

Aus dem Zentrum für Neurologie und Psychiatrie der Universität zu Köln

Klinik und Poliklinik für Neurologie

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

**Veränderungen der mikrovaskulären Architektur
nach wiederholter Gehirnerschütterung in der
subakuten und chronischen Phase im Mausmodell,
Assoziation mit Neurodegeneration und Störungen
der Blut-Hirn-Schranke und Intervention mittels
Dexamethason**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Lisa Carolin Maurer
aus Frechen

promoviert am 21. Mai 2026

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachterin: Universitätsprofessorin Dr. med. Dr. nat. med. M. A. Rüger
2. Gutachter: Professor Dr. rer. nat. M. Montesinos-Rongen

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich keine Unterstützungsleistungen erhalten.

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zur Erhebung der mikrovaskulären Veränderungen wurden von mir selbst nach Anleitung durch Dr. med. Stefan J. Blaschke, Dr. Nora Rautenberg, und Martin Lieb durchgeführt und eigenständig ausgewertet. Die für die Auswertung benötigte Software wurde von Herrn Dr. med. Stefan J. Blaschke erstellt und zur Verfügung gestellt. Die Färbungen des Immunglobulin G-Extravasats und die resultierenden Datensätze wurden von Aileen Jendro erhoben, ausgewertet und zur Verfügung gestellt. Die praktische Laborarbeit zur Erhebung der Last p-Tau-positiver Neuronenkerne wurden von Simon Schlömer erstellt, von Dr. med. Stefan J. Blaschke ausgewertet und zur Verfügung gestellt. Die Operation der Versuchstiere zur Beibringung des Traumas wurden von Dr. Nora Rautenberg und von Dr. med. Seda Demir durchgeführt und das Material zur Verfügung gestellt. Die Tierversuche des Dexamethason-Versuches sowie die Medikamentenapplikation wurden von Frau Dr. med. Seda Demir durchgeführt, die auch das Material zur Verfügung gestellt hat.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichtete mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 15.11.2025

Unterschrift:

Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei meiner Doktormutter Prof. Dr. Dr. Maria Adele Rüger und meinem Betreuer und Postdoc Dr. med. Stefan J. Blaschke für die Unterstützung bei der Durchführung des Forschungsprojektes und der Möglichkeit an diesem mitzuwirken. Die fachliche und menschliche Unterstützung hat mich nicht nur bei der Durchführung des Projektes bestärkt, sondern auch persönlich wachsen lassen.

Mein weiterer Dank gilt allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Neurale Stammzellen“ sowie Prof. Dr. Michael Schroeter und PD Dr. Sabine Vay für ihre Hilfestellung und fachlichen Diskussion im Rahmen der Labor Meetings. Ebenfalls möchte ich mich bei den anderen Arbeitsgruppen und allen Mitarbeitenden und Doktoranden des neurologischen Forschungslabors im FLEX-Gebäude für die fachliche und persönliche Unterstützung bedanken.

Ich bedanke ich mich bei Dr. Nora Rautenberg für die ausführliche Einarbeitung und Hilfestellung über die gesamte Zeit hinweg. Mein weiterer Dank gilt Elena Groß und Dr. med. Seda Demir, mit denen ich nicht nur gute Kolleginnen, sondern auch Freundinnen gewonnen habe. Vielen Dank an dieser Stelle auch an Martin Lieb und seine Einweisung in die Durchführung von Immunfluoreszenzfärbungen.

Ich danke Frau Dr. Claudia Wegscheid für die Koordination des SFB1451 und die Unterstützung im Rahmen des iRTG-Programmes. Mein Dank gilt ebenso dem SFB 1451 für die Möglichkeit der Mitarbeit und der Finanzierung durch das angebotene Promotionsstipendium, dessen Erhalt für mich eine große Ehre war.

Ich danke meinen Eltern, Jutta und Peter Maurer, für die wertvolle Unterstützung.

Mein Dank gilt ebenfalls meinen mainzer Freundinnen und Freunden, Selina, Sophia, Alexandra, Pierre und Phil. Bedanken möchte ich mich auch bei Daniela, Tina, Katharina und Alexandra; für die bedingungslose Unterstützung.

Inhalt

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	8
1. ZUSAMMENFASSUNG	9
2. EINLEITUNG	11
2.1 Schädel-Hirn-Traumata (SHT)	11
2.2 „Mild traumatic brain injury“ (mTBI) und “Gehirnerschütterung“	12
2.3 Epidemiologie von SHT und der Unterform mTBI	14
2.4 Gehirnerschütterungen im Sport	15
2.5 Klinisches Bild	16
2.6 Diagnostik	18
2.7 Behandlung	19
2.8 Folgeerkrankungen nach Gehirnerschütterungen	21
2.8.1. Post-Concussion-Syndrom	21
2.8.2. Chronisch-traumatische Enzephalopathie	22
2.9 Pathophysiologie	24
2.9.1. Neurochemische Kaskade	24
2.9.2. Traumatische axonale Schädigung	25
2.9.3. Beeinträchtigung der Blut-Hirn-Schranke und mikrovaskuläre Verletzung	26
2.10 Aufbau der Blut-Hirn-Schranke	26
2.10.1. Endothelzellen	27
2.10.2. Perizyten	28
2.10.3. Basalmembran	29
2.10.4. Astrozyten	29
2.11 Das glymphatische System	31
2.12 Neuroinflammation	33
2.13 Neurodegeneration	33
2.14 Fragestellungen und Ziel der vorliegenden Arbeit	35

3.	MATERIAL UND METHODEN	36
3.1.	Tierexperimentelles Modell	36
3.2.	Gewebeaufbereitung und Erstellen von Hirnschnitte am Kryostaten	39
3.3.	Immunhistochemische Färbungen gegen GFAP, Aquaporin-4 und Lectin	40
3.4.	Etablierung und immunhistochemische Färbung von Zonula Occludens – 1	41
3.5.	Korrelation der Parameter mit individuellen Markern von BHS-Störung und Neurodegeneration	41
3.6.	Mikroskopie	42
3.7.	Bildbearbeitung	43
3.7.1.	Erstellen einer Atlas-Maske	43
3.7.2.	Thresholding	45
3.8.	Automatisierte Auswertung	46
3.8.1.	Erhebung der Aquaporin-4- und GFAP-Coverage	46
3.8.2.	Erhebung der Aquaporin-4-Polarisation	47
3.9.	Statistik	48
4.	ERGEBNISSE	49
4.1	Blut-Hirn-Schranken-Charakteristika in der subakuten Phase nach CBI	49
4.1.1.	Aquaporin-4-Coverage in der subakuten Phase nach CBI	49
4.1.2.	GFAP-Coverage in der subakuten Phase nach CBI	51
4.1.3.	Aquaporin-4-Polarisation in der subakuten Phase nach CBI	52
4.2	Korrelation der BHS-Indices mit Immunglobulin G-Extravasat	53
4.2.1.	Korrelation von Aquaporin-4-Coverage und IgG-Extravasat	54
4.2.2.	Korrelation von GFAP-Coverage und IgG-Extravasat	55
4.2.3.	Korrelation von Aquaporin-4-Polarisation und IgG-Extravasat	56
4.3	BHS-Indices in der chronischen Phase nach CBI	57
4.3.1.	Aquaporin-4-Coverage der Blutgefäße in der chronischen Phase nach CBI	57
4.3.2.	GFAP-Coverage der Blutgefäße in der chronischen Phase nach CBI	58
4.3.3.	Aquaporin-4-Polarisation in der chronischen Phase nach CBI	60
4.4	Korrelation erhobener BHS-Indices mit phosphoryliertem Tau-Protein	61
4.4.1.	P-Tau Z-Scores nach Region	61
4.4.2.	Korrelation von Aquaporin-4-Coverage und p-Tau	62

4.4.3.	Korrelation von GFAP-Coverage und p-tau	63
4.4.4.	Korrelation von Aquaporin-4-Polarisation und p-Tau	63
4.5	Zusammenfassung der Ergebnisse aus Versuchsteil I	64
4.6	Modulation des mikrovaskulären Coverages mittels Dexamethason	65
4.6.1.	Aquaporin-4-Coverage in Dexamethason vs. Kontrolle	65
4.6.2.	GFAP-Coverage in Dexamethason vs. Kontrolle	66
4.6.3.	Aquaporin-4-Polarisation Dexamethason vs. Kontrolle	67
4.7	Zusammenfassung der Ergebnisse aus Versuchsteil II	67
4.8	Etablierung immunhistochemischer Darstellung von Zonula-Occludens-1	68
5.	DISKUSSION	70
5.1	Charakterisierung mikrovaskulärer Veränderungen in der subakuten und chronischen Phase nach CBI	71
5.1.1.	Mikrovaskuläre Veränderungen in der chronischen Phase, Korrelation mit neurodegenerativen Markern	71
5.1.2.	Mikrovaskuläre Veränderungen in der subakuten Phase, Korrelation mit Störungen der BHS 73	73
5.1.3.	Zusammenfassung mikrovaskulärer Veränderungen in der subakuten und chronischen Phase, Assoziation mit neurodegenerativen Markern	74
5.2	Charakterisierung des glymphatischen Systems, Korrelation mit Neurodegeneration	75
5.3	Modulation mittels Dexamethason	77
5.4	Etablierung der TJ-Färbung	78
5.5	Limitationen und andere Einflüsse	79
5.6	Fazit	81
6.	LITERATURVERZEICHNIS	83
7.	ANHANG	98
7.1	Abbildungsverzeichnis	98
7.2	Tabellenverzeichnis	103

Abkürzungsverzeichnis

ACRM	American Congress of Rehabilitation Medicine
AMBA	Allen Mouse Brain Atlas
AQP-Coverage	Aquaporin-4-Coverage
AQP-Polarisation	Aquaporin-4-Polarisation
ATP	Adenosintriphosphat
BHS	Blut-Hirn-Schranke
CBF	Cerebral Blood Flow
CBI	Concussive Brain Injury
CISG	Concussion in Sports Group
CRT	Concussion Recognition Tool
CSF	Cerebrospinal Fluid
CT	Computer Tomographie
CTE	Chronisch-traumatische Enzephalopathie
GAD	Generalized Anxiety Disorder 7
GCS	Glasgow-Coma-Scale
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
HE	Hämatoxylin-Eosin
IgG-Extravasat	Immunglobulin G-Extravasat
IL-1 β	Interleukin-1 β
ISF	Interstitial Fluid
MMP-9	Matrix Metalloproteinase-9
MRT	Magnetresonanztomographie
mTBI	Mild Traumatic Brain Injury
NVU	Neurovascular Unit
PCS	Post-Concussion-Syndrom
p-Tau	(hyper-) phosphoryliertes Tau-Protein
ROI	Region of Interest
SaG	Sport-assoziierte Gehirnerschütterung
SCAT	Sports Concussion Assessment Tool
SHT	Schädel-Hirn-Trauma
SNR	Signal-to-Noise-Ratio
TBI	Traumatic Brain Injury
TJ	Tight Junctions
TNF	Tumornekrosefaktor
VOMS	Vestibular/Ocular-Motor Screening
WHO	World Health Organization
ZO-1	Zonula Occludens-1

1. Zusammenfassung

Weltweit erleiden 50-60 Millionen Menschen pro Jahr ein Schädel-Hirn-Trauma (SHT), hiervon werden 90% als leichtes SHT, auch als „Gehirnerschütterung“ bezeichnet, eingestuft. Während sich die meisten Betroffenen innerhalb weniger Wochen von ihrer Verletzung erholen, ist ein gewisser Anteil der Betroffenen jedoch Wochen und Monate später nicht von der Verletzung genesen und zeigt langandauernde Beeinträchtigungen. Besonders repetitive Gehirnerschütterungen werden mit der neurodegenerativen Erkrankung chronisch-traumatische Enzephalopathie (CTE) in Verbindung gebracht. Die Pathophysiologie der CTE ist noch nicht vollständig verstanden und Gegenstand aktueller Forschungsbestrebungen. Diskutiert werden anhaltende Störungen der Blut-Hirn-Schranke und des glymphatischen Systems als potenzielle Mechanismen der Krankheitsentstehung nach wiederholten traumatischen Hirnschädigungen.

Um die Pathophysiologie der sekundären Neurodegeneration nach repetitiver Gehirnerschütterung zu untersuchen, bedienten wir uns des in der Arbeitsgruppe etablierten Closed-Head-Impact-Modells. Hierzu wurden männliche C56Bl/6J-Mäuse entweder einmalig oder mehrfach, letzteres wiederum nieder- und hochfrequent, einer Gehirnerschütterung unterworfen und zum subakuten (1 Woche; n = 18) und chronischen (3 Monate; n = 34) Zeitpunkt *ex vivo* immunhistochemisch untersucht. Hier dienten Aquaporin-4 und GFAP als Marker für mikrovaskuläre Veränderungen sowie Beeinträchtigungen des glymphatischen Systems, das Immunglobulin G-Extravasat sowie das Tight-Junction-Proteins Zonula Occludens-1 als Surrogat einer Blut-Hirn-Schrankenstörung, und phosphoryliertes Tau-Protein als Marker für neurodegenerative Veränderungen. In einem weiteren Versuchsteil erfolgte die präventive Gabe von Dexamethason zur Stabilisierung der Blut-Hirn-Schranke über 10 Tage im Vergleich zu einem verabreichten Placebo.

Mikrovaskuläre Veränderungen wurden anhand der Gefäßbedeckung (engl. „Coverage“) durch Aquaporin-4 und GFAP als Parameter für die Bedeckung der Gefäße durch astrozytäre Endfüße ermittelt. Zur Charakterisierung des glymphatischen Systems erfolgte die Untersuchung und Quantifizierung der Aquaporin-4-Polarisation. Zum chronischen Zeitpunkt, 82 Tage nach Gehirnerschütterung, konnten signifikante Veränderungen der Aquaporin-4- und der GFAP-Coverage der zerebralen Gefäße im Thalamus in den hochfrequent traumatisierten Tieren dargestellt werden. In der subakuten Phase, 7 Tage nach dem Trauma, zeigte diese Gruppe einen Trend zu einer Erhöhung der Aquaporin-4-Coverage im Thalamus. In der mit Dexamethason behandelten Gruppe zeigte sich ein Trend zur Erhöhung der kortikalen und

hippocampalen Aquaporin-4-, sowie der kortikalen GFAP-Coverage im Vergleich zu der Placebo-behandelten Kontrollgruppe.

Zusammenfassend konnte im vorliegenden Versuchsvorhaben eine chronische Störung der mikrovaskulären Architektur im Thalamus nach hochfrequenter Gehirnerschütterung nachgewiesen werden. Der Nachweis eines statistischen Zusammenhangs der mikrovaskulären Veränderungen mit dem vermehrten Auftreten einer Blut-Hirn-Schranken-Störung und neurodegenerativen Marker konnte allerdings nicht erbracht werden. Die vorliegenden Ergebnisse machen ein multifaktorielles Geschehen wahrscheinlich und dienen als Grundlage zukünftiger Forschungsvorhaben.

2. Einleitung

2.1 Schädel-Hirn-Traumata (SHT)

Schädel-Hirn-Traumata (engl. „traumatic brain injury“, TBI) stellen ein weltweites Problem und einen bedeutenden Grund von bleibenden Beeinträchtigungen und Folgekrankheiten dar.¹ Von allen neurologischen Erkrankungen treten sie mit einer geschätzten Gesamtinzidenz von jährlich weltweit 50-60 Millionen betroffenen Patienten am häufigsten auf.^{2,3}

Schädel-Hirn-Traumata (SHT) werden durch eine äußere Krafteinwirkung verursacht, welche eine Störung der Hirnfunktionen oder andere Pathologien des Gehirns zur Folge hat.⁴ Sie werden auf verschiedene Arten unterteilt. Eine gängige anatomische Einteilung benennt „offene“ SHT, bei eröffneter Dura Mater mit Verbindung zur Außenwelt, und geschlossene SHT bei intakter Dura Mater.⁵

Die Stratifikation des Schweregrades erfolgt anhand verschiedener Kriterien und ist im Krankheitsverlauf stetig zu reevaluieren, da es sich bei Schädel-Hirn-Traumata um eine Verletzung mit dynamischer klinischer Präsentation handelt.^{5,6} Der Schweregrad der Verletzung kann anhand verschiedener Parameter beschrieben werden, wobei Angaben hierzu in der Literatur variieren. Gebräuchlich ist die Beurteilung des Grades der Bewusstseinsstörung anhand der Glasgow-Coma-Scale⁷ (GCS), wobei dieser sequenziell erhoben werden sollte.⁶⁻⁸ Andere Autoren beziehen ebenfalls die Dauer der Bewusstlosigkeit, der posttraumatischen Amnesie und Auffälligkeiten in der neurologischen Bildgebung mit ein.⁹

Kriterien	GCS	Post-traumatische Amnesie	Neurologische Bildgebung	Dauer der Bewusstlosigkeit
Schweregrad				
Leicht	13-15	0-1 Tag	unauffällig	0-30 Minuten
Mittelgradig	12-9	>1 Tag und <7 Tagen	Unauffällig oder auffällig	30 Minuten bis < 24 Stunden
Schwer	<9	>7 Tage	Unauffällig oder auffällig	>24 Stunden

Abbildung 1: Detaillierte Stratifikation der Schweregrade eines Schädel-Hirn-Traumas anhand mehrerer Parameter. Wenn der Patient eines oder mehrere Kriterien einer höheren Klassifikation aufweist, wird die höhere Klassifikation vergeben. Der GCS bezieht sich auf den bestverfügbaren Punktwert innerhalb der ersten 24 Stunden nach dem Trauma. Eigene Abbildung, angelehnt an „Clinical practice guideline for the management and rehabilitation of post-acute mild traumatic brain injury“ (2021) des Department of Veteran Affairs/Defense der USA.⁹

2.2 „Mild traumatic brain injury“ (mTBI) und “Gehirnerschütterung“

Als “mild traumatic brain injury” (mTBI) werden im klinisch-wissenschaftlichen Sprachgebrauch Schädel-Hirn-Traumata bezeichnet, welche als leichtgradig eingestuft werden.

Die Definitionen der mTBI und Gehirnerschütterung, sowie die Abgrenzung der beiden Begriffe voneinander, waren in der Vergangenheit Gegenstand wissenschaftlicher Debatten. Die Begriffe „mTBI“ und Gehirnerschütterung“ sind in Leitlinien und Literatur teilweise synonym verwendet worden.^{10–12} Andere Autoren sahen die Gehirnerschütterung oder “Concussive Brain Injury” (CBI) als Subklasse im Spektrum der mTBI. Die mTBI ist ein Begriff der Akutmedizin mit Betonung der initialen Bewusstseinsstörung, während der Begriff der Gehirnerschütterung eine klinische Beschreibung einer neurologischen Funktionsstörung nach relevantem Trauma darstellt.^{1,13–15}

Die im Jahr 2004 getroffene und durch die „WHO Collaborating Centre Task Force on Mild Traumatic Brain Injury“ angepasste Definition des American Congress of Rehabilitation Medicine (ACRM) war bislang allgemein anerkannt.¹⁶ Diese wurde im Jahr 2023 durch das Expertenpanel der mTBI-Task Force des ACRM erneut angepasst und setzt sich aktuell wie folgt zusammen:

Eine mTBI wird diagnostiziert, wenn ein plausibler Verletzungsmechanismus vorlag und zusätzlich eines oder mehrere der folgenden Kriterien (1-3) zutreffen und auf eine Hirnverletzung hinweisen:

1. Eines oder mehrere klinische Zeichen (objektiv), im zeitlichen Zusammenhang mit dem Unfall;
2. Zwei oder mehr neu aufgetretene oder akut verschlechterte, klinische Symptome (subjektiv) und zusätzlich ein klinischer oder laborchemischer Befund;
3. Auffällige Befunde in der neurologischen Bildgebung mittels CT oder MRT (Kontusionen oder Blutungen)

Die Symptome und Befunde sind nicht auf andere Pathologien, Medikation, Vorerkrankungen, Begleitzustände oder Intoxikationen zurückzuführen.¹⁵ Eine detaillierte Beschreibung klinischer Zeichen und Symptome findet sich in Kapitel 2.5.

Uneinigkeit besteht weiterhin hinsichtlich des Vorliegens von strukturellen Pathologien als Ein- oder Ausschlusskriterium für die Diagnose einer mTBI. So klassifiziert das „Department of Veterans Affairs“ der USA eine TBI als mittelgradig oder schwer, sobald strukturelle Pathologien in der neurologischen Bildgebung vorhanden sind.⁹ Die ACRM empfiehlt, im Falle struktureller Läsionen die Bezeichnung „mTBI mit Nachweis struktureller, intrakranieller Verletzungen“ zu verwenden.¹⁵

Nach Meinung verschiedener Autoren ist aber eine Gehirnerschütterung eine kurzzeitige Unterbrechung der physiologischen neuronalen Prozesse, von kurzlebiger Dauer und im Verlauf selbstlimitierend, ohne makrostrukturelle Schädigungen in der neurologischen Bildgebung.^{14,17}

Das ACRM trägt dieser Ansicht in seiner Definition Rechnung, indem diese die Möglichkeit mikrostruktureller, in konventioneller Bildgebung nicht sichtbarer Schädigungen und funktioneller Beeinträchtigungen beinhaltet und damit die Gehirnerschütterung als eine Subklasse der mTBI einordnet:

„Die diagnostische Bezeichnung „Gehirnerschütterung“ kann synonym mit der Bezeichnung „leichtes Schädel-Hirn-Trauma“ verwendet werden, wenn die neurologische Bildgebung normal oder nicht klinisch indiziert ist.“¹⁵ (übersetzt aus: Silverberg et al.: „The American Congress of Rehabilitation Medicine Diagnostic Criteria for Mild Traumatic Brain Injury“, (2023), Seite 1348)

Im Folgenden wird der Begriff der Gehirnerschütterung gebraucht, da sich das in der vorliegenden Studie genutzte Traumamodell durch eine unauffällige, neurologische Bildgebung auszeichnet und damit die aktuellen Kriterien des ACRM für das diagnostische Label der Gehirnerschütterung erfüllt.

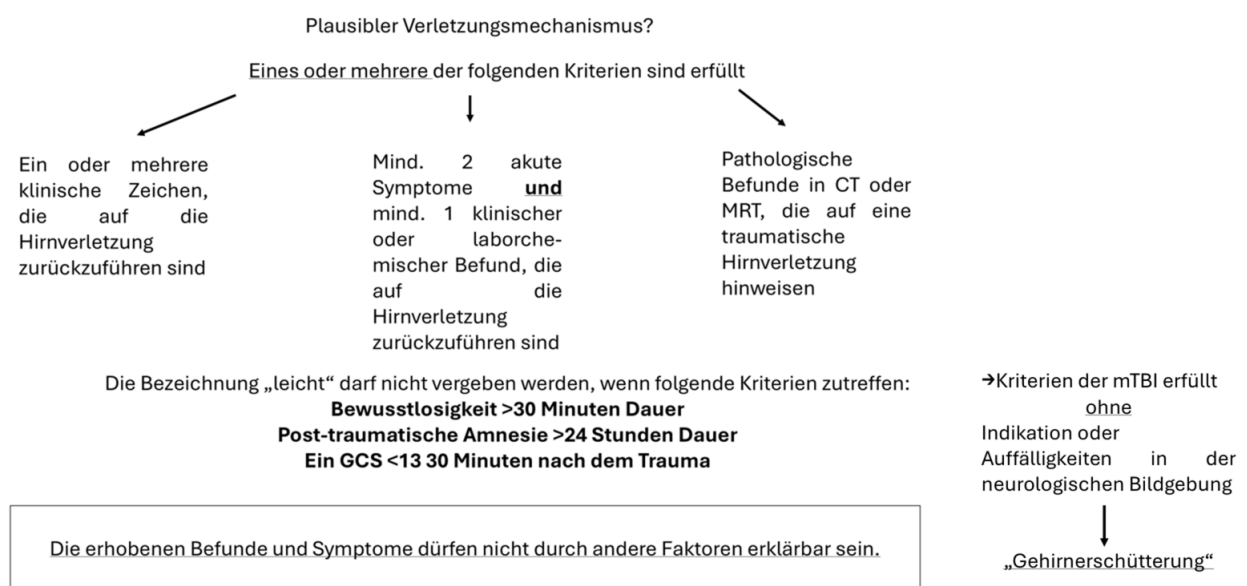


Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung der Klassifikation der mTBI nach den Kriterien des ACRM. ¹⁵ Eigene Abbildung.

2.3 Epidemiologie von SHT und der Unterform mTBI

Die Inzidenzen von SHT nehmen weltweit zu und stellen eine zunehmende Belastung für die Gesundheitssysteme dar.^{1,18} Studien zur Inzidenz der SHT aller Schweregrade schätzen eine jährliche Inzidenz von 50 bis 60 Millionen SHT weltweit, wovon 90% als mTBI eingestuft werden.^{2,18,19} Die höchsten Inzidenzen von SHT aller Schweregrade finden sich bei Kindern und jungen Erwachsenen – die meisten Betroffenen sind dabei Jungen und Männer.^{2,18,20,21} Betrachtet man mTBI isoliert, so finden sich zwei Altersgipfel: Kinder und junge Erwachsene, gefolgt von weiblichen Senioren.^{2,19,22,23} In einer kanadischen Studie konnten die höchsten Inzidenzen bei Kindern unter 5 Jahren und weiblichen Personen über 60 Jahren verzeichnet werden.²²

Die Verletzungsmechanismen, welche grundsätzlich zu einem SHT (unabhängig vom Schweregrad) führen, variieren regionsspezifisch und altersabhängig. Weltweit sind die dominierenden Verletzungsmechanismen Stürze, Verkehrsunfälle und Gewaltdelikte.^{2,18,20,23} Kinder und Senioren erleiden meist Stürze, junge Erwachsene sind von Verkehrsunfällen und Gewaltdelikten betroffen.² In Ländern mit niedrigem bis mittlerem Einkommen sind SHT oftmals die Folge von Verkehrsunfällen²⁴, während in Ländern mit hohem Einkommen oftmals Stürze ursächlich sind.^{2,19,21,23}

Epidemiologische Studien zur Inzidenz von SHT und der Unterform mTBI berichten heterogene Inzidenzen, je nachdem ob es sich um einen auf Krankenhausdaten basierenden Ansatz oder eine Populationsstudie handelt.^{2,20,22} Letztere vermelden höhere Inzidenzen, da in diesem Ansatz auch Fälle aus Hausarztpraxen erfasst werden, welche nicht in einem Krankenhaus vorstellig werden.^{2,18,22}

Anzumerken ist zudem, dass die Inzidenzen der SHT allgemein hoch sind, die Mortalität aber vergleichsweise gering. Dies deutet darauf hin, dass ein beträchtlicher Teil der Betroffenen die Verletzung zwar überlebt, aber mit neurologischen Folgen und Einschränkungen lebt.^{19,20} Hervorzuheben ist hier die mTBI: Obwohl als „leicht“ klassifiziert, erholt sich auch hier bis zur Hälfte der Betroffenen nach sechs Monaten nur unvollständig.^{19,25–28}

2.4 Gehirnerschütterungen im Sport

Zunehmend an Bedeutung gewinnen Gehirnerschütterungen im Kontext von sportlichen Wettkämpfen. Sportler können im Laufe einer professionellen Karriere wiederholte (repetitive) Gehirnerschütterungen erleiden. Diese werden als Risikofaktoren für längerdauernde Beeinträchtigungen und neurodegenerative Erkrankungen kontrovers diskutiert.^{29,30} Der Begriff der sport-assoziierten Gehirnerschütterung (SaG) ist durch das „Consensus Statement on Concussion in Sport“ der Concussion in Sport Group (CISG), einem internationalen Expertenpanel, definiert und als Orientierung im Management und der Behandlung betroffener Athleten zu verstehen.^{17,31}

- 1.) Eine SaG ist eine traumatische Hirnverletzung, welche während sportlicher Betätigung durch eine Krafteinwirkung gegen den Kopf, Nacken oder Körper ausgelöst wird.
- 2.) Hierdurch entsteht eine Kaskade aus Veränderungen des Neurometabolismus und des Gleichgewichts an Neurotransmittern, Veränderungen des zerebralen Blutflusses, möglicherweise Verletzung von Axonen und Neuroinflammation.
- 3.) Diese rufen Symptome hervor, welche unmittelbar vorhanden sind, sich aber auch Minuten bis Stunden nach dem Trauma entwickeln und für einige Tage anhalten können. In einigen Fällen kann die Dauer der Symptome verlängert sein. Eine SaG *kann* mit Bewusstlosigkeit einhergehen.
- 4.) Die neurologische Standard-Bildgebung ergibt keine Auffälligkeiten.
- 5.) Die Symptome und Zeichen sind nicht besser durch Medikamente, Drogen- oder Alkoholgebrauch, oder andere (Begleit-) Erkrankungen des Betroffenen zu erklären.¹⁷

Die höchsten Raten an SAGs lagen einer Metaanalyse von 83 Studien zufolge in Kollisionssportarten wie Rugby, gefolgt von American Football und Eishockey.³² Weibliche Sportlerinnen haben ein höheres Risiko, eine SaG zu erleiden als ihre männlichen Kollegen.³² Zudem ist das Risiko, eine SaG zu erleiden im Wettkampf höher als im Training.³²

Das Management einer SaG sieht bereits beim ersten Verdacht eine Herausnahme des betroffenen Spielers aus dem Spielgeschehen vor, da die Symptome einer SaG zeitverzögert auftreten können und eine sichere Beurteilung erschweren. Es wird in diesen Fällen empfohlen, eine reduzierte Exposition gegenüber akustischen und optischen Reizen (Bildschirmarbeit) von 24 bis 48 Stunden einzuhalten, gefolgt von einer schrittweisen Wiedereingliederung in Arbeit oder Schule und die sportliche Betätigung anhand sogenannter „Return-to-Sport“ und „Return-to-Learn“-Protokolle.¹⁷

Obwohl die Auswirkungen einer isolierten SaG in der Regel zeitlich limitiert sind, sind auch längerdauernde Beeinträchtigungen möglich.³³ Aufmerksamkeit erregten Berichte, die

wiederholte Gehirnerschütterungen im Sport mit einem erhöhten Risiko neurodegenerativer Erkrankungen in Verbindung brachten. Bei Fußballspielern konnte eine erhöhte Mortalität an neurodegenerativen Erkrankungen im Vergleich mit der Normalbevölkerung aufgezeigt werden.³⁴ Eine Studie an ehemaligen amerikanischen Footballspielern ergab, dass Spieler, welche drei oder mehr SaGs erlitten hatten, eine fünffach höhere Prävalenz leichter kognitiver Beeinträchtigungen hatten als Spieler ohne SaG in der Vorgeschichte und tendenziell jünger an Alzheimer erkrankten als der Durchschnitt der amerikanischen Bevölkerung.³⁵ Es konnte ebenfalls ein Zusammenhang zwischen der Zahl repetitiver Kopfstöße, welche nicht in einer Gehirnerschütterung mündeten, und dem Vorliegen einer chronisch-traumatischen Enzephalopathie gezeigt werden.³⁶ Zudem zeigte eine retrospektive Kohortenstudie von Daneshvar et Al. eine höhere Inzidenz der neurodegenerativen Erkrankung ALS in ehemaligen professionellen American Footballspielern gegenüber der amerikanischen Bevölkerung, wobei die Autoren einen möglichen Zusammenhang zwischen wiederholten Kopfstößen und einem erhöhten Erkrankungsrisiko diskutieren.³⁷

2.5 Klinisches Bild

Gehirnerschütterungen können ein vielgestaltiges, klinisches Bild zeigen. Zu unterscheiden ist zwischen Zeichen und Symptomen. Die Symptome einer Gehirnerschütterung können unmittelbar nach dem Trauma auftreten oder sich zeitverzögert über Stunden entwickeln, weshalb eine wiederholte Evaluation und Beobachtung der betroffenen Patienten wichtig ist.^{17,38} Zu den unmittelbar auftretenden, beobachtbaren Zeichen einer Gehirnerschütterung gehören: Bewusstlosigkeit unter 30 Minuten Dauer; Störungen der Koordination von Rumpf- und Extremitäten; Amnesie; Verwirrung; Gleichgewichtsprobleme; Änderungen des Verhaltens; Krampfanfälle und tonische Körperhaltung. Diese können, müssen jedoch nicht immer, vorhanden sein.^{15,17,38,39} Die von Patienten berichteten Symptome sind vielfältig und können verschiedene Domänen umfassen. Reddy et al. teilen berichtete Symptome in vier Kategorien ein: kognitive Symptome, somatische Symptome, Störungen des Schlafes und emotionale Veränderungen.³⁹ Diese können direkt nach dem Trauma auftreten oder sich im zeitlichen Verlauf entwickeln.^{31,40} Auftretende Schlafprobleme können erst im Verlauf beurteilt werden.³⁹ Die Symptome nach Gehirnerschütterungen sind unspezifisch und werden auch von unverletzten Personen erlebt.^{41,42} Die am häufigsten berichteten Symptome sind Kopfschmerzen, Fatigue, Konzentrationsprobleme, kognitive Verlangsamung, Schläfrigkeit, Störungen des Gleichgewichts und ein Gefühl des „benebelt seins“.⁴⁰⁻⁴² Weibliche Betroffene berichteten schon vor der Verletzung eine höhere Anzahl vermeintlicher „Gehirnerschütterungssymptome“, nach der Verletzung glichen sich die berichteten Beschwerden denen der männlichen Teilnehmer an.⁴¹

Die meisten Patienten erholen sich innerhalb von wenigen Tagen bis einigen Wochen von ihrer Verletzung.³³ Neuere Studien deuten auf eine deutlich längere Persistenz der Symptome hin und zeigen auch nach Monaten noch funktionelle Beeinträchtigungen.^{42,43} Als Confounder für die unterschiedlichen Erholungszeiten zwischen Gehirnerschütterungen im Sport und anderweitig erlittenen, leichten SHT werden Unterschiede der Verletzungsmechanismen und -intensitäten, Begleitverletzungen und Patientenkollektive diskutiert.^{44,45}

Eine höhere Symptomlast zu Anfang ist mit einer höheren Wahrscheinlichkeit für einen verzögerten Heilungsverlauf und persistierende Beschwerden vergesellschaftet.^{33,46} Auch sind vorbestehende psychiatrische Erkrankungen und das weibliche Geschlecht mit einem erhöhten Risiko persistierender Symptome assoziiert.⁴⁶ Zudem scheint eine stattgehabte Gehirnerschütterung mit einem erhöhten Risiko für eine weitere Gehirnerschütterung verbunden zu sein.⁴⁰

Symptomdomänen

<u>Kognitiv</u>	<u>Emotional</u>	<u>Somatisch</u>	<u>Schlaf</u>
Konzentrationsstörungen	Reizbarkeit	Kopfschmerzen	Schwierigkeiten einzuschlafen
Gedächtnisstörungen	Traurigkeit	Schwindel	Durchschlafstörungen
Fatigue	Ängstlichkeit	Gleichgewichtsstörungen	Übermäßiges oder verringertes Schlafbedürfnis
Gefühl „im Nebel zu sein“	Depressive Verstimmungen	Übelkeit	
Gefühl „verlangsamt zu sein“		Licht- und Geräuschempfindlichkeit	

Abbildung 3: Symptome nach Gehirnerschütterung, aufgeteilt in vier Domänen nach Reddy. Nach einer Gehirnerschütterung, aber auch im Rahmen eines Post-Concussion-Syndroms, ist eine Vielzahl an Symptomen möglich.^{9,38,39}

Beobachtbare Zeichen einer Gehirnerschütterung

Zeichen:	Beispiel:
Bewusstlosigkeit	➤ Person liegt regungslos; fällt auf den Boden, ohne sich abzufangen
Verwirrtheit oder Desorientiertheit	➤ Die Person sieht verwirrt aus oder schaut verwirrt umher; versteht Anweisungen nicht, beantwortet Fragen inadäquat
Krampfanfälle, tonische Körperhaltung	➤ Person zuckt, versteifte Körperhaltung
Koordinations- oder Gleichgewichtsstörungen	➤ Person bewegt sich ungeschickt, fällt oder stolpert
Amnesie	➤ Vergisst Events unmittelbar vor oder nach dem Trauma
Zeigt Veränderungen des Verhaltens und/oder der Persönlichkeit	➤ Bewegt oder artikuliert sich verlangsamt; gesteigerte Reizbarkeit

Abbildung 4: Beobachtbare Zeichen, die auf eine mögliche Gehirnerschütterung hindeuten.^{17,38,39,50,51}

2.6 Diagnostik

Die Ersteinschätzung im akuten Setting erfolgt mittels Beurteilung des Bewusstseinszustandes anhand der Glasgow-Coma-Scale und der Beurteilung und Sicherung der Vitalfunktionen.^{9,47} Geachtet wird besonders auf Warnzeichen, welche auf eine höhergradige Schädelverletzung hindeuten und sofortiges Handeln erfordern (s. Abb. 5).^{9,47} Zusätzlich ist auf Verletzungen der Halswirbelsäule zu untersuchen, da diese traumatisch bedingt ebenfalls erfolgt sein können.^{38,47,48} Bei Verdacht auf intrakranielle Pathologien ist eine Computertomographie des Schädels erforderlich, um zerebrale Blutungen und Frakturen auszuschließen.^{5,47-49} Bei Gehirnerschütterungen finden sich hier per Definitionem keine Auffälligkeiten (vgl. Kapitel 2.2).¹⁵ Im sportlichen Kontext finden zur Beurteilung des Sportlers bei Verdacht auf eine Gehirnerschütterung sogenannte „Sideline-Evaluationen“ Anwendung. Entwickelt und empfohlen von der „Conussion in Sports Group“ (CISG) wurden das „Concussion Recognition Tool“ (CRT)⁵⁰ für die Beurteilung durch nicht-medizinische Personen, sowie das „Sport Concussion Assessment Tool“⁵¹ zur Anwendung durch medizinisches Fachpersonal.¹⁷ Der SCAT-6 ist aus unterschiedlichen Testbatterien zusammengesetzt und beinhaltet die Erhebung des GCS, eine fokussierte neurologische Untersuchung, eine Symptomcheckliste und eine kognitive Testung zu Orientierung, Konzentration und Merkfähigkeit.⁵¹

Bei persistierenden Symptomen der Gehirnerschütterung über den akuten Zeitraum der Verletzung hinaus spricht man von einem sogenannten postkommotionellen oder engl. „Post-Concussion-Syndrom“ (PCS) (vgl. Kap. 2.8.1). Hier ist die Untersuchung verschiedener Systeme in Abhängigkeit der gebotenen Beschwerden sinnvoll. Nach Erhebung der Anamnese, des Unfallherganges und der Beschwerden des Patienten sollte eine klinisch-neurologisch Untersuchung und Beurteilung der Halswirbelsäule erfolgen.^{38,44} Ebenfalls beurteilt werden die Koordination von Stand und Gang und eventuelle Störungen des Gleichgewichts mit differenzieller Erhebung peripherer und zentraler Ursachen.⁴⁴ Zur Erhebung von Symptomen und deren Verlauf stehen Symptom-Checklisten zur Verfügung, wie beispielsweise die Post-Concussion-Symptom-Scale.^{41,44} Insbesondere die Provokationsfaktoren der Beschwerden, wie beispielsweise körperliche Belastung, sind gezielt zu erfragen.⁴⁴

Emotionale Beschwerden wie Ängstlichkeit, Unruhe oder depressive Verstimmungen können mit Fragebögen, wie beispielsweise dem GAD-7, evaluiert werden.⁴⁴ Häufig finden sich Störungen der Okkulomotorik im Rahmen eines Post-Concussion-Syndroms.⁴⁴ Zur Feststellung dieser eignet sich der VOMS-Test, welcher die Blickfolge, Sakkaden, den vestibulo-okulären-Reflex und die Nahpunkt Konvergenz beurteilt.^{44,49}

Stand heute gibt es keine zuverlässigen radiologischen oder laborchemischen Marker zur Diagnose einer Gehirnerschütterung oder eines Post-Concussion-Syndroms.^{17,38} Die Diagnostik der genannten Krankheitsbilder bleibt damit Domäne der Anamnese und ausführlichen, klinischen Untersuchung nach Ausschluss anderer Pathologien.

Warnzeichen

➔ **Sofortiges Verbringen in eine Klinik, Ausschluss höhergradiger Hirnverletzungen**

- Bewusstlosigkeit
- Zunehmend vermindertes Bewusstsein oder Schläfrigkeit, GCS <15
- Wiederholtes Erbrechen
- Zunehmende Kopfschmerzen
- Doppelbilder
- Krampfanfälle
- Asymmetrie der Pupillen
- Verwaschene Sprache
- Zunehmende Verwirrtheit oder Desorientierung
- Schwäche, Taubheit oder Kribbeln in ≥ 1 Extremität
- Aggression, Unruhe und Erregung
- Sichtbare Verformungen des Schädels
- Nackenschmerzen oder -steife




Abbildung 5: Warnzeichen bei Schädel-Hirn-Traumata („Red Flags“). Diese deuten auf eine höhergradige Hirnverletzung oder das Vorliegen einer zervikalen Verletzung hin und erfordern eine schnellstmögliche Abklärung im Krankenhaus. Eigene Abbildung.^{9,50,51}

2.7 Behandlung

Es existieren keine ursächlichen Therapien für Gehirnerschütterungen. Empfohlen wird im Sport eine sofortige Entfernung des Spielers aus dem Spielgeschehen zur weiteren Abklärung und um eine erneute Schädigung zu vermeiden.^{17,38} Initial wird nach dem Trauma eine Phase körperlicher und geistiger Ruhe von 24 bis 48 Stunden empfohlen, ebenso eine Reduktion der Bildschirmzeit.^{52,53} Hiernach schließt sich ein gradueller Aufbau der Aktivität bis zur vollständigen Wiederaufnahme beruflicher, akademischer und sportlicher Betätigung an.^{54,55} Es wird eine Integration aerober, sportlicher Belastung in der frühen Erholungsphase empfohlen. Die aerobe Belastung sollte adaptiert an die Herzfrequenz erfolgen und beendet werden, sobald ein Anstieg der Symptomintensität im Vergleich zum Ruhezustand des Athleten verzeichnet wird.^{17,53,56} Für den sportlichen Wiedereinstieg existieren spezielle „Return-to-Sports“-Protokolle. (s. Abb. 6)¹⁷

Pharmakologische Interventionen können beispielsweise zur Linderung von Kopfschmerzen, depressiven Verstimmungen und Schlafstörungen erwogen werden.^{54,55}

Die Therapie des Post-Concussion-Syndroms (s. Kapitel 2.8.1) erfolgt beschwerdeadaptiert in einem multimodalen Ansatz. Nach ausführlicher Evaluation der Symptomatik und deren Verlauf können beschwerdeorientierte Therapiekonzepte implementiert werden. Patienten mit vestibulo-okulären Beschwerden können von spezialisierter Physiotherapie und Neurooptometrie profitieren. Patienten, welche sich mit emotionalen Problemen präsentieren, profitieren von einer Psychotherapie und pharmakologischen Intervention.^{45,49,55}

Stufe	Belastung	Level der Aktivität	Ziel
1	Symptom-limitierte Aktivität	Aktivitäten des täglichen Lebens, welche nicht zur Verschlimmerung der Symptome führen	Graduelle Rückkehr in die Arbeit oder Schule
2	Aerobe Belastung 2A – Leicht (bis zu 55% der maximalen HF) danach 2B – Moderat (bis zu 70% der maximalen HF)	Gehen oder Radfahren bei geringer bis moderater Intensität, dass die Symptome nur geringgradig und kurzzeitig verschlimmert	Erhöhte Herzfrequenz
3	Sportart spezifische Übungen	Sportart-spezifisches Training außerhalb des Teamverbandes und ohne Risiko weiterer Kopfverletzungen	Mehr Bewegung und Richtungswechsel

Die Schritte 4-6 erfolgen erst bei vollständiger Symptombefreiheit, Rückbildung aller kognitiven Beeinträchtigungen und anderer klinischer Befunde im Rahmen der aktuellen Gehirnerschütterung, sowohl in Ruhe als auch während und nach körperlicher Belastung.

4	Übungen ohne Körperkontakt	Intensive körperliche Belastung mit komplizierteren Übungen im Umfeld der Mannschaft	Wiederaufnahme der vorigen Trainingsintensität, erhöhte Anforderungen an Koordination und Denken
5	Training mit Vollkontakt	Normale Trainingsteilnahme	Wiederherstellung des Selbstbewusstseins, Beurteilung durch Trainerstab
6	Wiederkehr in den Sport	Normales Training und Wettkampfteilnahme	

Abbildung 6: „Return-to-Sports“-Protokoll der CISG laut Stand 2022. Dargestellt sind die einzelnen Schritte bis zur vollständigen Wiedereingliederung in den Sport. Jede Stufe wird graduell durchlaufen, wobei eine Mindestdauer von 24 Stunden pro Stufe vorgesehen ist. Die maximale Herzfrequenz (HF) bezieht sich auf die altersadjustierte maximale Herzfrequenz nach folgender Formel: $HF_{max} = 220 - (\text{Alter in Jahren})$.

Eigene Abbildung, modifiziert nach Patricios et al., 2022 „Consensus statement on concussion in sport: the 6th International Conference on Concussion in Sport-Amsterdam, October 2022.“¹⁷

2.8 Folgeerkrankungen nach Gehirnerschütterungen

In den letzten Jahren rücken neurologische Folgeerkrankungen repetitiver Gehirnerschütterung in den Vordergrund. Nicht alle Gehirnerschütterungen heilen innerhalb weniger Wochen folgenlos aus. Eine gewisse Anzahl Betroffener erleidet ein Post-Concussion-Syndrom und zeigt sich nach mehreren Monaten immer noch symptomatisch eingeschränkt.^{26,42} Zudem deutet eine wachsende Zahl an Studien auf eine Assoziation zwischen wiederholten Gehirnerschütterungen und zeitverzögert, teils Jahrzehnte später auftretenden, neurodegenerativen Erkrankungen hin.⁵⁷⁻⁵⁹ Eine retrospektive Kohortenstudie von MacKay et al. verglich die Mortalität an neurodegenerativen Erkrankungen ehemaliger professioneller Fußballspieler mit denen der Allgemeinbevölkerung und stellte ein erhöhtes Vorkommen in der Kohorte der ehemaligen Profisportler fest.³⁴ In einer Studie von Guskiewicz et al. fand sich ein Trend zu einem früheren Beginn der Alzheimer Demenz und eine erhöhte Prävalenz milder, kognitiver Beeinträchtigungen bei ehemaligen American Footballspielern mit wiederholten Gehirnerschütterungen.³⁵

Die Pathophysiologie, welche hinter der Entstehung des Post-Concussion-Syndroms und der chronisch-traumatischen Enzephalopathie steht, ist noch unverstanden und deshalb Gegenstand aktueller Forschungsbestreben.

2.8.1. Post-Concussion-Syndrom

Das Postkommotionelle- oder Post-Concussion-Syndrom (PCS) ist ein unscharf definierter Komplex an Beschwerden und Beeinträchtigungen. Dieser beschreibt gemeinhin das Persistieren von Symptomen einer Gehirnerschütterung über den akuten Zeitraum der Verletzung hinaus. Vor allem der Begriff des zeitlichen Bestehens ist hierbei Gegenstand der Diskussion: Einige Autoren sprechen bereits ab einer Dauer von zwei Wochen³¹ von einem PCS, andere erst ab einer Dauer von einem Monat¹⁷ manche sogar erst nach drei Monaten persistierender Beschwerden.^{45,60} Ein Fortbestehen der Beschwerden über sechs Monate hinaus wird als persistierendes Post-Concussion-Syndrom bezeichnet.⁶¹ Die Ursache der bestehenden Beschwerden ist nach heutigem Stand unklar. Je nach zugrundeliegender Definition ergeben sich unterschiedliche Prävalenzen.⁴⁵ Die Spezifität der Kriterien ist dabei gering angesiedelt, so dass auch College Athleten ohne vorangehende Gehirnerschütterung zu einem gewissen Prozentsatz die Symptomatik für die Diagnose eines PCS aufweisen.⁶²

In der Behandlung des PCS hat sich aerobe, sportliche Belastung unterhalb der Symptomverschlimmerung als vorteilhaft erwiesen.⁵³ In Abhängigkeit der gebotenen Beschwerden stehen verschiedene therapeutische Optionen zur Verfügung. Handelt es sich um emotionale Beschwerden, kann eine psychotherapeutische Behandlung indiziert sein.⁶³

Bei vorrangig vestibulären Beschwerden ist Physiotherapie und eine Evaluation der Okulomotorik sinnvoll.^{44,45,63} Bei somatischen Beschwerden, wie beispielsweise Kopfschmerzen, kann eine medikamentöse Behandlung in Kombination mit Ausdauersport indiziert sein.⁶³ Ebenfalls evaluiert werden sollte die Halswirbelsäule als möglicher „Generator“ von Symptomen.⁴⁴ Diese ist einer physiotherapeutischen Behandlung zugänglich.⁶³

2.8.2. Chronisch-traumatische Enzephalopathie

Die chronisch-traumatische Enzephalopathie (CTE) ist eine neurodegenerative Erkrankung mit fortschreitendem Verlauf. Sie betrifft Personen, die wiederholt SHT erlitten haben, wie beispielsweise ehemalige Sportler in Kontaktsportarten⁶⁴ und militärisches Personal.⁶⁵

Die CTE ist eine Tauopathie und gekennzeichnet durch das perivaskuläre Auftreten von hyperphosphoryliertem Tau-Protein (p-Tau) in Neuronen, fakultativ auch in Astroglia in den Tiefen kortikaler Sulci.^{66,67} Tau-Protein ist ein Strukturprotein der axonalen Mikrotubuli und als solches nicht schädlich. Es wird davon ausgegangen, dass SHT über verschiedene Signalkaskaden zur Ablösung von Tau-Protein von den Mikrotubuli führt.⁵⁹ (2.9.2) Hierbei entstehen hyperphosphorylierte, fehlgefaltete Abbauprodukte und Aggregate.^{59,68,69} Insbesondere die Aminosäurereste an Position Ser202 und cis-Thr231 sind in der CTE hyperphosphoryliert.^{70,71} Das gesunde Hirngewebe verfügt über Mechanismen zum Abtransport solcher Produkte. Diese sind posttraumatisch jedoch beeinträchtigt.^{68,69}

Klinisch ist die CTE durch neuropsychiatrische Störungen wie Depressionen, Aggressionen und Stimmungslabilität, sowie Störungen des Gedächtnisses und der Sprache gekennzeichnet. Bei früh einsetzenden Verläufen stehen vornehmlich Stimmungsprobleme im Vordergrund, während bei älteren Patienten mit späterem Einsetzen der Symptomatik oftmals kognitive Störungen im Vordergrund stehen.⁷² Eine sichere Diagnose ist zu Lebzeiten nicht möglich, die Diagnostik erfolgt post mortem durch die histologische Untersuchung des Hirngewebes Betroffener.⁷³

Die Pathophysiologie der CTE ist unvollständig aufgeklärt. Ein Zusammenhang mit traumatischen Hirnverletzungen gilt als gesichert, unklar ist jedoch wie viele traumatische Verletzungen vorliegen müssen, um die neurodegenerativen Veränderungen auszulösen.⁵⁹ Als Auslöser diskutiert werden langanhaltende Störungen der Blut-Hirn-Schranke (Kap. 2.9.3) und des glymphatischen Systems (Kap. 2.11), in deren Folge es zu einer chronischen, perivaskulären Neuroinflammation und gestörten Clearance neurotoxischer Metabolite kommt.^{68,69,74–77}

Eine Aufklärung der Pathogenese der CTE ist Ziel aktueller Forschungsvorhaben. Durch die Identifizierung der zugrundeliegenden Pathomechanismen können gezielte präventive und

therapeutische Maßnahmen zur Verhinderung und Linderung der Krankheitsfolgen ergriffen werden.⁷³

2.9 Pathophysiologie

Die Pathophysiologie der Gehirnerschütterung wird immer besser verstanden, ist aber noch nicht vollständig entschlüsselt. Unterschieden wird einerseits zwischen dem primären Hirnschaden, welcher durch das Trauma selbst hervorgerufen wird und nicht behandelbar ist. Auf ihn folgen sequenziell auftretende Veränderungen als Reaktion auf diesen primären Schaden, welche sich zeitverzögert manifestieren. Diese gelten als behandelbar und stellen den sekundären Hirnschaden dar.⁷⁸

2.9.1. Neurochemische Kaskade

Die biophysikalischen Kräfte, welche unmittelbar mit dem Trauma einhergehen, wirken sich auf zellulärer Ebene aus. Es kommt zu einer diffusen Freisetzung des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat. Beschädigungen der Lipidmembranen der Zellen bewirken eine vermehrte Freisetzung von Kalium in den extrazellulären Raum, sowie einen vermehrten Einstrom von Kalzium und Natrium in die Zellen. Nachfolgend versuchen zelluläre ATP-abhängige Ionenpumpen den physiologischen Ionengradienten wieder herzustellen, woraus ein gesteigerter Energiebedarf resultiert. Dieser mündet in einem hypermetabolischen, glykolytischen Zustand und der Aufzehrung zellulärer Energiereserven. Der vermehrt anfallende Metabolit Laktat beeinträchtigt zudem die neuronale Aktivität.⁷⁹ Einströmendes Kalzium wird kompensatorisch in die Mitochondrien aufgenommen und stört deren Funktion, was zu Beeinträchtigungen des oxidativen Stoffwechsels führt.^{79,80} Trotz des hohen Energiebedarfs ist der zerebrale Blutfluss in dieser Phase vermindert. Es kommt zu einer Diskrepanz zwischen Energiebedarf und Energieversorgung, welche in einer Energiekrise mündet.^{79,80} Nach der initialen, hypermetabolen Stoffwechsellage kommt es zum Umschwung in einen Zustand beeinträchtigten Metabolismus.⁸¹ Fällt in die Zeit der Regeneration eine weitere Gehirnverletzung, geht diese mit vermehrten Defiziten und axonalen Schädigungen einher.⁸²

Neurometabolische Kaskade nach Gehirnerschütterung

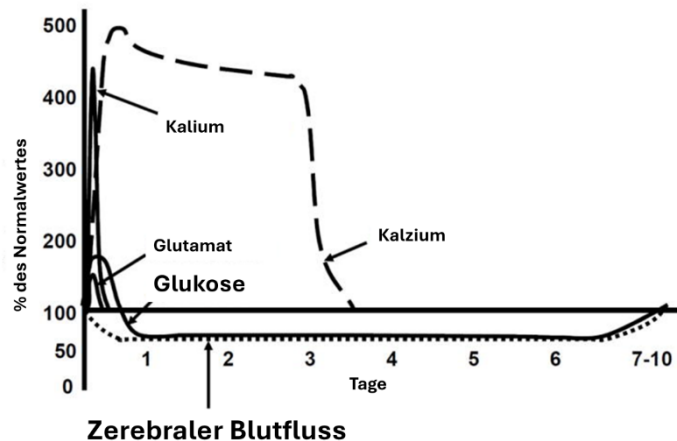


Abbildung 7: Neurometabolische Kaskade nach Gehirnerschütterung. Abbildung modifiziert nach Giza et al., 2014 „The new neurometabolic Cascade of Concussion“⁸⁰

2.9.2. Traumatische axonale Schädigung

Im Rahmen einer Gehirnerschütterung kann es zu diffusen axonalen Verletzungen kommen.^{80,82} Traumatisch bedingt können mikrostrukturelle Verletzungen des Zytoskeletts auftreten.⁸³ Diese gehen sowohl aus den neurochemischen Veränderungen als auch durch die biomechanischen Kräfte hervor.⁸⁰ Durch einwirkende Scherkräfte sind unter anderem die Mikrotubuli betroffen.^{80,82} Entlang der axonalen Mikrotubuli geschieht der Transport von Nährstoffen zur Unterhaltung der Synapsen, welcher durch traumatische Verletzungen beeinträchtigt wird. Hierdurch ist der Stofftransport der Synapsen nicht mehr gewährleistet und die Signaltransmission beeinträchtigt.⁸⁰ In Folge des Kalziumeinstroms durch die beschädigte, axonale Membran kommt es zu intrazellulären Signalkaskaden, die zu einer Beschädigung des axonalen Zytoskeletts führen.⁸⁰ Zusätzlich kommt es durch eine erhöhte mitochondriale Aufnahme des überschüssigen Kalziums zu Dysfunktionen der Mitochondrien.⁸³ Zudem scheinen unmyelinisierte Axone für traumatische Schädigungen vulnerabler zu sein als myelinisierte Axone.⁸⁴

2.9.3. Beeinträchtigung der Blut-Hirn-Schranke und mikrovaskuläre Verletzung

Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) kleidet die Blutgefäße des Gehirns aus, reguliert den Übertritt von Nährstoffen ins Hirngewebe und schützt es vor Elektrolytschwankungen und Toxinen aus der Kreislaufzirkulation.⁸⁵⁻⁸⁷ Nach einer Gehirnerschütterung ist die Barrierefunktion der Blut-Hirn-Schranke eingeschränkt.⁸⁸⁻⁹⁰ Diese kompromittierte Barrierefunktion steht im Verdacht, sekundäre Schädigungen des Gehirns nach Gehirnerschütterungen zu begünstigen.^{76,78,91} So ist ein Kennmerkmal der CTE das Auftreten von p-Tau um kleine Blutgefäße herum, welches eine Involvierung der Gefäße in die Krankheitsentstehung nahelegt.⁶⁶ Vorarbeiten konnten bereits nachweisen, dass sich p-Tau vorrangig in Hirnregionen sammelt, an denen die Barrierefunktion der BHS gestört ist.⁷⁷ Ein Zusammenhang zwischen Störung der BHS und Neurodegeneration wird auch in anderen Erkrankungen, wie beispielsweise der Alzheimer Demenz, beobachtet und als mitverursachend angenommen.⁹² Die Kausalkette aus gestörter Funktion der BHS und einsetzender Neurodegeneration ist bislang unverstanden und Gegenstand der Forschung.

Eine Beeinträchtigung der BHS nach Gehirnerschütterung konnte in Vorarbeiten dargestellt werden.⁹³ Hierzu wies man den Übertritt von Tracern oder Blutbestandteilen, welche die BHS unter physiologischen Voraussetzungen nicht passieren können, im Hirngewebe nach. Als Indikatoren werden beispielsweise Immunglobulin G, Albumin und Fibrinogen, als Tracer fluoreszierende Dextrane genutzt.⁹⁴ Diese Stoffe sind aufgrund ihres Molekulargewichtes nicht im Stande, die BHS zu überwinden und kommen ausschließlich intravasal vor.⁹⁴

2.10 Aufbau der Blut-Hirn-Schranke

Die Blut-Hirn-Schranke ist eine hochselektive Barriere, die den Austausch von Stoffen zwischen dem Blut und dem Hirngewebe reguliert und sich aus verschiedenen Komponenten zusammensetzt. Spezialisierte Endothelzellen kleiden die zerebralen Gefäße aus und dichten sie gegenüber dem Blutstrom effektiv ab. Diese werden abluminal von einer Basalmembran umgeben, in welche Perizyten und gefäßassoziierte glatte Muskelzellen eingebettet sind. Von außen gliedern sich Fortsätze von Astrozyten, die sogenannten Endfüße, an die Basalmembran an und umschließen so die Gefäße beinahe vollständig.⁹⁵ Die Blut-Hirn-Schranke ist im Gegensatz zum gefensterten Endothel in der Peripherie des Körpers für viele Stoffe nicht überwindbar und reguliert den Durchtritt von Nährstoffen und Metaboliten zwischen Gehirn und Kreislaufzirkulation. Darüber hinaus dient sie dem Schutz des Gehirns vor Toxinen, Krankheitserregern und Schwankungen der Elektrolytkonzentrationen.^{85-87,95}

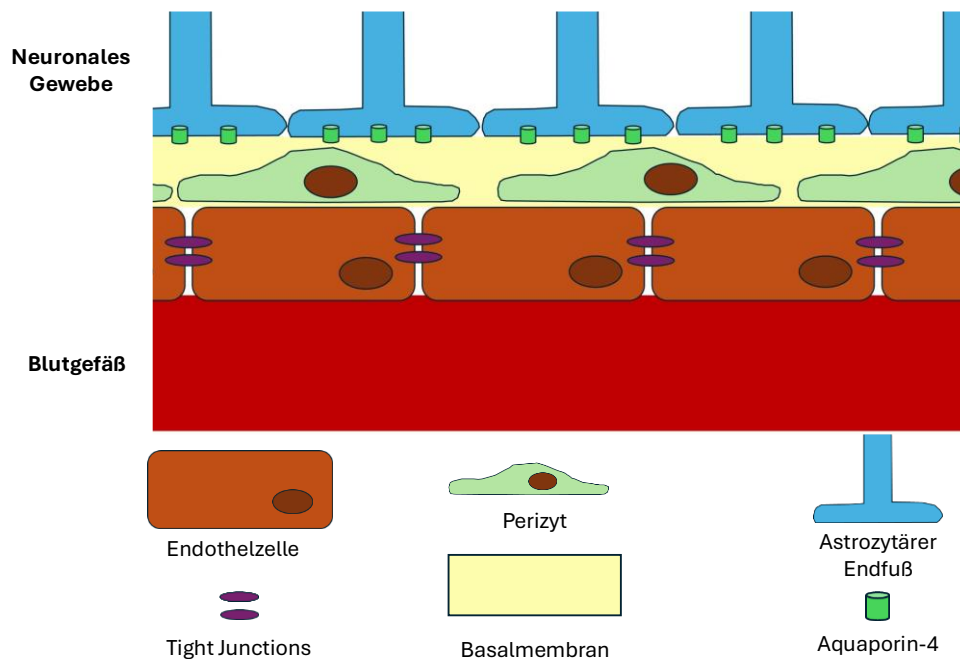


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Aufbaus der Blut-Hirn-Schranke. Dem Lumen zugewandt befinden sich die Endothelzellen, welche die Gefäße auskleiden und über Tight Junctions (lila) abdichten. Ihnen lagern sich von außen die Perizyten (hellgrün) an, welche in der Basalmembran (gelb) eingebettet sind. Von außen lagern sich die Endfüße der Astrozyten (blau) an, welche über spezielle Transportproteine wie Aquaporin-4 (grün) verfügen.⁹⁵ Eigene Abbildung.

Die neurovaskuläre Einheit (engl. „neurovascular unit“, NVU) bildet sowohl eine anatomische als auch eine funktionelle Einheit. Sie setzt sich aus verschiedenen Zelltypen zusammen und beinhaltet neben den Komponenten der Blut-Hirn-Schranke auch Mikroglia, Oligodendrozyten und die Neurone.⁹⁶ Die Zellen der NVU sind für die Funktion, Stabilität und den Erhalt der BHS wichtig und sind an der Regulation des zerebralen Blutflusses (engl. „cerebral blood flow“, CBF) beteiligt.^{95,96} Neuere Arbeiten stellen zunehmend einen Zusammenhang zwischen gestörter Funktion der NVU und neurodegenerativen Erkrankungen her.^{96,97} Komponenten der NVU sind auch im Rahmen von SHT aller Schweregrade betroffen. Es wird angenommen, dass bleibende Beeinträchtigungen der NVU und BHS nach SHT an der Entstehung späterer neurodegenerativer Erkrankungen beteiligt sind.⁹⁶⁻⁹⁸

2.10.1. Endothelzellen

Endothelzellen kleiden die zerebralen Blutgefäße vollständig aus und bilden die hauptsächliche Barriere der BHS.⁸⁵ Seine Funktion übernimmt das Endothel durch enge Zell-Zell-Kontakte, die sogenannten „Tight Junctions“ (TJ). Tight Junctions sind eine Familie verschiedener Proteine, welche die Zellzwischenräume zwischen den Endothelzellen in luminaler Richtung abdichten und die parazelluläre Diffusion äußerst effektiv beschränken.⁹⁴ Sie bilden Komplexe aus intrazellulären und membranständigen Einheiten. Zu ihren

Komponenten zählen Zonula Occludens-1, Occludin und Claudin-3 und -5.^{87,94} Tight Junctions unterliegen einer aktiven Regulation und beeinflussen die Durchlässigkeit der BHS für verschiedenste Stoffe.^{87,91,94,99}

Der Stofftransport durch die Endothelbarriere erfolgt auf verschiedenen Wegen.⁸⁵ Gase wie Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid können frei in beide Richtungen diffundieren, genauso wie kleine, lipophile Moleküle.⁸⁶ Größere Moleküle und Nährstoffe werden über Carrier- oder Rezeptor-vermittelten Transport aufgenommen.⁸⁶ Eine wichtige Funktion kommt dem Endothel bei der Aufrechterhaltung des Ionengleichgewichts des Gehirngewebes zu. Dieses beeinflusst entscheidend die Funktion und Erregbarkeit von Zellen und ist im neuronalen Gewebe in engen Grenzen reguliert. Um dieses Gleichgewicht aufrecht zu erhalten und eine optimale synaptische und neuronale Funktion, unabhängig von Schwankungen der Ionenkonzentration des Blutes, zu gewährleisten, exprimieren die Endothelzellen eine Vielzahl an Ionenkanälen und -transportern.^{86,87}

Endothelzellen sind ebenfalls bedeutende Regulatoren der Durchlässigkeit der BHS. Diese ist im Rahmen inflammatorischer Vorgänge erhöht.^{86,91} Pharmakologische Interventionen wie die Gabe von Glukokortikoiden hingegen stabilisieren die endothelialen Tight Junctions und verhindern eine vermehrte Permeabilität der BHS.¹⁰⁰⁻¹⁰² Im Rahmen experimenteller Schädel-Hirn-Traumata konnten Unterbrechungen der endothelialen Tight Junctions nachgewiesen werden. Studien im Mausmodell konnten über mehrere Monate persistierende Lücken in der Tight-Junction-Barriere nachweisen.¹⁰³ Doherty et al. gelang in einem Patienten mit post mortem bestätigter CTE der Nachweis, dass phosphoryliertes Tau-Protein sich vorrangig an Gefäßen mit Unterbrechung der Tight Junctions ansammelt.⁷⁷

2.10.2. Perizyten

Perizyten liegen den Endothelzellen abluminal an und sind von der Basalmembran umgeben. Sie sind an der Regulation des kapillären, zerebralen Blutflusses beteiligt.^{95,104} Sie besitzen kontraktile Elemente und Eigenschaften als Antwort auf Stimulation durch Neurotransmitter und bilden Rezeptoren für vasogene Mediatoren, was ihre Rolle in der Regulation des zerebralen, kapillären Blutflusses nahelegt.^{104,105} Darüber hinaus sind sie am Aufbau und Erhalt der Stabilität der BHS und Gefäßarchitektur beteiligt.^{105,106}

Ihr Fehlen ist mit einem Auftreten neurodegenerativer Veränderungen vergesellschaftet, welches sich unter anderem durch eine erhöhte Durchlässigkeit der BHS und verringerte, kapilläre Perfusion auszeichnet.¹⁰⁷ Auch im Nachgang nach einer Gehirnerschütterung ist eine verminderte Abdeckung muriner Kapillaren durch Perizyten beschrieben.¹⁰⁸

2.10.3. Basalmembran

Die Basalmembran ist ein stabilisierendes Gerüst aus extrazellulärer Matrix, in welches die Endothelzellen, Perizyten und astrozytären Endfüße eingebettet sind.⁹⁵ Sie besteht aus einem vaskulären und einem parenchymatösen Anteil und setzt sich aus verschiedenen Komponenten, darunter Kollagen, Lamininen, und Perlecan, zusammen.^{87,95,109} Ihre vaskulären Komponenten werden von Endothelzellen und ihre parenchymatösen Anteile von Astrozyten gebildet.⁹⁵ Die Basalmembran vermittelt die Stabilität der BHS und der neurovaskulären Einheit und stellt eine wichtige kommunikative Schnittstelle ihrer zellulären Komponenten dar, welche zur dynamischen Regulation der Basalmembran und BHS beitragen.^{87,95}

Beeinträchtigungen und Unterbrechungen der Basalmembran sind nach SHT bereits beobachtet worden.¹¹⁰ Im Rahmen inflammatorischer Vorgänge wurde die vermehrte Sekretion von Molekülen beschrieben, welche die Basalmembran abbauen.⁷⁸ Da die Basalmembran für die Verbindung und Stabilisierung der Komponenten der BHS und neurovaskulären Einheit bedeutsam ist, kommt eine Beeinträchtigung beider funktioneller Systeme durch diese Art der mikrovaskulären Schädigung in Betracht.

2.10.4. Astrozyten

Astrozyten gehören zu den Gliazellen und finden sich im gesamten Hirngewebe verteilt.⁹⁵ Sie unterstützen die synaptische Signalübertragung, indem sie Neurotransmitter aus dem synaptischen Spalt aufnehmen, halten die extrazelluläre Ionenkonzentration konstant, regulieren den pH-Wert und übernehmen eine Stützfunktion des Neuropils.^{95,111} Astrozyten, auch „Sternzellen“ genannt, sind über ihre Fortsätze weitverzweigt im Neuropil und umgeben Synapsen und Blutgefäße.¹¹¹ Über Kanalproteine, sogenannte „Gap Junctions“, kommunizieren Astrozyten untereinander und bilden eine weitverzweigte, funktionelle Einheit, ein sogenanntes „funktionelles Syncitium“.⁹⁵ Neuere Arbeiten zeigen, dass die einst als homogene Klasse angesehenen Astrozyten sich je nach Hirnregion in verschiedene Subklassen aufteilen.¹¹²

Astrozyten sind Teil mehrerer, funktioneller Systeme. An den Gefäßen des Gehirns umgeben die perivaskulären Fortsätze, die sogenannten Endfüße, der Astrozyten zusammen mit dem parenchymatösen Anteil der Basalmembran die Endothelzellen und angelagerte Perizyten und sind Teil der Blut-Hirn-Schranke.^{95,113,114} Als Teil der BHS sorgen sie für die Stabilisierung der Basalmembran über die Sekretion ihrer Komponenten, regulieren die Durchlässigkeit der BHS über verschiedene Mediatoren und Signalwege und sind am Transport aufgenommener Stoffe beteiligt.^{91,95,109,111} An ihren Endfüßen finden sich spezielle Transportproteine, die die selektive

Aufnahme von Stoffen und Metaboliten fein regulieren.⁹⁵ Hervorzuheben ist an dieser Stelle das Wasserkanalprotein Aquaporin-4. Die Expression von Aquaporin-4 ist „polarisiert“, das bedeutet, dass an den perivaskulären Endfüßen eine höhere Dichte an Aquaporin-4 exprimiert wird als an den parenchymatösen Fortsätzen und Zellkörpern.^{115,116} Hierüber regulieren sie als Teil der BHS deren Durchlässigkeit für Wassermoleküle. Als Bestandteil des glymphatischen Systems (vgl. Kap. 2.11) ermöglichen sie den Ein- und Austritt von Liquor und interstitieller Flüssigkeit (engl. „interstitial fluid“, ISF) aus dem perivaskulären Raum.^{95,115,116} Darüber hinaus sind Astrozyten essenzieller Bestandteil der NVU. Sie sind die Schnittstelle zwischen Neuronen und Gefäßen und übernehmen die Kommunikation des neurovaskulären Couplings zur Regulation des zerebralen Blutflusses im Kapillarbett.^{95,97,111}

Durch Schädigungen des Hirngewebes kommt es zu Veränderungen der astrozytären Funktionen und Morphologie. Diese Veränderungen sind heterogen und von Lokalisation und Schweregrad der Schädigungen abhängig.^{111,117,118} Astrozyten gehen in einen „reaktiven“ Phänotyp über, welcher zumeist durch eine Hochregulierung des Struktur- und Markerproteins GFAP gekennzeichnet ist.^{117,119,120} Nach SHT grenzen reaktive Astrozyten verletztes Hirngewebe von Gesunderm ab und regulieren sowohl die neuroinflammatorische Antwort als auch die Durchlässigkeit der BHS.^{117,121} Strittig ist, ob reaktive Astrozyten die Regeneration des Hirngewebes befördern oder behindern. Neuere Arbeiten deuten eine positive Rolle reaktiver Astrozyten bei der Regeneration neuronaler Gewebe und der Begrenzung sekundärer Schädigungen an.^{111,121} So sind sie an der Wiederherstellung der BHS-Funktion beteiligt und verhindern eine überschießende, inflammatorische Reaktion.¹²¹ Eine solche reaktive Astrogliose kann auch nach leichten SHT und Gehirnerschütterungen beobachtet werden, wobei sie bei wiederholten Traumata stärker ausfällt.^{122,123}

2.11 Das glymphatische System

Das glymphatische System wurde 2012 erstmals von Iliff et al. beschrieben. „Glymphatisch“ ist ein Neologismus und setzt sich aus den Worten „Glia“ und „lymphatisch“ zusammen.¹²⁴ Das glymphatische System hat analog zum lymphatischen System die Funktion, das Hirngewebe von extrazellulär anfallenden Toxinen, Metaboliten und Abfallstoffen zu befreien.^{124,125} Dies geschieht über den kontinuierlichen Austausch von ISF gegen den das Hirngewebe umgebenden Liquor (cerebrospinal fluid, CSF).¹²⁵

Das Gehirn ist von Liquor umgeben, welcher einerseits Nährstoffe enthält und andererseits als „Stoßdämpfer“ des Gehirns im knöchernen Schädel fungiert.¹¹⁶ Dem knöchernen Schädel innen anliegend befindet sich die harte Hirnhaut, „Dura mater“ (von lat. Durus = hart). Ihr innen anliegend findet sich die Arachnoidea, die „Spinnwebhaut“. Das Gehirngewebe wird direkt von der weichen Hirnhaut, der Pia Mater, bedeckt. Zwischen Pia und Arachnoidea erstreckt sich der sogenannte Subarachnoidalraum. In diesem befindet sich der Liquor cerebrospinalis. Auf der durch die Pia Mater bedeckten Hirnoberfläche verlaufen die Blutgefäße, welche schließlich in die Tiefen des Hirngewebes eindringen.¹²⁶ Entlang dieser Blutgefäße erstreckt sich weiter der Liquor-gefüllte, paravaskuläre Raum und zieht gemeinsam mit den Blutgefäßen mit in das Hirngewebe. Der paravaskuläre Raum, auch Virchow-Robin-Raum genannt, wird innerlich von der Pia Mater und äußerlich durch die astrozytären Endfüße und die parenchymatöse Basalmembran begrenzt.¹¹⁶ Der arteriellen Pulswelle folgend wird der Liquor mit ins Gewebe gespült und tritt vom paravaskulären Raum über den Wasserkanal Aquaporin-4 in den Endfüßen der Astrozyten in das Hirngewebe über. Innerhalb des Hirngewebes verteilt sich der Liquor und vermischt sich mit der interstitiellen Flüssigkeit. In einem kontinuierlichen Fluss sickert der Liquor durch das Hirngewebe, nimmt Abfallstoffe, Metabolite und Toxine aus dem extrazellulären Raum mit und verlässt das Hirngewebe als ISF wieder entlang des paravenösen Raumes über Aquaporin-4 in den astrozytären Endfüßen. Entlang der venösen Gefäße verlässt der ISF die Schädelgrube und wird schließlich in die lymphatische Zirkulation eingespeist.^{116,124,127}

Dem glymphatischen Fluss kommt so eine wichtige Funktion zu. Durch den ständigen Austausch von Liquor und ISF übernimmt er die Rolle einer „Müllabfuhr“ des Hirngewebes.¹²⁵ Studien deuten darauf hin, dass das glymphatische System während des Schlafes die höchste Aktivität aufweist.¹²⁸

Störungen dieses Systems werden deshalb mit neurodegenerativen Veränderungen in Verbindung gebracht. Insbesondere der polarisierten Expression des Wasserkanals Aquaporin-4 kommt hier eine Bedeutung zu. Aquaporin-4 wird deutlich häufiger entlang der paravaskulären Endfüße der Astrozyten exprimiert als entlang der astrozytären Zellfortsätze innerhalb des Hirngewebes. Diese Art der gerichteten Expression von Aquaporin-4 nennt man

„Polarisation“. Störungen der Aquaporin-4-Polarisation, also des Gleichgewichts zwischen perivaskulärem und nicht-perivaskulären Aquaporin-4, werden mit einem gestörten und eingeschränkten glymphatischen Fluss, und damit einem beeinträchtigten Abtransport von Abfallstoffen aus dem Hirngewebe in Verbindung gebracht.^{116,125,127} Durch Störungen des glymphatischen Flusses kommt es zur Akkumulation toxischer Abfallprodukte, welche neurodegenerative Veränderungen begünstigen. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass das Protein A β -40, welches sich im Rahmen der Alzheimer Erkrankung im Hirngewebe ansammelt, in Mäusen mit gestörter Funktion von Aquaporin-4 entlang des paravaskulären Raumes akkumuliert.¹²⁹

Auch im Rahmen von leichten SHT konnten experimentelle Studien chronische Beeinträchtigungen des glymphatischen Systems in Menschen und Tieren nahelegen.^{75,130}

Das glymphatische System bietet so eine potenzielle Erklärung, weshalb wiederholte Gehirnerschütterungen zu neurodegenerativen Erkrankungen führen.

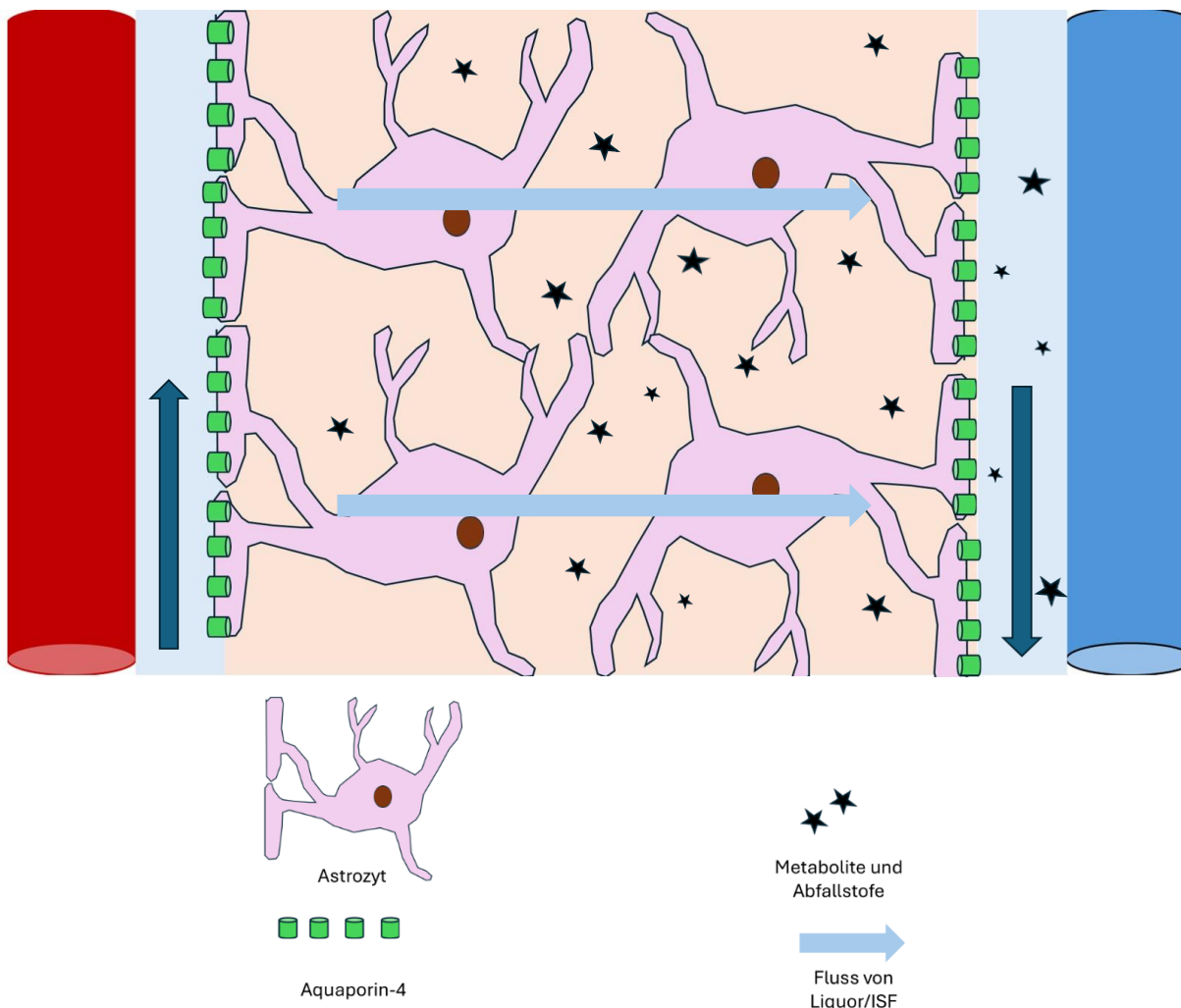


Abbildung 9: Schematischer Aufbau des glymphatischen Systems. Auf der arteriellen Seite des perivaskulären Raumes wird der Übertritt von Liquor über Aquaporin-4 in den astrozytären Endfüßen in das Hirnparenchym ermöglicht. Getrieben durch den Massenfluss, sickert der Liquor durch das Gewebe (hellblaue Pfeile), vermischt sich mit dem ISF und nimmt Abfallstoffe mit (schwarze Sterne). Auf der venösen Seite verlässt der ISF das Hirngewebe über Aquaporin-4 in den venösen, perivaskulären Raum. Eigene Abbildung, modifiziert nach Iliff et al., 2012¹²⁴

2.12 Neuroinflammation

Nach Schädel-Hirn-Traumata aller Schweregrade wurde ein Anstieg inflammatorischer Marker und Zytokine sowie ein vermehrtes Einwandern von Immunzellen beobachtet. Zudem kommt es zu einer Aktivierung von Astrozyten (vgl. Kap. 2.10.4) und Mikroglia. Insbesondere Mikroglia, die residenten Immunzellen des Gehirns, sind an der Vermittlung neuroinflammatorischer Vorgänge beteiligt.^{131,132} In Folge der Leckage der BHS kommt es zu einem Extravasat von Serumproteinen, welche diese sogenannte Neuroinflammation hervorrufen. In der Folge kommt es zu einer Freisetzung verschiedener inflammatorischer Mediatoren, welche die Barrierefunktion der BHS beeinträchtigen. Mikroglia sezernieren IL-1 β und TNF, welche die Verteilung der TJ beeinflussen. Astrozyten setzen MMP-9 frei, eine Matrixmetalloproteinase, welche die Basalmembran abbaut und so die Durchlässigkeit der BHS erhöht.^{91,131,132} Neuroinflammation kann im Rahmen von Reparaturvorgängen von Nutzen sein, etwa zur Abgrenzung einer Läsion von gesundem Gewebe und Phagozytose im Bereich der Nekrosezone, bei überschießender oder dysregulierter Immunantwort treten jedoch auch sekundär schädigende Effekte auf.^{132,133} Neuroinflammatorische Mediatoren und Zytokine bewirken über verschiedene Signalkaskaden eine erhöhte Durchlässigkeit der BHS, wobei eine Dysregulation der BHS über den Eintritt verschiedener Stoffe wiederum die neuroinflammatorische Antwort verstärkt.⁹¹

Nach Gehirnerschütterungen und leichtgradigen SHT können inflammatorische Antworten beobachtet werden.^{88,123,132} Diese beschränken sich im Rahmen einmaliger SHT zumeist auf die subakute Phase und bilden sich innerhalb weniger Wochen zurück.^{88,134} Nach wiederholten, leichten SHT werden auch längerfristige inflammatorische Veränderungen beobachtet.^{122,134} Persistierende Neuroinflammation wird mit neurodegenerativen Erkrankungen in Verbindung gebracht und könnte zu der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen nach SHT beitragen.¹³³

2.13 Neurodegeneration

Verschiedene Studien diskutieren einen Zusammenhang zwischen wiederholten Gehirnerschütterungen und Jahrzehnte später auftretenden, neurodegenerativen Erkrankungen (vgl. Kap. 2.8.2).^{29,34,35,135-59} Verschiedene Hypothesen und Studien deuten auf eine Beteiligung der BHS und des glymphatischen Systems bei der Entstehung dieser neurodegenerativen Veränderungen und der CTE hin. Besonders nach wiederholten Gehirnerschütterungen ist das Auftreten von Störungen der BHS in der akuten und subakuten Phase beschrieben worden.^{76,93} In neurologischen Bildgebungsstudien konnte auch der

Nachweis langfristiger Störungen der BHS erbracht werden.^{76,89} Dysfunktionen und eine erhöhte Durchlässigkeit der BHS werden auch in verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen beobachtet.¹³⁶ Die CTE ist unter anderem durch das vermehrte Auftreten perivaskulären p-Taus gekennzeichnet, was eine vaskuläre Beteiligung an der Entstehung dieser Erkrankung vermuten lässt.⁶⁷ Studien konnten zudem eine dauerhaft erhöhte Durchlässigkeit der BHS an Stellen, an denen sich p-Tau-Plaques sammelten, nachweisen.⁷⁷ Diskutiert wird eine erhöhte Durchlässigkeit der BHS als Folge wiederholter Traumata, welche über den akuten Zeitraum hinaus persistiert.^{76,98} Verursacht durch fokale Extravasate von Serumproteinen kommt es zur Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia, welche inflammatorische Botenstoffe freisetzen.¹³² Diese Botenstoffe führen zu einer erhöhten Durchlässigkeit der BHS. Eine erhöhte Durchlässigkeit der BHS führt jedoch wiederum zur Aufrechterhaltung der neuroinflammatorischen Antwort.⁹¹ Eine dauerhaft vorliegende Neuroinflammation ist wiederum Merkmal neurodegenerativer Erkrankungen.¹³³

Weiterhin werden Störungen des glymphatischen Systems als mögliche Ursache neurodegenerativer Erkrankungen diskutiert. Besonders der perivaskulären Expression von Aquaporin-4 kommt eine entscheidende Bedeutung zu: wurde die Funktion von Aquaporin-4 pharmakologisch oder genetisch unterdrückt, konnte eine vermehrte Akkumulation der neurodegenerativen Marker A β -40 und p-Tau beobachtet werden.^{74,129} Auch nach leichten SHT sind Beeinträchtigungen des glymphatischen Systems beschrieben worden.^{75,130} Diese könnten mitverursachend für das erhöhte Auftreten neurodegenerativer Erkrankungen nach wiederholten SHT sein.

2.14 Fragestellungen und Ziel der vorliegenden Arbeit

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, die mikrovaskuläre Architektur der Blut-Hirn-Schranke nach einmaligen und wiederholten Traumata verschiedener Frequenz über drei Hirnregionen hinweg im Mausmodell der Gehirnerschütterung darzustellen.

Hierzu wurden Parameter der „mikrovaskulären Coverage“ erhoben, die die Abdeckung der zerebralen Gefäße durch astrozytäre Endfüße und das Wasserkanalprotein Aquaporin-4 beschreibt. Zudem erfolgt die Evaluation des glymphatischen Systems anhand der Ermittlung der Aquaporin-4-Polarisation als Verhältnis der Verteilung von perivaskulärem zu nicht-perivaskulärem Aquaporin-4.

Die Hypothesen hierzu lauten:

- (i) Es sind Veränderungen der mikrovaskulären Komponenten der Blut-Hirn-Schranke und des glymphatischen Systems in der akuten und chronischen Phase nach Gehirnerschütterung nachweisbar. Diese drücken sich anhand von Veränderungen folgender Parameter aus: Aquaporin-4-Coverage, GFAP-Coverage, Aquaporin-4-Polarisation.
- (ii) Das Ausmaß dieser Veränderungen korreliert mit dem Ausmaß des Auftretens von Immunglobulin G Extravasat in der akuten Phase und
- (iii) mit dem Auftreten neurodegenerativer Marker in der chronischen Phase.
- (iii) Dexamethason beeinflusst die mikrovaskuläre Architektur bei hochfrequent traumatisierten Tieren in der subakuten Phase im Vergleich zu dem einer ebenfalls hochfrequent traumatisierten, unbehandelten Kontrollgruppe.

Die vorliegende Arbeit dient der Verbesserung des Verständnisses der Pathophysiologie nach wiederholten Gehirnerschütterungen, wie sie beispielsweise im professionellen Sportbereich vorkommen. Besonderes Augenmerk liegt auf der Charakterisierung mikrovaskulärer Schädigungsmuster und Regenerationsverläufe unterschiedlicher Hirnregionen im zeitlichen Verlauf. Kenntnisse hierüber könnten verbesserte Therapieempfehlungen und hierauf aufbauende, zukünftige Forschungsvorhaben ermöglichen.

3. Material und Methoden

3.1. Tierexperimentelles Modell

Die *in vivo* Versuche wurden durch andere Mitglieder der Arbeitsgruppe durchgeführt. Für den Tierversuch (Lizenz LANUV AZ 2020.A058) wurden neun Wochen alte, männliche Mäuse genutzt (Wildtyp der Rasse C57Bl/6Jrj, Charles River Laboratories Frankreich). Der Versuchsaufbau gliederte sich in zwei Teilversuche:

Für den ersten Versuchsteil wurden Tiere in der subakuten und chronischen Phase nach CBI untersucht und waren einer von vier Behandlungskonditionen zugeteilt: (i) Tiere, die eine einzelne CBI erhielten (CBI); (ii) Tiere, die eine CBI einmal pro Woche erhielten, insgesamt fünf Traumata (lowRepCBI) und (iii) Tiere, welche eine repetitive, hochfrequente CBI jeden zweiten Tag über eine Woche hinweg erhielten (highRepCBI) sowie (iv) eine Kontrollgruppe ohne Traumata (Sham). Die Traumatisierung der Tiere erfolgte mittels des in unserer Arbeitsgruppe etablierten „Closed-Head-Impact“-Modells.⁹³ Die Applikation des Traumas erfolgte über einen Bolzenschlag auf die geschlossene, knöcherne Schädeldecke in nur leichter Sedierung, um mögliche Auswirkungen einer Narkose auf die neuronale Aktivität gering zu halten. Das Trauma hinterließ keinerlei knöcherne oder parenchymatöse Defekte, wie mittels Bildgebung und HE-Übersichtsfärbung des Gehirns der Tiere dargestellt werden konnte.⁹³ Die Applikationsstelle des Traumas befand sich rechts paramedian entlang des Scheitelbeines zwischen Bregma und Lambda (AP 0.5 ML -2.5 Li). Die Beobachtungsperiode für die Tiere der subakuten Phase nach CBI (N=18) betrug sieben Tage, gezählt ab dem letzten Trauma. Die Tiere der chronischen Phase (N = 34) untergingen einer Beobachtungsperiode von 82 Tagen, ebenfalls gezählt ab dem letzten Tag der Traumatisierung.

Tabelle 1: Gruppenaufteilung in Versuchsteil 1

Behandlungsgruppe	Subakut (7 Tage)	Chronisch (82 Tage)
Sham	4	11
CBI	4	9
lowRepCBI	5	5
highRepCBI	5	9
Summe	18	34

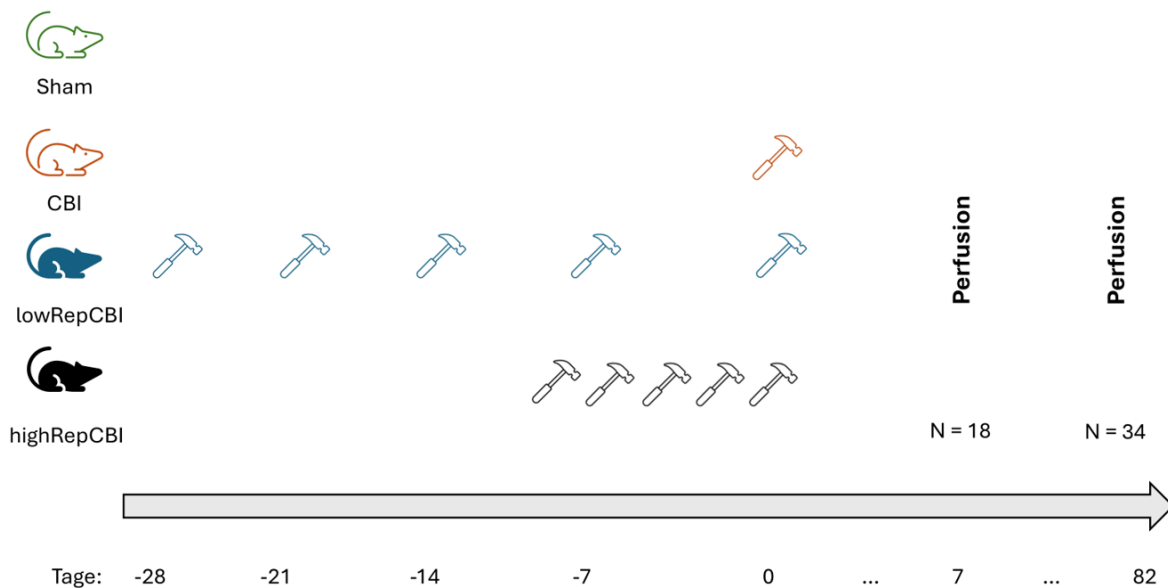


Abbildung 10: Versuchsanordnung in Versuchsteil 1. Untersucht wurden Veränderungen der mikrovaskulären Coverages nach einfacher („CBI“) und wiederholter mTBI („lowRepCBI“ und „highRepCBI“) zu zwei Zeitpunkten: für die subakute Phase nach sieben Tagen an N = 18 Tieren, für die chronische Phase nach 82 Tagen an N = 34 Tieren.

Die Tiere des zweiten Versuchsteils wurden zuvor in zwei Gruppen eingeteilt: (i) eine Interventionsgruppe, welche Dexamethason erhielt, und (ii) eine Kontrollgruppe, welche Kochsalzlösung erhielt. Alle Tiere erhielten eine hochfrequente Traumatisierung über eine Woche, jeden zweiten Tag, insgesamt fünfmal (highRepCBI). Beginnend zehn Tage vor der letzten Traumatisierung begann die tägliche Behandlung der Tiere, hierbei erhielt die Kontrollgruppe eine subkutane Injektion von Kochsalzlösung (NaCl; Kontrollgruppe) und die Interventionsgruppe eine subkutane Applikation von Dexamethason (Dexamethason Injektionslösung 2 mg/ml, CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf) in einer Dosis von 5mg/kg/Körpergewicht. Am Tag der letzten Traumatisierung erfolgte die Perfusion der Tiere und Hirnentnahme zur histologischen Untersuchung auf das Vorliegen von Veränderungen des mikrovaskulären Interfaces zwischen Interventions- und Kontrollgruppe als Hinweis auf einen möglichen prophylaktischen und therapeutischen Nutzen von Dexamethason in der Behandlung einer CBI.

Tabelle 2: Gruppeneinteilung Versuchsteil 2

Behandlungsgruppe	
Dexamethason	4
Kochsalzlösung	4
Summe	8

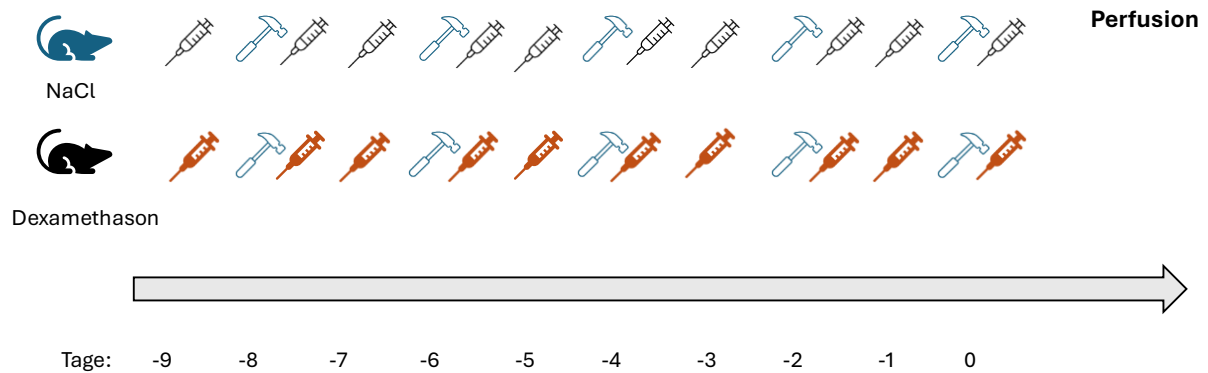


Abbildung 11: Gruppeneinteilung und Versuchsanordnung zu Versuchsteil 2. Beide Gruppen erhalten über zehn Tage hinweg eine subkutane Gabe von Kochsalzlösung (Kontrollgruppe, blaue Maus und durchsichtige Spritze) oder Dexamethason (Interventionsgruppe, schwarze Maus und orangene Spritze). Beide Gruppen erhalten jeden zweiten Tag eine mTBI (blauer Hammer).

Im Anschluss an die Beobachtungsperiode erfolgte in allen Versuchsteilen die Perfusion der Tiere, die Entnahme des Gehirns, sowie eine Cryofixation in Methylbutan (- 80°C).

3.2. Gewebeaufbereitung und Erstellen von Hirnschnitte am Kryostaten

Die weiteren *ex vivo* Experimente erfolgten durch die Doktorandin. Zunächst wurden Semidünnschnitte der Gehirne (Schnittdicke 10µm) am Kryostaten (Leica CM3050, Wetzlar, Deutschland) erstellt. Nach Akklimatisierung der bei -80°C gelagerten Gehirne der jeweiligen Tiere über 30 Minuten bei -23 °C in die Kammer des Kryostaten erfolgte die Fixierung der Probe mittels Tissue Tek (4583, Tissue-Tek® O.C.T. Compound, Sakura) auf einem Probenhalter.

Es erfolgte die durchgehende Erstellung koronarer Hirnschnitte vom Frontalhirn bis zum Okzipitalpol. Makroskopisch sichtbare Verletzungen und Abweichungen des Gehirns wurden notiert. Das Aufnehmen der Schnitte erfolgte mit Superfrost Slides (SuperFrost Plus™ Adhäsionsobjektträger, J1800AMNZ, EpreDia). Die endgültige Lagerung der Proben erfolgte bei -20°C bis zur weiteren Verwendung.

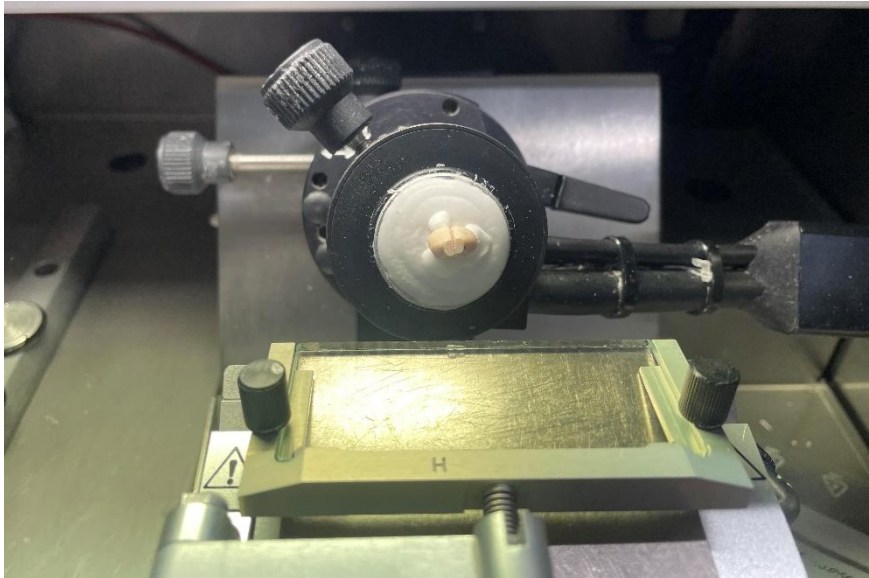


Abbildung 12: Gehirn eines Versuchstieres, welches in die Probenhalterung des Kryostaten eingespannt ist. Zu erkennen ist die koronare Schnittführung und die entstehende Schnittfläche.

3.3. Immunhistochemische Färbungen gegen GFAP, Aquaporin-4 und Lectin

Die immunhistochemischen Färbungen für GFAP und Aquaporin-4 erfolgten anhand eines an die Arbeit von Zaltsman et al.¹⁰³ angelehnten Protokolls.

Als Zielregion (region of interest, ROI) erfolgte primär die Analyse des Hippocampus. Nach Akklimatisation bei Raumtemperatur über 30 Minuten folgte die Umrandung der Proben auf dem Objektträger mittels Fettstiftes (Super PAP Pen Liquid Blocker neu, Science Services, München, Deutschland). Anschließend wurden die Proben für 30 Minuten mit 4% Paraformaldehyd (ROTI®Histofix 4 % Formaldehyd, phosphatgepuffert, pH 7, Carl Roth GmbH + Co. KG) in PBS post-fixiert. Hierauf folgte der erste Waschschrift für dreimal zehn Minuten in PBS. Es erfolgte das Auftragen einer Blocking Solution aus 5% Albumin aus Rinderserum (Bovine Serum Albumin (BSA), heat shock fraction, pH 5.2, ≥96%, A3912, Sigma-Aldrich) und 0,25% Triton™ X-100 (Triton™ X-100, T8787, Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt) in PBS und Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte das Auftragen des primären Antikörpers in einer Lösung aus 1% BSA in einfach konzentrierter PBS in einer Konzentration. Als Primärantikörper wurde Anti-Aquaporin-4 (Aquaporin-4 monoclonal Antibody (rabbit), ab259318, abcam, Cambridge, Großbritannien; 1:400) zur Darstellung der membranständigen Wassertransporter bzw. Anti-GFAP (MAB360 (mouse), EMD Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, 1:500) zur Darstellung von Astrozyten verwendet. Hiernach erfolgte die Inkubation über Nacht bei 4°C im Kühlschrank. Am Folgetag erfolgte das Entfernen des primären Antikörpers mittels dreimaligen Waschens für jeweils 10 Minuten in PBS. Anschließend erfolgte das Auftragen des sekundären Antikörpers (Donkey anti-Rabbit Alexa Fluor™ 568, #A10042, Invitrogen und Goat anti-Mouse Alexa Fluor™ 568, #A-21124, Invitrogen; 1:500) und zusätzlicher Inkubation mit dem primär fluoreszierenden Lectin-Antikörper (Lycopersion Tomato-Lectin 488, L32470, Invitrogen; 1:400) zur Darstellung zerebraler Kapillaren in einer Trägerlösung aus 1% BSA und PBS. Die Proben wurden lichtgeschützt für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgten drei Waschungen in PBS für je zehn Minuten. Im nächsten Schritt erfolgte die Gegenfärbung mittels Kernfarbstoffes Hoechst (Hoechst 3342, 62249, Thermo Fisher Scientific; 1:2000) in PBS für 30 Minuten und finale Waschung für dreimal zehn Minuten in PBS. Zur Aufbewahrung erfolgte das Covern mittels Fluoromount-G® (0100-01, Southern Biotech, Birmingham, USA) und Coverslides (Rechteckige Deckgläser, 631-0146, VWR®). Diese wurden zum Trocknen für 24 Stunden unter dem Abzug belassen. Nach Abschluss des Trocknungsvorgangs wurden die Objektträger aus dem Papierordner entnommen und bei 4°C gelagert.

3.4. Etablierung und immunhistochemische Färbung von Zonula Occludens – 1

Die Färbung von Zonula-Occludens-1, einem Transmembranprotein der Tight Junctions, erfolgte an Tieren des Dexamethasonversuchs.

In einem ersten Durchgang wurde in Referenz an das in Liraz Zaltsman et al.¹⁰³ verwendete Protokoll eine Verdünnungsreihe des primären Antikörpers (Zonula-Occludens-1 polyclonal Antibody (rabbit), #61-7300, Invitrogen) zur Ermittlung einer optimalen Konzentration bei geeignetem Signal-zu-Rausch-Verhältnis (engl. „Signal-to-noise-ratio“, SNR) durchgeführt. Die Verdünnungsreihe dieses Durchgangs wurde in Konzentrationen von 1:50, 1:100 und 1:200 angesetzt und im Anschluss mit den beschriebenen Standardeinstellungen mikroskopiert (3.6).

In einem zweiten Durchgang wurden Hirnschnitte aus Versuchsteil 2 mit dem in (3.3) beschriebenen Protokoll in Konzentrationen von 1:100 und 1:200 untersucht. Die Mikroskopie der Samples erfolgte in Standardsettings (3.6) und alterierten Settings für den RHOD-Kanal (Exposure: 120 ms, Gain: 60). Die gefärbten Schnitte wurden auf ihre Auswertbarkeit geprüft. Als nicht-auswertbar wurden Proben eingestuft, bei denen aufgrund eines ungünstigen SNR keine spezifische Darstellung der Zielstrukturen und automatisierte Auswertung (3.8) möglich war.

3.5. Korrelation der Parameter mit individuellen Markern von BHS-Störung und Neurodegeneration

Das Ausmaß der Störung der BHS war bereits zuvor durch andere Mitglieder der Arbeitsgruppe über den Surrogat-Parameter des extravasären Immunglobulins G in der akuten Phase nach CBI quantifiziert worden ⁷. Diese bereits publizierten Daten wurden hier zur individuellen sowie gruppenübergreifenden Korrelation der durch die Doktorandin erhobenen spezifischen Parameter genutzt.

Als Surrogatparameter von Neurodegeneration wurde die ebenfalls zuvor durch andere Mitglieder der Arbeitsgruppe bestimmte Expression von nukleärem, phosphoryliertem Tau-Protein verwendet. Auch diese bislang unpublizierten Daten wurden hier zur individuellen sowie gruppenübergreifenden Korrelation der durch die Doktorandin erhobenen spezifischen Parameter genutzt.

3.6. Mikroskopie

Die erstellten Fluoreszenzfärbungen wurden innerhalb einer Woche nach Beendigung des Färbeprozesses mittels eines Fluoreszenzmikroskops (Leica DMI8, CMS GmbH, Wetzlar, Deutschland) mikroskopiert und fotografiert. Bis zur Verwendung für die Mikroskopie wurden die Proben lichtgeschützt in einer Objektträgerkiste bei 4°C eingelagert. Die Mikroskopie erfolgte stets mit denselben Settings für Signalverstärkung (Gain) und Belichtungszeit (Exposure) in 20-facher Vergrößerung. Hierbei wurde ein Bild des gesamten Hirnschnitts in drei Kanälen angefertigt. Kennzeichnend für jeden Kanal ist, dass das über die Lichtquelle emittierte Licht durch einen Filter nur für bestimmte Wellenlängen durchlässig ist. Dieses regt spezifisch die Fluorophore der sekundären Antikörper und Detektionssysteme an, welche wiederum Licht im Bereich einer ebenfalls spezifischen Wellenlänge emittieren, welches nun detektiert wird. Die Einstellungen der Settings für die einzelnen Farbkanäle wurden zu Beginn empirisch, mittels visueller Kontrolle, vorgenommen und nachfolgend für jedes Bild beibehalten (DAPI: Exposure: 10 ms, Gain: 1, RHOD: Exposure: 50.00 ms, Gain: 22.21, FITC: Exposure: 43.71 ms, Gain: 24.55). Durch das symmetrische Setzen von „Focus Points“ zur Einstellung der Schärfe über das gesamte Hirn verteilt, konnte eine gleichmäßig hohe Auflösung erzielt werden. Es wurde jeweils nur ein Hirnschnitt des Objektträgers mikroskopiert und bei der Auswahl des Schnittes darauf geachtet, dass möglichst wenig störende Artefakte (Luftblasen oder Gewebeschäden) vorlagen. Das gesamte Bild eines Hirnschnitts bestand aus mehreren hundert Einzelaufnahmen des Gewebes. Die entstandenen Bilder wurden als „Overlay“-Bild gespeichert, ein mittels Software (Leica Application Suite (LAS X), Leica Microsystems, Wetzlar) erstelltes übereinandergelegtes und gerendertes Bild aus Aufnahmen aller drei verwendeten Farbkanäle. Das fertige Overlay-Bild wurde als TIF-Datei auf einer externen SSD gespeichert und zur weiteren Auswertung verwendet.

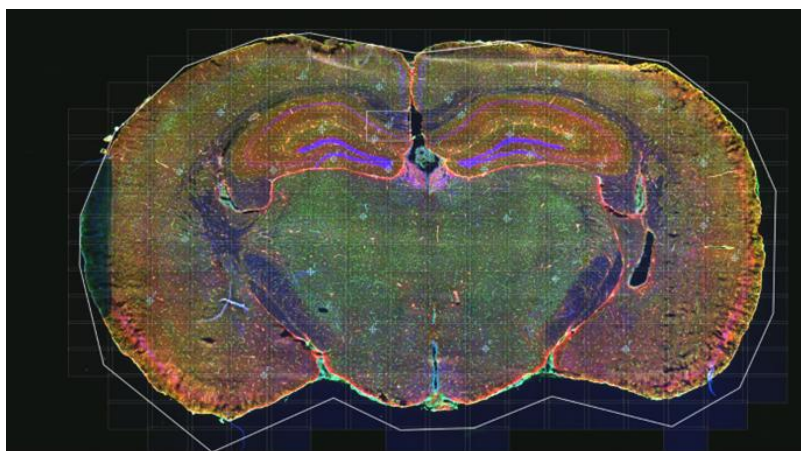


Abb. 13: Exemplarisches „Overlay“-Bild einer GFAP-Färbung. Zu sehen sind die hellblauen Focus Points über beiden Hemisphären sowie die Umgrenzung der einzelnen Aufnahmen des Mikroskops in weiß als Gittermuster.

3.7. Bildbearbeitung

3.7.1. Erstellen einer Atlas-Maske

Die Bildbearbeitungs- und Analysesoftware ImageJ 64 (Fiji Distribution, Version 1.54k 15 September 2024¹³⁷) wurde zur Vorbereitung des Bildmaterials genutzt. Zunächst erfolgt die semimanuelle Registrierung der histologischen Aufnahmen auf den Allen Mouse Brain Atlas (AMBA) ^{138,139} mittels ImageJ. Hierzu wurde die koronare Version des Allen mouse Reference Atlas in einer Schichtdicke von 50µm mit 264 Schichten (engl. „Stack“) genutzt.

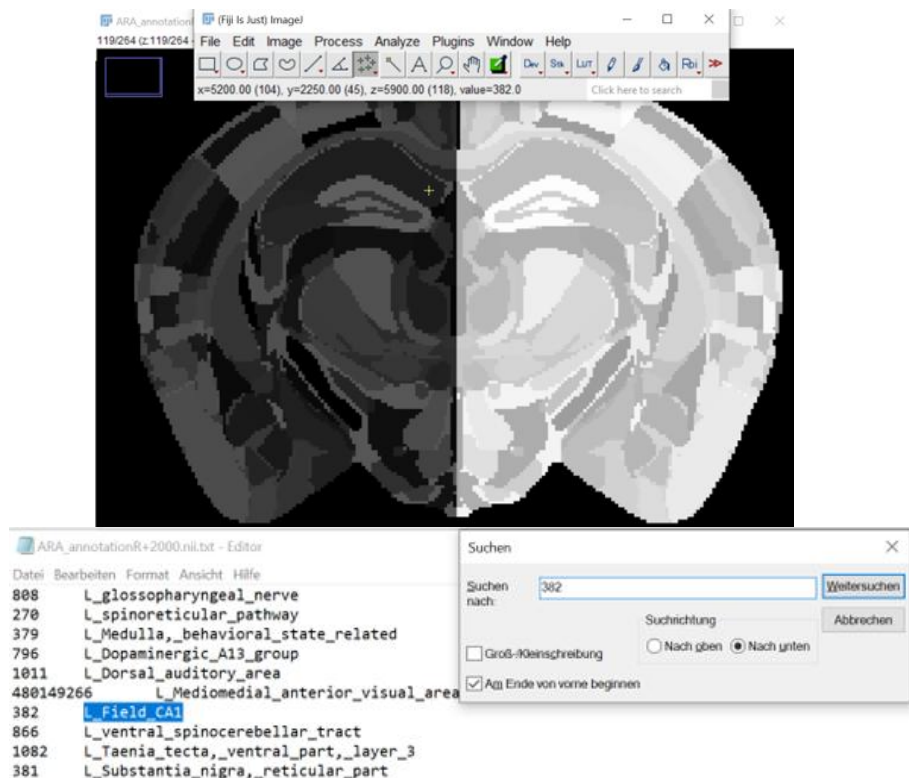


Abb. 14: Slide 119/264 des ARAannotation Atlas. Zu erkennen sind die einzelnen ROIs, welche in unterschiedlichen Graustufen abgebildet werden. Die gelbe Markierung kennzeichnet die Region des linken Cornu Ammonis, Sektor I. Dieser hat den Grauwert „382“, zu sehen ganz rechts unter der Kommandozeile als „value“. Anhand dieses Wertes ist diese ROI in der zugehörigen .txt-Datei eindeutig zu identifizieren.

Es erfolgte das Setzen von Landmarken (insgesamt 52 Punkte bihemisphärisch) mithilfe der Programm-eigenen „Landmark correspondance“-Funktion auf der histologischen Abbildung sowie korrespondierendem Referenzbild des „ARA Annotation Atlas“.

Als interessierende Regionen für die Erhebung der Daten und weitere Analyse wurden jeweils die Region des Hippocampus, Teile des Kortex' und des Thalamus aufgesucht und ausgewertet.

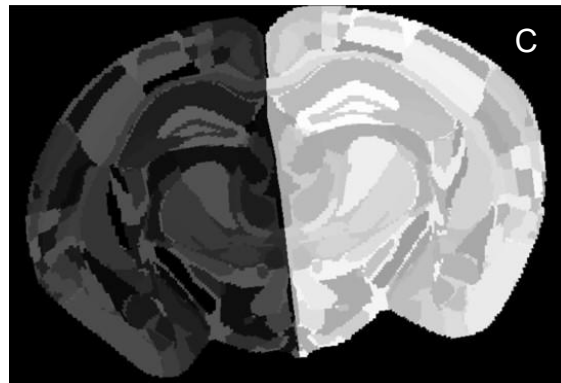
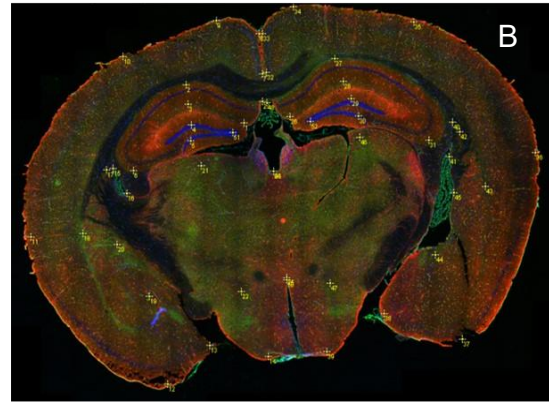
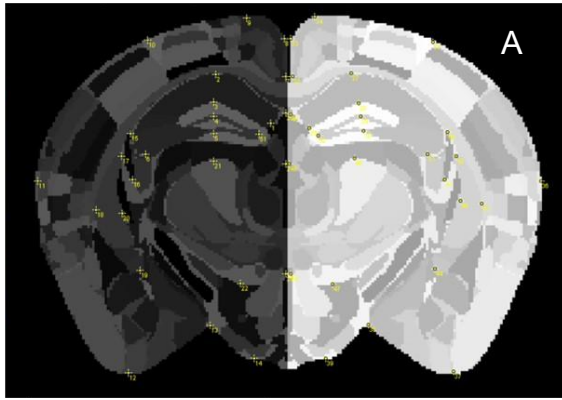


Abb. 15: Erstellen der Atlasmasken. A: Aufsuchen des korrespondierenden Schnittes auf dem ARA Annotation Atlas und Setzen von insgesamt 52 Landmarken (gelbe Markierungen). B: Aufsuchen und Setzen der korrespondierenden Landmarken auf dem „Overlay“-Bild des Hirnschnittes in derselben Reihenfolge. C: Generierte Maske des „Overlay“-Bildes, auf welcher sämtliche anatomischen ROIs des Hirnschnitts abgebildet sind.

3.7.2. Thresholding

Nach Generierung der Atlasmaske erfolgte eine manuelle Bildbearbeitung des „Overlay“-Bildes, um störende Artefakte zu mindern. Kleinere Falten oder Risse wurden aus der weiteren Analyse entfernt. Zur Erstellung einer vaskulären bzw. astrozytären Maske erfolgte das manuelle Setzen eines Schwellenwertes (engl. „thresholding“) für jedes einzelne Bild im grünen (FITC, Lectin-Färbung) und roten Kanal (RHOD, Signal von Aquaporin-4 oder GFAP).

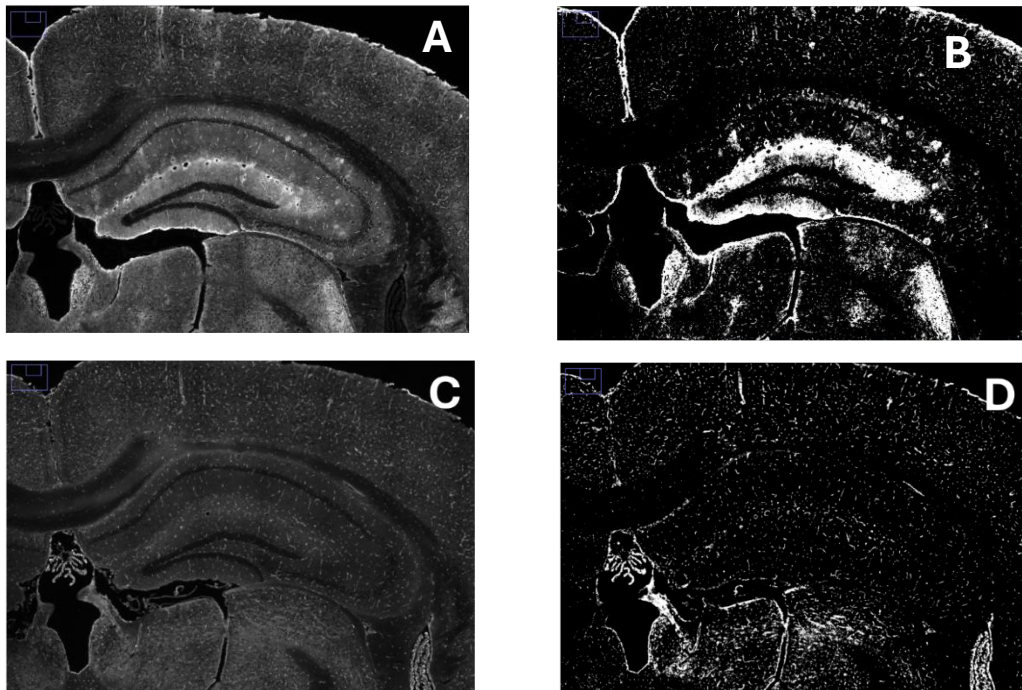


Abb. 16: Thresholding der Mikroskopie-Bilder. A: Graustufenbild des roten Kanals (hier Aquaporin-4-Signal), B: Bild A) nach Thresholding als Schwarz-Weiß-Darstellung C: Graustufenbild des grünen Kanals (Lectin-Signal), D: Bild C) nach Thresholding.

3.8. Automatisierte Auswertung

Die weitere Auswertung der Bilddateien erfolgte automatisiert in MATLAB (MATLAB Version: 24.1.0.2653294 (R2024a) Update 5, Natick, Massachusetts: The MathWorks Inc.; 2024). Die hierzu benötigte Software wurde von Herr Dr. med. Stefan J. Blaschke erstellt und zur Verfügung gestellt. Die Ausgabe der Parameter erfolgte als Excel-Datei, in welcher pro Zeile, für jede als Ziffer kodierte Region von Interesse (ROI), fünf berechnete Parameter angegeben wurden: der von Blutgefäßen bedeckte Anteil der Region in Prozent, die Aquaporin-4- bzw. GFAP-Coverage in Prozent, die vaskuläre und paravaskuläre Signalintensität und die hieraus errechnete Polarisation des Signals. Als interessierende Regionen wurden für alle Versuchsgruppen Teile des Kortex, der Hippocampus und der Thalamus festgelegt. Diese Read-Outs wurden für jede ROI jedes Tieres in einer separaten Datei in Microsoft Excel zur weiteren Verwendung zusammengetragen.

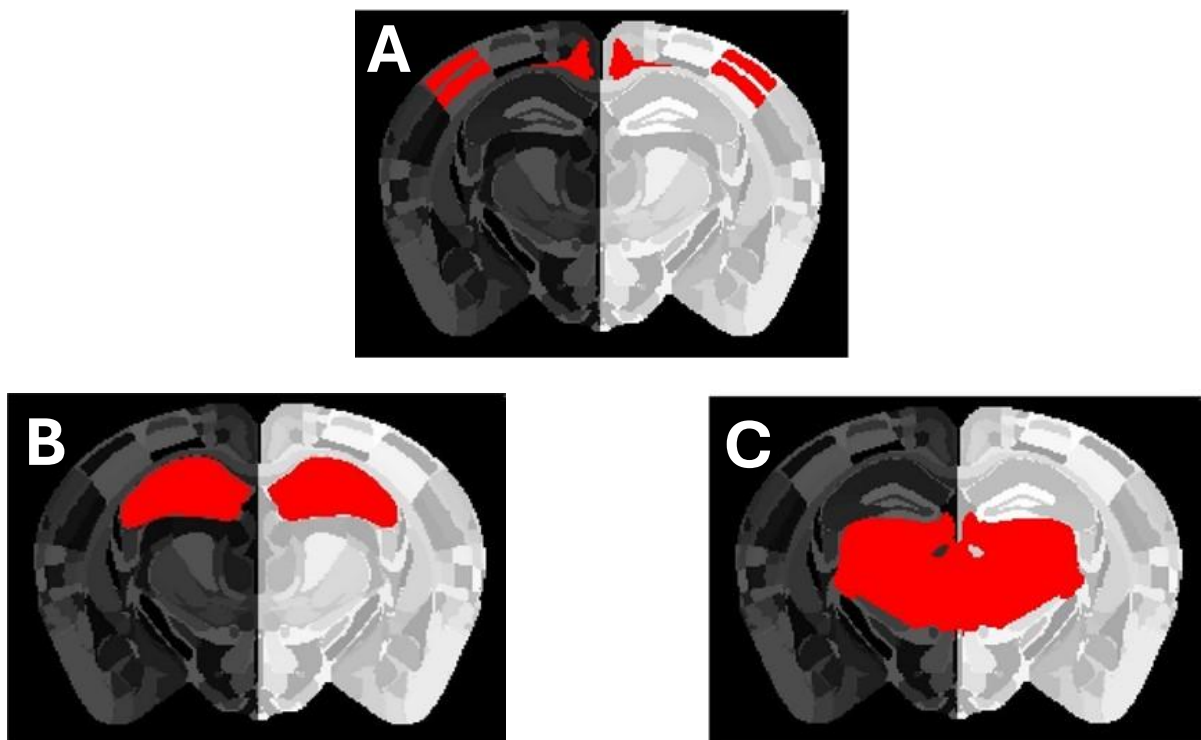


Abbildung 17: Grafische Darstellung der "Regions of interest" (ROIs): Die Regionen des Kortex (A), Hippocampus (B) und Thalamus (C) sind jeweils rot hervorgehoben.

3.8.1. Erhebung der Aquaporin-4- und GFAP-Coverage

Die BHS setzt sich aus den Tight Junctions der Endothelzellen, der Basallamina und den Endfüßen der Astrozyten zusammen (siehe Kap. 2.10). Die astrozytären Endfüße lagern sich den zerebralen Blutgefäßen an und bedecken diese von außen. Um diese mikrovaskuläre

Bedeckung (engl. „Coverage“) der Blutgefäße durch die Endfüße der Astrozyten zu quantifizieren und die Integrität der BHS detailliert zu untersuchen, wurden die Parameter der GFAP- und Aquaporin-4-Coverages erhoben. GFAP ist ein Strukturprotein der Astrozyten und diente zur Darstellung der Zellen und ihrer Endfüße. Aquaporin-4 findet sich in wesentlich höherer Zahl an den perivaskulären Endfüßen der Astrozyten als an den parenchymatösen Fortsätzen. Die Erhebung der Aquaporin-4-Coverages diente als ergänzender, sensitiver Parameter der Darstellung der astrozytären Endfüße.¹⁰³ Veränderungen dieser Bedeckung können auf Störungen der BHS-Funktion hinweisen. Vorarbeiten konnten bereits eine Korrelation zwischen gestörter BHS-Funktion im Sinne einer erhöhten Durchlässigkeit an Stellen mit *verminderter* GFAP- und Aquaporin-4-Coverage nachweisen.¹⁰³

Die „Coverage“ beschreibt die Abdeckung einer Zielregion A, in diesem Fall der Lectin-positiven Gefäße durch Signal B (z.B. Aquaporin-4 pos. astrozytäre Endfüße, GFAP pos. Astrozyten). Hierzu erfolgte zunächst die Erstellung einer binären Gefäßmaske auf Basis des Lectin-Signals (vgl. 3.7.2, Abb. 16). In einem zweiten Schritt erfolgte der Overlay einer gethresholdeten Signal-Maske mit der vorherigen Gefäßmaske. Der Anteil der doppelt-positiven (Lectin+, Signal+) Voxel an der Anzahl aller Gefäßvoxel innerhalb einer Region (in %) ergab den jeweiligen Coverage-Wert.

3.8.2. Erhebung der Aquaporin-4-Polarisation

Die Aquaporin-4-Polarisation diente als Parameter für Veränderungen des glymphatischen Systems. Sie beschreibt das Verhältnis von perivaskulärem zu nicht-perivaskulärem Aquaporin-4-Signal. Aquaporin-4 wird entlang der perivaskulären astrozytären Fortsätze in wesentlich höherer Zahl exprimiert als an den parenchymatösen Fortsätzen.

Nach Normalisierung auf die individuelle Hintergrundfluoreszenz erfolgte die Messung der Signalintensität (z.B. AQP-4 bzw. GFAP) innerhalb einer binärisierten Gefäßmaske (siehe oben), welche mittels morphologischer Dilation („imdilate“, disk, $r = 5$ px) erweitert wurde, um den perivaskulären Raum abzubilden. Das Verhältnis von peri- (I_p) zu extravaskulärer (I_e) Intensität (Polarisation = I_p/I_e) beschreibt die Polarisation.

Störungen der Aquaporin-4-Polarisation werden als Hinweise auf Dysfunktionen des glymphatischen Systems gewertet. In Vorarbeiten beschrieben ist eine *Abnahme* der Aquaporin-4-Polarisation nach Schädel-Hirn-Traumata, welche von einer verringerten Penetration intrazisternal applizierter Tracer in das Hirngewebe begleitet wurde und als putativer Marker einer Störung des glymphatischen Pathways interpretiert wird.¹³⁰ Ein erhöhter Wert zeigt hierbei eine relativ gesehen vermehrte perivaskuläre Signalintensität, welches entweder auf eine erhöhte vaskuläre Abdichtung oder Signalanreicherung im perivaskulären Gewebe hinweisen kann.

3.9. Statistik

Sämtliche Rohdaten wurden vor der weiteren statistischen Auswertung mittels Z-Transformation innerhalb der Färbedurchgänge in Microsoft Excel standardisiert. Die z-Transformation erfolgte normiert auf den jeweiligen Färbedurchgang, wobei die Färbedurchgänge gleichmäßig so aufgeteilt wurden, dass jeder Durchgang jede Behandlungskondition (Sham, CBI, lowRepCBI und highRepCBI) enthielt.

Für die statistische Auswertung wurde das Programm „Statistical Package for the Social Sciences“ (SPSS, Version 30.0, International Business Machines Corporation, Armonk, USA) verwendet. Die statistische Auswertung der Versuchsteile erfolgte getrennt voneinander. Es erfolgte die Prüfung der Datensätze auf Normalverteilung mittels Prüfung durch Shapiro-Wilks-Test bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ und graphischer Inspektion der Verteilung mittels Histogramms und Q-Q-Diagramm.

Nicht-normalverteilte Datensätze wurden mittels Kruskal-Wallis-Test für den Vergleich der Behandlungsgruppen der subakuten und chronischen Phase auf Signifikanz geprüft ($p < 0,05$), bei Normalverteilung erfolgte die Durchführung eines ANOVA. Für den Vergleich der Behandlungskonditionen in der Dexamethason-Studie erfolgte bei Normalverteilung die Durchführung eines T-Tests, bei nicht normalverteilten Daten die Durchführung eines Mann-Whitney-U-Tests unter Angabe der exakten Signifikanz (Signifikanzniveau jeweils $< 0,05$).

Die Berechnung der Korrelationen der Parameter des mikrovaskulären Interfaces (Aquaporin-4- und GFAP-Coverage, Aquaporin-4-Polarisation) mit Immunglobulin G-Extravasat und p-Tau-Immunreaktivität erfolgte für normalverteilte Daten mittels Pearson-Korrelationskoeffizient, für nicht-normalverteilte Daten mittels Spearman-Korrelationskoeffizient.

Zur Erstellung von Grafiken wurde die Software GraphPadPrism (Version 8.0.2, Dotmatics, Boston, USA) genutzt.

4. Ergebnisse

4.1 Blut-Hirn-Schranken-Charakteristika in der subakuten Phase nach CBI

Die Beobachtungsperiode für die subakute Phase betrug für alle Tiere und Konditionen sieben Tage, beginnend ab der letztmaligen CBI, die Gruppengröße betrug $n = 18$ Tiere (vgl. Abb. 10). Untersucht wurden die Regionen Kortex, Hippocampus und Thalamus (vgl. Kap. 3.8) in vier Behandlungskonditionen. Die erhobenen Parameter wurden rechtshemisphärisch (ipsilateral zur CBI) und linkshemisphärisch (contralateral zur CBI) gemessen, dann wurde zusätzlich ein Mittelwert der Hemisphären gebildet („mean“), und jeweils zwischen den Behandlungskonditionen verglichen.

4.1.1. Aquaporin-4-Coverage in der subakuten Phase nach CBI

Für die kortikalen ROIs ergaben sich keine signifikanten Gruppenunterschiede, weder gemittelt über beide Hemisphären („mean“ $p = 0.575$, $H(3) = 1.989$) noch in der isolierten linkshemisphärischen ($p = 0.865$, $H(3) = 0.737$) oder rechtshemisphärischen Region ($p = 0.190$, $H(3) = 4.768$).

Auch für den Hippocampus ergab sich weder im Mittel ($p = 0.854$, $H(3) = 0.779$), noch isoliert links- ($p = 0.575$, $H(3) = 1.989$) oder rechtshemisphärisch ($p = 0.888$, $H(3) = 0.639$) ein signifikanter Gruppenunterschied.

In den thalamischen ROIs (Abb. 18 A und B, jeweils rechter Boxplot) zeigte sich – gemittelt über die Hemisphären – ein nicht-signifikanter Trend zu einem Gruppenunterschied („mean“ $p = 0.095$, $H(3) = 6.368$) mit einer Erhöhung der Aquaporin-4-Coverage im paarweisen Vergleich der CBI und highRepCBI-Gruppe ($p = 0.091$, $z = -2.429$, Post-Hoc Tests mit Bonferroni-Korrektur für Mehrfachvergleiche). Dieser Effekt wurde nicht durch nur eine Hemisphäre getrieben, sondern war sowohl linkshemisphärisch ($p = 0.278$, $H(3) = 3.849$) als auch rechtshemisphärisch als Trend zu beobachten ($p = 0.186$, $H(3) = 4.812$).

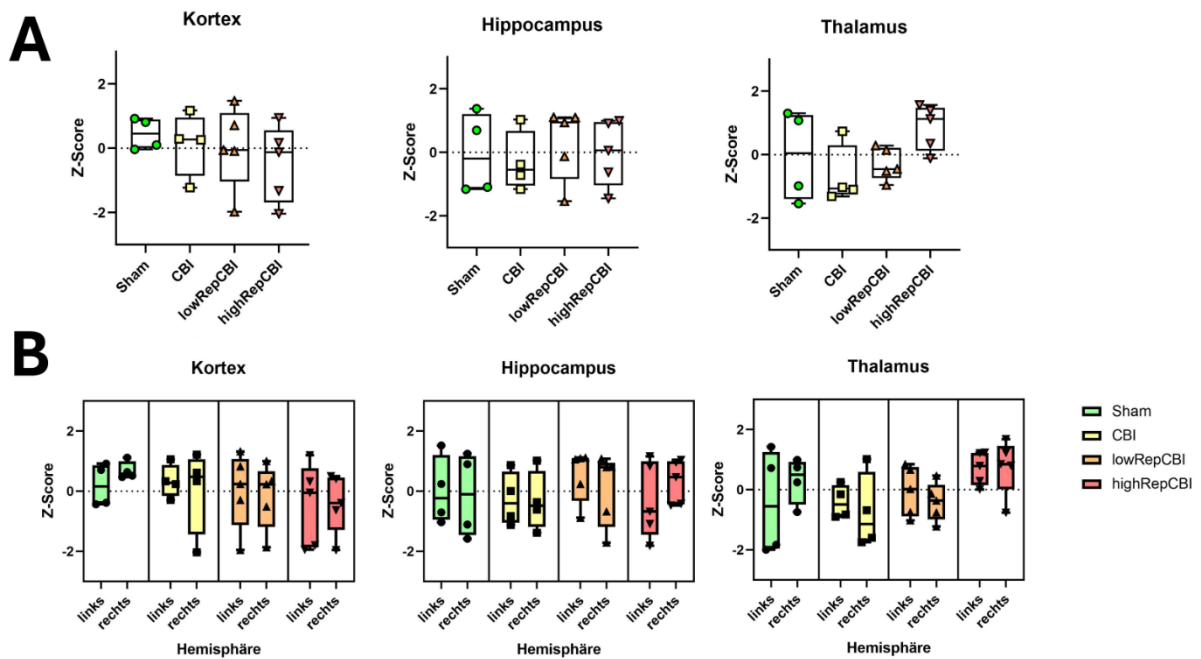


Abbildung 18: Boxplot der Z-Scores der Aquaporin-4-Coverage des Kortex, Hippocampus und Thalamus. A: Boxplots der zwischen den Hemisphären gemittelten Z-Scores („mean“), B: Z-Scores der jeweils linken und rechten Hemisphäre. Es zeigte sich ein nicht-signifikanter Trend einer Zunahme im Thalamus der highRepCBI-Tiere. Die Whisker der Boxen umfassen alle Werte, vom Minimum zum Maximum. Es erfolgte die Beurteilung der Verteilung der Daten mittels Shapiro-Wilk-Test, Histogramm und Q-Q-Diagramm. Die Daten der untersuchten Regionen lagen für alle erhobenen Parameter nicht normalverteilt vor. Es folgte die Anwendung eines Kruskal-Wallis-Tests zur Erhebung von Gruppenunterschieden. Alle Tiere konnten in die Auswertung eingeschlossen werden (n = 18).

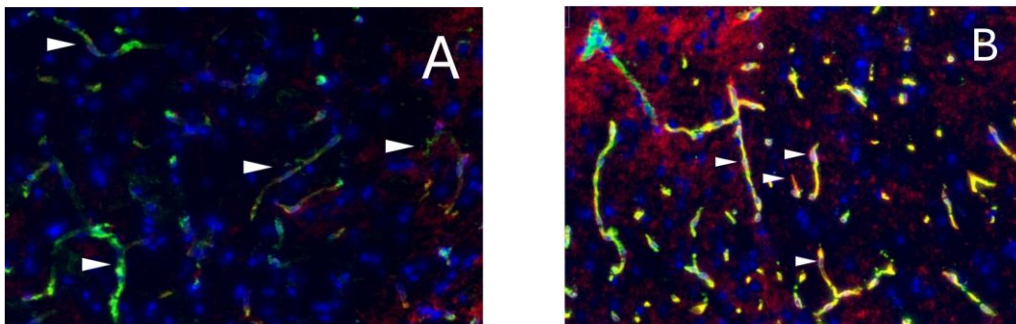


Abbildung 19: Darstellung der Aquaporin-4-Coverage im Thalamus der Versuchstiere im subakuten Zeitraum. Es zeigt sich eine Zunahme der Aquaporin-4-Coverage im highRepCBI-Tier (B) im Vergleich mit Sham (A), Das Aquaporin-4-Signal ist durch weiße Pfeile gekennzeichnet. Gezeigt sind beispielhafte Regionen aus dem Thalamus beider Behandlungskonditionen.

4.1.2. GFAP-Coverage in der subakuten Phase nach CBI

Gemittelt über den Kortex beider Hemisphären ließen sich keine Unterschiede im Vergleich der vier Behandlungsgruppen feststellen („mean“ $p = 0.743$, $H(3) = 1.240$). Auch in der seitengetrenten Auswertung der Parameter fanden sich weder linkshemisphärisch ($p = 0.379$, $H(3) = 3.086$) noch rechtshemisphärisch ($p = 0.740$, $H(3) = 1.254$) signifikante Gruppenunterschiede. Auch im Hippocampus bestanden weder über die Hemisphären gemittelt („mean“ $p = 0.988$, $H(3) = 0.132$) noch in der seitengetrenten Betrachtung signifikante Unterschiede (links: $p = 0.987$, $H(3) = 0.139$; rechts: $p = 0.811$, $H(3) = 0.960$). Im Thalamus waren ebenfalls keine signifikanten Gruppenunterschiede zu beobachten („mean“ $p = 0.715$, $H(3) = 1.360$, linkshemisphärisch: $p = 0.838$, $H(3) = 849$; rechtshemisphärisch: $p = 0.520$, $H(3) = 2.263$).

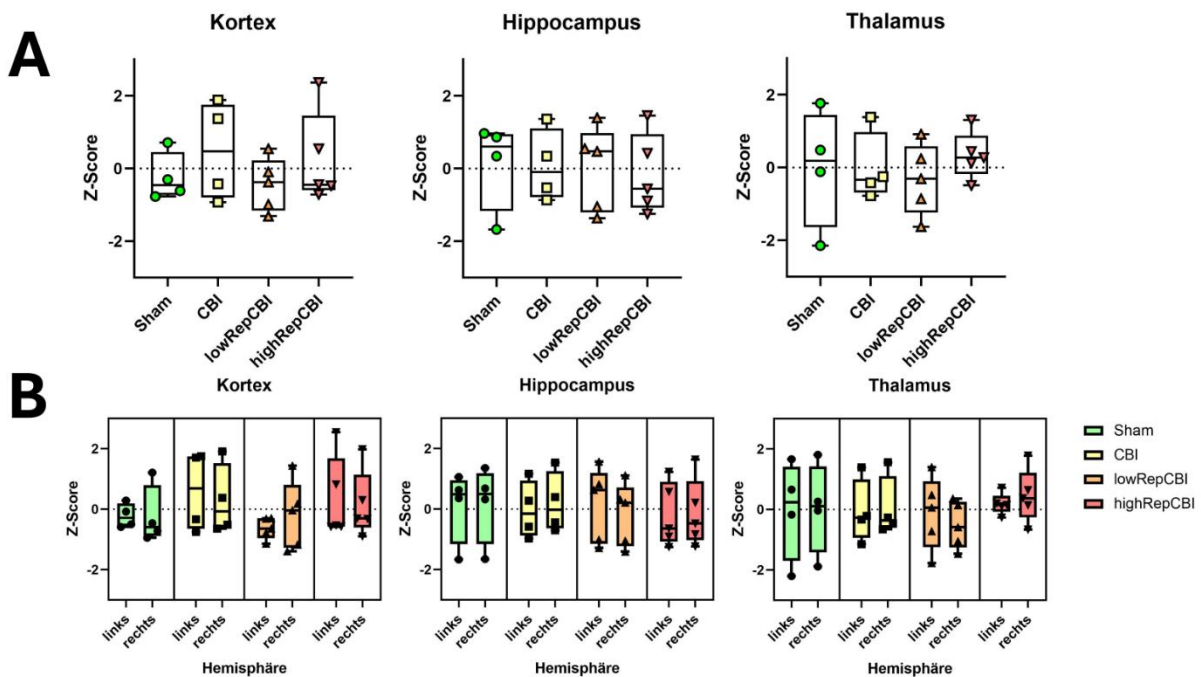


Abbildung 20: Z-Scores der GFAP-Coverages des Kortex, Hippocampus und Thalamus. A: Bilaterale Z-Scores („mean“), B: Z-Scores der linken und rechten Hemisphäre. Die Whisker der Boxen umfassen alle Werte, vom Minimum zum Maximum. Die z-standardisierten Werte wurden mittels Shapiro-Wilk-Tests, Histogramm und Q-Q-Plot auf Normalverteilung überprüft. Die Daten der GFAP-Coverages lagen für sämtliche ROIs nicht normalverteilt vor. Alle Tiere konnten in die Auswertung eingeschlossen werden ($n = 18$).

4.1.3. Aquaporin-4-Polarisation in der subakuten Phase nach CBI

Im Kortex ergaben sich keine signifikanten Gruppenunterschiede, weder in der gemittelten ($p = 0.462$, $H(3) = 2.575$), noch in der seitengetrenten Auswertung (linkshemisphärisch: $p = 0.438$, $H(3) = 2.714$, rechtshemisphärisch: $p = 0.571$, $H(3) = 2.005$).

Im Hippocampus bestand ein Trend zu einer Erhöhung der Aquaporin-4-Polarisation mit steigender Frequenz der Traumata (highRepCBI zu Sham, Abb. 22 A und B, jeweils mittlerer Boxplot), dieser war jedoch nicht statistisch signifikant (gemittelt: $p = 0.636$, $H(3) = 1.705$; isoliert linkshemisphärisch: $p = 0.403$, $H(3) = 2.926$; isoliert rechtshemisphärisch: $p = 0.969$, $H(3) = 0.251$).

Die Aquaporin-4-Polarisation im Thalamus war weder zwischen den Hemisphären gemittelt ($p = 0.485$, $H(3) = 2.447$) noch in der getrennten Betrachtung der Hemisphären (linkshemisphärisch: $p = 0.727$, $H(3) = 1.311$, rechtshemisphärisch: $p = 0.694$, $H(3) = 1.451$) verändert.

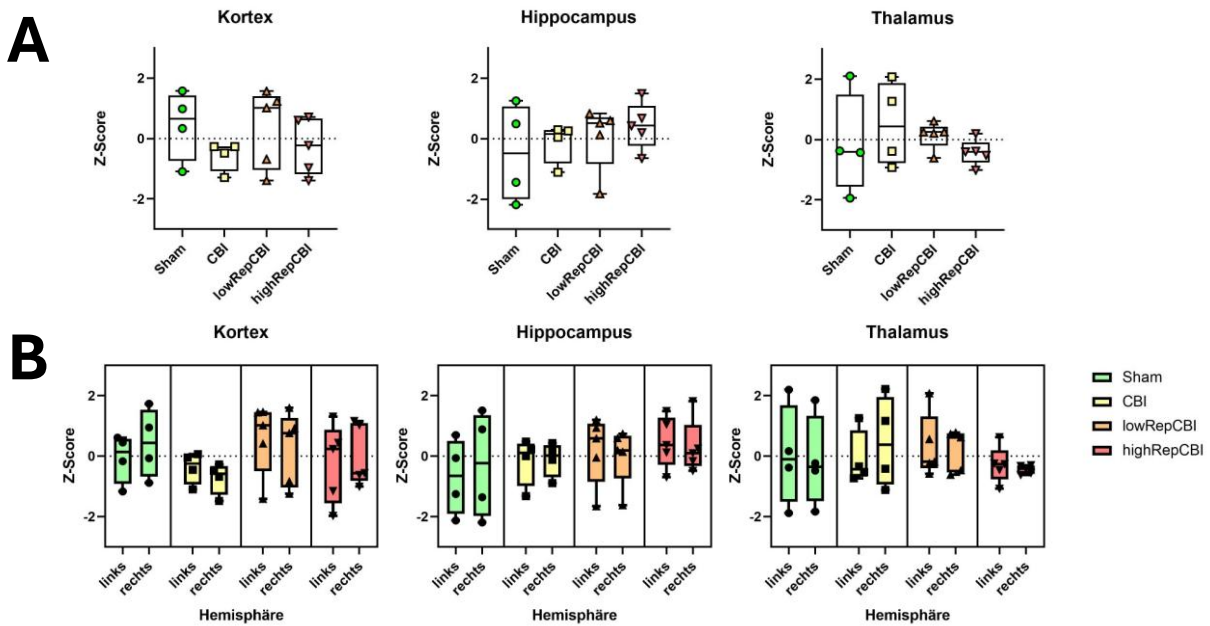


Abbildung 21: Z-Scores der Aquaporin-4-Polarisation des Kortex, Hippocampus und Thalamus. A: Bilaterale Z-Scores („mean“), B: Z-Scores der linken und rechten Hemisphäre Im Hippocampus der highRepCBI-Gruppe findet sich ein Trend zu einer Erhöhung der Aquaporin-4-Polarisation. Die Whisker der Boxen umfassen alle Werte, vom Minimum zum Maximum. Die z-standardisierten Werte für die Aquaporin-4-Polarisation lagen für sämtliche Regionen nicht normalverteilt vor. Es folgte die Durchführung eines Kruskal-Wallis-Test. Sämtliche Tiere konnten in die Auswertung eingeschlossen werden ($n = 18$).

4.2 Korrelation der BHS-Indices mit Immunglobulin G-Extravasat

Die Extravasation von Immunglobulin G (IgG) diente als Surrogatparameter für das Ausmaß der BHS-Störung und war in einer vorangegangenen Arbeit bereits untersucht worden. Für die vorliegende Arbeit wurden diese Werte in Korrelation gesetzt zu den hier erhobenen differenzierteren Parametern der BHS.

In allen drei untersuchten Hirnregionen war eine Erhöhung der IgG Extravasation als Zeichen der BHS-Störung nach hochfrequenter CBI im Vergleich zur untraumatisierten Sham-Kontrolle zu beobachten, die allerdings statistisch nicht ganz das Signifikanzniveau erreichte (Kortex: mean $p = 0.378$, $H(3) = 3.091$; rechtshemisphärisch $p = 0.706$, $H(3) = 1.397$, linkshemisphärisch $p = 0.227$, $H(3) = 4.342$; Hippocampus - mean: $p = 0.547$, $H(3) = 2.123$; rechtshemisphärisch: $p = 0.595$, $H(3) = 1.891$, linkshemisphärisch: $p = 0.436$, $H(3) = 2.727$; Thalamus: mean $p = 0.129$, $H(3) = 5.674$; rechtshemisphärisch: $p = 0.241$, $H(3) = 4.197$; linkshemisphärisch: $p = 0.053$, $H(3) = 7.687$).

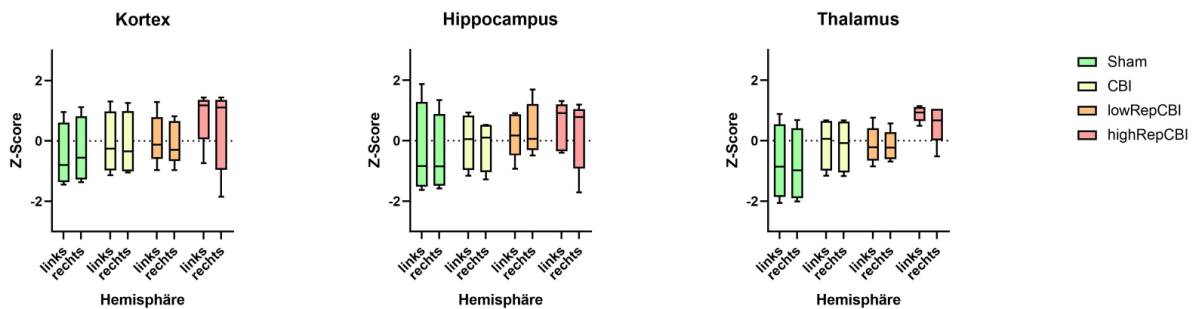


Abbildung 22: Darstellung der gemessenen IgG-Intensität als Z-Scores, aufgetrennt nach ROI und Hemisphäre. Am deutlichsten zu sehen ist ein Trend zu einer Erhöhung des IgG-Signals mit zunehmender Traumafrequenz im Thalamus der Tiere. Die Whisker des Boxplots umfassen alle Werte, vom Minimum bis zum Maximum. Sämtliche Datensätze lagen nicht normalverteilt vor, es erfolgte die Prüfung auf Korrelation mittels Spearman-Rho-Korrelationskoeffizienten für alle untersuchten Regionen. Es konnten alle Tiere in die Auswertung mit einbezogen werden ($n = 18$).

4.2.1. Korrelation von Aquaporin-4-Coverage und IgG-Extravasat

In den kortikalen Regionen fand sich über den gesamten Kortex hinweg keine signifikante Korrelation zwischen Aquaporin-4-Coverage und IgG-Extravasat ($r = -0.018$, $p = 0.945$). Auch in der seitengetrennten Betrachtung zwischen rechtem, ipsiläsionalem ($r = 0.056$, $p = 0.826$) und linkem, contraläsionalem Kortex fand sich keine Korrelation der beiden Parameter ($r = 0.160$, $p = 0.526$).

Zwischen Aquaporin-4-Coverage und IgG-Extravasat errechnete sich auch im gesamten Hippocampus kein gerichteter Zusammenhang („mean“: $r = 0.022$, $p = 0.932$). Rechtshemisphärisch offenbarte sich eine mittelgradig positive Korrelation ($r = 0.361$, $p = 0.141$), linkshemisphärisch eine schwach negativ ausgeprägte Korrelation $r = -0.236$, $p = 0.345$).

Über den bilateralen Thalamus hinweg fand sich keine signifikante Korrelation zwischen Aquaporin-4-Coverage und IgG-Extravasat ($r = 0.294$, $p = 0.236$), es ließ sich jedoch eine gerichtete Zunahme von Aquaporin-4-Coverage und IgG-Intensität in der highRepCBI-Gruppe feststellen. In der seitengetrennten Betrachtung fand sich linkshemisphärisch keine Korrelation ($r = 0.057$, $p = 0.823$), rechtshemisphärisch errechnete sich eine mittelgradig positive, nicht signifikante Korrelation ($r = 0.359$, $p = 0.144$).

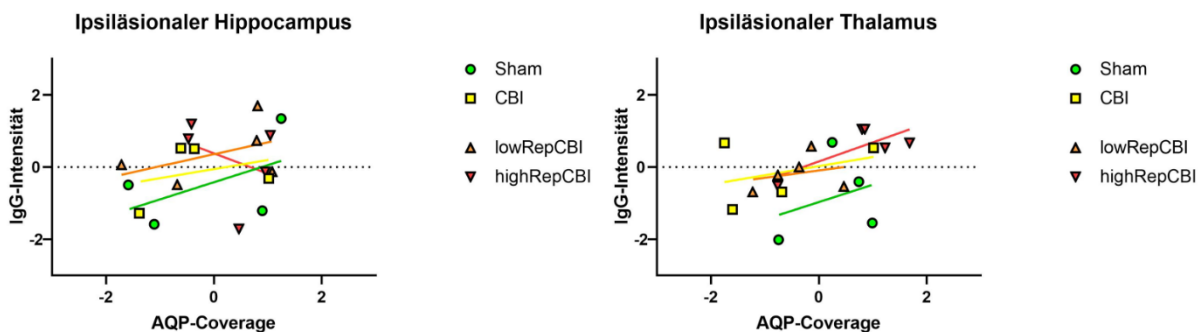


Abbildung 23: Scatter Plots der ipsiläsionalen, rechtshemisphärischen Z-Scores der Aquaporin-4-Coverage und IgG-Intensität im Hippocampus und Thalamus. Sämtliche Daten lagen nicht normalverteilt vor, es erfolgte die Erhebung der Korrelation mittels Spearman-Rangkorrelation der z-standardisierten Wertepaare ($n = 18$).

4.2.2. Korrelation von GFAP-Coverage und IgG-Extravasat

Über den kortikalen ROIs der Behandlungsgruppen errechnete sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen GFAP-Coverage und IgG-Extravasat („mean“: $r = 0.082$, $p = 0.748$; linkshemisphärisch: $r = 0.032$, $p = 0.032$; rechtshemisphärisch: $r = 0.138$, $p = 0.584$).

Für den Hippocampus errechnete sich über beide Hemisphären gemittelt ein Korrelationskoeffizient von $r = -0.195$ ($p = 0.438$). Linkshemisphärisch betrug dieser $r = -0.072$ ($p = 0.776$), rechtshemisphärisch $r = -0.372$ ($p = 0.129$). Zusammenfassend fand sich damit eine rechtshemisphärisch betonte, mittelgradige, negativ gerichtete Korrelation von GFAP-Coverage und Immunglobulin-G-Extravasat.

Im Thalamus der Versuchstiere fand sich eine schwach-negative Korrelation von IgG-Extravasat und GFAP-Coverage („mean“: $r = -0.121$, $p = 0.633$; linkshemisphärisch: $r = -0.057$, $p = 0.823$; rechtshemisphärisch: $r = -0.084$, $p = 0.741$).

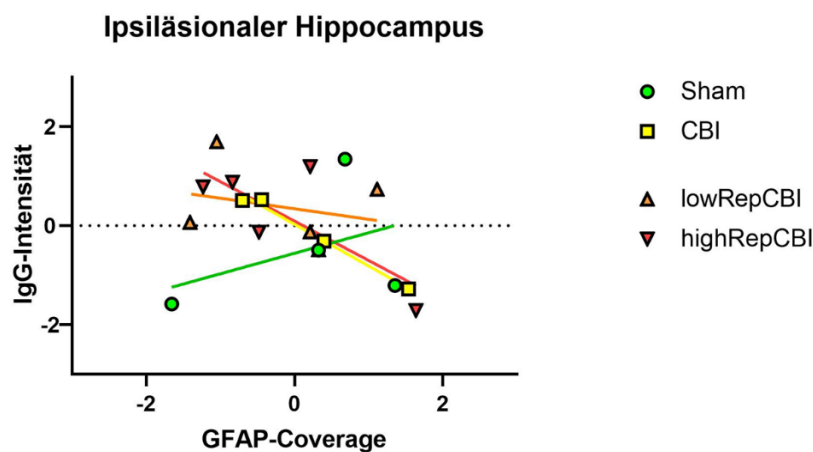


Abbildung 24: Scatter Plots der Z-Scores von GFAP-Coverage und IgG-Intensität im rechten, ipsiläsionalen Hippocampus. Die Regressionsgeraden deuten auf eine negative Korrelation von niedriger GFAP-Coverage und erhöhtem IgG-Extravasat hin. Sämtliche Daten lagen nicht normalverteilt vor, es erfolgte die Erhebung der Korrelation mittels Spearman-Rangkorrelation der z-standardisierten Wertepaare ($n = 18$).

4.2.3. Korrelation von Aquaporin-4-Polarisation und IgG-Extravasat

In den kortikalen ROIs ergab sich weder für die Betrachtung des gesamten Kortex noch in der seitengetrennten Betrachtung eine signifikante Korrelation zwischen Aquaporin-4-Polarisation und IgG-Extravasat („mean“: $r = 0.104$, $p = 0.681$; linkshemisphärisch“: $r = 0.143$, $p = 0.570$; rechtshemisphärisch: $r = 0.108$, $p = 0.608$).

Im Hippocampus zeigte sich eine positive, allerdings nicht statistisch signifikante Korrelation zwischen Aquaporin-4-Polarisation und gestörter BHS – also vermehrtem Auftreten von Immunglobulin-G-Extravasat ($r = 0.381$, $p = 0.119$). Diese Korrelation war für den rechten Hippocampus – ipsiläsional – stärker ausgeprägt ($r = 0.419$, $p = 0.083$) als für den linken, contraläsionalen Hippocampus ($r = 0.243$, $p = 0.332$).

Gemittelt über beide Thalami (rechts und links) fand sich eine negative, aber nicht signifikante Korrelation zwischen dem Ausmaß des IgG-Extravasats und der Aquaporin-4-Polarisation ($r = -0.379$, $p = 0.121$). Diese war für die linken – contraläsionalen – Thalami tendenziell größer ($r = -0.322$, $p = 0.192$) als für den rechten ($r = -0.241$, $p = 0.336$).

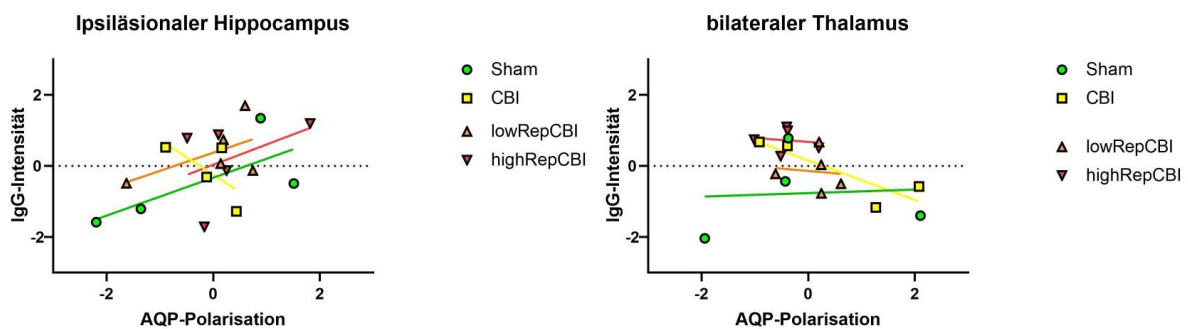


Abbildung 25: Scatter Plots der AQP-Polarisation und IgG-Intensität im bilateralen Thalamus und rechten, ipsiläsionalen Hippocampus. Im Hippocampus deutet sich ein positiver Zusammenhang von steigender Aquaporin-4-Polarisation und IgG-Extravasat an. Im Thalamus stellt sich dieser Trend allenfalls leichtgradig als negativ gerichteter Zusammenhang dar. Sämtliche Parameter lagen nicht normalverteilt vor, es erfolgte die Berechnung des Spearman-Rangkoeffizienten an $n = 18$ Wertepaaren.

4.3 BHS-Indices in der chronischen Phase nach CBI

Die Beobachtungsperiode für die chronische Phase betrug für alle Tiere und Konditionen 82 Tage, beginnend ab der letztmaligen CBI, und die Gruppengröße belief sich hier auf $n = 34$ Tiere (vgl. Abb. 10). Untersucht wurden wie für die subakute Phase wieder die Regionen Kortex, Hippocampus und Thalamus (vgl. Kap. 3.8) in vier Behandlungskonditionen. Die erhobenen Parameter wurden jeweils zwischen rechtshemisphärisch (ipsilateral zur CBI) und linkshemisphärisch (contralateral zur CBI) gemittelt.

4.3.1. Aquaporin-4-Coverage der Blutgefäße in der chronischen Phase nach CBI

In der Aquaporin-4-Coverage der kortikalen Region ergaben sich keine signifikanten Gruppenunterschiede ($p = 0.406$, $H(3) = 2.906$). Ebenfalls zeigten sich in den hippocampalen ROIs keine signifikanten Gruppenunterschiede ($p = 0.656$, $H(3) = 1.616$).

Im Thalamus der vier Behandlungsgruppen zeigten sich dagegen signifikante Gruppenunterschiede ($p = 0.029$, $H(3) = 9.040$). Post-Hoc Tests mit Bonferroni-Korrektur offenbarten eine signifikante Erhöhung der thalamischen Aquaporin-4-Coverage zwischen den Tieren, die eine hochfrequent wiederholte CBI erlitten hatten (highRepCBI), mit denen, die nur einmalig traumatisiert worden waren (CBI; $p = 0.048$, $z = -2.651$, $n = 18$, $r = 0.625$ nach Cohen). Dies entsprach einem starken Effekt.

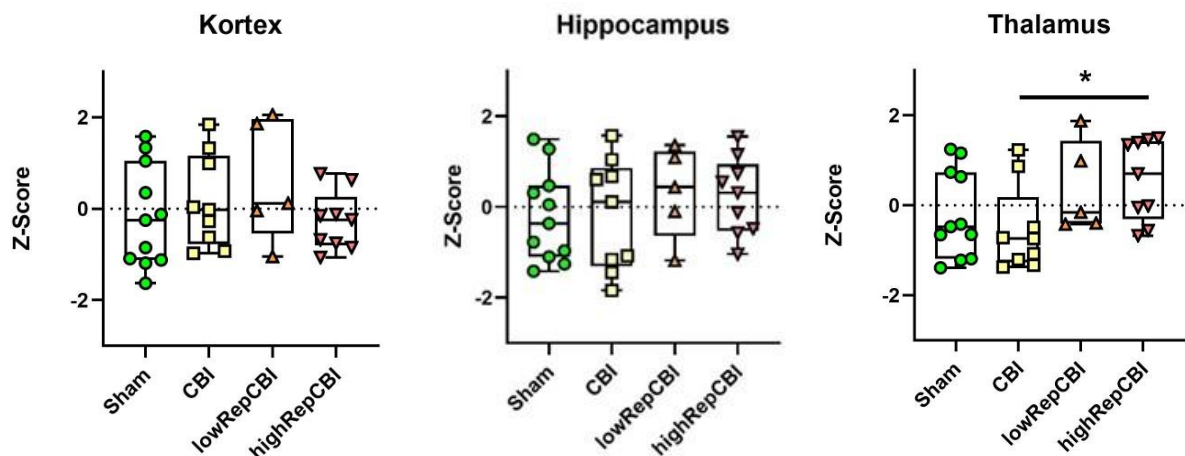


Abbildung 26: Aquaporin-4-Coverage in der chronischen Phase nach CBI. Darstellung aller Datenpunkte der Z-Scores im Vergleich der Hirnregionen und Behandlungsgruppen. Die Whisker umfassen alle Werte, vom Minimum bis zum Maximum. Im Thalamus der highRepCBI-Gruppe zeigten sich signifikant erhöhte Z-Scores des Aquaporin-4-Coverages. Die vorhandenen Datensätze wurden Z-transformiert und grafisch sowie mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung geprüft. Die Daten lagen nicht normalverteilt vor, es erfolgte die Auswertung mittels des Kruskal-Wallis-Test. Alle Tiere gingen in die Analyse mit ein ($N = 34$).

* = $p < 0.05$

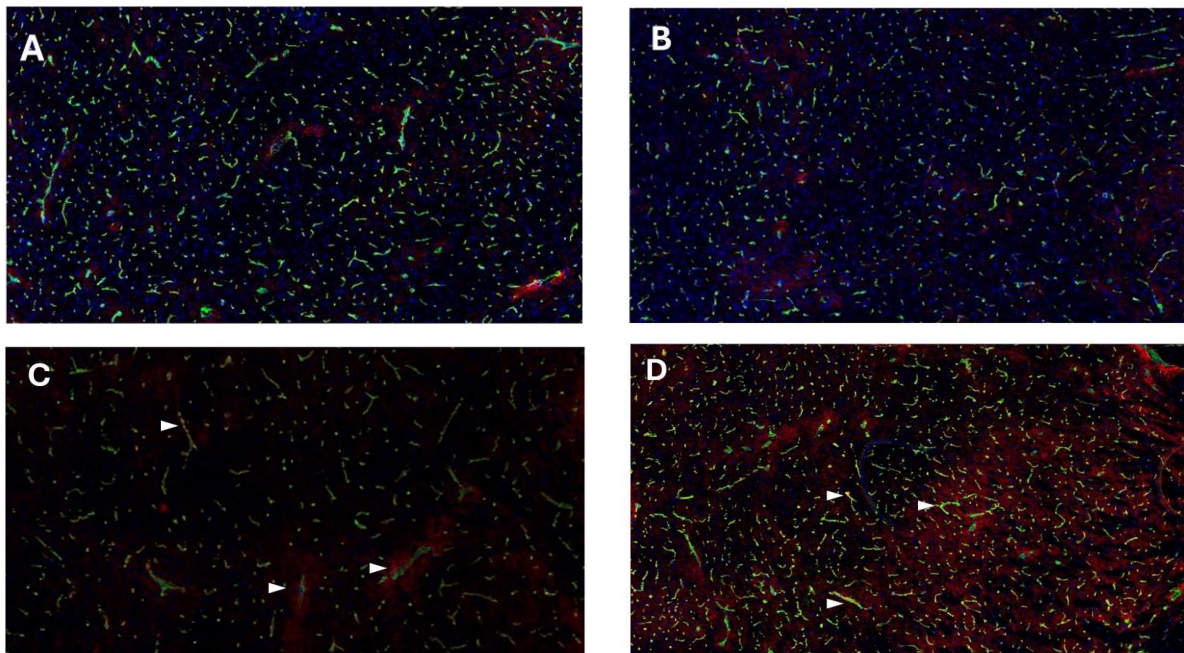


Abbildung 27: Aquaporin-4-Coverage im Thalamus in der chronischen Phase nach CBI. Es zeigt sich eine sichtbare Zunahme des Aquaporin-4-Signals in der highRepCBI-Gruppe (weiße Pfeile). A: Sham, B: CBI, C: lowRepCBI, D: highRepCBI.

4.3.2. GFAP-Coverage der Blutgefäße in der chronischen Phase nach CBI

Im Kortex sowie in zeigten der Hippocampusregion fanden sich keine signifikanten Gruppenunterschiede (Kortex: $p = 0.103$, $H(3) = 6.194$; Hippocampus: $p = 0.849$, $H(3) = 0.800$). Im Thalamus dagegen fielen – analog zur Aquaporin-4-Coverage – auch bezüglich der GFAP-Coverage signifikante Gruppenunterschiede auf ($p = 0.03$, $H(3) = 8.975$). In den durchgeführten Post-Hoc-Tests mit Bonferroni-Korrektur und paarweisen Vergleichen der Behandlungsgruppen lag dieser Unterschied zwischen der Sham- und der hochfrequent traumatisierten (highRepCBI-) Gruppe ($p = 0.029$, $z = -2.819$, $n = 20$). Dieser Unterschied konnte mit $r = 0.63$ quantifiziert werden, was einem starken Effekt nach Cohen entsprach.

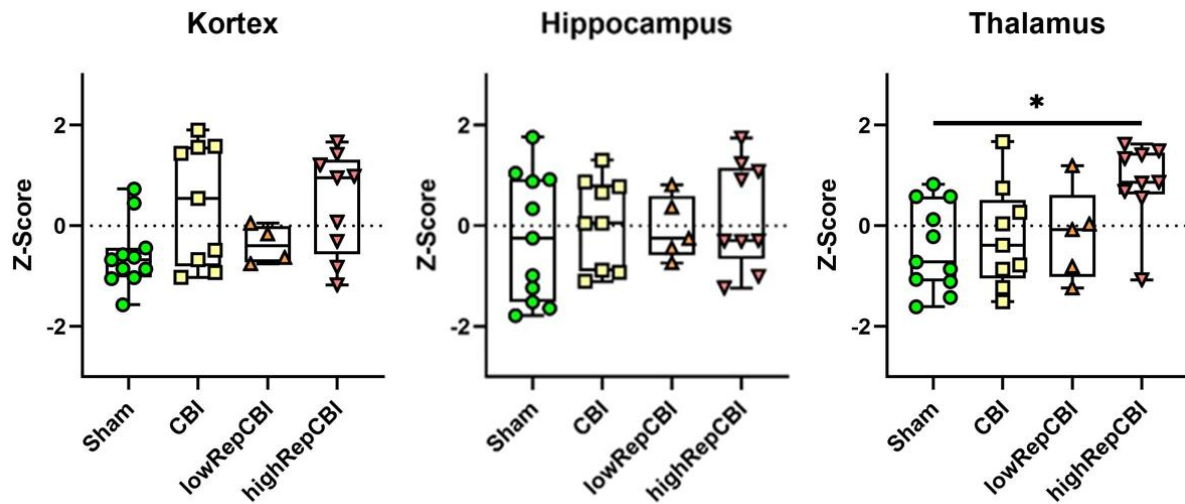


Abbildung 28: GFAP-Coverage in der chronischen Phase nach CBI. Darstellung aller Datenpunkte der Z-Scores im Vergleich der Hirnregionen und Behandlungsgruppen. Im Thalamus war die GFAP-Coverage in der highRepCBI-Gruppe signifikant erhöht im Vergleich zu Sham. Aufgrund von kortikalen Artefakten erfolgte der Ausschluss eines Tieres der lowRepCBI-Gruppe aus der Auswertung der kortikalen Region (n = 33). In den hippocampalen und thalamischen ROIs konnten alle Tiere mit einbezogen werden (n = 34). Sämtliche Parameter lagen nicht normalverteilt vor, es erfolgte die Durchführung eines Kruskal-Wallis-Tests.

* = $p < 0.05$

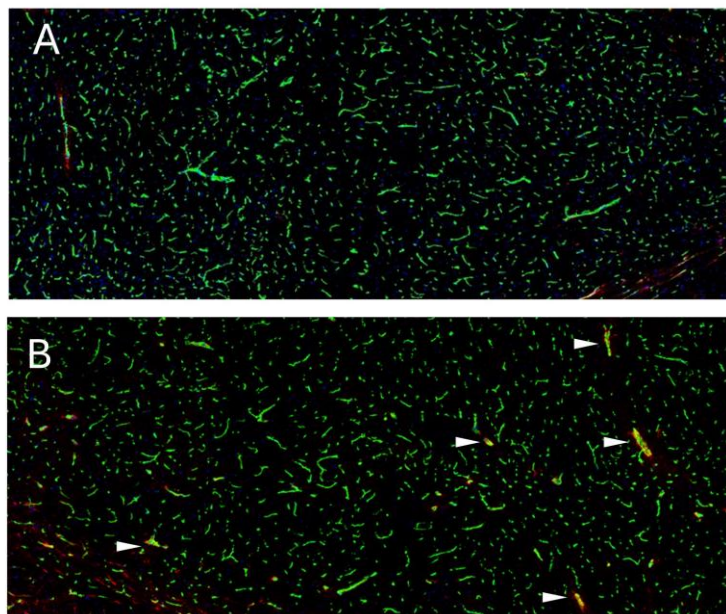


Abbildung 29: GFAP-Coverage im Thalamus nach chronischer CBI nach Sham-Trauma (A) und highRepCBI (B). Es zeigte sich eine Zunahme des perivaskulären GFAP-Signals (weiße Pfeile).

4.3.3. Aquaporin-4-Polarisation in der chronischen Phase nach CBI

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen bezüglich der Aquaporin-4-Polarisation im Kortex ($p = 0.327$, $H(3) = 3.456$), Hippocampus ($p = 0.241$, $H(3) = 4.201$) oder Thalamus ($p = 0.761$, $H(3) = 1.166$).

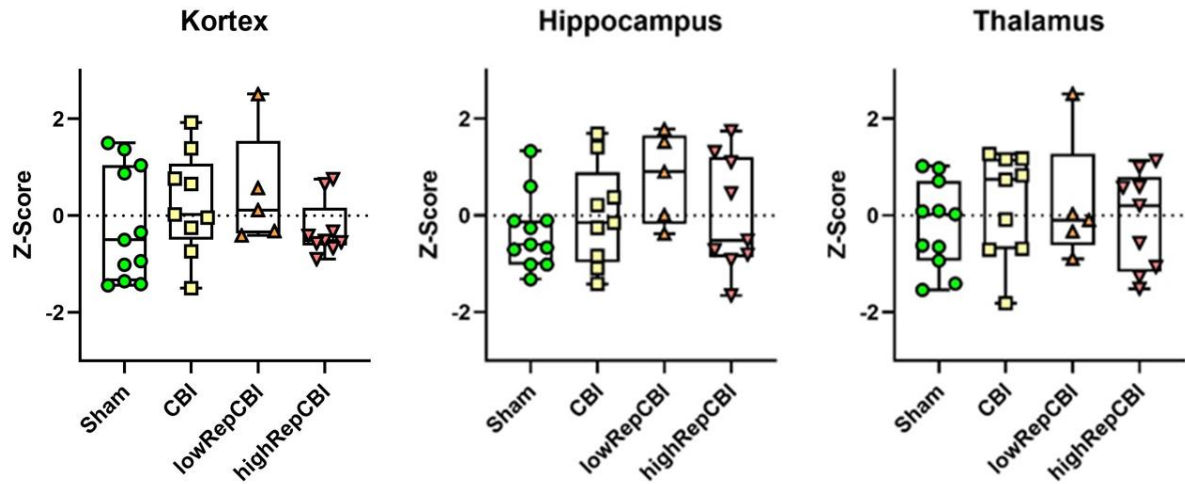


Abbildung 30: Aquaporin-4-Polarisation in der chronischen Phase nach CBI über alle untersuchten Hirnregionen. Es zeigen sich keine Unterschiede zwischen den Behandlungskonditionen. Alle Tiere konnten in die Analyse einbezogen werden ($n = 34$), bei nicht erfüllter Normalverteilung erfolgte die Durchführung eines Kruskal-Wallis-Tests.

4.4 Korrelation erhobener BHS-Indices mit phosphoryliertem Tau-Protein

Die Signalintensität des am Serin-Rest 202 phosphorylierten Tau-Proteins (p-Tau-Ser202) innerhalb NeuN-positiver Neuronenkerne diente als Surrogatparameter für das Ausmaß der Neurodegeneration und war in einer vorangegangenen Arbeit bereits untersucht worden. Für die vorliegende Arbeit wurden diese Werte in Korrelation gesetzt zu den hier erhobenen differenzierteren Parametern der BHS.

Da von einer diffusen Verteilung der Traumafolgen und nachfolgender Neurodegeneration ausgegangen wurde, erfolgte die Mittelung der jeweiligen Werte über beide Hirnhemisphären und keine seitengetrennte Betrachtung.

4.4.1. P-Tau Z-Scores nach Region

In allen drei untersuchten Hirnregionen war eine verstärkte Immunoreaktivität von p-Tau-Ser202 als Zeichen der verstärkten Neurodegeneration in der chronischen Phase, 82 Tage nach hochfrequenter CBI (highRepCBI), im Vergleich zur untraumatisierten Kontrolle (sham) zu beobachten. In keiner Region erreichte diese Beobachtung allerdings statistische Signifikanz (Kortex: $p = 0.248$, $H(3) = 4.124$; Hippocampus: $p = 0.334$, $H(3) = 3.399$; Thalamus: $p = 0.131$, $H(3) = 5.631$).

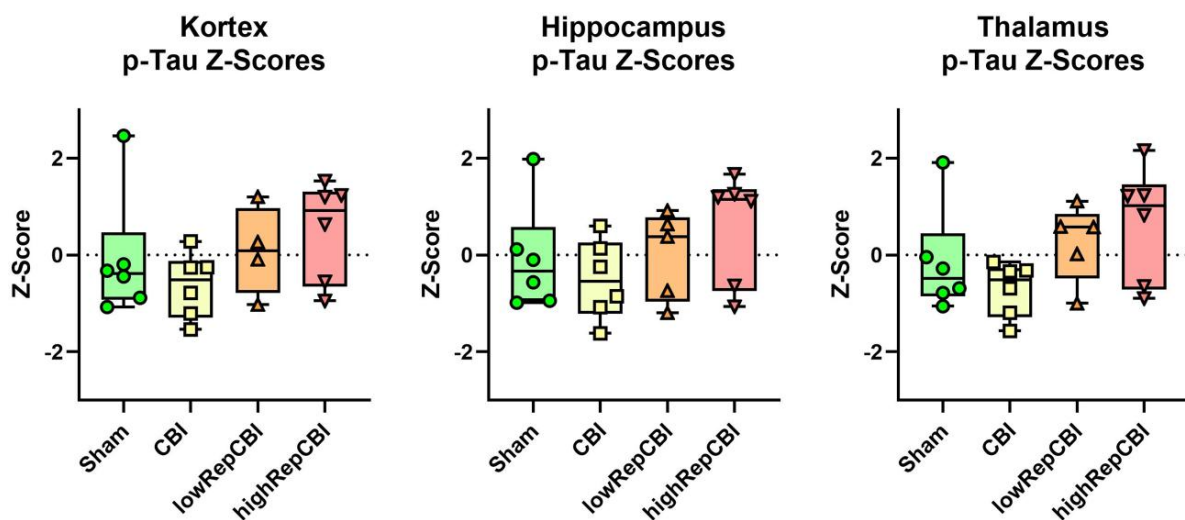


Abbildung 31: p-Tau-Signal als Surrogatparameter der Neurodegeneration in der chronischen Phase nach CBI. Darstellung der Z-Scores über alle untersuchten Hirnregionen. Im Thalamus der highRepCBI-Tiere findet sich der deutlichste Trend zu einer Erhöhung. Die Rohwerte der p-Tau-Färbungen wurden für die Auswertung ebenfalls z-transformiert. Es erfolgte die Prüfung auf Normalverteilung der erhobenen Parameter und Durchführung einer Prüfung auf statistische Korrelation mittels Spearman-rho-Korrelationskoeffizienten bei nicht vorliegender Normalverteilung ($n = 23$).

4.4.2. Korrelation von Aquaporin-4-Coverage und p-Tau

In den kortikalen Regionen errechnete sich ein Korrelationskoeffizient von $r = 0.358$ mit $p = 0.094$. Dies entsprach einer mittelgradigen, positiv gerichteten Korrelation: nahm die Aquaporin-4-Coverage der Region zu, wurde auch ein vermehrtes Auftreten p-Tau-positiver Neuronenkerne beobachtet.

In den Regionen des Hippocampus errechnete sich $r = 0.271$, $p = 0.211$. Dies entsprach einer schwachen, positiv gerichteten Korrelation. Im Thalamus errechnete sich $r = 0.223$, $p = 0.306$, ebenfalls einer schwach positiven Korrelation zwischen zunehmender Aquaporin-4-Coverage und erhöhter p-Tau-Expression entsprechend.

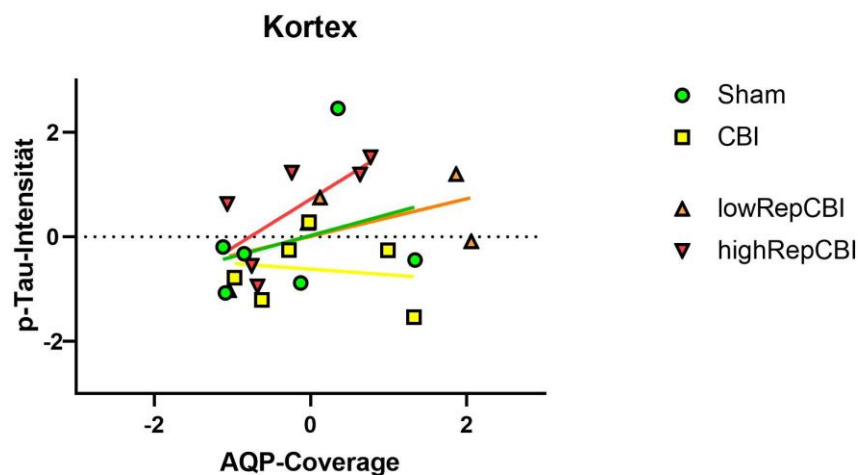


Abbildung 32: Scatterplot der Z-Scores der Aquaporin-4-Coverage und der p-Tau-Intensität des Kortex' mit eingezeichneten Regressionsgeraden. Ersichtlich wird ein geringgradiger Zusammenhang zwischen steigender Aquaporin-4-Coverage und p-Tau-Intensität. Es wurden $n = 23$ Tiere untersucht, für welche Wertepaare aus den Aquaporin-4- und p-Tau-Färbung vorlagen. Es erfolgte die Prüfung auf statistische Korrelation mittels Spearman-rho-Korrelationskoeffizienten bei nicht vorliegender Normalverteilung.

4.4.3. Korrelation von GFAP-Coverage und p-tau

Für die kortikalen Regionen errechnete sich ein Korrelationskoeffizient von -0.023 ($p = 0.919$). Dies entsprach keiner gerichteten Korrelation der beiden Parameter. Im Hippocampus der Versuchstiere errechnete sich ein Korrelationskoeffizient von $r = 0.335$ ($p = 0.118$), also ein mittelgradiger, positiver Zusammenhang zwischen erhöhter GFAP-Coverage und vermehrtem Auftreten p-Tau-positiver Neuronenkerne im Hippocampus. Im Thalamus errechnete sich ein schwach positiver Korrelationskoeffizient von $r = 0.209$ ($p = 0.337$).

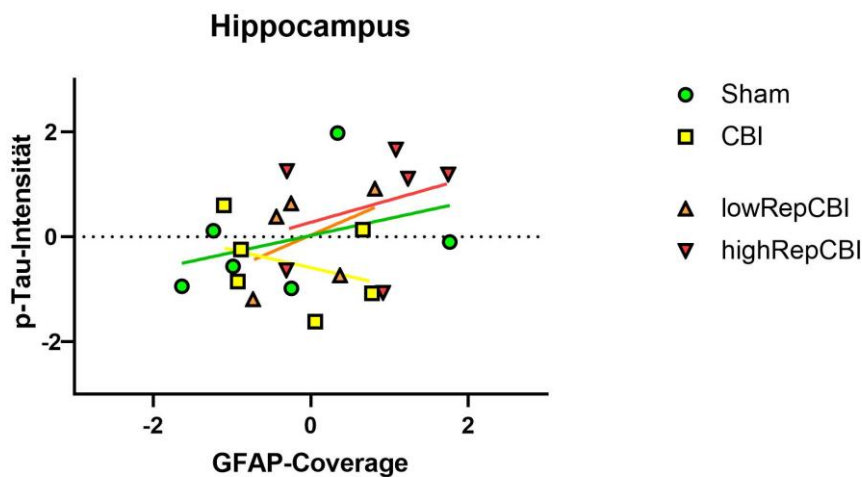


Abbildung 33: Scatterplot der Z-Scores der GFAP-Coverages und der p-Tau-Intensität im Hippocampus mit eingezeichneten Regressionsgeraden. Erkennlich wird ein positiver Trend zwischen ansteigender GFAP-Coverage und zunehmender p-Tau-Intensität. Die Daten lagen nicht normalverteilt vor, es erfolgte die Prüfung auf statistische Korrelation zwischen $n = 23$ Wertepaaren aus GFAP- und p-Tau-Färbung mittels Spearman-Rho-Koeffizient.

4.4.4. Korrelation von Aquaporin-4-Polarisation und p-Tau

Im Kortex errechnete sich eine Korrelation von $r = 0.180$ ($p = 0.412$), im Hippocampus von $r = 0.145$ ($p = 0.508$). Es bestand also zwar keine signifikante Korrelation zwischen Aquaporin-4-Polarisation und p-Tau, aber in beiden Regionen ein schwacher positiver Zusammenhang zwischen beiden Parametern.

Im Thalamus zeigte sich eine schwach positive Korrelation zwischen Zunahme der Aquaporin-4-Polarisation und vermehrtem Auftreten von p-Tau ($r = 0.248$, $p = 0.254$).

4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse aus Versuchsteil I

ROI Parameter	Kortex	Hippocampus	Thalamus
Aquaporin-4-Coverage	(0)	(0)	(↑)
GFAP-Coverage	(0)	(0)	(0)
Aquaporin-4-Polarisation	(0)	(↑)	(0)
Immunglobulin G – Extravasat	(↑)	(↑)	(↑)

ROI Parameter	Kortex	Hippocampus	Thalamus
Aquaporin-4-Coverage	(0)	(0)	↑
GFAP-Coverage	(0)	(0)	↑
Aquaporin-4-Polarisation	(0)	(0)	(0)
P-Tau	(↑)	(↑)	(↑)

Abbildung 34: Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse aus Versuchsteil I in tabellarischer Form. Die obere Tabelle (orange) gibt den subakuten Beobachtungszeitraum wieder, die untere Tabelle (blau) den chronischen Beobachtungszeitraum. Wiedergegeben ist stets die Richtung der gesehenen Veränderung in den traumatisierten Behandlungsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Sham).

Legende: 0 = nicht-signifikant; ↑ = signifikant erhöht, ↓ = signifikant erniedrigt, () = Trend

4.6 Modulation des mikrovaskulären Coverages mittels Dexamethason

Im zweiten Versuchsteil dieser Arbeit (vgl. Kapitel 3.1 sowie Tabelle 2 und Abb. 11) ging es um die Modulation der BHS durch Dexamethason, und den Effekten auf die mikrovaskulären und glymphatischen Parameter. Beide Versuchsgruppen erhielten eine hochfrequente Traumatisierung mit insgesamt fünf CBI. Der Beobachtungszeitraum endete mit dem Tag der letzten CBI im akuten Zeitraum.

4.6.1. Aquaporin-4-Coverage in Dexamethason vs. Kontrolle

Die Ergebnisse offenbarten keine signifikanten Gruppenunterschiede im Vergleich der Z-Scores der Aquaporin-4-Coverage zwischen der Dexamethason- und Kontrollgruppe (Kortex $p = 0.343$, Hippocampus $p = 0.343$, Thalamus $p = 0.821$).

Betrachtete man die Verteilung der Daten als Boxplot, wurde aber sowohl im Kortex als auch im Hippocampus ein gewisser Trend zu einer Erhöhung der Aquaporin-4-Coverage in der Dexamethason-Gruppe deutlich (Dexamethason Mdn = 0.64, SD = 0.43, Kontrolle Mdn = -0.95, SD = 1.3).

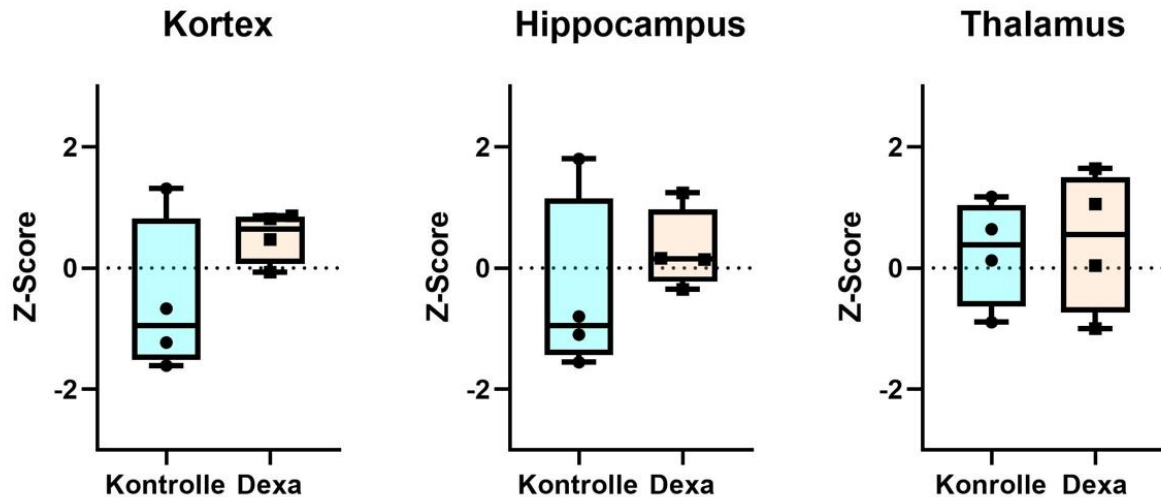


Abbildung 35: Aquaporin-4-Coverage behandelter vs. un behandelter Tiere. Boxplot mit Verteilung der einzelnen Datenpunkte bei $n = 4$ Tieren pro Kondition. Zu sehen ist ein nicht signifikanter Trend zu einer Erhöhung der Aquaporin-4-Coverages in der Dexamethasongruppe im Vergleich zu Kontrolltieren in Kortex und Hippocampus. Die Daten für die Aquaporin-4-Coverage lagen nicht normalverteilt vor, es erfolgte die Durchführung eines Man-Whitney-U-Tests ($n = 8$).

4.6.2. GFAP-Coverage in Dexamethason vs. Kontrolle

Im Kortex zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungskonditionen bezüglich der GFAP-Coverage ($p = 0.119$, $t(6) = -1.56$), es konnte jedoch ein Trend zu einer Erhöhung der GFAP-Coverages in der Dexamethason-Kohorte ($M = .52$, $SD = .43$) gegenüber der Kontrollgruppe ($M = -.548$, $SD = 1.3$) beobachtet werden. Im Hippocampus zeigten sich keine signifikanten Unterschiede ($p = 0.320$, $t(6) = 1,085$), ebenso wenig im Thalamus ($p = 0.908$, $t(6) = -,121$).

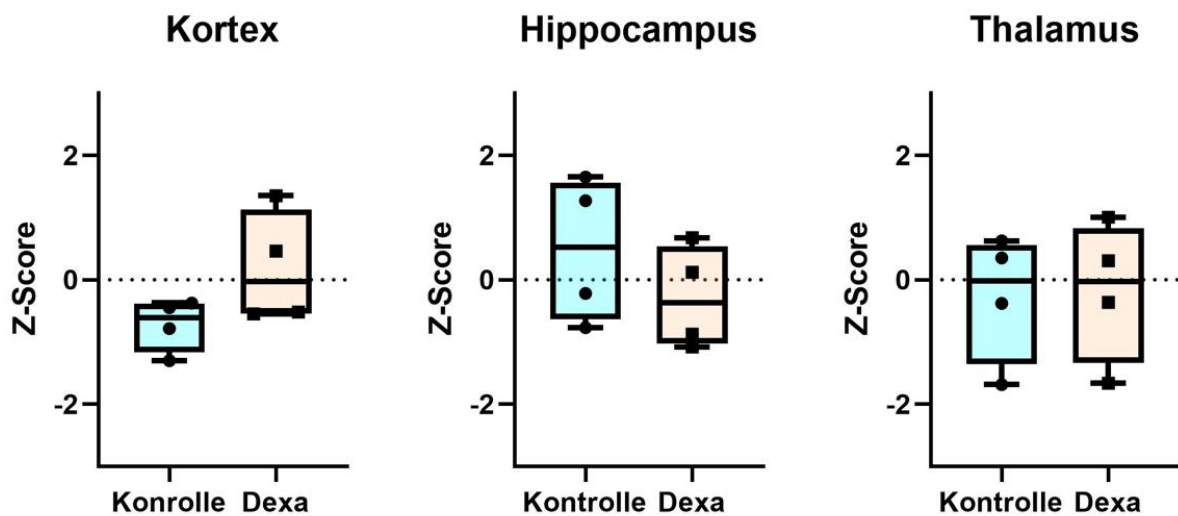


Abbildung 36: GFAP-Coverage behandelter vs. Unbehandelter Tiere. Verteilung der Z-Scores des beider Konditionen in den untersuchten Regionen. Im Kortex zeigt sich ein Trend zu einer erhöhten GFAP-Coverage, in Hippocampus und Thalamus sind keine wesentlichen Unterschiede ersichtlich. Die Daten für die sämtliche ROIs lagen normalverteilt vor, es erfolgte die Durchführung eines T-Tests ($n = 8$).

4.6.3. Aquaporin-4-Polarisation Dexamethason vs. Kontrolle

Im Kortex zeigten sich keine Unterschiede (Dexa Mdn = -0.75, Kontrolle Mdn = 0.23, $p = 0.343$), jedoch grafisch eine geringgradige Verringerung der Aquaporin-4-Polarisation der Dexamethason-Tiere im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Im Hippocampus zeigten sich keine Gruppenunterschiede (Dexa M = 0.14, Kontrolle M = 0.13, $p = 0.886$). Im Thalamus zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede der Aquaporin-4-Polarisation (Dexa M = 0.02, Kontrolle M = -0.7, zweiseitiges $p = 0.312$).

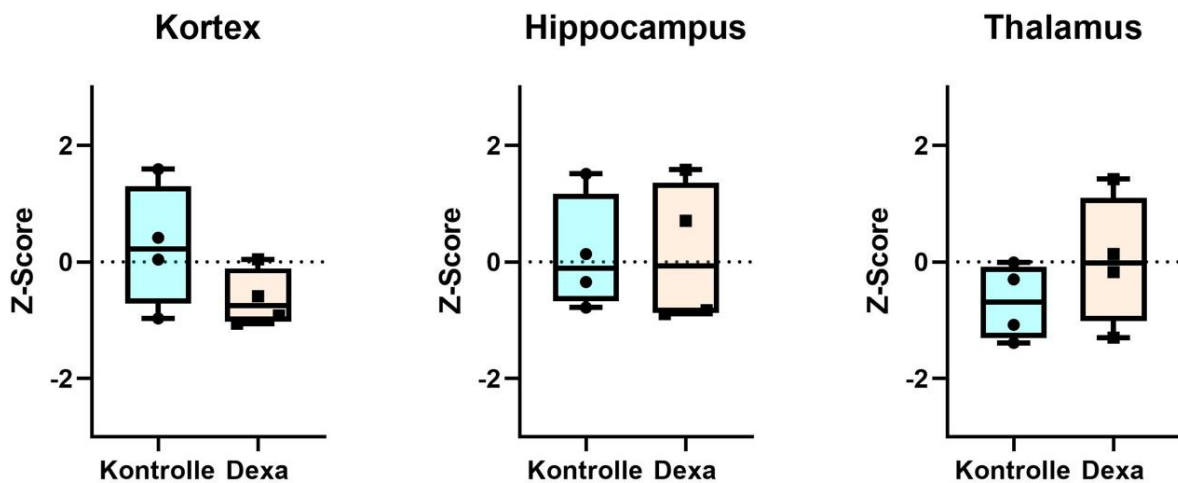


Abbildung 37: Aquaporin-4-Polarisation. Zu sehen ist ein leichtgradiger Trend zu einer Erniedrigung der Aquaporin-4-Polarisation im Kortex der Dexamethasongruppe. Die Daten lagen im Kortex nicht normalverteilt vor, in Hippocampus und im Thalamus waren die Kriterien einer Normalverteilung hingegen erfüllt.

4.7 Zusammenfassung der Ergebnisse aus Versuchsteil II

ROI \ Parameter	Kortex	Hippocampus	Thalamus
Aquaporin-4-Coverage	(↑)	(↑)	(0)
GFAP-Coverage	(↑)	(0)	(0)
Aquaporin-4-Polarisation	(↓)	(0)	(0)

Abbildung 38: Zusammenfassung der Ergebnisse der mikrovaskulären Parameter aus Versuchsteil II. Angegeben ist immer der Trend der mit Dexamethason behandelten Tiere.

Legende: 0 = nicht-signifikant; ↑ = signifikant erhöht, ↓ = signifikant erniedrigt, () = Trend

4.8 Etablierung immunhistochemischer Darstellung von Zonula-Occludens-1

Die Etablierung der Färbung von Zonula-Occludens-1 (ZO-1) folgte zunächst dem in ¹⁰³ angegebenen Protokoll in den Verdünnungsstufen 1:50, 1:100 und 1:200, sowie einer Negativkontrolle, auf welche nur sekundär Antikörper aufgetragen wurden. Die Proben wurden mit den in (3.6) beschriebenen Settings mikroskopiert und auf die Spezifität der Färbung hin beurteilt. Hierbei zeigten sich in den Verdünnungen 1:50 und 1:100 eine gefäßspezifische Färbung, welche in der Verdünnung von 1:50 aufgrund einer hohen Intensität des unspezifischen Hintergrundes nicht für eine automatisierte Auswertung (3.8) geeignet war.

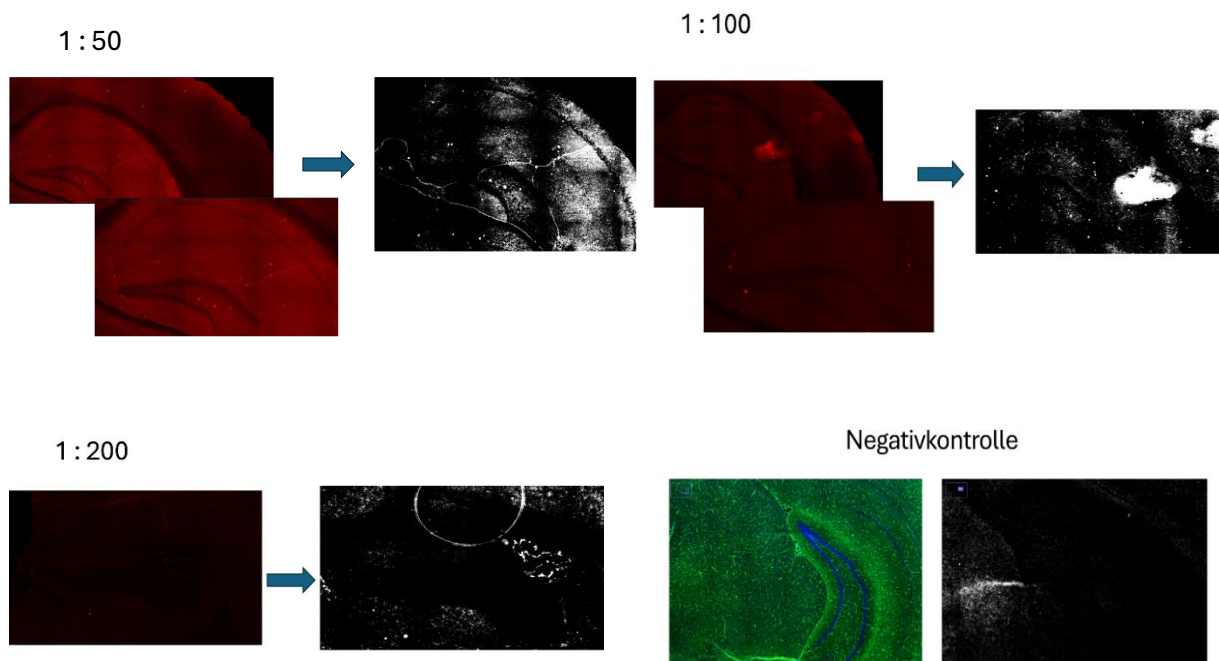


Abbildung 39: Etablierung einer immunhistochemischen Färbung zur Untersuchung von ZO-1. Ergebnisse der Verdünnungsreihe 1:50, 1:100 und 1:200, mit Negativkontrolle im RHOD-Kanal und als binärisierte Bilddatei (schwarzweiß). Dargestellt ist die Zielregion des Hippocampus'. Protokoll adaptiert nach Liraz Zaltsman et al. ¹⁰³

In einem zweiten Versuchsdurchlauf wurde das Protokoll nach (3.3) angepasst und in den Verdünnungen 1:100 und 1:200 getestet, da die Verdünnungsreihe 1:50 aufgrund eines zu hohen unspezifischen Hintergrundsignals verworfen wurde. Hier zeigten sich in allen Verdünnungen spezifische, vaskuläre Signale. In der Verdünnung 1:100 kamen unspezifische Zellfärbungen, insbesondere in der Region des Cornu Ammonis, zur Darstellung. Aufgrund einer höheren Spezifität gegenüber dem perivaskulären ZO-1 war als Resultat die Verdünnung 1:200 zu bevorzugen. Es erfolgte eine Anpassung der Settings des Fluoreszenzmikroskops im RHOD-Kanal: die Belichtungszeit wurde für sämtliche Proben auf 120 ms. eingestellt, die

Signalverstärkung (Gain) entweder bei 30 belassen oder auf 60 erhöht. Es zeigte sich eine Varianz in der Intensität des spezifischen Signals, sodass für die Hälfte ($n = 2$) der Proben auf eine Hochregulierung der Signalverstärkung auf 60 nicht verzichtet werden konnte. In Zusammenschau der Ergebnisse blieb hier also eine Verwendbarkeit der beschriebenen Färbemethodik in der automatisierten Auswertung problematisch, eine qualitativ-beschreibende Auswertung beispielhafter Regionen war zu bevorzugen.

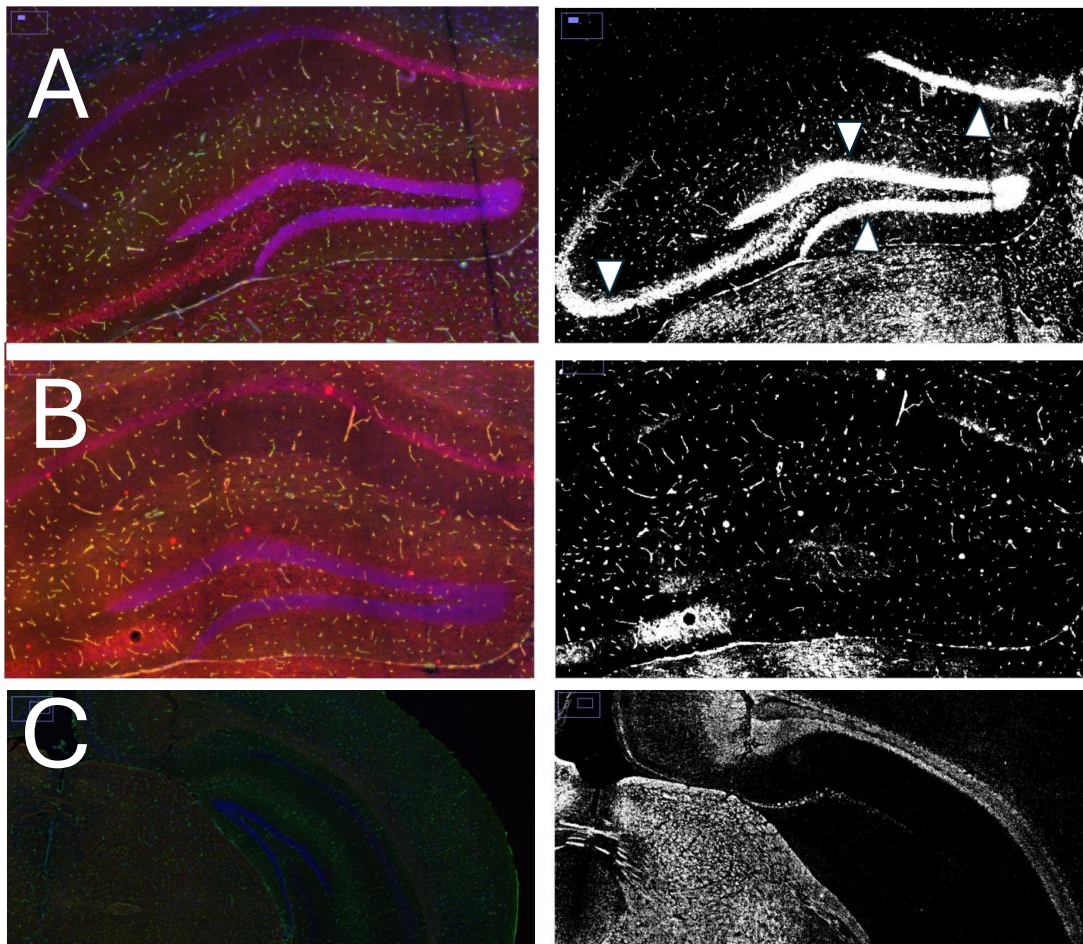


Abbildung 40: Beispielhafte Bilder der Verdünnungsreihen 1:100 (A) und 1:200 (B) des zweiten Färbedurchgangs und eine Negativkontrolle. Aufnahme aller Bilder bei einer Belichtungszeit von 120 ms und einer Signalverstärkung von 30. Zu sehen in (A) ist die unspezifische Anfärbung von Zellen (weiße Pfeile) in der Verdünnung 1:100. Auf der rechten Seite ist das Graustufen-Bild des RHOD-Kanals (rot, ZO-1-Färbung) beispielhaft dargestellt.

5. Diskussion

Ziel der Studie war es, Störungen der BHS und des glymphatischen Systems als mögliche Ursachen neurodegenerativer Erkrankungen nach wiederholten Gehirnerschütterungen, wie sie beispielsweise im Kontaktsport auftreten, zu untersuchen.

Hierzu erfolgte die detaillierte histologische Charakterisierung verschiedener Marker der BHS und des glymphatischen Systems in der subakuten und der chronischen posttraumatischen Phase nach CBI. Die Parameter der Aquaporin-4- und GFAP-Coverages beschreiben die Bedeckung der zerebralen Blutgefäße durch die astrozytären Endfüße, welche Teil der BHS sind. Eine verminderte Bedeckung korrelierte in Vorarbeiten mit einer erhöhten Permeabilität der BHS.¹⁰³ Die Charakterisierung des glymphatischen Systems erfolgte über die Erhebung der Aquaporin-4-Polarisation, einem Quotienten aus perivaskulärer zu nicht-perivaskulärer Aquaporin-4-Signalintensität. Eine Verminderung der Aquaporin-4-Polarisation zeigte sich in Vorarbeiten im Zusammenhang mit einer beeinträchtigten Funktion des glymphatischen Systems.¹³⁰ Darüber hinaus erfolgte der Vergleich verschiedener Parameter mikrovaskulärer Veränderung mit einem Extravasat von endogenem Immunglobulin G (als Indikator einer Störung der BHS) in der subakuten Phase, sowie pathologischer Tau-Phosphorylierung (als Frühzeichen neurodegenerativer Veränderungen) in der chronischen Phase. Zudem erfolgte die Evaluation akuter Effekte einer Gabe von Dexamethason im Vergleich zu Placebo auf die mikrovaskulären Parameter zweier hochfrequent traumatisierter Gruppen (Kap. 5.3). Im vorliegenden Forschungsvorhaben wurden Traumafolgen in den Regionen des Kortex, Hippocampus und Thalamus untersucht, da diese bedeutsame neurale Netzwerkpunkte darstellen.¹²⁶

Durch Evaluation der mikrovaskulären Komponenten besteht die Möglichkeit, Zielstrukturen für eine gezielte therapeutische Intervention aufzudecken und die vermutete Kette aus Blut-Hirn-Schranken-Störung, Neuroinflammation und -degeneration zu unterbrechen. Die vorliegende Studie soll hierzu beitragen, indem die räumliche Verteilung von mikrovaskulären Veränderungen in einem Mausmodell repetitiver Gehirnerschütterung in drei Gehirnregionen zu zwei Zeitpunkten untersucht wurden.

5.1 Charakterisierung mikrovaskulärer Veränderungen in der subakuten und chronischen Phase nach CBI

Die Untersuchung der mikrovaskulären Architektur in der chronischen Phase nach Gehirnerschütterung konnte signifikante Veränderungen im Thalamus der hochfrequent traumatisierten Gruppe nachweisen. Hier fanden sich eine erhöhte Aquaporin-4-Coverage im Vergleich mit der einfach traumatisierten CBI-Gruppe, und eine signifikant erhöhte GFAP-Coverage im Vergleich mit der Sham-Gruppe. Eine Erhöhung der Coverages über den Wert der Kontrollgruppe hinaus ist nach unserem Kenntnisstand noch nicht beschrieben worden. Diese könnte eine reaktive, (mal-)adaptive Kompensation zur vermehrten Abdichtung der BHS darstellen. Die Ergebnisse deuten auf eine dauerhaft alterierte Architektur der BHS und ausbleibende Erholung hin. Weiterhin konnte ein Trend zu einer erhöhten Last neurodegenerativer Marker in den hochfrequent traumatisierten Tieren beschrieben werden, welcher im Thalamus der Tiere am deutlichsten ausfiel.

In der subakuten Phase deutete sich eine vermehrte Abdichtung der BHS im Thalamus nach hochfrequentem, repetitivem Trauma auf Basis einer Erhöhung der Aquaporin-4-Coverage an. Analog zu vorbeschriebenen Arbeiten⁹³ fand sich tendenziell eine generalisierte Erhöhung des IgG-Extravasats über sämtliche Regionen hinweg in der hochfrequent traumatisierten Gruppe, welcher im Thalamus am ausgeprägtesten war.

5.1.1. Mikrovaskuläre Veränderungen in der chronischen Phase, Korrelation mit neurodegenerativen Markern

Die zum chronischen Zeitpunkt nachweisbare erhöhte Dichte von Aquaporin-4 und GFAP in thalamischen astrozytären Endfüßen könnte ein Hinweis auf eine bleibende Dysfunktion der BHS sein. Eine ausbleibende Erholung der BHS ist sowohl in murinen als auch humanen Studien mittels der fortgesetzten Persistenz fokaler Extravasate von injizierten Tracern oder Blutbestandteilen nachgewiesen. Diese traten zeit- und ortsgleich mit der Persistenz von Lücken der endothelialen Tight Junctions auf.^{77,103,110} Ebenfalls nachgewiesen ist die ausbleibende Regeneration von Komponenten der Basalmembran und Tight Junctions über einen Zeitraum von zwei Monaten.^{103,110} Diese ausbleibende Reparatur konnte vorwiegend in der Nachbarschaft von atypischen Astrozyten beobachtet werden, deren Vorkommen sich räumlich mit dem Vorhandensein fokaler Extravasate injizierter Tracer überlappten.¹¹⁰

Die These der bleibenden BHS-Dysfunktion und Kompensation durch Astrozyten wird durch die Ergebnisse der Studie von Liraz Zaltsman et al. unterstützt. Die Gruppe konnte initial mittels MRT eine BHS-Störung zeigen, welche sich über einen Zeitraum von 60 Tagen signifikant erholte. Zeitgleich erholten sich die Parameter der Aquaporin-4- und GFAP-

Coverages, nicht aber der prozentuale Anteil der Lücken der Tight-Junctions.¹⁰³ Diese Datenlage könnte die Kompensation einer endothelialen BHS-Störung durch erhöhte Aquaporin-4- und GFAP-Coverage nahelegen. Ein gleichartiger Mechanismus könnte der vorliegenden Studie ebenfalls zu Grunde liegen.

Im Vergleich zu übrigen Behandlungskonditionen war die Last an p-Tau positiven Neuronen in der hochfrequent traumatisierten Gruppe über alle Hirnregionen erhöht. Die deutlichsten Veränderungen fanden sich hier im Thalamus der Tiere. Eine signifikante Korrelation des vermehrten Auftretens von p-Tau mit den mikrovaskulären Veränderungen war aus den erhobenen Daten nicht herzustellen. Festzuhalten war aber eine schwache, nicht signifikante Korrelation vermehrter p-Tau-positiver Neurone mit erhöhter Aquaporin-4-Coverage über alle untersuchten Hirnregionen hinweg, welche im Kortex der Tiere am stärksten ausfiel. Zudem zeigte sich eine nicht-signifikante, positive Korrelation zwischen GFAP-Coverage und dem p-Tau-Signal im Hippocampus und Thalamus der Versuchstiere.

Während ein Anstieg neurodegenerativer Marker in allen untersuchten Regionen beschrieben werden konnte, fanden sich mikrovaskuläre Veränderungen lediglich im Thalamus der hochfrequent traumatisierten Tiere. Diese zeigten keine signifikante Korrelation zum Anstieg p-Tau-positiver Neurone. Dies wäre gut damit vereinbar, dass die neurodegenerativen Veränderungen auch durch andere Pathologien mit verursacht werden.

Zu diskutieren ist eine chronisch-schwelende, neuroinflammatorische Komponente. Diese könnte einerseits Folge als auch Ursache der dauerhaft veränderten Permeabilität der BHS sein. Pro-inflammatorische Mediatoren sind dazu in der Lage, die Durchlässigkeit der BHS zu erhöhen; gleichzeitig ist eine durchlässigere BHS selbst Ausgangspunkt für eine inflammatorische, gliale Antwort.⁹¹ Beschrieben ist das Einwandern von Immunzellen und eine Vermehrung aktivierter Mikroglia im akuten und subakuten Zeitraum nach dem Trauma.^{88,90,123,140} In ihrer Studie zu hochfrequenter, repetitiver mTBI konnten Petraglia et al. den Gipfel der neuroinflammatorischen Antwort sieben Tage nach erfolgtem Trauma sowie deren Abnahme einen Monat später darstellen. Im weiteren Verlauf zeigte sich eine erneute Zunahme der Astrogliose, die persistierende Aktivierung von Mikroglia und das diffuse Auftreten von p-Tau sechs Monate nach letztmaligem Trauma in der hochfrequent traumatisierten Gruppe.¹²² Die Autoren erklärten dies mit einer inflammatorisch geprägten, glialen Antwort auf das sich ausbreitende Auftreten neurodegenerativer Marker. Eine diffuse Ausbreitung neurodegenerativer Veränderungen trotz lediglich lokalisierter Auffälligkeiten in der akuten Phase ist ebenfalls in anderen Studien beschrieben worden.⁸⁸

In der vorliegenden Studie konnte im subakuten Zeitraum kein Nachweis einer Astrogliose oder Aktivierung von Mikroglia erbracht werden.⁹³ Weitere Studien mit ergänzender

Untersuchung des Hirngewebes auf neuroinflammatorische Veränderungen in der chronischen Phase nach dem Trauma könnten das Bild des Verlaufes aus veränderter Durchlässigkeit der BHS und Neurodegeneration im vorliegenden Versuchsvorhaben ergänzen. Erstrebenswert wäre in diesem Rahmen ebenfalls eine ergänzende Darstellung der Basalmembran im chronischen Zeitraum und endothelialen Barriere mit der Fragestellung nach strukturellen Alterationen, die Untersuchung auf persistierende Extravasate und eine genauere Charakterisierung der astrozytären Reaktion.

5.1.2. Mikrovaskuläre Veränderungen in der subakuten Phase, Korrelation mit Störungen der BHS

Es konnte ein Trend zur Erhöhung der Aquaporin-4-Coverages im Thalamus hochfrequent traumatisierter Tiere beschrieben werden. Die sich akut andeutenden Veränderungen persistierten bis in die chronische Phase nach Trauma und sprechen für eine chronisch veränderte mikrovaskuläre Architektur und eine ausbleibende Regeneration. Dieser Verlauf kann als Hinweis auf sekundär einsetzende Prozesse gedeutet werden. Auch im Thalamus der Tiere konnte ein signifikantes Extravasat von Immunglobulin G nachgewiesen werden, ebenso ein Anstieg p-Tau positiver Neuronenkerne in der chronischen Phase, welcher am stärksten in der hochfrequent traumatisierten Gruppe nachweisbar war.

Der Verlauf der Veränderungen könnte ein Hinweis auf eine Hochregulation von Aquaporin-4 im Sinne einer astrozytären Reaktion sein, welche sich als Antwort auf die gestörte Funktion der BHS bildet.¹⁴¹ Diese Reaktion persistiert und manifestiert sich über den zeitlichen Verlauf hinweg noch deutlicher. Die Veränderungen treten gemeinsam mit einer BHS-Störung und einer erhöhten Last neurodegenerativer Marker auf, eine deutliche Korrelation zwischen beiden Veränderungen konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Eine direkte, ursächliche Beziehung zwischen mikrovaskulären Veränderungen und dem Auftreten einer BHS-Störung kann aus den vorliegenden Ergebnissen zum jetzigen Zeitpunkt nicht sicher abgeleitet werden. Hierzu erscheint eine Ausweitung der histologischen Untersuchung und Gruppengröße notwendig.

In der akuten Phase könnte es sich bei der Erhöhung der thalamischen Aquaporin-4-Coverage um einen kompensatorischen Mechanismus handeln, der dazu dient, eine erhöhte Durchlässigkeit der BHS auszugleichen.¹⁴² Mittels Transmissionselektronenmikroskop durchgeführte Studien an anderen Mausmodellen traumatischer Hirnschädigung konnten in der subakuten Phase hydropisch vergrößerte, astrozytäre Endfüße und eine verdickte Basalmembran darstellen.^{88,108} Diese könnten sich durch einen vermehrten

Flüssigkeitseinstrom formiert haben. Die Erhöhung der Aquaporin-4-Dichte in den Endfüßen der Astrozyten könnte zum Ausleiten des vermehrten Flüssigkeitseinstroms dienen.

Vorarbeiten konnten mittels funktioneller MRT Veränderungen der Konnektivität thalamischer Kerngebiete nach leicht- und mittelgradigen Schädel-Hirn-Traumata zeigen.^{143,144} Die Messung mittels funktioneller MRT basiert auf Änderungen des zerebralen Blutflusses, welcher unter anderem durch Astrozyten im Rahmen des neurovaskulären Couplings als Antwort auf veränderte neuronale Aktivität vermittelt wird.^{95,145} Die histologisch festgestellten Veränderungen in der vorliegenden Studie könnten nicht nur Ausdruck einer maladaptiven Anpassung der Astrozyten in ihrer Rolle als Teil der BHS als Antwort auf die hochfrequente Traumatisierung sein. Denkbar ist auch, dass sich dieser Prozess Downstream auch in Veränderungen des neurovaskulären Couplings niederschlagen könnte¹⁴⁵, welche sich wiederum in einer veränderten Messung der Konnektivität widerspiegeln. Ob eine derartige Korrelation herleitbar ist, und ob eine veränderte, funktionelle Konnektivität Ursache oder Folge veränderter astrozytärer Funktion ist, sollte in zukünftigen Forschungsvorhaben evaluiert werden.

5.1.3. Zusammenfassung mikrovaskulärer Veränderungen in der subakuten und chronischen Phase, Assoziation mit neurodegenerativen Markern

In der Zusammenschau konnte das vorliegende Versuchsvorhaben im subakuten und chronischen Zeitraum eine veränderte Architektur der Blut-Hirn-Schranke im Thalamus darstellen. Verschiedene Hirnregionen zeigten hierbei verschiedene Antworten auf das Trauma: Während sich im Kortex und Hippocampus keine eindeutigen Veränderungen der mikrovaskulären Coverage fanden, konnte im Thalamus der hochfrequent traumatisierten Tiere subakut eine Erhöhung der Aquaporin-4-Coverage mit Persistenz bis in die chronische Phase beschrieben werden. Zusätzlich zeigte sich zum chronischen Zeitpunkt eine signifikant erhöhte GFAP-Coverage im Thalamus und der deutlichste Anstieg neurodegenerativer Veränderungen der Versuchstiere, eine signifikante Korrelation zwischen den erhobenen Parametern ergab sich jedoch nicht. In der vorliegenden Studie wurde die Phosphorylierung des Tau-Proteins am Serin-Rest 202 (p-Tau-Ser202) als Surrogatparameter für das Ausmaß der Neurodegeneration untersucht. Eine sinnvolle Ergänzung könnte die Untersuchung der Tau-Phosphorylierung am Threonin-Rest 231 (p-Tau-Thr231) darstellen, welcher im Rahmen einer CTE ebenfalls erhöht ist und die Datenlage robust ergänzen könnte.^{71,146}

Erklärend für die Unterschiede zwischen verschiedenen Hirnregionen könnte eine unterschiedliche Vulnerabilität je nach Lage zum Applikationsort des Traumas und physikalischer Eigenschaften und Richtung des Impakts sein.¹⁴⁷ Patton et al. untersuchten in ihrer Studie kinematische Eigenschaften von Kopfstößen, welche in einer Gehirnerschütterung mündeten und Kopfstößen, welche ohne klinische Beeinträchtigungen einhergingen. Hierzu modellierten sie kinematische Simulationen an einem Modell des menschlichen Schädels und Hirngewebes. Dieses zeigte unterschiedliche Profile erlittenen Scherstresses verschiedener Hirnregionen.¹⁴⁸ Eine unterschiedliche Affektion, Reaktion und Regeneration verschiedener neuronaler Gewebe und -regionen könnte das divergierende Outcome mikrovaskulärer Veränderungen und deren Verläufe nach Gehirnerschütterung erklären. Ebenfalls in Betracht kommt eine unterschiedliche, zelluläre Antwort in Abhängigkeit der biomechanischen Eigenschaften verschiedener Hirnregionen, wie an der Charakterisierung primärer Mikroglia auf verschiedenen elastischen Substraten in vitro bereits gezeigt werden konnte.¹⁴⁹ Endo et al. konnten in ihrer Studie das Vorkommen verschiedener Subklassen von Astrozyten je nach Hirnregion zeigen.¹¹² Dieses spezifische Vorkommen von Astrozyten könnte sich auch in einer unterschiedlich geprägten Antwort auf das erlittene Trauma widerspiegeln.

Die erhobenen Ergebnisse deuten auf Unterschiede in den Regenerationsverläufen und Vulnerabilitäten verschiedener Hirnregionen hin. Die Kenntnis hierüber könnte in Zukunft bei der Behandlung von Patienten mit wiederholten Gehirnerschütterungen und persistierenden Beschwerden von Bedeutung sein. Neue Studien zeigten ebenfalls einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten des Post-Concussion-Syndroms und früher Hyperkonnektivität thalamischer Kerngebiete.¹⁴³ Denkbar ist eine unterschiedliche zelluläre Antwort auf die mikrovaskulären Schädigungen in verschiedenen Hirnregionen. Diese näher zu charakterisieren, sollte Ziel zukünftiger Forschungsvorhaben sein und könnte Zielstrukturen und -mechanismen neuer Therapien für betroffene Patienten offenlegen.

5.2 Charakterisierung des glymphatischen Systems, Korrelation mit Neurodegeneration

Die Aquaporin-4-Polarisation ist als Surrogat für das glymphatische System zu verstehen. Sie beschreibt die räumliche Verteilung von Aquaporin-4 im neuronalen Gewebe anhand eines Quotienten von perivaskulärem Aquaporin-4 zu nicht-perivaskulärem Aquaporin-4.¹⁵⁰ Eine gestörte Aquaporin-4-Polarisation und Verminderung des perivaskulären Aquaporin-4 wird mit einem behinderten glymphatischen Fluss und Abtransport von Metaboliten und toxischen

Abbauprodukten in Verbindung gebracht.^{124,129,130} Ebenfalls diskutiert wird die Beteiligung des glymphatischen Pathways bei der Vermittlung inflammatorischer Vorgänge.^{127,151}

In unserem Versuchsvorhaben konnten im chronischen Zeitraum keine signifikanten Veränderungen der Aquaporin-4-Polarisation nachgewiesen werden. Subakut fand sich im Hippocampus eine dezente Erhöhung der Aquaporin-4-Polarisation in der hochfrequent traumatisierten Gruppe bei unveränderter Aquaporin-4-Coverage, welche in der chronischen Phase nicht mehr nachweisbar war, und eine Regeneration nahelegt. Dies könnte sowohl auf eine Abnahme des nicht-perivaskulären Aquaporin-4-Signals hindeuten als auch auf eine Zunahme der perivaskulären Aquaporin-4-Signals. Bei Letztgenanntem könnte es sich um einen Mechanismus zur Auflösung eines vermehrten Flüssigkeitseinstroms darstellen, welcher sich durch Diskontinuität der endothelialen Barriere formiert hat.^{141,142} Ob eine Erhöhung der Aquaporin-4-Polarisation die Funktion des glymphatischen Systems beeinträchtigt, ist nach jetzigem Kenntnisstand unklar und bedarf weiterer Untersuchungen.

Andere Studien mittels Explosions-induzierter mTBI¹³⁰ und mTBI nach Bolzenschlag auf die laterale, geschlossene Schädeldecke¹⁵² konnten Veränderungen der Aquaporin-4-Polarisation nachweisen. In ihrem Explosions-induzierten mTBI-Modell sahen Braun et al. eine Verringerung der Aquaporin-4-Polarisation der Versuchstiere. Diese Verringerung trat zeitverzögert nach 28 Tagen auf und wurde durch eine verminderte Penetration eines intracisternal applizierten Tracers ins Hirngewebe begleitet. Die verminderte Penetration des Tracers wurde hierbei als Indikator für eine Beeinträchtigung des glymphatischen Pathways gewertet.¹³⁰ Ren et al. beobachteten in ihrer Studie ebenfalls eine Umverteilung von Aquaporin-4. Dieses fand sich nicht wie üblich in den Endfüßen, sondern polarisiert in den Somata der Astrozyten.¹⁵² Diese Umverteilung, welche in unserem Modell durch eine Verringerung der Aquaporin-4-Polarisation deutlich werden würde, konnte durch uns leider nicht nachgewiesen werden. Dies könnte dadurch begründet sein, dass es sich in der vorliegenden Studie um nur geringgradige Veränderungen der mikrovaskulären Strukturen handelte. Ebenfalls in Betracht kommt eine Untererfassung mikrovaskulärer Veränderungen durch die gröbere räumliche Auflösung der gewählten Methoden. Eine Erhöhung der Gruppengröße könnte möglicherweise derart geringgradige Veränderungen robust nachweisen, ebenso wie die Nutzung höherer Vergrößerungen am Mikroskop, um zellzentriert Veränderungen der Aquaporin-4-Lokalisation darzustellen.

Denkbar ist ebenfalls, dass die Form des Traumas mittels Bolzenschlag und resultierender Rotationsbeschleunigung in der koronaren Ebene trotz hoher Trauma-Frequenz nicht ausreichend war, um anhaltende Pathologien des glymphatischen Systems herbeizuführen. Trotz der diffusen Verteilung der Traumafolgen auch an entfernteren Hirnregionen, wie anhand

des IgG-Extravasats und p-Tau-Last gezeigt werden konnte, könnten inhärente physikalische Unterschiede der Traumamodelle zu Unterschieden der Ergebnisse führen.⁸⁸

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass in der vorliegenden Studie keine eindeutigen Veränderungen des glymphatischen Systems gezeigt werden konnten. Folgend gelang auch kein Nachweis einer Korrelation zur gezeigten Erhöhung der Last neurodegenerativer Marker. Alterationen des glymphatischen Pathways als mögliche Ursache neurodegenerativer Veränderungen sind den vorliegenden Ergebnissen zufolge im vorliegenden Modell nicht zu belegen.

5.3 Modulation mittels Dexamethason

Im zweiten Versuchsteil erfolgte die Gabe von Dexamethason mit der Frage von Effekten auf mikrovaskuläre Veränderungen (Aquaporin-4- und GFAP-Coverage) einer behandelten und einer unbehandelten, hochfrequent traumatisierten Kohorte aus jeweils vier Tieren.

Es zeigten sich durch die Behandlung keine signifikanten Veränderungen der mikrovaskulären Coverages, jedoch konnten Trends beschrieben werden. Die Aquaporin-4-Coverage im Kortex und Hippocampus in der Dexamethason-Gruppe war erhöht gegenüber der pharmakologischen Kontrollgruppe. Ebenfalls erhöht zeigte sich die kortikale GFAP-Coverage. Zusätzlich zeigte sich eine relative Erniedrigung der kortikalen Aquaporin-4-Polarisation der mit Dexamethason behandelten Tiere. In Zusammenschau mit der tendenziell erhöhten Aquaporin-4-Coverage könnte es sich um eine Erhöhung des perivaskulären und nicht-perivaskulären Aquaporin-4 handeln, welche sich letztlich in einer Verringerung der Aquaporin-4-Polarisation (Kap. 3.8.2) niederschlägt. Eine Verringerung der Aquaporin-4-Polarisation war in Vorarbeiten mit einem beeinträchtigten glymphatischen Fluss vergesellschaftet.¹³⁰

Dexamethason hat sich in vitro als wirksamer Stabilisator der BHS erwiesen und wird im Menschen zur Reduktion des Hirnödems durch einen Tumor oder eine bakterielle Meningitis eingesetzt.^{153,154} An zerebralen, endothelialen Zellkulturen aus Rattenzellen konnten nach der Gabe von Glukokortikoiden verbesserte Barriereigenschaften nachgewiesen werden.^{101,155,156} Ebenfalls in vitro konnte gezeigt werden, dass Astrozyten im Rahmen einer reaktiven Umwandlung VEGF-A freisetzen, welches wiederum Downstream eine erhöhte Durchlässigkeit der BHS über eine verminderte Expression von Occludin und Claudin-5 bewirkt.¹⁵⁷ Dexamethason vermag über den Glukokortikoid-Rezeptor die Freisetzung von VEGF aus Astrozyten zu vermindern und so die BHS zu stabilisieren.¹⁰⁰

Die Evaluation der Dexamethason-Gabe im Hinblick auf die Verminderung eines IgG-Extravasats und der endothelialen Tight-Junctions wäre ebenfalls für zukünftige Studien

interessant, ebenso ein Vergleich mit scheintraumatisierten Tieren und der Verlauf der Veränderungen über einen längeren Beobachtungszeitraum. Anzustreben wäre eine Einordnung der gesehenen Veränderungen im Vergleich zu einer nicht-traumatisierten Kontrollgruppe (Sham), da aus den vorliegenden Daten nicht beantwortet werden kann, welche der gesehenen Veränderungen pathologisch ist, und welche dem physiologischen, nicht-traumatisierten Zustand am nächsten kommt, da der Vergleich mittels Z-Scores immer eine relative Änderung zum gesamten Mittelwert einer Kohorte angibt.

Die vorliegenden Ergebnisse deuten einen kortikal betonten Effekt der Gabe von Dexamethason an. Diese Effekte sollten mit einer Erhöhung der Gruppengröße und Einführung einer Sham-Gruppe weiter evaluiert werden. Im Hinblick auf eine translationale Anwendbarkeit am Menschen ist zu bedenken, dass die Gabe von Dexamethason im gewählten Tiermodell – im Sinne eines proof-of-principles - über zehn Tage sowohl prä- als auch posttraumatisch erfolgte, was einer hohen eingesetzten Dosis entspricht. Deren protektive wie adverse Effekte sind sorgfältig gegeneinander abzuwägen. Ein verlängerter Beobachtungszeitraum mit Evaluation der Dexamethason-Gabe im Hinblick auf chronische mikrovaskuläre und neurodegenerative Veränderungen und deren Prävention sollte ebenfalls das Ziel zukünftiger Projekte darstellen. Zukünftig angestrebte Versuchsreihen enthalten zudem die zu prüfende Hypothese, dass die Gabe von Dexamethason über eine Stabilisierung der Tight-Junctions zu einer Stabilisierung der BHS führt. Diese wird mittels IgG-Färbung und Darstellung des Tight-Junction-Proteins Zonula Occludens-1 erfolgen.

Da Patienten mit Schädel-Hirn-Trauma nicht per se von einer Steroidgabe profitieren, ist diese in den aktuellen Leitlinien auch nicht grundsätzlich empfohlen.^{5,158}

5.4 Etablierung der TJ-Färbung

Die Etablierung der Färbung von Zonula-Occludens-1 erfolgte mit dem Ziel, die endotheliale Komponente der BHS und deren Affektion nach wiederholten Traumata darzustellen und zu quantifizieren. Die Färbungen waren in einem Verhältnis von 1:200 spezifisch für gefäßassoziiertes ZO-1, in einer Konzentration von 1:100 wurden auch Zellen mit angefärbt und die Spezifität nahm ab. Während in der höheren Konzentration ein sehr gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis (SNR) erreicht werden konnte, war das SNR in der niedrigeren Konzentration durch die schwache Kontrastierung der interessierenden Strukturen zum Hintergrund unvorteilhaft. Die Negativkontrollen zeigten jeweils negative Ergebnisse.

Die vorliegende Färbung kann für qualitativ-beschreibende Nachweise einzelner Gefäße und Regionen herangezogen werden. Für eine verbesserte Vergleichbarkeit ist die vorherige Festlegung von Region und Größe anzustreben. Von einer automatisierten Auswertung ganzer Hirnschnitte ist aufgrund des ungünstigen SNR abzusehen, da es hier zu einer

erhöhten Rate falsch-positiver Ergebnisse kommen könnte. Zu bevorzugen ist die Konzentration von 1:200 aufgrund der besseren Spezifität für vaskulär lokalisiertes ZO-1.

Die Basis für immunhistochemische Färbungen bildet die Erkennung eines Zielantigens im Gewebe durch den primären Antikörper. Diese Antikörperbindung an das Zielantigen wird sichtbar gemacht, indem ein sekundärer, mit einem Fluorophor markierter Antikörper hinzugegeben wird, welcher an das Fc-Fragment des primären Antikörpers bindet. Immunhistochemische Färbeprotokolle sehen zur Verbesserung der Antigenerkennung durch den primären Antikörper ein sogenanntes Blocking vor. Beim Blocking wird das Serum der Spezies, aus welcher der primäre Antikörper gewonnen wurde, zum unspezifischen Blockieren aller enthaltenen Antigene des zu untersuchenden Gewebes gegeben. Dieser Vorgang verbessert durch Maskierung unspezifischer Antigene die Spezifität der Färbung. Eine verlängerte Einwirkzeit der Blocking Solution könnte das SNR der Färbung optimieren und in zukünftigen Versuchsreihen erprobt werden.¹⁵⁹

Eine weitere Verbesserung könnte durch die Durchführung eines Antigenretrievals entstehen. Bei einem Antigenretrieval wird die Immunreaktivität der Antigene des Gewebes verbessert. Dies geschieht, indem die durch die Fixierung entstandene Quervernetzungen rückgängig gemacht und die Antigenstrukturen wieder zugänglich gemacht werden. Ein Antigenretrieval kann auf verschiedenen Wegen durchgeführt werden, beispielsweise mittels verschiedener Puffer wie Citrat und EDTA, oder auch physikalisch mittels Hitze.¹⁶⁰

Die Etablierung der Zonula Occludens-1 Färbung kann zusammenfassend als teilweise erfolgreich gewertet werden. Die beschriebenen Anpassungen könnten eine weitere Verbesserung der Qualität der Färbung mit sich bringen. In Frage kommen auch die Erprobung von primären Antikörpern mit einer Spezifität für andere Komponenten der Tight Junctions, wie beispielsweise Claudin-5.⁹⁴

5.5 Limitationen und andere Einflüsse

Limitationen der vorliegenden Studie ergeben sich aus mehreren Faktoren. In der vorliegenden Studie sind ausschließlich männliche Mäuse verwendet worden, was eine Übertragbarkeit auf weibliche Tiere und translational auch Menschen einschränkt, da mögliche hormonelle und genetische Einflussfaktoren nicht abbildbar sind. Ebenfalls nicht auszuschließen ist eine schwankende Beibringung des Impakts. Trotz eines etablierten Protokolls kann eine leicht alterierte Beibringung des Traumas nicht ausgeschlossen werden, insbesondere da der Kopf des Versuchstieres nicht fixiert wurde, sondern auf einem Schaumstoffkissen ruhte. Obwohl die etablierte Traumatisierung der Versuchstiere eine reproduzierbare neuropsychiatrische Beeinträchtigung und BHS-Störung verursachte⁹³, konnten signifikante Veränderungen nur in den hochfrequent traumatisierten Tieren

beschrieben werden. Gegebenenfalls ist das von uns gewählte Traumamodell zu geringgradig, um gewichtigere, mikrovaskuläre Veränderungen zu produzieren.

Zusätzlich handelt es sich bei der gewählten Anzahl von Tieren um kleine Gruppen. Eine geringe Zahl an Versuchstieren erlaubt statistisch nur die Detektion starker Effekte. Dezentere Veränderungen, bleiben somit bei der vorliegenden Gruppenstärke unterdetektiert. Dies stellt eine gewisse Herausforderung dar, da es sich im verwendeten Traumamodell explizit um eine diffuse Verletzung ohne makroskopisch oder radiologisch diagnostizierbare Schädigungen handelt und starke Verletzungseffekte somit unwahrscheinlicher sind. Eine weitere Erhöhung der Gruppengröße könnte dazu beitragen, die beschriebenen Trends zu bestätigen oder zu verwerfen und robustere Einschätzungen der gesehenen Veränderungen zu erlauben.

Methodisch kommt zudem eine ungleiche Gewebefixierung während der Perfusion der Tiere und Gewebeaufbereitung am Kryostaten als Quelle von Verzerrungen in Betracht. Ebenso können Konzentrationsunterschiede der Antikörperlösungen auf den Objektträgern während des Färbevorgangs zu Verzerrungen führen. Diesen Fehlerquellen wurde mittels z-Transformation der Rohdaten begegnet, die Färbedurchgänge wurden der verblindeten Untersucherin so zugeteilt, dass jeder Durchgang jede Behandlungskondition enthielt und Unterschiede in den Resultaten der Färbungen randomisiert alle Behandlungskonditionen betrafen und statistisch nicht ins Gewicht fielen.

Zu diskutieren ist auch die hier gewählte Methode der Auswertung der immunhistochemischen Färbungen. Die gefärbten Slides wurden in einer 20-fachen Vergrößerung mikroskopiert und die binären Bilder automatisiert ausgewertet. Dieses Vorgehen erlaubt die Auswertung mehrerer, großflächiger Hirnregionen, welche Untersucher-unabhängig zum selben Ergebnis führt und somit einen Vorteil darstellt. Nachteilig hieran ist jedoch die entfallende Beurteilung zellulärer Morphologie und der Lokalisation der spezifischen Signale durch einen geschulten Untersucher in größerer Auflösung, wie sie beispielsweise von Ren et al. mittels eines Konfokal-Mikroskops in 40-facher Vergrößerung vorgenommen und so die Umverteilung von Aquaporin-4 an die Somata von Astrozyten detailliert beschrieben werden konnte.¹⁵²

Die gewählte zeitliche Auflösung der Kohorten, sieben Tage und drei Monate nach letztmaligem Trauma, diente dazu mikrovaskuläre Veränderungen in der subakuten und chronischen Phase nach wiederholter Gehirnerschütterung zu charakterisieren. In bereits veröffentlichten Ergebnissen der Studie war die prominenteste Unterbrechung der BHS im Hippocampus am 1. posttraumatischen Tag anhand eines Extravasats fluoreszierender Dextrane nachweisbar und zeigte bereits Zeichen einer Regeneration bis zum 7. Tag.⁹³ Der hier gewählte Untersuchungszeitpunkt in der subakuten Phase könnte möglicherweise akute, transiente Veränderungen der mikrovaskulären Coverages nicht erfasst haben. Die zeitliche Auflösung mit größeren Abständen erlaubt nur begrenzte Einblicke in den zeitlichen Verlauf der mikrovaskulären Veränderungen. Zusätzliche Untersuchungszeitpunkte, beispielsweise

nach drei Tagen, einem Monat und sechs Monaten könnten ergänzenden Aufschluss über den Verlauf der gesehenen Veränderungen bieten.

Zukünftig anzustreben ist die Darstellung möglicher Begleitpathologien, wie das vermehrte Auftreten neuroinflammatorischer Marker anhand aktivierter Mikroglia und Astrozyten auch in der chronischen Phase nach Trauma, die Persistenz fokaler Tracer-Extravasate über alle drei untersuchten Hirnregionen hinweg und eine hochauflösende Darstellung aller strukturellen Komponenten der Blut-Hirn-Schranke.

5.6 Fazit

Zusammenfassend gelang im vorliegenden Versuchsvorhaben der Nachweis chronischer, mikrovaskulärer Veränderungen im Thalamus und die Darstellung unterschiedlicher Affektionen und Verläufe verschiedener Hirnregionen zu subakuten und chronischen Zeiträumen. Die Bedeckung zerebraler Blutgefäße durch astrozytäre Endfüße ist im Thalamus sowohl subakut als auch chronisch erhöht. Hierbei könnte es sich um eine reaktive Veränderung perivaskulärer Astrozyten im Sinne einer vermehrten „Abdichtung“ als Antwort auf persistierende Beeinträchtigungen der BHS handeln. Hinweise für anhaltende Veränderungen des glymphatischen Systems fanden sich nicht, ebenso keine Korrelation mit dem vermehrten Auftreten neurodegenerativer Veränderungen. Die subakut erhöhte Aquaporin-4-Polarisation im Hippocampus könnte Ausdruck einer transienten, astrozytären Reaktion sein; ob die Funktion des glymphatischen Systems hierdurch beeinträchtigt ist, kann aus den vorliegenden Daten nicht beantwortet werden. Eine klare Korrelation mit den Parametern der BHS-Störung und Neurodegeneration zeigte sich nicht, jedoch traten auch hier die prominentesten Veränderungen im Thalamus der hochfrequent traumatisierten Tiere auf, was die Bedeutung dieser Hirnregion für zukünftige Untersuchungen unterstreicht.

Diese Erkenntnisse können für Bedeutung in der Behandlung von Patienten sein, welche von wiederholten Gehirnerschütterungen oder bleibender Beschwerden betroffen sind. Die Feststellung, dass verschiedene Hirnregionen unterschiedlich auf das Trauma reagieren, kann ein Hinweis darauf sein, dass diese Regionen unterschiedliche Verletzungsmuster aufweisen. Dies könnte in der Zusammensetzung des Nervengewebes und deren elastischen Eigenschaften, sowie durch die Nachbarschaft zu etwaigen knöchernen Strukturen bedingt sein. Zusätzlich in Frage kommen grundlegende Unterschiede in den Antworten der Gliazellen verschiedener Hirnregionen. Zusätzlich ist festzuhalten, dass sich die prominentesten Veränderungen in der Gruppe der hochfrequent traumatisierten Tiere fanden. Dieser Umstand sollte dazu veranlassen, Patienten und Athleten zu einer ausreichenden Pause mit vollständiger Regeneration vor Wiederaufnahme risikobehafteter Tätigkeiten zu beraten. Durch Kenntnis dieser Umstände ist eine präzisere Ausrichtung zukünftiger

Forschungsvorhaben möglich. Somit gelingt ein umfassenderes Verständnis der Pathophysiologie wiederholter Gehirnerschütterungen und deren Folgen.

6. Literaturverzeichnis

- 1 Maas AIR, Menon DK, Adelson PD, et al. Traumatic brain injury: integrated approaches to improve prevention, clinical care, and research. *Lancet Neurol* 2017; **16**: 987–1048.
- 2 Feigin VL, Theadom A, Barker-Collo S, et al. Incidence of traumatic brain injury in New Zealand: a population-based study. *Lancet Neurol* 2013; **12**: 53–64.
- 3 Maas AIR, Menon DK, Manley GT, et al. Traumatic brain injury: progress and challenges in prevention, clinical care, and research. *Lancet Neurol* 2022; **21**: 1004–60.
- 4 Menon DK, Schwab K, Wright DW, Maas AI. Position statement: definition of traumatic brain injury. *Arch Phys Med Rehabil* 2010; **91**: 1637–40.
- 5 Firsching R, Rickels E, Mauer UM, et al. S2e-Leitlinie Schädel-Hirn-Trauma im Erwachsenenalter. 2015. https://register.awmf.org/assets/guidelines/008-001I_S2e_Schaedelhirntrauma_SHT_Erwachsene_2015-12-abgelaufen.pdf (accessed Jan 08, 2025).
- 6 Hamou HA, Clusmann H. Schädel-Hirn-Trauma (SHT). In: Engelhardt, M., Raschke, M. (eds), Orthopädie und Unfallchirurgie. Berlin, Heidelberg: Springer Reference Medizin. Springer: S. 1-28, 2019.
- 7 Teasdale G, Jennett B. Assessment of Coma and impaired Consciousness - A Practical Scale. *Lancet* 1974; **2**: 81–84.
- 8 Hagebusch P, Pingel A, Kandziora F, Hoffmann R, Schweigkofler U. Das Schädel-Hirn-Trauma im Erwachsenenalter. *Notf.med. up2date* 2020; **15**: 59–74.
- 9 Cifu D, Eapen B, Burton J, et al. VA/DoD Clinical Practice Guideline for the Management and Rehabilitation of Post-Acute Mild Traumatic Brain Injury. 2021. <https://www.healthquality.va.gov/guidelines/Rehab/mtbi/VADoDmTBICPGFinal508.pdf> (accessed Jan 13, 2025).
- 10 Lefevre-Dognin C, Cogné M, Perdrieau V, Granger A, Heslot C, Azouvi P. Definition and epidemiology of mild traumatic brain injury. *Neurochirurgie* 2021; **67**: 218–21.

- 11 Cifu D, Bowles A, Hurley R, et al. VA/DoD Clinical Practice Guideline For Management of Concussion/mTBI. 2009.
<https://www.rehab.research.va.gov/jour/09/46/6/pdf/cpg.pdf> (accessed Jan 08, 2025).
- 12 Sussman ES, Pendharkar AV, Ho AL, Ghajar J. Mild traumatic brain injury and concussion: terminology and classification. *Handb Clin Neurol* 2018; **158**: 21–24.
- 13 McCrory P, Meeuwisse W, Aubry M, et al. Consensus statement on Concussion in Sport--the 4th International Conference on Concussion in Sport held in Zurich, November 2012. *J Sci Med Sport* 2013; **16**: 178–89.
- 14 Harmon KG, Drezner JA, Gammons M, et al. American Medical Society for Sports Medicine position statement: concussion in sport. *Br J Sports Med* 2013; **47**: 15–26.
- 15 Silverberg ND, Iverson GL, Cogan A, et al. The American Congress of Rehabilitation Medicine Diagnostic Criteria for Mild Traumatic Brain Injury. *Arch Phys Med Rehabil* 2023; **104**: 1343–55.
- 16 Carroll LJ, Cassidy JD, Holm L, Kraus J, Coronado VG. Methodological issues and research recommendations for mild traumatic brain injury: the WHO Collaborating Centre Task Force on Mild Traumatic Brain Injury. *J Rehabil Med* 2004; 113–25.
- 17 Patricios JS, Schneider KJ, Dvorak J, et al. Consensus statement on concussion in sport: the 6th International Conference on Concussion in Sport- Amsterdam, October 2022. *Br J Sports Med* 2023; **57**: 695–711.
- 18 Spencer L James, Alice Theadom, Richard G Ellenbogen, et al. Global, regional, and national burden of traumatic brain injury and spinal cord injury, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol* 2019; **18**: 56–87.
- 19 Thornhill S, Teasdale GM, Murray GD, McEwen J, Roy CW. Disability in young people and adults one year after head injury: prospective cohort study. *The BMJ* 17 JUNE 2000: 1631–35.
- 20 Majdan M, Plancikova D, Brazinova A, et al. Epidemiology of traumatic brain injuries in Europe: a cross-sectional analysis. *Lancet Public Health* 2016; **1**: e76-e83.

- 21 Brazinova A, Rehorcikova V, Taylor MS, et al. Epidemiology of Traumatic Brain Injury in Europe: A Living Systematic Review. *J Neurotrauma* 2021; **38**: 1411–40.
- 22 Langer L, Levy C, Bayley M. Increasing Incidence of Concussion: True Epidemic or Better Recognition? *J Head Trauma Rehabil* 2020; **35**: E60-E66.
- 23 Cancelliere C, Coronado VG, Taylor CA, Xu L. Epidemiology of Isolated Versus Nonisolated Mild Traumatic Brain Injury Treated in Emergency Departments in the United States, 2006-2012: Sociodemographic Characteristics. *J Head Trauma Rehabil* 2017; **32**: E37-E46.
- 24 Dewan MC, Rattani A, Gupta S, et al. Estimating the global incidence of traumatic brain injury. *J Neurosurg* 2019; **130**: 1080–97.
- 25 Dikmen S, Machamer J, Temkin N. Mild Traumatic Brain Injury: Longitudinal Study of Cognition, Functional Status, and Post-Traumatic Symptoms. *J Neurotrauma* 2017; **34**: 1524–30.
- 26 Cancelliere C, Verville L, Stubbs JL, et al. Post-Concussion Symptoms and Disability in Adults With Mild Traumatic Brain Injury: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Neurotrauma* 2023; **40**: 1045–59.
- 27 Kraus JF, Hsu P, Schafer K, Afifi AA. Sustained outcomes following mild traumatic brain injury: results of a five-emergency department longitudinal study. *Brain Inj* 2014; **28**: 1248–56.
- 28 Korley FK, Peacock WF, Eckner JT, et al. Clinical Gestalt for Early Prediction of Delayed Functional and Symptomatic Recovery From Mild Traumatic Brain Injury Is Inadequate. *Acad Emerg Med* 2019; **26**: 1384–87.
- 29 Gardner RC, Yaffe K. Epidemiology of mild traumatic brain injury and neurodegenerative disease. *Mol Cell Neurosci* 2015; **66**: 75–80.
- 30 McAllister T, McCrea M. Long-Term Cognitive and Neuropsychiatric Consequences of Repetitive Concussion and Head-Impact Exposure. *J Athl Train* 2017; **52**: 309–17.
- 31 McCrory P, Meeuwisse W, Dvořák J, et al. Consensus statement on concussion in sport-the 5th international conference on concussion in sport held in Berlin, October 2016. *Br J Sports Med* 2018; **51**: 838–47.

- 32 van Pelt KL, Puetz T, Swallow J, Lapointe AP, Broglio SP. Data-Driven Risk Classification of Concussion Rates: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sports Med* 2021; **51**: 1227–44.
- 33 McCrea M, Guskiewicz K, Randolph C, et al. Incidence, clinical course, and predictors of prolonged recovery time following sport-related concussion in high school and college athletes. *J Int Neuropsychol Soc* 2013; **19**: 22–33.
- 34 Mackay DF, Russell ER, Stewart K, MacLean JA, Pell JP, Stewart W. Neurodegenerative Disease Mortality among Former Professional Soccer Players. *N Engl J Med* 2019; **381**: 1801–08.
- 35 Guskiewicz KM, Marshall SW, Bailes J, et al. Association between Recurrent Concussion and Late-Life Cognitive Impairment in Retired Professional Football Players. *Neurosurgery* 2005; **57**: 719–26.
- 36 Daneshvar DH, Nair ES, Baucom ZH, et al. Leveraging football accelerometer data to quantify associations between repetitive head impacts and chronic traumatic encephalopathy in males. *Nat Commun* 2023; **14**: 3470.
- 37 Daneshvar DH, Mez J, Alosco ML, et al. Incidence of and Mortality From Amyotrophic Lateral Sclerosis in National Football League Athletes. *JAMA Netw Open* 2021; **4**: e2138801.
- 38 Harmon KG, Clugston JR, Dec K, et al. American Medical Society for Sports Medicine position statement on concussion in sport. *Br J Sports Med* 2019; **53**: 213–25.
- 39 Reddy CC, Collins MW, Gioia GA. Adolescent sports concussion. *Phys Med Rehabil Clin N Am* 2008; **19**: 247-69, viii.
- 40 Guskiewicz KM, McCrea M, Marshall SW, et al. Cumulative effects associated with recurrent concussion in collegiate football players: the NCAA Concussion Study. *JAMA* 2003; **290**: 2549–55.
- 41 Lovell MR, Iverson GL, Collins MW, et al. Measurement of symptoms following sports-related concussion: reliability and normative data for the post-concussion scale. *Appl Neuropsychol* 2006; **13**: 166–74.

- 42 Kashluba S, Paniak C, Blake T, Reynolds S, Toller-Lobe G, Nagy J. A longitudinal, controlled study of patient complaints following treated mild traumatic brain injury. *Arch Clin Neuropsychol* 2004; **19**: 805–16.
- 43 Nelson LD, Temkin NR, Dikmen S, et al. Recovery After Mild Traumatic Brain Injury in Patients Presenting to US Level I Trauma Centers: A Transforming Research and Clinical Knowledge in Traumatic Brain Injury (TRACK-TBI) Study. *JAMA Neurol* 2019; **76**: 1049–59.
- 44 Leddy JJ, Haider MN, Noble JM, et al. Clinical Assessment of Concussion and Persistent Post-Concussive Symptoms for Neurologists. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2021; **21**: 70.
- 45 Dwyer B, Katz DI. Postconcussion syndrome. *Handb Clin Neurol* 2018; **158**: 163–78.
- 46 Iverson GL, Gardner AJ, Terry DP, et al. Predictors of clinical recovery from concussion: a systematic review. *Br J Sports Med* 2017; **51**: 941–48.
- 47 Vos PE, Alekseenko Y, Battistin L, et al. Mild traumatic brain injury. *Eur J Neurol* 2012; **19**: 191–98.
- 48 McCrea MA, Nelson LD, Guskiewicz K. Diagnosis and Management of Acute Concussion. *Phys Med Rehabil Clin N Am* 2017; **28**: 271–86.
- 49 Collins MW, Kontos AP, Reynolds E, Murawski CD, Fu FH. A comprehensive, targeted approach to the clinical care of athletes following sport-related concussion. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2014; **22**: 235–46.
- 50 Echemendia RJ, Ahmed OH, Bailey CM, et al. The Concussion Recognition Tool 6 (CRT6). 2023. <https://bjsm.bmj.com/content/bjsports/57/11/692.full.pdf> (accessed Mar 07, 2025).
- 51 Echemendia RJ, Brett BL, Broglio S, et al. Sport concussion assessment tool™ - 6 (SCAT6). 2023. <https://bjsm.bmj.com/content/bjsports/57/11/622.full.pdf> (accessed Mar 07, 2025).
- 52 Macnow T, Curran T, Tolliday C, et al. Effect of Screen Time on Recovery From Concussion: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Pediatr* 2021; **175**: 1124–31.

- 53 Leddy JJ, Burma JS, Toomey CM, et al. Rest and exercise early after sport-related concussion: a systematic review and meta-analysis. *Br J Sports Med* 2023; **57**: 762–70.
- 54 Sergeyenko Y, Andreae ME, Segal M. Diagnosis and Management of Mild Traumatic Brain Injury (mTBI): A Comprehensive, Patient-centered Approach. *Curr Pain Headache Rep* 2025; **29**: 19.
- 55 Bramley H, Hong J, Zacko C, Royer C, Silvis M. Mild Traumatic Brain Injury and Post-concussion Syndrome: Treatment and Related Sequela for Persistent Symptomatic Disease. *Sports Med Arthrosc Rev* 2016; **24**: 123–29.
- 56 Leddy JJ, Master CL, Mannix R, et al. Early targeted heart rate aerobic exercise versus placebo stretching for sport-related concussion in adolescents: a randomised controlled trial. *Lancet Child Adolesc Health* 2021; **5**: 792–99.
- 57 Abdolmohammadi B, Tuz-Zahra F, Uretsky M, et al. Duration of Ice Hockey Play and Chronic Traumatic Encephalopathy. *JAMA Netw Open* 2024; **7**: e2449106.
- 58 Omalu BI, DeKosky ST, Minster RL, Kamboh MI, Hamilton RL, Wecht CH. Chronic traumatic encephalopathy in a National Football League player. *Neurosurgery* 2005; **57**: 128-34.
- 59 McKee AC, Stein TD, Nowinski CJ, et al. The spectrum of disease in chronic traumatic encephalopathy. *Brain* 2013; **136**: 43–64.
- 60 American Psychiatric Association (2013), Deutsche Ausgabe herausgegeben von Peter Falkai und Hans-Ulrich Wittchen, ed. Diagnostisches und Statistisches Manual Psychischer Störungen DSM-5®. Hogrefe, 2018.
- 61 Mavroudis I, Kazis D, Chowdhury R, et al. Post-Concussion Syndrome and Chronic Traumatic Encephalopathy: Narrative Review on the Neuropathology, Neuroimaging and Fluid Biomarkers. *Diagnostics (Basel)* 2022; **12**: 740.
- 62 Asken BM, Snyder AR, Clugston JR, Gaynor LS, Sullan MJ, Bauer RM. Concussion-Like Symptom Reporting in Non-Concussed Collegiate Athletes. *Arch Clin Neuropsychol* 2017; **32**: 1–9.
- 63 Ellis MJ, Leddy J, Willer B. Multi-Disciplinary Management of Athletes with Post-Concussion Syndrome: An Evolving Pathophysiological Approach. *Front Neurol* 2016; **7**: 136.

- 64 Bieniek KF, Ross OA, Cormier KA, et al. Chronic traumatic encephalopathy pathology in a neurodegenerative disorders brain bank. *Acta Neuropathol* 2015; **130**: 877–89.
- 65 Goldstein LE, Fisher AM, Tagge CA, et al. Chronic Traumatic Encephalopathy in Blast-Exposed Military Veterans and a Blast Neurotrauma Mouse Model. *Sci. Transl. Med.* 2012; **4**: 134ra60-134ra60.
- 66 McKee AC, Cairns NJ, Dickson DW, et al. The first NINDS/NIBIB consensus meeting to define neuropathological criteria for the diagnosis of chronic traumatic encephalopathy. *Acta Neuropathol* 2016; **131**: 75–86.
- 67 Bieniek KF, Cairns NJ, Crary JF, et al. The Second NINDS/NIBIB Consensus Meeting to Define Neuropathological Criteria for the Diagnosis of Chronic Traumatic Encephalopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 2021; **80**: 210–19.
- 68 Ruchika FN, Shah S, Neupane D, Vijay R, Mehkri Y, Lucke-Wold B. Understanding the Molecular Progression of Chronic Traumatic Encephalopathy in Traumatic Brain Injury, Aging and Neurodegenerative Disease. *IJMS* 2023; **24**: 1847.
- 69 Daneshvar DH, Goldstein LE, Kiernan PT, Stein TD, McKee AC. Post-traumatic neurodegeneration and chronic traumatic encephalopathy. *Molecular and Cellular Neuroscience* 2015; **66**: 81–90.
- 70 Stathas S, Alvarez VE, Xia W, et al. Tau phosphorylation sites serine202 and serine396 are differently altered in chronic traumatic encephalopathy and Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2022; **18**: 1511–22.
- 71 Kondo A, Shahpasand K, Mannix R, et al. Antibody against early driver of neurodegeneration cis P-tau blocks brain injury and tauopathy. *Nature* 2015; **523**: 431–36.
- 72 Stern RA, Daneshvar DH, Baugh CM, et al. Clinical presentation of chronic traumatic encephalopathy. *Neurology* 2013; **81**: 1122–29.
- 73 DeKosky ST, Asken BM. Injury cascades in TBI-related neurodegeneration. *Brain Inj* 2017; **31**: 1177–82.
- 74 Iliff JJ, Chen MJ, Plog BA, et al. Impairment of Glymphatic Pathway Function Promotes Tau Pathology after Traumatic Brain Injury. *J. Neurosci.* 2014; **34**: rau80–93.

- 75 Li L, Chopp M, Ding G, et al. MRI detection of impairment of glymphatic function in rat after mild traumatic brain injury. *Brain Res* 2020; **1747**: 147062.
- 76 Wu Y, Wu H, Guo X, Pluimer B, Zhao Z. Blood-Brain Barrier Dysfunction in Mild Traumatic Brain Injury: Evidence From Preclinical Murine Models. *Front Physiol* 2020; **11**: 1030.
- 77 Doherty CP, O'Keefe E, Wallace E, et al. Blood-Brain Barrier Dysfunction as a Hallmark Pathology in Chronic Traumatic Encephalopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 2016; **75**: 656–62.
- 78 Shlosberg D, Benifla M, Kaufer D, Friedman A. Blood-brain barrier breakdown as a therapeutic target in traumatic brain injury. *Nat Rev Neurol* 2010; **6**: 393–403.
- 79 Mullally WJ. Concussion. *The American Journal of Medicine* 2017; **130**: 885–92.
- 80 Giza CC, Hovda DA. The new neurometabolic cascade of concussion. *Neurosurgery* 2014; **75 Suppl 4**: S24-33.
- 81 Yoshino A, Hovda DA, Kawamata T, Katayama Y, Becker DP. Dynamic changes in local cerebral glucose utilization following cerebral conclusion in rats: evidence of a hyper- and subsequent hypometabolic state. *Brain Res* 1991; **561**: 106–19.
- 82 Longhi L, Saatman KE, Fujimoto S, et al. Temporal window of vulnerability to repetitive experimental concussive brain injury. *Neurosurgery* 2005; **56**: 364-74.
- 83 Büki A, Povlishock JT. All roads lead to disconnection? -Traumatic axonal injury revisited. *Acta Neurochir (Wien)* 2006; **148**: 181-94.
- 84 Reeves TM, Phillips LL, Povlishock JT. Myelinated and unmyelinated axons of the corpus callosum differ in vulnerability and functional recovery following traumatic brain injury. *Exp Neurol* 2005; **196**: 126–37.
- 85 Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 2006; **7**: 41–53.
- 86 Kadry H, Noorani B, Cucullo L. A blood-brain barrier overview on structure, function, impairment, and biomarkers of integrity. *Fluids Barriers CNS* 2020; **17**: 69.
- 87 Sweeney MD, Zhao Z, Montagne A, Nelson AR, Zlokovic BV. Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back. *Physiol Rev* 2019; **99**: 21–78.

- 88 Tagge CA, Fisher AM, Minaeva OV, et al. Concussion, microvascular injury, and early tauopathy in young athletes after impact head injury and an impact concussion mouse model. *Brain* 2018; **141**: 422–58.
- 89 O'Keeffe E, Kelly E, Liu Y, et al. Dynamic Blood-Brain Barrier Regulation in Mild Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma* 2020; **37**: 347–56.
- 90 Wu Y, Wu H, Zeng J, et al. Mild traumatic brain injury induces microvascular injury and accelerates Alzheimer-like pathogenesis in mice. *Acta Neuropathol Commun* 2021; **9**: 74.
- 91 Takata F, Nakagawa S, Matsumoto J, Dohgu S. Blood-Brain Barrier Dysfunction Amplifies the Development of Neuroinflammation: Understanding of Cellular Events in Brain Microvascular Endothelial Cells for Prevention and Treatment of BBB Dysfunction. *Front Cell Neurosci* 2021; **15**: 661838.
- 92 Sweeney MD, Kisler K, Montagne A, Toga AW, Zlokovic BV. The role of brain vasculature in neurodegenerative disorders. *Nat Neurosci* 2018; **21**: 1318–31.
- 93 Blaschke SJ, Rautenberg N, Endepols H, et al. Early Blood-Brain Barrier Impairment as a Pathological Hallmark in a Novel Model of Closed-Head Concussive Brain Injury (CBI) in Mice. *Int J Mol Sci* 2024; **25**: 4837.
- 94 Lochhead JJ, Yang J, Ronaldson PT, Davis TP. Structure, Function, and Regulation of the Blood-Brain Barrier Tight Junction in Central Nervous System Disorders. *Front Physiol* 2020; **11**: 914.
- 95 McConnell HL, Mishra A. Cells of the Blood–Brain Barrier: An Overview of the Neurovascular Unit in Health and Disease. In: Humana New York, NY, Hrsg., The Blood-Brain Barrier. Methods and Protocols. New York, NY: Springer US, 2022, S. 3-24.
- 96 Zhou Y, Chen Q, Wang Y, et al. Persistent Neurovascular Unit Dysfunction: Pathophysiological Substrate and Trigger for Late-Onset Neurodegeneration After Traumatic Brain Injury. *Front Neurosci* 2020; **14**: 581.
- 97 Yu X, Ji C, Shao A. Neurovascular Unit Dysfunction and Neurodegenerative Disorders. *Front Neurosci* 2020; **14**: 334.

- 98 Sandsmark DK, Bashir A, Wellington CL, Diaz-Arrastia R. Cerebral Microvascular Injury: A Potentially Treatable Endophenotype of Traumatic Brain Injury-Induced Neurodegeneration. *Neuron* 2019; **103**: 367–79.
- 99 Lok J, Wang X-S, Xing C-H, et al. Targeting the neurovascular unit in brain trauma. *CNS Neurosci Ther* 2015; **21**: 304–08.
- 100 Kim H, Lee JM, Park JS, et al. Dexamethasone coordinately regulates angiopoietin-1 and VEGF: a mechanism of glucocorticoid-induced stabilization of blood-brain barrier. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; **372**: 243–48.
- 101 Förster C, Silwedel C, Golenhofen N, et al. Occludin as direct target for glucocorticoid-induced improvement of blood-brain barrier properties in a murine in vitro system. *J Physiol* 2005; **565**: 475–86.
- 102 Michinaga S, Koyama Y. Pathogenesis of brain edema and investigation into anti-edema drugs. *Int J Mol Sci* 2015; **16**: 9949–75.
- 103 Liraz Zaltsman S, Sharabi S, Guez D, et al. Application of Delayed Contrast Extravasation Magnetic Resonance Imaging for Depicting Subtle Blood-Brain Barrier Disruption in a Traumatic Brain Injury Model. *J Neurotrauma* 2024; **41**: 430–46.
- 104 Hall CN, Reynell C, Gesslein B, et al. Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature* 2014; **508**: 55–60.
- 105 Winkler EA, Bell RD, Zlokovic BV. Central nervous system pericytes in health and disease. *Nat Neurosci* 2011; **14**: 1398–405.
- 106 Armulik A, Genové G, Mäe M, et al. Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature* 2010; **468**: 557–61.
- 107 Bell RD, Winkler EA, Sagare AP, et al. Pericytes control key neurovascular functions and neuronal phenotype in the adult brain and during brain aging. *Neuron* 2010; **68**: 409–27.
- 108 Li C, Chen S, Siedhoff HR, et al. Low-intensity open-field blast exposure effects on neurovascular unit ultrastructure in mice. *Acta Neuropathol Commun* 2023; **11**: 144.
- 109 Yao Y, Chen Z-L, Norris EH, Strickland S. Astrocytic laminin regulates pericyte differentiation and maintains blood brain barrier integrity. *Nat Commun* 2014; **5**: 3413.

- 110 George KK, Heithoff BP, Shandra O, Robel S. Mild Traumatic Brain Injury/Concussion Initiates an Atypical Astrocyte Response Caused by Blood-Brain Barrier Dysfunction. *J Neurotrauma* 2022; **39**: 211–26.
- 111 Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 2010; **119**: 7–35.
- 112 Endo F, Kasai A, Soto JS, et al. Molecular basis of astrocyte diversity and morphology across the CNS in health and disease. *Science* 2022; **378**: eadc9020.
- 113 Engelhardt B, Coisne C. Fluids and barriers of the CNS establish immune privilege by confining immune surveillance to a two-walled castle moat surrounding the CNS castle. *Fluids Barriers CNS* 2011; **8**: 4.
- 114 Mathiisen TM, Lehre KP, Danbolt NC, Ottersen OP. The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: an electron microscopic 3D reconstruction. *Glia* 2010; **58**: 1094–103.
- 115 Papadopoulos MC, Verkman AS. Aquaporin water channels in the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 2013; **14**: 265–77.
- 116 Peters ME, Lyketsos CG. The glymphatic system's role in traumatic brain injury-related neurodegeneration. *Mol Psychiatry* 2023; **28**: 2707–15.
- 117 Burda JE, Bernstein AM, Sofroniew MV. Astrocyte roles in traumatic brain injury. *Exp Neurol* 2016; **275 Pt 3**: 305–15.
- 118 Burda JE, Sofroniew MV. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron* 2014; **81**: 229–48.
- 119 Patani R, Hardingham GE, Liddelow SA. Functional roles of reactive astrocytes in neuroinflammation and neurodegeneration. *Nat Rev Neurol* 2023; **19**: 395–409.
- 120 Escartin C, Galea E, Lakatos A, et al. Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nat Neurosci* 2021; **24**: 312–25.
- 121 Alhadidi QM, Bahader GA, Arvola O, Kitchen P, Shah ZA, Salman MM. Astrocytes in functional recovery following central nervous system injuries. *J Physiol* 2024; **602**: 3069–96.
- 122 Petraglia AL, Plog BA, Dayawansa S, et al. The pathophysiology underlying repetitive mild traumatic brain injury in a novel mouse model of chronic traumatic encephalopathy. *Surg Neurol Int* 2014; **5**: 184.

- 123 Drieu A, Lanquetin A, Prunotto P, et al. Persistent neuroinflammation and behavioural deficits after single mild traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 2022; **42**: 2216–29.
- 124 Iliff JJ, Wang M, Liao Y, et al. A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β . *Sci Transl Med* 2012; **4**: 147ra111.
- 125 Nedergaard M. Neuroscience. Garbage truck of the brain. *Science* 2013; **340**: 1529–30.
- 126 Schünke M, Schulte E, Schumacher U. Kopf, Hals und Neuroanatomie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2015.
- 127 Hablitz LM, Nedergaard M. The Glymphatic System: A Novel Component of Fundamental Neurobiology. *J Neurosci* 2021; **41**: 7698–711.
- 128 Reddy OC, van der Werf YD. The Sleeping Brain: Harnessing the Power of the Glymphatic System through Lifestyle Choices. *Brain Sci* 2020; **10**: 868.
- 129 Rosu G-C, Catalin B, Balseanu TA, et al. Inhibition of Aquaporin 4 Decreases Amyloid A β 40 Drainage Around Cerebral Vessels. *Mol Neurobiol* 2020; **57**: 4720–34.
- 130 Braun M, Sevaio M, Keil SA, et al. Macroscopic changes in aquaporin-4 underlie blast traumatic brain injury-related impairment in glymphatic function. *Brain* 2024; **147**: 2214–29.
- 131 Cash A, Theus MH. Mechanisms of Blood-Brain Barrier Dysfunction in Traumatic Brain Injury. *Int J Mol Sci* 2020; **21**: 3344.
- 132 Neumann KD, Broshek DK, Newman BT, Druzgal TJ, Kundu BK, Resch JE. Concussion: Beyond the Cascade. *Cells* 2023; **12**: 2128.
- 133 Brett BL, Gardner RC, Godbout J, Dams-O'Connor K, Keene CD. Traumatic Brain Injury and Risk of Neurodegenerative Disorder. *Biol Psychiatry* 2022; **91**: 498–507.
- 134 Fehily B, Fitzgerald M. Repeated Mild Traumatic Brain Injury: Potential Mechanisms of Damage. *Cell Transplant* 2017; **26**: 1131–55.
- 135 Iverson GL, Castellani RJ, Cassidy JD, et al. Examining later-in-life health risks associated with sport-related concussion and repetitive head impacts: a systematic review of case-control and cohort studies. *Br J Sports Med* 2023; **57**: 810–21.

- 136 Sweeney MD, Sagare AP, Zlokovic BV. Blood–brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurol* 2018; **14**: 133–50.
- 137 Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 2012; **9**: 676–82.
- 138 Pallast N, Diedenhofen M, Blaschke S, et al. Processing Pipeline for Atlas-Based Imaging Data Analysis of Structural and Functional Mouse Brain MRI (AIDAmri). *Front Neuroinform* 2019; **13**: 42.
- 139 Allen Institute for Brain Science. Allen Mouse Brain Atlas [Coronal Atlas]. 2011. <https://mouse.brain-map.org/static/atlas> (accessed Apr 04, 2025).
- 140 Shandra O, Winemiller AR, Heithoff BP, et al. Repetitive Diffuse Mild Traumatic Brain Injury Causes an Atypical Astrocyte Response and Spontaneous Recurrent Seizures. *J Neurosci* 2019; **39**: 1944–63.
- 141 Thrane AS, Rangroo Thrane V, Nedergaard M. Drowning stars: reassessing the role of astrocytes in brain edema. *Trends Neurosci* 2014; **37**: 620–28.
- 142 Papadopoulos MC, Verkman AS. Aquaporin-4 and brain edema. *Pediatr Nephrol* 2007; **22**: 778–84.
- 143 Woodrow RE, Winzeck S, Luppi AI, et al. Acute thalamic connectivity precedes chronic post-concussive symptoms in mild traumatic brain injury. *Brain* 2023; **146**: 3484–99.
- 144 Harris NG, Verley DR, Gutman BA, Thompson PM, Yeh HJ, Brown JA. Disconnection and hyper-connectivity underlie reorganization after TBI: A rodent functional connectomic analysis. *Exp Neurol* 2016; **277**: 124–38.
- 145 Rajkowska G, Hughes J, Stockmeier CA, Javier Miguel-Hidalgo J, Maciag D. Coverage of blood vessels by astrocytic endfeet is reduced in major depressive disorder. *Biol Psychiatry* 2013; **73**: 613–21.
- 146 Moczczynski AJ, Strong W, Xu K, McKee A, Brown A, Strong MJ. Pathologic Thr175 tau phosphorylation in CTE and CTE with ALS. *Neurology* 2018; **90**: e380-e387.
- 147 McCrory P, Feddermann-Demont N, Dvořák J, et al. What is the definition of sports-related concussion: a systematic review. *Br J Sports Med* 2017; **51**: 877–87.

- 148 Patton DA, McIntosh AS, Kleiven S. The Biomechanical Determinants of Concussion: Finite Element Simulations to Investigate Brain Tissue Deformations during Sporting Impacts to the Unprotected Head. *Journal of Applied Biomechanics* 2013; **29**: 721–30.
- 149 Blaschke SJ, Demir S, König A, et al. Substrate Elasticity Exerts Functional Effects on Primary Microglia. *Front Cell Neurosci* 2020; **14**: 590500.
- 150 Verheggen ICM, van Boxtel MPJ, Verhey FRJ, Jansen JFA, Backes WH. Interaction between blood-brain barrier and glymphatic system in solute clearance. *Neurosci Biobehav Rev* 2018; **90**: 26–33.
- 151 Zou K, Deng Q, Zhang H, Huang C. Glymphatic system: a gateway for neuroinflammation. *Neural Regen Res* 2024; **19**: 2661–72.
- 152 Ren Z, Iloff JJ, Yang L, et al. 'Hit & Run' model of closed-skull traumatic brain injury (TBI) reveals complex patterns of post-traumatic AQP4 dysregulation. *J Cereb Blood Flow Metab* 2013; **33**: 834–45.
- 153 Huttner H., et al. Intrakranieller Druck (ICP), 2023, in: Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg.),. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. www.dgn.org/leitlinien (accessed Feb 06, 2025).
- 154 Sinha S, Bastin ME, Wardlaw JM, Armitage PA, Whittle IR. Effects of dexamethasone on peritumoural oedematous brain: a DT-MRI study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004; **75**: 1632–35.
- 155 Romero IA, Radewicz K, Jubin E, et al. Changes in cytoskeletal and tight junctional proteins correlate with decreased permeability induced by dexamethasone in cultured rat brain endothelial cells. *Neurosci Lett* 2003; **344**: 112–16.
- 156 Calabria AR, Weidenfeller C, Jones AR, Vries HE de, Shusta EV. Puromycin-purified rat brain microvascular endothelial cell cultures exhibit improved barrier properties in response to glucocorticoid induction. *J Neurochem* 2006; **97**: 922–33.
- 157 Argaw AT, Asp L, Zhang J, et al. Astrocyte-derived VEGF-A drives blood-brain barrier disruption in CNS inflammatory disease. *J Clin Invest* 2012; **122**: 2454–68.
- 158 Roberts I, Yates D, Sandercock P, et al. Effect of intravenous corticosteroids on death within 14 days in 10008 adults with clinically significant head injury (MRC CRASH trial): randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2004; **364**: 1321–28.

159 Mori H, Cardiff RD. Methods of Immunohistochemistry and Immunofluorescence: Converting Invisible to Visible. In: Humana New York, NY, Hrsg., The Tumor Microenvironment. New York, NY: Springer New York, 2016, S. 1-12.

160 Im K, Mareninov S, Diaz MFP, Yong WH. An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Methods Mol Biol* 2019; **1897**: 299–311.

7. Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Detaillierte Stratifikation der Schweregrade eines Schädel-Hirn-Traumas anhand mehrerer Parameter. Wenn der Patient eines oder mehrere Kriterien einer höheren Klassifikation aufweist, wird die höhere Klassifikation vergeben. Der GCS bezieht sich auf den bestverfügbaren Punktwert innerhalb der ersten 24 Stunden nach dem Trauma. Eigene Abbildung, angelehnt an „Clinical practice guideline for the management and rehabilitation of post-acute mild traumatic brain injury“ (2021) des Department of Veteran Affairs/Defense der USA. ⁹	11
Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung der Klassifikation der mTBI nach den Kriterien des ACRM. ¹⁵ Eigene Abbildung.	13
Abbildung 3: Symptome nach Gehirnerschütterung, aufgeteilt in vier Domänen nach Reddy. Nach einer Gehirnerschütterung, aber auch im Rahmen eines Post-Concussion-Syndroms, ist eine Vielzahl an Symptomen möglich. ^{9,38,39}	17
Abbildung 4: Beobachtbare Zeichen, die auf eine mögliche Gehirnerschütterung hindeuten. ^{17,38,39,50,51}	17
Abbildung 5: Warnzeichen bei Schädel-Hirn-Traumata („Red Flags“). Diese deuten auf eine höhergradige Hirnverletzung oder das Vorliegen einer zervikalen Verletzung hin und erfordern eine schnellstmögliche Abklärung im Krankenhaus. Eigene Abbildung. ^{9,50,51}	19
Abbildung 6: „Return-to-Sports“-Protokoll der CISG laut Stand 2022. Dargestellt sind die einzelnen Schritte bis zur vollständigen Wiedereingliederung in den Sport. Jede Stufe wird graduell durchlaufen, wobei eine Mindestdauer von 24 Stunden pro Stufe vorgesehen ist. Die maximale Herzfrequenz (HF) bezieht sich auf die altersadjustierte maximale Herzfrequenz nach folgender Formel: $HF_{max} = 220 - (\text{Alter in Jahren})$	20
Abbildung 7: Neurometabolische Kaskade nach Gehirnerschütterung. Abbildung modifiziert nach Giza et al., 2014 „The new neurometabolic Cascade of Concussion“ ⁸⁰	25
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Aufbaus der Blut-Hirn-Schranke. Dem Lumen zugewandt befinden sich die Endothelzellen, welche die Gefäße auskleiden und über Tight Junctions (lila) abdichten. Ihnen lagern sich von außen die Perizyten (hellgrün) an, welche in der Basalmembran (gelb) eingebettet sind. Von außen lagern sich die Endfüße der Astrozyten (blau) an, welche über spezielle Transportproteine wie Aquaporin-4 (grün) verfügen. ⁹⁵ Eigene Abbildung.	27
Abbildung 9: Schematischer Aufbau des glymphatischen Systems. Auf der arteriellen Seite des perivaskulären Raumes wird der Übertritt von Liquor über Aquaporin-4 in den astrozytären Endfüßen in das Hirnparenchym ermöglicht. Getrieben durch den Massenfluss,	

sickert der Liquor durch das Gewebe (hellblaue Pfeile), vermischt sich mit dem ISF und nimmt Abfallstoffe mit (schwarze Sterne). Auf der venösen Seite verlässt der ISF das Hirngewebe über Aquaporin-4 in den venösen, perivaskulären Raum. Eigene Abbildung, modifiziert nach Iliff et al., 2012 ¹²⁴	32
Abbildung 10: Versuchsanordnung in Versuchsteil 1. Untersucht wurden Veränderungen der mikrovaskulären Coverages nach einfacher („CBI“) und wiederholter mTBI („lowRepCBI“ und „highRepCBI“) zu zwei Zeitpunkten: für die subakute Phase nach sieben Tagen an N = 18 Tieren, für die chronische Phase nach 82 Tagen an N = 34 Tieren.	37
Abbildung 11: Gruppeneinteilung und Versuchsanordnung zu Versuchsteil 2. Beide Gruppen erhalten über zehn Tage hinweg eine subkutane Gabe von Kochsalzlösung (Kontrollgruppe, blaue Maus und durchsichtige Spritze) oder Dexamethason (Interventionsgruppe, schwarze Maus und orangene Spritze). Beide Gruppen erhalten jeden zweiten Tag eine mTBI (blauer Hammer).	38
Abbildung 12: Gehirn eines Versuchstieres, welches in die Probenhalterung des Kryostaten eingespannt ist. Zu erkennen ist die koronare Schnitfführung und die entstehende Schnittfläche.....	39
Abb. 13: Exemplarisches „Overlay“-Bild einer GFAP-Färbung. Zu sehen sind die hellblauen Focus Points über beiden Hemisphären sowie die Umgrenzung der einzelnen Aufnahmen des Mikroskops in weiß als Gittermuster.	42
Abb. 14: Slide 119/264 des ARAannotation Atlas. Zu erkennen sind die einzelnen ROIs, welche in unterschiedlichen Graustufen abgebildet werden. Die gelbe Markierung kennzeichnet die Region des linken Cornu Ammonis, Sektor I. Dieser hat den Grauwert „382“, zu sehen ganz rechts unter der Kommandozeile als „value“. Anhand dieses Wertes ist diese ROI in der zugehörigen .txt-Datei eindeutig zu identifizieren.	43
Abb. 15: Erstellen der Atlasmasken. A: Aufsuchen des korrespondierenden Schnittes auf dem ARA Annotation Atlas und Setzen von insgesamt 52 Landmarken (gelbe Markierungen). B: Aufsuchen und Setzen der korrespondierenden Landmarken auf dem „Overlay“-Bild des Hirnschnittes in derselben Reihenfolge. C: Generierte Maske des „Overlay“-Bildes, auf welcher sämtliche anatomischen ROIs des Hirnschnittes abgebildet sind.	44
Abb. 16: Thresholding der Mikroskopie-Bilder. A: Graustufenbild des roten Kanals (hier Aquaporin-4-Signal), B: Bild A) nach Thresholding als Schwarz-Weiß-Darstellung C: Graustufenbild des grünen Kanals (Lectin-Signal), D: Bild C) nach Thresholding.....	45
Abbildung 17: Grafische Darstellung der “Regions of interest“ (ROIs): Die Regionen des Kortex (A), Hippocampus (B) und Thalamus (C) sind jeweils rot hervorgehoben.....	46
Abbildung 18: Boxplot der Z-Scores der Aquaporin-4-Coverage des Kortex, Hippocampus und Thalamus. A: Boxplots der zwischen den Hemisphären gemittelten Z-Scores („mean“), B: Z-Scores der jeweils linken und rechten Hemisphäre. Es zeigte sich ein nicht-signifikanter	

Trend einer Zunahme im Thalamus der highRepCBI-Tiere. Die Whisker der Boxen umfassen alle Werte, vom Minimum zum Maximum. Es erfolgte die Beurteilung der Verteilung der Daten mittels Shapiro-Wilk-Test, Histogramm und Q-Q-Diagramm. Die Daten der untersuchten Regionen lagen für alle erhobenen Parameter nicht normalverteilt vor. Es folgte die Anwendung eines Kruskal-Wallis-Tests zur Erhebung von Gruppenunterschieden. Alle Tiere konnten in die Auswertung eingeschlossen werden (n = 18).50

Abbildung 20: Darstellung der Aquaporin-4-Coverage im Thalamus der Versuchstiere im subakuten Zeitraum. Es zeigt sich eine Zunahme der Aquaporin-4-Coverage im highRepCBI-Tier (B) im Vergleich mit Sham (A), Das Aquaporin-4-Signal ist durch weiße Pfeile gekennzeichnet. Gezeigt sind beispielhafte Regionen aus dem Thalamus beider Behandlungskonditionen.50

Abbildung 21: Z-Scores der GFAP-Coverages des Kortex, Hippocampus und Thalamus. A: Bilaterale Z-Scores („mean“), B: Z-Scores der linken und rechten Hemisphäre. Die Whisker der Boxen umfassen alle Werte, vom Minimum zum Maximum. Die z-standardisierten Werte wurden mittels Shapiro-Wilk-Tests, Histogramm und Q-Q-Plot auf Normalverteilung überprüft. Die Daten der GFAP-Coverages lagen für sämtliche ROIs nicht normalverteilt vor. Alle Tiere konnten in die Auswertung eingeschlossen werden (n = 18).51

Abbildung 22: Z-Scores der Aquaporin-4-Polarisation des Kortex, Hippocampus und Thalamus. A: Bilaterale Z-Scores („mean“), B: Z-Scores der linken und rechten Hemisphäre. Im Hippocampus der highRepCBI-Gruppe findet sich ein Trend zu einer Erhöhung der Aquaporin-4-Polarisation. Die Whisker der Boxen umfassen alle Werte, vom Minimum zum Maximum. Die z-standardisierten Werte für die Aquaporin-4-Polarisation lagen für sämtliche Regionen nicht normalverteilt vor. Es folgte die Durchführung eines Kruskal-Wallis-Test. Sämtliche Tiere konnten in die Auswertung eingeschlossen werden (n = 18).52

Abbildung 23: Darstellung der gemessenen IgG-Intensität als Z-Scores, aufgetrennt nach ROI und Hemisphäre. Am deutlichsten zu sehen ist ein Trend zu einer Erhöhung des IgG-Signals mit zunehmender Traumafrequenz im Thalamus der Tiere. Die Whisker des Boxplots umfassen alle Werte, vom Minimum bis zum Maximum. Sämtliche Datensätze lagen nicht normalverteilt vor, es erfolgte die Prüfung auf Korrelation mittels Spearman-Rho-Korrelationskoeffizienten für alle untersuchten Regionen. Es konnten alle Tiere in die Auswertung mit einbezogen werden (n = 18).53

Abbildung 24: Scatter Plots der ipsiläsionalen, rechtshemisphärischen Z-Scores der Aquaporin-4-Coverage und IgG-Intensität im Hippocampus und Thalamus. Sämtliche Daten lagen nicht normalverteilt vor, es erfolgte die Erhebung der Korrelation mittels Spearman-Rangkorrelation der z-standardisierten Wertepaare (n = 18).54

Abbildung 25: Scatter Plots der Z-Scores von GFAP-Coverage und IgG-Intensität im rechten, ipsiläsionalen Hippocampus. Die Regressionsgeraden deuten auf eine negative

Korrelation von niedriger GFAP-Coverage und erhöhtem IgG-Extravasat hin. Sämtliche Daten lagen nicht normalverteilt vor, es erfolgte die Erhebung der Korrelation mittels Spearman-Rangkorrelation der z-standardisierten Wertepaare (n = 18).55

Abbildung 26: Scatter Plots der AQP-Polarisation und IgG-Intensität im bilateralen Thalamus und rechten, ipsiläsionalen Hippocampus. Im Hippocampus deutet sich ein positiver Zusammenhang von steigender Aquaporin-4-Polarisation und IgG-Extravasat an. Im Thalamus stellt sich dieser Trend allenfalls leichtgradig als negativ gerichteter Zusammenhang dar. Sämtliche Parameter lagen nicht normalverteilt vor, es erfolgte die Berechnung des Spearman-Rangkoeffizienten an n = 18 Wertepaaren.56

Abbildung 27: Aquaporin-4-Coverage in der chronischen Phase nach CBI. Darstellung aller Datenpunkte der Z-Scores im Vergleich der Hirnregionen und Behandlungsgruppen. Die Whisker umfassen alle Werte, vom Minimum bis zum Maximum. Im Thalamus der highRepCBI-Gruppe zeigten sich signifikant erhöhte Z-Scores des Aquaporin-4-Coverages. Die vorhandenen Datensätze wurden Z-transformiert und grafisch sowie mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung geprüft. Die Daten lagen nicht normalverteilt vor, es erfolgte die Auswertung mittels des Kruskal-Wallis-Test. Alle Tiere gingen in die Analyse mit ein (N = 34).57

Abbildung 28: Aquaporin-4-Coverage im Thalamus in der chronischen Phase nach CBI. Es zeigt sich eine sichtbare Zunahme des Aquaporin-4-Signals in der highRepCBI-Gruppe (weiße Pfeile). A: Sham, B: CBI, C: lowRepCBI, D: highRepCBI.58

Abbildung 29: GFAP-Coverage in der chronischen Phase nach CBI. Darstellung aller Datenpunkte der Z-Scores im Vergleich der Hirnregionen und Behandlungsgruppen. Im Thalamus war die GFAP-Coverage in der highRepCBI-Gruppe signifikant erhöht im Vergleich zu Sham. Aufgrund von kortikalen Artefakten erfolgte der Ausschluss eines Tieres der lowRepCBI-Gruppe aus der Auswertung der kortikalen Region (n = 33). In den hippocampalen und thalamischen ROIs konnten alle Tiere in die Analyse mit einbezogen werden (n = 34). Sämtliche Parameter lagen nicht normalverteilt vor, es erfolgte die Durchführung eines Kruskal-Wallis-Tests.....59

Abbildung 30: GFAP-Coverage im Thalamus nach chronischer CBI nach Sham-Trauma (A) und highRepCBI (B). Es zeigte sich eine Zunahme des perivaskulären GFAP-Signals (weiße Pfeile).59

Abbildung 31: Aquaporin-4-Polarisation in der chronischen Phase nach CBI über alle untersuchten Hirnregionen. Es zeigen sich keine Unterschiede zwischen den Behandlungskonditionen. Alle Tiere konnten in die Analyse einbezogen werden (n = 34), bei nicht erfüllter Normalverteilung erfolgte die Durchführung eines Kruskal-Wallis-Tests.....60

Abbildung 32: p-Tau-Signal als Surrogatparameter der Neurodegeneration in der chronischen Phase nach CBI. Darstellung der Z-Scores über alle untersuchten Hirnregionen.

Im Thalamus der highRepCBI-Tiere findet sich der deutlichste Trend zu einer Erhöhung. Die Rohwerte der p-Tau-Färbungen wurden für die Auswertung ebenfalls z-transformiert. Es erfolgte die Prüfung auf Normalverteilung der erhobenen Parameter und Durchführung einer Prüfung auf statistische Korrelation mittels Spearman-rho-Korrelationskoeffizienten bei nicht vorliegender Normalverteilung (n = 23).....61

Abbildung 33: Scatterplot der Z-Scores der Aquaporin-4-Coverage und der p-Tau-Intensität des Kortex' mit eingezeichneten Regressionsgeraden. Ersichtlich wird ein geringgradiger Zusammenhang zwischen steigender Aquaporin-4-Coverage und p-Tau-Intensität. Es wurden n = 23 Tiere untersucht, für welche Wertepaare aus den Aquaporin-4- und p-Tau-Färbung vorlagen. Es erfolgte die Prüfung auf statistische Korrelation mittels Spearman-rho-Korrelationskoeffizienten bei nicht vorliegender Normalverteilung.62

Abbildung 34: Scatterplot der Z-Scores der GFAP-Coverages und der p-Tau-Intensität im Hippocampus mit eingezeichneten Regressionsgeraden. Erkenntlich wird ein positiver Trend zwischen ansteigender GFAP-Coverage und zunehmender p-Tau-Intensität. Die Daten lagen nicht normalverteilt vor, es erfolgte die Prüfung auf statistische Korrelation zwischen n = 23 Wertepaaren aus GFAP- und p-Tau-Färbung mittels Spearman-Rho-Koeffizient.63

Abbildung 35: Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse aus Versuchsteil I in tabellarischer Form. Die obere Tabelle (orange) gibt den subakuten Beobachtungszeitraum wieder, die untere Tabelle (blau) den chronischen Beobachtungszeitraum. Wiedergegeben ist stets die Richtung der gesehenen Veränderung in den traumatisierten Behandlungsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Sham).64

Abbildung 36: Aquaporin-4-Coverage behandelter vs. unbehandelter Tiere. Boxplot mit Verteilung der einzelnen Datenpunkte bei n = 4 Tieren pro Kondition. Zu sehen ist ein nicht signifikanter Trend zu einer Erhöhung der Aquaporin-4-Coverages in der Dexamethasongruppe im Vergleich zu Kontrolltieren in Kortex und Hippocampus. Die Daten für die Aquaporin-4-Coverage lagen nicht normalverteilt vor, es erfolgte die Durchführung eines Man-Whitney-U-Tests (n = 8).....65

Abbildung 37: GFAP-Coverage behandelter vs. Unbehandelter Tiere. Verteilung der Z-Scores des beider Konditionen in den untersuchten Regionen. Im Kortex zeigt sich ein Trend zu einer erhöhten GFAP-Coverage, in Hippocampus und Thalamus sind keine wesentlichen Unterschiede ersichtlich. Die Daten für die sämtliche ROIs lagen normalverteilt vor, es erfolgte die Durchführung eines T-Tests (n = 8).66

Abbildung 38: Aquaporin-4-Polarisation. Zu sehen ist ein leichtgradiger Trend zu einer Erniedrigung der Aquaporin-4-Polarisation im Kortex der Dexamethasongruppe. Die Daten lagen im Kortex nicht normalverteilt vor, in Hippocampus und im Thalamus waren die Kriterien einer Normalverteilung hingegen erfüllt.67

Abbildung 39: Zusammenfassung der Ergebnisse der mikrovaskulären Parameter aus Versuchsteil II. Angegeben ist immer der Trend der mit Dexamethason behandelten Tiere.	67
Abbildung 40: Etablierung einer immunhistochemischen Färbung zur Untersuchung von ZO-1. Ergebnisse der Verdünnungsreihe 1:50, 1:100 und 1:200, mit Negativkontrolle im RHOD-Kanal und als binärisierte Bilddatei (schwarzweiß). Dargestellt ist die Zielregion des Hippocampus'. Protokoll adaptiert nach Liraz Zaltsman et al. ¹⁰³	68
Abbildung 41: Beispielhafte Bilder der Verdünnungsreihen 1:100 (A) und 1:200 (B) des zweiten Färbedurchgangs und eine Negativkontrolle. Aufnahme aller Bilder bei einer Belichtungszeit von 120 ms und einer Signalverstärkung von 30. Zu sehen in (A) ist die unspezifische Anfärbung von Zellen (weiße Pfeile) in der Verdünnung 1:100. Auf der rechten Seite ist das Graustufen-Bild des RHOD-Kanals (rot, ZO-1-Färbung) beispielhaft dargestellt.	69

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gruppeneinteilung in Versuchsteil 1	36
Tabelle 2: Gruppeneinteilung Versuchsteil 2.....	38