kann also gezeigt werden, dass die Gesamtfläche an GFAP-Färbung abhängig vom Zeitpunkt der LPS-Inhalation nach initialem Trauma ist. Wird nur ipsiläsional betrachtet scheint es, dass auch hier ein CCI in Kombination mit LPS-Inhalation nach 24 Stunden zur größten GFAP-gefärbten Fläche führt.

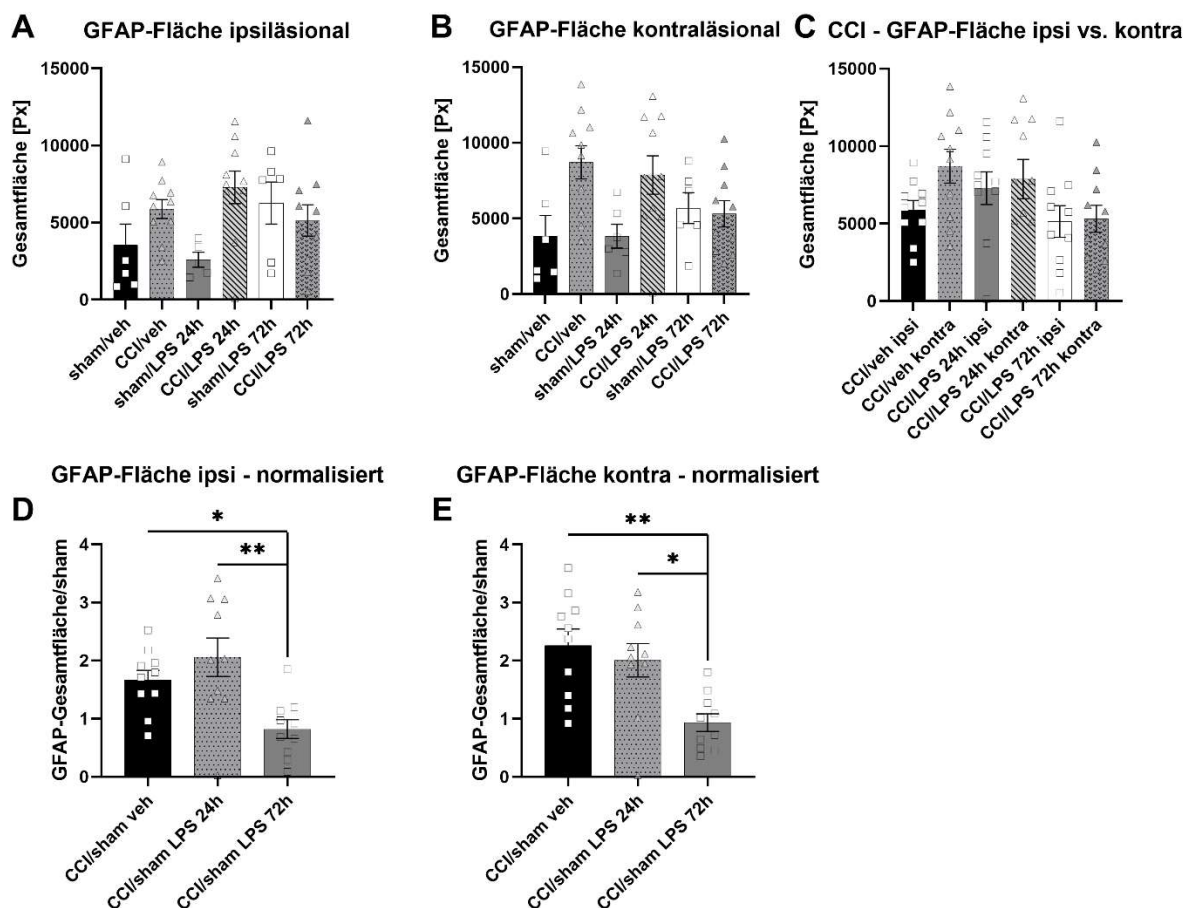


Abbildung 30: Ergebnisse der IHC-Auswertung von GFAP

Die Größe der GFAP-Fläche ist abhängig vom Zeitpunkt der LPS-Inhalation, wobei die Kombination CCI und Inhalation nach 72 Stunden zu signifikant kleineren GFAP gefärbten Flächen sowohl ipsi- (**D**) als auch kontraläsional (**E**) führt. Werden nur die CCI-Gruppen betrachtet (**C**) kann, wenn auch ohne statistische Signifikanz, gezeigt werden, dass die GFAP-Fläche ipsi- und kontraläsional in der CCI/LPS 72h-Gruppe am kleinsten ist. (**A**) zeigt die Gesamtfläche an GFAP ipsi- und (**B**) kontraläsional in allen Untersuchungsgruppen. Die Normalisierung zu den Sham-Gruppen erfolgt durch Division der Werte der jeweiligen CCI-Gruppe mit dem MW der zugehörigen Sham-Gruppe. Alle Ergebnisse werden auf eine Normalverteilung mittels D'Agostino & Person, Anderson-Darling, Shapiro-Wilk und Kolmogorov-Smirnov Test überprüft und mit dem Grubbs-Test ($\alpha = 0,05$) auf Ausreißer kontrolliert. Es wird ein Wert in (**A**; 1 in Sham/LPS 24h) ausgeschlossen. Die Darstellung aller Parameter erfolgt als MW \pm SEM; p-Werte werden durch One-way-ANOVA, gefolgt von Holm-Šidák multiple comparisons test, kalkuliert.

5.3 Molekularbiologie

5.3.1 Genexpressionsanalyse

Die auf das Trauma folgende Entzündungsreaktion des Gehirns kann durch Quantifizierung und Amplifikation von bestimmten Genen gemessen werden (s. 4.3.2 *Molekularbiologie*). Um diese nachweisen zu können wird eine qRT-PCR-Analyse durchgeführt. Die folgenden Targets werden in Lungen- und Gehirngewebe bestimmt: IL-6 wird als Marker für die akute Phase Reaktion bestimmt. Als Marker für M1- bzw. M2-Mikroglia/Makrophagen dienen CD68 bzw. CD206/MRC1. Der Marker GFAP kann zur Analyse von aktivierten Astrozyten im Hirngewebe genutzt werden. Der Inflammationsmarker sekretorischer Leukozyten Proteasen Inhibitor (*engl. Secretory Leukocyte Protease Inhibitor, SLPI*) und Makrophagenmarker Lysozym 2 (*Lyz2*) werden im Lungengewebe untersucht. Grundsätzlich werden die Daten gegen das Referenzgen PPIA analysiert. Die qRT-PCR Ergebnisse des Hirngewebes der CCI-Gruppen werden im Anschluss zusätzlich gegen ihre jeweilige Sham-Gruppe ins Verhältnis gesetzt

5.3.1.1 Lunge – LPS-Inhalation nach 72 Stunden führt zur signifikant erhöhten Expression von CD68, IL-6 und SLPI, ein gleichzeitig vorhandener zerebraler Schaden durch CCI führt zu einer signifikant erhöhten Expression von MRC1

Die Inhalation von LPS verursacht eine schnelle und starke lokale Entzündungsreaktion (22). Um diese Inflammation darstellen und quantifizieren zu können, werden die Targets CD68, MRC1 und *Lyz2* als Marker für eine Reaktion des humoralen Immunsystems durch qRT-PCR analysiert. IL-6 und SLPI dienen als Inflammationsmarker. Die Inhalation von LPS 72 Stunden nach CCI oder nach Sham-Operation führt zu signifikant höherer Expression von CD68 im Lungengewebe gegenüber der Sham bzw. CCI/Veh-Kontrollgruppe (Abb. **27A**). Wobei die Kombination von CCI und LPS-Inhalation nach 72 Stunden zu deutlicheren Unterschieden ($0,0082 \pm 0,00074$ vs. $0,0048 \pm 0,0002$, $p < 0,001$ bzw. $0,0048 \pm 0,000094$, $p < 0,01$) gegenüber der Sham/LPS 72h-Gruppe ($0,0084 \pm 0,00051$ vs. $0,0048 \pm 0,0002$, $p < 0,01$ bzw. $0,0048 \pm 0,000094$, $p < 0,05$) führt. Bei der Betrachtung der MRC1-Expression (Abb. **27B**) fällt eine signifikant höhere mRNA-Expression der Gruppe CCI/LPS 72h gegenüber den beiden Veh- und LPS-Inhalation nach 24h-Gruppen auf ($0,17 \pm 0,012$ vs. Sham/Veh $0,11 \pm 0,0047$;

Ergebnisse

CCI/Veh $0,1 \pm 0,0061$; Sham/LPS 24h $0,11 \pm 0,0078$; CCI/LPS 24h $0,12 \pm 0,013$). Die Expression von IL-6 (Abb. **27C**) und SLPI (Abb. **27E**) ist in der Sham/LPS 72h-Gruppe am höchsten und signifikant gegenüber CCI/Veh (IL-6 $2,15 \times 10^{-5} \pm 2,85 \times 10^{-6}$ vs. $1,068 \times 10^{-5} \pm 1,32 \times 10^{-6}$; SLPI $0,33 \pm 0,04$ vs. $0,22 \pm 0,014$). Die Expression von Lyz2 (Abb. **27D**) zeigt keinen nennenswerten Unterschied nach der Inhalation von LPS und / oder CCI. Zusammenfassend scheint die LPS-Inhalation nach 72 Stunden eine Inflammationsreaktion und eine Aktivierung des humoralen Immunsystems im Lungengewebe zu verursachen. Bei vorangegangenem CCI kommt es zu einer verstärkten Antwort.

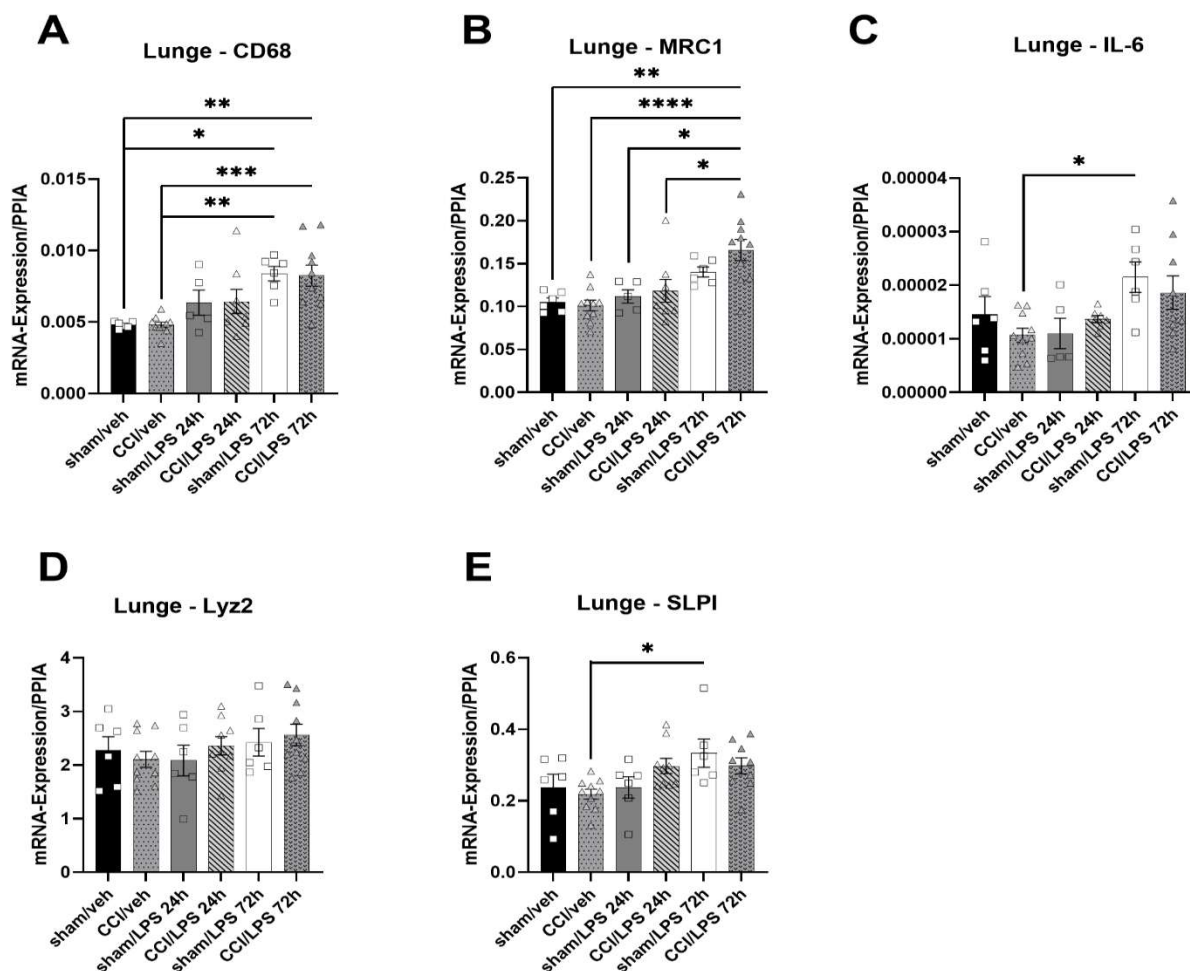


Abbildung 31: Ergebnisse der qRT-PCR der Targets CD68, MRC1, IL-6, Lyz2 und SLPI aus Lungengewebe.

Die Verneblung von LPS 72 Stunden nach Sham-OP bzw. CCI führt zur signifikanten Zunahme der Expression von CD68 im Lungengewebe (A) gegenüber der Kontrolle. Dabei ist die Signifikanz für CCI/LPS 72h höher als für Sham/LPS 72h. Die alleinige LPS-Inhalation nach 72 Stunden führt zu signifikant höheren Expressionen von IL-6 (C) und SLPI (E) gegenüber CCI/Veh. Ein CCI in Kombination mit LPS nach 72 Stunden hat eine signifikante Zunahme der Expression von MRC1 (B) gegenüber der Veh- und LPS 24h-Gruppen zur Folge. Die Säulendiagramme zeigen die mRNA-Expression gegen das Referenzgen PPIA aus Lungengewebe. Alle Daten werden als MW ± SEM dargestellt. Zuvor erfolgt eine Prüfung auf Normalverteilung der Daten mittels D'Agostino & Person, Anderson-Darling, Shapiro-Wilk und Kolmogorov-Smirnov Test. Es folgt die Identifikation und der Ausschluss von Ausreißern mittels Grubbs' test ($\alpha = 0,05$). Es werden zwei Werte in (C; 1 in CCI/LPS 24h, 1 in CCI/LPS 72h), einer in (D; 1 in CCI/LPS 24h) und zwei in (E; 1 in CCI/LPS 24h, 1 in CCI/LPS 72h) ausgeschlossen. Die abschließende Ermittlung der p-Werte, der von Außenseiter bereinigten Daten, erfolgt durch One-way-ANOVA, gefolgt von Holm-Šidák multiple comparisons test.

5.3.1.2 Gehirn – CCI erhöht die Expression von CD68, MRC1 und GFAP signifikant, eine gleichzeitige LPS-Inhalation nach 24 Stunden verursacht eine signifikante Zunahme der GFAP-Expression

Einem SHT folgt eine starke lokale Inflamationsreaktion. Gleichzeitig werden Mikroglia und Astrozyten aktiviert. Die Quantifizierung dieser Gliose und Inflammation erfolgt durch Auswertung der Ergebnisse der qRT-PCR. CCI führt zu stark signifikant erhöhten Expressionen von CD68 (Abb. **28A**), MRC1 (Abb. **28B**) und GFAP (Abb. **28D**). Die CD68-Expression ist nach CCI signifikant hoch gegenüber allen Sham-Gruppen und unabhängig von LPS-Inhalation (Sham/Veh $0,0031 \pm 6,14 \times 10^{-5}$, CCI/Veh $0,062 \pm 0,0041$, Sham/LPS 24h $0,0031 \pm 0,00018$, CCI/LPS 24h $0,067 \pm 0,0029$, Sham/LPS 72h $0,0028 \pm 6,75 \times 10^{-5}$, CCI/LPS 72h $0,065 \pm 0,0046$). Gleiches gilt für die MRC1- (Sham/Veh $0,00071 \pm 7,68 \times 10^{-5}$, CCI/Veh $0,0025 \pm 0,00018$, Sham/LPS 24h $0,00062 \pm 5,46 \times 10^{-5}$, CCI/LPS 24h $0,0028 \pm 0,00026$, Sham/LPS 72h $0,00063 \pm 4,3 \times 10^{-5}$, CCI/LPS 72h $0,003 \pm 0,00023$) und GFAP-Expression (Sham/Veh $0,0021 \pm 0,00013$, CCI/Veh $0,017 \pm 0,00086$, Sham/LPS 24h $0,0017 \pm 6,36 \times 10^{-5}$, CCI/LPS 24h $0,018 \pm 0,001$, Sham/LPS 72h $0,0018 \pm 0,00012$, CCI/LPS 72h $0,016 \pm 0,00098$). Der Inflamationsmarker IL-6 (Abb. **28C**) wird in seiner Expression nach CCI erhöht. Auch wenn diese Daten nicht statistisch signifikant sind, so kann doch ein starker statistischer Trend beim Vergleichen der CCI-Gruppen mit ihrer jeweiligen Sham-Gruppe dahingehend festgestellt werden (Sham/Veh $1,777 \times 10^{-5} \pm 1,610 \times 10^{-6}$ vs. CCI/Veh $3,433 \times 10^{-5} \pm 5,182 \times 10^{-6}$, $p = 0,12$; Sham/LPS 24h $1,013 \times 10^{-5} \pm 2,299 \times 10^{-6}$ vs. CCI/LPS 24h $2,896 \times 10^{-5} \pm 3,715 \times 10^{-6}$, $p = 0,057$; Sham/LPS 72h $1,916 \times 10^{-5} \pm 5,368 \times 10^{-6}$ vs. CCI/LPS 72h $3,568 \times 10^{-5} \pm 3,997 \times 10^{-6}$, $p = 0,12$). Folgt nun eine Normalisierung der Daten zur Sham-Gruppe (Abb. **28G**) zeigt sich eine erhöhte IL-6-Expression nach CCI in Verbindung mit LPS-Inhalation nach 24 Stunden gegenüber den anderen CCI-Gruppen mit statistischem Trend ($2,86 \pm 0,37$ vs. $1,93 \pm 0,29$, $p = 0,072$ (Veh) bzw. $1,86 \pm 0,21$, $p = 0,072$ (LPS 72h)). Diese Beobachtung kann nach Normalisierung der GFAP-Daten nochmals bestätigt werden (Abb. **28H**). Hier zeigt sich eine signifikant erhöhte GFAP-Expression nach CCI und LPS-Inhalation nach 24h gegenüber CCI/Veh ($10,53 \pm 0,61$ vs. $8,205 \pm 0,42$). Gegenüber CCI/LPS 72h kann lediglich ein statistischer Trend beobachtet werden ($10,53 \pm 0,61$ vs. $8,9 \pm 0,56$, $p = 0,082$). Darüber hinaus verursacht ein CCI in Kombination mit LPS-Inhalation nach 24 Stunden bzw. nach 72 Stunden gegenüber keiner Inhalation eine Zunahme der MRC1-Expression (Abb. **28F**; $3,54 \pm 0,25$ vs. $4,54 \pm 0,42$, $p = 0,12$ (24h), $4,75 \pm 0,37$, $p = 0,08$ (72h)). Es kann kein Effekt der LPS-Inhalation in Kombination mit CCI in der Expression von CD68 (Abb. **28E**) festgestellt werden. Ein CCI führt zur signifikant erhöhten Expression von CD68, MRC1 und GFAP. Gleichzeitig führt eine Inhalation von LPS nach 24 Stunden nach vorherigem CCI zu einer höheren GFAP-Expression. Auch die Expression von IL-6 ist mit statistischem Trend in dieser Gruppe am höchsten. MRC1 wird durch LPS-Inhalation egal ob nach 24 oder 72 Stunden in seiner Expression gesteigert. Jedoch sind die beiden zuletzt beschriebenen Beobachtungen ohne statistische Signifikanz.

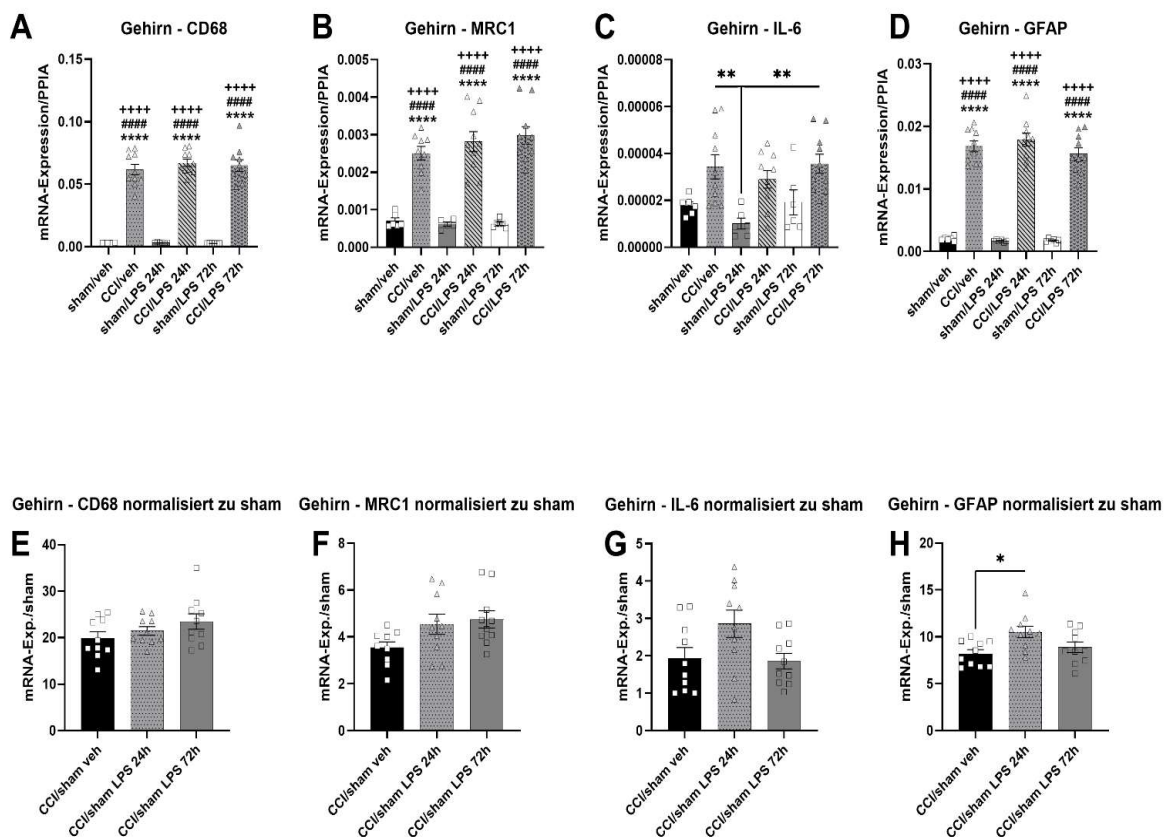


Abbildung 32: Ergebnisse der qRT-PCR der Targets CD68, MRC1, IL-6 und GFAP (A-D) aus Hirngewebe. Außerdem der gleichen Targets normalisiert zu Sham (E-H).

Durch CCI findet eine signifikante Zunahme der Expression von CD68 (A), MRC1 (B) und GFAP (D) im Vergleich zu allen Sham-Gruppen statt. Nach Normalisierung zu Sham kann eine signifikante Zunahme der GFAP-Expression (H) nach CCI und kombinierten LPS-Inhalation nach 24 Stunden im Vergleich zur Veh-Gruppe beobachtet werden. Erwähnenswert bleibt die signifikante IL-6 Zunahme (C) im Vergleich von Sham/LPS 24h zu CCI/Veh bzw. CCI/LPS 72h. Folgt eine Normalisierung zu Sham (G) kann eine statistisch nicht signifikant, erhöhte IL-6 Expression nach CCI und LPS-Inhalation nach 24 Stunden im Vergleich zu keiner LPS-Inhalation und nach 72 Stunden beobachtet werden. Werden die Daten aus (A) und (B) gegen Sham normalisiert (E und F), bleibt kein signifikanter Unterschied des CCIs mit LPS-Inhalation nach 24 Stunden bzw. nach 72h zur Kontrolle. Dargestellt ist hier die Genexpressionsanalyse aus Hirngewebe. In (A – D) wird in den Säulendiagrammen die mRNA-Expression gegen das Referenzgen PPIA betrachtet. (E – H) zeigen die CCI-Gruppen gegen den MW ihrer jeweiligen Sham-Gruppe normalisiert. Die Normalisierung zu den Sham-Gruppen erfolgt durch Division der Werte der jeweiligen CCI-Gruppe mit dem MW der zugehörigen Sham-Gruppe. Alle Ergebnisse werden auf eine Normalverteilung mittels D’Agostino & Person, Anderson-Darling, Shapiro-Wilk und Kolmogorov-Smirnov Test überprüft und mit dem Grubbs-Test ($\alpha = 0,05$) auf Ausreißer kontrolliert. Es wird ein Wert in (B; 1 in CCI/Veh) und (F; 1 in CCI/Sham Veh) ausgeschlossen. Die Darstellung aller Parameter erfolgt als MW \pm SEM; p-Werte werden durch One-way-ANOVA, gefolgt von Holm-Šidák multiple comparisons test, kalkuliert (**** = signifikant zu Sham/Veh, $p < 0,0001$; #### = signifikant zu Sham/LPS 24h, $p < 0,0001$; ++++ = signifikant zu Sham/LPS 72h, $p < 0,0001$).

5.3.2 Dot Blot – CCI erhöht die IgG-Konzentration im Hirngewebe, LPS-Inhalation hat keinen signifikanten Einfluss

CCI verursacht eine Schädigung der BHS, wodurch Serumproteine wie IgG im Hirnparenchym nachweisbar werden (238). Dieser Nachweis kann z.B. mittels Dot Blot durchgeführt werden (239). Zusätzlich erfolgt die Normalisierung der erhaltenen Daten zur jeweiligen Sham-Gruppe, da bereits eine alleinige LPS-Exposition die BHS-Permeabilität beeinflussen kann (194). Bei Betrachtung der Abb. (29A) fällt auf, dass ein CCI eine signifikante Intensitätszunahme von IgG gegenüber Sham/Veh verursacht (Sham/Veh $1,05 \times 10^6 \pm 0,13 \times 10^6$ AU vs. CCI/Veh $3,32 \times 10^6 \pm 0,15 \times 10^6$ AU, CCI/LPS 24h $3,54 \times 10^6 \pm 0,34 \times 10^6$ AU, CCI/LPS 72h $3,27 \times 10^6 \pm 0,37 \times 10^6$ AU). Außerdem ist die Intensitätszunahme zwischen den Sham/LPS 24h bzw. 72h und CCI/LPS 24h bzw. 72h signifikant hoch (Sham/LPS 24h $1,03 \times 10^6 \pm 0,07 \times 10^6$ AU bzw. 72h $0,89 \times 10^6 \pm 0,15 \times 10^6$ AU; $p < 0,0001$ (24h) bzw. $p < 0,0001$ (72h)). Die LPS-Inhalation nach 72h scheint im Vergleich zu Sham/Veh bzw. LPS 24h eine erniedrigte IgG-Intensität zu verursachen. Jedoch ohne statistische Signifikanz. Werden die Daten nun zu Sham normalisiert (Abb. 29B) kann die gleiche Abnahme der IgG-Intensität beobachtet werden (CCI/Sham LPS 72h $2,58 \pm 0,29$ vs. CCI/Sham Veh $3,16 \pm 0,14$, $p = 0,27$ bzw. CCI/Sham LPS 24h $3,43 \pm 0,33$, $p = 0,098$). In diesen Daten scheint ein deutlicherer statistischer Trend im Vergleich zu (A) vorzuliegen. Doch auch hier liegt keine Signifikanz vor. Die LPS-Inhalation zeigt keinen statistisch signifikanten Effekt auf die gemessene IgG-Konzentration im Hirngewebe.

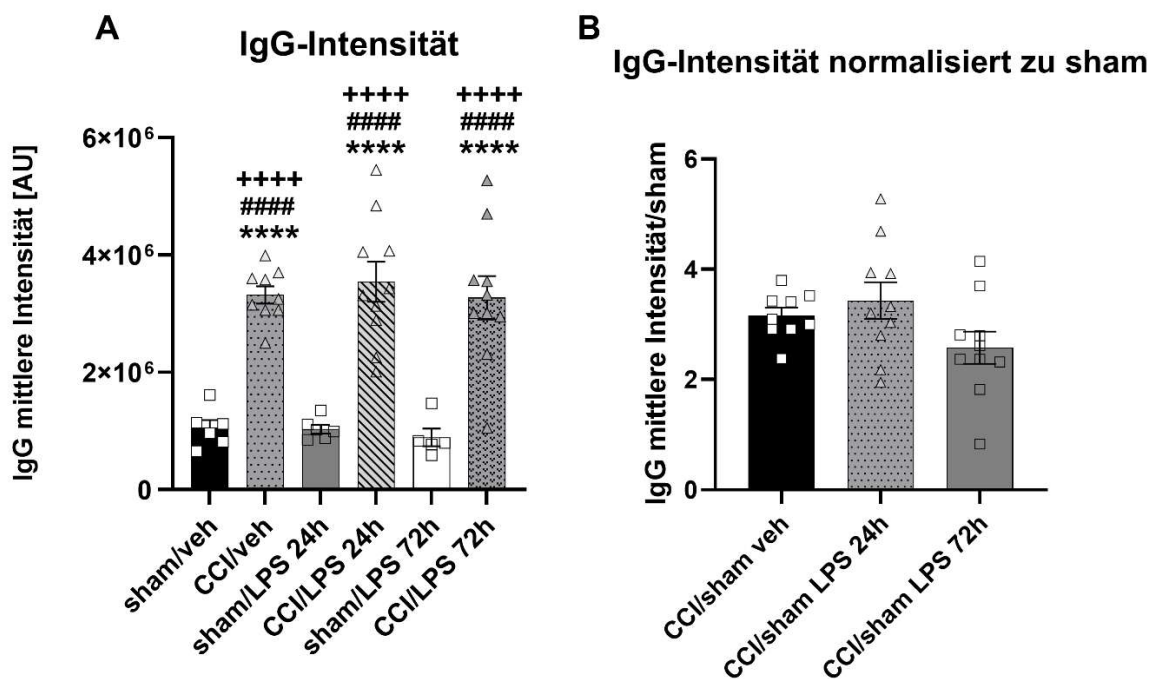


Abbildung 29: Ergebnisse des Dot Blots

Dargestellt sind die mittlere Intensität von IgG (**A**) und IgG-Intensität normalisiert zur jeweiligen Sham-Gruppe (**B**). Der CCI verursacht eine signifikant erhöhte Konzentration an IgG im Hirngewebe. Die zusätzliche Inhalation von LPS hat dagegen keinen signifikanten Effekt. Bei der alleinigen Betrachtung der Sham/LPS-Gruppen fällt eine Abnahme der IgG-Konzentration in der Gruppe LPS-Inhalation nach 72 Stunden auf. Die gleiche Beobachtung kann nach Normalisierung gegen Sham gemacht werden. Diese Beobachtungen sind nicht signifikant. Die Säulendiagramme zeigen die Untersuchungsgruppen gegen die mittlere Intensität [AU] von IgG aufgetragen. Die Darstellung der Parameter erfolgt als MW \pm SEM. Die Normalisierung zu den Sham-Gruppen erfolgt durch Division der Werte der CCI-Gruppe mit den MW der Sham-Gruppen. Die Ergebnisse werden auf eine Normalverteilung mittels D'Agostino & Person, Anderson-Darling, Shapiro-Wilk und Kolmogorov-Smirnov Test überprüft und mit dem Grubbs' test ($\alpha = 0,05$) von Ausreißer bereinigt. Es wurden zwei Werte in (**A**; 1 in CCI/veh, 1 in Sham/LPS 72h) und ein Wert in (**B**; 1 in CCI/sham Veh) ausgeschlossen. Die Ermittlung der p-Werte erfolgt durch One-way-ANOVA, gefolgt von Holm-Šidák multiple comparisons test (**** = signifikant zu Sham/Veh, $p < 0,0001$; ##### = signifikant zu Sham/LPS 24h, $p < 0,0001$; ++++ = signifikant zu Sham/LPS 72h, $p < 0,0001$).

6 Diskussion

6.1 Kombiniertes CCI- und LPS-Modell an der Maus

Nagetiermodelle sind bisher im weiten Feld der Neurowissenschaften unersetzlich und bieten gerade in der SHT-Forschung Einblicke in pathophysiologische Vorgänge, die es ermöglichen auf der Basis dieser Forschungsarbeiten vielversprechende, potenzielle Therapien für den Menschen abzuleiten. Aufgrund der häufigen Anwendungen besitzen sie ein hohes Maß an Standardisierung und bieten durch etablierte Auswertungsparameter eine gute Vergleichbarkeit (204, 240). Allerdings sind die aus SHT-Tiermodellen gewonnenen Untersuchungsergebnisse nicht vollständig auf den Menschen übertragbar, da kein gängiges Modell eine perfekte Nachahmung des menschlichen Zustands bietet (128).

Das in dieser Arbeit verwendete CCI-Modell zeichnet sich durch konsistente und reproduzierbare Verletzungen aus, was für eine hohe Reliabilität des Modells spricht (206). Diese beinhalten u.a. intrazerebrale Blutungen, Kontusionen, Lazerationen, DAI, Ödembildung, ICP-Erhöhung, Reduktion des CBF, Stoffwechsellstörungen und Neuroexzitation und -inflammation (128, 199, 202, 206). Die Verletzungsmuster und pathophysiologischen Kaskaden zeichnen sich durch ein hohes Maß an Übereinstimmung mit denen, die bei einem SHT gefunden werden, aus (7, 8, 124). Aufgrund seines Versuchsaufbaus wird ein CCI immer eine Kontusionsverletzung durch die mechanische Krafteinwirkung verursachen. Doch nicht jedes SHT geht auch zwangsläufig mit einer Kontusion einher (241). Gleichzeitig muss erwähnt werden, dass es durch die Präparation der Kalotte und der somit freiliegenden Dura mater zu einem persistierenden Duraleck während der Operation kommen kann (206). Hierbei können pathophysiologische Vorgänge, wie z.B. die Erhöhung des ICP aufgrund von Ödembildung und Blutungen, modifiziert werden.

Zusammengenommen ist das CCI-Modell geeignet, um wesentliche Verletzungsmuster wie Kontusion, Hämorrhagie und DAI und pathophysiologische Vorgänge eines schweren SHT zu erzeugen und führt zu einer hohen Reliabilität im Vergleich zu anderen SHT-Modellen (202, 204, 206). Ferner hat die Arbeitsgruppe nunmehr über zehn Jahre Erfahrung in der Anwendung des CCI-Modells, was einen robusten Versuchsaufbau mit geringer Fehleranfälligkeit unterstützt.

Die Verabreichung von LPS durch i.p. und intranasale Injektion oder direkte intratracheale Installation sind gängige Modelle zur Induktion einer ALI und / oder Sepsis und sind geeignet, um intensive lokale und systemische Inflammationsreaktionen hervorzurufen (207, 242-245). Die inhalative Verabreichung von LPS über einen Inhalator gehört bisher noch zu den neueren Methoden zur Induktion einer pulmonalen Inflammation und ist ebenfalls geeignet, um eine starke lokale, pulmonale und verzögerte systemische Inflammation hervorzurufen (22). Eine

weitere Studie von Costa et al. 2017 unterstützt diese Ergebnisse. Hier kann zusätzlich eine noch fünf Wochen nach Exposition persistierende pulmonale Inflammation und Reorganisation von Lungengewebe mit Septenbildung durch Kollagen nachgewiesen werden (21). Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass inhalativ verabreichtes LPS zur Induktion eines ALI geeignet scheint und in dieser Studie berechtigterweise als Modell verwendet wird. Es kann sogar gesagt werden, dass durch die einfache Anwendung, die gute Reproduzierbarkeit und die niedrige Invasivität eine Überlegenheit gegenüber herkömmlichen Modellen besteht.

Ein Nachteil der Nutzung von LPS-Modellen besteht in der nur inkompletten Darstellung der Realität, da LPS als Bestandteile der gramnegativen bakteriellen Zellwand außerhalb der Laborbedingungen nur in Form von lebenden Bakterien in den jeweiligen Organismus gelangen. Eine isolierte Verabreichung von LPS kann sich also in dem tatsächlichen Effekt im Menschen mit SHT unterscheiden (207).

Eine weitere Einschränkung in der Übertragbarkeit der Ergebnisse besteht in der Nutzung des LPS-Modells bei Mäusen. Die LPS-induzierte pulmonale Inflammation wird hauptsächlich durch den TLR4-Signalweg getragen. Dieser TLR4-Rezeptor bei Mäusen besitzt jedoch nur eine 48%ige Übereinstimmung mit dem von Menschen und die TLR4-vermittelte Immunantwort wird beim Menschen zusätzlich durch TLR2 modifiziert (207). Außerdem besitzen Mäuse eine von Natur aus erhöhte NO-Produktion. NO wirkt in diesem Kontext als negativer Regulator der Inflammationsreaktion und verringert die Aktivierung proinflammatorischer Signalwege. Dieser Effekt könnte das Ausmaß an Inflammation und Gewebeschädigung verringern und führt zu einer Resistenz der Maus gegenüber LPS (207, 220, 246, 247). Der Hauptnachteil der inhalativen Verabreichung von LPS gegenüber den herkömmlichen Applikationswegen besteht in der nicht messbaren, von den Mäusen aufgenommenen Gesamtkonzentration von LPS. Dies macht die Vergleichbarkeit zu anderen Studien mit z.B. intratrachealen Installationen schwierig und stellt so eine erhebliche Einschränkung dieser Arbeit dar.

Ferner werden durch die American Thoracic Society (ATS) relevante Messmethoden und deren Merkmale für experimentelles ALI in Tiermodellen definiert. Diese umfassen histologische Nachweise von Gewebeschäden, Veränderungen der alveolo-kapillären Permeabilität, das Vorhandensein einer Inflammationsreaktion und physiologische Dysfunktion (248). Es sollten laut ATS mindestens drei der vier genannten Merkmale nachzuweisen sein, um ein ALI im Tiermodell diagnostizieren zu können (248). In der vorliegenden Studie kann bis auf den Nachweis einer Inflammationsreaktion kein weiteres Merkmal nachgewiesen werden. In einem zukünftigen Studiendesign könnte es deshalb von Vorteil sein, histopathologische Untersuchungen am Lungengewebe vorzunehmen, um so

eine bestmögliche Vergleichbarkeit zu pathophysiologischen Veränderungen im Menschen zu schaffen.

Den vorherigen Ausführungen folgend ist die Eignung des CCI-Modells zur experimentellen Induktion eines SHT und seiner pathophysiologischen Veränderungen gegeben. Ebenso eignet sich ein inhalatives LPS-Modell, um eine pulmonale und systemische Inflamationsreaktion hervorzurufen. Diese Reaktion hat ein frühes Maximum und ist im Nachgang durch ein zügiges Abfallen der gängigen Inflamationsparameter gekennzeichnet (22). Daher sollte in zukünftigen Untersuchungen eine repetitive Exposition der Versuchstiere zur Aufrechterhaltung des inflammatorischen Reizes in Betracht gezogen werden.

Die in dieser Studie vorgenommene Kombination beider Modelle mit Induktion eines SHT durch CCI und anschließender inhalativer Exposition gegenüber LPS nach 24 Stunden oder 72 Stunden postoperativ spiegelt zum einen eine mögliche frühe Infektion durch SHT-induzierte Immunsuppression wider. Eine solche Infektion erhöht die Mortalität und resultiert in gesteigerter Neuroinflammation mit schlechtem neurologischem Outcome (11). Zum anderen können so neuroinflammatorische Einflüsse von LPS in Abhängigkeit des zurückliegenden posttraumatischen Zeitintervalls untersucht werden. Daneben kann die Verwendung eines CCI-Modells in Kombination mit einem inhalativen LPS-Modell zu einer Verstärkung der nach SHT auftretenden gesteigerten oxidativen Aktivität führen und die Produktion proinflammatorischer Zytokine (u.a. IL-6) im pulmonalen Gewebe massiv verstärken (249).

6.2 Neuromotorische und kognitive Defizite

Die durchgeführten verhaltensbiologischen Testungen wurden täglich zur gleichen Uhrzeit und vom gleichen Untersucher durchgeführt. Die Validität der Untersuchungsergebnisse wird durch festgelegte Zeitpunkte für die Beurteilung und Versuchsdurchführung erhöht. Auf diese Weise konnte sichergestellt werden, dass der Einfluss auf das Verhalten der Tiere, etwa durch Stress, der durch verschiedenste Faktoren verursacht werden kann, minimiert wird (250). Zudem wurde eine korrekte Handhabung der Mäuse durch den Durchführenden gewährleistet. Dazu gehört z.B., dass das Herausnehmen der Mäuse aus ihren Käfigen nicht durch Hochheben an ihrem Schwanz geschieht und eine moderate Beleuchtung des Untersuchungslabors gegeben ist (251). Veränderungen des Wohlbefindens der Tiere wurden durch das indirekte Monitoring des Fressverhaltens sichergestellt. Hierzu dient in der vorliegenden Studie die Gewichtskontrolle vor dem Durchführen der Untersuchungen. Anders als in früheren Studien (155, 239, 252) konnte in der vorliegenden Studie keine signifikante

Abnahme des Körpergewichts nach CCI in Kombination mit LPS-Inhalation beobachtet werden. Dies kann als Maß für den allgemeinen Gesundheitszustand angesehen werden, da Krankheitszustände bei Mäusen schnell zu Änderungen des Fressverhaltens und einer Abnahme des Körpergewichts führen (253, 254).

Eine weitere Möglichkeit, das Wohlbefinden zu überwachen, ist die Beurteilung des Nestbauverhaltens (255), was in dieser Studie allerdings nicht durchgeführt worden ist. Darüber hinaus kann eine Verschlechterung der Versuchstiere im Beobachtungszeitraum durch kontinuierliches Temperaturmonitoring frühzeitig detektiert werden (256). Dabei ist eine gute Korrelation zwischen Temperatur und Schwere der Verletzung bis hin zum Tod nachgewiesen worden. Dies ermöglicht ein frühzeitiges Beenden des Experiments für so identifizierte Mäuse und verringert unnötiges Leid der Versuchstiere (256). Ein Temperaturmonitoring oder die Evaluierung des Nestbauverhaltens war in dieser Studie nicht vorgesehen, sollte jedoch für zukünftige Entwürfe in Erwägung gezogen werden, insbesondere weil LPS pyrogen ist (257).

Ein SHT hat sowohl beim Menschen als auch bei der Maus neuromotorische und kognitive Funktionseinschränkungen zur Folge. Diese können im Tiermodell durch diverse verhaltensbiologische Tests erfasst werden. Zur Testung der neuromotorischen und -sensorischen Fähigkeiten haben sich der NSS und das RR etabliert. Beide Verfahren werden seit Jahren sowohl in der neurowissenschaftlichen Forschung als auch in der Arbeitsgruppe Neuroprotektion verwendet und stellen verlässliche Messinstrumente zur Evaluation der Einschränkungen dar (155, 258-260).

Die Ergebnisse dieses Experimentes haben sowohl im NSS als auch im RR erwartungsgemäß eine signifikante neuromotorische Beeinträchtigung der Versuchstiere der CCI-Gruppen unabhängig von der Exposition gegenüber LPS gezeigt. Die LPS-Inhalation hatte jedoch keinen unmittelbaren Effekt auf die neuromotorischen und -sensorischen Fähigkeiten der Mäuse. Auch verschlechterte sie die neurologische Beeinträchtigung nach CCI nicht. Dieses Ergebnis steht im Kontrast zu einer erst kürzlich erschienenen Studie, in der mit inhalativem LPS behandelte Mäuse signifikante neurologische Beeinträchtigungen im NSS unmittelbar nach dieser Behandlung zeigten (22). Allerdings sind diese Beeinträchtigungen in den darauffolgenden Untersuchungstagen fast vollständig abgeklungen und haben zu keinem Zeitpunkt die zwei-Punktmarke des NSS überschritten (22). Wird der gesamte Beobachtungszeitraum betrachtet, kann im Gesamten eine Übereinstimmung mit den hier erhobenen Daten festgehalten werden. Dies mag an der Unzulänglichkeit des NSS und RR, höhere kognitive Funktionen zu erfassen, liegen. In anderen Studien bezüglich LPS-induzierter Neuroinflammation und / oder SAE werden Beurteilungen des räumlichen und emotionalen Lernens und des Langzeitgedächtnisses miteinbezogen. Die Ergebnisse dieser Studien zeigen einen negativen Einfluss des LPS auf höhere kognitive Funktionen (28, 184).

Um Verhaltensänderungen wie Ängstlichkeit der Versuchstiere detektieren zu können, wurde der OFT und der EPM durchgeführt (261). Der OFT konnte keinen Einfluss eines CCI in Kombination mit einer LPS-Inhalation unabhängig vom Zeitpunkt feststellen. Die Analyse des EPM ergab im Gegensatz zum OFT Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen und könnte daher als ein sensitiverer Test angesehen werden. Es zeigte sich, dass die Kombination aus CCI und nachfolgender LPS-Inhalation nach 24 Stunden das Angst- und Explorationsverhalten der Versuchstiere signifikant gegenüber denen, die eine LPS-Inhalation 72 Stunden nach CCI erhalten hatten, veränderte. Die Tiere der Gruppe CCI/LPS 24h zeigten ein verstärktes Explorationsverhalten und waren weniger ängstlich, was aus den Ergebnissen der verbrachten Zeit in den offenen Armen und der Frequenz der Kopfsenkungen über die Dauer des Versuchs abgeleitet werden kann (215, 216). Frühere Studien belegen einen angstmodifizierenden Effekt eines CCIs bei Mäusen (252, 262), was das Auftreten von affektiven Störungen nach einem SHT untermauert (141). LPS-Inhalation scheint diesen Effekt abhängig von der zurückliegenden posttraumatischen Zeitspanne zu verändern.

Ein Grund dafür, dass keinerlei Einfluss der Interventionen auf das Angstverhalten der Mäuse im OFT, im EPM jedoch schon, nachgewiesen werden konnte, könnte an der detaillierteren Analyse des Angstverhaltens, der höheren Validität und der Spezifität des EPMS gegenüber des OFT liegen (263). Der OFT ist anfälliger für externe Variablen wie z.B. Umweltfaktoren (264).

6.3 Posttraumatisches Läsionsvolumen

Ein SHT ist per Definition unabhängig vom Schweregrad mit dem Untergang von Hirngewebe assoziiert (7, 265). Dabei gilt: je schwerer das SHT, desto größer ist der primäre Hirnschaden und das potenzielle neurologische Defizit (266). Ein CCI-Modell ist wie zuvor beschrieben geeignet SHT-typische Veränderungen auf makroskopischer, histologischer und pathophysiologischer Ebene hervorzurufen. Die hier gewählten CCI-Induktionsparameter (Durchmesser Implikatorspitze: 3 mm, Aufprallgeschwindigkeit: 6 m / s, Aufpralldauer: 200 ms, Eindringtiefe: 1,5 mm) entsprechen denen, die in vergleichbaren Experimenten alle Kriterien für ein induziertes schweres SHT bei den Versuchstieren erfüllen (267).

Ergänzend dazu konnten neuromotorische Defizite, Veränderungen in natürlichen Verhaltensweisen der Mäuse und ein histologisches Korrelat, passend zu einem schweren SHT, nachgewiesen werden. Der histologische Nachweis basiert auf der Kresylviolett-Färbung nach Nissl (221). Dabei werden vor allem basophile Strukturen wie DNA und RNA violett eingefärbt (221). Es kann also von einer Methode zur Färbung von vor allem intakten

Neuronen gesprochen werden. Entsprechend ist eine verminderte Farbtintensität mit einem Untergang von Neuronen im Präparat zu deuten (268). Es handelt sich um eine in der Arbeitsgruppe Neuroprotektion etablierte, in vorherigen Arbeiten eingesetzte Methode (155, 239, 252, 258, 260).

In der vorliegenden Studie konnte in Konsistenz zu vorherigen Arbeiten (155, 252, 260, 269) eine signifikante Läsion nach CCI festgestellt werden. Diese Läsion reichte teilweise bis in das Ventrikelsystem und verursachte ebenfalls eine signifikante Schädigung des Hippocampus. Eine posttraumatische LPS-Inhalation hatte dagegen keinen Einfluss auf das Ausmaß der Läsion. Diese Ergebnisse sind mit zuletzt veröffentlichten Studien vereinbar, die zwar neuroinflammatorische Effekte von LPS nachweisen können, aber keine Läsionsvolumensteigernden Effekte (270, 271).

Dem gegenüber stehen Untersuchungen, die eine signifikant reduzierte Kontusionsgröße im Rahmen von prätraumatischer LPS-Injektion nachweisen können (272, 273). Anzumerken ist, dass in den erwähnten Studien die LPS-Injektion i.p. erfolgt. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse der aufgeführten Studien ist somit eingeschränkt, da eine i.p.-Injektion vor allem zur Induktion von systemischen Entzündungsreaktionen verwendet und eine inhalative oder auch intratracheale Verabreichung initial eine lokale Inflammationsreaktion hervorruft.

Neben den unterschiedlichen Verabreichungszeitpunkten (prä- und posttraumatisch) ist ein potenzieller Unterschied in der Dosierung zu der hier durchgeführten Arbeit festzuhalten. Wie zuvor beschrieben (s. *Kapitel 4.2.2.4 LPS-Inhalation*) ergibt sich nach vollständiger Verneblung der LPS-Lösung eine minimale Exposition der Mäuse von 17,6 µg LPS / min. Bei einem durchschnittlichen Körpergewicht der Tiere von ca. 20 g und einer durchschnittlichen Restzeit im Aerosol von 15 Minuten ergibt sich eine minimale inhalative Exposition von 13,2 mg LPS / kgKG. Diese Dosis basiert zwar auf theoretischen Annahmen, ist aber deutlich höher als die i.p. Injektion von 1 mg / kgKG (270, 271) oder die prätraumatische Konditionierungsdosis von 0,1 mg / kgKG (272). Des Weiteren kann in zwei anderen Untersuchungen, die die Inflammationsreaktion nach inhalativer LPS-Exposition und intratrachealer Injektion vergleichen, festgestellt werden, dass die inhalative Exposition zu einer mindestens vergleichbaren, wenn nicht sogar vermehrten, lokalen Inflammationsreaktion bei ähnlichen verabreichten LPS-Dosen führt (274, 275). Dies unterstreicht nochmalig die Notwendigkeit, eine genauere Messmethode für die den Tieren verabreichte LPS-Dosis zu etablieren.

6.4 Aktivierung von Gliazellen im Hippocampus

Die durch ein SHT hervorgerufene Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten spielt über die Verstärkung der auftretenden Neuroinflammation eine der zentralen Rollen in der pathophysiologischen Kaskade des sekundären Hirnschadens und ist durch viele Studien mit unterschiedlichsten Bedingungen belegt (7, 8, 100, 123). Ebenso reicht eine singuläre LPS-Exposition aus, um Gliazellen zu aktivieren (22, 192). Der immunhistochemische Nachweis von aktivierten Astrozyten gelingt durch Nutzung eines Antikörpers gegen GFAP. Denn dieses aus der Familie der Proteine des Zytoskletts stammende Protein wird u.a. durch Trauma und neurodegenerative oder genetische Erkrankungen in seiner Expression massiv gesteigert. Daher hat sich GFAP als Marker einer reaktiven Astroglieose etabliert (223). Der Nachweis von aktivierten Mikroglia erfolgt durch die Verwendung eines AK gegen CD68. Dieses Glykoprotein gilt als etablierter Marker für aktivierte Makrophagen, Monozyten und Mikroglia (224). Die Betrachtung der hervorgerufenen Aktivierung von Gliazellen im Hippocampus und der damit verbundenen histopathologischen Veränderung ist von besonderem Interesse, da dieser eine zentrale Rolle bei kognitiven Funktionen und Gedächtnisprozessen spielt, die infolge eines SHT häufig beeinträchtigt werden (276).

Entgegen vorherigen Untersuchungen, in denen ein periläsionaler Anstieg von CD68 und GFAP nach CCI immunhistochemisch nachgewiesen werden konnte (239, 252, 277), gelang dieser Nachweis im Hippocampus außer in der Gruppe CCI und LPS-Inhalation nach 24 Stunden für CD68 hier nicht. Interessanterweise führte eine LPS-Exposition 72 Stunden nach CCI zu signifikant weniger Astroglieose und aktivierter Mikroglia im ipsiläsionalen Hippocampus. Ferner kam es in dieser Gruppe auch zu einer reduzierten Astroglieose im kontralateralen Hippocampus. Die Ergebnisse waren für GFAP sowohl gegenüber CCI und nachfolgender LPS-Inhalation nach 24 Stunden als auch zur Veh-Inhalations-Gruppe signifikant. Für CD68 konnte in der Gruppe CCI mit LPS-Inhalation nach 24 Stunden sowohl eine gesteigerte CD68-Aktivierung ipsiläsional gegenüber der Gruppe CCI mit LPS-Inhalation nach 72 Stunden, als auch kontraläsional gegenüber beiden Vergleichsgruppen (CCI/Veh und CCI/LPS 72h) gezeigt werden. Diese Ergebnisse sind insofern unerwartet, als es LPS auch ohne das Vorhandensein eines CCI möglich ist, über den TLR4-Signalweg Mikroglia (28, 192) und Astrozyten (192, 195) zu aktivieren. Auch die Expression von GFAP wird zu einem großen Teil über den Transkriptionsfaktor NF- κ B reguliert (278) und ist somit durch LPS stimulierbar. Bei vorausgehendem CCI und nachfolgender LPS-Exposition wäre daher eher eine überschießende Aktivierung von Astrozyten, GFAP-Expression und Mikroglia zu erwarten gewesen. Andererseits kann eine Abnahme der GFAP-Expression auch auf eine Schädigung von Astrozyten und veränderte Aktivierung mit Einschränkung neuronaler Reparaturprozesse hindeuten (279). Eine geringe reaktive Astroglieose nach SHT kann mit

einer schlechteren Prognose assoziiert sein (280). Daneben ist ein proteolytischer Abbau von GFAP durch Enzyme wie Calpain oder Caspase-6 möglich, was zur verringerten Immunreaktivität führt, obwohl die Astrozyten weiterhin vorhanden sind (279).

Durch immunhistochemische GFAP-Färbung lassen sich reaktive Astrozyten bis zu 30 Tage nach Trauma nachweisen (281). Dadurch ist jedoch keine Unterscheidung zwischen A1- und A2-Subtypen (analog zu M1- und M2-Mikroglia) der Astrozyten möglich. Die Transformation in den proinflammatorischen A1-Subtypen wird überwiegend durch über LPS aktivierte M1-Mikroglia (282), die Zytokine wie IL-1 α , TNF und Komplementkomponente eins Subkomponente q (C1q) freisetzen, induziert (131). Ein immunhistochemischer Nachweis von C3 oder Guanin-Nucleotid-Bindungsprotein 2 (GBP2) kann als Marker für A1-Astrozyten und S100 Calcium-bindendes-Protein A10 (S100a10) zum Nachweis von A2-Astrozyten genutzt werden (282). Die Unterscheidung zwischen A1- und A2-Astrozyten hätte im Kontext der Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung dieser Arbeit Rückschlüsse auf das Überwiegen pro- oder antiinflammatorischer Einflüsse auf die Hippocampuszellen geben können, wodurch eine differenziertere ursächliche Betrachtung der reduzierten GFAP-Färbung bei den Tieren möglich gewesen wäre.

Eine weitere Möglichkeit zur Erklärung der Ergebnisse besteht darin, dass durch die inhalative Exposition von LPS zwar eine frühe, starke, lokale, aber verzögerte neuronale Inflamationsreaktion hervorgerufen wird. Es kann nachgewiesen werden, dass diese verzögerte Inflammation mit Aktivierung von Astrozyten und erhöhter GFAP-Expression einhergeht. Dabei ist es wichtig, dass die lokale Reaktion nach 72 Stunden bereits wieder stark rückläufig ist, während die neuronale Inflammation erst nach Verstreichen dieser Zeitperiode messbar wird und ihren Peak 96 Stunden nach LPS-Inhalation erreicht (22). Wenn diese Daten nun auf die hier erhobenen übertragen werden, ist festzuhalten, dass die posttraumatische LPS-Exposition nach 72 Stunden einem darauffolgenden Beobachtungszeitraum von genau 96 Stunden entspricht, da alle Tiere nach sieben Tagen euthanasiert wurden. Hieraus lässt sich ableiten, dass in den Tieren, die eine LPS-Inhalation nach 72 Stunden erhalten haben, eine Aktivierung von Gliazellen messbar sein sollte. Tatsächlich konnte eine erhöhte absolute GFAP- und CD68-Expression in dieser Sham-Gruppe, wenn auch ohne Signifikanz, beobachtet werden. Folgt in dieser Situation eine Normalisierung der Daten gegenüber der jeweiligen Sham-Gruppe, können daraus vermeintlich niedrige Werte generiert worden sein. Eine gesteigerte Gliazellaktivierung war in der Sham/LPS 24h-Gruppe nicht zu beobachten. Dies könnte ein Zeichen für bereits reduzierte Aktivierung von Gliazellen sein.

Dem gegenüber stehen Arbeiten, bei denen andere Applikationswege von LPS wie z.B. i.p. genutzt werden. Dort kann zwar nach 24 Stunden ein früher Peak in der Aktivierung von Gliazellen gezeigt werden, der im weiteren Beobachtungszeitraum wieder fällt, aber bis zu 14

Tage nach Exposition anhält (236). Auch kann in einem Beobachtungszeitraum von insgesamt fünf (192) bis sieben (283) Tagen eine anhaltende Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia gezeigt werden. Der Versuchsaufbau entspricht durch den unterschiedlichen Applikationsweg von LPS jedoch nicht dem, der in dieser Studie und von Ritter et al. (22) genutzt wurde, wodurch die Ergebnisse nur eingeschränkt übertragbar sind.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass weitere Untersuchungen mit längeren Beobachtungszeiträumen benötigt werden, um zu verifizieren, ob die Kombination aus SHT und posttraumatischer LPS-Inhalation nach 72 Stunden zu geringerer Gliazellaktivität im Hippocampus führt oder die hier gefundenen Ergebnisse einem Bias aufgrund frühzeitiger Euthanasie unterliegen.

6.5 Neuro- und pulmonale Inflammation

Die inhalative Exposition von LPS scheint wie zuvor beschrieben (s. 6.1 *Kombiniertes CCI- und LPS-Modell an der Maus*) und in vorherigen Arbeiten belegt (21, 22) zur Induktion einer pulmonalen Inflammationsreaktion geeignet. Dazu wird neben der histologischen Beurteilung des Gewebes üblicherweise die Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β , IL-6 oder TNF- α nachgewiesen (21, 22). Sie zeigen nicht nur die proinflammatorische Zytokinantwort von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten, die durch die LPS / TLR4-Interaktion vermittelt wird (164, 171), sondern können auch verstärkt bei Patienten mit inflammatorischer Lungenschädigung, ARDS und Sepsis synthetisiert werden (284, 285). Die Messung von IL-1 β und TNF- α erfolgte in dieser Arbeit nicht. Dafür erfolgte zusätzlich zu IL-6 die Analyse der mRNA-Expression von CD68, MRC1, SLPI und Lyz2. Wie auch im Hirngewebe dient CD68 als Marker für aktivierte Makrophagen (224). Wohingegen der Nachweis von MRC1-Expression als Anhalt für eine M2-Polarisation der alveolären Makrophagen genutzt werden kann (286, 287). SLPI wird als Indikator für antimikrobielle und antiinflammatorische Aktivität verwendet (288). Ebenso ist Lyz2 ein Marker für neutrophile Granulozyten, die im Rahmen einer LPS-induzierten akuten Inflammationsreaktion in der Lunge eine wichtige Rolle spielen. Zusammengenommen repräsentieren die hier untersuchten Genexpressionen die humorale pulmonale Immunantwort der Versuchstiere.

Eine LPS-Inhalation 72 Stunden posttraumatisch hatte eine gesteigerte pulmonale CD68-Expression sowohl in der scheinoperierten als auch in der Trauma-Gruppe, zur Folge. Diese Resultate suggerieren eine bereits abklingende Entzündungsreaktion in den nach 24 Stunden exponierten LPS-Gruppen (Sham und CCI) und unterstützen die Aussage, dass LPS-Inhalation eine nur kurz anhaltende lokale Inflammationsreaktion der Lunge erzeugt (22). Ebenso konnte eine gegen alle anderen Gruppen gesteigerte MRC1-Expression durch die

Kombination SHT und LPS-Inhalation nach 72 Stunden gezeigt werden. Lediglich zur dazugehörigen Sham-Gruppe zeigten die Ergebnisse keine Signifikanz, was für keinen Effekt des CCIs spricht. Obwohl eine mögliche Interaktion zwischen Gehirn und Lunge durchaus zu erwarten gewesen wäre, da es im Rahmen eines SHT zu BHS-Permeabilitätsstörungen, die auch in dieser Arbeit gezeigt werden konnten, mit Dissoziation von u.a. proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und EVs in den systemischen Kreislauf kommt (187). Es folgt eine systemische Inflammation, die auch die Lunge betrifft. In anderen Arbeiten kann gezeigt werden, dass eine solche systemische Inflammation, ausgelöst durch ein SHT, zur Aktivierung und Differenzierung von alveolären Makrophagen beitragen kann (16, 289). In der Analyse der restlichen mRNA von IL-6, Lyz-2 und SLPI kam es zu keiner erwähnenswerten Änderung. Zusammengefasst konnte kein messbarer Effekt der Kombination eines SHT mit nachfolgender LPS-Inhalation auf die humorale Immunantwort im Lungengewebe festgestellt werden.

Wie zu erwarten und im Einklang mit vorherigen Untersuchungen (155, 239) verursachte ein SHT in allen Gruppen eine Erhöhung der BHS-Permeabilität, gemessen durch die Extravasation von IgG ins Hirngewebe. Dieses Eindringen von IgG ins Hirnparenchym wurde auch in anderen Arbeiten als guter Indikator einer BHS-Störung identifiziert (290, 291). Eine mögliche Interaktion von LPS mit TLR4 auf den Endothelzellen der BHS und folgende TLR4-Signalkaskaden, die ultimativ zur Schädigung von Tight Junctions und der Basalmembran und somit zum Verlust der BHS-Integrität führen (190, 191), bleibt nicht auszuschließen. In diesem Experiment konnte jedoch kein Effekt einer posttraumatischen LPS-Inhalation nachgewiesen werden. Um diesen Zusammenhang näher zu untersuchen, könnten in Zukunft mit den vorliegenden Gewebeproben Analysen zur Expression von Tight Junction Genen / Proteinen mittels qPCR, Immunhistologie und Western Blot durchgeführt werden.

Der Verlust der BHS-Integrität und die Erhöhung ihrer Permeabilität führen u.a. zur Migration weiterer peripherer Immunzellen, Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen, Rekrutierung und Aktivierung weiterer Mikroglia und Astrozyten, wodurch die Inflammation im Hirngewebe verschärft wird (7, 8, 123). Die massive Aktivierung des ansässigen Immunsystems und Neuroinflammation, die auf ein SHT folgt, ist keine an sich pathologische Reaktion des Körpers. Sie stellt die natürliche primäre Abwehrreaktion des Organismus dar und weist sowohl positive als auch negative Eigenschaften auf. Während am Anfang die Abwehr von potenziell eindringenden Mikroorganismen, Reparatur und Beseitigung des abgestorbenen Gewebes stehen, kann persistierende Inflammation zu Neurodegeneration und Persistenz neuronaler Pathologien beitragen (7, 90, 97, 292). Essenziell für den Prozess der Neuroinflammation sind das Zusammenspiel von peripheren Immunzellen und v.a. Mikroglia und Astrozyten, die sich gegenseitig in ihrer Wirkung in Feedback-Schleifen verstärken und aktivieren. Sie sind an allen zuvor beschriebenen Prozessen beteiligt und

spielen daher eine entscheidende Rolle in der Entwicklung des sekundären Hirnschadens. Gliazellen synthetisieren in ihrem M1- bzw. A1-Phänotyp u.a. proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β , IL-6 und TNF- α . Stellvertretend für die Zytokinproduktion wurde in dieser Arbeit die Expression von IL-6 im Hirngewebe der Versuchstiere gemessen. Es konnte zwar eine Hochregulation der IL-6 mRNA-Expression nach SHT festgestellt werden, jedoch demgegenüber kein signifikanter Effekt eines SHT in Kombination mit posttraumatischer LPS-Inhalation. Erwähnenswert war die im statistischen Trend erhöhte IL-6-Produktion bei einer LPS-Inhalation 24 Stunden nach Trauma gegenüber der Kontrolle und gegenüber der Inhalation nach 72 Stunden.

Je nach Differenzierungsstadium können aber auch antiinflammatorische Effekte überwiegen. In diesem Fall wird von M2-Mikroglia bzw. A2-Astrozyten gesprochen (97, 123). Für Mikroglia ist nachgewiesen, dass ihre Differenzierung zeitabhängig nach einem SHT variiert. In der Regel dominieren M1-Mikroglia in den ersten posttraumatischen Tagen. M2-Mikroglia hingegen erreichen ihren Höhepunkt ca. fünf Tage nach Trauma und fallen danach in ihrer Konzentration zugunsten der pro-inflammatorischen M1-Mikroglia ab (293, 294). Der Nachweis einer stark erhöhten Expression von CD68 und GFAP im gesamten Hirngewebe nach SHT konnte, wie in anderen Arbeiten auch, belegt werden (259, 260). Es spricht für eine starke Aktivierung von Gliazellen und kann somit auch als indirekter Marker für Neuroinflammation genutzt werden. Daneben wurde MRC1 als Marker für M2-Mikroglia (112) bestimmt. Hier wurde ebenfalls eine signifikant erhöhte Expression nach SHT nachgewiesen. Der inhalative LPS-Stimulus in dieser experimentellen Arbeit hat einen Einfluss auf die pathophysiologischen Kaskaden der Neuroinflammation gezeigt, wie die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung für den Hippocampus belegen. Bei Betrachtung der mRNA-Expression von CD68 und MRC1 konnte kein Effekt einer inhalativen LPS-Exposition gezeigt werden. Anders verhielt es sich in der GFAP-Expression. Diese war in der Gruppe CCI und LPS-Inhalation nach 24 Stunden größer als die Kontrolle und zumindest im statistischen Trend auch gegenüber der Inhalation nach 72 Stunden. Dieselbe Beobachtung konnte für IL-6 gemacht werden. In vitro Untersuchungen von posttraumatisch isolierten Mikrogliazellen können eine gesteigerte IL-6-Produktion nach LPS-Exposition zeigen (26). Neben einer lokalen, pulmonalen Immunantwort führt die inhalative LPS-Exposition zu systemisch erhöhten Inflamationsparametern (21, 22). Dies kann in einer Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten, einer Steigerung der Neuroinflammation und schlussendlich in einer SAE enden (295, 296). Daher ist die erhöhte GFAP-Expression nachvollziehbar. Die fehlende durch LPS-Inhalation gesteigerte Expression von CD68 und MRC1 als Marker für aktivierte Mikroglia war überraschend. Auch haben Studien gezeigt, dass das Hirngewebe gerade in der Frühphase nach einem SHT besonders anfällig für systemische Inflammation ist, was zu einer Intensivierung der Neuroinflammation führen kann (24, 26). Wie auch in den

immunhistochemischen Ergebnissen, konnte hier gezeigt werden, dass der Zeitpunkt der posttraumatischen LPS-Inhalation einen Unterschied in der Neuroinflammation verursachte. Zukünftige Untersuchungen sollten zeigen, ob diese Beobachtungen auch über einen längeren Beobachtungszeitraum zu sehen sind oder eventuell ein erneuter inhalativer LPS-Stimulus benötigt wird, um die Inflammation aufrechtzuerhalten.

6.6 Schlussfolgerungen

Die Notwendigkeit des Verständnisses der pathophysiologischen Vorgänge eines SHT ist zur Entwicklung neuer Therapien zur Reduktion des sekundären Hirnschadens essenziell. Gerade durch steigende weltweite Motorisierung nimmt die Inzidenz des SHT und damit auch die seiner Komplikationen stetig zu (5). Neben chronischen neurologisch-kognitiven Defiziten mit anhaltendem Leidensdruck für betroffene Menschen führen akute Erhöhungen systemischer Inflamationsparameter zur Beeinträchtigung weiterer Organe mit steigender Krankheitsschwere der Patienten. Darunter sind pulmonale Komplikationen wie Ventilator- oder Infekt-assoziierte Pneumonie, ALI und seine schwerste Form, das ARDS, seit Jahren steigend nach SHT (15, 17). Patienten nach einem SHT haben längere Aufenthaltszeiten auf Intensivstationen und durch schwere Beeinträchtigungen des ZNS, eine erhöhte Notwendigkeit, während ihres Aufenthaltes auf eine maschinelle Beatmung angewiesen zu sein. Somit ist das Risiko einer Ventilator-assoziierten Pneumonie und sonstiger pulmonaler Komplikationen in dieser Patientengruppe stark erhöht (15). Die inhalative Verabreichung von LPS wird in diesem Zusammenhang als Möglichkeit genutzt, eine bakterielle induzierte Inflamationsreaktion abzubilden. Die in dieser Arbeit genutzten unterschiedlichen Verabreichungszeitpunkte sollten zum einen die frühe Schädigung (24 h), ausgelöst durch Aspiration und Trauma, und zum anderen die später auftretenden (frühestens nach 48 h – LPS-Inhalation nach 72 h) pulmonalen Komplikationen wie die Ventilator-assoziierte Pneumonie (15) abbilden. Gleichzeitig kann eine LPS-vermittelte systemische Inflamationsreaktion zu anhaltender Neuroinflammation führen (28). Eine SAE kann sich entwickeln. Sie führt u.a. zu erhöhter Letalität und kognitiven Einschränkungen (185).

Um die Auswirkungen einer pulmonalen inflammatorischen Komplikation auf das Hirnparenchym nach SHT zu untersuchen, eignet sich dieses bisher neue CCI / LPS-Modell in besonderem Maße. Nicht nur diese Arbeit konnte durch inhalative LPS-Exposition eine Inflamationsreaktion im pulmonalen Gewebe nachweisen (22). Die geringe Invasivität, die einfache Reproduzierbarkeit und die niedrigen Kosten sprechen für sich. Ferner konnte hier eine erhöhte Neuroinflammation durch LPS-Inhalation 24 Stunden nach SHT gezeigt werden.

Die Versuchstiere zeigten eine erhöhte Expression proinflammatorischer Zytokine und reaktive Astroglie. Eine gesteigerte Neuroinflammation, ausgelöst durch LPS-Stimulus, ist durch mehrere Studien über den TLR4- und NF- κ B-Signalweg belegt (24, 26, 295, 296). Außerdem konnte in dieser Versuchsgruppe ein beeinträchtigtes Angstverhalten durch vermehrte Explorationen ungeschützter Bereiche im EPM gezeigt werden. Ein solches Verhalten spricht bei Nagetieren für kognitive Beeinträchtigung und kann ein erstes Anzeichen für das Auftreten von affektiven Störungen sein (141, 215). Diese Ergebnisse entsprechen den Erwartungen, dass eine auftretende pulmonale Komplikation zur Verschlechterung des neurologischen Outcomes führt (17) und zur Aufrechterhaltung inflammatorischer Prozesse beitragen kann (283).

Zudem konnte diese Arbeit feststellen, dass eine posttraumatische LPS-Inhalation nach 72 Stunden interessanterweise zu einer verminderten Aktivierung von Gliazellen im Hippocampus gegenüber Versuchstieren führte, die ausschließlich einem CCI unterzogen wurden. Eine geringere Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia, gezeigt durch immunhistochemische Färbung von GFAP und CD68, ist mit verringerter Neuroinflammation verbunden. Zahlreiche Studien belegen die wesentliche Rolle von Gliazellen in der Entwicklung von akuter und chronischer Neuroinflammation (7, 97, 123). Da der Hippocampus an vielen höheren kognitiven Funktionen, Gedächtnisbildung und Lernfähigkeit beteiligt ist (276), könnte hieraus eine geringere Rate an neurologisch-kognitiven Folgeerkrankungen wie Depressionen oder posttraumatischen Belastungsstörungen hervorgehen.

Eine vorherige Studie aus dieser Arbeitsgruppe konnte eine von 72 bis 96 Stunden verzögerte Neuroinflammation nach inhalativer LPS-Exposition zeigen (22). Dieses Zeitintervall entspricht dem Beobachtungszeitraum dieser Untersuchung für die Gruppen mit posttraumatischer LPS-Exposition nach 72 Stunden. Demnach ist aber keine weitere Aussage über längere Beobachtungszeiträume, wie der der früheren LPS-Inhalation nach 24 Stunden abzuleiten. Denn das vermeintlich bessere Abschneiden der späteren LPS-Gruppe in den Versuchen könnte Ausdruck einer bisher nicht abgeschlossenen Konvertierung der akuten systemischen Inflammation in erhöhte Neuroinflammation und anschließender Verschlechterung der neuromotorischen Fähigkeiten sein. Daher sind zukünftige Experimente mit längeren Versuchszeiträumen von bis zu 30 Tagen essenziell, um die hier erhobenen Unterschiede zwischen posttraumatischer LPS-Inhalation nach 24 und nach 72 Stunden zu verifizieren. Ebenso sollte eine Quantifizierung der inhalativ aufgenommenen LPS-Menge durchgeführt werden, da es Berichte über eine Immunpräkonditionierung durch Low-Dose-LPS im Bereich von 0,1 mg / kgKG gibt (272, 273). Außerdem ermöglicht dies eine Vergleichbarkeit zu ähnlichen Modellen, bei denen die LPS-Applikation über andere Verabreichungswege wie intratracheal oder i.p. erfolgt.

Zusammenfassend konnte diese Arbeit eine Modulation der pathophysiologischen Vorgänge nach SHT durch inhalative LPS-Exposition beweisen. Wobei das Ausmaß abhängig vom Zeitpunkt der posttraumatischen LPS-Inhalation zu sein scheint. Diese Entdeckung unterstreicht den in der bisherigen Literatur beschriebenen ambivalenten Einfluss von LPS. Wie durch diese Arbeit gezeigt und bereits dargelegt (siehe oben) existiert die Möglichkeit, dass ein systemischer oder inhalativer LPS-Stimulus Neuroinflammation auslöst und / oder verstärkt. Darüber hinaus können frühere Studien nachweisen, dass eine prätraumatische LPS-Behandlung zu geringeren absoluten Schadensvolumina, geringerer Neuroinflammation und verbessertem neurologischen Outcome führt (272, 273, 297). Hieraus lässt sich ableiten, dass zum einen der Zeitpunkt, an dem das Immunsystem mit LPS in Verbindung gebracht wird, als auch die verwendete LPS-Dosis eine Rolle zu spielen scheinen.

7 Zusammenfassung

Das Auftreten einer pulmonalen Komplikation, während der medizinischen Therapie nach Schädel-Hirn-Verletzungen, stellt mit einer Inzidenz von mindestens 20 % eine Komorbidität höchster Relevanz dar. Auch ohne das Vorhandensein einer zerebralen Schädigung können solche pulmonalen Komplikationen erhöhte Entzündungsparameter im Gehirnparenchym hervorrufen und das Risiko für neurologisch-psychiatrische Erkrankungen wie persistierende kognitive Dysfunktion und affektive Störungen erhöhen. Daher war es das Ziel dieser Arbeit, den Einfluss einer durch inhalative LPS-Exposition induzierten inflammatorischen pulmonalen Lungenschädigung auf die hirnpathologischen Entzündungsprozesse nach SHT zu untersuchen.

Zum Erreichen des Ziels wurden 48, acht bis zwölf Wochen alte, weibliche Mäuse des Stammes C57BL / 6JRj in die unterschiedlichen Versuchsgruppen randomisiert. Die Interventionsgruppen erhielten ein Controlled Cortical Impact. Je nach Gruppenzugehörigkeit wurden sie entweder nach 24 Stunden oder nach 72 Stunden einem pulmonalen inflammatorischen Stimulus durch inhalative LPS-Aufnahme ausgesetzt. Der gesamte postoperative Beobachtungszeitraum betrug sieben Tage. Während dieser Zeit wurden die Versuchstiere verschiedenen verhaltensbiologischen Testungen unterzogen. Nach Euthanasie der Tiere am siebten postoperativen Tag folgte die Präparation von Gehirn und Lunge, um Gewebematerial für die sich anschließenden histologischen, immunhistochemischen und molekulargenetischen Untersuchungen zu gewinnen.

Ein induziertes SHT durch CCI wies signifikante neuromotorische Defizite in den verhaltensbiologischen Untersuchungen und signifikante BHS-Permeabilitätsstörungen auf. Die postoperative LPS-Inhalation hatte keine Auswirkungen auf das neuromotorische Defizit oder die BHS-Permeabilität nach SHT. Noch konnte ein Effekt auf das Läsionsvolumen, Körpergewicht oder die Aktivität der Versuchstiere festgestellt werden. Die LPS-Inhalation 24 Stunden nach dem SHT konnte jedoch zu einer erhöhten Neuroinflammation und einer signifikant gesteigerten Expression von GFAP im Hirnparenchym führen. Gleichzeitig konnte in dieser Gruppe ein signifikant gestörtes Angstverhalten im EPM gezeigt werden. Im Kontrast zu diesen Ergebnissen schien eine spätere posttraumatische LPS-Inhalation nach 72 Stunden mit signifikant weniger Aktivierung von Astrozyten, gemessen an immunhistochemischer GFAP-Färbung, im ipsi- und kontraläsionalen Hippocampus herbeizuführen. Zusätzlich fiel in dieser Gruppe die CD68-Färbung im Hippocampus signifikant niedriger aus als der Vergleichsgruppe LPS-Inhalation 24 Stunden nach CCI. Bei Betrachtung der pulmonalen Genexpressionsanalysen konnte die LPS-Inhalation 72 Stunden nach Operation (Sham oder CCI) signifikant erhöhte CD68- und MRC1-Expressionen zeigen (nur für CCI).

Die in dieser Studie gewonnenen Ergebnisse lassen die zusammenfassende Aussage ableiten, dass eine nach CCI stattfindende LPS-Inhalation die pathophysiologischen Vorgänge, insbesondere die Neuroinflammation, moduliert. Das Ausmaß der Modulation scheint abhängig vom posttraumatischen Zeitpunkt der inhalativen LPS-Exposition zu sein. Die posttraumatische LPS-Administration ist in vielen Studien mit Aktivierung von Gliazellen, gesteigerter Neuroinflammation und Verschlechterung des neurologischen Outcomes verbunden. In der Literatur dokumentierte Ergebnisse weisen jedoch auch auf einen das Immunsystem präkonditionierenden Effekt von LPS hin, wenn sie prätraumatisch verabreicht werden, wodurch weniger Neuroinflammation beobachtet werden kann.

Dies untermauert die in diesem Experiment beobachtete unterschiedliche Reaktion des Immunsystems der Versuchstiere, die in Abhängigkeit des posttraumatischen Zeitintervalls bis zur LPS-Exposition steht. Da die Neuroinflammation einer der entscheidenden Faktoren in der Entwicklung des sekundären Hirnschadens ist, führt diese Erkenntnis unweigerlich zu der Notwendigkeit, zukünftige Untersuchungen mit längeren Beobachtungszeiträumen durchzuführen und so die hier gewonnenen Ergebnisse zu verifizieren, um die Auswirkungen einer inflammatorischen Lungenkomplikation auf das nach traumatischer Verletzung geschädigte Hirngewebe besser zu verstehen. Möglicherweise könnte dieses bessere Verständnis in der Zukunft zur Entwicklung erfolgsversprechender Therapien beitragen.

Literaturverzeichnis

1. Chikhladze N, Halliday F, Pitskhelauri N, Tsiskaridze A. Epidemiological features of traumatic brain injuries from a first-level trauma care national medical center in Georgia. *One Health Risk Manag.* 2023;4(2):5-11.
2. James SL, Theadom A, Ellenbogen RG, Bannick MS, Montjoy-Venning W, Lucchesi LR, et al. Global, regional, and national burden of traumatic brain injury and spinal cord injury, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology.* 2019;18(1):56-87.
3. Maegele M, Lefering R, Sakowitz O, Kopp MA, Schwab JM, Steudel WI, et al. The Incidence and Management of Moderate to Severe Head Injury. *Dtsch Arztebl Int.* 2019;116(10):167-73.
4. Peeters W, van den Brande R, Polinder S, Brazinova A, Steyerberg EW, Lingsma HF, et al. Epidemiology of traumatic brain injury in Europe. *Acta Neurochir (Wien).* 2015;157(10):1683-96.
5. Steyerberg EW, Mushkudiani N, Perel P, Butcher I, Lu J, McHugh GS, et al. Predicting outcome after traumatic brain injury: development and international validation of prognostic scores based on admission characteristics. *PLoS Med.* 2008;5(8):e165; discussion e.
6. McKee AC, Daneshvar DH. *The neuropathology of traumatic brain injury.* Elsevier; 2015. p. 45-66.
7. Orr TJ, Lesha E, Kramer AH, Cecia A, Dugan JE, Schwartz B, et al. Traumatic Brain Injury: A Comprehensive Review of Biomechanics and Molecular Pathophysiology. *World Neurosurg.* 2024;185:74-88.
8. Werner C, Engelhard K. Pathophysiology of traumatic brain injury. *Br J Anaesth.* 2007;99(1):4-9.
9. Wilson L, Stewart W, Dams-O'Connor K, Diaz-Arrastia R, Horton L, Menon DK, et al. The chronic and evolving neurological consequences of traumatic brain injury. *The Lancet Neurology.* 2017;16(10):813-25.
10. Howlett JR, Nelson LD, Stein MB. Mental Health Consequences of Traumatic Brain Injury. *Biol Psychiatry.* 2022;91(5):413-20.
11. Faden AI, Barrett JP, Stoica BA, Henry RJ. Bidirectional Brain-Systemic Interactions and Outcomes After TBI. *Trends Neurosci.* 2021;44(5):406-18.
12. Hendrickson CM, Howard BM, Kornblith LZ, Conroy AS, Nelson MF, Zhuo H, et al. The acute respiratory distress syndrome following isolated severe traumatic brain injury. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery.* 2016;80(6):989-97.
13. Hu PJ, Pittet J-F, Kerby JD, Bosarge PL, Wagener BM. Acute brain trauma, lung injury, and pneumonia: more than just altered mental status and decreased airway protection. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology.* 2017;313(1):L1-L15.
14. Kerr N, De Rivero Vaccari JP, Dietrich WD, Keane RW. Neural-respiratory inflammasome axis in traumatic brain injury. *Experimental Neurology.* 2020;323:113080.
15. Lee K, Rincon F. Pulmonary Complications in Patients with Severe Brain Injury. *Critical Care Research and Practice.* 2012;2012:1-8.
16. Kerr NA, De Rivero Vaccari JP, Abbassi S, Kaur H, Zambrano R, Wu S, et al. Traumatic Brain Injury-Induced Acute Lung Injury: Evidence for Activation and Inhibition of a Neural-Respiratory-Inflammasome Axis. *Journal of Neurotrauma.* 2018;35(17):2067-76.
17. Rincon F, Ghosh S, Dey S, Maltenfort M, Vibbert M, Urtecho J, et al. Impact of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome after traumatic brain injury in the United States. *Neurosurgery.* 2012;71(4):795-803.
18. Aisiku IP, Yamal J-M, Doshi P, Rubin ML, Benoit JS, Hannay J, et al. The incidence of ARDS and associated mortality in severe TBI using the Berlin definition. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery.* 2016;80(2):308-12.

19. Matthay MA, Zemans RL, Zimmerman GA, Arabi YM, Beitler JR, Mercat A, et al. Acute respiratory distress syndrome. *Nature Reviews Disease Primers*. 2019;5(1).
20. Meyer NJ, Gattinoni L, Calfee CS. Acute respiratory distress syndrome. *The Lancet*. 2021;398(10300):622-37.
21. De Souza Xavier Costa N, Ribeiro Júnior G, Dos Santos Alemany AA, Belotti L, Zati DH, Frota Cavalcante M, et al. Early and late pulmonary effects of nebulized LPS in mice: An acute lung injury model. *PLOS ONE*. 2017;12(9):e0185474.
22. Ritter K, Rissel R, Renz M, Ziebart A, Schäfer MKE, Kamuf J. Nebulized Lipopolysaccharide Causes Delayed Cortical Neuroinflammation in a Murine Model of Acute Lung Injury. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024;25(18):10117.
23. Fernández-Martín JC, Espinosa-Oliva AM, García-Domínguez I, Rosado-Sánchez I, Pacheco YM, Moyano R, et al. Gal3 Plays a Deleterious Role in a Mouse Model of Endotoxemia. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(3):1170.
24. Hang CH, Shi JX, Tian J, Li JS, Wu W, Yin HX. Effect of systemic LPS injection on cortical NF-kappaB activity and inflammatory response following traumatic brain injury in rats. *Brain Res*. 2004;1026(1):23-32.
25. Muccigrosso MM, Ford J, Benner B, Moussa D, Burnsides C, Fenn AM, et al. Cognitive deficits develop 1 month after diffuse brain injury and are exaggerated by microglia-associated reactivity to peripheral immune challenge. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2016;54:95-109.
26. Scott MC, LeBlanc O, Day H, Haase C, Olson SD, Cox CS, Jr. Cytokine Release by Microglia Exposed to Neurologic Injury Is Amplified by Lipopolysaccharide. *J Surg Res*. 2024;296:142-8.
27. Sheppard O, Coleman MP, Durrant CS. Lipopolysaccharide-induced neuroinflammation induces presynaptic disruption through a direct action on brain tissue involving microglia-derived interleukin 1 beta. *Journal of Neuroinflammation*. 2019;16(1).
28. Zhao J, Bi W, Xiao S, Lan X, Cheng X, Zhang J, et al. Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment in mice. *Scientific Reports*. 2019;9(1).
29. Teasdale G, Jennett B. Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. *Lancet*. 1974;2(7872):81-4.
30. Laureys S, Bodart O, Gosseries O. The Glasgow Coma Scale: time for critical reappraisal? *Lancet Neurol*. 2014;13(8):755-7.
31. Teasdale G, Maas A, Lecky F, Manley G, Stocchetti N, Murray G. The Glasgow Coma Scale at 40 years: standing the test of time. *Lancet Neurol*. 2014;13(8):844-54.
32. Balestreri M, Czosnyka M, Chatfield DA, Steiner LA, Schmidt EA, Smielewski P, et al. Predictive value of Glasgow Coma Scale after brain trauma: change in trend over the past ten years. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2004;75(1):161-2.
33. Marion DW, Carlier PM. Problems with initial Glasgow Coma Scale assessment caused by prehospital treatment of patients with head injuries: results of a national survey. *J Trauma*. 1994;36(1):89-95.
34. Krüger S, Weiller C. Glasgow Coma Scale (Glasgow-Koma-Skala). In: Van Aken HK, Reinhart K, Welte T, Weigand M, editors. *Intensivmedizin*. 3., vollständig überarbeitete Auflage ed: Georg Thieme Verlag KG; 2014.
35. Carroll LJ, Cassidy JD, Holm L, Kraus J, Coronado VG. Methodological issues and research recommendations for mild traumatic brain injury: the WHO Collaborating Centre Task Force on Mild Traumatic Brain Injury. *J Rehabil Med*. 2004(43 Suppl):113-25.
36. Silverberg ND, Duhaime AC, Iaccarino MA. Mild Traumatic Brain Injury in 2019-2020. *Jama*. 2020;323(2):177-8.
37. Gesundheitsberichterstattung des Bundes KG, Krankheiten allgemein [Internet]. Letzte Aktualisierung: 11.11.2022. Zitiert am 23.08.2023. URL: https://www.gbe-bund.de/gbe/!pkg_olap_tables.prc_set_page?p_uid=gast&p_aid=49982783&p_sprache=D&p_help=2&p_indnr=550&p_ansnr=15755080&p_version=3&D.001=1000001&D.946=14452&D.011=44302#SOURCES.
38. Wallesch C-W. Schädel-Hirn-Trauma aus neurologischer Sicht. *neurou2d*. 2019;2(04):375-88.

39. Rickels E, von Wild K, Wenzlaff P. Head injury in Germany: A population-based prospective study on epidemiology, causes, treatment and outcome of all degrees of head-injury severity in two distinct areas. *Brain Inj.* 2010;24(12):1491-504.
40. Roozenbeek B, Maas AI, Menon DK. Changing patterns in the epidemiology of traumatic brain injury. *Nat Rev Neurol.* 2013;9(4):231-6.
41. Striebel HW. Schädel-Hirn-Trauma (SHT). In: Striebel HW, editor. *Die Anästhesie.* 4., vollständig überarbeitete Auflage ed: Georg Thieme Verlag KG; 2019.
42. Jung K. Neuropathologische Untersuchungen nach Kombination von Schädelhirntrauma und Femurfraktur in der Maus: Universitätsmedizin der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz; 17-Nov-2022.
43. Ommaya AK, Goldsmith W, Thibault L. Biomechanics and neuropathology of adult and paediatric head injury. *Br J Neurosurg.* 2002;16(3):220-42.
44. Gennarelli TA, Thibault LE, Adams JH, Graham DI, Thompson CJ, Marcincin RP. Diffuse axonal injury and traumatic coma in the primate. *Ann Neurol.* 1982;12(6):564-74.
45. Johnson VE, Stewart W, Smith DH. Axonal pathology in traumatic brain injury. *Experimental Neurology.* 2013;246:35-43.
46. Hoppe K, Klingler W. Traumatic brain injury: pathophysiology and emergency management. *A&I.* 2021.
47. Pinton P, Giorgi C, Siviero R, Zecchini E, Rizzuto R. Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca²⁺ transfer in the control of apoptosis. *Oncogene.* 2008;27(50):6407-18.
48. Zetterberg H, Smith DH, Blennow K. Biomarkers of mild traumatic brain injury in cerebrospinal fluid and blood. *Nat Rev Neurol.* 2013;9(4):201-10.
49. Smith DH, Meaney DF, Shull WH. Diffuse axonal injury in head trauma. *J Head Trauma Rehabil.* 2003;18(4):307-16.
50. McConnell HL, Mishra A. Cells of the Blood–Brain Barrier: An Overview of the Neurovascular Unit in Health and Disease. Springer US; 2022. p. 3-24.
51. Hoth M, Rettig J. Die Blut-Hirn-Schranke. In: Behrends J, Bischofberger J, Deutzmann R, Ehmke H, Frings S, Grissmer S, et al., editors. *Duale Reihe Physiologie.* 4., unveränderte Auflage ed: Georg Thieme Verlag KG; 2021.
52. Rustenhoven J, Jansson D, Smyth LC, Dragunow M. Brain Pericytes As Mediators of Neuroinflammation. *Trends Pharmacol Sci.* 2017;38(3):291-304.
53. Mense S. Blut-Hirn-Schranke (BHS). In: Aumüller G, Aust G, Conrad A, Engele J, Kirsch J, Maio G, et al., editors. *Duale Reihe Anatomie.* 5., korrigierte Auflage ed: Georg Thieme Verlag KG; 2020.
54. Thal SC, Neuhaus W. The blood-brain barrier as a target in traumatic brain injury treatment. *Arch Med Res.* 2014;45(8):698-710.
55. Cash A, Theus MH. Mechanisms of Blood–Brain Barrier Dysfunction in Traumatic Brain Injury. *International Journal of Molecular Sciences.* 2020;21(9):3344.
56. Jha RM, Kochanek PM, Simard JM. Pathophysiology and treatment of cerebral edema in traumatic brain injury. *Neuropharmacology.* 2019;145(Pt B):230-46.
57. Katayama Y, Mori T, Maeda T, Kawamata T. Pathogenesis of the mass effect of cerebral contusions: rapid increase in osmolality within the contusion necrosis. *Acta Neurochir Suppl.* 1998;71:289-92.
58. Katayama Y, Kawamata T. Edema fluid accumulation within necrotic brain tissue as a cause of the mass effect of cerebral contusion in head trauma patients. *Acta Neurochir Suppl.* 2003;86:323-7.
59. Hudak AM, Peng L, Marquez de la Plata C, Thottakara J, Moore C, Harper C, et al. Cytotoxic and vasogenic cerebral oedema in traumatic brain injury: assessment with FLAIR and DWI imaging. *Brain Inj.* 2014;28(12):1602-9.
60. Winkler EA, Minter D, Yue JK, Manley GT. Cerebral Edema in Traumatic Brain Injury: Pathophysiology and Prospective Therapeutic Targets. *Neurosurg Clin N Am.* 2016;27(4):473-88.
61. Stokum JA, Gerzanich V, Simard JM. Molecular pathophysiology of cerebral edema. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2016;36(3):513-38.

62. Monro A. Observations on the Structure and Functions of the Nervous System. *Lond Med J.* 1783;4(2):5.
63. Kellie G. An Account of the Appearances Observed in the Dissection of Two of Three Individuals Presumed to Have Perished in the Storm of the 3d, and Whose Bodies Were Discovered in the Vicinity of Leith on the Morning of the 4th, November 1821; with Some Reflections on the Pathology of the Brain: Part I. *Trans Med Chir Soc Edinb.* 1824;1:84-122.
64. Czosnyka M, Czosnyka Z, Momjian S, Pickard JD. Cerebrospinal fluid dynamics. *Physiol Meas.* 2004;25(5):R51-76.
65. Helbok R, Meyfroidt G, Beer R. Intracranial pressure thresholds in severe traumatic brain injury: Con. *Intensive Care Medicine.* 2018;44(8):1318-20.
66. Sheth KN, Stein DM, Aarabi B, Hu P, Kufera JA, Scalea TM, et al. Intracranial pressure dose and outcome in traumatic brain injury. *Neurocrit Care.* 2013;18(1):26-32.
67. Latchaw RE, Yonas H, Hunter GJ, Yuh WTC, Ueda T, Sorensen AG, et al. Guidelines and Recommendations for Perfusion Imaging in Cerebral Ischemia. *Stroke.* 2003;34(4):1084-104.
68. Czosnyka M, Brady K, Reinhard M, Smielewski P, Steiner LA. Monitoring of cerebrovascular autoregulation: facts, myths, and missing links. *Neurocrit Care.* 2009;10(3):373-86.
69. Vu EL, Brown CH, Brady KM, Hogue CW. Monitoring of cerebral blood flow autoregulation: physiologic basis, measurement, and clinical implications. *Br J Anaesth.* 2024;132(6):1260-73.
70. Golding EM, Robertson CS, Bryan RM, Jr. The consequences of traumatic brain injury on cerebral blood flow and autoregulation: a review. *Clin Exp Hypertens.* 1999;21(4):299-332.
71. Enevoldsen EM, Jensen FT. Autoregulation and CO₂ responses of cerebral blood flow in patients with acute severe head injury. *J Neurosurg.* 1978;48(5):689-703.
72. Hlatky R, Furuya Y, Valadka AB, Gonzalez J, Chacko A, Mizutani Y, et al. Dynamic autoregulatory response after severe head injury. *J Neurosurg.* 2002;97(5):1054-61.
73. Bouma GJ, Muizelaar JP, Stringer WA, Choi SC, Fatouros P, Young HF. Ultra-early evaluation of regional cerebral blood flow in severely head-injured patients using xenon-enhanced computerized tomography. *J Neurosurg.* 1992;77(3):360-8.
74. Oertel M, Boscardin WJ, Obrist WD, Glenn TC, McArthur DL, Gravori T, et al. Posttraumatic vasospasm: the epidemiology, severity, and time course of an underestimated phenomenon: a prospective study performed in 299 patients. *J Neurosurg.* 2005;103(5):812-24.
75. Stein SC, Graham DI, Chen XH, Smith DH. Association between intravascular microthrombosis and cerebral ischemia in traumatic brain injury. *Neurosurgery.* 2004;54(3):687-91; discussion 91.
76. Maeda T, Katayama Y, Kawamata T, Aoyama N, Mori T. Hemodynamic depression and microthrombosis in the peripheral areas of cortical contusion in the rat: role of platelet activating factor. *Acta Neurochir Suppl.* 1997;70:102-5.
77. Verweij BH, Muizelaar JP, Vinas FC, Peterson PL, Xiong Y, Lee CP. Impaired cerebral mitochondrial function after traumatic brain injury in humans. *J Neurosurg.* 2000;93(5):815-20.
78. Tavazzi B, Signoretti S, Lazzarino G, Amorini AM, Delfini R, Cimatti M, et al. Cerebral oxidative stress and depression of energy metabolism correlate with severity of diffuse brain injury in rats. *Neurosurgery.* 2005;56(3):582-9; discussion -9.
79. Wu HM, Huang SC, Hattori N, Glenn TC, Vespa PM, Yu CL, et al. Selective metabolic reduction in gray matter acutely following human traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 2004;21(2):149-61.
80. Guerriero RM, Giza CC, Rotenberg A. Glutamate and GABA Imbalance Following Traumatic Brain Injury. *Current Neurology and Neuroscience Reports.* 2015;15(5).
81. Bullock R, Zauner A, Woodward JJ, Myseros J, Choi SC, Ward JD, et al. Factors affecting excitatory amino acid release following severe human head injury. *J Neurosurg.* 1998;89(4):507-18.

82. Floyd CL, Gorin FA, Lyeth BG. Mechanical strain injury increases intracellular sodium and reverses Na⁺/Ca²⁺ exchange in cortical astrocytes. *Glia*. 2005;51(1):35-46.
83. Rego AC, Oliveira CR. Mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species in excitotoxicity and apoptosis: implications for the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Neurochem Res*. 2003;28(10):1563-74.
84. Guerriero RM, Giza CC, Rotenberg A. Glutamate and GABA imbalance following traumatic brain injury. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2015;15(5):27.
85. Giunta B, Obregon D, Velisetty R, Sanberg PR, Borlongan CV, Tan J. The immunology of traumatic brain injury: a prime target for Alzheimer's disease prevention. *Journal of Neuroinflammation*. 2012;9(1):185.
86. Ramlackhansingh AF, Brooks DJ, Greenwood RJ, Bose SK, Turkheimer FE, Kinnunen KM, et al. Inflammation after trauma: microglial activation and traumatic brain injury. *Ann Neurol*. 2011;70(3):374-83.
87. Ortiz G, Gonzalez-Usigli H, Pacheco-Moises F, Mireles-Ramírez M, Sánchez-López A, Torres Sánchez E, et al. Physiology and Pathology of Neuroimmunology: Role of Inflammation in Parkinson's Disease. 2017. p. 173-97.
88. Neugebauer E, Hensler T, Rose S, Maier B, Holanda M, Raum M, et al. [Severe craniocerebral trauma in multiple trauma. An assessment of the interaction of local and systemic mediator responses]. *Unfallchirurg*. 2000;103(2):122-31.
89. Herbert MR. Large brains in autism: the challenge of pervasive abnormality. *Neuroscientist*. 2005;11(5):417-40.
90. Melchior B, Puntambekar SS, Carson MJ. Microglia and the control of autoreactive T cell responses. *Neurochem Int*. 2006;49(2):145-53.
91. Kanegawa N, Collste K, Forsberg A, Schain M, Arakawa R, Jucaite A, et al. In vivo evidence of a functional association between immune cells in blood and brain in healthy human subjects. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2016;54:149-57.
92. Carson MJ, Doose JM, Melchior B, Schmid CD, Ploix CC. CNS immune privilege: hiding in plain sight. *Immunological Reviews*. 2006;213(1):48-65.
93. Barnum SR. Complement in central nervous system inflammation. *Immunol Res*. 2002;26(1-3):7-13.
94. Allan SM, Rothwell NJ. Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci*. 2001;2(10):734-44.
95. Hopkins SJ, Rothwell NJ. Cytokines and the nervous system. I: Expression and recognition. *Trends Neurosci*. 1995;18(2):83-8.
96. Nataf S, Stahel PF, Davoust N, Barnum SR. Complement anaphylatoxin receptors on neurons: new tricks for old receptors? *Trends Neurosci*. 1999;22(9):397-402.
97. Carson MJ, Thrash JC, Walter B. The cellular response in neuroinflammation: The role of leukocytes, microglia and astrocytes in neuronal death and survival. *Clin Neurosci Res*. 2006;6(5):237-45.
98. ElAli A, Rivest S. Microglia Ontology and Signaling. *Front Cell Dev Biol*. 2016;4:72.
99. Jin R, Yang G, Li G. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. *J Leukoc Biol*. 2010;87(5):779-89.
100. Schmidt O, Infanger M, Heyde C, Ertel W, Stahel P. The Role of Neuroinflammation in Traumatic Brain Injury. *European Journal of Trauma*. 2004;30:135-49.
101. Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med*. 2011;17(7):796-808.
102. Dugue R, Nath M, Dugue A, Barone F. Roles of Pro- and Anti-inflammatory Cytokines in Traumatic Brain Injury and Acute Ischemic Stroke. 2017.
103. Jayaraj RL, Azimullah S, Beiram R, Jalal FY, Rosenberg GA. Neuroinflammation: friend and foe for ischemic stroke. *Journal of Neuroinflammation*. 2019;16(1).
104. Mittmann T, Sakry D. Gliazellen: Unterschätzte Gehirnzellen. *Deutsches Ärzteblatt Online*. 2016.
105. How many neurons do you have? Some dogmas of quantitative neuroscience under revision. *European Journal of Neuroscience*. 2012;35(1).

106. Nimmerjahn A, Bergles DE. Large-scale recording of astrocyte activity. *Current Opinion in Neurobiology*. 2015;32:95-106.
107. Li X, Shi H, Zhang D, Jing B, Chen Z, Zheng Y, et al. Paeonol alleviates neuropathic pain by modulating microglial M1 and M2 polarization via the RhoA/p38MAPK signaling pathway. *CNS Neuroscience & Therapeutics*. 2023;29(9):2666-79.
108. Tang Y, Le W. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol*. 2016;53(2):1181-94.
109. Boche D, Perry VH, Nicoll JA. Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2013;39(1):3-18.
110. Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiol Rev*. 2011;91(2):461-553.
111. Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer*. 2006;42(6):717-27.
112. Younger D, Murugan M, Rama Rao KV, Wu LJ, Chandra N. Microglia Receptors in Animal Models of Traumatic Brain Injury. *Mol Neurobiol*. 2019;56(7):5202-28.
113. Jin X, Ishii H, Bai Z, Itokazu T, Yamashita T. Temporal changes in cell marker expression and cellular infiltration in a controlled cortical impact model in adult male C57BL/6 mice. *PLoS One*. 2012;7(7):e41892.
114. Navone SE, Peroglio M, Guarnaccia L, Beretta M, Grad S, Paroni M, et al. Mechanical loading of intervertebral disc modulates microglia proliferation, activation, and chemotaxis. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2018;26(7):978-87.
115. R. The Chemokine System in Neuroinflammation: An Update. *The Journal of Infectious Diseases*. 2002;186(s2):S152-S6.
116. Lozano D, Schimmel S, Acosta S. Neuroinflammation in traumatic brain injury: A chronic response to an acute injury. *Brain Circulation*. 2017;3(3):135.
117. Brett BL, Gardner RC, Godbout J, Dams-O'Connor K, Keene CD. Traumatic Brain Injury and Risk of Neurodegenerative Disorder. *Biol Psychiatry*. 2022;91(5):498-507.
118. Abbott NJ. Astrocyte–endothelial interactions and blood–brain barrier permeability*. *Journal of Anatomy*. 2002;200(6):629-38.
119. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010;119(1):7-35.
120. Kumar A, Loane DJ. Neuroinflammation after traumatic brain injury: opportunities for therapeutic intervention. *Brain Behav Immun*. 2012;26(8):1191-201.
121. Zhao Z, Alam S, Oppenheim RW, Prevette DM, Evenson A, Parsadanian A. Overexpression of glial cell line-derived neurotrophic factor in the CNS rescues motoneurons from programmed cell death and promotes their long-term survival following axotomy. *Exp Neurol*. 2004;190(2):356-72.
122. Wu LY, Bao XQ, Sun H, Zhang D. Scavenger receptor on astrocytes and its relationship with neuroinflammation. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*. 2014;36(3):330-5.
123. Karve IP, Taylor JM, Crack PJ. The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury. *British Journal of Pharmacology*. 2016;173(4):692-702.
124. Pearn ML, Niesman IR, Egawa J, Sawada A, Almenar-Queralt A, Shah SB, et al. Pathophysiology Associated with Traumatic Brain Injury: Current Treatments and Potential Novel Therapeutics. *Cell Mol Neurobiol*. 2017;37(4):571-85.
125. Burda JE, Bernstein AM, Sofroniew MV. Astrocyte roles in traumatic brain injury. *Experimental Neurology*. 2016;275:305-15.
126. Liu M, Luo P, Wang Z, Fei Z. Changes of serum Tau, GFAP, TNF- α and malonaldehyde after blast-related traumatic brain injury. *Chinese journal of traumatology*. 2014;17(06):317-22.
127. Halford J, Shen S, Itamura K, Levine J, Chong AC, Czerwieniec G, et al. New astroglial injury-defined biomarkers for neurotrauma assessment. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2017;37(10):3278-99.

128. Chiu C-C, Liao Y-E, Yang L-Y, Wang J-Y, Tweedie D, Karnati HK, et al. Neuroinflammation in animal models of traumatic brain injury. *Journal of Neuroscience Methods*. 2016;272:38-49.
129. Zamanian JL, Xu L, Foo LC, Nouri N, Zhou L, Giffard RG, et al. Genomic Analysis of Reactive Astrogliosis. *The Journal of Neuroscience*. 2012;32(18):6391-410.
130. Liddelow SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*. 2017;541(7638):481-7.
131. Liddelow SA, Barres BA. Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity*. 2017;46(6):957-67.
132. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*. 1995;146(1):3-15.
133. Harwood SM, Yaqoob MM, Allen DA. Caspase and calpain function in cell death: bridging the gap between apoptosis and necrosis. *Ann Clin Biochem*. 2005;42(Pt 6):415-31.
134. Finnie JW. Neuroinflammation: beneficial and detrimental effects after traumatic brain injury. *Inflammopharmacology*. 2013;21(4):309-20.
135. Zhang X, Chen Y, Jenkins LW, Kochanek PM, Clark RS. Bench-to-bedside review: Apoptosis/programmed cell death triggered by traumatic brain injury. *Crit Care*. 2005;9(1):66-75.
136. Kursancew ACS, Faller CJ, Bortoluzzi DP, Niero LB, Brandão B, Danielski LG, et al. Neuroinflammatory Response in the Traumatic Brain Injury: An Update. *Neurochemical Research*. 2025;50(1).
137. Qin D, Wang J, Le A, Wang TJ, Chen X, Wang J. Traumatic Brain Injury: Ultrastructural Features in Neuronal Ferroptosis, Glial Cell Activation and Polarization, and Blood–Brain Barrier Breakdown. *Cells*. 2021;10(5):1009.
138. Bersano A, Engele J, Schäfer MKE. Neuroinflammation and Brain Disease. *BMC Neurology*. 2023;23.
139. Bieler DGfUeVDP-DDmhD. S3-Leitlinie Polytrauma / Schwerverletzten-Behandlung [Internet] Zitiert am 26.04.2024. Letzte Aktualisierung: 31.12.2022. Version: 4. URL: <https://register.awmf.org/de/leitlinien/detail/187-0232022>.
140. Engelhard K, Müller-Forell W, Werner C. Therapie des schweren Schädel-Hirn-Traumas. *Der Anaesthesist*. 2008;57(12):1219-31.
141. Berufsverbände für Psychiatrie K-uJ, Psychotherapie, Psychosomatik, Nervenheilkunde und Neurologie aus Deutschland,, Neurologen und Psychiater im Netz, Meier DmU. Schädel-Hirn-Trauma [Internet]. Zitiert am: 26.04.24.URL: <https://www.neurologen-und-psychiater-im-netz.org/neurologie/erkrankungen/schaedel-hirn-trauma/auswirkungen-und-folgeschaeden/>.
142. Guskiewicz KM, Marshall SW, Bailes J, McCrea M, Harding HP, Jr., Matthews A, et al. Recurrent concussion and risk of depression in retired professional football players. *Med Sci Sports Exerc*. 2007;39(6):903-9.
143. Sribnick EA, Popovich PG, Hall MW. Central nervous system injury–induced immune suppression. *Neurosurgical Focus*. 2022;52(2):E10.
144. Sribnick EA, Weber MD, Hall MW. Innate immune suppression after traumatic brain injury and hemorrhage in a juvenile rat model of polytrauma. *Journal of Neuroimmunology*. 2019;337:577073.
145. Sabet N, Soltani Z, Khaksari M. Multipotential and systemic effects of traumatic brain injury. *Journal of Neuroimmunology*. 2021;357.
146. Evans L, Rhodes A, Alhazzani W, Antonelli M, Coopersmith CM, French C, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock 2021. *Critical Care Medicine*. 2021;49(11):e1063-e143.
147. Civiletti F, Assenzio B, Mazzeo AT, Medica D, Giaretta F, Deambrosio I, et al. Acute Tubular Injury is Associated With Severe Traumatic Brain Injury: in Vitro Study on Human Tubular Epithelial Cells. *Sci Rep*. 2019;9(1):6090.

148. Mrozek S, Luzi A, Gonzalez L, Kerhuel L, Fourcade O, Geeraerts T. Cerebral and extracerebral vulnerability to hypoxic insults after diffuse traumatic brain injury in rats. *Brain Res.* 2016;1646:334-41.
149. Ziaka M, Exadaktylos A. Brain–lung interactions and mechanical ventilation in patients with isolated brain injury. *Critical Care.* 2021;25(1).
150. Cai SS, Bonds BW, Hu PF, Stein DM. The role of cardiac troponin I in prognostication of patients with isolated severe traumatic brain injury. *J Trauma Acute Care Surg.* 2016;80(3):477-83.
151. Cheah CF, Kofler M, Schiefecker AJ, Beer R, Klug G, Pfausler B, et al. Takotsubo Cardiomyopathy in Traumatic Brain Injury. *Neurocritical Care.* 2017;26(2):284-91.
152. Edavettal M, Gross BW, Rittenhouse K, Alzate J, Rogers A, Estrella L, et al. An Analysis of Beta-Blocker Administration Pre-and Post-Traumatic Brain Injury with Subanalyses for Head Injury Severity and Myocardial Injury. *Am Surg.* 2016;82(12):1203-8.
153. Rimaz S, Ashraf A, Marzban S, Haghighi M, Zia Ziabari SM, Biazar G, et al. Significance of Cardiac Troponin I Elevation in Traumatic Brain Injury Patients. *Anesthesiology and Pain Medicine.* 2019;In Press(In Press).
154. Faries PL, Simon RJ, Martella AT, Lee MJ, Machiedo GW. Intestinal permeability correlates with severity of injury in trauma patients. *J Trauma.* 1998;44(6):1031-5; discussion 5-6.
155. Ritter K, vetter d, Wernersbach I, Schwanz T, Hummel R, Schäfer MKE. Pre-traumatic antibiotic-induced microbial depletion reduces neuroinflammation in acute murine traumatic brain injury. *Neuropharmacology.* 2023;237.
156. Simon DW, Rogers MB, Gao Y, Vincent G, Firek BA, Janesko-Feldman K, et al. Depletion of gut microbiota is associated with improved neurologic outcome following traumatic brain injury. *Brain Res.* 2020;1747:147056.
157. Vernooij JHJ, Dentener MA, Van Suylen RJ, Buurman WA, Wouters EFM. Long-Term Intratracheal Lipopolysaccharide Exposure in Mice Results in Chronic Lung Inflammation and Persistent Pathology. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology.* 2002;26(1):152-9.
158. Eisenbarth SC, Piggott DA, Huleatt JW, Visintin I, Herrick CA, Bottomly K. Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J Exp Med.* 2002;196(12):1645-51.
159. Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, Bartlett JG, Campbell GD, Dean NC, et al. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society Consensus Guidelines on the Management of Community-Acquired Pneumonia in Adults. *Clinical Infectious Diseases.* 2007;44(Supplement_2):S27-S72.
160. Miyake K. Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface Toll-like receptors. *Semin Immunol.* 2007;19(1):3-10.
161. Shi T, Denouel A, Tietjen AK, Lee JW, Falsey AR, Demont C, et al. Global and Regional Burden of Hospital Admissions for Pneumonia in Older Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis. *The Journal of Infectious Diseases.* 2020;222(Supplement_7):S570-S6.
162. Rubenfeld GD, Herridge MS. Epidemiology and outcomes of acute lung injury. *Chest.* 2007;131(2):554-62.
163. Raetz CR, Ulevitch RJ, Wright SD, Sibley CH, Ding A, Nathan CF. Gram-negative endotoxin: an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction. *Faseb j.* 1991;5(12):2652-60.
164. Schletter J, Heine H, Ulmer AJ, Rietschel ET. Molecular mechanisms of endotoxin activity. *Archives of Microbiology.* 1995;164(6):383-9.
165. Muotiala A, Helander IM, Pyhälä L, Kosunen TU, Moran AP. Low biological activity of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Infection and Immunity.* 1992;60(4):1714-6.
166. Ko H-K, Lin A-H, Perng D-W, Lee T-S, Kou YR. Lung Epithelial TRPA1 Mediates Lipopolysaccharide-Induced Lung Inflammation in Bronchial Epithelial Cells and Mice. *Frontiers in Physiology.* 2020;11.
167. Shen B, Zhang H, Zhu Z, Ling Z, Zeng F, Wang Y, et al. Baicalin Relieves LPS-Induced Lung Inflammation via the NF- κ B and MAPK Pathways. *Molecules.* 2023;28(4):1873.

168. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu M-Y, Huffel CV, Du X, et al. Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in *Tlr4* Gene. *Science*. 1998;282(5396):2085-8.
169. Kumar V. Toll-Like Receptors in Adaptive Immunity. *Handb Exp Pharmacol*. 2022;276:95-131.
170. Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, et al. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med*. 1999;189(11):1777-82.
171. Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*. 2008;42(2):145-51.
172. Dickson K, Lehmann C. Inflammatory Response to Different Toxins in Experimental Sepsis Models. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(18):4341.
173. Tomlinson JE, Blikslager AT. Interactions between lipopolysaccharide and the intestinal epithelium. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2004;224(9):1446-52.
174. Park BS, Song DH, Kim HM, Choi B-S, Lee H, Lee J-O. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4–MD-2 complex. *Nature*. 2009;458(7242):1191-5.
175. Chen L, Zheng L, Chen P, Liang G. Myeloid Differentiation Primary Response Protein 88 (MyD88): The Central Hub of TLR/IL-1R Signaling. *J Med Chem*. 2020;63(22):13316-29.
176. Lee AJ, Cho K-J, Kim J-H. MyD88–BLT2-dependent cascade contributes to LPS-induced interleukin-6 production in mouse macrophage. *Experimental & Molecular Medicine*. 2015;47(4):e156-e.
177. Perry AK, Chen G, Zheng D, Tang H, Cheng G. The host type I interferon response to viral and bacterial infections. *Cell Research*. 2005;15(6):407-22.
178. Watanabe S, Kumazawa Y, Inoue J. Liposomal Lipopolysaccharide Initiates TRIF-Dependent Signaling Pathway Independent of CD14. *PLoS ONE*. 2013;8(4):e60078.
179. Akira S, Hoshino K. Myeloid Differentiation Factor 88–Dependent and –Independent Pathways in Toll-Like Receptor Signaling. *The Journal of Infectious Diseases*. 2003;187(s2):S356-S63.
180. Mazgaeen L, Gurung P. Recent Advances in Lipopolysaccharide Recognition Systems. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(2):379.
181. Kayagaki N, Wong MT, Stowe IB, Ramani SR, Gonzalez LC, Akashi-Takamura S, et al. Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4. *Science*. 2013;341(6151):1246-9.
182. Hagar JA, Powell DA, Aachoui Y, Ernst RK, Miao EA. Cytoplasmic LPS Activates Caspase-11: Implications in TLR4-Independent Endotoxic Shock. *Science*. 2013;341(6151):1250-3.
183. Zamyatina A, Heine H. Lipopolysaccharide Recognition in the Crossroads of TLR4 and Caspase-4/11 Mediated Inflammatory Pathways. *Front Immunol*. 2020;11:585146.
184. Skrzypczak-Wiercioch A, Sałat K. Lipopolysaccharide-Induced Model of Neuroinflammation: Mechanisms of Action, Research Application and Future Directions for Its Use. *Molecules*. 2022;27(17):5481.
185. Iwashyna TJ, Ely EW, Smith DM, Langa KM. Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. *Jama*. 2010;304(16):1787-94.
186. Gottschaldt U, AW R. Pathophysiologie des Lungenversagens. *Anästh Intensivmed*. 2018;59:249-64.
187. Lu J, Goh SJ, Tng PY, Deng YY, Ling EA, Moochhala S. Systemic inflammatory response following acute traumatic brain injury. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2009;14(10):3795-813.
188. Morel N, Morel O, Petit L, Hugel B, Cochard JF, Freyssinet JM, et al. Generation of procoagulant microparticles in cerebrospinal fluid and peripheral blood after traumatic brain injury. *J Trauma*. 2008;64(3):698-704.
189. Prescott HC, Angus DC. Enhancing Recovery From Sepsis. *JAMA*. 2018;319(1):62.

190. Qin L-H, Huang W, Mo X-A, Chen Y-L, Wu X-H. LPS Induces Occludin Dysregulation in Cerebral Microvascular Endothelial Cells via MAPK Signaling and Augmenting MMP-2 Levels. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2015;2015:1-9.
191. Cardoso FL, Brites D, Brito MA. Looking at the blood-brain barrier: molecular anatomy and possible investigation approaches. *Brain Res Rev*. 2010;64(2):328-63.
192. Kang J-B, Park D-J, Shah M-A, Kim M-O, Koh P-O. Lipopolysaccharide induces neuroglia activation and NF- κ B activation in cerebral cortex of adult mice. *Laboratory Animal Research*. 2019;35(1).
193. Liu L, Zhang H, Shi Y, Pan L. Prostaglandin E1 Improves Cerebral Microcirculation Through Activation of Endothelial NOS and GRPCH1. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2020;70(12):2041-8.
194. Peng X, Luo Z, He S, Zhang L, Li Y. Blood-Brain Barrier Disruption by Lipopolysaccharide and Sepsis-Associated Encephalopathy. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11:768108.
195. Che DN, Cho BO, Kim J-S, Shin JY, Kang HJ, Jang SI. Luteolin and Apigenin Attenuate LPS-Induced Astrocyte Activation and Cytokine Production by Targeting MAPK, STAT3, and NF- κ B Signaling Pathways. *Inflammation*. 2020;43(5):1716-28.
196. Chaudhry N, Duggal AK. Sepsis Associated Encephalopathy. *Advances in Medicine*. 2014;2014:1-16.
197. Markram H. The blue brain project. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7(2):153-60.
198. Teranishi K, Scultetus A, Haque A, Stern S, Philbin N, Rice J, et al. Traumatic brain injury and severe uncontrolled haemorrhage with short delay pre-hospital resuscitation in a swine model. *Injury*. 2012;43(5):585-93.
199. Lighthall JW. Controlled cortical impact: a new experimental brain injury model. *J Neurotrauma*. 1988;5(1):1-15.
200. Smith DH, Soares HD, Pierce JS, Perlman KG, Saatman KE, Meaney DF, et al. A model of parasagittal controlled cortical impact in the mouse: cognitive and histopathologic effects. *J Neurotrauma*. 1995;12(2):169-78.
201. Osier ND, Korpon JR, Dixon CE. *Frontiers in Neuroengineering*
Controlled Cortical Impact Model. In: Kobeissy FH, editor. *Brain Neurotrauma: Molecular, Neuropsychological, and Rehabilitation Aspects*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis
© 2015 by Taylor & Francis Group, LLC.; 2015.
202. Cernak I. Animal models of head trauma. *NeuroRx*. 2005;2(3):410-22.
203. Van KC, Lyeth BG. Lateral (Parasagittal) Fluid Percussion Model of Traumatic Brain Injury. Springer New York; 2016. p. 231-51.
204. Xiong Y, Mahmood A, Chopp M. Animal models of traumatic brain injury. *Nat Rev Neurosci*. 2013;14(2):128-42.
205. Kalish BT, Whalen MJ. Weight Drop Models in Traumatic Brain Injury. Springer New York; 2016. p. 193-209.
206. Osier ND, Dixon CE. The Controlled Cortical Impact Model: Applications, Considerations for Researchers, and Future Directions. *Frontiers in Neurology*. 2016;7.
207. Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. Animal models of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;295(3):L379-99.
208. Russo C, Evans A, Sullivan C, Wands K, Hudson A, Bedocs P. Bronchoalveolar Lavage and Oleic Acid Two-hit Model for Inducing Acute Respiratory Distress Syndrome in Swine Models. *Military Medicine*. 2024.
209. Kilkeny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol*. 2010;8(6):e1000412.
210. Soblosky JS, Matthews MA, Davidson JF, Tabor SL, Carey ME. Traumatic brain injury of the forelimb and hindlimb sensorimotor areas in the rat: physiological, histological and behavioral correlates. *Behavioural Brain Research*. 1996;79(1):79-92.

211. Dunham NW, Miya TS. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc.* 1957;46(3):208-9.
212. Hall C. *A Study of the Rat's Behavior in a Field, a Contribution to Method in Comparative Psychology*, by Calvin Hall and E.L. Ballachey: University of California Press; 1932.
213. Lister R. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology.* 1987;92(2).
214. Espejo EF. <Structure of the mouse behaviour on the elevated plus-maze test of anxiety.pdf>. *Behavioural Brain Research.* 1997.
215. Danduga RCSR, Kola PK. Elevated Plus Maze for Assessment of Anxiety and Memory in Rodents. Springer US; 2024. p. 93-6.
216. Sorregotti T, Cipriano AC, Cruz FC, Mascarenhas DC, Rodgers RJ, Nunes-De-Souza RL. Amygdaloid involvement in the defensive behavior of mice exposed to the open elevated plus-maze. *Behavioural Brain Research.* 2018;338:159-65.
217. Fernández Espejo E. Structure of the mouse behaviour on the elevated plus-maze test of anxiety. *Behav Brain Res.* 1997;86(1):105-12.
218. Onyszchuk G, Al-Hafez B, He YY, Bilgen M, Berman NE, Brooks WM. A mouse model of sensorimotor controlled cortical impact: characterization using longitudinal magnetic resonance imaging, behavioral assessments and histology. *J Neurosci Methods.* 2007;160(2):187-96.
219. L. A. Schwarte CJZ, C. Ince. Mechanical Ventilation of mice. *Basic Research in Cardiology.* 2000;Vol. 95, No. 6.
220. Yuki K, Koutsogiannaki S. Translational Role of Rodent Models to Study Ventilator-Induced Lung Injury. *Transl Perioper Pain Med.* 2021;8(4):404-15.
221. Deitch AD, Moses MJ. The Nissl substance of living and fixed spinal ganglion cells. II. An ultraviolet absorption study. *J Biophys Biochem Cytol.* 1957;3(3):449-56.
222. Spanel-Borowski K, Mayerhofer A. Immunohistochemie (Immunhistologie). In: Aumüller G, Aust G, Conrad A, Engele J, Kirsch J, Maio G, et al., editors. *Duale Reihe Anatomie. 5., korrigierte Auflage* ed: Georg Thieme Verlag KG; 2020.
223. Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. Glial Fibrillary Acidic Protein: GFAP-Thirty-One Years (1969–2000). *Neurochemical Research.* 2000;25(9/10):1439-51.
224. Chistiakov DA, Killingsworth MC, Myasoedova VA, Orekhov AN, Bobryshev YV. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. *Laboratory Investigation.* 2017;97(1):4-13.
225. Gusel'nikova VV, Korzhevskiy DE. NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker. *Acta Naturae.* 2015;7(2):42-7.
226. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc.* 2006;1(2):581-5.
227. Okamoto T, Okabe S. Ultraviolet absorbance at 260 and 280 nm in RNA measurement is dependent on measurement solution. *Int J Mol Med.* 2000;5(6):657-9.
228. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986;51 Pt 1:263-73.
229. Netzker R. Polymerasekettenreaktion (PCR). In: Rassow J, Netzker R, Hauser K, editors. *Duale Reihe Biochemie. 5. vollständig überarbeitete Auflage* ed: Georg Thieme Verlag KG; 2022.
230. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y).* 1992;10(4):413-7.
231. Thal SC, Wyszkon S, Pieter D, Engelhard K, Werner C. Selection of endogenous control genes for normalization of gene expression analysis after experimental brain trauma in mice. *J Neurotrauma.* 2008;25(7):785-94.
232. Jain BP, Goswami SK, Pandey S. Chapter 4 - Protein. In: Jain BP, Goswami SK, Pandey S, editors. *Protocols in Biochemistry and Clinical Biochemistry*: Academic Press; 2021. p. 31-48.

233. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75.
234. Nezlin R, Mozes E. Detection of antigens in immune complexes by a dot blot assay. *J Immunol Methods.* 1995;184(2):273-6.
235. Emma Easthope, Jackson ImmunoResearch Inc. SaR-ifr. Dot Blot: A Quick and Easy Method for Separation-Free Protein Detection [Internet]. Letzte Aktualisierung: 15.10.2022. Zitiert am 08.08.2023. URL: <https://www.jacksonimmuno.com/secondary-antibody-resource/immuno-techniques/dot-blotting-for-quick-detection/?pdf=92372022>.
236. Bowyer JF, Sarkar S, Burks SM, Hess JN, Tolani S, O'Callaghan JP, et al. Microglial activation and responses to vasculature that result from an acute LPS exposure. *NeuroToxicology.* 2020;77:181-92.
237. Wang S, Weyer MP, Hummel R, Wilken-Schmitz A, Tegeder I, Schäfer MKE. Selective neuronal expression of progranulin is sufficient to provide neuroprotective and anti-inflammatory effects after traumatic brain injury. *J Neuroinflammation.* 2024;21(1):257.
238. Johnson VE, Weber MT, Xiao R, Cullen DK, Meaney DF, Stewart W, et al. Mechanical disruption of the blood–brain barrier following experimental concussion. *Acta Neuropathologica.* 2018;135(5):711-26.
239. Hummel R, Dorochoew E, Zander S, Ritter K, Hahnefeld L, Gurke R, et al. Valproic Acid Treatment after Traumatic Brain Injury in Mice Alleviates Neuronal Death and Inflammation in Association with Increased Plasma Lysophosphatidylcholines. *Cells.* 2024;13(9):734.
240. Zhang YP, Cai J, Shields LBE, Liu N, Xu X-M, Shields CB. Traumatic Brain Injury Using Mouse Models. *Translational Stroke Research.* 2014;5(4):454-71.
241. Silverberg ND, Iaccarino MA, Panenka WJ, Iverson GL, McCulloch KL, Dams-O'Connor K, et al. Management of Concussion and Mild Traumatic Brain Injury: A Synthesis of Practice Guidelines. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation.* 2020;101(2):382-93.
242. Khadangi F, Forgues A-S, Tremblay-Pitre S, Dufour-Mailhot A, Henry C, Boucher M, et al. Intranasal versus intratracheal exposure to lipopolysaccharides in a murine model of acute respiratory distress syndrome. *Scientific Reports.* 2021;11(1).
243. Aeffner F, Bolon B, Davis IC. Mouse Models of Acute Respiratory Distress Syndrome: A Review of Analytical Approaches, Pathologic Features, and Common Measurements. *Toxicologic Pathology.* 2015;43(8):1074-92.
244. Tsikis ST, Fligor SC, Hirsch TI, Pan A, Yu LJ, Kishikawa H, et al. Lipopolysaccharide-induced murine lung injury results in long-term pulmonary changes and downregulation of angiogenic pathways. *Scientific Reports.* 2022;12(1).
245. D'Alessio FR. *Mouse Models of Acute Lung Injury and ARDS.* Springer New York; 2018. p. 341-50.
246. Mao K, Chen S, Chen M, Ma Y, Wang Y, Huang B, et al. Nitric oxide suppresses NLRP3 inflammasome activation and protects against LPS-induced septic shock. *Cell Research.* 2013;23(2):201-12.
247. Xiong H, Zhu C, Li F, Hegazi R, He K, Babyatsky M, et al. Inhibition of Interleukin-12 p40 Transcription and NF- κ B Activation by Nitric Oxide in Murine Macrophages and Dendritic Cells. *Journal of Biological Chemistry.* 2004;279(11):10776-83.
248. Matute-Bello G, Downey G, Moore BB, Groshong SD, Matthay MA, Slutsky AS, et al. An Official American Thoracic Society Workshop Report: Features and Measurements of Experimental Acute Lung Injury in Animals. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology.* 2011;44(5):725-38.
249. Liao Y, Liu P, Guo F, Zhang Z-Y, Zhang Z. Oxidative Burst of Circulating Neutrophils Following Traumatic Brain Injury in Human. *PLoS ONE.* 2013;8(7):e68963.
250. Carneiro De Oliveira PE, Zaniboni CR, Carmona IM, Fonseca AR, Canto-De-Souza A. Preliminary behavioral assessment of cagemates living with conspecifics submitted to chronic restraint stress in mice. *Neuroscience Letters.* 2017;657:204-10.
251. Redaelli V, Bosi A, Luzi F, Cappella P, Zerbi P, Ludwig N, et al. Neuroinflammation, body temperature and behavioural changes in CD1 male mice undergoing acute restraint stress: An exploratory study. *PLOS ONE.* 2021;16(11):e0259938.

252. Ritter K, Baalman M, Dolderer C, Ritz U, Schäfer MKE. Brain–Bone Crosstalk in a Murine Polytrauma Model Promotes Bone Remodeling but Impairs Neuromotor Recovery and Anxiety-Related Behavior. *Biomedicines*. 2024;12(7):1399.
253. Kahrman A, Bouley J, Bosco DA, Shazeeb MS, Henninger N. Differential association of baseline body weight and body-weight loss with neurological deficits, histology, and death after repetitive closed head traumatic brain injury. *Neurosci Lett*. 2022;771:136430.
254. Jacovides CL, Ahmed S, Suto Y, Paris AJ, Leone R, McCarry J, et al. An inflammatory pulmonary insult post-traumatic brain injury worsens subsequent spatial learning and neurological outcomes. *J Trauma Acute Care Surg*. 2019;87(3):552-8.
255. Schmidt R, Welzel B, Loscher W. Animal welfare assessment after controlled cortical impact in CD-1 mice - A model of posttraumatic epilepsy. *Epilepsy Behav*. 2024;163:110214.
256. Mei J, Riedel N, Grittner U, Endres M, Banneke S, Emmrich JV. Body temperature measurement in mice during acute illness: implantable temperature transponder versus surface infrared thermometry. *Scientific Reports*. 2018;8(1).
257. Nilsberth C, Hamzic N, Norell M, Blomqvist A. Peripheral lipopolysaccharide administration induces cytokine mRNA expression in the viscera and brain of fever-refractory mice lacking microsomal prostaglandin E synthase-1. *J Neuroendocrinol*. 2009;21(8):715-21.
258. Hummel R, Lang M, Walderbach S, Wang Y, Tegeder I, Götz C, et al. Single intracerebroventricular progranulin injection adversely affects the blood–brain barrier in experimental traumatic brain injury. *Journal of Neurochemistry*. 2021;158(2):342-57.
259. Hummel R, Ulbrich S, Appel D, Li S, Hirnet T, Zander S, et al. Administration of all-trans-retinoic acid after experimental traumatic brain injury is brain protective. *British Journal of Pharmacology*. 2020;177(22):5208-23.
260. Ritter K, Jung K, Dolderer C, Appel D, Oswald CC, Ritz U, et al. Early Reciprocal Effects in a Murine Model of Traumatic Brain Injury and Femoral Fracture. *Mediators of Inflammation*. 2021;2021:1-14.
261. Tucker LB, McCabe JT. Measuring Anxiety-Like Behaviors in Rodent Models of Traumatic Brain Injury. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 2021;15.
262. Popovitz J, Mysore SP, Adwanikar H. Long-Term Effects of Traumatic Brain Injury on Anxiety-Like Behaviors in Mice: Behavioral and Neural Correlates. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 2019;13.
263. Carobrez AP, Bertoglio LJ. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev*. 2005;29(8):1193-205.
264. Figueiredo Cerqueira MMD, Castro MML, Vieira AA, Kurosawa JAA, Amaral Junior FLD, Siqueira Mendes FDCCD, et al. Comparative analysis between Open Field and Elevated Plus Maze tests as a method for evaluating anxiety-like behavior in mice. *Heliyon*. 2023;9(4):e14522.
265. Harris TC, De Rooij R, Kuhl E. The Shrinking Brain: Cerebral Atrophy Following Traumatic Brain Injury. *Annals of Biomedical Engineering*. 2019;47(9):1941-59.
266. Cole JH, Jolly A, De Simoni S, Bourke N, Patel MC, Scott G, et al. Spatial patterns of progressive brain volume loss after moderate-severe traumatic brain injury. *Brain*. 2018;141(3):822-36.
267. Siebold L, Obenaus A, Goyal R. Criteria to define mild, moderate, and severe traumatic brain injury in the mouse controlled cortical impact model. *Exp Neurol*. 2018;310:48-57.
268. Chen S, Pickard JD, Harris NG. Time course of cellular pathology after controlled cortical impact injury. *Exp Neurol*. 2003;182(1):87-102.
269. Romine J, Gao X, Chen J. Controlled Cortical Impact Model for Traumatic Brain Injury. *Journal of Visualized Experiments*. 2014(90).
270. Rewell SSJ, Shad A, Chen L, Macowan M, Chu E, Gandasmita N, et al. A post-injury immune challenge with lipopolysaccharide following adult traumatic brain injury alters neuroinflammation and the gut microbiome acutely, but has little effect on chronic outcomes. *Exp Neurol*. 2025;386:115150.
271. Sharma R, Casillas-Espinosa PM, Dill LK, Rewell SSJ, Hudson MR, O'Brien TJ, et al. Pediatric traumatic brain injury and a subsequent transient immune challenge independently influenced chronic outcomes in male mice. *Brain Behav Immun*. 2022;100:29-47.

272. Longhi L, Gesuete R, Perego C, Ortolano F, Sacchi N, Villa P, et al. Long-lasting protection in brain trauma by endotoxin preconditioning. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2011;31(9):1919-29.
273. Chen Z, Jalabi W, Shpargel KB, Farabaugh KT, Dutta R, Yin X, et al. Lipopolysaccharide-Induced Microglial Activation and Neuroprotection against Experimental Brain Injury Is Independent of Hematogenous TLR4. *The Journal of Neuroscience*. 2012;32(34):11706-15.
274. Liu F, Li W, Pauluhn J, Trubel H, Wang C. Lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats: comparative assessment of intratracheal instillation and aerosol inhalation. *Toxicology*. 2013;304:158-66.
275. Smith KR, Leonard D, McDonald JD, Tesfaigzi Y. Inflammation, mucous cell metaplasia, and Bcl-2 expression in response to inhaled lipopolysaccharide aerosol and effect of rolipram. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2011;253(3):253-60.
276. Gao X, Deng P, Xu ZC, Chen J. Moderate Traumatic Brain Injury Causes Acute Dendritic and Synaptic Degeneration in the Hippocampal Dentate Gyrus. *PLoS ONE*. 2011;6(9):e24566.
277. Cao T, Thomas TC, Ziebell JM, Pauly JR, Lifshitz J. Morphological and genetic activation of microglia after diffuse traumatic brain injury in the rat. *Neuroscience*. 2012;225:65-75.
278. Li D, Liu X, Liu T, Liu H, Tong L, Jia S, et al. Neurochemical regulation of the expression and function of glial fibrillary acidic protein in astrocytes. *Glia*. 2020;68(5):878-97.
279. Yang Z, Arja RD, Zhu T, Sarkis GA, Patterson RL, Romo P, et al. Characterization of Calpain and Caspase-6-Generated Glial Fibrillary Acidic Protein Breakdown Products Following Traumatic Brain Injury and Astroglial Cell Injury. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(16):8960.
280. Yang Z, Wang KK. Glial fibrillary acidic protein: from intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. *Trends Neurosci*. 2015;38(6):364-74.
281. Clement T, Lee JB, Ichkova A, Rodriguez-Grande B, Fournier ML, Aussudre J, et al. Juvenile mild traumatic brain injury elicits distinct spatiotemporal astrocyte responses. *Glia*. 2020;68(3):528-42.
282. Fan YY, Huo J. A1/A2 astrocytes in central nervous system injuries and diseases: Angels or devils? *Neurochem Int*. 2021;148:105080.
283. Fu HQ, Yang T, Xiao W, Fan L, Wu Y, Terrando N, et al. Prolonged Neuroinflammation after Lipopolysaccharide Exposure in Aged Rats. *PLoS ONE*. 2014;9(8):e106331.
284. McClintock D, Zhuo H, Wickersham N, Matthay MA, Ware LB. Biomarkers of inflammation, coagulation and fibrinolysis predict mortality in acute lung injury. *Critical Care*. 2008;12(2):R41.
285. Wang Y, Wang H, Zhang C, Zhang C, Yang H, Gao R, et al. Lung fluid biomarkers for acute respiratory distress syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Critical Care*. 2019;23(1).
286. Maris NA, Dessing MC, De Vos AF, Bresser P, Van Der Zee JS, Jansen HM, et al. Toll-like receptor mRNA levels in alveolar macrophages after inhalation of endotoxin. *European Respiratory Journal*. 2006;28(3):622-6.
287. Jardine L, Wiscombe S, Reynolds G, McDonald D, Fuller A, Green K, et al. Lipopolysaccharide inhalation recruits monocytes and dendritic cell subsets to the alveolar airspace. *Nature Communications*. 2019;10(1).
288. Osbourn M, Rodgers AM, Dubois AV, Small DM, Humphries F, Delagic N, et al. Secretory Leucoprotease Inhibitor (SLPI) Promotes Survival during Acute Pseudomonas aeruginosa Infection by Suppression of Inflammation Rather Than Microbial Killing. *Biomolecules*. 2022;12(12):1728.
289. Chan W-H, Huang S-M, Chiu Y-L. Pulmonary Effects of Traumatic Brain Injury in Mice: A Gene Set Enrichment Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024;25(5):3018.

290. Hay JR, Johnson VE, Young AM, Smith DH, Stewart W. Blood-Brain Barrier Disruption Is an Early Event That May Persist for Many Years After Traumatic Brain Injury in Humans. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2015;74(12):1147-57.
291. van Vliet EA, Ndode-Ekane XE, Lehto LJ, Gorter JA, Andrade P, Aronica E, et al. Long-lasting blood-brain barrier dysfunction and neuroinflammation after traumatic brain injury. *Neurobiol Dis.* 2020;145:105080.
292. Schmidt OI, Heyde CE, Ertel W, Stahel PF. Closed head injury--an inflammatory disease? *Brain Res Brain Res Rev.* 2005;48(2):388-99.
293. Wang G, Zhang J, Hu X, Zhang L, Mao L, Jiang X, et al. Microglia/Macrophage Polarization Dynamics in White Matter after Traumatic Brain Injury. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism.* 2013;33(12):1864-74.
294. Kumar A, Alvarez-Croda D-M, Stoica BA, Faden AI, Loane DJ. Microglial/Macrophage Polarization Dynamics following Traumatic Brain Injury. *Journal of Neurotrauma.* 2016;33(19):1732-50.
295. Yan X, Yang K, Xiao Q, Hou R, Pan X, Zhu X. Central role of microglia in sepsis-associated encephalopathy: From mechanism to therapy. *Frontiers in Immunology.* 2022;13.
296. Bellaver B, Rocha AS, Souza DG, Leffa DT, De Bastiani MA, Schu G, et al. Activated peripheral blood mononuclear cell mediators trigger astrocyte reactivity. *Brain Behav Immun.* 2019;80:879-88.
297. Yu JT, Lee CH, Yoo K-Y, Choi JH, Li H, Park OK, et al. Maintenance of anti-inflammatory cytokines and reduction of glial activation in the ischemic hippocampal CA1 region preconditioned with lipopolysaccharide. *Journal of the Neurological Sciences.* 2010;296(1-2):69-78.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe Neuroprotektion der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität bedanken. Insbesondere gilt mein Dank meinem Doktorvater und meiner Betreuerin. Ohne deren besonders guter Betreuung, ständiger Erreichbarkeit und tatkräftiger Unterstützung mit neuen Ideen und Impulsen sich der Abschluss meiner Dissertation um ein Vielfaches verlängert hätte. Auch möchte ich mich bei allen anderen Helfern aus der AG Neuroprotektion für die Unterstützung und Beantwortung meiner Fragen, während der Laborarbeit bedanken.

Darüber hinaus danke ich auch meiner Familie, die mich in allem, was ich bisher gemacht und erreicht habe, unterstützt und mir dadurch den Rückhalt vermittelt hat, den ich hier besonders zu schätzen wusste.

Mein größter Dank gilt allerdings meiner Frau, die mich immer wieder motiviert und animiert hat, die Arbeit an meiner Dissertation weiter voranzubringen und somit einen erheblichen Anteil an der Fertigstellung dieser Arbeit gehabt hat.

DANKE!

Tabellarischer Lebenslauf