

Verhaltensbiologische Untersuchungen
über die Langzeitauswirkungen von experimentellem
Schädel-Hirn-Trauma in der Maus

von Bruno Richard Yannick Pöttker

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Verhaltensbiologische Untersuchungen
über die Langzeitauswirkungen von experimentellem
Schädel-Hirn-Trauma in der Maus

von Bruno Richard Yannick Pöttker

aus Siegen

München 2015

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. med. vet. Heidrun Potschka

Angefertigt an der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Klinik für Anästhesiologie

Mentor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Michael K. E. Schäfer

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Potschka

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Kaspar Matiasek

Tag der Promotion: 31. Januar 2015

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG.....	1
II. LITERATURÜBERSICHT	4
1. Schädel-Hirn-Trauma	4
1.1. Epidemiologie	4
1.2. Klinische Bedeutung	4
1.3. Pathophysiologie	5
1.4. Tierexperimentelle Erforschung des Schädel-Hirn-Traumas.....	6
2. Funktionen betroffener Hirnstrukturen	8
2.1. Zentrale Regulation der Motorik.....	8
2.2. Motorkortex	9
2.3. Somatosensibler Kortex	9
2.4. Anatomische Grundlagen des Gedächtnisses.....	10
2.5. Limbisches System	10
2.6. Hippocampus	11
2.7. Amygdala	11
3. Organische psychische Störungen nach Schädel-Hirn-Trauma.....	13
3.1. Psychosyndrom nach Schädel-Hirn-Trauma.....	13
3.2. Angststörung	14
3.3. Schizophrenie.....	14
3.4. Depression.....	15
3.5. Leichte kognitive Störungen	15
4. Epilepsie	17
III. MATERIAL	19
1. Materiallisten.....	19
2. Versuchstiere	25
3. Genehmigung des Tierversuchs	25
IV. METHODEN	26
1. Studienplanung.....	26
1.1. Gruppenbeschreibung	26

1.2. Gruppengrößen/Gesamtfallzahl	26
1.3. Zeitliche Versuchsabfolge.....	27
2. Haltungsbedingungen	28
3. Induktion eines experimentellen Schädel-Hirn-Traumas mit dem Controlled Cortical Impact -Modell	29
3.1. Operationsvorbereitung.....	29
3.2. Operation.....	29
3.2.1. Einleitungen/Narkose.....	29
3.2.2. Controlled Cortical Impact (CCI)	30
3.2.3. Sham.....	31
3.3. Postoperative Beobachtungsphase	31
4. Verhaltensbiologische Untersuchungen.....	32
4.1. Motorische Koordination und Kombinationstests zur allgemeinen Verhaltensbeurteilung	32
4.1.1. Neurological Deficit Score (NDS)	32
4.1.2. Rotarod.....	34
4.1.3. CatWalk® XT	34
4.2. Depressions-ähnliches, Schizophrenie-ähnliches, Angst-assoziiertes und soziales Verhalten	36
4.2.1. Angst-assoziiertes Verhalten, Mobilität und Aktivität	36
4.2.1.1. Elevated Plus Maze (EPM)	36
4.2.1.2. Open Field (OF)	36
4.2.2. Sozialverhalten.....	37
4.2.2.1. Social Interaction (SI) = Crawley Box.....	37
4.2.3. Schizophrenie-ähnliches Verhalten.....	37
4.2.3.1. Prepulse Inhibition of Acoustic Startle Response (PPI)	37
4.2.4. Depressions-ähnliches Verhalten	39
4.2.4.1. Tail Suspension (TS).....	39
4.3. Kognitive Fähigkeiten	39
4.3.1. Morris Water Maze (MWM).....	39
4.3.2. Fear Conditioning (FC).....	40
4.4. Visuelle Wahrnehmung.....	41
4.4.1. Visual Cliff Test.....	41
4.5. Krampfneigung	42

4.5.1. Messung Pentylentetrazol-induzierter Krampfanfälle (PTZ).....	42
5. Tötung und Präparation.....	43
6. Kryosektion.....	44
7. Histologische Färbung und Auswertung.....	45
7.1. Nissl-Färbung	45
7.2. Bestimmung des Schadenvolumens	45
7.3. Iba-1-Färbung.....	46
7.4. Bestimmung der Mikrogliazellaktivierung	47
8. Molekularbiologische Methoden.....	49
8.1. Ribonukleinsäure-Extraktion	49
8.2. cDNA-Synthetisierung	50
8.3. Polymerasekettenreaktion (PCR).....	51
8.4. Quantitative Echtzeit-PCR (real-time PCR)	52
9. Statistische Datenauswertung	54
V. ERGEBNISSE	55
1. Körpergewichtskontrolle.....	56
2. Verhaltensbiologische Untersuchungen.....	58
2.1. Neurological Deficit Score (NDS).....	58
2.1.1. CCI vs. Sham zum frühen Untersuchungszeitpunkt	58
2.1.2. CCI vs. Sham zum späten Untersuchungszeitpunkt	59
2.1.3. Vergleich der Untersuchungszeitpunkte	60
2.2. Rotarod	61
2.2.1. CCI vs. Sham zum frühen Untersuchungszeitpunkt	61
2.2.2. CCI vs. Sham zum späten Untersuchungszeitpunkt	61
2.2.3. Vergleich der Untersuchungszeitpunkte	61
2.3. CatWalk® XT	62
2.3.1. CCI vs. Sham zum frühen Untersuchungszeitpunkt	62
2.3.2. CCI vs. Sham zum späten Untersuchungszeitpunkt	64
2.3.3. Vergleich der Untersuchungszeitpunkte	65
2.4. Elevated Plus Maze (EPM)	66
2.4.1. CCI vs. Sham zum frühen Untersuchungszeitpunkt	66
2.4.2. CCI vs. Sham zum späten Untersuchungszeitpunkt	66

2.4.3. Vergleich der Untersuchungszeitpunkte	66
2.5. Open Field (OF)	68
2.5.1. CCI vs. Sham zum frühen Untersuchungszeitpunkt	68
2.5.2. CCI vs. Sham zum späten Untersuchungszeitpunkt	68
2.5.3. Vergleich der Untersuchungszeitpunkte	68
2.6. Social Interaction (SI) = Crawley Box.....	70
2.6.1. CCI vs. Sham zum frühen Untersuchungszeitpunkt	70
2.6.2. CCI vs. Sham zum späten Untersuchungszeitpunkt	70
2.6.3. Vergleich der Untersuchungszeitpunkte	70
2.7. Prepulse Inhibition of Acoustic Startle Response (PPI)	72
2.7.1. CCI vs. Sham zum frühen und späten Untersuchungszeitpunkt.....	72
2.7.2. Vergleich der Untersuchungszeitpunkte	72
2.8. Tail Suspension (TS).....	73
2.8.1. CCI vs. Sham zum frühen Untersuchungszeitpunkt	73
2.8.2. CCI vs. Sham zum späten Untersuchungszeitpunkt	73
2.8.3. Vergleich der Untersuchungszeitpunkte	73
2.9. Morris Water Maze (MWM).....	74
2.9.1. CCI vs. Sham zum frühen Untersuchungszeitpunkt	74
2.9.2. CCI vs. Sham zum späten Untersuchungszeitpunkt	76
2.9.3. Vergleich der Untersuchungszeitpunkte	78
2.10. Fear Conditioning (FC).....	79
2.10.1. CCI vs. Sham zum frühen Untersuchungszeitpunkt	79
2.10.2. CCI vs. Sham zum späten Untersuchungszeitpunkt	79
2.10.3. Vergleich der Untersuchungszeitpunkte	79
2.11. Visual Cliff Test.....	81
2.11.1. CCI vs. Sham zum späten Untersuchungszeitpunkt	81
2.12. Messung Pentylentetrazol-induzierter Krampfanfälle (PTZ).....	82
2.12.1. CCI vs. Sham zum frühen Untersuchungszeitpunkt	82
2.12.2. CCI vs. Sham zum späten Untersuchungszeitpunkt	82
2.12.3. Vergleich der Untersuchungszeitpunkte	82
3. Histologische Färbung und Auswertung.....	84
3.1. Bestimmung des Schadenvolumens.....	84
3.1.1. CCI vs. Sham zum frühen Untersuchungszeitpunkt	85
3.1.2. CCI vs. Sham zum späten Untersuchungszeitpunkt	85

3.1.3. Vergleich der Untersuchungszeitpunkte	85
3.2. Bestimmung der Mikrogliazellaktivierung	87
3.2.1. CCI vs. Sham zum frühen Untersuchungszeitpunkt	87
3.2.2. CCI vs. Sham zum späten Untersuchungszeitpunkt	88
3.2.3. Vergleich der Untersuchungszeitpunkte	88
4. Molekularbiologische Ergebnisse	89
4.1. Expression des Gens <i>Iilβ</i>	89
4.1.1. CCI vs. Sham zum frühen Untersuchungszeitpunkt	89
4.1.2. CCI vs. Sham zum späten Untersuchungszeitpunkt	89
4.1.3. Vergleich der Untersuchungszeitpunkte	89
4.2. Expression des Gens <i>Iil6</i>	91
4.2.1. CCI vs. Sham zum frühen Untersuchungszeitpunkt	91
4.2.2. CCI vs. Sham zum späten Untersuchungszeitpunkt	91
4.2.3. Vergleich der Untersuchungszeitpunkte	91
4.3. Expression des Gens <i>Gfap</i>	92
4.3.1. CCI vs. Sham zum frühen Untersuchungszeitpunkt	92
4.3.2. CCI vs. Sham zum späten Untersuchungszeitpunkt	92
4.3.3. Vergleich der Untersuchungszeitpunkte	92
4.4. Expression des Gens <i>Lcn2</i>	93
4.4.1. CCI vs. Sham zum frühen Untersuchungszeitpunkt	93
4.4.2. CCI vs. Sham zum späten Untersuchungszeitpunkt	93
4.4.3. Vergleich der Untersuchungszeitpunkte	93
4.5. Expression des Gens <i>Gadd45b</i>	95
4.6. Expression des Gens <i>Gap43</i>	96
4.6.1. CCI vs. Sham zum frühen Untersuchungszeitpunkt	96
4.6.2. CCI vs. Sham zum späten Untersuchungszeitpunkt	96
4.6.3. Vergleich der Untersuchungszeitpunkte	96
4.7. Expression des Gens <i>Llcam</i>	97
4.7.1. CCI vs. Sham zum frühen Untersuchungszeitpunkt	97
4.7.2. CCI vs. Sham zum späten Untersuchungszeitpunkt	97
4.7.3. Vergleich der Untersuchungszeitpunkte	97
4.8. Expression des Gens <i>Argl</i>	98
4.8.1. CCI vs. Sham zum frühen Untersuchungszeitpunkt	98
4.8.2. CCI vs. Sham zum späten Untersuchungszeitpunkt	98

4.8.3. Vergleich der Untersuchungszeitpunkte	98
VI. DISKUSSION.....	99
1. Körpergewichtskontrolle.....	99
2. Verhaltensbiologische Untersuchungen.....	100
2.1. Motorische Koordination und Kombinationstests zur allgemeinen Verhaltensbeurteilung	100
2.1.1. Neurological Deficit Score (NDS)	100
2.1.2. Rotarod.....	100
2.1.3. CatWalk® XT	101
2.1.4. Schlussfolgerung: Motorische Koordination	102
2.2. Depressions-ähnliches, Schizophrenie-ähnliches, Angst-assoziiertes und soziales Verhalten	103
2.2.1. Elevated Plus Maze (EPM)	103
2.2.2. Open Field (OF)	103
2.2.3. Social Interaction (SI) = Crawley Box.....	104
2.2.4. Prepulse Inhibition of Acoustic Startle Response (PPI)	105
2.2.5. Tail Suspension (TS).....	105
2.2.6. Schlussfolgerung: Depressions-ähnliches, Schizophrenie-ähnliches, Angst- assoziiertes und soziales Verhalten.....	106
2.3. Kognitive Fähigkeiten.....	107
2.3.1. Morris Water Maze (MWM).....	107
2.3.2. Fear Conditioning (FC).....	108
2.3.3. Schlussfolgerung: Kognitive Fähigkeiten	109
2.4. Visuelle Wahrnehmung.....	110
2.4.1. Visual Cliff Test.....	110
2.5. Krampfneigung	110
2.5.1. Messung Pentylentetrazol-induzierter Krampfanfälle (PTZ).....	110
3. Histologische Färbung und Auswertung.....	112
3.1. Bestimmung des Schadenvolumens.....	112
3.2. Bestimmung der Mikrogliazellaktivierung	112
4. Molekularbiologische Genexpression.....	114
4.1. Inflammationsmarker	114
4.1.1. <i>Il1β</i>	114

4.1.2. <i>Il6</i>	114
4.2. Astrozytenmarker	115
4.2.1. <i>Gfap</i>	115
4.2.2. <i>Lcn2</i>	116
4.3. Plastizitätsmarker	117
4.3.1. <i>Gadd45b</i>	117
4.4. Marker für Neuritenwachstum	118
4.4.1. <i>Gap43</i>	118
4.4.2. <i>L1cam</i>	118
4.5. Mikroglia marker	119
4.5.1. <i>Arg1</i>	119
5. Übergreifender Vergleich der Ergebnisse mit vorhandenen Erkenntnissen	121
6. Validitätsbeurteilung der angewandten Methoden	124
VII. ZUSAMMENFASSUNG	126
VIII. SUMMARY	129
IX. ANHANG	131
1. Abbildungsverzeichnis	131
2. Tabellenverzeichnis	134
3. Literaturverzeichnis	135
X. DANKSAGUNG	177

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
allg.	allgemein
AM	arithmetisches Mittel
ANOVA	Analysis of Variance
ARG1	Arginase 1
Aqua dest.	Aqua destillata (gereinigtes Wasser)
a.u.	arbitrary unit (willkürliche Einheit)
AUC	Area under the curve
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
c	Konzentration
ca.	circa
C57Bl/6N	Black 6 N (Mausstamm)
CCI	Controlled-Cortical-Impact
cDNA	komplementäre DNA
CH	Schweiz
cm	Zentimeter
CP	Crossing Point
d	Tag/e
DK	Dänemark
FC	Fear Conditioning Test
DAB	Diaminobenzidin
dB	Dezibel

DE	Deutschland
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EPM	Elevated Plus Maze Test
g	Gramm
GADD45b	Growth arrest and DNA damage-inducible 45 β Protein
GAP43	Growth Associated Protein 43
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GCS	Glasgow Coma Scale
h	Stunde/n
Iba-1	Ionized calcium binding adaptor molecule 1
ICD	International statistical classification of diseases and related health problems
i.d.R.	in der Regel
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL6	Interleukin-6
Iqa	Interquartilsabstand
LCN2	Lipocalin-2
lx	Lux
L1CAM	Cell adhesion molecule L1
m	Meter
min	Minuten
ml	Milliliter
ms	Millisekunden
max	maximal
Md	Median

MRT	Magnetresonanztomographie
MWM	Morris Water Maze Test
NDS	Neurological deficit score
NGS	Normal goat serum
NL	Niederlande
nm	Nanometer
OF	Open Field Test
OP	Operation
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PBST	phosphatgepufferte Salzlösung mit Triton X
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PPI	PrePulse Inhibition Test
PPIA	Peptidylprolyl Isomerase A (Cyclophilin A)
PTZ	Pentylentetrazol
PVC	Polyvinylchlorid
qPCR	Quantitative Echtzeit- Polymerase Kettenreaktion
rpm	revolutions per minute
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	Region of interest (Bereich von Interesse)
U/min	Umdrehungen pro Minute
s. c.	sub cutan
s	Sekunden
SEM	Standard error of mean
Sham	scheinoperiert

SHT	Schädel-Hirn-Trauma
SI	Social Interaction Test
t	Zeit
TST	Tail Suspension Test
u. a.	unter anderem
UK	Vereinigtes Königreich
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
VC	Visual Cliff Test
Vol.	Volumen
vs.	versus
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentrales Nervensystem
µl	Mikroliter

I. EINLEITUNG

Das Schädel-Hirn-Trauma (SHT) als häufige Unfallfolge beim Menschen ist durch hohe Morbidität und Mortalität (1-3) gekennzeichnet, verbunden mit langfristigen Folgen für den einzelnen Patienten (4-6) sowie von gesamtgesellschaftlicher (7) und globaler Bedeutung (8). Auch in der veterinärmedizinischen Praxis werden regelmäßig an einem SHT leidende Tiere vorgestellt (9, 10).

Da die Pathogenese dieser Erkrankung nur unvollständig bekannt und die therapeutische Einflussnahme auf den Krankheitsverlauf noch begrenzt ist, nimmt ihre grundlegende Erforschung eine wesentliche Rolle innerhalb der gegenwärtigen medizinischen Forschung ein (11, 12). Das gilt insbesondere für langfristige SHT-Konsequenzen (13). Aufgrund der Komplexität des betroffenen Organs und der vielfältigen Folgen eines SHT sind dabei Experimente an lebenden Versuchstieren unverzichtbar (14-18). Trotz der Dauerhaftigkeit der klinischen Folgen beschäftigt sich ein Großteil der tierexperimentellen Forschung bisher mit den kurzfristigen Konsequenzen eines SHT (19). Im Jahr 2013 untersuchte eine Studie 314 experimentelle Publikationen zum SHT beim Labornager. Nur bei 10 % dieser Studien wurde eine Untersuchung der funktionellen Folgen nach zwei Monaten oder mehr durchgeführt (20). Aus diesem Grund besteht trotz eines erhöhten zeitlichen und finanziellen Aufwands ein besonderes Interesse an der Erforschung von SHT-Langzeitauswirkungen im Tierversuch (19).

Das SHT stellt Ärzte seit jeher (21) vor therapeutische Schwierigkeiten, ein Rückgang seiner klinischen Bedeutung ist nicht absehbar (8, 22). Hauptbetroffene dieses Krankheitsbildes sind junge männliche Erwachsene als Folge von Verkehrs-, Sport- und Arbeitsunfällen oder Gewaltverbrechen, wobei unabhängig von Alter und Geschlecht jede(r) Leidtragende(r) eines SHT werden kann (2, 23).

Abgesehen von einer hohen Mortalität treten beim Menschen langfristige motorische Koordinationsstörungen, kognitive Defizite, Krampfleiden und Persönlichkeitsstörungen auf (24-26). Deshalb wird die Lebensqualität der Betroffenen dauerhaft als stark reduziert wahrgenommen (26, 27). Zudem wird die Ausprägung einer Reihe neuropsychiatrischer Erkrankungen durch ein SHT

begünstigt (28). Eine lang andauernde Behandlung verbunden mit hohen finanziellen Kosten ist dabei häufig unvermeidbar (29).

Beim Tier als Patient der tiermedizinischen Praxis betrifft die Ätiologie des SHT eine Vielzahl von Unfällen wie Zusammenstöße mit Fahrzeugen oder Biss-, Schuss- und Sturzverletzungen (16, 30). Das Spektrum der betroffenen Spezies umfasst dabei alle domestizierten Tierarten. Ausführlich dokumentierte Beispiele aus der kurativen Praxis finden sich für den Hund (31-33), die Katze (34-36) und das Pferd (37, 38). Für den Tierbesitzer sind Krampfleiden und motorische Defizite, die die Leistungsfähigkeit des Tiers einschränken und sogar Grund für eine Euthanasie werden können, vermutlich die schwerwiegendsten Konsequenzen eines SHT (9, 39). Auch kognitive, neuropsychiatrische und auf das Sozialverhalten bezogene Folgen können bei Haustieren nicht ausgeschlossen werden. Sie dürften für den Tierbesitzer aber weniger deutlich erkennbar sein und werden daher nur selten diagnostiziert. Die veterinärmedizinische Behandlung orientiert sich zu großen Teilen an humanmedizinischen Therapiekonzepten und basiert wie diese auf tierexperimentellen Erkenntnissen sowie klinischen Studien (9).

Ein Großteil der tierexperimentellen Modelle zum SHT wurde an Labornagern entwickelt (14-17). Aber auch größere Spezies wie das Schwein eignen sich für klinisch relevante Forschung (40, 41). Im Zusammenhang mit der Untersuchung von Krampfleiden wird derzeit auch die Eignung des Hundes als Versuchstier diskutiert (42, 43). Eine Reihe von Studien beschäftigt sich mit Kopfverletzungen und dem SHT bei Wiederkäuern, wobei die tierschutzgerechte Tötung zur Fleischproduktion im Zentrum steht (44, 45). Unabhängig von der Tierart und dem Forschungsschwerpunkt gilt für alle tierexperimentellen Untersuchungen das 3R-Prinzip (46). Das dort beschriebene Ziel, die Zahl und Belastung der Versuchstiere zu minimieren, ist für Tierärzte, die im Versuchstierbereich tätig sind, von zentraler Bedeutung.

Ziel dieser Studie ist eine verhaltensbiologische Charakterisierung von Langzeitauswirkungen eines SHT im Mausmodell. Die breitgefächerte Testauswahl berücksichtigt einen Großteil der klinisch relevanten Krankheitsbilder nach einem SHT und soll die prognostische Beurteilung dieser Erkrankungen in der Praxis verbessern. Dabei soll festgestellt werden, welche der etablierten Testverfahren zur Validierung eines SHT sich nach mehreren Monaten

eigenen, um so eine Grundlage für die Etablierung und Beurteilung langfristiger Therapiekonzepte nach SHT im Mausmodell zu schaffen. Die beobachteten Ergebnisse sollen dabei eine zielgerichtete Methodenauswahl fördern und dadurch die Zahl benötigter Versuchstiere bei zukünftigen Untersuchungen minimieren helfen.

Untersuchte Verhaltensmuster sind: motorische Koordination, Krampfleiden, kognitive Defizite, Depressions-ähnliches, Schizophrenie-ähnliches, Angst-assoziiertes und soziales Verhalten, was durch histologische und molekularbiologische Analysen des Schadens ergänzt wird. Alle Parameter werden zunächst wenige Wochen und später ca. sieben Monate nach einem experimentellen SHT untersucht.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Schädel-Hirn-Trauma

Das SHT ist die Folge von äußerer Krafteinwirkung auf den Kopf mit Verletzungen an den Weichteilen des Kopfes, dem Schädel und dem Gehirn. Anhand der Art der Krafteinwirkung und der Verletzungen kann das SHT klassifiziert werden. Beispielsweise unterscheiden sich SHT durch einen mechanischen Aufprall von solchen, deren Ursprung in hohen Trägheitskräften (Beschleunigung, Bremsung) liegt. Zudem werden offene Verletzungen von geschlossenen abgegrenzt. Unabhängig von Art und Schweregrad des SHT liegt bei allen eine Schädigung des Gehirngewebes vor (47).

1.1. Epidemiologie

Ausgelöst wird das SHT meist durch Verkehrs-, Sport- und Arbeitsunfälle sowie Gewaltverbrechen. Es weist weltweit eine hohe Morbidität und Mortalität auf und betrifft Patienten beider Geschlechter sowie aller Altersgruppen (1-3, 8). Eine regionale multizentrische Studie zur Epidemiologie in Deutschland weist eine Inzidenz von 332 pro 100.000 Einwohner pro Jahr auf, eine Schweregradverteilung von 91 % (leichtes SHT) zu 9 % (mittleres und schweres SHT) und eine Geschlechterverteilung von 58 % (männlich) zu 42 % (weiblich) (48). Dabei muss beachtet werden, dass aufgrund fehlender Symptomatik nach leichten SHT und dadurch ausbleibender ärztlicher Versorgung die Inzidenz mutmaßlich höher liegt als es solche klinischen Studien ermitteln können (47).

1.2. Klinische Bedeutung

In Abhängigkeit vom Schweregrad zeigen Patienten im Anschluss an ein SHT Kopfschmerzen, Übelkeit, Schwindel und Bewusstseinstörungen bis hin zu Bewusstlosigkeit, Krampfanfällen und dem Ausfall der Vitalfunktionen (49). Auch bei Überleben des SHT und nach Abklingen der akuten Symptome leiden viele Betroffene an den Spätfolgen des zentralnervösen Schadens. Dieser kann zu langfristigen motorischen Koordinationsstörungen, kognitiven Defiziten,

Krampfleiden, Persönlichkeitsstörungen sowie einer erhöhten Inzidenz für psychiatrische und neurodegenerative Erkrankungen führen (18, 27, 50).

Zur Einschätzung des Schweregrades des SHT und der damit zusammenhängenden Hirnfunktionsstörung hat sich der Glasgow Coma Scale (GCS) durchgesetzt. Er ermöglicht eine standardisierte Bewertung der Aspekte Augenöffnung, verbale Kommunikation und motorische Reaktion (51). Zur Abschätzung der intrakraniellen Verletzungen können ergänzend bildgebende Diagnoseverfahren wie die Computertomographie, Röntgenaufnahmen und die Magnetresonanztomographie eingesetzt werden.

Bestreben der Therapie nach einem SHT ist eine Begrenzung des sekundären Hirnschadens mit dem Ziel, dem funktionsgeschädigten, aber nicht zerstörten Gewebe des ZNS beste Voraussetzungen zur Regeneration zu geben. Besondere Bedeutung hat dabei die Senkung des intrakraniellen Drucks, welche unter anderem durch Osmodiuretikagabe, Oberkörperhochlagerung, Sedierung, Hypothermie, Verabreichung hypertoner Kochsalzlösung und kurzzeitige Hyperventilation erreicht werden kann. Raumfordernde Verletzungen im Gehirn (Impressionsfrakturen, intrakranielle Blutungen) können dabei operativ durch eine Entlastungskraniektomie versorgt werden (52). Die antibiotische Therapie offener SHT und eine antikonvulsive Behandlung nach Auftreten von Krämpfen werden ebenfalls empfohlen (49).

1.3. Pathophysiologie

Die Verletzung des Gehirns beim und nach dem SHT lässt sich in einen primären und einen sekundären Hirnschaden gliedern. Die primäre Läsion ist gekennzeichnet durch die erste Zerstörung von Nervengewebe und Gefäßen als direkte Folge der Gewalteinwirkung in der betroffenen Gehirnregion. Das dabei verletzte Hirngewebe ist zu großen Teilen irreversibel geschädigt und für keine Therapie zugänglich (53). Lediglich präventive Maßnahmen zum Schutz des Kopfes im Augenblick der Gewalteinwirkung können das Ausmaß des primären Hirnschadens verringern.

Die primäre Schädigung ist Ausgangspunkt für eine Reihe von Reaktionen, welche Sekundärläsionen des Nervengewebes hervorrufen. Die zugrundeliegenden Prozesse beginnen direkt nach dem SHT und können über

mehrere Wochen Einfluss auf das ZNS nehmen (12, 52). Die Therapie des SHT strebt eine Reduzierung dieser Vorgänge an (53). Ein zentraler Mechanismus der sekundären Hirnschädigung ist eine Schwellung des Gehirns, in dessen Folge der intrakranielle Druck aufgrund der begrenzten Ausbreitungsmöglichkeit des Gehirns in der Schädelhöhle ansteigt (54). Weiterhin führt dieser Prozess zu einer nachlassenden zerebralen Blutperfusion (55), welche eine Ischämie und Hypoxie im betroffenen Hirngewebe bedingt. Die dadurch verursachte Laktatanhäufung und anaerobe Glykolyse führt letztlich zur Bildung eines Ödems um die Primärläsion (53). Zusätzlich können Einblutungen in des Gewebe zur Bildung eines intrakraniellen Hämatoms, weiterem Druckanstieg in der Schädelhöhle und zusätzlicher Gehirnkompensation führen (56). Der Großteil der therapeutischen Maßnahmen in den ersten Stunden und Tagen nach einem SHT strebt eine Senkung des intrakraniellen Blutdrucks an.

1.4. Tierexperimentelle Erforschung des Schädel-Hirn-Traumas

Die Komplexität und Verschiedenartigkeit des SHT macht tierexperimentelle Forschung zur Entwicklung neuer erfolgversprechender Therapiemethoden unverzichtbar (14-18). Beispielhaft für den Versuch, die Gehirnfunktionen anhand von Computermodellen ohne den Einsatz von Tieren zu untersuchen, ist das Blue Brain-Projekt, welches auf dem Konzept der computerbasierten Simulation eines neuronalen Netzes basiert und in Zukunft die Funktion eines Nagergehirns imitieren soll (57). Solche Ansätze zu Ersatzmethoden für tierexperimentelle Modelle haben jedoch noch nicht den nötigen Entwicklungsstand erreicht, um Tierversuche zu ersetzen.

Labornager sind die bevorzugten Spezies zur Erforschung des SHT in der tierexperimentellen Forschung. Ausnahmen bilden Untersuchungen am Schwein (40, 41) und an Wiederkäuern, wobei bei letztgenannten die tierschutzgerechte Tötung zur Fleischproduktion im Zentrum des Interesses steht (44, 45). Hinsichtlich der vielseitigen Auslöser der Gewalteinwirkung auf den Kopf wurden mehrere SHT-Modelle beim Labornager entwickelt. Häufig eingesetzt wird das *Controlled Cortical Impact*-Modell (CCI, Bolzeneinschlag nach Kraniotomie), das *Fluid Percussion*-Modell (Flüssigkeitsimpuls nach Kraniotomie), das *Weight Drop*-Modell (Aufprall eines fallenden Gewichts mit

oder ohne Kraniotomie), das *Penetrating Ballistic-like Brain Injury*-Modell (Eindringen einer Sonde, die im Gehirn verbleibt, mit oder ohne Kraniotomie), das *Blast Injury*-Modell (Luftdruckwelle trifft auf den geschlossenen Schädel auf) und das *Cortical Cryolesion*-Modell (punktuelle Erfrierung am geschlossenen Schädel) (19, 20, 58). Das für diese Studie ausgewählte CCI-Modell ist gut reproduzierbar und vergleichbar mit einem offenen SHT, ausgelöst durch die mechanische Krafteinwirkung eines festen Körpers, wie man es z.B. nach Sport- oder Verkehrsunfällen antrifft.

2. Funktionen betroffener Hirnstrukturen

Die in diesem Kapitel vorgestellten Informationen stammen überwiegend aus einem humanmedizinischen Standardlehrbuch (59) und treffen daher in erster Linie auf den Menschen zu. In ihren Grundsätzen lassen sich die funktionellen neuroanatomischen Prinzipien jedoch auf die meisten Säugetiere übertragen. Zumal ein Teil der humanmedizinischen Erkenntnisse aus tierexperimentellen Untersuchungen stammen (z.B (60-62)).

2.1. Zentrale Regulation der Motorik

Das Zustandekommen einer willkürlichen Bewegung bei Säugetieren findet seinen Ursprung zu großen Teilen im limbischen System, welches die Bewegungsimpulse auf drei unterschiedlichen Wegen zum Thalamus und von dort zum Motorkortex weitergibt. Der erste Weg ist eine direkte Verbindung zum Thalamus zur Bewegungsinitiation. Ob und in welcher Form daraus eine Bewegung entsteht, ist von den beiden weiteren bewegungsmodulierenden Übertragungswegen abhängig. Der eine dieser modulierenden Wege wird im Kleinhirn verschaltet und führt zur Feinabstimmung des Bewegungsimpulses. Beim letzten Weg dagegen kommt es zu einer Verschaltung in den Basalganglien (subkortikale Kerngebiete, die funktionell dem motorischen System zuzuordnen sind, primär Striatum und Pallidum), welche hemmende bzw. permissive Einflüsse auf die Weitergabe der Information nehmen. Nach der Integration der Impulse aus allen drei Wegen im Thalamus wird ein zentraler Reiz an den Motorkortex weitergeleitet. Hier gelegene zentrale Motoneurone leiten die Impulse über Pyramiden und extrapyramidale Bahnen in das Rückenmark weiter, wo eine abschließende Innervation auf untere Motoneuronen stattfindet, bevor der Bewegungsimpuls die motorischen Endplatten erreicht. Je nach Spezies kreuzen 50 – 90 % der motorischen Axone im Hirnstamm auf die contralaterale Seite, so dass einseitige Hirnverletzung vornehmlich zu motorischen Defiziten, auf der contralateralen Seite führen.

2.2. Motorkortex

Der Motorkortex, auch somatomotorische Rinde, ist die letzte Station der oben beschriebenen zentralnervösen Verarbeitung willkürlicher Bewegungen im Gehirn. Er erhält mit seinen afferenten Fasern Bewegungsimpulse vom Thalamus und leitet diese über efferente Verbindungen weiter an die Ausführungsorgane. Er weist eine somatotopische Gliederung auf, so dass alle versorgten Körperteile auf klar begrenzten Arealen des Motorkortex repräsentiert sind. Dabei ist zu beachten, dass die unteren Extremitäten ihre motorische Innervation von der Medialseite nahe dem Interhemisphärenspalt, erhalten. Da die efferenten Fasern wie oben beschrieben im Hirnstamm großteils zur contralateralen Seite ziehen, führen Schäden des Nervengewebes in diesem Bereich des Motorkortex zu einer contralateralen Funktionsstörung des Bewegungsapparats und letztlich zu Defiziten der Feinmotorik. Bei diesen contralateralen Defiziten handelt es sich meist um schlaffe Paresen (= unvollständige Lähmungen), da keine Bewegungsimpulse von betroffenen Bereichen des Motorkortex mehr weitergeleitet werden können.

2.3. Somatosensibler Kortex

Kaudal an den Motorkortex schließt sich die somatosensible Rinde an. Sie weist wie die motorischen Rindenareale eine somatotopische Gliederung der contralateralen Körperseite auf. Die hier endenden afferenten somatosensiblen Fasern leiten Impulse aus der Haut, propriozeptiven Wahrnehmungsorganen wie Muskelspindeln, Gelenk- und Sehnenrezeptoren aus der Peripherie in das ZNS. Somit ist dieses Kortexareal essentiell an der feinen Temperatur- und Tastempfindung sowie der Propriozeption des Bewegungsapparats beteiligt. Aus diesem Grund führen Läsionen dieses Bereichs zu Einschränkungen der Empfindung von Berührung, Druck, Schmerz und Temperatur auf der contralateralen Körperhälfte. Der Verlust der fein lokalisierten Wahrnehmung und Propriozeption im Bewegungsapparat kann dabei motorische Koordinationsdefizite bewirken bzw. verstärken. Die somatosensiblen Kortexareale sind zudem über zahlreiche Kommunikationsfasern mit anderen kortikalen Arealen, unter anderem dem Motorkortex, verbunden.

2.4. Anatomische Grundlagen des Gedächtnisses

Gedächtnisleistungen des Menschen lassen sich anhand der Zeitspanne der erlernten Inhalte in ein Kurz- (Sekunde bis Minuten) und ein Langzeitgedächtnis (Jahre bis Jahrzehnte) unterteilen. Während am Kurzzeitgedächtnis primär der präfrontale Kortex beteiligt ist, scheint das Langzeitgedächtnis eine Leistung der gesamten Großhirnrinde zu sein. Das Erlernen im engeren Sinne, die Gedächtniskonsolidierung, ist das Überführen von Gedächtnisinhalten vom Kurz- in das Langzeitgedächtnis. Dabei können explizite (Fakten, sachliche Zusammenhänge) von impliziten (Handlungsabläufe, Motorik, Emotionen) Inhalten unterschieden werden. Für die folgende Studie ist besonders wichtig, dass das Erlernen räumlicher Gegebenheiten zu den expliziten Gedächtnisinhalten zählt und der Hippocampus zentral daran beteiligt ist. Läsionen des Hippocampus führen daher zu erheblichen Defiziten der Merkfähigkeit ohne Beeinflussung des Kurz- oder Langzeitgedächtnisses. Demgegenüber wird beim Erlernen der klassischen Konditionierung als emotionalem Gedächtnisinhalt der Amygdala (Corpus amygdaloideum) eine zentrale Rolle zugeschrieben, mit entsprechenden Defiziten nach Läsionen in diesem Bereich. Motorisches Lernen im Sinne von Geschicklichkeit wird hingegen primär vom Kleinhirn geleistet.

2.5. Limbisches System

Ursprünglich wurde der Begriff limbisches System für Gehirnareale verwendet, die eine Übergangszone zwischen Neokortex und Hirnstamm bilden. Mit der Zeit entwickelte sich daraus jedoch eine Definition, welche weniger auf die topographische Lage der beteiligten Strukturen eingeht, als vielmehr mehrere funktionell miteinander verbundene Regionen beschreibt. Meist werden der Hippocampus, der Gyrus cinguli, der Gyrus parahippocampalis, die Amygdala und der Corpus mamillaria als anatomische zentralnervöse Strukturen zum limbischen System gezählt. Ihm wird eine Schlüsselrolle bei der Entstehung von Gefühlen, Trieben und zahlreichen intellektuellen Leistungen zugeschrieben. Jedoch ist das Zustandekommen von Gefühlen und intellektuellen Leistungen so komplex, dass es nicht möglich ist, es in wenigen neuroanatomischen Strukturen zu lokalisieren. Das limbische System ist jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit für das reibungslose Funktionieren zahlreicher emotionaler, vegetativer und intellektueller Prozesse unverzichtbar.

2.6. Hippocampus

Der Hippocampus liegt im Schläfenlappen an der Medialwand des Seitenventrikels und somit in direktem Kontakt zu motorischen und somatosensiblen Kortexarealen. Dabei nimmt er eine gebogene dreidimensionale Form in beiden Hemisphären an. In einem frontalen Querschnitt hat der Hippocampus ein typisch eingerolltes dreischichtiges Aussehen. Es lassen sich von distal nach proximal der Gyrus dentatus, das Cornu ammonis und das Subiculum unterscheiden. Weiterhin wird das Cornu ammonis histologisch aufgrund unterschiedlicher morphologischer Zelltypen in die Felder CA1 bis CA4 aufgeteilt.

Afferente Fasern erhält der Hippocampus vom medial von ihm gelegenen Gyrus parahippocampalis. In dieser Struktur konvergieren Impulse aus dem Riechhirn, der Amygdala und dem Neokortex. Sie enthalten visuelle, somatosensible, auditorische und olfaktorische Informationen. Efferenzen ziehen zu den Corpora mamillaria und geben dabei Fasern an das Septum, die Amygdala und den Hypothalamus ab. Somit ist der Hippocampus am Papez-Neuronenkreis beteiligt, dem eine zentrale Rolle bei der Überführung von Erlerntem vom Kurzzeit- in das Langzeitgedächtnis zugeschrieben wird. Aus diesem Grund führen Läsionen des Hippocampus zu Defiziten der Gedächtnisbildung bzw. der Merkfähigkeit bis hin zum völligen Verlust der räumlichen und zeitlichen Orientierung. Weiterhin können Störungen des Nervengewebes im Hippocampus zu unkoordinierter Nervenzellaktivität und Spontanentladungen an Neuronen führen, was charakteristische epileptische Anfälle zur Folge hat. Auch bei der Ausbildung psychiatrischer Erkrankungen scheint der Hippocampus ursächlich beteiligt zu sein, da bei schweren Formen der Schizophrenie mit Halluzinationen und Wahnvorstellungen eine Verminderung glutamaterger Neuronen in dieser Struktur beobachtet wurde.

2.7. Amygdala

Die Amygdala (Corpus amygdaloideum) besteht aus mehreren Kernen und ist rostral im Temporallappen lokalisiert. Als Teil des limbischen Systems ist sie sowohl durch afferente als auch durch efferente Fasern mit den anderen Strukturen dieser funktionellen Einheit verbunden. Zudem bestehen ausgeprägte

Verbindungen zu kortikalen Arealen. Ebenso wird ihr funktionell eine zentrale Bedeutung bei der vegetativen Hormon-, Kreislauf und Nahrungsaufnahmesteuerung wie bei der Entstehung von emotionalen Reaktionen sowie Flucht- und Angstreaktionen zugeschrieben. Für diese Studie ist ihre besondere Rolle bei der Speicherung emotional betonter Gedächtnisinhalte hervorzuheben. Diese ist ähnlich wie die Emotionalität bei Erkrankungen des ZNS unter Beteiligung der Amygdala gestört.

3. Organische psychische Störungen nach Schädel-Hirn-Trauma

In diesem Kapitel vorgestellte Hintergrundinformationen stammen wiederum vornehmlich aus einem humanmedizinischen Standardwerk (63), das sich an der aktuellen Ausgabe der Internationalen statistischen Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme ICD-10 der WHO von 2012 orientiert.

Organische Psychosen sind allgemein definiert durch das Vorhandensein eines relevanten körperlichen Befundes, eines eindeutigen Zusammenhangs zwischen dem organischen Faktor und der Psychose, das Fehlen alternativer Ursachen und eine günstige Beeinflussung durch eine Besserung der organischen Erkrankung (64).

Es ist zu beachten, dass die nach einem SHT auftretenden Störungen in vielen Fällen nicht ausschließlich auf den neurologischen Schaden zurückzuführen sind, sondern sich mit einer posttraumatischen Belastungsstörung aufgrund der psychischen Strapazen vermischen, die im Zusammenhang mit dem SHT stehen. Zudem ist eine Differenzierung zwischen normalpsychologischen reaktiven Folgen der Erkrankung einerseits und den unmittelbar organisch bedingten Folgen andererseits schwierig.

3.1. Psychosyndrom nach Schädel-Hirn-Trauma

Das organische Psychosyndrom nach SHT ist durch mindestens drei der Merkmale gekennzeichnet: Kopfschmerz, Schwindel, Erschöpfung, Reizbarkeit, Störung der Konzentration, des geistigen Leistungsvermögens, des Gedächtnisses, des Schlafs sowie Verminderung der Belastbarkeit. Es lässt sich weiterhin mit bildgebenden Verfahren bzw. EEG-Untersuchungen diagnostizieren. Eine abschließende Diagnose kann jedoch nur bei entsprechender Anamnese erfolgen. Zusätzlich hat das Ausmaß der Schädigung einen erheblichen Einfluss auf das Ausmaß der posttraumatischen Persönlichkeitsstörung.

3.2. Angststörung

Physiologisches Angstverhalten ist eine existentielle Grunderfahrung und Bestandteil des menschlichen und tierischen Lebens. Mit ihm verbunden ist eine Reaktionsfolge von Wahrnehmung, Bewältigung und daraus folgend Vermeidung möglicher Bedrohungen bzw. Gefahren. Angst ist entwicklungsbiologisch verankert und trägt einen großen Teil zum Selbsterhalt bei. Sowohl vom Menschen als auch vom Tier (65-67) ist eine krankhafte Übersteigerung des Angstverhaltens aufgrund organischer Störungen bekannt. Diese hat meist eine für Außenstehende nicht nachvollziehbare Reaktionskette zur Folge und schränkt die Lebensqualität der Betroffenen grundlegend ein. Neuroanatomisch lassen sich vornehmlich bei Patienten, deren Angststörung mit einem epileptischen Krampfleiden auftritt, Veränderungen im Temporallappen bei einer MRT-Untersuchung feststellen. Davon abgesehen sind bei einer Vielzahl von Angsterkrankungen Abweichungen der Durchblutung und des Metabolismus hippocampaler und kortikaler Regionen nachgewiesen worden. In vielen Fällen erfordert die Behandlung eine Pharmakotherapie, wofür eine ganze Reihe von Stoffgruppen zur Verfügung steht. Bei leichteren Angsterkrankungen kann auch ein verhaltenstherapeutisches Eingreifen ausreichen. Die nachhaltigsten Therapieerfolge werden durch eine Kombination aus Pharmako- und Verhaltenstherapie erzielt.

3.3. Schizophrenie

Die Bedeutung des Begriffs Schizophrenie hat sich seit seiner Einführung im Jahr 1908 mehrfach geändert und wird heute vor allem umgangssprachlich ambivalent genutzt. Vor allem ist er als Überbegriff einer Reihe schwerer psychischer Erkrankungen zu verstehen. Diese sind durch Störungen des Denkens, der Wahrnehmung und der Affektivität (Gesamtheit des Gefühls- und Gemütslebens) charakterisiert. Die Symptomatik lässt sich in Positivsymptome (Übersteigerung und Fehlinterpretation des Erlebten) und in Negativsymptome (Einschränkung und Verlust früher vorhandener Persönlichkeitseigenschaften) unterteilen. Im Verlauf organischer Störungen des ZNS, wie dem SHT, kann es zu schizophrenieformen Defekten beim humanen Patienten kommen. Sie werden häufig von Wahnideen und Halluzinationen begleitet. Die beim Menschen schwer

abgrenzbare Diagnose der Schizophrenie lässt sich aufgrund der Komplexität der Erkrankung nicht auf das Tier übertragen und hat in der tiermedizinischen Praxis keine Bedeutung. Zur grundlegenden Untersuchung verschiedener Therapieansätze wurden jedoch mehrere tierexperimentelle Modelle entwickelt, die Einzelbestandteile der Schizophrenie-Symptomatik bzw. mit der Krankheit verbundene neurologische Mechanismen beurteilen helfen (68, 69).

3.4. Depression

Depressivität beschreibt eine krankhaft negativ getönte Befindlichkeit im Sinne einer niedergedrückten Stimmung gepaart mit Antriebslosigkeit. Depressive Störungen stellen die häufigste psychopathologische Folge von organisch bedingten zentralnervösen Erkrankungen dar. Jedoch ist besonders in diesem Zusammenhang eine Abgrenzung zu normalpsychologisch interpretierbaren Reaktionen auf die Erkrankung problematisch. Ein Zusammenhang zwischen speziellen Läsionsarealen im Gehirn und einer besonders erhöhten Wahrscheinlichkeit von depressiven Folgen ließ sich bis jetzt nicht nachweisen. Jedoch steigt die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung einer depressiven Störung mit dem Umfang des geschädigten Gehirngewebes.

Ein zentrales Merkmal von Depressionen beim Menschen ist eine psychopathologische Anhedonie. Damit verbundene Verhaltensmuster lassen sich auch bei Säugetieren beobachten und eignen sich zur Beurteilung von Depressions-ähnlichem Verhalten im Tierversuch (70).

3.5. Leichte kognitive Störungen

Für leichte kognitive Störungen sind Gedächtnisstörungen, Vergesslichkeit, Lernschwierigkeiten und verminderte Konzentrationsfähigkeit charakteristisch. Weiterhin wird häufig das Erlernen eines neuen Stoffs als schwieriger wahrgenommen, obwohl ein Test Normalwerte der Lernfähigkeit ergibt. Keines der genannten Symptome ist so schwer, dass die Diagnose Demenz gestellt werden kann. Nicht selten geht mit den leichten kognitiven Störungen eine Depression einher. Häufig ist es schwierig, eine leichte kognitive Störung von normalen Abweichungen von der mittleren Gedächtnisleistung gesunder

Menschen abzugrenzen. Um eine kognitive Gedächtnisstörung abschließend zu diagnostizieren, fehlen auch oft Vergleichswerte zur prätraumatischen Gedächtnisleistung. Nicht selten tritt eine Verschlimmerung der Symptome über mehrere Jahre auf, wobei eine Vorhersage zum Krankheitsverlauf kaum getroffen werden kann. Patienten mit einer posttraumatischen kognitiven Gedächtnisstörung sollten langfristig psychotherapeutisch betreut werden.

4. Epilepsie

Epilepsie beschreibt eine charakteristische rezidivierende anfallartige Störung mit oder ohne Bewusstseinsstörung, welche ihren Ursprung in einer strukturellen bzw. funktionellen Anomalie des Gehirns nimmt. Physiologisch besteht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen inhibitorischen und exzitatorischen postsynaptischen Potentialen an Nervenzellen. Es wurde beobachtet, dass dieses Gleichgewicht in epileptogenem Gewebe gestört ist, was vermutlich ursächlich mit der Störung im Zusammenhang steht. Die bei einem epileptischen Anfall auftretende unkoordinierte Nervenzellaktivität wird weiterhin mit Abweichungen des GABA_A-Chlorid-Gleichgewichtspotenzials an Neuronen und Veränderungen nicht synaptischer Zell-Zell-Kommunikation über Gap Junctions in Verbindung gebracht. Epileptische Krampfleiden gehören zu den häufigsten chronischen Erkrankungen des Nervensystems, wobei die Ätiologie vielseitig ist und z. B. morphologische, metabolische, toxische und traumatische Ursachen umfasst.

Posttraumatische Krampfanfälle nach einem SHT weichen in ihrer Phänomenologie in Abhängigkeit vom geschädigten Hirnareal voneinander ab. Sie können direkt mit dem Trauma auftreten oder sich erst Wochen, Monate oder Jahre nach der Verletzung ereignen. Häufig kommt es zunächst zu einem fokalen Anfallsgeschehen, welches sich sekundär generalisiert. Prinzipiell erhöht sich das Risiko, eine posttraumatische Epilepsie auszubilden, mit ansteigender Schwere der Hirnschädigung. Dabei ist auch eine genetische Disposition bei der Ausbildung der Epilepsie nach SHT zu beachten (71-76). In vielen Fällen kommt es zu mehrmaligen epileptischen Anfällen, so dass von einer chronischen posttraumatischen Epilepsie gesprochen werden muss. Unabhängig von einer Behandlung sind ca. 50 % der Patienten innerhalb von fünf bis zehn Jahren anfallsfrei. Kommt es zu keiner Spontanheilung, ist meist eine lebenslange chronische Behandlung mit antikonvulsiv wirksamen Medikamenten (Antiepileptika) unumgänglich. Dabei werden lediglich die Krämpfe unterdrückt, ohne eine Heilung vom Anfallsleiden zu erreichen (77). Behandlungsresistente Epilepsieformen treten sowohl beim Menschen als auch beim Tier auf und stellen in der Praxis ein besonderes Problem dar. Ihre Untersuchung nimmt daher eine außerordentlich relevante Stellung innerhalb der Epilepsieforschung ein (78).

In der Humanmedizin stehen ca. 20 Antiepileptika für eine Behandlung zur Verfügung (77). Beim tiermedizinischen Patienten kommt aufgrund speziesspezifischer Stoffwechseleigenschaften oder der zu erwartenden Nebenwirkungen einiger Antiepileptika meist nur eine Behandlung mit Phenobarbital und Kaliumbromid in Frage (79).

III. MATERIAL

1. Materiallisten

Tabelle 1: Materialauflistung-Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Filtertopkäftig Typ-II lang	Bioscape GmbH, Castrop-Rauxel, DE
Pelletiertes Spezialfutter	ssniff Spezialdiät GmbH, Soest, DE
Einstreu Lignocel® FS14	J.Rettenmaier & Söhne GmbH + Co KG, Rosenberg, DE
Papierhandtücher 25x21 cm, grün, ZZ Falz, 1-lagig	Schuch Laborhandel und Klinikbedarf, Langgöns, DE
Wattetupfer	BZ Medizin-Technik, Nierstein, DE
Prolene® Nahtmaterial USP 6-0	Ethicon Inc., Somerville, USA
Leukosilk® Klebeband	BSNmedical, Hamburg, DE
Tissue-Tek® Einbettmedium	Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, NL
SuperFrost® Plus-Objekträger	Thermo Scientific, Menzel-Gläser, Menzel GmbH, Braunschweig, DE
Deckgläser	Diagonal GmbH & Co KG, Münster, DE
Laborfolie	VWR international, Radnor, USA
Papierfilter	Whatman GmbH, Dassel, DE
Einweghandschuhe Safe Ex	SafeMed Pro Ltd., Bern, CH
Einwegpipetten	VWR international, Radnor, USA
Falcon® Zentrifugenröhrchen	VWR international, Radnor, USA
Sterican® Kanülen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
LightCycler® Kapillaren	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, CH
PCR Reaktionsgefäße, 0,5 ml	Biozym Scientific, Oldendorf, DE
Pipettenspitzen	Starlab GmbH, Ahrensburg, DE
Skalpelle	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Saugtupfer steril	Kettenbach GmbH & Co KG, Eschenburg, DE

Tabelle 2: Materialauflistung-Geräte

Geräte	Hersteller
Ohrlochzange	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Vapor 19.3 Isofluran (Forene®) Vaporizer	Draeger AG & Co. KGaA, Lübeck, DE
Temperaturhomöostasegerät	Hugo Sachs, March-Hugstetten, DE
Stereotaktischer Rahmen	Kopf Instruments, Tujunga, USA
Mikrobohrer	Handbohrer Uni-Drive N Komplettgerät, Paggen, Starnberg, DE
CCI-Applikator	Kopacz, Mainz, DE
Säuglingsinkubator IC8000	Draeger AG & Co. KGaA, Lübeck, DE
ENV-577 Fife Station Mouse RotaRod Treadmills	MED Associates INC, Vermont, USA
Fear Conditioning System	TSE GmbH, Bad Homburg, DE
CatWalk® XT	Noldus Information Technology, Wageningen, NL
Startle Response/PPI Test System	TSE GmbH, Bad Homburg, DE
Kryostat Microm HM 560 Cryo-Star	Thermo Fischer Scientific, Walldorf, DE
Inverses Mikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss AG, Oberkochen, DE
Mikroskope Wild M420	Leica Camera AG, Solms, DE
Schüttler Rotamax 120	Heidolph Instruments, Schwabach, DE
Mastermill MM 300 Homogenisator	Retsch Technology GmbH, Haan, DE
Vortexmischer Reax control	Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Hamburg, DE
Centrifuge 5804 R	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Centrifuge 5415 C	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Mini Star silverline	VWR international, Radnor, USA
Photometer NanoVue™	GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK
LightCycler® 480 System	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, CH
Analysenwaage	Sartorius AG, Göttingen, DE
Gefrierschrank: - 80 °C	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, DE
Gefrierschrank: - 20 °C	Liebherr-International AG, Bulle, CH
Mikropipetten	Eppendorf AG, Hamburg, DE

Tabelle 3: Materialauflistung-Software

Software	Hersteller
EthoVision® XT, Version 8.0	Noldus Information Technology, Wageningen, NL
DeltaPix® InSight, Version 4.0	DeltaPix, Maalov, DK
CatWalk® XT, Version 9.0	Noldus Information Technology, Wageningen, NL
SOF-825 Startle Reflex System, Version 5.9	MED Associates, INC, Vermont, USA
ImageJ, Version 1.47	National Institutes of Health, Bethesda, USA
LightCycler® Software, Version 4.5	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, CH
Prism 6 für Mac OS X, Version 6.0c	GraphPad Software, San Diego, USA
Microsoft® Excel for Mac 2011	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Endnote X5 (Mac)	Thomson Reuters Corporation, New York, USA
Microsoft® Word for Mac 2011	Microsoft Corporation, Redmond, USA

Tabelle 4: Materialauflistung-Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Ethanol	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE
Aqua dest.	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Roti®-Histol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Roti® Histokit	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Kresylviolett (Acetat)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Chloroform	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Isotonische Kochsalzlösung	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Flüssiger Stickstoff	Air Liquide S.A., Düsseldorf, DE
Paraformaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Biochrom GmbH, Berlin, DE
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Tabelle 5: Materialauflistung-Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen	Hersteller
RWT-Puffer	Qiagen N.V., Venlo, NL
RDD Buffer	Qiagen N.V., Venlo, NL
RLT-Buffer	Qiagen N.V., Venlo, NL
RPE Puffer	Qiagen N.V., Venlo, NL
RNAse freies Wasser (nuclease-free)	Fermentas, St. Leon Rot, DE
gDNA wipeout buffer	Qiagen N.V., Venlo, NL
Normal Goat Serum	DAKO, Hamburg, DE
Ethanolverdünnungen	Eigene Herstellung (aus Ethanol und Aqua dest. gemischt)
Paraformaldehydlösung (PFA 4%)	Eigene Herstellung (235 ml Aqua dest. auf 70 °C erhitzen und 18,8 g Paraformaldehyd und 0,47 ml 10 molare NaOH dazugeben. Über einen Faltenfilter die angesetzte Lösung filtrieren. Filter mit 235 ml 0,2 molaren Phosphatpuffer nachspülen)
phosphatgepufferte Salzlösung (PBS/T)	Eigene Herstellung (9,55 g PBS in 1 Liter Aqua dest. lösen. Für PBST + 3 ml Triton X 100)
Kresylviolett (Acetat)-Lösung	Eigene Herstellung (5 g Kresylviolett in 100 ml Ethanol für 30 min bei 50 °C lösen. Unter Zugabe von 400 ml Aqua dest. in einem Faltenfilter filtrieren)

Tabelle 6: Materialauflistung-Arzneimittel

Arzneimittel	Hersteller
Bepanthen-Augensalbe®	Bayer Vital, Leverkusen, DE
Forene®, Wirkstoff: Isofluran	Baxter, Unterschleißheim, DE
Histoacryl®-Gewebekleber	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Pentylentetrazole	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Tabelle 7: Materialauflistung-Kits

Kits	Hersteller
Vectastain® ABC Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Diaminobenzidin (DAB) + Substrat Chromogen System	DAKO, Hamburg, DE
RNeasy® Mini Kit	Qiagen N.V., Venlo, NL
QuantiTect® Reverse Transcription Kit	Qiagen N.V., Venlo, NL
KapaProbeFast qPCR	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE
Light Cycler® 480 Probes Master	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, CH
Absolute Blue qPCR SybrgreenMix	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

Tabelle 8: Materialauflistung-Antikörper

Antikörper	Hersteller
Anti-Iba1 Rabbit, Wako Cat.	WAKO Chemicals, Neuss, DE
Biotinylated Goat Anti Rabbit IgG (H+L)	Abcam®, Cambridge, UK

Tabelle 9: Materialauflistung-Sonden

Sonden	5' → 3'	Sequenz
Ppia FL	5'gCTCTgAgCACTggRgAgAAAggA--FL	24
PPIA Cy5	5'-TTGGCTATAAGGGTTCCTCCTTTCACAG-3'	28
mu IL 1b FL	TAA TGA AAG ACG GCA CAC CCA CCC-FL	24
mu IL 1b 610	LC Red610--CAG CTG GAG AGT GTG GAT CCC AAG C--PH	25
mIL6 FL	CAT AAA ATA GTC CTT CCT ACC CCA ATT TCC-FL	30
mIL6 Cy5	Cy5--TGC TCT CCT AAC AGA TAA GCT GGA GTC AC--PH	29

Tabelle 10: Materialauflistung-Primer

Primer	5' → 3'		Produktlänge (Bp)
Ppia F	5'gCgTCTSCTTCgAgCTgTT	19	146
Ppia R	5'RAAgTCACCACCCTggCA	18	
muIL 1b S	GTG CTG TCG GAC CCA TAT GAG	21	348
muIL 1b A	CAG GAA GAC AGG CTT GTG CTC	21	
mIL6 F(ex2,3)	TCG TGG AAA TGA GAA AAG AGT TG	23	471
mIL6 R(ex5,6)	TAT GCT TAG GCA TAA CGC ACT AG	23	
Gap43-F	AGGAGCCTAAACAAGCCGAT	20	150
Gap43-R	CGTCTACAGCGTCTTTCTCCTC	22	
Arg1-F	CTCCAAGCCAAAGTCCTTAGAG	22	185
Arg1-R	AGGAGCTGTCATTAGGGACATC	22	
Gadd45b-F	CCTCCTGGTCACGAACTGTC	20	133
Gadd45b-R	TGGGTCTCAGCGTTCCTCTA	20	
L1cam-F	TGGATGAACAGCAAGATT	18	105
L1cam-R	TGAATGATTGTCTGAGGTAA	20	
GFAP-F	CGGAGACGCATCACCTCTG	19	120
GFAP-R	TGGAGGAGTCATTTCGAGACAA	21	
Lcn2-F	TGGCCCTGAGTGTCATGTG	19	239
Lcn2-R	CTCTTGTAGCTCATAGATGGTGC	23	

2. Versuchstiere

Für alle Testgruppen wurden zum Zeitpunkt der OP zehn bis zwölf Wochen alte männliche Mäuse vom Stamm C57Bl/6N (Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld, DE) verwendet.

3. Genehmigung des Tierversuchs

Das gesamte Versuchsvorhaben wurde vom Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz (Mainzer Strasse 112, 56068 Koblenz) am 13.5.2013 genehmigt. Die Genehmigung nach §8 des TierschG liegt unter dem Aktenzeichen 23 177-07/G 13-1-018 vor.

IV. METHODEN

1. Studienplanung

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Studien lassen sich methodisch in drei Abschnitte unterteilen. Zunächst erfolgt die operative Induktion eines Schädel-Hirn-Traumas bzw. eine Scheinoperation als Kontrolle. Nach einer gruppenspezifischen Überlebensdauer von zwei Wochen bzw. ca. sechs Monaten wird eine Reihe verhaltensbiologischer Untersuchungen durchgeführt. Nach Abschluss dieser Untersuchungen werden die Gehirne entnommen, kryokonserviert, 12 µm dicke Kryotomschnitte angefertigt und immunhistologisch untersucht. Abschließend werden mit dem Gewebe zwischen den Schnittebenen molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt.

1.1. Gruppenbeschreibung

Unterschieden wird zwischen einer CCI-Gruppe, bei welcher ein operatives SHT induziert wird, und einer Sham-Gruppe mit einer Scheinoperation ohne SHT. Im Anschluss wurde zu zwei verschiedenen Zeitpunkten mit den verhaltensbiologischen Untersuchungen begonnen. Gemessen wurde zu einem frühen Zeitpunkt mit Testbeginn 14 Tage und Tötung/Hirnentnahme 58 Tage nach SHT sowie zu einem späten Zeitpunkt mit Testbeginn 184 Tage und Tötung/Hirnentnahme 225 Tage nach SHT.

1.2. Gruppengrößen/Gesamtfallzahl

Es werden vier Untersuchungsgruppen anhand der Operation und des Testzeitpunkts unterschieden.

Die Fallzahl wurde gemäß der behördlichen Genehmigung und in Übereinstimmung mit ähnlichen verhaltensbiologischen Experimenten festgelegt. Aufgrund anzunehmender Verluste bis zum späten Untersuchungszeitpunkt wurde sie in den Gruppen mit Langzeitüberleben erhöht.

Tabelle 11: Versuchsgruppen und Gruppengrößen

Operation	Testzeitpunkt*	Tierzahl
Sham	14 Tage	15
CCI	14 Tage	15
Sham	ca. 6 Monate	16
CCI	ca. 6 Monate	18 **
Gesamtanzahl		64

* Beginn der verhaltensbiologischen Untersuchungen nach OP

** ursprünglich 20, -2 wegen Euthanasie nach Wundinfektion

1.3. Zeitliche Versuchsabfolge

Bei der Abfolge der verhaltensbiologischen Untersuchungen wurde mit den am wenigsten belastenden Untersuchungen begonnen und die Belastung danach gesteigert, um eine Beeinflussung der Tests untereinander zu minimieren. Die chronologische Abfolge der Eingriffe und verhaltensbiologischen Untersuchungen wird im Folgenden für beide Testzeitpunkte als Pfeildiagramm dargestellt.

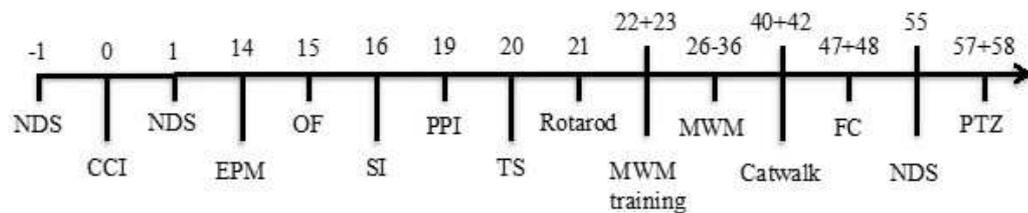


Abbildung 1: Chronologische Versuchsabfolge Testzeitpunkt 14 Tage post OP (siehe Abkürzungsverzeichnis Seite XIII bis XVI)

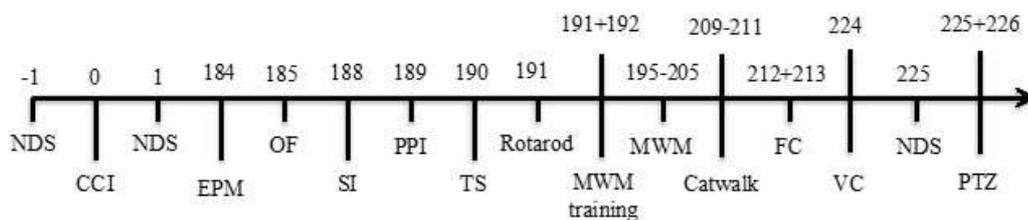


Abbildung 2: Chronologische Versuchsabfolge Testzeitpunkt ca. sechs Monate post OP (siehe Abkürzungsverzeichnis Seite XIII bis XVI)

2. **Haltungsbedingungen**

Um negativen Einflüssen auf das Sozialverhalten vorzubeugen, wurden die Mäuse während der gesamten Versuchsdauer in einer Gruppenhaltung von vier (langer Überlebenszeitpunkt) bzw. fünf (kurzer Überlebenszeitpunkt) Tieren/Käfig gehalten. Freier Zugang zu frischem Trinkwasser und pelletiertem Spezialfutter für Mäuse (ssnif, Soest, DE) wurde zu jedem Versuchszeitpunkt sichergestellt, auch prä-operativ, um die Mikroflora und Peristaltik des Darms nicht negativ zu beeinflussen. Als Einstreu wurden entkeimte und entstaubte Holzspäne (Lignocel® FS14, J.Rettenmaier & Söhne GmbH + Co KG, Rosenberg, DE) genutzt. Zur weiteren Käfigausgestaltung diente ein PVC-Röhrchen als Rückzugsort sowie Papierhandtücher (25x21 cm, grün, ZZ Falz, 1-lagig, Schuch Laborhandel und Klinikbedarf, Langgöns, DE) um dem Nestbautrieb der Mäuse gerecht zu werden. Es gibt keine Hinweise auf eine Beeinflussung der Ergebnisse durch Inhaltsstoffe oder Faktoren der Käfigausgestaltung.

Über die gesamte Zeit des Versuchsablaufs wurden die Tiere in einem 12 h-Tag-Nacht-Rhythmus bei künstlicher Beleuchtung gehalten. Alle Untersuchungen und Manipulationen wurden während der Hellphase durchgeführt. Die Haltungs- und Versuchsräume wurden bei einer Luftfeuchtigkeit von ca. 55 % und einer Temperatur von 22-23 °C automatisch klimatisiert.

Der Käfig inkl. Einstreu, Trinkwasser und Käfigausgestaltung wurde mindestens einmal wöchentlich durch geschultes Personal gewechselt. Dabei wurde darauf geachtet, dass zwischen dem Käfigwechsel und einer verhaltensbiologischen Untersuchung mindestens 48 h vergingen, um Einflüsse der neuen Umgebung auf das Verhalten ausschließen zu können. Alle Mäuse wurden zweimal wöchentlich in Augenschein genommen und das Allgemeinbefinden beurteilt. Zusätzlich erfolgte eine wöchentliche Gewichtskontrolle.

3. Induktion eines experimentellen Schädel-Hirn-Traumas mit dem Controlled Cortical Impact -Modell

3.1. Operationsvorbereitung

Sieben Tage vor Induktion des SHT werden die Tiere mit individuellen Ohrmarkierungen versehen, um mögliche Stresseinflüsse beim präoperativen „*Neurological Deficit Score*“ (NDS) zu minimieren. Anhand der Ohrmarken können die Mäuse trotz Gruppenhaltung im Verlauf der gesamten Versuchsreihe unterschieden werden.

Einen Tag vor dem Eingriff wird das Gewicht und das Allgemeinbefinden aller Mäuse kontrolliert und zusätzlich ein NDS erhoben (Tabelle 12). Tiere, die durch Störungen des Allgemeinbefindens, offensichtliche Beeinträchtigungen wie Dermatitis oder einem NDS über drei auffallen, würden vor Versuchsbeginn ausgeschlossen. In diesem Fall erfüllte keines der Versuchstiere eines der Ausschlusskriterien.

3.2. Operation

3.2.1. Einleitungen/Narkose

Jede Maus verbleibt bis zur Narkoseeinleitung in seiner Käfiggruppe und wird unmittelbar nach Entfernung aus dem Käfig unter einem Plastiktrichter platziert. Hier verbleibt sie für ca. 60 Sekunden (s) in 4 Vol. % Isofluranatmosphäre bis zur Bewusstlosigkeit. Nun erfolgt die Fixierung in Bauchlage durch Einspannen der Dentes incisivi in einen stereotaktischen Rahmen (Kopf Instruments, Tujung, USA) einer aus einem Untersuchungshandschuh selbst hergestellten Vinylmaske. Die Maske wird mit einer Gefäßklemme individuell für jedes Tier abgedichtet. Abschließend erfolgt die Versorgung der Augen mit Bepanthen-Augensalbe® (Bayer Vital, Leverkusen, DE) und eine Temperatursonde (Temperaturhomöostasegerät, Hugo Sachs, March-Hugstetten, DE) wird rektal eingeführt.

Das Narkosesystem wird bei konstantem Flow von 0,5 l/min Frischluft- und 1,0 l/min Sauerstoffzufuhr, 2 – 2,5 Vol. % Isofluran sowie aktivem Gasabzug betrieben. Im gesamten Operationsverlauf zeigt die Maus Spontanatmung.

Da ein neuroprotektiver Effekt von intraoperativer Hypothermie bekannt ist (80, 81), liegt die Maus im gesamten Operationsverlaufs auf einer mit der Rektalsonde rückgekoppelten Wärmeplatte (Temperaturhomöostasegerät, Hugo Sachs, March-Hugstetten, DE), welche eine konstante Körpertemperatur von 37 °C aufrechterhält. Eine regelmäßige Temperaturkontrolle wird im OP-Verlauf protokolliert.

Die Narkosezeit von der Einleitung bis zum Erwachen überschreitet 20 min nicht.

Um eine eventuelle Beeinflussung des Verhaltens zu vermeiden, wird in Übereinstimmung mit der Genehmigung der zuständigen Behörde zunächst auf eine peri- und postoperative Analgesie verzichtet (82-86), zumal eine hohe Schmerzbelastung in vorherigen Studien nicht beobachtet wurde. Nach Erwachen aus der Narkose ist in der Regel kein deutlich verändertes Verhalten bei den Tieren feststellbar. Nach ein bis zwei Stunden zeigen sie gewöhnlich ein normales Trink- und Fressverhalten. Auch eine Störung des Putzverhaltens oder des Schlaf- und Wachrhythmus ist nicht beobachtet worden. Sollten postoperative Schmerzsymptome auftreten (z. B. verlängerte Liegedauer, gesträubtes Fell, fehlende bzw. reduzierte Nahrungs- und Trinkwasseraufnahme), würden solche Tiere durch subkutane Applikation des Analgetikums Buprenorphin behandelt. In diesem Fall musste aber keines der Versuchstiere wegen einer postoperativen Analgesie medikamentös versorgt werden.

3.2.2. Controlled Cortical Impact (CCI)

Über eine 1 – 1,5 cm lange mediane Hautinzision wird der Schädelknochen von der vorderen (Sutura lamboidea, Lambda) bis zur hinteren Kopfnaht (Sutura coronalis, Bregma) freigelegt und das Periost mit zwei Wattetupfern entfernt.

Orientierend am Bregma wird unter Zuhilfenahme eines Mikrobohrers (Handbohrer Uni-Drive N Komplettgerät, Paggen, Starnberg, DE) über der rechten Hemisphäre ein offenes Rechteck mit den Begrenzungen Bregma, Jochbogen (Arcus zygomaticus), Lambda und der offenen Seite an der Sagittalnaht (Sutura sagittalis) gefräst. Die Dura mater bleibt im Verlauf der Kraniotomie intakt. Das entstandene Knochenfenster wird eröffnet, wobei die Sagittalnaht als Scharnier dient.

Im nächsten Schritt wird der Stempel (Durchmesser 3 mm) eines druckluftbetriebenen CCI-Applikators (Kopacz, Mainz, DE) ausgerichtet und auf der Dura mater positioniert. Das Hirn-Trauma erfolgt computergesteuert mit einer definierten Geschwindigkeit von 8 m/s, einer Eindringtiefe von 1 mm und einer Aufpralldauer von 150 ms. Anschließend wird das Knochenfenster verschlossen und mit Histoacryl®-Gewebeleber (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE) abgedichtet und fixiert. Zum Verschluss der Hautinzision wird PROLENE®-Nahtmaterial USP 6-0 (ETHICON Inc., Somerville, USA) mit 4 – 5 Knopfnähten verwendet.

3.2.3. Sham

Der scheinoperierte Eingriff umfasst ebenfalls die oben beschriebene stereotaktische Fixierung, die Hautinzision, die Periostentfernung, die Hautnaht sowie eine 15-minütige Narkose mit 2,3 Vol. % Isofluran. Da die Beeinflussung von Entzündungsparametern durch Hitzeeinwirkung während einer Kraniotomie beschrieben wurde (87), wird auf diese verzichtet. Ersatzweise wird die Schädeloberfläche mit einer spitzen Pinzette im Bereich des oben beschriebenen Schädelfensters aufgeraut. Vor allem entfällt schließlich das Hirn-Trauma durch den CCI-Applikator.

3.3. Postoperative Beobachtungsphase

Im Anschluss an den Eingriff verbleiben die Tiere während der Aufwachphase für 2 h in einem Säuglingsinkubator (IC8000, Draeger, Lübeck, DE) bei 33 °C und 35 % Luftfeuchtigkeit und werden danach in die ursprünglichen Käfiggruppen regroupiert.

In den folgenden Tagen finden tägliche Kontrollen des Gewichts, der Wundheilung und des Sozialverhaltens statt. Bei übermäßigen Rankämpfen werden die Käfiggruppen aufgeteilt, wobei immer mindestens zwei Mäuse zusammen bleiben, um eine Einzelhaltung zu vermeiden. Bei vier Tieren musste aufgrund von Wundheilungsstörungen in einer maximal zweiminütigen Kurznarkose (2 Vol. % Isofluran) die Wunde versorgt werden, wobei zwei vorzeitig zu töten waren und nicht in die Studie eingehen können.

4. Verhaltensbiologische Untersuchungen

Zur besseren Übersicht lassen sich die Verhaltenstests anhand des untersuchten Verhaltenstyps unterscheiden. Dabei ist unvermeidlich, dass diese Unterteilung die gegenseitige Einflussnahme und Komplexität verschiedener Verhaltensmuster außer Acht lässt.

4.1. Motorische Koordination und Kombinationstests zur allgemeinen Verhaltensbeurteilung

4.1.1. Neurological Deficit Score (NDS)

Dieser Test umfasst sieben verschiedene Aufgaben bzw. Bewertungskriterien, die zur Einschätzung des Allgemeinbefindens, der motorischen Koordination, von Aktivität und kranialen Nervenfunktionen (z.B. Gehör) dienen. Der Test ist unspezifisch und erlaubt nur Aussagen über allgemeine Verhaltenszustände.

Jede neurologische Auffälligkeit führt zur Vergabe von Punkten (Tabelle 12), deren Gesamtpunktzahl für jedes Tier addiert wird. Eine gesunde Maus sollte einen NDS von 0 – 2 Punkten erreichen, während die Maximalpunktzahl von 15 die maximale messbare Verhaltensbeeinträchtigung wiedergibt.

Zunächst wird die Maus auf eine freie Fläche gesetzt und die Zeit gemessen, innerhalb der sie einen Kreis (Durchmesser 30 cm) verlässt. Ab 120 s wird die Maximalpunktzahl vergeben. Verzögertes Verlassen des Kreises deutet auf Einschränkungen der Aktivität bzw. der motorischen Koordination hin.

Weiterhin wird die Reaktion der Maus auf ein lautes Händeklatschen beurteilt. Eine verzögerte oder fehlende Schreckreaktion weist auf Störungen der kranialen Nervenfunktionen, der Reflexabläufe oder des Allgemeinbefindens hin.

Eingeschränkte Wahrnehmung bzw. Aufmerksamkeit zeigt sich am Ausbleiben des Interesses für die Umgebung, das sich unter anderem im „*seeking behavior*“ (Aufstellen auf die Hintergliedmaßen) manifestiert und ebenfalls begutachtet wird.

Zur Koordinationsprüfung wird der Beam-Balance-Test herangezogen. Hier besteht die Aufgabe darin, eine Strecke von ca. 50 cm nacheinander auf drei

verschieden dicken Balken (3 cm, 1,5 cm, 1 cm) zurückzulegen. Je nach motorischer Konstitution geschieht dies ohne Probleme, mit Fehlritten oder ist nicht möglich bzw. führt zum Gleichgewichtsverlust. Anschließend wird die Maus nacheinander an einen eckigen und einen runden Stab (Durchmesser 0,5 cm) gehängt und muss sich für mindestens 10 s mit vier Gliedmaßen daran festhalten. Frühzeitiges Abrutschen führt auch hier zu Punktvergabe.

Zum Abschluss wird das Gangbild evaluiert und zwischen keiner, einer auf eine Gliedmaße beschränkten und einer vollen Hemiparese unterschieden.

In der folgenden Tabelle ist der NDS mit seinen Unterpunkten aufgeführt:

Neuroscore		Punkte	Prä OP	24 h	Prä mortem
Verlassen eines 30 cm Kreises	<30 s	(0)			
	31-60 s	(1)			
	61-120 s	(2)			
	>120 s	(3)			
Schreckreaktion	vorhanden	(0)			
	fehlt	(1)			
Seeking behavior	vorhanden	(0)			
	fehlt	(1)			
Beam Balance	3 cm (0 = fehlerfrei, 1 = min. drei Fehlritte, 2 = Ziel nicht erreicht)	(0-2)			
	1,5 cm (s. o.)	(0-2)			
	1 cm (s. o.)	(0-2)			
Hängen	Rund (0 = min. 10 s hängend, 1 = <10 s hängend)	(0/1)			
	Eckig (s. o.)	(0/1)			
Gangbild	fehlt/eine Gliedmaße/ Hemiparese	(0-2)			

Tabelle 12: Neurological Deficit Score -Protokoll

4.1.2. Rotarod

In diesem Test wird die motorische Koordination und Ausdauer der Maus geprüft.

Die Testmaus wird auf einem rotierenden Zylinder (Durchmesser 3 cm, Ugo Basile, Italien) gesetzt und die Drehung innerhalb von 5 min gleichmäßig von 4 U/min auf 40 U/min beschleunigt. Die Dauer bis zum Herabfallen (Fallhöhe 27 cm) der Maus vom Zylinder wird automatisch aufgezeichnet.

4.1.3. CatWalk® XT

Dieser Test untersucht lokomotorische Defizite und schmerzinduzierte Gang-Anpassungen. Bei CatWalk® XT (Noldus Information Technology, Wageningen, NL) handelt es sich um ein videobasiertes Analysesystem zur Bewertung der Schritte und zur Ganganalyse von sich frei bewegenden Mäusen und Ratten.

Der Versuchsaufbau besteht aus einem Korridor, welcher die Bewegungsfreiheit auf eine gerade Linie einschränkt, auf einer 1,3 m langen Glasplatte und einer unterseitig befestigten Hochgeschwindigkeits-Farb-Videokamera. Die Auswertung der Videoaufzeichnungen erfolgt mit der Software CatWalk® XT (Version 9.0, Noldus Information Technology, Wageningen, NL). Die CatWalk XT-Technologie basiert auf veränderter Totalreflexion und führt bei Berührung zum Erleuchten der Glasoberfläche. Dieser Effekt ermöglicht die Erfassung der Pfotenabdrücke einer Testmaus durch die Videokamera. Anschließend erfolgt die computerbasierte Auswertung hinsichtlich einzelner Pfotenabdrücke (Intensität, Fläche, Länge und Breite), der Anordnung mehrerer Abdrücke zueinander (Abstand und Schrittlänge) sowie des Gangs (Schrittabfolge, -rythmus, -profil, -geschwindigkeit, Stand-, Schwungphase, Schwunggeschwindigkeit). Aufeinanderfolgend werden mehrere Durchläufe aufgezeichnet, wobei das arithmetische Mittel der drei stabilsten hinsichtlich Geschwindigkeit und Gleichförmigkeit ins Ergebnis eingeht.

Folgende Tabelle erklärt alle hier erfassten und berechneten Parameter.

Parameter	Erläuterung
<i>Average walk speed</i>	Zurückgelegte Distanz pro s
<i>Cadence</i>	Schrittfrequenz pro Durchlauf
<i>Print position</i> (<i>Relative paw placement</i>)	Distanz der Hinterpfoten zu den Vorderpfoten
<i>Step patterns</i>	Schrittfolge (6 Muster werden unterschieden: Ca: RV-LV-RH-LH; Cb: LV-RV-LH-RH; Aa: RV-RH-LV-LH; Ab: LV-RH-RV-LH; Ra: RV-LV-LH-RH; Rb: LV-RV-RH-LH)
<i>Support pattern</i>	Kontaktzeit aller möglichen Pfotenkombinationen mit dem Boden
<i>Base of support (BOS)</i>	Distanz zwischen dem Mittelpunkt der Vorderpfoten bzw. der Hinterpfoten
<i>Stance</i>	Kontaktzeit jeder Pfote mit dem Boden
<i>Stride length</i>	Distanz zwischen zwei Bodenberührungen der selben Pfote
<i>Swing speed</i>	Schwunggeschwindigkeit jeder Gliedmaße
<i>Swing</i>	Schwungzeit jeder Gliedmaße ohne Bodenberührung
<i>Print area</i>	Gesamtkontaktfläche jeder Pfote im Verlauf eines Schritts
<i>Print width</i>	Breite der Kontaktfläche jeder Pfote
<i>Print length</i>	Länge der Kontaktfläche jeder Pfote
<i>Min intensity</i>	Minimaler Druck, den eine Pfote beim Kontakt mit dem Boden auslöst, in arbitrary unit (a.u.)
<i>Max intensity</i>	Maximaler Druck, den eine Pfote beim Kontakt mit dem Boden auslöst, in arbitrary unit (a.u.)
<i>Mean intensity</i>	Mittlerer Druck, den eine Pfote beim Kontakt mit dem Boden auslöst, in arbitrary unit (a.u.)
<i>Max area</i>	Maximale Kontaktfläche der Pfote im Verlauf eines Schrittes

Tabelle 13: Erfasste Parameter im CatWalk® XT

4.2. Depressions-ähnliches, Schizophrenie-ähnliches, Angst-assoziiertes und soziales Verhalten

4.2.1. Angst-assoziiertes Verhalten, Mobilität und Aktivität

4.2.1.1. Elevated Plus Maze (EPM)

Dieser Test basiert auf dem Konflikt zwischen der natürlichen Aversion von Mäusen gegenüber freien Flächen und Höhe sowie dem Drang, unbekannte Umgebungen zu erkunden.

Beim Versuchsaufbau handelt es sich um ein kreuzförmiges, erhöhtes Areal (40 cm über dem Boden), das zwei offene und zwei geschlossene Arme (mit Umrandung von 15 cm Höhe) der Fläche 30×5 cm aufweist, die über eine Zentralfläche von 5×5 cm miteinander verbunden sind. Die Beleuchtungsstärke beträgt 140 – 150 lx an der Zentralfläche.

Die Maus wird in das zentrale Areal gesetzt und für 5 min mittels einer Videokamera und der Software EthoVision® XT (Version 8.0, Noldus Information Technology, Wageningen, NL) in ihrem Verhalten beobachtet. Es werden die Verweildauer, Laufstrecke und Häufigkeit des Betretens der offenen Arme im Vergleich zu den geschlossenen Armen ausgewertet.

4.2.1.2. Open Field (OF)

Ähnlich dem EPM bildet auch hier der Konflikt zwischen natürlicher Abneigung vor freien Flächen und dem Erkundungsdrang die Grundlage.

Das Tier wird in das Zentrum eines Plastikzylinders (120 cm Durchmesser, Wandhöhe 40 cm, Beleuchtungsstärke 140 – 150 lx) gesetzt und es wird abgewartet, bis es sich selbstständig zur Wand bewegt. Ab dem Zeitpunkt der ersten Wandberührung wird für 7 min mittels einer Videokamera und der Software EthoVision® XT (Version 8.0, Noldus Information Technology, Wageningen, NL) das Verhalten der Testmaus aufgezeichnet. Die Daten werden in Bezug auf die Gesamtlaufstrecke der Maus, ihre Aufenthaltsorte und auffällige Bewegungsabläufe oder Verhaltensweisen ausgewertet. Bzgl. des Aufenthaltsortes wird zwischen einer zentralen und einer peripheren Zone unterschieden, wobei beide jeweils 50 % des Gesamtradius umfassen.

4.2.2. Sozialverhalten

4.2.2.1. Social Interaction (SI) = Crawley Box

Das Interesse der Testmaus an einer unbekanntem weiteren Maus dient hier als Messgröße für die soziale Interaktion.

Die Testmaus wird in das Zentrum einer Kammer (Crawley Box, Eigenbau, Abmessung 30x60x40) mit drei Kompartimenten gesetzt. An ein zentrales Kompartiment grenzen zwei äußere Kompartimente: das eine enthält einen leeren kleinen Käfig (rund, 10 cm Durchmesser), das andere enthält eine unbekanntem Maus in einem ebensolchen Käfig. Bei der unbekanntem Maus handelt es sich wie bei der Testmaus um ein adultes männliches Tier vom Stamm C57Bl/6N. Von oben wird mittels einer Videokamera der Aufenthaltsort der Testmaus aufgezeichnet und mit der Software EthoVision® XT (Version 8.0, Noldus Information Technology, Wageningen, NL) ausgewertet. Dabei wird zwischen den drei Kompartimenten (zentrales, leeres und Kompartiment mit unbekanntem Maus) unterschieden und es wird ermittelt, in welchem sich die Testmaus bevorzugt aufhält.

Anhand der Formel

$$\text{Sozialindex} = \left(\frac{t[\text{unbekannte Maus}]}{\{t[\text{unbekannte Maus}] + t[\text{leeres Kompartiment}]\} \times 100} \right) - 50$$

kann der Sozialindex errechnet werden, der als Maß für das Sozialverhalten dient.

4.2.3. Schizophrenie-ähnliches Verhalten

4.2.3.1. Prepulse Inhibition of Acoustic Startle Response (PPI)

Dieser Test dient der Untersuchung der sensorisch-motorischen Reizverarbeitung anhand der Messung einer Schreckreaktion (Zucken, Springen) nach einem akustischen Stimulus. Ein spezieübergreifender Zusammenhang mit zahlreichen neuropsychiatrischen Krankheitsbildern, vor allem Schizophrenie, wurde mehrfach beschrieben (88, 89).

Ein Käfig (Abmessung 9 x 4 x 4 cm) lässt der Testmaus während des Versuchs nur eingeschränkten Bewegungsspielraum. Der Käfig befindet sich in einer

schallgeschützten Kammer, in der über ein Lautsprechersystem eine kontrollierte Beschallung der Maus erfolgt. Über Vibrationssensoren im Boden des Käfigs können vertikale Bewegungen der Maus gemessen und aufgezeichnet werden. Das gesamte Beschallungs- und Messsystem wird über eine einheitliche Software gesteuert (Startle Response/PPI Test System, TSE GmbH, Bad Homburg, DE).

Ein durchgehendes Hintergrundrauschen von 65 dB bleibt über die gesamte Versuchsspanne bestehen. Die Schreckreaktionen werden durch einen akustischen Stimulus mit einer Intensität von 120 dB über 40 ms ausgelöst und für 140 ms ab Stimulusbeginn aufgezeichnet. In diesem Zeitfenster fließt die Spitze der Schreckreaktion ins Ergebnis ein. Einigen Stimuli wird ein schwächerer Stimulus („*Prepulse*“) im Abstand von 100 ms in unterschiedlicher Intensität (75 dB, 80 dB und 85 dB) vorgeschaltet. Somit ergeben sich fünf unterschiedliche Testtypen (nur Stimulus, kein Stimulus, *Prepulse* 75 dB, *Prepulse* 80 dB und *Prepulse* 85dB), die jeweils zehnmals in randomisierter Reihenfolge durchgeführt werden. Das Zeitintervall zwischen den Testungen variiert zwischen 10 und 20 s. Vor Testbeginn liegt eine Gewöhnungsphase von 5 min mit Hintergrundrauschen, gefolgt von acht einfachen Stimuli. Dies dient der Umgebungsgewöhnung sowie einer Normalisierung der Schreckreaktion.

Die Amplitude der Schreckreaktion (angegeben in a. u. = arbitrary unit) wird definiert als die Differenz zwischen dem Maximum der detektierten, von der Maus auf den Boden ausgeübten Kraft im Aufzeichnungsfenster und der gemessenen Kraft direkt vor Stimulusbeginn.

Eine mögliche Abschwächung der Schreckreaktion durch den *Prepulse* wird in Prozent angegeben als *Prepulse Inhibition* (PPI) und berechnet sich mit der Formel

$$PPI [\%] = 100 - \left(\left[\frac{(\text{Amplitude nach } \textit{Prepulse} \text{ und } \textit{Stimulus})}{(\text{Amplitude nach alleinigem } \textit{Stimulus})} \right] \times 100 \right)$$

4.2.4. Depressions-ähnliches Verhalten

4.2.4.1. Tail Suspension (TS)

In diesem Test wird das Verhalten hinsichtlich der physischen und psychischen Gesamtkonstitution untersucht. Er basiert auf der Motivation, sich aus einer unangenehmen Situation zu befreien bzw. sich in eine solche zu fügen. Änderungen dieses Verhaltenstyps werden bei Menschen mit Depressionserkrankungen in Verbindung gebracht. Ihre Signifikanz kann auf die Maus übertragen werden (90, 91).

Über einen Zeitraum von sechs Minuten (min) wird die Maus an ihrem Schwanz mit einem Leukosilk®-Klebeband (BSNmedical, Hamburg, DE) an einem Brett befestigt und die Zeit aufgezeichnet, in der sie versucht sich aus dieser Situation zu befreien bzw. in der sie unbewegt hängt. Das Verhalten der Testmaus wird von einer Videokamera aufgezeichnet, mit der Software EthoVision® XT (Version 8.0, Noldus Information Technology, Wageningen, NL) ausgewertet und die Gesamtzeit der Immobilität angegeben.

4.3. Kognitive Fähigkeiten

4.3.1. Morris Water Maze (MWM)

Dieser Test untersucht die räumliche Erinnerungs- und Lernfähigkeit über mehrere Tage (92). Die natürliche Aversion von Mäusen gegen Wasser stellt die Lernmotivation dar.

Ein rundes Becken (120 cm Durchmesser, Tiefe 40 cm, Beleuchtungsstärke 140 – 150 lx) wird mit Wasser (21 ± 2 °C) gefüllt und eine runde Plattform (Durchmesser 9 cm) 1 cm unter der Wasseroberfläche platziert. Die Plattform befindet sich im mittleren Drittel zwischen Rand und Mittelpunkt des Beckens an einer festgelegten Position. Zur besseren Erkennbarkeit einer Testmaus mittels einer Videokamera und der Software EthoVision® XT (Version 8.0, Noldus Information Technology, Wageningen, NL) wird das Wasser weiß gefärbt. Die Wände (Abstand ca. 50 - 100 cm vom Beckenrand) des Testraums sind mit einer Vielzahl von Symbolen (z. B. Pfeile, Kreuze, Punkte, Dreiecke und Rechenzeichen) zur räumlichen Orientierung markiert.

Jede Maus wird viermal täglich von einem festgelegten und täglich wechselnden Startpunkt aus in das Becken gesetzt und hat max. 90 s Zeit, um die Plattform schwimmend zu erreichen. Beim Auffinden der Plattform innerhalb der vorgegebenen Zeit wird der Testlauf frühzeitig beendet und die Testmaus aus dem Versuchsaufbau genommen. Sollte die Plattform nach 90 s nicht erreicht worden sein, wird die Maus manuell zur Plattform geleitet und bleibt dort 10 – 15 s.

Für die ersten zwei Untersuchungstage ist die Plattform zunächst mit einer orangenen Fahne (15 cm Höhe über der Wasseroberfläche) markiert und damit deutlich erkennbar für eine schwimmende Testmaus. In dieser Zeit kann erlernt werden, dass die Plattform den Ausweg aus dem unangenehmen Zustand des Schwimmens darstellt und gleichzeitig erhält man erste Ergebnisse zu visuellen, motorischen und kognitiven Fähigkeiten der Maus. Vom dritten Tag an wird die Plattform an einen neuen Standort verschoben und die Fahne entfernt. Im Verlauf der folgenden acht Tage verändert sich der Standort nicht mehr und die Plattform ist für eine schwimmende Maus nicht sichtbar. Somit muss sie die Plattform in dieser Zeit anhand räumlicher Orientierung und Erinnerung finden. Es werden die Zeit bis zum Erreichen der Plattform (90 s, wenn Plattform nicht erreicht wird), die Geschwindigkeit sowie die zurückgelegte Strecke ermittelt.

Am letzten Untersuchungstag (*probe trial*) wird die Plattform aus dem Becken entfernt und der Aufenthaltsort der Testmaus einmal bei einem Lauf von 90 s erfasst. Zur Auswertung wird das Becken in vier Quadranten unterteilt und die Aufenthaltszeit jeweils in Prozent errechnet. Von diesem Resultat lassen sich Rückschlüsse auf die Strategie zum Auffinden der Plattform ziehen.

4.3.2. Fear Conditioning (FC)

Grundlage für diesen Test bildet eine Form der Erinnerung, bei welcher ein neutraler Reiz (akustisches Signal) mit einem negativen Stimulus (elektrischer Schlag) assoziiert und zu einem späteren Zeitpunkt in einer abgeänderten Umgebung erneut induziert wird. Eine häufige Reaktion auf Angst ist Erstarren (93), das hier als Maß für die Erinnerung an die negative Assoziation gewertet wird.

Ein transparenter Acrylglas-Käfig (25 × 28 × 33 cm) mit einem Boden aus elektrisch leitfähigen Metallstäben, eine oberseitige Videokamera und ein

Beschallungssystem innerhalb einer schalldichten Kammer bilden den Versuchsaufbau (Fear Conditioning System, TSE GmbH, Bad Homburg, DE). Die Auswertung der Videoaufzeichnungen erfolgt mit der Software EthoVision® XT (Version 8.0, Noldus Information Technology, Wageningen, NL).

Der erste Untersuchungstag umfasst zunächst eine Gewöhnungsphase von 120 s (*baseline*) gefolgt von einem akustischen Signal (Frequenz 10 000 Hz, 90 dB) für 28 s, an welchen sich ein elektrischer Schlag (2 s, 0,4 mA) anschließt. Nach einer kurzen Pause von 20 s wird der Ton inklusive dem elektrischen Schlag wiederholt und die Testmaus abschließend aus dem Versuchsaufbau genommen. Der zweite Untersuchungstag beginnt mit einer Kontrollphase (120 s) in der unveränderten Umgebung des Vortags (*context*). Darauf wird nach einer Pause von 2 bis 3 h die Umgebung verändert (Geruch, Käfigform, Wandform und -farbe) und erneut ohne akustisches Signal oder Schock das Verhalten für 120 s aufgezeichnet (*cue baseline*). Daran schließt sich erneut der Ton (10 000 Hz, 90 dB) für 120 s an und das Verhalten wird erfasst (*cue*).

Jeder der vier aufgezeichneten Durchläufe (*training, context, cue baseline, cue*) wird hinsichtlich der immobilen Zeit ausgewertet und in Prozent von 120 s angegeben.

4.4. Visuelle Wahrnehmung

4.4.1. Visual Cliff Test

Ziel dieses Tests ist, visuelle Defizite anhand der natürlichen Akrophobie von Mäusen zu ermitteln.

Eine am Boden (Acrylglas) transparente und oben offene Box (70 × 35 × 30 cm) wird so auf der Kante eines Labortisches (1 m Höhe) platziert, dass 50 % der Grundfläche über die Kante hinausragen und daher in diesem Bereich die Höhe visuell wahrgenommen werden kann. Über einen Zeitraum von 5 min wird das Verhalten einer Testmaus per Videokamera aufgezeichnet und später mit der Software EthoVision® XT (Version 8.0, Noldus Information Technology, Wageningen, NL) hinsichtlich des Aufenthaltsortes bestimmt. Dabei wird zwischen einem erhöhten („*elevated*“) und einem ebenerdigen („*grounded*“) Areal unterschieden und die anteilige Aufenthaltszeit prozentual errechnet.

4.5. Krampfneigung

4.5.1. Messung Pentylentetrazol-induzierter Krampfanfälle (PTZ)

Die beobachteten Krämpfe werden durch eine s. c. PTZ-Injektion (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) induziert. Die angewandte Dosis von 50 mg/kg ist die minimale Dosis zur Induktion milder Anfälle bei Mäusen (94). Nach der Injektion werden die Mäuse sofort in einen transparenten Käfig gesetzt und ihr Verhalten für 30 min mittels einer Videokamera aufgezeichnet. Es werden bei diesem akuten Anfallsmodell folgende Phasen als kontinuierliche Parameter der Verhaltensreaktionen unterschieden:

(P1) Hypoaktivität: Diese Phase ist durch eine fortschreitende Abnahme der motorischen Aktivität gekennzeichnet, bis das Tier hockend zur Ruhe kommt oder in Bauchlage vollen Kontakt mit dem Käfiguntergrund hat.

(P2) Teilweise klonischer Anfallsablauf den Kopf betreffend.

(P3) Teilweise klonischer Anfallsablauf, Kopf und Vorderbeine betreffend. Teilweise oder fokale Anfälle dauern in der Regel 1-2 s und werden oft durch Laute begleitet.

(P4) Generalisierte Klone mit plötzlichem Verlust der aufrechten Haltung und/oder Ganzkörper-Klone unter Einbeziehung aller vier Gliedmaßen und des Schwanzes.

(P5) Tonischer Maximal-Anfall, das heißt generalisierter Anfall, durch tonische Hintergliedmaßen-Dehnung gekennzeichnet.

(P6) Tod durch Erstickung innerhalb eines tonischen Anfalls.

Die Anfallrate wird mit geringfügigen Änderungen nach Ferraro und Kollegen (94) anhand der Latenz der Phasen berechnet. Dabei wird jeder Maus ein Anfallswert nach folgender Formel zugewiesen:

$$\text{Anfallswert} = 0,1 \times \left(\frac{1}{\text{Latenz P1}} \right) + 0,2 \times \left(\frac{1}{\text{Latenz P2}} \right) + 0,3 \times \left(\frac{1}{\text{Latenz P3}} \right) + 0,4 \times \left(\frac{1}{\text{Latenz P4}} \right) + 0,5 \times \left(\frac{1}{\text{Latenz Phase5}} \right) + 0,6 \times \left(\frac{1}{\text{Latenz P6}} \right)$$

Aufgrund der Gewichtungsfaktoren (0,1 bis 0,6) steigt bei dieser Art der Analyse der Anfallswert mit dem Grad der Progression sowie der Latenz der Anfalls-Syndrome.

5. Tötung und Präparation

Unmittelbar nach Ermittlung der Phentylentetrazol-induzierten Krampfanfälligkeit werden die Tiere mittels zervikaler Dislokation getötet. Hierbei erfolgt eine Fixation hinter dem Okziput mit einer geschlossenen Schere, dann wird ein ruckartiger, starker Zug an der Schwanzwurzel ausgeübt. Die Durchtrennung des Rückenmarks bzw. der Medulla oblongata und der versorgenden Blutgefäße des Gehirns sind die Folge und führen zum sofortigen Verenden.

Zur Gehirnentnahme wird der Kopf abgetrennt und die Haut medial eröffnet. Nach Freipräparation des Schädels wird das Okziput medial aufgeschnitten und das Schädeldach, unter Schonung des Gehirns, nach rostral entfernt. Mit einem Spatel werden die Gehirnnerven durchtrennt und das Gehirn aus dem Schädel gehoben.

Nach Schockgefrieren in pulverisiertem Trockeneis werden die Gehirne bei -20 °C in luftdichten Tüten gelagert.

6. Kryosektion

Die Herstellung 12 µm dicker frontaler Schnitte wird ab Bregma +3,14 mm im Abstand von 500 µm nach kaudal mit einem Kryostat (Microm HM 560 Cryo-Star, Thermo Fischer Scientific, Walldorf, DE) durchgeführt. Dabei erhält man 16 Schnittebenen, welche auf SuperFrost® Plus-Objekträgern (Thermo Scientific, Menzel-Gläser, Menzel GmbH, Braunschweig, DE) aufgezogen werden. Nach kurzer Trocknung werden die Gewebeschnitte bis zur (immun-) histologischen Untersuchung bei -20 °C gelagert.

Von Ebene 6 (Bregma + 0,64 mm) bis Ebene 14 (Bregma -3,36 mm) wird der Bereich zwischen den Aufnahmeebenen in 8 × 30 µm dicke Scheiben geschnitten und diese so passend aufeinander gelagert, dass man einen 240 µm dicken Gehirnschnitt in Frontalebene erhält. Dieser wird entlang der Trennungslinie der Hemisphären und einer gedachten Linie zwischen ventraler und dorsaler Gehirnhälfte in vier Quadranten geteilt. Die dorsalen Quadranten (ipsilateral = rechts, contralateral = links) werden getrennt aufgenommen und bei -80 °C aufbewahrt. Die erhaltenen acht Quadranten pro Hemisphäre liegen im Schadensbereich und werden für molekularbiologische Untersuchungen verwendet.

7. Histologische Färbung und Auswertung

7.1. Nissl-Färbung

Diese Färbetechnik basiert auf der Bindung des Farbstoffs Kresylviolett an basophile Strukturen wie RNA und DNA. Insbesondere Nukleoli und Ribosomen weisen einen hohen Gehalt an diesen Strukturen auf. Speziell das endoplasmatische Retikulum mit einer Vielzahl von Ribosomen an seiner Membranoberfläche wird angefärbt und in typischen Nissl-Schollen sichtbar. In der Übersicht sind Zellkörper der Neuronen deutlich zu erkennen, wogegen andere Zellstrukturen (z. B. Dendrite und Axone) transparent bleiben. Die Gesamtheit des Nervengewebes verfärbt sich blau-violett, wobei einzelne Neuronen voneinander abgrenzbar bleiben.

Nach einer ca. 60-minütigen Trocknung bei Raumtemperatur erfolgt ein Reinigungsschritt in 70 % Ethanol (AppliChem GmbH, Darmstadt, DE) für 2 min. Die Gehirnschnitte verbleiben nun für 10 min in Kresylviolett (Acetat)-Lösung (Merck KGaA, Darmstadt, DE), bevor überflüssiger Farbstoff durch mehrmaliges Eintauchen in Aqua dest. (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE) entfernt wird. Zur ersten Entwässerung durchlaufen die angefärbten Schnitte eine aufsteigende Alkoholreihe mit jeweils zweimaligem Eintauchen in Ethanol 70 % und 96 %. Weiterhin werden letzte Wasserreste bei 7 min in Roti®-Histol (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE) eliminiert, ehe die Gehirnschnitte mit dem Eindeckmedium Roti®-Histokit (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE) eingeschlossen werden. Abschließend wird ein Deckglas (Diagonal GmbH & Co KG, Münster, DE) zum mechanischen Schutz der Präparate auf dem Objektträger fixiert.

7.2. Bestimmung des Schadenvolumens

Anhand der nach Nissl gefärbten Gehirnschnitte lässt sich mit der Software DeltaPix® InSight (Version 4.0, DeltaPix, Maalov, DK) unter dem Mikroskop (Mikroskope Wild M420, Leica, Solms, DE) gesundes Nervengewebe abgrenzen und das Schadenvolumen sowie das Hemisphärenvolumen ermitteln. Von allen Gehirnen und Ebenen wird die Gesamtfläche beider Hemisphären (ipsilateral und contralateral) sowie auf der ipsilateralen Seite zusätzlich die Fläche des gesunden

Nervengewebes ausgemessen. Aus der Differenz zwischen Gesamtfläche und gesundem Gewebe auf der ipsilateralen Seite ergibt sich die Schadensfläche, aus welcher sich anhand folgender Formel das Schadensvolumen berechnen lässt:

$$V = \sum_1^{16} Ax \times 500 \mu m$$

7.3. Iba-1-Färbung

Das Protein Iba1 (ionized calcium binding adaptor molecule 1) wird spezifisch in Mikroglia und Makrophagen exprimiert und kann im Gehirn als Mikroglia-Marker verwendet werden. Weiterhin deutet eine verstärkte Expression von Iba-1 auf die Aktivierung von Mikroglia/Makrophagen hin (95).

Für diese immunhistologische Untersuchung werden die Gehirnschnitte zunächst für mindestens 30 min bei Raumtemperatur aufgetaut und getrocknet. Die Fixierung der Schnitte erfolgt für 10 min in 4 % PFA (Paraformaldehyd). Nach einem zweimaligen Waschschrift in PBS (phosphatgepufferte Salzlösung) folgt zur Reduktion des Hintergrundsignals die Hemmung endogener Peroxidasen für 5 min in 0,3 % H₂O₂. Nach erneutem Waschen mit PBS inkubieren die Schnitte 1 h in einer Blockierungslösung (5 % NGS + 0,5 % BSA in PBST). Dies führt zur Sättigung freier Bindungsstellen mit dem Ziel, die Bildung unspezifischer Bindungen zu minimieren. Der polyklonale Primärantikörper (1:500 in Blockierungslösung, Anti-Iba1 Rabbit, Wako Cat. #019-19741, WAKO Chemicals, Neuss, DE) wirkt über Nacht bei 4 °C in einer Feuchtkammer ein. Am zweiten Tag werden alle nicht gebundenen Antikörper bei zweimaligem Waschen in PBST entfernt, bevor der Sekundärantikörper (1:500 in Blockierungslösung, Biotinylated Goat Anti Rabbit IgG (H+L), #ab64256, Abcam®, Cambridge, UK) für 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. An einen weiteren Waschschrift mit PBST schließt sich eine zweistündige Einwirkzeit mit dem Avidin-Peroxidase-Komplex (Vectastain® ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA) an. Dieser bindet an den Sekundärantikörper und die Peroxidase reagiert nach erneutem PBST-Waschen mit Diaminobenzidin (DAKO, Hamburg, DE). Die dabei schnell eintretende Braunfärbung wird nach exakt 65 s durch Waschen mit PBS unterbrochen, um eine adäquate Signalstärke zu erhalten. Nun werden unerwünschte Rückstände mit Aqua dest. (Braun, Melsungen, DE) entfernt und

die Schnitte für 30 min getrocknet. Schließlich erfolgt eine Entwässerung mit Roti®-Histol (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE) sowie ein Eindecken mit Roti®-Histokit (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE) und Deckgläsern (Diagonal GmbH & Co KG, Münster, DE).

7.4. Bestimmung der Mikrogliazellaktivierung

Die Auswertung der Mikrogliazellaktivierung wird ausschließlich hinsichtlich der Zellkörperzahl, nicht jedoch hinsichtlich der Zellmorphologie vorgenommen. Die Iba-1-postiven Mikroglia sind dunkelbraun gefärbt und werden auf einer Fläche von $0,52 \times 0,65$ mm (ROI) bei 10-facher Vergrößerung (inverses Mikroskop Axiovert 200, Carl Zeiss AG, Oberkochen, DE) beidseits im Kortex ausgezählt. Ipsilateral grenzt das auszuzählende Feld an den Schaden (Abb. 3), wobei contralateral ein spiegelbildlicher Bereich (Achse ist Trennungslinie der Hemisphären) gewählt wird. Für Sham-operierte Gehirne wird an den sich entsprechenden kortikalen Arealen beidseits ausgezählt. Die Zellkörperzahl wird auf den vier Ebenen zwischen Bregma +0,14 cm und -1,86 cm beidseitig mit der Software ImageJ (Version 1.47, National Institutes of Health, Bethesda, USA) ermittelt und für jede Hemisphäre das arithmetische Mittel errechnet.

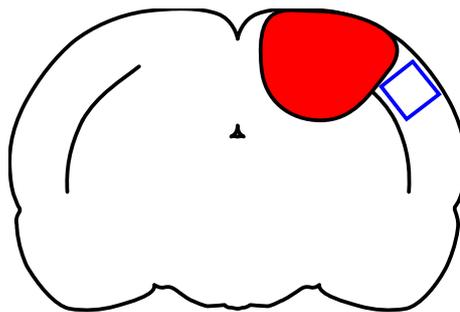


Abbildung 3: Schematische Darstellung des ausgezählten ipsilateralen Felds hinsichtlich der Mikrogliazellaktivierung

Bei dieser quantitativen Zellzahlbestimmung besteht das Risiko einer Verzerrung des Resultats durch Abweichungen des Extrazellularräumvolumens bzw. Veränderungen der Mikrogliamorphologie im Schadensbereich (96, 97). Die durch ein SHT ausgelöste Störung der Blut-Hirn-Schranke führt dabei zur

Ödematisierung des angrenzenden Hirngewebes wenige Stunden bis Tage nach der Verletzung (98-102). Dieser Prozess erreicht sein Maximum 24 bis 48 Stunden nach dem CCI und nimmt danach stetig ab (103). Die hier untersuchten Zeitpunkte liegen mehrere Wochen bis Monate nach der maximalen Ödematisierung im Schadensbereich, trotzdem kann eine Modifikation des Extrazellularraums nicht ausgeschlossen werden.

8. Molekularbiologische Methoden

Hier beschriebene molekularbiologische Methoden werden hinsichtlich der Expression der Zielgene *Il1 β* , *Il6*, *Gfap*, *Lcn2*, *Gadd45b*, *Gap43*, *Arg1* und *L1cam* durchgeführt.

8.1. Ribonukleinsäure-Extraktion

Die in den dorsalen Gehirnquadranten enthaltene RNA wird nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (104) extrahiert. Alle verwendeten Substanzen und die Mini-Spin-Säulen sind im verwendeten RNeasy® Mini Kit (Qiagen N.V., Venlo, NL) enthalten.

Dabei werden zunächst die Gewebeproben in 0,7 ml Qiazol-Reagenz für 2 min mit einer Metallkugel im Mastermill (MM 300, Retsch Technology GmbH, Haan, DE) bei 20 Hertz zerkleinert und danach für 5 min stehen gelassen. So wird das Gehirnmaterial lysiert, enthaltene Proteine denaturiert und somit RNasen und andere Enzyme inaktiviert. Nach Zugabe von 140 μ l Chloroform (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) wird die Flüssigkeit für mindestens 15 s auf einem Schüttler (Vortexmischer Reax control, Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Hamburg, DE) vermenget, bevor sie erneut für 2 min steht. Zur Phasentrennung wird das Gemisch für 15 min bei 4 °C und 12000 \times g-Kraft zentrifugiert (Centrifuge 5804 R, Eppendorf AG, Hamburg, DE), wonach drei Phasen abgrenzbar sind. Die obere wässrige, RNA-haltige Phase wird vorsichtig abpipettiert und zu 500 μ l 100 % Ethanol (Carl Roth, Karlsruhe, DE) gegeben. Die weiße, DNA-haltige Interphase sowie die untere hell-rote, Protein-haltige Phase werden verworfen. Im Anschluss wird zur Präzipitation der RNA das Ethanolgemisch auf eine Mini-Spin-Säule aufgetragen und 15 s bei 8.000 \times g-Kraft zentrifugiert (Mini Star silverline, VWR international, Radnor, USA). Dabei binden sich RNA-Moleküle selektiv an die Silikatmembran der Säule. In einem ersten Waschschriff werden 350 μ l RWT-Puffer auf die Mini-Spin-Säule aufgetragen und 15 s bei 8.000 \times g-Kraft zentrifugiert (VWR international, Mini Star silverline, Radnor, USA). Zur Minimierung möglicher DNA-Verunreinigungen werden 80 μ l DNase-Mix (610 μ l RDD-Puffer + 80 μ l DNase) auf die Membran aufgetragen und 15 min dort belassen. An diesen DNase-Verdau schließt sich ein Waschschriff mit 350 μ l RWT-Puffer sowie zwei weitere Waschschriffe mit jeweils 500 μ l RPE Puffer an.

Wie schon zuvor werden die Waschpuffer 15 s bei $8.000 \times g$ -Kraft durch die Säulen zentrifugiert (VWR international, Mini Star silverline, Radnor, USA) und der Durchlauf verworfen. Zum Trocknen der Säulen werden sie für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit in der Minizentrifuge (VWR international, Mini Star silverline, Radnor, USA) belassen.

Zur Eluierung der RNA aus der Silikatmembran werden $30 \mu\text{l}$ RNA-freies Wasser auf die Säule pipettiert und 1 min bei $8.000 \times g$ -Kraft durch diese zentrifugiert. Die RNA löst sich im Wasser und ihre Konzentration und Reinheit kann nun photometrisch bestimmt werden. Hierzu werden $2 \mu\text{l}$ RNA-Wassergemisch auf das Photometer (NanoVue™, GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK) aufgetragen und deren optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm gemessen. Das Absorptionsmaximum von RNA liegt bei einer Wellenlänge von 260 nm, eine optische Dichte von 1,0 entspricht hier einer Konzentration von $40 \mu\text{g/ml}$. Dementsprechend kann die Gesamtkonzentration in der Probe anhand folgender Formel berechnet werden:

$$\alpha(\text{RNA}) = OD(260) \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40 [\mu\text{g/ml}]$$

Proteine haben ihr Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 280 nm, so dass sich mögliche Kontaminationen mit folgender Formel berechnen lassen:

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

Reinheitsgrad-Werte zwischen 1,8 und 2,1 weisen auf eine geringe bis keine Kontamination hin und können zur Synthetisierung von komplementärer DNA (complementary DNA, cDNA) genutzt werden.

8.2. cDNA-Synthetisierung

Vor einer Polymerase Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) muss die in der Probe enthaltene und zuvor extrahierte RNA in cDNA umgeschrieben bzw. eine reverse Transkription durchgeführt werden. Die wird mit einem QuantiTect® *Reverse Transcription Kit* (Qiagen N.V., Venlo, NL) entsprechend dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Dabei werden zunächst Reste der genomischen DNA mittels einem gDNA *wipeout buffer* (Qiagen N.V., Venlo, NL) eliminiert. Im nächsten Schritt wird eine DNA-Polymerase bzw. reverse

Transkriptase zur Probe gegeben, welche vorhandene RNA-Stränge als Matrize verwendet und dazu komplementäre DNA-Stränge erzeugt. Die noch zusammenhängenden DNA- und RNA-Stränge werden im Anschluss hydrolysiert und voneinander separiert. Nach Abschluss der cDNA-Synthese wird das Produkt bei -80 °C eingefroren und kann in dieser Form gelagert werden.

8.3. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Ziel dieser Methode ist eine kontrollierte Vervielfältigung von DNA. Sie basiert auf einer Abfolge von mehreren Zyklen, innerhalb derer die DNA verdoppelt wird und das Produkt jedes Zyklus als Ausgangssubstanz für den nächsten Zyklus dient. Das Ergebnis ist eine exponentielle Vermehrung der DNA. Der amplifizierte Abschnitt der DNA kann durch die Auswahl spezieller Oligonukleotid-Primer bestimmt werden. Diese bestehen aus ca. 20 Nukleotiden, deren Sequenz sich unterscheidet und ausschlaggebend ist für die Bindungsstelle des Primers auf dem DNA-Strang. Sie dienen als Ansatzstellen für DNA-Polymerasen, welche einen komplementären DNA-Strang zum zwischen den Primern liegenden Abschnitt erstellen. Durch die Auswahl der Primerpaare kann die Expression unterschiedlicher Gene untersucht werden.

Jeder PCR-Zyklus umfasst drei Schritte. Zunächst erfolgt mittels Erhitzung der Probe auf $90 - 95\text{ °C}$ eine Denaturierung und Trennung der doppelsträngigen DNA durch Öffnung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Einzelsträngen. Die Primerhybridisierung an die freiliegende DNA im zweiten Schritt erfordert eine Abkühlung, da die optimale Temperatur zur spezifischen Anlagerung der Primer je nach Sequenz und Größe der Oligonukleotide i.d.R. zwischen $55 - 65\text{ °C}$ liegt. Abschließend nutzt eine DNA-Polymerase den Primer als Ansatzstelle zur Amplifikation der jeweils komplementären Nukleotide an den Einzelstrang. In Abhängigkeit vom Arbeitsoptimum der DNA-Polymerase wird dazu die Probe erneut leicht erhitzt.

8.4. Quantitative Echtzeit-PCR (real-time PCR)

Bei der qPCR handelt es sich um eine Erweiterung des klassischen PCR-Verfahrens. Sie erlaubt eine Quantifizierung der DNA-Menge in Echtzeit. Dazu wird die amplifizierte DNA anhand von fluoreszierenden Sonden oder dem Cyanin-Farbstoff SYBR Green (Absolute Blue qPCR SybrgreenMix, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) markiert. Diese werden durch Licht angeregt und das darauf emittierte Fluoreszenzsignal nimmt proportional zur Menge an PCR-Produkten zu. Die Durchführung der qPCR und die Berechnung der cDNA-Konzentration wurde mit einem LightCycler® 480 System (F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, CH) sowie der dazugehörigen LightCycler® Software (Version 4.5, F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, CH) ausgeführt.

Nach grafischer Auftragung des Fluoreszenzsignals gegen die Zahl an durchlaufenen PCR-Zyklen entsteht eine Kurve, welche Rückschlüsse auf die Menge amplifizierter cDNA zulässt. Der typische Kurvenverlauf lässt sich in eine Anfangsphase mit niedrigem, eine exponentielle Wachstumsphase mit ansteigendem und eine Plateauphase mit konstant hohem Fluoreszenzsignal unterteilen. Nur während der exponentiellen Wachstumsphase herrschen optimale Reaktionsbedingungen bezogen auf die Temperatur sowie die Template-, Primer-, Polymerase-, Substrat- und Produktmenge. In der Wachstumsphase werden *crossing points* (CP) festgelegt. Der CP beschreibt den Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmals signifikant die Hintergrund-Fluoreszenz übersteigt. Ein früheres Erreichen des CP entspricht einer kleineren Zyklenzahl bzw. einer höheren Konzentration amplifizierter cDNA in der Probe.

Parallel zu den Probelösungen wird die Verdünnungsreihe einer Standardlösung mit bekannter cDNA-Konzentration im LightCycler® 480 System (F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, CH) untersucht und eine Standardkurve ermittelt. Ein Abgleich der Probenergebnisse mit dieser Standardkurve lässt Rückschlüsse auf die cDNA-Konzentration der untersuchten Proben bzw. auf die RNA-Konzentration der Ausgangsprobe zu.

Um abschließend Aussagen zur Expression des Zielgens treffen zu können, erfolgt eine Normalisierung gegenüber des *housekeeping*-Gens *Ppia* (Cyclophilin-A). Das *Ppia*-Gen wurde zuvor als valider Normalisator für das hier verwendete CCI-Modell beschrieben (105). Die Normalisierung der Expressionsergebnisse

erfolgt mit einer effizienz-korrigierten relativen Quantifizierung nach der $\Delta\Delta\text{CP}$ -Methode. Dabei wird zunächst der CP-Wert des zu untersuchenden Zielgens mit dem CP-Wert des Referenzgens normalisiert und in einem zweiten Schritt auf eine Standardprobe bezogen. Verschiedene Gene haben abweichende PCR-Effizienzen mit einer 1,7- bis 1,9-fachen Vervielfältigung pro PCR-Zyklus. Um geringe Schwankungen in der Effizienz von Zielgenen und Referenzgenen zu berücksichtigen wird die zuvor ermittelte Effizienz für jedes Zielgen und das Referenzgen berücksichtigt. Daraus ergibt sich folgende Formel zur Ermittlung der Zielgenexpression prozentual zur Referenzgenexpression (106):

$$\text{Ratio}_{(\text{Zielgenexpression})} = \frac{(\text{Effizienz}_{\text{Zielgen}})^{\Delta\text{CP}} \text{Zielgen}^{(\text{MW/Kontrolle-Behandlung})}}{(\text{Effizienz}_{\text{Referenzgen}})^{\Delta\text{CP}} \text{Referenzgen}^{(\text{MW/Kontrolle-Behandlung})}} \times 100$$

Somit können die Ergebnisse aller Proben trotz unterschiedlicher Probenmengen, abweichender Effizienz der reversen Transkription und Messfehlern der RNA-Konzentration hinsichtlich der Expression des Zielgens miteinander verglichen werden.

9. Statistische Datenauswertung

Die statistische Analyse und graphische Darstellung werden mit der Software Prism 6 für Mac OS X (Version 6.0c, GraphPad Software, San Diego, USA) berechnet und erstellt. Das Signifikanzniveau wird für alle Berechnungen einheitlich festgelegt, so dass p-Werte $<0,05$ als signifikant gelten. Bei der Untersuchung nach Shapiro-Wilk's zeigte sich, dass ein Großteil der Ergebnisse mit Ausnahme der Gewichtskontrolle, des MWM, des NDS und der histologischen Bestimmung des Schadensvolumens keine Normalverteilung aufweist. Die Ergebnisse der histologischen Bestimmung der Mikrogliazellaktivierung und der molekularbiologischen Methoden lassen aufgrund der niedrigen Kontrollgruppengröße ($n = 5$) keine Prüfung der Normalverteilung zu. Es wird daher bei allen Ergebnissen mit Ausnahme der Gewichtskontrolle, des MWM, des NDS und der histologischen Bestimmung des Schadensvolumens von keiner Normalverteilung ausgegangen.

Werden zwei Gruppen ohne Normalverteilung zu einem Zeitpunkt verglichen, wird das Signifikanzniveau anhand des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt und die graphische Darstellung erfolgt als Boxplot (Median, oberes und unteres Quartil, Whisker bis zum größten bzw. kleinsten Wert → deckt gesamte Spannweite der Daten ab). Bei anzunehmender Normalverteilung wird das Signifikanzniveau anhand des ungepaarten t-Tests bestimmt und die grafische Darstellung erfolgt als Säulendiagramm \pm dem Standardfehler (SEM).

Zur Betrachtung einer Entwicklung über mehrere Zeitpunkte werden die Gruppen mittels Two-way ANOVA-Test auf signifikante Unterschiede geprüft und zusätzlich mit der *area under the curve* (AUC) verglichen. Dargestellt wird in diesem Fall das arithmetische Mittel in einem Liniendiagramm \pm Standardfehler (SEM).

V. ERGEBNISSE

Die vorgestellten Ergebnisse beziehen sich auf zwei Vergleichsdimensionen. Entsprechend dem Experimentcharakter der Untersuchung sind Unterschiede zwischen CCI-Gruppe (mit induziertem SHT) und Sham-Gruppe (mit Scheinoperation) zentral. Die Besonderheit der vorliegenden Untersuchung besteht darin, dass diese Unterschiede nicht nur zu einem frühen (Testbeginn 14 Tage und Tötung/Hirnentnahme 58 Tage nach OP), sondern auch zu einem späten Zeitpunkt (Testbeginn 184 Tage und Tötung/Hirnentnahme 225 Tage nach OP) untersucht werden. Um Unklarheiten hinsichtlich der Vergleichsdimensionen zu vermeiden, wird der zentrale CCI/Sham-Vergleich im Folgenden jeweils zunächst für den frühen und danach gesondert für den späten Untersuchungszeitpunkt dargestellt. Am Ende folgt, soweit sinnvoll, der Vergleich der beiden Zeitpunkte, aus dem auf mögliche Entwicklungen geschlossen werden kann. Ein direkter Vergleich ist auf dieser Ebene nur bedingt möglich, da die Versuchstiere zu den verschiedenen Zeitpunkten ein anderes Alter aufweisen und alters- sowie gewichtsbedingten Einflüssen unterliegen.

1. Körpergewichtskontrolle

Die Entwicklung des Körpergewichts in den Langzeitüberlebens-Gruppen stellt sich wie folgt dar:

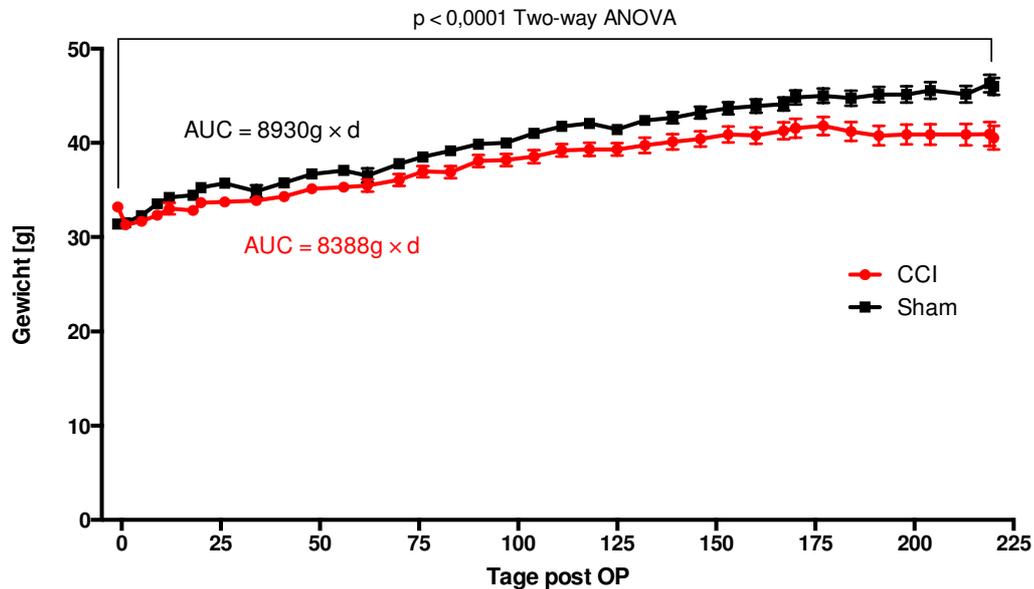


Abbildung 4: Entwicklung des mittleren Körpergewichts in der Langzeitüberlebens-Gruppe

Da aus vorherigen Studien bekannt ist, dass Mäuse nach einem CCI innerhalb von 24 h ca. 5 – 10 % Körpergewicht verlieren (107), wurden in dieser Studie schwere Tiere in die CCI-Gruppe genommen und erst nach der Gruppenzuteilung randomisiert. Daraus ergibt sich ein gewollter präoperativer Unterschied zwischen den Gruppen, der jedoch 24 h nach CCI nicht mehr besteht. Vorteil dieser Versuchsplanung ist ein nahezu gleiches Gewichtsniveau 24 h nach SHT und die Minimierung gewichtsbedingter Versuchseinflüsse. Weiterhin minimiert sich das Risiko von Tierverlusten durch plötzliche Gewichtsabnahme bei Versuchstieren im unteren Gewichtsspektrum.

Über die gesamte Kontrollzeit zeigt sich, dass beide Gruppen an Körpergewicht zunehmen, wobei die Gewichtszunahme in der CCI-Gruppe (Tag 1: AM 31,31 g \pm SEM 0,4724; Tag 220: AM 40,54 g \pm SEM 1,259) mit durchschnittlich 9,14 g deutlich niedriger ausfällt als bei scheinoperierten Tieren (Tag 1: AM 31,36 g \pm SEM 0,3258; Tag 220: AM 46,01 g \pm SEM 0,8948) mit durchschnittlich 14,65 g. Ab Kontrolltag 18 lässt sich ein deutlicher Unterschied bestimmen ($p = 0,035$), der seinen maximalen Umfang kurz vor Tötung der Tiere am Tag 220 ($p =$

0,0008) erreicht. Die Berechnung der AUC ergibt eine Differenz von $542 \text{ g} \times \text{d}$ (nach SHT $8388 \text{ g} \times \text{d}$, Kontrollgruppe $8930 \text{ g} \times \text{d}$).

Weiter fällt auf, dass die Gewichtszunahme in der CCI-Gruppe mit Beginn der verhaltensbiologischen Untersuchungen an Tag 184 zum Erliegen kommt bzw. sogar ein leichter Gewichtsverlust von durchschnittlich $1,27 \text{ g}$ (Tag 177: AM $41,81 \text{ g} \pm \text{SEM } 0,9738$; Tag 220: AM $40,54 \text{ g} \pm \text{SEM } 1,259$) bis zum Versuchsende festzustellen ist, während das mittlere Körpergewicht in der scheinoperierten Gruppe weiter zunimmt.

2. Verhaltensbiologische Untersuchungen

Unterschieden werden die Gruppen Kurzzeitüberleben (Testbeginn 14 Tage post OP) und Langzeitüberleben (Testbeginn ca. sechs Monate post OP) sowie CCI (mit SHT) und Sham (scheinoperiert).

2.1. Neurological Deficit Score (NDS)

2.1.1. CCI vs. Sham zum frühen Untersuchungszeitpunkt

Die mittlere Gesamtpunktzahl in beiden Testgruppen von kurzer Überlebenszeit zeigt folgendes Liniendiagramm:

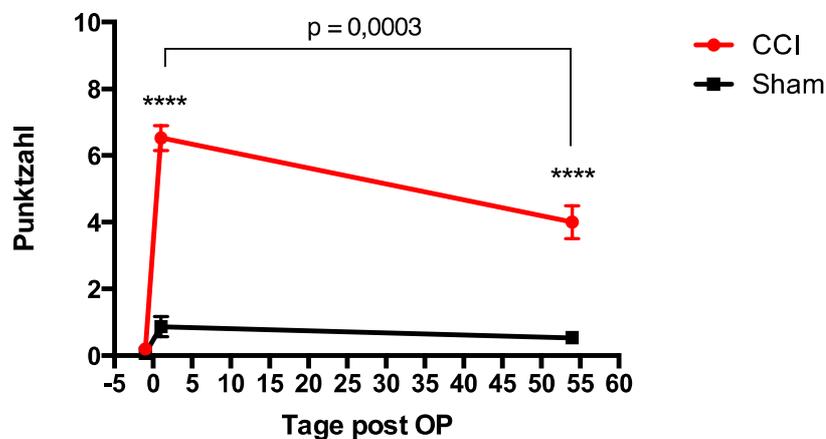


Abbildung 5: Mittlere Gesamtpunktzahl im NDS bei Kurzzeitüberleben zu den Testzeitpunkten prä OP, Tag 1 und Tag 54 post OP

Präoperativ weist kein Tier eine Punktzahl von mehr als zwei auf und es zeigen sich keine neurologischen Auffälligkeiten oder Unterschiede in den Gruppen. Ausgehend von diesem Niveau steigt die Punktzahl in der CCI-Gruppe im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren auf ein Maximum (AM 6,533 Punkte \pm SEM 0,3763) nach 24 h, mit einem hoch signifikanten Unterschied zu den scheinoperierten Tieren ($p < 0,001$), der auch nach 54 Tagen deutlich bestehen bleibt (AM 4,0 Punkte \pm SEM 0,4976, Signifikanz $p < 0,001$). Die Punktzahl in der Kontrollgruppe steigt 24 h post OP geringfügig an (prä OP: AM 0,6667 Punkte \pm SEM 0,6667; 24 h: AM 0,8667 Punkte \pm SEM 0,3065) und verbleibt auf diesem Niveau bis zum Tag 54 (AM 0,5333 Punkte \pm SEM 0,1333, Abb. 5).

Die Berechnung mittels Two-way ANOVA liefert das gleiche Ergebnis bezogen auf die Art der Operation ($p < 0,001$) und die zeitliche Entwicklung ($p < 0,001$).

Um eine Aussage über die Entwicklung des neurologischen Defizits treffen zu können, wird innerhalb der CCI-Gruppe zwischen den Tagen 1 und 54 mittels Mann-Whitney-U-Test verglichen. Hier zeigt sich eine deutliche (24 h post OP: AM 6,533 Punkte \pm SEM 0,3763; 54 Tage post OP: AM 4,0 Punkte \pm SEM 0,4976) und auch statistisch signifikante ($p = 0,003$) Abnahme der Punktzahl bzw. der neurologischen Einschränkung.

2.1.2. CCI vs. Sham zum späten Untersuchungszeitpunkt

In der Langzeitüberlebens-Gruppe zeigt sich Folgendes:

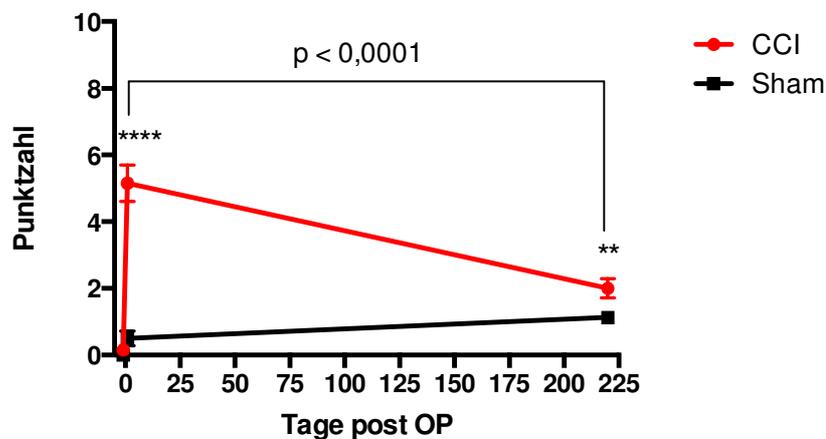


Abbildung 6: Mittlere Gesamtpunktzahl im NDS bei Langzeitüberleben zu den Testzeitpunkten prä OP, Tag 1 und Tag 225 post OP

Wie bei der Kurzzeitüberlebens-Gruppe starten alle Tiere hinsichtlich des NDS von einem niedrigen prä-operativen Niveau (CCI: 0,15 Punkte \pm SEM 0,109; Sham: 0,0 \pm SEM 0,0). Er ist einen Tag nach CCI im Vergleich zu scheinoperierten Mäusen signifikant erhöht (CCI: AM 5,150 Punkte \pm SEM 0,5538; Sham: AM 0,5 Punkte \pm SEM 0,2236 Punkte; $p < 0,001$). Am Tag 220 bleibt der NDS in den CCI-Tieren im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren signifikant erhöht (CCI: AM 2,0 Punkte \pm SEM 0,2862; Sham: AM 1,125 Punkte \pm SEM 0,1548; $p = 0,0087$). Weiterhin lässt sich eine geringfügige (prä OP: AM 0,0 Punkte \pm SEM 0,0; 24 h post OP: AM 0,5 Punkte \pm SEM 0,2236), aber statistisch signifikante ($p = 0,0434$) Punktzahlerhöhung der scheinoperierten Tiere 24 h post OP beobachten (Abb. 6). Das Ergebnis der Berechnung mittels Two-way ANOVA liefert einen deutlichen Unterschied bezogen auf die Art der Operation ($p < 0,001$) und die zeitliche Entwicklung ($p < 0,001$).

2.1.3. Vergleich der Untersuchungszeitpunkte

Der Vergleich innerhalb der CCI-Gruppe zwischen Tag 1 und Tag 220 zeigt eine hoch signifikante ($p < 0,0001$) Abnahme der im NDS erreichten Punktzahl (24 h post OP: AM 5,150 Punkte \pm SEM 0,554; 220 Tage post OP: AM 2,0 Punkte \pm SEM 0,286) um 3,15 Punkte und belegt hier wie bei der Kurzzeitüberlebens-Gruppe eine Verminderung der neurologischen Einschränkung. Demgegenüber weisen die scheinoperierten Tiere im Vergleich dieser beiden Testzeitpunkte eine signifikante ($p = 0,0044$) Zunahme der erreichten Punktzahl (24 h post OP: AM 0,5 Punkte \pm SEM 0,2236; 220 Tage post OP: AM 1,125 Punkte \pm SEM 0,1548) um 0,6125 Punkte und damit verminderte neurologische Fähigkeiten an Tag 220 auf.

Betrachtet man die Kurzzeit- und die Langzeitüberlebensgruppe mit CCI, lässt sich ab einem Maximum an Tag 1 post OP (AM 5,743 Punkte \pm SEM 0,369) für alle Tiere mit einem SHT eine fortlaufende Abnahme der Punktzahl im NDS und damit eine Zunahme der neurologischen Fähigkeit feststellen, was sich nach Tag 54 (AM 4,0 Punkte \pm SEM 0,497) fortsetzt und den niedrigsten Wert an Tag 220 post OP (AM 2,0 Punkte \pm SEM 0,286) erreicht. Ein Vergleich dieser beiden Testzeitpunkte ist in Abbildung 7 dargestellt und zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied ($p = 0,002$).

Eine Gegenüberstellung der Kurzzeit- und Langzeitüberlebensgruppen der scheinoperierten Kontrollgruppen ergibt dagegen eine signifikante ($p = 0,0143$) Steigerung (54 Tage post OP: AM 0,5333 Punkte \pm SEM 0,1333; 220 Tage post OP: AM 1,125 Punkte \pm SEM 0,1548) der Punktzahl um 0,5917 und somit eine Abnahme der neurologischen Fähigkeiten.

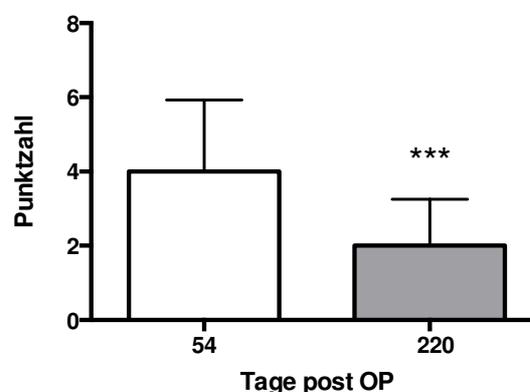


Abbildung 7: Mittlere Gesamtpunktzahl im NDS prä mortem der Kurzzeitüberlebens-Gruppe (Tag 54) vs. Langzeitüberlebens-Gruppe (Tag 220)

2.2. Rotarod

2.2.1. CCI vs. Sham zum frühen Untersuchungszeitpunkt

Zum frühen Testzeitpunkt (21 Tage post OP) fallen Tiere mit einem SHT (Md. 42 s, Iqa. 35 – 64 s) im Vergleich zu scheinoperierten Tieren (Md. 73 s, Iqa. 53 – 115 s) im Mittel 31 s früher vom rotierenden Rotarod-Zylinder. Dieser Unterschied ist signifikant ($p = 0,0035$). Abbildung 8 veranschaulicht die Differenz zwischen den Kurzzeitüberlebens-Gruppen anhand der Dauer der Latenz bis zum Herabfallen.

2.2.2. CCI vs. Sham zum späten Untersuchungszeitpunkt

Die Langzeitüberlebensgruppe wurde 191 Tage post OP getestet und zeigte gegenüber der scheinoperierten Tiere keine Unterschiede im Rotarod-Test auf ($p = 0,7125$). Es lässt sich kein Unterschied zwischen Mäusen mit (Md. 53 s, Iqa. 42 – 74 s) und ohne (Md. 56,5 s, Iqa. 45,25 – 65,75 s) SHT feststellen, wie Abbildung 8 auf der rechten Seite zeigt.

2.2.3. Vergleich der Untersuchungszeitpunkte

Ein Vergleich der Kontrollgruppen zwischen dem frühen (Md. 73 s, Iqa. 53 – 115 s) und dem späten Untersuchungszeitpunkt (Md. 56,5 s, Iqa. 45,25 – 65,75 s) ergibt eine mittlere Abnahme von 16,5 s zum späten Untersuchungszeitpunkt. Diese Differenz ist statistisch nicht signifikant ($p = 0,0529$).

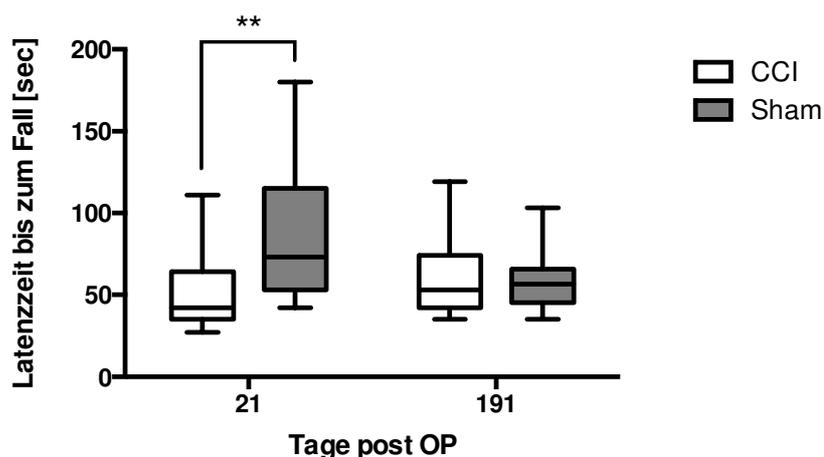


Abbildung 8: Latenz bis zum Herabfallen vom Rotarod 21 und 191 Tage post OP

2.3. CatWalk® XT

Aufgrund der Vielzahl an erfassten Parametern werden hier nur die wichtigsten dargestellt, die einen signifikanten Gruppenunterschied aufweisen.

2.3.1. CCI vs. Sham zum frühen Untersuchungszeitpunkt

Der zentrale Messwert, der mit allen anderen Parametern zusammenhängt, ist die durchschnittliche Geschwindigkeit (*Average walk speed*). Nach 40 – 42 Tagen post OP ist diese bei Mäusen mit SHT signifikant ($p = 0,0066$) niedriger, mit einem durchschnittlichen Unterschied von 72,6 mm/s (Tiere mit SHT Md. 201,7 mm/s, Iqa. 162,6 – 228,6 mm/s, scheinoperierte Tiere Md. 274,3 mm/s, Iqa. 235,6 – 312,6 mm/s) zwischen den Testgruppen (Abb. 9A).

Weitere Parameter mit signifikanten Abweichungen zwischen Gruppen mit SHT und scheinoperierten sind die *Print position* ($p = 0,0011$, Abb. 9B), *Cadence* ($p = 0,0075$, Abb. 9C), *Base of support* ($p = 0,0061$, Abb. 9D), *Stance* ($p = 0,0074$, Abb. 9E), *Stride length* ($p < 0,0001$, Abb. 9F), *Swing speed* ($p < 0,0001$, Abb. 9G), *Swing* ($p < 0,0001$, Abb. 9H), *Print width* ($p = 0,0121$, Abb. 9I) und *Print length* ($p = 0,0160$, Abb. 9J). Eine Auswahl der Ergebnisse ist in Abbildung 9 dargestellt.

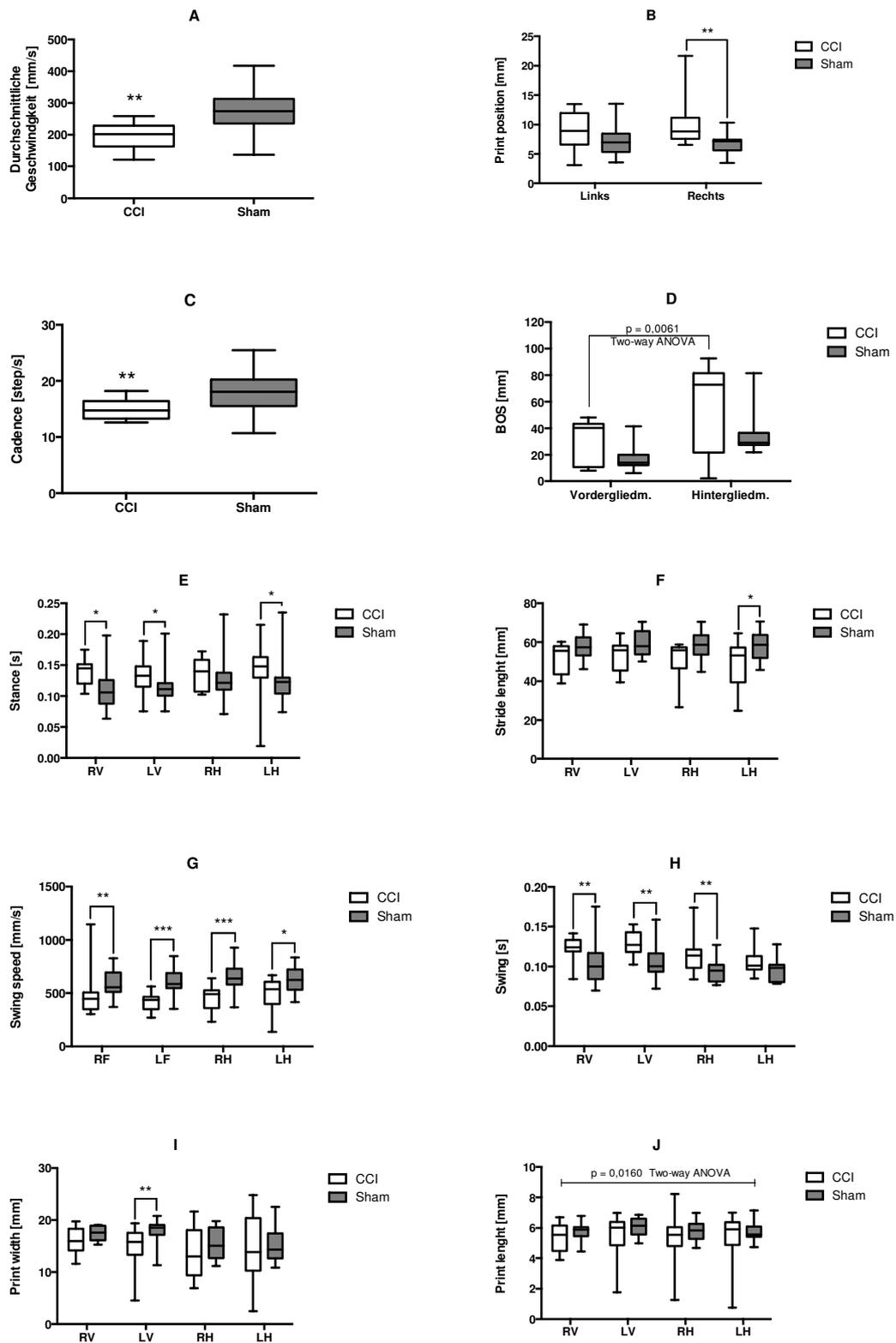


Abbildung 9: Durchschnittliche Geschwindigkeit (A), *Print position* (B), *Cadence* (C), *Base of support* (D), *Stance* (E), *Stride length* (F), *Swing speed* (G), *Swing* (H), *Print width* (I) und *Print length* (J) im CatWalk® XT 40 – 42 Tage post OP

2.3.2. CCI vs. Sham zum späten Untersuchungszeitpunkt

Parameter mit signifikanter Differenz zwischen CCI- und Sham-Gruppe zum späten Untersuchungszeitpunkt (209 – 211 Tage post OP) sind die durchschnittliche Geschwindigkeit ($p = 0,0461$, Abb. 10A), *Cadence* ($p = 0,005$, Abb. 10B), *Swing* ($p < 0,0001$, Abb. 10C), *Stance* ($p < 0,0001$, Abb. 10D) und *Step pattern* ($p = 0,0004$, Abb. 10E). Abbildung 10 veranschaulicht alle hier aufgeführten Ergebnisse zum späten Untersuchungszeitpunkt.

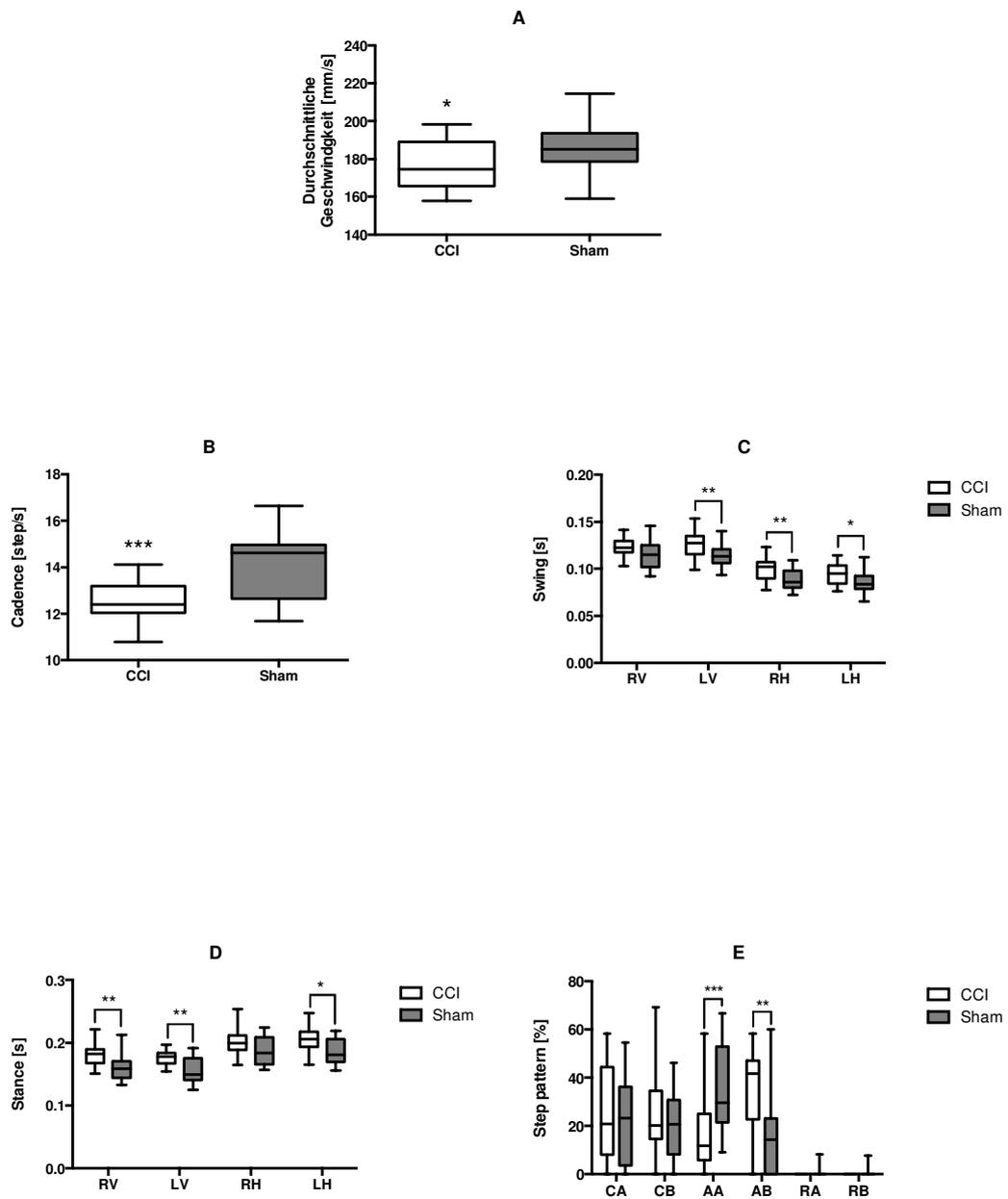


Abbildung 10: Durchschnittliche Geschwindigkeit (A), *Cadence* (B), *Swing* (C), *Stance* (D) und *Step pattern* (E) im CatWalk® XT 209 – 211 Tage post OP

2.3.3. Vergleich der Untersuchungszeitpunkte

Die Gesamtzahl der abweichenden Parameter beträgt zum frühen Untersuchungszeitpunkt zehn und reduziert sich mehrere Monate später auf fünf.

209 – 211 Tage post OP ist die durchschnittliche Geschwindigkeit von Tieren mit SHT und scheinoperierten gegenüber dem Kurzzeitüberlebenszeitpunkt generell erniedrigt. Die Verlangsamung fällt bei scheinoperierten Mäusen deutlicher als bei Tieren mit SHT aus (Tiere mit SHT Md. 174,6 mm/s, Iqa. 165,6 – 188,9 mm/s, scheinoperierte Tiere Md. 185,2 mm/s, Iqa. 178,6 – 193,5,6 mm/s). Dadurch ergibt sich zum späten Untersuchungszeitpunkt eine niedrigere mittlere Differenz von 10,6 mm/s zwischen Tieren mit CCI und scheinoperierten als zum frühen Untersuchungszeitpunkt (72,6 mm/s).

Im Vergleich zum frühen Untersuchungszeitpunkt findet sich mehrere Monate nach SHT eine andere Art der Schrittabfolge (*Step pattern*, Abb. 10E). Während Tiere mit SHT das Schrittmuster AB (LF-RH-RF-LH) bevorzugen, liegt bei scheinoperierten Tieren die Präferenz bei Schrittmuster AA (RF-RH-LF-LH).

2.4. Elevated Plus Maze (EPM)

2.4.1. CCI vs. Sham zum frühen Untersuchungszeitpunkt

Abbildung 11 veranschaulicht das Abschneiden der Gruppen mit Kurzzeitüberleben 14 Tage post OP im EPM. Es lässt sich nach SHT eine um 32,8 s verlängerte Zeit im offenen Arm der plusförmigen Fläche (Md. 79,84 s, Iqa. 32,97 – 170,2 s) im Vergleich zu scheinoperierten Tieren (Md. 47,94 s, Iqa. 11,92 – 66,00 s) messen (Abb. 11A). Abbildung 11B verdeutlicht jedoch, dass der Unterschied des Mittelwerts nur auf einen Teil (5 Tiere) der Gruppe mit SHT zurückzuführen ist, weshalb sich keine Signifikanz im Mann-Whitney-U-Test ($p = 0,0885$) zeigt. Im Gegensatz dazu ist die im Mittel um 212,5 cm verkürzte zurückgelegte Distanz bei Tieren mit SHT (Md. 669,5 cm, Iqa. 494,7 – 949,4 cm) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Md. 882,0 cm, Iqa. 770,7 – 1079,0 cm) signifikant ($p = 0,0164$, Abb. 11C).

2.4.2. CCI vs. Sham zum späten Untersuchungszeitpunkt

Zum späten Untersuchungszeitpunkt, 184 Tage nach dem Eingriff, verbringen Tiere mit SHT (Md. 66,48 s, Iqa. 14,88 – 116,1 s) gegenüber scheinoperierten Tieren im Mittel (Md. 18,36 s, Iqa. 0,160 – 51,66 s) 48,12 s mehr Zeit im offenen Arm der plusförmigen Fläche (Abb. 11A). Trotz einer ähnlich ungleichmäßigen Verteilung (Abb. 11B) wie zum frühen Untersuchungszeitpunkt ist dieser Unterschied signifikant ($p = 0,0446$). Demgegenüber lässt sich kein signifikanter Unterschied bei der zurückgelegten Distanz feststellen (Abb. 11C).

2.4.3. Vergleich der Untersuchungszeitpunkte

Die zurückgelegte Distanz der Kontrollgruppen ist zum späten gegenüber dem frühen Untersuchungszeitpunkt im Mittel um 365 cm verkürzt (früher Md. 882,0 cm, Iqa. 770,7 – 1079,0 cm und später Untersuchungszeitpunkt Md. 536,9 cm, Iqa. 292,9 – 704,4 cm, Abb. 11C). Diese Differenz ist signifikant ($p < 0,0001$).

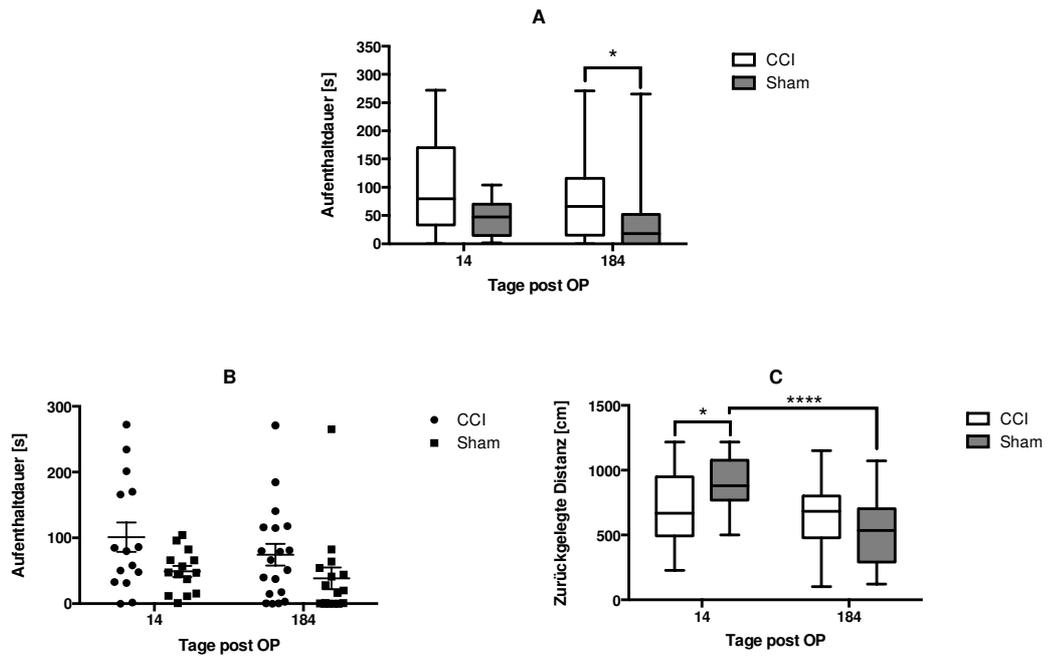


Abbildung 11: Aufenthaltsdauer im offenen Arm des EPM als Boxplot (A) und als Dotplot (B) sowie die zurückgelegte Distanz (C) 14 und 184 Tage post OP

2.5. Open Field (OF)

2.5.1. CCI vs. Sham zum frühen Untersuchungszeitpunkt

Die ersten Messungen an Tag 15 nach OP ergeben, dass sich die Mäuse mit SHT (Md. 24,48 s, Iqa. 9,36 – 38,32 s) im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren (Md. 51,2 s, Iqa. 46,4 – 85,68 s) im Mittel 26,72 s kürzer in der zentralen Zone aufhalten und entsprechend längere Zeit Schutz an der Wand des Plastikzylinders suchen (Abb. 12A). Dieser Unterschied erweist sich im Mann-Whitney-U-Test als statistisch signifikant ($p = 0,0002$). Weiterhin vergehen durchschnittlich 14 s mehr, bis sich die Tiere mit SHT vor Beginn der Messung selbstständig vom Zentrum des Fläche zur Wand bewegen ($p = 0,0006$, Abb. 12B). Bei der mittleren zurückgelegten Distanz, die als Maß der Aktivität gilt, lassen sich zu diesem Zeitpunkt keine signifikanten Unterschiede ermitteln (Abb. 12C).

2.5.2. CCI vs. Sham zum späten Untersuchungszeitpunkt

Zum zweiten Untersuchungszeitpunkt, an Tag 185 post OP, kann der zuvor beobachtete Unterschied zwischen Tieren mit SHT (Md. 30,08 s, Iqa. 14,32 – 59,92 s) und Scheinoperierten (Md. 34,2 s, Iqa. 21,52 – 44,48 s) nicht mehr festgestellt werden (Abb. 12A). Auch die Zeit bis zum Erreichen der Zylinderwand vor Aufnahmebeginn ist nun nahezu gleich (Abb. 12B). Lediglich die zurückgelegte Distanz ist zu diesem Zeitpunkt in der CCI-Gruppe (Md. 4302 cm, Iqa. 3630 – 5216 cm) gegenüber der Kontrollgruppe (Md. 3159 cm, Iqa. 2499 – 3573 cm) um 1143 cm länger (Abb. 12C). Diese Differenz ist signifikant ($p = 0,004$).

2.5.3. Vergleich der Untersuchungszeitpunkte

Die Aufenthaltszeit im Zentrum des OF ist im Mittel um 17,0 s (früher Md. 51,2 s, Iqa. 46,4 – 85,68 s und später Untersuchungszeitpunkt Md. 34,2 s, Iqa. 21,52 – 44,48 s, $p = 0,0048$, Abb. 12A) und die zurückgelegte Distanz um 898 cm (früher Md. 4057 cm, Iqa. 3483 – 4921 cm und später Untersuchungszeitpunkt Md. 3159 cm, Iqa. 2499 – 3573 cm, $p = 0,0008$, Abb. 12C) zwischen den Kontrollgruppen zum späten gegenüber dem frühen Untersuchungszeitpunkt verkürzt. Die Zeit bis zum Erreichen der Zylinderwand ist in diesem Vergleich im Mittel um 27,5 s (früher Md. 7 s, Iqa. 4 – 10 s und später Untersuchungszeitpunkt Md. 34,5 s, Iqa. 18 – 98 s, $p < 0,0001$, Abb. 12B) verlängert.

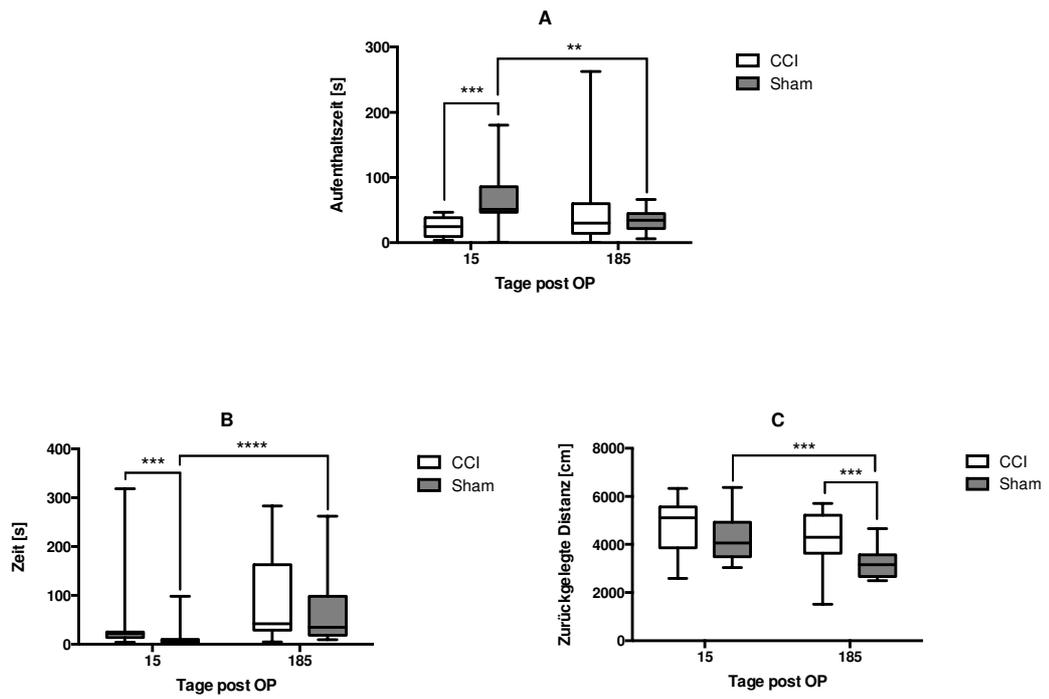


Abbildung 12: Aufenthaltszeit im Zentrum des OF (A), Zeit bis zum Erreichen der Zylinderwand vor Aufnahmebeginn (B) und zurückgelegte Distanz (C) 15 und 185 Tage post OP

2.6. Social Interaction (SI) = Crawley Box

2.6.1. CCI vs. Sham zum frühen Untersuchungszeitpunkt

Die Versuchsgruppe mit kurzer Überlebenszeit wurde an Tag 16 post OP in der Crawley Box untersucht. Tiere mit SHT (durchschnittliche Zeit im leeren Kompartiment 173,6 s und bei unbekannter Maus 319,7 s) und scheinoperierte Tiere (durchschnittlich Zeit im leeren Kompartiment 172,2 s und bei unbekannter Maus 338,7 s) verbringen mehr Zeit im Kompartiment mit einer unbekannten Maus (Abb. 13B), was als normales Verhalten für Mäuse angesehen wird. Der errechnete Sozialindex (Abb. 13A) ergab keine signifikanten ($p = 0,4555$) Unterschiede zwischen Tieren mit SHT (Md. 12,23 a.u., Iqa. 6,332 – 24,12 a.u.) und scheinoperierten (Md. 16,31 a.u., Iqa. 8,391 – 24,61 a.u.).

2.6.2. CCI vs. Sham zum späten Untersuchungszeitpunkt

188 Tage post OP verbringen beide Testgruppen im Schnitt mehr Zeit im Kompartiment mit einer unbekannten Maus als im leeren Kompartiment und zeigen somit Normalverhalten (Abb. 13C). Es lässt sich daher sowohl für Mäuse mit SHT (Md. 7,737 a.u., Iqa. -11,5 – 10,35 a.u.) und Scheinoperierte (Md. 6,704 a.u., Iqa. -1,088 – 20,19 a.u.) ein positiver Sozialindex ohne signifikante ($p = 0,5191$) Gruppenunterschiede konstatieren (Abb. 13A).

2.6.3. Vergleich der Untersuchungszeitpunkte

Zum späten Untersuchungszeitpunkt lässt sich im Vergleich zum frühen sowohl für Tiere mit SHT (durchschnittliche Zeit im leeren Kompartiment 214,1 s, und bei unbekannter Maus 248,1 s) und Scheinoperierte (durchschnittliche Zeit im leeren Kompartiment 218,3 s und bei unbekannter Maus 290,2 s) eine verlängerte Aufenthaltszeit im leeren bzw. eine verkürzte Aufenthaltszeit im Kompartiment mit unbekannter Maus feststellen.

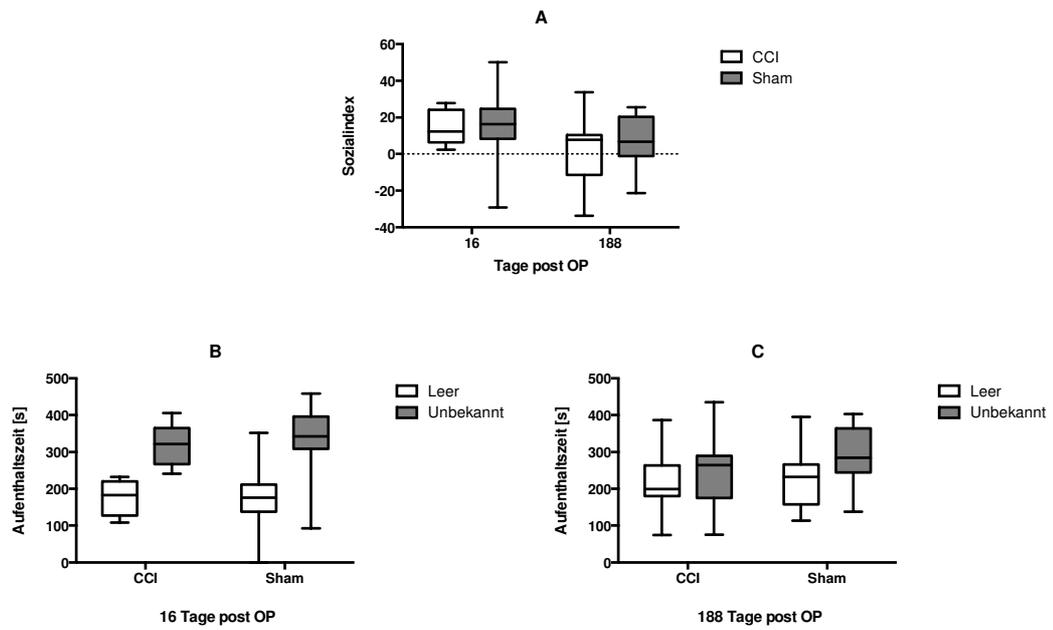


Abbildung 13: Sozialindex zu beiden Testzeitpunkten (A) sowie Aufenthaltszeit in verschiedenen Kompartimenten der Crawley Box 16 (B) und 188 (C) Tage post OP

2.7. Prepulse Inhibition of Acoustic Startle Response (PPI)

2.7.1. CCI vs. Sham zum frühen und späten Untersuchungszeitpunkt

Zu beiden Testzeitpunkten, also 19 und 189 Tage post OP, lässt sich kein Einfluss des CCI auf das Verhalten der Testtiere im PPI feststellen. Abbildung 14A und 14B zeigt, dass sich eine Abschwächung der Schreckreaktion durch den Prepulse, also eine Prepulse Inhibition, bei allen Gruppen zeigt. Weiterhin wird hier ein Zusammenhang von Prepulseintensität und Prepulse Inhibition sichtbar.

2.7.2. Vergleich der Untersuchungszeitpunkte

Auffallend ist, dass zum späten (Md. 657,6 a.u., Iqa. 458,8 – 854,3 a.u.) gegenüber dem frühen Untersuchungszeitpunkt (Md. 380,8 a.u., Iqa. 318,4 – 536,2 a.u.) gruppensübergreifend ein im Mittel um 276,8 a.u. höherer Wert bzgl. der Amplitude der Schreckreaktion gemessen wird (Berechnung mit Two-way ANOVA-Test bezogen auf den Zeitpunkt $p = 0,0001$, Abb. 14C).

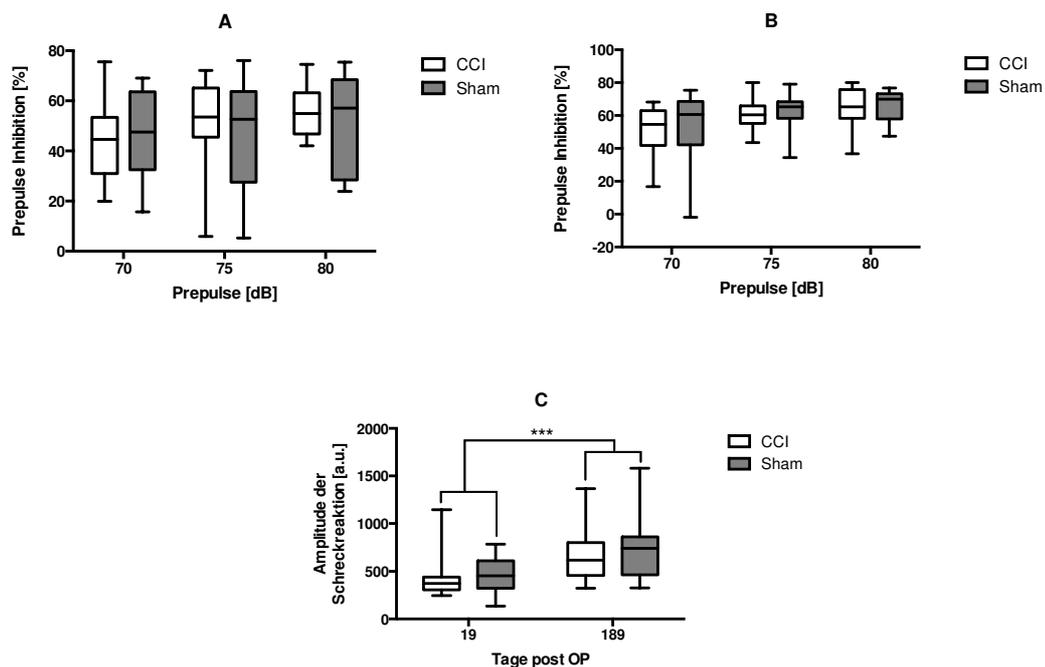


Abbildung 14: Prepulse Inhibition bei einem Prepulse von 75 dB, 80 dB und 85 dB 19 (A) und 189 (B) Tage post OP sowie Amplitude der Schreckreaktion (C) im Vergleich

2.8. Tail Suspension (TS)

2.8.1. CCI vs. Sham zum frühen Untersuchungszeitpunkt

Zum frühen Untersuchungszeitpunkt 20 Tage nach OP ist die Immobilitätszeit bei Tieren mit einem SHT (Md. 47,11 s, Iqa. 39,2 – 59,76 s) im Gegensatz zur Kontrollgruppe (Md. 64,87 s, Iqa. 61,87 – 75,07 s) statistisch signifikant ($p = 0,006$) verkürzt (Abb. 15).

2.8.2. CCI vs. Sham zum späten Untersuchungszeitpunkt

Zum späten Untersuchungszeitpunkt, 190 Tage nach OP, weisen die SHT-Gruppe (Md. 175,5 s, Iqa. 150,1 – 208,6 s) und die Kontrollgruppe (Md. 206,7 s, Iqa. 169,0 – 220,9 s) ähnlich lange Immobilitätszeiten auf. Es lässt sich auch keine signifikante Differenz mehr nachweisen ($p = 0,1795$, Abb. 15).

2.8.3. Vergleich der Untersuchungszeitpunkte

Gruppenübergreifend ist die Gesamtzeit der Immobilität zum späten gegenüber dem frühen Untersuchungszeitpunkt deutlich erhöht (20 Tage post OP Md. 61,73 s, Iqa. 46,76 – 66,21 s, 190 Tage post OP Md. 184,2 s, Iqa. 151,7 – 220,5 s, Mann-Whitney-U-Test $p < 0,0001$, Abb. 15).

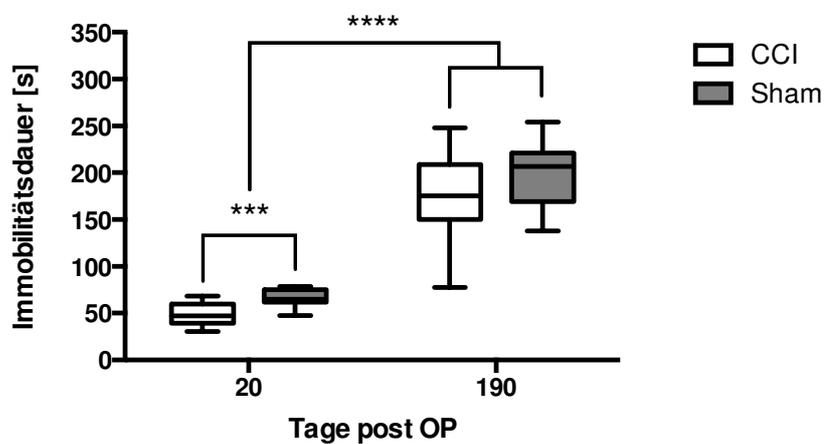


Abbildung 15: Immobilitätsdauer im Tail Suspension Test 20 und 190 Tage post OP

2.9. Morris Water Maze (MWM)

2.9.1. CCI vs. Sham zum frühen Untersuchungszeitpunkt

Die Morris Water Maze-Testreihe zum frühen Zeitpunkt wurde an den Tagen 22 und 23 nach OP mit einer sichtbaren Plattform (Abb. 16A) und zwischen den Tagen 26 und 36 nach OP mit einer verborgenen Plattform durchgeführt (Abb. 16B). An beiden Tagen mit sichtbarer Plattform benötigten die Tiere mit SHT signifikant (Two-way ANOVA bezogen auf die beiden Versuchsgruppen $p = 0,0049$) mehr Zeit, um auf diese zu gelangen (durchschnittlich erster Tag 15,0 s und zweiter Tag 16,3 s länger). Es lässt sich für die CCI- und die Kontrollgruppe eine ähnliche mittlere Zeitverkürzung (nach SHT 15,33 s, Kontrollgruppe 16,62 s) am zweiten Testtag feststellen (Two-way ANOVA bezogen auf die Testtage $p < 0,0001$, Abb. 16A). Am ersten Testtag mit verborgener Plattform ergibt sich kein Unterschied zwischen der SHT- und der scheinoperierten Gruppe (AM nach SHT 44,06 s \pm SEM 4,198, Kontrollgruppe 39,64 s \pm SEM 4,564; $p = 0,4806$). Die scheinoperierten Tiere verkürzen die Zeit an den folgenden Tagen kontinuierlich, bis sie an den letzten drei Testtagen ein konstant niedriges Niveau (AM letzter Testtag 16,64 s \pm SEM 3,507) und eine durchschnittliche Zeitverkürzung von 23,0 s erreichen. Hingegen zeigen die Tiere mit SHT lediglich eine Zeitverkürzung von 6,15 s (AM letzter Testtag 37,91 s \pm SEM 7,040) und keine kontinuierliche Verbesserung der Leistung, wodurch sich beide Gruppen in der grafischen Darstellung voneinander entfernen (Two-way ANOVA bezogen auf die Versuchsgruppen $p < 0,0001$, Abb 16B). Eine Berechnung der *area under the curve* (AUC) belegt den Gruppenunterschied mit einer um 65,9 % größeren Fläche bei der Gruppe mit SHT bzw. einer Differenz von 112,8 s \times d (nach SHT 284 s \times d, Kontrollgruppe 171,2 s \times d).

Die Aufenthaltsdauer in der randnahen Zone des Beckens (Abb. 16C) verhält sich ähnlich mit einer deutlichen und konstanten Zeitverkürzung von 27,1 s (AM erster 28,11 s \pm SEM 3,4 und letzter Testtag 1,01 s \pm SEM 0,164) bei scheinoperierten Tieren und einer diskontinuierlichen Entwicklung mit einer Zeitverkürzung von 10,89 s (AM erster 26,16 s \pm SEM 4,121 und letzter Testtag 15,27 s \pm SEM 3,645) bei Tieren mit SHT sowie einer hoch signifikanten Differenz zwischen den Versuchsgruppen (Two-way ANOVA bezogen auf die Versuchsgruppen $p < 0,0001$). Die Berechnung der AUC ergibt eine Differenz von 101,89 s \times d (nach

SHT $141 \text{ s} \times \text{d}$, Kontrollgruppe $39,11 \text{ s} \times \text{d}$). Die Darstellung der Aufenthaltszeit in den vier Quadranten am letzten Untersuchungstag (*probe trial*) veranschaulicht, dass der Plattformquadrant sowie der links danebenliegende Quadrant bevorzugt werden, wobei kein Unterschied zwischen Tieren mit und ohne SHT besteht (Abb. 16D).

Ein Vergleich der Durchschnittsgeschwindigkeit während des ersten Testlaufs am ersten Testtag soll Aufschluss über die motorischen Fähigkeiten beim Schwimmen geben. Der Vergleich zeigte keine signifikanten ($p = 0,1592$) Gruppenunterschiede (AM nach SHT $16,64 \text{ cm/s} \pm \text{SEM } 0,86$, Kontrollgruppe AM $17,84 \text{ cm/s} \pm \text{SEM } 1,729$, Abb. 16E).

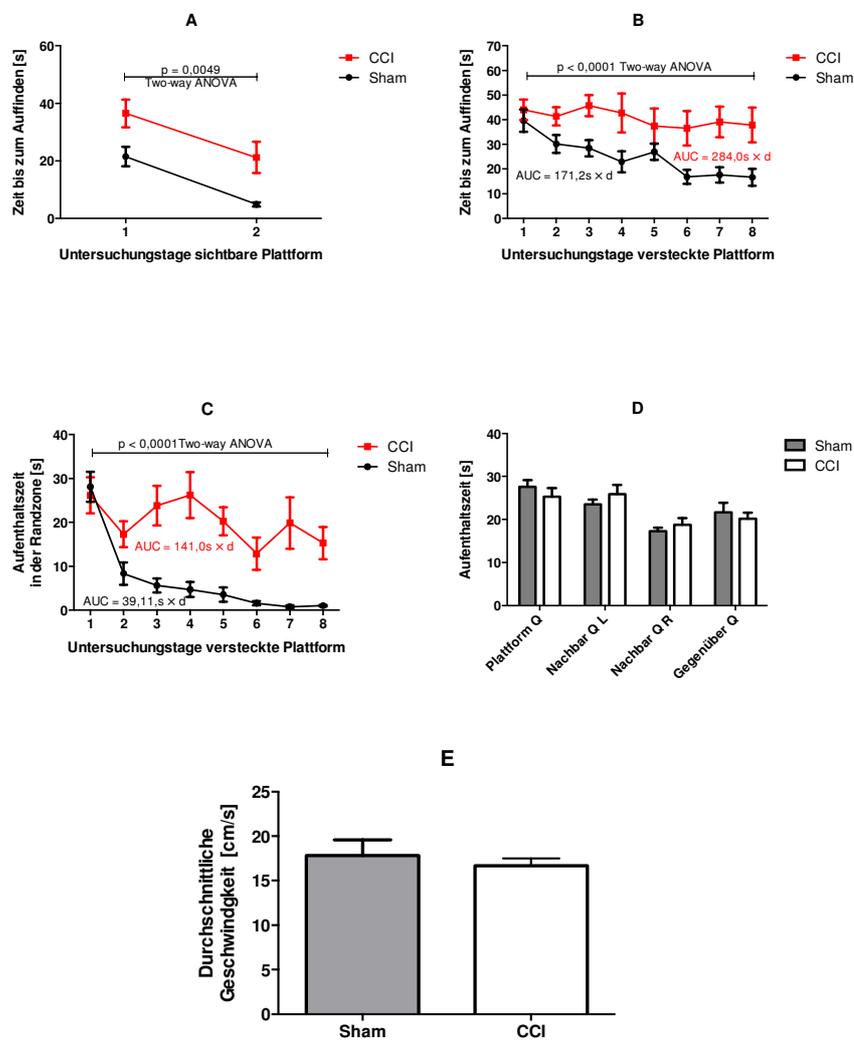


Abbildung 16: Zeit bis zum Auffinden der sichtbaren (A) und versteckten (B) Plattform, Aufenthaltszeit in der Randzone (C) und den vier Quadranten (D) sowie durchschnittliche Schwimgeschwindigkeit während des ersten Testlaufs (E) im Morris Water Maze 22 bis 36 Tage post OP

2.9.2. CCI vs. Sham zum späten Untersuchungszeitpunkt

Nach Langzeitüberleben wurden die Tiere an den postoperativen Tagen 191 und 192 mit sichtbarer (Abb. 17A), und zwischen den postoperativen Tagen 195 und 205 mit verborgener Plattform untersucht (Abb. 17B). Zu diesem Untersuchungszeitpunkt ist die Dauer bis zum Auffinden der sichtbaren Plattform bei Tieren mit SHT im Vergleich zur Kontrollgruppe an beiden Testtagen signifikant (Two-way ANOVA bezogen auf die beiden Versuchsgruppen $p < 0,0001$) verlängert (Differenz des AM erster Tag 21,7 s und zweiter Tag 7,919 s länger), am zweiten Tag zeigen alle Tiere eine signifikante Zeitverkürzung (Two-way ANOVA bezogen auf die beiden Testtage $p < 0,0001$, Abb. 17A). Beide Gruppen beginnen am ersten Testtag bei verborgener Plattform mit einer ähnlichen durchschnittlichen Zeit (AM nach SHT 51,07 s \pm SEM 4,86, Kontrollgruppe 44,42 s \pm SEM 5,451) und ohne signifikante Differenz ($p = 0,1864$). Die scheinoperierten Tiere verkürzen die Zeit bis zum Erreichen der verborgenen Plattform an den folgenden Tagen bis auf ein Minimum (AM letzter Testtag 20,58 s \pm SEM 4,061) mit einer durchschnittlichen Zeitverkürzung von 23,84 s. Diese fällt mit lediglich 13,31 s (AM letzter Testtag 37,76 s \pm SEM 5,29) bei Tieren mit SHT schwächer aus, so dass ein Unterschied zwischen den Gruppen offenkundig ist (Two-way ANOVA bezogen auf die Versuchsgruppen $p < 0,0001$, Abb. 17B). Die Berechnung der AUC ergibt eine um 46,74 % größere Fläche nach SHT und einer Differenz von $90,0 \text{ s} \times \text{d}$ (nach SHT $282,6 \text{ s} \times \text{d}$, Kontrollgruppe $192,6 \text{ s} \times \text{d}$) zwischen den beiden Versuchsgruppen.

Bezogen auf die Aufenthaltsdauer in der randnahen Zone (Abb. 17C) unterscheiden sich die Testgruppen ab dem ersten Tag der Untersuchung (AM nach SHT 30,93 s \pm SEM 4,391, Kontrollgruppe 21,04 s \pm SEM 3,209) mit verborgener Plattform über die gesamte Zeitspanne mit einer diskontinuierlichen Zeitverkürzung von 11,72 s (AM erster 30,93 s \pm SEM 4,391 und letzter Testtag 19,21 s \pm SEM 5,039) bei Tieren mit SHT sowie einer deutlichen und konstanten Zeitverkürzung von 15,95 s (AM erster 21,04 s \pm SEM 3,209 und letzter Testtag 5,090 s \pm SEM 2,395) bei scheinoperierten Mäusen. Dieser Unterschied zwischen den Versuchsgruppen ist ebenfalls signifikant (Two-way ANOVA bezogen auf die beiden Versuchsgruppen $p < 0,0001$). Die Berechnung der AUC bezogen auf die Aufenthaltszeit in der randnahen Zone eine deutliche Differenz von $88,37 \text{ s} \times \text{d}$ (nach SHT $143,1 \text{ s} \times \text{d}$, Kontrollgruppe $54,73 \text{ s} \times \text{d}$).

Der *probe trial* am letzten Testtag belegt bei allen Tieren eine Präferenz für den Plattform- und den links daneben liegenden Quadranten ohne Beeinflussung durch das SHT (Abb. 17D).

Die Analyse der Durchschnittsgeschwindigkeit (AM nach SHT $17,64 \text{ cm/s} \pm \text{SEM } 0,5482$, Kontrollgruppe $17,14 \text{ cm/s} \pm \text{SEM } 0,6942$) während des ersten Testlaufs am ersten Testtag weist auch zum späten Untersuchungszeitpunkt keine signifikanten Unterschiede auf ($p = 0,9509$, Abb. 17E).

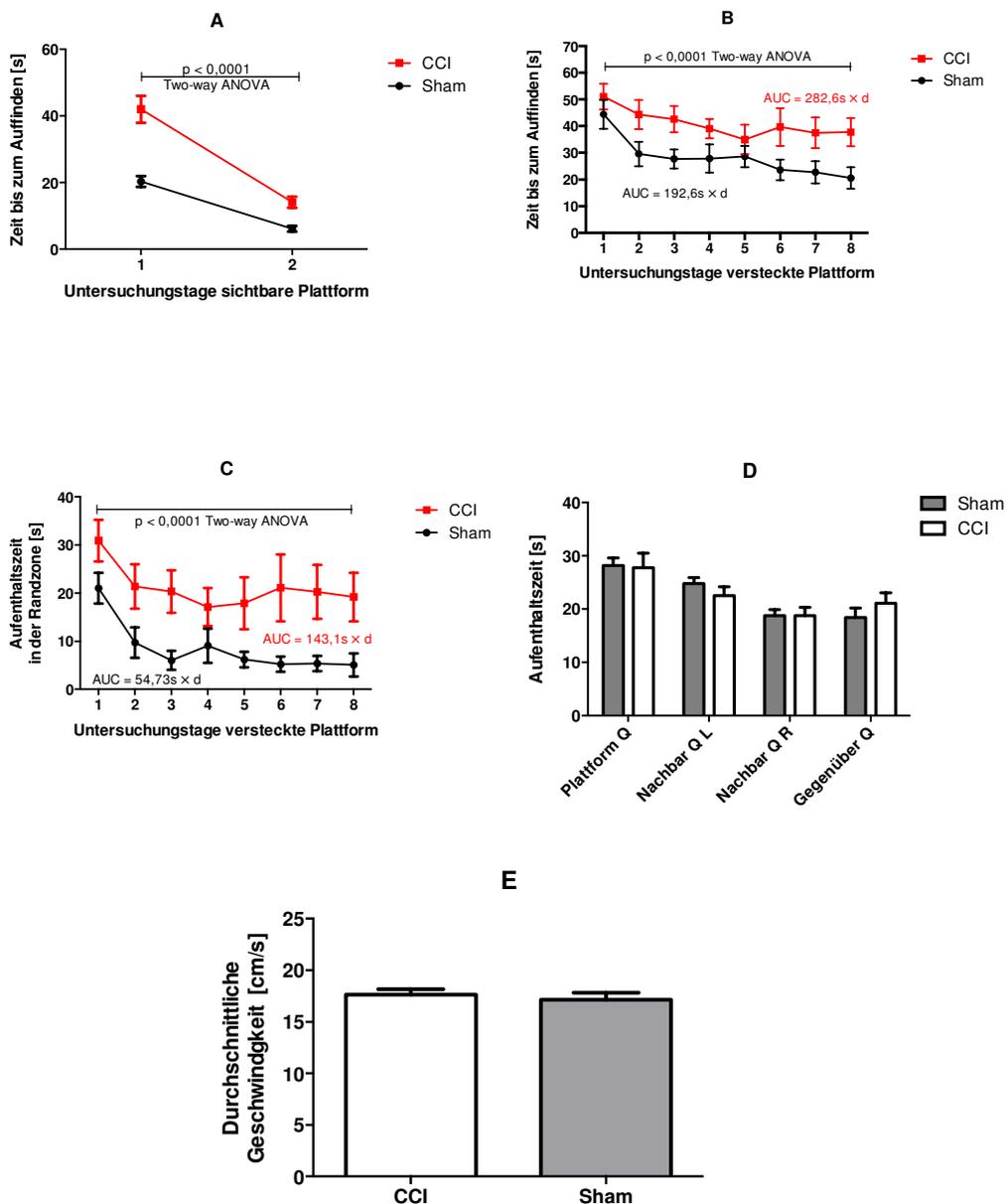


Abbildung 17: Zeit bis zum Auffinden der sichtbaren (A) und versteckten (B) Plattform, Aufenthaltszeit in der Randzone (C) und den vier Quadranten (D) sowie durchschnittliche Schwimmgeschwindigkeit während des ersten Testlaufs (E) im Morris Water Maze 191 bis 205 Tage post OP

2.9.3. Vergleich der Untersuchungszeitpunkte

Ein Vergleich der Untersuchungszeitpunkte bezogen auf die durchschnittliche Schwimmgeschwindigkeit ergibt keine nennenswerten Differenzen (Abb. 16E und 17E). Ein Vergleich weiterer Parameter ist aufgrund der altersabhängigen Unterschiede in diesem Zusammenhang nicht sinnvoll.

2.10. Fear Conditioning (FC)

2.10.1. CCI vs. Sham zum frühen Untersuchungszeitpunkt

An den Tagen 47 und 48 post OP wurde die Angst-assoziierte Lernfähigkeit im FC für die Gruppen mit Kurzzeitüberleben ermittelt. Abbildung 18A veranschaulicht, dass beide Testgruppen zunächst sehr mobil sind (*baseline*), nach Angst-assoziierte Konditionierung deutlich inaktiver werden (*context*), durch Veränderung der Umgebung wieder mehr Bewegung zeigen (*cue baseline*) und schließlich beim Ertönen des akustischen Signals die höchste Immobilitätsdauer erkennen lassen. Dies ist das gesunde und erwartungsgemäße Verhalten und bestätigt einen korrekten Versuchsaufbau. Im Anschluss an die Angst-assoziierte Konditionierung (*context*) lässt sich eine signifikant ($p = 0,0359$) erhöhte Immobilität bei Tieren nach CCI errechnen. Die anderen drei Versuchsphasen weisen hinsichtlich der Immobilität keine Unterschiede zwischen den Testgruppen auf.

2.10.2. CCI vs. Sham zum späten Untersuchungszeitpunkt

Für die Langzeitüberlebensgruppe erfolgte die Untersuchung in der Fear Conditioning-Testreihe (FC) 212 und 213 Tage nach OP (Abb. 18B). Ebenso wie zum frühen Untersuchungszeitpunkt lässt sich eine Angst-assoziierte Konditionierung mit den entsprechenden Immobilitätsveränderungen erzeugen. In keiner der vier Testphasen tritt ein signifikanter Unterschied zwischen Tieren mit CCI und scheinoperierten Mäusen auf.

2.10.3. Vergleich der Untersuchungszeitpunkte

Die Dauer der Immobilität ist gruppenübergreifend und in allen vier Testphasen zum späten Untersuchungszeitpunkt gegenüber dem frühen Zeitpunkt leicht erhöht (durchschnittliche Differenz zwischen den Zeitpunkten in den Phasen *baseline* 19,27 s, *context* 25,84 s, *cue baseline* 2,19 s, *cue* 9,65 s).

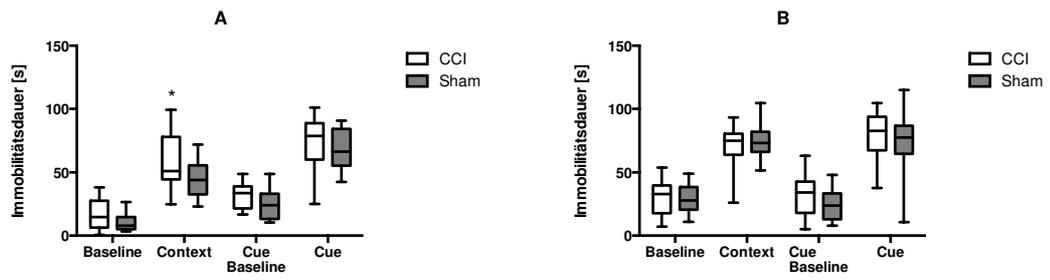


Abbildung 18: Immobilitätsdauer im Fear Conditioning 47 und 48 (A) Tage sowie 212 und 213 (B) Tage post OP

2.11. Visual Cliff Test

Die Entscheidung, diesen Test durchzuführen, um visuelle Störungen ausschließen zu können, wurde erst nach Beendigung der frühen Untersuchungsreihe getroffen. Daher liegen nur Ergebnisse nach Langzeitüberleben mehrere Monate nach CCI vor.

2.11.1. CCI vs. Sham zum späten Untersuchungszeitpunkt

An Tag 224 nach OP verbrachten Tiere mit SHT (Md. ebenerdig 162,6 s und erhöht 137,5 s) als auch scheinoperierte (Md. ebenerdig 233,7 s und erhöht 66,4 s) mehr Zeit im ebenerdigen als im erhöhten Areal (Abb. 19). Sowohl innerhalb der Gruppe mit SHT (Mann-Whitney-U-Tests $p = 0,0369$) als auch bei der Kontrollgruppe ($p < 0,0001$) ist diese Präferenz signifikant, wobei Abbildung 19 veranschaulicht, dass die Differenz bei scheinoperierten Tieren deutlicher ist.

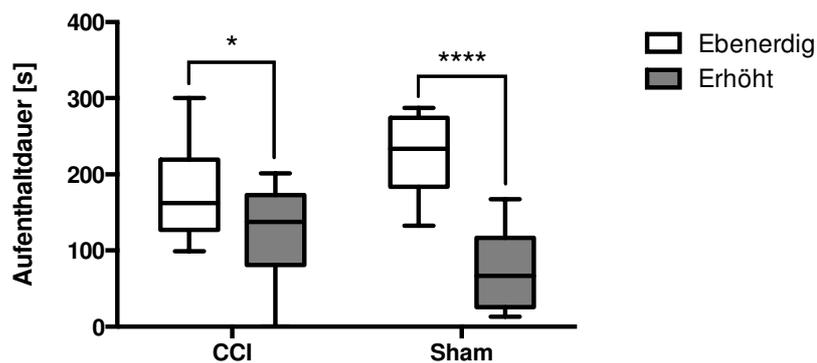


Abbildung 19: Aufenthaltsdauer in verschiedenen Arealen des VC 224 Tage post OP

2.12. Messung Pentylentetrazol-induzierter Krampfanfälle (PTZ)

2.12.1. CCI vs. Sham zum frühen Untersuchungszeitpunkt

Nach Abschluss aller verhaltensbiologischen Untersuchungen wurde die Pentylentetrazol-induzierte Krampfneigung (50 mg/kg) zunächst 57 Tage post OP für die Gruppen mit Kurzzeitüberleben ermittelt. Der errechnete Anfallswert zeigt, dass sich nach SHT schneller stärkere Krampfanfälle (Md. 23,2, Iqa. 15,83 – 29,88) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Md. 16,11, Iqa. 13,48 – 19,36) induzieren lassen (Abb. 20). Diese Differenz ist im Mann-Whitney-U-Test signifikant ($p = 0,0098$). Die Latenzzeit bis zum Auftreten erster Anfallssymptome nach SHT (Md. 150 s, Iqa. 100 – 167 s) ist im Vergleich zur Kontrollgruppe (Md. 160 s, Iqa. 122 – 170 s) geringfügig verkürzt. Zwei Mäuse mit SHT verstarben innerhalb eines tonischen Anfalls gegenüber einem Tier der Kontrollgruppe.

2.12.2. CCI vs. Sham zum späten Untersuchungszeitpunkt

Bei Langzeitüberleben wurden die Pentylentetrazol-induzierten Krampfanfälle 225 Tage nach OP bewertet. Auch hier liegt der Anfallswert nach einem SHT (Md. 51,11, Iqa. 24,02 – 62,49) mit einer signifikanten Differenz ($p = 0,0403$) höher als bei scheinoperierten Tieren (Md. 24,91, Iqa. 20,49 – 27,93, Abb. 20). Die Latenzzeit bis zum Auftreten erster Anfallssymptome nach SHT (Md. 220 s, Iqa. 162 – 268 s) weicht im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht ab (Md. 223 s, Iqa. 214 – 256 s). Zehn Mäuse mit SHT verstarben innerhalb eines tonischen Anfalls gegenüber vier Tieren der Kontrollgruppe.

2.12.3. Vergleich der Untersuchungszeitpunkte

Es lässt sich feststellen, dass die Anfallsanfälligkeit im Vergleich zum frühen Testzeitpunkt bei allen Tieren signifikant ($p = 0,0001$) erhöht ist (Md. früher Zeitpunkt 18,14 und später Zeitpunkt 25,93). Auch die Anzahl verstorbener Tiere während des Versuchs ist mit zehn Mäusen der CCI-Gruppe und vier der Sham-Gruppe zum späten Zeitpunkt deutlich erhöht.

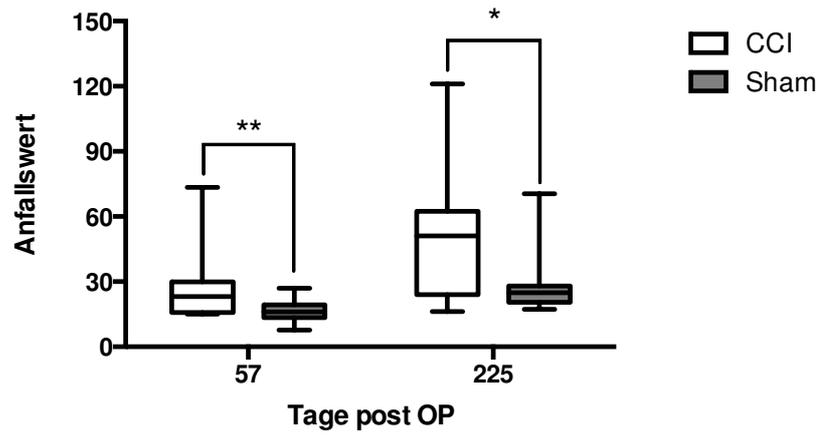


Abbildung 20: Anfallswert im PTZ 57 und 225 Tage post OP

3. Histologische Färbung und Auswertung

Unmittelbar im Anschluss an die Messung Pentylentetrazol-induzierter Krampfanfälligkeit, also 57 und 225 Tage post OP, wurden die Tiere getötet und die Gehirne für histologische und molekularbiologische Untersuchungen entnommen.

3.1. Bestimmung des Schadenvolumens

Nach Nissl gefärbte Gehirnschnitte, eines scheinoperierten Gehirns (Abb. 21A) sowie jeweils des Gehirns das dem mittleren Schaden am nächsten kommt (Abb. 21B und 21C) sind für beide Untersuchungszeitpunkte in Abbildung 21 dargestellt. Makroskopisch können motorische und somatosensible Areale des Kortex sowie der Hippocampus als primär am Schaden beteiligte anatomische Strukturen ausgemacht werden.

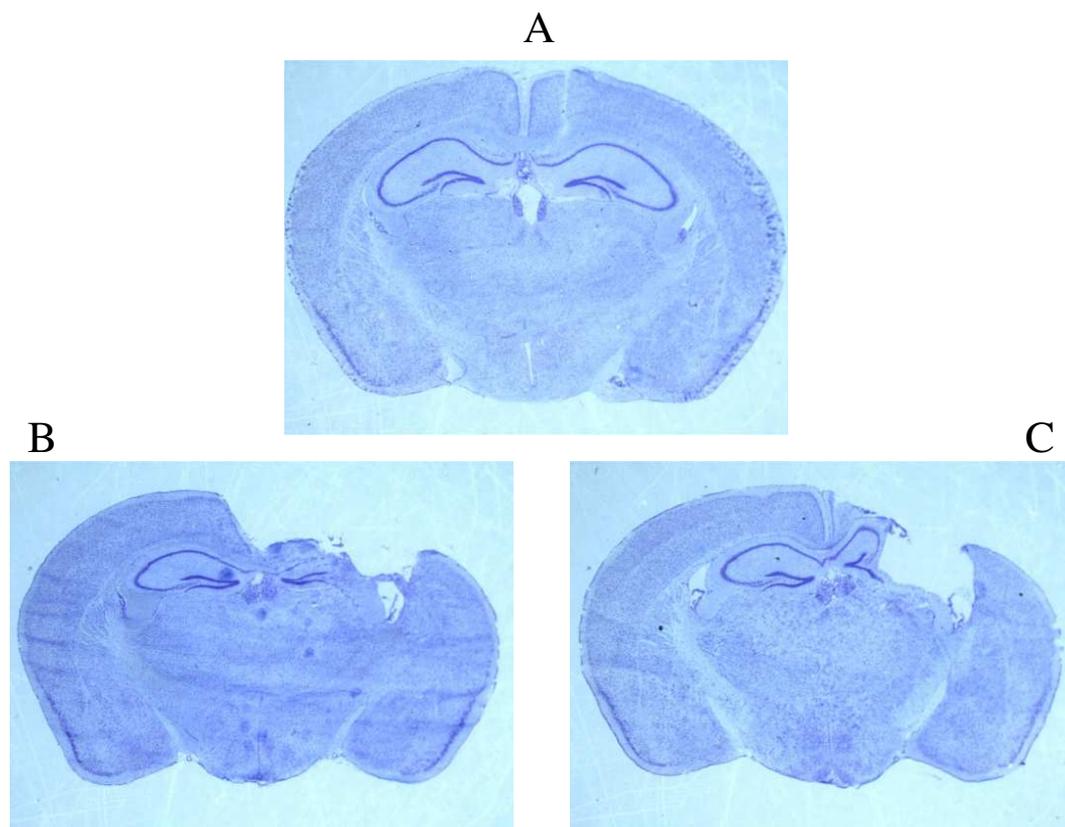


Abbildung 21: Beispielhaft nach Nissl gefärbte Gehirnschnitte eines scheinoperierten Gehirns (A) sowie 57 (B) und 225 (C) Tage post SHT

3.1.1. CCI vs. Sham zum frühen Untersuchungszeitpunkt

Zum frühen Untersuchungszeitpunkt ergibt die Ausmessung der Hemisphärengröße nach CCI eine mittlere Verkleinerung der ipsilateralen um $15,3 \text{ mm}^3$ ($p < 0,0001$) und eine Vergrößerung der contralateralen Hemisphäre um $3,8 \text{ mm}^3$ ($p = 0,0303$) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 22A).

3.1.2. CCI vs. Sham zum späten Untersuchungszeitpunkt

Mehrere Monate nach SHT ergibt die Ausmessung der Hemisphärengrößen eine im Mittel um $18,7 \text{ mm}^3$ signifikant verkleinerte ($p < 0,0001$, Abb. 22B) ipsilaterale Gehirnhemisphäre im Vergleich zur Kontrollgruppe. Eine Diskrepanz des contralateralen Hemisphärenvolumens lässt sich nun jedoch nicht ($p = 0,1866$) mehr feststellen (AM nach SHT $155 \text{ mm}^3 \pm \text{SEM } 1,408$ und Kontrollgruppe $157,7 \text{ mm}^3 \pm \text{SEM } 1,369$).

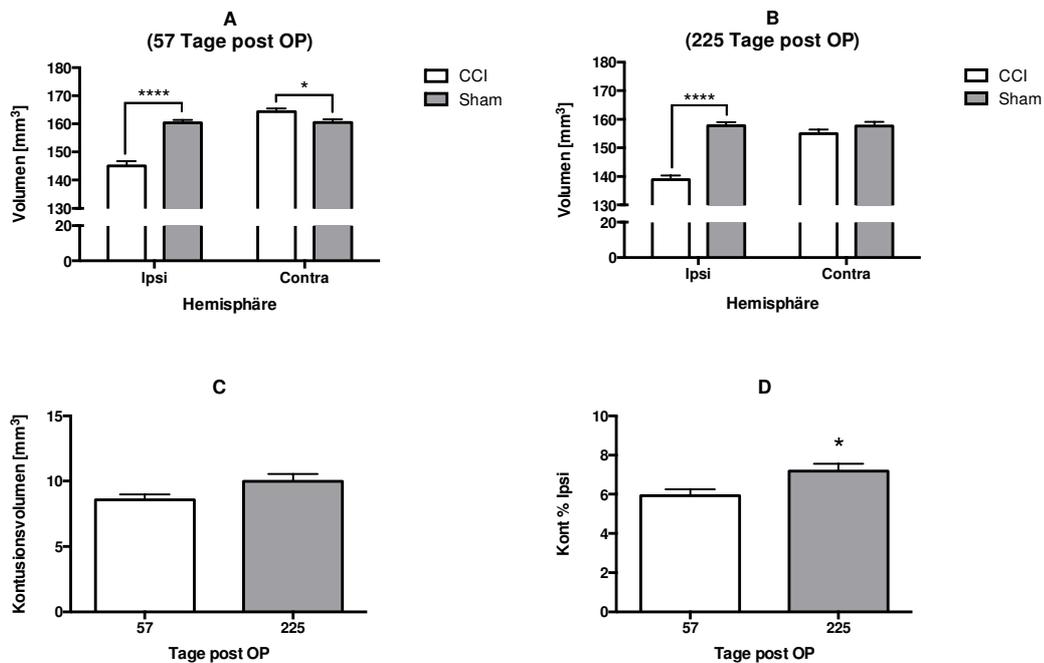


Abbildung 22: Hemisphärenvolumen (A und B), absolutes Kontusionsvolumen (C) sowie Kontusionsvolumen in Prozent der ipsilateralen Hemisphäre (D) 57 und 225 Tage post OP

3.1.3. Vergleich der Untersuchungszeitpunkte

ischen Maßnahmen in beide Untersuchungszeitpunkte ergibt eine Reduzierung des ipsilateralen und contralateralen Hemisphärenvolumens nach Langzeitüberleben bei scheinoperierten Tieren (Ipsi $2,7 \text{ mm}^3$, Contra $2,8 \text{ mm}^3$, Abb. 23B) sowie nach SHT (Ipsi $6,1 \text{ mm}^3$, Contra $9,3 \text{ mm}^3$, Abb. 23A). Die

langfristige Gehirnvolumenabnahme ist jedoch ausschließlich nach SHT signifikant (Ipsi $p = 0,0078$, Contra $p < 0,0001$). Das Kontusionsvolumen unterscheidet sich zwischen den Untersuchungszeitpunkten nicht signifikant ($p = 0,0586$, Abb. 22C), so dass der prozentuale Anteil des Schadens an der ipsilateralen Gehirnhälfte nach Langzeitüberleben um 21 % (früher 5,931 % und später Zeitpunkt 7,18 % von Ipsi) zunimmt ($p = 0,0215$, Abb. 22D). Anders ausgedrückt wird eine Atrophie des Hirngewebes der geschädigten Hemisphäre mehrere Monate nach SHT beobachtet.

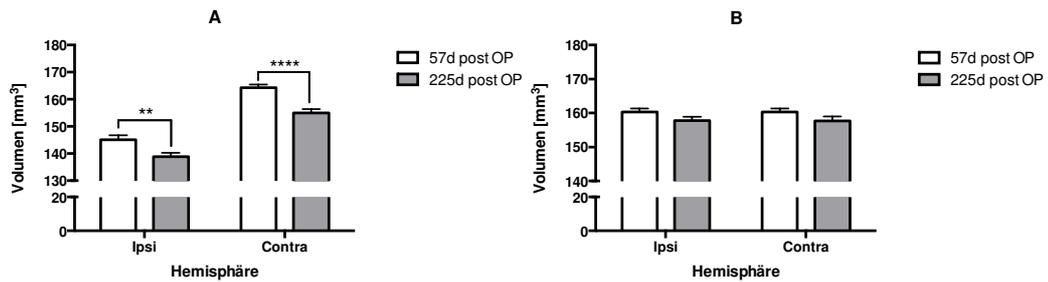


Abbildung 23: Gegenüberstellung des Hemisphärenvolumens der CCI (A) und Sham (B) Gruppen nach Kurz- und Langzeitüberleben

3.2. Bestimmung der Mikrogliazellaktivierung

Für die Analyse der Mikrogliazellaktivierung wurde eine Auswahl von je zehn Tieren der CCI-Gruppen und fünf der Sham-Gruppen getroffen. Ausschlaggebend bei der Selektion war das Ergebnis der Nissl-Färbung hinsichtlich der Nähe zum arithmetischen Mittel des Kontusionsvolumens (CCI) bzw. des Gesamtgehirnvolumens (Sham).

Beispiele für die ausgezählten kortikalen Bereiche zu beiden Untersuchungszeitpunkten nach Iba-1-Färbung sind in Abbildung 24 dargestellt.

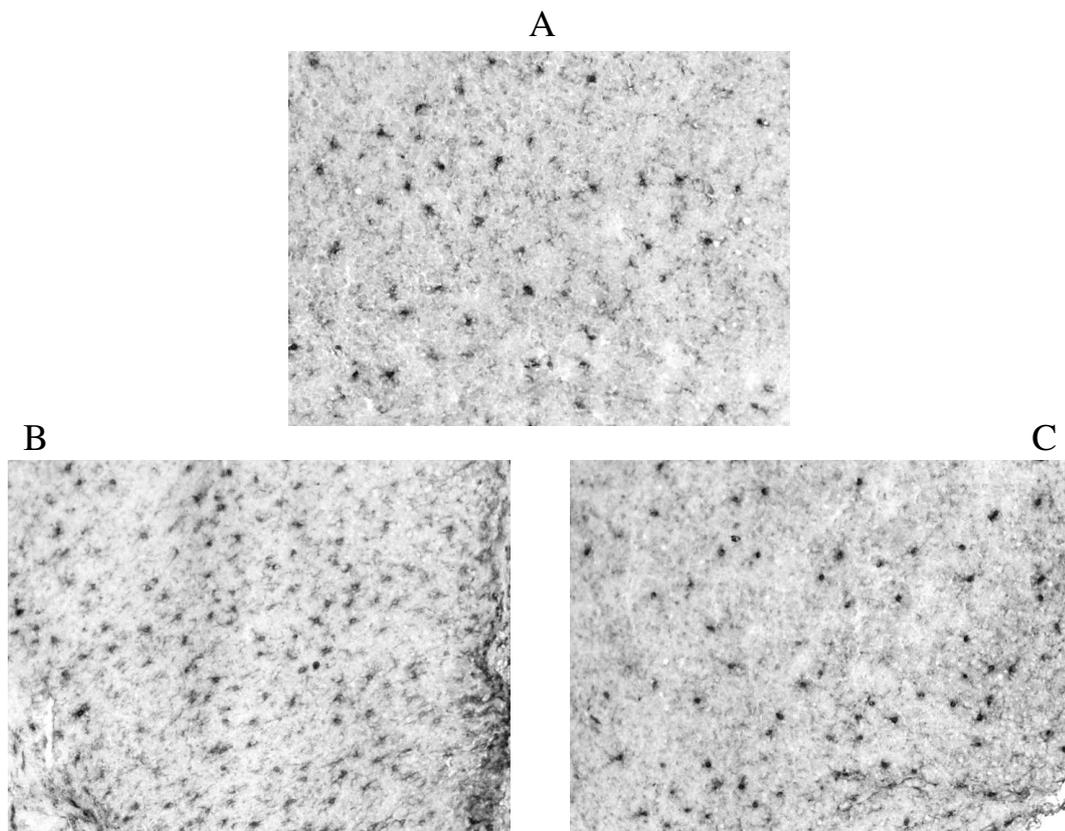


Abbildung 24: Beispielhafte ausgezählte kortikale Bereiche der ipsilateralen Hemisphäre eines scheinoperierten Gehirn (A) sowie 57 (B) und 225 (C) Tage post SHT

3.2.1. CCI vs. Sham zum frühen Untersuchungszeitpunkt

Die quantitative Analyse aktivierter Mikroglia 57 Tage nach SHT im Kortex (Abb. 25A) ergibt eine im Mittel um 31,82 n/ROI (AM nach SHT 94,65 n/ROI \pm SEM 3,695 und Kontrollgruppe 62,83 n/ROI \pm SEM 0,6136) signifikant ($p < 0,0001$) erhöhte Zellkonzentration in der ipsilateralen Hemisphäre gegenüber der Kontrollgruppe, während die Zahl Iba-1-positiver Zellen der contralateralen

4. Molekularbiologische Ergebnisse

Genexpressionsanalysen mittels qPCR wurden für jeweils zehn Tiere mit SHT und fünf scheinoperierte Tiere zu beiden Untersuchungszeitpunkten durchgeführt.

4.1. Expression des Gens *Il1 β*

4.1.1. CCI vs. Sham zum frühen Untersuchungszeitpunkt

Il1 β ist ein Inflammationsmarkergen im Gehirn (108). Seine Expression ist in der ipsilateralen Hemisphäre 57 Tage nach SHT im Vergleich zu scheinoperierten Tieren um das 2,28-fache (Md. nach SHT 228,8 % Sham, Iqa. 162 – 365 % Sham) erhöht (Abb. 26A). Diese Differenz ist signifikant ($p = 0,0009$). In der contralateralen Hemisphäre ist zu diesem Zeitpunkt die *Il1 β* -Expression signifikant ($p = 0,0087$) um das 1,45-fache (Md. nach SHT 145,5 % Sham, Iqa. 121,1 – 191,9 % Sham) gegenüber der Kontrollgruppe gesteigert (Abb. 26B). Aufgrund eines sehr hohen Maximalwerts in der ipsilateralen Hemisphäre (1565 % Sham) wird zur besseren Erkennbarkeit der niedrigen Werte eine logarithmische Skalierung der y-Achse in Abbildung 26A verwendet.

4.1.2. CCI vs. Sham zum späten Untersuchungszeitpunkt

Abbildung 26A zeigt, dass eine *Il1 β* -Überexpression 225 Tage nach SHT in der ipsilateralen (Md. nach SHT 106,1 % Sham, Iqa. 92,56 – 130,6 % Sham) und der contralateralen (Md. nach SHT 106,8 % Sham, Iqa. 89,2 – 118,1 % Sham) nicht mehr nachweisbar ist und sich die CCI- und die Sham-Gruppen auf einem ähnlichen Niveau befinden.

4.1.3. Vergleich der Untersuchungszeitpunkte

Aus oben aufgeführten Ergebnissen ergibt sich eine signifikante *Il1 β* -Expressionsabnahme mehrere Monate nach SHT in der ipsilateralen um das 0,46-fache ($p > 0,0001$) und in der contralateralen Hemisphäre um das 0,73-fache ($p = 0,0156$). Die Maximalwerte der contralateralen Hemisphäre erreichen weniger hohe Werte als sie im Schadensbereich festgestellt werden.

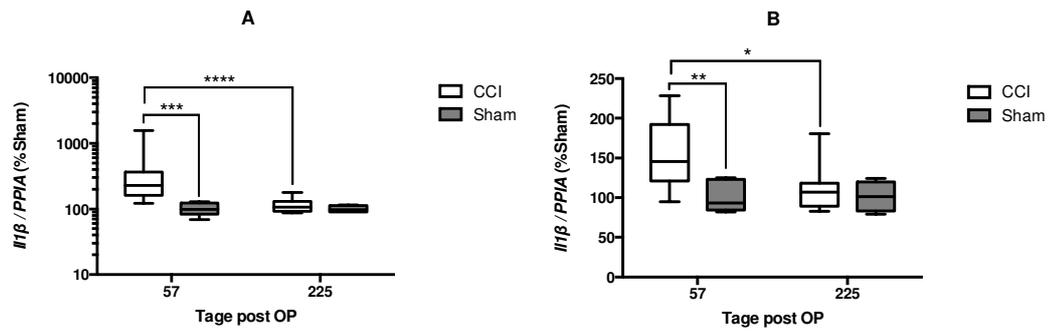


Abbildung 26: *Il1β*-Expression in der ipsilateralen (A) und contralateralen (B) Hemisphäre 57 und 225 Tage post OP

4.2. Expression des Gens *Il6*

4.2.1. CCI vs. Sham zum frühen Untersuchungszeitpunkt

Il6 ist ein Inflammationsmarker im Gehirn (109). Seine mittlere Expression 57 Tage nach SHT ist in der ipsilateralen (Md. nach SHT 144,9 % Sham, Iqa. 105,9 – 176,3 % Sham, Abb. 27A) als auch in der contralateralen Hemisphäre (Md. nach SHT 108,8 % Sham, Iqa. 88,8 – 123,5 % Sham, Abb. 27B) auf einem ähnlichen Niveau wie in den Kontrollgruppen. Weder in der ipsilateralen ($p = 0,0664$) noch in der contralateralen Hemisphäre ($p = 0,4753$) gibt es zu diesem Zeitpunkt einen signifikanten Gruppenunterschied.

4.2.2. CCI vs. Sham zum späten Untersuchungszeitpunkt

225 Tage nach SHT weicht die *Il6*-Expression sowohl in der ipsilateralen (Md. nach SHT 74,16 % Sham, Iqa. 65,57 – 101,8 % Sham, Abb. 27A) als auch in der contralateralen Hemisphäre (Md. nach SHT 83,02 % Sham, Iqa. 75,74 – 97,69 % Sham, Abb. 27B) nur geringfügig vom Niveau der Kontrollgruppe ab. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen lässt sich in der ipsilateralen ($p = 0,1703$) und der contralateralen Hemisphäre ($p = 0,1703$) zu diesem Zeitpunkt nicht ermitteln.

4.2.3. Vergleich der Untersuchungszeitpunkte

Die *Il6*-Expression nimmt in der ipsilateralen Hemisphäre zum späten (Md. nach SHT 74,16 % Sham, Iqa. 65,57 – 101,8 % Sham) im Vergleich zum frühen Untersuchungszeitpunkt (Md. nach SHT 144,9 % Sham, Iqa. 105,9 – 176,3 % Sham) um das 0,51-fache statistisch signifikant ab ($p = 0,0001$, Abb. 27A). In der contralateralen Hemisphäre lässt sich keine nennenswerte Differenz zwischen den Untersuchungszeitpunkten feststellen (Abb. 27B).

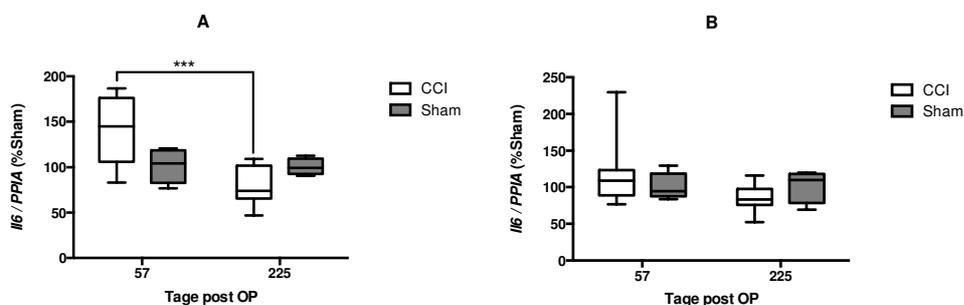


Abbildung 27: *Il6*-Expression in der ipsilateralen (A) und contralateralen (B) Hemisphäre 57 und 225 Tage post OP

4.3. Expression des Gens *Gfap*

4.3.1. CCI vs. Sham zum frühen Untersuchungszeitpunkt

Gfap ist ein Markergen für reaktive Astrozyten (110). Seine Expression ist in der ipsilateralen Hemisphäre 57 Tage nach SHT um das 3,89-fache (Md. nach SHT 389,7 % Sham, Iqa. 272,2 – 1028 % Sham) gegenüber der Kontrollgruppe erhöht (Abb. 28A). Dieser Unterschied ist signifikant ($p = 0,0005$). In der contralateralen Hemisphäre weichen zu diesem Zeitpunkt die Tiere mit SHT nicht von der Kontrollgruppe ab (Md. nach SHT 120,1 % Sham, Iqa. 68,7 – 185,2 % Sham, Abb. 28B) und eine signifikante Differenz lässt sich nicht ermitteln ($p = 0,6172$). Aufgrund der großen Spannweite wird zur besseren Erkennbarkeit der niedrigen Werte eine logarithmische Skalierung der y-Achse in Abbildung 28A verwendet.

4.3.2. CCI vs. Sham zum späten Untersuchungszeitpunkt

Mehrere Monate später, 225 Tage nach OP, ist die *Gfap*-Expression in der ipsilateralen Hemisphäre noch um das 2,45-fache (Md. nach SHT 245,6 % Sham, Iqa. 132,9 – 461,8 % Sham) erhöht, jedoch nicht rechnerisch signifikant ($p = 0,0725$). In der contralateralen Hemisphäre weichen zum späten Untersuchungszeitpunkt die Tiere mit SHT nicht von der Kontrollgruppe ab (Md. nach SHT 134,7 % Sham, Iqa. 88,93 – 160,6 % Sham, Abb. 28B) und eine signifikante Differenz zwischen den Gruppen lässt sich nicht ermitteln ($p = 0,4736$).

4.3.3. Vergleich der Untersuchungszeitpunkte

Eine nennenswerte Differenz der *Gfap*-Expression zwischen den Untersuchungszeitpunkten lässt sich weder in der ipsilateralen (Abb. 28A) noch in der contralateralen Hemisphäre (Abb. 28B) beobachten.

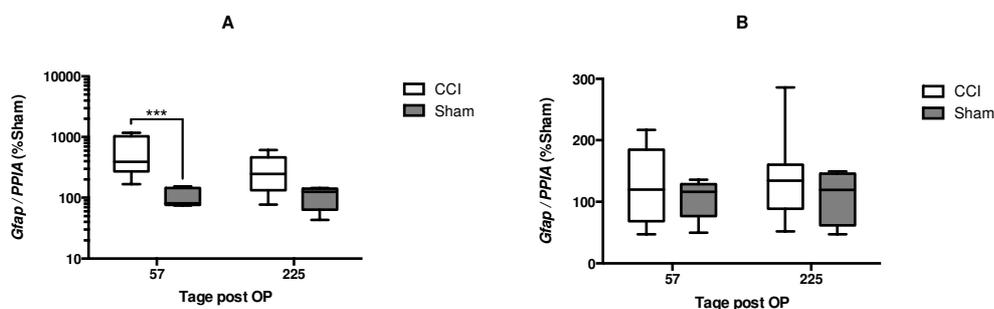


Abbildung 28: *Gfap*-Expression in der ipsilateralen (A) und contralateralen (B) Hemisphäre 57 und 225 Tage post OP

4.4. Expression des Gens *Lcn2*

4.4.1. CCI vs. Sham zum frühen Untersuchungszeitpunkt

Lcn2 ist ein Markergen für reaktive Astrozyten (111). Seine Expression in der ipsilateralen Hemisphäre ist 57 Tage nach SHT um das 55,4-fache (Md. nach SHT 5539 % Sham, Iqa. 4544 – 6247 % Sham) im Vergleich zu scheinoperierten Tieren erhöht (Abb. 29A). Diese Differenz ist statistisch signifikant ($p = 0,0005$). In der contralateralen Hemisphäre ist die *Lcn2*-Expression zu diesem Zeitpunkt um das 7,22-fache (Md. nach SHT 722,8 % Sham, Iqa. 58,6 – 1420 % Sham) gegenüber der Kontrollgruppe erhöht (Abb. 29B). Diese Differenz ist jedoch nicht statistisch signifikant ($p = 0,0861$).

4.4.2. CCI vs. Sham zum späten Untersuchungszeitpunkt

225 Tage nach SHT ist die *Lcn2*-Expression in der ipsilateralen Hemisphäre um das 6,32-fache (Md. nach SHT 632,2 % Sham, Iqa. 384,3 – 1720 % Sham) im Vergleich zu scheinoperierten Tieren erhöht (Abb. 29A). Dieser Unterschied ist statistisch signifikant ($p = 0,0077$). In der contralateralen Hemisphäre befinden sich beide Gruppen auf einem ähnlichen *Lcn2*-Expressionsniveau (Md. nach SHT 112,3 % Sham, Iqa. 53,58 – 417,8 % Sham) und weisen wie schon zuvor keine signifikanten Unterschiede auf ($p = 0,8813$).

4.4.3. Vergleich der Untersuchungszeitpunkte

In der ipsilateralen Hemisphäre lässt sich eine wesentliche Abnahme der *Lcn2*-Expression um das 0,11-fache (Md. früher 5539 % Sham, Iqa. 4544 – 6247 % Sham und später Untersuchungszeitpunkt 632,2 % Sham, Iqa. 384,3 – 1720 % Sham) bei Tieren mit SHT feststellen ($p > 0,0001$). In der contralateralen Hemisphäre lässt sich keine nennenswerte Differenz zwischen den Untersuchungszeitpunkten feststellen, wobei die Daten zu diesem Zeitpunkt eine besonders große Streuung aufweisen (Abb. 29B).

Aufgrund der großen Spannweite wird zur besseren Erkennbarkeit der niedrigen Werte eine logarithmische Skalierung der y-Achse in beiden Abbildungen verwendet.

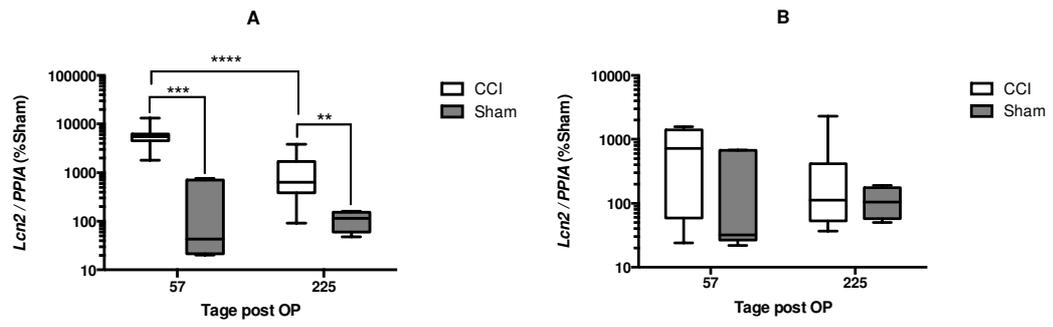


Abbildung 29: *Lcn2*-Expression in der ipsilateralen (A) und contralateralen (B) Hemisphäre 57 und 225 Tage post OP

4.5. Expression des Gens *Gadd45b*

Gadd45b ist ein Markergen für neuronale Aktivität und Plastizität (112). Eine nennenswerte Differenz seiner Expression in der ipsilateralen oder contralateralen Hemisphäre zwischen Tieren mit SHT und der Kontrollgruppe lässt sich zu beiden Untersuchungszeitpunkten nicht beobachten. Auch ein Vergleich zwischen den Zeitpunkten ergibt sowohl in der ipsilateralen als auch in der contralateralen Hemisphäre keine nennenswerten Unterschiede (Abb. 30A und 30B).

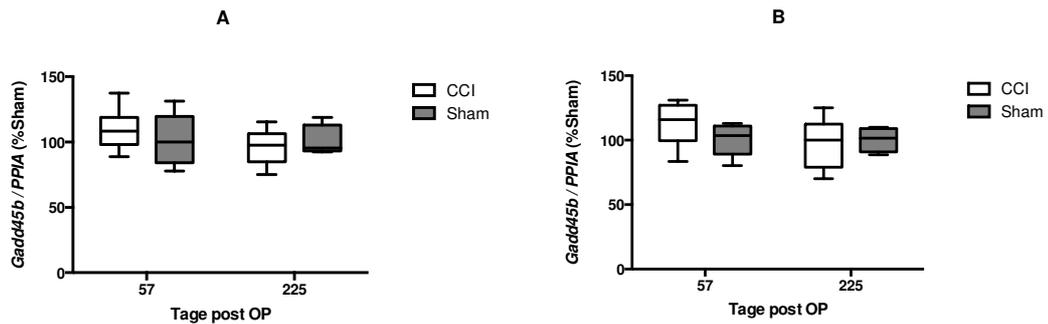


Abbildung 30: *Gadd45b*-Expression in der ipsilateralen (A) und contralateralen (B) Hemisphäre 57 und 225 Tage post OP

4.6. Expression des Gens *Gap43*

4.6.1. CCI vs. Sham zum frühen Untersuchungszeitpunkt

Gap43 ist ein Markergen für Neuritenwachstum und -regeneration (113). Seine Expression in der ipsilateralen Hemisphäre ist 57 Tage nach SHT auf einem ähnlichen Niveau wie bei der Kontrollgruppe (Md. nach SHT 107,7 % Sham, Iqa. 103,5 – 125,7 % Sham, Abb. 31A). Diese Differenz ist statistisch nicht signifikant ($p = 0,0861$). Auch in der contralateralen Hemisphäre ist zu diesem Zeitpunkt kein Effekt des SHT auf die *Gap43*-Expression festzustellen (Md. nach SHT 100,4 % Sham, Iqa. 96,44 – 102,9 % Sham, $p = 0,8228$, Abb. 31B).

4.6.2. CCI vs. Sham zum späten Untersuchungszeitpunkt

225 Tage nach SHT ist die *Gap43*-Expression in der ipsilateralen Hemisphäre um das 1,3-fache (Md. nach SHT 130 % Sham, Iqa. 115,6 – 134,7 % Sham) gegenüber den scheinoperierten Tieren gesteigert (Abb. 31A). Diese Differenz ist statistisch signifikant ($p = 0,0286$). In der contralateralen Hemisphäre ist zum späten Untersuchungszeitpunkt kein Effekt des SHT auf die *Gap43*-Expression festzustellen (Md. nach SHT 99,41 % Sham, Iqa. 95,77 – 106,1 % Sham, $p = 0,8813$, Abb. 31B).

4.6.3. Vergleich der Untersuchungszeitpunkte

Eine nennenswerte Differenz der *Gap43*-Expression zwischen den Untersuchungszeitpunkten lässt sich weder in der ipsilateralen (Abb. 31A) noch in der contralateralen Hemisphäre (Abb. 31B) beobachten.

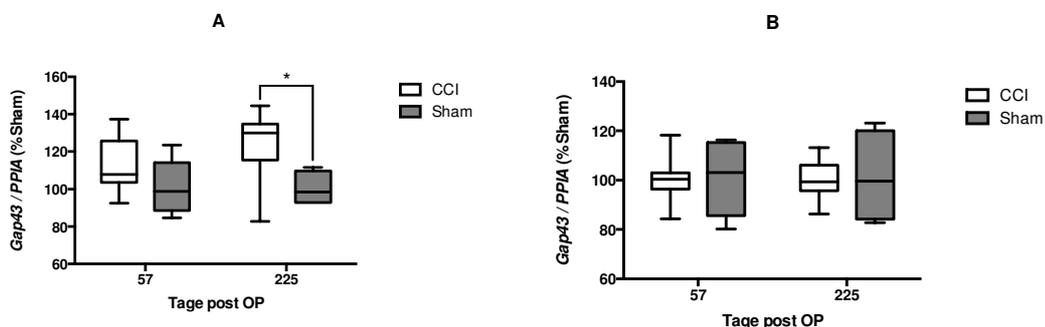


Abbildung 31: *Gap43*-Expression in der ipsilateralen (A) und contralateralen (B) Hemisphäre 57 und 225 Tage post OP

4.7. Expression des Gens *L1cam*

4.7.1. CCI vs. Sham zum frühen Untersuchungszeitpunkt

L1cam ist ein Markergen für axonale Entwicklung und Regeneration (114). In der ipsilateralen Hemisphäre kann 57 Tage nach OP eine Beeinflussung der *L1cam*-Expression durch das SHT nicht beobachtet werden (Md. nach SHT 95,19 % Sham, Iqa. 83,71 – 106,1 % Sham, Abb. 32A). Diese geringfügige Differenz ist statistisch nicht signifikant ($p = 0,4405$). Demgegenüber ist in der contralateralen Hemisphäre zu diesem Zeitpunkt eine 0,8-fache Reduktion (Md. nach SHT 80,4 % Sham, Iqa. 74,39 – 100,9 % Sham) gegenüber der Kontrollgruppe festzustellen (Abb. 32B). Dieser Unterschied ist signifikant ($p = 0,038$).

4.7.2. CCI vs. Sham zum späten Untersuchungszeitpunkt

Zum späten Untersuchungszeitpunkt, 225 Tage nach OP, ist eine Beeinflussung der *L1cam*-Expression durch das SHT weder in der ipsilateralen (Md. nach SHT 103,9 % Sham, Iqa. 98,34 – 116,7 % Sham, $p = 0,4405$, Abb. 32A) noch in der contralateralen Hemisphäre (Md. nach SHT 101,7 % Sham, Iqa. 98,46 – 109,6 % Sham, $p = 0,7066$, Abb. 32B) festzustellen.

4.7.3. Vergleich der Untersuchungszeitpunkte

Eine nennenswerte Differenz der *L1cam*-Expression zwischen den Untersuchungszeitpunkten lässt sich in der ipsilateralen Hemisphäre nicht beobachten ($p = 0,0509$, Abb. 32A). In der contralateralen Hemisphäre kommt es zu einer 1,26-fachen (Md. früher 80,4 % Sham, Iqa. 74,39 – 100,9 % Sham und später Untersuchungszeitpunkt 101,7 % Sham, Iqa. 98,46 – 109,6 % Sham) und statistisch signifikanten ($p = 0,0045$) Expressionssteigerung im Vergleich zum späten Untersuchungszeitpunkt (Abb. 32B).

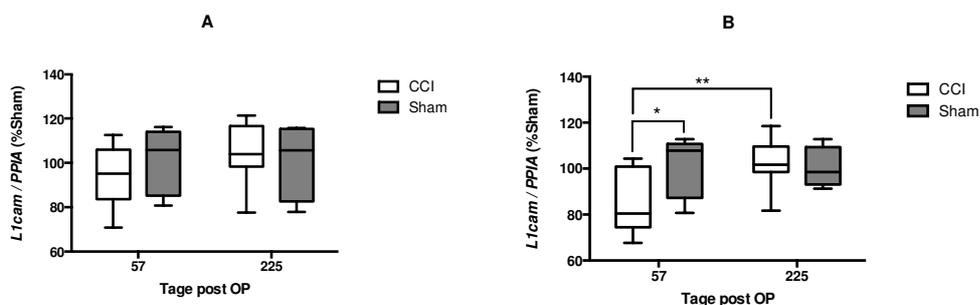


Abbildung 32: *L1cam*-Expression in der ipsilateralen (A) und contralateralen (B) Hemisphäre 57 und 225 Tage post OP

4.8. Expression des Gens *Arg1*

4.8.1. CCI vs. Sham zum frühen Untersuchungszeitpunkt

Arg1 ist ein Markergen für M2-aktivierte Mikroglia (115). Seine Expression in der ipsilateralen Hemisphäre 57 Tage nach SHT ist um das 1,81-fache (Md. nach SHT 181,9 % Sham, Iqa. 141,8 – 387,4 % Sham) gegenüber scheinoperierten Mäusen erhöht (Abb. 33A). Dieser Unterschied ist statistisch signifikant ($p = 0,0087$). In der contralateralen Hemisphäre weichen Tiere mit SHT zu diesem Zeitpunkt nicht nennenswert vom Niveau der Kontrollgruppe ab (Md. nach SHT 108,7 % Sham, Iqa. 75,34 – 114,6 % Sham, $p = 0,7237$ Abb. 33B). Aufgrund der großen Spannweite wird zur besseren Erkennbarkeit der niedrigen Werte eine logarithmische Skalierung der y-Achse in Abbildung 33A verwendet.

4.8.2. CCI vs. Sham zum späten Untersuchungszeitpunkt

225 Tage nach SHT ist die *Arg1*-Expression in der ipsilateralen Hemisphäre um das 1,86-fache (Md. nach SHT 186,6 % Sham, Iqa. 147,7 – 211,8 % Sham) gegenüber scheinoperierten Mäusen erhöht (Abb. 33A). Diese Differenz ist statistisch signifikant ($p = 0,0132$). In der contralateralen Hemisphäre befinden sich beide Gruppen auf einem ähnlichen *Arg1*-Expressionsniveau (Md. nach SHT 114,2 % Sham, Iqa. 92,3 – 137,4 % Sham, Abb. 33B) und weisen wie schon zuvor keine signifikanten Unterschiede auf ($p = 0,4456$).

4.8.3. Vergleich der Untersuchungszeitpunkte

Eine nennenswerte Differenz der *Arg1*-Expression zwischen den Untersuchungszeitpunkten lässt sich weder in der ipsilateralen (Abb. 33A) noch in der contralateralen Hemisphäre (Abb. 33B) beobachten.

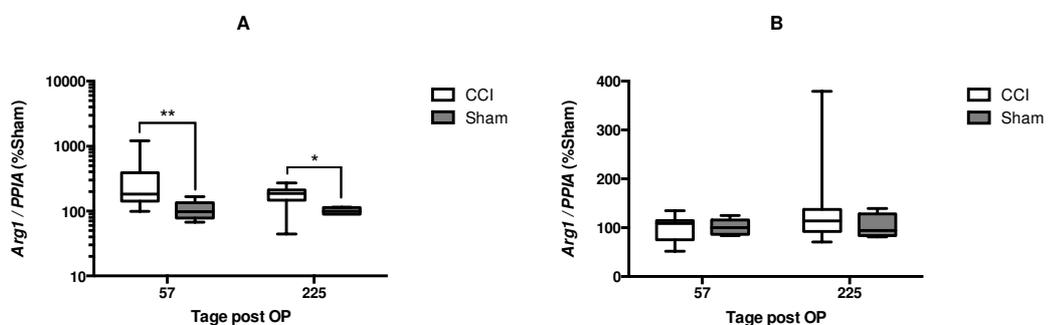


Abbildung 33: *Arg1*- Expression in der ipsilateralen (A) und contralateralen (B) Hemisphäre 57 und 225 Tage post OP

VI. DISKUSSION

Zum besseren Verständnis werden mehrere Testverfahren, die den gleichen bzw. einen ähnlichen Verhaltenskomplex untersuchen, zunächst einzeln und später gesammelt in einer auf den gesamten Verhaltenskomplex bezogenen Schlussfolgerung diskutiert. Wurde nur ein Testverfahren zu einem Verhaltenskomplex durchgeführt, wird auf diese Schlussfolgerung verzichtet.

1. Körpergewichtskontrolle

Eine Verminderung des Körpergewichts nach SHT ist von humanen Patienten (116) sowie von tierexperimentellen Studien (117) bekannt. Es wird vermutet, dass ein CCI beim Nager zu einer neuroendokrinen Störung führt (118), welche über negative Feedbackmechanismen der Glucocorticoide Einfluss auf Funktionen des Hypothalamus nimmt und dadurch die Futteraufnahme hemmt (119-121).

Dieser neuroendokrine Effekt kann die hier beobachtete reduzierte Gewichtszunahme der CCI-operierten Gruppe gegenüber den Sham-Tieren erklären. Weiterhin liegt es nahe, dass sich dieser Mechanismus stressbedingt nach Beginn der verhaltensbiologischen Untersuchungen verstärkt und die geringfügige Körpergewichtsabnahme während der Untersuchungsphase (letzte vier Wochen prä mortem) erklärt.

2. Verhaltensbiologische Untersuchungen

2.1. Motorische Koordination und Kombinationstests zur allgemeinen Verhaltensbeurteilung

2.1.1. Neurological Deficit Score (NDS)

Vorliegende Studien belegen, dass der verwendete NDS zur Evaluierung des neurologisch-motorischen Status bei Mäusen nach einem SHT erfolgreich verwendet werden kann (122). Auch wurde anhand dieses Score-Systems bereits eine zeitliche Entwicklung des funktionellen Schadens nach CCI beobachtet (123).

Auffällig ist, dass in dieser Versuchsreihe die Regeneration über mehrere Monate anhält, wogegen scheinoperierte Tiere im selben Zeitraum eine Verschlechterung ihrer neurologisch-motorischen Fähigkeiten erfahren. Vermutlich hängt dieses Defizit in der Sham-Gruppe mit dem parallel zunehmenden Körpergewicht und damit verbundenen Erschwernissen beim Beam-Balance-Test zusammen.

Das hier verwendete Score-System inkl. des Beam-Balance-Tests eignet sich, um motorische Störungen nach einem CCI selbst nach mehreren Monaten zu veranschaulichen und gleichzeitig eine Genesung dieser Beeinträchtigung nachzuweisen.

2.1.2. Rotarod

Das Rotarod wurde schon oft erfolgreich zur Beurteilung des motorischen Status nach einem SHT bei Nagern herangezogen (124, 125). Die in diesem Versuchsaufbau beobachteten motorischen Störungen in der subakuten Phase nach einem CCI sowie eine Reduktion dieser Beeinträchtigung innerhalb von wenigen Wochen ist bekannt (126-129).

Wir konnten eine Fortsetzung dieser motorischen Regeneration bei den Langzeitüberlebenden beobachten und 191 Tage post OP keine Unterschiede zwischen scheinoperierten Tieren und Tieren mit SHT im Rotarod mehr feststellen.

Die verkürzte Latenz bis zum Herabfallen der Tiere 191 Tage post OP hängt vermutlich vor allem mit dem gestiegenen Körpergewicht und daraus resultierenden Erschwernissen während des Laufens auf dem rotierenden Zylinder zusammen.

2.1.3. CatWalk® XT

Computerbasierte dreidimensionale Schritt- und Ganganalyse-Systeme finden bei Studien an humanen Patienten schon seit längerer Zeit erfolgreiche Anwendung (130, 131). Die CatWalk® XT-Technologie hat diese Methoden auf den Nager übertragen und wurde hier bei der Erforschung einer Reihe von zentralnervösen Erkrankungen verwendet (132-134).

Auch in der Akutphase nach einem CCI bei der Maus wurde diese Art der Schritt- und Ganganalyse bereits durchgeführt und ergab weitgehend ähnliche Resultate, wie sie hier 40 – 42 Tage post OP beobachtet werden (135). Die oben beschriebenen Daten bei Langzeitüberleben nach CCI (209 – 211 Tage post OP) zeigen im Vergleich dazu eine Reduktion der Abweichungen bei zunächst zehn zu nur noch fünf auffälligen Parametern. Weiterhin fällt die Differenz beim wichtigsten Parameter, der durchschnittlichen Geschwindigkeit, nach mehreren Monaten weniger deutlich aus. Insgesamt ergibt sich aus diesen Beobachtungen ein Bild, das auf eine Abnahme der motorischen Störungen schließen lässt. Aufgrund der immer noch bestehenden Schritt- und Gangunterschiede kann jedoch nicht von einer absoluten Wiederherstellung der motorischen Fähigkeiten innerhalb des langen Untersuchungszeitraums gesprochen werden.

Die sich erst nach 209 – 211 Tagen entwickelnde Schrittfolgeabweichung (*Step pattern*) der Tiere mit SHT könnte einen Hinweis auf Mechanismen zur funktionellen Kompensation motorischer Defizite geben.

Mit der in VI. 1. diskutierten Körpergewichtszunahme und damit verbundenen motorischen Einschränkungen lässt sich höchst wahrscheinlich die Verminderung der durchschnittlichen Geschwindigkeit zum späten Testzeitpunkt erklären.

2.1.4. Schlussfolgerung: Motorische Koordination

Sensomotorische Defizite nach CCI wurden mehrfach beobachtet und lassen sich v. a. mit Gewebeverlust im primären Schadensgebiet, neuronalem Zelluntergang in der Penumbra sowie diffusen axonalen Störungen im gesamten ZNS erklären (136-139). Auch eine Besserung dieser Schäden im Anschluss an die akute Phase, also innerhalb weniger Wochen, wurde bereits beschrieben (136, 140). Die Regeneration erklärt sich vermutlich mit zunehmender Adaptation an die Einschränkung und damit verbundener zentralnervöser Plastizität (141-143) mit axonaler Neubildung als zentralem Mechanismus (144-146). Weiterhin sind wahrscheinlich reaktive Astrozyten und die Neubildung von Synapsen an diesem Prozess beteiligt (147, 148). Diese Umbauprozesse manifestieren sich auch in der contralateralen Gehirnhemisphäre (149, 150).

Bei Haustieren sind motorische Ausfallerscheinungen eine der häufigsten beobachteten Folgen eines SHT und werden u. a. zur Beurteilung des Schadenumfangs herangezogen (9, 10, 151, 152). Von kleinen Haustieren ist eine gute funktionelle Regeneration nach Gehirngewebeverlust bekannt (153) und sollte bei der Beratung von Patientenbesitzern bzgl. einer langfristigen Prognose beachtet werden.

Bezogen auf das Langzeitüberleben nach einem CCI, das hier erstmals so umfassend untersucht wurde, lässt sich festhalten, dass die oben beschriebene Regeneration über mehrere Monate anhält und mit den verwendeten Tests evaluiert werden kann. Sechs bis sieben Monate post OP wird die Differenz zwischen CCI- und Sham-Gruppe aufgrund der beschriebenen Rekonvaleszenz motorischer Defizite nach CCI sowie einer Körpergewichtszunahme aller Tiere kleiner. Dies hat zur Folge, dass im CatWalk® XT weniger Parameter zur Beurteilung des motorischen Status herangezogen werden können und der NDS geringere Gruppenunterschiede aufweist. Der Rotarod-Test lässt zu diesem Zeitpunkt gar keinen Nachweis einer Differenz zwischen scheinoperierten und Tieren mit CCI mehr zu.

Die Körpergewichtszunahme beeinflusst die Ergebnisse bei den verwendeten Experimenten derart, dass absolute Werte zwischen beiden Testzeitpunkten bei ad libitum Fütterung nur schwer verglichen werden können.

2.2. Depressions-ähnliches, Schizophrenie-ähnliches, Angst-assoziiertes und soziales Verhalten

2.2.1. Elevated Plus Maze (EPM)

Im Elevated Plus Maze Test wurde bereits früher eine Störung des Angstverhaltens nach einem CCI bei Mäusen nachgewiesen. Während in der akuten Phase (24 h und 48 h post OP) noch eine verstärkte Aversion gegen die offenen Arme anhand verkürzter Aufenthaltszeiten in diesem Bereich beobachtet wurde (154), scheint sich dieses Verhalten in der subakuten Phase (21 Tage post OP) umzukehren und zu einer Präferenz für die offenen Arme zu entwickeln (155).

Der erste hier untersuchte Zeitpunkt liegt möglicherweise im Übergang von verstärkter zu gehemmter Aversion vor den offenen Armen, so dass keine Störung des Angstverhaltens gemessen werden kann. Das reduzierte Angstverhalten bei einigen Tieren mit SHT (Ausreißer im Dotplot) könnte hier auf eine unterschiedlich schnelle individuelle Entwicklung zum bekannten subakuten Phänotyp hindeuten.

Die festgestellte Zunahme der Aufenthaltszeit in den offenen Armen zum späten Untersuchungszeitpunkt (184 Tage post OP) nach einem SHT belegt, dass bereits früher untersuchte Störungen im Angstverhalten mehrere Monate anhalten können. In Relation zu den Ergebnissen bei der frühen Untersuchungsgruppe scheinen sich die Abweichungen des Angstverhaltens sogar erst im Verlauf mehrerer Monate auszuprägen und zu manifestieren.

Diskrepanzen bei der zurückgelegten Distanz zwischen den Untersuchungszeitpunkten erklären sich vermutlich mit altersabhängigen Verhaltensänderungen und dem gestiegenen Körpergewicht bei Langzeitüberleben.

2.2.2. Open Field (OF)

Daten von Mäusen wenige Tage, Wochen und Monate nach einem CCI liegen bereits vor und zeigen in einigen Fällen keine Einflüsse auf die Aktivität und das Angstverhalten (155, 156). Andere Studien beschreiben eine gesteigerte Aktivität und ein vermehrtes Angstverhalten als Folge des CCI (136).

Wir beobachteten 15 Tage post OP eine verstärkte Angst vor freien Flächen und nach 185 Tagen eine erhöhte Aktivität in folge des CCI. Da die beobachteten Ergebnisse in diesem Test interagieren (Zusammenhang von Aufenthaltszeit in verschiedenen Bereichen des OF und der Aktivität sowie motorischen Fähigkeiten des Versuchstiers) und zudem vermutlich ein Einfluss von in VI. 2.1.4. diskutierten motorischen Defiziten besteht, kann aufgrund dieser Ergebnisse keine endgültige Aussage bzgl. des Verhaltens getroffen werden. Nur eine Differenz des Verhaltens zu beiden Untersuchungszeitpunkten und eine Entwicklung der Verhaltensirritationen kann zusammenfassend festgestellt werden.

Diskrepanzen der Kontrollgruppen zwischen den Untersuchungszeitpunkten erklären sich vermutlich mit dem gestiegenen Körpergewicht sowie altersabhängiger Verhaltensänderungen bei Langzeitüberleben.

2.2.3. Social Interaction (SI) = Crawley Box

Störungen des Sozialverhaltens sind die häufige Folge eines SHT beim Menschen (5, 157-159). Auch bei Mäusen ist bekannt, dass Defizite im Sozialverhalten nach einem SHT auftreten können (160, 161). Die hier verwendete Testmethode wurde schon häufig zur Beurteilung des Sozialverhaltens bei Mäusen eingesetzt und das untersuchte Verhalten in Zusammenhang zu Autismus-assoziierten Störungen gebracht (162-164).

Wir konnten zu beiden Testzeitpunkten keine Einschränkungen des Sozialverhaltens feststellen. Die beobachtete Abnahme des Interesses an der unbekanntem Maus lässt sich vermutlich mit einer natürlichen Entwicklung des Sozialverhaltens in Abhängigkeit vom Alter der Testmäuse und ihrer Haltung erklären (165). Die Abnahme des Interesses fiel für Tier mit SHT deutlicher aus, da Sie jedoch weiterhin mehr Zeit im Kompartiment der unbekanntem Maus verbrachten, kann aufgrund dieser Daten noch kein soziales Defizit festgestellt werden. Das induzierte CCI scheint lediglich entwicklungsbedingte Änderungen des Sozialverhaltens zu beeinflussen bzw. zu beschleunigen.

2.2.4. Prepulse Inhibition of Acoustic Startle Response (PPI)

Die Messung der Prepulse Inhibition wird beim Menschen mit bipolaren Störungen in Zusammenhang gebracht und kann hier zur Diagnose von Schizophrenie und anderen neuropsychiatrischen Erkrankungen verwendet werden (166, 167). Zur Erforschung bipolarer Störungen wird diese Methode schon seit langem auch bei Labornagern eingesetzt (168-170). Es wurde bereits nachgewiesen, dass SHT-Modelle (u. a. das CCI) zu Defiziten der in diesem Test untersuchten Reizverarbeitung führen können (155, 171).

Der Effekt, dass eine Zunahme der Intensität des *Prepulse* mit einer Steigerung der Prepulse Inhibition einhergeht, wird erwartet und als gesundes Verhalten angesehen (172, 173). Die scheinbar gesteigerte Schreckreaktion bei allen Mäusen zum späten Untersuchungszeitpunkt lässt sich wahrscheinlich auf das gesteigerte Körpergewicht und damit einhergehende stärkere Krafteinwirkung an den Vibrationssensoren des Käfigbodens zurückführen.

In dieser Versuchsreihe war es weder in der subakuten Phase noch bei Langzeitüberleben nach einem CCI möglich, einen Einfluss auf die Prepulse Inhibition festzustellen. Abweichungen von oben aufgeführten Studien lassen sich vermutlich mit unterschiedlichen Versuchsanordnungen und anders definierter Schadensgröße erklären. Da eine physiologische Prepulse Inhibition bei allen Tieren festgestellt wurde, scheint es keine grundlegenden Fehler bei der Versuchsdurchführung gegeben zu haben.

2.2.5. Tail Suspension (TS)

Der Tail Suspension Test ist einer der Standardtests, um das Depressions-assoziierte Verhalten bei Nagern zu untersuchen (174-176). Der Forced Swim Test untersucht das gleiche Verhaltensmuster, konnte hier jedoch aufgrund möglicher negativer Beeinflussung auf den Morris Water Maze Test nicht angewandt werden (177, 178). Nach einem CCI wurde schon eine erhöhte Immobilität im Tail Suspension Test (179) und im Forced Swim Test (155) nachgewiesen, also eine Neigung zu Depressions-assoziiertem Verhalten.

Unsere Ergebnisse zeigen 20 Tage nach OP eine verkürzte Immobilitätszeit bei Tieren mit SHT. Die als Folge eines SHT mehrfach beobachtete Neigung zu

Depressions-assoziiertem Verhalten kann somit nicht nur nicht belegt werden, es zeigt sich sogar eine erhöhte Aktivität als Folge des CCI.

Eine verzögerte Wundheilung hatte zur Folge, dass 20 Tage nach OP die Operationswunden sowie das Knochenfenster noch nicht ganz verschlossen waren. Dies in Kombination mit erhöhtem Blutdruck beim Über-Kopf-hängen könnte schmerzhafteste Prozesse im Wundbereich und eine damit einhergehende Hyperaktivität ausgelöst haben. Diese Vermutung wird dadurch gestützt, dass zum zweiten Untersuchungszeitpunkt die Wunden aller Tiere gänzlich verheilt waren und kein Unterschied zwischen den Testgruppen mehr nachweisbar war. Deshalb sollte aus unseren Ergebnissen im Tail Suspension Test kein endgültiger Rückschluss auf Depressions-assoziiertes Verhalten gezogen und für folgende Studien bei Wundheilungsstörungen z. B. der Forced Swim Test bevorzugt werden.

2.2.6. Schlussfolgerung: Depressions-ähnliches, Schizophrenie-ähnliches, Angst-assoziiertes und soziales Verhalten

Depressionen, bipolare Störungen und Defizite im Sozial- und Angstverhalten sind häufige Folgen eines SHT bei humanen Patienten (180, 181). Sie sind die schwersten Langzeitschäden und stellen die Betroffenen oft noch Jahre nach dem Trauma vor Probleme im alltäglichen Leben (182-184).

Da die Diagnose von neuropsychiatrischen Störungen bei Haustieren sehr beschwerlich ist, liegen dazu keine Daten nach einem SHT vor. Aufgrund der Deutlichkeit von Ergebnissen aus humanmedizinischen Studien und aus Untersuchungen an Labornagern ist das Vorkommen dieser Defizite auch bei Haustieren als sehr wahrscheinlich anzusehen.

Die hier aufgeführten Resultate veranschaulichen, dass es sowohl in der subakuten als auch in der chronischen Phase nach einem SHT zu Defiziten im Angstverhalten kommt und sich diese im Verlauf mehrerer Monate wandeln. In Anbetracht der Multiperspektivität der untersuchten Verhaltensart ist eine umfassende qualitative Aussage zur Entwicklung der beobachteten Beeinträchtigungen jedoch nicht möglich. Änderungen des Schizophrenie-ähnlichen und des Sozialverhaltens nach einem SHT lassen sich mit der hier angewandten Methode nicht nachweisen. Vermutlich kommt es auch zu Defiziten

beim Depressions-ähnlichen Verhalten und der Aktivität, wobei im verwendeten Test wahrscheinlich Schmerzen im Wundbereich auftreten und auf das Verhalten einwirken. Hier sollten künftig andere Untersuchungsmethoden bevorzugt werden.

2.3. Kognitive Fähigkeiten

2.3.1. Morris Water Maze (MWM)

Beeinträchtigungen der räumlichen Erinnerungs- und Lernfähigkeit wenige Wochen nach einem CCI wurden bei Mäusen im MWM bereits nachgewiesen (129, 136, 155). Die dargestellten Ergebnisse zum frühen Untersuchungszeitpunkt belegen solche kognitiven Defizite in der subakuten Phase nach einem CCI. Da bereits beim Auffinden der sichtbaren Plattform Beeinträchtigungen durch das SHT beobachtet wurden, muss von einer übergeordneten kognitiven und nicht rein hippocampalen Störung ausgegangen werden, wie man sie im MWM vornehmlich untersucht (185-188). Weitere Gründe für das beobachtete Verhalten können eine Schädigung der visuellen Wahrnehmung oder gestörte motorische Funktionen sein. Allerdings können später im Visuell Cliff Test keine Störungen der visuellen Fähigkeiten nachgewiesen werden. Da die Durchschnittsgeschwindigkeit während des ersten Testlaufs am ersten Testtag unverändert ist, kann keine Beeinträchtigung von motorischen Fähigkeiten bzgl. des Schwimmens beobachtet werden. Somit sind wahrscheinlich kognitive Defizite allein für das verzögerte Auffinden der sichtbaren und verborgenen Plattform nach einem SHT verantwortlich. Scheinoperierte Tiere verkürzen nicht nur die Zeit bis zum Erreichen der Plattform, sondern auch die Aufenthaltszeit in der randnahen Zone. Dies zeigt, dass diese Mäuse die Fähigkeit haben, eine Strategie zur gezielten Suche der Plattform zu entwickeln. Im Vergleich dazu suchen Tiere mit SHT täglich für lange Zeit die Beckenwand auf und entwickeln keine gezielte Strategie zum Auffinden der Plattform. Dieses Verhalten wird auch als Thigmotaxis bezeichnet und unterstützt die Annahme kognitiver Defizite nach einem SHT. Das Ergebnis des *probe trial* belegt, dass alle Mäuse trotz fehlender Plattform den Plattformquadranten bevorzugen und sich räumlich orientieren können. Daneben wird der links neben dem Plattformquadranten gelegene Quadrant vermutlich bevorzugt, weil er sich zwischen dem Plattformquadranten

und der Tür des Versuchsraums befindet und diese Tür einen der augenscheinlichsten Hinweise für die räumliche Orientierung der Mäuse darstellt.

Persistierende kognitive Defizite bis zu einem Jahr nach einem SHT konnten beim Labornager schon nachgewiesen werden (189, 190). Die beobachtete kognitive Leistung im MWM an den Tagen 191 bis 205 post OP, zeigt ähnliche Abweichungen wie in der subakuten Phase nach dem SHT. Mäuse nach einem CCI benötigen im Vergleich mit scheinoperierten Tieren länger zum Auffinden der sichtbaren und verborgenen Plattform, starten jedoch am ersten Tag bei verborgener Plattform vom selben Niveau, weichen bei der Durchschnittsgeschwindigkeit während des ersten Testlaufs am ersten Testtag nicht ab, verbringen aber über die gesamte Zeitspanne mehr Zeit in der Randzone und bevorzugen im *probe trial* den Plattform- sowie den links daneben gelegenen Quadranten.

Somit lassen sich Beeinträchtigungen bei der in diesem Test untersuchten räumlichen Erinnerungs- und Lernfähigkeit nachweisen, die im Verlauf mehrerer Monate nach einem SHT in ähnlicher Form bestehen bleiben.

2.3.2. Fear Conditioning (FC)

Die in diesem Versuch untersuchte Lernfähigkeit basiert auf der klassischen Konditionierung (191-193). Dieses emotionale Lernen ist primär mit der Amygdala-assoziiert (194-196) und nur untergeordnet von Hippocampus (197, 198) und präfrontalem Kortex abhängig (199, 200). Abgewandelte Versuchsprotokolle können den Anteil der letztgenannten Hirnstrukturen am getesteten Verhalten erhöhen (201-203).

Defizite der Angst-assoziierten Lernfähigkeit wurden bei Nagern als Auswirkung eines SHT schon mehrfach beobachtet (204-206). Die hier dargestellten Ergebnisse können solche Störungen nicht belegen. Vor allem die gleichmäßig erhöhte Immobilitätsdauer nach Ertönen des Signaltons (*cue*) in beiden Gruppen zu beiden Testzeitpunkten zeigt, dass alle Tiere dieses Geräusch im gleichen Maße negativ assoziieren und deshalb ein gesteigertes Angstverhalten zeigen. Die zum frühen Testzeitpunkt beobachtete verlängerte Immobilität im Anschluss an die Angst-assoziierte Konditionierung (*context*) bei Tieren mit SHT deutet auf eine verstärkte Schreckhaftigkeit, nicht jedoch auf ein Defizit der Angst-

assozierten Lernfähigkeit zu diesem Zeitpunkt hin. Daher ist aufgrund der Ergebnisse im FC eine Beteiligung der Amygdala am Hirnschaden unwahrscheinlich. Vermutlich hängt die mehrere Monate nach OP beobachtete Mobilitätsminderung aller Tiere mit einer altersabhängigen Hypoaktivität und dem gesteigerten Körpergewicht zusammen.

2.3.3. Schlussfolgerung: Kognitive Fähigkeiten

Kognitive Einschränkungen sind eine bekannte Folge des SHT sowohl beim Menschen (207-209) als auch beim Labornager (136, 204, 210).

Die in dieser Studie verwendeten Verfahren testen die Leistungsfähigkeit unterschiedlicher Hirnregionen. Nicht nur die Arten der ermittelten Kognition, sondern auch der Schwierigkeitsgrad der zu erlernenden Aufgaben weicht zwischen den Testverfahren ab. Aufgrund der Kombination aus räumlicher Orientierung anhand von Hinweisschildern an einem unbekanntem Ort mit der Art der Fortbewegung muss das Verhalten im MWM über eine längere Zeit erlernt werden. Der Test stellt somit eine vergleichsweise schwierige Aufgabe für das Versuchstier dar. Er liefert Informationen über die hippocampale räumliche Erinnerungs- und Lernfähigkeit, welche über mehrere Monate nach einem CCI deutlich eingeschränkt ist. Demgegenüber wird im FC primär das Amygdala-assoziierte emotionale Lernen erforscht (194-196), welches keine Abweichungen wenige Wochen bis Monate nach CCI aufweist. Die erzeugte Konditionierung wird im Vergleich zur Aufgabenstellung im MWM innerhalb kurzer Zeit erlernt und es muss keine Lösungsstrategie entwickelt werden. Dies zeigt, dass im FC eine verhältnismäßig einfach zu erlernende kognitive Funktion untersucht wird.

Folglich ist für das beobachtete kognitive Defizit charakteristisch, dass es keinen messbaren Einfluss auf einfache Amygdala-assoziierte emotionale Funktionen im FC nimmt, aber negative Auswirkungen auf die komplexere hippocampale räumliche Erinnerungs- und Lernfähigkeit im MWM hat. Der Hirnschaden scheint sich funktionell nur auf den Hippocampus sowie den präfrontalen Kortex auszuwirken und die Amygdala nicht miteinzubeziehen. Diese Beobachtung stimmt mit der histologischen Schadensanalyse in der Nissl-Färbung überein. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse muss angenommen werden, dass sich diese kognitive Störung auch im Verlauf mehrerer Monate nicht verändert.

2.4. Visuelle Wahrnehmung

2.4.1. Visual Cliff Test

Es wurde bereits nachgewiesen, dass Neurodegeneration im visuellen Kortex eine mögliche Folge des CCI ist, auch wenn diese Hirnregion nicht primär vom neuronalen Schaden betroffen ist (211). Da eine verminderte visuelle Wahrnehmung viele der durchgeführten Tests beeinflussen kann, soll diese Möglichkeit mit dem VC ausgeschlossen werden.

Die vorliegenden Ergebnisse 224 Tage nach OP können mit hoher Wahrscheinlichkeit auf alle Tiere übertragen werden, da man mit steigendem Alter eine Verschlechterung der visuellen Fähigkeiten erwarten würde und keine offensichtlichen Einflüsse auf das Sehvermögen im Verlaufe der Tests gegeben waren. Da sowohl scheinoperierte als auch Tiere mit SHT eine längere Aufenthaltsdauer im ebenerdigen (*grounded*) Areal zeigen, kann für beide Gruppen kein Defizit des Sehvermögens nachgewiesen werden. Die deutlichere Präferenz der scheinoperierten Tiere kann auf eine zuvor im EPM schon beobachtete Störung des Angstverhaltens nach CCI zurückgeführt werden.

2.5. Krampfneigung

2.5.1. Messung Pentylentetrazol-induzierter Krampfanfälle (PTZ)

Es wird vermutet, dass mehrere Wirkmechanismen die konvulsive Wirkung von Pentylentetrazol induzieren und dabei interagieren (212-214). Eine zentrale Rolle wird der hohen Affinität zur Picrotoxin-Bindungsstelle am GABA_A-Rezeptor zugeschrieben. Dies hat eine Hemmung der GABA_A-Rezeptoren und dadurch gestörte neuronale Inhibition zur Folge (215-218).

Eine durch ein SHT ausgelöste gesteigerte Krampfanfälligkeit wurde sowohl beim Menschen (219-223) und beim Labornager (224-227) als auch beim Hund (33, 39, 228, 229) beschrieben. Grund für dieses Krampfleiden sind vermutlich vornehmlich im Gyrus dentatus lokalisierte Störungen neuronaler Kreisbahnen sowie hippocampaler Zelluntergang (230-233).

Krampfleiden sind tiermedizinisch vermutlich die für Tierbesitzer relevanteste Folge eines SHT. Da eine Behandlung nur in seltenen Fällen möglich ist, spielt

eine langfristige Prognose ohne Therapie hinsichtlich der Euthanasieentscheidung eine zentrale Rolle.

Die Messung Pentylentetrazol-induzierter Krampfanfälle (PTZ) ist ein akutes Anfallsmodell, welches oft zur Untersuchung der antikonvulsiven oder prokonvulsiven Wirkungen von Substanzen genutzt wird (234). Die primär bei der Entstehung Pentylentetrazol-induzierter Krampfanfälle beteiligten Mechanismen sind nicht mit den Vorgängen identisch, die zur posttraumatischen Epilepsie führen (218, 234-236). Daher hat dieses Modell eine eingeschränkte prädiktive Validität für die Untersuchung des Krampfleidens nach SHT. Die langfristige Erfassung spontan auftretender Anfälle könnte beispielsweise aussagekräftigere Ergebnisse zur posttraumatischen Epilepsie liefern. Im Hinblick auf möglichst geringen zeitlichen und apparativen Aufwand wurde die Messung Pentylentetrazol-induzierter Krampfanfälle als die einzig praktikable Methode zur Untersuchung der Krampfanfälligkeit in dieser Studie ausgemacht. Dieses Testverfahren wurde bereits mehrfach erfolgreich zur Untersuchung der Krampfanfälligkeit nach SHT genutzt (225, 227), die zudem nur eine von mehreren untersuchten verhaltensbiologischen Folgen des SHT ist.

Die dargestellten Ergebnisse belegen eine erhöhte Krampfneigung sowohl in der subakuten als auch in der chronischen Phase nach einem SHT. Weder eine Erholung noch eine Verschlechterung der gesteigerten Auslösbarkeit von Pentylentetrazol-induzierten Krämpfen kann bei langzeitüberlebenden Mäusen beobachtet werden. Zu beachten ist dabei, dass sich die Krampfneigung unabhängig vom SHT mit steigendem Alter erhöht. Der altersabhängige Anstieg von Krampfleiden ist vom Menschen bekannt (237-240) und hat beim Labornager Einfluss auf die Wirkung konvulsiver Substanzen (241), darunter PTZ (242, 243). Eine herabgesetzte hippocampale Plastizität und altersbedingte neuronale Zellverluste könnten eine Erklärung für den Alterseinfluss auf die Krampfinduktion liefern (244-246).

3. Histologische Färbung und Auswertung

3.1. Bestimmung des Schadenvolumens

Die Färbung histologischer Schnitte nach Nissl ist eine Standardmethode zur Evaluierung des Schadenvolumens nach einem SHT und zur Ergänzung verhaltensbiologischer Untersuchungen (247-249).

Auch wenn das Kontusionsgebiet mitberücksichtigt wird, ist eine Atrophie der ipsilateralen Hemisphäre zu beiden Untersuchungszeitpunkten festzustellen. Dies hängt mit Gewebeerlust, Zelluntergang und Umorganisation im primären und sekundären Schadensbereich zusammen (250-252).

Umbauprozesse der contralateralen Hemisphäre nach einem fokalen SHT wurden experimentell beim Labornager bereits beschrieben und können als Erklärung für die in VI. 2.1.4 diskutierte funktionell-motorische Regeneration dienen (149, 150). Es ist naheliegend, dass die bei diesem Geschehen im Vordergrund stehende axonale Neubildung (144-146) zu einer Hypertrophie des Nervengewebes führt und die beobachtete contralaterale Volumenzunahme wenige Wochen nach SHT erklärt. Dass es zur selben Zeit zur Atrophie der ipsilateralen Hemisphäre kommt, könnte diesen Prozess hinsichtlich der intrakraniellen Platzverhältnisse begünstigen. Das contralaterale Hemisphärenvolumen nach CCI weicht nach Langzeitüberleben nicht mehr von dem scheinoperierter Tiere ab und weist darauf hin, dass oben aufgeführte Umbauprozesse mehrere Monate nach SHT weitgehend abgeschlossen sind.

Eine altersabhängige Gehirnatrophie ist beim Menschen (253) und beim Labornager (102) bereits beobachtet worden und erklärt die festgestellte Hemisphärenvolumenreduzierung nach Langzeitüberleben. Die Zunahme des prozentualen Anteils des Schadens an der ipsilateralen Hemisphäre erklärt sich dementsprechend ebenfalls mit dieser Gehirnatrophie, da ein alters- oder zeitabhängiger Einfluss auf das absolute Kontusionsvolumen nach SHT nicht festgestellt werden konnte.

3.2. Bestimmung der Mikrogliazellaktivierung

Es ist bekannt, dass die Expression von Iba1 bei aktivierten Mikroglia erhöht ist (95). Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass Mikroglia bei einer Verletzung des ZNS aktiviert werden und ihre Morphologie ändern (254-257).

Mikroglia wird sowohl eine degenerative neurotoxische als auch eine regenerative neuroprotektive Funktion im verletzten und ausheilenden Gehirn zugewiesen (258). Zudem wurde bereits ein Zusammenhang zwischen der Aktivität von Mikroglia und synaptischer Aktivität sowie Synaptogenese, also neuroplastischen Prozessen, im Nervengewebe beschrieben (259-262). Diese unterschiedlichen Effekte sind vermutlich von Subtyp-spezifischen molekularen Signaturen der Mikroglia abhängig und überlagern sich im Verlauf der Heilung nach einer Verletzung des ZNS (263-265).

Ein Anstieg der Anzahl aktivierter Mikroglia im perikontusionalen Gewebe wurde schon häufig als Folge eines experimentellen SHT beim Labornager beobachtet (266-268). Auch eine langfristige Abnahme der Mikrogliaaktivierung nach Erreichen eines Maximums wenige Tage nach SHT wurde bereits festgestellt (267).

Die in der Iba1-Färbung nachgewiesene Mikrogliazellzahl stimmt erwartungsgemäß weitestgehend mit diesen Resultaten überein. Aufgrund der Zellzahl kann keine Aussage zum funktionellen Zustand der Mikroglia getroffen werden. Es kann vermutet werden, dass wenige Wochen nach dem SHT in der contralateralen Hemisphäre aufgrund von neuroplastischen Prozessen Mikroglia einwandern und hier ggf. einen positiven Einfluss nehmen (259-262). Eine weitere Erklärung für die erhöhte Mikrogliazellzahl in diesem Bereich kann auch eine systemische Inflammationsreaktion aufgrund des SHT liefern, welche unter anderem auch in der contralateralen Hemisphäre zum tragen kommt (269-271).

Im perikotusionalen Bereich der ipsilateralen Hemisphäre spricht die stark erhöhte Mikrogliaaktivierung für ein inflammatorisches Geschehen als direkte Folge der Verletzung. Neben seiner inflammatorischen Wirkung besteht auch in der ipsilateralen Hemisphäre die Möglichkeit einer neuroplastischen Einwirkung auf das Nervengewebe. Der Einfluss auf die Zahl an Mikroglia durch diese Vorgänge kann mehrere Monate nach SHT nur noch in sehr geringem Maß nachgewiesen werden. Es liegt nahe, dass sich die inflammatorischen und ggf. auch neuroplastischen Prozesse bei Langzeitüberleben nach SHT nahezu auf ein Normalmaß reduzieren.

4. Molekularbiologische Genexpression

4.1. Inflammationsmarker

4.1.1. *Il1 β*

Das *Il1 β* -Gen kodiert über eine Reihe inaktiver Vorläuferproteine das Zytokin Interleukin-1 β . Dieser Entzündungsmediator wird im ZNS vornehmlich von Mikroglia sezerniert und bewirkt im Zusammenspiel mit anderen endogenen Mediatoren eine lokale und systemische Entzündung nach einer Verletzung des ZNS (108, 272). Innerhalb kurzer Zeit nach einem SHT steigt die Konzentration von Interleukin-1 β im Schadensgebiet an und verstärkt die Entwicklung des sekundären Hirnschadens. Die gesteigerte Verletzung des Hirngewebes manifestiert sich unter anderem im Hippocampus (273). Ein erschwerender Einfluss hoher *Il1 β* -Expression auf funktionelle Defizite nach einem SHT wurde in humanmedizinischen Studien bereits nachgewiesen (274, 275). Unter anderem konnte ein positiver Zusammenhang zwischen der posttraumatischen Interleukin-1 β -Konzentration im Serum und der Ausbildung von posttraumatischen Krampfleiden ermittelt werden (276).

Die dargestellte Überexpression des *Il1 β* -Gens 57 Tage nach OP ist ein Hinweis auf eine prägnante Entzündungsreaktion mit erhöhter Mikrogliazellaktivierung im Schadensgebiet und in der contralateralen Hemisphäre wenige Wochen nach dem SHT. Da vornehmlich M1-Mikroglia zur *Il1 β* -Expression neigen (277), scheint dieser proinflammatorische Subtyp in der subakuten Phase nach einem SHT einen deutlich größeren Anteil an der Gesamtheit der beobachteten Mikroglia im Schadensgebiet auszumachen als später in der chronischen Phase. Weiterhin bestätigt dieses Ergebnis die zuvor durch die Iba1-Färbung gestützte Vermutung einer Abnahme der Inflammation im Schadensgebiet mit zunehmender Zeit nach SHT. Ebenso kann die, aufgrund der Volumenzunahme wenige Wochen nach SHT, vermutete Mitbeteiligung der contralateralen Hemisphäre am inflammatorischen Geschehen belegt werden.

4.1.2. *Il6*

Das *Il6*-Gen kodiert das Zytokin Interleukin-6. Dieser Entzündungsmediator nimmt eine Schlüsselstellung in der akuten Entzündungsphase nach einem SHT ein und beeinflusst dessen funktionelle Folgen (109, 278). Im ZNS wird es

vornehmlich von Gliazellen, endothelialen Zellen und Neuronen sezerniert und hat Einfluss auf die Einwanderung und Aktivierung von Immunzellen im Schadensgebiet (279, 280). Da eine neurotrophe Wirkung bereits nachgewiesen werden konnte (281), ist Interleukin-6 sowohl eine neuroprotektive als auch eine neurotoxische Wirkung nach Schädigungen des ZNS zuzuschreiben (282). Eine Messung der *Il6*-Expression kann ebenso wie die Interleukin-6-Expression als Anhaltspunkt für aktuelle Inflamationsprozesse herangezogen werden.

Die festgestellte *Il6*-Expression gibt keine Hinweise auf ein vermehrtes Entzündungsgeschehen im Schadensgebiet und der contralateralen Hemisphäre, Interleukin-6 scheint mehrere Wochen bis Monate nach SHT keinen Einfluss auf den Schaden zu nehmen. Eine Steigerung der IL6-Expression 24 h nach CCI in der ipsilateralen Hemisphäre konnte bereits nachgewiesen werden (107). Es ist wahrscheinlich, dass die akute Entzündungsphase zu den hier untersuchten Zeitpunkten bereits zu großen Teilen abgeschlossen und die *Il6*-Expression wieder auf ein Normalmaß gesunken ist. Die beobachtete *Il6*-Expressionsabnahme in der ipsilateralen Hemisphäre hängt vermutlich mit Alterungsprozessen im Gehirn zusammen (102).

4.2. Astrozytenmarker

4.2.1. *Gfap*

Das *Gfap*-Gen kodiert das gleichnamige saure Gliafaserprotein (*glial fibrillary acidic protein*), welches eine zentrale Komponente des Intermediärfilaments von Astrozyten ist (110). Als Bestandteil des Zytoskeletts spielt es eine wichtige Rolle bei der Formgebung, mechanischen Stabilität und Beweglichkeit dieser Zellen im ZNS (283). Häufig wird dieses Protein bzw. seine Genexpression in der klinischen Diagnostik und tierexperimentellen Forschung als Marker für Astrozyten verwendet (284, 285). Ein vermehrtes Auftreten hyperplastischer Astrozyten im Schadensgebiet wird als Astrogliose bezeichnet und ist eine typische Reaktion nach Schädigungen des ZNS und neuronalem Zelluntergang (286). Einerseits wird den beteiligten reaktiven Astrozyten eine Rolle bei der neuronalen Regeneration und Wundheilung nach Verletzungen des ZNS zugeschrieben (147, 287, 288), andererseits scheinen sie diese Regeneration zu hemmen (289) und sind eine Begleiterscheinung einiger zentralnervöser

Erkrankungen (290, 291). Die Funktion der Astroglie nach SHT wurde noch nicht abschließend geklärt, wobei sowohl eine neurotoxische als auch eine neurprotektive Wirkung möglich sind (292). Reaktive Astrozyten weisen vor allem in den ersten Tagen nach SHT eine erhöhte *Gfap*-Expression auf (293). Die hier untersuchte *Gfap*-Expression ist daher sowohl ein Indikator für die Ausbreitung der Astroglie im Schadensgebiet als auch für den Grad der Reaktivität beteiligter Astrozyten. Ihre abschließende Interpretation ist daher problematisch.

Die beobachteten Ergebnisse deuten auf eine erwartungsgemäße Astroglie nach 57 Tagen mit einer vermehrten Anzahl reaktiver Astrozyten im Schadensgebiet hin. Vermutlich nimmt die Anzahl und die Reaktivität dieser Astrozyten in den folgenden Monaten so weit ab, dass 225 Tage nach SHT keine signifikante *Gfap*-Expressionssteigerung mehr nachweisbar ist. Ein Absinken auf Normalniveau kann jedoch bis zum späten Untersuchungszeitpunkt nicht endgültig festgestellt werden und es ist weiterhin eine Tendenz zu einer Erhöhung der *Gfap*-Expression zu beobachten.

In der contralateralen Hemisphäre gibt es keine Hinweise auf eine Beeinflussung der Astrozytenaktivität durch das SHT aufgrund der hier beobachteten *Gfap*-Expression.

4.2.2. *Lcn2*

Das *Lcn2*-Gen kodiert das gleichnamige Lipocalin-2, auch bekannt als Neutrophilengelatinase-assoziiertes Lipocalin (NGAL). Kurz nach seiner Entdeckung (294) konnte diesem Protein eine Beteiligung an Akute-Phase-Reaktionen nachgewiesen werden (295). Die *Lcn2*-Expression ist nach zentralnervösen Schädigungen bei reaktiven Astrozyten erhöht (296) und nimmt Einfluss auf Inflammationsprozesse im ZNS (297, 298). Mehrere pathologische Prozesse im ZNS schließen Abweichungen der *Lcn2*-Expression ein, es wird vermutet, dass in diesem Zusammenhang eine proapoptotische Wirkung als neurotoxischer Mediator vorliegt (299-302). Zugleich könnte Lipocalin-2 auch das Überleben von Zellen nach Schädigung fördern (303). Unabhängig von seiner nicht endgültig aufgeklärten Wirkung kann die *Lcn2*-Expression als Indikator für reaktive Astrozyten und Inflammationsgeschehen genutzt werden (111).

Die festgestellte *Lcn2*-Expression belegt eine aufgrund der vorliegenden *Gfap*-Expression bereits vermutete Astrogliose im perikontusionalen Schadensgebiet. Auch eine Abnahme der Astrozytenanzahl und Reaktivität in den folgenden Monaten bestätigt sich durch die nach 225 Tagen festgestellte *Lcn2*-Expression in der ipsilateralen Hemisphäre. Jedoch lässt sich zu diesem späten Zeitpunkt, im Gegensatz zur *Gfap*-Expression, weiterhin eine Expressionserhöhung nach SHT erkennen. Daraus lässt sich folgern, dass es selbst in der chronischen Phase mehrere Monate nach SHT zu astrogliotischen Prozessen im Schadensgebiet kommt und eine Glianarbe bestehen bleibt.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann eine vermehrte Astrozytenaktivierung in der contralateralen Hemisphäre nach SHT weder bestätigt noch widerlegt werden. Die *Lcn2*-Expressionserhöhung wenige Wochen nach SHT könnte bei höherer Probenanzahl signifikant werden und auf Umbauprozesse in der contralateralen Hemisphäre hindeuten. Zum späten Untersuchungszeitpunkt gibt es keine Hinweise auf einen Effekt des SHT auf die *Lcn2*-Expression in der contralateralen Hemisphäre.

4.3. Plastizitätsmarker

4.3.1. *Gadd45b*

Bei *Gadd45b* handelt es sich um ein Gen, welches das gleichnamige Growth arrest and DNA damage-inducible 45 β Protein kodiert. Die Proteine der Gadd45-Familie sind an einer aktiven Demethylierung von DNA beteiligt (304, 305). Ein Zusammenhang zwischen der hippocampalen *Gadd45 β* -Expression und daraus folgender Synaptogenese nach induzierten Krampfanfällen wurde schon früh nachgewiesen (306). Auch eine Beeinflussung der Lernfähigkeit durch Manipulation der *Gadd45 β* -Expression (307) sowie eine gesteigerte *Gadd45 β* -Expression nach neuronaler Aktivität (112) wurden bereits beobachtet.

Da zu beiden Untersuchungszeitpunkten und in beiden Hemisphären keine Beeinflussung der *Gadd45b*-Expression durch das SHT zu beobachten ist, kann daraus kein Rückschluss auf neuroplastische Prozesse im Schadensgebiet gezogen werden.

4.4. Marker für Neuritenwachstum

4.4.1. *Gap43*

Das *Gap43*-Gen kodiert das gleichnamige Growth Associated Protein 43. Dieses Protein ist beteiligt an der Ausbildung von Dendriten und Axonen in der Gehirnentwicklung sowie an deren Plastizität und Regeneration (113). Eine erhöhte *Gap43*-Expression wurde nach einem SHT schon beobachtet, dadurch induzierte neuroplastische Prozesse werden mit der Rehabilitation kognitiver Defizite in Verbindung gebracht (308, 309). Die *Gap43*-Expression soll in diesem Zusammenhang als Indikator für neuroplastische Vorgänge an Neuriten dienen.

Die zunächst festgestellte Tendenz zur Überexpression des *Gap43*-Gens 57 Tage nach SHT in der ipsilateralen Hemisphäre intensiviert sich in den folgenden Monaten zu einer deutlichen Erhöhung 225 Tagen nach SHT. Dies deutet auf ein sich steigerndes Neuritenwachstum im Schadensbereich des Gehirns hin. Dadurch neugebildete Verbindungen zwischen Neuronen und daraus folgende Umstrukturierungen der Informationsübertragung im geschädigten Gewebe können eine Erklärung für die beobachtete funktionelle Regeneration mehrere Monate nach SHT liefern. Anscheinend nehmen diese Vorgänge über mehrere Monate zu und bleiben selbst nach 225 Tagen deutlich bestehen.

Die ermittelte *Gap43*-Expression in der contralateralen Hemisphäre liefert keine Hinweise auf ein verändertes Neuritenwachstum in diesem Bereich.

4.4.2. *L1cam*

Das *L1cam*-Gen kodiert das gleichnamige *cell adhesion molecule L1*. Es findet sich vornehmlich auf der Oberfläche von Neuronen mit einer großen extrazellulären Transmembrandomäne und einer kurzen Zytoplasmadomäne. Wie alle Zelladhäsionsmoleküle vermittelt es den Kontakt zwischen Zellen sowie Molekülen der extrazellulären Matrix und den Mikrofilamenten des Zytoskeletts. Dabei hat es entscheidende Funktionen bei der Interaktion von extrazellulären und intrazellulären Strukturen (310, 311). *L1cam* wird am stärksten auf Axonen während des axonalen Wachstums exprimiert (312) und spielt eine Rolle bei der Zellmigration, Myelinisierung und neuronalen Adhäsion im Verlauf der Entwicklung des Nervensystems (313, 314). Weiterhin beeinflusst die *L1cam*-

Expression die Lernfähigkeit und Synaptogenese nach Abschluss der Gehirnentwicklung (315) sowie axonale Regenerationsprozesse nach Verletzungen des ZNS (114). Ähnlich wie die *Gap43*-Expression wird die *Llcam*-Expression in dieser Studie als Indikator für Umbauprozesse an Axonen untersucht.

Da zu beiden untersuchten Zeitpunkten nach SHT keine Beeinflussung der *Llcam*-Expression in der ipsilateralen Hemisphäre feststellbar ist, bietet sie keinen Anhaltspunkt für veränderte axonale Umbauvorgänge im Schadensgebiet nach SHT. Aufgrund der ermittelten Daten kann auch keine Beeinflussung der *Llcam*-Expression durch das Alter der Tiere festgestellt werden.

Die beobachtete *Llcam*-Expressionsabnahme in der contralateralen Hemisphäre zum frühen Untersuchungszeitpunkt deutet auf eine Beeinflussung des Neuritenwachstums und vor allem des axonalen Wachstums in diesem Bereich durch das SHT hin. Dieser Effekt ist mehrere Monate nach SHT nicht mehr nachweisbar. Die Auswirkungen der Veränderung hinsichtlich neuroplastischer Prozessen kann aufgrund der vorliegenden Ergebnisse nicht beurteilt werden.

4.5. Mikroglia marker

4.5.1. *Arg1*

Das *Arg1*-Gen kodiert das gleichnamige Enzym Arginase 1, welches den Abbau der Aminosäure Arginin zu Ornithin und Harnstoff katalysiert. Da ARG1 mit der NO-Synthase um das Substrat Arginin konkurriert, führt eine Überexpression dieses Enzyms zur verminderten Verfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO). In Makrophagen/Mikrogliazellen wird NO in großen Mengen zur Immunabwehr produziert und nimmt Einfluss auf weitere Signalwege der Inflammation (316).

Mikroglia lassen sich nach einer Schädigung des ZNS in zwei Aktivierungsformen unterteilen, dabei wird zwischen klassisch aktivierten (M1) und alternativ aktivierten (M2) unterschieden (115, 317). Während M1-Mikroglia durch Sezernierung proinflammatorischer Substanzen (z.B. IL-6, IL-1 β und NO) die Entzündungsreaktion anregen, wird M2-Mikroglia eine entzündungshemmende und wundheilungsfördernde Wirkung zugeschrieben (115, 318). Alternativ aktivierte M2-Mikrogliazellen sind unter anderem durch eine

hohe Arginase 1-Expression gekennzeichnet, welche daher als Indikator für die Mikrogliaaktivierung im Allgemeinen und M2-Aktivierung im Speziellen dienen kann. Es gibt nach aktuellen Erkenntnissen eine Reihe von Übergangsstufen zwischen klassisch aktivierten (M1) und alternativ aktivierten (M2) Mikroglia, so dass diese Klassifikation eine deutliche Vereinfachung der realen Zustände darstellt (319-321).

Die beobachtete *Arg1*-Expressionssteigerung in der ipsilateralen Hemisphäre und deren langfristige Abnahme nach SHT stimmt weitgehend mit den Ergebnissen der Iba1-Färbung zur Mikrogliaquantifizierung in diesem Bereich überein. Die zuvor in der histologischen Untersuchung beobachtete Zunahme der Mikrogliazahl führt auch zu einer Steigerung der *Arg1*-Expression im Schadensbereich. Folglich ist von einer alternativen M2-Aktivierung bei einem Teil der Mikrogliazellen im perikontusionalen Gewebe auszugehen. Wie groß der Anteil M2-aktivierter im Vergleich zu klassisch aktivierten M1-Mikrogliazellen ist, kann aufgrund dieser Ergebnisse nicht beurteilt werden. M2-Mikrogliazellen können die Wundheilung fördern sowie Entzündungsreaktionen hemmen und schaffen so die Voraussetzung für Regenerationsprozesse im geschädigten Gewebe (115, 318). Ihr langanhaltendes Auftreten kann daher in Zusammenhang mit den beobachteten funktionellen Regenerationsvorgängen gebracht werden, welche auf zellulärer Ebene möglicherweise selbst Monate nach dem SHT noch nicht abgeschlossen sind. Außerdem geben die Ergebnisse der contralateralen Hemisphäre keine Hinweise auf eine Beeinflussung der *Arg1*-Expression bzw. der Mikrogliazellaktivierung durch das SHT in diesem Gehirnbereich. Alterungsabhängige Veränderungen der *Arg1*-Expression sind bekannt und könnten einen Einfluss auf die vorliegenden Ergebnisse haben (322).

5. Übergreifender Vergleich der Ergebnisse mit vorhandenen Erkenntnissen

Der Großteil publizierter tierexperimenteller verhaltensbiologischer Studien untersucht kurzfristige Folgen wenige Tage bis Wochen nach einem SHT. Daher steht für den frühen Untersuchungszeitpunkt eine deutlich größere Zahl von Vergleichsergebnissen zur Verfügung, als dies mehrere Monate nach SHT der Fall ist.

Die breitgefächerte Testauswahl in Kombination mit dem Vergleich zu einem zweiten Untersuchungszeitpunkt mehr als sechs Monate nach SHT ist ein Alleinstellungsmerkmal dieser Untersuchung. Dabei ergibt sich zwangsläufig eine Überschneidung mit bereits publizierten Konsequenzen des SHT vornehmlich zum frühen Untersuchungszeitpunkt.

Zu Abschnitt VI. 2.1.: Die in anderen Studien beschriebene motorische Beeinträchtigung wenige Wochen nach einem SHT konnte in den hier verwendeten Testverfahren bestätigt werden. Neu ist die Erkenntnis, dass eine ebenfalls bereits beobachtete Regeneration dieser Defizite sich über mehrere Monate fortsetzt, sodass sie sich nicht mehr (Rotarod) oder nur noch in abgeschwächter Form (NDS, CatWalk® XT) nachweisen lassen. Die motorische Regeneration hängt vermutlich mit der oben beschriebenen Adaptation an die Einschränkung, mit zentralnervöser Plastizität sowie axonaler und synaptischer Neubildung zusammen.

Zu Abschnitt VI. 2.2.: Wenige Tage bis Wochen nach einem SHT wurden in früheren Untersuchungen Abweichungen im Depressions-ähnlichen (TS, Forced Swim Test), Schizophrenie-ähnlichen (PPI), Angst-assoziierten (OF, EPM) und sozialen Verhalten (SI) beobachtet. Einerseits konnten diese Ergebnisse bezogen auf des Angst-assoziierte und das Depressions-ähnliche Verhalten in weniger deutlicher Form reproduziert werden. Andererseits lassen die hier vorgestellten Ergebnisse keine Rückschlüsse auf Defizite im Schizophrenie-ähnlichen und sozialen Verhalten zu. Bereits publizierte Ergebnisse tierexperimenteller Studien bezogen auf neuropsychiatrische Störungen zeigen unterschiedliche Störungsmuster mit teilweise widersprüchlichen Resultaten in den gleichen Testverfahren. Dies geht vermutlich auf die Komplexität neuropsychiatrischer Störungen sowie eine fehlende neuroanatomische Zuordnung ihres Ursprungs

zurück. Geringfügige Haltungsunterschiede, individuelle Verhaltensabweichungen trotz der Nutzung von Inzuchtstämmen, geringe Differenzen der beteiligten Hirnareale beim SHT und abweichende Testreihenfolgen müssen beim Vergleich mit bereits publizierten Ergebnissen beachtet werden.

Die hier vorgestellten Ergebnisse mehrere Monate nach SHT sind hinsichtlich der Vielzahl der untersuchten neuropsychiatrischen Verhaltenstypen neu, es finden sich keine vergleichbaren Resultate in der Literatur. Daher lässt sich lediglich festhalten, dass das Angst-assoziierte Verhalten nach SHT zu beiden Testzeitpunkten gestört ist, sich weiterentwickelt und je nach Untersuchungszeitpunkt in einem anderen neuropsychiatrischen Muster sichtbar wird. Eine Beeinflussung des sozialen und Schizophrenie-ähnlichen Verhaltens durch das SHT kann anders als in Vergleichsstudien nicht festgestellt werden.

Zu Abschnitt VI. 2.3.: Störungen der kognitiven Fähigkeiten wenige Tage bis Wochen nach einem SHT wurden in beiden hier verwendeten Testverfahren (MWM, FC) bereits früher beobachtet. Die Defizite konnten hinsichtlich der primär Hippocampus-assoziierten (MWM) Kognition, nicht jedoch hinsichtlich der Amygdala-assoziierten Kognition reproduziert werden. Neu in dieser Studie ist die beide Testverfahren kombinierende Untersuchung der kognitiven Fähigkeit mehr als sechs Monate nach SHT. Das beobachtete Defizit Hippocampus-assoziiierter Kognition bleibt ähnlich wie zum frühen Untersuchungszeitpunkt ohne Beeinflussung der Amygdala-assoziierten Kognition bestehen. Dies hängt vermutlich mit einer ausbleibenden Einbeziehung der Amygdala in das Schadensgebiet zusammen und legt eine eingeschränkte regenerative Plastizität des Hippocampus nach SHT nahe.

Zu Abschnitt VI. 2.4.: Eine Einschränkung der visuellen Wahrnehmung der Maus nach SHT wurde bereits früher beschrieben und könnte das Verhalten in den meisten der angewandten Testverfahren beeinflussen. Im VC konnte dieses Defizit nicht beobachtet werden, was gegen eine Beteiligung des visuellen Kortex am Hirnschaden beim CCI-Modell spricht.

Zu Abschnitt VI. 2.5.: Die in dieser Untersuchung beobachtete erhöhte Krampfauslösbarkeit sowohl wenige Wochen als auch mehrere Monate nach SHT hat sich bereits in anderen Studien gezeigt. Auch eine ausbleibende spontane

Erholung von diesem Defizit stimmt mit den Ergebnissen vorhergehender Untersuchungen überein. Mechanismen, die zu einem posttraumatischen Krampfleiden führen, sind bis jetzt nur unvollständig bekannt, legen jedoch eine Beteiligung des Hippocampus an ihrer Entstehung nahe, so dass die Ergebnisse unter anderem als weiterer Hinweis auf eine eingeschränkte regenerative hippocampale Plastizität gedeutet werden können.

Zu den Abschnitten VI. 3. und VI. 4.: Publierte histologische und molekularbiologische Untersuchungen wenige Wochen nach einem SHT stimmen weitgehend mit der hier beobachteten Atrophie, Inflammation, Mikrogliazellaktivierung und Astrogliose im Schadensgebiet zum frühen Untersuchungszeitpunkt überein. Auch eine Beteiligung der contralateralen Hemisphäre wenige Wochen nach einem SHT wurde bereits beobachtet und zeigt sich in dieser Untersuchung als Hypertrophie und Inflammation. Weiterhin finden sich in der aktuellen Fachliteratur vereinzelt Ergebnisse zur Entwicklung des histologisch und molekularbiologisch messbaren Schadens mehrere Monate nach SHT. Für die hier vorgestellten Ergebnisse zum späten Untersuchungszeitpunkt finden sich in ihrer Vielseitigkeit und Kombination jedoch keine vergleichbaren Feststellungen in der Literatur. Die beobachtete nachlassende Inflammation, Mikrogliazellaktivierung und Astrogliose im Schadensgebiet nähert sich mit fortschreitender Zeit nach SHT dem Normalwert weiter an. Dafür gibt es Anzeichen für eine gesteigerte neuronale Plastizität in diesem Bereich mehrere Monate nach SHT. Eine Beteiligung der contralateralen Hemisphäre am Krankheitsgeschehen kann zu diesem späten Zeitpunkt nicht mehr beobachtet werden.

6. Validitätsbeurteilung der angewandten Methoden

Das verwendete CCI-Modell ist zusammen mit der *Fluid Percussion*-Methode (Flüssigkeitsimpuls nach Kraniotomie) das in den letzten Jahren am häufigsten verwendete tierexperimentelle SHT-Modell. 2013 gab eine Studie einen Überblick über 314 experimentelle Publikationen zum SHT beim Labornager und ermittelte bei 42 % dieser Untersuchungen das CCI als angewandtes SHT-Modell (20). Dabei wurde das CCI-Modell auch als besonders geeignete Methode bei den wenigen Langzeitstudien über mehr als einen Monat nach SHT festgestellt. Sie kann bei einer Reihe von Versuchstierspezies wie dem Frettchen, dem Affen, dem Schwein und dem Labornager angewandt werden (19, 138, 323-326).

Ein Vorteil dieses experimentellen SHTs gegenüber anderen Modellen, z.B. dem *Fluid Percussion*-Modell, ist eine hohe Reproduzierbarkeit und Reliabilität durch präzise Kontrolle der Bolzengeschwindigkeit, der Eindringtiefe, der Aufpralldauer und der Schadenslokalisation (19).

Außerdem sind die gewonnenen Einsichten realitätsnah: Beim CCI-Modell werden nicht nur die primär betroffene Region des Kortex, sondern auch subkortikale Strukturen wie der Hippocampus geschädigt (211). Diese Hirnstrukturen sind aufgrund ihrer exponierten Lage auch häufig bei einem klinischen SHT nach äußerer Gewalteinwirkung lädiert. Aufgrund der klaren neuroanatomischen Schadenszuordnung beim CCI konnten für eine Verletzung dieser Strukturen typische sensomotorische und kognitive Defizite sowie eine erhöhte Neigung zu Krampfleiden festgestellt werden. Diese sind als häufige und schwerwiegende posttraumatische Störungen bei human- wie veterinärmedizinischen Patienten nach einem SHT bekannt. Realitätsnahe Einsichten dieser Art sind möglich, weil das CCI-Modell die außerexperimentelle Wirklichkeit einer Gewalteinwirkung auf das Gehirn besonders präzise rekonstruiert.

Aufgrund der festgestellten hohen Überlebensrate, persistenter sensomotorischer und kognitiver Störungen sowie der dauerhaft erhöhten Krampfnäigung belegt die hier vorgestellte Untersuchung, dass sich das CCI-Modell zur Untersuchung solcher Defizite auch bei Langzeitüberleben eignet. Dabei haben sich besonders der CatWalk® XT und der NDS (sensomotorische Koordination) sowie der MWM (Kognition) als valide Verfahren zur Messung von Folgeschäden eines

SHT herausgestellt. Auch die Messung Pentylentetrazol-induzierter Krampfanfälle (PTZ) erweist sich trotz deren limitierter prädiktiver Validität als verwertbare Methode zur Untersuchung einer posttraumatischen Krampfneigung, zumal sie sich mit anderen Testverfahren aufgrund ihres geringen zeitlichen und apparativen Aufwands leicht kombinieren lässt. Die zur Beobachtung neuropsychiatrischer Störungen angewandten Methoden sind wegen ausbleibender Beeinflussung des untersuchten Verhaltens durch das SHT (SI, PPI), zu vermutender störender Einwirkung von Wundschmerzen (TS) und undeutlicher Verhaltensentwicklung nach Langzeitüberleben (EPM, OF) nur bedingt aussagekräftig. Wobei sich in diesem Verhaltensbereich aufgrund seiner Komplexität und fehlender Kenntnisse über die neuroanatomische Zuordnung von Störungen besonders schwer messbare Folgen des SHT zeigen.

Abschließend lässt sich festhalten, dass sich etliche der angewendeten Testverfahren zur Untersuchung der funktionellen Langzeitfolgen eines SHT in der Maus gut eignen (NDS, CatWalk® XT, MWM, PTZ). Die in dieser Studie erworbenen Erkenntnisse sind bereits als Grundlage für die Untersuchung von Xenon zur Therapie eines SHTs genutzt worden (327). Entsprechende Studien zur therapeutischen Anwendbarkeit von Propofol für die Behandlung der Langzeitfolgen eines SHTs wurden ebenfalls bereits durchgeführt und werden in naher Zukunft publiziert (328).

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Ein Schädel-Hirn-Trauma (SHT) kann zu langfristigen neuropathologischen Störungen führen. Diese Veränderungen zeigen sich klinisch u. a. als motorische Ausfälle, kognitive Einschränkungen, erhöhte Neigung zu Krampfleiden, Veränderungen des Sozialverhaltens und vermehrtes Auftreten von neuropsychiatrischen Erkrankungen. Ziel der vorliegenden Studie ist eine verhaltensbiologische, histologische und molekularbiologische Charakterisierung der Langzeitauswirkung eines SHT im Mausmodell. Dabei soll festgestellt werden, welche der etablierten Testverfahren zur Validierung eines SHT nach mehreren Monaten genutzt werden können und wie sich ein verhaltensbiologisches Schadensmuster ohne Behandlung in diesem Zeitraum entwickelt. Histologische und molekularbiologische Analysen sollen erste Erklärungen für beobachtete verhaltensbiologische Effekte liefern.

Als Modell für das SHT dient der *Controlled Cortical Impact* (CCI), Testobjekte sind geschlechtsreife männliche Mäuse vom Stamm C57BL/6, die zu zwei verschiedenen Zeitpunkten (Testbeginn der verhaltensbiologischen Untersuchungen 14 Tage und ca. sechs Monate nach CCI) gemeinsam mit je einer Kontrollgruppe untersucht wurden. Folgende Testverfahren werden in chronologischer Reihenfolge durchgeführt: Neurological Deficit Score (NDS), Elevated Plus Maze (EPM), Open Field (OF), Social Interaction (SI), Prepulse Inhibition (PPI), Rotarod, Morris Water Maze (MWM), CatWalk® XT, Pentylentetrazol-induzierte Krampfanfälle (PTZ) und der Visual Cliff Test (VC). Ergänzt werden diese Untersuchungen durch die Bestimmung des Schadens- und Gehirnvolumens (Nissl-Färbung), der Mikrogliazellaktivierung (Iba-1-Färbung) sowie der Genexpression einer Reihe von Inflammations-, Astrozyten-, Plastizitäts-, Mikroglia- und Neuritenwachstumsmarkergene.

Wenige Wochen nach CCI zeigen sich Störungen der kognitiven (MWM) und motorischen (NDS; Rotarod; CatWalk® XT) Fähigkeiten sowie eine erhöhte Auslösbarkeit von Krampfanfällen (PTZ). Ein Teil der auf Angststörungen gerichteten Tests (OF; TST) zeigt ebenfalls signifikante Abweichungen zwischen den Testgruppen, wogegen andere Angstindikatoren (EPM; PPI) sowie das Sozialverhalten (SI) unbeeinflusst vom SHT bleiben. Mehrere Monate nach CCI

ist keine bzw. nur eine deutlich abgeschwächte motorische Beeinträchtigung nachweisbar (NDS; Rotarod; CatWalk® XT). Die erhöhte Krampfneigung (PTZ) und die kognitiven Störungen (MWM) bleiben bestehen. Im Vergleich zum frühen Testzeitpunkt zeigt sich nach sechs Monaten eine verminderte Akrophobie (EPM). Demgegenüber können zum späten Testzeitpunkt keine Beeinträchtigung der Angst vor freien Flächen (OF) und keine Depressions-assoziierten Verhaltensmuster (TST) mehr nachgewiesen werden. Lediglich das Schizophrenie-assoziierte Verhalten (PPI), die visuelle Wahrnehmung (VC) und das Sozialverhalten (SI) bleiben zu beiden Zeitpunkten ohne Beeinflussung durch das SHT.

Die histologischen und molekularbiologischen Untersuchungen zeigen im Schadensbereich eine konstante Atrophie zu beiden Untersuchungszeitpunkten, regressive Inflammation, Mikrogliazellaktivierung und Astrogliose mit einem Maximum zum frühen Untersuchungszeitpunkt sowie eine lediglich mehrere Monate nach SHT geringfügig gesteigerte neuronale Plastizität. In der contralateralen Hemisphäre fällt Hypertrophie und Inflammation zum frühen Untersuchungszeitpunkt auf, wogegen mehrere Monate nach CCI keine Abweichung von der Kontrollgruppe mehr feststellbar ist.

Die beobachtete Regeneration motorischer Defizite erklärt sich vermutlich mit zunehmender Adaptation an diese Einschränkung und damit verbundener zentralnervöser Plastizität u. a. auch in der contralateralen Hemisphäre. Dagegen wurde keine Rehabilitation der Störungen hippocampaler Funktionen (Beeinträchtigung der Orientierung und Kognition bzw. Neigung zu Krampfleiden) beobachtet, was auf eine eingeschränkte regenerative Plastizität des Hippocampus nach SHT hindeutet. Eine traumatisch bedingte Veränderung der Neurogenese oder der Balance zwischen synaptischer Inhibition und Exzitation können diesem Phänotyp zu Grunde liegen. Die Angst-assoziierten Veränderungen zeigen deutliche Abweichungen zu beiden Testzeitpunkten. Allerdings lässt sich hier festhalten, dass sich die Art der Beeinträchtigung weiterentwickelt und je nach Untersuchungszeitpunkt in einem anderen neuropsychiatrischen Muster sichtbar wird. Eine Einflussnahme bereits

bestehender Störungen auf die Entwicklung neuer Defizite könnte dies erklären. Eine Beeinflussung des sozialen und Schizophrenie-ähnlichen Verhaltens, der visuellen Wahrnehmung sowie der klassischen Konditionierung durch das SHT kann nicht festgestellt werden.

Zusammenfassend ermöglicht die Studie eine verbesserte Prognose bzgl. der Entwicklung von Verhaltensstörungen nach einem SHT in der kurativen Praxis und liefert zugleich eine Messbasis für die zukünftige Erforschung neuer Behandlungsstrategien des SHT. Die hier erworbenen Erkenntnisse konnten bereits erfolgreich als Grundlage für die Untersuchung von Propofol bzw. Xenon zur Therapie des SHTs genutzt werden.

VIII. SUMMARY

Neurological deficits are a common consequence of traumatic brain injury (TBI). These deficits are characterized clinically by motor and cognitive dysfunctions, seizure disorders, social behavior changes and increased incidence of neuropsychiatric diseases. The aim of the present thesis is to characterize long-term effects of TBI in mice at the behavioral, histological and molecular level.

In this thesis controlled cortical impact (CCI) is used as an experimental model for TBI. Adult male C57BL/6 mice were tested at two different post-traumatic time points (starting point 14 days and approximately six months post injury) and compared to sham operated mice. To this end various behavioral tests such as neurological deficit score (NDS), elevated plus maze (EPM), open field (OF), social interaction (SI), prepulse inhibition (PPI), Rotarod (RR), morris water maze (MWM), CatWalk® XT (CW), pentylenetetrazol-induced seizure (PTZ) and visual cliff test (VC) were used in chronological order. Additionally, the brain damage extension, brain volume, the activation of microglia/macrophages and the gene expression of several markers for inflammation, gliosis and neural plasticity were determined.

The results demonstrate the presence of cognitive (MWM) and motor deficits (NDS; RR; CW) between two and eight weeks after brain trauma. One anxiety test (OF) and the depressive-like behavior test (TST) revealed differences between the experimental groups, whereas other anxiety indicators (EPM; PPI) and the social behavior (SI) were unchanged. However, traumatized mice showed increased sensitivity towards PTZ-induced seizures compared to sham-operated mice.

Several months after CCI motor disabilities were not any longer observed (RR) or less obvious (NDS; CW) compared to sham-operated mice. In contrast, the cognitive dysfunctions (MWM) and increased seizure sensitivity (PTZ) persisted as a long-term consequence. Compared to the earlier post-traumatic time point, acrophobia (EPM) is decreased after six months, whereas the OF task revealed increased anxiety. Furthermore, disturbance of depressive-like behavior disappear several months after brain trauma (TST). Schizophrenia-like behavior (PPI),

visual perception (VC) and social behavior (SI) are unaffected at both time points in traumatized compared to sham mice.

Histological analysis shows brain atrophy of the injured hemisphere at both time points. While microglia activation, astrogliosis and inflammation marker genes are increased eight weeks after trauma, these effects became largely normalized seven months after trauma. The expression of a plasticity marker gene is increased only several months post CCI in this region. Within the contralateral hemisphere, hypertrophy and inflammation were present in the early time point compared to the later time point where no aberrations between those groups occurred.

Histological and molecular results indicate that motor recovery is explained by assimilation to existing disabilities and an increase of neuronal plasticity, also including the contralateral hemisphere. In contrast the persistent hippocampal dysfunctions (inhibited hippocampal cognition and seizure disorders) could be caused by a limited regenerative plasticity of hippocampus after TBI. Reduced neurogenesis and the imbalance of synaptic inhibition and excitation might lead to these alterations. During both time points anxiety show obvious aberrances in a developing manner, whereas a recovery of depressive-like behavior occur. An interaction between existing with newly developed anxiety disorders might lead to further disabilities. An influence of visual perception, social and schizophrenia-like behaviors after CCI have not been shown.

The obtained findings should enhance the quality of clinical prognosis respective behavioral deficits and psychiatric diseases after TBI and provides a baseline for further treatment studies. Simultaneously, histological and molecular analysis should give explanations for recovery processes in the brain explaining the functional outcome. However, the results were used successful in the investigation of Propofol and Xenon as a therapy of TBI.

IX. ANHANG

1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Chronologische Versuchsabfolge Testzeitpunkt 14 Tage post OP (siehe Abkürzungsverzeichnis Seite XIII bis XVI).....	27
Abbildung 2: Chronologische Versuchsabfolge Testzeitpunkt ca. sechs Monate post OP (siehe Abkürzungsverzeichnis Seite XIII bis XVI).....	27
Abbildung 3: Schematische Darstellung des ausgezählten ipsilateralen Felds hinsichtlich der Mikrogliazellaktivierung.....	47
Abbildung 4: Entwicklung des mittleren Körpergewichts in der Langzeitüberlebens-Gruppe.....	56
Abbildung 5: Mittlere Gesamtpunktzahl im NDS bei Kurzzeitüberleben zu den Testzeitpunkten prä OP, Tag 1 und Tag 54 post OP.....	58
Abbildung 6: Mittlere Gesamtpunktzahl im NDS bei Langzeitüberleben zu den Testzeitpunkten prä OP, Tag 1 und Tag 225 post OP.....	59
Abbildung 7: Mittlere Gesamtpunktzahl im NDS prä mortem der Kurzzeitüberlebens-Gruppe (Tag 54) vs Langzeitüberlebens-Gruppe (Tag 220).....	60
Abbildung 8: Latenz bis zum Herabfallen vom Rotarod 21 und 191 Tage post OP.....	61
Abbildung 9: Durchschnittliche Geschwindigkeit (A), <i>Print position</i> (B), <i>Cadence</i> (C), <i>Base of support</i> (D), <i>Stance</i> (E), <i>Stride length</i> (F), <i>Swing speed</i> (G), <i>Swing</i> (H), <i>Print width</i> (I) und <i>Print length</i> (J) im CatWalk® XT 40 – 42 Tage post OP.....	63
Abbildung 10: Durchschnittliche Geschwindigkeit (A), <i>Cadence</i> (B), <i>Swing</i> (C), <i>Stance</i> (D) und <i>Step pattern</i> (E) im CatWalk® XT 209 – 211 Tage post OP.....	64
Abbildung 11: Aufenthaltsdauer im offenen Arm des EPM (A) und zurückgelegte Distanz (B) 14 und 184 Tage post OP.....	67

Abbildung 12: Aufenthaltszeit im Zentrum des OF (A), Zeit bis zum Erreichen der Zylinderwand vor Aufnahmebeginn (B) und zurückgelegte Distanz (C) 15 und 185 Tage post OP.....	69
Abbildung 13: Sozialindex zu beiden Testzeitpunkten (A) sowie Aufenthaltszeit in verschiedenen Kompartimenten der Crawley Box 16 (B) und 188 (C) Tage post OP.....	71
Abbildung 14: Prepulse Inhibition bei einem Prepulse von 75 dB, 80 dB und 85 dB 19 (A) und 189 (B) Tage post OP sowie Amplitude der Schreckreaktion (C) im Vergleich.....	72
Abbildung 15: Immobilitätsdauer im Tail Suspension Test 20 und 190 Tage post OP.....	73
Abbildung 16: Zeit bis zum Auffinden der sichtbaren (A) und versteckten (B) Plattform, Aufenthaltszeit in der Randzone (C) und den vier Quadranten (D) sowie durchschnittliche Geschwindigkeit während des ersten Testlaufs (E) im Morris Water Maze 22 bis 36 Tage post OP.....	75
Abbildung 17: Zeit bis zum Auffinden der sichtbaren (A) und versteckten (B) Plattform, Aufenthaltszeit in der Randzone (C) und den vier Quadranten (D) sowie durchschnittliche Geschwindigkeit während des ersten Testlaufs (E) im Morris Water Maze 191 bis 205 Tage post OP.....	77
Abbildung 18: Immobilitätsdauer im Fear Conditioning 47 und 48 (A) Tage sowie 212 und 213 (B) Tage post OP.....	80
Abbildung 19: Aufenthaltsdauer in verschiedenen Arealen des VC 224 Tage post OP.....	81
Abbildung 20: Anfallswert im PTZ 57 und 225 Tage post OP.....	83
Abbildung 21: Beispielhaft nach Nissl gefärbte Gehirnschnitte eines scheinoperierten Gehirns (A) sowie 57 (B) und 225 (C) Tage post SHT.....	84

Abbildung 22: Hemisphärenvolumen (A und B), absolutes Kontusionsvolumen (C) sowie Kontusionsvolumen in Prozent der ipsilateralen Hemisphäre (D) 57 und 225 Tage post OP.....	85
Abbildung 23: Gegenüberstellung des Hemisphärenvolumens der CCI (A) und Sham (B) Gruppen nach Kurz- und Langzeitüberleben.....	86
Abbildung 24: Beispielhafte ausgezählte kortikale Bereiche der ipsilateralen Hemisphäre eines scheinoperierten Gehirn (A) sowie 57 (B) und 225 (C) Tage post SHT.....	87
Abbildung 25: Kortikale Anzahl Iba-1-positiver Mikroglia 57 (A) und 225 (B) Tage post OP sowie ein Vergleich zwischen den Zeitpunkten der ipsilateralen Hemisphären (C).....	88
Abbildung 26: <i>Il1β</i> -Expression in der ipsilateralen (A) und contralateralen (B) Hemisphäre 57 und 225 Tage post OP.....	90
Abbildung 27: <i>Il6</i> -Expression in der ipsilateralen (A) und contralateralen (B) Hemisphäre 57 und 225 Tage post OP.....	91
Abbildung 28: <i>Gfap</i> -Expression in der ipsilateralen (A) und contralateralen (B) Hemisphäre 57 und 225 Tage post OP.....	92
Abbildung 29: <i>Lcn2</i> -Expression in der ipsilateralen (A) und contralateralen (B) Hemisphäre 57 und 225 Tage post OP.....	94
Abbildung 30: <i>Gadd45b</i> -Expression in der ipsilateralen (A) und contralateralen (B) Hemisphäre 57 und 225 Tage post OP.....	95
Abbildung 31: <i>Gap43</i> -Expression in der ipsilateralen (A) und contralateralen (B) Hemisphäre 57 und 225 Tage post OP.....	96
Abbildung 32: <i>L1cam</i> -Expression in der ipsilateralen (A) und contralateralen (B) Hemisphäre 57 und 225 Tage post OP.....	97
Abbildung 33: <i>Arg1</i> -Expression in der ipsilateralen (A) und contralateralen (B) Hemisphäre 57 und 225 Tage post OP.....	98

2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Materialauflistung-Verbrauchsmaterialien.....	19
Tabelle 2:	Materialauflistung-Geräte.....	20
Tabelle 3:	Materialauflistung-Software.....	21
Tabelle 4:	Materialauflistung-Chemikalien.....	21
Tabelle 5:	Materialauflistung-Puffer und Lösungen.....	22
Tabelle 6:	Materialauflistung-Arzneimittel.....	22
Tabelle 7:	Materialauflistung-Kits.....	23
Tabelle 8:	Materialauflistung-Antikörper.....	23
Tabelle 9:	Materialauflistung-Sonden.....	23
Tabelle 10:	Materialauflistung-Primer.....	24
Tabelle 11:	Versuchsgruppen und Gruppengrößen.....	27
Tabelle 12:	Neurological Deficit Score-Protokoll.....	33
Tabelle 13:	Erfasste Parameter im CatWalk® XT.....	35

3. Literaturverzeichnis

1. Tagliaferri F, Compagnone C, Korsic M, Servadei F, Kraus J. A systematic review of brain injury epidemiology in Europe. *Acta neurochirurgica*. 2006;148(3):255-68; discussion 68. Epub 2005/11/29.
2. Todesursachen in Deutschland 2012, Fachserie 12 Reihe 4: Statistisches Bundesamt, Wiesbaden; 2013.
3. Coronado VG, McGuire LC, Sarmiento K, Bell J, Lionbarger MR, Jones CD, et al. Trends in Traumatic Brain Injury in the U.S. and the public health response: 1995-2009. *Journal of safety research*. 2012;43(4):299-307. Epub 2012/11/07.
4. Colantonio A, Dawson DR, McLellan BA. Head injury in young adults: long-term outcome. *Archives of physical medicine and rehabilitation*. 1998;79(5):550-8. Epub 1998/05/22.
5. Engberg AW, Teasdale TW. Psychosocial outcome following traumatic brain injury in adults: a long-term population-based follow-up. *Brain injury : [BI]*. 2004;18(6):533-45. Epub 2004/06/19.
6. Andelic N, Hammergren N, Bautz-Holter E, Sveen U, Brunborg C, Roe C. Functional outcome and health-related quality of life 10 years after moderate-to-severe traumatic brain injury. *Acta neurologica Scandinavica*. 2009;120(1):16-23. Epub 2008/11/04.
7. Haase J. Social-economic impact of head injury. *Acta neurochirurgica Supplementum*. 1992;55:75-9. Epub 1992/01/01.
8. Hyder AA, Wunderlich CA, Puvanachandra P, Gururaj G, Kobusingye OC. The impact of traumatic brain injuries: a global perspective. *NeuroRehabilitation*. 2007;22(5):341-53. Epub 2007/12/29.

9. Sande A, West C. Traumatic brain injury: a review of pathophysiology and management. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*. 2010;20(2):177-90. Epub 2010/05/22.
10. DiFazio J, Fletcher DJ. Updates in the management of the small animal patient with neurologic trauma. *The Veterinary clinics of North America Small animal practice*. 2013;43(4):915-40. Epub 2013/06/12.
11. Napolitano E, Elovic EP, Qureshi AI. Pharmacological stimulant treatment of neurocognitive and functional deficits after traumatic and non-traumatic brain injury. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. 2005;11(6):RA212-20. Epub 2005/05/27.
12. Maas AI, Stocchetti N, Bullock R. Moderate and severe traumatic brain injury in adults. *Lancet neurology*. 2008;7(8):728-41. Epub 2008/07/19.
13. Bramlett H, Dietrich WD, 3rd. Long-Term Consequences of Traumatic Brain Injury: Current Status of Potential Mechanisms of Injury and Neurologic Outcomes. *Journal of neurotrauma*. 2014. Epub 2014/08/27.
14. Finnie J. Animal models of traumatic brain injury: a review. *Australian veterinary journal*. 2001;79(9):628-33. Epub 2001/11/13.
15. Morganti-Kossmann MC, Yan E, Bye N. Animal models of traumatic brain injury: is there an optimal model to reproduce human brain injury in the laboratory? *Injury*. 2010;41 Suppl 1:S10-3. Epub 2010/04/27.
16. Finnie JW, Blumbergs PC. Traumatic brain injury. *Veterinary pathology*. 2002;39(6):679-89. Epub 2002/11/27.
17. Marklund N, Hillered L. Animal modelling of traumatic brain injury in preclinical drug development: where do we go from here? *British journal of pharmacology*. 2011;164(4):1207-29. Epub 2010/12/24.

18. Malkesman O, Tucker LB, Ozl J, McCabe JT. Traumatic brain injury - modeling neuropsychiatric symptoms in rodents. *Frontiers in neurology*. 2013;4:157. Epub 2013/10/11.
19. Xiong Y, Mahmood A, Chopp M. Animal models of traumatic brain injury. *Nature reviews Neuroscience*. 2013;14(2):128-42. Epub 2013/01/19.
20. Gold EM, Su D, Lopez-Velazquez L, Haus DL, Perez H, Lacuesta GA, et al. Functional assessment of long-term deficits in rodent models of traumatic brain injury. *Regenerative medicine*. 2013;8(4):483-516. Epub 2013/07/06.
21. Stein SC, Georgoff P, Meghan S, Mizra K, Sonnad SS. 150 years of treating severe traumatic brain injury: a systematic review of progress in mortality. *Journal of neurotrauma*. 2010;27(7):1343-53. Epub 2010/04/16.
22. Corrigan JD, Selassie AW, Orman JA. The epidemiology of traumatic brain injury. *The Journal of head trauma rehabilitation*. 2010;25(2):72-80. Epub 2010/03/18.
23. Paden M, McGee K, Krug E. *Injury: a leading cause of the global burden of disease: WHO, Geneva; 2002.*
24. Gualtieri T, Cox DR. The delayed neurobehavioural sequelae of traumatic brain injury. *Brain injury : [BI]*. 1991;5(3):219-32. Epub 1991/07/01.
25. Sinha S, Nehra A, Sharma BS. 158 Cognitive, functional and psychosocial outcome after severe traumatic brain injury: a cross-sectional study at a tertiary care trauma center. *Neurosurgery*. 2014;61 Suppl 1:212. Epub 2014/07/18.
26. Diaz AP, Schwarzbald ML, Thais ME, Hohl A, Bertotti MM, Schmoeller R, et al. Psychiatric disorders and health-related quality of life after severe traumatic brain injury: a prospective study. *Journal of neurotrauma*. 2012;29(6):1029-37. Epub 2011/11/25.

27. Masel BE, DeWitt DS. Traumatic brain injury: a disease process, not an event. *Journal of neurotrauma*. 2010;27(8):1529-40. Epub 2010/05/28.
28. Bryant RA, O'Donnell ML, Creamer M, McFarlane AC, Clark CR, Silove D. The psychiatric sequelae of traumatic injury. *The American journal of psychiatry*. 2010;167(3):312-20. Epub 2010/01/06.
29. Ponsford JL, Spitz G, Cromarty F, Gifford D, Attwood D. Costs of care after traumatic brain injury. *Journal of neurotrauma*. 2013;30(17):1498-505. Epub 2013/04/11.
30. Summers B, Cumming J, deLahunta A. *Veterinary Neuropathology*, p. 15: Mosby, St Louis MO; 1995.
31. Foley C, Bracker K, Drellich S. Hypothalamic-pituitary axis deficiency following traumatic brain injury in a dog. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*. 2009;19(3):269-74. Epub 2009/08/21.
32. Hayes GM. Severe seizures associated with traumatic brain injury managed by controlled hypothermia, pharmacologic coma, and mechanical ventilation in a dog. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*. 2009;19(6):629-34. Epub 2009/12/19.
33. Beltran E, Platt SR, McConnell JF, Dennis R, Keys DA, De Risio L. Prognostic value of early magnetic resonance imaging in dogs after traumatic brain injury: 50 cases. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*. 2014;28(4):1256-62. Epub 2014/05/13.
34. Adamantos S, Garosi L. Head trauma in the cat: 1. assessment and management of craniofacial injury. *Journal of feline medicine and surgery*. 2011;13(11):806-14. Epub 2011/11/09.

35. Garosi L, Adamantos S. Head trauma in the cat: 2. assessment and management of traumatic brain injury. *Journal of feline medicine and surgery*. 2011;13(11):815-23. Epub 2011/11/09.
36. Grohmann KS, Schmidt MJ, Moritz A, Kramer M. Prevalence of seizures in cats after head trauma. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2012;241(11):1467-70. Epub 2012/11/28.
37. Feary DJ, Magdesian KG, Aleman MA, Rhodes DM. Traumatic brain injury in horses: 34 cases (1994-2004). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2007;231(2):259-66. Epub 2007/07/17.
38. MacKay RJ. Brain injury after head trauma: pathophysiology, diagnosis, and treatment. *The Veterinary clinics of North America Equine practice*. 2004;20(1):199-216. Epub 2004/04/06.
39. Steinmetz S, Tipold A, Loscher W. Epilepsy after head injury in dogs: a natural model of posttraumatic epilepsy. *Epilepsia*. 2013;54(4):580-8. Epub 2013/01/09.
40. Teranishi K, Scultetus A, Haque A, Stern S, Philbin N, Rice J, et al. Traumatic brain injury and severe uncontrolled haemorrhage with short delay pre-hospital resuscitation in a swine model. *Injury*. 2012;43(5):585-93. Epub 2010/11/03.
41. Friess SH, Ralston J, Eucker SA, Helfaer MA, Smith C, Margulies SS. Neurocritical care monitoring correlates with neuropathology in a swine model of pediatric traumatic brain injury. *Neurosurgery*. 2011;69(5):1139-47; discussion 47. Epub 2011/06/15.
42. Potschka H, Fischer A, von Ruden EL, Hulsmeyer V, Baumgartner W. Canine epilepsy as a translational model? *Epilepsia*. 2013;54(4):571-9. Epub 2013/03/20.

43. Potschka H. Animal models of drug-resistant epilepsy. *Epileptic disorders: international epilepsy journal with videotape*. 2012;14(3):226-34. Epub 2012/09/06.
44. Finnie IW. Traumatic head injury in ruminant livestock. *Australian veterinary journal*. 1997;75(3):204-8. Epub 1997/03/01.
45. Finnie JW, Manavis J, Blumbergs PC, Summersides GE. Brain damage in sheep from penetrating captive bolt stunning. *Australian veterinary journal*. 2002;80(1-2):67-9. Epub 2002/08/16.
46. Russell WMS, Burch RL. *The Principles of Humane Experimental Technique*, p. 69- 154: Methuen, London; 1957.
47. Mattle H, Mumenthaler M. Schädel-Hirn-Trauma. In: *Neurologie*. 13. Auflage. p. 38: Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart; 2013.
48. Rickels E, von Wild K, Wenzlaff P. Head injury in Germany: A population-based prospective study on epidemiology, causes, treatment and outcome of all degrees of head-injury severity in two distinct areas. *Brain injury : [BI]*. 2010;24(12):1491-504. Epub 2010/07/22.
49. Leitlinien Schädel-Hirn-Trauma im Erwachsenenalter: Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie, ICD 10-GM; Version 2006, überarbeitet 2007.
50. Hesdorffer DC, Rauch SL, Tamminga CA. Long-term psychiatric outcomes following traumatic brain injury: a review of the literature. *The Journal of head trauma rehabilitation*. 2009;24(6):452-9. Epub 2009/11/27.
51. Teasdale G, Jennett B. Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. *Lancet*. 1974;2(7872):81-4. Epub 1974/07/13.

52. Zweckberger K, Eros C, Zimmermann R, Kim SW, Engel D, Plesnila N. Effect of early and delayed decompressive craniectomy on secondary brain damage after controlled cortical impact in mice. *Journal of neurotrauma*. 2006;23(7):1083-93. Epub 2006/07/27.
53. Werner C, Engelhard K. Pathophysiology of traumatic brain injury. *British journal of anaesthesia*. 2007;99(1):4-9. Epub 2007/06/19.
54. Mendelson AA, Gillis C, Henderson WR, Ronco JJ, Dhingra V, Griesdale DE. Intracranial pressure monitors in traumatic brain injury: a systematic review. *The Canadian journal of neurological sciences Le journal canadien des sciences neurologiques*. 2012;39(5):571-6. Epub 2012/08/31.
55. Depreitere B, Guiza F, Van den Berghe G, Schuhmann MU, Maier G, Piper I, et al. Pressure autoregulation monitoring and cerebral perfusion pressure target recommendation in patients with severe traumatic brain injury based on minute-by-minute monitoring data. *Journal of neurosurgery*. 2014;120(6):1451-7. Epub 2014/04/22.
56. Leitgeb J, Mauritz W, Brazinova A, Majdan M, Wilbacher I. Outcome after severe brain trauma associated with epidural hematoma. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*. 2013;133(2):199-207. Epub 2012/11/20.
57. Markram H. The blue brain project. *Nature reviews Neuroscience*. 2006;7(2):153-60. Epub 2006/01/24.
58. Siren AL, Radyushkin K, Boretius S, Kammer D, Riechers CC, Natt O, et al. Global brain atrophy after unilateral parietal lesion and its prevention by erythropoietin. *Brain : a journal of neurology*. 2006;129(Pt 2):480-9. Epub 2005/12/13.
59. Trepel M. Kapitel 9. In: *Neuroanatomie*, 5. Auflage, p. 199: Urban & Fischer Verlag, München; 2013.

60. Neychev VK, Gross RE, Lehericy S, Hess EJ, Jinnah HA. The functional neuroanatomy of dystonia. *Neurobiology of disease*. 2011;42(2):185-201. Epub 2011/02/10.
61. Bjorck G, Margolin G, Maback GM, Persson JK, Mattsson P, Hydman J. New animal model for assessment of functional laryngeal motor innervation. *The Annals of otology, rhinology, and laryngology*. 2012;121(10):695-9. Epub 2012/11/08.
62. Szabadi E. Functional neuroanatomy of the central noradrenergic system. *J Psychopharmacol*. 2013;27(8):659-93. Epub 2013/06/14.
63. Berger M. Kapitel II. In: *Psychische Erkrankungen*, 4. Auflage: Urban & Fischer Verlag, München; 2012.
64. Schneider K. *Klinische Psychopathologie*, 15. Auflage, p. 37: Georg Thieme Verlag, Stuttgart; 2007.
65. Frank D. Recognizing behavioral signs of pain and disease: a guide for practitioners. *The Veterinary clinics of North America Small animal practice*. 2014;44(3):507-24. Epub 2014/04/29.
66. Ogata N. Animal behavior case of the month. Fear behavior in a cat. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2013;243(5):641-3. Epub 2013/08/27.
67. Wessmann A, Volk HA, Parkin T, Ortega M, Anderson TJ. Evaluation of quality of life in dogs with idiopathic epilepsy. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*. 2014;28(2):510-4. Epub 2014/03/13.
68. Jones CA, Watson DJ, Fone KC. Animal models of schizophrenia. *British journal of pharmacology*. 2011;164(4):1162-94. Epub 2011/04/01.

69. Koch M. Clinical relevance of animal models of schizophrenia. *Supplements to Clinical neurophysiology*. 2013;62:113-20. Epub 2013/09/24.
70. Kuhlmann SR, Walter H, Schlapfer TE. [The neurobiology of anhedonia. The pathophysiology of an important symptom in depressive disorders]. *Der Nervenarzt*. 2013;84(5):590-5. Epub 2012/10/23. Neurobiologie der Anhedonie. Zur Pathophysiologie eines bedeutenden Symptoms der depressiven Störung.
71. Chiang MF, Chang JG, Hu CJ. Association between apolipoprotein E genotype and outcome of traumatic brain injury. *Acta neurochirurgica*. 2003;145(8):649-53; discussion 53-4. Epub 2003/10/02.
72. Nathoo N, Chetry R, van Dellen JR, Connolly C, Naidoo R. Apolipoprotein E polymorphism and outcome after closed traumatic brain injury: influence of ethnic and regional differences. *Journal of neurosurgery*. 2003;98(2):302-6. Epub 2003/02/21.
73. Chamelian L, Reis M, Feinstein A. Six-month recovery from mild to moderate Traumatic Brain Injury: the role of APOE-epsilon4 allele. *Brain : a journal of neurology*. 2004;127(Pt 12):2621-8. Epub 2004/10/22.
74. Diaz-Arrastia R, Gong Y, Fair S, Scott KD, Garcia MC, Carlile MC, et al. Increased risk of late posttraumatic seizures associated with inheritance of APOE epsilon4 allele. *Archives of neurology*. 2003;60(6):818-22. Epub 2003/06/18.
75. Anderson GD, Temkin NR, Dikmen SS, Diaz-Arrastia R, Machamer JE, Fahrenbruch C, et al. Haptoglobin phenotype and apolipoprotein E polymorphism: relationship to posttraumatic seizures and neuropsychological functioning after traumatic brain injury. *Epilepsy & behavior : E&B*. 2009;16(3):501-6. Epub 2009/09/22.
76. Kharatishvili I, Pitkanen A. Posttraumatic epilepsy. *Current opinion in neurology*. 2010;23(2):183-8. Epub 2010/02/04.

77. Loscher W, Potschka H. Role of multidrug transporters in pharmacoresistance to antiepileptic drugs. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2002;301(1):7-14. Epub 2002/03/22.
78. Potschka H. Animal and human data: where are our concepts for drug-resistant epilepsy going? *Epilepsia*. 2013;54 Suppl 2:29-32. Epub 2013/05/10.
79. Bagley R. Clinical Evaluation and Management of Animals with Seizures, In: *Fundamentals of Veterinary Clinical Neurology*, p. 363-376: Oxford Blackwell Publishing; 2005.
80. Sirimanne ES, Blumberg RM, Bossano D, Gunning M, Edwards AD, Gluckman PD, et al. The effect of prolonged modification of cerebral temperature on outcome after hypoxic-ischemic brain injury in the infant rat. *Pediatric research*. 1996;39(4 Pt 1):591-7. Epub 1996/04/01.
81. Torok E, Klotowski M, Trabold R, Thal SC, Plesnila N, Scholler K. Mild hypothermia (33 degrees C) reduces intracranial hypertension and improves functional outcome after subarachnoid hemorrhage in rats. *Neurosurgery*. 2009;65(2):352-9; discussion 9. Epub 2009/07/25.
82. Statler KD, Alexander H, Vagni V, Dixon CE, Clark RS, Jenkins L, et al. Comparison of seven anesthetic agents on outcome after experimental traumatic brain injury in adult, male rats. *Journal of neurotrauma*. 2006;23(1):97-108. Epub 2006/01/25.
83. Statler KD, Janesko KL, Melick JA, Clark RS, Jenkins LW, Kochanek PM. Hyperglycolysis is exacerbated after traumatic brain injury with fentanyl vs. isoflurane anesthesia in rats. *Brain research*. 2003;994(1):37-43. Epub 2003/12/04.
84. Shuster L, Webster GW, Yu G. Increased running response to morphine in morphine-pretreated mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1975;192(1):64-7. Epub 1975/01/01.

85. Stone WS, Walser B, Gold SD, Gold PE. Scopolamine- and morphine-induced impairments of spontaneous alternation performance in mice: reversal with glucose and with cholinergic and adrenergic agonists. *Behavioral neuroscience*. 1991;105(2):264-71. Epub 1991/04/01.
86. Walker DL, McGlynn T, Grey C, Ragozzino M, Gold PE. Naloxone modulates the behavioral effects of cholinergic agonists and antagonists. *Psychopharmacology*. 1991;105(1):57-62. Epub 1991/01/01.
87. Cole JT, Yarnell A, Kean WS, Gold E, Lewis B, Ren M, et al. Craniotomy: true sham for traumatic brain injury, or a sham of a sham? *Journal of neurotrauma*. 2011;28(3):359-69. Epub 2010/12/31.
88. Powell SB, Zhou X, Geyer MA. Prepulse inhibition and genetic mouse models of schizophrenia. *Behavioural brain research*. 2009;204(2):282-94. Epub 2009/04/29.
89. Gould TD, Gottesman, II. Psychiatric endophenotypes and the development of valid animal models. *Genes, brain, and behavior*. 2006;5(2):113-9. Epub 2006/03/02.
90. Cryan JF, Holmes A. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nature reviews Drug discovery*. 2005;4(9):775-90. Epub 2005/09/03.
91. Pollak DD, Rey CE, Monje FJ. Rodent models in depression research: classical strategies and new directions. *Annals of medicine*. 2010;42(4):252-64. Epub 2010/04/07.
92. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of neuroscience methods*. 1984;11(1):47-60. Epub 1984/05/01.

93. LeDoux J. Emotional networks and motor control: a fearful view. *Progress in brain research*. 1996;107:437-46. Epub 1996/01/01.
94. Ferraro TN, Golden GT, Smith GG, St Jean P, Schork NJ, Mulholland N, et al. Mapping loci for pentylenetetrazol-induced seizure susceptibility in mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1999;19(16):6733-9. Epub 1999/08/06.
95. Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain research Molecular brain research*. 1998;57(1):1-9. Epub 1998/06/19.
96. Chen Z, Shin D, Chen S, Mikhail K, Hadass O, Tomlison BN, et al. Histological quantitation of brain injury using whole slide imaging: a pilot validation study in mice. *PloS one*. 2014;9(3):e92133. Epub 2014/03/19.
97. Bjornsson CS, Lin G, Al-Kofahi Y, Narayanaswamy A, Smith KL, Shain W, et al. Associative image analysis: a method for automated quantification of 3D multi-parameter images of brain tissue. *Journal of neuroscience methods*. 2008;170(1):165-78. Epub 2008/02/26.
98. Zlokovic BV. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron*. 2008;57(2):178-201. Epub 2008/01/25.
99. Unterberg AW, Stover J, Kress B, Kiening KL. Edema and brain trauma. *Neuroscience*. 2004;129(4):1021-9. Epub 2004/11/25.
100. Thal SC, Luh C, Schaible EV, Timaru-Kast R, Hedrich J, Luhmann HJ, et al. Volatile anesthetics influence blood-brain barrier integrity by modulation of tight junction protein expression in traumatic brain injury. *PloS one*. 2012;7(12):e50752. Epub 2012/12/20.

101. Marmarou A. Pathophysiology of traumatic brain edema: current concepts. *Acta neurochirurgica Supplement*. 2003;86:7-10. Epub 2004/02/03.
102. Timaru-Kast R, Luh C, Gotthardt P, Huang C, Schafer MK, Engelhard K, et al. Influence of age on brain edema formation, secondary brain damage and inflammatory response after brain trauma in mice. *PloS one*. 2012;7(8):e43829. Epub 2012/09/07.
103. Bao HJ, Wang T, Zhang MY, Liu R, Dai DK, Wang YQ, et al. Poloxamer-188 attenuates TBI-induced blood-brain barrier damage leading to decreased brain edema and reduced cellular death. *Neurochemical research*. 2012;37(12):2856-67. Epub 2012/09/27.
104. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature protocols*. 2006;1(2):581-5. Epub 2007/04/05.
105. Thal SC, Wyszkon S, Pieter D, Engelhard K, Werner C. Selection of endogenous control genes for normalization of gene expression analysis after experimental brain trauma in mice. *Journal of neurotrauma*. 2008;25(7):785-94. Epub 2008/07/17.
106. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*. 2001;29(9):e45. Epub 2001/05/09.
107. Luh C, Gierth K, Timaru-Kast R, Engelhard K, Werner C, Thal SC. Influence of a brief episode of anesthesia during the induction of experimental brain trauma on secondary brain damage and inflammation. *PloS one*. 2011;6(5):e19948. Epub 2011/06/01.
108. Holmin S, Hojeberg B. In situ detection of intracerebral cytokine expression after human brain contusion. *Neuroscience letters*. 2004;369(2):108-14. Epub 2004/09/29.

109. Ley EJ, Clond MA, Singer MB, Shouhed D, Salim A. IL6 deficiency affects function after traumatic brain injury. *The Journal of surgical research*. 2011;170(2):253-6. Epub 2011/05/03.
110. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica*. 2010;119(1):7-35. Epub 2009/12/17.
111. Zamanian JL, Xu L, Foo LC, Nouri N, Zhou L, Giffard RG, et al. Genomic analysis of reactive astrogliosis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2012;32(18):6391-410. Epub 2012/05/04.
112. Ma DK, Jang MH, Guo JU, Kitabatake Y, Chang ML, Pow-Anpongkul N, et al. Neuronal activity-induced Gadd45b promotes epigenetic DNA demethylation and adult neurogenesis. *Science*. 2009;323(5917):1074-7. Epub 2009/01/03.
113. Benowitz LI, Routtenberg A. GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends in neurosciences*. 1997;20(2):84-91. Epub 1997/02/01.
114. Schafer MK, Frotscher M. Role of L1CAM for axon sprouting and branching. *Cell and tissue research*. 2012;349(1):39-48. Epub 2012/03/01.
115. Hsieh CL, Kim CC, Ryba BE, Niemi EC, Bando JK, Locksley RM, et al. Traumatic brain injury induces macrophage subsets in the brain. *European journal of immunology*. 2013;43(8):2010-22. Epub 2013/05/01.
116. Crenn P, Hamchaoui S, Bourget-Massari A, Hanachi M, Melchior JC, Azouvi P. Changes in weight after traumatic brain injury in adult patients: a longitudinal study. *Clin Nutr*. 2014;33(2):348-53. Epub 2013/07/03.

117. Rauen K, Trabold R, Brem C, Terpolilli NA, Plesnila N. Arginine vasopressin V1a receptor-deficient mice have reduced brain edema and secondary brain damage following traumatic brain injury. *Journal of neurotrauma*. 2013;30(16):1442-8. Epub 2013/02/28.
118. Taylor AN, Rahman SU, Sanders NC, Tio DL, Prolo P, Sutton RL. Injury severity differentially affects short- and long-term neuroendocrine outcomes of traumatic brain injury. *Journal of neurotrauma*. 2008;25(4):311-23. Epub 2008/04/01.
119. Taylor AN, Tio DL, Sutton RL. Restoration of neuroendocrine stress response by glucocorticoid receptor or GABA(A) receptor antagonists after experimental traumatic brain injury. *Journal of neurotrauma*. 2013;30(14):1250-6. Epub 2013/02/07.
120. Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Jr., Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature*. 2000;404(6778):661-71. Epub 2000/04/15.
121. Fang J, DuBois DC, He Y, Almon RR, Jusko WJ. Dynamic modeling of methylprednisolone effects on body weight and glucose regulation in rats. *Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2011;38(3):293-316. Epub 2011/03/12.
122. Tsenter J, Beni-Adani L, Assaf Y, Alexandrovich AG, Trembovler V, Shohami E. Dynamic changes in the recovery after traumatic brain injury in mice: effect of injury severity on T2-weighted MRI abnormalities, and motor and cognitive functions. *Journal of neurotrauma*. 2008;25(4):324-33. Epub 2008/04/01.
123. Timaru-Kast R, Wyschkon S, Luh C, Schaible EV, Lehmann F, Merk P, et al. Delayed inhibition of angiotensin II receptor type 1 reduces secondary brain damage and improves functional recovery after experimental brain trauma. *Critical care medicine*. 2012;40(3):935-44. Epub 2011/09/20.

124. Hamm RJ, Pike BR, O'Dell DM, Lyeth BG, Jenkins LW. The rotarod test: an evaluation of its effectiveness in assessing motor deficits following traumatic brain injury. *Journal of neurotrauma*. 1994;11(2):187-96. Epub 1994/04/01.
125. Raghupathi R, Fernandez SC, Murai H, Trusko SP, Scott RW, Nishioka WK, et al. BCL-2 overexpression attenuates cortical cell loss after traumatic brain injury in transgenic mice. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 1998;18(11):1259-69. Epub 1998/11/11.
126. Clausen F, Hanell A, Israelsson C, Hedin J, Ebendal T, Mir AK, et al. Neutralization of interleukin-1beta reduces cerebral edema and tissue loss and improves late cognitive outcome following traumatic brain injury in mice. *The European journal of neuroscience*. 2011;34(1):110-23. Epub 2011/06/01.
127. Onyszchuk G, He YY, Berman NE, Brooks WM. Detrimental effects of aging on outcome from traumatic brain injury: a behavioral, magnetic resonance imaging, and histological study in mice. *Journal of neurotrauma*. 2008;25(2):153-71. Epub 2008/02/12.
128. Villapol S, Yaszemski AK, Logan TT, Sanchez-Lemus E, Saavedra JM, Symes AJ. Candesartan, an angiotensin II AT(1)-receptor blocker and PPAR-gamma agonist, reduces lesion volume and improves motor and memory function after traumatic brain injury in mice. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 2012;37(13):2817-29. Epub 2012/08/16.
129. Liu NK, Zhang YP, Zou J, Verhovshek T, Chen C, Lu QB, et al. A semicircular controlled cortical impact produces long-term motor and cognitive dysfunction that correlates well with damage to both the sensorimotor cortex and hippocampus. *Brain research*. 2014;1576:18-26. Epub 2014/06/07.

130. Chen G, Patten C, Kothari DH, Zajac FE. Gait differences between individuals with post-stroke hemiparesis and non-disabled controls at matched speeds. *Gait & posture*. 2005;22(1):51-6. Epub 2005/07/06.
131. Ng SS, Hui-Chan CW. The timed up & go test: its reliability and association with lower-limb impairments and locomotor capacities in people with chronic stroke. *Archives of physical medicine and rehabilitation*. 2005;86(8):1641-7. Epub 2005/08/09.
132. Hamers FP, Koopmans GC, Joosten EA. CatWalk-assisted gait analysis in the assessment of spinal cord injury. *Journal of neurotrauma*. 2006;23(3-4):537-48. Epub 2006/04/25.
133. Starkey ML, Barritt AW, Yip PK, Davies M, Hamers FP, McMahon SB, et al. Assessing behavioural function following a pyramidotomy lesion of the corticospinal tract in adult mice. *Experimental neurology*. 2005;195(2):524-39. Epub 2005/07/30.
134. Vlamings R, Visser-Vandewalle V, Koopmans G, Joosten EA, Kozan R, Kaplan S, et al. High frequency stimulation of the subthalamic nucleus improves speed of locomotion but impairs forelimb movement in Parkinsonian rats. *Neuroscience*. 2007;148(3):815-23. Epub 2007/08/21.
135. Neumann M, Wang Y, Kim S, Hong SM, Jeng L, Bilgen M, et al. Assessing gait impairment following experimental traumatic brain injury in mice. *Journal of neuroscience methods*. 2009;176(1):34-44. Epub 2008/09/23.
136. Budinich CS, Tucker LB, Lowe D, Rosenberger JG, McCabe JT. Short and long-term motor and behavioral effects of diazoxide and dimethyl sulfoxide administration in the mouse after traumatic brain injury. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 2013;108:66-73. Epub 2013/04/16.

137. Fox GB, Fan L, Levasseur RA, Faden AI. Sustained sensory/motor and cognitive deficits with neuronal apoptosis following controlled cortical impact brain injury in the mouse. *Journal of neurotrauma*. 1998;15(8):599-614. Epub 1998/09/03.
138. Smith DH, Soares HD, Pierce JS, Perlman KG, Saatman KE, Meaney DF, et al. A model of parasagittal controlled cortical impact in the mouse: cognitive and histopathologic effects. *Journal of neurotrauma*. 1995;12(2):169-78. Epub 1995/04/01.
139. Lighthall JW, Goshgarian HG, Pinderski CR. Characterization of axonal injury produced by controlled cortical impact. *Journal of neurotrauma*. 1990;7(2):65-76. Epub 1990/01/01.
140. Nishibe M, Barbay S, Guggenmos D, Nudo RJ. Reorganization of motor cortex after controlled cortical impact in rats and implications for functional recovery. *Journal of neurotrauma*. 2010;27(12):2221-32. Epub 2010/09/30.
141. Ramanathan D, Conner JM, Tuszynski MH. A form of motor cortical plasticity that correlates with recovery of function after brain injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(30):11370-5. Epub 2006/07/14.
142. Nakagawa H, Ueno M, Itokazu T, Yamashita T. Bilateral movement training promotes axonal remodeling of the corticospinal tract and recovery of motor function following traumatic brain injury in mice. *Cell death & disease*. 2013;4:e534. Epub 2013/03/09.
143. Conner JM, Chiba AA, Tuszynski MH. The basal forebrain cholinergic system is essential for cortical plasticity and functional recovery following brain injury. *Neuron*. 2005;46(2):173-9. Epub 2005/04/26.

144. Ramic M, Emerick AJ, Bollnow MR, O'Brien TE, Tsai SY, Kartje GL. Axonal plasticity is associated with motor recovery following amphetamine treatment combined with rehabilitation after brain injury in the adult rat. *Brain research*. 2006;1111(1):176-86. Epub 2006/08/22.
145. Smith JM, Lunga P, Story D, Harris N, Le Belle J, James MF, et al. Inosine promotes recovery of skilled motor function in a model of focal brain injury. *Brain : a journal of neurology*. 2007;130(Pt 4):915-25. Epub 2007/02/13.
146. Oshima T, Lee S, Sato A, Oda S, Hirasawa H, Yamashita T. TNF-alpha contributes to axonal sprouting and functional recovery following traumatic brain injury. *Brain research*. 2009;1290:102-10. Epub 2009/07/21.
147. Wieloch T, Nikolich K. Mechanisms of neural plasticity following brain injury. *Current opinion in neurobiology*. 2006;16(3):258-64. Epub 2006/05/23.
148. Nudo RJ. Mechanisms for recovery of motor function following cortical damage. *Current opinion in neurobiology*. 2006;16(6):638-44. Epub 2006/11/07.
149. Zhang Y, Xiong Y, Mahmood A, Meng Y, Liu Z, Qu C, et al. Sprouting of corticospinal tract axons from the contralateral hemisphere into the denervated side of the spinal cord is associated with functional recovery in adult rat after traumatic brain injury and erythropoietin treatment. *Brain research*. 2010;1353:249-57. Epub 2010/07/27.
150. Axelson HW, Winkler T, Flygt J, Djupsjo A, Hanell A, Marklund N. Plasticity of the contralateral motor cortex following focal traumatic brain injury in the rat. *Restorative neurology and neuroscience*. 2013;31(1):73-85. Epub 2012/10/11.
151. Platt SR, Radaelli ST, McDonnell JJ. The prognostic value of the modified Glasgow Coma Scale in head trauma in dogs. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*. 2001;15(6):581-4. Epub 2002/01/31.

152. Hall KE, Holowaychuk MK, Sharp CR, Reineke E. Multicenter prospective evaluation of dogs with trauma. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2014;244(3):300-8. Epub 2014/01/18.
153. Sorjonen D, Thomas W, Myers L. Radical cerebral cortical resection in dogs. *Prog Vet Neurol*. 1991;2:225-36.
154. Chauhan NB, Gatto R, Chauhan MB. Neuroanatomical correlation of behavioral deficits in the CCI model of TBI. *Journal of neuroscience methods*. 2010;190(1):1-9. Epub 2010/04/14.
155. Washington PM, Forcelli PA, Wilkins T, Zapple DN, Parsadonian M, Burns MP. The effect of injury severity on behavior: a phenotypic study of cognitive and emotional deficits after mild, moderate, and severe controlled cortical impact injury in mice. *Journal of neurotrauma*. 2012;29(13):2283-96. Epub 2012/05/31.
156. Niesman IR, Schilling JM, Shapiro LA, Kellerhals SE, Bonds JA, Kleschevnikov AM, et al. Traumatic brain injury enhances neuroinflammation and lesion volume in caveolin deficient mice. *Journal of neuroinflammation*. 2014;11:39. Epub 2014/03/07.
157. Rosema S, Crowe L, Anderson V. Social function in children and adolescents after traumatic brain injury: a systematic review 1989-2011. *Journal of neurotrauma*. 2012;29(7):1277-91. Epub 2012/01/21.
158. Spikman JM, Timmerman ME, Milders MV, Veenstra WS, van der Naalt J. Social cognition impairments in relation to general cognitive deficits, injury severity, and prefrontal lesions in traumatic brain injury patients. *Journal of neurotrauma*. 2012;29(1):101-11. Epub 2011/09/22.

159. Benedictus MR, Spikman JM, van der Naalt J. Cognitive and behavioral impairment in traumatic brain injury related to outcome and return to work. *Archives of physical medicine and rehabilitation*. 2010;91(9):1436-41. Epub 2010/08/31.
160. Fenn AM, Gensel JC, Huang Y, Popovich PG, Lifshitz J, Godbout JP. Immune Activation Promotes Depression 1 Month After Diffuse Brain Injury: A Role for Primed Microglia. *Biological psychiatry*. 2013. Epub 2013/12/03.
161. Semple BD, Canchola SA, Noble-Haeusslein LJ. Deficits in social behavior emerge during development after pediatric traumatic brain injury in mice. *Journal of neurotrauma*. 2012;29(17):2672-83. Epub 2012/08/15.
162. Nadler JJ, Moy SS, Dold G, Trang D, Simmons N, Perez A, et al. Automated apparatus for quantitation of social approach behaviors in mice. *Genes, brain, and behavior*. 2004;3(5):303-14. Epub 2004/09/04.
163. Silverman JL, Yang M, Lord C, Crawley JN. Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. *Nature reviews Neuroscience*. 2010;11(7):490-502. Epub 2010/06/19.
164. Yang M, Silverman JL, Crawley JN. Automated three-chambered social approach task for mice. *Current protocols in neuroscience / editorial board, Jacqueline N Crawley [et al]*. 2011;Chapter 8:Unit 8 26. Epub 2011/07/07.
165. Fairless AH, Katz JM, Vijayvargiya N, Dow HC, Kreibich AS, Berrettini WH, et al. Development of home cage social behaviors in BALB/cJ vs. C57BL/6J mice. *Behavioural brain research*. 2013;237:338-47. Epub 2012/09/18.
166. Braff D, Stone C, Callaway E, Geyer M, Glick I, Bali L. Prestimulus effects on human startle reflex in normals and schizophrenics. *Psychophysiology*. 1978;15(4):339-43. Epub 1978/07/01.

167. Kohl S, Heekeren K, Klosterkötter J, Kuhn J. Prepulse inhibition in psychiatric disorders--apart from schizophrenia. *Journal of psychiatric research*. 2013;47(4):445-52. Epub 2013/01/05.
168. Braff DL, Geyer MA. Sensorimotor gating and schizophrenia. Human and animal model studies. *Archives of general psychiatry*. 1990;47(2):181-8. Epub 1990/02/01.
169. Swerdlow NR, Geyer MA, Braff DL. Neural circuit regulation of prepulse inhibition of startle in the rat: current knowledge and future challenges. *Psychopharmacology*. 2001;156(2-3):194-215. Epub 2001/09/11.
170. Singer P, Hauser J, Llano Lopez L, Peleg-Raibstein D, Feldon J, Gargiulo PA, et al. Prepulse inhibition predicts working memory performance whilst startle habituation predicts spatial reference memory retention in C57BL/6 mice. *Behavioural brain research*. 2013;242:166-77. Epub 2013/01/02.
171. Heldt SA, Elberger AJ, Deng Y, Guley NH, Del Mar N, Rogers J, et al. A novel closed-head model of mild traumatic brain injury caused by primary overpressure blast to the cranium produces sustained emotional deficits in mice. *Frontiers in neurology*. 2014;5:2. Epub 2014/01/31.
172. Inui K, Tsuruhara A, Kodaira M, Motomura E, Tani H, Nishihara M, et al. Prepulse inhibition of auditory change-related cortical responses. *BMC neuroscience*. 2012;13:135. Epub 2012/11/02.
173. Martin AL, Brown RE. The lonely mouse: verification of a separation-induced model of depression in female mice. *Behavioural brain research*. 2010;207(1):196-207. Epub 2009/10/13.
174. Cryan JF, Mombereau C, Vassout A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2005;29(4-5):571-625. Epub 2005/05/14.

175. Chermat R, Thierry B, Mico JA, Steru L, Simon P. Adaptation of the tail suspension test to the rat. *Journal de pharmacologie*. 1986;17(3):348-50. Epub 1986/07/01.
176. Berrocoso E, Ikeda K, Sora I, Uhl GR, Sanchez-Blazquez P, Mico JA. Active behaviours produced by antidepressants and opioids in the mouse tail suspension test. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2013;16(1):151-62. Epub 2012/01/06.
177. Dhingra D, Valecha R. Behavioural and neuroendocrine effects of aqueous extract of *Boerhaavia diffusa* Linn. in mice using tail suspension and forced swim tests--a preliminary study. *Indian journal of experimental biology*. 2014;52(1):53-9. Epub 2014/03/13.
178. Warner TA, Stafford NP, Rompala GR, Van Hoogenstyn AJ, Elgert E, Drugan RC. Intermittent swim stress causes Morris water maze performance deficits in a massed-learning trial procedure that are exacerbated by reboxetine. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 2013;113:12-9. Epub 2013/10/15.
179. Zhao Z, Loane DJ, Murray MG, 2nd, Stoica BA, Faden AI. Comparing the predictive value of multiple cognitive, affective, and motor tasks after rodent traumatic brain injury. *Journal of neurotrauma*. 2012;29(15):2475-89. Epub 2012/08/29.
180. Jorge RE, Robinson RG, Starkstein SE, Arndt SV. Depression and anxiety following traumatic brain injury. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences*. 1993;5(4):369-74. Epub 1993/01/01.
181. Williams WH, Evans JJ, Fleminger S. Neurorehabilitation and cognitive-behaviour therapy of anxiety disorders after brain injury: An overview and a case illustration of obsessive-compulsive disorder. *Neuropsychological rehabilitation*. 2003;13(1-2):133-48. Epub 2003/01/01.

182. Andruszkow H, Deniz E, Urner J, Probst C, Grun O, Lohse R, et al. Physical and psychological long-term outcome after traumatic brain injury in children and adult patients. *Health and quality of life outcomes*. 2014;12:26. Epub 2014/02/28.
183. Trevena L, Cameron I. Traumatic brain injury - long term care of patients in general practice. *Australian family physician*. 2011;40(12):956-61. Epub 2011/12/08.
184. Chaves C, Trzesniak C, Derenusson GN, Araujo D, Wichert-Ana L, Machado-de-Sousa JP, et al. Late-onset social anxiety disorder following traumatic brain injury. *Brain injury : [BI]*. 2012;26(6):882-6. Epub 2012/05/16.
185. Garthe A, Behr J, Kempermann G. Adult-generated hippocampal neurons allow the flexible use of spatially precise learning strategies. *PloS one*. 2009;4(5):e5464. Epub 2009/05/08.
186. Dupret D, Fabre A, Dobrossy MD, Panatier A, Rodriguez JJ, Lamarque S, et al. Spatial learning depends on both the addition and removal of new hippocampal neurons. *PLoS biology*. 2007;5(8):e214. Epub 2007/08/09.
187. Deng W, Saxe MD, Gallina IS, Gage FH. Adult-born hippocampal dentate granule cells undergoing maturation modulate learning and memory in the brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2009;29(43):13532-42. Epub 2009/10/30.
188. Laeremans A, Sabanov V, Ahmed T, Nys J, Van de Plas B, Vinken K, et al. Distinct and simultaneously active plasticity mechanisms in mouse hippocampus during different phases of Morris water maze training. *Brain structure & function*. 2014. Epub 2014/02/25.

189. Dixon CE, Kochanek PM, Yan HQ, Schiding JK, Griffith RG, Baum E, et al. One-year study of spatial memory performance, brain morphology, and cholinergic markers after moderate controlled cortical impact in rats. *Journal of neurotrauma*. 1999;16(2):109-22. Epub 1999/03/31.
190. Dixon CE, Kraus MF, Kline AE, Ma X, Yan HQ, Griffith RG, et al. Amantadine improves water maze performance without affecting motor behavior following traumatic brain injury in rats. *Restorative neurology and neuroscience*. 1999;14(4):285-94. Epub 2003/04/03.
191. Pavlov I. *Conditioned reflexes: An investigation of the physiological activity of the cerebral cortex*: Oxford University Press, London; 1927.
192. VanElzakker MB, Dahlgren MK, Davis FC, Dubois S, Shin LM. From Pavlov to PTSD: the extinction of conditioned fear in rodents, humans, and anxiety disorders. *Neurobiology of learning and memory*. 2014;113:3-18. Epub 2013/12/11.
193. Fendt M, Fanselow MS. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 1999;23(5):743-60. Epub 1999/07/07.
194. Davis M. The role of the amygdala in fear-potentiated startle: implications for animal models of anxiety. *Trends in pharmacological sciences*. 1992;13(1):35-41. Epub 1992/01/01.
195. LeDoux JE, Cicchetti P, Xagoraris A, Romanski LM. The lateral amygdaloid nucleus: sensory interface of the amygdala in fear conditioning. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1990;10(4):1062-9. Epub 1990/04/01.
196. Maren S, Fanselow MS. The amygdala and fear conditioning: has the nut been cracked? *Neuron*. 1996;16(2):237-40. Epub 1996/02/01.

197. Stiedl O, Birkenfeld K, Palve M, Spiess J. Impairment of conditioned contextual fear of C57BL/6J mice by intracerebral injections of the NMDA receptor antagonist APV. *Behavioural brain research*. 2000;116(2):157-68. Epub 2000/11/18.
198. Sanders MJ, Wiltgen BJ, Fanselow MS. The place of the hippocampus in fear conditioning. *European journal of pharmacology*. 2003;463(1-3):217-23. Epub 2003/02/26.
199. Moustafa AA, Gilbertson MW, Orr SP, Herzallah MM, Servatius RJ, Myers CE. A model of amygdala-hippocampal-prefrontal interaction in fear conditioning and extinction in animals. *Brain and cognition*. 2013;81(1):29-43. Epub 2012/11/21.
200. Gilmartin MR, Kwapis JL, Helmstetter FJ. NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors in the prelimbic medial prefrontal cortex differentially mediate trace, delay, and contextual fear conditioning. *Learn Mem*. 2013;20(6):290-4. Epub 2013/05/17.
201. Burman MA, Simmons CA, Hughes M, Lei L. Developing and validating trace fear conditioning protocols in C57BL/6 mice. *Journal of neuroscience methods*. 2014;222:111-7. Epub 2013/11/26.
202. Misane I, Tovote P, Meyer M, Spiess J, Ogren SO, Stiedl O. Time-dependent involvement of the dorsal hippocampus in trace fear conditioning in mice. *Hippocampus*. 2005;15(4):418-26. Epub 2005/01/26.
203. Runyan JD, Moore AN, Dash PK. A role for prefrontal cortex in memory storage for trace fear conditioning. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2004;24(6):1288-95. Epub 2004/02/13.

204. Allen CP, Dunkley BT, Muthukumaraswamy SD, Edden R, Evans CJ, Sumner P, et al. Enhanced awareness followed reversible inhibition of human visual cortex: a combined TMS, MRS and MEG study. *PloS one*. 2014;9(6):e100350. Epub 2014/06/24.
205. Smith CJ, Johnson BN, Elkind JA, See JM, Xiong G, Cohen AS. Investigations on alterations of hippocampal circuit function following mild traumatic brain injury. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2012(69):e4411. Epub 2012/11/28.
206. Titus DJ, Sakurai A, Kang Y, Furones C, Jergova S, Santos R, et al. Phosphodiesterase inhibition rescues chronic cognitive deficits induced by traumatic brain injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2013;33(12):5216-26. Epub 2013/03/22.
207. Eramudugolla R, Bielak AA, Bunce D, Eastal S, Cherbuin N, Anstey KJ. Long-term cognitive correlates of traumatic brain injury across adulthood and interactions with APOE genotype, sex, and age cohorts. *Journal of the International Neuropsychological Society : JINS*. 2014;20(4):444-54. Epub 2014/03/29.
208. de Oliveira Thais ME, Cavallazzi G, Formolo DA, de Castro LD, Schmoeller R, Guarnieri R, et al. Limited predictive power of hospitalization variables for long-term cognitive prognosis in adult patients with severe traumatic brain injury. *Journal of neuropsychology*. 2014;8(1):125-39. Epub 2012/11/22.
209. Lewis H, Benton A, Grossman R. *Neurobehavioural consequences of closed head injury*: Oxford University Press; 1982.
210. Dash PK, Orsi SA, Moore AN. Histone deacetylase inhibition combined with behavioral therapy enhances learning and memory following traumatic brain injury. *Neuroscience*. 2009;163(1):1-8. Epub 2009/06/18.

211. Hall ED, Sullivan PG, Gibson TR, Pavel KM, Thompson BM, Scheff SW. Spatial and temporal characteristics of neurodegeneration after controlled cortical impact in mice: more than a focal brain injury. *Journal of neurotrauma*. 2005;22(2):252-65. Epub 2005/02/18.
212. Loscher W. Preclinical assessment of proconvulsant drug activity and its relevance for predicting adverse events in humans. *European journal of pharmacology*. 2009;610(1-3):1-11. Epub 2009/03/19.
213. Davoudi M, Shojaei A, Palizvan MR, Javan M, Mirnajafi-Zadeh J. Comparison between standard protocol and a novel window protocol for induction of pentylenetetrazol kindled seizures in the rat. *Epilepsy research*. 2013;106(1-2):54-63. Epub 2013/04/27.
214. Marquezan BP, Funck VR, Oliveira CV, Pereira LM, Araujo SM, Zarzecki MS, et al. Pentylenetetrazol-induced seizures are associated with Na(+),K(+)-ATPase activity decrease and alpha subunit phosphorylation state in the mice cerebral cortex. *Epilepsy research*. 2013;105(3):396-400. Epub 2013/04/23.
215. Ramanjaneyulu R, Ticku MK. Interactions of pentamethylenetetrazole and tetrazole analogues with the picrotoxinin site of the benzodiazepine-GABA receptor-ionophore complex. *European journal of pharmacology*. 1984;98(3-4):337-45. Epub 1984/03/02.
216. Psarropoulou C, Matsokis N, Angelatou F, Kostopoulos G. Pentylenetetrazol-induced seizures decrease gamma-aminobutyric acid-mediated recurrent inhibition and enhance adenosine-mediated depression. *Epilepsia*. 1994;35(1):12-9. Epub 1994/01/01.
217. Rocha L, Ackermann RF, Engel J, Jr. Chronic and single administration of pentylenetetrazol modifies benzodiazepine receptor-binding: an autoradiographic study. *Epilepsy research*. 1996;24(2):65-72. Epub 1996/06/01.

218. Loscher W, Honack D, Fassbender CP, Nolting B. The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs. III. Pentylenetetrazole seizure models. *Epilepsy research*. 1991;8(3):171-89. Epub 1991/04/01.
219. Annegers JF, Hauser WA, Coan SP, Rocca WA. A population-based study of seizures after traumatic brain injuries. *The New England journal of medicine*. 1998;338(1):20-4. Epub 1998/01/01.
220. Asikainen I, Kaste M, Sarna S. Early and late posttraumatic seizures in traumatic brain injury rehabilitation patients: brain injury factors causing late seizures and influence of seizures on long-term outcome. *Epilepsia*. 1999;40(5):584-9. Epub 1999/07/01.
221. Lowenstein DH. Epilepsy after head injury: an overview. *Epilepsia*. 2009;50 Suppl 2:4-9. Epub 2009/02/24.
222. Piek J, Chesnut RM, Marshall LF, van Berkum-Clark M, Klauber MR, Blunt BA, et al. Extracranial complications of severe head injury. *Journal of neurosurgery*. 1992;77(6):901-7. Epub 1992/12/01.
223. Bratton SL, Chestnut RM, Ghajar J, McConnell Hammond FF, Harris OA, Hartl R, et al. Guidelines for the management of severe traumatic brain injury. XIII. Antiseizure prophylaxis. *Journal of neurotrauma*. 2007;24 Suppl 1:S83-6. Epub 2007/05/22.
224. Hunt RF, Scheff SW, Smith BN. Posttraumatic epilepsy after controlled cortical impact injury in mice. *Experimental neurology*. 2009;215(2):243-52. Epub 2008/11/18.
225. Bolkvadze T, Pitkanen A. Development of post-traumatic epilepsy after controlled cortical impact and lateral fluid-percussion-induced brain injury in the mouse. *Journal of neurotrauma*. 2012;29(5):789-812. Epub 2011/10/26.

226. Kharatishvili I, Nissinen JP, McIntosh TK, Pitkanen A. A model of posttraumatic epilepsy induced by lateral fluid-percussion brain injury in rats. *Neuroscience*. 2006;140(2):685-97. Epub 2006/05/03.
227. Silva LF, Hoffmann MS, Gerbatin Rda R, Fiorin Fda S, Dobrachinski F, Mota BC, et al. Treadmill exercise protects against pentylenetetrazol-induced seizures and oxidative stress after traumatic brain injury. *Journal of neurotrauma*. 2013;30(14):1278-87. Epub 2013/03/28.
228. Dewey CW. Emergency management of the head trauma patient. *Principles and practice. The Veterinary clinics of North America Small animal practice*. 2000;30(1):207-25, vii-viii. Epub 2000/02/19.
229. FriedenberG SG, Butler AL, Wei L, Moore SA, Cooper ES. Seizures following head trauma in dogs: 259 cases (1999-2009). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2012;241(11):1479-83. Epub 2012/11/28.
230. Lothman EW, Bertram EH, 3rd, Stringer JL. Functional anatomy of hippocampal seizures. *Progress in neurobiology*. 1991;37(1):1-82. Epub 1991/01/01.
231. Golarai G, Greenwood AC, Feeney DM, Connor JA. Physiological and structural evidence for hippocampal involvement in persistent seizure susceptibility after traumatic brain injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2001;21(21):8523-37. Epub 2001/10/19.
232. Hunt RF, Boychuk JA, Smith BN. Neural circuit mechanisms of post-traumatic epilepsy. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2013;7:89. Epub 2013/06/21.
233. Sutula TP, Dudek FE. Unmasking recurrent excitation generated by mossy fiber sprouting in the epileptic dentate gyrus: an emergent property of a complex system. *Progress in brain research*. 2007;163:541-63. Epub 2007/09/04.

234. Loscher W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure: the journal of the British Epilepsy Association*. 2011;20(5):359-68. Epub 2011/02/05.
235. Fariello RG, Hornykiewicz O. Substantia nigra and pentylenetetrazol threshold in rats: correlation with striatal dopamine metabolism. *Experimental neurology*. 1979;65(1):202-8. Epub 1979/07/01.
236. Zhang H, Rosenberg HC, Tietz EI. Anticonvulsant actions and interaction of GABA agonists and a benzodiazepine in pars reticulata of substantia nigra. *Epilepsy research*. 1991;8(1):11-20. Epub 1991/01/01.
237. Hauser WA. Seizure disorders: the changes with age. *Epilepsia*. 1992;33 Suppl 4:S6-14. Epub 1992/01/01.
238. DeLorenzo RJ, Hauser WA, Towne AR, Boggs JG, Pellock JM, Penberthy L, et al. A prospective, population-based epidemiologic study of status epilepticus in Richmond, Virginia. *Neurology*. 1996;46(4):1029-35. Epub 1996/04/01.
239. Wallace H, Shorvon S, Tallis R. Age-specific incidence and prevalence rates of treated epilepsy in an unselected population of 2,052,922 and age-specific fertility rates of women with epilepsy. *Lancet*. 1998;352(9145):1970-3. Epub 1999/01/01.
240. Tallis R, Hall G, Craig I, Dean A. How common are epileptic seizures in old age? *Age and ageing*. 1991;20(6):442-8. Epub 1991/11/01.
241. McCord MC, Lorenzana A, Bloom CS, Chancer ZO, Schauwecker PE. Effect of age on kainate-induced seizure severity and cell death. *Neuroscience*. 2008;154(3):1143-53. Epub 2008/05/16.

242. Mishra A, Goel RK. Age dependent learning and memory deficit in Pentylenetetrazol kindled mice. *European journal of pharmacology*. 2012;674(2-3):315-20. Epub 2011/11/29.
243. Grecksch G, Becker A, Rauca C. Effect of age on pentylenetetrazol-kindling and kindling-induced impairments of learning performance. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 1997;56(4):595-601. Epub 1997/04/01.
244. deToledo-Morrell L, Geinisman Y, Morrell F. Age-dependent alterations in hippocampal synaptic plasticity: relation to memory disorders. *Neurobiology of aging*. 1988;9(5-6):581-90. Epub 1988/09/01.
245. de Toledo-Morrell L, Morrell F, Fleming S. Age-dependent deficits in spatial memory are related to impaired hippocampal kindling. *Behavioral neuroscience*. 1984;98(5):902-7. Epub 1984/10/01.
246. Fanelli RJ, McNamara JO. Effects of age on kindling and kindled seizure-induced increase of benzodiazepine receptor binding. *Brain research*. 1986;362(1):17-22. Epub 1986/01/01.
247. Deitch AD, Moses MJ. The Nissl substance of living and fixed spinal ganglion cells. II. An ultraviolet absorption study. *The Journal of biophysical and biochemical cytology*. 1957;3(3):449-56. Epub 1957/05/25.
248. Jongen-Relo AL, Feldon J. Specific neuronal protein: a new tool for histological evaluation of excitotoxic lesions. *Physiology & behavior*. 2002;76(4-5):449-56. Epub 2002/07/20.
249. Talley Watts L, Long JA, Chemello J, Van Koughnet S, Fernandez A, Huang S, et al. Methylene blue is neuroprotective against mild traumatic brain injury. *Journal of neurotrauma*. 2014;31(11):1063-71. Epub 2014/02/01.

250. MacKenzie JD, Siddiqi F, Babb JS, Bagley LJ, Mannon LJ, Sinson GP, et al. Brain atrophy in mild or moderate traumatic brain injury: a longitudinal quantitative analysis. *AJNR American journal of neuroradiology*. 2002;23(9):1509-15. Epub 2002/10/10.
251. Ding K, Marquez de la Plata C, Wang JY, Mumphrey M, Moore C, Harper C, et al. Cerebral atrophy after traumatic white matter injury: correlation with acute neuroimaging and outcome. *Journal of neurotrauma*. 2008;25(12):1433-40. Epub 2008/12/17.
252. Ross DE, Ochs AL, Seabaugh JM, Demark MF, Shrader CR, Marwitz JH, et al. Progressive brain atrophy in patients with chronic neuropsychiatric symptoms after mild traumatic brain injury: a preliminary study. *Brain injury : [BI]*. 2012;26(12):1500-9. Epub 2012/06/23.
253. Takao H, Hayashi N, Ohtomo K. A longitudinal study of brain volume changes in normal aging. *European journal of radiology*. 2012;81(10):2801-4. Epub 2011/11/23.
254. Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in neurosciences*. 1996;19(8):312-8. Epub 1996/08/01.
255. Nakajima K, Kohsaka S. Microglia: activation and their significance in the central nervous system. *Journal of biochemistry*. 2001;130(2):169-75. Epub 2001/08/02.
256. Loane DJ, Byrnes KR. Role of microglia in neurotrauma. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. 2010;7(4):366-77. Epub 2010/10/01.
257. Helmy A, Antoniadou CA, Guilfoyle MR, Carpenter KL, Hutchinson PJ. Principal component analysis of the cytokine and chemokine response to human traumatic brain injury. *PloS one*. 2012;7(6):e39677. Epub 2012/06/30.

258. Popovich PG, Longbrake EE. Can the immune system be harnessed to repair the CNS? *Nature reviews Neuroscience*. 2008;9(6):481-93. Epub 2008/05/21.
259. Welberg L. Synaptic plasticity: a synaptic role for microglia. *Nature reviews Neuroscience*. 2014;15(2):69. Epub 2014/01/18.
260. Morris GP, Clark IA, Zinn R, Vissel B. Microglia: a new frontier for synaptic plasticity, learning and memory, and neurodegenerative disease research. *Neurobiology of learning and memory*. 2013;105:40-53. Epub 2013/07/16.
261. Hayashi Y, Nakanishi H. [Synaptic plasticity and synaptic reorganization regulated by microglia]. *Nihon shinkei seishin yakurigaku zasshi = Japanese journal of psychopharmacology*. 2013;33(5-6):211-6. Epub 2014/07/30.
262. Ji K, Miyauchi J, Tsirka SE. Microglia: an active player in the regulation of synaptic activity. *Neural plasticity*. 2013;2013:627325. Epub 2013/12/05.
263. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nature reviews Immunology*. 2003;3(1):23-35. Epub 2003/01/04.
264. Chen MK, Guilarte TR. Translocator protein 18 kDa (TSPO): molecular sensor of brain injury and repair. *Pharmacology & therapeutics*. 2008;118(1):1-17. Epub 2008/04/01.
265. Graeber MB. Changing face of microglia. *Science*. 2010;330(6005):783-8. Epub 2010/11/06.
266. Ziebell JM, Taylor SE, Cao T, Harrison JL, Lifshitz J. Rod microglia: elongation, alignment, and coupling to form trains across the somatosensory cortex after experimental diffuse brain injury. *Journal of neuroinflammation*. 2012;9:247. Epub 2012/11/01.

267. Cao T, Thomas TC, Ziebell JM, Pauly JR, Lifshitz J. Morphological and genetic activation of microglia after diffuse traumatic brain injury in the rat. *Neuroscience*. 2012;225:65-75. Epub 2012/09/11.
268. Glushakova OY, Johnson D, Hayes RL. Delayed increases in microvascular pathology after experimental traumatic brain injury are associated with prolonged inflammation, blood-brain barrier disruption, and progressive white matter damage. *Journal of neurotrauma*. 2014;31(13):1180-93. Epub 2014/02/26.
269. Cunningham C. Microglia and neurodegeneration: the role of systemic inflammation. *Glia*. 2013;61(1):71-90. Epub 2012/06/08.
270. Perry VH, Teeling J. Microglia and macrophages of the central nervous system: the contribution of microglia priming and systemic inflammation to chronic neurodegeneration. *Seminars in immunopathology*. 2013;35(5):601-12. Epub 2013/06/05.
271. Probst C, Mirzayan MJ, Mommsen P, Zeckey C, Tegeder T, Geerken L, et al. Systemic inflammatory effects of traumatic brain injury, femur fracture, and shock: an experimental murine polytrauma model. *Mediators of inflammation*. 2012;2012:136020. Epub 2012/04/25.
272. Morganti-Kossmann MC, Rancan M, Otto VI, Stahel PF, Kossmann T. Role of cerebral inflammation after traumatic brain injury: a revisited concept. *Shock*. 2001;16(3):165-77. Epub 2001/09/04.
273. Lu KT, Wang YW, Yang JT, Yang YL, Chen HI. Effect of interleukin-1 on traumatic brain injury-induced damage to hippocampal neurons. *Journal of neurotrauma*. 2005;22(8):885-95. Epub 2005/08/09.
274. Waters RJ, Murray GD, Teasdale GM, Stewart J, Day I, Lee RJ, et al. Cytokine gene polymorphisms and outcome after traumatic brain injury. *Journal of neurotrauma*. 2013;30(20):1710-6. Epub 2013/06/19.

275. Potapov AA, Iusupova MM, Tenedieva VD, Nikitin AG, Nosikov VV. [Clinical and prognostic value of inflammatory genetic markers in traumatic brain injury]. *Zhurnal voprosy neirokhirurgii imeni N N Burdenko*. 2012;76(3):90-5. Epub 2012/08/04.
276. Diamond ML, Ritter AC, Failla MD, Boles JA, Conley YP, Kochanek PM, et al. IL-1beta associations with posttraumatic epilepsy development: A genetics and biomarker cohort study. *Epilepsia*. 2014;55(7):1109-19. Epub 2014/04/24.
277. Hattermann K, Sebens S, Helm O, Schmitt AD, Mentlein R, Mehdorn HM, et al. Chemokine expression profile of freshly isolated human glioblastoma-associated macrophages/microglia. *Oncology reports*. 2014;32(1):270-6. Epub 2014/05/27.
278. Frugier T, Morganti-Kossmann MC, O'Reilly D, McLean CA. In situ detection of inflammatory mediators in post mortem human brain tissue after traumatic injury. *Journal of neurotrauma*. 2010;27(3):497-507. Epub 2009/12/25.
279. Juttler E, Tarabin V, Schwaninger M. Interleukin-6 (IL-6): a possible neuromodulator induced by neuronal activity. *The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*. 2002;8(3):268-75. Epub 2002/06/14.
280. Campbell IL, Erta M, Lim SL, Frausto R, May U, Rose-John S, et al. Trans-signaling is a dominant mechanism for the pathogenic actions of interleukin-6 in the brain. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 2014;34(7):2503-13. Epub 2014/02/14.
281. Kushima Y, Hama T, Hatanaka H. Interleukin-6 as a neurotrophic factor for promoting the survival of cultured catecholaminergic neurons in a chemically defined medium from fetal and postnatal rat midbrains. *Neuroscience research*. 1992;13(4):267-80. Epub 1992/05/01.

282. Lenzlinger PM, Morganti-Kossmann MC, Laurer HL, McIntosh TK. The duality of the inflammatory response to traumatic brain injury. *Molecular neurobiology*. 2001;24(1-3):169-81. Epub 2002/02/08.
283. Pekny M, Pekna M. Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. *The Journal of pathology*. 2004;204(4):428-37. Epub 2004/10/21.
284. Lyubimova NV, Toms MG, Fu RG, Bondarenko YV. Biochemical markers of brain tumours. *Klinicheskaia laboratornaia diagnostika*. 2013(10):71-2, 40-2. Epub 2014/03/20.
285. Kamphuis W, Mamber C, Moeton M, Kooijman L, Sluijs JA, Jansen AH, et al. GFAP isoforms in adult mouse brain with a focus on neurogenic astrocytes and reactive astrogliosis in mouse models of Alzheimer disease. *PloS one*. 2012;7(8):e42823. Epub 2012/08/23.
286. Pekny M, Nilsson M. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia*. 2005;50(4):427-34. Epub 2005/04/23.
287. Bos EH, Hoenders R, de Jonge P. Wind direction and mental health: a time-series analysis of weather influences in a patient with anxiety disorder. *BMJ case reports*. 2012;2012. Epub 2012/06/12.
288. Yuan YM, He C. The glial scar in spinal cord injury and repair. *Neuroscience bulletin*. 2013;29(4):421-35. Epub 2013/07/19.
289. Fawcett JW, Asher RA. The glial scar and central nervous system repair. *Brain research bulletin*. 1999;49(6):377-91. Epub 1999/09/14.
290. Schnieder TP, Dwork AJ. Searching for neuropathology: gliosis in schizophrenia. *Biological psychiatry*. 2011;69(2):134-9. Epub 2010/11/03.

291. Devinsky O, Vezzani A, Najjar S, De Lanerolle NC, Rogawski MA. Glia and epilepsy: excitability and inflammation. *Trends in neurosciences*. 2013;36(3):174-84. Epub 2013/01/10.
292. Pekny M, Wilhelmsson U, Pekna M. The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. *Neuroscience letters*. 2014;565:30-8. Epub 2014/01/11.
293. Kim WR, Kim JY, Moon Y, Kim HJ, Kim H, Sun W. Regional difference of reactive astrogliosis following traumatic brain injury revealed by hGFAP-GFP transgenic mice. *Neuroscience letters*. 2012;513(2):155-9. Epub 2012/02/22.
294. Kjeldsen L, Johnsen AH, Sengelov H, Borregaard N. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *The Journal of biological chemistry*. 1993;268(14):10425-32. Epub 1993/05/15.
295. Liu Q, Nilsen-Hamilton M. Identification of a new acute phase protein. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270(38):22565-70. Epub 1995/09/22.
296. Lee S, Park JY, Lee WH, Kim H, Park HC, Mori K, et al. Lipocalin-2 is an autocrine mediator of reactive astrocytosis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2009;29(1):234-49. Epub 2009/01/09.
297. Jang E, Lee S, Kim JH, Kim JH, Seo JW, Lee WH, et al. Secreted protein lipocalin-2 promotes microglial M1 polarization. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2013;27(3):1176-90. Epub 2012/12/05.
298. Lee S, Kim JH, Kim JH, Seo JW, Han HS, Lee WH, et al. Lipocalin-2 Is a chemokine inducer in the central nervous system: role of chemokine ligand 10 (CXCL10) in lipocalin-2-induced cell migration. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(51):43855-70. Epub 2011/10/28.

299. Bi F, Huang C, Tong J, Qiu G, Huang B, Wu Q, et al. Reactive astrocytes secrete lcn2 to promote neuron death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(10):4069-74. Epub 2013/02/23.
300. Naude PJ, Nyakas C, Eiden LE, Ait-Ali D, van der Heide R, Engelborghs S, et al. Lipocalin 2: novel component of proinflammatory signaling in Alzheimer's disease. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2012;26(7):2811-23. Epub 2012/03/24.
301. Choi J, Lee HW, Suk K. Increased plasma levels of lipocalin 2 in mild cognitive impairment. *Journal of the neurological sciences*. 2011;305(1-2):28-33. Epub 2011/04/06.
302. Nam Y, Kim JH, Seo M, Kim JH, Jin M, Jeon S, et al. Lipocalin-2 Protein Deficiency Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: THE PATHOGENIC ROLE OF LIPOCALIN-2 IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM AND PERIPHERAL LYMPHOID TISSUES. *The Journal of biological chemistry*. 2014;289(24):16773-89. Epub 2014/05/09.
303. Tong Z, Wu X, Ovcharenko D, Zhu J, Chen CS, Kehrer JP. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a survival factor. *The Biochemical journal*. 2005;391(Pt 2):441-8. Epub 2005/08/03.
304. Barreto G, Schafer A, Marhold J, Stach D, Swaminathan SK, Handa V, et al. Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation. *Nature*. 2007;445(7128):671-5. Epub 2007/02/03.
305. Niehrs C, Schafer A. Active DNA demethylation by Gadd45 and DNA repair. *Trends in cell biology*. 2012;22(4):220-7. Epub 2012/02/22.

306. Nedivi E, Hevroni D, Naot D, Israeli D, Citri Y. Numerous candidate plasticity-related genes revealed by differential cDNA cloning. *Nature*. 1993;363(6431):718-22. Epub 1993/06/24.
307. Leach PT, Poplawski SG, Kenney JW, Hoffman B, Liebermann DA, Abel T, et al. Gadd45b knockout mice exhibit selective deficits in hippocampus-dependent long-term memory. *Learn Mem*. 2012;19(8):319-24. Epub 2012/07/18.
308. Gu YL, Zhang LW, Ma N, Ye LL, Wang de X, Gao X. Cognitive improvement of mice induced by exercise prior to traumatic brain injury is associated with cytochrome c oxidase. *Neuroscience letters*. 2014;570:86-91. Epub 2014/04/22.
309. Schirmer L, Merkler D, Konig FB, Bruck W, Stadelmann C. Neuroaxonal regeneration is more pronounced in early multiple sclerosis than in traumatic brain injury lesions. *Brain Pathol*. 2013;23(1):2-12. Epub 2012/05/23.
310. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*. 1992;69(1):11-25. Epub 1992/04/03.
311. Juliano RL. Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2002;42:283-323. Epub 2002/01/25.
312. Thor G, Probstmeier R, Schachner M. Characterization of the cell adhesion molecules L1, N-CAM and J1 in the mouse intestine. *The EMBO journal*. 1987;6(9):2581-6. Epub 1987/09/01.
313. Coman I, Barbin G, Charles P, Zalc B, Lubetzki C. Axonal signals in central nervous system myelination, demyelination and remyelination. *Journal of the neurological sciences*. 2005;233(1-2):67-71. Epub 2005/05/17.

314. Kiryushko D, Berezin V, Bock E. Regulators of neurite outgrowth: role of cell adhesion molecules. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2004;1014:140-54. Epub 2004/05/22.
315. Venero C, Tilling T, Hermans-Borgmeyer I, Herrero AI, Schachner M, Sandi C. Water maze learning and forebrain mRNA expression of the neural cell adhesion molecule L1. *Journal of neuroscience research*. 2004;75(2):172-81. Epub 2004/01/06.
316. Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nature immunology*. 2001;2(10):907-16. Epub 2001/09/29.
317. Geissmann F, Gordon S, Hume DA, Mowat AM, Randolph GJ. Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity. *Nature reviews Immunology*. 2010;10(6):453-60. Epub 2010/05/15.
318. Colton CA. Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*. 2009;4(4):399-418. Epub 2009/08/06.
319. Jonas RA, Yuan TF, Liang YX, Jonas JB, Tay DK, Ellis-Behnke RG. The spider effect: morphological and orienting classification of microglia in response to stimuli in vivo. *PloS one*. 2012;7(2):e30763. Epub 2012/03/01.
320. Yamada J, Jinno S. Novel objective classification of reactive microglia following hypoglossal axotomy using hierarchical cluster analysis. *The Journal of comparative neurology*. 2013;521(5):1184-201. Epub 2012/09/19.
321. Walker FR, Beynon SB, Jones KA, Zhao Z, Kongsui R, Cairns M, et al. Dynamic structural remodelling of microglia in health and disease: a review of the models, the signals and the mechanisms. *Brain, behavior, and immunity*. 2014;37:1-14. Epub 2014/01/15.

322. Smallwood HS, Lopez-Ferrer D, Squier TC. Aging enhances the production of reactive oxygen species and bactericidal activity in peritoneal macrophages by upregulating classical activation pathways. *Biochemistry*. 2011;50(45):9911-22. Epub 2011/10/11.
323. King C, Robinson T, Dixon CE, Rao GR, Larnard D, Nemoto CE. Brain temperature profiles during epidural cooling with the ChillerPad in a monkey model of traumatic brain injury. *Journal of neurotrauma*. 2010;27(10):1895-903. Epub 2010/08/06.
324. Lighthall JW. Controlled cortical impact: a new experimental brain injury model. *Journal of neurotrauma*. 1988;5(1):1-15. Epub 1988/01/01.
325. Dixon CE, Clifton GL, Lighthall JW, Yaghmai AA, Hayes RL. A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat. *Journal of neuroscience methods*. 1991;39(3):253-62. Epub 1991/10/01.
326. Manley GT, Rosenthal G, Lam M, Morabito D, Yan D, Derugin N, et al. Controlled cortical impact in swine: pathophysiology and biomechanics. *Journal of neurotrauma*. 2006;23(2):128-39. Epub 2006/03/01.
327. Campos-Pires R, Armstrong SP, Sebastiani A, Luh C, Gruss M, Radyushkin K, et al. Xenon Improves Neurologic Outcome and Reduces Secondary Injury Following Trauma in an In Vivo Model of Traumatic Brain Injury. *Critical care medicine*. 2014. Epub 2014/09/05.
328. Sebastiani A, Granold M, Ditter A, Sebastiani P, Gözl C, Pöttker B, et al. Delayed GABAA receptor activation by propofol increases brain damage and limits long-term neurofunctional recovery via p75NTR and induces calpain dependent cell death after acute brain injury in adult mice. *Uni.-Med. Mainz, unv. Manuskript*.

X. DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich meinem Betreuer an der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Herrn Professor Dr. Michael K. E. Schäfer, für die freundliche Überlassung des hochinteressanten Themas sowie die Bereitstellung des Arbeitsplatzes danken. Während jeder Phase dieser Arbeit wurde ich von ihm intensiv, hilfreich, professionell und freundlich unterstützt. Besonders bedanken will ich mich auch für die wissenschaftliche Freiheit, die er mir während der Umsetzung des Forschungsprojekts gewährte.

Großer Dank gilt auch meiner Doktormutter an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, Frau Professorin Dr. Heidrun Potschka. Über ihre Verantwortlichkeit für die Dissertation hinaus waren ihre sachkundigen Ratschläge bei der Versuchsplanung und die zeitnahe Beantwortung meiner Fragen maßgeblich für das Gelingen der Arbeit. Die Bereitschaft, ihr Wissen zum Krampfleiden mit mir zu teilen, hat diesen Aspekt der Untersuchung erst ermöglicht.

Große Teile der Untersuchung basieren auf jahrelanger Erfahrung in der tierexperimentellen Erforschung des Schädel-Hirn-Traumas an der Klinik für Anästhesiologie der Universitätsmedizin Mainz, dessen Leiter Professor Dr. Christian Werner und Professorin Dr. Kristin Engelhard mir die Möglichkeit gaben, an Ihrer Einrichtung zu forschen, wofür ich ihnen zu großem Dank verpflichtet bin.

Für die fundierte und sachkundige Einführung, Versuchsplanung und Umsetzung der verhaltensbiologischen Methoden möchte ich mich herzlich bei Dr. Konstantin Radyushkin von der Mouse Behavior Unit des Forschungszentrums Translationale Neurowissenschaften (FTN) bedanken. Sein verhaltensbiologischer Erfahrungsschatz sowie sein tatkräftiges und warmherziges Engagement waren unverzichtbar für die Umsetzung dieses Forschungsprojekts. Auch die Hilfe von Guilherme Horta war mir bei der Umsetzung der verhaltensbiologischen Messungen hilfreich und hat diesen Teil der Arbeit interessanter gestaltet.

Weiterhin danke ich Herrn Privatdozent Dr. med. vet. Sven Reese für die Beratung bei den statistischen Analysen und Björn Dittrich für die Hilfe bei der Umschlaggestaltung.

Nicht zuletzt gilt mein spezieller Dank allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Neuroprotektion der Klinik für Anästhesiologie der Universitätsmedizin Mainz. Hervorheben möchte ich Larissa Dangel, Christina Gölz, Tobias Hirnet, Dr. med. Tobias Krämer, Frida Kornes, Lutz Mentzel, Dana Peter und Dr. med. Anne Sebastiani. Ihre tatkräftige Hilfe hat meine Forschung inhaltlich unterstützt und ein angenehmes Arbeitsumfeld geschaffen.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, Professor Dr. phil. Horst Pöttker und Dominique Prodel. Sie gaben mir ein zuverlässiges und warmherziges Zuhause. Ohne ihre großzügige Förderung und ihren liebevoller Rückhalt wäre mir weder das Studium der Tiermedizin noch die Promotion möglich gewesen.

Ich danke auch meinem Bruder Dr. jur. Erik Pöttker, dessen Freundschaft mir schon immer ein wertvoller Halt war. Allen meinen Freunden danke ich für willkommene Ablenkungen vom Forschungsalltag, die auch dazu beigetragen haben, dass ich meine Doktorandenzeit in allerbesten Erinnerung behalten werde.