

Aus dem Institut für Physiologie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Untersuchungen zur synaptischen Plastizität und Spontanaktivität im Hippocampus
in der Akutphase nach unilateralem Schädelhirntrauma (SHT) bei der Maus

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

Vorgelegt von

Tobias Sebastian Renneisen
aus Saarbrücken

Mainz, 2024

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

Tag der Promotion: 27. Juni 2025

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis.....	VIII
1 Einleitung / Ziel der Dissertation	1
1.1 Erforschung von Veränderungen synaptischer Plastizität des Hippocampus in der Akutphase nach einem Schädelhirntrauma (SHT).....	1
1.2 Erforschung von Veränderung der Netzwerkaktivität und synaptischen Erregbarkeit	2
2 Literaturdiskussion.....	3
2.1 Schädelhirntrauma (SHT).....	3
2.1.1 Übersicht.....	3
2.1.2 Epidemiologie	3
2.1.3 Pathophysiologie.....	5
2.1.4 Tiermodelle eines Schädelhirntraumas	9
2.2 Anatomie des Gehirns.....	13
2.2.1 Hippocampus	14
2.3 Synaptische Plastizität	18
2.3.1 Synaptische Kurzzeitplastizität	19
2.3.2 Synaptische Langzeitplastizität	20
3 Material und Methoden.....	22
3.1 Materialien	22
3.1.1 Tiere (n=44, 23 männlich, 21 weiblich).....	22
3.1.2 Chemikalien und Medikamente	22
3.1.3 Antikörper.....	23
3.1.4 Verbrauchsmittel	23
3.1.5 Instrumente.....	23
3.1.6 Software.....	24
3.2 Tierhaltung	25
3.3 Induktion des SHTs.....	25
3.4 Zusammensetzung der künstlichen Zerebrospinalflüssigkeit (ACSF)	28
3.5 Präparation der Hirnschnitte.....	28
3.6 Elektrophysiologie	29
3.6.1 Multi-Elektroden-Array Messungen	29
3.6.2 Stimulationsprotokoll	32
3.6.3 Induktion der LTP.....	34
3.6.4 Spontanaktivitätsmessungen.....	34
3.7 Immunhistochemische Färbung.....	35

3.8	Datenanalyse	36
3.8.1	Elektrophysiologie	36
3.8.2	Immunhistochemie	37
3.8.3	Datenanalyse	38
4	Ergebnisse	39
4.1	Verletzung nach CCI	39
4.2	GFAP-Färbung von Astrozyten im Hippocampus in der Akutphase nach SHT	40
4.3	LTP-Experimente	42
4.3.1	Beispiel Feldpotentiale	42
4.3.2	Input/Output-Kurven	43
4.3.3	Paired Pulse Ratio	46
4.3.4	Langzeitpotenzierung 1-2 Tage nach SHT	47
4.4	Spontanaktivitätsmessungen 1-2 Tage nach SHT	51
5	Diskussion	55
5.1	Diskussion der Methoden	55
5.1.1	Die Maus als Modell für den Menschen	55
5.1.2	Messung von neuronalen Signalen mit dem Multi-Elektroden-Array (MEA)	56
5.2	Veränderungen in der synaptischen Plastizität in der akuten Phase des SHTs im Hippocampus	57
5.2.1	Keine Astrogliose nachweisbar in der immunhistochemischen Färbung	57
5.2.2	Verringerte synaptische Erregbarkeit gemessen in Input/Output-Kurven im Hippocampus ipsi- und kontralateral vs sham	58
5.2.3	Keine Anzeichen für Veränderung der Kurzzeitplastizität und Langzeitplastizität nach SHT	58
5.3	Gesteigerte Spontanaktivität ipsi- und kontralateral vs sham	60
5.4	Fazit	62
6	Zusammenfassung	64
7	Literaturverzeichnis	64
7.1	Literaturverweise	66
7.2	Abbildungsverweise	83
8	Danksagung	84
9	Tabellarischer Lebenslauf	85

Abkürzungsverzeichnis

ACSF artificial cerebrospinal fluid

mACSF modifizierte ACSF

ALS Amyotrophe Lateralsklerose

AMPA alpha-Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionsäure

AMPA alpha-Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionsäure-
Rezeptor

CA Cornu Ammonis

Ca² Calcium

CaMKII Calcium-/Calmodulin-abhängige Protein-Kinase II

cAMP Cyclisches Adenosinmonophosphat

CCI controlled cortical impact

CREB cAMP response-element binding protein

DAI Diffuse axonale Verletzung

DAMP damage-associated molecular pattern

DAPI 4',6-Diamidino-2-phenylindol

DG Gyrus dentatus

DGNC	Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie
DNQX	6,7-Dinitroquinoxaline-2,3-dione
EC	Entorhinaler Kortex
LEC	lateraler entorhinaler Kortex
MEC	medialer entorhinaler Kortex
EEG	Elektroenzephalographie
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potential
Fi	Fimbria hippocampi
FPI	fluid percussion injury
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
Gad67	Glutamat-Decarboxylase 67
GCS	Glasgow Coma Scale
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
HF	Hochfrequenzstimulation
Hi	Hilus
I/O	Input/Output

ICP	intrakranieller Druck
Ipsi	ipsilateral
ISI	Interstimulus-Intervall
Kontra	kontralateral
FP	lokales Feldpotential
LTD	Langzeitdepression
LTP	Langzeitpotenzierung
e-LTP	frühe (early) Langzeitpotenzierung
I-LTP	späte (late) Langzeitpotenzierung
MAP-Kinase	mitogen activated protein kinase
MEA	Multi-Elektroden-Array
MF	Moosfasern
Mg ²⁺	Magnesium
mGluR	metabotrope Glutamatrezeptor
MRT	Magnetresonanztomographie
Na ⁺	Natrium
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMDAR	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor

PBBI	penetrating ballistic brain injury
PBS	phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
PKA	Proteinkinase A
PP	Tractus perforans
PPR	Paired Pulse Ratio
PTE	Posttraumatische Epilepsie
SC	Schaffer-Kollaterale
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
Sham	scheinoperiert
SHT	Schädelhirntrauma
Str. m.	Stratum moleculare
Str. p.	Stratum pyramidum
Sub	Subiculum
TARC	Translational Animal Research Center
TBI	traumatic brain injury
TTX	Tetrodotoxin

WD weight drop

ZNS Zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Modell der blast-TBI (modifiziert von Shah et al., 2019)
- Abbildung 2: weight drop-Modell (WD) (modifiziert von Shah et al., 2019)
- Abbildung 3: Modell der fluid percussion injury (FPI) (modifiziert von Shah et al., 2019)
- Abbildung 4: Modell des controlled cortical impacts (CCI) (modifiziert von Shah et al., 2019)
- Abbildung 5: Maushippocampus mit histologischer Beschriftung
- Abbildung 6: Vernetzung des Hippocampus (modifiziert von bristol.ac.uk)
- Abbildung 7: Impact one
- Abbildung 8: Darstellung eines Mäusegehirns im koronalen Schnitt mit der Region der SHT-Induktion (modifiziert von Paxinos, G. and Franklin, K. B. J., 2001)
- Abbildung 9: Leica VT1000s
- Abbildung 10: MEA-Chip 60MEA200/30iR-Ti-gr (modifiziert von multichannelsystems.com)
- Abbildung 11: MEA-Set-Up MEA2100-System (modifiziert von multichannelsystems.com)
- Abbildung 12: Platingrid
- Abbildung 13: Foto eines Hirnschnitts mit markierter Position der Stimulations- und Ableitungselektrode

- Abbildung 14: Repräsentative LTP-Messungen mit der Software LTP-Analyzer
- Abbildung 15: Darstellung der SHT-Verletzung im Mausgehirn und im Hirnschnitt
- Abbildung 16: Zusammengefügtes Bild GFAP/DAPI-Färbung in der Region CA1 72 h nach CCI
- Abbildung 17: Astrozytendichte in der Area CA1 72 h nach CCI
- Abbildung 18: Beispiel lokales Feldpotential (FP)
- Abbildung 19: Input/Output-Kurven 1 bis 2 Tage nach SHT oder nach sham-Operation
- Abbildung 20: Beispiel FPs bei Messung der PPR
- Abbildung 21: Boxplot Paired Pulse Ratio vor und nach LTP-Induktion
- Abbildung 22: Lokale Feldpotentiale vor und nach LTP-Induktion
- Abbildung 23: LTP-Messungen 1 bis 2 Tage nach SHT
- Abbildung 24: Boxplot mit dem Ergebnis der LTP-Messungen
- Abbildung 25: FPs vor und nach DNQX-Gabe
- Abbildung 26: Repräsentative MEA-Kanäle mit Spontanaktivitätsmessungen in der Region CA1
- Abbildung 27: Boxplots Spontanaktivität im Hippocampus 1 bis 2 Tage nach SHT

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Statistische Auswertung der Input/Output-Kurven

1 Einleitung / Ziel der Dissertation

Schädelhirntraumata (SHTs) sind ein sehr häufiges Krankheitsbild und die häufigste Todesursache von jungen Menschen in entwickelten Ländern (Capizzi et al., 2020). Oft kommt es nach der Verletzung zu neurologischen Folgeschäden (Gardner et al., 2015, Goldman et al., 2006, Fordington and Manford, 2020, Plassman et al., 2000). Gleichzeitig gibt es bisher nur sehr begrenzt Therapieoptionen, um präventiv gegen diese Folgeschäden vorzugehen (Lucke-Wold et al., 2018). Aus diesem Grund besteht ein hohes gesellschaftliches Interesse die Pathomechanismen von SHTs zu erforschen, damit in Zukunft bessere Therapien entwickelt werden können.

Im Fokus meiner Arbeit steht die Untersuchung neuronaler Veränderungen in der Akutphase nach SHT. Dafür wurden elektrophysiologische Experimente an Hirnschnitten des Hippocampus von Mäusen gemacht, bei denen zuvor durch ein etabliertes Modell ein SHT ausgelöst wurde (siehe Kapitel 3.3). In meiner Arbeit gab es zwei zentrale Fragestellungen, zum einen sollte überprüft werden, ob es durch das SHT zu Veränderungen der Plastizität im Hippocampus kommt, und zum anderen untersuchte ich Veränderungen der Netzwerkaktivität und synaptischen Erregbarkeit.

1.1 Erforschung von Veränderungen synaptischer Plastizität des Hippocampus in der Akutphase nach einem Schädelhirntrauma (SHT)

Synaptische Plastizität ist ein wichtiger Mechanismus für Lernvorgänge. Er kann unterteilt werden in Kurzzeitplastizität und Langzeitplastizität. Langzeitpotenzierung (LTP) beschreibt die zellulären Prozesse an einer Synapse, die mit Gedächtnis und Lernvorgängen einhergehen (siehe Kapitel 2.3.1). In einem früheren Experiment unseres Labors konnte bereits gezeigt werden, dass unser SHT-Modell 24 bis 48 Stunden nach der Verletzungsinduktion zu einer Abschwächung der LTP im Kortex führt (Feldmann et al., 2019). Ein Ziel dieser Arbeit war zu überprüfen, ob unser SHT-Modell auch die Plastizität im Hippocampus, der eine zentrale Rolle für Lernvorgänge und in der Gedächtniskonsolidierung spielt, beeinflusst. Um dies zu klären wurde 24 bis 48 Stunden nach SHT im ipsilateral und kontralateral zur Verletzung liegenden Hippocampus in der Region Cornu ammonis 1 (CA1) die LTP bestimmt.

Um potenzielle Veränderungen der Kurzzeitplastizität zu messen, wurde die Paired Pulse Ratio (PPR) in der gleichen Region bestimmt. Die PPR wird bestimmt, indem das Verhältnis der Amplituden zweier aufeinanderfolgender Reizantworten berechnet wird (siehe Kapitel 2.3.1 und 3.6.2). Eine PPR von über 1 bedeutet, dass die Amplitude der zweiten Reizantwort größer ist als die der ersten. Dies ist bei einer sogenannten Bahnung der Fall.

1.2 Erforschung von Veränderung der Netzwerkaktivität und synaptischen Erregbarkeit

Eine häufige Folge von SHTs ist die Entwicklung einer posttraumatischen Epilepsie (PTE) (Frey, 2003). Es konnte festgestellt werden, dass es in Tierversuchen häufig noch vor Entwicklung von epileptischer Aktivität zu einer neuronalen Übererregbarkeit kommt (Bolkvadze and Pitkänen, 2012). Am häufigsten leiden Patienten an einer Temporallappenepilepsie (Hudak et al., 2004) und der Hippocampus scheint bei deren Entstehung eine wichtige Rolle zu spielen (Webster et al., 2017). Aus diesem Grund war es von hohem Interesse die Erregbarkeit im Hippocampus zu messen. Um die synaptische Erregbarkeit von Neuronen im CA1 zu bestimmen wurden Input/Output-Kurven aufgenommen. Zusätzlich wurde die Netzwerkaktivität durch Spontanaktivitätsmessungen erfasst.

2 Literaturdiskussion

2.1 Schädelhirntrauma (SHT)

2.1.1 Übersicht

Ein Schädelhirntrauma (SHT) ist die Folge einer Gewalteinwirkung auf den Kopf und führt zu einer Funktionsstörung oder Verletzung des Gehirns. Zusätzlich kann es Verletzungen des Schädels, der Kopfschwarte, der Dura mater und der Hirngefäße umfassen. Eine Kopfverletzung ohne Funktionsstörung oder Verletzung des Gehirns bezeichnet man als Schädelprellung (Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie e.V. (DGNC), 2015).

Des Weiteren unterteilt man Schädelhirntraumata in offene SHTs mit einer Verletzung von Dura mater, Schädelkalotte und Hirngewebe, wodurch eine direkte Verbindung von Hirngewebe und Außenwelt entsteht, und geschlossene SHTs ohne direkte Verbindung (Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie e.V. (DGNC), 2015).

Außerdem unterteilt man SHTs nach dem Schweregrad in mild, moderat und schwer. Zur Einteilung wird meist die Glasgow Coma Scale (GCS) verwendet, die das Bewusstsein mit Hilfe einer Punkteskala von 3 bis 15 Punkten bewertet. Dabei werden folgende drei Kriterien überprüft und die Einzelpunkte addiert: Öffnen der Augen (1 Punkt für keine Reaktion bis 4 Punkte für spontanes Öffnen), beste verbale Antwort (1 Punkt für keine Reaktion bis 5 Punkte für konversationsfähig und orientiert), beste motorische Antwort (1 Punkt für keine Reaktion bis 6 Punkte, wenn eine verbale Aufforderung befolgt wird). Ein SHT wird mit einer GCS von 13 bis 15 als mild bezeichnet, mit einer GCS von 9 bis 12 als moderat und mit einer GCS < 9 als schwer (Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie e.V. (DGNC), 2015).

2.1.2 Epidemiologie

Schädelhirntraumata sind die häufigste Todesursache junger Menschen in Ländern mit hohem Einkommen, wobei vor allem junge Männer betroffen sind (Capizzi et al., 2020). In Deutschland erleiden jährlich ca. 248.000 Menschen ein SHT. Das sind 332 SHTs pro 100.000 Einwohner pro Jahr, wovon die meisten mit einem Anteil von 75 bis 85% (Walker and Tesco, 2013) als leichtes SHT definiert werden. Jährlich sterben 2750 Menschen in Deutschland an einem SHT und der volkswirtschaftliche

Schaden, der durch die Folgen von Schädelhirntraumata entsteht, wird auf 2,8 Milliarden € pro Jahr geschätzt (Rickels, 2006).

Die Ursachen für ein SHT können vielfältig sein. Während in Entwicklungsländern Verkehrsunfälle die häufigste Ursache sind, überwiegen in entwickelten Ländern Stürze als Auslöser eines SHTs (Li M, 2016). Das hängt wahrscheinlich mit dem unterschiedlichen demografischen Aufbau der Gesellschaften zusammen. So sind Verkehrsunfälle die häufigste Ursache bei jungen Erwachsenen und Stürze die wichtigste Ursache vor allem bei Menschen über 65 Jahren, deren Bevölkerungsanteil in entwickelten Ländern höher ist, und auch bei Kindern (Thompson et al., 2006, Ghajar, 2000, Peeters et al., 2015). Als Auslöser eines SHTs kommen des Weiteren Schläge gegen den Kopf, zum Beispiel im Sport oder bei körperlichen Auseinandersetzungen, sowie eine schnelle Beschleunigung bzw. ein abruptes Abbremsen des Kopfes in Frage. Bei Kleinkindern kann ein SHT durch ein Schütteltrauma ausgelöst werden. Eine weitere Ursache ist ein durch Explosionen ausgelöstes SHT, das „blast-TBI (traumatic brain injury)“ genannt wird. Dieses wurde bei einer Großzahl von US-Soldaten bei Einsätzen im Irak- und Afghanistankrieg festgestellt (Terrio et al., 2009, Mac Donald et al., 2011).

Zudem hat in den letzten Jahren das öffentliche Interesse an SHTs im Sport, insbesondere im American Football, zugenommen. Beim Sport spielen besonders repetitive SHTs, wie sie zum Beispiel beim Boxen und American Football vorkommen, eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von neurologischen Spätfolgen (Manley et al., 2017). Schon 1928 wurde das sogenannte „punch-drunken“-Syndrom erstmals bei Boxern beschrieben (MARTLAND, 1928), das heute als Variante der neurodegenerativen Erkrankung Chronische Traumatische Enzephalopathie (CTE) gilt. Erstmals von Omalu et al. beschrieben (Omalu et al., 2005) zeigten in den letzten Jahren einige Studien das Vorkommen von CTE bei ehemaligen American Football-Profis (Mez et al., 2017, Hazrati et al., 2013, Omalu et al., 2011). Bei weiteren neurodegenerativen Erkrankungen gibt es Hinweise auf SHT als einen Risikofaktor. So zeigen einige Studien einen Zusammenhang eines SHTs mit der späteren Entwicklung von Krankheiten wie Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer oder Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) (Gardner et al., 2015, Goldman et al., 2006, Plassman et al., 2000, Watanabe and Watanabe, 2017).

In der Zeit nach einem SHT steigt das Risiko epileptische Anfälle zu erleiden. Auch bei der Entwicklung einer Epilepsie gilt ein SHT als ein bedeutender Risikofaktor (Fordington and Manford, 2020).

2.1.3 Pathophysiologie

Die Pathophysiologie des SHTs lässt sich in einen primären und sekundären Hirnschaden unterteilen. Zum Zeitpunkt der Gewalteinwirkung entsteht der primäre Hirnschaden. Er umfasst den Zelltod von Neuronen und Gliazellen, sowie Funktionsstörungen von Neuronen und Schäden an intrakraniellen Blutgefäßen. Der primäre Hirnschaden lässt sich weiter in fokale und diffuse Verletzungen des Gehirns unterteilen. So entsteht lokal ein Hirnschaden nach dem Prinzip des „Coup-Contrecoup-Mechanismus“. Das Gehirn schlägt von innen auf die Kalotte, sowohl am Ort der direkten Gewalteinwirkung (Coup) als auch auf der gegenüberliegenden Seite (Contrecoup). Dabei wird das Gewebe komprimiert, wodurch häufig zwei Verletzungspole entstehen. Bei offenen SHTs kann das Hirngewebe durch penetrierende Objekte direkt verletzt werden (Ng and Lee, 2019).

Durch Beschleunigungs- und Rotationskräfte, die durch eine starke Kopfbewegung direkt im Moment der Gewalteinwirkung entstehen, kann es zu einer diffusen Verletzung von Hirngewebe kommen. Dabei sind von den Schärkräften neben Blutgefäßen insbesondere Axone betroffen, was zu einer diffusen axonalen Verletzung (DAI) führt. Eine DAI kann in einer bei SHT standardmäßig durchgeführten Computertomographie-Untersuchung nicht festgestellt werden, allerdings ist es möglich mit Hilfe einer diffusionsgewichteten Magnetresonanztomographie (MRT)-Untersuchung bestimmte Muster einer DAI festzustellen (Mac Donald et al., 2007). Es konnte an SHT-Patienten gezeigt werden, dass eine DAI zu Neurodegeneration im Bereich der Weißen Substanz führen kann (Graham et al., 2020).

Als Folge des primären Schadens entsteht in den Stunden bis Wochen nach dem SHT der sekundäre Hirnschaden. Während der primäre Hirnschaden irreversibel ist und deshalb nur mit primärpräventiven Maßnahmen verhindert werden kann, stellen die Prozesse, die zum sekundären Hirnschaden führen, ein potenzielles Ziel für zukünftige Therapien dar, weshalb sie im Fokus vieler Studien stehen. Durch Verletzung von Blutgefäßen kann es zu intrakraniellen Blutungen, Hirnödemen und einem damit einhergehenden Anstieg des intrakraniellen Drucks (ICP) kommen

(Walker and Tesco, 2013). Durch diese Prozesse wird die Perfusion im Gehirn gestört, wodurch es zu einer Ischämie kommt. Die mangelhafte Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen führt zur Schädigung weiterer Neuronen und Gliazellen.

In der Akutphase nach dem SHT kommt es durch verschiedene Ursachen zu einem starken Anstieg des extrazellulären Glutamat-Levels. Dies konnte sowohl im Tiermodell (Palmer et al., 1993) als auch beim Menschen (Bullock et al., 1998) nachgewiesen werden. Für den Glutamat-Anstieg kommen mehrere Ursachen in Betracht (Yi and Hazell, 2006):

- Durch Verletzung von Blutgefäßen wird die Bluthirnschranke gestört, wodurch Glutamat direkt vom Blut in das Interstitium des Gehirns gelangt.
- Durch Schädigung von Neuronen tritt intrazelluläres Glutamat aus der Zelle aus.
- Nach Schädigung und Untergang von Neuronen kommt es zu einer Imbalance der intra- und extrazellulären Ionen. Dies führt zur Depolarisation der Membran glutamaterger Neuronen, wodurch Glutamat freigesetzt wird.
- Die ischämische Stoffwechsellage führt zu einem Energiemangel in Astrozyten und Neuronen, wodurch die Glutamat-Wiederaufnahme gestört wird.

Der erhöhte Glutamat-Spiegel führt durch einen als „Exzitotoxizität“ beschriebenen Effekt zu einer Schädigung weiterer Neuronen. Eine wichtige Rolle in diesem Pathomechanismus spielen die beiden Kationen Ca^{2+} (Calcium) und Na^+ (Natrium), die durch Aktivierung von Glutamatrezeptoren vom extrazellulären in den intrazellulären Raum gelangen. Die Natrium-Ionen führen dabei über eine Depolarisation zu einem weiteren Calciumeinstrom, einer Freisetzung von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum und über osmotische Kräfte zu einer Zellschwellung (Walker and Tesco, 2013). Durch den intrazellulären Calcium-Anstieg werden Caspasen und Calpaine aktiviert, die den Zelltod durch Apoptose bzw. Nekrose einleiten (McAllister, 2011).

Zusätzlich zu den exzitatorischen Effekten führt die Ischämie nach SHT zur Entstehung von freien Radikalen, zu einer mitochondriellen Dysfunktion und zu einer inflammatorischen Reaktion. Durch Zellschäden und Zelluntergang nach SHT kommt es zur Freisetzung der sogenannten damage-associated molecular patterns (DAMPs) (Karve et al., 2016). DAMPs sind endogene Moleküle, die an Toll-like-

Rezeptoren binden, die sich unter anderem auch auf Mikroglia und Astrozyten befinden und dadurch aktiviert werden. Durch eine Schädigung der Bluthirnschranke kommt es außerdem zur Infiltration von peripheren Immunzellen (Jin et al., 2012). In Läsionsnähe des SHTs kommt es zu einer Aktivierung von Astrozyten und durch deren gesteigerte Proliferation zu einer Zunahme ihrer Anzahl (Karve et al., 2016). Die Auswirkungen, die sich daraus auf die Hirnverletzung ergeben, werden kontrovers diskutiert. So können Astrozyten eine protektive als auch schädliche Rolle nach SHT spielen. Durch Ausbildung einer Glianarbe wird eine Barriere geschaffen, die das gesunde Gewebe vor Schädigung von DAMPs und infiltrierenden Immunzellen schützt (Karve et al., 2016). Außerdem spielen Astrozyten eine wichtige Rolle für die Glutamat-Homöostase und sind zur Glutamat-Wiederaufnahme fähig. In einem Experiment an Ratten und Zellkulturen konnte gezeigt werden, dass es durch Blockade der Synthese von Glutamat-Transportern an Astrozyten *in vitro* und *in vivo* zu einer Erhöhung des extrazellulären Glutamats kam, die mit einer Neurotoxizität einherging (Rothstein et al., 1996). Somit haben Astrozyten potenziell eine protektive Funktion, um Neurone vor der gesteigerten Exzitotoxizität nach SHT zu schützen. Allerdings kommt es durch Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine zu einer weiteren Schädigung der Bluthirnschranke (Karve et al., 2016). In einem Versuch an Ratten, konnte durch Blockade der Astrozytenproliferation der Zelltod von Neuronen reduziert werden (Di Giovanni et al., 2005). Astrozyten scheinen auch Einfluss auf die Aktivität von Mikroglia zu nehmen. In einem Zellkulturmodell eines SHTs bei genetisch veränderten Astrozyten, die zu keiner Migration in Richtung Verletzung fähig waren, wurde eine Erhöhung der Mikroglia-Dichte in Läsionsnähe beobachtet (Robel et al., 2011). In einem *in vitro* Modell wurde an Astrozyten-Zellkulturen durch Glukose und Sauerstoffentzug der Zustand einer Ischämie simuliert. Es zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine gesteigerte Freisetzung neuroprotektiver Faktoren, die die Aktivierung von Mikrogliazellen hemmte (Kim et al., 2010). Somit scheint eine gesteigerte Mikroglia-Aktivität ein Kompensationsmechanismus bei einer abgeschwächten Astrozytenaktivierung zu sein und umgekehrt Astrozyten die Mikroglia-Aktivität zu hemmen (Karve et al., 2016).

Ähnlich wie bei Astrozyten scheinen Mikroglia sowohl die Erholung des Nervengewebes nach SHT zu unterstützen, als auch zu einer weiteren Schädigung beizutragen. Durch Phagozytose und Freisetzung anti-inflammatorischer Zytokine

können sie einer weiteren Schädigung von Hirngewebe vorbeugen, allerdings kommt es bei einer Überaktivierung von Mikroglia zur Freisetzung zytotoxischer Substanzen, welche die Nervenfunktion stören und zum Absterben von Neuronen führen können. (Loane and Kumar, 2016).

2.1.3.1 Epileptogenese nach Schädelhirntrauma

Als Epileptogenese wird der Prozess nach einer Hirnschädigung genannt, bei dem es zu Veränderungen des neuronalen Netzwerkes kommt und das Gehirn der Geschädigten dadurch anfälliger für die Entstehung von epileptischen Anfällen wird (Pitkänen et al., 2015). Diese Veränderungen spielen eine wesentliche Rolle bei der Entstehung von posttraumatischer Epilepsie (PTE). PTE wird definiert durch das Auftreten von spontanen, wiederkehrenden oder chronischen epileptischen Anfällen nach einer Kopfverletzung (Webster et al., 2017). Angaben zur Häufigkeit der Entstehung von PTE nach Schädelhirntrauma schwanken dabei stark. In einer Metaanalyse von mehreren Studien zu dem Thema wurde eine Inzidenz zwischen 4,4% bis 53% festgestellt, wobei das Risiko anstieg, je schwerer das SHT war (Frey, 2003). Dabei kann es Jahre dauern bis zum Einsetzen der PTE (Webster et al., 2017). Das Risiko der Entwicklung einer pharmakoresistenten Epilepsie, bei der es zu keiner zufriedenstellenden Anfallskontrolle trotz Einsatz von mindestens zwei anerkannten Antikonvulsiva kommt, ist bei PTE deutlich erhöht (Kwan et al., 2011, Larkin et al., 2016).

Um die Pathomechanismen der Epileptogenese nach SHT besser zu verstehen, sind neben klinischen Untersuchungen auch Tierversuche hilfreich. Bedingt durch das häufig späte Einsetzen von epileptischen Anfällen bei PTE sind Untersuchungen am Menschen sehr aufwendig und viele elektrophysiologische Untersuchungen sind aus ethischen Gründen nicht durchführbar. In vielen Untersuchungen an Mäusen und Ratten konnte ebenfalls eine erhöhte Rate von epileptischer Aktivität nach SHT festgestellt werden (Bugay et al., 2020, Kharatishvili et al., 2006, Hunt et al., 2010, Konduru et al., 2021).

Die meisten epileptischen Anfälle von PTE-Patienten entstehen im Temporallappen (Hudak et al., 2004) und PTE ist assoziiert mit einer Hippocampusklerose, einem Pyramidenzellverlust und reaktiver Gliose (Webster et al., 2017). In der frühen Phase nach SHT wurde sowohl bei Menschen als auch in Tierversuchen ein Anstieg der hippocampalen Erregbarkeit beobachtet (Webster et al., 2017). Damit in

Zusammenhang scheint ein verstärktes irreguläres Sprießen von Moosfasern zu stehen. Moosfasern ziehen eigentlich vom Gyrus dentatus zu den Pyramidenzellen im CA3. Als Folge eines SHTs kommt es vermehrt zum Zelltod im CA3 (Feng et al., 2012, Tsuda et al., 2016). Durch den Verlust von Zielzellen entstehen Verbindungen zwischen Moosfasern mit angrenzenden Körnerzellen des Gyrus dentatus (Cavarsan et al., 2018). Dadurch entsteht eine exzitatorisch rekurrente Verschaltung (Golub and Reddy, 2022b). Das irreguläre Moosfasersprießen konnte an Patienten mit Temporallappenepilepsie nachgewiesen werden (Sutula et al., 1989). In einem Versuch mit Mäusen, denen ein SHT zugefügt wurde, konnte ebenfalls ein irreguläres Moosfasersprießen nachgewiesen werden. Dabei war das Moosfasersprießen stärker ausgeprägt bei Mäusen, die direkt nach CCI-Induktion epileptische Anfälle hatten, und korrelierte positiv mit der Stärke der CCI (Hunt et al., 2012).

Neben den Veränderungen der neuronalen Vernetzung wird ein Ungleichgewicht zwischen inhibitorischen und exzitatorischen Signalen nach SHT diskutiert. So zeigte eine kürzlich veröffentlichte Studie an Mäusen einen signifikanten Verlust von exzitatorischen Prinzipalzellen und inhibitorischen Interneuronen in allen Regionen des Hippocampus nach CCI, wobei der Verlust der Interneurone deutlich stärker ausgeprägt war (Golub and Reddy, 2022a). Dabei war der Gyrus dentatus am stärksten von einem Zellverlust von Interneuronen betroffen. In Microdialyseuntersuchungen von Patienten konnte in der Akutphase nach SHT ein signifikanter Anstieg an extrazellulärem Glutamat festgestellt werden (Bullock et al., 1998, Vespa et al., 1998).

2.1.4 Tiermodelle eines Schädelhirntraumas

Um die pathophysiologischen Auswirkungen eines Schädelhirntraumas zu erforschen, sind Tiermodelle nötig, da viele Experimente aus ethischen Gründen nicht an Menschen durchgeführt werden können. Es wurden verschiedene Modelle entwickelt, wobei sich die Modelle unter anderem dadurch unterscheiden, welche SHT-Ursache sie simulieren sollen. Etablierte Modelle für ein SHT sind controlled cortical impact (CCI), fluid percussion injury (FPI), weight drop (WD), blast-TBI und penetrating ballistic brain injury (PBBi).

Modelle der blast-TBI stehen besonders im Fokus militärischer Forschung, um die Folgen von SHTs bei Soldaten nach Explosionen zu untersuchen. Es gibt zwei

etablierte Modelle zur Simulation der blast-TBI (Ma et al., 2019). Die Tiere werden in einem Rohr platziert, in dem sie einer Druckwelle ausgesetzt sind. Durch eine schnelle Rotation des Kopfes wird das Gehirn innerhalb des Schädels beschleunigt, wodurch ein geschlossenes SHT entsteht (Petersen et al., 2021). Als Auslöser wird entweder Druckluft oder Sprengstoff verwendet. Druckluft hat den Vorteil, dass die Experimente damit besser reproduzierbar sind und die Stärke der Druckwelle einfacher zu regulieren ist (Ma et al., 2019). Studien haben gezeigt, dass Modelle der blast-TBI die Bluthirnschranke schädigen und zu Hirnödemen sowie zu diffusen axonalen Verletzungen (DAI) führen können (Kabu et al., 2015, Garman et al., 2011). Ein weiteres für das Militär interessantes Modell ist die penetrating ballistic brain injury (PBBi), welche zur Erforschung von offenen SHTs verwendet wird. Es wurden Versuche an Katzen (Carey et al., 1990) gemacht, bei denen ein SHT durch den Schädel penetrierende ballistische Projektile ausgelöst wurde. Das PBBi-Modell verursacht eine starke intrazerebrale Blutung, die durch das ballistische Geschoss entsteht, und ist damit nur bedingt mit anderen TBI-Modellen vergleichbar (Xiong et al., 2013).

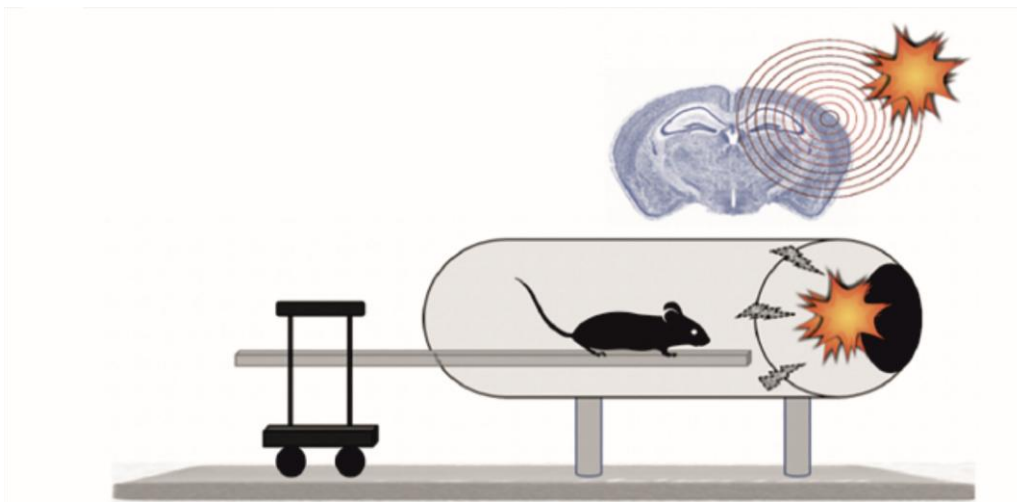


Abbildung 1: Modell der blast-TBI (modifiziert von Shah et al., 2019)

Bei dem weight drop-Modell (WD) wird der Kopf des Tieres unter einem Rohr platziert, durch das ein Gewicht fallen gelassen wird. Die Stärke der Verletzung kann beeinflusst werden, indem man entweder das Gewicht verändert oder die Länge des Rohrs und damit die Fallhöhe variiert. Das Gewicht kann auf den Schädel des Versuchstiers fallen gelassen werden (Xiong et al., 2013) oder nach Öffnung des

Schädelknochens direkt auf die Dura mater (Feeney et al., 1981). Dadurch wird sowohl eine fokale als auch diffuse Hirnverletzung ausgelöst (Petersen et al., 2021). Speziell zur Erforschung von diffusen Hirnverletzungen kann ein Helm am Schädel der Mäuse angebracht werden, auf den das Gewicht fällt (Marmarou et al., 1994, Chakraborty et al., 2021). Dadurch verteilt sich die Kraft des Einschlages besser auf das Hirngewebe, und es wird eine diffuse axonale Verletzung ausgelöst. Ein Vorteil des WD ist der einfache und kostengünstige Versuchsaufbau, jedoch wird die höhere Mortalität von Versuchstieren im Vergleich zu anderen Modellen kritisiert.

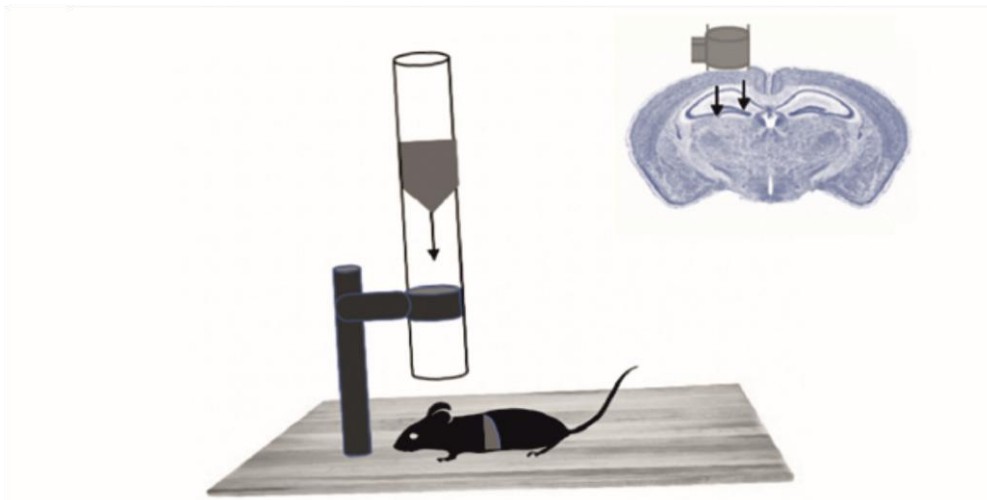


Abbildung 2: weight drop-Modell (WD) (modifiziert von Shah et al., 2019)

Bei dem FPI-Modell schlägt ein Pendel auf einen Kolben, der den Impuls auf ein mit Flüssigkeit gefülltes Rohr überträgt. Der hydraulische Impuls wird über einen Schlauch auf die Dura mater des Versuchstiers weitergeleitet. Die Verletzung wird entweder in der Nähe der Mediansagittallinie (midline FPI) oder weiter lateral (lateral FPI) induziert. Der Pathomechanismus der FPI wird primär durch eine DAI ausgelöst und weniger durch Zelltod von Neuronen (Petersen et al., 2021). Ein Problem der FPI, insbesondere der midline FPI, ist eine erhöhte Mortalität durch Verletzung des Hirnstammes und einer damit einhergehenden Störung des Atemantriebs (Cernak, 2005).

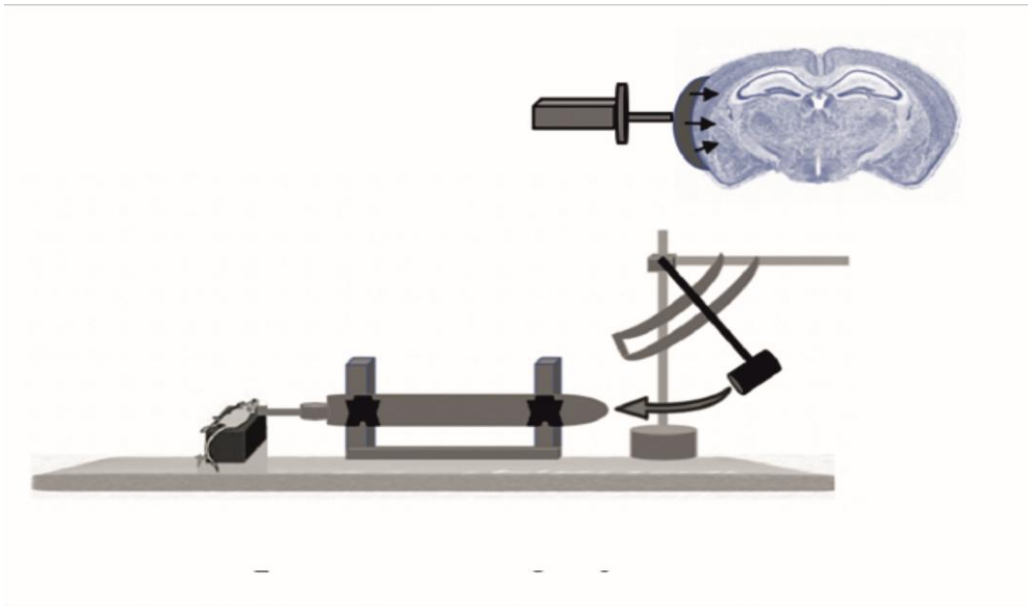


Abbildung 3: Modell der fluid percussion injury (FPI) (modifiziert von Shah et al., 2019)

Bei dem CCI-Modell wird das SHT durch Schlag eines Bolzens direkt auf die intakte Dura mater ausgelöst. Der Bolzen wird je nach Modell des Impactors entweder pneumatisch oder elektromagnetisch beschleunigt. Dabei kann sowohl die Eindringtiefe und die Verweildauer der Bolzenspitze im Hirngewebe als auch die Geschwindigkeit des Bolzens eingestellt werden. Durch die einfache Kontrolle dieser Parameter lässt sich eine einheitliche, sehr gut reproduzierbare Verletzung induzieren (Petersen et al., 2021). Der durch die CCI ausgelöste Gewebeschaden betrifft initial besonders den Zelltod von Neuronen in der kortikalen Region, in der die Verletzung durch CCI appliziert wurde. Allerdings konnte gezeigt werden, dass eine ausgedehnte Zelldegeneration nach kortikaler CCI bis in den ipsilateralen und kontralateralen Hippocampus möglich ist (Hall et al., 2005).

Aus den genannten Gründen scheint das CCI-Modell sich sehr gut zur Erforschung der Folgen eines SHT im Tiermodell zu eignen und wurde in den von mir durchgeführten Experimenten angewandt.

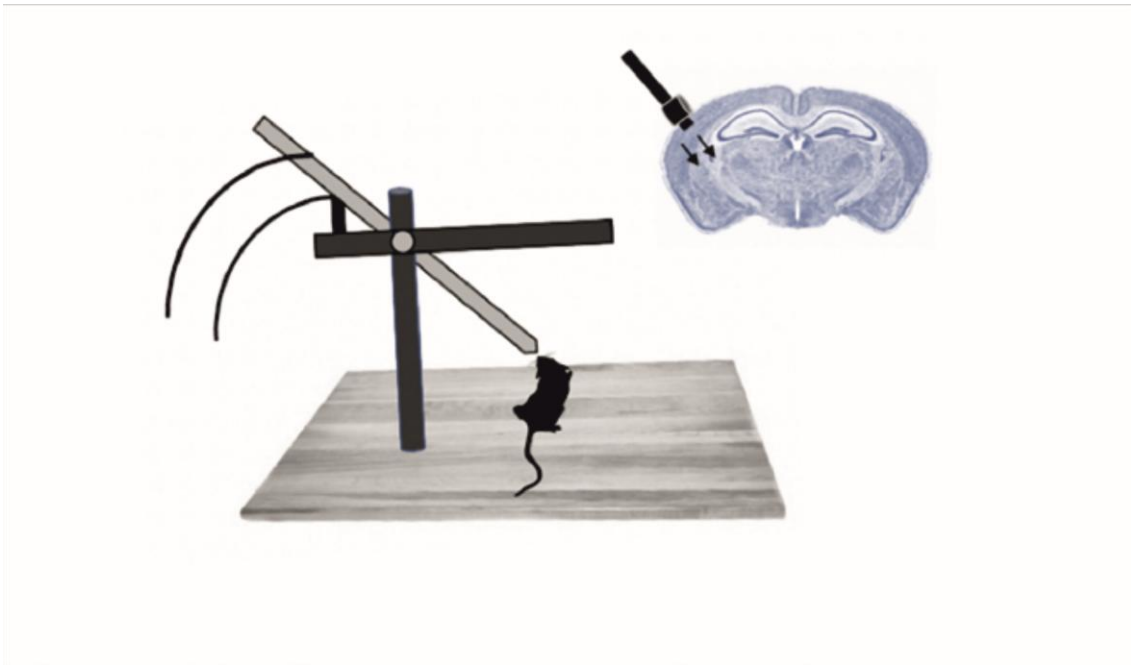


Abbildung 4: Modell des controlled cortical impacts (CCI) (modifiziert von Shah et al., 2019)

2.2 Anatomie des Gehirns

Das menschliche Gehirn ist zusammen mit dem Rückenmark Teil des zentralen Nervensystems (ZNS). Das Gehirn kann man unterteilen in Hirnstamm, Kleinhirn (Cerebellum), Zwischenhirn (Diencephalon) und Endhirn (Telencephalon). Das Telencephalon wiederum umfasst sowohl Kernregionen (Nuclei) und eine Hirnrinde (Kortex) und wird in zwei Hemisphären unterteilt, ist somit paarig angelegt.

Beim Menschen lassen sich die Hemisphären wiederum in einen Frontal-, Parietal-, Temporal- und Okzipitallappen unterteilen, die wiederum mehrere Gehirnwindungen (Gyri), die durch Furchen (Sulci) voneinander getrennt sind, umfassen (Trepel, M., 2021). Im Gegensatz dazu hat der zerebrale Kortex von Mäusen wie auch von anderen Nagern keine Lappen und keine Gyri, sondern zeigt einen lissenzephalen Aufbau (Schröder, H. et al., 2020). Außerdem wird der Kortex in verschiedene Areale unterteilt. Die verschiedenen Gehirnregionen haben dabei spezifische Aufgaben. So ist der Motorkortex, der Ort des verursachten Schädelhirntraumas in meinen Experimenten, für die Steuerung der Skelettmuskulatur verantwortlich.

Zusätzlich lässt sich der Kortex histologisch in den sechsschichtigen Neokortex, auch Isokortex genannt, und den drei- bis fünfschichtigen Allokokortex unterteilen. Der Allokokortex lässt sich wiederum in den Archikortex und den Paläokortex, den

phylogenetisch ältesten Teil der Großhirnrinde, unterteilen. Der Übergangsbereich zwischen diesen Kortexarealen wird Mesokortex genannt. Der Neokortex macht mit ca. 95 % den größten Teil des Kortexes aus (Welsch, U. et al., 2018).

2.2.1 Hippocampus

Der Hippocampus gehört zum Archikortex und wird funktionell als Teil des limbischen Systems gesehen. Er hat eine wichtige Funktion bei der Konsolidierung von neuen Gedächtnisinhalten (siehe Kapitel 2.2.1.3).

2.2.1.1 Anatomie des Hippocampus

Der Hippocampus bildet zusammen mit dem entorhinalen Kortex (EC) und dem Subiculum die Hippocampusformation, die wiederum funktionell dem limbischen System angehört. Weitere Strukturen des limbischen Systems sind Fornix, Gyrus cinguli, Corpus mamillare und Corpus amygdaloidum. Meist werden das Indusium griseum, der Großteil des Riechhirns und Anteile des Thalamus ebenfalls dazugerechnet. Der Hippocampus selbst kann wiederum unterteilt werden in das Cornu ammonis (CA), auch Hippocampus proprius genannt, und den Gyrus dentatus (DG) (Trepel, M., 2021).

Während sich der histologische Aufbau des Hippocampus bei Menschen und Mäusen ähnelt (siehe Kapitel 2.2.1.2), unterscheidet sich die topographische Lage. Beim Menschen liegt das rostrale Ende des Hippocampus, der Pes hippocampi, in der Tiefe des Temporallappens, medial des Unterhorns des Seitenventrikels. Er zieht sich von da bogenförmig entlang des Seitenventrikels in okzipital-parietaler Richtung und geht über in das Crus fornicis. Bei der Maus liegt das rostradorsale Ende des Hippocampus unterhalb des Corpus callosum und ist vom Motorkortex und dem somatosensorischen Kortex bedeckt. Der Hippocampus zieht sich von da aus hinter dem Diencephalon kommaförmig kaudoventral in Richtung des temporalen Kortexes (Trepel, M., 2021, Schröder, H. et al., 2020, Watson, C. et al., 2012).

2.2.1.2 Histologischer Aufbau des Hippocampus

Der entorhinale Kortex liegt als Teil des Gyrus parahippocampalis im Lobus temporalis und hat, im Gegensatz zum Hippocampus, einen sechsschichtigen Aufbau. Da sich der Kortex nach innen einrollt, bedeckt der Gyrus parahippocampalis den Hippocampus von außen. Der entorhinale Kortex geht über in das Parasubiculum und weiter folgen das Presubiculum, das Subiculum und das Cornu ammonis. Dabei geht der sechsschichtige Neokortex in einen dreischichtigen

Archikortex über. Das Cornu ammonis windet sich in die Gegenrichtung, wodurch die Hippocampusformation einen S-förmigen Verlauf hat. Das Cornu ammonis kann wiederum je nach Definition in 3 oder 4 Subareale unterteilt werden. An das Subiculum anschließend wird es wie folgt unterteilt: Cornu ammonis 1 (CA1), Cornu ammonis 2 (CA2), Cornu ammonis 3 (CA3) und je nach Literatur Cornu ammonis 4 (CA4). Das CA4 wird V-förmig umschlungen vom Gyrus dentatus, weshalb es teilweise auch als Zellschicht des Gyrus dentatus gezählt wird. (Welsch, U. et al., 2018, Trepel, M., 2021, Schröder, H. et al., 2020)

Wie oben bereits erwähnt hat der Hippocampus einen dreischichtigen Aufbau. Allerdings haben der Gyrus dentatus, das Cornu ammonis und das Subiculum unterschiedliche Schichten, wobei die mittlere Schicht jeweils die höchste Zelldichte aufweist. Der Gyrus dentatus hat von apikal nach basal die folgenden Schichten: das Stratum moleculare, in dem sich u.a. die Dendriten der Körnerzellen aus dem Stratum granulosum befinden; das Stratum granulosum mit den glutamatergen Körnerzellen und GABAergen Korbzellen (GABA = Gamma-Aminobuttersäure) (Watson, C. et al., 2012) und dem Hilus, der mittig im V-förmigen Gyrus dentatus liegt, auch polymorphe Zellschicht genannt. Hier befindet sich auch das CA4.

Die apikale Zellschicht des Cornu ammonis, das Stratum moleculare, lässt sich je nach Subregion (CA1-CA3) in weitere Unterschichten einteilen. Dabei liegen jeweils apikal das Stratum lacunosum-moleculare, durch das der Tractus perforans zieht (siehe Kapitel 2.2.1.3), und das Stratum radiatum, in dem sich vor allem hippocampuseigene Assoziationsfasern befinden. Im CA1 und CA2 grenzt das Stratum lacunosum-moleculare direkt an das Stratum pyramidum an. Im CA3 liegt basal davon noch das Stratum lucidum mit den Axonen der Körnerzellen des DG, den Moosfasern. Das Ende des Stratum lucidum markiert den Übergang von CA3 zu CA2. Das zellreiche Stratum pyramidale beherbergt vorwiegend glutamaterge Pyramidenzellen, deren Dendriten in die apikalen und basalen Schichten hineinragen. Basal liegt das zellarme Stratum oriens. An das Stratum oriens angrenzend liegt der Alveus. Durch den Alveus ziehen efferente Fasern des Cornu ammonis zur Fimbria hippocampi und von dort weiter zum Fornix.

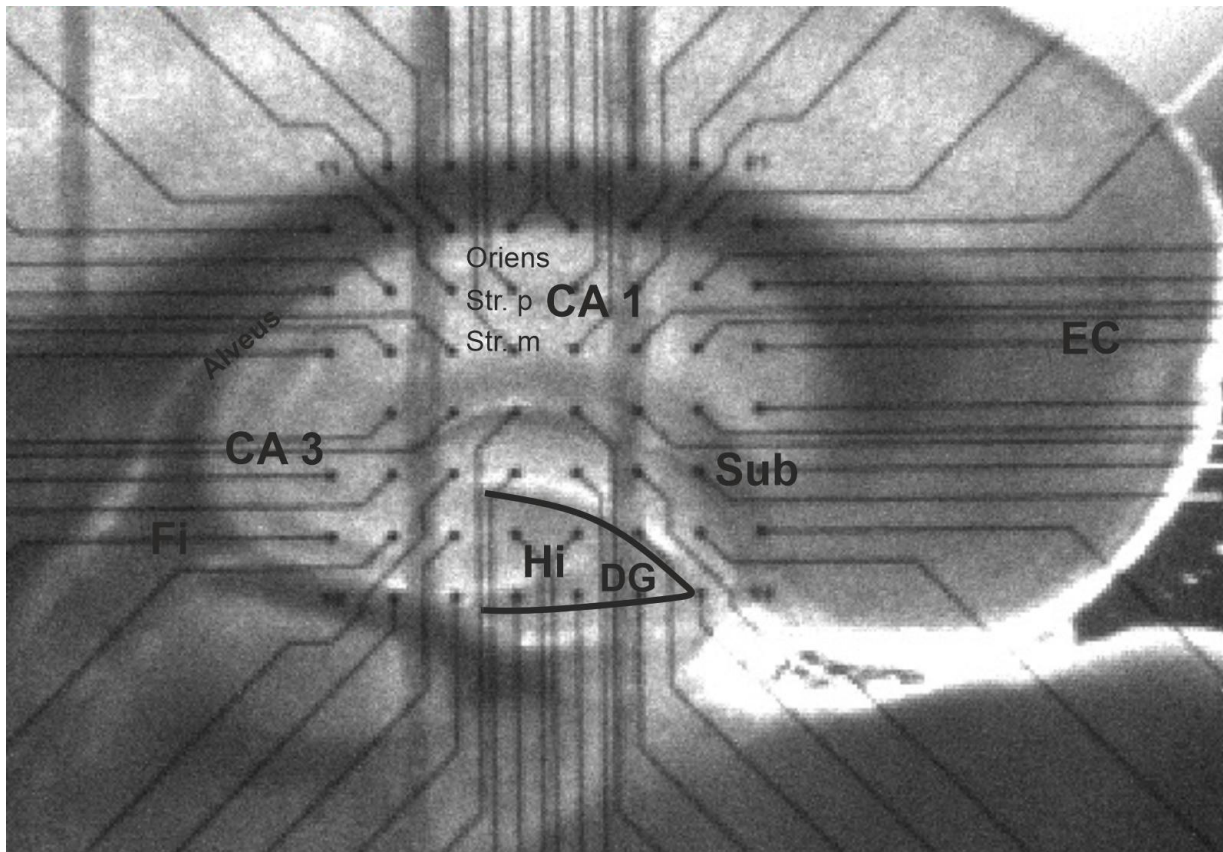


Abbildung 5: Maushippocampus mit histologischer Beschriftung

Foto eines horizontalen Schnitts durch den Hippocampus einer Maus. Der Hirnschnitt ist auf einem MEA-Chip platziert, dessen Elektroden man im Hintergrund erkennen kann. Der Kortex windet sich im Bereich der Hippocampusformation vom entorhinalen Kortex (EC) über das Subiculum (Sub) bis zum Cornu ammonis (CA) S-förmig ein und geht dabei von einem sechsschichtigen neokortikalen Aufbau in den dreischichtigen Archikortex über. Das Ammonshorn selbst wird unterteilt in CA1-4, wobei CA4 auch als Hilus (Hi) des Gyrus Dentatus (DG) bezeichnet wird, der sich V-förmig darumlegt. Der histologische Aufbau ist hier beispielhaft in der Region CA1 angedeutet. Apikal (hier im Bild die unterste Schicht) liegt das Stratum moleculare (Str.m). Darüber ist das Stratum pyramidale (Str. p) zu sehen, in dem die Somata der Pyramidenzellen des CA liegen. Basal liegt der Oriens, über dem im Bild der Alveus zu sehen ist. Durch den Alveus ziehen Axone des CA in Richtung Fimbria hippocampi (Fi) und von dort aus weiter zum Fornix.

Das Gewebe des Hippocampus besteht aus Nervenzellen (Neuronen) und Gliazellen. Die Gliazellen im Gehirn umfassen Astrozyten, Oligodendrozyten, Ependymzellen und Mikroglia. Die Astrozyten haben neben einer Stützfunktion unter anderem die Aufgabe Neurone mit Nährstoffen zu versorgen, sie bilden zusammen mit den Blutgefäßen die Bluthirnschranke und sind an der Wiederaufnahme von Neurotransmittern beteiligt. Bei Verletzungen, die zu einem Untergang von Neuronen führen, kommt es meist zu einer Proliferation von Astrozyten und diese bilden eine

sogenannte Glianarbe (Trepel, M., 2021). Die Aufgabe der Oligodendrozyten ist die Bildung der Myelinschicht um die Axone der Neurone. Die Ependymzellen bilden die Begrenzung der Ventrikel und die Mikroglia haben eine protektive Funktion und sind als Teil des Immunsystems zu Phagozytose und Antigenpräsentation fähig (Trepel, M., 2021).

Im Hippocampus werden die Neurone in Prinzipalzellen und Nicht-Prinzipalzellen unterteilt (Welsch, U. et al., 2018). Die Prinzipalzellen umfassen die Körnerzellen des Gyrus dentatus und die Pyramidenzellen im Cornu ammonis und bilden ca. 90% aller hippocampalen Neurone ab. Nicht-Prinzipalzellen sind Interneurone, die meist GABAerg sowohl Prinzipalzellen als auch andere Interneurone inhibieren.

2.2.1.3 Vernetzung des Hippocampus

Die Vernetzung des Hippocampus kann vereinfacht in eine intrinsische und eine extrinsische Neuronenschleife unterteilt werden. In beiden Schleifen ziehen Axone aus Neuronen des EC im Tractus perforans in Richtung Stratum moleculare zu den Dendriten der Körnerzellen des DG. Auf diesem Weg zieht der Tractus perforans durch das Subiculum. Vom DG ausgehend ziehen die Axone als sogenannte Moosfasern entlang des Stratum lucidum zu den apikalen Dendriten der Pyramidenzellen des CA3. Von dort aus ziehen die Schaffer-Kollaterale entlang des Stratum radiatum zu den apikalen Dendriten der Pyramidenzellen des CA1. Als Teil der intrinsischen Neuronenschleife ziehen Fasern des CA1 zum Subiculum, wo es zu einer weiteren Verschaltung kommt, bevor von dort aus Axonen zurück zum EC ziehen und die intrinsische Neuronenschleife schließen. Die extrinsische Neuronenschleife wird auch Papez-Neuronenkreis genannt und umfasst weitere Kerngebiete des limbischen Systems. In der externen Neuronenschleife ziehen die Axone der Pyramidenzellen des CA1 durch den Alveus in Richtung Fimbria hippocampi und von dort über den Fornix zum Corpus mamillare. Dort findet eine synaptische Signalübertragung statt und vom Corpus mamillare ziehen Fasern über den Fasciculus mamillothalamicus, auch Vicq d'Azyr-Bündel genannt, zu den Neuronen der Nuclei anteriores thalami. Das Signal wird von dort aus zu Neuronen des Gyrus cinguli weitergeleitet, deren Axone schließlich über das Cingulum zurück zum EC führen, wodurch sich die extrinsische Neuronenschleife schließt (Trepel, M., 2021).

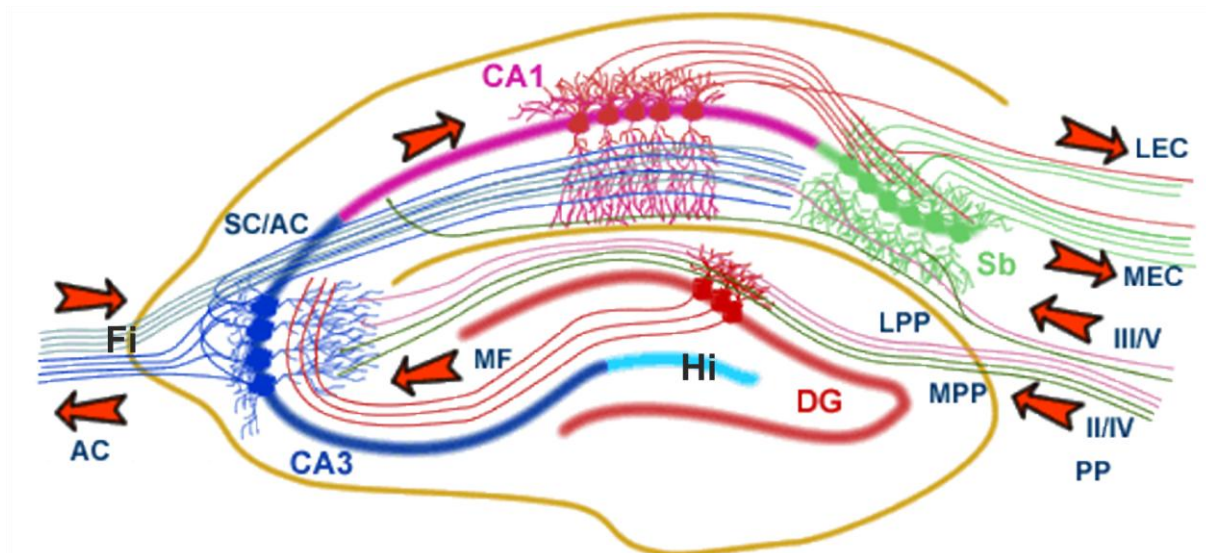


Abbildung 6: Vernetzung des Hippocampus (modifiziert von bristol.ac.uk)

Der Gyrus dentatus (DG) empfängt exzitatorische Signale über den Tractus perforans (PP) vom entorhinalen Kortex (MEC = medialer entorhinaler Kortex, LEC = lateraler entorhinaler Kortex). Dabei werden apikal gelegene Dendriten erregt. Vom DG aus ziehen die Moosfasern (MF) in Richtung CA3, wo es zu einer weiteren synaptischen Verschaltung kommt. Die Pyramidenzellen des CA3 aktivieren über die Schaffer-Kollateralen (SC) Pyramidenzellen im CA1, von wo aus Fasern in Richtung EC ziehen und somit die intrinsische Neuronenschleife schließen. Außerdem ziehen Fasern vom CA1 in Richtung Fimbria hippocampi (Fi) als Teil der extrinsischen Neuronenschleife, die auch Papez-Neuronenkreis genannt wird.

Weitere Efferenzen ziehen über das Fornix zum Hypothalamus, wodurch der Hippocampus Einfluss auf das endokrine System nimmt, sowie zu den Nuclei anteriores des Thalamus und zur Amygdala.

Außerdem gibt es Assoziationsfasern, die vom Stratum pyramidale des CA3 zu Pyramidenzellen im CA3 und CA1 ziehen. Zudem ziehen Kommissurenfasern über das Corpus callosum zum kontralateralen CA und verbinden damit beide Hippocampi (Watson, C. et al., 2012).

2.3 Synaptische Plastizität

Synaptische Plastizität beschreibt eine Veränderung der synaptischen Übertragungsstärke in Abhängigkeit zu deren Aktivität und gilt als essentieller Mechanismus für das Erlernen neuer Gedächtnisinhalte (Luchkina and Bolshakov, 2019). Synaptische Plastizität wurde 1949 von Donald Olding Hebb erstmals beschrieben. Seine These beschrieb, dass sich die Stärke der synaptischen Übertragung durch metabolische Prozesse verstärkte, wenn es zu repetitiven

Aktionspotentialen in einer exzitatorischen Zelle kommt, wodurch eine weitere Zelle wiederholt aktiviert wird (Hebb, 1949).

Synaptische Plastizität lässt sich unterteilen in Kurzzeit- und Langzeitplastizität. Bei der Kurzzeitplastizität hält die Signalverstärkung bzw. -abschwächung nur ca. 1 Minute lang an. Dabei unterscheiden sich die beiden auch in den Mechanismen, die das synaptische Signal beeinflussen. Zur Kurzzeitplastizität wird die signalverstärkende Kurzzeitpotenzierung, auch Bahnung genannt, und die signalabschwächende Kurzzeitdepression gezählt. Beide entstehen durch eine repetitive synaptische Erregung (Brandes, R. et al., 2019).

2.3.1 Synaptische Kurzzeitplastizität

In chemischen Synapsen wird der Neurotransmitter in präsynaptischen Vesikeln gespeichert. Vor einer synaptischen Transmission kommt es durch Depolarisation der Präsynapse zu einem Ca^{2+} -Einstrom, der über eine biochemische Kaskade zur Verschmelzung der Vesikel mit der präsynaptischen Zellmembran führt und so die Transmitterfreisetzung initiiert. Im Falle der Bahnung ist bei der darauffolgenden Depolarisation noch Restcalcium in der Präsynapse vorhanden, da das Calcium noch nicht zum Ruhewert zurückgelangt ist. Der nun erhöhte präsynaptische Calciumspiegel führt zu einer erhöhten Transmitterfreisetzung und dadurch zu einem verstärkten exzitatorischen postsynaptischen Potential (EPSP), einer Depolarisation der postsynaptischen Membran (Brandes, R. et al., 2019, Regehr, 2012)

Eine repetitive synaptische Erregung kann allerdings auch zu einer Abschwächung des Signals führen. Dabei gibt es mehrere Gründe für eine Kurzzeitdepression:

- Durch repetitive Erregung der Präsynapse kommt es zu einer Vesikeldepletion, wodurch die Menge an freigesetztem Neurotransmitter abnimmt (Burrone and Lagnado, 2000).
- Bei steigender Transmitterkonzentration kommt es dagegen im synaptischen Spalt zu einer Sättigung der postsynaptisch gelegenen Rezeptoren (Wadiche and Jahr, 2001) und diese können nach einer bestimmten Zeit desensibilisieren, was bedeutet, dass es trotz Transmitterbindung nicht zu einer Signalweiterleitung kommt (Chen et al., 2002).
- Freigesetztes Glutamat bindet auch an präsynaptisch gelegene metabotrope Glutamatrezeptoren (mGluR). Diese metabotropen Rezeptoren sind G-Protein

gekoppelt und können in 3 Gruppen und weitere Subgruppen unterteilt werden (Gubellini et al., 2004). Es konnte gezeigt werden, dass mGluRs der Gruppe 3, über eine präsynaptische Hemmung von Calciumkanälen und Öffnung von Kaliumkanälen, die Freisetzung von Glutamat hemmen und dadurch die synaptische Depression verstärken (Takahashi et al., 1996, von Gersdorff et al., 1997).

Beide Formen der Kurzzeitplastizität kommen meist kombiniert an einer Synapse vor (Regehr, 2012). Um herauszufinden, ob die Kurzzeitdepression oder Bahnung dominiert, kann eine Paired Pulse Ratio (PPR) berechnet werden. Dabei wird die Synapse durch zwei kurz aufeinander folgende Reize stimuliert und man misst die Amplitude der ausgelösten EPSPs. Das Verhältnis der Amplitude des zweiten EPSP zum ersten EPSP bildet die PPR. Bei einer Kurzzeitdepression ist der Wert der PPR kleiner 1 und bei der Bahnung größer 1. Entscheidend dafür, welche Form der Kurzzeitplastizität dominiert, scheint die Menge der freigesetzten Vesikel nach dem initialen Reiz zu sein. Wenn ein großer Anteil der Vesikel bereits bei dem ersten Reiz verbraucht wird, zeigt die Synapse aufgrund der Vesikeldepletion eher eine Kurzzeitdepression (Regehr, 2012). Die initiale Vesikel-Freisetzung ist abhängig von der Menge an extrazellulärem Calcium. So konnte an Synapsen von Kletterfasern an Purkinjenzellen im Kleinhirn gezeigt werden, dass mit einem steigenden extrazellulären Calciumspiegel die PPR abnimmt und damit der Effekt der Kurzzeitdepression steigt (Foster et al., 2002).

2.3.2 Synaptische Langzeitplastizität

Die Langzeitplastizität kann in eine Langzeitpotenzierung (LTP) und eine Langzeitdepression (LTD) unterteilt werden.

Langzeitpotenzierung beschreibt eine länger andauernde synaptische Signalverstärkung, welche in zwei Phasen unterteilt werden kann, und spielt im Hippocampus eine wichtige Rolle für Gedächtnisbildung und Lernvorgänge. Die frühe Phase der LTP, early-LTP (e-LTP), hält dabei von Minuten bis zu wenigen Stunden an, während die späte Phase, late-LTP (l-LTP), Tage andauern kann (Wu et al., 2007). Sie kann vor allem an glutamatergen Synapsen nachgewiesen werden, allerdings scheint sie auch eine Rolle an inhibitorischen Synapsen zu spielen (Castillo, 2012). Es kann zwischen einer NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptor-abhängigen und nicht-NMDA-Rezeptor-abhängigen Form unterschieden werden. In

der weiteren Betrachtung liegt der Fokus auf der NMDA-Rezeptor-abhängigen Form, die besonders gut beschrieben ist für die Synapsen im Bereich zwischen den Schaffer-Kollateralen und den Pyramidenzellen des CA1, was auch den Messbereich meiner elektrophysiologischen Messungen darstellt. Bei einer synaptischen Signalübertragung bindet Glutamat an postsynaptische AMPA (α -Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionsäure)-, Kainat- und NMDA-Rezeptoren (NMDAR), wodurch sich diese öffnen. Der Großteil der NMDAR ist bei bestehendem Ruhemembranpotential durch Mg^{2+} (Magnesium) blockiert (Mayer et al., 1984, Nowak et al., 1984). AMPA- und Kainat-Rezeptoren sind vorwiegend durchlässig für monovalente Kationen, wie z.B. Na^+ , wodurch es zu einem Natriumeinstrom in die Postsynapse kommt, was zu einer Depolarisation der postsynaptischen Membran führt. Die Depolarisation ermöglicht, dass sich der Mg^{2+} -Block lösen kann. Allerdings öffnen sich die NMDAR nur, wenn gleichzeitig Glutamat gebunden ist (Lüscher and Malenka, 2012). NMDAR sind permeabel für monovalente und divalente Kationen, wie Ca^{2+} (Calcium). Der Calciumeinstrom führt über verschiedene Mechanismen zu einer Veränderung der Postsynapse und verstärkt dadurch die synaptische Erregbarkeit. Eine wichtige Rolle spielt dabei die durch Calcium und Calmodulin aktivierbare Calcium-/Calmodulin-abhängige Protein-Kinase II (CaMKII) (Lisman et al., 2002). CaMKII verstärkt durch Phosphorylierung von AMPA-Rezeptor(AMPA)-Untereinheiten den Leitwert deren Kationenkanäle (Derkach et al., 1999). Außerdem erhöht die CaMKII die postsynaptische AMPAR-Dichte (Hayashi et al., 2000). Dabei werden zwei Mechanismen diskutiert: Die CaMKII könnte den Einbau weiterer in Vesikeln gespeicherten AMPAR induzieren und zum anderen durch eine laterale Diffusion von AMPAR, die außerhalb der Synapse in der Zellmembran eingebaut sind, die Dichte in der Postsynapse erhöhen (Opazo et al., 2010, Wu et al., 2017). Diese Mechanismen können die Induktion einer e-LTP erklären. Für eine länger andauernde l-LTP ist hingegen eine Steigerung der Transkription bestimmter Gene und deren Proteinsynthese nötig (Scharf et al., 2002, Wu et al., 2007, Nguyen et al., 1994). Der gestiegene postsynaptische Calciumspiegel führt durch weitere Zwischenschritte zu einer Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) und der MAP-Kinase (mitogen activated protein kinase), die durch Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB (cAMP (Cyclisches Adenosinmonophosphat) response-element binding protein) die Transkription und damit die Proteinsynthese von wichtigen Proteinen für LTP auslöst (Baltaci et al., 2019).

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Tiere (n=44, 23 männlich, 21 weiblich)

C57BL/6N: Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA

gezüchtet in TARC (Translational Animal Research Center, Mainz, Deutschland)

Gad67-GFP (Tamamaki et al., 2003)

gezüchtet in TARC (Translational Animal Research Center, Mainz, Deutschland)

3.1.2 Chemikalien und Medikamente

NaCl: Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

KCl: Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

CaCl₂: Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

MgSO₄*7H₂O: Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

MgCl₂: Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

NaH₂PO₄*H₂O: Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

NaHCO₃: Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

D-Glukose: Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Sukrose: Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Tramadolhydrochlorid: Tramadol ratiopharm; ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland

Isofluran: Isofluran-Piramal, Piramal Critical Care Deutschland GmbH, Hallbergmoos, Deutschland

Lidocain: Xylocain Pumpspray, Aspen Pharma Trading Limited, Dublin, Irland

DNQX: Tocris Bioscience, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland

TTX: Tocris Bioscience, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland

Carbachol: Tocris Bioscience, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland

Kainat: Tocris Bioscience, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland

PBS 10X pH 7,4: life technologies, Carlsbad, CA, USA

PFA: Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

DAPI: Dianova, Hamburg, Deutschland

Ketamin: Hameln Pharma GmbH, Hameln, Deutschland

Xylazine: Rampun 2%, Bayer, Leverkusen, Deutschland

Blocking kit: Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

3.1.3 Antikörper

polyclonal rabbit Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein: Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA

Cy5-anti-rabbit: Jackson immunoresearch, West Grove, PA, USA

3.1.4 Verbrauchsmittel

Pipettenspitze Tip One: STARLAB GmbH Hamburg, Deutschland

Ballpipetten: Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Cyanoacrylat-Kleber UHU Sekundenkleber blitzschnell mini: UHU GmbH & Co KG, Bühl, Deutschland

Cyanoacrylate-Kleber: 3M Vetbond, 3M Animal care Products, St.Paul, MN, USA

Rasierklingen Personna: Amercian Safety Razor Company Verona, USA

Polypropylene Faden: Ethicon, Sommerville, NJ, USA

3.1.5 Instrumente

MEA2100-System: Multichannel Systems, Reutlingen, Deutschland

MEA-Chip 60MEA200/30iR-Ti-gr: Multichannel Systems, Reutlingen, Deutschland

Impact One: Leica Mikrosysteme, Wetzlar, Deutschland

Leica VT 1000s vibratome: Leica Mikrosysteme, Wetzlar, Deutschland

Kryostat Leica CM1325: Leica Mikrosysteme, Wetzlar, Deutschland

Olympus IX81SF-3 Mikroskop: Olympus, Shinjuku, Japan

Pump System Mini Pulse 3: Gilson Middleton, WS, USA

Waage Kern ABJ-220-4M: Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland

Eppendorf-Research Pipetten: STARLAB GmbH Hamburg, Deutschland

3.1.6 Software

LTP-Director: Multichannel Systems, Reutlingen, Deutschland

LTP-Analyzer: Multichannel Systems, Reutlingen, Deutschland

Multi Channel Experimenter: Multichannel Systems, Reutlingen, Deutschland

Multi Channel DataManager: Multichannel Systems, Reutlingen, Deutschland

Multi Channel Analyzer: Multichannel Systems, Reutlingen, Deutschland

MEA-Monitor: Multichannel Systems, Reutlingen, Deutschland

Graphpad Prism 8: GraphPad Software, San Diego, CA, USA

CorelDRAW 2021 V5: Corel Corporation, Ottawa, ON, Kanada

Fiji: ImageJ Rasband WS, NIH, Bethesda, MD, USA

Excel: Microsoft, Redmond, WA, USA

Word: Microsoft, Redmond, WA, USA

3.2 Tierhaltung

Für die elektrophysiologischen Experimente wurden 39 C57/BL6N Wildtyp Mäuse, davon 23 männlich und 16 weiblich, im Alter von 20 bis 25 Tagen verwendet. Weitere 5 weibliche Gad67-GFP Mäuse (Gad67 = Glutamat-Decarboxylase 67, GFP = Grün fluoreszierendes Protein) (Tamamaki et al., 2003) im Alter von 25 Tagen wurden für die immunhistochemischen Versuche verwendet. Die Tiere stammten vom Translational Animal Research Center (TARC) der Universitätsmedizin Mainz und wurden konform zu den EU-Gesetzen gehalten mit freiem Zugang zu Futter und Wasser. Es wurde ein Hell/Dunkel-Zyklus von 12 Stunden bei $23 \pm 2^\circ \text{C}$ befolgt. Alle Experimente wurden vom Landesuntersuchungsamt des Bundeslands Rheinland-Pfalz genehmigt (Genehmigungsnummer G-15-1). Die Minimierung der Versuchstieranzahl und des Leidens der Tiere hatte höchste Priorität.

3.3 Induktion des SHTs

Um ein Schädelhirntrauma beim Menschen zu simulieren, nutzten wir ein Mausmodell namens controlled cortical impact (CCI), um eine standardisierte Hirnverletzung zu erzeugen. Die CCI wurde 1988 von (Lighthall, 1988) erstbeschrieben, wobei wir ein im Vergleich dazu leicht verändertes CCI-Modell verwendet haben (Thal et al., 2008). Alle CCIs für die hier beschriebenen Experimente wurden von einer wissenschaftlichen Mitarbeiterin des Labors durchgeführt. Unser CCI-Modell kann als mild beschrieben werden und löst ein offenes SHT aus. Im Gegensatz zu anderen SHT-Modellen wird durch CCI eine eher fokale Verletzung induziert (siehe Kapitel 2.1.4 Tiermodelle eines Schädelhirntraumas). Um die Schmerzen zu reduzieren, wurde den Mäusen 24 Stunden vor bis 24 Stunden nach der Operation 0,45mg/mL Tramadolhydrochlorid über das Trinkwasser verabreicht. Die Mäuse wurden direkt vor der Operation mit 4% Isofluran betäubt und wurden für die Dauer der Operation mit einer Mischung aus 1,5% Isofluran und Carbogen, bestehend aus 95% Sauerstoff und 5% Kohlenstoffdioxid, begast. Um die Körpertemperatur konstant zu halten, wurden die Mäuse in einen stereotaktischen Rahmen auf einer Heizplatte mit 37°C platziert und über eine rektale Sonde wurde die Körpertemperatur gemessen. Zum Schutz vor Austrocknung wurde den Mäusen Bepanthen Creme auf die Augen aufgetragen. Die

Haut der Mäuse wurde mit einem Hub Isofluran betäubt, bevor wir die Haut entlang der Mediansagittallinie mit einem Skalpell eröffneten. Mit Hilfe einer Highspeed Bohrmaschine wurde eine Kraniotomie in Form eines 2x2 mm Vierecks durchgeführt. Die Schnittkante der Kraniotomie begann bei Bregma 0 und folgte zunächst der koronalen Sutur, verlief dann parallel zur Mediansagittallinie und kehrte schließlich zurück zur Mediansagittallinie.

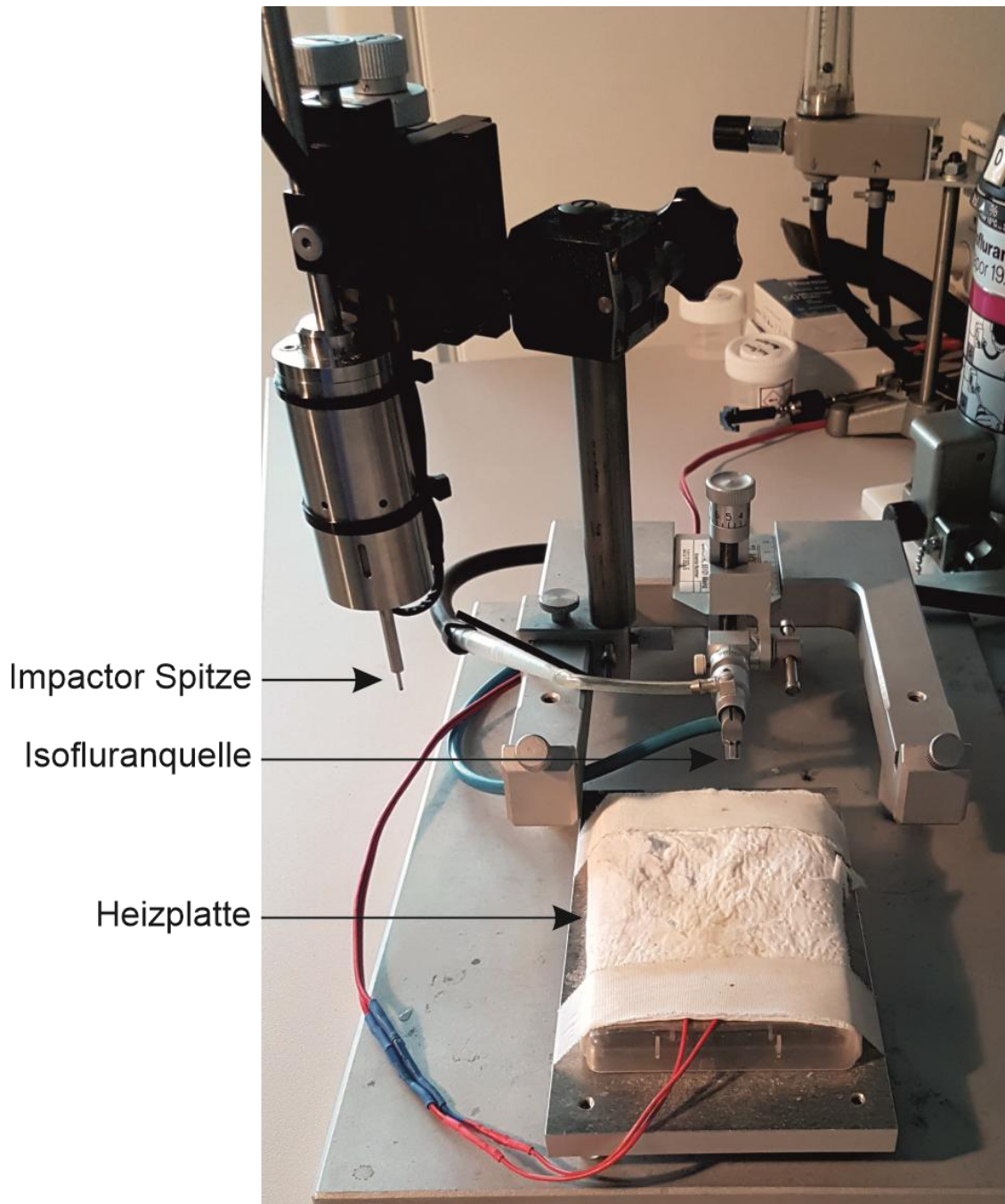


Abbildung 7: Impact one

Bild des Set-Ups mit dem stereotaxischen Impactor, der zur Induktion der CCI verwendet wurde.

Als Nächstes wurde die CCI mit Hilfe des stereotaktischen Impactors induziert. Dabei positionierten wir die runde Spitze des Impactors, die einen Durchmesser von 1,5 mm hat, senkrecht über der intakten Dura mater. Der Stoß erfolgte mit einer Geschwindigkeit von 6 m/s und einer Eindringtiefe von 0,8 mm, wobei die Verweildauer 200 ms betrug. Nach der CCI wurde die Kraniotomie mit einem auf Cyanoacrylat basierenden Kleber geschlossen und wir nähten die Haut mit einem Polypropylen-Faden zu

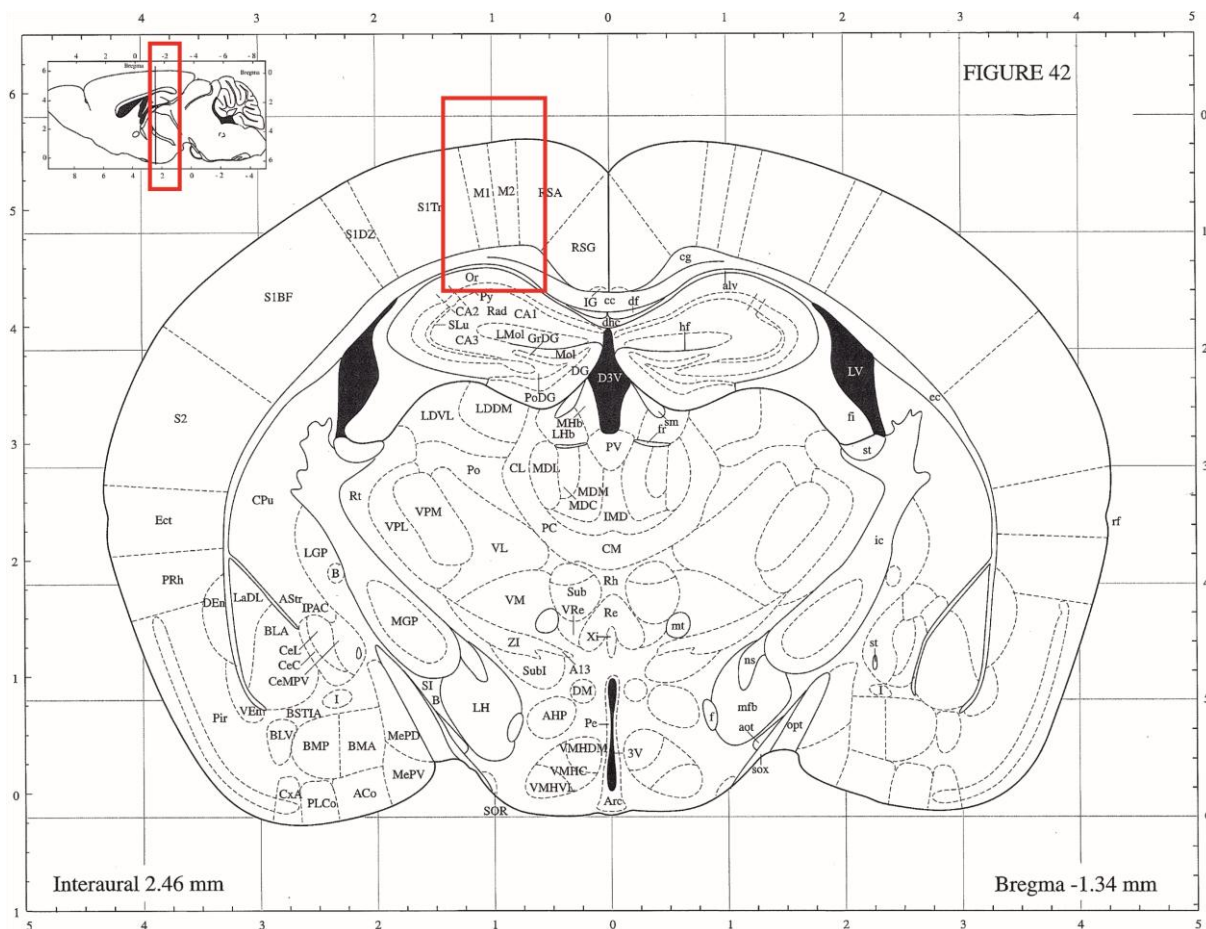


Abbildung 8: Darstellung eines Mäusegehirns im koronalen Schnitt mit der Region der SHT-Induktion (modifiziert von Paxinos, G. and Franklin, K. B. J., 2001)

Die Abbildung zeigt einen koronalen Hirnschnitt. Rot umrandet ist der Bereich der Verletzung nach SHT, der sowohl den Motokortex M1/M2 als auch die angrenzenden Areale umfasst. Die kleine Abbildung in der linken oberen Ecke zeigt rot markiert die Lage der Hirnschnitte im Verhältnis zum Bregma. Für die Versuche wurden Hirnschnitte 0 bis -2 mm relativ zum Bregma verwendet.

Als Kontrollgruppe wurden Mäuse verwendet, die anstatt der CCI einer Scheinoperation (sham) unterzogen wurden. Dabei wurde ihnen unter den oben

genannten Bedingungen die Haut entlang der Mediansagittallinie eröffnet und ohne weitere Verletzung der Schädelkalotte wieder zugenäht.

3.4 Zusammensetzung der künstlichen Zerebrospinalflüssigkeit (ACSF)

Um eine gute Qualität der Hirnschnitte zu erreichen, benötigt man eine künstliche Hirnflüssigkeit (artificial cerebrospinal fluid = ACSF), die der tatsächlichen Hirnflüssigkeit in ihrer Zusammensetzung nachempfunden ist. Diese ACSF muss das Hirngewebe während der gesamten Zeit von Beginn der Präparation der Hirnschnitte an bis zum Ende der elektrophysiologischen Messungen umgeben. Außerdem muss die ACSF durchgehend mit Carbogen begast werden. Zu Beginn der Experimente probierte ich verschiedene Zusammensetzungen der ACSF aus. Die Standard ACSF hatte folgende Zusammensetzung in [mM]: 125 NaCl, 3 KCl, 2.5 CaCl₂, 1.3 MgSO₄*7H₂O, 1.25 NaH₂PO₄*H₂O, 26 NaHCO₃, 13 D-Glukose. Um die Qualität der Hirnschnitte zu verbessern, verwendete ich während der Präparation für die Spontanaktivitätsmessungen ACSF mit Saccharose mit folgender Zusammensetzung in [mM] 87 NaCl, 2.5KCl, 0.5 CaCl₂, 7 MgCl₂, 1.25 NaH₂PO₄*7H₂O, 26 NaHCO₃, 10 D-Glukose, 75 Saccharose.

3.5 Präparation der Hirnschnitte

Vor der Präparation wurden die Mäuse mit 4% Isofluran betäubt. Es wurde, mit Hilfe einer Pinzette, durch Kneifen am Ende des Schwanzes und zwischen den Zehen getestet, ob die Schmerzreaktionen verschwunden waren. Im Folgenden wurde die Maus dekapitiert. Das Gehirn wurde entfernt und in eine mit 4° C eisgekühlte, vorbegaste Standard ACSF gefüllte Petrischale gelegt. Dort wurde das Gehirn mit Hilfe einer Rasierklinge zurechtgeschnitten, wobei für die Messungen im Hippocampus die Hemisphären entlang der Mediansagittallinie voneinander getrennt wurden. Das Gehirn wurde mit Cyanoacrylat-Kleber auf einen Sockel geklebt und mit Hilfe des Vibrationsmikrotoms Leica VT 1000s Vibratome (Leica Mikrosysteme) in 400 µm breite Hirnschnitte geschnitten. Die Schnitte wurden dann für eine Stunde in eine begaste Standard ACSF auf Raumtemperatur gegeben.



Abbildung 9: Leica VT1000s

Bild des Vibrationsmikrotoms Leica VT1000s, das zur Erstellung der Hirnschnitte verwendet wurde.

3.6 Elektrophysiologie

3.6.1 Multi-Elektroden-Array Messungen

Für die elektrophysiologischen Messungen verwendete ich ein Multi-Elektroden-Array (MEA) MEA2100-System (Multichannel Systems) mit 2 Kammern für 2 Mikrochips, sodass 2 Messungen parallel laufen konnten. Ich verwendete für alle elektrophysiologischen Experimente den MEA-Chip 60MEA200/30iR-Ti-gr

(Multichannel Systems). Jeder dieser Mikrochips hat 60 Elektroden, die in 8 Reihen mit je 8 Elektroden angeordnet sind, wobei die vier Eckelektroden fehlen, sodass die erste und achte Reihe jeweils nur 6 Elektroden aufweisen. (siehe Abbildung 10).

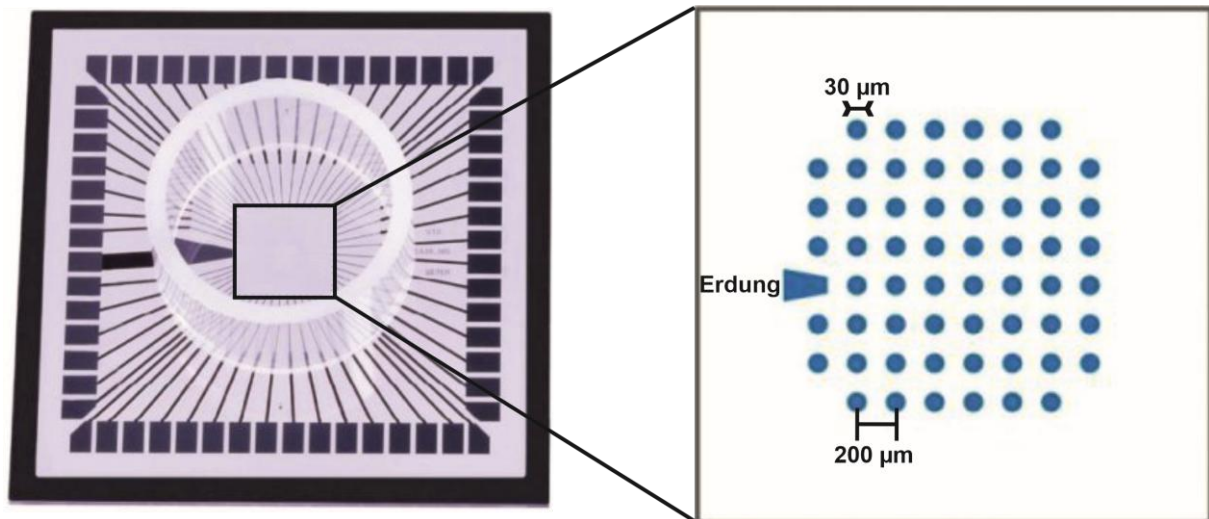


Abbildung 10: MEA-Chip 60MEA200/30iR-Ti-gr (modifiziert von multichannelsystems.com)

Auf der rechten Seite zu sehen ist der MEA-Chip 60MEA200/30iR-Ti-gr, der für alle elektrophysiologischen Experimente verwendet wurde. Um die Elektroden ist ein Glasring positioniert, der während der Experimente mit ACSF gefüllt ist. Links im Bild sieht man die Anordnung der 60 Elektroden, die sich in der Mitte des Chips befinden. Die Elektroden haben einen Durchmesser von 30 µm und einen Abstand untereinander von 200 µm. Bis auf die Erdungselektrode, an erster Position in der fünften Reihe, können alle Elektroden stimuliert werden und von allen Elektroden können Signale abgeleitet werden.

Jede der 60 Elektroden konnte lokale Feldpotentiale (FPs) aufnehmen und alle, bis auf die Erdungselektrode, konnten stimuliert werden. Die einzelnen Elektroden hatten die Form eines 30 µm x 30 µm Quadrats und waren in einem Abstand von je 200 µm voneinander angeordnet. Die beiden Mikrochips wurden in die Headstage eingesetzt, welche die Signale an ein Interfaceboard weiterleitete. Dieses diente als Schnittstelle zu einem Computer, an dem die Daten schließlich ausgewertet wurden.

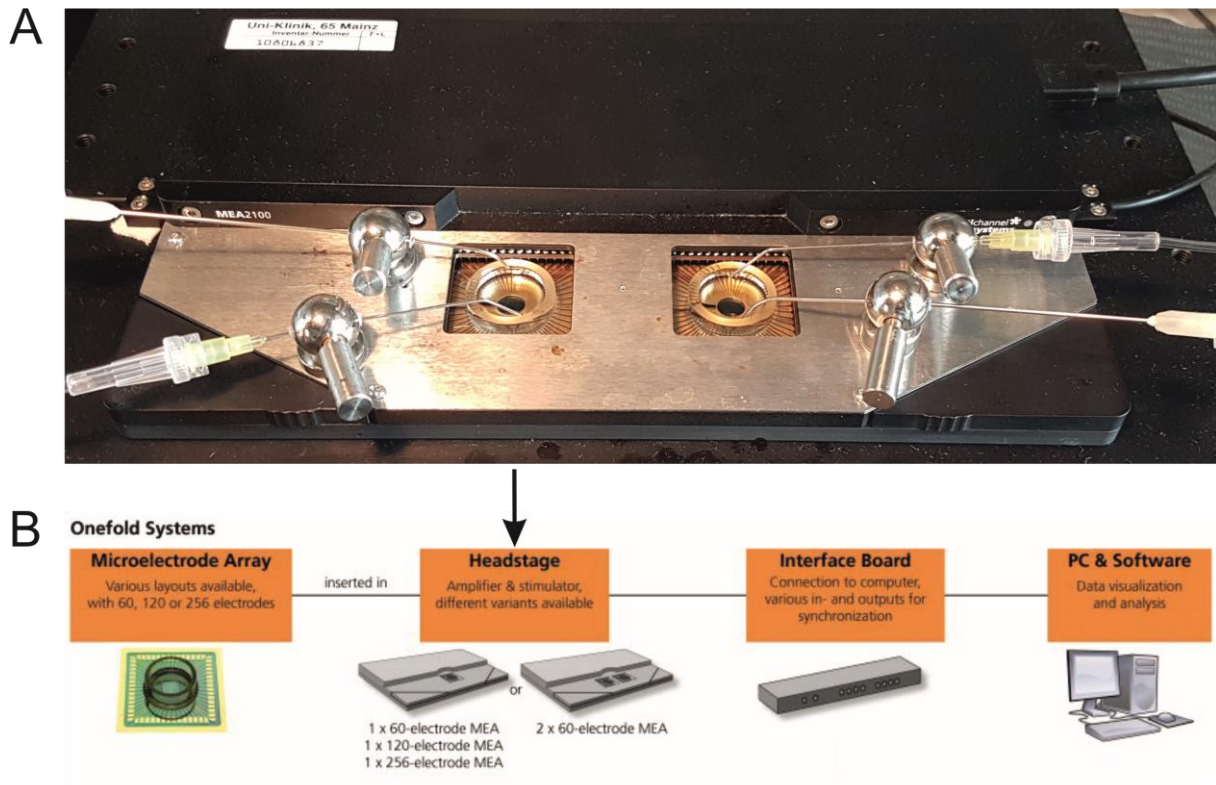


Abbildung 11: MEA-Set-Up MEA2100-System (Multichannel Systems)

- A)** Bild der MEA-Headstage mit eingesetzten Mikrochips und konstantem Zu- und Abfluss von begaster ACSF über die seitlich von den Mikrochips platzierten Kanülen.
- B)** Schema des Aufbaus eines MEA-Set-UPS (modifiziert von multichannelsystems.com). Die elektrischen Signale, die von dem MEA-Chip gemessen werden, werden über die Headstage an das Interface Board und schließlich zum PC weitergeleitet.

Um zu verhindern, dass elektrische Störsignale die Aufnahmen behindern, befand sich das ganze MEA-Set-Up in einem Faradayschen Käfig. Außerdem wurde für jeden Chip eine zusätzliche Erdungselektrode am Interfaceboard angeschlossen.

Um die Elektroden war ein mehrere Millimeter hoher Glasring an dem Mikrochip angebracht, damit der Hirnschnitt und die einzelnen Elektroden von begaster Standard ACSF bedeckt sein konnten. Während der Messungen wurden die Hirnschnitte mit einer konstanten Flussrate von 4,5-5 ml/min mit Carbogen begaster ACSF umspült. Die MEA-Chips wurden auf 32° C erwärmt. 30 Minuten vor Beginn der Messungen wurden die Hirnschnitte auf den MEA-Chip übertragen und unter einem digitalen Mikroskop über den Elektroden positioniert. Um einen guten Kontakt zwischen Elektroden und dem Hirngewebe herzustellen, wurden Schnitte mit einem Gitter (Platingrid) fixiert. Der Rahmen dieses Gitters bestand aus einem

zurechtgebogenen Platindraht mit feinen querverlaufenden Fäden, die parallel aufgespannt waren (Abbildung 12). In dieser Position verblieben die Hirnschnitte für 30 Minuten, bevor mit den Messungen begonnen wurde.



Abbildung 12: Platingrid

Bild eines Platingrids, das während der elektroфизиologischen Messungen auf die Hirnschnitte platziert wurde, um einen besseren Kontakt zu den Elektroden zu garantieren.

3.6.2 Stimulationsprotokoll

Für die Messungen der Langzeitpotenzierung (LTP) im Hippocampus verwendete ich 20 bis 25 Tage alte Mäuse 24 bis 48 Stunden nach CCI. Die Messungen wurden mit Hilfe des Programms LTP-Director durchgeführt. Ich stimulierte eine Elektrode im Bereich der Schaffer-Kollateralen mit einem biphasischen Stimulus von 100 μ s Dauer. Die FPs wurden 400 μ m entfernt von der Stimulationselektrode in der Region des Cornu ammonis 1 (CA1) gemessen.

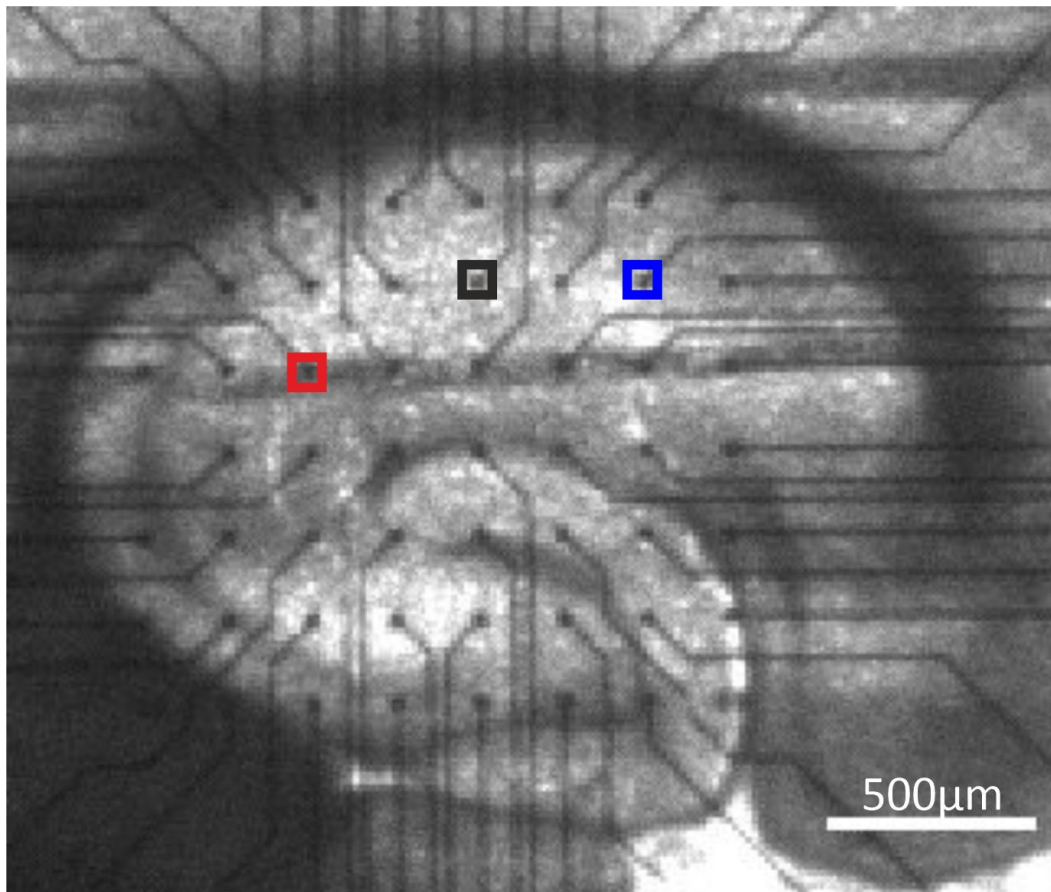


Abbildung 13: Foto eines Hirnschnitts mit markierter Position der Stimulations- und Ableitungselektrode

Im Hintergrund sieht man die Elektroden des MEA-Chips. Die Stimulationselektrode ist rot markiert und befindet sich in einem Abstand von 400 µm zur schwarz markierten Ableitungselektrode. Die hier in blau markierte Elektrode wurde in den Intervallen zwischen zwei Stimuli stimuliert, um den Kontrollpfad (s.u) aufzunehmen.

Zur Auswertung bestimmte ich die negative Steigung der gemessenen FPs zwischen 10 % und 90 % (Slope10/90). Während der Aufnahmen wurde der Hirnschnitt alle 60 Sekunden stimuliert. Das Stimulationsprotokoll umfasste zunächst die Aufnahme einer Input/Output-Kurve zur Ermittlung der optimalen Stimulationsintensität, gefolgt von der Messung der Paired Pulse Ratio. Anschließend wurde für 30 min eine Baseline gemessen. Bei stabiler Baseline folgte die LTP-Induktion, bevor für weitere 60 min Signale aufgenommen wurden. Anschließend wurde erneut die Paired Pulse Ratio bestimmt. Um zu zeigen, dass ich spezifisch die gewünschte Region stimuliert, wurde zusätzlich eine Kontrollstimulation zu einem anderen, unabhängigen synaptischen Eingang aufgenommen. Dabei wurde eine Elektrode

400 μm entfernt von der Ableitungselektrode und 800 μm von der Stimulationselektrode zusätzlich in den Intervallen zwischen zwei Stimuli stimuliert. Für diesen Kontrollpfad wurde keine Hochfrequenz-Stimulation durchgeführt.

Für die zu Beginn gemessene Input/Output (I/O)-Kurve wurde die Stimulationsintensität in 500 mV Schritten von 500 mV bis 5000 mV gesteigert, wobei alle 60 Sekunden die Slope_{10/90} bestimmt wurde. Ich nutzte für den weiteren Verlauf der Messungen die Stimulationsintensität, bei der in der I/O-Kurve 30% der maximalen Slope_{10/90} erreicht wurden. Des Weiteren bestimmte ich die sogenannte Paired Pulse Ratio (PPR), bei der das Verhältnis der Slope_{10/90} zweier Stimuli im Abstand von 50 ms bestimmt wurde. Dabei wurde der Wert des zweiten Stimulus durch den des ersten geteilt. Die PPR wurde jeweils vor der Induktion der LTP und am Ende der Messungen bestimmt.

3.6.3 Induktion der LTP

Zur Induktion der LTP nutzte ich eine Hochfrequenzstimulation (HF), bei der ich mit einer Frequenz von 100 Hz für die Dauer von einer Sekunde stimulierte. Zur Bestimmung der Stärke der LTP teilte ich jeweils den Mittelwert der Slope_{10/90} der letzten 10 Minuten durch den Mittelwert der Werte der letzten 10 Minuten der Baseline.

Um zu zeigen, dass die gemessenen synaptischen Signale nicht durch Artefakte bedingt waren, ließ ich die Hirnschnitte nach Beendigung der oben genannten Messungen für 30 Minuten in Standard ACSF mit 10 μM 6,7-Dinitroquinoxaline-2,3-dione (DNQX) inkubieren, während ich weitere Signale aufzeichnete. DNQX ist ein kompetitiver AMPA- und Kainat-Rezeptor Antagonist, wodurch das synaptisch erzeugte elektrische Signal der Neurone blockiert werden soll.

3.6.4 Spontanaktivitätsmessungen

Um Spontanaktivität im CA1 im Hippocampus aufzunehmen, verwendete ich das Programm Multi Channel Experimenter. Die Signale wurden mit einer Abtastrate von 50 kHz aufgenommen. Zur Verbesserung der Aufnahmen von extrazellulären Aktionspotentialen (Spikes) verwendete ich einen Butterworth Highpass-Filter mit 200

Hz. Ab einer Schwelle von 5 Standardabweichungen vom Hintergrundrauschen wurden Signale aufgezeichnet. Die Signale wurden als Cutouts 1 ms vor Beginn des Erreichens der Schwelle bis 2 ms danach angezeigt. Um die Erregbarkeit der Hirnschnitte zu erhöhen und in vivo Bedingungen von glutamatergen und cholinergen Signaleingängen zu simulieren, benutzte ich eine modifizierte ACSF (mACSF), die bereits früher in unserem Labor verwendet wurde (Le Priault et al., 2017). Für die Herstellung der mACSF fügte ich 400 nM Kainat, einen Agonisten an glutamatergen Kainatkanälen, und 30 μ M Carbachol, ein Acetylcholin-Analogon, zur Standard-ACSF hinzu. Die mACSF wurde für 15 Minuten vor Beginn der Spontanaktivitätsmessungen eingewaschen. Es wurde dann die Spontanaktivität für einen Zeitraum von 300 Sekunden aufgenommen. Zum Ausschluss einer fälschlichen Messung von Störsignalen wurden die Schnitte für 15 Minuten in ACSF mit 2 μ M Tetrodotoxin (TTX), das spannungsabhängige Natriumkanäle blockiert, inkubiert. Für weitere 300 Sekunden nahm ich die Spontanaktivität auf. Die Daten wurden mit Hilfe des Multi Channel Analyzers (Multichannel Systems) ausgewertet. Die Frequenz der Spikes wurde für jeden Chip einzeln bestimmt.

3.7 Immunhistochemische Färbung

Zur Darstellung einer potenziellen Astrogliose wurde das Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) in Hirnschnitte von SHT- und sham-Tieren immunhistochemisch angefärbt. GFAP ist ein Protein und Bestandteil des Zytoskeletts von Astrozyten und eignet sich daher zu deren Anfärbung. Es wurden 25 Tage alte Gad67-GFP Mäuse 72 Stunden nach SHT verwendet. Die Mäuse erhielten zur Betäubung eine intraperitoneale Injektion mit 250 mg/kg Ketamin und 25 mg/kg Xylazine. Die linke Herzkammer wurde mit einer Butterflynadel punktiert und die rechte Herzkammer wurde aufgeschnitten. Die Maus wurde zunächst mit einer phosphatgepufferten Salzlösung (phosphate buffered saline = PBS) und danach mit 4% Paraformaldehyd (PFA) mit einer Flussrate von 2,5 ml/min durchspült. Das Gehirn wurde nach Dekapitation entnommen und im Kühlschrank bei 4° C gelagert, zunächst über Nacht in PFA und dann für 3 Tage in PBS mit 30% Saccharose, bevor es mit einem Kryostat in 20 μ m breite koronale Hirnschnitte geschnitten wurde. Die Schnitte kamen für 90 Minuten in eine Blocking Solution bestehend aus 10% Ziegen Serum, 20% Avidin, 0,2% Triton-X-100 Lösung in PBS gelöst (Blocking kit, Vector Laboratories). Sie verblieben danach

über Nacht bei 4° C in einer Lösung aus PBS, 1% Ziegen Serum, 20% Avidin, 20% Biotin und 0,2% Triton-X Lösung (Blocking kit, Vector Laboratories) und der polyklonale Antikörper rabbit Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) (1:150, Agilent Technologies) wurde als primärer Antikörper zugesetzt. Der sekundäre Antikörper Cy5-anti-rabbit (1:500, Jackson immunoresearch) wurde in PBS mit 1% Ziegen Serum und 0,1% Triton-X aufgelöst. Die Schnitte wurden 120 Minuten bei Raumtemperatur in dieser Lösung inkubiert. Danach wurden die Schnitte zusammen mit einem Mounting Medium mit 4',6-diamidino-2-Phenylindole (DAPI) (SCR28448, Dianova), einem DNA-Marker, auf ein Deckglas transferiert und eingedeckelt. Die Objektträger wurden dann bis zur Auswertung bei 4° C gelagert. Die Bilder der gefärbten Schnitte wurden mit einem Epifluoreszenz-Mikroskop (Olympus IX81SF-3, Olympus) erstellt.

3.8 Datenanalyse

3.8.1 Elektrophysiologie

Zur Auswertung der LTP-Messungen verwendete ich das Programm LTP-Analyzer (Multichannel Systems). Dabei wurden ausschließlich Messwerte von Hirnschnitten mit stabiler Baseline verwendet, deren FP-Amplitude mindestens 300 μ V betrug, bei einer Stimulationsintensität, bei der in der I/O-Kurve 30 % der Maximal-Amplitude erreicht wurden.

Für die FPs wurde die Slope10/90, die den Betrag der Steigung zwischen 10% und 90% angibt, bestimmt. Mit Hilfslinien konnte der Bereich eingestellt werden, der von dem Programm ausgewertet werden sollte. Die Rohdaten wurden dann mittels Excel (Microsoft) weiter ausgewertet. Um den Effekt der LTP zu bestimmen, wurde der Mittelwert der Slope10/90 der letzten 10 Messungen des Aufnahmeprotokolls durch den Mittelwert der letzten 10 Messungen vor LTP-Induktion geteilt.

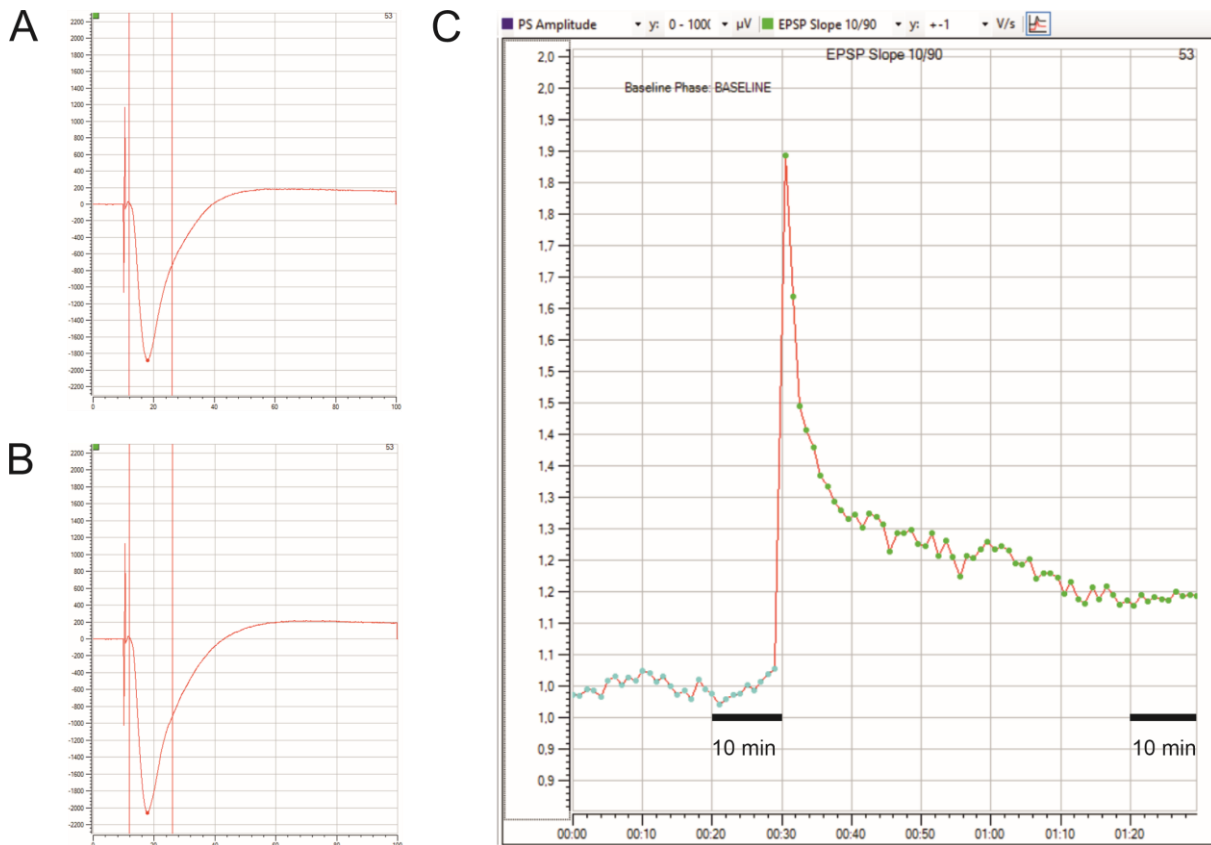


Abbildung 14: Repräsentative LTP-Messungen mit der Software LTP-Analyzer

Auf der linken Seite sind repräsentative FPs zu sehen (Abbildung A vor der LTP-Induktion und Abbildung B nach LTP-Induktion). Mit Hilfe der Hilfslinien in A und B kann der Bereich zur Auswertung der Slope10/90 festgelegt werden. Die Y-Achse zeigt die gemessene Spannung in μV und die X-Achse die Zeit in $[\text{ms}]$. Auf der rechten Abbildung C sieht man den Betrag der gemessenen Werte der Slope10/90 der FPs einer ganzen LTP-Messung als relative Werte zur Baseline. Die Y-Achse zeigt den Betrag der gemessenen Slope10/90 in Relation zum Mittelwert aller gemessenen Werte der Slope10/90 der Baseline (erste 30 Minuten der Aufnahme). Die X-Achse gibt den Zeitpunkt des gemessenen Wertes in $[\text{Stunden:Minuten}]$ an. Um den Effekt der LTP zu berechnen wurde der Mittelwert der letzten 10 Minuten der Messung durch den Mittelwert der letzten 10 Minuten vor LTP-Induktion geteilt.

Die Spontanaktivitätsmessungen wurden mit Hilfe des Multi Channel Analyzers (Multichannel Systems) ausgewertet. Die Frequenz der Spikes wurde dabei für jeden Chip einzeln bestimmt und die Rohdaten per Excel weiter ausgewertet.

3.8.2 Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Bilder wurden mit Fiji (ImageJ Rasband) ausgewertet. Dabei wurden die angefärbten Astrozyten in der Area CA1 gezählt und die Dichte der Astrozyten in Anzahl pro mm^2 berechnet.

3.8.3 Datenanalyse

Zur Erstellung der Graphen und zur statistischen Auswertung der Daten wurde das Programm Graphpad Prism 8 (GraphPad Software) verwendet. Die Graphen zeigen den Mittelwert \pm SEM (Standardfehler des Mittelwerts). Die Daten sind nicht normalverteilt. Es wurde ein Kruskal Wallis Test angewandt mit einem Signifikanzniveau von *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$; #: $p < 0,05$; ##: $p < 0,01$. Als Follow-Up-Test wurde Dunn's multiple comparison test verwendet. Alle Abbildungen wurden mit CorelDRAW 2021 V5 (Corel Corporation) bearbeitet.

4 Ergebnisse

4.1 Verletzung nach CCI

Es kam weder nach CCI-Induktion noch bei Sham-Operationen zum Tod eines Tieres infolge des Eingriffes.

Um die Größe der Verletzung nach CCI sichtbar zu machen, wurden 72 Stunden nach SHT-Induktion immunhistochemische Hirnschnitte erstellt (siehe Kapitel 3.7 Immunhistochemische Färbung). Der Hirnschnitt wurde mit einer DAPI-Färbung, die sich an DNA anlagert und so die Zellkerne sichtbar macht, behandelt. Die Verletzung betraf die Motorkortizes M1 und M2 sowie den angrenzenden Bereich des somatosensorischen Kortex und hatte einen Durchmesser von 1,5 bis 2 mm. Die Verletzung befand sich zwischen 0 und -2 mm relativ zum Bregma. Bei Betrachtung des Hirnschnitts (Abbildung 15) war keine direkte Verletzung des Hippocampus oder der Fasern des Corpus Callosum zu erkennen.

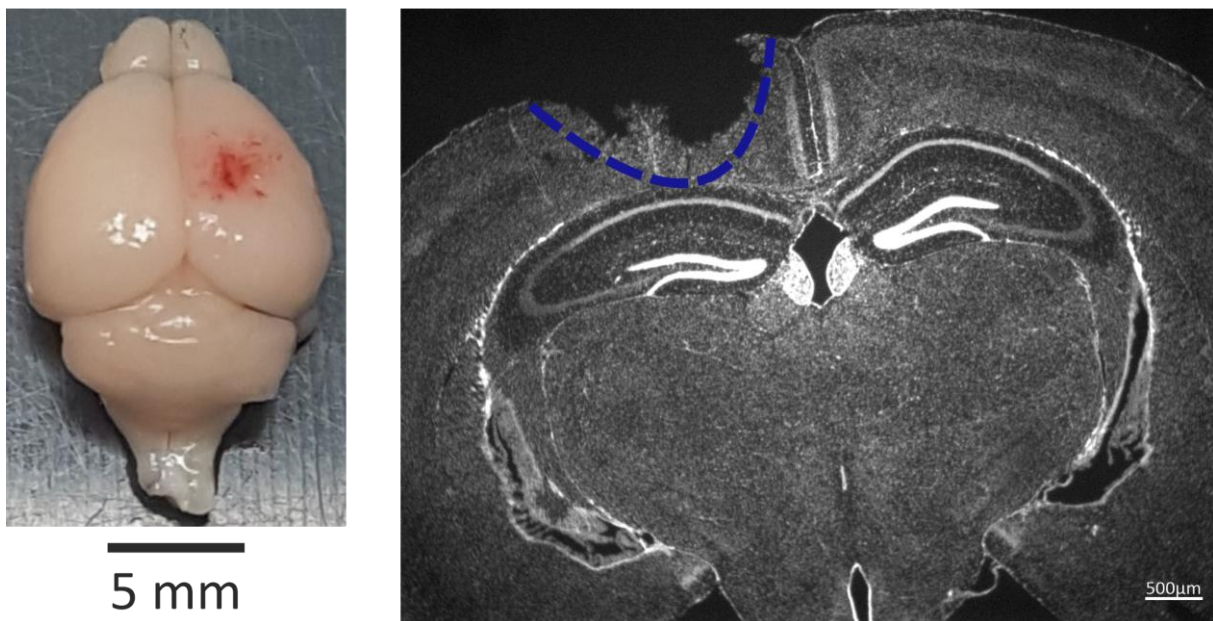


Abbildung 15: Darstellung der SHT-Verletzung im Mausgehirn und im Hirnschnitt

Links: Mausgehirn mit einem SHT der rechten Hemisphäre 72 h nach CCI.

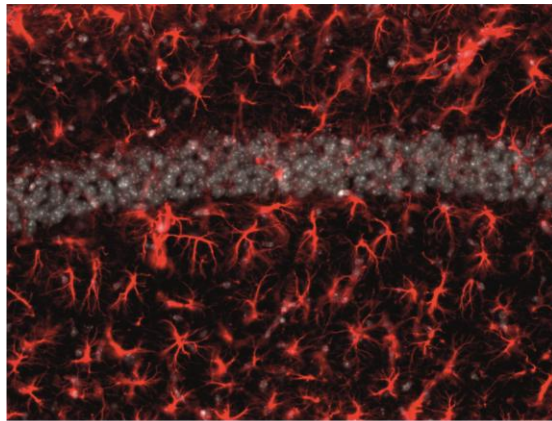
Rechts: Hirnschnitt mit DAPI-Färbung nach 2,5-facher Vergrößerung mit markierter Verletzung im Bereich des Motorkortex M1/M2 und des angrenzenden somatosensorischen Kortex.

4.2 **GFAP-Färbung von Astrozyten im Hippocampus in der Akutphase nach SHT**

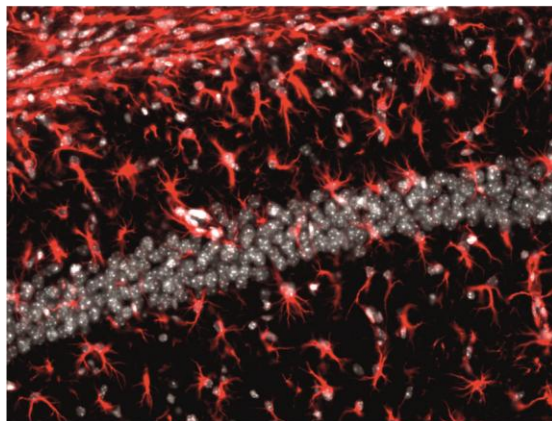
Da keine direkte Verletzung des Hippocampus erkennbar war, wollte ich untersuchen, ob es eine Astrozytenreaktion, eine sogenannte Astrogliose, in der Region CA1 des Hippocampus gab. Diese Region stand im Fokus meiner elektrophysiologischen Experimente. Dafür wurden immunhistochemische Hirnschnitte mit einer DAPI- und GFAP-Färbung (siehe Kapitel 3.7 Immunhistochemische Färbung) erstellt. Die Bilder der DAPI- und GFAP-Färbung wurden übereinandergelegt, sodass man die zellreiche Region CA1 mit Hilfe der DAPI-Färbung erkennen konnte. Die Dichte der Astrozyten wurde als Anzahl pro mm^2 bestimmt.

Für die Versuche wurden insgesamt 5 Hirnschnitte von 5 weiblichen Mäusen verwendet, wobei 3 Mäuse sham-operiert waren und 2 Mäuse eine CCI bekommen hatten. Von den 3 sham-operierten Mäusen wurden 5 CA1-Regionen ausgewertet und von den 2 CCI-Mäusen 2 ipsilaterale und 2 kontralaterale CA1-Regionen.

sham



ipsi



kontra

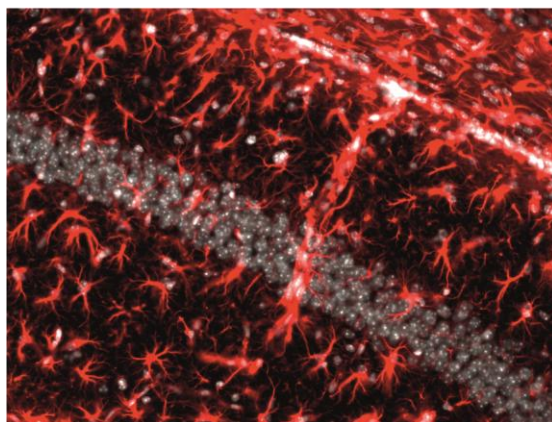


Abbildung 16: Zusammengefügtes Bild GFAP/DAPI-Färbung in der Region CA1 72 h nach CCI

Zu sehen sind 3 Aufnahmen der CA1-Region von GFAP- und DAPI-gefärbten Hirnschnitten der sham-Gruppe (sham) und des ipsilateralen (ipsi) und kontralateralen (kontra) Hippocampus nach CCI. In rot sind die spezifisch durch die GFAP-Färbung markierten Astrozyten zu erkennen. Die DAPI-Färbung, die Zellkerne anfärbt, ist hier grau dargestellt und zeigt sich besonders prominent in der Region CA1.

Ich konnte keine signifikante Veränderung der Astrozytendichte im CA1 beim Vergleich mit der sham-Gruppe ($n=5$ von 3 Mäusen, $366,4475 \pm 27,5911$) im ipsilateralen ($n=2$ von 2 Mäusen, $453,0513 \pm 38,3049$) und kontralateralen ($n=2$ von 2 Mäusen, $469,8890 \pm 19,9462$) CA1 nach CCI erkennen. Zur statistischen

Auswertung wurde ein Kruskal Wallis Test mit Dunn's multiple comparison Test als Folgetest angewandt mit einem Signifikanzniveau von *: $p < 0,05$. Allerdings zeigte sich ein Trend zu einer erhöhten Astrozytendichte im CA1 nach SHT, sowohl ipsilateral als auch kontralateral zur Verletzung, wie Abbildung 17 zeigt.

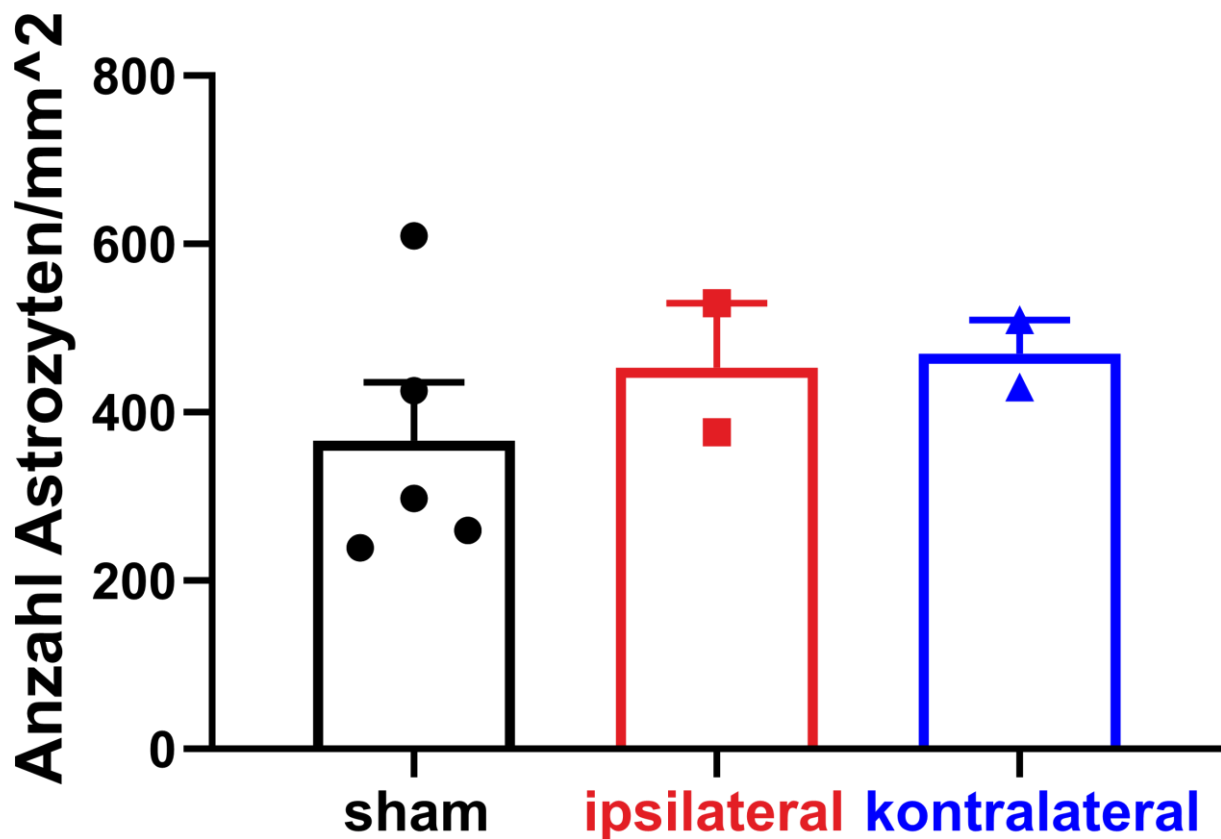


Abbildung 17: Astrozytendichte in der Area CA1 72 h nach CCI

Die Abbildung zeigt die Dichte der Astrozyten in der Region CA1 72 h nach CCI ipsilateral (roter Balken mit Vierecken) und kontralateral (blauer Balken mit Dreiecken) zum SHT im Vergleich zur sham-Gruppe (schwarzer Balken mit Kreis). Es wurden die einzelnen Werte als Punkte aufgetragen und der Boxplot zeigt die Mittelwerte mit dem SEM als nach oben aufgetragenem Fehlerbalken an. Es zeigte sich in einem Kruskal Wallis Test mit Dunn's multiple comparison Test als Folgetest mit einem Signifikanzniveau von *: $p < 0,05$ kein signifikanter Unterschied in der Astrozytendichte nach CCI im Vergleich zu sham-operierten Mäusen, allerdings zeigte sich ein Trend mit einer erhöhten Astrozytendichte ipsilateral und kontralateral zum SHT.

4.3 LTP-Experimente

4.3.1 Beispiel Feldpotentiale

Zur Erzeugung lokaler Feldpotentiale wurde der Hirnschnitt mit Hilfe eines MEAs stimuliert (in Kapitel 3.6 Elektrophysiologie genauer beschrieben). Dabei wurde ein Stimulus in der Region der Schaffer-Kollateralen appliziert und ein FP in der Region

CA1. Das MEA zeichnet die extrazellulär gemessenen Spannungsveränderungen 10 ms vor Stimulusgabe bis 100 ms nach Stimulusgabe auf. Dabei zeigen die gemessenen FPs einen spezifischen Verlauf. Jedes FP ist dabei das Abbild extrazellulärer Spannungsveränderungen, die durch Kumulation vieler intrazellulärer Aktionspotentiale entstehen. Die FPs verlaufen daher invers zu den Aktionspotentialen. In Abbildung 18 ist beispielhaft ein FP gezeigt. Zu Beginn ist das Stimulationsartefakt zu sehen. Darauf folgend kommt es mit leichter Verzögerung zu einer deutlichen negativen Potentialdifferenz, die durch einen Einstrom von positiv geladenen Ionen in die Nervenzellen ausgelöst wird. Durch Beendigung der Aktionspotentiale der Nervenzellen kehrt auch die extrazellulär gemessene Spannung wieder in den Ausgangszustand zurück. Um die FPs zu vergleichen, wurde der Betrag der Steigung zwischen 10% und 90% (Slope10/90) der Hyperpolarisation der Spannungskurve bestimmt.

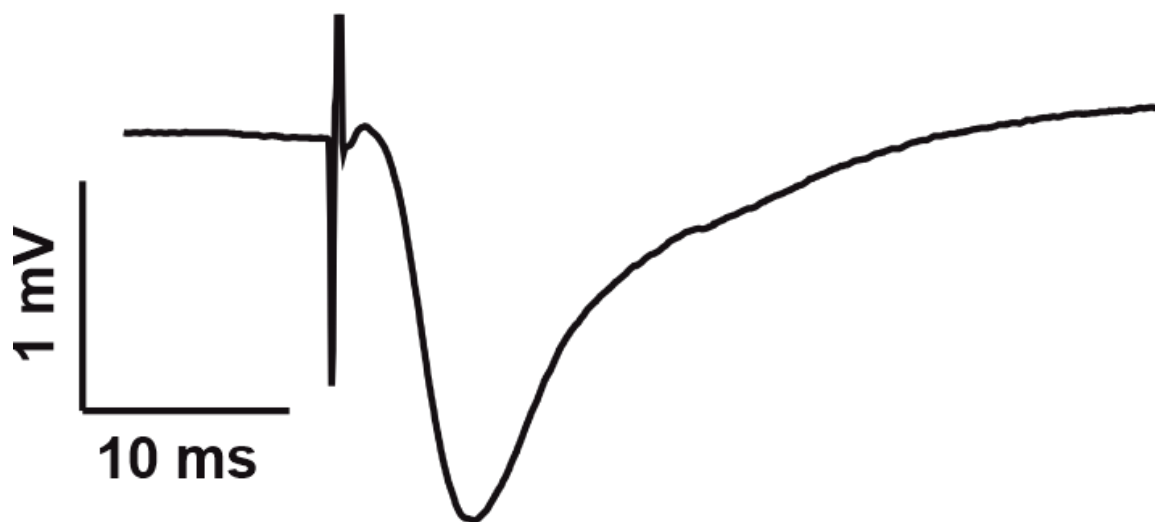


Abbildung 18: Beispiel lokales Feldpotential (FP)

Zu sehen ist ein typisches lokales Feldpotential gemessen in der Region CA1 nach Stimulation der Schaffer-Kollaterale. Die Maßstabsleiste gibt den Maßstab 1 mV (Y-Achse) und 10 ms (X-Achse an).

4.3.2 Input/Output-Kurven

Um potenzielle Variabilitäten in der synaptischen Erregbarkeit im Hirnschnittpräparat zu untersuchen und um die optimale Stimulationsintensität für die LTP-Experimente zu bestimmen, wurde vor jeder Baseline-Aufnahme eine Input/Output-Kurve erstellt. Dabei wurde der Schnitt in steigender Intensität an gleicher Stelle wie bei der darauffolgenden LTP-Aufnahme stimuliert und die Slope10/90 der FPs bestimmt. Es

wurde mit einer Stimulus-Intensität von 500 mV begonnen und die Intensität in Schritten von 500 mV bis zu einem Maximum von 5000 mV erhöht. Das Interstimulus-Intervall (ISI) betrug eine Minute. Die in den Input/Output-Kurven bestimmte Erregbarkeit war im Vergleich zu sham-Gruppe (n=27 von 10 Mäusen) ipsilateral (n=26 von 18 Mäusen) und kontralateral (n=24 von 18 Mäusen) zum SHT im Bereich der Stimulus-Intensität von 1500 mV bis 5000 mV signifikant reduziert. Zur statistischen Auswertung wurde ein Kruskal Wallis Test mit Dunn's multiple comparison Test als Folgetest angewandt mit einem Signifikanzniveau von *: $p < 0,05$; #: $p < 0,05$ und ##: $p < 0,01$. Die Werte für die einzelnen Stimulus-Intensitäten sind in Tabelle 1 aufgelistet.

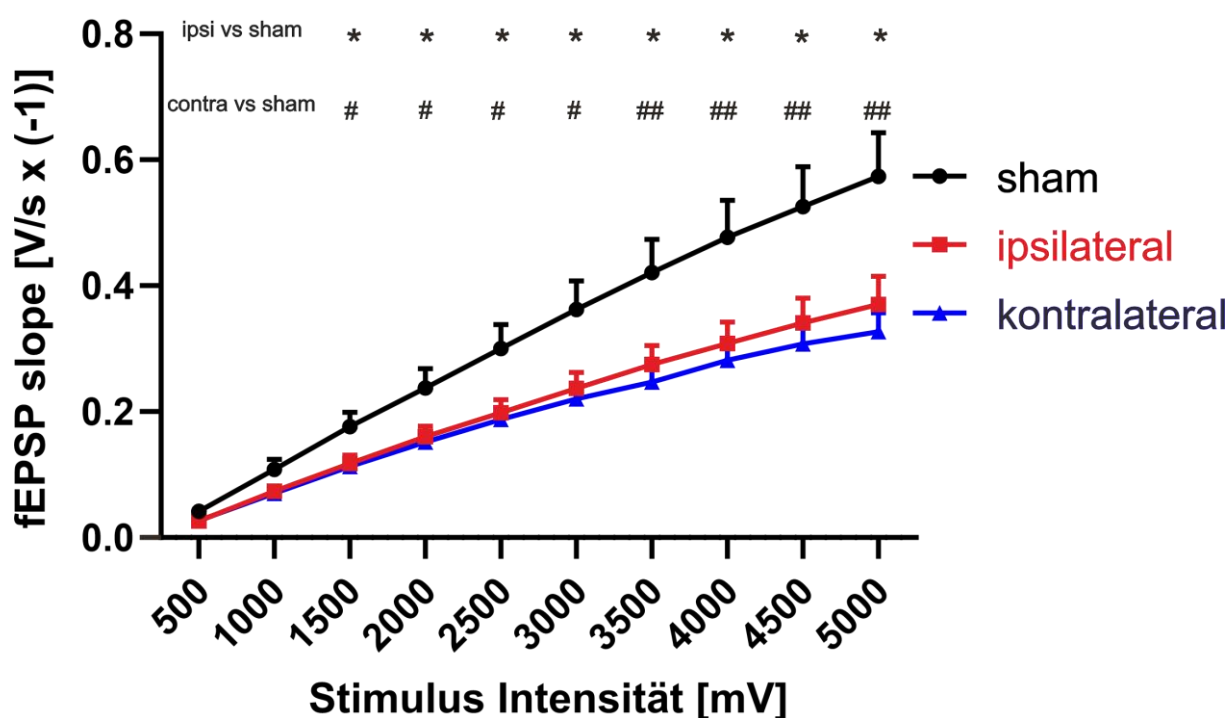


Abbildung 19: Input/Output-Kurven 1 bis 2 Tage nach SHT oder nach sham-Operation

Die Abbildung zeigt die Mittelwerte der Input/Output-Kurven mit dem SEM als nach oben markiertem Fehlerbalken. Die sham-Gruppe (sham) wird dabei mit schwarzen Kreisen angezeigt, während die roten Vierecke die ipsilateral zum SHT gemessenen Werte und die blauen Dreiecke die kontralateral zum SHT gemessenen Werte anzeigen. Dabei gibt die Y-Achse den Betrag der Slope_{10/90} in [V/s] und die X-Achse die Stimulus-Intensität in [mV] an. Zur statistischen Auswertung wurde ein Kruskal Wallis Test mit Dunn's multiple comparison Test als Folgetest angewandt mit einem Signifikanzniveau von *: $p < 0,05$; #: $p < 0,05$ und ##: $p < 0,01$. Es zeigte sich eine signifikant verringerte Erregbarkeit im Bereich zwischen 1500 mV und 5000 mV.

Stimulus-Intensität	Sham [V/s x -1]	Ipsi [V/s x -1]	<i>P</i> -Wert ¹	<i>P</i> -Wert ²
500 mV	0,0417 ± 0,0080	0,0263 ± 0,0036	0,6116	0,3372
1000 mV	0,1087 ± 0,0155	0,0735 ± 0,0083	0,1434	0,0927
1500 mV	0,1760 ± 0,0224	0,1178 ± 0,0127	0,0373	0,0294
2000 mV	0,2380 ± 0,0301	0,1601 ± 0,0165	0,0461	0,0372
2500 mV	0,3002 ± 0,0375	0,1980 ± 0,0204	0,0224	0,0220
3000 mV	0,362 ± 0,0445	0,2368 ± 0,0251	0,0196	0,0197
3500 mV	0,4209 ± 0,0519	0,2752 ± 0,0293	0,0164	0,0243
4000 mV	0,477 ± 0,0578	0,3082 ± 0,0334	0,0159	0,0211
4500 mV	0,5257 ± 0,0622	0,3413 ± 0,0382	0,0128	0,0163
5000 mV	0,5740 ± 0,0676	0,3703 ± 0,0441	0,0125	0,0302

Stimulus-Intensität	Sham [V/s x -1]	Kontra [V/s x -1]	<i>P</i> -Wert ¹	<i>P</i> -Wert ²
500 mV	0,0417 ± 0,0080	0,0273 ± 0,0038	0,6116	0,5023
1000 mV	0,1087 ± 0,0155	0,0707 ± 0,0069	0,1434	0,0873
1500 mV	0,1760 ± 0,0224	0,1130 ± 0,0106	0,0373	0,0255
2000 mV	0,2380 ± 0,0301	0,1519 ± 0,0134	0,0461	0,0291
2500 mV	0,3002 ± 0,0375	0,1874 ± 0,0164	0,0224	0,0145
3000 mV	0,362 ± 0,0445	0,2203 ± 0,0187	0,0196	0,0129
3500 mV	0,4209 ± 0,0519	0,2469 ± 0,0213	0,0164	0,0085
4000 mV	0,477 ± 0,0578	0,2817 ± 0,0229	0,0159	0,0089
4500 mV	0,5257 ± 0,0622	0,3078 ± 0,0253	0,0128	0,0078

5000 mV	$0,5740 \pm 0,0676$	$0,3271 \pm 0,0289$	0,0125	0,0052
---------	---------------------	---------------------	--------	--------

1 = *P*-Wert des Kruskal-Wallis Tests

2 = korrigierte *P*-Wert des Dunn's multiple comparison Tests

Tabelle 1: Statistische Auswertung der Input/Output-Kurven

Die Tabelle zeigt in der ersten Spalte die Stimulus-Intensität der Input/Output-Kurven. In den beiden folgenden Spalten wird der Mittelwert und der SEM der sham-Gruppe (sham) ipsilateral zum SHT (ipsi) und kontralateral zum SHT (kontra) angegeben. Die vierte Spalte zeigt den *P*-Wert des Kruskal Wallis Tests und die fünfte den korrigierten *P*-Wert des Dunn's multiple comparison Tests. Falls der *P*-Wert des Kruskal-Wallis-Tests $p < 0,05$ beträgt, wird der korrigierte *P*-Wert des Dunn's multiple comparison Tests mit einem Signifikanzniveau von *: $p < 0,05$; #: $p < 0,05$ und ##: $p < 0,01$ für die Bestimmung der Signifikanz herangezogen.

4.3.3 Paired Pulse Ratio

Um zu untersuchen, ob sich die in den Input/Output-Kurven gezeigte verringerte Erregbarkeit auf die Kurzzeitplastizität auswirkt, wurde die Paired Pulse Ratio (PPR) als Maß für die Kurzzeitplastizität bestimmt. Die PPR wurde zu zwei Zeitpunkten gemessen: einmal vor Beginn der Baseline (PPR pre HF) und einmal nach Ende der LTP-Aufnahmen (PPR post HF). Um die PPR zu ermitteln wurde der Hirnschnitt im Abstand von 50 ms zwei Mal mit der in den Input/Output-Kurven ermittelten Reizstärke stimuliert. Dadurch konnten jeweils 2 FPs aufgezeichnet werden, wie in Abbildung 20 zu sehen ist. Zur Berechnung der PPR wurde die Slope_{10/90} des zweiten FPs durch die Slope_{10/90} des ersten FPs geteilt. Für die Auswertung wurden ausschließlich Daten von Hirnschnitten berücksichtigt, die eine stabile Baseline und FPs mit einer Amplitude von über 300 μ V aufwiesen.

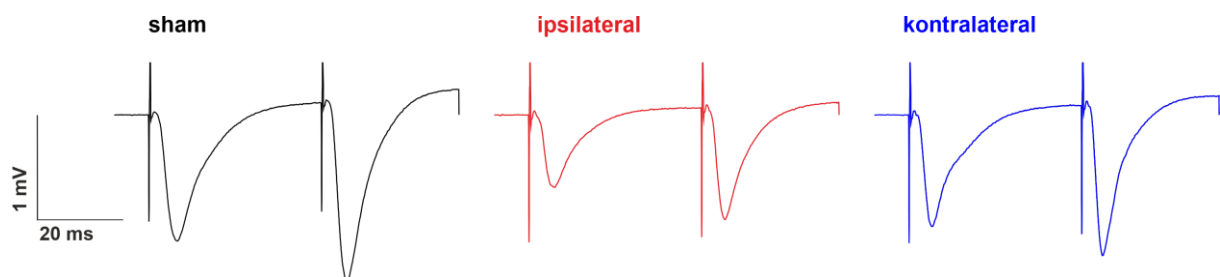


Abbildung 20: Beispiel FPs bei Messung der PPR

Die Abbildung zeigt beispielhaft PPR-Aufnahmen der sham-Gruppe (sham) in schwarz, ipsilateral zum SHT in rot und kontralateral zum SHT in blau. Zu sehen sind jeweils zwei FPs im Abstand von 50 ms mit dem typischen Verlauf (wie er in Kapitel 4.3.1 Beispiel Feldpotentiale beschrieben ist). Die Maßstabsleiste zeigt den Maßstab von 1 mV auf der Y-Achse und 20 ms auf der X-Achse an.

Beim Vergleich der PPR mit der sham-Gruppe (n=17 von 9 Mäusen) konnte keine signifikante Änderung 1-2 Tage nach SHT in der ipsilateralen (n=11 von 11 Mäusen) oder in der kontralateralen (n=8 von 8 Mäusen) CA1 festgestellt werden. Statistisch ausgewertet wurden die Daten mit einem Kruskal Wallis Test mit Dunn's multiple comparison Test als Folgetest mit einem Signifikanzniveau von *: $p < 0,05$.

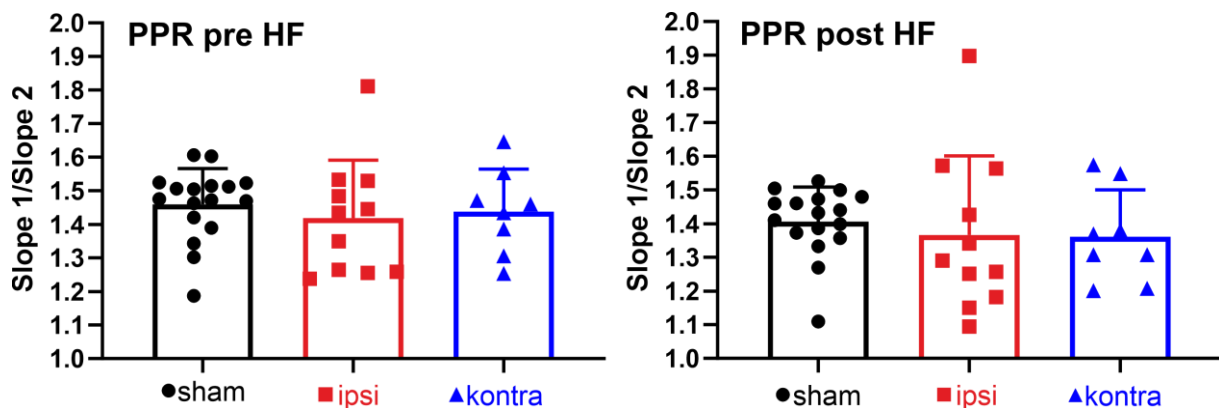


Abbildung 21: Boxplot Paired Pulse Ratio vor und nach LTP-Induktion

Die Abbildungen zeigen die Paired Pulse Ratios der sham-Gruppe (sham) als schwarze Kreise, ipsilateral zum SHT (ipsi) als rote Vierecke und kontralateral zum SHT als blaue Dreiecke 1 bis 2 Tage nach der Operation. Auf der linken Abbildung sind die PPRs zu sehen, die vor Beginn der Baseline aufgenommen wurden (PPR pre HF) und auf der rechten Abbildung die PPRs nach Ende der LTP-Aufnahme (PPR post HF). Die Boxplots zeigen die Werte der einzelnen Messungen, dabei repräsentieren sie die Mittelwerte und tragen die SEMs als Fehlerbalken nach oben auf. Die Y-Achsen zeigen das Verhältnis der Slope10/90 der zweiten FPs im Verhältnis zur Slope10/90 der ersten FPs, die beispielhaft in Abbildung 20 zu sehen sind. Nach Anwendung eines Kruskal Wallis Tests mit Dunn's multiple comparison Test als Folgetest mit einem Signifikanzniveau von *: $p < 0,05$ zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen,

4.3.4 Langzeitpotenzierung 1-2 Tage nach SHT

Um weitere Veränderungen in der Akutphase 1 bis 2 Tage nach SHT im Hippocampus zu untersuchen, wurde die Langzeitpotenzierung als Maß für die Langzeitplastizität in der Region CA1 gemessen. Dazu wurden die Hirnschnitte (wie in Kapitel 3.6.2 Stimulationsprotokoll genauer beschrieben) im Bereich der Schaffer-Kollaterale stimuliert und es wurde die Slope10/90 in der Region CA1 gemessen.

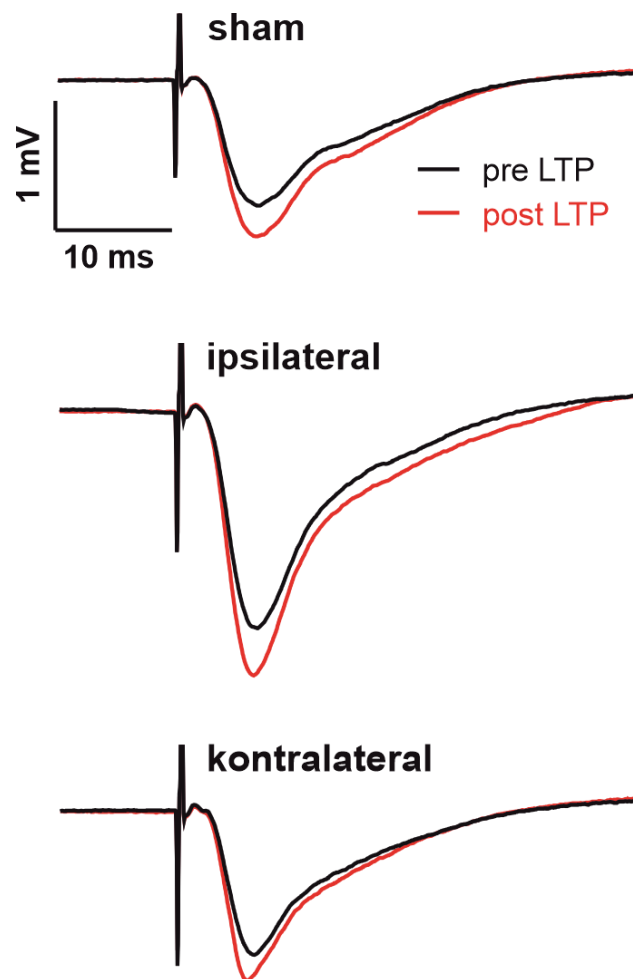


Abbildung 22: Lokale Feldpotentiale vor und nach LTP-Induktion

Die Abbildungen zeigen repräsentative FPs in schwarz vor LTP-Induktion und in rot nach LTP-Induktion, von Mäusen 1-2 Tagen nach sham-Operation (sham) und 1-2 Tage nach CCI, ipsilateral und kontralateral zur Verletzung in der Region CA1. Die Maßstabsleiste gibt den Maßstab 1 mV (Y-Achse) und 10 ms (X-Achse) an.

Nach Aufnahme einer 30-minütigen Baseline wurden eine LTP mit Hilfe einer Hochfrequenz (HF)-Stimulation induziert (siehe Kapitel 3.6.3 Induktion der LTP) und FPs wurden für weitere 60 Minuten gemessen. Um die Stärke der LTP zu bestimmen, wurde der Mittelwert der gemessenen Slope_{10/90} der FPs der letzten 10 Minuten durch den Mittelwert der FPs der letzten 10 Minuten der Baseline geteilt. Zur Auswertung wurden jeweils nur Schnitte mit einer stabilen Baseline mit einer FP-Amplitude > 300 μ V verwendet. Um den Effekt der LTP zu bestimmen, wurde der Mittelwert der FPs in den letzten 10 Minuten durch den Mittelwert der letzten 10 Minuten der Baseline vor LTP-Induktion geteilt. Zusätzlich wurde ein Kontrollpfad aufgenommen, um zu zeigen, dass für die induzierte LTP synaptische Veränderungen zwischen den Schaffer-Kollateralen und der Region CA1

verantwortlich waren. Die Werte des Kontrollpfads wurden normalisiert zum Mittelwert der Messwerte der FPs der ersten 30 Minuten. Die Daten wurden mit einem Kruskal Wallis Test mit Dunn's multiple comparison Test als Folgetest mit einem Signifikanzniveau von *: $p < 0,05$; # ausgewertet. Die Slope_{10/90} der FPs des Kontrollpfads der letzten 10 Minuten ($n=15$ von 14 Mäusen, $0,9073 \pm 0,017$) zeigte keine signifikante Veränderung im Vergleich zu den FPs vor LTP-Induktion.

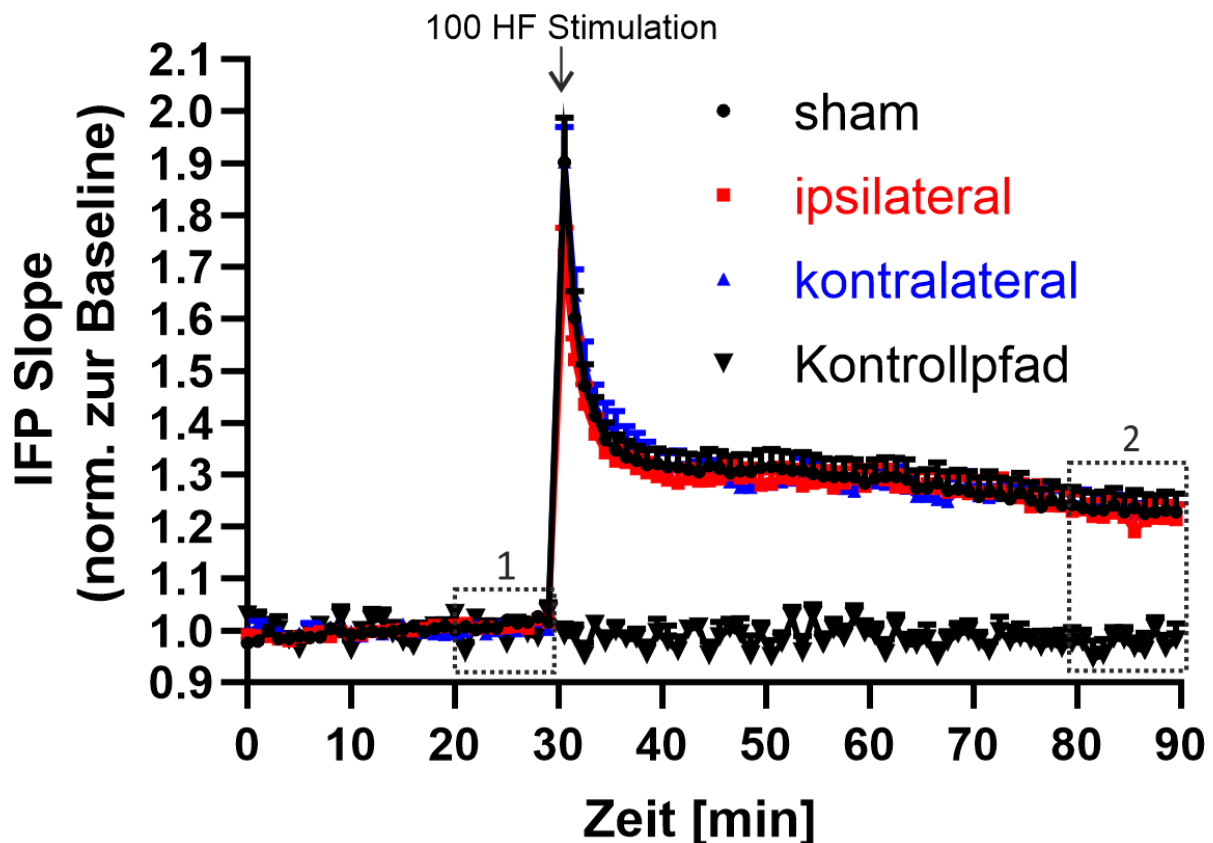


Abbildung 23: LTP-Messungen 1 bis 2 Tage nach SHT

Die Abbildung zeigt die gemessenen Werte der LTP-Messungen der sham-Gruppe (sham) als schwarze Kreise, ipsilateral zum SHT als rote Vierecke und kontralateral zum SHT als blaue Dreiecke. Zu Beginn jeder Messreihe wurde für 30 Minuten eine Baseline aufgenommen. Bei stabiler Baseline wurde daraufhin die LTP induziert, indem der Schnitt eine Sekunde lang mit 100 Hertz (Hochfrequenz-Stimulation) stimuliert wurde. Der Zeitpunkt der HF-Stimulation ist in der Abbildung mit einem Pfeil markiert. Die Messwerte des Kontrollpfads sind als schwarze Dreiecke zu sehen. Die Y-Achse gibt die Höhe der Slope_{10/90} der gemessenen FPs in Relation zur Baseline an. Die X-Achse zeigt die Zeit in Minuten. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert der Slope_{10/90} der FPs zu dem gemessenen Zeitpunkt mit dem SEM als Fehlerbalken nach oben dargestellt. Dabei wurden die Werte in Relation zum Mittelwert der Baseline der sham-Gruppe (schwarze Kreise) gesetzt. Um die Stärke der LTP zu bestimmen, wurde der Mittelwert der FP Slopes der letzten 10 Minuten der LTP-Messung (mit 2 markierter Bereich) durch den Mittelwert der letzten 10 Minuten vor LTP-Induktion (mit 1 markierter Bereich) geteilt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 zu sehen.

Nach Auswertung mit Hilfe eines Kruskal Wallis Tests mit einem Signifikanzniveau von *: $p < 0,05$ konnte kein signifikanter Unterschied der LTP zwischen der sham-Gruppe ($n=18$ von 10 Mäusen, $1,2172 \pm 0,0297$) und den SHT-Mäusen in der ipsilateralen CA1-Region ($n=13$ von 12 Mäusen, $1,2045 \pm 0,0284$) und der kontralateralen CA1-Region ($n=9$ von 7 Mäusen, $1,2255 \pm 0,017$) festgestellt werden.

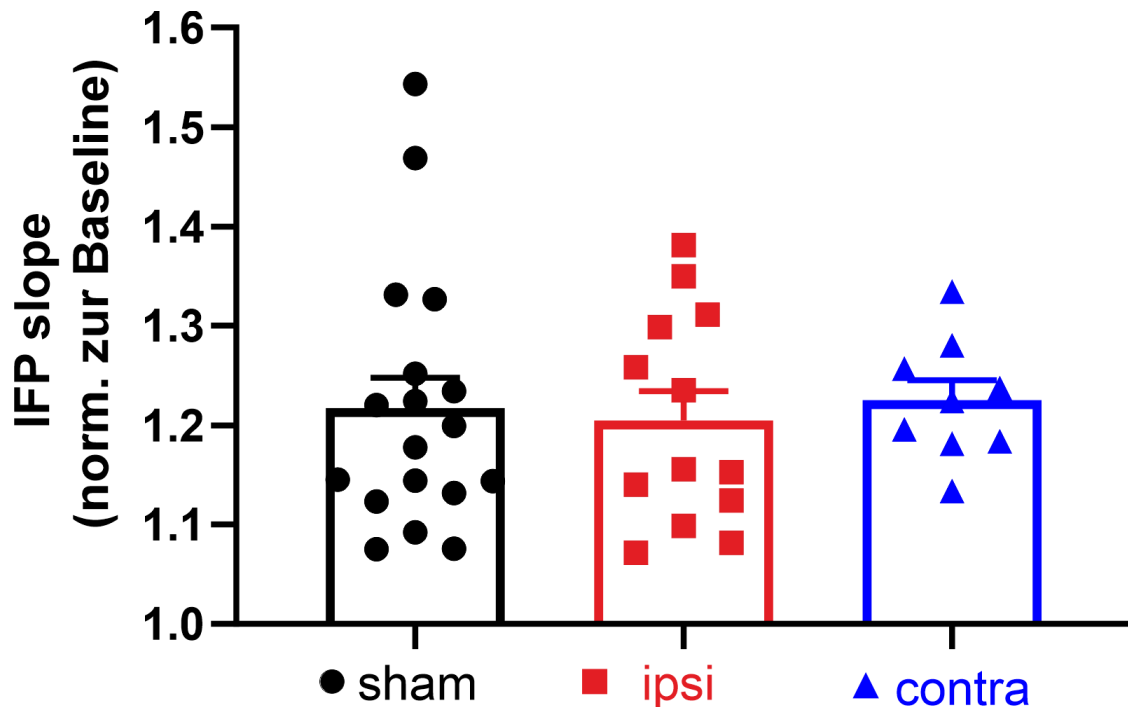


Abbildung 24: Boxplot mit dem Ergebnis der LTP-Messungen

Zu sehen sind die berechneten LTPs normalisiert zu den letzten 10 Minuten der Baseline der sham-Gruppe. Dabei sind die Werte der sham-Gruppe (sham) als schwarze Kreise, der SHT-Gruppe ipsilateral zum SHT (ipsi) als rote Vierecke und kontralateral zum SHT als blaue Dreiecke angezeigt. Es sind die Werte der einzelnen Messungen zu sehen mit den Boxplots, die die Mittelwerte anzeigen und die SEMs als nach oben aufgetragene Fehlerbalken beinhalten.

Um zu zeigen, dass die gemessenen FPs nicht fälschlicherweise mit Artefakten verwechselt werden, wurde der ACSF DNQX zugefügt (siehe Kapitel 3.6.4 Spontanaktivitätsmessungen). FPs wurden sowohl vor der DNQX-Gabe als auch nach 30 Minuten Inkubation gemessen. Wie in Abbildung 25 zu sehen, verschwanden die Signale nach DNQX-Gabe.

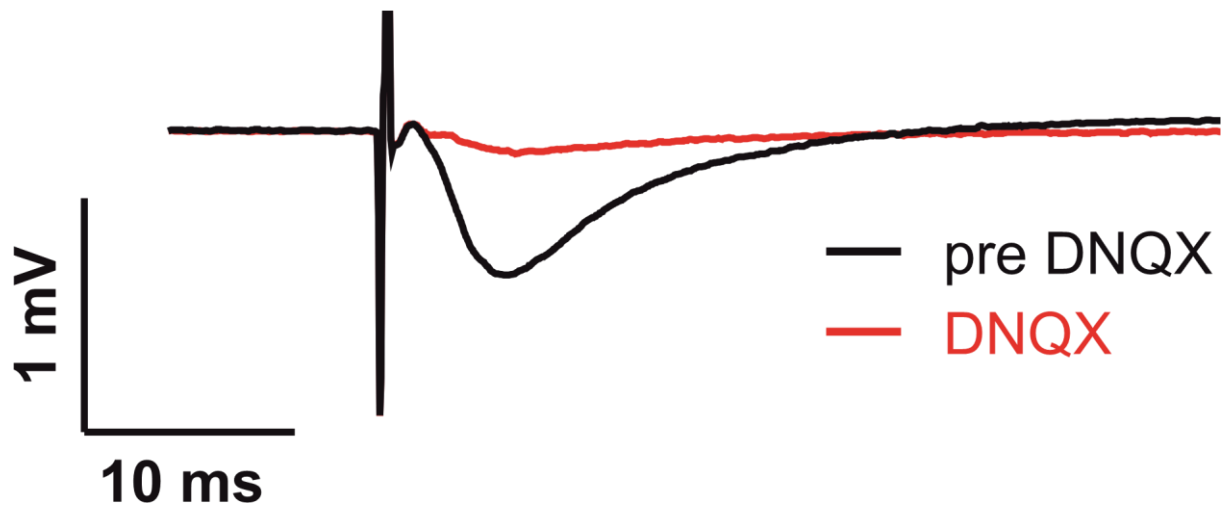


Abbildung 25: FPs vor und nach DNQX-Gabe

Die Abbildung zeigt ein FP vor DNQX-Gabe (pre DNQX) in schwarz und die gemessene Spannung nach DNQX-Gabe in rot. Nach DNQX-Gabe konnte kein FP mehr ausgelöst werden.

4.4 Spontanaktivitätsmessungen 1-2 Tage nach SHT

Um ein besseres Verständnis für Veränderungen der neuronalen Netzwerkaktivität im Hippocampus in der Akutphase nach unilateralem kortikalem SHT zu bekommen, wurde die Spontanaktivität in der Region CA1 1 bis 2 Tage nach SHT gemessen. Es wurde versucht (wie in Kapitel 3.6.4 Spontanaktivitätsmessungen genauer erläutert), mit Hilfe einer modifizierten ACSF (mACSF), die Kainat und Carbachol beinhaltete, physiologische Verhältnisse mit glutamatergen und cholinergen Signalen nachzuahmen. Die Registrierung einzelner Spikes erfolgte, sobald der Grenzwert von fünf Standardabweichungen des Grundrauschens erreicht war. Außerdem wurde ein Butterworth Highpass-Filter mit 200 Hz angewandt, um die Signalqualität zu verbessern. Die Spontanaktivität wurde mit Hilfe des MEAs bestimmt. Die Spikes wurden über einen Zeitraum von 600 Sekunden aufgenommen. Dabei wurde die Spontanaktivität für das CA1 sowohl im Bereich des Stratum pyramidum mit den Zellkörpern der Pyramidenzellen (somatische Spontanaktivität) als auch im Bereich des Stratum moleculare, in dem sich die apikalen Dendriten der Pyramidenzellen befinden (dendritische Spontanaktivität), ermittelt. Die Spikefrequenz wurde jeweils normalisiert zum Mittelwert der sham-Gruppe. Zusätzlich erfolgte eine Bestimmung der Spontanaktivität 15 Minuten nach der Zugabe von TTX, um sicherzustellen, dass Störsignale nicht fälschlicherweise als Spikes interpretiert wurden.

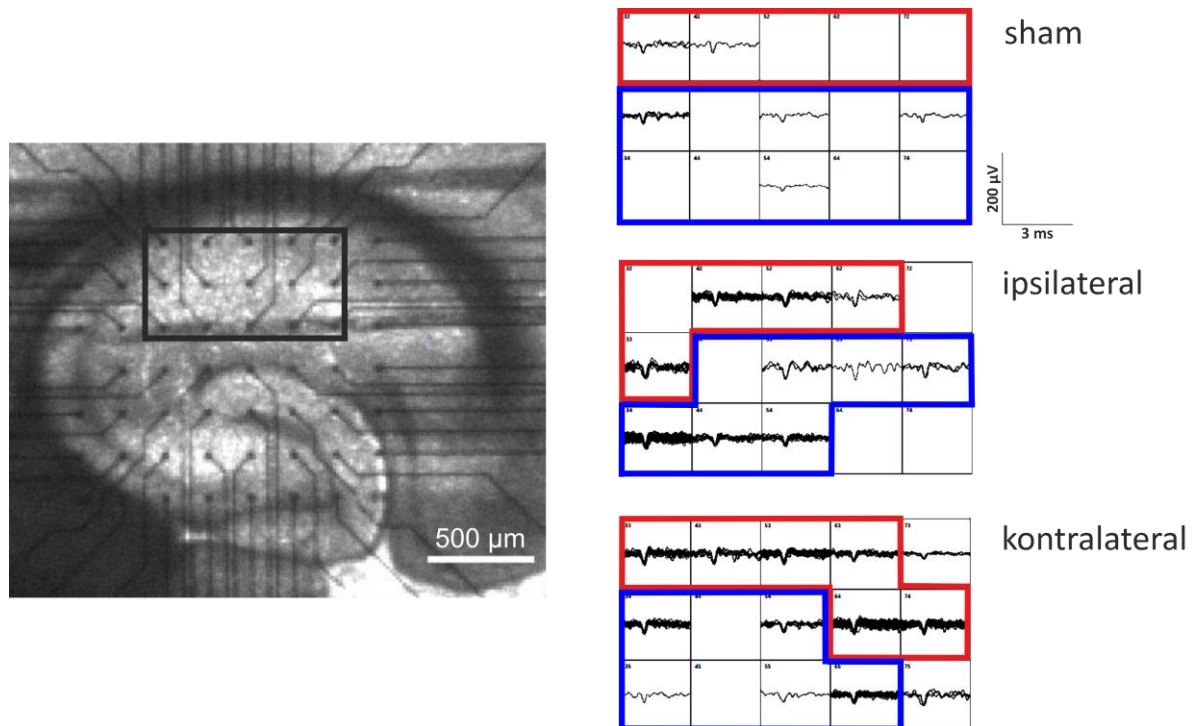


Abbildung 26: Repräsentative MEA-Kanäle mit Spontanaktivitätsmessungen in der Region CA1

Links zu sehen ist ein Foto eines Hirnschnitts, der über den Elektroden eines MEA-Chips platziert ist. Das schwarzumrandete Viereck markiert die Elektroden, in denen die Spontanaktivität ausgewertet wurde. Von diesen Elektroden sind repräsentative Kanäle in den Abbildungen auf der rechten Seite zu sehen. Der Maßstab beträgt $500 \mu\text{m}$.

Rechts sind drei Kanäle mit Spontanaktivitätsmessungen zu sehen, die mit dem Programm Multi Channel Analyzer (Multichannel Systems) gemessen wurden. Dargestellt sind die sham-Gruppe (sham), sowie Messungen ipsilateral und kontralateral zum SHT. Die Cutouts haben jeweils eine Länge von 3 ms, wobei ein Bereich aufgenommen wurde, beginnend 1 ms vor bis 2 ms nach Erreichen des Grenzwertes. Der rot umrandete Bereich markiert die Elektroden im Bereich der Zellkörper im CA1, welche zur Ermittlung der somatischen Spontanaktivität herangezogen wurden. Der blau umrandete Bereich zeigt die Elektroden mit der dendritischen Spontanaktivität. Die Maßstabsleiste gibt den Maßstab mit $200 \mu\text{V}$ (Y-Achse) und 3 ms (X-Achse) an.

Zur Auswertung wurde ein Kruskal Wallis Test mit Dunn's multiple comparison test als Folgetest mit einem Signifikanzniveau von *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$ angewandt. Der Kruskal Wallis Test war sowohl für die Messung der somatischen als auch der dendritischen Spontanaktivitätsmessungen hoch signifikant: ****: $p < 0,0001$. Es zeigte sich eine signifikante Steigerung der somatischen Spontanaktivität im ipsilateralen ($n=30$ von 6 Hirnschnitten von 3 Mäusen, $1,7325 \pm 0,3568$; ipsi vs sham *: $p=0,0281$) und kontralateralen

Hippocampus (n=28 von 5 Hirnschnitten von 4 Mäusen, $4,2429 \pm 1,1943$; kontra vs sham *: $p=0,0173$) im Vergleich zur sham-Gruppe (n=33 von 7 Hirnschnitten von 3 Mäusen; $1 \pm 0,2033$). Im Bereich der Dendriten kam es ebenfalls zu einer signifikant erhöhten Spikefrequenz im kontralateralen Hippocampus (n=23 von 5 Hirnschnitten von 4 Mäusen; $1,7460 \pm 0,4062$; kontra vs sham *: $p=0,0152$) im Vergleich zur sham-Gruppe (n=37 von 8 Hirnschnitten von 3 Mäusen; $1 \pm 0,2517$). Allerdings zeigte sich keine signifikante Veränderung im ipsilateralen Hippocampus (n=32 von 6 Hirnschnitten von 4 Mäusen; $2,1919 \pm 0,7449$). Nach Gabe von TTX verschwanden die Spikes weitestgehend sowohl im Bereich der Zellkörper (n=29 von 7 Hirnschnitten von 4 Mäusen; $0,3129 \pm 0,0341$; TTX vs sham **: $p=0,0079$) als auch im Bereich der Dendriten (n= 33 von 7 Hirnschnitten von 4 Mäusen; $0,2462 \pm 0,0260$; TTX vs sham **: $p=0,0015$).

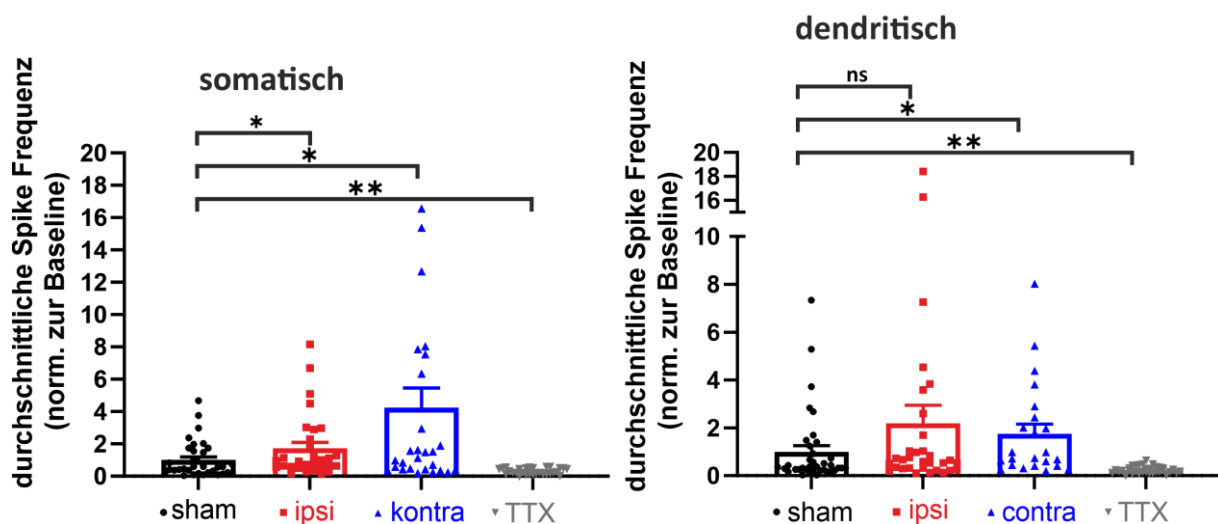


Abbildung 27: Boxplots Spontanaktivität im Hippocampus 1 bis 2 Tage nach SHT

Die Abbildungen zeigen das Ergebnis der somatischen und dendritischen Spontanaktivitätsmessungen. Jeder einzelne Punkt repräsentiert die Spikefrequenz, die von einer Elektrode gemessen wurde. Dabei repräsentieren die schwarzen Kreise die Ergebnisse der sham-Gruppe (sham), die roten Vierecke die Werte, die ipsilateral (ipsi) zum SHT gemessen wurden, die blauen Dreiecke die kontralateral (kontra) zum SHT gemessenen Werte und die grauen Dreiecke die Messwerte nach TTX-Applikation. Die Werte wurden normalisiert zum Mittelwert der sham-Gruppe (sham). Die Boxplots zeigen den Mittelwert an, während die Fehlerbalken den SEM angeben. Zur statistischen Auswertung wurde ein Kruskal Wallis Test mit Dunn's multiple comparison Test als Folgetest angewandt mit einem Signifikanzniveau von *: $p<0,05$; **: $p<0,01$.

Die linke Abbildung zeigt eine signifikant gesteigerte somatische Spontanaktivität in der ipsi- und kontralateralen Region CA1 1 bis 2 Tage nach SHT im Vergleich zur sham-Gruppe. Nach TTX-Gabe kam es zu einer signifikanten Reduktion der Spontanaktivität.

Die rechte Abbildung zeigt eine signifikant gesteigerte dendritische Spontanaktivität kontralateral im Vergleich zur sham-Gruppe. Allerdings wurde ipsilateral keine signifikante Veränderung der Spontanaktivität im Bereich der Dendriten gemessen. Nach TTX-Gabe kam es ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der Spontanaktivität.

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Methoden

5.1.1 Die Maus als Modell für den Menschen

In der Grundlagenwissenschaft werden oft Mäuse und Ratten zur Erforschung der Pathomechanismen von Krankheiten verwendet. Tierversuche mit Nagern spielen eine wichtige Rolle, um ein besseres Verständnis von Krankheiten zu bekommen und leisten somit einen wichtigen Beitrag zur Entwicklung von zukünftigen Behandlungsoptionen für den Menschen. Mäuse haben sich als gutes Modell für den Menschen erwiesen, da sie als Säugetiere über eine ähnliche Physiologie verfügen und 95% ihrer Gene mit menschlichen Genen übereinstimmen (Barré-Sinoussi and Montagutelli, 2015). Während sich der Kortex der Maus durch seine lissenzephalie Struktur von dem des Menschen unterscheidet, hat der Hippocampus den gleichen histologischen Aufbau wie der des Menschen (siehe Kapitel 2.2).

Die Zucht von Mausstämmen ermöglicht außerdem eine hohe Reproduzierbarkeit. Des Weiteren sind Mäuse günstiger und einfacher in ihrer Haltung als größere Tiere. Allerdings hat sich gezeigt, dass die Übertragbarkeit von Ergebnissen wissenschaftlicher Untersuchungen nicht immer gegeben ist. Dies betrifft sowohl verschiedene Mausstämme als auch den Vergleich zwischen Maus und Ratte sowie zwischen Maus und Mensch (Barré-Sinoussi and Montagutelli, 2015). Viele Experimente sind aus ethischen Gründen am Menschen nicht durchführbar, wie die Entnahme von Hirngewebe zur histologischen und elektrophysiologischen Untersuchung nach SHT. Außerdem zeigen Patienten eine hohe Variabilität der Ursache, Art und Schwere des Schädelhirntraumas und unterscheiden sich in Parametern wie Alter, Geschlecht und Gewicht, wodurch die Reproduzierbarkeit eingeschränkt wird.

Andere Methoden wie Zellkulturen eignen sich ebenfalls zur Untersuchung von Zellen oder Organen, allerdings können sie keine Aussagen über physiologische Mechanismen einer Krankheit geben, bei der systemische Interaktionen verschiedener Organsysteme eine Rolle spielen (Barré-Sinoussi and Montagutelli, 2015). So spielt beispielsweise bei der Pathophysiologie des SHTs die Schädigung der Bluthirnschranke und das Einwandern von peripheren Immunzellen eine wichtige Rolle (siehe Kapitel 2.1.3).

Tierexperimente sollen sich immer an den drei Rs replacement, reduction und refinement orientieren, die von W. M. S. Russel 1959 beschrieben wurden (Russell, 1959). Damit ist gemeint, dass Tierversuche bei einer gleichwertigen Alternative durch diese zu ersetzen sind, die Anzahl der verwendeten Tiere auf eine für die Fragestellung nötige Menge reduziert werden soll und das Leid der Tiere so weit wie möglich reduziert werden soll. Nach diesen Prinzipien wurden die Tierversuche in meinen Experimenten durchgeführt.

5.1.2 Messung von neuronalen Signalen mit dem Multi-Elektroden-Array (MEA)

Es stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, um elektrische Aktivität von einzelnen Nervenzellen oder ganzer neuronaler Netzwerke zu messen. Die Patch-Clamp-Technik erlaubt es mit Glaspipetten die Zellmembran von Nervenzellen zu penetrieren und dadurch intrazelluläre Spannungsänderungen einzelner Neurone zu messen. Allerdings ist diese Technik sehr aufwendig und erlaubt meist nur die Aufnahme an wenigen Nervenzellen pro Experiment, und die Länge der Messungen ist durch die Schädigung der Zelle zeitlich begrenzt (Obien et al., 2014, Spira and Hai, 2013).

Mit Hilfe von Elektroenzephalographie (EEG) und funktionellen MRT-Aufnahmen lässt sich neuronale Aktivität im gesamten Gehirn darstellen.

Extrazelluläre Aufnahmen bilden regionale Spannungsänderungen als lokale Feldpotentiale (FPs) ab. Die FPs entsprechen Aktionspotentialen einzelner Nervenzellen oder der Überlagerung von Summen-Aktionspotentialen einer ganzen Population von Nervenzellen und synaptischen Potentialen (Spira and Hai, 2013). In den Experimenten für meine Arbeit wurde zur Aufnahme der FPs ein Multi-Elektroden-Array verwendet (siehe Kapitel 3.6.1). Ein klassischer MEA-Chip verfügt über eine Vielzahl gitterartig angeordneter flacher Elektroden, mit denen Spannungsänderungen gemessen werden können und die man ebenfalls zur Stimulation verwenden kann. Über den Elektroden können Hirnschnitte, aber auch Nervenzellkulturen platziert werden. Die gitterartige Anordnung der Elektroden erlaubt das Aufnehmen von neuronaler Aktivität an verschiedenen Orten zur gleichen Zeit. Außerdem werden dabei die Nervenzellen im Gegensatz zu intrazellulären Aufnahmen nicht direkt geschädigt, wodurch sehr lange Experimente, die Tage und sogar Monate dauern, möglich sind (Spira and Hai, 2013, Blanche et al., 2005).

Die Nervenzellen sind bei Messungen mit einem planaren MEA durch einen Spalt von den Elektroden entfernt. Dadurch kommt es zu einem erheblichen Signalverlust. Kleine Spannungsänderungen von Nervenzellen, die nicht ausreichen, um ein Aktionspotential auszulösen, können im Gegensatz zu intrazellulären Messungen nicht aufgezeichnet werden. Deshalb kann auch nicht unterschieden werden, ob das Aktionspotential durch eine spontane Depolarisation, durch ein exzitatorisches Signal einer anderen Nervenzelle oder durch das Ausbleiben von inhibitorischen Signalen ausgelöst wird (Spira and Hai, 2013). Neuere Entwicklungen von MEAs mit spitzen Elektroden ermöglichen hingegen auch intrazelluläre Aufnahmen (Xu et al., 2021).

5.2 Veränderungen in der synaptischen Plastizität in der akuten Phase des SHTs im Hippocampus

5.2.1 Keine Astrogliose nachweisbar in der immunhistochemischen Färbung

In der Akutphase nach SHT konnte in einer Vielzahl von Experimenten eine Astrogliose in der direkten Umgebung der Verletzung nachgewiesen werden (Le Priault et al., 2017, Friedman-Levi et al., 2021, Jin et al., 2016, Babaei et al., 2015). Es ist nicht abschließend geklärt, ob die Astrogliose protektiv oder schädlich auf den Heilungsprozess wirkt (Karve et al., 2016). In einem Experiment aus unserem Labor, das das gleiche CCI-Protokoll wie in meinen Experimenten verwendete, war ebenfalls eine Astrogliose in direkter Nähe der Läsion sichtbar (Le Priault et al., 2017). In einem Experiment an Mäusen, bei denen ein moderates SHT durch CCI ausgelöst wurde, zeigte sich im Zeitraum von 24 Stunden bis zu einer Woche nach CCI im Bereich des Hippocampus eine erhöhte Astrozyten-Aktivität (Nikolakopoulou et al., 2016). Die 2021 veröffentlichten Ergebnisse eines Experiments an Ratten mit moderater CCI zeigten ebenfalls eine erhöhte Anzahl von Astrozyten im CA1 und DG 24 Stunden nach Verletzungsinduktion (Huang et al., 2021). Aus diesem Grund war es von Interesse zu überprüfen, ob unser Modell einer milden CCI im Hippocampus ebenfalls zu einer Astrozytenreaktion führt. Allerdings ließ sich 72 h nach CCI keine signifikante Erhöhung der Astrozytenzahl im CA1 feststellen, wobei ein Trend auf einen Anstieg der Astrozytendichte ipsilateral und kontralateral zur Verletzung hinwies. Möglicherweise war die Versuchsgröße von 3 sham-Mäusen und 2 CCI-Mäusen nicht ausreichend.

5.2.2 Verringerte synaptische Erregbarkeit gemessen in Input/Output-Kurven im Hippocampus ipsi- und kontralateral vs sham

Zur Bestimmung der synaptischen Erregbarkeit wurden, wie in Kapitel 3.6.2 beschrieben, Input/Output-Kurven gemessen. Dafür wurde die Region CA3 stimuliert und es wurden Signale in der Region CA1 abgeleitet. Die gemessenen Reizantworten zeigten somit die Stärke der synaptischen Erregbarkeit zwischen den Schaffer-Kollateralen und Pyramidenzellen im CA1. Bei den Messungen zeigten sich signifikant abgeschwächte Signale im ipsi- und kontralateralen Hippocampus im Vergleich zur sham-Gruppe 24 bis 48 Stunden nach CCI. Die verringerte synaptische Erregbarkeit scheint typisch für die akute Phase nach SHT zu sein. In Studien an Mäusen und Ratten mit einem durch FPI bzw. WD-TBI ausgelösten SHT zeigte sich ebenfalls eine geringere Erregbarkeit in I/O-Kurven während der ersten 48 Stunden nach Verletzung (Wilson et al., 2016, Sun et al., 2015, Chen et al., 2018, Reeves et al., 2000). In zwei dieser Studien kam es zu einer Erholung der Erregbarkeit zwei bzw. drei Tage nach SHT (Chen et al., 2018, Reeves et al., 2000). In weiteren Studien wurden auch zwei Wochen nach dem Ereignis und später noch I/O-Kurven mit abgeschwächter Signalstärke gemessen (Titus et al., 2016, Titus et al., 2013, Titus et al., 2019). Andere Experimente zeigten sogar eine Steigerung der synaptischen Erregbarkeit eine Woche nach FPI (Cao et al., 2006) und einen Monat nach wiederholter geschlossener Kopfverletzung (McDaid et al., 2021).

Der Abfall der synaptischen Erregbarkeit lässt sich eventuell mit einer Schädigung von exzitatorischen Neuronen durch das SHT erklären. Es konnte gezeigt werden, dass besonders das CA3 einen starken Verlust an Pyramidenzellen aufweist (Deng and Xu, 2011). Durch den Verlust von exzitatorischen Zellen im CA3 sollte die Reizweiterleitung zum CA1 beeinträchtigt sein. Allerdings wären mit unserem Modell weitergehende Untersuchungen notwendig, um zu überprüfen, ob sich diese Hypothese bestätigen lässt.

5.2.3 Keine Anzeichen für Veränderung der Kurzzeitplastizität und Langzeitplastizität nach SHT

Eine zentrale Fragestellung meiner Arbeit ist die Auswirkung von Schädelhirntraumata auf die Plastizität des Hippocampus. Um dies genauer zu untersuchen, wurden Messungen der Kurz- und Langzeitplastizität durchgeführt.

Eine gute Methode, um präsynaptische Kurzzeitplastizität zu messen, ist die Bestimmung der PPR (siehe Kapitel 2.3.1). Die PPR wurde, wie in Kapitel 4.3.3 beschrieben, an Hirnschnitten vor und nach der HF-Stimulation an den Synapsen zwischen Schaffer-Kollateralen und Pyramidenzellen des CA1 bestimmt. Das ISI betrug 50 ms. Es konnte sowohl vor als auch nach HF-Stimulation eine deutliche synaptische Bahnung gezeigt werden. Allerdings war in der Akutphase nach SHT keine signifikante Veränderung der PPR zu beobachten, weder ipsilateral noch kontralateral zur Verletzung. Dies steht im Kontrast zu anderen Forschungsergebnissen, die eine Auswirkung von SHTs auf die Kurzzeitplastizität nachwiesen. So wurde ein Abfall der PPR an Synapsen zwischen Schaffer-Kollateralen und CA1 in Hirnschnitten von Ratten während der Akutphase nach SHT (Wilson et al., 2016, Chen et al., 2018) eine Woche nach SHT (Cao et al., 2006) bzw. 12 Wochen nach SHT (Titus et al., 2016) nachgewiesen. Allerdings zeigten vergleichbare Experimente an Ratten eine gesteigerte PPR im CA1 sowohl bei Stimulation des zur Verletzung kontralateral liegenden CA3, welches über Kommissurenfasern mit dem ipsilateralen Hippocampus verbunden ist (Reeves et al., 1997), als auch an Synapsen zwischen Schaffer-Kollateralen und CA1 (Reeves et al., 2000, Hernandez et al., 2018). Dite unveränderte PPR ist möglicherweise durch die geringere Schädigung des Hippocampus durch unser CCI-Modell erklärbar, das nur ein mildes SHT auslöst. So konnte in einem Experiment an Hirnschnitten von Ratten 2 Wochen nach milder SHT-Induktion ebenfalls keine Veränderung der PPR festgestellt werden, während diese nach einem moderaten SHT signifikant abfiel (Titus et al., 2013). In den oben genannten Veröffentlichungen wurden FPI-Modelle bzw. blast-TBI-Modelle zur SHT-Induktion verwendet. Andere Ergebnisse von Experimenten an Ratten zeigten auch keine Veränderung der PPR nach SHT (Warren et al., 2012, Marshall et al., 2017, Titus et al., 2019, Corser-Jensen et al., 2014). An einem Versuch mit Mäusen konnte ebenfalls keine Veränderung der PPR nach repetitiven geschlossenen SHTs festgestellt werden (Logue et al., 2016).

Zur Messung von potenziellen Veränderungen der synaptischen Langzeitplastizität wurde die LTP an Synapsen zwischen Schaffer-Kollateralen und Pyramidenzellen des CA1 bestimmt. Es konnte sowohl bei sham-operierten Mäusen als auch nach TBI eine signifikante LTP ausgelöst werden. Allerdings war kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen messbar, was darauf hindeutet, dass unser SHT-Modell keinen Einfluss auf die Langzeitplastizität im Hippocampus hat. In

früheren Experimenten unseres Labors konnte bei gleichem SHT-Modell eine signifikante Abschwächung der LTP im ipsilateralen Kortex gezeigt werden (Feldmann et al., 2019). Im Unterschied zu meinen Experimenten wurde dort in direkter Nähe zur Verletzung gemessen, während bei meinen Experimenten keine makroskopische Schädigung des Hippocampus erkennbar war. Im Gegensatz zu meinen Ergebnissen zeigt die Mehrzahl der Experimente an Synapsen des CA1 eine Abschwächung der LTP nach TBI im Hippocampus. So konnte an Hirnschnitten von Ratten und Mäusen eine Abschwächung der LTP in der Akutphase nach SHT (Lecca et al., 2019, Marshall et al., 2017, Wilson et al., 2016, Sun et al., 2015, Albeni et al., 2000) und zu späteren Mess-Zeitpunkten (Schwarzbach et al., 2006, Titus et al., 2013, Titus et al., 2016, Titus et al., 2019) gezeigt werden oder es war nach SHT keine LTP mehr auslösbar. Ähnliche Ergebnisse wurden an organotypischen hippocampalen Zellkulturen gezeigt (Effgen and Morrison, 2017, Vogel et al., 2017). In vivo Experimente konnten an Synapsen zwischen dem Tractus perforans und dem Gyrus dentatus (Mashhadizadeh et al., 2017) und an Synapsen von Schaffer-Kollateralen am CA1 (Miyazaki et al., 1992) eine Abschwächung der LTP nach SHT nachweisen. Im Gegensatz dazu zeigte sich in einem Experiment 7 Tage nach einem geschlossenen SHT keine Veränderung der LTP und nach repetitivem geschlossenen SHT, induziert durch drei CCI, eine Verstärkung der LTP (Logue et al., 2016). In einem Modell einer milden blast-TBI konnte an Ratten weder in der Akutphase noch zu späteren Zeitpunkten eine Veränderung der LTP festgestellt werden (Hernandez et al., 2018). Die Ergebnisse der LTP-Messungen, zusammen mit den Ergebnissen meiner PPR-Messungen, zeigen, dass unser Modell einer milden CCI während der Akutphase nach SHT keinen Einfluss auf die Plastizität des Hippocampus hat.

5.3 Gesteigerte Spontanaktivität ipsi- und kontralateral vs sham

Als Folge eines SHTs erleiden viele Patienten epileptische Anfälle und bei einigen kommt es zur Entwicklung einer posttraumatischen Epilepsie. Die größte Gruppe der PTE-Patienten leidet an einer Temporallappenepilepsie (Hudak et al., 2004), und in Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass ein SHT eine Hippocampusklerose ipsi- und kontralateral auslösen kann (Golarai et al., 2001, Golub and Reddy, 2022a).

In EEG-Untersuchungen konnte an Mäusen nach SHT eine erhöhte Netzwerkaktivität vor dem Einsetzen epileptischer Anfälle gezeigt werden (Bolkvadze and Pitkänen, 2012). In früheren Experimenten unseres Labors zeigte sich eine kortikale gesteigerte Spontanaktivität auch kontralateral zur Verletzung in der Akutphase nach milder CCI (Le Priault et al., 2017, Ihbe et al., 2021). In einem Versuch an Ratten wurde 7 Tage nach moderater CCI eine gesteigerte Spontanaktivität in Pyramidenzellen des ipsilateral zur Verletzung liegenden CA1 gemessen (Karimi et al., 2021). Um herauszufinden, ob unser Modell einer milden CCI 24 bis 48 Stunden nach Verletzungsinduktion ebenfalls die Netzwerkaktivität im CA1 verändert, wurde extrazellulär die Spontanaktivität bestimmt (siehe Kapitel 3.6.4). Die Spontanaktivität wurde sowohl ipsilateral als auch kontralateral im CA1 im Bereich des Stratum pyramidale, somatische Spontanaktivität, und im Bereich des Stratum moleculare, dendritische Spontanaktivität gemessen. Dabei zeigte sich ipsilateral eine signifikant erhöhte somatische Spontanaktivität und kontralateral eine signifikant erhöhte somatische und dendritische Spontanaktivität. Um die Mechanismen besser zu verstehen, die zu dieser gesteigerten Netzwerkaktivität führen, sind weitere Untersuchungen nötig. So könnte mit Hilfe von Patch-Clamp-Untersuchungen das Verhältnis von inhibitorischen zu exzitatorischen Signalen an Pyramidenzellen des CA1 überprüft werden. Es konnte gezeigt werden, dass nach CCI der Zellverlust von Interneuronen im Verhältnis zum Verlust von Pyramidenzellen im Hippocampus besonders hoch ist (Golub and Reddy, 2022a). Außerdem zeigten Untersuchungen an SHT-Patienten eine gesteigerte extrazelluläre Glutamat-Konzentration (Bullock et al., 1998, Vespa et al., 1998). Dies deutet auf eine Verschiebung der Balance von exzitatorischen und inhibitorischen Signalen hin. Eine weitere mögliche Erklärung ist, dass der Anstieg der Netzwerkaktivität im Zusammenhang mit Veränderungen aus anderen Hippocampus-Arealen steht. Es konnte nach CCI ein Pyramidenzellverlust im CA3/2 und der Hilusregion beobachtet werden (Deng and Xu, 2011). Zu den Pyramidenzellen des CA3 ziehen die Moosfasern, Axone von Prinzipalzellen des Gyrus dentatus. Es gibt Hinweise, dass es durch den Verlust der Zielzellen zu einem irregulären Sprießen von Moosfasern kommt, wodurch eine rekurrente exzitatorische Verschaltung entsteht (Webster et al., 2017, Golub and Reddy, 2022b). In einer Untersuchung an Mäusen zeigte sich nach CCI sowohl ein irreguläres Sprießen der Moosfasern als auch eine erhöhte Frequenz von spontanen EPSCs im Gyrus dentatus (Hunt et al., 2010). Da die Pyramidenzellen des CA1 in Verschaltung hinter

dem Gyrus dentatus liegen, könnte sich die gesteigerte Netzwerkaktivität bis dahin weiterleiten.

5.4 Fazit

Um ein Schädelhirntrauma auszulösen, wurde als Methode eine milde CCI verwendet, die besonders zu einer fokalen Zellschädigung führt (siehe Kapitel 2.14). Makroskopisch zeigte sich eine Verletzung, die sich auf den Kortex beschränkte. Es war keine direkte Schädigung des Hippocampus oder des darüberliegenden Corpus callosum sichtbar. In einer früheren Studie unseres Labors mit dem gleichen CCI-Modell beschränkte sich der Zelltod auf die direkte Umgebung der Verletzung im Kortex (Feldmann et al., 2019). Dies schließt eine Schädigung des Hippocampus jedoch nicht aus, da es bei SHTs neben dem direkten Zelluntergang von Neuronen zu axonalen Schädigungen und einem sekundären Hirnschaden kommt (siehe Kapitel 2.1.3). Obwohl ein Trend erkennbar war, der auf einen Anstieg der Astrozytdichte im CA1 hindeutet, war dieser in meinen Experimenten nicht signifikant.

In den elektrophysiologischen Messungen war keine Veränderung der Plastizität messbar. Sowohl die Langzeitplastizität, die in den LTP-Messungen bestimmt wurde, als auch die Kurzzeitplastizität, gemessen mit Hilfe der PPR, war 24 bis 48 Stunden nach CCI unverändert. Dieses Ergebnis widerspricht der Mehrzahl von Studien, die eine Verringerung der Plastizität im CA1 nach SHT zeigten (Wilson et al., 2016, Titus et al., 2019, Cao et al., 2006, Sun et al., 2015, Albensi et al., 2000, Titus et al., 2013). Ein Grund hierfür liegt vermutlich in der geringeren Schädigung des Hippocampus durch unser CCI-Modell.

Einige Patienten entwickeln nach einem SHT eine posttraumatische Epilepsie (siehe Kapitel 2.1.3.1). Da die ersten Symptome oft erst spät auftreten, sind die pathologischen neuronalen Veränderungen nach SHT, die zur Epileptogenese beitragen, von besonderem wissenschaftlichen Interesse, um die Entwicklung zukünftiger Therapien zu ermöglichen. Es konnte in einem Tierversuch eine Übererregbarkeit von Nervenzellen noch vor Auftreten der epileptischen Aktivität festgestellt werden (Bolkvadze and Pitkänen, 2012). Um eine potenzielle Übererregbarkeit nach SHT zu messen, wurden 24 bis 48 Stunden nach CCI Input/Output-Kurven erstellt und die Spontanaktivität im CA1 gemessen.

Im Gegensatz zur Plastizität konnte eine starke Veränderung der Erregbarkeit festgestellt werden. Die synaptische Erregbarkeit, die durch I/O-Kurven bestimmt wurde, war nach CCI sowohl im ipsi- als auch im kontralateralen CA1 deutlich verringert. Gleichzeitig konnte ein Anstieg der Netzwerkaktivität in Spontanaktivitätsmessungen gezeigt werden. Um diese gegensätzliche Veränderung der synaptischen und Netzwerk-Erregbarkeit besser erklären zu können, sind weitere Untersuchungen nötig. Ein möglicher Erklärungsansatz für diese Veränderungen könnte ein Pyramidenzellverlust sein, der nach SHT besonders stark in der Region CA3 beobachtet wurde (Deng and Xu, 2011). Die Axone der Pyramidenzellen haben eine direkte synaptische Verbindung zum CA1, wodurch ein Zellverlust die synaptischen Signale abschwächt. Der Zellverlust im CA3 wird als Ursache für das Sprießen von Moosfasern diskutiert. Ein Sprießen von Moosfasern, verbunden mit einer erhöhten Spontanaktivität im Gyrus dentatus, konnte bereits nach CCI nachgewiesen werden (Golub and Reddy, 2022a, Hunt et al., 2010). Somit ließe sich durch den Zellverlust im CA3 sowohl die gesteigerte Spontanaktivität als auch der Verlust an synaptischer Erregbarkeit erklären. Es sind weitere Experimente nötig, um diese Hypothese zu überprüfen.

6 Zusammenfassung

Schädelhirntraumata sind die häufigste Todesursache junger Menschen. Aus diesem Grund und wegen der chronischen Folgeerkrankungen nach SHT ergibt sich eine hohe gesellschaftliche Relevanz. Die medizinischen Möglichkeiten, auf die Entwicklung dieser Erkrankungen Einfluss zu nehmen, sind bisher noch sehr begrenzt. Ziel meiner Arbeit war es, die pathophysiologischen Veränderungen in der Akutphase nach einem Schädelhirntrauma besser zu verstehen in der Hoffnung zur Entwicklung zukünftiger, verbesserter Behandlungsmöglichkeiten beizutragen.

In meiner Arbeit konzentrierte ich mich auf die Untersuchung von Veränderungen in der Plastizität und Erregbarkeit von Neuronen im Hippocampus, die 24 bis 48 Stunden nach einem Schädelhirntrauma auftreten. Zu diesem Zweck wurde bei Mäusen mittels der etablierten controlled cortical impact (CCI)-Methode ein solches Trauma induziert. Anschließend wurden mit Hilfe eines Multi-Elektroden-Arrays an Hirnschnitten sowohl in der zum Trauma ipsilateral als auch in der kontralateral gelegenen Region CA1, extrazelluläre Feldpotentiale an akuten Hirnschnitten gemessen, um die neuronalen Aktivitäten in diesen Bereichen zu analysieren.

Eine Veränderung der Plastizität konnte nicht festgestellt werden. Sowohl die Messungen der LTP als Parameter der Langzeitplastizität als auch die der Paired Pulse Ratio zur Bestimmung der Kurzzeitplastizität blieben im Vergleich zu den sham-operierten Tieren unverändert. Die Ergebnisse legen nahe, dass ein mildes SHT während der Akutphase keinen Einfluss auf die Plastizität im Hippocampus hat.

In weiteren Experimenten untersuchte ich Veränderungen der Astrozytendichte im CA1 als Hinweis auf eine Entzündungsreaktion. Dazu wurden Astrozyten und Zellkerne mit GFAP- und DAPI-Färbungen sichtbar gemacht und ausgezählt. Eine signifikante Veränderung der Astrozytendichte zeigte sich nicht. Allerdings war ein Trend einer erhöhten Anzahl von Astrozyten sowohl ipsilateral als auch kontralateral zur Verletzung zu erkennen.

Die nicht signifikante Entzündungsreaktion und die unbeeinträchtigte Plastizität ist zurückzuführen auf unser Modell eines milden SHTs.

Zur Bestimmung der synaptischen Erregbarkeit wurden Input/Output-Kurven gemessen. Eine signifikante Abschwächung der synaptischen Erregbarkeit konnte

nach CCI nachgewiesen werden. Von dieser Abschwächung war sowohl der ipsilaterale als auch kontralaterale Hippocampus betroffen.

Um Einblicke in die Netzwerkaktivität zu erhalten, führte ich Messungen der Spontanaktivität durch. Die Ergebnisse offenbarten einen signifikanten Anstieg der Spontanaktivität im CA1 sowohl ipsilateral als auch kontralateral zur Verletzung im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Die gesteigerte Netzwerkaktivität im CA1 und die abgeschwächte synaptische Erregbarkeit zeigen, dass es auch bei milden SHT bereits in der akuten Phase zu Netzwerkveränderungen im Hippocampus kommt. Eine mögliche Erklärung ist ein Pyramidenzellverlust insbesondere in der Region CA3. Um diese Hypothese zu überprüfen sind weitere Experimente nötig. Diese könnten maßgeblich zu einem besseren Verständnis der Entwicklung von Spätfolgen nach einem Schädelhirntrauma beitragen.

7 Literaturverzeichnis

7.1 Literaturverweise

- ALBENSI, B. C., SULLIVAN, P. G., THOMPSON, M. B., SCHEFF, S. W. & MATTSON, M. P. 2000. Cyclosporin ameliorates traumatic brain-injury-induced alterations of hippocampal synaptic plasticity. *Exp Neurol*, 162, 385-9.
- BABAEI, A., EFTEKHAR-VAGHEFI, S. H., ASADI-SHEKAARI, M., SHAHROKHI, N., SOLTANI, S. D., MALEKPOUR-AFSHAR, R. & BASIRI, M. 2015. Melatonin treatment reduces astrogliosis and apoptosis in rats with traumatic brain injury. *Iran J Basic Med Sci*, 18, 867-72.
- BALTACI, S. B., MOGULKOC, R. & BALTACI, A. K. 2019. Molecular Mechanisms of Early and Late LTP. *Neurochem Res*, 44, 281-296.
- BARRÉ-SINOUSSE, F. & MONTAGUTELLI, X. 2015. Animal models are essential to biological research: issues and perspectives. *Future Sci OA*, 1, Fso63.
- BLANCHE, T. J., SPACEK, M. A., HETKE, J. F. & SWINDALE, N. V. 2005. Polytrodes: high-density silicon electrode arrays for large-scale multiunit recording. *J Neurophysiol*, 93, 2987-3000.
- BOLKVADZE, T. & PITKÄNEN, A. 2012. Development of post-traumatic epilepsy after controlled cortical impact and lateral fluid-percussion-induced brain injury in the mouse. *J Neurotrauma*, 29, 789-812.
- BRANDES, R., LANG, F., SCHMIDT, R. F. 2019. Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie. 32. Ausgabe, *Springer Nature Switzerland AG*, pp. 117-120
- BUGAY, V., BOZDEMIR, E., VIGIL, F. A., CHUN, S. H., HOLSTEIN, D. M., ELLIOTT, W. R., SPRAGUE, C. J., CAVAZOS, J. E., ZAMORA, D. O., RULE, G., SHAPIRO, M. S., LECHLEITER, J. D. & BRENNER, R. 2020. A Mouse Model of Repetitive Blast Traumatic Brain Injury Reveals Post-Trauma Seizures and Increased Neuronal Excitability. *J Neurotrauma*, 37, 248-261.

- BULLOCK, R., ZAUNER, A., WOODWARD, J. J., MYSEROS, J., CHOI, S. C., WARD, J. D., MARMAROU, A. & YOUNG, H. F. 1998. Factors affecting excitatory amino acid release following severe human head injury. *J Neurosurg*, 89, 507-18.
- BURRONE, J. & LAGNADO, L. 2000. Synaptic depression and the kinetics of exocytosis in retinal bipolar cells. *J Neurosci*, 20, 568-78.
- CAO, R., HASUO, H., OOBA, S., AKASU, T. & ZHANG, X. 2006. Facilitation of glutamatergic synaptic transmission in hippocampal CA1 area of rats with traumatic brain injury. *Neurosci Lett*, 401, 136-41.
- CAPIZZI, A., WOO, J. & VERDUZCO-GUTIERREZ, M. 2020. Traumatic Brain Injury: An Overview of Epidemiology, Pathophysiology, and Medical Management. *Med Clin North Am*, 104, 213-238.
- CAREY, M. E., SARNA, G. S. & FARRELL, J. B. 1990. Brain edema following an experimental missile wound to the brain. *J Neurotrauma*, 7, 13-20.
- CASTILLO, P. E. 2012. Presynaptic LTP and LTD of excitatory and inhibitory synapses. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4.
- CAVARSAN, C. F., MALHEIROS, J., HAMANI, C., NAJM, I. & COVOLAN, L. 2018. Is Mossy Fiber Sprouting a Potential Therapeutic Target for Epilepsy? *Front Neurol*, 9, 1023.
- CERNAK, I. 2005. Animal models of head trauma. *NeuroRx*, 2, 410-22.
- CHAKRABORTY, N., HAMMAMIEH, R., GAUTAM, A., MILLER, S. A., CONDLIN, M. L., JETT, M. & SCRIMGEOUR, A. G. 2021. TBI weight-drop model with variable impact heights differentially perturbs hippocampus-cerebellum specific transcriptomic profile. *Exp Neurol*, 335, 113516.

- CHEN, C., BLITZ, D. M. & REGEHR, W. G. 2002. Contributions of receptor desensitization and saturation to plasticity at the retinogeniculate synapse. *Neuron*, 33, 779-88.
- CHEN, Y. H., KUO, T. T., YI-KUNG HUANG, E., HOFFER, B. J., CHOU, Y. C., CHIANG, Y. H., MA, H. I. & MILLER, J. P. 2018. Profound deficits in hippocampal synaptic plasticity after traumatic brain injury and seizure is ameliorated by prophylactic levetiracetam. *Oncotarget*, 9, 11515-11527.
- CORSER-JENSEN, C. E., GOODELL, D. J., FREUND, R. K., SERBEDZIJA, P., MURPHY, R. C., FARIAS, S. E., DELL'ACQUA, M. L., FREY, L. C., SERKOVA, N. & HEIDENREICH, K. A. 2014. Blocking leukotriene synthesis attenuates the pathophysiology of traumatic brain injury and associated cognitive deficits. *Exp Neurol*, 256, 7-16.
- DENG, P. & XU, Z. C. 2011. Contribution of Ih to neuronal damage in the hippocampus after traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma*, 28, 1173-83.
- DERKACH, V., BARRIA, A. & SODERLING, T. R. 1999. Ca²⁺/calmodulin-kinase II enhances channel conductance of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 3269-74.
- Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie e.V. (DGNC), S2e-Leitlinie Schädel-Hirn Trauma im Erwachsenenalter (online), Langfassung, 02.12.2015, <https://register.awmf.org/de/leitlinien/detail/008-001> (Zugriff am 10.01.2024)
- DI GIOVANNI, S., MOVSESYAN, V., AHMED, F., CERNAK, I., SCHINELLI, S., STOICA, B. & FADEN, A. I. 2005. Cell cycle inhibition provides neuroprotection and reduces glial proliferation and scar formation after traumatic brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 8333-8.

- EFFGEN, G. B. & MORRISON, B., 3RD 2017. Memantine Reduced Cell Death, Astrogliosis, and Functional Deficits in an in vitro Model of Repetitive Mild Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma*, 34, 934-942.
- FEENEY, D. M., BOYESON, M. G., LINN, R. T., MURRAY, H. M. & DAIL, W. G. 1981. Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat. *Brain Res*, 211, 67-77.
- FELDMANN, L. K., LE PRIEULT, F., FELZEN, V., THAL, S. C., ENGELHARD, K., BEHL, C. & MITTMANN, T. 2019. Proteasome and Autophagy-Mediated Impairment of Late Long-Term Potentiation (l-LTP) after Traumatic Brain Injury in the Somatosensory Cortex of Mice. *Int J Mol Sci*, 20.
- FENG, J. F., ZHAO, X., GURKOFF, G. G., VAN, K. C., SHAHLAIE, K. & LYETH, B. G. 2012. Post-traumatic hypoxia exacerbates neuronal cell death in the hippocampus. *J Neurotrauma*, 29, 1167-79.
- FORDINGTON, S. & MANFORD, M. 2020. A review of seizures and epilepsy following traumatic brain injury. *J Neurol*, 267, 3105-3111.
- FOSTER, K. A., KREITZER, A. C. & REGEHR, W. G. 2002. Interaction of postsynaptic receptor saturation with presynaptic mechanisms produces a reliable synapse. *Neuron*, 36, 1115-26.
- FREY, L. C. 2003. Epidemiology of posttraumatic epilepsy: a critical review. *Epilepsia*, 44, 11-7.
- FRIEDMAN-LEVI, Y., LIRAZ-ZALTSMAN, S., SHEMESH, C., ROSENBLATT, K., KESNER, E. L., GINCBURG, G., CARMICHAEL, S. T., SILVA, A. J. & SHOHAMI, E. 2021. Pharmacological blockers of CCR5 and CXCR4 improve recovery after traumatic brain injury. *Exp Neurol*, 338, 113604.

- GARDNER, R. C., BURKE, J. F., NETTIKSIMMONS, J., GOLDMAN, S., TANNER, C. M. & YAFFE, K. 2015. Traumatic brain injury in later life increases risk for Parkinson disease. *Ann Neurol*, 77, 987-95.
- GARMAN, R. H., JENKINS, L. W., SWITZER, R. C., 3RD, BAUMAN, R. A., TONG, L. C., SWAUGER, P. V., PARKS, S. A., RITZEL, D. V., DIXON, C. E., CLARK, R. S., BAYIR, H., KAGAN, V., JACKSON, E. K. & KOCHANNEK, P. M. 2011. Blast exposure in rats with body shielding is characterized primarily by diffuse axonal injury. *J Neurotrauma*, 28, 947-59.
- GHAJAR, J. 2000. Traumatic brain injury. *The Lancet*, 356, 923-929.
- GOLARAI, G., GREENWOOD, A. C., FEENEY, D. M. & CONNOR, J. A. 2001. Physiological and structural evidence for hippocampal involvement in persistent seizure susceptibility after traumatic brain injury. *J Neurosci*, 21, 8523-37.
- GOLDMAN, S. M., TANNER, C. M., OAKES, D., BHUDHIKANOK, G. S., GUPTA, A. & LANGSTON, J. W. 2006. Head injury and Parkinson's disease risk in twins. *Ann Neurol*, 60, 65-72.
- GOLUB, V. M. & REDDY, D. S. 2022a. Contusion brain damage in mice for modelling of post-traumatic epilepsy with contralateral hippocampus sclerosis: Comprehensive and longitudinal characterization of spontaneous seizures, neuropathology, and neuropsychiatric comorbidities. *Exp Neurol*, 348, 113946.
- GOLUB, V. M. & REDDY, D. S. 2022b. Post-Traumatic Epilepsy and Comorbidities: Advanced Models, Molecular Mechanisms, Biomarkers, and Novel Therapeutic Interventions. *Pharmacol Rev*, 74, 387-438.
- GRAHAM, N. S. N., JOLLY, A., ZIMMERMAN, K., BOURKE, N. J., SCOTT, G., COLE, J. H., SCHOTT, J. M. & SHARP, D. J. 2020. Diffuse axonal injury predicts neurodegeneration after moderate-severe traumatic brain injury. *Brain*, 143, 3685-3698.

- GUBELLINI, P., PISANI, A., CENTONZE, D., BERNARDI, G. & CALABRESI, P. 2004. Metabotropic glutamate receptors and striatal synaptic plasticity: implications for neurological diseases. *Prog Neurobiol*, 74, 271-300.
- HALL, E. D., SULLIVAN, P. G., GIBSON, T. R., PAVEL, K. M., THOMPSON, B. M. & SCHEFF, S. W. 2005. Spatial and temporal characteristics of neurodegeneration after controlled cortical impact in mice: more than a focal brain injury. *J Neurotrauma*, 22, 252-65.
- HAYASHI, Y., SHI, S. H., ESTEBAN, J. A., PICCINI, A., PONCER, J. C. & MALINOW, R. 2000. Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction. *Science*, 287, 2262-7.
- HAZRATI, L. N., TARTAGLIA, M. C., DIAMANDIS, P., DAVIS, K. D., GREEN, R. E., WENBERG, R., WONG, J. C., EZERINS, L. & TATOR, C. H. 2013. Absence of chronic traumatic encephalopathy in retired football players with multiple concussions and neurological symptomatology. *Front Hum Neurosci*, 7, 222.
- HEBB, D. O. 1949. *The organization of behavior; a neuropsychological theory*, Oxford, England, Wiley.
- HERNANDEZ, A., TAN, C., PLATTNER, F., LOGSDON, A. F., POZO, K., YOUSUF, M. A., SINGH, T., TURNER, R. C., LUCKE-WOLD, B. P., HUBER, J. D., ROSEN, C. L. & BIBB, J. A. 2018. Exposure to mild blast forces induces neuropathological effects, neurophysiological deficits and biochemical changes. *Mol Brain*, 11, 64.
- HUANG, P. S., TSAI, P. Y., YANG, L. Y., LECCA, D., LUO, W., KIM, D. S., HOFFER, B. J., CHIANG, Y. H., GREIG, N. H. & WANG, J. Y. 2021. 3,6'-Dithiopomalidomide Ameliorates Hippocampal Neurodegeneration, Microgliosis and Astrogliosis and Improves Cognitive Behaviors in Rats with a Moderate Traumatic Brain Injury. *Int J Mol Sci*, 22.

- HUDAK, A. M., TRIVEDI, K., HARPER, C. R., BOOKER, K., CAESAR, R. R., AGOSTINI, M., VAN NESS, P. C. & DIAZ-ARRASTIA, R. 2004. Evaluation of seizure-like episodes in survivors of moderate and severe traumatic brain injury. *J Head Trauma Rehabil*, 19, 290-5.
- HUNT, R. F., HASELHORST, L. A., SCHOCH, K. M., BACH, E. C., RIOS-PILIER, J., SCHEFF, S. W., SAATMAN, K. E. & SMITH, B. N. 2012. Posttraumatic mossy fiber sprouting is related to the degree of cortical damage in three mouse strains. *Epilepsy Res*, 99, 167-70.
- HUNT, R. F., SCHEFF, S. W. & SMITH, B. N. 2010. Regionally localized recurrent excitation in the dentate gyrus of a cortical contusion model of posttraumatic epilepsy. *J Neurophysiol*, 103, 1490-500.
- IHBE, N., LE PRIEULT, F., WANG, Q., DISTLER, U., SIELAFF, M., TENZER, S., THAL, S. C. & MITTMANN, T. 2021. Adaptive Mechanisms of Somatostatin-Positive Interneurons after Traumatic Brain Injury through a Switch of α Subunits in L-Type Voltage-Gated Calcium Channels. *Cereb Cortex*.
- JIN, W., XU, W., CHEN, J., ZHANG, X., SHI, L. & REN, C. 2016. Adenosine kinase facilitated astrogliosis-induced cortical neuronal death in traumatic brain injury. *J Mol Histol*, 47, 259-71.
- JIN, X., ISHII, H., BAI, Z., ITOKAZU, T. & YAMASHITA, T. 2012. Temporal changes in cell marker expression and cellular infiltration in a controlled cortical impact model in adult male C57BL/6 mice. *PLoS One*, 7, e41892.
- KABU, S., JAFFER, H., PETRO, M., DUDZINSKI, D., STEWART, D., COURTNEY, A., COURTNEY, M. & LABHASETWAR, V. 2015. Blast-Associated Shock Waves Result in Increased Brain Vascular Leakage and Elevated ROS Levels in a Rat Model of Traumatic Brain Injury. *PLoS One*, 10, e0127971.

- KARIMI, S. A., HOSSEINMARDI, N., SAYYAH, M., HAJISOLTANI, R. & JANAHMADI, M. 2021. Enhancement of intrinsic neuronal excitability-mediated by a reduction in hyperpolarization-activated cation current (I_h) in hippocampal CA1 neurons in a rat model of traumatic brain injury. *Hippocampus*, 31, 156-169.
- KARVE, I. P., TAYLOR, J. M. & CRACK, P. J. 2016. The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury. *Br J Pharmacol*, 173, 692-702.
- KHARATISHVILI, I., NISSINEN, J. P., MCINTOSH, T. K. & PITKÄNEN, A. 2006. A model of posttraumatic epilepsy induced by lateral fluid-percussion brain injury in rats. *Neuroscience*, 140, 685-97.
- KIM, J. H., MIN, K. J., SEOL, W., JOU, I. & JOE, E. H. 2010. Astrocytes in injury states rapidly produce anti-inflammatory factors and attenuate microglial inflammatory responses. *J Neurochem*, 115, 1161-71.
- KONDURU, S. S., WALLACE, E. P., PFAMMATTER, J. A., RODRIGUES, P. V., JONES, M. V. & MAGANTI, R. K. 2021. Sleep-wake characteristics in a mouse model of severe traumatic brain injury: Relation to posttraumatic epilepsy. *Epilepsia Open*, 6, 181-194.
- KWAN, P., SCHACHTER, S. C. & BRODIE, M. J. 2011. Drug-resistant epilepsy. *N Engl J Med*, 365, 919-26.
- LARKIN, M., MEYER, R. M., SZUFLITA, N. S., SEVERSON, M. A. & LEVINE, Z. T. 2016. Post-Traumatic, Drug-Resistant Epilepsy and Review of Seizure Control Outcomes from Blinded, Randomized Controlled Trials of Brain Stimulation Treatments for Drug-Resistant Epilepsy. *Cureus*, 8, e744.
- LE PRIEULT, F., THAL, S. C., ENGELHARD, K., IMBROSCI, B. & MITTMANN, T. 2017. Acute Cortical Transhemispheric Diaschisis after Unilateral Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma*, 34, 1097-1110.

- LECCA, D., BADER, M., TWEEDIE, D., HOFFMAN, A. F., JUNG, Y. J., HSUEH, S. C., HOFFER, B. J., BECKER, R. E., PICK, C. G., LUPICA, C. R. & GREIG, N. H. 2019. (-)-Phenserine and the prevention of pre-programmed cell death and neuroinflammation in mild traumatic brain injury and Alzheimer's disease challenged mice. *Neurobiol Dis*, 130, 104528.
- LI M, Z. Z., YU G AND ZHANG J. 2016. Epidemiology of Traumatic Brain Injury over the World: A Systematic Review. *Austin Neurol & Neurosci*. 2016.
- LIGHTHALL, J. W. 1988. Controlled cortical impact: a new experimental brain injury model. *J Neurotrauma*, 5, 1-15.
- LISMAN, J., SCHULMAN, H. & CLINE, H. 2002. The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat Rev Neurosci*, 3, 175-90.
- LOANE, D. J. & KUMAR, A. 2016. Microglia in the TBI brain: The good, the bad, and the dysregulated. *Exp Neurol*, 275 Pt 3, 316-327.
- LOGUE, O. C., CRAMER, N. P., XU, X., PERL, D. P. & GALDZICKI, Z. 2016. Alterations of functional properties of hippocampal networks following repetitive closed-head injury. *Exp Neurol*, 277, 227-243.
- LUCHKINA, N. V. & BOLSHAKOV, V. Y. 2019. Mechanisms of fear learning and extinction: synaptic plasticity–fear memory connection. *Psychopharmacology*, 236, 163-182.
- LUCHE-WOLD, B. P., LOGSDON, A. F., NGUYEN, L., ELTANAHAY, A., TURNER, R. C., BONASSO, P., KNOTTS, C., MOECK, A., MAROON, J. C., BAILES, J. E. & ROSEN, C. L. 2018. Supplements, nutrition, and alternative therapies for the treatment of traumatic brain injury. *Nutr Neurosci*, 21, 79-91.
- LÜSCHER, C. & MALENKA, R. C. 2012. NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4.

- MA, X., ARAVIND, A., PFISTER, B. J., CHANDRA, N. & HAORAH, J. 2019. Animal Models of Traumatic Brain Injury and Assessment of Injury Severity. *Mol Neurobiol*, 56, 5332-5345.
- MAC DONALD, C. L., DIKRANIAN, K., BAYLY, P., HOLTZMAN, D. & BRODY, D. 2007. Diffusion tensor imaging reliably detects experimental traumatic axonal injury and indicates approximate time of injury. *J Neurosci*, 27, 11869-76.
- MAC DONALD, C. L., JOHNSON, A. M., COOPER, D., NELSON, E. C., WERNER, N. J., SHIMONY, J. S., SNYDER, A. Z., RAICHLE, M. E., WITHEROW, J. R., FANG, R., FLAHERTY, S. F. & BRODY, D. L. 2011. Detection of blast-related traumatic brain injury in U.S. military personnel. *N Engl J Med*, 364, 2091-100.
- MANLEY, G., GARDNER, A. J., SCHNEIDER, K. J., GUSKIEWICZ, K. M., BAILES, J., CANTU, R. C., CASTELLANI, R. J., TURNER, M., JORDAN, B. D., RANDOLPH, C., DVOŘÁK, J., HAYDEN, K. A., TATOR, C. H., MCCRORY, P. & IVERSON, G. L. 2017. A systematic review of potential long-term effects of sport-related concussion. *Br J Sports Med*, 51, 969-977.
- MARMAROU, A., FODA, M. A., VAN DEN BRINK, W., CAMPBELL, J., KITA, H. & DEMETRIADOU, K. 1994. A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics. *J Neurosurg*, 80, 291-300.
- MARSHALL, J., SZMYDYNGER-CHODOBSKA, J., RIOULT-PEDOTTI, M. S., LAU, K., CHIN, A. T., KOTLA, S. K. R., TIWARI, R. K., PARANG, K., THRELKELD, S. W. & CHODOBSKI, A. 2017. TrkB-enhancer facilitates functional recovery after traumatic brain injury. *Sci Rep*, 7, 10995.
- MARTLAND, H. S. 1928. PUNCH DRUNK. *Journal of the American Medical Association*, 91, 1103-1107.

- MASHHADIZADEH, S., FARBOOD, Y., DIANAT, M., KHODADADI, A. & SARKAKI, A. 2017. Therapeutic effects of ellagic acid on memory, hippocampus electrophysiology deficits, and elevated TNF- α level in brain due to experimental traumatic brain injury. *Iran J Basic Med Sci*, 20, 399-407.
- MAYER, M. L., WESTBROOK, G. L. & GUTHRIE, P. B. 1984. Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature*, 309, 261-263.
- MCALLISTER, T. W. 2011. Neurobiological consequences of traumatic brain injury. *Dialogues Clin Neurosci*, 13, 287-300.
- MCDALD, J., BRIGGS, C. A., BARRINGTON, N. M., PETERSON, D. A., KOZLOWSKI, D. A. & STUTZMANN, G. E. 2021. Sustained Hippocampal Synaptic Pathophysiology Following Single and Repeated Closed-Head Concussive Impacts. *Front Cell Neurosci*, 15, 652721.
- MEZ, J., DANESHVAR, D. H., KIERNAN, P. T., ABDOLMOHAMMADI, B., ALVAREZ, V. E., HUBER, B. R., ALOSCO, M. L., SOLOMON, T. M., NOWINSKI, C. J., MCHALE, L., CORMIER, K. A., KUBILUS, C. A., MARTIN, B. M., MURPHY, L., BAUGH, C. M., MONTENIGRO, P. H., CHAISSON, C. E., TRIPODIS, Y., KOWALL, N. W., WEUVE, J., MCCLEAN, M. D., CANTU, R. C., GOLDSTEIN, L. E., KATZ, D. I., STERN, R. A., STEIN, T. D. & MCKEE, A. C. 2017. Clinicopathological Evaluation of Chronic Traumatic Encephalopathy in Players of American Football. *Jama*, 318, 360-370.
- MIYAZAKI, S., KATAYAMA, Y., LYETH, B. G., JENKINS, L. W., DEWITT, D. S., GOLDBERG, S. J., NEWLON, P. G. & HAYES, R. L. 1992. Enduring suppression of hippocampal long-term potentiation following traumatic brain injury in rat. *Brain Res*, 585, 335-9.
- NG, S. Y. & LEE, A. Y. W. 2019. Traumatic Brain Injuries: Pathophysiology and Potential Therapeutic Targets. *Front Cell Neurosci*, 13, 528.

- NGUYEN, P. V., ABEL, T. & KANDEL, E. R. 1994. Requirement of a critical period of transcription for induction of a late phase of LTP. *Science*, 265, 1104-7.
- NIKOLAKOPOULOU, A. M., KOEPPEN, J., GARCIA, M., LEISH, J., OBENAU, A. & ETHELL, I. M. 2016. Astrocytic Ephrin-B1 Regulates Synapse Remodeling Following Traumatic Brain Injury. *ASN Neuro*, 8, 1-18.
- NOWAK, L., BREGESTOVSKI, P., ASCHER, P., HERBET, A. & PROCHIANTZ, A. 1984. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature*, 307, 462-5.
- OBIEN, M. E., DELIGKARIS, K., BULLMANN, T., BAKKUM, D. J. & FREY, U. 2014. Revealing neuronal function through microelectrode array recordings. *Front Neurosci*, 8, 423.
- OMALU, B., BAILES, J., HAMILTON, R. L., KAMBOH, M. I., HAMMERS, J., CASE, M. & FITZSIMMONS, R. 2011. Emerging histomorphologic phenotypes of chronic traumatic encephalopathy in American athletes. *Neurosurgery*, 69, 173-83; discussion 183.
- OMALU, B. I., DEKOSKY, S. T., MINSTER, R. L., KAMBOH, M. I., HAMILTON, R. L. & WECHT, C. H. 2005. Chronic traumatic encephalopathy in a National Football League player. *Neurosurgery*, 57, 128-34; discussion 128-34.
- OPAZO, P., LABRECQUE, S., TIGARET, C. M., FROUIN, A., WISEMAN, P. W., DE KONINCK, P. & CHOQUET, D. 2010. CaMKII Triggers the Diffusional Trapping of Surface AMPARs through Phosphorylation of Stargazin. *Neuron*, 67, 239-252.
- PALMER, A. M., MARION, D. W., BOTSCHHELLER, M. L., SWEDLOW, P. E., STYREN, S. D. & DEKOSKY, S. T. 1993. Traumatic brain injury-induced excitotoxicity assessed in a controlled cortical impact model. *J Neurochem*, 61, 2015-24.

- PEETERS, W., VAN DEN BRANDE, R., POLINDER, S., BRAZINOVA, A., STEYERBERG, E. W., LINGSMA, H. F. & MAAS, A. I. 2015. Epidemiology of traumatic brain injury in Europe. *Acta Neurochir (Wien)*, 157, 1683-96.
- PETERSEN, A., SODERSTROM, M., SAHA, B. & SHARMA, P. 2021. Animal models of traumatic brain injury: a review of pathophysiology to biomarkers and treatments. *Exp Brain Res*, 239, 2939-2950.
- PITKÄNEN, A., LUKASIUK, K., DUDEK, F. E. & STALEY, K. J. 2015. Epileptogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 5.
- PLASSMAN, B. L., HAVLIK, R. J., STEFFENS, D. C., HELMS, M. J., NEWMAN, T. N., DROSDICK, D., PHILLIPS, C., GAU, B. A., WELSH-BOHMER, K. A., BURKE, J. R., GURALNIK, J. M. & BREITNER, J. C. 2000. Documented head injury in early adulthood and risk of Alzheimer's disease and other dementias. *Neurology*, 55, 1158-66.
- REEVES, T. M., KAO, C. Q., PHILLIPS, L. L., BULLOCK, M. R. & POVLISHOCK, J. T. 2000. Presynaptic excitability changes following traumatic brain injury in the rat. *J Neurosci Res*, 60, 370-9.
- REEVES, T. M., LYETH, B. G., PHILLIPS, L. L., HAMM, R. J. & POVLISHOCK, J. T. 1997. The effects of traumatic brain injury on inhibition in the hippocampus and dentate gyrus. *Brain Res*, 757, 119-32.
- REGEHR, W. G. 2012. Short-term presynaptic plasticity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4, a005702.
- RICKELS, E., K. VON WILD, P. WENZLAFF AND W.J. BOCK 2006. *Schädel-Hirn-Verletzung - Epidemiologie und Versorgung - Ergebnisse einer prospektiven Studie*. München-Wien-New York, Zuckschwerdt – Verlag.

- ROBEL, S., BARDEHLE, S., LEPIER, A., BRAKEBUSCH, C. & GÖTZ, M. 2011. Genetic deletion of *cdc42* reveals a crucial role for astrocyte recruitment to the injury site in vitro and in vivo. *J Neurosci*, 31, 12471-82.
- ROTHSTEIN, J. D., DYKES-HOBERG, M., PARDO, C. A., BRISTOL, L. A., JIN, L., KUNCL, R. W., KANAI, Y., HEDIGER, M. A., WANG, Y., SCHIELKE, J. P. & WELTY, D. F. 1996. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron*, 16, 675-86.
- RUSSELL, W. M. S. 1959. *The principles of humane experimental technique [by] W.M.S. Russell and R.L. Burch*, London, Methuen.
- SCHARF, M. T., WOO, N. H., LATTAL, K. M., YOUNG, J. Z., NGUYEN, P. V. & ABEL, T. 2002. Protein synthesis is required for the enhancement of long-term potentiation and long-term memory by spaced training. *J Neurophysiol*, 87, 2770-7.
- SCHRÖDER, H., MOSER, N., HUGGENBERGER, S. 2020. Neuroanatomy of the Mouse: An Introduction. 1. Ausgabe, *Springer Nature Switzerland AG*, pp. 45-57, 267-288
- SCHWARZBACH, E., BONISLAWSKI, D. P., XIONG, G. & COHEN, A. S. 2006. Mechanisms underlying the inability to induce area CA1 LTP in the mouse after traumatic brain injury. *Hippocampus*, 16, 541-50.
- SUN, L., GAO, J., ZHAO, M., CUI, J., LI, Y., YANG, X., JING, X. & WU, Z. 2015. A novel cognitive impairment mechanism that astrocytic p-cnxn 43 promotes neuronal autophagy via activation of P2X7R and down-regulation of GLT-1 expression in the hippocampus following traumatic brain injury in rats. *Behav Brain Res*, 291, 315-324.

- SUTULA, T., CASCINO, G., CAVAZOS, J., PARADA, I. & RAMIREZ, L. 1989. Mossy fiber synaptic reorganization in the epileptic human temporal lobe. *Ann Neurol*, 26, 321-30.
- TAKAHASHI, T., FORSYTHE, I. D., TSUJIMOTO, T., BARNES-DAVIES, M. & ONODERA, K. 1996. Presynaptic calcium current modulation by a metabotropic glutamate receptor. *Science*, 274, 594-7.
- TAMAMAKI, N., YANAGAWA, Y., TOMIOKA, R., MIYAZAKI, J., OBATA, K. & KANEKO, T. 2003. Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse. *J Comp Neurol*, 467, 60-79.
- TERRIO, H., BRENNER, L. A., IVINS, B. J., CHO, J. M., HELMICK, K., SCHWAB, K., SCALLY, K., BRETTHAUER, R. & WARDEN, D. 2009. Traumatic brain injury screening: preliminary findings in a US Army Brigade Combat Team. *J Head Trauma Rehabil*, 24, 14-23.
- THAL, S. C., WYSCHKON, S., PIETER, D., ENGELHARD, K. & WERNER, C. 2008. Selection of endogenous control genes for normalization of gene expression analysis after experimental brain trauma in mice. *J Neurotrauma*, 25, 785-94.
- THOMPSON, H. J., MCCORMICK, W. C. & KAGAN, S. H. 2006. Traumatic brain injury in older adults: epidemiology, outcomes, and future implications. *J Am Geriatr Soc*, 54, 1590-5.
- TITUS, D. J., FURONES, C., KANG, Y. & ATKINS, C. M. 2013. Age-dependent alterations in cAMP signaling contribute to synaptic plasticity deficits following traumatic brain injury. *Neuroscience*, 231, 182-94.

- TITUS, D. J., JOHNSTONE, T., JOHNSON, N. H., LONDON, S. H., CHAPALAMADUGU, M., HOGENKAMP, D., GEE, K. W. & ATKINS, C. M. 2019. Positive allosteric modulation of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor as a treatment for cognitive deficits after traumatic brain injury. *PLoS One*, 14, e0223180.
- TITUS, D. J., WILSON, N. M., FREUND, J. E., CARBALLOSA, M. M., SIKAH, K. E., FURONES, C., DIETRICH, W. D., GURNEY, M. E. & ATKINS, C. M. 2016. Chronic Cognitive Dysfunction after Traumatic Brain Injury Is Improved with a Phosphodiesterase 4B Inhibitor. *J Neurosci*, 36, 7095-108.
- TREPEL, M. 2021. Neuroanatomie. Struktur und Funktion. 8. Auflage, Elsevier GmbH, pp. 7-10,109-114. 217-222
- TSUDA, S., HOU, J., NELSON, R. L., WILKIE, Z. J., MUSTAFA, G., SINHAROY, A., WATTS, J. V., THOMPSON, F. J. & BOSE, P. K. 2016. Prolonged hippocampal cell death following closed-head traumatic brain injury in rats. *Neuroreport*, 27, 724-9.
- VESPA, P., PRINS, M., RONNE-ENGSTROM, E., CARON, M., SHALMON, E., HOVDA, D. A., MARTIN, N. A. & BECKER, D. P. 1998. Increase in extracellular glutamate caused by reduced cerebral perfusion pressure and seizures after human traumatic brain injury: a microdialysis study. *J Neurosurg*, 89, 971-82.
- VOGEL, E. W., 3RD, RWEMA, S. H., MEANEY, D. F., BASS, C. R. & MORRISON, B., 3RD 2017. Primary Blast Injury Depressed Hippocampal Long-Term Potentiation through Disruption of Synaptic Proteins. *J Neurotrauma*, 34, 1063-1073.
- VON GERSDORFF, H., SCHNEGGENBURGER, R., WEIS, S. & NEHER, E. 1997. Presynaptic depression at a calyx synapse: the small contribution of metabotropic glutamate receptors. *J Neurosci*, 17, 8137-46.

- WADICHE, J. I. & JAHR, C. E. 2001. Multivesicular Release at Climbing Fiber-Purkinje Cell Synapses. *Neuron*, 32, 301-313.
- WALKER, K. R. & TESCO, G. 2013. Molecular mechanisms of cognitive dysfunction following traumatic brain injury. *Front Aging Neurosci*, 5, 29.
- WARREN, K. M., REEVES, T. M. & PHILLIPS, L. L. 2012. MT5-MMP, ADAM-10, and N-cadherin act in concert to facilitate synapse reorganization after traumatic brain injury. *J Neurotrauma*, 29, 1922-40.
- WATANABE, Y. & WATANABE, T. 2017. Meta-analytic evaluation of the association between head injury and risk of amyotrophic lateral sclerosis. *European Journal of Epidemiology*, 32, 867-879.
- WATSON, C., PAXINOS, G., PUELLES, L. 2012. The mouse nervous system. 1. Ausgabe, *Elsevier GmbH*, pp. 112-136
- WEBSTER, K. M., SUN, M., CRACK, P., O'BRIEN, T. J., SHULTZ, S. R. & SEMPLE, B. D. 2017. Inflammation in epileptogenesis after traumatic brain injury. *J Neuroinflammation*, 14, 10.
- WELSCH, U., KUMMER, W., DELLER, T. 2018. Histologie. Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie. Das Lehrbuch. 5. Auflage, *Elsevier GmbH*, pp. 660-670
- WILSON, N. M., TITUS, D. J., OLIVA, A. A., JR., FURONES, C. & ATKINS, C. M. 2016. Traumatic Brain Injury Upregulates Phosphodiesterase Expression in the Hippocampus. *Front Syst Neurosci*, 10, 5.
- WU, D., BACAJ, T., MORISHITA, W., GOSWAMI, D., ARENDT, K. L., XU, W., CHEN, L., MALENKA, R. C. & SÜDHOF, T. C. 2017. Postsynaptic synaptotagmins mediate AMPA receptor exocytosis during LTP. *Nature*, 544, 316-321.

WU, H., ZHOU, Y. & XIONG, Z. Q. 2007. Transducer of regulated CREB and late phase long-term synaptic potentiation. *Febs j*, 274, 3218-23.

XIONG, Y., MAHMOOD, A. & CHOPP, M. 2013. Animal models of traumatic brain injury. *Nat Rev Neurosci*, 14, 128-42.

XU, D., MO, J., XIE, X. & HU, N. 2021. In-Cell Nanoelectronics: Opening the Door to Intracellular Electrophysiology. *Nanomicro Lett*, 13, 127.

YI, J. H. & HAZELL, A. S. 2006. Excitotoxic mechanisms and the role of astrocytic glutamate transporters in traumatic brain injury. *Neurochem Int*, 48, 394-403.

7.2 **Abbildungsverweise**

Abbildung 1 - 4: SHAH, E. J., GURDZIEL, K. & RUDEN, D. M. 2019. Mammalian Models of Traumatic Brain Injury and a Place for Drosophila in TBI Research. *Frontiers in neuroscience* [Online], 13. Available: <http://europepmc.org/abstract/MED/31105519>
<https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00409>,
<https://europepmc.org/articles/PMC6499071>,
<https://europepmc.org/articles/PMC6499071?pdf=render>
[Accessed 2019].

Abbildung 6: <<http://www.bristol.ac.uk/synaptic/pathways/>> vom 12.08.2022

Abbildung 8: Paxinos, G. and Franklin, K. B. J., 2001 The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, 2nd Edition, Elsevier, 2001

Abbildung 10: <<https://www.multichannelsystems.com/products/microelectrode-arrays/60mea20030ir-ti>> vom 16.07.2022.

Abbildung 11: <<https://www.multichannelsystems.com/products/mea2100-systems#description>>

8 Danksagung

Diese Seite wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

9 Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Tobias Renneißen

Geburtsdatum: 16.12.1995

Geburtsort Saarbücken

Universität

2023 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Note gut (2,0)

2022 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Note gut (2,0)

2019 Beginn des Forschungsprojekt für die medizinische Doktorarbeit (Dr.med.), Institut für Physiologie, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
“Untersuchungen zur synaptischen Plastizität und Spontanaktivität im Hippocampus der Maus in der Akutphase nach unilateralem Schädelhirntrauma (SHT)“

2018 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Note sehr gut (1,0)

2016 – 2023 Studium der Humanmedizin Johannes Gutenberg-Universität, Mainz

Stipendium

10/2018 – 09/2019 MD-PHD-Stipendium FTN (Focus Program Translational Neuroscience)

Medizinische Praktika und Arbeitserfahrung

11/2022 – 10/2023	Praktisches Jahr
11/2022 – 03/2023	Innere Medizin, Uniklinik Mainz
03/2023 – 07/2023	Neurologie, Uniklinik Mainz
07/2023 – 10/2023	Chirurgie, Krankenhaus St. Marienwörth, Bad Kreuznach
03/2021 – 04/2021	Famulatur in der Zentralen Notaufnahme der Uniklinik des Saarlandes
11/2020 – 01/2022	Pflegehelfer Notaufnahme HNO/Auge der Uniklinik Mainz
09/2020 - 10/2020	Famulatur in der Neurologie des Caritas Klinikums Saarbrücken
08/2020 – 09/2020	Famulatur in Hausarztpraxis
03/2020 – 04/2020	Famulatur in der Hepatologie der Uniklinik Mainz
04/2018 – 06/2018	Wissenschaftliche Hilfskraft im Kurs der makroskopischen Anatomie der Johannes Gutenberg-Universität

Schule

08/2002 – 06/2015	Freie Waldorfschule Saarpfalz in Bexbach Abschluss: Abitur Note sehr gut (1,1)
-------------------	---