

Aus der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie  
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Ernestus

Therapeutisches Potential der IL-1 $\beta$ -Neutralisierung nach Schädel-Hirn-Trauma -

Eine präklinische randomisierte Kontrollstudie

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Elisa Stollburges

aus Warburg

Würzburg, April 2023

Referentin: Univ. -Prof. i.R. Dr. Anna-Leena Sirén

Korreferentin: PD. Dr. med Camelia-Maria Monoranu

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Mathias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 05.02.2024

Die Promovierende ist Ärztin

Meinen Eltern

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Schädelhirntrauma .....	1
1.1.1	Definition:.....	1
1.1.2	Epidemiologie:.....	1
1.1.3	Klinischer Verlauf .....	2
1.1.4	Outcome.....	3
1.1.5	Pathophysiologie .....	3
1.2	Interleukin 1 Beta.....	7
1.3	Induktion eines experimentellen Schädelhirntraumas .....	9
1.4	Hypothese .....	10
2	Material .....	12
2.1	Materialliste .....	12
2.1.1	Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	12
2.1.2	Verwendete Substanzen.....	13
2.2	Versuchstiere.....	14
3	Methoden.....	14
3.1.1	Studienaufbau .....	14
3.1.2	Versuchsgruppen .....	15
3.1.3	Zeitliche Abfolge.....	16
3.1.4	Haltungsbedingungen .....	16
3.2	Induktion eines experimentellen Schädelhirntraumas .....	17
3.2.1	Weight Drop Modell.....	17
3.2.2	Narkose.....	17
3.2.3	Operation .....	18
3.2.4	Drop-Outs .....	18
3.2.5	Sham .....	18
3.2.6	Postoperative Beobachtungsphase.....	19
3.2.7	Tötung und Präparation .....	19
3.3	Verhaltensbiologische Untersuchungen.....	20
3.3.1	Neurological Severity Score.....	20
3.3.2	<i>Open Field</i> Experiment .....	21
3.3.3	<i>Object Recognition</i> Test .....	22

3.4	Immunhistologische Färbung.....	23
3.4.1	Immun histochemie .....	23
3.4.2	GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein).....	24
3.4.3	Entwässern der Gehirne.....	24
3.4.4	Erstellen der Paraffinblöcke .....	24
3.4.5	Paraffinblöcke schneiden.....	25
3.4.6	H.E. Färbung.....	25
3.4.7	Immun histochemische Fluoreszenz-Färbung.....	26
3.4.8	Fotografieren der Präparate .....	27
3.4.9	Zählen der Zellen.....	27
3.4.10	Verblindung.....	27
3.5	Statistische Datenauswertung .....	28
4	Ergebnisse .....	29
4.1	Änderung des Körpergewichts.....	30
4.2	Neurological Severity Score (NSS) .....	31
4.2.1	Verlauf des NSS nach Behandlung mit dem Kontrollantikörper .....	32
4.2.2	Verlauf des NSS nach Behandlung mit Anti- IL- 1 beta Antikörper .....	33
4.3	<i>Open Field</i> Versuch.....	36
4.3.1	TBI vs. Sham .....	36
4.3.2	Verhalten im <i>Open Field</i> Test nach Behandlung mit dem Anti-Interleukin-1-beta-Antikörper.....	38
4.4	<i>Object Recognition</i> Test.....	42
4.4.1	SHT vs. Sham .....	42
4.4.2	Verhalten im <i>Object Recognition</i> Test nach Behandlung mit dem Anti-Interleukin-1-beta-Antikörper.....	44
4.5	Auszählung der Astrozyten im Hirngewebe .....	46
4.5.1	Sham vs. SHT .....	49
4.5.2	Einfluss von Behandlung mit Anti-IL-1beta Antikörper.....	50
5	Diskussion.....	51
5.1	Körpergewichtskontrolle.....	51
5.2	Neurological Severity Score .....	51
5.3	<i>Open field</i> Versuch.....	54
5.4	<i>Object Recognition</i> Test.....	55
5.5	Astrozytenfärbung.....	55

6	Zusammenfassung und Ausblick .....	57
7	Literaturverzeichnis.....	58
8	Abkürzungsverzeichnis	
9	Abbildungsverzeichnis	
10	Tabellenverzeichnis	
11	Lebenslauf	

# 1 Einleitung

## 1.1 Schädelhirntrauma

### 1.1.1 Definition:

„Ein Schädelhirntrauma ist Folge einer Gewalteinwirkung, die zu einer Funktionsstörung und/oder Verletzung des Gehirns geführt hat und mit einer Prellung oder Verletzung der Kopfschwarte, des knöchernen Schädels, der Gefäße und/oder der Dura verbunden sein kann. Eine Verletzung des Kopfes ohne Hirnfunktionsstörung oder Verletzung des Gehirns bezeichnet man als Schädelprellung.“ (R. Firsching & K. Engelhard, 2015)

### 1.1.2 Epidemiologie:

Ein Schädelhirntrauma entsteht durch große, äußere Krafteinwirkung gegen den Kopf und führt zu Verletzungen des Schädels und des Gehirns. Häufigste Auslöser des Schädelhirntraumas sind Verkehrs- oder Sportunfälle. Bei jungen Erwachsenen unter 45 Jahren stellt das Schädelhirntrauma eine der häufigsten Todesursachen dar und ist oftmals ein Grund für körperliche und geistige Behinderungen unter jungen Menschen. Als Folgen von Schädelhirntraumen werden häufig Veränderungen in der Persönlichkeit der Betroffenen, neurologische Defizite, sowie persistierende kognitive Beeinträchtigungen beobachtet (Ekmark-Lewén et al., 2016). Es konnte gezeigt werden, dass durch ein Schädelhirntrauma insbesondere die Gedächtnisfunktion gestört wird (Muradashvili et al., 2017), sowie das Lernen und die Aufmerksamkeit beeinträchtigt sind (Walker & Tesco, 2013). Die Patienten erfahren infolgedessen eine große Einschränkung in ihrer Lebensqualität. Über ein Drittel der Patienten mit einem milden SHT (GCS 13-15) klagen auch nach 12 Monaten über noch weiterhin bestehende Beeinträchtigungen durch die Folgen des Schädelhirntraumas (Schwenkreis et al., 2021).

Eine im Jahr 2001 durchgeführte Studie zur Epidemiologie in Deutschland konnte zeigen, dass die Inzidenz von Schädelhirntraumata bei 332 pro 100000 Einwohnern pro Jahr liegt. Dabei sind beide Geschlechter betroffen. 58% der erfassten Fälle waren männlich; 42% weiblich und 30% Kinder im Alter unter 16 Jahren. Nach der klinischen

Einteilung des GCS, hatten 90% der Patienten ein leichtes, 4% ein moderates und 5% ein schweres Schädelhirntrauma. Die Letalität betrug 1% (Rickels et al., 2010). Eine neuere Studie konnte zwei Häufigkeitsgipfel für ein Schädelhirntrauma belegen. In der Gruppe der 20–50-jährigen Patienten sind Männer häufiger betroffen als Frauen. Die häufigsten Ursachen sind ein erlittenes Trauma durch äußere Krafteinwirkung, Auto- und Fahrradunfälle. Bei Patienten, die älter als 75 Jahre sind, sind Stürze der häufigste Grund für das SHT. In dieser Gruppe sind beide Geschlechter gleich häufig betroffen (Schwenkreis et al., 2021).

Damit ist das Schädelhirntrauma auch ein großes ökonomisches Problem für das Gesundheitssystem mit weitreichenden Folgen für die Gesellschaft.

### 1.1.3 Klinischer Verlauf

In der Klinik werden Schädelhirntraumen in geschlossene und offene Schädelverletzungen unterteilt. Bei der offenen Form sind sowohl die Kopfhaut, der Schädelknochen als auch die Dura mater verletzt, sodass eine Verbindung des intrakraniellen Raums mit der Außenwelt besteht. Bei geschlossenen Schädelhirntraumen bleibt die Dura unverletzt.

Klinisch kann sich ein Schädelhirntrauma in Abhängigkeit vom Schweregrad durch Kopfschmerzen, Übelkeit und Schwindel äußern. Wenn das Nervensystem geschädigt wurde, kann der Patient Symptome wie Amnesie, Wachheitsstörungen bis hin zum Koma, Lähmungen und Krampfanfälle aufweisen (R. Firsching & K. Engelhard, 2015).

Die Einteilung des Schweregrads des Schädelhirntraumas, sowie die Erfassung der damit verbundenen Hirnfunktionsstörungen erfolgt mithilfe des Glasgow Coma Scales. Er umfasst die Prüfung von drei verschiedenen Kriterien. Es wird geschaut, ob der Patient in der Lage ist, die Augen zu öffnen. Zudem wird die beste verbale, sowie die beste motorische Reaktion des Patienten begutachtet. An jede dieser Kategorien werden Punkte verteilt, die am Ende addiert werden und so eine Einschätzung über die Schwere des Traumas geben können (Teasdale & Jennett, 1974). Erreicht ein Patient eine Punktzahl von 15-13 Punkten, spricht man von einem milden, bei 12-9 Punkten von einem mittelschweren und bei 8-3 Punkten von einem schweren Schädelhirntrauma (Schimmel et al., 2017). Zur weiteren Beurteilung des Schädelhirntraumas können

ergänzend bildgebende Verfahren, z.B. computertomographische Untersuchungen genutzt werden.

#### 1.1.4 Outcome

Studien zeigen, dass die Mortalitätsrate bei schwerem Schädelhirntrauma bei 30,6%, bei mittlerem bei 13% liegt, 70% dieser Patienten versterben bereits in den ersten 14 Tagen (McCrea et al., 2021). Jedoch behalten viele Patienten, wenn sie die akute Phase überstanden haben, noch Spätfolgen des Traumas zurück. Diese können sowohl motorische als auch kognitive Defizite, Gedächtnisprobleme und Veränderungen in der Persönlichkeit des Patienten umfassen. Auch beschreiben die Patienten psychische Probleme, so leiden 30 % an einer Depression (Jorge et al., 2004). Auch Angststörungen können in der Folge auftreten. Viele der Patienten benötigen dauerhafte Unterstützung bei der Bewältigung ihres Alltags, nur 20% der Patienten mit verlängerter Erholungsphase gelingt die Wiederaufnahme ihrer Arbeit oder der Schulbesuch (Whyte et al., 2013). Ein Jahr nach schwerem SHT schaffen es 50% der Patienten 8h selbständig zuhause zurechtzukommen (McCrea et al., 2021). Des Weiteren ist das Risiko für neurodegenerative Erkrankungen, z.B. Demenz und Parkinson stark erhöht (Ozen et al., 2020).

#### 1.1.5 Pathophysiologie

Die Verletzungen, die beim Schädelhirntrauma entstehen, lassen sich in zwei Phasen unterteilen.

Die direkte Gewalteinwirkung des SHT führt zu einer Kompression und Schädigung des Hirngewebes. Insbesondere Neurone, Axone, Gliazellen und Blutgefäße sind davon betroffen (Schimmel et al., 2017) (Muradashvili et al., 2017). Durch Nekrose der betroffenen Zellen können diese auch irreversibel zerstört und somit nicht mehr durch eine Therapie beeinflusst werden (Werner & Engelhard, 2007). Dies wird als die Primärläsion bezeichnet und beschreibt die Hirnschädigung als direkte Folge durch das Trauma selbst.

In der Phase nach dem direkten Trauma kommt es zu einem zweiten Stadium der Zellschädigung (die Sekundärläsion), welche erst mit Verzögerung auftritt (Werner & Engelhard, 2007). Der nun entstehende Schaden entwickelt sich nach Minuten bis über

Monate hinweg (Xiong et al., 2013) und kann über Jahre andauern. Auch sind die Schädigungen der Sekundärläsion nicht auf das ursprüngliche Traumagebiet begrenzt, sondern können sich über das ganze Gehirn ausbreiten (Schimmel et al., 2017).

Die bei der Primärläsion entstandenen Schäden bewirken eine biochemische Kaskade, wodurch es nun zur Sekundärläsion kommt. Diese ist somit bedingt durch die pathologischen Prozesse in dem Gewebe selbst. Die wichtigsten Mechanismen der Sekundärläsion sind Exzitotoxizität, Oxidativer Stress, mitochondriale Dysfunktion, sowie Neuroinflammation (Schimmel et al., 2017).

Es kommt zu einem Zusammenbruch der Bluthirnschranke, welche durch die Interaktion von Endothelzellen und Astrozyten gekennzeichnet ist. Das wiederum führt durch einen unkontrollierten Übertritt von Plasmaproteinen zu einem Hirnödem. Auch gelangen periphere Immunzellen in das Hirngewebe, wodurch die Permeabilität noch mehr zunimmt.

Die geschädigten Zellen setzen vermehrt Glutamat in den Extrazellulärraum frei. Dieses aktiviert unterschiedliche Transporter, welche zu einem erhöhten Calcium- und Natriumeinstrom in die Zellen führen. Die Folgen für die betroffenen Zellen sind Nekrosen und Apoptosen (Schimmel et al., 2017). Das wird auch als Exzitotoxizität bezeichnet.

Oxidativer Stress verursacht durch vermehrte freie Radikale, z.B. reaktive Sauerstoffspezies (ROS), stört die normale Zellfunktion und führt zu Schäden der DNA der Zellen, was wiederum den Zelltod zur Folge hat (Schimmel et al., 2017).

Des Weiteren werden pro- und antiinflammatorische Mediatoren, wie zum Beispiel Chemokine und Zytokine verstärkt freigesetzt (Clausen et al., 2009). Diese rekrutieren periphere Immunzellen z.B. periphere neutrophile Granulozyten, Lymphozyten und Makrophagen und aktivieren sich im ZNS befindliche Immunzellen: Mikrogliazellen (Simon et al., 2017), welche vermehrt freie Radikale und proinflammatorische Zytokine, z.B. IL-1-beta freisetzen und so die Neuroinflammation zusätzlich verstärken. Die Neuroinflammation, deren anfänglicher Zweck die Reparatur geschädigter Zellen und der Schutz des Gewebe vor eindringenden Pathogenen war, gehört zu den

wichtigsten Verursachern von neuronalem Zelltod während der Sekundärläsion und kann bis zu 17 Jahre nach dem Trauma andauern (Schimmel et al., 2017).

Auch Astrozyten spielen bei der Sekundärläsion eine wichtige Rolle. Ihre normalen Aufgaben umfassen die Regulierung der Bluthirnschranke, sowie der Homöostase von Ionen und anderen Transmittern. Sie reagieren sehr früh nach dem Trauma und setzen gebildetes ATP, sowie auch weitere Zyto- und Chemokine frei. Aktivierte Astrozyten werden auch „reactive gliosis“ genannt. Die Läsion selbst, aber auch die ischämische Umgebung, die Exzitotoxizität und auch der Oxidative Stress beeinflussen die Ausdehnung und die Qualität der reaktiven Gliose (Pekny & Nilsson, 2005).

Das freigesetzte ATP lockt z.B. Mikrogliazellen und Neutrophile an und wirkt so durch die Rekrutierung von angeborenen Immunzellen auch indirekt neuroprotektiv. Auch formen sie Astrozytennarben, welche geschädigtes von noch gesundem Gewebe trennen und so einen Schutz für das noch gesunde bilden und die weitere Ausbreitung der Inflammation eindämmen (Burda et al., 2016). Auch die Synthese von neuro- und glioprotektiven Wachstumsfaktoren z.B. BDNF (brain derived neurotrophic factor) und NGF (nerve growth factor) unterstützt die Regenerationsprozesse (Burda et al., 2016).

Infolge der vermehrten Freisetzung von Botenstoffen kommt es zu einer vermehrten Einwanderung von peripheren Leukozyten, was auch die Entwicklung eines Hirnödems fördert. Diese intrakranielle Druckerhöhung schränkt die Durchblutung des Hirns immer weiter ein, sodass die Folgen Hypoxie und Ischämie des betroffenen Gewebes sind. Einblutungen können die Druckerhöhung zusätzlich vergrößern. Aufgrund von fehlenden Ausweichmöglichkeiten des Gehirns durch die knöchernen Begrenzung kann es zu einer weiteren Drucksteigerung kommen.

Auch ist die zelluläre Calciumhomöostase u.a. durch die gestörte mitochondriale Funktion nicht normal. Es kommt zu vermehrter Apoptose und diffuser axonaler Verletzung (DAI) (Xiong et al., 2013).

Eine weitere Komplikation der erhöhten vaskulären Permeabilität ist ein vereinfachter Übertritt von Proteinen, wie z.B. Fibrinogen aus den Gefäßen in das umgebende Gewebe. Diese Vorgänge können zur Plaquentstehung beitragen und erhöhen das

langfristige Risiko für die Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen, z.B. vaskulärer Demenz und Morbus Alzheimer (Muradashvili et al., 2017).

Strukturelle Veränderungen lassen sich auch nach Jahren noch nachweisen. So zeigen die MRT- Aufnahmen von 10/14 Patienten eine progrediente Atrophie des Gewebes im Bereich der Hippocampusregion bis zu 2,5 Jahre nach moderatem bis schweren Trauma (Ng et al., 2008). Andere Studien zeigen eine Verminderung des gesamten Volumens im ersten Jahr nach schwerem SHT um im Durchschnitt 4% im Vergleich zu gesunden Gehirnen (Sidasos et al., 2009). Andere Studien konnten keine langzeitigen Veränderungen aufzeigen.

Prozesse, die im Verlauf zu chronisch neurodegenerativen Erkrankungen führen, werden durch ein TBI verstärkt, sodass sich neben M. Alzheimer, M. Parkinson auch weitere Erkrankungen wie amyotrophische Lateralsklerose entwickeln können (Walker & Tesco, 2013).

Zudem bewirkt ein Schädelhirntrauma eine Rarefizierung der Gefäße, wodurch es zu einer eingeschränkten Durchblutung im betroffenen Areal kommt. Es konnte gezeigt werden, dass dies die Ursache einer Verkürzung und Reduktion von Gefäßverbindungen ist, wodurch es zu einer Abnahme der Durchblutung kommen kann. Obwohl sich die Blutversorgung über Tage bis Wochen regenerieren kann, bleibt häufig eine veränderte zerebrale Gefäßversorgung langfristig bestehen (Obenaus et al., 2017).

Diese zur Sekundärläsion führenden Prozesse sind das Ziel von möglichen therapeutischen Ansätzen, da diese im Gegensatz zur Primärläsion noch durch therapeutische Maßnahmen beeinflusst werden können.

Es konnte beobachtet werden, dass die initiale Schwere des erlittenen Schädelhirntraumas mit den beobachteten Beeinträchtigungen korreliert. So zeigen im Tiermodell Mäuse mit schwerem Trauma eine verstärkte Hyperaktivität im Vergleich zu Mäusen, die ein milderes Trauma erlitten haben. Auch waren die kognitive Flexibilität, sowie das räumliche Denken stärker eingeschränkt. (Lopez-Caperuchi et al., 2021)

Da der primäre Zellschaden therapeutisch kaum beeinflusst werden kann, ist das Ziel von Interventionen den sekundären Schaden so gering wie möglich zu halten, um den Zellen die Regeneration zu ermöglichen. Der Schwerpunkt der Therapie liegt dabei auf

der Vermeidung eines erhöhten intrakraniellen Drucks. Dazu stehen verschiedenste Maßnahmen zur Verfügung. So wird versucht, durch eine Oberkörperhochlagerung von 30°, Hyperventilation, der Gabe von Mannitol und hypertoner Kochsalzlösung den Druck zu senken. Eine weitere therapeutische Möglichkeit ist die Analgosedierung. Durch Propofol und Pentobarbital wird versucht, die cerebralen Stoffwechselprozesse zu verringern, um somit eine Reduktion des Sauerstoffbedarfs des Hirngewebes zu bewirken. Eine Hypotension und Hypoxie sollten vermieden werden (Abdelmalik et al., 2019). Als operative Maßnahme zur Druckentlastung z.B. bei einem epiduralem Hämatom ist die Kraniotomie eine Option (Vella et al., 2017). Bis heute existiert keine sichere und neuroprotektive Behandlung des Schädelhirntraumas. Neue Forschungsansätze beschäftigen sich unter anderem mit der Möglichkeit, Stammzellen als Therapie zu nutzen (Xiong et al., 2018) oder eine Verbesserung des Outcomes durch Blockade der posttraumatischen Entzündungsreaktion zu erzielen.

## 1.2 Interleukin 1 Beta

Interleukine beeinflussen andere Zellen in ihrer Funktion. So können sie einen stimulierenden Einfluss auf andere Zellen haben oder hemmend auf diese wirken. So führt Interleukin 1 beta zu Fieber und verstärkt die Produktion von Interleukin 6 und Prostaglandinen, welche maßgeblich an dem weiteren entzündlichen Geschehen beteiligt sind. Auch beeinflusst es die Apoptoserate und die Aufrechterhaltung der Blut-Hirnschranke (Flygt et al., 2018). Ein Anstieg des Interleukin 1 beta lässt sich bereits in der frühen Phase nach dem Schädelhirntrauma beobachten (Ekmark-Lewén et al., 2016).

Interleukine sind stark proinflammatorische Zytokine, die die Schmerzschwelle senken und den Gewebeschaden eingrenzen (Dinarello et al., 2012).

Insbesondere bei der Sekundärläsion spielt Interleukin beta eine entscheidende Rolle (Clausen et al., 2009). Der Anstieg von Interleukin 1 beta korreliert mit der Schwere des erlittenen Traumas (Ozen et al., 2020).

Interleukin 1 beta wird hauptsächlich von Makrophagen und Astrozyten hergestellt und ausgeschüttet. Beim Menschen findet sich überwiegend Interleukin 1 beta, während in der Maus das Interleukin 1 alpha überwiegt (Chemie, 2021). Jedoch ist Interleukin 1 beta in gesunden Zellen kaum nachweisbar (Dinarello et al., 2012).

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die Wirkung von Interleukin 1 beta zu blockieren. Interleukin 1 alpha und beta binden an den Typ 1 IL-1-Rezeptor ihrer Zielzellen und aktivieren so Kaskaden, die zu einer gesteigerten Synthese und Expression von proinflammatorischen Zytokinen führen. Interleukin-1-Rezeptor Antagonisten, z.B. Anakinra binden ebenfalls an diesen Rezeptor und blockieren ihn somit für IL-1-beta. Eine andere Möglichkeit ist der Einsatz von Interleukin-1- AK. So ist z.B. Canakinumab ein monoklonaler AK, der spezifisch Interleukin-1-beta bindet und es so neutralisiert. Auch können Caspase-1-Inhibitoren, wie z.B. VRT-018858, eingesetzt werden. Diese verhindern die Spaltung von pro-Interleukin-1-beta durch Caspase-1 zu aktivem Interleukin-1-beta (Brough et al., 2015) (Lambertsen et al., 2019).

In der Literatur sind ein positiver Effekt auf den funktionellen Outcome und eine Reduzierung des neurologischen Defizits durch die Blockade von Interleukin 1, insbesondere durch den Einsatz eines Rezeptorantagonisten, nach ischämischen Schlaganfällen im Tierversuch bereits beschrieben (Maysami et al., 2016) (Lambertsen et al., 2019).

Durch den Einsatz von Interleukin 1 Hemmern bei chronisch entzündlichen Erkrankungen kann eine starke Reduktion der Krankheitsaktivität und eine verbesserte Organfunktion erzielt werden. So werden sie bereits in der Therapie von rheumatoider Arthritis und Typ II Diabetes verwendet (Dinarello et al., 2012).

Aktuelle Studien belegen, dass der Einsatz von Interleukin 1 beta Antikörpern in verschiedenen Modellen des Schädelhirntraumas (SHT) zu einer Reduktion der Anzahl der aktivierten Mikrogliazellen im ipsilateralen Cortex und in der Hippocampusregion führt (Ozen et al., 2020). Durch die Therapie konnte ein vergleichbares Ergebnis wie in der Kontrollgruppe der schein-operierten Mäuse erzielt werden (Flygt et al., 2018). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass auf diese Weise die Einwanderung von Neutrophilen ins Hirngewebe vermindert wird (Clausen et al., 2009). Weiterhin fand sich ein verminderter Verlust von Hirnzellen (Clausen et al., 2009). Auch die durch ein Schädelhirntrauma entstandenen kognitiven Defizite konnten durch die Neutralisation von Interleukin 1 beta reduziert werden. Im Besonderen lässt sich eine Verbesserung der Gedächtnisfunktion, sowie eine Reduktion von nicht normalem, stereotypischem Verhalten erkennen (Ekmark-Lewén et al., 2016). Jedoch zeigte sich kaum eine

Veränderung der motorischen Funktion. In einer weiteren Studie dieser Arbeitsgruppe konnte durch die Neutralisation von Interleukin 1 beta der posttraumatische Gewebsuntergang vermindert, sowie eine Verbesserung der Lernfähigkeit erzielt werden (Clausen et al., 2011.)

### 1.3 Induktion eines experimentellen Schädelhirntraumas

Schädelhirntrauma können durch verschiedene Methoden erzeugt werden. Das *Weight Drop* Modell, das in dieser Arbeit verwendet wird, nutzt die Gravitationskraft eines fallenden Gewichts. So können sowohl fokale, als auch diffuse Hirnverletzungen erzeugt werden. Die Schwere des SHTs lässt sich über das Gewicht und dessen Fallhöhe steuern (Albert-Weissenberger & Sirén, 2010). Die Modelle nach Shohami, Feeney und Shapira verursachen in der Regel eher fokale Trauma, jedoch können auch gemischte erzeugt werden. Typische Verletzungen nach fokalem Trauma sind eine kortikale Kontusion, hämorrhagische Läsionen, sowie Störungen der Bluthirnschranke. Zudem kommt es in Abhängigkeit der Schwere des Traumas zu einer Infiltration des Gewebes durch Immunzellen und zur Aktivierung von Gliazellen (Ma et al., 2019). Auch kognitive Langzeitdefizite können imitiert werden. Bei dem Modell nach Marmarou entsteht ein diffuses Trauma. Es dient der Simulation von Verletzungen, welche durch Stürze und Autounfälle auftreten können, da es zu einer Beschleunigung des gesamten Kopfes kommt. Histologisch nachweisbar können Blutungen, Zellverluste, DAI und eine Astroglia sein (Ma et al., 2019).

Alternativ können Schädelhirntraumen auch durch das CCI (Controlled Cortical Impact Injury) Modell oder das FPI (Fluid Percussion Injury) Modell erzeugt werden; beides nach Kraniotomie. Beim CCI entsteht die Verletzung durch einen Bolzeneinschlag. Es bewirkt eine fokale, meist auf die ipsilaterale Hemisphäre beschränkte Verletzung, weshalb dieses Modell gut zur Imitation von Boxverletzungen, Kontusionen und ballistischen Verletzungen geeignet ist. Häufig wird eine Verletzung der Blutgefäße bewirkt, was eine Störung der Bluthirnschranke nach sich zieht. Als Folge entwickelt sich häufig ein Hirnödem. Weitere Verletzungen, die durch das CCI verursacht werden, umfassen ein akutes Hämatom, kortikalen Gewebsverlust und Schäden der Hirnzellen (Ma et al., 2019). Des Weiteren werden eine kortikale Kontusion, sowie eine Neurodegeneration im Schadensgebiet induziert. Vorteile dieser Methode sind die gute

Kontrollierbarkeit von Geschwindigkeit, Dauer und Tiefe des Aufpralls. Zudem besteht kein Risiko einer Rebound Verletzung, welche z.B. nach dem *Weight Drop* Modell auftreten kann (Ma et al., 2019).

Beim FPI wird das SHT durch einen Flüssigkeitsimpuls erzeugt, es entsteht ein gemischter Verletzungstyp. Je nach der Position, medial oder lateral, kommt es zu unterschiedlichem, regionalem Zellverlust. Dies führt u.a. zu kognitiven Dysfunktionen. Deshalb ist es eine anerkannte Methode zur Erforschung von posttraumatischer Demenz und Epilepsie (Albert-Weissenberger & Sirén, 2010). Die Schwere des Traumas kann über die Dauer des Flüssigkeitsimpulses reguliert werden. Typische Folgen sind Kontusionen, subdurale Hämatome, Blutungen sowie durch Dehnung des Gewebes entstandene Schäden in der grauen Substanz. Beim FPI folgt auf die Primärläsion auch eine entzündliche Sekundärläsion, bei der sich der ursprünglich fokale Schaden diffus ausbreiten kann. Es sollen ein menschliches TBI ohne Schädelbruch, sowie Erschütterungen, wie sie bei Sportverletzungen entstehen, imitiert werden (Ma et al., 2019)

#### 1.4 Hypothese

Basierend auf der Annahme, dass die frühe neuroinflammatorische Antwort des Organismus auf ein erlittenes Trauma maßgeblich das Outcome des Patienten beeinflusst, wird die Hypothese I aufgestellt, dass durch die Blockade dieses entzündlichen Geschehens die Prognose für den Betroffenen verbessert werden kann. Interleukin 1 beta ist ein wichtiger Bestandteil für die Aufrechterhaltung und Funktion des Inflammasoms. Es konnte gezeigt werden, dass Interleukin 1 beta zudem einen schädlichen Einfluss auf das Schädelhirntrauma (SHT) ausübt. Deshalb ist es das Ziel dieser Studie, zu zeigen, dass es durch die Neutralisation von Interleukin 1 beta zu einer verbesserten Langzeitfunktion und histologischem Outcome, zu einer reduzierten Mortalität sowie zu einem geringeren Gewichtsverlust in experimentellen Schädelhirntraumamodellen kommt. Des Weiteren soll untersucht werden, inwieweit sich dieser Effekt durch eine Behandlung nach einem Zeitfenster von vier Stunden nach Schädelhirntrauma - statt nach 30 Minuten (Hypothese II)- nachweisen lässt. Dies ist für eine mögliche klinische Umsetzung von Relevanz.

Durch den NSS werden sowohl die Schwere des Traumas, die Auswirkungen auf die Motorik und das Verhalten, als auch die klinische Entwicklung der Versuchstiere über den Untersuchungszeitraum hinweg untersucht. Der *Openfield* Test erfasst Veränderungen im Verhalten der Mäuse, und der *Object recognition* Test analysiert die kognitive Funktion.

Durch immunhistochemische Färbungen können der strukturelle Schaden und entzündliche Veränderungen auf zellulärer Ebene betrachtet werden.

## 2 Material

### 2.1 Materialliste

#### 2.1.1 Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät	Hersteller
Isofluran-Verdampfer	Drägerwerk AG, Deutschland
Weight- Drop Apparatur	Werkstatt Neurologische Universitätsklinik Würzburg
Waage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Apparatur zur NSS- Testung	Werkstatt Physiologisches Institut der Julius Maximiliansuniversität Würzburg
Openfield/ NOR Arena	Werkstatt Physiologisches Institut der Julius Maximiliansuniversität Würzburg
Videokamera: SD-5 WV- CP500	Panasonic, Kadoma, Japan
Insulinspritzen (zur AK- Behandlung) U100 0,5 ml, 29G, 12,7mm	BD Becton- Dickinson GmbH, Heidelberg
Dampfgarer	Multigormet Braun
Schüttelgerät	Heidolph Polymax 1040
Entwässerung	STP 120 Thermo Scientific
Paraffinblock-Herstellung	Medite
Wasserbecken	Leica Modell HI1210
Mikrotom	Leica SM 200OR
Kühlschrank	Liebherr Premium Nofrost
X-Cite 120 PC Fluorescence Illumination System	EXFO
ApoTome	Zeiss
Axiovert 200M	Zeiss

Tabelle 1: Verwendete Geräte

Software	
ZEN 2.6 Blue edition	
Microsoft Word	
Microsoft Excel	
Microsoft Powerpoint	
Spss	
EthoVision XT 10.1 Software	Noldus, Wageningen, the Netherlands

Tabelle 2: Verwendete Software

Materialien	Hersteller/ Bestellnummer
Timer	TFA Dostmann Kat.-Nr.: 382010
Pap-Pen	Science Services N71312-N
Einbettkassetten	Resolab 421714
Filterblock Einwegkassetten	TISSUE- TEK II SA-4699
SuperFrost Objektträger	R. Langenbrinck GmbH Art. Nr. 03-0060
Deckgläser	Supearior Marienfeld DIN ISO8255 Ref. 01012222 LOT: 46652006

Stoppuhr HC-7	Schütt Nr.: 10-0050
Filter Tips	BiosphereR 16515
Labor und Hygienetücher	zetBox
Einmalhandschuhe	Qube Medical Products Sdn. Bhd. Lot.Nr. 10408
Pipette tip 10µl	Sarstedt Lot: 1050621 Ref: 70.3010
Pipette tip 1000µl	Sarstedt AG LOT: 2052521
Safe-Lock Tube 0,5ml	Eppendorf AG 0030121.023
SafeSeal Tube 1,5ml	Sarstedt Ref: 72706
SafeSeal Micro Tube 2ml	Sarstedt Ref: 72.695.500 Lot: 1083821
Chirurgisches Nahtmaterial Ethilon-3.0	

Tabelle 3: Verwendete Materialien

## 2.1.2 Verwendete Substanzen

### Neutralisierende Antikörper

Anti-IL-1beta (10 mg/kg)	Novartis
--------------------------	----------

Tabelle 4: Neutralisierender Antikörper

### Primäre Antikörper

Anti-Körper	Firma	Verdünnung	Art	Darstellung
Anti-GFAP	Santa Cruz sc-33673 2E1	1:100 in Verdünnungspuffer	Anti-Mouse monoklonal	Astrozyten

Tabelle 5: Primärantikörper

### Sekundäre Antikörper

Anti-Körper	Firma	Verdünnung	Art
Alexa 488	Invitrogen A32723	1:1000 in TBS- T	Goat-anti- Mouse IgG

Tabelle 6: Sekundärantikörper

Chemikalien	Hersteller/ Bestellnummer
Glycerol	104093.100
Trisultrapure	AppliChem A1086,1000
Natriumchlorid	ROTH 0601.1
Xylol	AnalaRNORMAPUR 28975.325
Citronensäure	Sigma Aldrich 33114-500G
Ethanol 70% vergällt	Roth T913.3
Ethanol 100% vergällt	Roth K928.4
Eosin G-Lösung 1% wässrig	Roth 3137.2
Essigsäure	Chemsolute 2234.1000
Hämalaunlösung nach Mayer	Roth T865.3
Synthetisches Schnelleindeckmittel	Medite Pertex LOT 10401702; Ref.: 414011-00
Aqua dest.	Ampuwa Fresenius Kabi 1080181

Immersol 518 F Immersion oil for Fluorescence	Zeiss No:150519
---	-----------------

Puffer und Lösungen	Hersteller
10% Goat-Serum	Ready to use lifetechnologies Best-Nr. 50062Z
Verdünnungspuffer	DCS ALI Best-Nr. 20R500
Eindeckmittel und DAPI	Abcam ab Best-Nr. 104139

Tabelle 7: Verwendete Chemikalien

## 2.2 Versuchstiere

Alle Versuchstiere zu Beginn des Experiments bestanden ausschließlich aus zwölf Wochen alten, männlichen Mäuse vom Stamm C57BL/6J (Envigo, Niederlande oder Charles-River, Sulzfeld, Deutschland).

### Genehmigung des Tierversuchs

Die Genehmigung für die durchgeführten Versuche liegt unter dem Aktenzeichen AZ 55.2-2532-2-758 vor.

## 3 Methoden

### 3.1.1 Studienaufbau

Die Studie, auf der diese Promotionsarbeit aufbaut, ist als eine randomisierte, multizentrische und doppelblinde Studie angelegt (EU-ERANET- NEURON „CnsAflame“, Literatur referenz: ERA-NET NEURON European Research Projects on Neuroinflammation, Impact Report: Joint Transnational Call 2014. Eds. Salome Legoff, Kiri Couchmann, Sheyla Mejia-Gervacio, ANR Research National Agency, Paris, France). Insgesamt beteiligten sich sechs unterschiedliche Institute in verschiedenen Ländern. In Lund, Bordeaux und München wurde das Schädelhirntrauma durch *Controlled Cortical Impact* Modell induziert, welches einen fokalen Schaden verursacht, während in Jerusalem, Riga und Würzburg das *Weight Drop* Modell genutzt wurde.

Die Experimente lassen sich thematisch in zwei Abschnitte gliedern. Zuerst erfährt ein Teil der Mäuse ein operatives Schädelhirntrauma (SHT), während der andere Teil der Mäuse lediglich einer Scheinoperation zur Kontrolle („*Sham*“) unterliegt. Im Anschluss erfolgen verschiedenste Experimente, um die Folgen für die motorische Kontrolle sowie

die kognitiven Funktionen erfassen zu können. Nach Beendigung der Versuche werden die Gehirne der Versuchstiere entnommen, sodass im zweiten Teil die inflammatorischen und immunhistologischen Veränderungen auf zellulärer Ebene im ZNS untersucht werden können.

### 3.1.2 Versuchsgruppen

Insgesamt wurden 90 Versuchstiere während der Experimente untersucht. Der Versuch wurde in 3 Teilversuche unterteilt, sodass bei jedem 30 Tiere getestet wurden. Alle Mäuse wurden randomisiert und verblindet sechs Untersuchungsgruppen zugewiesen. Diese wurden wie folgt aufgeteilt:

- 1) A: SHT, 1. Behandlung nach 4h, Kontrollantikörper
- 2) B: Sham, 1. Behandlung nach 1h, Kontrollantikörper
- 3) C: SHT, 1. Behandlung nach 1h, Anti-IL-1beta- AK
- 4) D: Sham, 1. Behandlung nach 1h, Anti-IL-1beta- AK
- 5) E: SHT, 1. Behandlung nach 4h, Anti-IL-1beta- AK
- 6) F: SHT, 1. Behandlung nach 1h, Kontrollantikörper

Die Verblindung wurde bis zum Ende aller Analysen beibehalten.

Unterschieden wurden zwei Obergruppen: Die erste Gruppe umfasste die Mäuse, die ein operatives SHT erhalten haben, die zweite bestand aus *Sham*-Versuchstieren, welche lediglich einer Scheinoperation unterzogen wurden und somit kein Schädelhirntrauma erlitten haben. Beide Gruppen wurden wiederum in zwei weitere Untergruppen unterteilt, der einen wurde der wirksame Antikörper (Anti-IL-1beta, 10 mg/kg, Novartis) intraperitoneal (0,1 ml/10 g Körpergewicht) injiziert, der anderen ein Antikörper mit keiner spezifischen biologischen Funktion (Isotyp-gepasster Kontrollantikörper, 10mg/kg, Novartis). Diese Injektion erfolgte bei den *Sham*-Versuchstieren eine Stunde, in der anderen Gruppe eine, sowie vier Stunden nach dem Setzen des Schädelhirntraumas. Nach einer Woche wurde den Mäusen eine zweite Dosis des entsprechenden Antikörpers gespritzt. Es wurde darauf geachtet, dass die Kühlkette der

AK bis zum Auftauen kurz vor Verabreichung nicht unterbrochen wurde. Des Weiteren wurden die erhaltenen Antikörper nicht verdünnt oder verändert.

### 3.1.3 Zeitliche Abfolge

Während des Versuchszeitraums wurden die Mäuse genau beobachtet und zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht und Experimenten unterzogen. So wurden die Sterblichkeit und das Gewicht der Tiere an Tag eins, drei und sieben kontrolliert, danach erfolgten die Messungen wöchentlich. Der *Neurological Severity Score* wurde zum ersten Mal eine Stunde nach dem gesetzten Schädelhirntrauma bestimmt, im Anschluss daran wurde der NSS an Tag eins, drei, sieben, vierzehn, einundzwanzig und achtundzwanzig erhoben. Der Versuch *des Open fields* wurde an Tag vierzehn und achtundzwanzig vorgenommen. Im Anschluss an diesen fand der *Object recognition* Test statt.

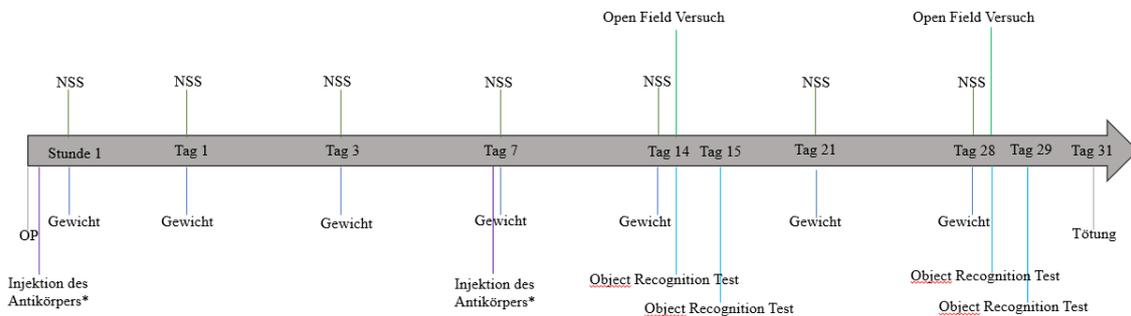


Abbildung 1: Zeitlicher Ablauf der Versuche (\*Kontroll-/ Interleukin- 1 beta-AK Injektion nach 1h/4h)

### 3.1.4 Haltungsbedingungen

Über die gesamte Zeitspanne des Beobachtungszeitraums wurden die Mäuse in ihren Käfigen in konstanten Gruppen gehalten, welche aus jeweils fünf Tieren bestanden, die sich auch im Verlauf nicht änderten. Die Mäuse hatten ständig Zugang zu Futter und frischem Wasser. Die Käfige wurden regelmäßig von ausgebildetem Personal gereinigt, sowie die Streu erneuert. Die Haltungs- und Versuchsräume wurden automatisch konstant bei einer Luftfeuchtigkeit von 45-65% und einer Temperatur von 21°C gehalten. Zudem wurde ein regelmäßiger Tag-Nacht- Rhythmus durch künstliche Beleuchtung garantiert. Die Experimente fanden während der hellen Phasen statt. Durch stete Begutachtungen der Mäuse wurde ihr Wohlbefinden regelmäßig kontrolliert.

## 3.2 Induktion eines experimentellen Schädelhirntraumas

### 3.2.1 Weight Drop Modell

Zur Induktion des Schädelhirntraumas wurde das *Weight Drop* Modell verwendet. Bei dieser Methode wird eine geschlossene Kopfverletzung verursacht, welche zum Ziel hat, das natürliche Trauma möglichst realitätsnah zu imitieren. Da es ein geschlossenes SHT ist, findet keine Kraniotomie statt, und die Schädeldecke bleibt intakt (Xiong et al., 2013). Es kann auch eine diffuse axonale Verletzung entstehen, welche eine typische Begleitverletzung eines SHTs ist. Eine andere mögliche Verletzung, die durch das *Weight Drop* Modell imitiert werden kann, ist die Contre Cou Verletzung. Für dieses Projekt wurde das von Albert-Weissenberger et al. modifizierte Modell nach Shohami verwendet (Albert-Weissenberger et al., 2012). Die SHT dieser Studie waren ausschließlich als mild zu charakterisieren.

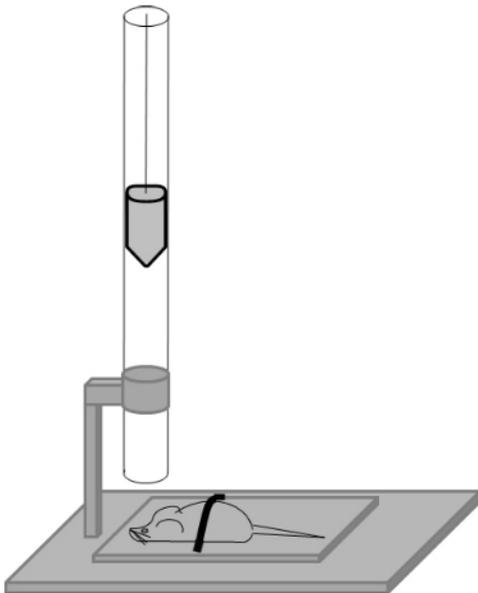


Abbildung 2: Schematische Zeichnung des Weight-Drop Apparates; aus Albert-Weissenberger et al., 2012, eine Druckerlaubnis liegt nach Bestimmungen von Creative Commons Attribution CC-BY 2.0, (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>) vor

### 3.2.2 Narkose

Dreißig Minuten vor der Operation bekam jede Maus zur Analgesie Tramadol in einer Dosierung von 0,6mg/Tier subkutan verabreicht. Im Anschluss wurde die Narkose mit 2.5% Isofluran/Sauerstoff eingeleitet und per Maske über die gesamte Operationsdauer aufrechterhalten. Vor der Operation bekamen die Mäuse individuelle Ohrmarkierungen,

sodass sie anschließend ohne Probleme ihrer Nummer zugeordnet und somit identifiziert werden konnten, auch wenn sie sich in ihrer Gruppe unter anderen Mäusen befanden.

### 3.2.3 Operation

Zuerst wurde die Maus zur korrekten Positionierung in die *Weight Drop* Apparatur gelegt. Ein 75g schweres Gewicht in Form eines Kegels wurde über dem linken Os parietale platziert, genau 2mm lateral und 2mm posterior des Bregma. Es hatte an seiner Spitze eine Beschichtung mit Teflon, um so das Risiko einer Schädelfraktur zu reduzieren (Albert-Weissenberger & Sirén, 2010). Wenn die richtige Position gefunden war, wurde der Kopf des Versuchstieres so fixiert, dass er nicht mehr verrutschen konnte. Nun wurde die Kopfhaut durch einen longitudinalen Schnitt in der Mittellinie eröffnet und so der Schädelknochen freigelegt. Aus einer Höhe von 7cm fiel der Kegel auf die gewünschte Stelle auf den Schädel der Maus und verursachte auf diese Weise das SHT. Die Schwere des Traumas konnte durch das Gewicht des Kegels, sowie die Fallhöhe reguliert werden (Albert-Weissenberger & Sirén, 2010). Im Anschluss wurden knöcherne Verletzungen ausgeschlossen, die Wunde wurde standardmäßig versorgt und mit chirurgischem Nahtmaterial (Ethilon-3.0) zugenäht. Nach erfolgter Operation sind bei der Maus auf Komplikationen, insbesondere respiratorische Insuffizienz und Tod zu achten (Albert-Weissenberger et al., 2012). Ausschlusskriterien der Studie waren intraoperative Mortalität, Schädelbruch, sowie ein Gewichtsverlust von mehr als 20%.

### 3.2.4 Drop-Outs

Die Maus der Nummer 49 musste aufgrund von Verletzungen auf dem Rücken von der Testung ausgeschlossen werden.

### 3.2.5 Sham

Die Scheinoperation der *Sham* Versuchstiere erfolgte ebenfalls unter Narkose mit 2,5% Isofluran/ Sauerstoff. Bei den *Sham* Mäusen wurde nach einer Hautinzision der Schädelknochen freigelegt und danach die Schnittwunde mit einer Naht geschlossen.

### 3.2.6 Postoperative Beobachtungsphase

Direkt nach dem gesetzten SHT/ *Sham*-Operation wurden die Mäuse in einen Käfig mit gewärmtem Boden gesetzt, sodass sie in Ruhe aus der Narkose erwachen konnten. In den ersten 3 Tagen nach der Operation wurde allen Tieren Tramadol peroral im Trinkwasser (1mg/ml) verabreicht. Die Mäuse verblieben in der gleichen Gruppierung wie vor dem Eingriff, sodass *Sham* und SHT-Mäuse sich einen Käfig mit Zugang zu Wasser und Futter teilten.

### 3.2.7 Tötung und Präparation

Nach einem Beobachtungszeitraum von 31 Tagen erfolgte die Tötung der Mäuse mit anschließender Hirnentnahme. Zu Beginn wurde die Maus narkotisiert und anschließend durch CO<sub>2</sub>-Gas getötet. In einem nächsten Schritt wurde eine 0,01M phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) mit Heparin (10 000 U/l) transkardial in die Maus geleitet, bis diese aus dem rechten Herzvorhof austrat und sich die Leber gelblich verfärbte. Danach wurde die Perfusion mit 4%igem Paraformaldehyd (PFA) in 0,01M PBS für 10 min aufrechterhalten. Im Folgenden konnte das Gehirn entnommen werden, und die Basis und Oberfläche des Hirns wurden fotografiert. Dann wurde das Hirn über Nacht in 4% PFA in 0,01M PBS bei 4°C postfixiert. Nachfolgend wurde das Hirn mit PBS gewaschen und in 10% Saccharose in PBS bei 4°C entwässert. Nach ein bis zwei Tagen sollte das Gehirn auf den Boden des Röhrchens abgesunken sein. Dieser Vorgang wurde mit 20%iger und 30%iger Saccharoselösung wiederholt. Abschließend wurden die Gehirne an die „*CnsAflame*“ Koordinationsstelle in München verschickt.

### 3.3 Verhaltensbiologische Untersuchungen

Die die Versuche durchführenden Personen waren bezüglich der Behandlung und des Verletzungsstatus der Mäuse verblindet.

#### 3.3.1 Neurological Severity Score

Schädelhirntraumata sind unter anderem auch die Ursache von neurologischen Verhaltensauffälligkeiten. Um diese zu charakterisieren, eignet sich insbesondere der *Neurological Severity Score*. Speziell für ein Schädelhirntrauma, welches durch das *Weight Drop* Modell verursacht wird, eignet er sich besonders, um die initiale Schwere, sowie die Erholung der Maus von diesem zu beschreiben (Albert-Weißberger et al., 2012). Eine hohe Punktzahl kann als Hinweis auf ein schwereres Trauma gewertet werden. Der NSS umfasst verschiedene klinische Parameter, so auch Übungen, um die motorische Funktion, sowie das normale Verhalten der Maus zu erfassen.

- 1) *Exit Circle*: Die Maus wird in einem Rondell platziert, welches nur einen Ausgang hat. Nun wird die Zeit gemessen, die sie braucht, um es aus diesem hinauszuschaffen. Gesunde Mäuse benötigen normalerweise weniger als 2 min, bis sie den Ausgang gefunden haben. Benötigt sie aber länger oder findet den Ausgang gar nicht, wird ihr ein Punkt gegeben.
- 2) *Seeking behavior*: In diesem Versuch wird die Maus in die Mitte einer Plattform gesetzt. Jetzt wird beobachtet, wie sie sich verhält. Physiologischerweise würde die Maus ihre Umgebung untersuchen, tut sie dies jedoch nicht, bekommt sie einen Punkt zugewiesen.
- 3) *Monoparesis/Hemiparesis*: Von einer Monoparese spricht man, wenn die Maus eine Pfote nicht mehr bewegen kann. Eine Hemiparese beschreibt, wenn zwei Extremitäten nicht mehr benutzt werden können. Wird die Maus am Schwanz hochgehoben und währenddessen eine Pfote mit einer Stange berührt, greift eine gesunde Maus zu und hält diesen Gegenstand fest. Tut sie dies jedoch nicht, bekommt sie einen Punkt.
- 4) *Straight walk*: Die Fähigkeit der Maus, geradeaus zu gehen, wird getestet. Auf einer geraden Oberfläche wird ihr Gangbild begutachtet. Zeigt sie Auffälligkeiten, zum Beispiel, wenn sie gar nicht läuft oder eine Pfote hinter sich herzieht, bekommt sie einen Punkt.

- 5) *Startle Reflex*: Erschrickt eine gesunde Maus aufgrund eines lauten Geräuschs, zuckt sie zusammen. Zeigt sie jedoch keine Reaktion, bekommt sie aufgrund dieser Verhaltensauffälligkeit einen Punkt.
- 6) *Beam balancing*: Zu diesem Versuch wird ein Balken mit einem Durchmesser von 7x7mm benötigt. Auf diesem wird die Maus platziert und soll nun für mindestens zehn Sekunden versuchen, zu balancieren. Schafft sie es jedoch nicht und fällt vorher herunter, wird ihr ein Punkt gegeben.
- 7) *Beam walk*: Um die Koordination und Balance der Maus zu überprüfen, wird ein Set aus 3 verschiedenen Balken genutzt. Die Maus wird zuerst auf den breitesten Balken gesetzt, welcher eine Länge von 30 cm und eine Breite von drei cm aufweist. Nun soll sie diesen überqueren. Gelingt es ihr, wird der Balken gegen einen neuen von nur 2 cm Breite ausgewechselt und die Maus wieder dazu animiert, über diesen zu laufen. Der letzte Balken ist nur noch 1 cm breit. Schafft die Maus es nicht, über den ersten Balken zu laufen, bekommt sie drei Punkte, beim zweiten Balken zwei Punkte und wenn sie den dritten Balken nicht bewältigen kann, wird ihr ein Punkt zugeteilt. Schafft sie jedoch alle Balken ohne Probleme, bekommt sie null Punkte.
- 8) *Round stick balancing*: Dieser Test überprüft die Balance und Griffstärke der Maus, da beide Eigenschaften nötig sind, um sich an einen Balken klammern zu können. Die Maus soll sich an einer runden Stange mit einem Durchmesser von 3 mm festhalten. Dabei wird darauf geachtet, dass die Maus mindestens zwei ihrer Pfoten benutzt. Schafft sie es nicht, bekommt sie einen Punkt.

### 3.3.2 *Open Field* Experiment

Dieses Experiment diente der Untersuchung der generellen Aktivität, des Bewegungsmusters sowie des Verhaltens der Maus in einer für sie als bedrohlich empfundenen Situation (Crawley, 1999). Dazu wurde die Maus für 10 Minuten in eine ansonsten leere Box aus weißem Kunststoff (43cm x 43cm x 43cm) gesetzt, und ihre Bewegungen wurden durch eine Kamera (SD-5 WV-CP500, Panasonic, Kadoma, Japan) in der Vogelperspektive aufgezeichnet. Die Aufnahme begann in dem Moment, als die Maus in die Arena gesetzt wurde. Bevor das nächste Tier den Versuch begann,

wurde die gesamte Box gereinigt, umso mögliche Irritationen auszuschließen. Auch wurde die Box ausgeleuchtet, um Lichtunterschiede zu vermeiden. Im Anschluss wurde das Verhalten der Maus mithilfe eines Computerprogramms (EthoVisionXT 10.1. Software (Noldus, Wageningen, the Netherlands) ausgewertet, wobei die Gesamtlaufstrecke, die Geschwindigkeit, sowie die Aufenthaltsorte des Tieres erfasst wurden. So konnte analysiert werden, ob sich die Maus eher zentral oder peripher in der Box aufhielt.

### 3.3.3 *Object Recognition Test*

Durch dieses Experiment wurde das Erinnerungsvermögen des Versuchstieres untersucht (Bevins & Besheer, 2006). Basierend auf dem gewöhnlichen Verhalten der Maus, wurde von gesunden Tieren erwartet, sich ausführlicher mit einem neuen, noch unbekanntem Objekt zu beschäftigen, statt mit einem bereits bekannten. Des Weiteren sollte sie in der Lage sein das bereits bekannte Objekt auch als schon bekannt zu identifizieren und somit den Austausch von einem der Objekte zu bemerken. Abbildung 3 zeigt die Dimensionen der Testbox und die Stellung der Testobjekte sowie die Reihenfolge der Testung. Der Versuch fand an zwei aufeinander folgenden Tagen statt. Am ersten Tag bekam die Maus für eine Stunde die Möglichkeit, die Box zu erkunden und sich mit ihrer Umgebung vertraut zu machen. Am folgenden Tag befanden sich zwei identische Objekte in der Box. Die Maus bekam nun fünf Minuten Zeit, die Gegenstände zu untersuchen, bis sie wieder zurück in den Käfig gesetzt wurde. Nach einer Pause von vier Stunden wurde die Maus erneut in die Box gebracht, allerdings wurde nun eines der Objekte durch ein neues ersetzt. Die Experimente wurden per Kamera aufgezeichnet und später auf zwei verschiedene Weisen ausgewertet. Zum einen wurde die Zeit gemessen, die die Maus an jedem Objekt verbrachte, zum anderen wurde gezählt, wie oft die Maus jedes Objekt untersuchte, um später einen möglichen Unterschied zwischen bekannten und neuen Objekten feststellen zu können. Des Weiteren wurden die Exploration Ratio (ER) mit der Formel:  $\text{Explorationszeit Neues Objekt} / (\text{Explorationszeit Neues Objekt} + \text{Explorationszeit altes Objekt})$  berechnet. Außerdem wurde der Präferenzindex (PI) mit folgender Formel bestimmt:  $(\text{Explorationszeit Neues Objekt} - \text{Explorationszeit Altes Objekt}) / (\text{Explorationszeit Neues Objekt} + \text{Explorationszeit Altes Objekt})$  (Fleischmann et al., 2020).

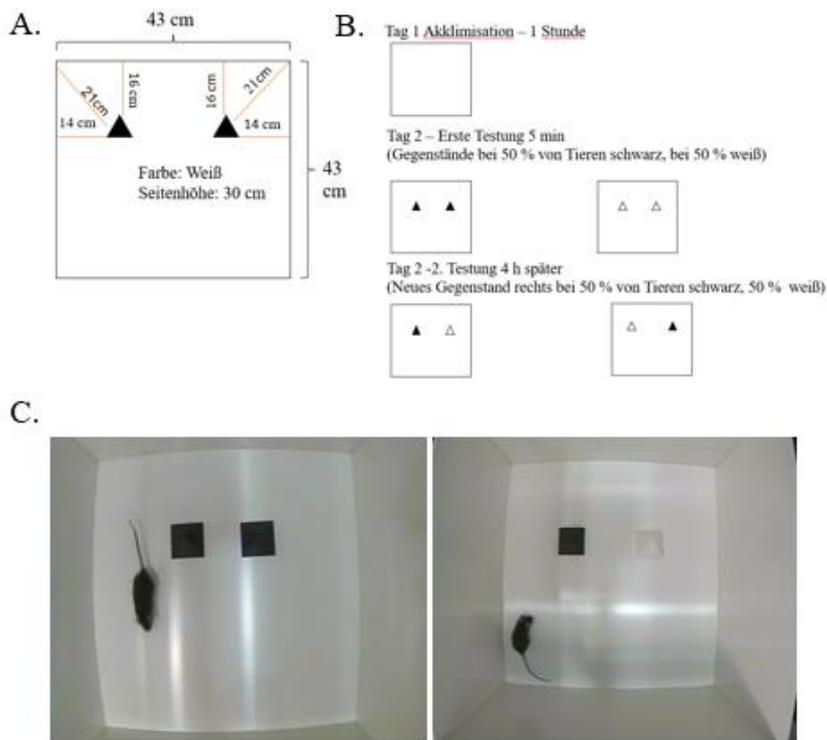


Abbildung 3: A: Schematischer Aufbau des ORT; B: Ablauf ORT; C: Beispielaufnahmen des ORT

### 3.4 Immunhistologische Färbung

#### 3.4.1 Immunhistochemie

Durch das Verfahren der Immunhistochemie können Proteine mittels Markierung durch Antikörper sichtbar gemacht werden. Das Prinzip der Färbung basiert auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion, welche die Affinität von einem Antikörper zu bestimmten Gewebsstrukturen ausnutzt. Diese Gewebsstrukturen werden auch als Epitope bezeichnet. Das Ziel dieser Methode ist eine spezifische Bindung zwischen Antikörper und Epitop. Wichtig ist, dass der Antikörper nicht mit anderen ähnlichen Epitopen reagiert. Dieser Antikörper, welcher das nachzuweisende Protein bindet, wird Primärantikörper genannt. Bei der indirekten Methode wird ein zweiter mit fluoreszierendem Farbstoff markierter Antikörper verwendet, welcher wiederum den Primärantikörper bindet. Dieser Antikörper wird als Sekundärantikörper bezeichnet.

### 3.4.2 GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein)

Das saure Gliafaserprotein, auch GFAP genannt, ist ein im Zytoplasma von Astrozyten vorkommendes Protein. Es ist Bestandteil von Intermediärfilamenten und dient somit sowohl der Stabilität, als auch der Beweglichkeit der Astrozyten (Sofroniew & Vinters, 2010). In der Phase nach einem Schädelhirntrauma kann es zu einer Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia kommen, welche auch noch Jahre nach dem Trauma im Hirn nachzuweisen sind (Clausen et al., 2009). Durch diese Aktivierung wird GFAP in den Astrozyten vermehrt exprimiert und kann deshalb im ZNS-Präparat zu ihrem Nachweis dienen (Pekny & Nilsson, 2005).

### 3.4.3 Entwässern der Gehirne

Zuerst wurden die Gehirne mithilfe einer Rasierklinge in zwei Teile geschnitten. Diese zwei Teile wurden in einer mit der Nummer der entsprechenden Maus beschrifteten Kassette in destilliertem Wasser aufbewahrt. Zu Beginn der Entwässerung wurden die Kassetten in den ersten Behälter des Entwässerungsgeräts gegeben. Die Behälter wurden nun geschlossen und das Programm 03 ausgewählt und gestartet. Danach wurde eine Reihe verschiedener Behälter durchlaufen. Gestartet wurde mit 50% Ethanol, es folgten 70%, 80%, 96% und 100% Ethanol. An diese Reihe schlossen sich Behälter mit 100% Ethanol und Chloroform im Verhältnis 1:1 an, dann ausschließlich Chloroform und zuletzt Paraffin.

### 3.4.4 Erstellen der Paraffinblöcke

Im ersten Schritt wurde die Platte auf 60°C erwärmt. Währenddessen wurden die Förmchen mit Glycerol ausgepinselt, um später das Herauslösen zu vereinfachen. Anschließend wurden sie auf die nun warme Platte gestellt. Die Kassetten mit den entwässerten Gehirnen wurden in einen Behälter mit warmem Paraffin gegeben. Jetzt wurden die Deckel der Kassetten entfernt und die Gehirne mit der breiten Seite nach unten in das Förmchen gelegt. Dann wurden die Förmchen mit Paraffin gefüllt und der Boden der Kassette auf dem Förmchen platziert. Zum Erhärten wurden sie auf eine Kühlplatte gestellt und noch ein mit der Nummer der entsprechenden Maus beschrifteter Zettel auf die Kassette gegeben. Nach einer halben Stunde, nachdem das Paraffin

ausgehörtet war, wurden die Ränder des Förmchens sauber geschnitten und die Kassette vorsichtig aus dem Förmchen gelöst.

#### 3.4.5 Paraffinblöcke schneiden

Um die Paraffinblöcke schneiden zu können, mussten sie im Kühlschrank bei  $-20^{\circ}\text{C}$  vorgekühlt werden. Währenddessen wurde das Wasserbecken mit destilliertem Wasser aufgefüllt und auf  $44^{\circ}\text{C}$  erwärmt. Kaltes destilliertes Wasser wurde in die Schalen gegossen. Nach Abkühlung der Blöcke wurden sie in die Schneidemaschine eingespannt und angeschnitten, sodass eine gerade Schnittfläche entstand. Danach konnten die Schnitte mit einer Dicke von  $2\ \mu\text{m}$  geschnitten und mit einem Pinsel ausgerollt werden. Der nächste Schritt war die Überführung der Schnitte in das kalte Wasser, sodass die matte Seite nach oben zeigte. Entstandene Falten konnten mit einem Pinsel vorsichtig herausgestrichen werden. Mithilfe eines Objektträgers folgte die Überführung der Schnitte ins warme Wasser, sodass sie sich ausdehnen konnten. Die Schnitte wurden auf einen Superfrost Plus Objektträger aufgezogen und bei Raumtemperatur über Nacht vertikal getrocknet.

#### 3.4.6 H.E. Färbung

Durch die H.E. Färbung wurden die strukturelle Beschaffenheit des Mäusehirns und gegebenenfalls vorhandene Läsionen dargestellt.

Der erste Schritt war die Endparaffinierung der Hirnschnitte. Dazu wurden sie für zweimal 10 Minuten in Xylol gestellt. Im Anschluss durchliefen die Präparate die absteigende Ethanolreihe. Es wurde vergällter Alkohol benutzt. Zuerst wurde 100%iger Ethanol verwendet, dann 96%, 70% und als letztes 50%iger. Die Schnitte wurden zuerst für 30 Sekunden, danach für 5 Minuten in den jeweiligen Alkohol gestellt und in 50%igen Alkohol dreimal kurz geschwenkt. Im Anschluss wurden die Präparate für eine Minute in destilliertem Wasser zwischengelagert. Danach wurden die Zellkerne gefärbt. Dazu wurden die Schnitte für 5 Minuten in Hämalaun gelagert. Anschließend mussten die Präparate für zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser gewässert werden. Um im nächsten Schritt das Zytoplasma der Zellen zu färben, wurde Eosin verwendet. Dazu wurden die Objektträger für 3 Minuten in Eosin gelegt. Nachfolgend wurden die Schnitte durch die aufsteigende Ethanolreihe geführt. Für zweimal 10

Sekunden kamen die Schnitte zuerst in 70%igen, danach in 96%igen und abschließend in 100%igen Ethanol. Danach mussten sie noch zweimal 5 Minuten in Xylol deponiert werden. Zuletzt wurden die Objektträger mit DPX Mountant eingedeckt. Über Nacht wurden die Schnitte zum Trocknen bei Raumtemperatur unter dem Abzug aufbewahrt.

### 3.4.7 Immunhistochemische Fluoreszenz-Färbung

Die immunhistochemische Fluoreszenzfärbung begann mit der Endparaffinierung der Gehirnschnitte, damit diese im Verlauf gefärbt werden konnten. Dazu wurden die Objektträger zu Beginn für zweimal 10 Minuten in Xylol gegeben. Im Anschluss wurde die Endparaffinierung durch die Ethanolreihe fortgeführt. Es wurde vergälltes Ethanol in den Konzentrierungen 100%, 96% und 70% verwendet. In diese Lösungen wurden die Schnitte erst 30 Sekunden und danach weitere 5 min gestellt und zum Schluss in 50%igem Ethanol dreimal kurz geschwenkt. Danach wurden die Präparate in bidestilliertem Wasser zwischengelagert, während 10mM Citratpuffer mit 0,05% Tween im Dampfgerer erwärmt wurden. Sobald dieser 100°C erreicht hatte, wurden die Objektträger hineingestellt und für 20 Minuten gekocht. Anschließend sollten die Präparate für 20 Minuten im Citratpuffer abkühlen, bevor sie in bidestilliertes Wasser gestellt wurden. Im nächsten Schritt wurde die Fläche um die Schnitte herum abgetrocknet, sodass sie nun mit einem Pap-Pen umrandet werden konnten. Bevor die Blocking Solution auf die Schnitte gegeben werden konnte, mussten diese in TBS-T für zweimal 5 Minuten auf dem Schüttler gewaschen werden. Dann wurden pro Schnitt 100µl 5% Blocking Solution vorsichtig so neben die Schnitte pipettiert, dass diese bedeckt waren und in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur geblockt werden konnten. Nach 20 Minuten wurde die Blocking Solution abgekippt und 100µl der Primärantikörper pro Schnitt auf die Objektträger gegeben. Über Nacht wurden sie nun in einer feuchten Kammer bei 4°C gelagert, wobei darauf geachtet werden musste, dass die Schnitte nicht mehr austrocknen konnten.

Am folgenden Tag wurde der Primärantikörper abgekippt, dann die Schnitte für zweimal 5 Minuten in TBS-T auf dem Schüttler gewaschen. Währenddessen musste der Arbeitsraum abgedunkelt sein. Im Anschluss wurden jeweils 100 µl des in Verdünnungspuffer gelösten Sekundärantikörpers auf die Schnitte gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer belassen. Danach wurden die

Objektträger für dreimal 5 Minuten in TBS-T auf dem Schüttler gewaschen. Zum Schluss erfolgte das Eindecken der Präparate. Dazu wurde Mounting Medium mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) verwendet. Die Präparate wurden in geschlossener Mappe über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt und konnten am folgenden Tag unter dem Mikroskop angeschaut und fotografiert werden.

Für die immunhistochemischen Färbungen wurde eine repräsentative Auswahl aus der gesamten Versuchsgruppe gewählt. Insgesamt wurden die Hirnschnitte von 26 Mäusen analysiert und ausgewertet. Man entschied sich für die Mäuse mit den Nummern 10, 11, 12, 13, 15, 16, 18, 25, 30, 36, 37, 41, 42, 44, 46, 51, 53, 65, 70, 71, 75, 76, 83, 86, 89 und 90.

Für jedes der untersuchten Tiere wurden je vier Objektträger mit je zwei Präparaten sowie eine Negativkontrolle gefärbt. Die Negativkontrollen wurden nur mit dem Sekundärantikörper behandelt, sodass Rückschlüsse auf dessen Spezifität gezogen werden konnten. Bei jedem Färbedurchgang wurde zudem auch eine Positivkontrolle, bestehend aus menschlichem Normalhirn, angefertigt.

#### 3.4.8 Fotografieren der Präparate

Für die Analyse der Hirnschnitte wurde die CA3-Region des Hippocampus untersucht. Dazu wurden die Präparate mithilfe eines Apotoms fotografiert, sodass im Anschluss die gefärbten Zellen gezählt werden konnten. Von jeder CA3-Region wurden drei Aufnahmen in jeweils zwei Kanälen gemacht, sodass die DAPI und die GFAP-Färbung analysiert werden konnten.

#### 3.4.9 Zählen der Zellen

Alle im entsprechenden Bereich gesehenen mit GFAP gefärbten Zellen wurden händisch ausgezählt. Dabei wurden nur die Zellen mit erkennbarem Zellkern berücksichtigt.

#### 3.4.10 Verblindung

Die Versuchsdurchführenden waren über den gesamten Untersuchungszeitpunkt verblindet. Die Verblindung wurde erst am Ende der Analysen aufgelöst. Auch die injizierten Antikörper wurden verblindet verabreicht.

### 3.5 Statistische Datenauswertung

Für die statistische Analyse und Darstellung der Ergebnisse wurde die Software Microsoft Excel, sowie SPSS benutzt. Das Signifikanzniveau wurde für alle Berechnungen einheitlich festgelegt, sodass p-Werte  $< 0,05$  als signifikant angesehen wurden. Die grafische Darstellung erfolgte als Boxplot, als Linien- oder als Balkendiagramm. Dargestellt wurden die jeweiligen Mittelwerte mit dem Standardfehler des Mittelwerts. Die Prüfung auf Normalverteilung erfolgte durch den Shapiro- Wilk- Test. Um das Signifikanzniveau zu bestimmen, wurden bei der Körpergewichtskontrolle und dem *Neurological Severity Score* der Kruskal- Wallis- Test angewendet; beim *Object Recognition* Test, sowie beim *Open Field* Test zum Vergleich von zwei Gruppen mit unabhängigen Proben der Mann- Whitney- U- Test. Zur Beurteilung der Effektstärke wurde die Einteilung nach Cohen herangezogen.

## 4 Ergebnisse

Die vorgestellten Ergebnisse beziehen sich auf die Untersuchung der Unterschiede zwischen SHT-Mäusen, welche ein Schädelhirntrauma erlitten haben, und *Sham*-Mäusen, welche einer Scheinoperation unterzogen wurden.

Die Gruppen:

- 1) A: SHT, 1. Behandlung nach 4h, Kontrollantikörper
- 2) B: *Sham*, 1. Behandlung nach 1h, Kontrollantikörper
- 3) C: SHT, 1. Behandlung nach 1h, Anti-IL-1beta
- 4) D: *Sham*, 1. Behandlung nach 1h, Anti-IL-1beta
- 5) E: SHT, 1. Behandlung nach 4h, Anti-IL-1beta
- 6) F: SHT, 1. Behandlung nach 1h, Kontrollantikörper

## 4.1 Änderung des Körpergewichts

Die Entwicklung des durchschnittlichen Körpergewichts in den einzelnen Gruppen stellt sich wie folgt dar:

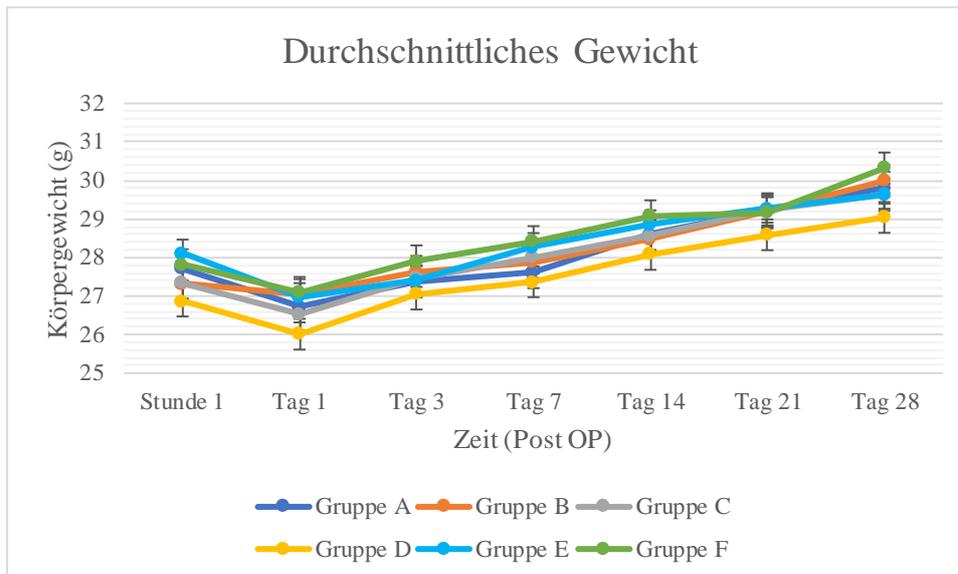


Abbildung 4: Verlauf des durchschnittlichen Gewichts aller Gruppen über den Versuchszeitraum. Gruppe A: TBI, Behandlung nach 4h, Kontrollantikörper, Gruppe B: *Sham*, Behandlung nach 1h, Kontrollantikörper. Gruppe C: TBI, Behandlung nach 1h, Anti-IL-1beta, Gruppe D: *Sham*, Behandlung nach 1h, Anti-IL-1beta, Gruppe E: TBI, Behandlung nach 4h, Anti-IL-1beta und Gruppe F: TBI, Behandlung nach 1h, Kontrollantikörper.

Daten zeigen den Mittelwert  $\pm$  Standardfehler; n=15 in jeder Gruppe.

Alle Mäuse verloren am Tag nach der Operation bzw. Scheinoperation vorläufig an Gewicht. Über den gesamten Beobachtungszeitraum zeigten sie jedoch eine Gewichtszunahme. Insgesamt zeigten sich über den Beobachtungszeitraum hinweg keine signifikanten Unterschiede in der Entwicklung des Körpergewichts zwischen den verschiedenen Gruppen.

## 4.2 Neurological Severity Score (NSS)

Zur Messung der Schwere des gesetzten SHTs, wurde eine Stunde nach Trauma der NSS erhoben. Ein Score von 2,5 bis 3,5 Punkten entspricht einem leichten SHT und war in allen Gruppen ähnlich (Abb. 5). Im Verlauf erholten sich Tiere in allen Gruppen innerhalb des ersten post-operativen Tags. Ab dem 3. Tag zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Trauma-Tieren und den *Sham*-operierten Tieren.

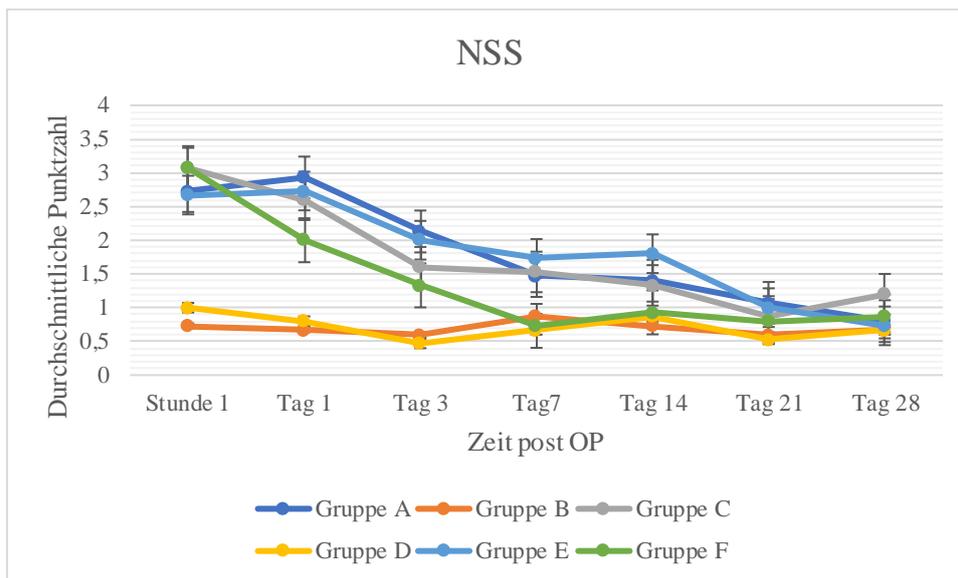


Abbildung 5: Neurological Severity Score (NSS) aller Gruppen über den Versuchszeitraum. Gruppe A: TBI, Behandlung nach 4h, Kontrollantikörper, Gruppe B: Sham, Behandlung nach 1h, Kontrollantikörper. Gruppe C: TBI, Behandlung nach 1h, Anti-IL-1beta, Gruppe D: Sham, Behandlung nach 1h, Anti-IL-1beta, Gruppe E: TBI, Behandlung nach 4h, Anti-IL-1beta und Gruppe F: TBI, Behandlung nach 1h, Kontrollantikörper. Daten zeigen den Mittelwert  $\pm$  Standardfehler; n=15 in jeder Gruppe

#### 4.2.1 Verlauf des NSS nach Behandlung mit dem Kontrollantikörper

Der erreichte NSS der SHT- Tiere, die in mit dem Kontrollantikörper behandelten Gruppen waren, war eine Stunde nach Trauma signifikant höher als bei den Sham-operierten Tieren (Abb. 6). Die Gruppe, der der Kontrollantikörper nach einer Stunde injiziert wurde, erholte sich bereits am ersten post-operativen Tag, sodass es keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Sham Gruppe an den anderen Messzeitpunkten gab (Tag 1:  $p=0,059$ ; Tag 3:  $p=0,11$ ; Tag 7:  $0,89$ ; Tag 14:  $p=0,27$ ; Tag 21:  $p=0,47$ ; Tag 28:  $p=0,67$ ). Der NSS in der Gruppe, die erst nach 4h nach dem Trauma mit dem Kontrollantikörper behandelt wurde, war sowohl eine Stunde nach Trauma als auch am 1. und 3. Tag nach der Operation im Vergleich zu den Sham Tieren signifikant erhöht (1 Stunde:  $p=0,03$ , Tag 1:  $p<0,001$ ; Tag 3:  $p=0,016$ ). Der Kruskal-Wallis- Test zeigte an den anderen Tagen keine statistische Signifikanz (Tag 7:  $0,29$ ; Tag 14:  $p=0,18$ ; Tag 21:  $p=0,38$ ; Tag 28:  $p=0,97$ ).

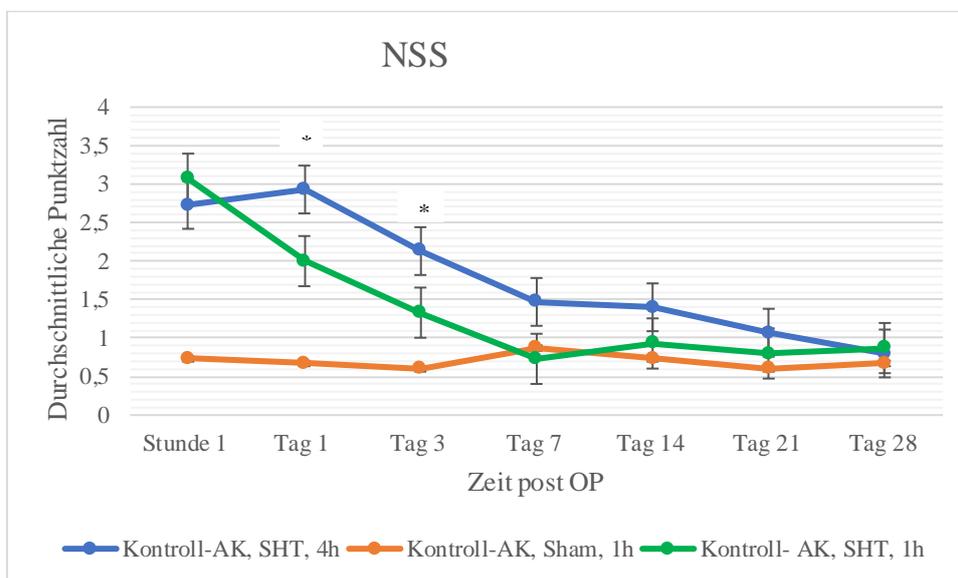


Abbildung 6: Neurological Severity Score (NSS) der mit Placebo behandelten Gruppe über den Versuchszeitraum Daten zeigen den Mittelwert  $\pm$  Standardfehler,  $n=15$  in jeder Gruppe; \*Signifikanz 1. Tag:  $p<0,001$ ; \*Signifikanz 3. Tag:  $p<0,016$

#### 4.2.2 Verlauf des NSS nach Behandlung mit Anti- IL- 1 beta Antikörper

Die intraperitoneale Injektion des Anti- IL-1-beta Antikörpers (10mg/kg) oder Kontrollantikörpers (10mg/kg) erfolgte kurz nach der Operation und am 7. postoperativen Tag. Die erste Dosis erhielten die Tiere entweder eine oder vier Stunden nach Trauma. Mäuse, die mit dem Anti- IL-1-beta- AK behandelt wurden, zeigten im Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppe keine Unterschiede im NSS.

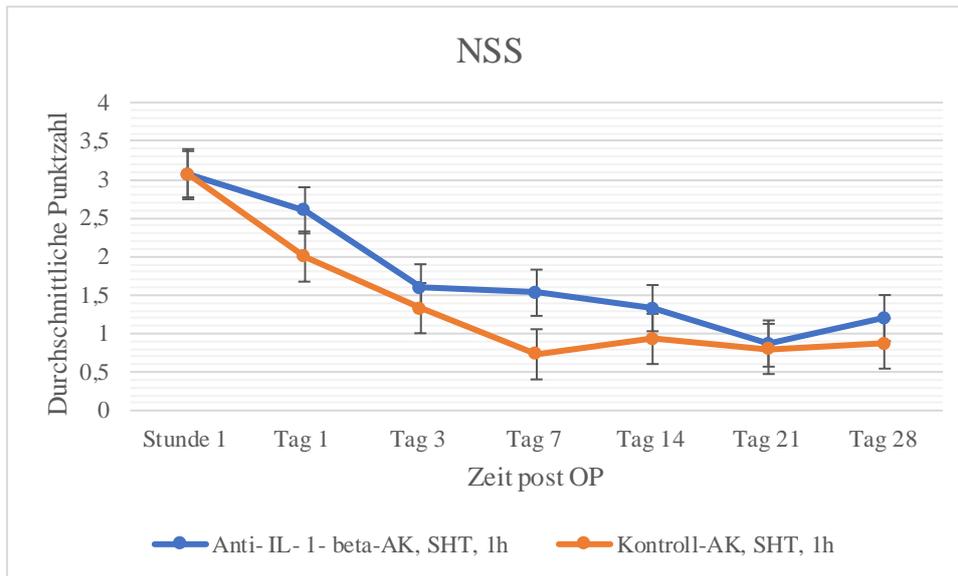


Abbildung 7: Verlauf des NSS in den Tieren, die 1h nach SHT mit Kontrollantikörper oder Anti-IL-1 beta Antikörper behandelt wurden. Daten zeigen den Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, n=15 in jeder Gruppe

In den Gruppen, die in der ersten Stunde nach dem Trauma behandelt wurden, erreichten beide Gruppen vor der Behandlung eine fast gleiche Punktzahl im NSS (SHT, Anti-IL-1beta AK 3,07 Punkte  $\pm$  0,56 Punkte, Kontroll-AK 3,07 Punkte  $\pm$  0,61 Punkte; Mittelwert  $\pm$  Standardfehler) (Abb. 7). Die Behandlung mit Anti-IL-1 beta Antikörper zeigte keinen Einfluss auf die im Verlauf erzielten Ergebnisse im NSS. Auch im Kruskal Wallis Test lies sich für keinen dieser Unterschiede eine statistische Signifikanz nachweisen (Tag 1: p=0,66; Tag 3: p=0,96; Tag 7: p=0,3; Tag 14: p=0,32; Tag 21: p=0,56; Tag 28: p=0,61). Die Gruppen, die die erste AK- Dosis 4 Stunden nach Trauma erhielten, zeigten keinen Unterschied im NSS zwischen den Behandlungen (Abb. 8). Des Weiteren war auch bei den Sham-operierten Tieren nach der Behandlung kein Unterschied im NSS zwischen den mit dem Anti-IL-1beta Antikörper und den mit dem Kontroll-Antikörper behandelten Tieren nachweisbar (Abb. 10).

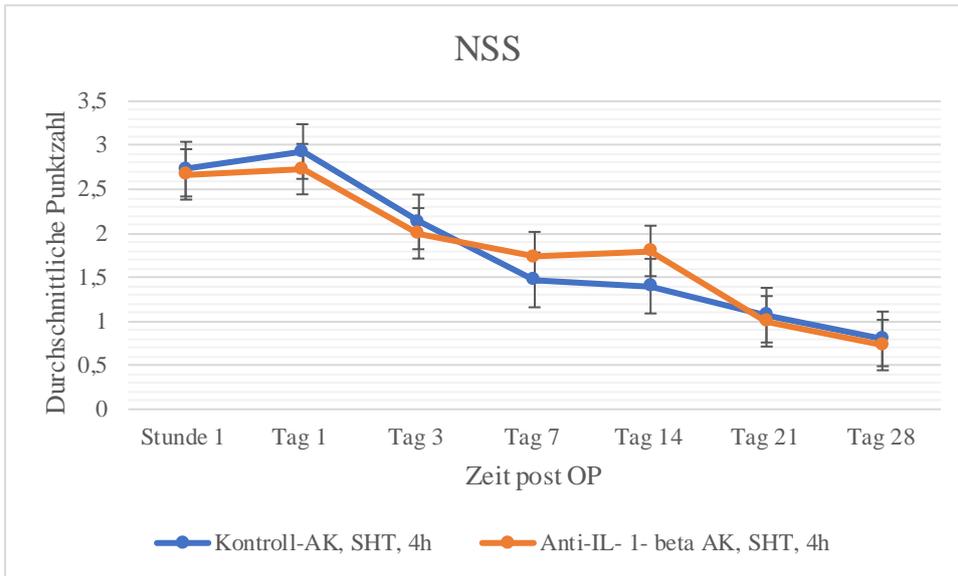


Abbildung 8: Verlauf von NSS in den Tieren, die 4h nach SHT mit Kontrollantikörper oder Anti-IL-1beta Antikörper behandelt wurden. Daten bezeichnen Mittelwert± Standardfehler, n=15 in jeder Gruppe.

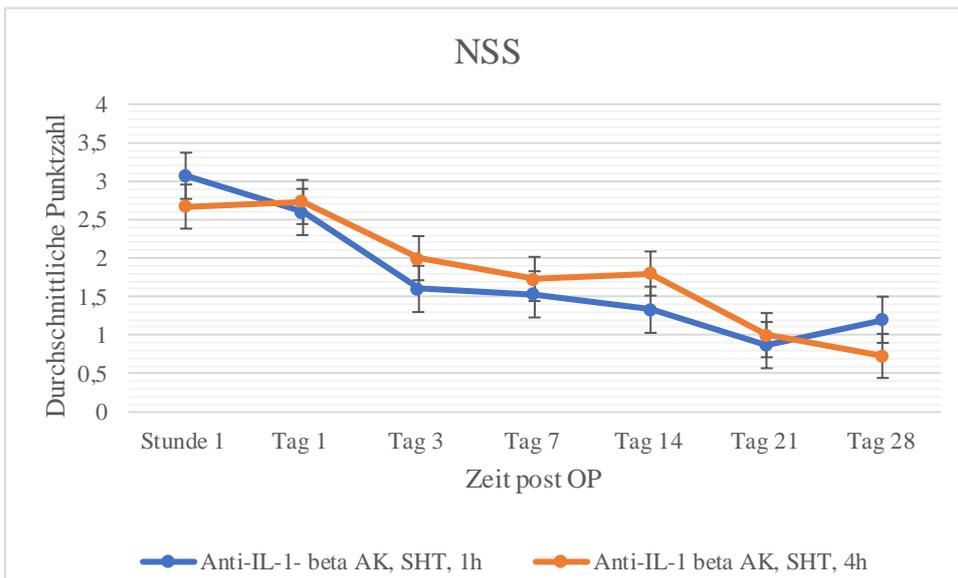


Abbildung 9: Verlauf von NSS in den Tieren, die 1h oder 4h nach SHT mit Anti-IL-1beta Antikörper behandelt wurden. Daten bezeichnen Mittelwert± Standardfehler, n=15 in jeder Gruppe

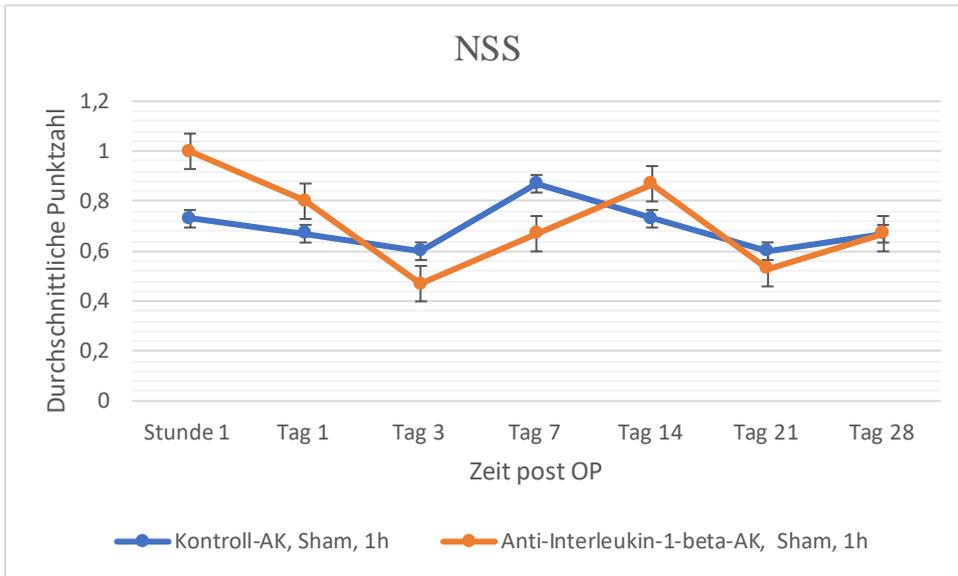


Abbildung 10: Verlauf von NSS in den Sham Tieren, die 1h nach Operation mit Kontroll-Antikörper oder mit Anti-IL-1beta Antikörper behandelt wurden. Daten bezeichnen Mittelwert± Standardfehler, n=15 in jeder Gruppe

### 4.3 *Open Field* Versuch

Für den *Open Field* Versuch wurden die Mäusegruppen bezüglich ihrer insgesamt gelaufenen Strecke, der Geschwindigkeit und der Aufenthaltshäufigkeit im Zentrum der Box, sowie der dort verbrachten Zeit analysiert.

#### 4.3.1 TBI vs. Sham

Wie aus anderen Studien hervorgeht, kann ein Schädelhirntrauma zu einer gesteigerten Aktivität der Mäuse führen (Budinich et al., 2013) (Vogel et al., 2020) (Lopez-Caperuchi et al., 2021). Auch in dieser Studie konnte festgestellt werden, dass 2 Wochen nach Operation Tiere mit SHT eine signifikant größere Strecke laufen als Tiere der *Sham*-Gruppe (Mittelwert  $\pm$  SEM: SHT: 4783cm  $\pm$  380cm, n=15; Sham: 4420,7cm  $\pm$  309cm, n=15;  $p < 0,05$ , Abb. 1A). Die Berechnung der Effektstärke nach Cohen ergab  $d=0,24$ , somit handelt es sich um einen mittelstarken Effekt.

Auch waren Mäuse der SHT-Gruppe signifikant schneller als Mäuse der *Sham*-Gruppe (Mittelwert  $\pm$  SEM: SHT: 8s  $\pm$  0,6s n=15; Sham: 7,4s  $\pm$  0,52s, n=15  $p < 0,05$ ; Effektstärke nach Cohens:  $d=0,24$ , Abb. 1B). Diese signifikanten Differenzen zwischen den beiden Gruppen lassen sich 4 Wochen nach Operation bereits nicht mehr nachweisen.

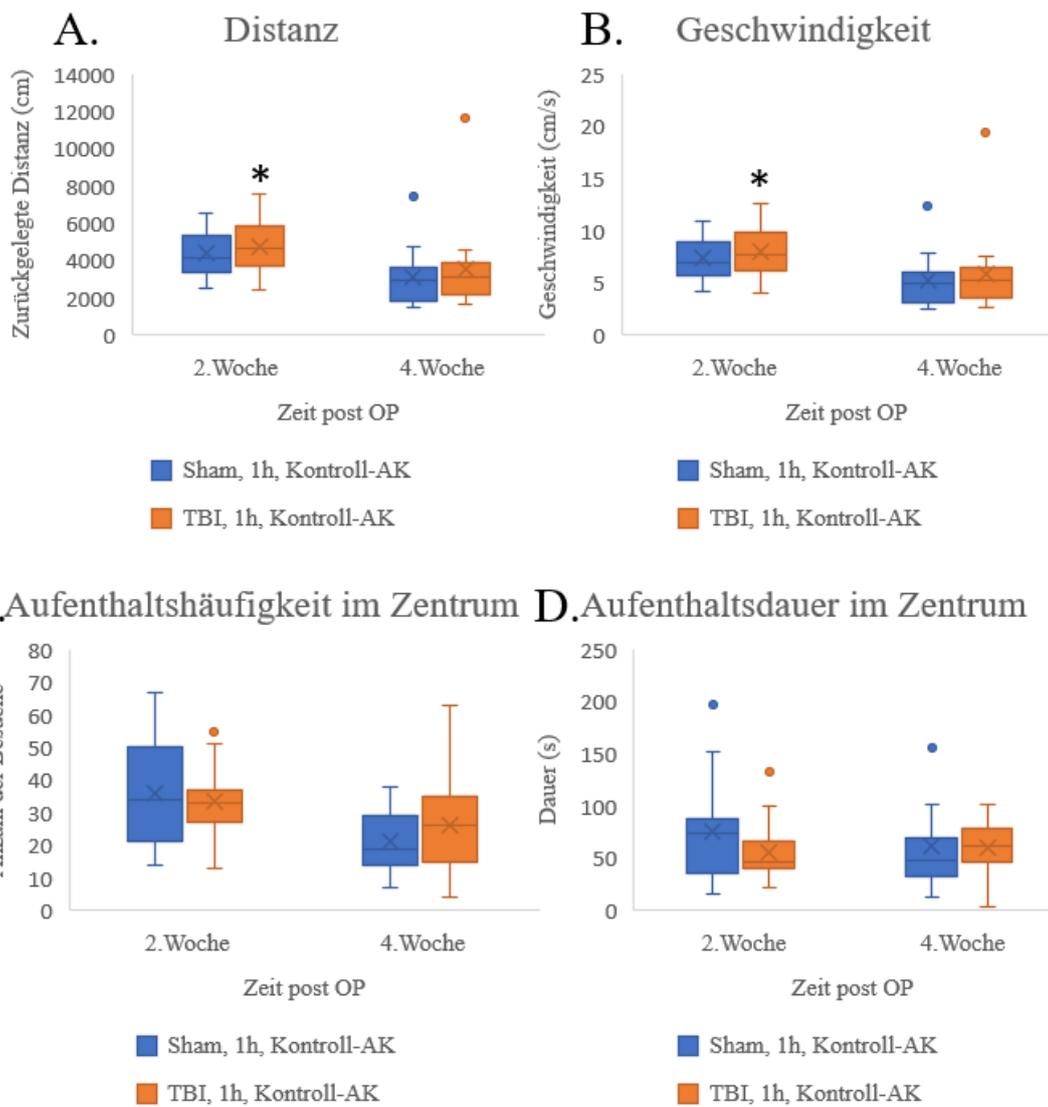


Abbildung 11: Open Field Test (OF), Vergleich der zurückgelegten Distanz (A), der Geschwindigkeit (B), Aufenthaltshäufigkeit im Zentrum (C) Aufenthaltsdauer im Zentrum (D) der TBI/Sham-Mäuse, n= 15 in jeder Gruppe, Daten zeigen mögliche Ausreißer, Minimum, Maximum, Median und den Iqa, \* signifikantes Ergebnis  $p < 0,05$  im Vergleich zur Sham-Gruppe

### 4.3.2 Verhalten im *Open Field* Test nach Behandlung mit dem Anti-Interleukin-1-beta-Antikörper

Zwei Wochen nach Trauma zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Aktivität im *Open Field* Test zwischen den mit Anti-IL-1beta-Antikörpern behandelten und den mit dem Kontroll-AK behandelten Gruppen.

Vier Wochen nach erlittenem Trauma waren Mäuse, die den Anti-IL-1beta Antikörper injiziert bekamen, in den zweiten 5 min im *Open Field* Test sowohl aktiver (Mittelwert  $\pm$  SEM Anti-IL-1-beta-AK: 2131cm  $\pm$  200 cm, n=15, Kontroll-AK: 1394cm  $\pm$  153cm, n=15,  $p < 0.05$ , Effektstärke Cohens'  $d = 0,95$ , Abb.12A) als auch schneller (Mittelwert  $\pm$  SEM Anti-IL-1-beta-AK: 7,1cm/s  $\pm$  0,67 cm/s, n=15, Kontroll-AK: 4,9 cm/ s  $\pm$  0,51cm/s, n=15;  $p < 0.05$ , Effektstärke Cohens'  $d = 0,95$ , Abb. 12B) als Mäuse, die mit Kontroll-Antikörper behandelt wurden. Jedoch verweilten die mit anti-IL-1beta-AK behandelten Tiere 4 Wochen nach Trauma insgesamt und insbesondere in den zweiten 5 min des Experiments signifikant seltener im Zentrum der Untersuchungsbox als Tiere, die den Kontroll- AK gespritzt bekamen.

2. Woche post OP						
erste 5 min						
	TBI, 4h, Kontroll-AK	Sham, 1h, Kontroll-AK	TBI, 1h, Anti-IL-1-beta-AK	Sham, 1h, Anti-IL-1beta-AK	TBI, 4h, Anti-IL-1-beta-AK	TBI, 1h, Kontroll-AK
Distanz (cm)	2517,8 $\pm$ 252	2503 $\pm$ 203,59	2685,5 $\pm$ 217,78	2466,3 $\pm$ 182,5	2999 $\pm$ 165,69	2630 $\pm$ 246
Geschwindigkeit (cm/s)	8,4 $\pm$ 0,84	8,3 $\pm$ 0,68	9 $\pm$ 0,73	8,2 $\pm$ 0,22	9,99 $\pm$ 0,55	8,8 $\pm$ 0,82
Frequenz	16,5 $\pm$ 2,36	16,1 $\pm$ 2,25	13,8 $\pm$ 1,9	12,9 $\pm$ 1,86	17,7 $\pm$ 2,95	14,8 $\pm$ 1,72
Dauer (s)	35 $\pm$ 7,7	23,9 $\pm$ 4,69	22,2 $\pm$ 3,15	24,2 $\pm$ 5,53	20,9 $\pm$ 4,07	24,2 $\pm$ 3,68
2. Woche post OP						
zweite 5 min						
	TBI, 4h, Kontroll-AK	Sham, 1h, Kontroll-AK	TBI, 1h, Anti-IL-1-beta-AK	Sham, 1h, Anti-IL-1beta-AK	TBI, 4h, Anti-IL-1-beta-AK	TBI, 1h, Kontroll-AK
Distanz (cm)	2223,8 $\pm$ 258,33	1917,5 $\pm$ 125	2334,5 $\pm$ 197,93	2269 $\pm$ 199,93	2595,36 $\pm$ 199,77	2152,9 $\pm$ 152,29
Geschwindigkeit (cm/s)	7,4 $\pm$ 0,86	6,4 $\pm$ 0,42	7,8 $\pm$ 0,66	7,6 $\pm$ 0,67	8,65 $\pm$ 0,67	7,2 $\pm$ 0,51
Frequenz	21,3 $\pm$ 3,18	19,9 $\pm$ 2,34	15,6 $\pm$ 1,49	15,1 $\pm$ 1,98	17,93 $\pm$ 2,32	18,7 $\pm$ 1,59
Dauer (s)	56,4 $\pm$ 9,45	51,3 $\pm$ 9,16	31,7 $\pm$ 4,4	27,2 $\pm$ 5,34	31,81 $\pm$ 4,86	31,7 $\pm$ 4,22
4. Woche post OP						
erste 5 min						
	TBI, 4h, Kontroll-AK	Sham, 1h, Kontroll-AK	TBI, 1h, Anti-IL-1-beta-AK	Sham, 1h, Anti-IL-1beta-AK	TBI, 4h, Anti-IL-1-beta-AK	TBI, 1h, Kontroll-AK
Distanz (cm)	1724,6 $\pm$ 209,1	1598,7 $\pm$ 151,82	2036,8 $\pm$ 258,5	1765,7 $\pm$ 167,8	2180 $\pm$ 215,15	1920,9 $\pm$ 366,23
Geschwindigkeit (cm/s)	5,8 $\pm$ 0,7	5,3 $\pm$ 0,506	6,8 $\pm$ 0,86	5,9 $\pm$ 0,56	7,27 $\pm$ 0,72	6,4 $\pm$ 1,22
Frequenz	10,3 $\pm$ 1,45	8,8 $\pm$ 1,42	10 $\pm$ 1,73	8,7 $\pm$ 1,35	12,47 $\pm$ 2,1	12,9 $\pm$ 2,03
Dauer (s)	27,2 $\pm$ 4,96	22,1 $\pm$ 4,38	20,8 $\pm$ 4,74	16,9 $\pm$ 3,73	22,99 $\pm$ 5,08	27,6 $\pm$ 4,53
4. Woche post OP						
zweite 5 min						
	TBI, 4h, Kontroll-AK	Sham, 1h, Kontroll-AK	TBI, 1h, Anti-IL-1-beta-AK	Sham, 1h, Anti-IL-1beta-AK	TBI, 4h, Anti-IL-1-beta-AK	TBI, 1h, Kontroll-AK
Distanz (cm)	1494 $\pm$ 153	1537,2 $\pm$ 258,14	1730,2 $\pm$ 209,73	1814,8 $\pm$ 237,14	2131 $\pm$ 199	1635,5 $\pm$ 251,05
Geschwindigkeit (cm/s)	4,65 $\pm$ 0,5	5,1 $\pm$ 0,86	5,8 $\pm$ 0,7	6 $\pm$ 0,79	7,10 $\pm$ 0,67	5,5 $\pm$ 0,84
Frequenz	13,9 $\pm$ 2,3	12,3 $\pm$ 1,58	10,8 $\pm$ 1,98	13,9 $\pm$ 1,47	12,27 $\pm$ 1,68	13,3 $\pm$ 2,19
Dauer (s)	42,5 $\pm$ 8,14	39,8 $\pm$ 9,89	23,5 $\pm$ 6,47	31,9 $\pm$ 5,71	27,61 $\pm$ 5,01	32 $\pm$ 3,51

Tabelle 8: OF-Test, Vergleich der ersten 5 min mit den zweiten 5 min; 2 und 4 Wochen post OP, Daten zeigen Mittelwert  $\pm$  Standardfehler; \* signifikant  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle

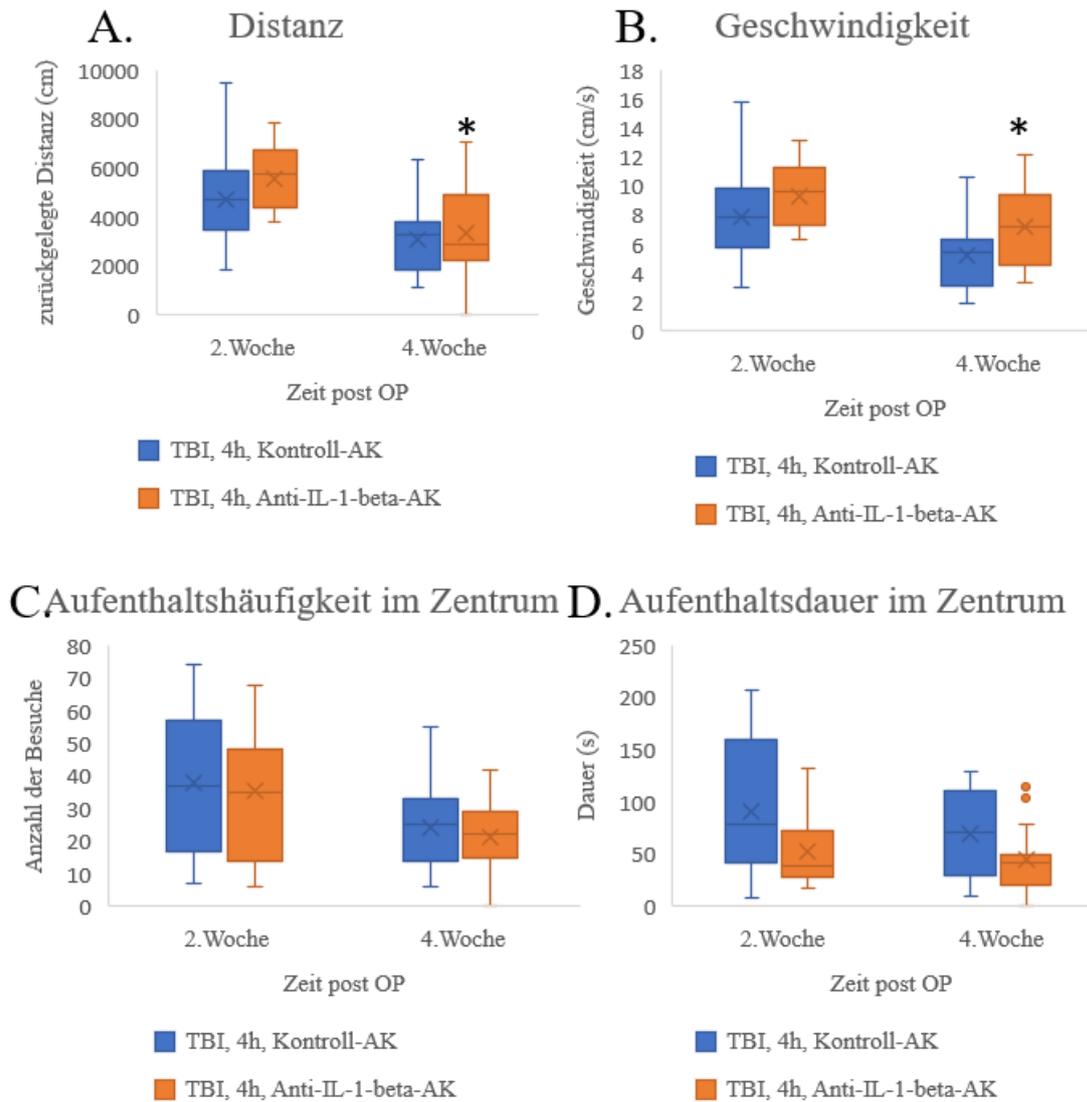


Abbildung 12: Open Field Test (OF), Vergleich der zurückgelegten Distanz (A), der Geschwindigkeit (B), Aufenthaltshäufigkeit im Zentrum (C) Aufenthaltsdauer im Zentrum (D) der mit Kontroll-AK/ Anti-IL-1-beta-1-AK behandelten Mäuse, n=15 in jeder Gruppe, Daten zeigen mögliche Ausreißer, Minimum, Maximum, Median und den Iq, \* signifikant  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle

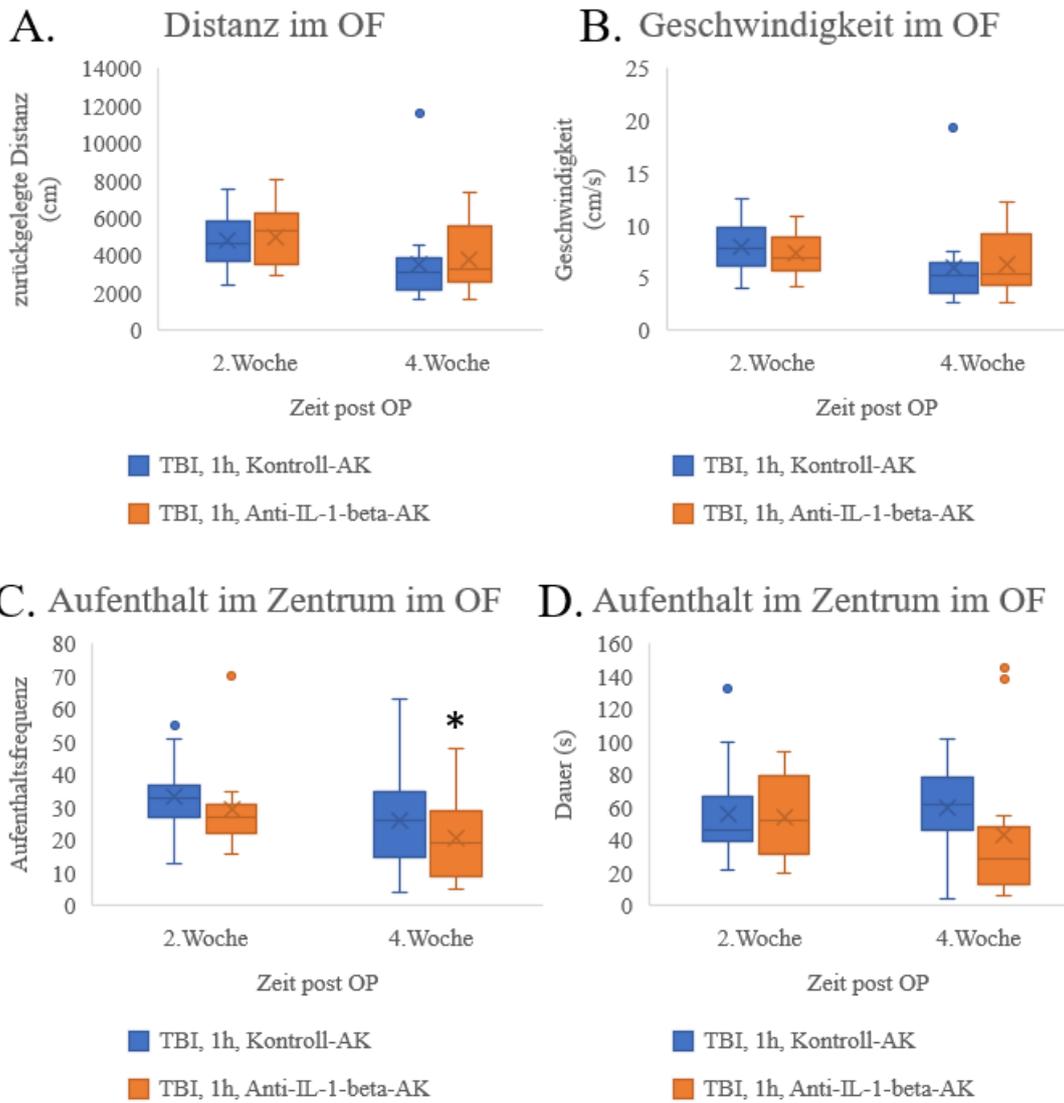


Abbildung 13: Open Field Test (OF), Vergleich der zurückgelegten Distanz (A), der Geschwindigkeit (B), Aufenthaltshäufigkeit im Zentrum (C) Aufenthaltsdauer im Zentrum (D) der mit Kontroll-AK/ Anti-IL-1-beta-1-AK behandelten Mäuse, n=15 in jeder Gruppe, Daten zeigen mögliche Ausreißer, Minimum, Maximum, Median und den Iq, \* signifikant  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle

Es gab keine Unterschiede in der Aktivität und Schnelligkeit der Sham-operierten Mäuse nach Behandlung mit Anti-IL-1beta Antikörper (Abb. 14A, 14B). Interessanterweise hielten sich die mit Anti-IL-1beta AK behandelten Mäuse in den ersten 5 min des Versuchs signifikant kürzer in der Mitte der Untersuchungsbox auf als Mäuse der Kontroll- Gruppe (Abb. 14D). Die Beobachtung, dass sich die Mäuse verstärkt in den peripheren und somit weniger exponierten Bereichen der Box aufhielten, entspricht eher ihrem natürlichen Verhalten und ist somit ein positiv zu wertendes Ergebnis der Entzündungshemmung.

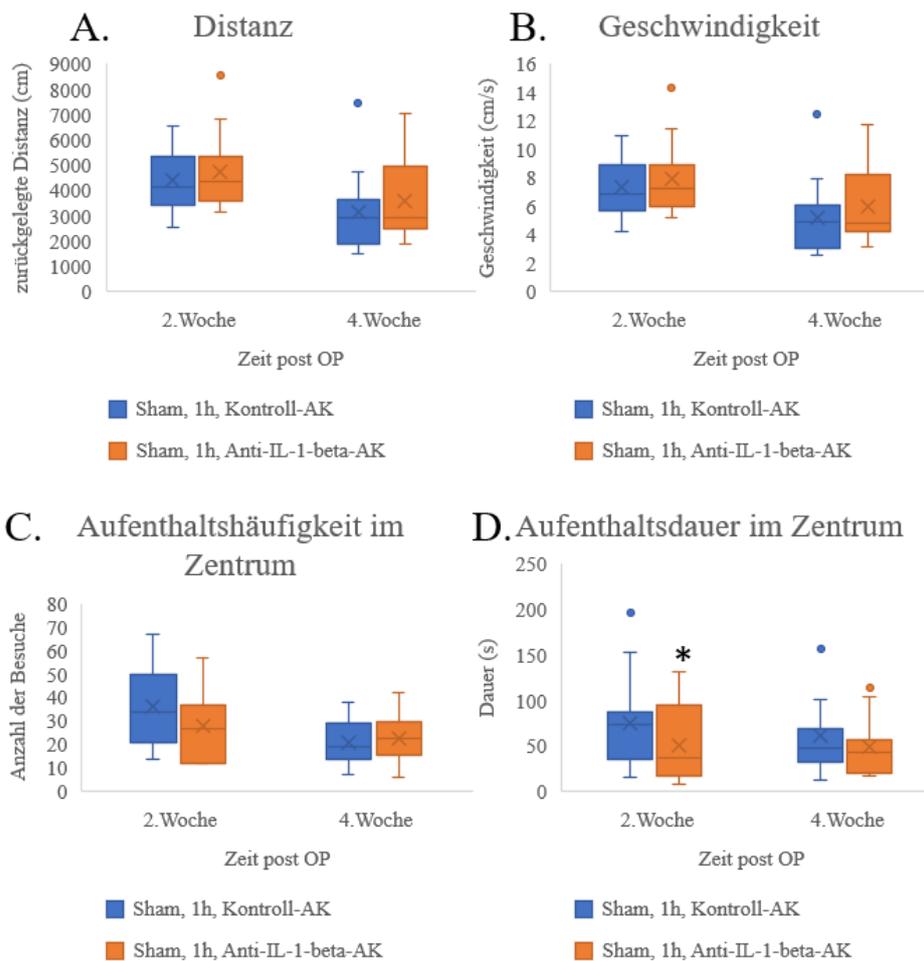


Abbildung 14: Open Field Test (OF), Vergleich der zurückgelegten Distanz (A), der Geschwindigkeit (B), Aufenthaltshäufigkeit im Zentrum (C) Aufenthaltsdauer im Zentrum (D) der mit Kontroll-AK/ Anti-IL-1-beta-1-AK behandelten Mäuse, n= 15 in jeder Gruppe, Daten zeigen mögliche Ausreißer, Minimum, Maximum, Median und den Iqa, \* signifikant p<0,05 im Vergleich zur Kontrolle

#### 4.4 *Object Recognition Test*

Der *Object Recognition Test* (ORT) wurde unter zwei Aspekten ausgewertet: Zunächst wurden die verschiedenen Gruppen bezüglich der an den Gegenständen verbrachten Untersuchungszeit verglichen, dann wurde die Anzahl der Kontaktaufnahmen der Mäuse zu den Gegenständen analysiert.

##### 4.4.1 SHT vs. Sham

Ein erlittenes SHT beeinträchtigt das Gedächtnis der betroffenen Mäuse. Dies zeigte sich auch hier im ORT. Die *Sham*- Mäuse befassten sich 2 Wochen nach dem Trauma signifikant länger mit dem neuen Objekt als die SHT- Mäuse. Der d-Wert nach Cohens beträgt: -0,52. Dies deutet darauf hin, dass Sham-Tiere das neue Objekt auch als neu erkannten und es, gemäß ihrem natürlichen Verhalten, intensiver untersuchten (Lueptow, 2017). 4 Wochen nach Operation gab es bereits keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen mehr.

Jedoch untersuchten die Mäuse der Sham-Gruppe 2 Wochen post OP den bekannten Gegenstand signifikant öfter als Mäuse der TBI- Gruppe. Der ermittelte d-Wert beträgt -0,7. Auch bei der Anzahl der Kontakte zu den Gegenständen gab es 4 Wochen nach Operation keine signifikanten Differenzen zwischen den Gruppen mehr.

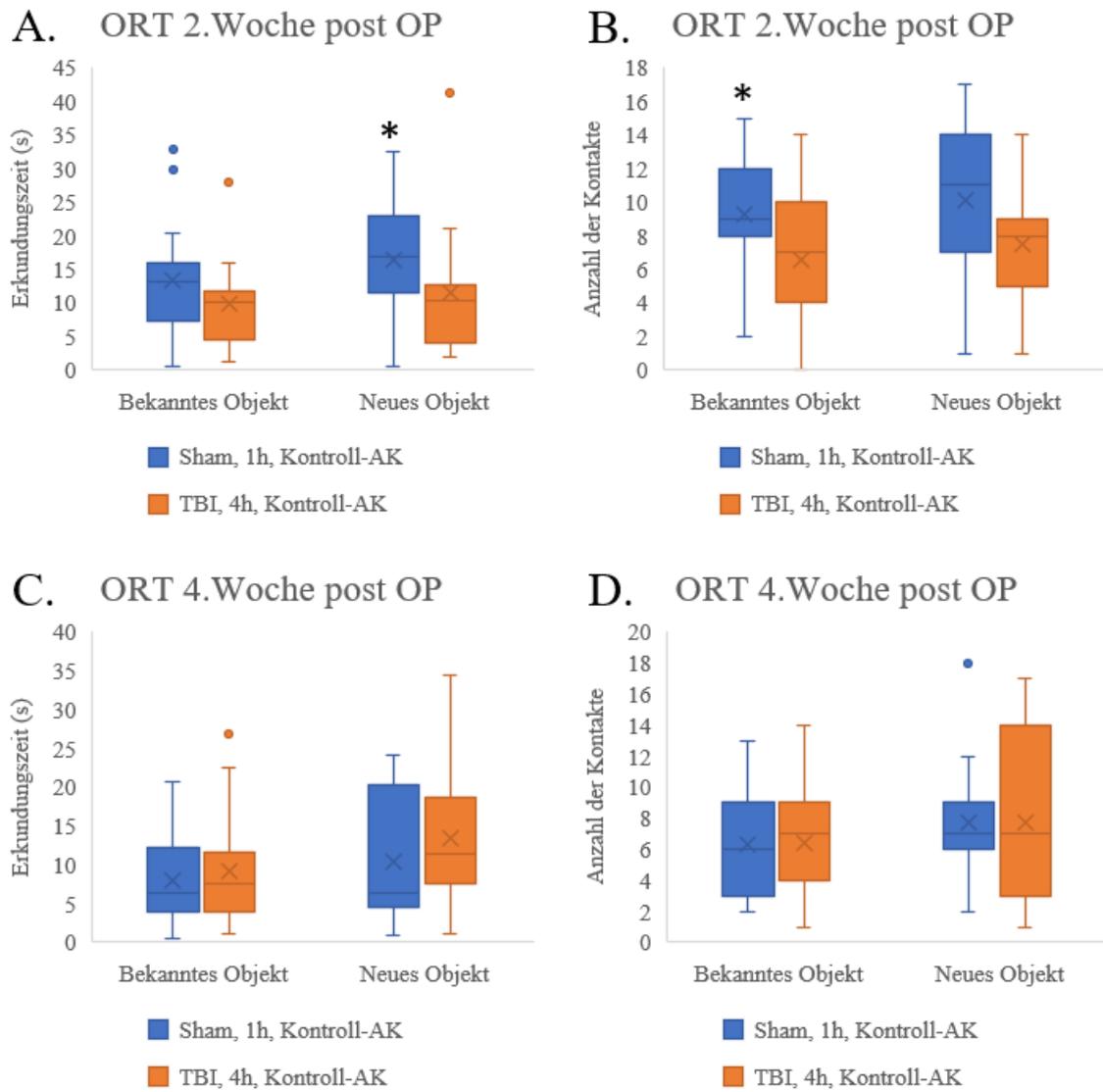


Abbildung 15: Object Recognition Test (ORT) Vergleich Erkundungszeit (A,C)/ Kontaktanzahl (B,D) der Sham/TBI-Tiere, bekanntes/neues Objekt, n=15 in jeder Gruppe, Daten zeigen mögliche Ausreißer, Minimum, Maximum, Median, IQA; \* signifikantes Ergebnis  $p < 0,05$  im Vergleich zu TBI

#### 4.4.2 Verhalten im *Object Recognition* Test nach Behandlung mit dem Anti-Interleukin-1-beta-Antikörper

Bei der Analyse möglicher Effekte des verabreichten Antikörpers, fällt beim Vergleich der Erkundungszeit auf, dass 2 Wochen nach Operation Tiere, welche den Anti-IL-1-beta-AK injiziert bekommen haben, sowohl den bekannten als auch den ausgetauschten Gegenstand statistisch signifikant länger erforschten als Tiere, die nur mit dem Kontroll-AK behandelt wurden. Der für das bekannte Objekt berechnete d-Wert beträgt 0,8 und ist somit starker Effekt nach der Einteilung von Cohen. Für das neue Objekt liegt der d-Wert bei 0,76 und mittelstarker Effekt nach der Einteilung von Cohen. Es scheint, dass die durch den Anti-Interleukin-1-beta-Antikörper erzielte Entzündungshemmung kaum einen Effekt auf die Gedächtnisleistung der Mäuse ausgeübt hat.

Auch untersuchten Mäuse, die den Anti-IL-1-beta-AK erhalten haben, beide Gegenstände öfter als Mäuse der Placebogruppe, was diese Annahme unterstreicht. Der d-Wert für das bekannte Objekt beträgt 0,94. So liegt gemäß der Einteilung nach Cohen ein starker Effekt vor. Die Effektstärke nach Cohen für das neue Objekt liegt bei  $d=0,65$  und ist demnach mittelstark.

4 Wochen nach Operation ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen mehr finden.

Betrachtet man die unterschiedlichen Behandlungszeitpunkte, sieht man, dass sich Mäuse, die den Antikörper erst 4h nach der Operation erhalten haben, signifikant öfter mit dem bekannten Gegenstand beschäftigten als Mäuse, deren Behandlung bereits eine Stunde nach der Operation stattfand. Nach der Einteilung nach Cohen ist der Effekt mittelstark ( $d=0,63$ ).

So lässt sich vermuten, dass eine frühere Behandlung die Gedächtnisleistung der Maus positiv beeinflusst. Nach 4 Wochen lässt sich dieser signifikante Unterschied nicht mehr nachweisen.

Beim Vergleich aller anderen Gruppen zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede.

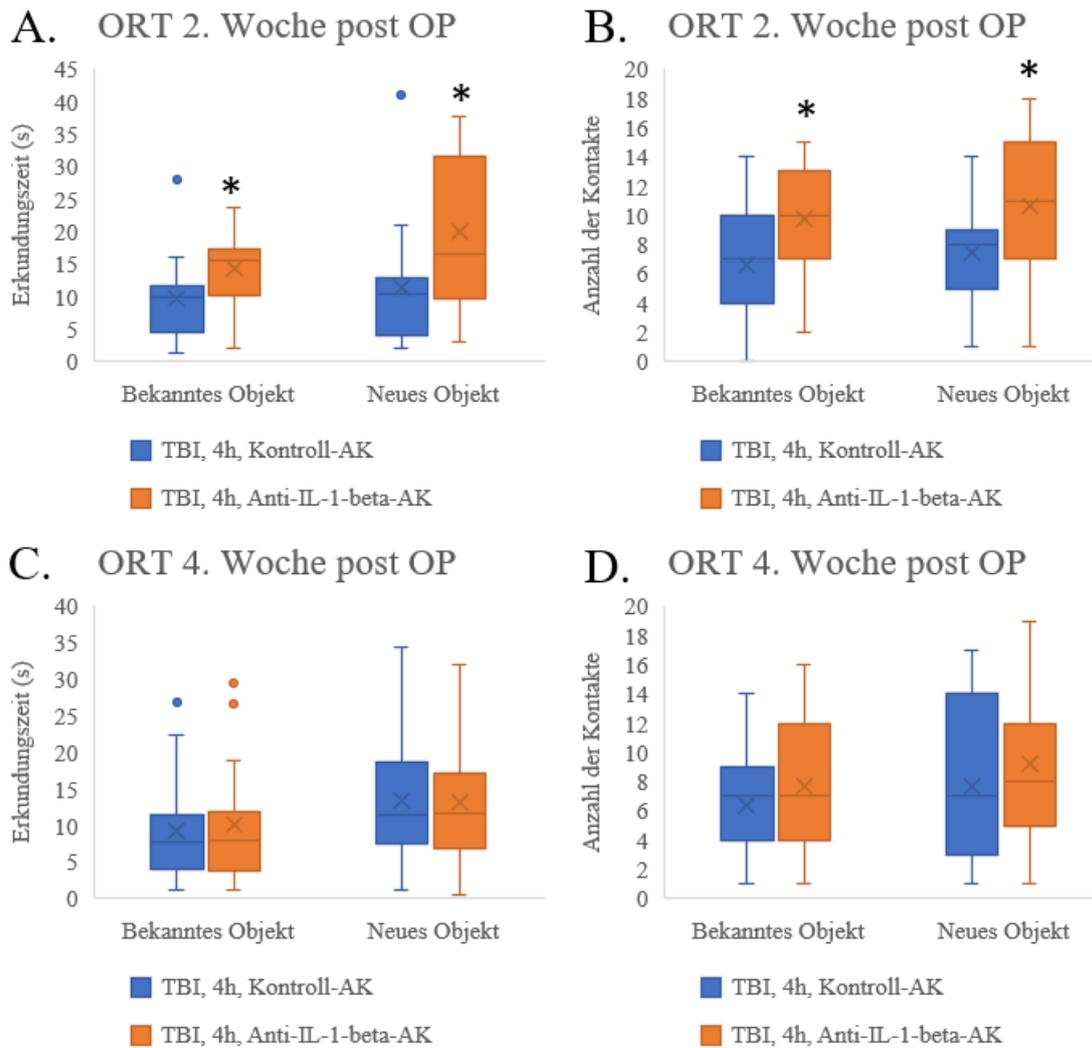


Abbildung 16: Object Recognition Test (ORT) Vergleich Erkundungszeit (A,C) / Kontaktanzahl (B,D) Kontroll-AK/Anti-IL-1-beta-AK; Behandlungsbeginn nach 1h/4h, bekanntes/neues Objekt, n=15 in jeder Gruppe, Daten zeigen mögliche Ausreißer, Minimum, Maximum, Median, IQA; \* signifikantes Ergebnis  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontroll-AK Gruppe

#### 4.5 Auszählung der Astrozyten im Hirngewebe

Für die Analyse der Astrozyten im Gehirn wurde eine Auswahl an Mäusen getroffen. So wurden für die Untersuchung 26 Mäuse aus 2 TBI- Gruppen (7 Behandlung mit Kontroll-AK und 5 Anti-IL-1beta-AK, 1h nach Trauma) und aus zwei Sham- Gruppen (8 Behandlung mit Kontroll-AK und 6 Anti-IL-1beta-AK, 1h nach Trauma) gewählt. Insgesamt wurden 698 Fotos ausgezählt.

Treatment	Maus Nummer	Gezählte Hippocampi	Gezählte Fotos	Durchschnitt gezählte Zellen	Zellen insgesamt
Sham, 1h, Kontroll-AK	11	8	24	0,54	13
Sham, 1h, Kontroll-AK	13	12	37	2,62	97
Sham, 1h, Kontroll-AK	36	3	4	0,5	2
Sham, 1h, Kontroll-AK	37	8	24	1,29	31
Sham, 1h, Kontroll-AK	41	7	21	0,38	8
Sham, 1h, Kontroll-AK	70	10	30	0,93	28
Sham, 1h, Kontroll-AK	71	6	18	3,33	60
Sham, 1h, Kontroll-AK	86	9	27	2,59	70
TBI, 1h, Kontroll-AK	10	8	24	0,67	16
TBI, 1h, Kontroll-AK	12	12	35	0,36	13
TBI, 1h, Kontroll-AK	15	12	36	2,11	48
TBI, 1h, Kontroll-AK	42	11	35	0,83	29
TBI, 1h, Kontroll-AK	44	6	18	1,44	26
TBI, 1h, Kontroll-AK	65	4	12	1,67	20
TBI, 1h, Kontroll-AK	75	16	48	1,44	69
Sham, 1h, Anti-IL-1-beta-AK	18	9	27	1,19	32
Sham, 1h, Anti-IL-1-beta-AK	30	14	42	1,02	43
Sham, 1h, Anti-IL-1-beta-AK	46	8	24	1,46	35
Sham, 1h, Anti-IL-1-beta-AK	53	4	12	1,58	19
Sham, 1h, Anti-IL-1-beta-AK	89	16	48	2,46	118
Sham, 1h, Anti-IL-1-beta-AK	90	6	18	2,17	39
TBI, 1h, Anti-IL-1-beta-AK	16	4	12	1,25	15
TBI, 1h, Anti-IL-1-beta-AK	25	14	41	2,32	95
TBI, 1h, Anti-IL-1-beta-AK	51	7	21	3	63
TBI, 1h, Anti-IL-1-beta-AK	76	7	21	4,24	89
TBI, 1h, Anti-IL-1-beta-AK	83	13	39	3,23	126

Tabelle 9: Auszählung Astrozytenfärbung

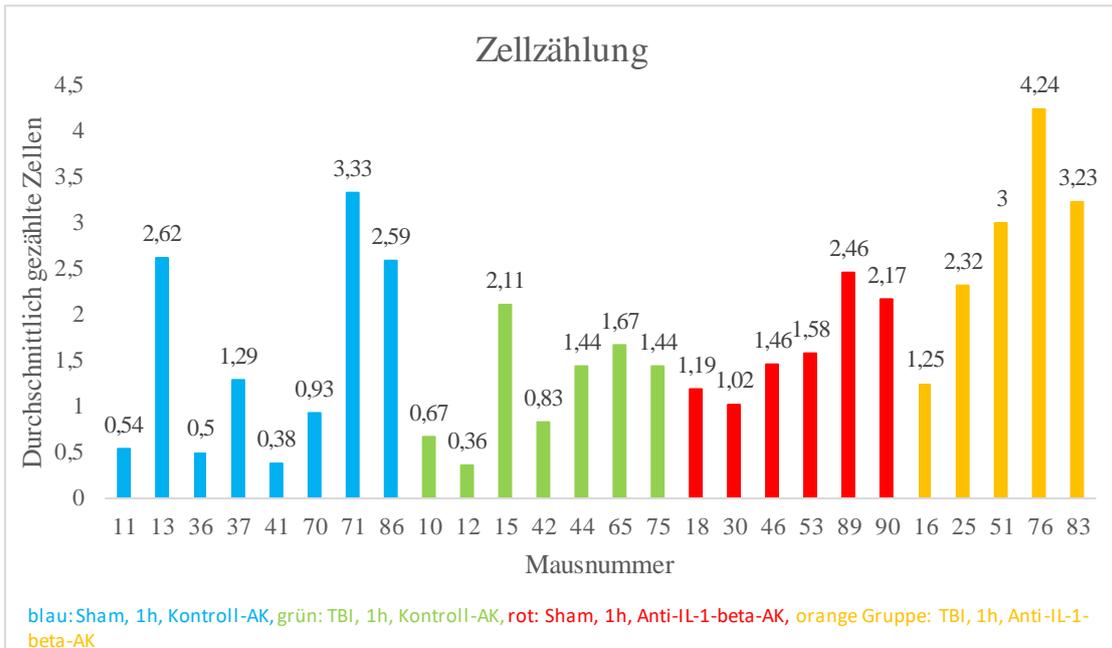


Abbildung 17: Durchschnitt gezählter Zellen der Hirschnitte der einzelnen Mäuse

Für die Zählung wurde nur die CA3- Region des Hippocampus berücksichtigt, da im Cortex zu wenige Zellen zu finden waren.

Ein ROI ist 218,47  $\mu\text{m}$  x 163,7  $\mu\text{m}$  groß.

Die Verteilung aller insgesamt gezählten Zellen ist nicht normalverteilt. Wenn jedoch die durchschnittlich gezählten Zellen der einzelnen Mäuse innerhalb der jeweiligen Gruppe gewertet werden, liegt eine Normalverteilung der Daten vor.

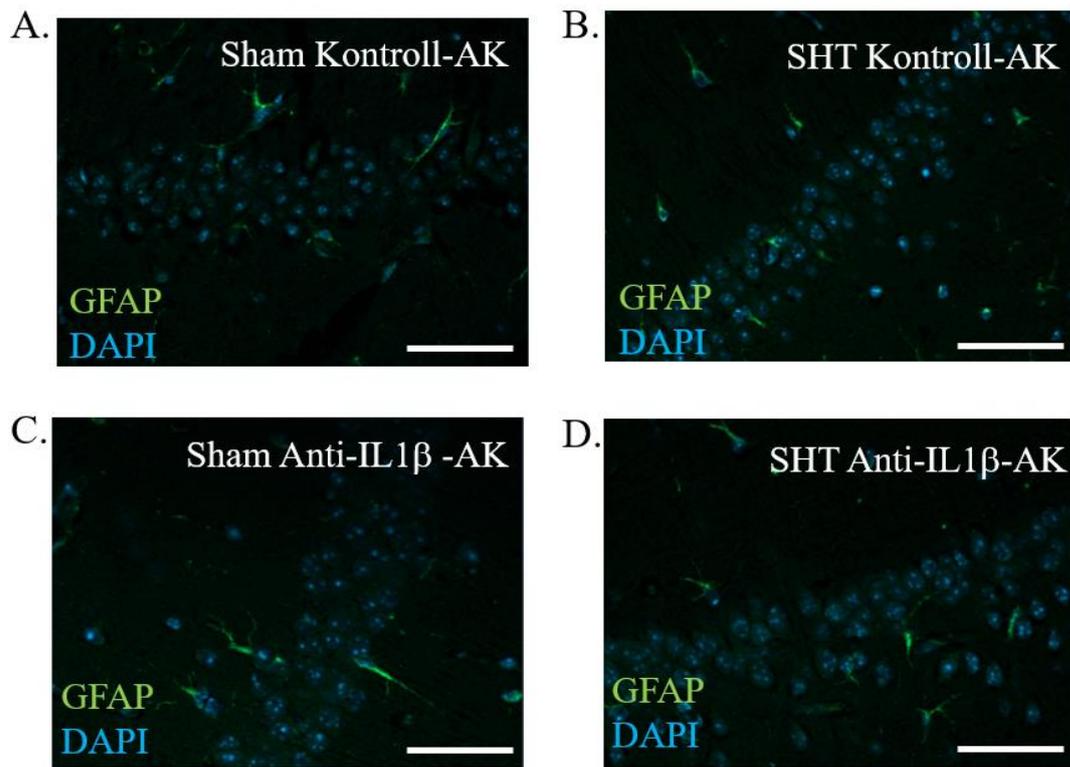


Abbildung 18: Ausgewählte Beispiele von Immunfärbungen gegen den Astrozyten Marker, saures Gliafaserprotein (GFAP), Zellkerne gegengefärbt mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI). Maßstab= 50  $\mu$ m

### 4.5.1 Sham vs. SHT

Die Auszählungen von GFAP-gefärbten Zellen im Hippocampus zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen der Sham-Gruppe ( $1,52 \pm 0,38$  Zellen/ROI,  $n=8$ , Mittelwert  $\pm$  SEM) und der SHT-Gruppe ( $1,22 \pm 0,22$  Zellen/ROI,  $n=7$ , Mittelwert  $\pm$  SEM).

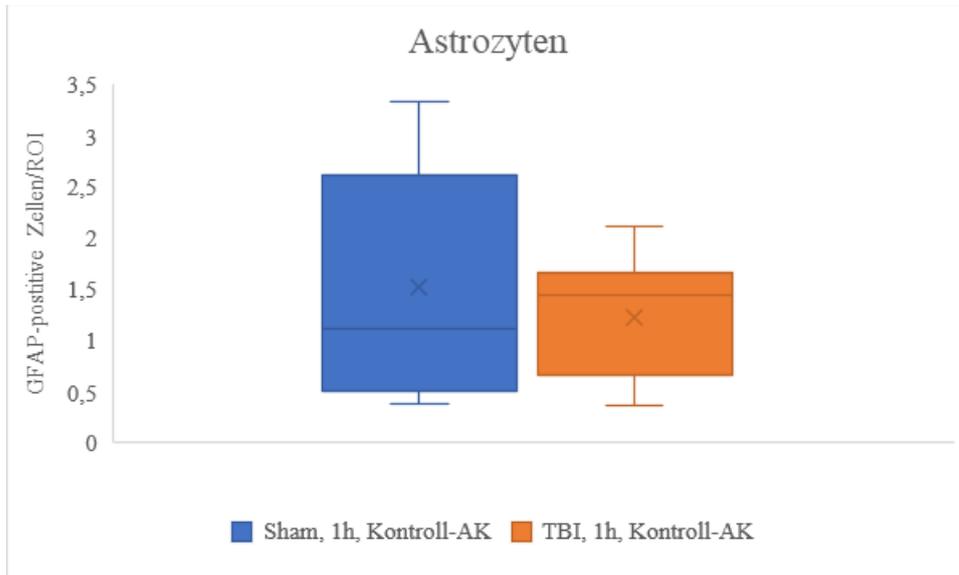


Abbildung 19: Durchschnittliche Zellzahl Sham/TBI; Daten zeigen mögliche Ausreißer, Minimum, Maximum, Median und den Iq

#### 4.5.2 Einfluss von Behandlung mit Anti-IL-1beta Antikörper

Beim Vergleich der Ergebnisse der Zellzählungen im Hippocampus der Gruppe mit Kontroll-Antikörperbehandlung ( $1,22 \pm 0,22$  Zellen/ROI, Mittelwert  $\pm$  SEM,  $n=7$ ) und der Gruppe mit Anti-IL-1beta-Antikörper Behandlung ( $2,81 \pm 0,44$  Zellen/ROI, Mittelwert  $\pm$  SEM,  $n=5$ ) gab es überraschend einen signifikanten Unterschied zwischen den Behandlungen (Abb. 20 A).

Bei Sham-Mäusen konnte kein Unterschied bei den gezählten GFAP-positive Zellen zwischen den Behandlungen festgestellt werden (Kontroll-AK:  $1,52 \pm 0,38$  Zellen//ROI,  $n=8$ ; Anti-IL-1beta-AK:  $1,65 \pm 0,21$  Zellen/ROI,  $n=6$ , Mittelwert $\pm$  SEM).

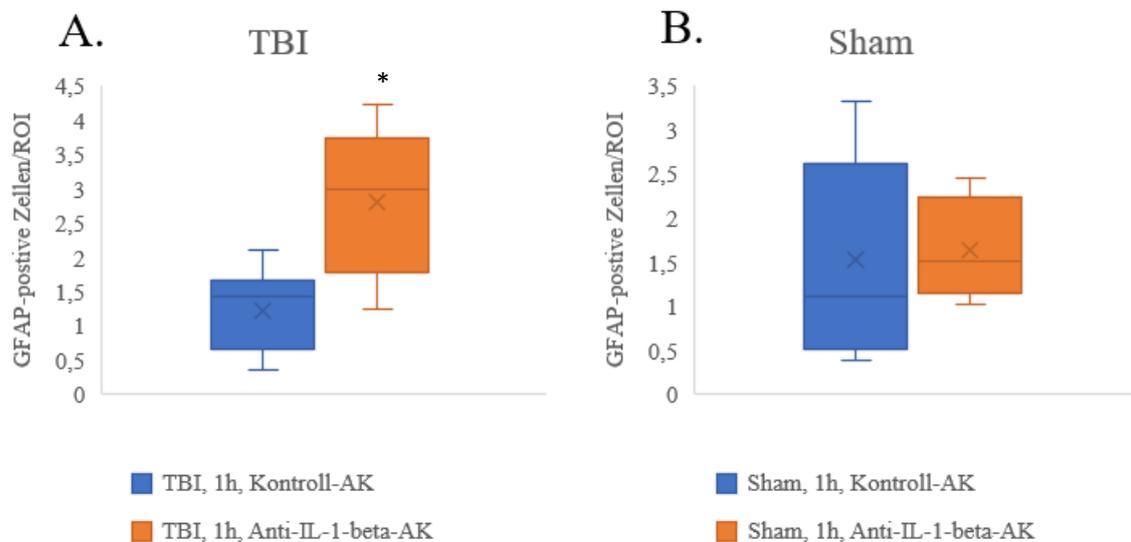


Abbildung 20: Durchschnittliche Zellzahl; A: TBI, B: Sham; \* signifikant  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrollgruppe; Daten zeigen mögliche Ausreißer, Minimum, Maximum, Median und den Iqa

## 5 Diskussion

### 5.1 Körpergewichtskontrolle

Wie aus anderen Studien bereits bekannt, kommt es nach SHT sowohl bei Menschen (Crenn et al., 2014), als auch bei Mäusen vorübergehend zu einer Reduktion des Körpergewichts (Rauen et al., 2013). Diese Gewichtsminderung am ersten Tag nach der Operation zeigten auch die Mäuse in dieser Studie. Mögliche Erklärungen sind Störungen im neuroendokrinen System, welche z.B. nach SHT durch das Controlled Cortical Impact (CCI) Verfahren, einem anderen Verfahren, um ein SHT bei Nagern zu induzieren, gesehen wurden (Taylor et al., 2008). Durch die nachfolgende Entzündungsreaktion des Gewebes entsteht ein Ungleichgewicht im Cortisonhaushalt. So kommt es insbesondere in den ersten Stunden nach SHT zu einer Aktivierung der HPA, sodass ein kurzzeitiger Anstieg der Cortisonkonzentration folgt (Tapp et al., 2019). Das wiederum beeinträchtigt die Futteraufnahme der Mäuse (Taylor et al., 2013); (Schwartz et al., 2000); (Fang et al., 2011). Da zwischen keiner der verglichenen Gruppen statistisch signifikante Unterschiede belegt werden konnten, ist davon auszugehen, dass in dieser Studie weder die Gabe von Anti- Interleukin- 1- beta Antikörpern (statt des Kontrollantikörpers), noch die Injektion nach einer bzw. nach 4 Stunden Auswirkungen auf die Entwicklung des Körpergewichts haben.

### 5.2 Neurological Severity Score

Nach einem erlittenen Schädelhirntrauma durch das *Weight Drop* Modell, bietet der verwendete NSS eine sehr gute Möglichkeit, die initiale Schwere des Traumas sowie die Erholung von diesem einzuschätzen (Albert-Weissenberger et al., 2012); (Tsenter et al., 2008). Erklärungen für die durch das Weight Drop Modell verursachten sensomotorischen Defizite bei Mäusen sind unter anderem ein entstehendes Hirnödem, Untergang von Neuronen sowie diffuse axonale Zellschädigungen (Aertker et al., 2016; Albert-Weissenberger et al., 2012; Chen et al., 1996; Foda & Marmarou, 1994; Ma et al., 2019; Marmarou et al., 1994).

Die inflammatorischen Reaktionen im Anschluss an das TBI haben sowohl positive als auch negative Auswirkungen auf das ZNS. So steigt z.B. die Zahl der sich im ZNS befindlichen Neutrophilen Zellen stark an. Dies dient zwar dem Schutz vor Pathogenen, bewirkt aber z.B. durch die gesteigerte Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies

(ROS) eine Verschlimmerung der Sekundärläsion. ROS können Makromoleküle irreversibel oxidieren und so die Zellen schädigen (Rauchman et al., 2023). Es konnte gezeigt werden, dass durch eine Reduzierung der Neutrophilenzahl eine Verkleinerung des Schadengebiets, sowie ein geringerer neuronaler Zellverlust erzielt werden kann (Morganti-Kossmann et al., 2019). Normalerweise umfassen die Aufgaben der Mikrogliazellen die Phagozytose geschädigter Zellen und Zelltrümmer, die Organisation der Zirkulation sowie die Regulation der Synapsen. Auch fördern sie die Angiogenese und Wundheilung (Witcher et al., 2015). Als Reaktion auf ein Trauma ändern die Mikroglia jedoch ihren Phänotyp und ihre Funktion und setzen nun in ihrer M1-Form verstärkt proinflammatorische Zytokine z.B. IL-1-beta und IL-6 frei. Es wird vermutet, dass sie so die Alterung des Gehirns und die Entwicklung von neurologischen Erkrankungen, z.B. Parkinson, fördern (Morganti-Kossmann et al., 2019). Der M2-Phänotyp ist eher antiinflammatorisch.

Astrozyten sind normalerweise an der Aufrechterhaltung der Bluthirnschranke und der metabolischen Versorgung der Neuronen beteiligt. Nach dem Trauma werden diese Zellen aktiviert, die Konzentration von GFAP wird hochreguliert, und die Astrozyten können zum Läsionsort migrieren. Zudem synthetisieren sie viele Chemo- und Zytokine und aktivieren Neutrophile und Mikrogliazellen. Des Weiteren kann sich durch ATP-Mangel eine intrazelluläre Anschwellung der Astrozyten ereignen. Kalium- und Natriumausstrom und Calciumeinstrom führen zu einem Ionenungleichgewicht, was wiederum durch Anschwellen der Astrozyten die Bildung eines zytotoxischen Hirnödems fördert (Morganti-Kossmann et al., 2019). Zudem kann der Energiemangel Funktionsstörungen der astrozytären Glutamat- und Ionentransporter hervorrufen, sodass diese nicht mehr effektiv Glutamat aus dem synaptischen Spalt entfernen und so der Exzitotoxizität entgegenwirken können. Im synaptischen Spalt bindet Glutamat an NMDA-Rezeptoren und führt so zu einer Öffnung der Natriumkanäle, was eine neuronale Zellschwellung nach sich zieht. Zudem werden auch Calciumkanäle geöffnet. Das freiwerdende Calcium setzt eine destruktive Kaskade in Gang. Es kommt zur Freisetzung von katabolischen Enzymen, die zu einer Zellzerstörung und somit zur Apoptose und Nekrose führen. Freies intrazelluläres Calcium stört auch die Mitochondrien in ihrer Funktion der ATP-Gewinnung. Andererseits kann oxidiertes Glutamat zur ATP Gewinnung genutzt werden (Rauchman et al., 2023). Zusätzlich

bilden sie Glianarben, welche zwar die Entzündung örtlich begrenzen, aber auch ein Sprießen der Axone und somit die Wiederherstellung neuronaler Funktion behindern. Jedoch bilden Astrozyten regenerationsfördernde Faktoren, wie z.B. das calciumbindendes Protein S100 $\beta$ , welches insbesondere die Neurogenese im Hippocampus fördert (Rauchman et al., 2023; Witcher et al., 2015).

Durch die Störungen der Blut-Hirnschranke gelangen proinflammatorische Mediatoren in die systemische Blutbahn und in die peripheren Organe. Dies kann zu einer systemischen Immunantwort, Hyperinflammation und Multiorganversagen führen. Aber auch systemische Chemo- und Zytokine können in das Gehirn gelangen und die Entzündungsreaktion dort verstärken. Durch diese Mechanismen können sich im Anschluss an das TBI Autoimmunerkrankungen entwickeln (Morganti-Kossmann et al., 2019). In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass die systemische Gabe von IL-1-beta sowohl die Läsionsgröße, als auch die Veränderungen in den Verhaltensweisen verstärkt, wohingegen die Neutralisation von IL-1-beta zu einem verminderten Gewebsverlust, einem geringeren Hirnödem und zu einer kognitiven Verbesserung führt (Morganti-Kossmann et al., 2019). Ebenso kann die Injektion eines IL-1-Rezeptor-Antagonisten die Schäden nach SHT minimieren.

Jedoch könnte die Neuroinflammation regenerative Prozesse z.B. bei der Neurogenese unterstützen. Es konnte beobachtet werden, dass nach einem SHT sowohl neuronale Stammzellen (NPC), als auch Körnerzellen eine gesteigerte Proliferation aufweisen. Des Weiteren migrieren auch vermehrt Zellen zum Läsionsort, was wiederum die Regeneration unterstützt (Morganti-Kossmann et al., 2019).

In der ersten Wochen nach einem Trauma verfügt das Gehirn über neuroregenerative Mechanismen, um sich von dem entstandenen Schaden zu erholen. So kann es wahrscheinlich durch die neuronale Plastizität und neue Synapsenverbindungen die Einschränkungen zum Teil ausgleichen (Nudo, 2006; Wieloch & Nikolich, 2006). Neuere Studien weisen auch auf eine regenerative Rolle der Mikroglia und Astrozyten nach ZNS-Verletzungen hin, die zu einer funktionellen Verbesserung beitragen können (Chen et al., 2020; Morganti-Kossmann et al., 2019).

Mäuse aus der TBI- Gruppe zeigten eine über den ganzen Beobachtungszeitraum hinweg andauernde Erholung der neurologischen Funktion. Alle untersuchten Mäuse

erreichten bei den ersten Untersuchungen einen Neuroscore von 3-4 von 10 möglichen Punkten, der sich in den ersten 24 Stunden nochmals verbesserte. Dies spricht für ein leichtes bis mittelschweres Schädel-Hirn-Trauma. Dass die Tiere initial keine fokalneurologischen Ausfälle aufwiesen, unterstreicht dies. Andere Studien mit diesem Modell zeigen ebenfalls, dass Mäuse mit einem ähnlich schweren Neuroscore eine Verbesserung der zuvor beobachteten Einschränkungen innerhalb der ersten Woche post OP erzielen (Flierl et al., 2009), (Khalin et al., 2016). Die Injektion von einem Anti- Interleukin-1-beta Antikörper scheint auf den erhobenen NSS keine Auswirkungen zu haben. Die in Bezug auf diese Hypothese verglichenen Gruppen zeigten an keinem Untersuchungstag signifikante Unterschiede. Auch zeigte der Zeitpunkt der Injektion, ob 1h oder 4h nach Operation, keinen signifikanten Effekt auf das funktionelle Outcome. Eine mögliche Ursache, warum in dieser Arbeit, im Vergleich zu bereits publizierten Studien (Ekmark-Lewén et al., 2016; Flygt et al., 2018; Ozen et al., 2020), keine Wirksamkeit der Anti-IL-1-beta-Therapie gesehen werden konnte, könnte eine zu geringe AK-Dosis gewesen sein. Weitere denkbare Gründe für den fehlenden Therapieerfolg könnten ein ungünstiger Injektionszeitpunkt und eine zu geringe Häufigkeit der Antikörpergabe sein. Rein hypothetisch könnte auch eine Unterbrechung der Kühlkette, sowie eine falsche Lagerung des Antikörpers zu einem Verlust der neutralisierenden Kapazität des AK geführt haben. Jedoch scheinen diese Möglichkeit aufgrund des fachgerechten Transports und der sachgerechten Lagerung des Antikörper-Aliquots bei -20°C sehr unwahrscheinlich.

### 5.3 *Open field* Versuch

Mäuse, die ein Schädelhirntrauma erlitten hatten, zeigten im *Open Field* Test ein hyperaktives Verhaltensmuster, da sie signifikant mehr und schneller gelaufen sind als Mäuse der *Sham*-Gruppe. Auch in der Literatur finden sich Belege für dieses Verhalten, sowohl in Tiermodellen (Lopez-Caperuchi et al., 2021; Malkesman et al., 2013; Mannix et al., 2014; Pallela et al., 2006; Schwarzbald et al., 2010; Sirén et al., 2006) als auch bei Menschen. Häufig auftretende Symptome umfassen sensorische und motorische Defizite, Probleme mit dem Gedächtnis und der Aufmerksamkeit, aber auch neuropsychiatrische Störungen, wie Depressionen, Angststörungen, Aggressivität bis hin zu suizidalem Verhalten (Malkesman et al., 2013). 10-30% der Kinder leiden nach einem leichten bis mittelschwerem Schädelhirntrauma an Aufmerksamkeitsstörungen,

Impulskontrollstörungen, Lernschwierigkeiten, Gedächtniseinschränkungen und an Hyperaktivität (Hadanny et al., 2022). Insbesondere Kinder können in der Folge eine ADHS- Symptomatik entwickeln (Max et al., 2005; Yeates et al., 2005). Ursächlich dafür können Verletzungen des subkortikalen Systems und die DAI sein (Tramontana et al., 2014). Eine andere mögliche Erklärung für das beobachtete Verhalten könnte die Schädigung des räumlichen Gedächtnisses sein, sodass die Maus nicht mehr in der Lage war, sich in der Box zu orientieren (Li et al., 2006; Mao et al., 2020; Schwarzbald et al., 2010).

#### 5.4 *Object Recognition* Test

Mäuse beschäftigen sich natürlicherweise länger mit neuen Gegenständen als mit ihnen bereits bekannten (Ennaceur & Delacour, 1988). Somit ist der *Object Recognition* Test ein geeignetes Verfahren, die Gedächtnisleistung der Mäuse zu untersuchen. Frühere Studien zeigen, dass Mäuse nach Schädelhirntrauma eine beeinträchtigte Gedächtnisfunktion haben, sodass sie sich, entgegen ihrer natürlichen Neugier, nicht intensiver mit dem neuen Objekt beschäftigen (Moojen et al., 2012; Stetter et al., 2021; Tsenter et al., 2008), da sie Schwierigkeiten haben, das bekannte Objekt auch als bereits bekannt zu erkennen. Auch in dieser Studie konnte gesehen werden, dass *Sham*-Mäuse den neuen Gegenstand signifikant länger erforschten als den bereits bekannten. Der Effekt, den das Trauma auf die Gedächtnisleistung der Mäuse hat, war aber bereits nach 4 Wochen nicht mehr nachweisbar, was durch die geringe Schwere des Traumas bedingt sein kann. Die Gedächtnisfunktion scheint auch durch den injizierten Antikörper kaum beeinflusst worden zu sein.

#### 5.5 Astrozytenfärbung

Durch die entzündliche Reaktion nach SHT werden sowohl Mikroglia, als auch Astrozyten aktiviert. Es kommt zur Astroglie, einer deutlichen Erhöhung der Anzahl aktivierter Astrozyten (Burda et al., 2016; Mannix et al., 2014; Pekny & Nilsson, 2005). Zudem steigt die Expression von GFAP deutlich an, weshalb eigentlich zu erwarten wäre, dass diese Zellen in den Präparaten der Mäuse mit SHT als Traumareaktion im Vergleich zu den *Sham*-Tieren signifikant häufiger nachzuweisen gewesen wären. Durch die lange Lagerung der Gehirne während der Corona Pandemie, befanden sich diese in einem schlechten Zustand, sodass die Färbung der Zellen durch die schlechte

Qualität nur noch bedingt möglich war. Des Weiteren war die Quantifizierung der Zellen aufgrund der schwachen Fluoreszenz und vielen leuchtenden Zellüberresten schwierig. Aus diesem Grund konnte nicht die Fluoreszenz als Zählkriterium genutzt werden, sondern die Sichtbarkeit eines Zellkerns durch die DAPI-Färbung.

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Trotz Verbesserungen in der Akutversorgung sind Therapiemöglichkeiten beim Schädelhirntrauma (SHT) begrenzt. Der klinische Verlauf des SHTs hängt erheblich von den sekundären neuroinflammatorischen Prozessen ab, die über Stunden bis Tage/Wochen nach dem ursprünglichen Trauma ablaufen und häufig zu einer progressiven Neurodegeneration führen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Erprobung eines entzündungshemmenden Therapieansatzes für SHT mit einem Anti-Interleukin-1-beta Antikörper.

Zur Induktion des SHTs wurde in dieser Arbeit das *Weight Drop* Modell verwendet; Testobjekte waren 90 zwölf Wochen alte, männliche Mäuse vom Stamm C57BL/6J. Diese wurden in sechs verschiedene Gruppen eingeteilt und später miteinander verglichen. Die einzelnen Gruppen erhielten entweder ein SHT oder eine Scheinoperation und die Injektion eines Anti-IL-1-beta AKs oder eines Kontrollantikörpers nach einer oder nach vier Stunden und nach 7 Tagen nach der Operation. Die mit dem Kontroll-AK behandelten SHT- Mäuse zeigten leichte Beeinträchtigungen im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren in allen durchgeführten Testverfahren (Gewichtskontrolle, NSS, *Open Field Test*, *Object Recognition Test*), die sich innerhalb der ersten Tage bis ersten 2 Wochen komplett zurückbildeten. Hierbei konnte keine Verbesserung des Outcomes durch die Therapie mit dem IL-1-beta-AK bei den Mäusen gesehen werden.

Da mehrere Studien (Ozen et al., 2020) (Flygt et al., 2018) (Ekmark-Lewén et al., 2016) einen therapeutischen Effekt der Interleukin 1 beta- Blockade auf das Outcome nach einem SHT aufzeigen konnten, wäre die Testung des Anti-IL-1-beta-AK in anderen, höheren Dosierungen oder bei Mäusen mit mittlerem bis schweren Schädelhirntrauma ein möglicher Ansatzpunkt für neue Studien.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abdelmalik, P. A., Draghic, N., & Ling, G. S. F. (2019). Management of moderate and severe traumatic brain injury. *Transfusion*, 59(S2), 1529-1538. <https://doi.org/10.1111/trf.15171>
- Aertker, B. M., Bedi, S., & Cox, C. S., Jr. (2016). Strategies for CNS repair following TBI. *Exp Neurol*, 275 Pt 3, 411-426. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.01.008>
- Albert-Weissenberger, C., & Sirén, A. L. (2010). Experimental traumatic brain injury. *Exp Transl Stroke Med*, 2(1), 16. <https://doi.org/10.1186/2040-7378-2-16>
- Albert-Weissenberger, C., Stetter, C., Meuth, S. G., Göbel, K., Bader, M., Sirén, A. L., & Kleinschnitz, C. (2012). Blocking of bradykinin receptor B1 protects from focal closed head injury in mice by reducing axonal damage and astroglia activation. *J Cereb Blood Flow Metab*, 32(9), 1747-1756. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2012.62>
- Albert-Weissenberger, C., Várrallyay, C., Raslan, F., Kleinschnitz, C., & Sirén, A. L. (2012). An experimental protocol for mimicking pathomechanisms of traumatic brain injury in mice. *Exp Transl Stroke Med*, 4, 1. <https://doi.org/10.1186/2040-7378-4-1>
- Bevins, R. A., & Besheer, J. (2006). Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. *Nat Protoc*, 1(3), 1306-1311. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.205>
- Brough, D., Rothwell, N. J., & Allan, S. M. (2015). Interleukin-1 as a pharmacological target in acute brain injury. *Exp Physiol*, 100(12), 1488-1494. <https://doi.org/10.1113/ep085135>
- Budinich, C. S., Tucker, L. B., Lowe, D., Rosenberger, J. G., & McCabe, J. T. (2013). Short and long-term motor and behavioral effects of diazoxide and dimethyl sulfoxide administration in the mouse after traumatic brain injury. *Pharmacol Biochem Behav*, 108, 66-73. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2013.04.001>
- Burda, J. E., Bernstein, A. M., & Sofroniew, M. V. (2016). Astrocyte roles in traumatic brain injury. *Exp Neurol*, 275 Pt 3(0 3), 305-315. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.03.020>
- Chemie, U. U. Z. E. k. (2021). *Leistungsverzeichnis Interleukin 1 beta FB-PÄ 6 IL-1β OE*. [https://www.uniklinik-ulm.de/fileadmin/default/09\\_Sonstige/Klinische-Chemie/Seiteninhalte/Seiteninhalte\\_I/Interleukin\\_1\\_beta\\_FB-PAE\\_6\\_IL-1ss\\_OE.pdf](https://www.uniklinik-ulm.de/fileadmin/default/09_Sonstige/Klinische-Chemie/Seiteninhalte/Seiteninhalte_I/Interleukin_1_beta_FB-PAE_6_IL-1ss_OE.pdf)
- Chen, Y., Constantini, S., Trembovler, V., Weinstock, M., & Shohami, E. (1996). An experimental model of closed head injury in mice: pathophysiology, histopathology, and cognitive deficits. *J Neurotrauma*, 13(10), 557-568. <https://doi.org/10.1089/neu.1996.13.557>
- Chen, Y., Li, J., Ma, B., Li, N., Wang, S., Sun, Z., Xue, C., Han, Q., Wei, J., & Zhao, R. C. (2020). MSC-derived exosomes promote recovery from traumatic brain injury via microglia/macrophages in rat. *Aging (Albany NY)*, 12(18), 18274-18296. <https://doi.org/10.18632/aging.103692>
- Clausen, F., Hånell, A., Björk, M., Hillered, L., Mir, A. K., Gram, H., & Marklund, N. (2009). Neutralization of interleukin-1beta modifies the inflammatory response and improves histological and cognitive outcome following traumatic brain

- injury in mice. *Eur J Neurosci*, 30(3), 385-396. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06820.x>
- Clausen, F., Hånell, A., Israelsson, C., Hedin, J., Ebendal, T., Mir, A. K., Gram, H., & Marklund, N. (2011). Neutralization of interleukin-1 $\beta$  reduces cerebral edema and tissue loss and improves late cognitive outcome following traumatic brain injury in mice. *Eur J Neurosci*, 34(1), 110-123. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07723.x>
- Crawley, J. N. (1999). Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice: experimental design and evaluation of general health, sensory functions, motor abilities, and specific behavioral tests. *Brain Res*, 835(1), 18-26. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(98\)01258-x](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(98)01258-x)
- Crenn, P., Hamchaoui, S., Bourget-Massari, A., Hanachi, M., Melchior, J. C., & Azouvi, P. (2014). Changes in weight after traumatic brain injury in adult patients: a longitudinal study. *Clin Nutr*, 33(2), 348-353. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2013.06.003>
- Dinarello, C. A., Simon, A., & van der Meer, J. W. (2012). Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nat Rev Drug Discov*, 11(8), 633-652. <https://doi.org/10.1038/nrd3800>
- Ekmark-Lewén, S., Flygt, J., Fridgeirsdottir, G. A., Kiwanuka, O., Hånell, A., Meyerson, B. J., Mir, A. K., Gram, H., Lewén, A., Clausen, F., Hillered, L., & Marklund, N. (2016). Diffuse traumatic axonal injury in mice induces complex behavioural alterations that are normalized by neutralization of interleukin-1 $\beta$ . *Eur J Neurosci*, 43(8), 1016-1033. <https://doi.org/10.1111/ejn.13190>
- Ennaceur, A., & Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res*, 31(1), 47-59. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(88\)90157-x](https://doi.org/10.1016/0166-4328(88)90157-x)
- Fang, J., DuBois, D. C., He, Y., Almon, R. R., & Jusko, W. J. (2011). Dynamic modeling of methylprednisolone effects on body weight and glucose regulation in rats. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*, 38(3), 293-316. <https://doi.org/10.1007/s10928-011-9194-4>
- Fleischmann, C., Shohami, E., Trembovler, V., Heled, Y., & Horowitz, M. (2020). Cognitive Effects of Astaxanthin Pretreatment on Recovery From Traumatic Brain Injury. *Front Neurol*, 11, 999. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00999>
- Flierl, M. A., Stahel, P. F., Beauchamp, K. M., Morgan, S. J., Smith, W. R., & Shohami, E. (2009). Mouse closed head injury model induced by a weight-drop device. *Nat Protoc*, 4(9), 1328-1337. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.148>
- Flygt, J., Ruscher, K., Norberg, A., Mir, A., Gram, H., Clausen, F., & Marklund, N. (2018). Neutralization of Interleukin-1 $\beta$  following Diffuse Traumatic Brain Injury in the Mouse Attenuates the Loss of Mature Oligodendrocytes. *J Neurotrauma*, 35(23), 2837-2849. <https://doi.org/10.1089/neu.2018.5660>
- Foda, M. A., & Marmarou, A. (1994). A new model of diffuse brain injury in rats. Part II: Morphological characterization. *J Neurosurg*, 80(2), 301-313. <https://doi.org/10.3171/jns.1994.80.2.0301>
- Hadanny, A., Catalogna, M., Yaniv, S., Stolar, O., Rothstein, L., Shabi, A., Suzin, G., Sasson, E., Lang, E., Finci, S., Polak, N., Fishlev, G., Harpaz, R. T., Adler, M., Goldman, R. E., Zemel, Y., Bechor, Y., & Efrati, S. (2022). Hyperbaric oxygen therapy in children with post-concussion syndrome improves cognitive and

- behavioral function: a randomized controlled trial. *Sci Rep*, 12(1), 15233.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-19395-y>
- Jorge, R. E., Robinson, R. G., Moser, D., Tateno, A., Crespo-Facorro, B., & Arndt, S. (2004). Major depression following traumatic brain injury. *Arch Gen Psychiatry*, 61(1), 42-50. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.61.1.42>
- Khalin, I., Jamari, N. L., Razak, N. B., Hasain, Z. B., Nor, M. A., Zainudin, M. H., Omar, A. B., & Alyautdin, R. (2016). A mouse model of weight-drop closed head injury: emphasis on cognitive and neurological deficiency. *Neural Regen Res*, 11(4), 630-635. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.180749>
- Lambertsen, K. L., Finsen, B., & Clausen, B. H. (2019). Post-stroke inflammation-target or tool for therapy? *Acta Neuropathol*, 137(5), 693-714.  
<https://doi.org/10.1007/s00401-018-1930-z>
- Li, S., Kuroiwa, T., Katsumata, N., Ishibashi, S., Sun, L. Y., Endo, S., & Ohno, K. (2006). Transient versus prolonged hyperlocomotion following lateral fluid percussion injury in mongolian gerbils. *J Neurosci Res*, 83(2), 292-300.  
<https://doi.org/10.1002/jnr.20720>
- Lopez-Caperuchi, S., Kürzinger, L., Hopp-Krämer, S., Albert-Weissenberger, C., Paul, M. M., Sirén, A. L., & Stetter, C. (2021). Posttraumatic learning deficits correlate with initial trauma severity and chronic cellular reactions after closed head injury in male mice. *Exp Neurol*, 341, 113721.  
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2021.113721>
- Lueptow, L. M. (2017). Novel Object Recognition Test for the Investigation of Learning and Memory in Mice. *J Vis Exp*(126). <https://doi.org/10.3791/55718>
- Ma, X., Aravind, A., Pfister, B. J., Chandra, N., & Haorah, J. (2019). Animal Models of Traumatic Brain Injury and Assessment of Injury Severity. *Mol Neurobiol*, 56(8), 5332-5345. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1454-5>
- Malkesman, O., Tucker, L. B., Ozl, J., & McCabe, J. T. (2013). Traumatic brain injury - modeling neuropsychiatric symptoms in rodents. *Front Neurol*, 4, 157.  
<https://doi.org/10.3389/fneur.2013.00157>
- Mannix, R., Berglass, J., Berkner, J., Moleus, P., Qiu, J., Andrews, N., Gunner, G., Berglass, L., Jantzie, L. L., Robinson, S., & Meehan, W. P., 3rd. (2014). Chronic gliosis and behavioral deficits in mice following repetitive mild traumatic brain injury. *J Neurosurg*, 121(6), 1342-1350.  
<https://doi.org/10.3171/2014.7.Jns14272>
- Mao, X., Terpolilli, N. A., Wehn, A., Cheng, S., Hellal, F., Liu, B., Seker, B., & Plesnila, N. (2020). Progressive Histopathological Damage Occurring Up to One Year after Experimental Traumatic Brain Injury Is Associated with Cognitive Decline and Depression-Like Behavior. *J Neurotrauma*, 37(11), 1331-1341.  
<https://doi.org/10.1089/neu.2019.6510>
- Marmarou, A., Foda, M. A., van den Brink, W., Campbell, J., Kita, H., & Demetriadou, K. (1994). A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics. *J Neurosurg*, 80(2), 291-300.  
<https://doi.org/10.3171/jns.1994.80.2.0291>
- Max, J. E., Schachar, R. J., Levin, H. S., Ewing-Cobbs, L., Chapman, S. B., Dennis, M., Saunders, A., & Landis, J. (2005). Predictors of attention-deficit/hyperactivity disorder within 6 months after pediatric traumatic brain injury. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 44(10), 1032-1040.  
<https://doi.org/10.1097/01.chi.0000173293.05817.b1>

- Maysami, S., Wong, R., Pradillo, J. M., Denes, A., Dhungana, H., Malm, T., Koistinaho, J., Orset, C., Rahman, M., Rubio, M., Schwaninger, M., Vivien, D., Bath, P. M., Rothwell, N. J., & Allan, S. M. (2016). A cross-laboratory preclinical study on the effectiveness of interleukin-1 receptor antagonist in stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*, 36(3), 596-605. <https://doi.org/10.1177/0271678x15606714>
- McCrea, M. A., Giacino, J. T., Barber, J., Temkin, N. R., Nelson, L. D., Levin, H. S., Dikmen, S., Stein, M., Bodien, Y. G., Boase, K., Taylor, S. R., Vassar, M., Mukherjee, P., Robertson, C., Diaz-Arrastia, R., Okonkwo, D. O., Markowitz, A. J., Manley, G. T., Adeoye, O., . . . Zafonte, R. (2021). Functional Outcomes Over the First Year After Moderate to Severe Traumatic Brain Injury in the Prospective, Longitudinal TRACK-TBI Study. *JAMA Neurol*, 78(8), 982-992. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2021.2043>
- Moojen, V. K., Damiani-Neves, M., Bavaresco, D. V., Pescador, B. B., Comim, C. M., Quevedo, J., & Boeck, C. R. (2012). NMDA preconditioning prevents object recognition memory impairment and increases brain viability in mice exposed to traumatic brain injury. *Brain Res*, 1466, 82-90. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.05.041>
- Morganti-Kossmann, M. C., Semple, B. D., Hellewell, S. C., Bye, N., & Ziebell, J. M. (2019). The complexity of neuroinflammation consequent to traumatic brain injury: from research evidence to potential treatments. *Acta Neuropathol*, 137(5), 731-755. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1944-6>
- Muradashvili, N., Tyagi, S. C., & Lominadze, D. (2017). Localization of Fibrinogen in the Vasculo-Astrocyte Interface after Cortical Contusion Injury in Mice. *Brain Sci*, 7(7). <https://doi.org/10.3390/brainsci7070077>
- Ng, K., Mikulis, D. J., Glazer, J., Kabani, N., Till, C., Greenberg, G., Thompson, A., Lazinski, D., Agid, R., Colella, B., & Green, R. E. (2008). Magnetic resonance imaging evidence of progression of subacute brain atrophy in moderate to severe traumatic brain injury. *Arch Phys Med Rehabil*, 89(12 Suppl), S35-44. <https://doi.org/10.1016/j.apmr.2008.07.006>
- Nudo, R. J. (2006). Mechanisms for recovery of motor function following cortical damage. *Curr Opin Neurobiol*, 16(6), 638-644. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2006.10.004>
- Obenaus, A., Ng, M., Orantes, A. M., Kinney-Lang, E., Rashid, F., Hamer, M., DeFazio, R. A., Tang, J., Zhang, J. H., & Pearce, W. J. (2017). Traumatic brain injury results in acute rarefaction of the vascular network. *Sci Rep*, 7(1), 239. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00161-4>
- Ozen, I., Ruscher, K., Nilsson, R., Flygt, J., Clausen, F., & Marklund, N. (2020). Interleukin-1 Beta Neutralization Attenuates Traumatic Brain Injury-Induced Microglia Activation and Neuronal Changes in the Globus Pallidus. *Int J Mol Sci*, 21(2). <https://doi.org/10.3390/ijms21020387>
- Pekny, M., & Nilsson, M. (2005). Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia*, 50(4), 427-434. <https://doi.org/10.1002/glia.20207>
- Pullela, R., Raber, J., Pfankuch, T., Ferriero, D. M., Claus, C. P., Koh, S. E., Yamauchi, T., Rola, R., Fike, J. R., & Noble-Haeusslein, L. J. (2006). Traumatic injury to the immature brain results in progressive neuronal loss, hyperactivity and delayed cognitive impairments. *Dev Neurosci*, 28(4-5), 396-409. <https://doi.org/10.1159/000094166>

- R. Firsching, E. R., U.M. Mauer, O.W. Sakowitz, M. Messing-Jünger, , & K. Engelhard, P. S., J. Linn, K. Schwerdtfeger. (2015). *Leitlinie Schädelhirntrauma im Erwachsenenalter*. AWMF.  
[https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/008-0011\\_S2e\\_Schaedelhirntrauma\\_SHT\\_Erwachsene\\_2015-12-abgelaufen.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/008-0011_S2e_Schaedelhirntrauma_SHT_Erwachsene_2015-12-abgelaufen.pdf)
- Rauchman, S. H., Zubair, A., Jacob, B., Rauchman, D., Pinkhasov, A., Placantonakis, D. G., & Reiss, A. B. (2023). Traumatic brain injury: Mechanisms, manifestations, and visual sequelae. *Front Neurosci*, *17*, 1090672.  
<https://doi.org/10.3389/fnins.2023.1090672>
- Rauen, K., Trabold, R., Brem, C., Terpolilli, N. A., & Plesnila, N. (2013). Arginine vasopressin V1a receptor-deficient mice have reduced brain edema and secondary brain damage following traumatic brain injury. *J Neurotrauma*, *30*(16), 1442-1448. <https://doi.org/10.1089/neu.2012.2807>
- Rickels, E., von Wild, K., & Wenzlaff, P. (2010). Head injury in Germany: A population-based prospective study on epidemiology, causes, treatment and outcome of all degrees of head-injury severity in two distinct areas. *Brain Inj*, *24*(12), 1491-1504. <https://doi.org/10.3109/02699052.2010.498006>
- Schimmel, S. J., Acosta, S., & Lozano, D. (2017). Neuroinflammation in traumatic brain injury: A chronic response to an acute injury. *Brain Circ*, *3*(3), 135-142.  
[https://doi.org/10.4103/bc.bc\\_18\\_17](https://doi.org/10.4103/bc.bc_18_17)
- Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte, D., Jr., Seeley, R. J., & Baskin, D. G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature*, *404*(6778), 661-671.  
<https://doi.org/10.1038/35007534>
- Schwarzbold, M. L., Rial, D., De Bem, T., Machado, D. G., Cunha, M. P., dos Santos, A. A., dos Santos, D. B., Figueiredo, C. P., Farina, M., Goldfeder, E. M., Rodrigues, A. L., Prediger, R. D., & Walz, R. (2010). Effects of traumatic brain injury of different severities on emotional, cognitive, and oxidative stress-related parameters in mice. *J Neurotrauma*, *27*(10), 1883-1893.  
<https://doi.org/10.1089/neu.2010.1318>
- Schwenkreis, P., Gonschorek, A., Berg, F., Meier, U., Rogge, W., Schmehl, I., Kern, B. C., Meisel, H. J., Wohlfarth, K., Gross, S., Sczesny-Kaiser, M., Tegenthoff, M., Boschert, J., Bruckmoser, R., Fürst, A., Schaan, M., Strowitzki, M., Pingel, A., Jägers, L. L., . . . Lemcke, J. (2021). Prospective observational cohort study on epidemiology, treatment and outcome of patients with traumatic brain injury (TBI) in German BG hospitals. *BMJ Open*, *11*(6), e045771.  
<https://doi.org/10.1136/bmjopen-2020-045771>
- Sidaros, A., Skimminge, A., Liptrot, M. G., Sidaros, K., Engberg, A. W., Herning, M., Paulson, O. B., Jernigan, T. L., & Rostrup, E. (2009). Long-term global and regional brain volume changes following severe traumatic brain injury: a longitudinal study with clinical correlates. *Neuroimage*, *44*(1), 1-8.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2008.08.030>
- Simon, D. W., McGeachy, M. J., Bayır, H., Clark, R. S., Loane, D. J., & Kochanek, P. M. (2017). The far-reaching scope of neuroinflammation after traumatic brain injury. *Nat Rev Neurol*, *13*(3), 171-191.  
<https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.13>
- Sirén, A. L., Radyushkin, K., Boretius, S., Kämmer, D., Riechers, C. C., Natt, O., Sargin, D., Watanabe, T., Sperling, S., Michaelis, T., Price, J., Meyer, B., Frahm, J., & Ehrenreich, H. (2006). Global brain atrophy after unilateral parietal

- lesion and its prevention by erythropoietin. *Brain*, 129(Pt 2), 480-489.  
<https://doi.org/10.1093/brain/awh703>
- Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*, 119(1), 7-35. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>
- Stetter, C., Lopez-Caperuchi, S., Hopp-Krämer, S., Bieber, M., Kleinschnitz, C., Sirén, A. L., & Albert-Weissenberger, C. (2021). Amelioration of Cognitive and Behavioral Deficits after Traumatic Brain Injury in Coagulation Factor XII Deficient Mice. *Int J Mol Sci*, 22(9). <https://doi.org/10.3390/ijms22094855>
- Tapp, Z. M., Godbout, J. P., & Kokiko-Cochran, O. N. (2019). A Tilted Axis: Maladaptive Inflammation and HPA Axis Dysfunction Contribute to Consequences of TBI. *Front Neurol*, 10, 345.  
<https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00345>
- Taylor, A. N., Rahman, S. U., Sanders, N. C., Tio, D. L., Prolo, P., & Sutton, R. L. (2008). Injury severity differentially affects short- and long-term neuroendocrine outcomes of traumatic brain injury. *J Neurotrauma*, 25(4), 311-323.  
<https://doi.org/10.1089/neu.2007.0486>
- Taylor, A. N., Tio, D. L., & Sutton, R. L. (2013). Restoration of neuroendocrine stress response by glucocorticoid receptor or GABA(A) receptor antagonists after experimental traumatic brain injury. *J Neurotrauma*, 30(14), 1250-1256.  
<https://doi.org/10.1089/neu.2012.2847>
- Teasdale, G., & Jennett, B. (1974). Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. *Lancet*, 2(7872), 81-84. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(74\)91639-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(74)91639-0)
- Tramontana, M. G., Cowan, R. L., Zald, D., Prokop, J. W., & Guillaumondegui, O. (2014). Traumatic brain injury-related attention deficits: treatment outcomes with lisdexamfetamine dimesylate (Vyvanse). *Brain Inj*, 28(11), 1461-1472.  
<https://doi.org/10.3109/02699052.2014.930179>
- Tsenter, J., Beni-Adani, L., Assaf, Y., Alexandrovich, A. G., Trembovler, V., & Shohami, E. (2008). Dynamic changes in the recovery after traumatic brain injury in mice: effect of injury severity on T2-weighted MRI abnormalities, and motor and cognitive functions. *J Neurotrauma*, 25(4), 324-333.  
<https://doi.org/10.1089/neu.2007.0452>
- Vella, M. A., Crandall, M. L., & Patel, M. B. (2017). Acute Management of Traumatic Brain Injury. *Surg Clin North Am*, 97(5), 1015-1030.  
<https://doi.org/10.1016/j.suc.2017.06.003>
- Vogel, A., Wilken-Schmitz, A., Hummel, R., Lang, M., Gurke, R., Schreiber, Y., Schäfer, M. K. E., & Tegeder, I. (2020). Low brain endocannabinoids associated with persistent non-goal directed nighttime hyperactivity after traumatic brain injury in mice. *Sci Rep*, 10(1), 14929. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71879-x>
- Walker, K. R., & Tesco, G. (2013). Molecular mechanisms of cognitive dysfunction following traumatic brain injury. *Front Aging Neurosci*, 5, 29.  
<https://doi.org/10.3389/fnagi.2013.00029>
- Werner, C., & Engelhard, K. (2007). Pathophysiology of traumatic brain injury. *Br J Anaesth*, 99(1), 4-9. <https://doi.org/10.1093/bja/aem131>
- Whyte, J., Nakase-Richardson, R., Hammond, F. M., McNamee, S., Giacino, J. T., Kalmar, K., Greenwald, B. D., Yablon, S. A., & Horn, L. J. (2013). Functional outcomes in traumatic disorders of consciousness: 5-year outcomes from the

- National Institute on Disability and Rehabilitation Research Traumatic Brain Injury Model Systems. *Arch Phys Med Rehabil*, 94(10), 1855-1860.  
<https://doi.org/10.1016/j.apmr.2012.10.041>
- Wieloch, T., & Nikolich, K. (2006). Mechanisms of neural plasticity following brain injury. *Curr Opin Neurobiol*, 16(3), 258-264.  
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2006.05.011>
- Witcher, K. G., Eiferman, D. S., & Godbout, J. P. (2015). Priming the inflammatory pump of the CNS after traumatic brain injury. *Trends Neurosci*, 38(10), 609-620. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2015.08.002>
- Xiong, Y., Mahmood, A., & Chopp, M. (2013). Animal models of traumatic brain injury. *Nat Rev Neurosci*, 14(2), 128-142. <https://doi.org/10.1038/nrn3407>
- Xiong, Y., Mahmood, A., & Chopp, M. (2018). Current understanding of neuroinflammation after traumatic brain injury and cell-based therapeutic opportunities. *Chin J Traumatol*, 21(3), 137-151.  
<https://doi.org/10.1016/j.cjtee.2018.02.003>
- Yeates, K. O., Armstrong, K., Janusz, J., Taylor, H. G., Wade, S., Stancin, T., & Drotar, D. (2005). Long-term attention problems in children with traumatic brain injury. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 44(6), 574-584.  
<https://doi.org/10.1097/01.chi.0000159947.50523.64>

## 8 Abkürzungsverzeichnis

AK: Antikörper

AM: Arithmetisches Mittel

Aqua dest.: Aqua destillata

BDNF: brain derived neurotrophic factor

bzw.: beziehungsweise

CCI: Controlled Cortical Impact

cm: Zentimeter

d: Tage

DAI: Diffuse axonale Verletzung

g: Gramm

GFAP: Glial fibrillary acidic protein

GCS: Glasgow Coma Scale

h: Stunde/n

HPA: hypothalamic-pituitary-adrenal axis / Stressachse

Iba-1: Ionized calcium binding adaptor molecule 1

ICD: International statistical classification of diseases and related health problems

IL-1 $\beta$ : Interleukin-1-beta

Insg.: insgesamt

Iqa: Interquartilsabstand

Md: Median

min: Minuten

NGF: nerve growth factor

NPC: Neuronal stem/ progenitor cells

NSS: Neurological severity score

OF: Open Field Test

OP: Operation

ORT: Object Recognition Test

ROI: Region of Interest

s: Sekunden

SEM: Standard error of mean

Sham: Scheinoperiert

SHT: Schädelhirntrauma

t: Zeit

TBI: Traumatic brain injury

u.a.: unter anderem

vs.: versus

$\mu$ l: Mikroliter

ZNS: Zentrales Nervensystem

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zeitlicher Ablauf der Versuche (*Kontroll-/ Interleukin- 1 beta-AK Injektion nach 1h/4h).....	16
Abbildung 2: schematische Zeichnung des Weight-Drop Apparates; Aus Albert-Weissenberger et al., 2012, eine Druckerlaubnis liegt nach Bestimmungen von Creative Commons Attribution CC-BY 2.0, ( <a href="http://creativecommons.org/licenses/by/2.0">http://creativecommons.org/licenses/by/2.0</a> ) vor...17	
Abbildung 3: A: Schematischer Aufbau des ORT; B: Ablauf ORT; C: Beispielaufnahmen des ORT .....	23
Abbildung 4 Verlauf des durchschnittlichen Gewichts aller Gruppen über den Versuchszeitraum. Gruppe A: TBI, Behandlung nach 4h, Kontrollantikörper, Gruppe B: Sham, Behandlung nach 1h, Kontrollantikörper. Gruppe C: TBI, Behandlung nach 1h, Anti-IL-1beta, Gruppe D: Sham, Behandlung nach 1h, Anti-IL-1beta, Gruppe E: TBI, Behandlung nach 4h, Anti-IL-1beta und Gruppe F: TBI, Behandlung nach 1h, Kontrollantikörper. Daten zeigen den Mittelwert $\pm$ Standardfehler; n=15 in jeder Gruppe. ....	30
Abbildung 5: Neurological Severity Score (NSS) aller Gruppen über den Versuchszeitraum. . Gruppe A: TBI, Behandlung nach 4h, Kontrollantikörper, Gruppe B: Sham, Behandlung nach 1h, Kontrollantikörper. Gruppe C: TBI, Behandlung nach 1h, Anti-IL-1beta, Gruppe D: Sham, Behandlung nach 1h, Anti-IL-1beta, Gruppe E: TBI, Behandlung nach 4h, Anti-IL-1beta und Gruppe F: TBI, Behandlung nach 1h, Kontrollantikörper. Daten zeigen den Mittelwert $\pm$ Standardfehler; n=15 in jeder Gruppe .....	31
Abbildung 6: Neurological Severity Score (NSS) der mit Placebo behandelten Gruppe über den Versuchszeitraum Daten zeigen den Mittelwert $\pm$ Standardfehler, n= 15 in jeder Gruppe; *Signifikanz 1. Tag: $p < 0,001$ ; *Signifikanz 3. Tag: $p < 0,016$ .....	32
Abbildung 7: Verlauf des NSS in den Tieren, die 1h nach SHT mit Kontrollantikörper oder Anti-IL-1beta Antikörper behandelt wurden. Daten zeigen den Mittelwert $\pm$ Standardfehler, n=15 in jeder Gruppe .....	33
Abbildung 8: Verlauf von NSS in den Tieren, die 4h nach SHT mit, Kontrollantikörper oder Anti-IL-1beta Antikörper behandelt wurden. Daten bezeichnen Mittelwert $\pm$ Standardfehler, n=15 in jeder Gruppe. ....	34
Abbildung 9: Verlauf von NSS in den Tieren, die 1h oder 4h nach SHT mit, Anti-IL-1beta Antikörper behandelt wurden. Daten bezeichnen Mittelwert $\pm$ Standardfehler, n=15 in jeder Gruppe.....	34
Abbildung 10: Verlauf von NSS in den Sham Tieren, die 1h nach Operation mit, Kontroll-Antikörper oder mit Anti-IL-1beta Antikörper behandelt wurden. Daten bezeichnen Mittelwert $\pm$ Standardfehler, n=15 in jeder Gruppe .....	35
Abbildung 11: Open Field Test (OF), Vergleich der zurückgelegten Distanz (A), der Geschwindigkeit (B), Aufenthaltshäufigkeit im Zentrum (C) Aufenthaltsdauer im Zentrum (D) der TBI/Sham-Mäuse, n= 15 in jeder Gruppe, Daten zeigen mögliche Ausreißer, Minimum, Maximum, Median und den Iqa, * signifikantes Ergebnis $p < 0,05$ im Vergleich zur Sham-Gruppe.....	37

Abbildung 12: Open Field Test (OF), Vergleich der zurückgelegten Distanz (A), der Geschwindigkeit (B), Aufenthaltshäufigkeit im Zentrum (C) Aufenthaltsdauer im Zentrum (D) der mit Kontroll-AK/ Anti-IL-1-beta-1-AK behandelten Mäuse, n= 15 in jeder Gruppe, Daten zeigen mögliche Ausreißer, Minimum, Maximum, Median und den Iqa, * signifikant $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle .....	39
Abbildung 13: Open Field Test (OF), Vergleich der zurückgelegten Distanz (A), der Geschwindigkeit (B), Aufenthaltshäufigkeit im Zentrum (C) Aufenthaltsdauer im Zentrum (D) der mit Kontroll-AK/ Anti-IL-1-beta-1-AK behandelten Mäuse, n= 15 in jeder Gruppe, Daten zeigen mögliche Ausreißer, Minimum, Maximum, Median und den Iqa, * signifikant $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle .....	40
Abbildung 14: Open Field Test (OF), Vergleich der zurückgelegten Distanz (A), der Geschwindigkeit (B), Aufenthaltshäufigkeit im Zentrum (C) Aufenthaltsdauer im Zentrum (D) der mit Kontroll-AK/ Anti-IL-1-beta-1-AK behandelten Mäuse, n= 15 in jeder Gruppe, Daten zeigen mögliche Ausreißer, Minimum, Maximum, Median und den Iqa, * signifikant $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle .....	41
Abbildung 15: Object Recognition Test (ORT) Vergleich Erkundungszeit (A,C)/ Kontaktanzahl (B,D) der Sham/TBI-Tiere, bekanntes/neues Objekt, n=15 in jeder Gruppe, Daten zeigen mögliche Ausreißer, Minimum, Maximum, Median, IQA; * signifikantes Ergebnis $p < 0,05$ im Vergleich zu TBI.....	43
Abbildung 16: Object Recognition Test (ORT) Vergleich Erkundungszeit (A,C) / Kontaktanzahl (B,D) Kontroll-AK/Anti-IL-1-beta-AK; Behandlungsbeginn nach 1h/4h, bekanntes/neues Objekt, n=15 in jeder Gruppe, Daten zeigen mögliche Ausreißer, Minimum, Maximum, Median, IQA; * signifikantes Ergebnis $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontroll-AK Gruppe.....	45
Abbildung 17: Durchschnitt gezählter Zellen der Hirnschnitte der einzelnen Mäuse.....	47
Abbildung 18: Ausgewählte Beispiele von Immunfärbungen gegen den Astrozyten Marker, saures Gliafaserprotein (GFAP), Zellkerne gegengefärbt mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI). Maßstab= 50 $\mu$ m.....	48
Abbildung 19: Durchschnittliche Zellzahl Sham/TBI; Daten zeigen mögliche Ausreißer, Minimum, Maximum, Median und den Iqa .....	49
Abbildung 20: Durchschnittliche Zellzahl; A: TBI, B: Sham; * signifikant $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrollgruppe; Daten zeigen mögliche Ausreißer, Minimum, Maximum, Median und den Iqa .....	50

## 10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte .....	12
Tabelle 2: Verwendete Software.....	12
Tabelle 3: Verwendete Materialien .....	13
Tabelle 4: Neutralisierender Antikörper .....	13
Tabelle 5: Primärantikörper .....	13
Tabelle 6: Sekundärantikörper.....	13
Tabelle 7: Verwendete Chemikalien .....	14
Tabelle 8: OF-Test, Vergleich der ersten 5 min mit den zweiten 5 min; 2 und 4 Wochen post OP, Daten zeigen Mittelwert $\pm$ Standardfehler; * signifikant $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle.....	38
Tabelle 9: Auszählung Astrozytenfärbung.....	46

## Danksagung

Für meine Doktorarbeit schulde ich vielen Menschen ein großes Dankeschön. Ganz besonders danke ich Fr. Prof. Dr. Sirén für die Bereitstellung des Themas, für die hervorragende Betreuung, Unterstützung und für die vielen Anregungen während meiner Arbeit. Ebenso möchte ich mich bei Frau Priv.- Doz. Dr. med. Camelia Monoranu und Herrn Prof. Dr. med. Manfred Heckmann für die wertvollen Anregungen und Kommentare und die Begutachtung meiner Arbeit bedanken. Darüber hinaus bedanke ich mich bei Frau Frauke Köhler, Frau Siglinde Kühnel und Frau Claudia Häußlein für die Einführung in die experimentelle Arbeit und Einweisung in die Methoden, sowie der tatkräftigen Unterstützung und Hilfe im Labor. Mein Dank gilt meinen Eltern für ihre Unterstützung, Hilfsbereitschaft und Geduld bei der Korrektur der Dissertation.

Ko-Autorschaft an der wissenschaftlichen Präsentation: Exner C, Štelfa G, Sjölund C, Fournier M-L, Schwarzmaier S, Stollburg E, Kürzinger L, Badaut J, Zvejniece L, Sirén A-L, Liraz Zaltsman S, Shohami E, Marklund N, Plesnila N. Neutralization of interleukin-1-beta after traumatic brain injury – preclinical evaluation using a blinded and randomised international multi-center trial protocol. 15<sup>th</sup> International Neurotrauma Society, Berlin 17-20 Juli, 2022.