

Aus dem Bereich Anatomie und Zellbiologie  
Theoretische Medizin und Biowissenschaften  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg / Saar

**Einfluss eines milden Schädel-Hirn-Traumas in juvenilen Ratten auf exploratives  
Verhalten und kognitive Leistung**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2019**

vorgelegt von: Sina Wittenbecher  
geb. am: 10.09.1980 in Recklinghausen

Tag der mündlichen Prüfung: 10.12.2019

Dekan: Prof. Dr. M.D. Menger

Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. K. Faßbender

1.Berichterstatter: Prof. Dr. C. Meier

2.Berichterstatter: Prof. Dr. J. Oertel



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung.....</b>	<b>7</b>
1.1 Zusammenfassung.....	7
1.2 Summary.....	9
<b>2. Einleitung.....</b>	<b>11</b>
2.1 Definition und Epidemiologie des Schädel-Hirn-Traumas.....	11
2.2 Pathomechanismen nach Schädel-Hirn-Trauma.....	12
2.3 Das Schädel-Hirn-Trauma im Tiermodell.....	16
2.3.1 Traumamodelle in der adulten Ratte.....	16
2.3.2 Traumamodell in der juvenilen Ratte.....	19
2.4 Lernen und Gedächtnis.....	19
2.4.1 Sensorisches Gedächtnis.....	22
2.4.2 Kurzzeitgedächtnis.....	22
2.4.3 Arbeitsgedächtnis.....	23
2.4.4 Langzeitgedächtnis.....	24
2.4.5 Hippocampus und limbisches System.....	25
2.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit.....	27
<b>3. Material und Methoden.....</b>	<b>28</b>
3.1 Materialien.....	28
3.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	28
3.1.2 Verbrauchsmaterialien/Lösungen/Chemikalien.....	29
3.1.3 Versuchstiere.....	29
3.2 Methoden.....	30
3.2.1 Operation.....	30
3.2.2 Verhaltensanalysen.....	33
3.2.3 Präparation.....	37
3.2.4 Anfertigung von Kryoschnitten.....	38
3.2.5 Hämatoxylin-Eosin (HE-)-Färbung.....	38

3.2.6 Luxol-Fast-Blue (LFB-)-Färbung (Markscheidenfärbung nach Klüver-Barrera (1953)).....	39
3.2.7 Auswertung .....	40
<b>4. Ergebnisse.....</b>	<b>42</b>
4.1 Makroskopische und mikroskopische Beurteilung .....	42
4.2 Open Field Test.....	43
4.3 Habituation .....	49
4.4 Novelty Object Recognition Test (NOR Test).....	50
4.4.1 Testdurchgang 1 (Tag 1, Stunde 0) .....	51
4.4.2 Testdurchgang 2 (Tag 1, Stunde 1) .....	53
4.4.3 Testdurchgang 3 (Tag 2, Stunde 24) .....	55
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>61</b>
5.1. Wahl der Tierart.....	62
5.2 Weight Drop Modell.....	63
5.3 Open Field Test und Habituation .....	64
5.4 Novelty Object Recognition Test.....	69
5.5 Schlussfolgerungen.....	75
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>77</b>
<b>7. Danksagung.....</b>	<b>88</b>

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Systeme des Gedächtnisses mit Angabe beteiligter Strukturen .....	21
<b>Abbildung 2:</b> Stadien des Gedächtnisses mit Angabe der relativen Speicherkapazität ..	25
<b>Abbildung 3:</b> Darstellung des limbischen Systems (orange gefärbte Strukturen) mit Hippocampus .....	26
<b>Abbildung 4:</b> Darstellung der Platzierung der juvenilen Ratte unter der Plexiglasröhre sowie eine Übersichtszeichnung der geschädigten Hirnareale .....	32
<b>Abbildung 5:</b> Übersichtszeichnung der Versuchsanordnung .....	33
<b>Abbildung 6:</b> Übersicht über die Testarena des Open field tests und der Habituation sowie Darstellung der inneren (Zone 1) und äußeren Zone (Zone 2) .....	35
<b>Abbildung 7</b> Beispielhafte Darstellung der Versuchsanordnung sowie Platzierung der Objekte für Testdurchgang 1 (Tag 1, Stunde 0), Testdurchgang 2 (Tag 1, Stunde 1) und Testdurchgang 3 (Tag 2, Stunde 24).....	37
<b>Abbildung 8:</b> Lichtmikroskopische Darstellung der Hippokampusformation (ca. Bregma - 3,24 mm).....	43
<b>Abbildung 9:</b> Lichtmikroskopische Darstellung der Hippocampusformation (ca. Bregma - 6,9 mm).....	43
<b>Abbildung 10:</b> Durchschnittliche Aufenthaltsdauer und zurückgelegter Weg der Trauma-, Kontroll- und Shamgruppe beim Open Field Test.....	45
<b>Abbildung 11:</b> Aufenthaltsdauer in Zone 1 in der 1. Minute des Open Field Tests .....	46
<b>Abbildung 12:</b> Aufenthaltsdauer in Zone 1 in der 2. Minute des Open Field Tests .....	46
<b>Abbildung 13:</b> Zurückgelegter Weg in Zone 2 in der 1. Minute des Open Field Tests ....	47
<b>Abbildung 14:</b> Durchschnittsgeschwindigkeit in der gesamten Testarena .....	48

<b>Abbildung 15:</b> Durchschnittsgeschwindigkeit in der gesamten Testarena über 5 Minuten des Open Field Tests .....	48
<b>Abbildung 16:</b> Durchschnittsgeschwindigkeit in der 1. Minute des dritten Habituationstages .....	50
<b>Abbildung 17:</b> Beispielhafte Darstellung der Versuchsanordnung sowie Platzierung der Objekte für Testdurchgang 1 (Tag 1, Stunde 0), Testdurchgang 2 (Tag 1, Stunde 1) und Testdurchgang 3 (Tag 2, Stunde 24).....	51
<b>Abbildung 18:</b> Aufenthaltsdauer und zurückgelegter Weg bei Testdurchgang 1 an Tag 1 zur Stunde 0.....	52
<b>Abbildung 19:</b> Zoneneintritte in Zone 3 (Abb. A) und Zone 5 (Abb. B) der Trauma-, Kontroll- und Shamgruppe .....	53
<b>Abbildung 20:</b> Aufenthaltsdauer und zurückgelegter Weg bei Testdurchgang 2 an Tag 1 zur Stunde 1.....	54
<b>Abbildung 21:</b> Aufenthaltsdauer in Zone 3 (altes Objekt) in der 4. Minute des Testdurchgangs 2 an Tag 1 zur Stunde 1.....	55
<b>Abbildung 22:</b> Aufenthaltsdauer und zurückgelegter Weg bei Testdurchgang 3 an Tag 2 zur Stunde 24.....	56
<b>Abbildung 23:</b> Aufenthaltsdauer in Zone 3 in der 4. Minute des Testdurchgangs 3 (Tag 2, Stunde 24) .....	57
<b>Abbildung 24:</b> Zoneneintritte in Zone 3 für die 4. Minute des Testdurchgangs 3 (Tag 2 Stunde 24) .....	58
<b>Abbildung 25:</b> Zoneneintritte in Zone 5 (Abb. A) und Zone 6 (Abb. B) für die 1. – 5. Minute des Testdurchgangs 3 an Tag 2 zur Stunde 24 .....	59
<b>Abbildung 26:</b> Zoneneintritte in Zone 5 (Abb. A) und Zone 6 (Abb. B) in der 1. Minute des 3. Testdurchgangs 3 (Tag 2, Stunde 24).....	59

## Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ADHS	Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitätsstörung
AMPA	Alpha-Amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionsäure
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
bzw.	beziehungsweise
CBF	Cerebraler Blutfluss
CCI	Controlled Cortical Impact
CIDS	CNS-Injury-Induced-Immundepression
cm	Zentimeter
CNS	Central Nervous System
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
g	Gramm
HE	Hämatoxylin-Eosin
HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrindenachse
ICP	Intracranial Pressure (Intrakranieller Druck)
KG	Körpergewicht
Kg	Kilogramm
LFB	Luxol-Fast-Blue
m	Meter
MAD	Mittlerer Arterieller Druck
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
µm	Mikrometer
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
N <sub>2</sub> O	Lachgas
NOR-Test	Novelty Object Recognition Test
O <sub>2</sub>	Sauerstoff

OFT	Open Field Test
o.g.	oben genannt
pH	Potential Hydrogenii
s	Sekunde
SHT	Schädel-Hirn-Trauma
SIRS	Systemisches Inflammatorisches Response-Syndrom
u.a.	unter anderem
v/v	Volume/Volume
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

## 1. Zusammenfassung

### 1.1 Zusammenfassung

**Hintergrund:** Das Schädel-Hirn-Trauma ist die häufigste Ursache für Morbidität und Mortalität bei Kindern und Jugendlichen sowie Erwachsenen unter 40 Jahren in der westlichen Welt. In Deutschland erleiden jährlich circa 332 Menschen pro 100.000 Einwohner ein Schädel-Hirn-Trauma und Betroffene leiden häufig unter den Folgen. Das Schädel-Hirn-Trauma weicht insbesondere im Kindesalter in Bezug auf Verletzungsmechanismen sowie anatomische und pathophysiologische Besonderheiten vom Schädel-Hirn-Trauma des Erwachsenen ab. Bei Kindern ist hauptsächlich ein diffuser axonaler Hirnschaden, vornehmlich im Thalamus, Hippocampus und Cortex, nachweisbar. Kognitive Leistungsminderung mit Konzentrationsstörung, Gedächtnisstörung, Aufmerksamkeitsstörung, aber auch Krampfanfälle und soziale Anpassungsstörungen können die Folge sein. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, ein Tiermodell zu etablieren, welches in juvenilen Ratten ein mildes Schädel-Hirn-Trauma ähnlich dem humanen produziert. Im Anschluss erfolgte die Untersuchung traumabedingter Änderungen in Verhalten und Kognition.

**Methode:** Mittels des Weight Drop Models in Modifikation für juvenile Ratten nach Adelson wurde ein mildes Schädel-Hirn-Trauma bei 21-25 Tage alten Ratten erzeugt. Änderungen in Verhalten und Kognition wurden 7 Tage nach erfolgtem Trauma mittels eines Open Field Tests evaluiert. Anschließend folgte eine Habituationsphase als Vorbereitung auf den Novelty Object Recognition Test. Dieser gliederte sich in drei Testzeitpunkte (1: Stunde 0; 2: Stunde 1 und 3: Stunde 24). Hierbei sollte das Arbeits-, Kurzzeit- und Langzeitgedächtnis der Tiere nach Schädel-Hirn-Trauma im Vergleich zu Kontrollen und Sham-operierten Tieren untersucht werden. Nach Versuchsende wurden die Gehirne der Tiere analysiert.

**Ergebnis:** Das in dieser Arbeit induzierte milde Schädel-Hirn-Trauma resultierte weder makroskopisch noch mikroskopisch in erkennbarer struktureller Schädigung des Gehirns. Die Analyse von Verhalten und Gedächtnis zeigte jedoch deutliche Auswirkungen des Traumas: Die Traumatiere wiesen nach Schädel-Hirn-Trauma im Open Field Test zu Beginn eine signifikant erhöhte Aktivität bzw. ein gesteigertes Explorationsverhalten im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Prinzipiell zeigten die Tiere aller Versuchsgruppen während des Open Field Tests ein aktives exploratives Verhalten. Die anschließende Habituation war bei allen Versuchsgruppen erfolgreich. Während der darauffolgenden Überprüfung des Kurz- bzw. Langzeitgedächtnisses mittels des Novelty Object Recognition

Tests ergaben sich Unterschiede zwischen den Traumatieren und der Sham- sowie Kontrollgruppe. Zunächst reagierten alle Versuchsgruppen mit erhöhter Neugier und Aktivität auf zwei neu eingebrachte Objekte. Zur Überprüfung des Kurzzeitgedächtnisses wurde nach einer Stunde eines der beiden Objekte ausgetauscht. Nun befassten sich die Traumatiere länger mit dem ihnen schon bekannten Objekt als die Sham- und Kontrollgruppen. Das Kurzzeitgedächtnis der Traumatiere ermöglichte nicht die Wahrnehmung des bekannten Objekts als solches. Um das Langzeitgedächtnis zu überprüfen, wurde 24 Stunden später erneut eines der bekannten Objekte gegen ein neues Objekt ausgetauscht. Die Tiere der Traumagruppe befassten sich in der ersten Minute dieses Versuchs signifikant länger mit dem alten Objekt als die Tiere der Shamgruppe. Im weiteren Verlauf glich sich das Verhalten aller Gruppen an. Generell ließ sich in diesem Versuch feststellen, dass die jungen Versuchstiere in allen Phasen ein aktives, neugieriges Verhalten zeigten, da sie sich überwiegend in der Innenzone (Zone 1) aufhielten und nicht primär am Rande der Testarena (Zone 2), was als Zeichen für Angst oder Gewöhnung gewertet werden könnte.

**Diskussion:** In der vorliegenden Arbeit wurde ein Tiermodell zur Induktion eines milden traumatischen Hirnschadens bei juvenilen Ratten etabliert. Im Modell des diffusen axonalen Traumas zeigten sich auch in Abwesenheit schwerer struktureller Schäden deutliche Veränderungen in Verhalten und Gedächtnis: Im Open Field Test konnte eine Verhaltensänderung in Form einer Hyperaktivität gezeigt werden, die klinisch am ehesten mit den Symptomen einer Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitäts-Störung vergleichbar ist. Bei der Überprüfung der Gedächtnisleistung sowohl für Kurz- als auch für Langzeitfunktionen zeigte sich, dass die Traumatiere ein bekanntes Objekt nicht als schon bekannt wahrnahmen und somit hier kognitive Defizite vorlagen. Die Ergebnisse belegen, dass sowohl der Open Field Test Verhaltensänderungen als auch der Novelty Object Recognition Test Beeinträchtigungen des Kurz-, Arbeits- und Langzeitgedächtnisses, nach Erzeugung eines milden Schädel-Hirn-Traumas, detektiert. Dabei scheinen beide Tests so sensitiv zu sein, dass auch Verhaltensänderungen, die nicht mit signifikanter Schädigung der Hirnstrukturen einhergehen, durch diese erkannt werden. Deutlich wird hier, dass bereits ein mildes Schädel-Hirn-Trauma Verhaltensänderungen und kognitive Beeinträchtigungen in juvenilen Ratten hervorrufen kann. Damit wurde in dieser Arbeit ein Modell etabliert, dessen Ergebnisse sich zumindest in Grundzügen in den humanen Bereich übertragen lassen, um darauf aufbauend adäquate Therapieformen, zur Vermeidung von neurologischen Langzeitschäden zu entwickeln.

## 1.2 Summary

**Background and introduction:** Traumatic brain injury is one of the most common causes of morbidity and mortality in children, adolescents and young adults under the age of forty in industrial countries. In Germany, approximately 332 out of 100.000 people sustain a traumatic brain injury per year. Consistent and durable neurological impairment is the main consequence of traumatic brain injury. The reaction of children concerning the mechanism of injury differs from the mechanisms after traumatic brain injury in adolescents and adults. In the cortex, hippocampus and thalamus there is a diffuse axonal injury detectable with anatomical alterations. Inattention, hyperactivity, impulsivity, deficits in executive functions, adjustment disorders and cerebral seizures can be a result of traumatic brain injury. For this reason, our aim was to establish an animal model of trauma for juvenile rats in order to evaluate the trauma associated influence on behavior and cognition.

**Methods:** A mild traumatic brain injury was induced to 21-25 days old male Sprague Dawley rats by the Weight Drop Model in modification for juvenile rats according to Adelson. Seven days after the trauma, alterations in activity, behavior and exploration due to traumatic brain injury were measured by an Open Field Test. After a subsequent habituation phase, a Novelty Object Recognition Test was performed. The test was divided into three phases (1: hour 0; 2: hour 1; 3: hour 24) in order to analyze the working-memory, the short-term memory as well as the long-term memory in relation to a control and sham group.

**Results:** In the Open Field Test an elevated activity and exploration rate has been measured for the trauma group in relation to the control group. In general, all groups showed an inquisitive behavior during the Open Field Test. The following habituation phase was effective in all groups. In the subsequent analysis of the short-term and long-term memory by using the Novelty Object Recognition Test, differences have been detected between all groups. Initially, all groups showed again an increased inquisitive and exploratory behavior respective to the new objects that were placed in the arena. After one hour, one of the known objects has been replaced to evaluate impairments in short-term and working memory due to traumatic brain injury (phase 2). Here the trauma group explored the familiar object more frequently than the sham and control group. The short-term memory of the trauma group was unable to recognize the familiar object as common. After 24 hours, a further familiar object has been replaced by a new one to test the long-term memory (phase 3). In the first minute of this testing phase, the trauma group explored the familiar object significantly longer than the sham group. In the course of the third testing phase, the behavior adapted to each other. Generally, all animals of each group showed an increased inquisitive and active behavior by spending more time in the inner zone (zone 1). They

avoided spending time in the edges of the test arena (zone 2), which might be an indication for anxiety and habituation.

**Discussion:** In this study we established a modified trauma animal model for juvenile rats. The Open Field Test showed modifications in the behavior in terms of hyperactivity, which are similar to symptoms of an attention deficit hyperactivity syndrome. Testing the short-term and long-term memory, we noticed that the trauma group was not able to recognize a known object as common. Thus, the results demonstrate changings in behavior and impairments in memory. Additionally, both tests could show impairments in memory without the presence of significant brain injuries. Obviously, a mild traumatic brain injury results in impairments in behavior and cognition in juvenile rats. In the present study a trauma animal model has been established, which shows similarities to the human mild traumatic brain injury. Our results may be the source of further subsequent studies to evaluate possible therapies to avoid neurological long-term damages.

## 2. Einleitung

### 2.1 Definition und Epidemiologie des Schädel-Hirn-Traumas

Das Schädel-Hirn-Trauma (SHT) ist eine schwerwiegende Verletzung eines der komplexesten Organe des menschlichen Körpers. Es ist die häufigste Ursache für Tod und Erkrankung bei Kindern, Jugendlichen und jungen Erwachsenen unter 40 Jahren in der westlichen Welt und Überlebende leiden häufig unter den Folgen des SHT wie kognitive Defizite, motorische Einschränkungen, Depression und Persönlichkeitsveränderungen (Marklund 2016).

Das SHT ist definiert als „Folge einer Gewalteinwirkung, die zu einer Funktionsstörung und/oder Verletzung des Gehirns führt und mit einer Prellung oder Verletzung der Kopfschwarte, des knöchernen Schädels, der Gefäße und/oder der Dura einhergeht“ (Firsching 2015). Eine Kopfverletzung ohne Störung der Hirnfunktion oder Schädigung des Gehirns bezeichnet man als Kontusion (Firsching 2015). Von einem offenen Schädel-Hirn-Trauma wird gesprochen, wenn die Dura zusammen mit Knochen und Weichteilen verletzt worden ist und eine Verbindung der intrakraniellen Kompartimente zur Umwelt besteht (Firsching 2015).

Zusätzlich können die resultierenden Hirnverletzungen in diffuse sowie fokale Läsionen unterteilt werden. Die mildeste diffuse Form ist eine Gehirnerschütterung. Zu den schwereren diffusen Formen gehören unter anderem axonale Schertraumen; oft einhergehend mit fokale Hirnverletzungen und intrakraniellen Hämorrhagien. Schädelprellungen können als sogenannte Coup- oder Contre-Coup-Herde oder kombiniert auftreten. Coup-Herde sind im Bereich der ursprünglichen Krafteinwirkung lokalisiert, während sich oft mindestens genauso ausgeprägt an der gegenüberliegenden Hirnoberfläche Contre-Coup-Kontusionen nachweisen lassen (Stubbe et al. 2012). Intrakranielle Hämorrhagien sind nach stumpfer oder penetrierender Krafteinwirkung möglich (Stubbe et al. 2012).

In Deutschland erleiden pro Jahr 332 Menschen pro 100.000 Einwohner ein Schädel-Hirn-Trauma. Davon werden 91% als leichtes SHT, 4% als mittleres und 5% als schweres SHT bewertet (Rickels 2006). Die Gesamtkosten für die Behandlung von SHT-Patienten betragen in Deutschland pro Jahr ungefähr 2,8 Milliarden Euro (Rickels 2006). In Deutschland sind pro Jahr 70.000 Patienten jünger als 16 Jahre. Dies entspricht einem Anteil von 28,1% aller jährlich auftretenden SHTs in Deutschland. Circa 90% der Kinder erleiden ein mildes SHT. Vornehmlich sind hierbei Kleinkinder und Säuglinge betroffen. Das

SHT zählt mit zu den häufigsten Gründen für erworbene Beeinträchtigungen in der Kindheit (Brunnberg et al. 2012), wie z.B. motorische und kognitive Defizite, Probleme im Sozialverhalten und Veränderungen der Persönlichkeit (Deppe 2014) und ist bei Kindern unter 15 Jahren die häufigste Todesursache in den Industrieländern. Die Gesamtmortalität bei SHT im Kindesalter liegt bei 4,5% und bei einem schwerem SHT bei 14,5% (Brunnberg et al. 2012).

Während im jugendlichen Alter das SHT in Bezug auf die Ätiologie, die Pathogenese und die Therapie dem SHT im Erwachsenenalter ähnelt, weicht das SHT im Säuglings - und Kleinkindalter durch andere Verletzungsmuster sowie durch anatomische und pathophysiologische Besonderheiten von dem SHT des Erwachsenen ab. Eine möglichst schnelle Beurteilung des Ausmaßes des SHT sowie eine sofortige Therapie sind für das Überleben und die Entstehung neurologischer Schäden bei Kinder entscheidend, da die Zellen des Gehirns die geringste Toleranz aller Zellen des menschlichen Körpers gegenüber Sauerstoffmangel besitzen (Brunnberg et al. 2012). Kognitive Leistungsminderung mit Konzentrations-, Gedächtnis- und Aufmerksamkeitsstörungen, aber auch Krampfanfälle und soziale Anpassungsstörung können die Folge eines kindlichen SHTs sein (Kapapa et al. 2010, Keenan et al. 2006). Aus diesen genannten Gründen ist das Schädel-Hirn-Trauma von hoher medizinischer und gesundheitspolitischer Relevanz.

## **2.2 Pathomechanismen nach Schädel-Hirn-Trauma**

Durch ein erzeugtes Schädel-Hirn-Trauma werden verschiedene Pathomechanismen zum Zeitpunkt der Schädigung ausgelöst, die trotz nachhaltiger Untersuchungen bisher nicht komplett analysiert sind. Ein komplexes Zusammenspiel unterschiedlichster Mechanismen läuft auf zellulärer, funktionaler, molekularer sowie struktureller Ebene ab. Erkennbar wird dies an der unmittelbaren Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke (BHS) mit Ausbildung eines Hirnödems, einer Störung des Stoffwechsels, Durchblutungsstörungen, entzündlichen Veränderungen mit Freisetzung zytotoxischer Mediatoren und freier Radikale, bis hin zu Veränderungen auf genetischer Ebene. Hohlräume und Narben, sowie Verluste des Gewebes entstehen nach Abheilung (Laurer et al. 1999).

Schädel-Hirn-Traumen werden klinisch-pathologisch nach dem führenden morphologischen Verletzungsmuster eingeteilt. Hirnverletzungen können dabei diffuse oder umschriebene Veränderungen nach sich ziehen, inklusive aller Übergänge und Kombinationen (Stubbe et al. 2012).

Epidurale Hämatome bilden sich zwischen der Dura mater und dem Schädelknochen. Dabei handelt es sich meist um Blutungen aus der A. meningea media (Stubbe et al. 2012). Aus oberflächlichen Hirnkontusionen oder gerissenen Brückenvenen entwickeln sich subdurale Hämatome im Spaltraum zwischen Dura mater und Arachnoidea (Wallesch et al. 2017). Subarachnoidalblutungen finden sich zwischen Pia mater und Arachnoidea und resultieren immer aus Zerreißung von Hirnoberflächengefäßen und sind ein Zeichen für strukturelle Hirnverletzungen.

Oberflächliche Kontusionen, genannt Coup, finden sich sowohl am Ort der Krafteinwirkung als auch mindestens genauso häufig mit gleicher Ausprägung an der gegenüberliegenden Seite des Gehirns als Ausdruck einer sogenannten Contre-Coup-Verletzung (Stubbe et al. 2012). Bei einem diffusen axonalen Schertrauma entwickeln sich im Regelfall kleine punktförmige Einblutungen in Strukturen wie Balken, Diencephalon und Hirnstamm (Stubbe et al. 2012). Das Hirnödem ist die Folge von diffizilen pathophysiologischen Abläufen nach einem Trauma, das den Übergang zwischen primärem und sekundärem Hirnschaden darstellt.

Der primäre Hirnschaden entsteht innerhalb kürzester Zeit durch die verschiedensten Kräfte, die auf das Hirnparenchym einwirken: Lineare Beschleunigungskräfte führen eher zu oberflächlichen Läsionen wie Kontusionen oder Blutungen, während Rotationsbewegungen des Gehirns mit der diffusen Schädigung tiefer gelegener Areale der weißen Substanz sowie der Kerngebiete und Bahnen des Mittelhirns und Hirnstamms einhergehen können (Stubbe et al. 2012).

Der sekundäre Hirnschaden entsteht z.B. durch erhöhten Hirndruck, ein Hirnödem oder eine Hypoxie und ist eine Folge des initialen Traumas, d.h. die Läsion des Gehirns ist durch das primäre Trauma noch nicht abgeschlossen.

Das Schädel-Hirn-Trauma wird heutzutage als Vorgang gesehen, bei dem viele Einflüsse eine Rolle für die längerfristige Vorhersage spielen, die erst innerhalb von Tagen nach Entstehung des Traumas von Bedeutung sind. Letztendlich ist die Pathophysiologie des sekundären Hirnschadens für die Prognose des Patienten von entscheidender Bedeutung (Stubbe et al. 2012). Begleitverletzungen, die nicht am Schädel lokalisiert sind und die zu Hypoxämie und Hypotonie führen und somit in Folge zu einer Hypoxie oder cerebralen Durchblutungsstörung führen können, gehören zu den aussagekräftigsten Parametern bezüglich der Prognose nach SHT (Chesnut et al. 1993).

Auch der intrakranielle Druck (ICP, Intracranial Pressure) hat eine hohe Relevanz für die Entstehung von sekundären Hirnschäden. Unter dem erhöhten intrakraniellen Druck wird der supratentorielle Liquordruck in den Seitenventrikeln und im Subarachnoidalraum im Bereich der Großhirnkonvexität verstanden. Der im Liquorraum herrschende Druck

überträgt sich auf das umgebende Hirngewebe. Der ICP beträgt beim Erwachsenen 10-15 mmHg und bei Kindern 0-10 mmHg (Striebel 2014).

Das in der Schädelkalotte befindliche Gesamtvolumen setzt sich zusammen aus 80-85% Gehirns substanz, 5-15% Liquorvolumen und 3-10% intracerebralem Blutvolumen (Striebel 2014). Eine Zunahme einer der drei intrakraniellen Volumenkomponenten führt zur Zunahme des ICP. Diese Volumenzunahme kann in gewissen Grenzen durch die Volumenreduktion einer anderen Komponente kompensiert werden; dieser Mechanismus wird als Monroe-Kellie-Doktrin bezeichnet (Striebel 2014).

Die wichtigsten Ursachen für die Erhöhung des intrakraniellen Drucks sind sowohl das Hirnödem, eine intrakranielle Blutung als auch der Liquorstau. Veränderungen des intracerebralen Blutvolumens können ebenfalls zu einer Zunahme des ICP führen (Stubbe et al. 2012).

Eine Mischung aus vasogenem und zytotoxischem Hirnödem findet man häufig bei dem durch ein Trauma ausgelöstes Hirnödem. Beim zytotoxischen Hirnödem ist die BHS unversehrt, dagegen liegt eine Störung der Zellmembran mit einem Defekt der Adenosintriphosphat-abhängigen  $\text{Na}^{2+}/\text{K}^{+}$ -Pumpe vor, während beim isolierten vasogenen Hirnödem immer eine Schädigung der BHS vorliegt. Über eine Ansammlung von Ionen in den Zellen führt dieser Pathomechanismus zu einer Änderung des osmotischen Gradienten und somit zu einer Zunahme des Wassergehalts in der Zelle (Stubbe et al. 2012). Das vasogene Hirnödem führt zu einer Instabilität der Blut-Hirn-Schranke. Grund hierfür kann sowohl eine Verbreiterung der Tight Junctions und eine endotheliale Schädigung als auch die Auslösung eines unphysiologischen vesikulären Transports sein. Diese Pathomechanismen sind ursächlich für Erhöhung von Blutplasmakomponenten im Gehirn (Klatzo 1985). 24 Stunden nach Trauma ist das Maximum der Ausbildung des Ödems erreicht und bleibt in dieser Form bis zum zweiten Tag nach dem Trauma bestehen. Bereits nach einer Woche ist das Gehirnödem in der Regel wieder bis zu 70 % resorbiert (Kochanek et al. 1995).

Bei 80-90% der Patienten entsteht nach einem Trauma ein ischämischer Sekundärschaden (Graham 1985). Neben dem mittleren arteriellen Blutdruck (MAD) ist auch der cerebrale Blutfluss (CBF) für die Entstehung der Perfusionsstörung entscheidend. Der cerebrale Perfusionsdruck ist direkt abhängig vom mittleren arteriellen Druck und vom intrakraniellen Druck (ICP) (cerebraler Perfusionsdruck = MAD – ICP) (Striebel 2014). Dabei kann sich die Störung in zwei Richtungen entwickeln. Einige Patienten unterliegen einer Reduktion des cerebralen Blutflusses. Dieses Patientenkollektiv hat generell eine schlechtere Prognose, da aus einem erniedrigtem CBF fast immer eine erhöhte Mortalitätsrate, Schwerstbehinderung oder ein vegetativer Zustand resultiert (Obrist et al. 1979). Von einer

irreversiblen Durchblutungsstörung sind Patienten besonders in der Phase unmittelbar nach dem Trauma bedroht (Bouma et al. 1992). Tierexperimentelle Analysen zeigen, dass der cerebrale Blutfluss posttraumatisch für einen Zeitraum von drei Stunden um mehr als 80% auf der Seite der Schädigung abfällt, ein Anstieg ist zwar nach einem Tag erkennbar, jedoch bleibt der cerebrale Blutfluss auf der Kontusionsseite im Bereich der Verletzung erniedrigt (Hendrich et al. 1999). Die verminderte Durchblutung im Bereich der Läsion weitet sich binnen eines kurzen Zeitraums auf weiter distal gelegene Gebiete wie den Thalamus, den Hippocampus oder die Stammganglien aus. Ob auch die kontralaterale Seite betroffen ist, hängt von dem Ausmaß der Schädigung, der Erhöhung des intrakraniellen Blutdrucks und einem ausreichenden cerebralen Perfusionsdruck ab. Um minderperfundierte Areale im Zentrum der Läsion entstehen Areale mit gesteigerter Perfusion. Ursächlich für dieses Phänomen kann zum einen eine entkoppelte Autoregulation der Gefäße sein und zum anderen eine gesteigerte Metabolismusrate (Bryan et al. 1995).

Bei anderen Patientengruppen wurde wiederum eine Hyperperfusion nach einem SHT beobachtet. Hier sind vor allem junge Patienten zu erwähnen, die eher zu einer gesteigerten Perfusion nach Trauma tendieren (Biagas et al. 1996). Die arteriovenöse Sauerstoffdifferenz ist nach einem Trauma vermindert, was bedeutet, dass weniger Sauerstoff vom Gehirn benötigt wird und die Metabolismusrate abfällt. Ein kontinuierlicher cerebraler Blutfluss garantiert eine Hyperperfusion bei sinkendem Sauerstoffbedarf und für drei Tage nach dem Trauma wird eine Phase mit gesteigerter Perfusion beobachtet (Obrist et al. 1984). Dieses Phänomen wird als „luxury perfusions syndrome“ bezeichnet und ist auf eine entkoppelte Autoregulation der cerebralen Gefäße zurückzuführen (Lassen 1966). Anstatt einer Anpassung an den erniedrigten Sauerstoffbedarf, wird eine Weitstellung der Gefäße und damit eine vermehrte Durchblutung des Hirngewebes beobachtet. Selbst bei einem milden Schädel-Hirn-Trauma kommt es zu einer Beeinträchtigung der Autoregulation der cerebralen Gefäße und somit zu einem erhöhten Risiko für einen neuronalen Sekundärschaden (Junger et al. 1997).

Auf zellulärer Ebene kommt es nach einer traumatisch entstandenen Hirnverletzung auch zur Nekrose und Apoptose (Rink et al. 1995). Bei der primären traumatischen Läsion sind vorrangig Nekrosen erkennbar, aber auch Apoptose kommt in einem signifikant erhöhten Maße nach einem SHT vor. Die Relation zwischen Apoptose und Nekrose hängt zum einen von der Größe der Läsion und des Hirnareals ab und zum anderen von sekundären Faktoren (MacManus et al. 1997). Dabei spielt die Neuroinflammation eine wichtige Rolle. Man geht davon aus, dass erregende Aminosäuren wie Glutamat einen Kalziumeinstrom in Neuronen und anderen Gehirnzellen herbeiführen. Die Bildung radikaler Sauerstoffspezies und Stickstoffmonoxid wird vermutlich durch eine Überladung mit

Kalzium ausgelöst, die dann über eine Lipidperoxidation zu Zellschäden, Nekrose und Apoptose führen (Lau et al. 2010).

Neben den oben beschriebenen Mechanismen werden aktuell weitere Mediatoren diskutiert, die im Tierexperiment von Bedeutung bei der sekundären Schädigung von Zellen des Gehirns sind, deren neuropathologische Bedeutung aber bislang noch unklar ist (Stubbe et al. 2012).

Die generelle Immunantwort des Körpers auf ein Trauma ist pro-inflammatorisch und stellt sich als systemische Entzündungsreaktion (Systemic Inflammatory Response Syndrome; SIRS) dar. Auf diese pro-inflammatorische Phase folgt eine anti-inflammatorische Phase, einhergehend mit einer Suppression des Immunsystems (CNS-Injury Induced Immundepression, CIDS). Dies ist möglicherweise die Ursache für die erhöhte Infektanfälligkeit von Patienten nach Schädel-Hirn-Trauma. Man geht davon aus, dass das CIDS multifaktoriell, unter Beteiligung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrindenachse (HPA-Achse), bedingt ist (Meisel et al. 2005). Außerdem scheint auch das autonome Nervensystem relevant für die Entstehung einer Immunsuppression nach SHT zu sein (Stubbe et al. 2012).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die weitere Klärung der Pathomechanismen des SHTs eine hohe Relevanz besitzt, um sowohl heutige Therapien als auch die Spätfolgen gerade bei Kindern und Jugendlichen zu verbessern.

## **2.3 Das Schädel-Hirn-Trauma im Tiermodell**

### **2.3.1 Traumamodelle in der adulten Ratte**

Klinische Studien an Patienten mit Schädel-Hirn-Trauma sind nicht nur in Bezug auf die Ethik eher ungeeignet. Aufgrund von Unterschieden in Alter und Geschlecht der Patienten, der Art des Traumas, Therapiebeginn und -schemata entstehen zahlreiche unterschiedliche Variablen, die eine Standardisierung und Auswertung der Daten kaum möglich machen.

Da jedoch das SHT weiterhin eine der maßgeblichsten Gründe für Mortalität und Morbidität bei Kindern, Jugendlichen und jungen Erwachsenen darstellt (Finnie et al. 2002), ist es notwendig tierexperimentelle Modelle zu etablieren, um weitere Erkenntnisse über die Pathomechanismen des SHTs und deren Folgen zu erlangen, sowie die damit verbundene Etablierung neuer Therapiemöglichkeiten zu ermöglichen.

Im Tierexperiment kann ein reproduzierbares SHT unter kontrollierten Bedingungen induziert werden und Variablen generiert werden, die eine standardisierte Auswertung möglich machen (Finnie et al. 2002). Insbesondere Modelle an der Ratte erwiesen sich als praktikabel, da in verschiedenen Studien nachgewiesen werden konnte, dass das Verhalten von Ratten in bestimmten Bereichen dem des menschlichen Verhaltens ähnelt (Whishaw et al. 1992). Des Weiteren können am Modell der Ratte in kürzeren Zeiträumen ganze Entwicklungsabschnitte beobachtet werden, während dies beim Menschen nur bedingt möglich ist (Whishaw et al. 1992).

Das SHT im Menschen ist dadurch charakterisiert, dass kein einheitliches neuropathologisches Korrelat existiert, sondern sich nach Trauma, je nach Schwere und Ausmaß, viele unterschiedliche Pathologien entwickeln können (Johnson et al. 2015). Insbesondere das milde SHT ist bisher noch nicht ausreichend untersucht, wobei man davon ausgeht, dass es sich hierbei eher um einen homogenen umfassenden diffusen axonalen Hirnschaden handelt (Blumbergs et al. 1994). Aufgrund der schon oben erwähnten Komplexität des humanen SHTs ist es schwierig, dieses in ein einziges Tiermodell abzubilden (Finnie et al. 2002). Daher wurden in den letzten Jahrzehnten viele unterschiedliche Tiermodelle zur Induktion eines traumatischen Hirnschadens entwickelt, in denen jeweils Teilaspekte des Traumas berücksichtigt wurden (Johnson et al. 2015). Allen Traumamodellen gemein war jedoch die Untersuchung sowohl der neurologischen Symptome und die Erforschung der pathologischen Prozesse des Schädel-Hirn-Traumas. An unterschiedlichen Tierspezies, wie Katzen (Sullivan et al. 1976), Affen (Grimmelt et al. 2011) sowie Schweinen (Missios et al. 2009), wurden zur Erzeugung eines diffusen traumatischen Hirnschadens zahlreiche Modelle etabliert (Johnson et al. 2015). Aufgrund von einfacher Durchführbarkeit und aus ökonomischen Gesichtspunkten sind jedoch bisher die meisten Traumamodelle an der Ratte und Maus durchgeführt worden (Johnson et al. 2015). Die Bedeutendsten sind dabei das Weight Drop-Modell (Feeney et al. 1981), das Controlled Cortical Impact Injury-Modell (Dixon et al. 1991), sowie Fluid Percussion- (Dixon et al. 1987) und Impact Acceleration-Modelle.

Wie der Name schon impliziert, werden beim Weight Drop-Modell Gewichte verwendet, die, z.B. durch eine Röhre, auf den Schädel des Tieres fallen, dadurch einen Aufprall erzeugen und entweder direkt auf dem geschlossenen Schädel, auf einer auf dem Cranium fixierten Metallplatte oder durch eine Kraniektomie direkt auf der Dura aufschlagen (Johnson et al. 2015).

Das modifizierte Weight Drop-Modell nach Marmarou ist aktuell das bekannteste Modell in der Forschung zur Erzeugung eines diffusen traumatischen Hirnschadens (Marmarou et al. 1994). Ein variables Gewicht aus Messing wird aus einer frei gewählten Höhe ungebremst

auf den geschlossenen, vorher fixierten Schädelknochen der Ratte fallen gelassen. Der Vorteil dieses Modells liegt in der Reproduzierbarkeit der diffusen Schädigungen und Darstellbarkeit unterschiedlichster Aspekte des Schädel-Hirn-Traumas aus dem Gebiet der Humanmedizin. Hier konnten nach der Erzeugung einer Schädigung sowohl Verhaltensänderungen als auch kognitive und motorische Behinderungen gesehen werden (Shapira et al. 1988, Tang et al. 1997b). Unter anderem kam es zusätzlich zu dem diffusen Trauma auch zu einer fokalen Kontusion und damit verbunden zu einem Untergang von Neuronen hauptsächlich im Kortex, Thalamus und Hippocampus (Smith et al. 1997, Tang et al. 1997a). Insgesamt konnten motorische Defizite, Hypotonie, ein Gewichtsverlust, ein mikroskopisch erkennbares diffuses Ödem sowie neurologische Defizite und eine gesteigerte Sterblichkeitsrate nachgewiesen werden (Adelson et al. 1996). Nachteile dieses Modells sind die fehlende Kontrolle der Fallgeschwindigkeit und die damit zusammenhängende Kontrolle der Größe des erzielten SHTs. Jedoch ist das modifizierte Weight Drop-Modell (Marmarou et al. 1994) eines der am häufigsten verwendeten Modelle zur Induktion eines diffusen traumatischen Hirnschadens.

Auch die anderen oben erwähnten Modelle zur Erzeugung eines traumatischen Hirnschadens verwenden mechanische Kräfte, um eine dynamische Verformung des Hirngewebes zu erreichen. Alle Modelle haben zudem gemein, dass die Kräfte direkt auf das Gehirn oder den Schädel einwirken (Johnson et al. 2015). Beim Fluid Percussion Modell (Dixon et al. 1987) wird über eine schnelle Ausbreitung einer Druckwelle mittels einer Flüssigkeit, die direkt an den geschlossenen Schädel oder an das offene Cranium durch ein Führungsröhrchen weitergeleitet wird, ein traumatischer Hirnschaden erzeugt (Johnson et al. 2015). Hierbei kann das Ausmaß des SHTs durch die Höhe der applizierten Flüssigkeitsmenge variiert werden. Der entstandene Schaden entspricht in diesem Fall eher einem diffusen axonalen Schaden als einem lokalen Schaden (Povlishock et al. 1995). Das Trauma im Controlled Cortical Impact-Modell (CCI) wird ausgelöst durch einen pneumatisch betriebenen Stempel, der nach Kraniotomie direkt auf die Dura wirkt. Durch Geschwindigkeit und Eindringtiefe des Stempels kann die Stärke der Schädigung verändert werden. Hier wird am ehesten ein fokales Trauma produziert (Prins et al. 2003). In anderen Forschungsgruppen wurde das CCI-Modell modifiziert, um einen milden diffusen traumatischen Hirnschaden zu erzeugen. Hier wurde der pneumatisch betriebene Stempel auf den geschlossenen Schädel und nicht auf den eröffneten Schädel aufgesetzt (Creed et al. 2011, Hylin et al. 2013, Mouzon et al. 2012). Aufgrund des weichen und verformbaren Schädels der Ratte ist es jedoch bei allen Traumamodellen schwer vorauszusagen in welchem Ausmaß eine Kompression des Gehirns bei der Erzeugung des Traumas

stattfindet und inwiefern die Kompression eine Rolle bei der Entstehung des Schadens spielt (Johnson et al. 2015).

### **2.3.2 Traumamodell in der juvenilen Ratte**

Traumamodelle zur Induktion eines diffusen traumatischen Hirnschadens bei juvenilen Ratten sind eher selten, denn in den meisten Studien wird eine fokale Hirnschädigung durch das CCI-Modell erzeugt (Adelson et al. 1996). Um eine diffuse Schädigung bei juvenilen Ratten zu erreichen, modifizierte Adelson das Weight-Drop Modell nach Marmarou (Marmarou et al. 1994). Hier wurde bei 17 Tage alten Ratten ein Trauma, ausgelöst durch Aufprall eines Gewichts aus einer definierten Höhe, auf den Schädelknochen erzeugt. Ziel war es, einen moderaten oder schweren traumatischen Hirnschaden bei jungen Ratten zu erzeugen und die daraus resultierenden neurologischen Schäden sowie die Pathophysiologie und Neuropathologie zu untersuchen. Außerdem sollte ein Modell etabliert werden, das die Pathomechanismen nach einem SHT bei Kindern simuliert, da diffuse cerebrale Schäden nach einem SHT bei Kindern häufiger als bei Erwachsenen vorkommen (Adelson et al. 1996). Legt man die Anzahl der Synapsen gemessen an der Enzymaktivität der Glutamat-Decarboxylase und der Cholinacetyltransferase und die elektrische Aktivität des Gehirns zugrunde, entspricht der Entwicklungsstand des Gehirns einer juvenilen Ratte am 12. bzw. 13. Tag postpartum dem eines reifen Neugeborenen (37.-42.Gestationswoche) (Romijn et al. 1991). In dem von Adelson et al. etablierten Traumamodell wurden Ratten, die 17 Tage alt waren eingesetzt, was dem humanen Entwicklungsstand eines Kleinkindes gleichkommt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in dem Model von Adelson nach Induktion eines traumatischen Hirnschadens sowohl Gewichtsverlust, ein Ungleichgewicht der Homöostase als auch akute neurologische Defizite bei den juvenilen Ratten beobachtet werden konnten.

## **2.4 Lernen und Gedächtnis**

Die Fähigkeit aus Erlebtem zu lernen, diese Erfahrungen in der Erinnerung zu speichern und bedarfsweise abzurufen, ist eine der bemerkenswertesten Aufgaben des Gehirns, ohne die viele kognitive Leistungen nicht möglich wären (Pape et al. 2018).

Die biologische Basis der Anpassung eines Individuums sowie dessen Verhaltens an die Umwelt ist Erinnerung, Lernen und Gedächtnis und demzufolge die Aufnahme und

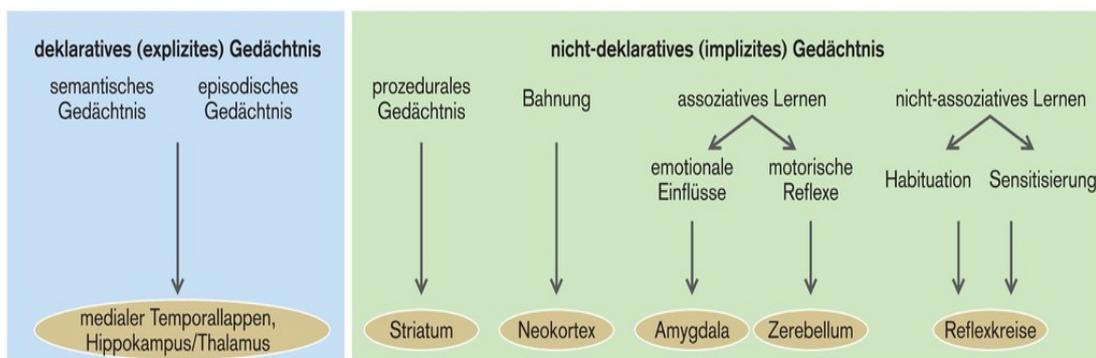
Speicherung sowie Abgabe von Wissen und Informationen durch neuronale Netzwerke. Ohne diese Abläufe könnten weder Erfolge gezielt reproduziert noch Niederlagen geplant verhindert werden und das Fortbestehen eines einzelnen Individuums sowie das seiner Spezies wäre nicht realisierbar (Fuster 1999).

Inhalte des Gedächtnisses werden in neuronalen Netzwerken dargestellt, während im Laufe der Erinnerungsbildung die Daten auf verschiedene Art und Weise und unter Einbindung unterschiedlicher neuronaler Formationen abgespeichert werden (Mesulam 1990). Neuronale Plastizität und Lernen liegen elektrochemischen Vorgängen an den sogenannten Spines (Dornen) der Dendriten zugrunde (Daum et al. 1993). Wichtig für das Lernen und das Gedächtnis ist daher auch die adaptive Veränderung der synaptischen Übertragung zwischen den Neuronen. Dieses Phänomen der Potenzierung der synaptischen Übertragung wird auch Langzeitpotenzierung genannt und wurde erstmals von Bliss und Gardner-Medwin beschrieben (Bliss et al. 1973). Diese langanhaltenden Potenzierungen werden als Grundlage von Lernprozessen betrachtet. Wenn auf eine Synapse eine Folge von Aktionspotentialen einwirkt, so entsteht danach eine gesteigerte Reaktion auf einen singulären Reiz, dies bedeutet es entsteht eine gesteigerte synaptische Antwort (Hebb 1949). Dabei spielen die Rezeptoren vom NMDA- (N-Methyl-D-Aspartat) und AMPA- (alpha-Amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionsäure) Typ bei der Langzeitpotenzierung eine besondere Rolle. Durch deren Aktivierung kommt es unter anderem durch vermehrtes Ausschütten von Glutamat zu Veränderungen an der Prä- und Postsynapse. Bei Beteiligung mehrerer miteinander verbundener Nervenzellen, kommt es dabei zu einer zusätzlichen Steigerung der synaptischen Übermittlung, z.B. durch Aktivierung verschiedener Enzymsysteme (Lisman 2017, Manabe 2017). Durch minimale Anregung können diese Nervenzellen bzw. neuronale Strukturen bereits stimuliert werden. Langzeitpotenzierungen können auch noch nach Monaten oder Wochen nachgewiesen werden (Luscher et al. 2012, Schmidt 2010).

Lern- und Gedächtnisprozesse finden nicht in einem einzelnen Abschnitt des ZNS statt, sondern in Strukturen, die anatomisch voneinander getrennt sind, funktional jedoch zusammengehören und eine große Anzahl von Schaltkreisen der Nervenzellen in unterschiedlichen Arealen mit einbeziehen. Eine hohe Bedeutung besitzt in diesem Fall die Hippocampusformation, zu der der Gyrus dentatus, das Ammonshorn und das Subiculum gehören (McDonald et al. 2017). Die Prozesse des Gedächtnisses und des Lernens sind sehr komplex, so dass unterschiedliche Gedächtnismodelle existieren, die versuchen Aufbau und Funktionsweise sowohl vom Lernen als auch vom Gedächtnis zu erklären.

Qualitativ wird das Gedächtnis in zwei unterschiedliche Kategorien unterteilt, das sogenannte deklarative explizite Gedächtnis und das nicht-deklarative implizite Gedächtnis.

Das deklarative Gedächtnis repräsentiert Faktenwissen, wie z.B. Namen, Zahlen oder Orte und wird in ein semantisches Gedächtnis (Kenntnis von Ausdrücken und Symbolen) und ein episodisches Gedächtnis (Kenntnis von Geschehnissen und persönlich Erlebtem) aufgliedert (Horzyk et al. (2017)). Das nicht-deklarative Gedächtnis beinhaltet Informationen über Eignungen, gewisse Dinge durchzuführen oder zu verknüpfen (z.B. Fahrrad fahren), diese Vorgänge finden häufig unbewusst statt. Das nicht-deklarative Gedächtnis wird in vier unterschiedliche Systeme unterteilt. Das prozedurale Gedächtnis (Lernen von Kompetenzen, Prozessen und Routine), die Bahnung (Beeinflussung der Verarbeitung eines Reizes), das nicht-assoziative Lernen (Habituation, Sensitisierung) und das assoziative Lernen (klassische Konditionierung) (Squire 1992). In Abbildung 1 wird schematisch die Einteilung der qualitativen Kategorien des Gedächtnisses dargestellt.



**Abbildung 1:** Systeme des Gedächtnisses mit Angabe beteiligter Strukturen

Bildquelle: (Pape et al. 2018) Lizenznummer: 4615480507656

Zusätzlich geht man von einer chronologischen Unterteilung des Gedächtnisses in unterschiedliche Speicher aus. Im Anschluss folgt die Beschreibung des Mehrspeichermodells (Atkinson et al. 1968), welches die Gedächtnisforschung immer noch maßgebend prägt.

## 2.4.1 Sensorisches Gedächtnis

Im sensorischen Gedächtnis werden für eine kurze Zeitspanne von wenigen hundert Millisekunden Sinnesreize wie Sehen, Hören, Schmecken und Riechen gespeichert, um hier die wesentlichsten Kriterien zu selektieren und um dabei für das Kurzzeitgedächtnis verschlüsselt zu werden (Ku et al. 2015). Die Speicherkapazität im sensorischen Gedächtnis ist dabei ungleich größer als die des Arbeitsgedächtnisses. Nach Eintritt der Information in das Gedächtnis beginnt jedoch sofort der Verlust der Inhalte. Zudem können die abgespeicherten Inhalte auch bewusst eliminiert, bzw. durch anschließend gespeicherte Inhalte überschrieben werden (Ku et al. 2015). Der Transfer der Inhalte aus dem Kurzzeitgedächtnis in das Langzeitgedächtnis kann durch verbale Kodierung der sensorischen Daten erfolgen oder durch non-verbale Kodierung, die von kleinen Kindern und Tieren genutzt wird. Die non-verbale Kodierung dient auch der Aufnahme von Erinnerungen, die auf sprachlicher Ebene kaum oder gar nicht begreifbar sind. Dabei werden vor allem räumliche Beziehungen als Kontextreize gelernt. Bei dieser Form des Gedächtnisses spielen zentral gesteuerte Prozesse, wie Bewusstsein oder Aufmerksamkeit eher eine untergeordnete Rolle. Einen großen Einfluss können diese jedoch bei der Übertragung von Informationen ins Arbeitsgedächtnis haben (Pape et al. 2018).

## 2.4.2 Kurzzeitgedächtnis

Das Kurzzeitgedächtnis dient der vorübergehenden Aufnahme verbal kodierten Materials und speichert Inhalte über eine Dauer von Sekunden bis Minuten. Das Fassungsvermögen ist um Längen geringfügiger als das des sensorischen Gedächtnisses. Inhalte werden in der chronologischen Abfolge ihrer Ankunft abgespeichert (Jonides et al. 2008). Ohne Übertragung der Gedächtnisinhalte in das dauerhafte Langzeitgedächtnis können Informationen verloren gehen, da nicht mehr als  $7 \pm 2$  Informationen im Kurzzeitgedächtnis gespeichert werden können (Norris 2017, Schmidt 2010). Die Informationen aus dem Kurzzeitgedächtnis werden graduell in ein beständiges Langzeitgedächtnis verbracht (Shallice et al. 1970), wobei ein unbeschränktes Anhalten der Gedächtnisspur, eine Repetition der Information und eine bestimmter Zeitraum erforderlich sind (Konsolidierung). In dieser Theorie sind Kurz- und Langzeitgedächtnis getrennte Speicher (Multi-Speicher-Modell) und sequentiell verschaltet (Atkinson et al. 1968, Waugh et al. 1965). Dieser Theorie zufolge werden gespeicherte Inhalte im Langzeitgedächtnis vorab erst wieder in das Kurzzeitgedächtnis übertragen bevor eine Wiedergabe der

Information stattfinden kann (Atkinson et al. 1968). Andere Untersuchungen gehen davon aus, dass Kurz- und Langzeitgedächtnis simultan verschaltet und auf der Ebene der Rezeptoren miteinander gekoppelt sind, so dass die Inhalte nicht komplett im Kurzzeitgedächtnis gespeichert werden müssen, ehe sie das Langzeitgedächtnis erreichen (Izquierdo et al. 1999, Shallice et al. 1970, Weiskrantz 1990).

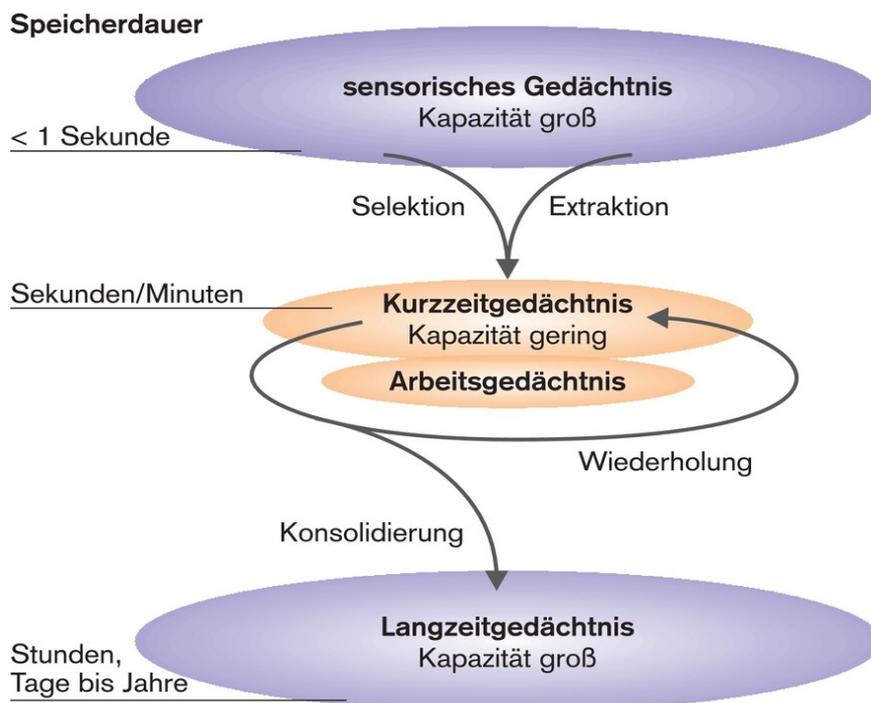
### **2.4.3 Arbeitsgedächtnis**

Zwischen dem Kurzzeit- und Arbeitsgedächtnis existiert keine klare Abgrenzung, da das Arbeitsgedächtnis lediglich eine eingeschränkte Möglichkeit der Speicherung besitzt und Speicherung von Inhalten auch hier nur über eine kurze Zeitspanne von Minuten erfolgt. Die Lokalisation des Arbeitsgedächtnisses befindet sich im präfrontalen Cortex und reagiert sensibel auf Störungen, weist jedoch eine große Adaptivität auf (Olton et al. 1979). Der Ausdruck „Arbeitsgedächtnis“ beschreibt das Vermögen Inhalte über Sekunden bis Minuten im Gedächtnis zu behalten, um sie dort zur weiteren Verarbeitung zur Verfügung zu stellen. Die Gedächtnisinhalte sind allerdings nicht mehr zugänglich, wie in der Konsolidierungsphase (Schmidt 2010). Im neuronalen Bereich stellt sich dar, dass entsprechende Gebiete im präfrontalen Cortex mit höheren Verarbeitungsstrukturen der unterschiedlichen Sinnessysteme miteinander verbunden sind. Im Arbeitsgedächtnis werden Informationen zeitweise abgespeichert und für die erneute Präsentation im sensorischen Gedächtnis zugänglich gehalten (Barak et al. 2014). Das Arbeitsgedächtnis weist deshalb sowohl Verarbeitungs- als auch Speicherfunktion auf (Goldman-Rakic 1996) und setzt sich aus drei unterschiedlichen Bausteinen zusammen. Jedoch wird davon ausgegangen, dass eine zentrale Schaltstelle existiert, die die Bedeutung eines vorangestellten Überwachungssystems hat und mit dem präfrontalen Cortex verknüpft ist. Zusätzlich existieren ergänzend nachrangig zwei Speichersysteme. Dies ist zum einen die phonologische Schleife, die für artikulatorische und akustische Informationen verantwortlich ist und die Wiedergabe und Speicherung von gehörten Aussagen beinhaltet, und zum anderen der viso-spatiale Teil, der visuell-räumliche Informationen bearbeitet (Baddeley 1998). Außerdem können in der phonologischen Schleife Gedächtnisinhalte über einen sehr kurzen Zeitraum von Sekunden abgespeichert werden und durch Wiedergabe und Abruf des Gedächtnisinhalts erneuert werden. Die phonologische Schleife ist im temporoparietalen Areal der linken Gehirnhälfte lokalisiert, während der viso-spatiale Teil dem temporoparietalen Areal der rechten Großhirnhälfte zugeordnet ist (Baddeley 1998).

In Tierstudien ist es lediglich möglich die visuell-räumlichen Gesichtspunkte des Arbeitsgedächtnisses zu analysieren, während in der Humanforschung eher die phonologische Schleife in Untersuchungen befürwortet und analysiert wird.

#### **2.4.4 Langzeitgedächtnis**

Das Langzeitgedächtnis ist eine multimodale, neuronale Funktion, die der langfristigen Speicherung und Verarbeitung von Informationen dient. Bisher gibt es keine genauen Daten zu der Kapazität des Langzeitgedächtnisses und der Verweildauer der gespeicherten Informationen (Schmidt 2010). Man geht allerdings von einer hohen Kapazität aus, da die Informationen über Stunden, Tage, Jahre oder zum Teil lebenslang gespeichert werden können (Pape et al. 2018). Die Begriffe Encodierung (Einprägen) und Speicherung (Behalten) beziehen sich hierbei auf die neuronalen Mechanismen, die die Informationen in einen stabilen Zustand übertragen. Erleichtert wird die Überführung, wenn die einzelnen Informationen zueinander, die sich bereits im Gedächtnis befinden, in Beziehung gesetzt werden können. Hier spricht man von Assoziation (Pape et al. 2018). Der Prozess der Stabilisierung wird auch Konsolidierung genannt, der durch korrespondierendes Zirkulieren der Informationen in den synaptischen Schaltkreisen gefördert wird. Die erneute Darbietung der zu erfassenden Inhalte und der Zugriff auf Gedächtnisinhalte während der Konsolidierungsphase kann die Matrix des Gedächtnisses in einen empfänglichen und empfindlichen Zustand versetzen. Dieser Vorgang wird als Re-Konsolidierung bezeichnet, der molekulare Vorgänge rekapituliert, die bei der Speicherung in den synaptischen Schaltkreisen stattfinden. Dadurch wird eine Überführung in einen labileren Frühzustand bewirkt (Pape et al. 2018).



**Abbildung 2:** Stadien des Gedächtnisses mit Angabe der relativen Speicherkapazität

Bildquelle: (Pape et al. 2018) Lizenznummer: 4615480507656

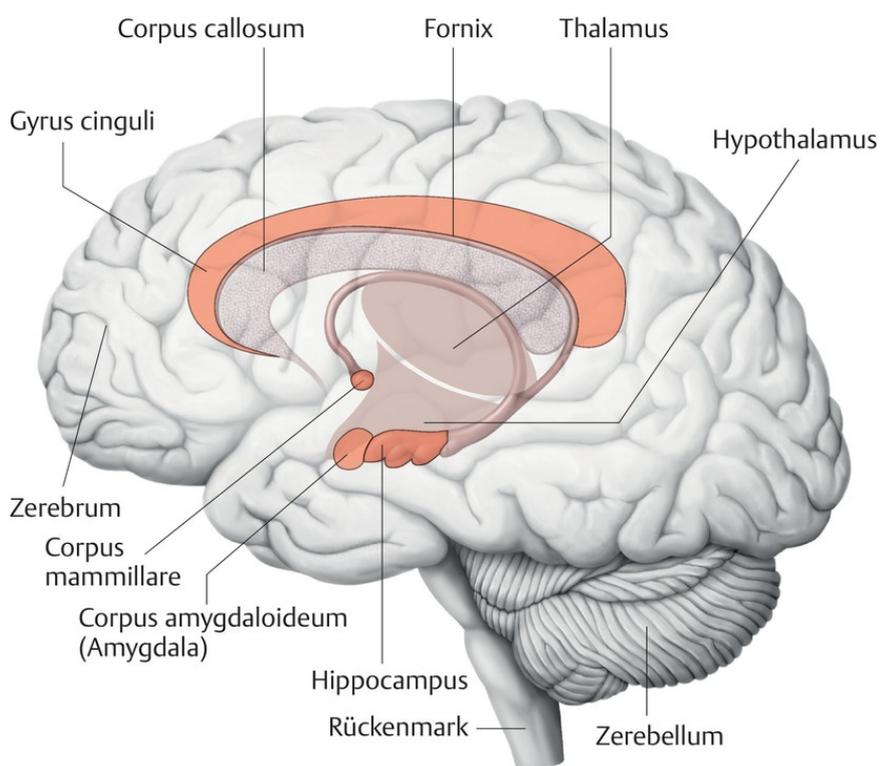
## 2.4.5 Hippocampus und limbisches System

Vegetative Körperfunktionen, emotionale Reaktionen sowie Lernen und Gedächtnis werden vom limbischen System reguliert. Corpus amygdaloideum und Hippocampus gehören zu den bedeutendsten Kontrollzentren des limbischen Systems, sowie ferner der Gyrus parahippocampalis und der Gyrus cinguli. Über die Area entorhinalis und den Tractus perforans werden dem Hippocampus Afferenzen aus allen somatischen Cortexgebieten zugeleitet (Morgane et al. 2005).

Nach Verarbeitung werden vom Hippocampus über Efferenzen Informationen ins Frontalhirn zum Hypothalamus und motorischen System (Striatum) geleitet. Über die Nuclei habenulares kommt es zu einer Verknüpfung mit dem Hirnstamm. Cortex, Hypothalamus, Hirnstamm und Striatum sind mit dem limbischen System verknüpft, das als Kontrollzentrum zur Adaption vegetativer und corticaler Aufgaben an emotionale Faktoren dient (Schiebler et al. 2007). Der Hippocampus ist eine entscheidende Struktur für Lern- und Gedächtnisfunktionen. Die Verarbeitung der Signale, die im Hippocampus eintreffen, dient hauptsächlich dem deklarativen Lernen. Über unterschiedliche Regionen des Cortex werden dem Hippocampus über Afferenzen Signale zugeleitet, die untereinander

assoziative Verknüpfungen herstellen, dies ist der Beginn des Lernens (Knierim 2015). Durch eine vorliegende Verschaltung mit positiver Rückkopplung wird im Hippocampus eine Grundlage für die Langzeitpotenzierung geschaffen, die als Voraussetzung für Lernprozesse angesehen wird. Allerdings wird angenommen, dass die Einprägung der erlernten Informationen in anderen kortikalen Bereichen erfolgt als im Hippocampus, während davon ausgegangen wird, dass sich im Hippocampus lediglich die Gedächtnisspur (Engramm) entwickelt (Aumüller 2014). Durch die enge Verbindung des limbischen Systems mit dem Hippocampus lässt sich erklären, warum Inhalte die affektiv erlebt werden besonders gut behalten und gespeichert werden (Aumüller 2014).

Fällt der Hippocampus aus, durch Trauma oder beispielsweise Tumoren, ist die Verknüpfung von Altem mit Neuem nicht mehr möglich. Jede Erfahrung und jede Impression wird dementsprechend als unbekannt bewertet und lediglich über einen kurzen Zeitraum (Kurzzeitgedächtnis) behalten. So kann gerade Erlebtes nicht mehr gespeichert und ins Langzeitgedächtnis überführt werden (Knierim 2015, Schiebler et al. 2007).



**Abbildung 3:** Darstellung des limbischen Systems (orange gefärbte Strukturen) mit Hippocampus

Bildquelle: (Kessler et al. 2015) Lizenznummer 4615490845880

## 2.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Während das SHT bei Jugendlichen in den Pathomechanismen, der Ätiologie und der Behandlung dem SHT des Erwachsenen gleicht, unterscheiden sich die Auswirkungen eines SHTs im Säuglings- und Kleinkindalter durch abweichende Verletzungsmuster sowie durch physiologisch und anatomisch besondere Merkmale (Brunnberg et al. 2012). In klinischen Studien wurde belegt, dass im Gegensatz zu Erwachsenen, das SHT bei Kindern mit einer diffusen axonalen Schwellung einhergeht (Prins et al. 2003). Daher ist es von essentieller Bedeutung Tiermodelle zu etablieren, die die Pathologie und Pathophysiologie nach einem SHT bei Kindern imitieren können, um im Anschluss adäquate und effektive Therapien in Bezug auf das kindliche SHT begründen zu können.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung eines Traumamodells, in Modifikation nach Adelson, zur Erzeugung eines milden traumatischen Hirnschadens bei juvenilen Ratten. Hierbei soll nachgewiesen werden, dass die in diesem Tiermodell erzeugte diffuse axonale Schädigung messbare und relevante kognitive Beeinträchtigungen hinterlässt. Als Parameter dienen hier Änderungen im Explorationsverhalten, Änderung der Gedächtnisleistung und des Lernverhaltens sowohl im Open Field Test als auch im Novelty Object Recognition Test.

Die Hypothese dieser Arbeit ist, dass nach der Erzeugung eines milden SHTs pathologische Veränderungen in Verhalten und Kognition der juvenilen Ratte detektiert werden können, die sich in Grundzügen auf Verhaltensänderungen nach mildem SHT bei Kindern auf diese übertragen lassen.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

- Anästhesie- Vorrichtung: Narkosegerät mit Fluovac-System,  
Beatmungsmaschine für Kleintiere,  
Vorrichtung zum Absaugen der Narkosegase,  
Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten,  
Deutschland
- AxioScan.Z1, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
- Bildsoftware Zen, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
- Capnograph, Harvard Apparatus Ltd Kent, United Kingdom
- Deckgläser, 34x60mm, Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
- Guillotine
- Homeothermic Blanket System (Wärmekissen), Harvard Apparatus Ltd Kent,  
United Kingdom
- Käfige, PC 3108, Ebeco, Castrop-Rauxel, Deutschland
- Kryostat, CM 3050 S, Leica Microsystems, Nußloch, Deutschland
- Objektträger SuperFrost® Plus, Menzel-Gläser, Menzel-GmbH, Braunschweig,  
Deutschland
- Präparierbesteck (Scheren und Pinzetten)
- Reaktionsgefäße, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
- Skalpell (Standard scalpel handel), Fine Science Tools GmbH, Heidelberg,  
Deutschland
- Tracking software Viewer, Firma Biobserve, Bonn, Deutschland
- Digitale Videokamera, Sony DCR-PC 106, MiniDV-Videokamera, Sony,  
Weybridge, United Kingdom
- Wärmeschrank, WTB Binder GmbH, D-Tuttlingen

### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien/Lösungen/Chemikalien

- Antisedan ad us. vet., Injektionslösung, Provet AG, Lyssach, Schweiz
- Bepanthen A + N Salbe, hauseigene Apotheke
- Domitor ad us. vet., Injektionslösung, Provet AG, Lyssach, Schweiz
- Eosin G (Pulver), Carl-Roth GmbH + Co.KG, D-Karlsruhe
- Essigsäure 100%, VWR™, D-Darmstadt
- Ethanol 99,9%, hauseigenes zentrales Chemikalienlager
- Hämatoxylinlösung sauer nach Ehrlich, Carl-Roth GmbH + Co.KG, D-Karlsruhe
- Handschuhe, Meditrade, D-Kiefersfelden
- Isopropanolol, Fisher Chemical, D-Schwerte
- Lithiumcarbonat, Sigma Aldrich Chemie GmbH, D-Steinheim
- Luxol® Fast Blue, MBSN, Acros Organics, Geel, Belgien
- Roti®-Histokitt, Carl Roth GmbH + Co.KG, D-Karlsruhe
- Skalpellklingen
- steriles chirurgisches Nahtmaterial
- Tissue Freezing Medium, Jung, Leica Microsystems Nußloch GmbH, D-Nußloch
- Xylol Isomerengemisch, hauseigenes zentrales Chemikalienlager

### 3.1.3 Versuchstiere

Bei den eingesetzten Versuchstieren handelte es sich um männliche Sprague-Dawley-Ratten, die von dem Züchter Janvier aus Frankreich bezogen wurden (Centre d'Élevage R. Janvier, LE Genest-St-Isle, Frankreich). Es wurden lediglich männliche Ratten für die Untersuchungen ausgewählt, um unkalkulierbare Faktoren, wie hormonelle Schwankungen im weiblichen Zyklus, nach Möglichkeit zu vermeiden. Die Ratten wurden als kompletter Wurf inklusive Mutter geliefert. Zu diesem Zeitpunkt waren die Jungtiere 17 Tage alt. Die Haltung erfolgte zunächst in den Käfigen zusammen mit der Mutter. Erst am 20. Lebenstag, einen Tag vor der Operation, trennte man die Versuchstiere von ihren Geschwistertieren und der Mutter und setzte sie in Typ IV Standard-Einzelkäfige (54 x 33 x 18,5 cm). Die Tiere wurde in einem Raum mit einem Dunkel-Hell-Zyklus von zwölf Stunden und einer Raumtemperatur von 22,0 +/- 0,5 Grad Celsius gehalten. Die Haltung erfolgte in der zentralen Versuchstierhaltung der Medizinischen Einrichtungen der Ruhr-Universität-

Bochum. Futterpellets und Wasser standen den Tieren ohne Limitierung nach Bedarf zur Verfügung.

Die Ratten wurden randomisiert in die folgenden Versuchsgruppen unterteilt: Kontrollgruppe (n=19), Sham-Gruppe (n=9; scheinoperierte Tiere) und Traumagruppe (n=9; Induktion eines milden Schädelhirntraumas mittels des Weight Drop-Modells (s.u.)). Die Genehmigung der Versuche erfolgte durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV-Recklinghausen) und entsprach den Richtlinien des Deutschen Tierschutzgesetzes vom 09.12.2010.

## **3.2 Methoden**

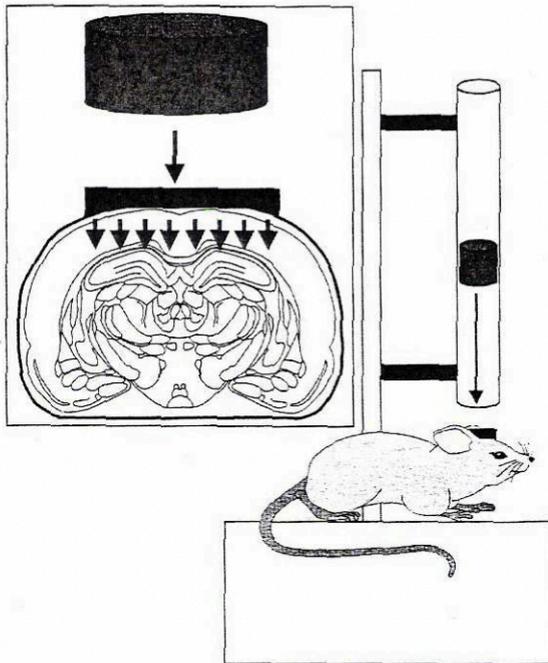
### **3.2.1 Operation**

Die Erzeugung einer diffusen axonalen Schädigung bzw. eines milden traumatischen Hirnschadens bei 21-25 Tage alten juvenilen Ratten wurde nach dem Modell von Marmarou (Foda et al. 1994, Marmarou et al. 1994) in Modifikation für juvenile Tiere nach Adelson (Adelson et al. 1996) durchgeführt.

Zur Einleitung der Narkose und Durchführung der Operation bekamen die Sprague-Dawley-Ratten 0,46 mg pro kg Körpergewicht (KG) Medetomidin (Dormitor) und 65 mg/kg KG Ketanest (Ketamin) intraperitoneal gespritzt. Zur Analgesie kam entweder Metacam (Meloxicam 0,4 ml/kg KG, n=10), Temgesic (Buprenorphin 0,085 mg/kg KG, n=4), Phenylbutazon (1 ml/kg KG, n=3) oder Metamizol (1 ml/kg KG, n=1) zum Einsatz. Diese Analgetika wurden ebenfalls intraperitoneal gespritzt und die Applikation erfolgte einmalig direkt nach der Gabe von Domitor und Ketamin. Anschließend wurden die Tiere endotracheal intubiert und die Narkose wurde mit Isofluran (1,5-2%) als Inhalationsanästhetikum in einem Gemisch aus Distickstoffmonoxid (70%, N<sub>2</sub>O, Lachgas) und Sauerstoff (30%, O<sub>2</sub>) aufrechterhalten. Direkt nach der Intubation wurde die Ratte an eine Beatmungspumpe für Kleintiere (Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland) angeschlossen und der endexpiratorische CO<sub>2</sub>-Wert (Harvard Apparatus Ltd Kent, United Kingdom) gemessen, um eine Beatmung im Normalbereich zu gewährleisten. Der ideale endexpiratorische CO<sub>2</sub>-Gehalt sollte im Bereich zwischen 3,5-4,5 Volumenprozent liegen. Die Regulierung dieses Wertes erfolgte über die Atemfrequenz und das Atemvolumen. Um eine Auskühlung während der Operation zu vermeiden, lagen die Versuchstiere vor und nach der Traumainduktion auf einem Wärmekissen, so dass die Körpertemperatur konstant bei 37 ± 0,5 Grad Celsius gehalten werden konnte. Die

Messung der Körpertemperatur erfolgte mittels einer rektalen Temperatursonde. Während des operativen Eingriffs und der Traumainduktion wurde auf die Erhebung von Vitalparametern, wie eine invasive Blutdruckmessung oder Blutgasanalysen verzichtet, um die Operationsdauer und die damit verbundene Komplikationsrate nicht zu erhöhen. Alle Versuche wurden weitestgehend unter sterilen Bedingungen ausgeführt.

Im Areal der Inzisionsstelle wurde die Kopfhaut rasiert und desinfiziert. Es folgte ein Schnitt mittels eines Skalpells im Bereich der Mittellinie des Kopfes. Die Haut und das Periost wurden mit einem Wattestäbchen beiseitegeschoben. Auf den trockenen Schädelknochen wurde eine runde Stahlplatte (10mm Durchmesser, 3mm Dicke) auf die Schädelwölbung zwischen Sutura coronalis und Sutura lambdoidea platziert und mit Sekundenkleber am Schädelknochen fixiert. Die Metallplatte diente als Schutz vor Frakturen im Bereich des Schädels. Unmittelbar vor Auslösen des Traumas wurde der Tubus diskonnektiert und die Ratte wurde in Bauchlage auf einem Schaumstoffbett platziert und mit zwei Gurten befestigt, um beim Aufprall des Gewichtes eine vertikale Abwärtsbewegung zu ermöglichen. Darüber wurde eine zwei Meter lange Plexiglasröhre, die an einer Metallstange mit einer Klemmbefestigung fixiert war, installiert, und deren unteres Ende direkt auf den Kopf bzw. die Metallplatte ausgerichtet war. In der Röhre befand sich ein Gewicht, dass aus einer vorher gewählten Höhe direkt auf die fixierte Metallplatte fallen gelassen wurde. Das Gewicht wurde am oberen Ende mit einer Schnur versehen, so dass dieses in die gewünschte Höhe verbracht werden konnte, um es von dort dann herunterfallen zu lassen. Um eine geeignete Fallhöhe und ein geeignetes Gewicht zu finden, wurden mehrere Varianten getestet. Zuerst wurden die von Adelson beschriebenen Parameter (100 g Gewicht und 2 m Fallhöhe) übernommen (Adelson et al. 1996). Diese erwiesen sich jedoch nicht als praktikabel, denn aus diesem Versuchsaufbau resultierten Risse am Schädelknochen oder andere letale Verletzungen der Ratten. Daher wurden die Parameter verändert und sukzessive an sechs Tieren untersucht. Dabei wählte man 75 g, 80 g, 85 g und 100g Gewichte und eine Fallhöhe von 1 m. Dabei erwiesen sich ein Gewicht von 80 g und eine Fallhöhe von 1 Meter am praktikabelsten. Unmittelbar nach dem Trauma wurde die Ratte mit dem Schaumstoffbett beiseitegeschoben, um einen zweiten Aufprall des Gewichtes zu verhindern.



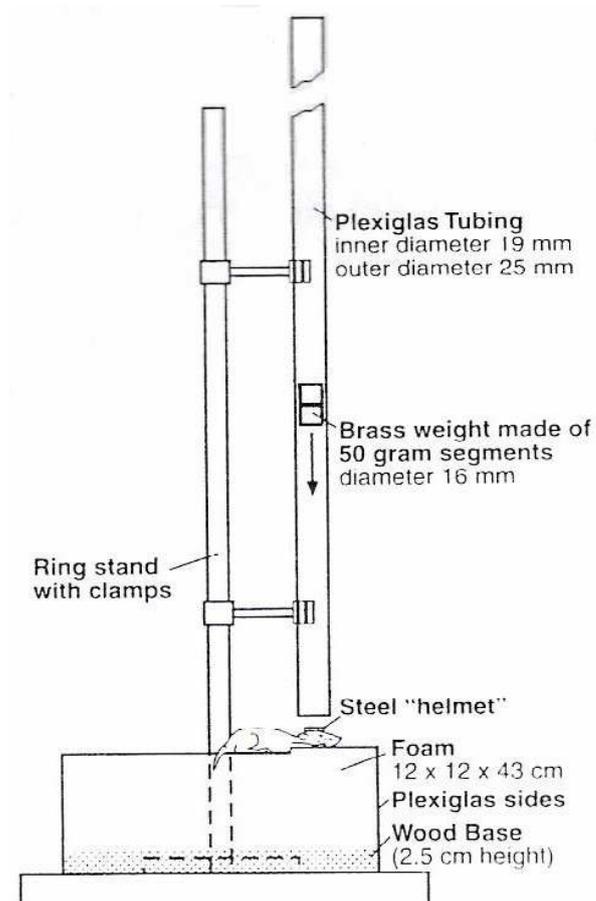
**Abbildung 4:** Darstellung der Platzierung der juvenilen Ratte unter der Plexiglasröhre sowie eine Übersichtszeichnung der geschädigten Hirnareale

Bildquelle (Prins et al. 2003) Lizenz: Journal Mary Ann Liebert, Inc., New Rochelle, NY

Nach Auslösen des Traumas wurde die Ratte wieder zurück auf das Wärmekissen gelegt und der Tubus wurde wieder an das Beatmungsgerät angeschlossen. Die Metallplatte und die Klebereste wurde noch während der Narkose mit 70% Ethanol in Aqua dest. vom Schädelknochen entfernt. Vor Wundverschluss wurde der Schädel auf makroskopisch sichtbare Risse untersucht. Im Falle sichtbarer Verletzungen im Schädelknochen wurde das Tier nicht für weitere Untersuchungen verwendet. Das Periost wurde anschließend über den Schädelknochen gelegt und darüber die Kopfhaut mit einer Einzelknopfnah (0,3 Ethicon Monocryl) verschlossen. Um das vor der Operation verabreichte sedierende Medikament Domitor (Medetomidin) zu antagonisieren, bekamen die Ratten 45 Minuten postoperativ 1,7 mg/kg KG Antisedan (Atipamezol) intraperitoneal gespritzt. Bei Einsetzen der Spontanatmung wurde die Ratte extubiert und in ihren Käfig gelegt. Dort wurde sie bis zum völligen Erwachen beobachtet. Anschließend wurden die Tiere zurück in die Tierhaltungsräume gebracht und bis zum Beginn der Verhaltensversuche täglich visitiert. Die postoperative Analgesie erfolgte mittels Buprenorphin (Temgesic® 0,05 mg/kg KG) über 3 Tage alle 12 Stunden.

Bei den Ratten der Kontrollgruppe wurde keine Operation durchgeführt. Bei den scheinoperierten Kontrolltieren (Sham-Grupp) erfolgte der Versuch in gleicher Vorgehensweise, wie oben beschrieben. Es wurde jedoch kein Trauma durch Fallenlassen eines Gewichtes induziert.

Frau Dr. rer. nat. Astrid Roth-Härer führte unter meiner Mithilfe die oben beschriebenen Versuche zur Erzeugung eines milden SHTs durch.



**Abbildung 5:** Übersichtszeichnung der Versuchsanordnung

Bildquelle: (Marmarou et al. 1994)

Lizenznummer:P10081.AANS.JNS.Marmarou.4699.University of Saarland.Wittenbecher

### 3.2.2 Verhaltensanalysen

Zur Testung der funktionalen Auswirkungen nach einem Schädel-Hirn-Trauma bei Ratten wurden verschiedene Verhaltensparameter analysiert. In dieser Studie wurden exploratives Verhalten (Open Field Test) und kognitive Funktionen (Novelty Object Recognition Test) untersucht.

Zur Auswertung des Open Field Tests (OFT) als auch Novelty Object Recognition Tests (NOR) wurde eine bestimmte Software benötigt, die speziell Ratten detektieren und Parameter wie Wegstrecke, Aufenthaltsdauer in Zonen, Geschwindigkeit und Zoneneintritte

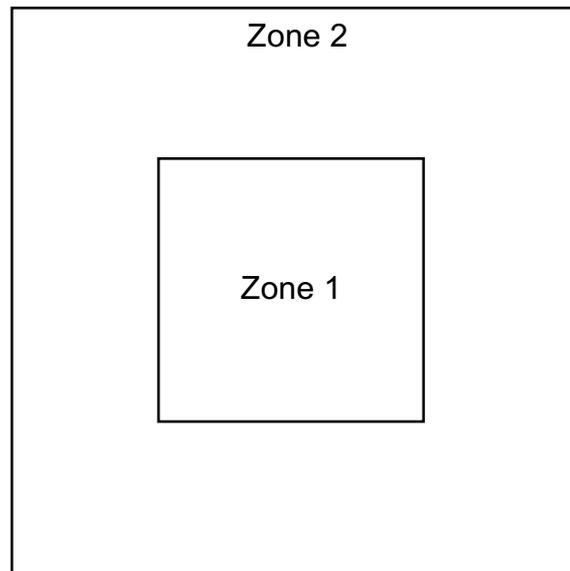
bestimmen konnte. Außerdem mussten die Nase bzw. der Kopf der Ratte vom Programm erkannt werden, sowie die für den NOR-Test benutzten Objekte, damit eine genaue Auswertung gewährleistet werden konnte. Diese Voraussetzungen erfüllte die Software der Firma Biobserve (Bonn). Zum Zubehör gehörten das Programm „Tracking software Viewer“ (Software zur automatischen Objektverfolgung inklusive Echtzeit-Datenanalyse), eine digitale Videokamera (Sony DCR-PC 106; MiniDV-Videokamera mit 10fach optischem Zoom und 120fach digitalem Zoom), Bildstabilisator und NightShot Modus, sowie Computer und Monitor.

### **3.2.2.1 Open Field Test**

Mit dem Open Field Test (OFT) kann das explorative Verhalten und die allgemeine Aktivität von Ratten sowie deren Veränderungen gemessen werden. Dazu wurden die Tiere in eine nach oben hin offene Testarena (1 Meter x 1 Meter) verbracht und dort 5 Minuten mittels einer Videokamera beobachtet. Die zurückgelegte Wegstrecke während des Versuches, die Aufenthaltsdauer in den definierten Zonen, die einzelnen Zoneneintritte und die Durchschnittsgeschwindigkeit wurden dabei als Parameter aufgezeichnet. Als Testarena wurde eine dunkelgraue Testarena mit einem Maß von 1 Meter x 1 Meter verwendet. Die dunkle Farbe für die Testarena wurde aufgrund des weißen Fells der Ratten gewählt, um einen möglichst hohen Kontrast für die Erkennung der Tiere durch das Auswertungsprogramm zu gewährleisten. Die indirekte Beleuchtung wurde außerhalb der Testarena angebracht. Dazu wurden zwei drehbare Tischleuchten mit jeweils 60 Watt benutzt. Die Testarena musste dabei relativ dunkel ausgeleuchtet sein, um ein aversives Verhalten der Ratten durch Helligkeit zu vermeiden. Außerdem durften keine Reflexionen vorhanden sein. Die Aufnahme des Versuches erfolgte mit einer Videokamera, die oberhalb und in der Mitte der Testarena montiert worden war.

Nachdem die Ratten in den Testraum gebracht worden waren, wurde die erste Ratte aus ihrem Heimkäfig genommen und es fand ein Handling auf dem Arm statt, bis diese sich beruhigt und an die Situation gewöhnt hatte. Anschließend wurde sie gewogen und ein weiteres Handling auf dem Arm wurde für kurze Zeit vorgenommen. Hiernach wurde sie in die Mitte der Testarena gesetzt und das Auswertungsprogramm wurde gestartet. Das Tier hatte fünf Minuten Zeit, die Testarena zu explorieren. Im Programm Viewer wurde das gesamte Feld in eine innere zentrale und eine äußere Zone unterteilt, so dass später untersucht werden konnte, ob und wie häufig sich die Ratte in der Mitte der Arena aufhielt. Nach Beendigung des OFT wurde die Ratte aus der Testarena genommen und wieder

zurück in ihren Heimkäfig gesetzt. Anschließend wurde die Arena gesäubert, desinfiziert und mit Zellstoff ausgewischt, um Irritationen des folgenden Testtieres durch vorhandene Gerüche zu verhindern. Mit allen Tieren wurde in gleicher Weise, wie oben beschrieben, verfahren.



**Abbildung 6:** Übersicht über die Testarena des Open Field Tests und der Habituation sowie Darstellung der inneren (Zone 1) und äußeren Zone (Zone 2)

### 3.2.2.2 Novelty Object Recognition Test

Der NOR-Test diente der Überprüfung des Arbeitsgedächtnisses und des Langzeitgedächtnisses. Der genaue Versuchsaufbau wurde im Rahmen des oben dargelegten OFTs bereits beschrieben.

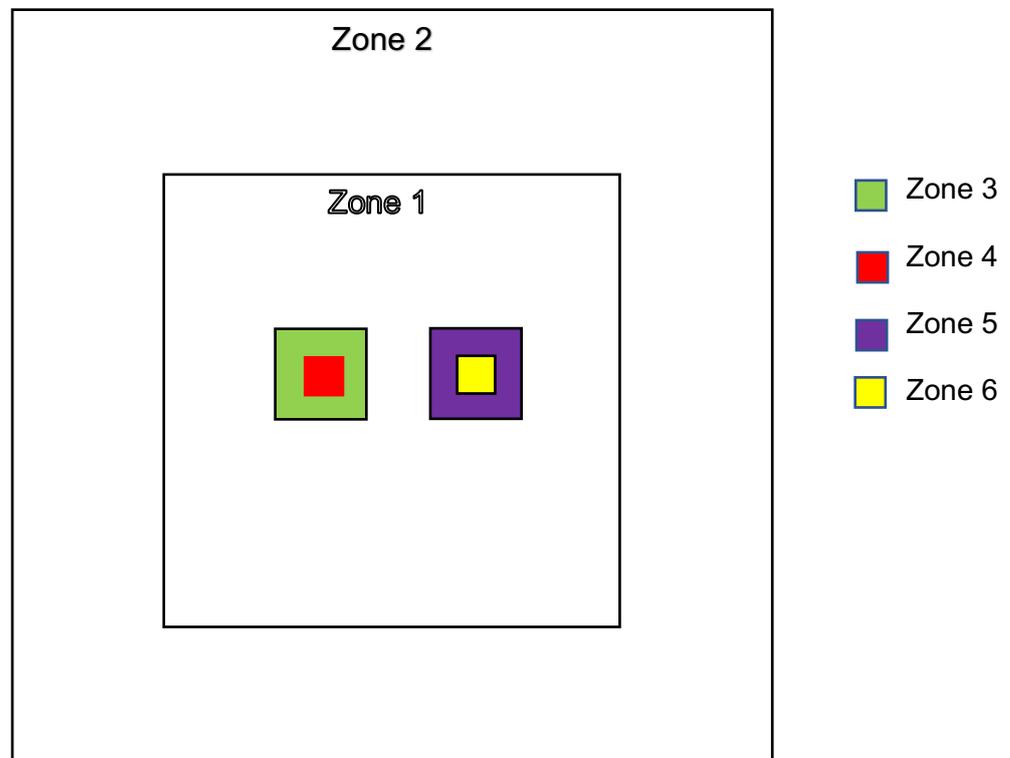
Die Versuchsdurchführung dauerte insgesamt sechs Tage, wobei diese sich in vier Habituationstage und zwei Testtage zur Durchführung des NOR-Tests aufteilten. Die ersten vier Tage dienten der Gewöhnung der Ratte an die Umgebung, die Testsituation und die Testarena. Die Habituation wurde in einem Abstand von 24 Stunden und immer mit dem gleichen Ablauf durchgeführt. So wurden die Ratten z.B. immer in der gleichen Reihenfolge in die Testarena verbracht, um möglichst wenig Irritation der Tiere und damit Verfälschung der Tests zu induzieren. Der Versuchsablauf und -aufbau sowie die gemessenen Parameter entsprachen dabei dem bereits oben beschriebenen OFT. Alle Habituationstage fanden in gleicher Vorgehensweise statt.

An den zwei Testtagen wurde der NOR-Test insgesamt dreimal durchgeführt. Bei diesem Test wurden zwei Stimuli in Form von Objekten in die Testarena gestellt. Diese durften nicht kleiner als die Ratte sein, aber auch nicht mehr als die 2,5fache Größe der Ratte überschreiten. Das Tier hatte für fünf Minuten die Möglichkeit, diese Objekte zu explorieren. Für den ersten Versuchsdurchgang wurden zwei gleiche Objekte (Tassen) in die Testarena gestellt, wobei der Standort vor Testbeginn mit einem wasserfesten Stift auf dem Boden der Testarena markiert wurde, um eine gleiche Position der Objekte während der gesamten Testphase zu gewährleisten. In gleicher Weise wurde auch mit den Objekten für die anderen Versuchsdurchläufe verfahren. Des Weiteren wurden im Programm Viewer für die Objekte eigene Zonen festgelegt, um später auswerten zu können, in welchem Ausmaß sich die Ratten mit den Objekten beschäftigt hatten. Dabei wurde jedes Objekt als eigene Zone markiert. Außerdem wurde eine Zone, die etwa 1 cm Abstand zu allen Seiten des Objektes hatte, eingefügt.

Bevor der Test beginnen konnte, fand ein erneutes Handling der Ratte statt, anschließend wurden sie gewogen und zur Rehabilitation noch mal für 1 Minute in die leere Testarena gesetzt. Die beiden Testobjekte wurden an den markierten Stellen in der Testarena platziert, dazu wurde die Ratte noch mal in ihren Heimkäfig gesetzt. Zum Start des NOR-Tests wurde die Ratte auf der den Objekten gegenüberliegenden Seite der Testarena, mit der Schnauze von den Objekten abgewandt, platziert. Die Aufzeichnung mittels des Programms Viewer wurde unmittelbar gestartet. Nach Versuchsende wurden die Ratten wieder in ihren Käfig zurückgesetzt. Die Testarena sowie die Objekte wurden, wie oben schon für den OFT beschrieben, gereinigt, desinfiziert und mit Zellstoff ausgewischt. Die Objekte waren zudem in mehreren Kopien vorhanden, um die Wahrscheinlichkeit, dass an den Objekten noch Gerüche anderer Ratten existierten, zu vermindern.

Der zweite Versuchsdurchlauf wurde eine Stunde nach dem ersten Test durchgeführt, um das Arbeitsgedächtnis zu überprüfen. Dabei wurde Objekt A (linke Tasse aus Sicht des Versuchsleiters) durch ein neues Objekt A` (Plastikbox) ersetzt, so dass sich nun ein bekanntes Objekt aus dem vorherigen Testdurchlauf (A) und ein unbekanntes Objekt (A`) in der Testarena befanden. Der weitere Versuch wurde in gleicher Vorgehensweise, wie oben schon für den ersten Test beschrieben, durchgeführt.

Der dritte Versuchsdurchlauf begann 24 Stunden nach dem zweiten Versuch, so dass ein geeigneter Zeitabstand zur Überprüfung des Langzeitgedächtnisses gegeben war. Diesmal wurde das bekannte Objekt B, die rechte Tasse, durch ein neues Objekt B`, eine 500ml Desinfektionsflasche, ersetzt. Alle anderen Schritte des Versuchsablaufs wurden wiederum, wie oben schon beim ersten Test beschrieben, durchgeführt.



**Abbildung 7** Beispielhafte Darstellung der Versuchsanordnung sowie Platzierung der Objekte für Testdurchgang 1 (Tag 1, Stunde 0), Testdurchgang 2 (Tag 1, Stunde 1) und Testdurchgang 3 (Tag 2, Stunde 24).

### 3.2.3 Präparation

Unmittelbar im Anschluss an die Verhaltenstests, zwei Wochen nach Induktion des Traumas, erfolgte die Tötung der Versuchstiere mittels Dekapitation. Zunächst wurden die Gehirne entnommen. Nachfolgend fand die Entnahme von Herz, Lunge, Leber, Niere, Milz und Teile des abdominalen Fettgewebes der Versuchstiere statt.

Alle Organe wurden mit Einfriermedium (Tissue Freezing Medium; OCT) überzogen und auf dafür vorbereitete Korkplättchen gelegt und anschließend in  $-80\text{ °C}$  kaltem 8%igen Cyclohexan in Isopentan (v/v) eingefroren. Die Lagerung der Organe erfolgte, bis zur weiteren Verwendung, bei  $-80\text{ °C}$ .

### **3.2.4 Anfertigung von Kryoschnitten**

Zur histologischen Aufarbeitung der Gehirne wurden Kryoschnitte angefertigt. Das in OCT eingefrorene Gewebe wurde in den Objekthalter des Kryostaten eingespannt und ausgerichtet. Anschließend wurden bei einer Temperatur von -80 °C, die Gehirne mit einer Schnittdicke von 30 µm von rostral bis Bregma +2,7 mm angeschnitten. Nach Erreichen dieser Ebene wurde die Schnittdicke auf 12 µm reduziert und jeder zweite Schnitt auf einen Objektträger aufgenommen, bis die Gehirne bis zum Ende aufgeschnitten waren.

Folgend wurden die Objektträger mit den fertigen Schnitten bei 40 °C auf einer Wärmplatte für 30 Minuten getrocknet und danach in Aufbewahrungskisten trocken bei Raumtemperatur aufbewahrt.

### **3.2.5 Hämatoxylin-Eosin (HE-)-Färbung**

Die HE-Färbung dient der Unterscheidung unterschiedlicher Gewebestrukturen im mikroskopischen Bild anhand von zwei Einzelfärbungen.

Im ersten Schritt wird Hämatoxylin verwendet, ein Pflanzenfarbstoff aus dem Blauholzbaum, der alle basophilen Strukturen, wie Zellkerne mit der darin enthaltenen Desoxyribonukleinsäure (DNA), das mit Ribosom angereicherte raue endoplasmatische Retikulum oder Kalk, blau-violett anfärbt. Im zweiten Schritt, der Gegenfärbung, wird Eosin benötigt, ein synthetischer saurer Farbstoff, der alle azidophilen bzw. basischen Strukturen, wie Zellplasmaproteine, Mitochondrien, das glatte endoplasmatische Retikulum, Kollagen und Keratin rot anfärbt (Mulisch et al. 2015).

Zur Fixierung der Schnitte wurden die Objektträger für fünf Minuten in -20 °C kaltes 100%iges Ethanol in eine vorgekühlte Küvette gestellt. Die Schnitte wurden anschließend für 6 Minuten in einer Hämatoxylinlösung nach Ehrlich gefärbt, gefolgt von einer kurzen Spülung in Aqua dest. zur Entfernung aller überschüssigen Farbreste. Unter fließendem Leitungswasser wurden die Schnitte für 10 Minuten „gebläut“, so dass dadurch der pH-Wert angehoben und die tiefblaue Anfärbung der Zellkerne erreicht wurde. Zusätzlich wurden dadurch die eingegangenen Verbindungen sowohl stabilisiert als auch fixiert. Um das „Bläuen“ zu stoppen wurden die Objektträger kurz in Aqua dest. eingetaucht. Nun erfolgte die zweite Färbung, in dem die Objektträger für 30 Sekunden in frisch angesetzter 0,1%iger Eosinlösung (200 ml Aqua dest. und 200 mg Eosin Pulver und 1 Tropfen 100%ige Essigsäure) getaucht wurden mit erneuter anschließender Spülung in Aqua dest. zur

Entfernung überschüssiger Farbreste. Um das Gewebe zu entwässern, wurden nach den Färbeprozessen die Präparate durch eine aufsteigende Alkoholreihe geführt. Zum Schluss fand die Klärung der Schnitte in Xylol, einem organischen Lösungsmittel, statt, um dann im letzten Schritt die Präparate mit Roti-Histokitt einzudecken und unter dem Abzug aushärten zu lassen. Die angefärbten Schnitte wurden bei Raumtemperatur gelagert.

Die HE-angefärbten Präparate dienten zur Analyse der Hirnstruktur auf lichtmikroskopischer Ebene.

### **3.2.6 Luxol-Fast-Blue (LFB-)-Färbung (Markscheidenfärbung nach Klüver-Barrera (1953))**

Die Luxol-Fast-Blue (LFB-)-Färbung ist ebenfalls eine Doppelfärbung und beinhaltet die Färbung von Markscheiden und dem Myelin der Neuronen, sowie eine Zellkernfärbung. Der Farbstoff Luxol-Fast-Blue zeigt eine spezifische Affinität für Neurokeratin und ist ein basisches Kupfer-Phthalocyanin mit einer komplizierten Ringstruktur, ähnlich dem Chlorophyll oder Hämoglobin. Es bindet an den Markscheiden über die Cholinbausteine der Phospholipide. In saurer alkoholischer Lösung verbinden sich die Aminogruppen des Luxol-Fast-Blue mit Ketogruppen und anderen großen Molekülen des Gewebes zu großen Polymerisationsaggregaten, die nur teilweise bis schwer zu lösen sind. Als Differenzierungsmittel wird Lithiumcarbonat verwendet, der gelöste Farbstoff wird mit Ethanol ausgewaschen. Dabei werden die Markscheiden leuchtend blau angefärbt. In der Gegenfärbung mit Hämatoxylinlösung nach Ehrlich werden dann die basophilen Zellkerne dunkelblau gefärbt (Mulisch et al. 2015).

Die Gefrierschnitte wurden zunächst für 10 Minuten in -20 °C kaltem 100%igem Ethanol in einer vorgekühlten Küvette fixiert und im Anschluss für 5 Minuten bei Raumtemperatur in 96%igem Ethanol entwässert. Im nächsten Schritt wurden die Präparate in eine Küvette mit LFB-Lösung gestellt, diese wurden mit Parafilm verschlossen und bei Raumtemperatur für 24 Stunden inkubiert.

Am zweiten Tag wurden die Präparate in Aqua dest. gespült und mit Lithiumcarbonat differenziert, eine weitere Differenzierung fand mit 70%igem Ethanol statt, gestoppt wurde der Vorgang durch Spülung der Schnitte mit Aqua dest. Danach wurde die Differenzierung zwischen grauer und weißer Substanz unter dem Mikroskop kontrolliert. Bei nicht ausreichender Unterscheidung der beiden Substanzen, konnten die Differenzierungsschritte bis zu drei Mal wiederholt werden.

Nachfolgend wurden die Zellkerne mit Hämatoxylin nach Ehrlich gegengefärbt. Dazu wurden die Gefrierschnitte für 2 Minuten in Hämatoxylinlösung nach Ehrlich gefärbt und zur Entfernung der Farbreste kurz in Aqua dest. gespült.

Zur Anhebung des pH-Werts und der damit verbundenen dunkelblauen Anfärbung der Zellkerne wurden die Präparate für 5 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Zur Entwässerung des Gewebes wurden die Objektträger in aufsteigender Ethanolreihe gespült und anschließend in Xylol geklärt. Im letzten Schritt wurden die gefärbten Gefrierschnitte wiederum mit Roti-Histokitt eingedeckt und zum Aushärten über Nacht gelagert. Die Aufbewahrung fand bei Raumtemperatur in Aufbewahrungskisten statt.

Die LFB-gefärbten Schnitten wurden zur Analyse der Hirnstruktur sowie des Myelins auf lichtmikroskopischer Ebene angefertigt.

### **3.2.7 Auswertung**

Die statistische Auswertung der Verhaltensexperimente erfolgte mit Hilfe des Programms SPSS für Mac OS Version 25 auf der Basis der im Programm Viewer (Biobserve, Bonn) ermittelten Einzeldaten. Als Parameter wurden der zurückgelegte Weg während des Versuches, die Aufenthaltsdauer in den einzelnen Zonen, die Durchschnittsgeschwindigkeit und die Häufigkeit der Zoneneintritte in die einzelnen Zonen gemessen. Für jede Versuchstiergruppe (Kontroll-, Trauma-, Shamgruppe) wurde der Mittelwert und Standardfehler ermittelt und die statistische Analyse durchgeführt. Zur Überprüfung der Normalverteilung der ermittelten Werte diente der Kolmogorov-Smirnov-Test. Da die Werte nicht-normalverteilt waren kam der Kruskal-Wallis-Test in Kombination mit dem Mediantest zum Einsatz. Die Tests dienten der Überprüfung der Signifikanz des Unterschiedes von Mittelwertdifferenzen. Für die nicht-normalverteilten Werte überprüften die Tests, ob sich die zentralen Tendenzen unabhängiger Stichproben unterschieden. Dabei zeigten sie auf, ob mindestens ein Unterschied zwischen den Vergleichsgruppen gegeben war.

Zur Überprüfung von statistischen Signifikanzen zwischen einzelnen Minuten innerhalb einer Gruppe wurde der Wilcoxon-Rank-Test als nichtparametrischer Test verwendet. Hier werden anhand zweier gepaarter Stichproben die Gleichheit der zentralen Tendenzen der verbundenen Grundgesamtheit überprüft.

Bei einem Wert von  $p < 0,05$  wurde eine statistische Signifikanz angenommen. Werte von  $p < 0,05$  wurden in den Diagrammen als \* angegeben. Die Abbildungen wurden mittels des Programms Graph Pad Prism angefertigt. Die dargestellten Box Plots zeigen alle Werte vom Minimum bis zum Maximum. Die weißen Box Plots stellten die Kontrollgruppe, die

hellgrauen die Shamgruppe und die dunkelgrauen Box Plots repräsentierten die Traumagruppe. Hierbei wurden nicht alle Signifikanzen in die Graphen integriert, um eine Übersichtlichkeit der dargestellten Daten zu gewährleisten. Im Text werden jedoch die Signifikanzen erläutert.

## 4. Ergebnisse

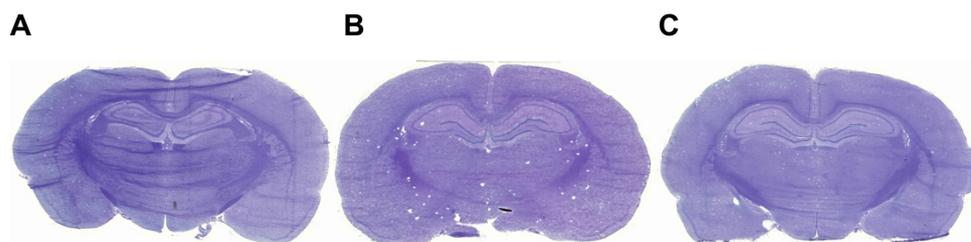
### 4.1 Makroskopische und mikroskopische Beurteilung

Nach Erzeugung eines milden traumatischen Hirnschadens mittels des Weight Drop Models in Modifikation nach Adelson und Durchführung der oben beschriebenen Verhaltensversuche zur Detektierung von Beeinträchtigungen in Verhalten und Kognition, wurden zunächst die knöchernen Anteile des Rattenschädels auf Haarrisse oder weitere Verletzungen untersucht, um sicherzugehen, dass lediglich ein isoliertes Schädel-Hirn-Trauma ohne Begleitverletzungen erzeugt wurde. Bei keiner der drei Gruppen, insbesondere bei der Traumagruppe, konnte eine makroskopische Schädigung der Hirnsubstanz gesehen werden.

Nach Entnahme und Aufarbeitung der Gehirne sowie Anfertigung und Färbung der Schnitte mittels HE- und LFB-Färbung wurden diese im Mikroskop beurteilt, um nach Läsionen auf lichtmikroskopischer Ebene zu schauen. Auch hier konnten in allen drei Gruppen keine Veränderungen gesehen werden, was in Abbildung 8 noch mal für alle Gruppen mittels HE-Färbung gezeigt wird. In Abbildung 9 wird eine andere Schnittebene eines Gehirns aus der Traumagruppe mittels HE- und LFB-Färbung dargestellt.

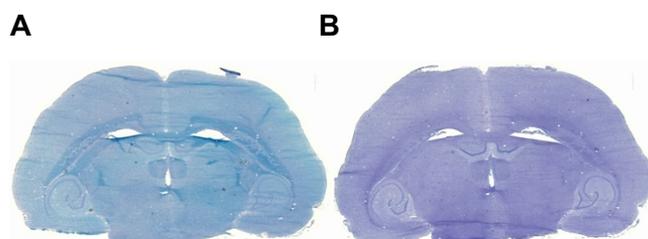
In einer anderen Arbeit wurden bei den gleichen Versuchstieren immunhistochemische Methoden zur Detektierung eines SHT verwendet. Dort konnte sowohl in der cranialen bzw. caudalen Hirnoberfläche, als auch im Thalamus und im Hippocampus bei den Traumatieren vermehrt Apoptose und Inflammation nachgewiesen werden (Geers 2013)

Aufgrund dieser Ergebnisse konnte davon ausgegangen werden, dass bei der Traumagruppe ein mildes SHT erzeugt wurde, ohne jedoch einen makroskopisch oder lichtmikroskopisch sichtbaren Schaden hinterlassen zu haben. Daher waren die Verhaltensänderungen, die sich in den Verhaltenstests in der Traumagruppe darstellten, am ehesten auf einen milden traumatischen Hirnschaden zurückzuführen.



**Abbildung 8:** Lichtmikroskopische Darstellung der Hippocampusformation (ca. Bregma - 3,24 mm)

Darstellung der Hippocampusformation circa Bregma -3,24 mm mittels der HE-Färbung bei jeweils einem Tier aus der Kontroll- (Abb. A), Sham- (Abb. B) und Traumagruppe (Abb. C).



**Abbildung 9:** Lichtmikroskopische Darstellung der Hippocampusformation (ca. Bregma - 6,9 mm)

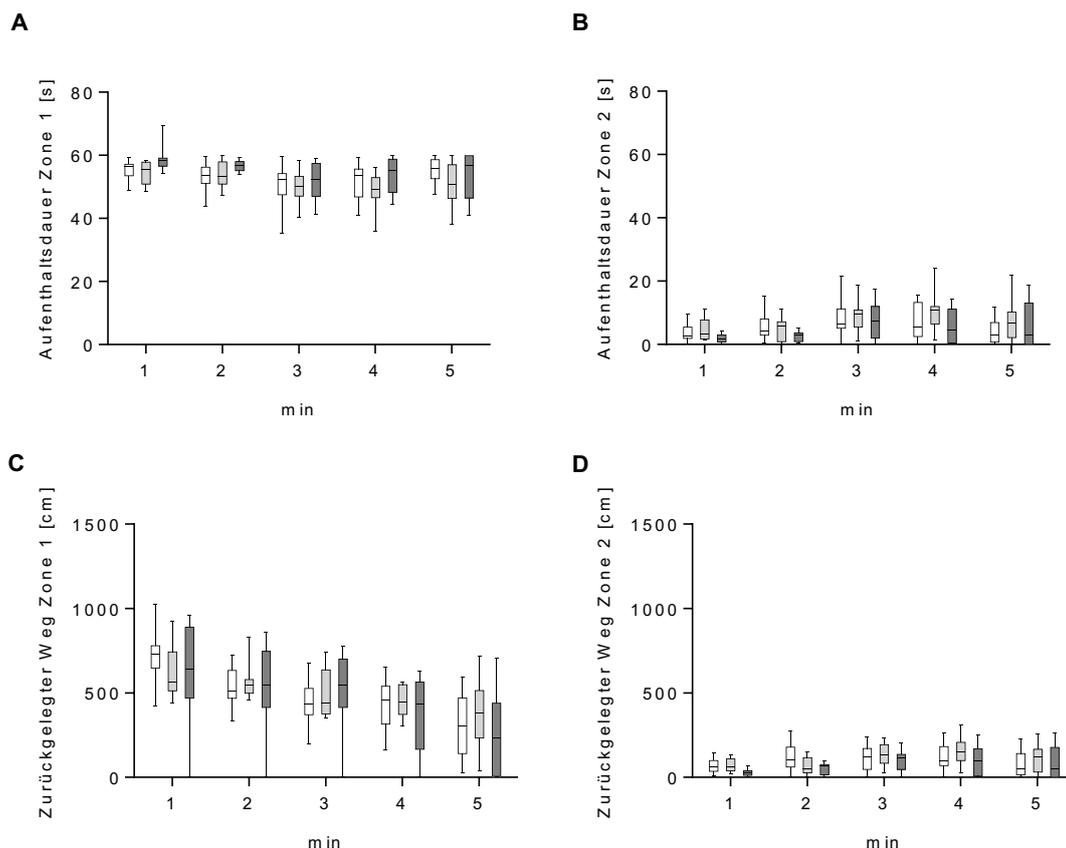
Darstellung der Hippocampusformation bei circa Bregma – 6,9 mm mittels der LFB-Färbung (Abb. A) und der HE – Färbung (Abb. B) bei einem Tier aus der Traumagruppe.

## 4.2 Open Field Test

Um Verhaltensänderungen nach SHT zu untersuchen, wurden die juvenilen Ratten sieben Tage nach Trauma zwei Verhaltenstests unterzogen. Am ersten Tag fand der Open Field Test statt, an dem das Explorationsverhalten und die allgemeine Aktivität der Ratten beobachtet wurde. In allen drei Gruppen (Kontrolle, Sham, Trauma) wurde die Bewegung eines jeden Tieres über fünf Minuten mit der Videokamera aufgezeichnet und folgende Parameter mit dem Computerprogramm gemessen: Durchschnittsgeschwindigkeit über fünf Minuten in Sekunden, zurückgelegter Weg in Zentimeter, Aufenthaltsdauer in den einzelnen Zonen in Sekunden, Zoneneintritte in die vorher definierten Zonen und die Geschwindigkeit der Ratten in den einzelnen Zonen in Sekunden. Zusätzlich wurde die

Testarena in eine innere Zone (Zone 1) und eine äußere Zone (Zone 2) unterteilt. Erhöht gemessene Werte, wie eine längere Aufenthaltsdauer oder eine längere Wegstrecke in der inneren Zone (Zone 1) sprachen eher für ein hohes Maß an Aktivität und Erkundungsverhalten und bei erhöht gemessenen Werten in der äußeren Zone (Zone 2) konnte entweder von einer beginnenden Gewöhnung (Habituation) oder von einem ängstlichen Verhalten ausgegangen werden.

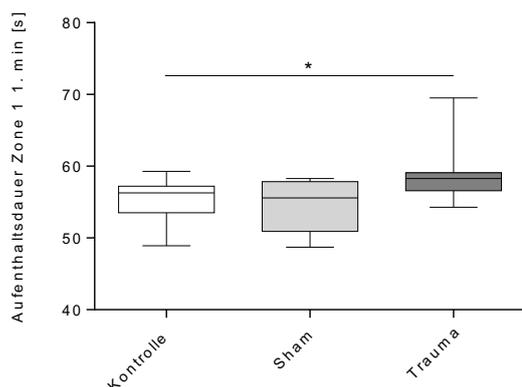
Während des Open Field Tests wurde ersichtlich, wie in Abbildung 10 verdeutlicht, dass die Tiere aller Gruppen eine längere Aufenthaltsdauer in der inneren Zone (Zone 1) als in der äußeren Zone (Zone 2) hatten (siehe Abb. 10A und Abb. 10B) und somit ein hohes Maß an Aktivität zeigten. Hierbei hatten die Traumatiere eine signifikant längere Aufenthaltsdauer in der inneren Zone 1 ( $p=0,008$ ) als in der äußeren Zone 2, genauso wie die Tiere aus der Sham- ( $p=0,008$ ) und Kontrollgruppe ( $p=0,008$ ). Auch legten die Tiere in der inneren Zone (Zone 1) deutlich mehr Wegstrecke, mit einer Signifikanz von  $p=0,008$  für die Traumatiere,  $p=0,0008$  für die Shamgruppe und  $p<0,001$  für die Kontrollgruppe, als in der äußeren Zone (Zone 2) zurück, was ebenfalls ein Anhalt für vermehrtes exploratives Verhalten darstellt. Dies wird Abbildung 10C und 10D dargestellt.



**Abbildung 10:** Durchschnittliche Aufenthaltsdauer und zurückgelegter Weg der Trauma-, Kontroll- und Shamgruppe beim Open Field Test

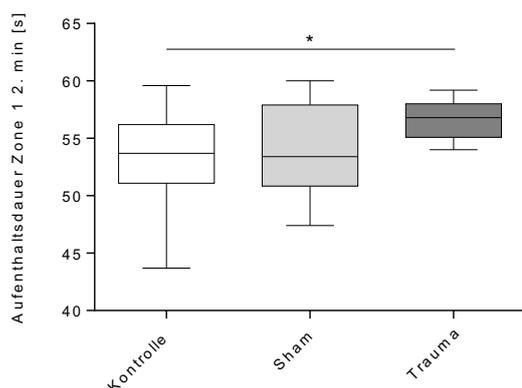
Dargestellt sind die jeweilige Aufenthaltsdauer für Minute 1 bis 5 aller Gruppen in Zone 1 (Abb. A) und Zone 2 (Abb. B) sowie der jeweils zurückgelegte Weg für alle Gruppen für Minute 1 bis 5 in Zone 1 (Abb. C) und Zone 2 (Abb. D). Die Messwerte wurden als Box Plots aufgetragen: Kontrolle = weiß, Sham = hellgrau, Trauma = dunkelgrau. Signifikanzen wurden nicht dargestellt, sind jedoch im Text erläutert.

Nach separater Auswertung jeder einzelnen Minute stellte sich dar, dass sich die Traumatiere mit einer Signifikanz von  $p=0,026$  im Vergleich zu den Tieren aus der Kontrollgruppe in der ersten Minute länger in Zone 1 aufhielten als in Zone 2. Auch in der zweiten Minute des OFTs verblieben die Traumatiere mit einer Signifikanz von  $p=0,044$  im Vergleich zu den Kontrolltieren länger in der inneren Zone 1 als in der äußeren Zone 2. Die Shamgruppe zeigte weder zur Kontroll- noch zur Traumagruppe signifikante Unterschiede (siehe Abb. 11 und Abb. 12).



**Abbildung 11:** Aufenthaltsdauer in Zone 1 in der 1. Minute des Open Field Tests

Dargestellt ist der Median der Aufenthaltsdauer der einzelnen Gruppen in Zone 1 in der ersten Minute des Open Field Test als Box Plot. Zwischen der Kontroll- und Shamgruppe gab es keine Unterschiede. Die Traumagruppe hielt sich signifikant länger in Zone 1 auf als die Kontrollgruppe, \*  $p < 0,05$  versus Kontrolle.

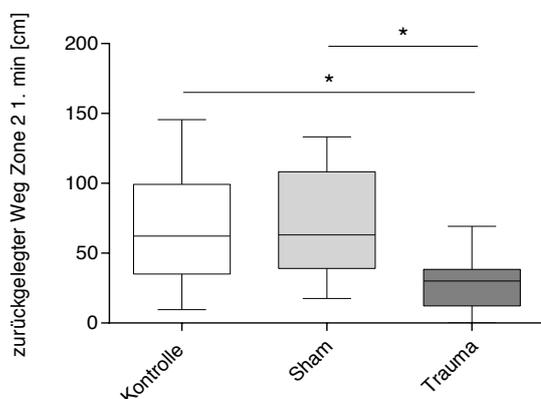


**Abbildung 12:** Aufenthaltsdauer in Zone 1 in der 2. Minute des Open Field Tests

Dargestellt ist der Median der Aufenthaltsdauer der einzelnen Gruppen in Zone 1 in der zweiten Minute des Open Field Test als Box Plot. Zwischen der Kontroll- und Shamgruppe gab es keine Unterschiede. Die Traumagruppe hielt sich signifikant länger in Zone 1 auf als die Kontrollgruppe, \*  $p < 0,05$  versus Kontrolle.

Reziprok dazu wird in Abbildung 13 deutlich, dass die Wegstrecke der Traumagruppe in der äußeren Zone (Zone 2) in der ersten Minute wesentlich geringer war, als die der Vergleichsgruppen und sich somit die traumatisierten Tiere signifikant länger im zentralen Bereich der Testarena aufhielten. Die Signifikanz zwischen der Trauma- und Kontrollgruppe lag hier bei  $p = 0,046$  und die Signifikanz zwischen der Sham- und Traumagruppe bei  $p = 0,047$ . Diese Unterschiede scheinen durch das milde SHT bedingt zu sein. Die

Traumatiere schienen durch den erzeugten Schaden eine erhöhte Aktivität bzw. ein gesteigertes Explorationsverhalten zu zeigen.

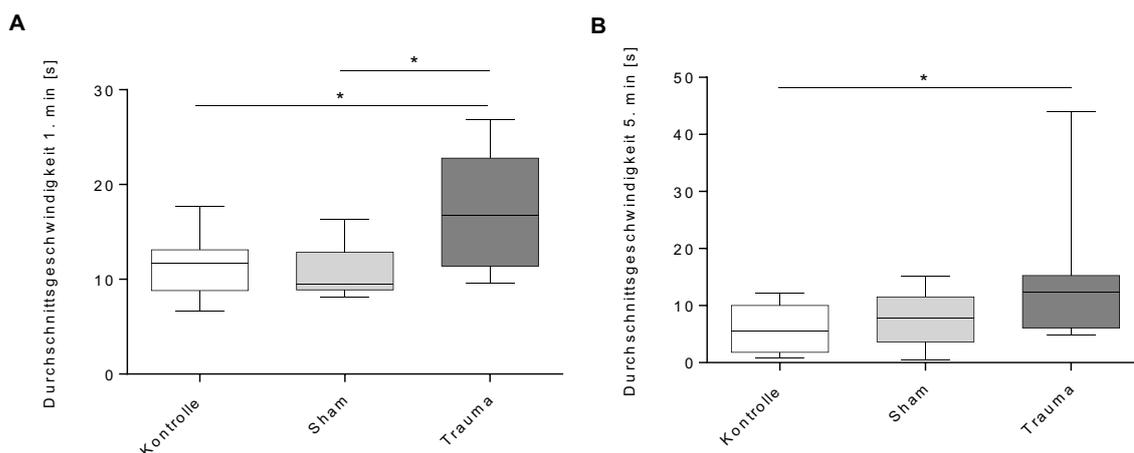


**Abbildung 13:** Zurückgelegter Weg in Zone 2 in der 1. Minute des Open Field Tests

Dargestellt ist der Median des zurückgelegten Wegs der einzelnen Gruppen in Zone 2 in der ersten Minute des Open Field Test als Box Plot. Die Traumagruppe legte signifikant weniger Wegstrecke in Zone 2 zurück als die Kontroll- und Shamgruppe, \*  $p < 0,05$  versus Kontrolle und Sham.

Für die gemessene Durchschnittsgeschwindigkeit konnte gesehen werden, dass die Traumatiere signifikant schneller waren, als die Tiere aus der Kontroll- und Shamgruppe, was wiederum für die oben genannte Hypothese spricht (siehe Abbildung 14).

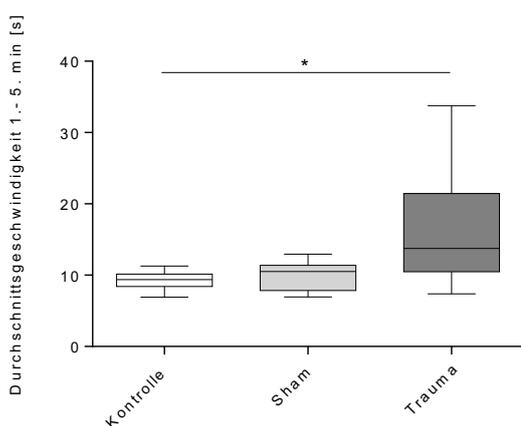
Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren teilweise signifikant. In der ersten Minute waren die Traumatiere, mit einer Signifikanz von  $p = 0,029$ , schneller als die Kontrolltiere und die Signifikanz zwischen der Trauma- und Shamgruppe lag hier bei  $p = 0,037$ . In der fünften Minute bewegten sich die Traumatiere weiterhin schneller als die Vergleichsgruppen, jedoch lag hier nur noch ein signifikanter Unterschied zwischen der Trauma- und Kontrollgruppe vor ( $p = 0,033$ ). Insgesamt bewegten sich die Tiere in der ersten Minute, gemessen an der Durchschnittsgeschwindigkeit, noch deutlich schneller als in der fünften Minute des OFTs. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Aktivitätsniveau aller Gruppen über 5 Minuten abnahm, was auf eine beginnende Gewöhnung hinwies.



**Abbildung 14:** Durchschnittsgeschwindigkeit in der gesamten Testarena

Dargestellt ist der Median der Durchschnittsgeschwindigkeit der einzelnen Gruppen für die gesamte Testarena für die erste Minute (Abb. A) und die fünfte Minute (Abb. B) des Open Field Test als Box Plot. Die Traumagruppe war in der ersten Minute signifikant schneller als die Kontroll- und Shamgruppe,  $p < 0,05$  versus Kontrolle und Sham (Abb. A) und in der fünften Minute war die Traumagruppe signifikant schneller als die Kontrollgruppe, \*  $p < 0,05$  versus Kontrolle (Abb. B).

Auch die Durchschnittsgeschwindigkeit über fünf Minuten war bei den Traumatieren höher als bei der Kontroll- und Shamgruppe (siehe Abb. 15), mit einer Signifikanz von  $p = 0,015$  im Vergleich zur Kontrolle. Ein signifikanter Unterschied zwischen der Trauma- und Shamgruppe bestand hier nicht.



**Abbildung 15:** Durchschnittsgeschwindigkeit in der gesamten Testarena über 5 Minuten des Open Field Tests

Dargestellt ist der Median der Durchschnittsgeschwindigkeit der einzelnen Gruppen für die gesamte Testarena für die erste bis fünfte Minute als Box Plot. Die Traumagruppe war signifikant schneller als die Kontrollgruppe. Zwischen der Trauma- und Shamgruppe gab es keine signifikanten Unterschiede, \*  $p < 0,05$  versus Kontrolle.

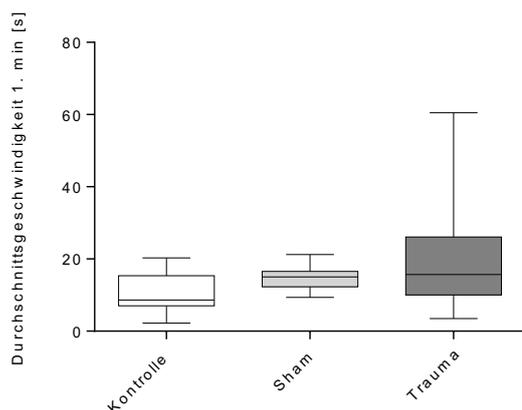
### 4.3 Habituation

Vom zweiten bis zum fünften Tag fand die Habituation der Tiere in Vorbereitung auf den Object Recognition Test statt. Dazu wurden alle Tiere, an allen vier Tagen, einzeln nacheinander für jeweils fünf Minuten in die Testarena verbracht, um eine weitere Gewöhnung der Tiere an die Umgebung und die Situation zu initiieren. An diesen Tagen wurden, wie schon für den Open Field Test beschrieben, ebenfalls die fünf Parameter zurückgelegter Weg, Geschwindigkeit, Durchschnittsgeschwindigkeit, Zoneneintritte und Aufenthaltsdauer in den Zonen von der mit dem Computerprogramm gekoppelten Videokamera aufgezeichnet und gemessen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass über die vier Tage eine Gewöhnung der Tiere aller drei Gruppen (Kontrolle, Sham, Trauma) an die Testarena stattgefunden hatte. Nach Auswertung der Parameter war ersichtlich, dass sich die Durchschnittsgeschwindigkeit aller Gruppen über fünf Tage vermindert hatte. Signifikanzen zwischen den Gruppen gab es nicht. Bezüglich des zurückgelegten Weges gab es ebenfalls Unterschiede, hier legten am ersten Habituationstag alle Tiere mehr Wegstrecke in der inneren Zone 1 zurück als am letzten Habituationstag. Dabei legten die Traumatiere mit einer Signifikanz von  $p=0,008$  am letzten Habituationstag weniger Wegstrecke als am ersten Habituationstag zurück, genauso wie die Sham- ( $p=0,008$ ) und die Kontrolltiere ( $p<0,001$ ). Somit hatte sich das Aktivitätsniveau der Tiere vermindert und es konnte davon ausgegangen werden, dass eine Habituation aller Tiere erfolgt war.

Zusätzlich war auffällig, dass das Aktivitätsniveau der Tiere aus der Traumagruppe und letztendlich auch der Tiere aus der Shamgruppe langsamer sank als in der Kontrollgruppe, so dass die Ratten, die ein mildes SHT oder eine Scheinoperation erhielten, sich im Durchschnitt langsamer an die Umgebung gewöhnten als die Tiere aus der Kontrollgruppe. In Abbildung 16 ist exemplarisch die Durchschnittsgeschwindigkeit in der ersten Minute des dritten Habituationstages aller drei Gruppen dargestellt. Ein signifikanter Unterschied bestand zu diesem Zeitpunkt nicht mehr.

Schlussendlich lässt sich sagen, dass über die gesamte Zeit, am Ende der Habituationstage, eine Gewöhnung aller Tiere stattgefunden hatte.



**Abbildung 16:** Durchschnittsgeschwindigkeit in der 1. Minute des dritten Habituationstages

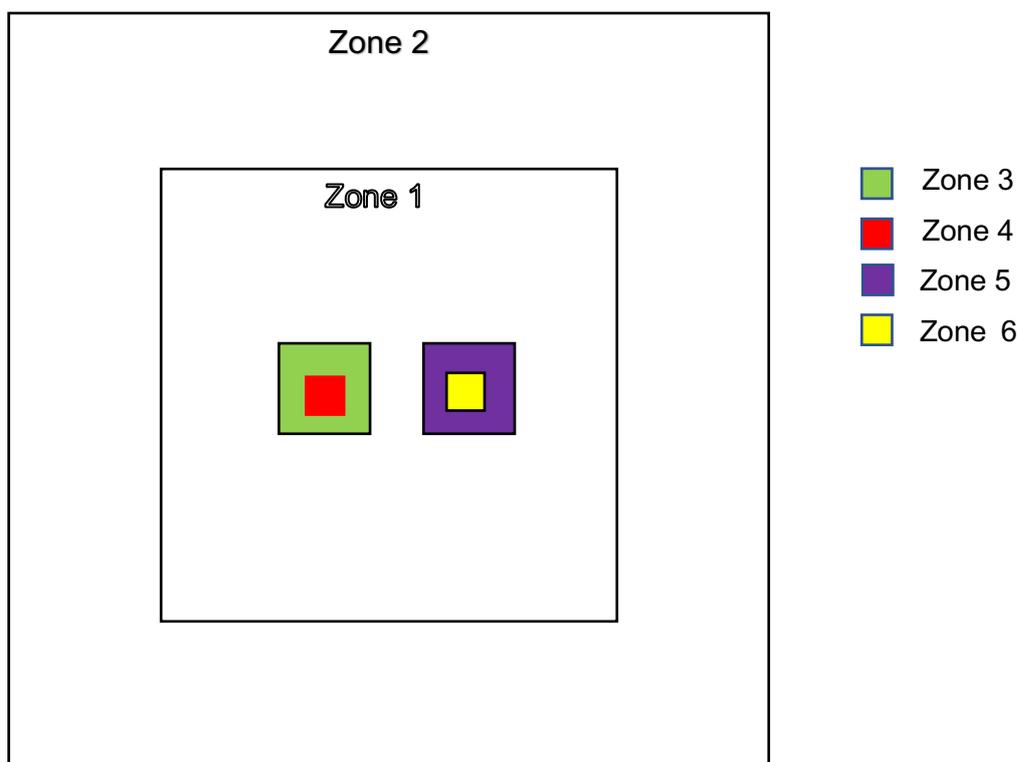
Dargestellt ist der Median der Durchschnittsgeschwindigkeit der einzelnen Gruppen für die gesamte Testarena für die erste Minute des dritten Habituationstages. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontroll-, Sham- und Traumagruppe.

#### 4.4 Novelty Object Recognition Test (NOR Test)

Nach Abschluss der Habituationsphase wurde mit dem NOR Test begonnen. Diese Testphase teilte sich in drei Versuchsdurchgänge auf. Im ersten Versuchsdurchgang wurden zwei gleiche Objekte zentral in die Box gestellt, im zweiten Versuchsdurchgang eine Stunde später wurde ein bekanntes Objekt gegen ein unbekanntes Objekt ausgetauscht und im dritten und letzten Durchgang, 24 Stunden später, wurde erneut ein bekanntes Objekt durch ein unbekanntes Objekt ersetzt. Die Definition der inneren Zone (Zone 1) und äußeren Zone (Zone 2) wurde, wie schon oben bei dem Open Field Test beschrieben, beibehalten. Zusätzlich wurden weitere Zonen hinzugefügt (Zone 3-Zone 6), um mit den gleichen schon oben erwähnten Parametern messen zu können, in welchem Ausmaß sich die Ratten mit den Objekten beschäftigten und ob es Präferenzen zwischen dem bekanntem und unbekanntem Objekt gab.

Mit Hilfe des NOR Tests ist es möglich, sowohl das Kurz- bzw. Arbeitsgedächtnis als auch Teile des Langzeitgedächtnisses zu überprüfen (Antunes et al. 2012).

Ziel dieses Tests war es, herauszufinden, ob eine Störung der Gedächtnisleistung durch das induzierte milde Schädel-Hirn-Trauma vorlag.



**Abbildung 17:** Beispielhafte Darstellung der Versuchsanordnung sowie Platzierung der Objekte für Testdurchgang 1 (Tag 1, Stunde 0), Testdurchgang 2 (Tag 1, Stunde 1) und Testdurchgang 3 (Tag 2, Stunde 24)

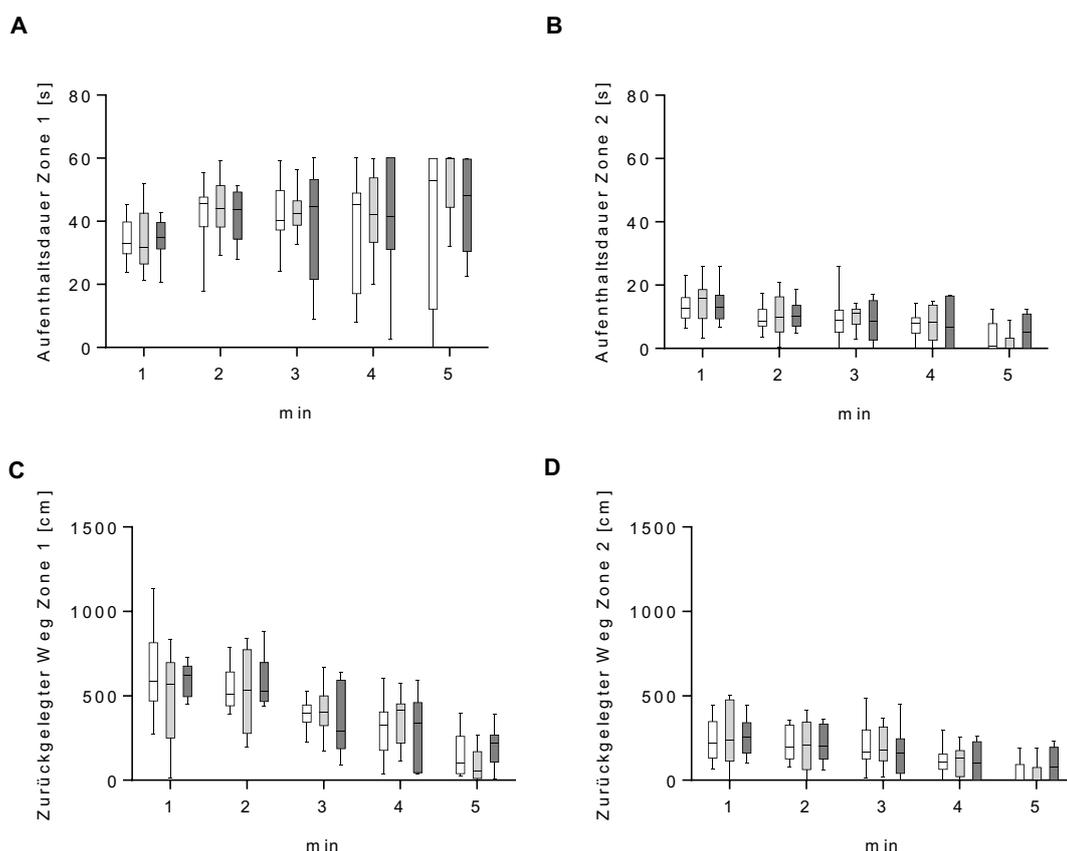
#### 4.4.1 Testdurchgang 1 (Tag 1, Stunde 0)

Am ersten Tag wurden zwei Objekte (2 Tassen) zentral in der Testarena platziert und die Tiere aller Gruppen (Kontrolle, Sham, Trauma) hatten nacheinander Zeit diese Objekte für maximal fünf Minuten zu explorieren und sich mit diesen vertraut zu machen. Es wurden erneut die schon bekannten Parameter gemessen.

In diesem Testlauf wurde deutlich, dass durch das Platzieren der Objekte in der Testarena und die damit verbundene Veränderung der Umwelt, an die die Tiere vorher habituiert waren, sich das Aktivitätsniveau der Tiere aller Gruppen, verglichen mit dem letzten Habituationstag erhöhte und auch das Explorationsverhalten verändert war.

In der inneren Zone 1 hielten sich die Traumatiere mit einer Signifikanz von  $p=0,008$  länger auf als in der äußeren Zone 2, ebenso wie die Shamtiere ( $p=0,008$ ) und die Kontrolltiere ( $p<0,001$ ), dies wird in Abbildung 18A und 18B dargestellt. Zugleich legten die Traumtiere mit einer Signifikanz von  $p=0,008$  mehr Wegstrecke in der inneren Zone 1 als in der

äußeren Zone 2 zurück, sowie die Tiere aus der Sham- ( $p=0,008$ ) und Kontrollgruppe ( $p<0,001$ ), wie in Abbildung 18C und 18C gezeigt. Dadurch wird deutlich, dass die Veränderungen der bereits bekannten Umwelt ursächlich für den erneuten Anstieg des Aktivitätsniveaus und die vermehrte Exploration, im Vergleich zum letzten Habituationstag, sind.

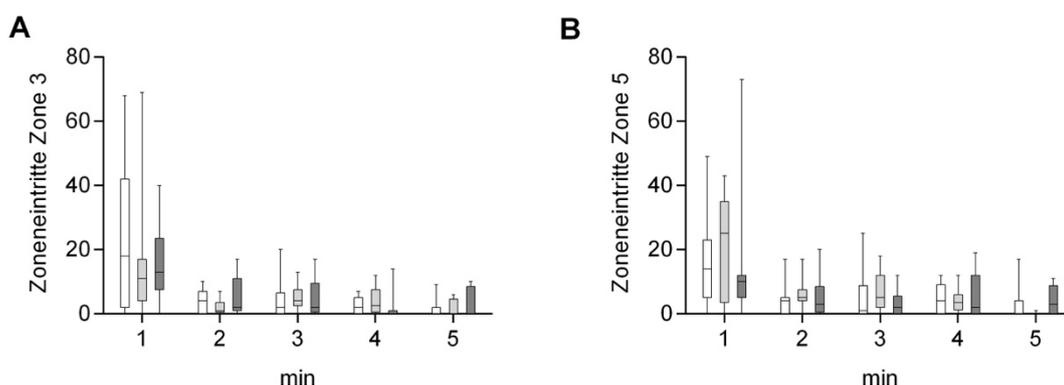


**Abbildung 18:** Aufenthaltsdauer und zurückgelegter Weg bei Testdurchgang 1 an Tag 1 zur Stunde 0

Dargestellt sind die jeweilige Aufenthaltsdauer für Minute 1 bis 5 aller Gruppen in Zone 1 (Abb. A) und Zone 2 (Abb. B) sowie der jeweils zurückgelegte Weg für alle Gruppen für Minute 1 bis 5 in Zone 1 (Abb. C) und Zone 2 (Abb. D). Die Messwerte wurden als Box Plots aufgetragen: Kontrolle = weiß, Sham = hellgrau, Trauma = dunkelgrau. Signifikanzen wurden nicht dargestellt, sind jedoch im Text erläutert.

Zone 3 und Zone 4 spiegeln an diesem Testtag das Objekt A und Zone 5 und Zone 6 Objekt B wieder. In diesem Testdurchgang konnten keine Unterschiede hinsichtlich der Aufenthaltsdauer, des zurückgelegten Weges, der Geschwindigkeit oder Zoneneintritte um Objekt A und Objekt B herum detektiert werden. In Abbildung 19A und 19B ist exemplarisch

dargestellt, dass sowohl die Trauma- als auch die Sham- und Kontrolltiere ungefähr gleich häufig in Zone 3 und Zone 5 eintraten und somit beide Objekte gleichermaßen explorierten. Die Absicht war dabei die Tiere auf die nachfolgenden Testdurchgänge vorzubereiten, bzw. die Prüfung des Kurz-, Arbeits- und Langzeitgedächtnis erst möglich zu machen.



**Abbildung 19:** Zoneneintritte in Zone 3 (Abb. A) und Zone 5 (Abb. B) der Trauma-, Kontroll- und Shamgruppe

Darstellung der Zoneneintritte aller Gruppen für die 1.-5 Minute des Testdurchgangs 1 an Tag 1 zur Stunde 0 in Zone 3 (Abb. A) und Zone 5 (Abb. B) als Box Plots aufgetragen: Kontrolle = weiß, Sham = hellgrau, Trauma = dunkelgrau, signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen gab es nicht.

Zusammenfassend konnte davon ausgegangen werden, dass keine der Gruppen eine Bevorzugung für eines der beiden Objekte hatte und hier lediglich wieder vermehrt exploratives Verhalten, aufgrund der veränderten Umwelt gesehen werden konnte. Signifikanzen zwischen den Gruppen bestanden nicht.

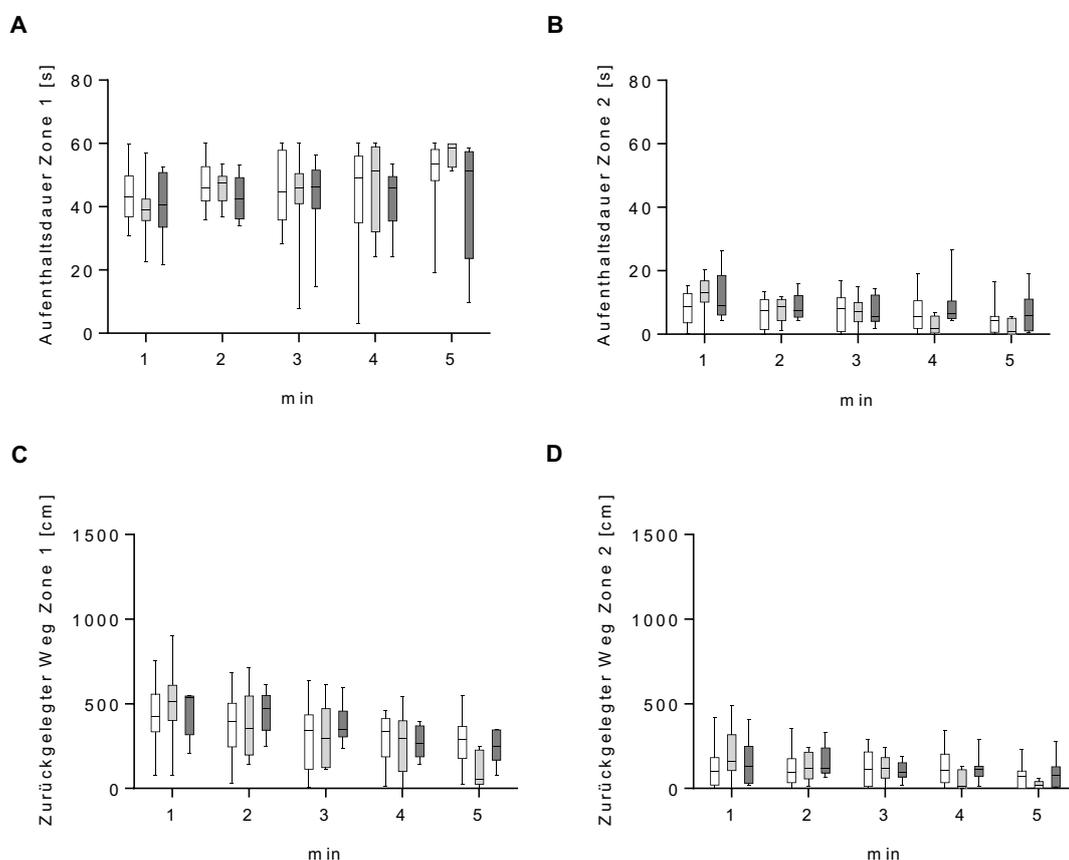
#### 4.4.2 Testdurchgang 2 (Tag 1, Stunde 1)

Im zweiten Versuchsdurchgang eine Stunde nach dem ersten Versuch wurde das bekannte Objekt B gegen das neue Objekt B` ausgetauscht. Zone 3 und Zone 4 repräsentierten hier das bekannte Objekt A und Zone 5 und Zone 6 das unbekannte Objekt B`. Ziel dieses Versuchsdurchgangs war die Überprüfung der Funktion des Arbeits- bzw. Kurzzeitgedächtnisses.

Auch in diesem Versuchsdurchgang hatten die Ratten eine längere Aufenthaltsdauer in Zone 1 als in Zone 2. Zusätzlich wird die vermehrte Exploration der Umgebung, um die

Objekte herum, deutlich durch die längere Wegstrecke, die die Tiere in der inneren Zone 1 zurücklegten.

Abbildung 20A und 20B verdeutlichen den Unterschied zwischen der Aufenthaltsdauer in der inneren Zone 1 und der äußeren Zone 2, hier hielten sich die die Traumatierte mit einer Signifikanz von  $p=0,008$  länger in der inneren Zone 1 als in der äußeren Zone 2 auf, die Signifikanz für die Shamtiere lag hierbei bei  $p=0,008$  und für die Kontrolltiere bei  $p<0,008$ . In Abbildung 20C und 20D ist der Unterschied zwischen der inneren Zone 1 und der äußeren Zone 2 bezüglich des zurückgelegten Wegs dargestellt. Hier lag eine Signifikanz von  $p=0,008$  für die Traumatierte, eine Signifikanz von  $p=0,008$  für die Shamtiere und eine Signifikanz von  $p<0,001$  für die Kontrolltiere für die Zone 1 im Vergleich zu Zone 2, vor.

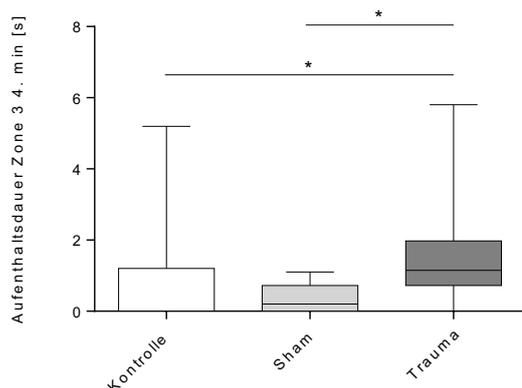


**Abbildung 20:** Aufenthaltsdauer und zurückgelegter Weg bei Testdurchgang 2 an Tag 1 zur Stunde 1

Dargestellt sind die jeweilige Aufenthaltsdauer für Minute 1 bis 5 aller Gruppen in Zone 1 (Abb. A) und Zone 2 (Abb. B) sowie der jeweils zurückgelegte Weg für alle Gruppen für Minute 1 bis 5 in Zone 1 (Abb. C) und Zone 2 (Abb. D). Die Messwerte wurden als Box Plots aufgetragen: Kontrolle = weiß, Sham = hellgrau, Trauma = dunkelgrau. Signifikanz wurden nicht dargestellt, sind jedoch im Text erläutert.

Nach Auswertung von Zone 3 und Zone 4 (altes Objekt A) und Zone 5 und Zone 6 (neues Objekt B') konnte gesehen werden, dass die Traumatiere häufiger in die Zone 3, um das alte Objekt (Objekt A) herum eintraten, als die Tiere aus den anderen Gruppen und somit häufiger das alte Objekt A explorierten. Einen signifikanten Unterschied gab es jedoch nicht. Hinsichtlich der Zoneneintritte um das neue Objekt B' herum (Zone 5) ergaben sich keine Unterschiede in Bezug auf die Trauma- und Kontrollgruppe. Hier traten alle Tiere aller Gruppen ungefähr gleich häufig in Zone 5 (neues Objekt B') ein. Daher gab es auch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Zusätzlich konnte gesehen werden, dass sich die Traumatiere länger am alten Objekt (Objekt A) in Zone 3 aufhielten, als die Tiere aus der Sham- oder Traumagruppe, wie in Abbildung 21 dargestellt. Dies weist darauf hin, dass die Traumatiere das alte Objekt (Objekt A) nicht als bekannt erkannten. Hier lag die Signifikanz bei  $p=0,024$  zwischen der Kontroll- und Traumagruppe und bei  $p=0,035$  zwischen der Sham- und der Traumagruppe für die 4. Minute in Zone 3 des zweiten Versuchsdurchlaufs.



**Abbildung 21:** Aufenthaltsdauer in Zone 3 (altes Objekt) in der 4. Minute des Testdurchgangs 2 an Tag 1 zur Stunde 1

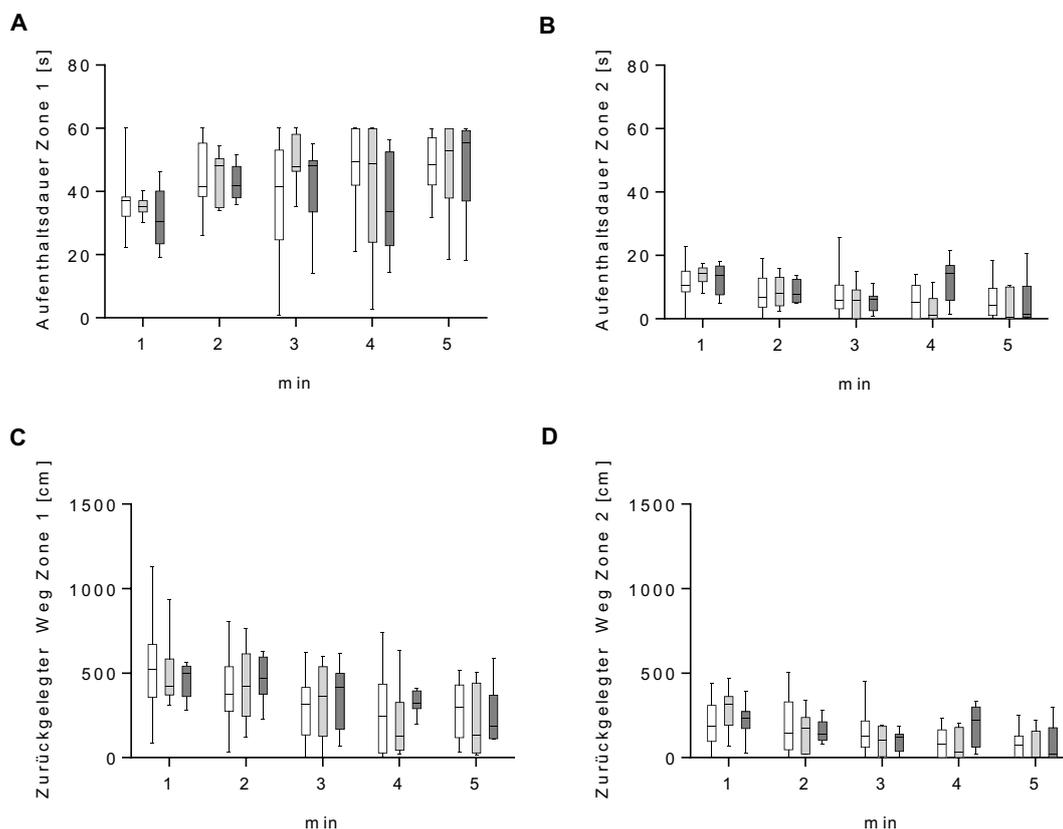
Dargestellt ist der Median der Aufenthaltsdauer der einzelnen Gruppen in Zone 3 in der vierten Minute des Testdurchgangs 2 an Tag 1 zur Stunde 1 als Box Plot. Die Traumagruppe hielt sich signifikant länger in Zone 3 auf als die Kontroll- und Shamgruppe, \*  $p<0,05$  versus Kontrolle und Sham.

#### 4.4.3 Testdurchgang 3 (Tag 2, Stunde 24)

Am zweiten Testtag, dem dritten Versuchsdurchlauf, 24 Stunden nach dem zweiten Versuchsdurchlauf wurde erneut ein unbekanntes gegen ein bekanntes Objekt ausgetauscht. In diesem Fall wurde eine Tasse gegen eine 500 ml Desinfektionsflasche gewechselt. Zone 3 und Zone 4 stellten in diesem Fall das alte Objekt A dar und Zone 5

und Zone 6 das neue Objekt B'. Nach einer Pause von 24 Stunden sollte im letzten Teil des Novelty Object Recognition Tests das Langzeitgedächtnis überprüft werden.

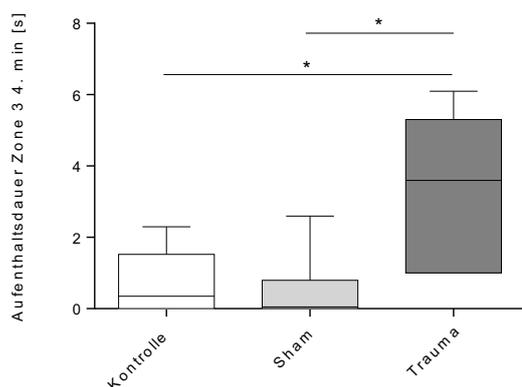
Auch hier wurde erneut ersichtlich, dass die Tiere sowohl eine signifikant längere Aufenthaltsdauer in der inneren Zone (Zone 1) hatten, als auch eine längere Wegstrecke zurücklegten. Die Tiere der Traumagruppe hielten sich mit einer Signifikanz von  $p=0,008$  auch im dritten Testdurchgang länger in der inneren Zone 1 auf als in der äußeren Zone 2, ebenso wie die Sham- ( $p=0,008$ ) und die Kontrolltiere ( $p<0,001$ ). Dies ist in Abbildung 22A und 22B dargestellt. Auch bezüglich des zurückgelegten Weges ergaben sich Differenzen zwischen der inneren Zone 1 und der äußeren Zone 2. Hier legten die Traumtiere ( $p=0,008$ ) signifikant mehr Wegstrecke in Zone 1 als in Zone 2 zurück, ebenso wie die Tiere aus der Sham- ( $p=0,008$ ) und Kontrollgruppe ( $p<0,001$ ), was in Abbildung 22C und 22D dargestellt ist. Aufgrund der erhöhten Aktivität auch im dritten Versuchsdurchlauf konnte nicht von einer Habituation der Tiere an die veränderte Umwelt ausgegangen werden.



**Abbildung 22:** Aufenthaltsdauer und zurückgelegter Weg bei Testdurchgang 3 an Tag 2 zur Stunde 24

Dargestellt ist die jeweilige Aufenthaltsdauer für Minute 1 bis 5 aller Gruppen in Zone 1 (Abb. A) und Zone 2 (Abb. B) sowie der jeweils zurückgelegte Weg für alle Gruppen für Minute 1 bis 5 in Zone 1 (Abb. C) und Zone 2 (Abb. D). Die Messwerte wurden als Box Plots aufgetragen: Kontrolle = weiß, Sham = hellgrau, Trauma = dunkelgrau. Signifikanzen wurden nicht dargestellt, sind jedoch im Text erläutert.

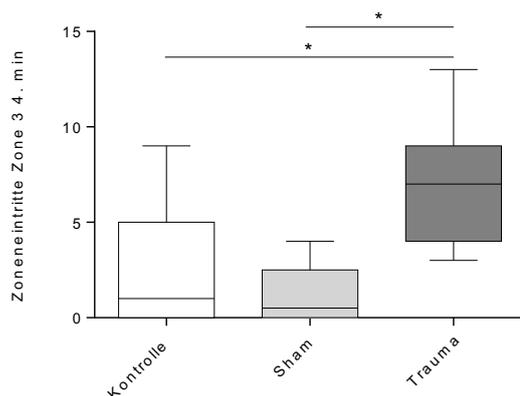
In Zone 3 (altes Objekt A) hielten sich in der Gesamtbetrachtung die Traumatiere länger auf als die Tiere aus den anderen Gruppen, was wiederum einen Anhaltspunkt dafür gibt, dass die Tiere, die ein SHT erlitten, das alte Objekt nicht als bekanntes Objekt erkannten. Es konnten nach Auswertung der einzelnen Minuten in der 4. Minute des 3. Testdurchgangs gesehen werden, dass sich die Traumatiere, wie in Abbildung 23 dargestellt, mit einer Signifikanz von  $p=0,016$  länger in Zone 3 aufhielten als die Kontrolltiere und mit einer Signifikanz von  $p=0,011$  länger als die Shamtiere.



**Abbildung 23:** Aufenthaltsdauer in Zone 3 in der 4. Minute des Testdurchgangs 3 (Tag 2, Stunde 24)

Dargestellt ist der Median der Aufenthaltsdauer der einzelnen Gruppen in Zone 3 in der vierten Minute des Testdurchgangs 3 an Tag 2 zur Stunde 24 als Box Plot. Die Traumagruppe hielt sich signifikant länger in Zone 3 auf als die Kontroll- und Shamgruppe, \*  $p<0,05$  versus Kontrolle und Sham.

In Zone 3 (altes Objekt A) ergaben sich zusätzlich in der 4. Minute Unterschiede bezüglich der Zoneneintritte (siehe Abbildung 24) um das alte Objekt A herum. Auch hier sprechen die vermehrten Zoneneintritte um das alte Objekt herum für eine Beeinträchtigung des Langzeitgedächtnisses. Die Signifikanz zwischen der Trauma- und Kontrollgruppe lag hier bei  $p=0,014$  und zwischen der Sham- und Traumagruppe bei  $p=0,006$ .

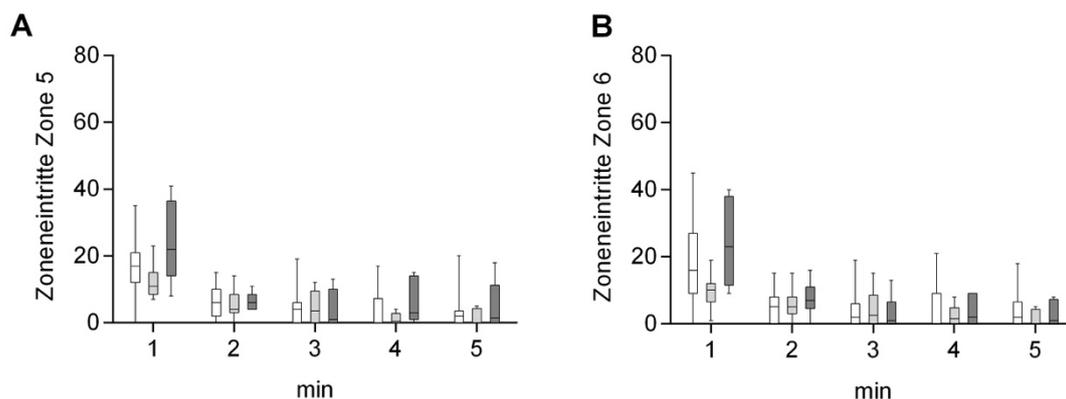


**Abbildung 24:** Zoneneintritte in Zone 3 für die 4. Minute des Testdurchgangs 3 (Tag 2 Stunde 24)

Dargestellt ist der Median der Zoneneintritte der einzelnen Gruppen in Zone 3 in der vierten Minute des Testdurchgangs 3 an Tag 2 zur Stunde 24 als Box Plot. Die Traumagruppe trat signifikant häufiger in Zone 3 ein als die Kontroll- und Shamgruppe, \*  $p < 0,05$  versus Kontrolle und Sham.

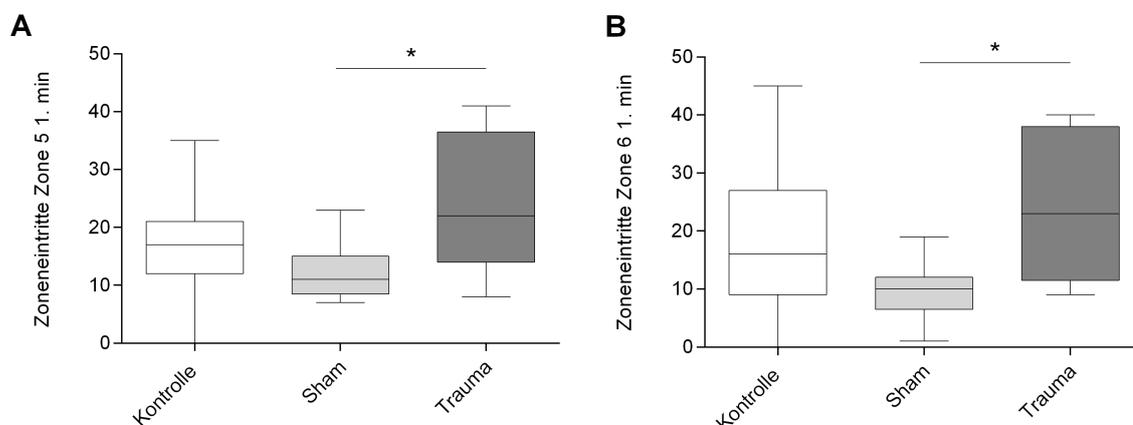
Auch für Zone 5 und Zone 6 (neues Objekt B') waren nach Auswertung Unterschiede zu erkennen.

Insgesamt traten die Traumatiere häufiger in Zone 5 (neues Objekt B') ein, als die Tiere aus der Sham- und Kontrollgruppe (siehe Abbildung 25A). Nach Auswertung der einzelnen Minuten, wurde ersichtlich, dass in der 1. Minute des Versuchs, wie in Abbildung 26A dargestellt, die Tiere aus der Traumagruppe mit einer Signifikanz von  $p = 0,03$  signifikant häufiger in Zone 5 eintraten als die Shamtiere, zwischen der Trauma- und der Kontrollgruppe ergaben sich keine Signifikanzen. In Zone 6 (siehe Abbildung 25B) traten die Traumatiere ebenfalls häufiger ein als die Tiere aus den anderen Gruppen. In der ersten Minute des Tests traten die Traumatiere, wie in Abbildung 26 B ersichtlich, mit einer Signifikanz von  $p = 0,032$  häufiger in Zone 6 ein als die Shamtiere, zwischen der Kontroll- und Traumagruppe bestand auch hier kein signifikanter Unterschied.



**Abbildung 25:** Zoneneintritte in Zone 5 (Abb. A) und Zone 6 (Abb. B) für die 1. – 5. Minute des Testdurchgangs 3 an Tag 2 zur Stunde 24

Dargestellt sind die jeweiligen Zoneneintritte für Minute 1 bis 5 aller Gruppen in Zone 5 (Abb. A) und Zone 6 (Abb. B) Die Messwerte wurden als Box Plots aufgetragen: Kontrolle = weiß, Sham = hellgrau, Trauma = dunkelgrau.



**Abbildung 26:** Zoneneintritte in Zone 5 (Abb. A) und Zone 6 (Abb. B) in der 1. Minute des 3. Testdurchgangs 3 (Tag 2, Stunde 24)

Dargestellt ist der Median der Zoneneintritte der einzelnen Gruppen in Zone 5 in der ersten Minute (Abb. A) und in Zone 6 in der ersten Minute (Abb. B) des Testdurchgangs 3 an Tag 2 zur Stunde 24 als Box Plot. Die Traumagruppe trat signifikant häufiger in Zone 5 und Zone 6 ein als die Shamgruppe, ein Unterschied zur Kontrollgruppe bestand nicht, \*  $p < 0,05$  versus Sham.

Zusammenfassend lässt sich für alle Versuche sagen, dass nach Auswertung des Open Field Tests, der Habituationstage und des Novelty Object Recognition Tests sowohl eine Veränderung des Aktivitätsniveaus und des Explorationverhaltens als auch eine

Veränderung der Gedächtnisleistung bei den Traumatieren, im Vergleich zur Kontroll- und Shamgruppe, belegbar war.

## 5. Diskussion

Das leichte SHT ist eines der häufigsten Verletzungsmuster im Kindesalter mit anfänglich eher geringen, meist nicht sichtbaren Verletzungsfolgen. Verzögert oder gar nicht erkannte Verletzungen nach mildem SHT können jedoch irreversible Schäden nach sich ziehen (Leidel et al. 2015). Wenn Kinder ein Schädel-Hirn-Trauma erleiden, ist dieses meist eher mild in der Ausprägung, zudem sind die betroffenen Kinder meist jung und männlich (Januszek et al. 2018). In einer Studie aus Großbritannien waren 55% der verunfallten Kinder jünger als 5 Jahre, 28 % jünger als 2 Jahre und 65 % der Kinder waren Jungen. Meist, in 98 % der Fälle, handelte es sich um ein mildes SHT. Die Gründe hierfür waren meistens Verkehrsunfälle sowie Stürze (Dunning et al. 2004). Veränderungen der Persönlichkeit, besondere Erregbarkeit, Probleme im Sozialverhalten und ungewohnte Emotionen sind häufig die Folge (Deppe 2014). Bereits nach minimaler Schwere der Verletzung können Beeinträchtigungen der geistigen Leistungsfähigkeit, Defizite im Verhalten und emotionalen Erlebens einen permanenten Charakter annehmen (Deppe 2014). In einer Studie von Barlow (Barlow et al. 2010) waren 3 Monate nach Trauma 11% der Kinder und nach einem Jahr nach Trauma noch 2,3 % der Kinder auffällig. Beobachtet wurden hier häufig Kopfschmerzen, Übelkeit, Schwindel, depressive Verstimmung, Lernschwäche, erhöhte Reizbarkeit, Sprachstörungen, Müdigkeit, Schlafstörungen, erhöhte Risikobereitschaft und kognitive Defizite (Barlow et al. 2010, Januszek et al. 2018). In einer anderen Untersuchung war nach mildem SHT bei 10,9 % der Kinder eine Epilepsie beobachtet worden (Petridis et al. 2012), sowie eine posttraumatische Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitätsstörung (ADHS), die in bis zu 12 % bei Kinder nach mildem SHT beobachtet worden ist (Studer et al. 2014). Zusätzlich müssen weitere Faktoren des kindlichen SHTs im Vergleich zu Erwachsenen beachtet werden (Januszek et al. 2018); die Halswirbelsäule ist bei Kindern noch hypermobil, hinzu kommt ein ungünstiges Kopf-Körper-Verhältnis, sowie eine noch unvollständige Myelinisierung der Nerven und eine erhöhte Schwellungsneigung des Gehirns (Januszek et al. 2018), was zusätzlich erschwerend wirkt, wenn ein Kind ein SHT erleidet.

Daher wurde in der vorliegenden Arbeit ein Tiermodell zur Induktion eines milden traumatischen Hirnschadens bei juvenilen Ratten etabliert, um weitere Pathomechanismen, wie den Einfluss auf exploratives Verhalten und kognitive Leistung nach mildem SHT zu untersuchen. Als Grundlage wurde das Weight Drop Model von Marmarou in Modifikation nach Adelson verwendet. Zwei Verhaltenstest, der sogenannte Open Field Test und der Novelty Object Recognition wurden eingesetzt, um Verhalten, Aktivität und Gedächtnis nach SHT zu analysieren. Dabei wurden die Durchschnittsgeschwindigkeit der Tiere, der

zurückgelegte Weg, die Aufenthaltsdauer und die Zoneneintritte, in vorher bestimmte Zonen über einen vorher definierten Zeitraum gemessen.

Die Tiere wurden in eine Trauma-, Sham- und Kontrollgruppe unterteilt und die Ergebnisse aus den einzelnen Gruppen miteinander verglichen.

## 5.1. Wahl der Tierart

Es existieren viele verschiedene Tiermodelle zur Induktion eines milden Schädel-Hirn-Traumas in denen vornehmlich Nagetiere für experimentelle Untersuchungen verwendet worden sind (Bodnar et al. 2019).

Schon Dixon erklärte die unterschiedlichsten Vorteile des Einsatzes von Ratten in experimentellen Studien gegenüber anderen Spezies (Dixon et al. 1987). Im Gegensatz zu Primaten ist die Aufzucht, Pflege und Versorgung von Ratten kosteneffizient. Zusätzlich besteht eine hohe Resistenz gegenüber Infektionen und der ökonomische Einsatz von Medikamenten jeglicher Art ist ebenfalls aufgrund des niedrigen Körpergewichts möglich. Da Ratten für experimentelle Studien bei Tierzüchtern gezüchtet werden, ist sowohl das genaue Alter der Tiere, als auch die genetische Herkunft nachweisbar. Ferner existiert eine Vielzahl von physiologischen Daten und Verhaltensparametern, die standardisiert gemessen werden können und damit untereinander vergleichbar sind (Dixon et al. 1987). Als Nachteile sind die kleinen Strukturen, die die Untersuchungen erschweren und die unzulängliche Detektierung von komplexen neurologischen Schäden, im Vergleich zum Menschen anzuführen.

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich männliche Sprague-Dawley-Ratten verwendet um hormonelle Schwankungen im weiblichen Zyklus auszuschließen und den damit verbundenen Einfluss auf Kognition und affektives Verhalten zu vermeiden. In einer Studie von Walf et al. (Walf et al. 2009) konnte gezeigt werden, dass 17  $\beta$ -Estradiol sowohl Kognition als auch Affektion beeinflusst und Tiere mit einem höheren 17  $\beta$ -Estradiol-Spiegel bessere Ergebnisse im Object Recognition Test erzielten (Walf et al. 2009).

Insgesamt wurden Ratten als geeignete Spezies zur Untersuchung des SHT angesehen, da sowohl der NOR-Test (Ennaceur et al. 1988, Gaskin et al. 2010, Reger et al. 2009), als auch das Modell zur Induktion eines diffusen axonalen Hirnschadens, das vornehmliche Verletzungsmuster beim milden SHT, bei Ratten bereits etabliert waren. (Adelson et al. 1996, Marmarou et al. 1994).

## 5.2 Weight Drop Modell

Das milde SHT, verursacht durch stumpfe Traumen oder Scherkräfte, ist eine in der Gesellschaft häufig vorkommende Erkrankung gerade bei Kindern und Jugendlichen. Tiermodelle unter standardisierten Bedingungen sind unerlässlich, um die Mechanismen der Entstehung des SHT und dessen pathologisches Korrelat zu untersuchen und zu verstehen, sowie zur Etablierung neuer therapeutischer Interventionsmöglichkeiten (Bodnar et al. 2019). Insgesamt gibt es weniger Tiermodelle, im Vergleich zu Modellen mit Erzeugung eines moderaten oder schweren SHT, in denen der milde traumatische Hirnschaden untersucht wurde. Noch mehr fehlt es jedoch an Modellen, die sich mit den Auswirkungen und der Pathologie des milden juvenilen SHT auseinandersetzen (Bodnar et al. 2019).

Gerade bei Kindern sind die Beeinträchtigungen, Konzentrationsstörungen oder Hyperaktivität, nach einem Trauma ausgeprägter und langwieriger (Catroppa et al. 2008, Prins et al. 2003). In Untersuchungen wurde gesehen, dass das Ausmaß der diffusen axonalen Schädigung mit dem Ausmaß der späteren Einschränkung der Gedächtnisleistung bei Kindern korreliert. Hierbei scheint das Arbeitsgedächtnis, in Bezug auf die Intensität des SHTs, vulnerabler zu sein als andere Gedächtnisstrukturen (Catroppa et al. 2008). Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass eine diffuse zerebrale Schwellung bei Kindern verstärkt auftritt (Mazzola et al. 2002) und dies eine gesteigerte Morbidität sowie Mortalität verursacht (Adelson et al. 1998).

Deshalb ist es von Bedeutung bei der Wahl des Tiermodells zur Erzeugung eines SHT einerseits das Alter der Versuchstiere zu berücksichtigen und andererseits ein Modell auszuwählen, das vornehmlich einen diffusen axonalen Hirnschaden erzeugt, um Pathologien zu erzeugen, die dem des kindlichen SHTs ähneln.

Im Mittelpunkt stand daher bei dieser Arbeit das Weight Drop Model von Marmarou in Modifikation nach Adelson (Adelson et al. 1996), um die für das kindliche SHT charakteristische, axonale Schädigung zu reproduzieren. Alle anderen etablierten Modelle, wie z.B. CCI-Modelle (Dixon et al. 1991) oder Fluid Percussion Modelle (Dixon et al. 1987), zur Erzeugung eines traumatischen Hirnschadens bewirken eher eine fokale Schädigung und waren daher zur Beantwortung der Fragestellung dieser Arbeit eher ungeeignet. Der Vorteil in dem Modell nach Marmarou liegt in der Reproduzierbarkeit der diffusen Schädigung. Zusätzlich zu dem diffusen Schaden entstehen bei diesem Modell auch fokale Läsionen, die mit einem Untergang von Neuronen hauptsächlich im Kortex, Thalamus und Hippocampus einhergehen (Smith et al. 1997, Tang et al. 1997a). Die genannten Areale waren bei den hier durchgeführten Analysen von Verhaltensänderungen und von

Einschränkungen der Kognition nach SHT bei juvenilen Ratten ebenfalls von besonderem Interesse. Auch konnten schon in anderen Arbeiten sowohl Änderungen im Verhalten als auch motorische und kognitive Defizite nach Schädigung beobachtet werden (Shapira et al. 1988, Tang et al. 1997a).

Um eine Standardisierung und Reproduzierbarkeit der Daten zu gewährleisten wurde hierbei auf die Einhaltung eines stringenten Protokolls, wie das Narkoseprotokoll, die gewichtsadaptierte Gabe von Medikamenten, die Fallhöhe des Gewichts oder die immer gleiche Positionierung der Metallplatte auf den knöchernen Schädel, geachtet. Um eine zusätzliche Objektivierbarkeit der Daten zu garantieren wurden Parameter, wie z.B. der endexpiratorische CO<sub>2</sub>-Wert und die Körpertemperatur, normiert und gemessen. Zusätzlich wurde während der Versuche die Schaumstoffplatte, auf der die Ratten lagen und die Plexiglasröhre fixiert, um eine Bewegung dieser und die damit verbundene Veränderung des Aufprallorts durch das Messinggewicht zu verhindern. Eine weitere Reduzierung der Fehlerquellen sollte durch die Durchführung der Operation durch nur einen Operateur erreicht werden.

In diesem Versuchsaufbau ergaben sich aber auch Schwachstellen, wie die fehlende Kontrolle der Aufprallgeschwindigkeit des Messinggewichts oder die fehlende Steuerbarkeit der Tiefe der Duraimpression, so dass auch der Umfang des SHTs schlecht lenkbar war. Damit bot sich eine mögliche Variationsbreite der Daten, die die Objektivierbarkeit dieser erschweren könnten.

Aufgrund der oben dargelegten Vorgehensweise konnte dennoch eine gewissenhafte und qualitativ hochwertige Durchführung des Versuches angenommen werden, der sich gut zur Nachahmung eines SHTs bei Kindern eignete und eine Untersuchung von Pathologien in Bezug auf Kognition und Affektion nach SHT ermöglichte.

### **5.3 Open Field Test und Habituation**

Im OFT wird sowohl bei Ratten als auch bei Mäusen, das Explorationsverhalten und die allgemeine Aktivität der Tiere beobachtet und bewertet, wobei hier sowohl die Qualität als auch die Quantität gemessen werden kann (Gould 2009). Ursprünglich wurde dieser Test von Hall entwickelt, um die Emotionalität von Nagern zu untersuchen. Dabei machte man sich zu Nutze, dass Ratten und Mäuse eine natürliche Aversion gegenüber großen, offenen und unbekanntem Räumen besitzen und bei Aversion oder Ängstlichkeit sich zunächst Schutz suchend in der Nähe von Wänden oder in Ecken aufhalten (Hall 1934). Während des Versuches können die unterschiedlichsten Variablen gemessen werden, wie z.B. der

zurückgelegte Weg, die Geschwindigkeit oder die Aufenthaltsdauer im Zentrum, sodass hiermit verschiedene Verhaltensweisen der Ratten durch einfache Messung diverser Bewegungen abgebildet werden können (Gould 2009).

Aus den oben genannten Gründen wurde der OFT für unseren Versuchsaufbau gewählt, um Änderungen im Verhalten bzgl. Exploration, Aktivitätsniveau und Ängstlichkeit nach Induktion eines SHTs darzustellen.

In unterschiedlichen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Ratten nach induziertem milden SHT im Vergleich zu Tieren ohne SHT, im OFT Verhaltensänderungen im Sinne einer gesteigerten Ängstlichkeit zeigten. Wirth et al. (Wirth et al. 2017) überprüfte z.B. in seiner Arbeit, ebenfalls mittels des OFTs Verhaltensänderungen bei adoleszenten Ratten nach Induktion eines milden SHT. Hierbei wurden der zurückgelegte Weg während der gesamten Testphase, der zurückgelegte Weg im Zentrum und die Zoneneintritte in der inneren Zone gemessen. In dieser Arbeit wurden adulte Ratten verwendet. Die Tiere, die ein Trauma erhielten, präsentierten in den Verhaltensversuchen eine vermehrte Ängstlichkeit, im Sinne eines Vermeidungsverhaltens. Insgesamt hielten sich die Tiere vermehrt an Wänden und in Ecken auf als Ausdruck der Ängstlichkeit. Die Traumatiere legten hier signifikant weniger Wegstrecke zurück als die Kontrolltiere und auch die Aufenthaltsdauer im Zentrum war bei den Traumatieren deutlich geringer (Wirth et al. 2017). In einer Studie von Almeida-Suhett et al. (Almeida-Suhett et al. 2014) erhielten fünf bis sechs Wochen alte männliche Ratten ein SHT nach dem Controlled Cortical Impact Modell. Auch hier wurde ein vermehrt ängstliches Verhalten im OFT beobachtet, gemessen an der Aufenthaltsdauer im Zentrum, der zurückgelegten Wegstrecke und der Zeit, in der die Ratten in Bewegung waren (Almeida-Suhett et al. 2014). In einer weiteren Studie von Statz (Statz et al. 2019) konnte ebenfalls ein ängstlich-vermeidendes Verhalten bei Ratten nach mildem SHT gezeigt werden. Hier lagen bei den Ratten erhöhte Corticosteron-Spiegel, sowie weniger Stathmin im präfrontalen Cortex und mehr Stathmin in der Amygdala vor. Stathmin ist ein Protein, das an der Regulation des Zytoskeletts der Zelle beteiligt ist (Statz et al. 2019).

In der vorliegenden Arbeit konnte bei den Tieren, die ein SHT mittels des Weight Drop Modells erhielten, kein gesteigertes Angstverhalten gesehen werden, sondern es wurde eher eine gesteigerte Aktivität, im Sinne einer Hyperaktivität, beobachtet, gemessen an der Aufenthaltsdauer in der inneren Zone, dem zurückgelegten Weg und der Durchschnittsgeschwindigkeit. In unterschiedlichen Studien wurde ein Zusammenhang zwischen einem milden Schädel-Hirn Trauma bei Kindern und einer nachfolgenden Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitätsstörung (ADHS) diskutiert (Adeyemo et al. 2014, Königs et al. 2015). Auch tierexperimentell konnten Verhaltensweisen bei Ratten, die den Symptomen eines ADH-Syndroms beim Menschen ähneln, nachgewiesen werden (Haar et

al. 2019, Hehar et al. 2015, Mychasiuk et al. 2015). Zu den Anzeichen eines ADHS gehören Impulsivität, Hyperaktivität, Konzentrationsschwäche und Unaufmerksamkeit. Die Entwicklung von Funktionen, wie Impulskontrolle, Aufrechterhaltung von Aufmerksamkeit oder Kontrolle der motorischen Aktivität, die beim ADHS gestört sind, sind assoziiert mit den verschiedenen Entwicklungsstufen der kortikalen Reifung. Man geht daher davon aus, dass nicht nur das Ausmaß der Schädigung, sondern auch der Zeitpunkt der Schädigung bei juvenilen Ratten von Bedeutung ist für die Entstehung von ADHS-Symptomen (Mychasiuk et al. 2015, Sinopoli et al. 2012). In der vorliegenden Arbeit waren die Ratten zum Zeitpunkt der Induktion des Traumas 21-25 Tage alt, dieses Alter bei juvenilen Ratten entspricht in etwa dem Entwicklungsstand von 6–8 Jahre alten Kindern (Sengupta 2013), so dass man bei den hier vorliegenden Versuchen davon ausgehen kann, dass der Zeitpunkt der Schädigung ebenfalls eine Rolle für das Ausmaß und die Art der Schädigung spielt. Die oben genannten Symptome des ADHS können tierexperimentell mit verschiedenen Verhaltensversuchen, wie z.B. dem Beam Walking Test, dem Open Field Test oder dem Go/No Go Task Test, untersucht werden. Mit dem OFT kann die Hyperaktivität, als ein Symptom des ADHS, überprüft werden. Hierbei wird eine erhöhte Agilität der Tiere als Maß für die Hyperaktivität im Vergleich zu gesunden Tieren aufgezeichnet (Hehar et al. 2015).

Signifikante Unterschiede in der vorliegenden Arbeit zeigten sich im OFT zwischen der Trauma- und Kontrollgruppe und teilweise auch zwischen der Trauma- und Shamgruppe. Die Durchschnittsgeschwindigkeit sowohl in der 1. und 5. Minute des Tests, als auch die Durchschnittsgeschwindigkeit über die gesamten 5 Minuten war bei den Traumatieren signifikant höher als bei den Kontrolltieren. Auch die Dauer des Aufenthalts in der inneren Zone war bei der Traumagruppe in der 1. und 2. Minute des Tests signifikant länger als in der Kontrollgruppe. Auch für die Durchschnittsgeschwindigkeit in der 1. Minute ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den Trauma- und Shamtieren. Die Tiere der Traumagruppe waren insgesamt schneller als die Tiere der Shamgruppe. Insgesamt kann aufgrund der oben erwähnten Ergebnisse davon ausgegangen werden, dass das SHT bei den Traumatieren zu einer Verhaltensänderung in Form einer Hyperaktivität geführt hat. Ob diese Hyperaktivität auf ein trauminduziertes ADHS zurückzuführen ist, lässt sich anhand der vorliegenden Arbeit schlussendlich nicht klären, da dazu noch andere Verhaltenstest hätten durchgeführt werden müssen, um andere Symptome des ADHS, wie Impulsivität oder Unaufmerksamkeit, nachzuweisen. Aber auch die Tiere der Kontrollgruppe hielten sich, anders als zunächst erwartet, vermehrt in der inneren Zone 1 auf. Für adulte Tiere wird, wie bereits oben beschrieben, eher ein ängstlich vermeidendes Verhalten für den OFT erwartet (Almeida-Suhett et al. 2014, Wirth et al. 2017). Für juvenile

Tiere wurde in anderen Untersuchungen jedoch gesehen, dass gerade männliche juvenile Ratten, vor allem in der Pubertät, ein gesteigertes exploratives Verhalten im Sinne eines vermehrten Verteidigungsverhaltens sowie einer erhöhten Risikobereitschaft zeigten (Arakawa 2007, Douglas et al. 2003). Der Höhepunkt des gesteigerten explorativen Verhaltens lag hierbei um den 35. Lebenstag herum (Arakawa 2007). Zusätzlich gibt es Hinweise darauf, dass juvenile Ratten, die früh von der Mutter entwöhnt wurden, ebenfalls ein vermehrtes exploratives Verhalten im OFT präsentieren, im Gegensatz zu juvenile Ratten die eine spätere Entwöhnung erfuhren (Ferdman et al. 2007). In der Studie von Ferdman et al. entwöhnte man die Ratten, aus der Gruppe der frühen Entwöhnung, am 21. postnatalen Tag (Ferdman et al. 2007). In unserer Arbeit trennten wir die Tiere aller Gruppen am 20. postnatalen Tag von der Mutter und hielten diese in Einzelkäfigen. Aufgrund der oben beschriebenen Umstände lässt sich erklären, weshalb die Tiere der Kontrollgruppe, genauso wie die Tiere der Trauma- und Shamgruppe, eine gesteigertes exploratives Verhalten in der inneren Zone 1 der Testbox zeigten.

Die fehlenden Signifikanzen zwischen der Trauma- und Shamgruppe könnten auf die Auswahl der Narkosemedikamente zurückgeführt werden. Zur Narkoseeinleitung bekamen die Ratten Medetomidin und Ketanest intraperitoneal gespritzt. Ketanest hemmt einen Rezeptorsubtyp des erregenden Transmitters Glutamat, der auch als NMDA-Rezeptor bezeichnet wird. Das Rezeptorprotein umfasst einen unspezifischen Ionenkanal, der vom Ketanest blockiert wird. Hierbei handelt es sich um einen nicht-kompetitiven Antagonismus. Nach Blockaden des NMDA-Rezeptors kommt es beim Menschen zur Bewusstlosigkeit, mit dissoziativem Erleben und postnarkotischer Amnesie, sowie zur Analgesie (Lüllmann et al. 2016). Die Aktivität der NMDA-Rezeptoren spielt in verschiedenen Stadien der Gehirnentwicklung eine wichtige Rolle und die Rezeptordichte ist während der Entwicklung deutlich höher als im Erwachsenenalter (Chang et al. 2014). Nach experimenteller medikamentöser Blockierung, sowohl kompetitiv als auch nicht-kompetitiv, der NMDA-Rezeptoren bei 21-28 Tage alten Ratten fand man bei diesen, signifikant reduzierte Gewichte des gesamten Gehirns. Bei Ratten ist dieser Zeitraum (Tag 21-28 postnatal) ein kritischer Zeitpunkt für die anatomische, funktionelle und auch neurochemische Entwicklung des Gehirns. Diese Tiere zeigten in Verhaltenstests eine deutliche Hyperaktivität mit unkoordinierten Bewegungen (Facchinetti et al. 1993). Zusätzlich wurden unterschiedliche Veränderungen auf Rezeptorebene nach Blockade des NMDA-Rezeptors, wie z.B. eine erhöhte Wiederaufnahme des Glutamats im Nucleus accumbens gefunden (Facchinetti et al. 1994). Im Gesamten wird davon ausgegangen, dass eine eingeschränkte Funktion des NMDA-Rezeptors bzw. die Blockade dieser, die Entwicklung der neuronalen Schaltkreise während sensibler Phasen der Hirnentwicklung beeinflusst (Chang et al.

2014). Auch in anderen Studien wurde ein Zusammenhang zwischen der Entstehung eines ADHS und einem beeinträchtigten NMDA-Rezeptor nachgewiesen (Archer et al. 2016, Qin et al. 2016). Daher liegt es nah zu vermuten, dass auch in der vorliegenden Arbeit die Gabe von Ketanest einen Einfluss auf die Entwicklung der neuronalen Schaltkreise im Gehirn bei den Versuchstieren hatte. Die Shamtiere, die ebenfalls Ketanest bekamen, zeigten im OFT ähnliche Verhaltensweisen, wie die Tiere mit einem milden SHT, was vermutlich auf die Blockade der NMDA-Rezeptoren durch die Gabe von Ketanest zurückzuführen ist. Dadurch werden wiederum die fehlenden Signifikanzen zwischen der Trauma- und Shamgruppe erklärlich.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die oben beschriebenen Unterschiede in Bezug auf die Aufenthaltsdauer, den zurückgelegten Weg und die Durchschnittsgeschwindigkeit in der inneren Zone 1 und äußeren Zone 2 ein Anhaltspunkt dafür sein könnten, dass Verhaltensänderungen bei juvenilen Ratten nach mildem SHT entstehen. Bei fehlenden Signifikanzen zwischen der Trauma- und Shamgruppe lässt sich nicht sicher ausschließen, ob Narkosemedikamente ebenfalls Änderungen im Explorationsverhalten und Aktivitätsniveau herbeiführen.

Im Anschluss an den OFT, fand die Habituationsphase statt. Habituation ist definiert, als die Abnahme der Reaktionen auf einen dargebotenen Reiz ohne positive oder negative Konsequenzen. Der wiederholte Stimulus wird vom zentralen Nervensystem als unwichtig eingestuft und eine Reaktion auf den Reiz unterbleibt (Ramaswami 2014). In unserer Arbeit fand eine Gewöhnung der Tiere an die Testarena an vier aufeinanderfolgenden Tagen statt. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bestand nicht. Insgesamt sank aber das Aktivitätsniveau der Trauma- und Shamgruppe etwas langsamer als das der Kontrollgruppe, was möglicherweise auf die oben genannten ursächlichen Faktoren zurückzuführen ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der OFT ein geeigneter Test ist, um Schäden im zentralen Nervensystem über Änderungen im Verhalten, darzustellen.

Zusätzlich lässt sich ableiten, dass eine Veränderung des Verhaltens, im Sinne einer Hyperaktivität, nach Schädel-Hirn-Trauma der Traumatiere stattgefunden hatte. Ersichtlich ist aber auch eine Verhaltensänderung der Shamtiere, die vermutlich auf die Modulation neuronaler Strukturen auf Rezeptorebene durch Gabe von Ketanest zurückzuführen war. Eine Habituation an die Testsituation hatte in allen Versuchsgruppen stattgefunden.

## 5.4 Novelty Object Recognition Test

Tiermodelle, in denen mittels Verhaltenstests sowohl Gedächtnis- und Lernprozesse untersucht werden, stehen schon seit Anfang des zwanzigsten Jahrhunderts im Interesse der Forschung (Antunes et al. 2012). Bei Menschen können diese Funktionen mit Sprache in Wort und Schrift überprüft werden. Da dies im Tiermodell nicht möglich ist, müssen verschiedene Verhaltensmuster von Tieren betrachtet werden, um kognitive Funktionen zu überprüfen (Antunes et al. 2012).

Die Vorteile des NOR-Test sind, dass viele verschiedene Fragestellungen damit untersucht werden können, wie z.B. Lernen und Gedächtnis, Neugierverhalten sowie der Einfluss bestimmter Hirnregionen in Bezug auf Lernen und Gedächtnis. Ebenso kann der Einfluss von Medikamenten auf bestimmte Verhaltensweisen bzw. Hirnregionen betrachtet werden (Antunes et al. 2012).

Ennaceur und Delacour entwickelten erstmalig den NOR-Test und folgerten, dass mittels dieses Tests eine einfache Überprüfung des Gedächtnisses bei Nagetieren erfolgen kann (Ennaceur et al. 1988). Mittlerweile ist dieser Test ein weit verbreitetes Modell zur Überprüfung von Gedächtnisinhalten und deren Veränderungen. Er eignet sich besonders zur Überprüfung des Arbeits-, Kurzzeit- und Langzeitgedächtnisses (Antunes et al. 2012). Dabei geht man davon aus, dass die Präferenz für ein neues Objekt bedeutet, dass das alte Objekt bereits im Gedächtnis der Ratte präsent ist (Ennaceur 2010). Darüber hinaus werden die Ergebnisse des NOR-Tests sowohl von hippocampalen als auch von kortikalen Läsionen beeinflusst (Buckmaster et al. 2004, Clark et al. 2000).

In der vorliegenden Arbeit fanden drei Testläufe in vorher definierten Zeitabständen statt. Gemessen wurden dieselben Parameter wie beim OFT; von besonderer Bedeutung waren aber hier die Parameter, die bezüglich der neuen Objekte erhoben wurden. Im ersten Testdurchlauf, der Eingewöhnungsphase, wurden den Tieren 2 gleiche Objekte, in diesem Fall 2 Tassen, präsentiert. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ergaben sich bei keinem der gemessenen Parameter, was auch primär nicht zu erwarten war. Es war lediglich zu erkennen, dass die Tiere aller Gruppen trotz durchgeführter Habituation, nach Platzierung der Objekte, mehr Wegstrecke in der inneren Zone als in der äußeren Zone zurücklegten. Dies machte deutlich, dass eine Reaktion aller Ratten auf eine Veränderung der Umwelt stattgefunden hatte. Offensichtlich scheint es in anderen Studien für die Ergebnisse der Testphase keinen Unterschied zu machen, ob für die Eingewöhnungsphase Objekte gewählt wurden, die eine hohe oder niedrige Spontanaktivität bei den Tieren auslösten (Antunes et al. 2012), so dass auch in der vorliegenden Arbeit davon

ausgegangen werde konnte, dass das erhöhte Aktivitätsniveau keinen Einfluss auf die eigentlichen Testergebnisse hatte.

Im zweiten Testdurchgang, der 1. Testphase, wurde eine Stunde nach der Eingewöhnung eine Tasse gegen eine Plastikbox ausgetauscht. Ziel war es hier sowohl das Arbeits- als auch das Kurzzeitgedächtnis zu untersuchen, bzw. zu überprüfen, ob es durch das milde SHT zu Beeinträchtigungen bei den oben genannten Speichersystemen kam. In diesem Testdurchlauf konnten signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen gesehen werden, die auf Läsionen im Kurz- und Arbeitsgedächtnis hinwiesen. In einer anderen Arbeit wurden ebenfalls traumatische Läsionen bei denselben Tieren, die für die Verhaltensversuche verwendet worden sind, nachgewiesen (Geers 2013). Hier wurde sowohl vermehrt Inflammation, Apoptose und ein diffuses axonales Trauma als auch eine Störung der Blut-Hirn-Schranke im Thalamus und Hippocampus mit Hilfe immunhistochemischer Methoden belegt (Geers 2013). In der Arbeit von Sychowski (Sychowski et al. 2019) wurde ebenfalls vermehrt Neuroinflammation und ein Untergang neuronaler Strukturen nach mildem SHT nachgewiesen.

Der Hippocampus, aber auch der Thalamus spielen eine wichtige Rolle in Bezug auf Lernen und Gedächtnis und bei Läsionen in diesen Strukturen scheint es zu Beeinträchtigungen in der Gedächtnisfunktion zu kommen, offenbar kommt es aber nicht zu einer vollständigen Amnesie bei Beschädigung oder Inaktivierung dieser Regionen, sondern nur zu Funktionseinschränkung in bestimmten Teilen des Gedächtnisses (Oliveira et al. 2010). In einer Studie von Pinar et al. (Pinar et al. 2019) wurde beschrieben, dass Schädigungen der hippocampalen synaptischen Plastizität zu Defiziten im Lernen und Gedächtnis führen (Pinar et al. 2019). Zusätzlich gibt es Hinweise darauf, dass Strukturen anderer Hirnregionen ebenfalls für die Gedächtnisbildung von Bedeutung sind (Broadbent et al. 2010). Dabei spielen dem Hippocampus benachbarte kortikale Areale, wie der entorhinale, perirhinale und der parahippocampale Cortex für die normale Funktion des Gedächtnisses eine Rolle (Baxter 2010). Der perirhinale Cortex gibt Informationen an den Hippocampus weiter, ist aber auch gleichzeitig eine Eingangsstelle für visuelle, olfaktorische und somatosensorische Informationen, die wiederum essentiell für die Wiedererkennung von Objekten sind (Clarke et al. 2010), so dass davon ausgegangen wird, dass gerade der perirhinale Cortex eine wichtige Rolle bei der Objekterkennung spielt und damit auch die Ergebnisse des NOR-Tests beeinflusst. In unterschiedlichen Arbeiten wurde ein Defizit im NOR-assoziierten Langzeitgedächtnis bei intaktem Kurzzeitgedächtnis, nach Ausschaltung des Hippocampus, gesehen (Baker et al. 2002, Bruel-Jungerman et al. 2005, Clark et al. 2000, Hammond et al. 2004). In einer Studie von Albasser (Albasser et al. 2009) konnte gezeigt werden, dass es bei Läsionen im perirhinalen Cortex zu signifikanten Korrelationen

mit den Ergebnissen des NOR-Tests kam. Je grösser der Schaden in dieser Hirnregion war, umso schlechter waren die Ergebnisse der Objekterkennung und die Tiere mit einer Läsion im perirhinalen Cortex waren nach SHT nicht in der Lage, auch nach nur kurzen Zeitintervallen zwischen Eingewöhnungs- und Testphase, zwischen dem neuen und dem alten Objekt zu unterscheiden (Albasser et al. 2009). Hippocampus und der perirhinale Cortex scheinen unterschiedliche Rollen bei der Objekterkennung zu spielen. Während der perirhinale Cortex dafür zuständig ist Aussagen über die Bekanntheit bzw. Neuheit eines Objekt zu treffen und eher mit dem Kurzzeitgedächtnis assoziiert wird, ist der Hippocampus für die Gedächtnisbildung verantwortlich und repräsentiert dabei eher das Langzeitgedächtnis (Hammond et al. 2004). Dadurch lässt sich in der vorliegenden Arbeit erklären, warum es nur zu geringen signifikanten Unterschieden kam. Die Präsentation des ersten unbekanntes Objekts erfolgte eine Stunde nach der Eingewöhnung, um die Funktion des Kurzzeitgedächtnisses zu überprüfen; eine Konsolidierung und damit eine Übertragung der Inhalte in das Langzeitgedächtnis ist hier, aufgrund des kurzen Zeitabstands, eher unwahrscheinlich. Da es durch das von uns ausgelöste milde SHT nachweislich zu keiner Schädigung im perirhinalen Cortex kam (Geers 2013), ist verständlich, dass es im Bereich des Kurzzeitgedächtnisses zu keiner Einschränkung der Kognition kam.

In der zweiten Testphase, dem dritten Testdurchgang, wurde 24 Stunden nach der Eingewöhnungsphase eine Tasse gegen eine Desinfektionsflasche ausgetauscht. Hierbei fand eine Überprüfung des Langzeitgedächtnisses statt. In der Arbeit von Marschner et al. (Marschner et al. 2019) konnte nach Induktion eines milden SHT in Mäusen eine Schädigung im räumlichen Langzeitgedächtnis nachgewiesen werden, die jedoch nur vorübergehend und reversibel waren (Marschner et al. 2019). In der vorliegenden Arbeit ergaben sich Signifikanzen sowohl zwischen der Trauma- und Kontrollgruppe, als auch zwischen der Trauma- und Shamgruppe. Insgesamt hielten sich die Tiere mit SHT länger an dem schon im zweiten Testdurchgang verwendeten Objekt B auf und auch die Eintritte in die Zone um das Objekt B herum war häufiger, als bei den Tieren ohne SHT, was auf eine Störung des Langzeitgedächtnisses schließen lassen könnte. Was bedeutet, dass das bekannte Objekt nicht als bekannt erkannt wurde und somit eine Speicherung im Langzeitgedächtnis nicht stattgefunden hatte. Die Konsolidierung von Information, also die Speicherung bzw. Überführung vom Kurzzeit- in das Langzeitgedächtnis von Informationen, scheint unter anderem ebenfalls abhängig vom Hippocampus zu sein (Oliveira et al. 2010). Eine Schädigung oder Inhibierung dieser Hirnregion führt zu einer Beeinträchtigung des anterograden Gedächtnisses (Broadbent et al. 2010), was hier die Signifikanzen zwischen den Gruppen erklären könnte, da in unserer Arbeit eine Schädigung unter anderem im Hippocampus der Traumatiere nachzuweisen war (Geers 2013).

In einer Arbeit von Goulart (Goulart et al. 2010) wird jedoch erwähnt, dass vor allem der dorsale Hippocampus eine essentielle Rolle für die Gedächtnisbildung bei der Objekterkennung spielt. Bei den Tieren, die für die Verhaltensversuche in unserer Arbeit verwendet worden sind, ist vornehmlich im vorderen, also ventralen Hippocampusbereich eine erhöhte Apoptoserate gesehen worden, während die Apoptose im dorsalem Bereich abnahm (Geers 2013). Dies könnte, neben anderen Ursachen, ein Grund für die geringe Anzahl an Signifikanzen zwischen der Trauma-, Sham- und Kontrollgruppe sein. Hierbei könnte trotz geschädigter Strukturen eine Konsolidierung der Informationen, also Speicherung des bekannten Objektes im Langzeitgedächtnis der Traumatiere, über noch intakte dorsale Hippocampusbereiche stattgefunden haben.

Zudem könnte ursächlich für die gering ausgeprägten Unterschiede sein, dass die Tiere gut an die Umgebung bzw. Umwelt, in der die Versuche stattfanden, gewöhnt waren. Es gibt Anhaltspunkte dafür, dass bei experimenteller Inaktivierung des Hippocampus das Objekterkennungsgedächtnis davon unberührt bleibt, wenn die Eingewöhnungsphase in einem schon bekanntem Umfeld stattgefunden hatte (Oliveira et al. 2010). Dieser Effekt scheint umso ausgeprägter, je reizärmer die Umgebung war, an die die Tiere im Vorfeld gewöhnt worden waren (Oliveira et al. 2010), was in der vorliegenden Arbeit der Fall war. Im Gegensatz dazu wird davon ausgegangen, dass der Hippocampus in die Konsolidierung bzw. Encodierung involviert ist, wenn die Tiere an eine Umgebung mit vielen Umweltreizen gewöhnt werden (Oliveira et al. 2010). In anderen Studien wurde ebenfalls bestätigt, dass die hippocampale Konsolidierung beim NOR-Test hauptsächlich dann beteiligt ist, wenn die Tiere sich in einem komplexen räumlichen Umfeld befinden und der Hippocampus bei der Objekterkennung nur dann eine Rolle spielt, wenn für den NOR-Test räumliche oder kontextabhängige Merksuren von Bedeutung sind. Bei einer Minimierung der äußeren Reize durch die umgebende Umwelt führt dies zu keiner Beeinträchtigung des Objekterkennungsgedächtnisses bei geschädigtem Hippocampus (Forwood et al. 2005, Langston et al. 2010, Oliveira et al. 2010, Winters et al. 2004). Früher wurde dem Hippocampus eine bedeutende Rolle für das Gedächtnismodell zugeschrieben, viele Studien haben mittlerweile demonstriert, dass die Inaktivierung des Hippocampus nicht eine generalisierte Amnesie erzeugt, sondern nur eine Schädigung bestimmter Bereiche des Gedächtnisses hervorruft, was wiederum die These des Mehrspeichermodells unterstützt (Poldrack et al. 2003). Bisher ist noch nicht vollständig geklärt, welche Strukturen des Gehirns sich funktionell bezüglich der Objekterkennung mit dem Hippocampus überschneiden, hierbei scheint ebenfalls der anatomisch benachbarte perirhinale Kortex für die Funktion des Langzeitgedächtnisses eine wichtige Rolle in diesem System zu spielen (Oliveira et al. 2010, Winters et al. 2008). Alle oben genannten

Mechanismen machen deutlich, warum die Unterschiede bezüglich der Gedächtnisleistung in dem von uns durchgeführten NOR-Test eher gering waren. Nicht nur das milde Trauma, sondern auch unterschiedliche Wege zur Überführung der Informationen in das Langzeitgedächtnis spielen offenbar eine Rolle bei der Entstehung der Ergebnisse der hier durchgeführten Verhaltenstests.

Unterschiede zwischen der Sham- und Kontrollgruppe in Bezug auf die kognitive Leistung, waren im NOR-Test nicht erkennbar. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass sowohl die Sham- als auch die Kontrollgruppe das bekannte Objekt als bekannt erkannten und nur die Traumatiere hier ein kognitives Defizit aufwiesen, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass die Narkosemedikamente keinen Einfluss auf die Gedächtnisleistung hatten. In einer Studie von Goulart (Goulart et al. 2010) wurde jedoch ein hemmender Effekt auf die Gedächtniskonsolidierung nach Gabe von Ketamin nachgewiesen. Hier wurde eine Beeinträchtigung des Langzeitgedächtnisses nach Gabe der Substanz gezeigt, die jedoch dosisabhängig war. Ketamin verhindert dabei die Produktion des brain-derived neurotrophic factor (BDNF), das wahrscheinlich bei Lernprozessen vermehrt im Hippocampus gebildet wird und diesen bei Lernvorgängen unterstützt (Antunes et al. 2012, Goulart et al. 2010). Hier wurde von Goulart et al. allerdings der Zeitpunkt, an dem das Medikament gegeben wurde, anders gewählt und lag deutlich näher an den Verhaltensversuchen als in der vorliegenden Arbeit.

Schlussendlich lässt sich sagen, dass in der vorliegenden Arbeit mittels des NOR-Tests ein Einfluss auf Verhalten und Kognition nach SHT in Teilaspekten zu belegen war. Ein Schädigung bestimmter Hirnstrukturen hatte nachweislich stattgefunden (Geers 2013), so dass davon ausgegangen werden konnte, dass die oben genannten Faktoren ursächlich für die beschriebenen Ergebnisse und die geringen Signifikanzen waren. Der NOR-Test scheint eine ausreichende Sensitivität zu besitzen, um zumindest in bestimmten Bereichen Beeinträchtigungen nach einem milden SHT oder nach Gabe von Medikamenten zu detektieren. Das Alter der juvenilen Ratten scheint für den NOR-Test keine Rolle zu spielen. Reger (Reger et al. 2009) beschrieb in seiner Arbeit, dass adulte und juvenile Ratten gleiche Ergebnisse im NOR-Test erzielten, lediglich neonatale bzw. Ratten, die frisch von der Mutter entwöhnt waren, zeigten Defizite im Langzeitgedächtnis. Die Entwicklung des medialen temporalen Lappens, derjenigen Hirnregion, die u.a. für die Objekterkennung zuständig ist, ist in der juvenilen Phase der Ratten bereits abgeschlossen. Bei jüngeren Ratten kann die fehlende Ausreifung der o.g. Hirnstrukturen jedoch noch zur einer „infantilen Amnesie“ führen (Reger et al. 2009), was in der vorliegenden Arbeit aber nicht von Bedeutung war.

Schlussendlich lässt sich mittels des NOR-Tests ein kognitives Defizit im Bereich des Arbeits-, Kurz- und Langzeitgedächtnisses belegen, auch wenn nur Teile der Hirnstrukturen, die an der Gedächtnisbildung beteiligt sind, geschädigt waren. Dies wiederum lässt auf eine hohe Sensitivität des NOR-Tests in Bezug auf Beeinträchtigungen des Gedächtnisses schließen.

## 5.5 Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit gelang die Induktion eines milden SHT mittels des modifizierten Weight Drop Modells nach Adelson für juvenile Ratten. Der direkte immunhistochemische Nachweis des Traumas wurde hierbei bei den gleichen Ratten in einer anderen Arbeit geführt (Geers 2013).

Weiterhin konnte im Open Field Test, eine Verhaltensänderung in Form einer Hyperaktivität gezeigt werden, die am ehesten mit den Symptomen eines ADHS bei Kindern oder Jugendlichen vereinbar ist. Ein zusätzlicher Einfluss auf exploratives Verhalten nach Gabe von Ketanest lässt sich im OFT nicht sicher ausschließen. Auch im Novelty Object Recognition Test gelang der Nachweis von Teilbeeinträchtigungen der Gedächtnisleistungen nach SHT. Hierbei ergaben sich aber signifikante Unterschiede zwischen der Trauma- und Shamgruppe, so dass Einflüsse der Narkose auf die Ergebnisse des NOR-Tests zumindest ausgeschlossen werden konnten.

Das milde SHT ist eines der häufigsten Gründe für erworbene Behinderungen in der Kindheit und ist mit 90% die häufigste Form des SHTs bei Kindern und Jugendlichen (Brunnberg et al. 2012). Trotz der großen klinischen Bedeutung wird das milde SHT immer noch zu selten diagnostiziert und führt daher nicht selten zu Hirnschädigungen (Simma et al. 2016). Neuere Analysen zeigen einen Zusammenhang zu neurodegenerativen Erkrankungen wie Demenz, Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson durch Amyloidablagerungen im Gehirn (Simma et al. 2016). Kinder, die nach einem mildem SHT an einem ADHS erkrankt sind, leiden häufig in der Adoleszenz sowie im frühen Erwachsenenalter unter Lernschwierigkeiten, Sozialisierungsstörung und zusätzlichen psychiatrischen Erkrankungen (Klein et al. 2012). ADHS sowie die damit verbundenen Folgen verursachen mit einer der höchsten Kosten im Gesundheitssystem (Matthews et al. 2014) und auch die gesellschaftlichen Auswirkungen, wie z.B. Beeinträchtigungen durch ADHS im Straßenverkehr, Verbindung zwischen aggressiv-dissozialem Verhalten oder Strafvollzug und ADHS, sind von Bedeutung (Petermann et al. 2013). Daher ist es von hohem klinischen Nutzen, die Pathomechanismen nach SHT bei Kindern genauer zu untersuchen, um die Diagnostik und die geeignete Therapie nach mildem SHT zu verbessern und um neurologischen Langzeitfolgen und weitere Schäden zu vermeiden. (Simma et al. 2016).

Unser Modell stellt einen geeigneten Versuchsaufbau, zum Nachweis von Änderungen in Verhalten und Kognition in juvenilen Ratten nach mildem SHT dar. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich mittels des Novelty Object Recognition Tests kognitive Defizite sowohl im Kurz-, Arbeits- und Langzeitgedächtnis nachweisen lassen auch wenn nur

Teilaspekte des Gedächtnisses Schädigungen aufwiesen, was für die Sensitivität des Tests spricht. Die Ergebnisse bilden daher eine Grundlage für weiterführende Untersuchungen, um andere kognitive Defizite nach mildem SHT tierexperimentell zu belegen, die der NOR-Test nicht detektieren kann, wie z.B. der Water Maze Test, der das räumliche Lernen von Nagern überprüft (Vorhees et al. 2006) oder der Beam Walking Test, der feinmotorische Defizite bei Nagern detektieren kann (Mychasiuk et al. 2015). Auch der Open Field Test belegt eine Änderung im Verhalten nach einem mildem SHT. Da es hier einen Hinweis auf ein ADHS nach mildem SHT gibt, könnte in anderen Verhaltenstests, die andere Symptome des ADHS, als die Hyperaktivität, identifizieren weiter untersucht werden, wie z.B. der Go/No-Go Task, der eine gesteigerte Impulsivität bei Nagern erkennen kann (Mychasiuk et al. 2015). Jedoch müsste für folgende Untersuchungen eine andere Auswahl der Narkosemedikamente erfolgen, um Auswirkungen dieser auf Verhalten zu vermeiden. Zusätzlich zeigen die Tests, dass bereits Beeinträchtigungen, die durch ein mildes SHT erzeugt werden und die nicht mit einer signifikanten Schädigung der Hirnstruktur einhergehen kognitive Defizite und Verhaltensänderungen auslösen können. Damit wurde in dieser Arbeit ein Modell etabliert, dessen tierexperimentellen Ergebnisse sich zumindest in Grundzügen in den Bereich der Humanmedizin übertragen lassen. Darauf aufbauend lassen sich wiederum in weiterführenden Studien adäquate Therapieformen, zur Minimierung von neurologischen Langzeitschäden, etablieren.

## 6. Literaturverzeichnis

Adelson PD, Robichaud P, Hamilton RL, Kochanek PM. 1996. A model of diffuse traumatic brain injury in the immature rat. *J Neurosurg* 85:877-884.

Adelson PD, Whalen MJ, Kochanek PM, Robichaud P, Carlos TM. 1998. Blood brain barrier permeability and acute inflammation in two models of traumatic brain injury in the immature rat: a preliminary report. *Acta Neurochir Suppl* 71:104-106.

Adeyemo BO, Biederman J, Zafonte R, Kagan E, Spencer TJ, Uchida M, Kenworthy T, Spencer AE, Faraone SV. 2014. Mild traumatic brain injury and ADHD: a systematic review of the literature and meta-analysis. *J Atten Disord* 18:576-584.

Albasser MM, Davies M, Futter JE, Aggleton JP. 2009. Magnitude of the object recognition deficit associated with perirhinal cortex damage in rats: Effects of varying the lesion extent and the duration of the sample period. *Behav Neurosci* 123:115-124.

Almeida-Suhett CP, Prager EM, Pidoplichko V, Figueiredo TH, Marini AM, Li Z, Eiden LE, Braga MF. 2014. Reduced GABAergic inhibition in the basolateral amygdala and the development of anxiety-like behaviors after mild traumatic brain injury. *PLoS One* 9:e102627.

Antunes M, Biala G. 2012. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn Process* 13:93-110.

Arakawa H. 2007. Age-dependent change in exploratory behavior of male rats following exposure to threat stimulus: Effect of juvenile experience. *Developmental Psychobiology: The Journal of the International Society for Developmental Psychobiology* 49:522-530.

Archer T, Garcia D. 2016. Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: Focus upon Aberrant N-Methyl-D-Aspartate Receptors Systems. *Curr Top Behav Neurosci* 29:295-311.

Atkinson RC, Shiffrin RM. 1968. Human memory a proposed system and its control processes. Academic Press.

Aumüller G. 2014. Anatomie. Thieme.

Baddeley A. 1998. Working memory. *C R Acad Sci III* 321:167-173.

Baker KB, Kim JJ. 2002. Effects of stress and hippocampal NMDA receptor antagonism on recognition memory in rats. *Learn Mem* 9:58-65.

Barak O, Tsodyks M. 2014. Working models of working memory. *Curr Opin Neurobiol* 25:20-24.

- Barlow KM, Crawford S, Stevenson A, Sandhu SS, Belanger F, Dewey D. 2010. Epidemiology of postconcussion syndrome in pediatric mild traumatic brain injury. *Pediatrics* 126:e374.
- Baxter MG. 2010. "I've seen it all before": explaining age-related impairments in object recognition. Theoretical comment on Burke et al. (2010). *Behav Neurosci* 124:706-709.
- Biagas KV, Grundl PD, Kochanek PM, Schiding JK, Nemoto EM. 1996. Posttraumatic hyperemia in immature, mature, and aged rats: autoradiographic determination of cerebral blood flow. *J Neurotrauma* 13:189-200.
- Bliss TV, Gardner-Medwin AR. 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232:357-374.
- Blumbergs PC, Scott G, Manavis J, Wainwright H, Simpson DA, McLean AJ. 1994. Staining of amyloid precursor protein to study axonal damage in mild head injury. *Lancet* 344:1055-1056.
- Bodnar CN, Roberts KN, Higgins EK, Bachstetter AD. 2019. A systematic review of closed head injury models of mild traumatic brain injury in mice and rats. *J Neurotrauma*.
- Bouma GJ, Muizelaar JP, Stringer WA, Choi SC, Fatouros P, Young HF. 1992. Ultra-early evaluation of regional cerebral blood flow in severely head-injured patients using xenon-enhanced computerized tomography. *J Neurosurg* 77:360-368.
- Broadbent NJ, Gaskin S, Squire LR, Clark RE. 2010. Object recognition memory and the rodent hippocampus. *Learn Mem* 17:5-11.
- Bruel-Jungerman E, Laroche S, Rampon C. 2005. New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. *Eur J Neurosci* 21:513-521.
- Brunnberg S, Brentrup A, Fiedler B. 2012. Das Schädel-Hirn-Trauma bei Kindern. *Intensivmedizin up2date* 08:269-285.
- Bryan RM, Jr., Cherian L, Robertson C. 1995. Regional cerebral blood flow after controlled cortical impact injury in rats. *Anesth Analg* 80:687-695.
- Buckmaster CA, Eichenbaum H, Amaral DG, Suzuki WA, Rapp PR. 2004. Entorhinal cortex lesions disrupt the relational organization of memory in monkeys. *J Neurosci* 24:9811-9825.
- Catroppa C, Anderson V, Ditchfield M, Coleman L. 2008. Using magnetic resonance imaging to predict new learning outcome at 5 years after childhood traumatic brain injury. *J Child Neurol* 23:486-496.

- Chang JP, Lane HY, Tsai GE. 2014. Attention deficit hyperactivity disorder and N-methyl-D-aspartate (NMDA) dysregulation. *Curr Pharm Des* 20:5180-5185.
- Chesnut RM, Marshall LF, Klauber MR, Blunt BA, Baldwin N, Eisenberg HM, Jane JA, Marmarou A, Foulkes MA. 1993. The role of secondary brain injury in determining outcome from severe head injury. *J Trauma* 34:216-222.
- Clark RE, Zola SM, Squire LR. 2000. Impaired recognition memory in rats after damage to the hippocampus. *J Neurosci* 20:8853-8860.
- Clarke JR, Cammarota M, Gruart A, Izquierdo I, Delgado-Garcia JM. 2010. Plastic modifications induced by object recognition memory processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:2652-2657.
- Creed JA, DiLeonardi AM, Fox DP, Tessler AR, Raghupathi R. 2011. Concussive brain trauma in the mouse results in acute cognitive deficits and sustained impairment of axonal function. *J Neurotrauma* 28:547-563.
- Daum I, Ackermann H, Schugens MM, Reimold C, Dichgans J, Birbaumer N. 1993. The cerebellum and cognitive functions in humans. *Behav Neurosci* 107:411-419.
- Deppe W. 2014. Verhaltensauffälligkeiten und therapeutische Ansätze nach Schädel-Hirn-Trauma. *neuroreha* 6:136-141.
- Dixon CE, Clifton GL, Lighthall JW, Yaghmai AA, Hayes RL. 1991. A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat. *J Neurosci Methods* 39:253-262.
- Dixon CE, Lyeth BG, Povlishock JT, Findling RL, Hamm RJ, Marmarou A, Young HF, Hayes RL. 1987. A fluid percussion model of experimental brain injury in the rat. *J Neurosurg* 67:110-119.
- Douglas LA, Varlinskaya EI, Spear LP. 2003. Novel-object place conditioning in adolescent and adult male and female rats: effects of social isolation. *Physiology & behavior* 80:317-325.
- Dunning J, Daly JP, Malhotra R, Stratford-Smith P, Lomas J, Lecky F, Batchelor J, Mackway-Jones K. 2004. The implications of NICE guidelines on the management of children presenting with head injury. *Archives of disease in childhood* 89:763-767.
- Ennaceur A. 2010. One-trial object recognition in rats and mice: methodological and theoretical issues. *Behav Brain Res* 215:244-254.
- Ennaceur A, Delacour J. 1988. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res* 31:47-59.
- Facchinetti F, Ciani E, Dall'Olio R, Virgili M, Contestabile A, Fonnum F. 1993. Structural, neurochemical and behavioural consequences of neonatal blockade of NMDA receptor

through chronic treatment with CGP 39551 or MK-801. *Brain Res Dev Brain Res* 74:219-224.

Facchinetti F, Dall'Olio R, Ciani E, Sparapani M, Virgili M, Contestabile A. 1994. Long-lasting effects of chronic neonatal blockade of N-methyl-D-aspartate receptor through the competitive antagonist CGP 39551 in rats. *Neuroscience* 60:343-353.

Feeney DM, Boyeson MG, Linn RT, Murray HM, Dail WG. 1981. Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat. *Brain Res* 211:67-77.

Ferdman N, Murmu R, Bock J, Braun K, Leshem M. 2007. Weaning age, social isolation, and gender, interact to determine adult explorative and social behavior, and dendritic and spine morphology in prefrontal cortex of rats. *Behavioural brain research* 180:174-182.

Finnie JW, Blumbergs PC. 2002. Traumatic brain injury. *Vet Pathol* 39:679-689.

Firsching RR, E.; Mauer, U.M.; Sakowitz, O.W.; Messing-Jünger, M.; Engelhard, L. für DGAI; Schwenkreis, P. für DGN, Linn, J. für DGNR; Biberthaler, P. für DGU und Schwerdtfeger, K. 2015. S2-Leitlinie Schädel-Hirn-Trauma im Erwachsenenalter. (2018/12/20 2018; [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/008-001l\\_S2e\\_Schaedelhirntrauma\\_SHT\\_Erwachsene\\_2016-06.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/008-001l_S2e_Schaedelhirntrauma_SHT_Erwachsene_2016-06.pdf))

Foda MA, Marmarou A. 1994. A new model of diffuse brain injury in rats. Part II: Morphological characterization. *J Neurosurg* 80:301-313.

Forwood SE, Winters BD, Bussey TJ. 2005. Hippocampal lesions that abolish spatial maze performance spare object recognition memory at delays of up to 48 hours. *Hippocampus* 15:347-355.

Fuster JM. 1999. *Memory in the cerebral cortex: An empirical approach to neural networks in the human and nonhuman primate.* MIT press.

Gaskin S, Tardif M, Cole E, Piterkin P, Kayello L, Mumby DG. 2010. Object familiarization and novel-object preference in rats. *Behav Processes* 83:61-71.

Geers A. 2013. *Inflammation und Apoptose nach traumatischer Hirnschädigung in juvenilen Ratten.* pdf

Goldman-Rakic PS. 1996. Regional and cellular fractionation of working memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13473-13480.

Goulart BK, de Lima MN, de Farias CB, Reolon GK, Almeida VR, Quevedo J, Kapczinski F, Schroder N, Roesler R. 2010. Ketamine impairs recognition memory consolidation and prevents learning-induced increase in hippocampal brain-derived neurotrophic factor levels. *Neuroscience* 167:969-973.

- Gould TD. 2009. Mood and anxiety related phenotypes in mice characterization using behavioral tests. *Humana*.
- Graham DI. 1985. The pathology of brain ischaemia and possibilities for therapeutic intervention. *Br J Anaesth* 57:3-17.
- Grimmelt AC, Eitzen S, Balakhadze I, Fischer B, Wolfer J, Schiffbauer H, Gorji A, Greiner C. 2011. Closed traumatic brain injury model in sheep mimicking high-velocity, closed head trauma in humans. *Cent Eur Neurosurg* 72:120-126.
- Haar CV, Martens KM, Bashir A, McInnes KA, Cheng WH, Cheung H, Stukas S, Barron C, Ladner T, Welch KA. 2019. Repetitive closed-head impact model of engineered rotational acceleration (CHIMERA) injury in rats increases impulsivity, decreases dopaminergic innervation in the olfactory tubercle and generates white matter inflammation, tau phosphorylation and degeneration. *Experimental neurology* 317:87-99.
- Hall CS. 1934. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Journal of Comparative psychology* 18:385.
- Hammond RS, Tull LE, Stackman RW. 2004. On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory. *Neurobiol Learn Mem* 82:26-34.
- Hebb DO. 1949. <<The>> organization of behavior a neuropsychological theory. John Wiley & Sons.
- Hehar H, Yeates K, Kolb B, Esser MJ, Mychasiuk R. 2015. Impulsivity and Concussion in Juvenile Rats: Examining Molecular and Structural Aspects of the Frontostriatal Pathway. *PLoS One* 10:e0139842.
- Hendrich KS, Kochanek PM, Williams DS, Schiding JK, Marion DW, Ho C. 1999. Early perfusion after controlled cortical impact in rats: quantification by arterial spin-labeled MRI and the influence of spin-lattice relaxation time heterogeneity. *Magn Reson Med* 42:673-681.
- Horzyk A, Starzyk JA, Graham J. 2017. Integration of Semantic and Episodic Memories. *IEEE Trans Neural Netw Learn Syst* 28:3084-3095.
- Hylin MJ, Orsi SA, Rozas NS, Hill JL, Zhao J, Redell JB, Moore AN, Dash PK. 2013. Repeated mild closed head injury impairs short-term visuospatial memory and complex learning. *J Neurotrauma* 30:716-726.
- Izquierdo I, Medina JH, Vianna MR, Izquierdo LA, Barros DM. 1999. Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behav Brain Res* 103:1-11.
- Januschek E, Eymann R. 2018. Schädel-Hirn-Trauma bei Kindern. Pages 609-628. *Pädiatrische Neurochirurgie*, Springer.

Johnson VE, Meaney DF, Cullen DK, Smith DH. 2015. Animal models of traumatic brain injury. *Handb Clin Neurol* 127:115-128.

Jonides J, Lewis RL, Nee DE, Lustig CA, Berman MG, Moore KS. 2008. The mind and brain of short-term memory. *Annu Rev Psychol* 59:193-224.

Junger EC, Newell DW, Grant GA, Avellino AM, Ghatan S, Douville CM, Lam AM, Aaslid R, Winn HR. 1997. Cerebral autoregulation following minor head injury. *J Neurosurg* 86:425-432.

Kapapa T, Pfister U, Konig K, Sasse M, Woischneck D, Heissler HE, Rickels E. 2010. Head trauma in children, part 3: clinical and psychosocial outcome after head trauma in children. *J Child Neurol* 25:409-422.

Keenan HT, Runyan DK, Nocera M. 2006. Longitudinal follow-up of families and young children with traumatic brain injury. *Pediatrics* 117:1291-1297.

Kessler H, Rothgangel S. 2015. *Medizinische Psychologie und Soziologie Kurzlehrbuch*. Thieme.

Klatzo I. 1985. Brain oedema following brain ischaemia and the influence of therapy. *Br J Anaesth* 57:18-22.

Klein RG, Mannuzza S, Olazagasti MA, Roizen E, Hutchison JA, Lashua EC, Castellanos FX. 2012. Clinical and functional outcome of childhood attention-deficit/hyperactivity disorder 33 years later. *Arch Gen Psychiatry* 69:1295-1303.

Knierim JJ. 2015. The hippocampus. *Curr Biol* 25:R1116-1121.

Kochanek PM, et al. 1995. Severe controlled cortical impact in rats: assessment of cerebral edema, blood flow, and contusion volume. *J Neurotrauma* 12:1015-1025.

Konigs M, et al. 2015. Pediatric Traumatic Brain Injury and Attention Deficit. *Pediatrics* 136:534-541.

Ku Y, Bodner M, Zhou YD. 2015. Prefrontal cortex and sensory cortices during working memory: quantity and quality. *Neurosci Bull* 31:175-182.

Langston RF, Wood ER. 2010. Associative recognition and the hippocampus: differential effects of hippocampal lesions on object-place, object-context and object-place-context memory. *Hippocampus* 20:1139-1153.

Lassen NA. 1966. The luxury-perfusion syndrome and its possible relation to acute metabolic acidosis localised within the brain. *Lancet* 2:1113-1115.

Lau A, Tymianski M. 2010. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Arch* 460:525-542.

Laurer HL, McIntosh TK. 1999. Experimental models of brain trauma. *Curr Opin Neurol* 12:715-721.

Leidel B, Lindner T, Wolf S, Bogner V, Steinbeck A, Börner N, Peiser C, Audebert H, Biberthaler P, Kanz K-G. 2015. Leichtes Schädel-Hirn-Trauma bei Kindern und Erwachsenen. *Der Unfallchirurg* 118:53-70.

Lisman J. 2017. Glutamatergic synapses are structurally and biochemically complex because of multiple plasticity processes: long-term potentiation, long-term depression, short-term potentiation and scaling. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 372.

Lüllmann H, Mohr K, Wehling M, Hein L. 2016. Pharmakologie und Toxikologie : Arzneimittelwirkungen verstehen - Medikamente gezielt einsetzen : ein Lehrbuch für Studierende der Medizin, der Pharmazie und der Biowissenschaften, eine Informationsquelle für Ärzte, Apotheker und Gesundheitspolitiker.

Luscher C, Malenka RC. 2012. NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4.

MacManus JP, Linnik MD. 1997. Gene expression induced by cerebral ischemia: an apoptotic perspective. *J Cereb Blood Flow Metab* 17:815-832.

Manabe T. 2017. NMDA receptor-independent long-term potentiation in hippocampal interneurons. *J Physiol* 595:3263-3264.

Marklund N. 2016. Rodent Models of Traumatic Brain Injury: Methods and Challenges. *Methods Mol Biol* 1462:29-46.

Marmarou A, Foda MA, van den Brink W, Campbell J, Kita H, Demetriadou K. 1994. A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics. *J Neurosurg* 80:291-300.

Marschner L, Schreurs A, Lechat B, Mogensen J, Roebroek A, Ahmed T, Balschun D. 2019. Single mild traumatic brain injury results in transiently impaired spatial long-term memory and altered search strategies. *Behavioural brain research* 365:222-230.

Matthews M, Nigg JT, Fair DA. 2014. Attention deficit hyperactivity disorder. *Curr Top Behav Neurosci* 16:235-266.

Mazzola CA, Adelson PD. 2002. Critical care management of head trauma in children. *Crit Care Med* 30:S393-401.

McDonald AJ, Mott DD. 2017. Functional neuroanatomy of amygdalohippocampal interconnections and their role in learning and memory. *J Neurosci Res* 95:797-820.

Meisel C, Schwab JM, Prass K, Meisel A, Dirnagl U. 2005. Central nervous system injury-induced immune deficiency syndrome. *Nat Rev Neurosci* 6:775-786.

- Mesulam MM. 1990. Large-scale neurocognitive networks and distributed processing for attention, language, and memory. *Ann Neurol* 28:597-613.
- Missios S, Harris BT, Dodge CP, Simoni MK, Costine BA, Lee YL, Quebada PB, Hillier SC, Adams LB, Duhaime AC. 2009. Scaled cortical impact in immature swine: effect of age and gender on lesion volume. *J Neurotrauma* 26:1943-1951.
- Morgane PJ, Galler JR, Mokler DJ. 2005. A review of systems and networks of the limbic forebrain/limbic midbrain. *Prog Neurobiol* 75:143-160.
- Mouzon B, Chaytow H, Crynen G, Bachmeier C, Stewart J, Mullan M, Stewart W, Crawford F. 2012. Repetitive mild traumatic brain injury in a mouse model produces learning and memory deficits accompanied by histological changes. *J Neurotrauma* 29:2761-2773.
- Mulisch M, Welsch U. 2015. *Romeis - Mikroskopische Technik*. Springer Berlin Heidelberg.
- Mychasiuk R, Hehar H, Esser MJ. 2015. A mild traumatic brain injury (mTBI) induces secondary attention-deficit hyperactivity disorder-like symptomology in young rats. *Behav Brain Res* 286:285-292.
- Norris D. 2017. Short-term memory and long-term memory are still different. *Psychol Bull* 143:992-1009.
- Obrist WD, Gennarelli TA, Segawa H, Dolinskas CA, Langfitt TW. 1979. Relation of cerebral blood flow to neurological status and outcome in head-injured patients. *J Neurosurg* 51:292-300.
- Obrist WD, Langfitt TW, Jaggi JL, Cruz J, Gennarelli TA. 1984. Cerebral blood flow and metabolism in comatose patients with acute head injury. Relationship to intracranial hypertension. *J Neurosurg* 61:241-253.
- Oliveira AM, Hawk JD, Abel T, Havekes R. 2010. Post-training reversible inactivation of the hippocampus enhances novel object recognition memory. *Learn Mem* 17:155-160.
- Olton DS, Papas BC. 1979. Spatial memory and hippocampal function. *Neuropsychologia* 17:669-682.
- Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S, Klinke R, Brenner B, Gay W-R, Rothenburger A. 2018. *Physiologie*. Georg Thieme Verlag.
- Petermann F, Koglin U. 2013. *Aggression und Gewalt von Kindern und Jugendlichen: Hintergründe und Praxis*. Springer-Verlag.
- Petridis AK, Doukas A, Maslehaty H, Mehdorn HM. 2012. Predictors and incidence of posttraumatic seizures in children and adolescents after brain injury. *Clin Pract* 2:e66.

- Pinar C, Fontaine CJ, Christie B, Nahirney PC. 2019. Repeated mild traumatic brain injury in the juvenile brain: Investigations on synaptic plasticity in the hippocampus. *The FASEB Journal* 33:448.445-448.445.
- Poldrack RA, Packard MG. 2003. Competition among multiple memory systems: converging evidence from animal and human brain studies. *Neuropsychologia* 41:245-251.
- Povlishock JT, Christman CW. 1995. The pathobiology of traumatically induced axonal injury in animals and humans: a review of current thoughts. *J Neurotrauma* 12:555-564.
- Prins ML, Hovda DA. 2003. Developing experimental models to address traumatic brain injury in children. *J Neurotrauma* 20:123-137.
- Qin L, Liu W, Ma K, Wei J, Zhong P, Cho K, Yan Z. 2016. The ADHD-linked human dopamine D4 receptor variant D4.7 induces over-suppression of NMDA receptor function in prefrontal cortex. *Neurobiol Dis* 95:194-203.
- Ramaswami M. 2014. Network plasticity in adaptive filtering and behavioral habituation. *Neuron* 82:1216-1229.
- Reger ML, Hovda DA, Giza CC. 2009. Ontogeny of Rat Recognition Memory measured by the novel object recognition task. *Dev Psychobiol* 51:672-678.
- Rickels E. 2006. Schädel-Hirn-Verletzung Epidemiologie und Versorgung ; Ergebnisse einer prospektiven Studie. Zuckschwerdt.
- Rink A, Fung KM, Trojanowski JQ, Lee VM, Neugebauer E, McIntosh TK. 1995. Evidence of apoptotic cell death after experimental traumatic brain injury in the rat. *Am J Pathol* 147:1575-1583.
- Romijn HJ, Hofman MA, Gramsbergen A. 1991. At what age is the developing cerebral cortex of the rat comparable to that of the full-term newborn human baby? *Early Hum Dev* 26:61-67.
- Schiebler TH, Korf H-W. 2007. Anatomie Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie unter Berücksichtigung des Gegenstandskatalogs. Steinkopff.
- Schmidt RF. 2010. Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie. Springer.
- Sengupta P. 2013. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *Int J Prev Med* 4:624-630.
- Shallice T, Warrington EK. 1970. Independent functioning of verbal memory stores: a neuropsychological study. *Q J Exp Psychol* 22:261-273.

- Shapira Y, Shohami E, Sidi A, Soffer D, Freeman S, Cotev S. 1988. Experimental closed head injury in rats: mechanical, pathophysiologic, and neurologic properties. *Crit Care Med* 16:258-265.
- Simma B, Stelzl W, Schwerzler T, Seidel B, Lütschg J. 2016. Mildes Schädel-Hirn-Trauma. *Monatsschrift Kinderheilkunde* 164:739-745.
- Sinopoli KJ, Dennis M. 2012. Inhibitory control after traumatic brain injury in children. *Int J Dev Neurosci* 30:207-215.
- Smith DH, Chen XH, Pierce JE, Wolf JA, Trojanowski JQ, Graham DI, McIntosh TK. 1997. Progressive atrophy and neuron death for one year following brain trauma in the rat. *J Neurotrauma* 14:715-727.
- Squire LR. 1992. Declarative and nondeclarative memory: multiple brain systems supporting learning and memory. *J Cogn Neurosci* 4:232-243.
- Statz JK, Ciarlone SL, Goodrich JA, McCarron RM, Walker PB, Norris JN, Ahlers ST, Tschiffely AE. 2019. Affective profiling for anxiety-like behavior in a rodent model of mTBI. *Behavioural brain research* 368:111895.
- Striebel HW. 2014. <<Die>> Anästhesie Grundlagen und Praxis. Schattauer.
- Stubbe H, Wölfer J. 2012. Schädel-Hirn-Trauma beim Erwachsenen. *Intensivmedizin* up2date 08:253-269.
- Studer M, Simonetti BG, Joeris A, Margelisch K, Steinlin M, Roebbers CM, Heinks T. 2014. Post-concussive symptoms and neuropsychological performance in the post-acute period following pediatric mild traumatic brain injury. *Journal of the International Neuropsychological Society* 20:982-993.
- Sullivan HG, Martinez J, Becker DP, Miller JD, Griffith R, Wist AO. 1976. Fluid-percussion model of mechanical brain injury in the cat. *J Neurosurg* 45:521-534.
- Sychowski DJ, Love J, Greene R, Peterson DA. 2019. Investigation of the Neuroinflammatory Response in Hippocampal Subfields After a Single Mild Traumatic Brain Injury (mTBI) in Rats.
- Tang YP, Noda Y, Hasegawa T, Nabeshima T. 1997a. A concussive-like brain injury model in mice (II): selective neuronal loss in the cortex and hippocampus. *J Neurotrauma* 14:863-873.
- Tang YP, Noda Y, Nabeshima T. 1997b. Involvement of activation of dopaminergic neuronal system in learning and memory deficits associated with experimental mild traumatic brain injury. *Eur J Neurosci* 9:1720-1727.

Vorhees CV, Williams MT. 2006. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc* 1:848-858.

Walf AA, Koonce C, Manley K, Frye CA. 2009. Proestrous compared to diestrous wildtype, but not estrogen receptor beta knockout, mice have better performance in the spontaneous alternation and object recognition tasks and reduced anxiety-like behavior in the elevated plus and mirror maze. *Behav Brain Res* 196:254-260.

Wallesch C-W, Kulke H. 2017. Schädel-Hirn-Trauma. Neurologische Rehabilitation und Neuropsychologie. Eine Einführung für Ärzte, Psychologen, Therapeuten und Pflegende. Kohlhammer.

Waugh NC, Norman DA. 1965. Primary Memory. *Psychol Rev* 72:89-104.

Weiskrantz L. 1990. Problems of learning and memory: one or multiple memory systems? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 329:99-108.

Whishaw IQ, Pellis SM, Gorny BP. 1992. Skilled reaching in rats and humans: evidence for parallel development or homology. *Behav Brain Res* 47:59-70.

Winters BD, Forwood SE, Cowell RA, Saksida LM, Bussey TJ. 2004. Double dissociation between the effects of peri-postrhinal cortex and hippocampal lesions on tests of object recognition and spatial memory: heterogeneity of function within the temporal lobe. *J Neurosci* 24:5901-5908.

Winters BD, Saksida LM, Bussey TJ. 2008. Object recognition memory: neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. *Neurosci Biobehav Rev* 32:1055-1070.

Wirth P, Yu W, Kimball AL, Liao J, Berkner P, Glenn MJ. 2017. New method to induce mild traumatic brain injury in rodents produces differential outcomes in female and male Sprague Dawley rats. *J Neurosci Methods* 290:133-144.

## 7. Danksagung

Ganz besonders herzlich und ausdrücklich möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. rer. physiol. Carola Meier für die Ermöglichung dieser Arbeit, die gemeinsame Ausarbeitung des Themas, sowie die hervorragende Beratung, die wertvollen Tipps und die langjährige, intensive Betreuung bedanken. Ohne Ihre Unterstützung wäre die Fertigstellung dieser Arbeit niemals möglich gewesen.

Mein weiterer Dank geht an die Forschungsgruppe und allen Mitarbeitern des ZKF (Zentrum für klinische Forschung) der Ruhr-Universität Bochum für die gute und kollegiale Unterstützung und Zusammenarbeit. Ihre Hilfe und hohe Motivation waren ein wichtiger Beitrag für die Ausarbeitung dieser Arbeit. Mein besonderer Dank geht hierbei an Frau Dr. rer. nat. Astrid Roth-Härer für die Erarbeitung und Durchführung des operativen Teils sowie für die fachliche Anleitung und Hilfe bezüglich der Verhaltensversuche. Mit ihr habe ich eine sehr angenehme und kompetente Betreuung erfahren.

Ebenfalls danke ich Janet Moers und Dr. rer. nat. Sandra Kumbruch für die Ermöglichung der Rahmenbedingungen, die große Hilfsbereitschaft und kollegiale Unterstützung.

Ein großer Dank geht an Dr. rer. nat. Nadine Hainz für die wertvolle Hilfe bei der Erstellung der Graphiken, sowie die von mir sehr geschätzten Tipps zur Vollendung dieser Arbeit.

Zusätzlich danke ich Dr. rer. nat. Anja Scheller aus der Abteilung von Prof. Dr. Frank Kirchhoff des Centers for Integrative Physiology and Molecular Medicine für den Scan der HE- und LFB-gefärbten Gehirnschnitte.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Freunden und vor allem bei meiner Mitstreiterin und Freundin Alina Geers, die mir immer zur Seite stand und mich mit wertvollen Ratschlägen über einen langen Zeitraum beständig in allen Lagen begleitet und unterstützt hat, sowie Anne-Kathrin Eickelmann, bedanken.

Ausdrücklich gilt mein großer und herzlichster Dank meinem Ehemann Jörn, der mit seinem andauernden Beistand und seiner täglichen Bestärkung mir Kraft und Zuversicht für die Fertigstellung dieser Arbeit gegeben hat. Ich danke meiner Familie für Ihren permanenten Rückhalt und Ratschlag auf meinem bisherigen Lebensweg, insbesondere meinem Vater, Barbara, meiner Schwester Juliane und Manuel Debald sowie meinen Schwiegereltern Rita und Heiko.