

Aus dem Arbeitsbereich Pädiatrische Neurochirurgie,
Klinik für Neurochirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Korrelation des Kontusionsvolumens (gemessen mit 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid) und der Immunzellinfiltration im Zeitverlauf nach experimenteller kortikaler Kontusion.

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)
vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

Patryk Aleksander Faber
aus Pless

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. U.-W. Thomale
2. Priv.-Doz. Dr. med. K.-D. Schaser
3. Priv.-Doz. Dr. med. O. Sakowitz

Datum der Promotion: 03.06.2012

ABSTRACT

Einleitung: Das Ausmaß des Läsionsvolumens nach tierexperimentellem Hirntrauma ist ein wichtiger Parameter zur Beurteilung neuroprotektiver Strategien.

Es existieren immer noch Unstimmigkeiten, ob das Kontusionsvolumen an Zeitpunkten über 72 Stunden nach dem Trauma dem Einfluss immunkompetenter Zellen unterliegt, wenn Energie-abhängige Enzymaktivitätsmethoden (2,3,5-Triphenyltetrazolium Chlorid, TTC) zu Bestimmungen herangezogen werden. In diesem Kontext haben wir in einer Vergleichsstudie die Messergebnisse der Entwicklung der traumatischen Hirnläsion durch die Methoden Nissl und TTC miteinander verglichen und diese ergänzend mit der Immunhistochemie (IHC) korreliert.

Material und Methoden: Prospektive, randomisierte tierexperimentelle Studie. 36 männliche Sprague Dawley Ratten wurden, entsprechend folgender Untersuchungszeitpunkten, in vier Gruppen unterteilt: 48, 72 Stunden, 5 und 7 Tage nach experimenteller traumatischer Läsion mittels Controlled Cortical Impact (CCI). Die chirurgischen Eingriffe wurden unter Isoflurananästhesie durchgeführt, wobei am CCI-Traumamodell eine fokale Läsion mit einer Penetrationstiefe von 1,5mm auf die intakte Dura mater des linken parieto-temporalen Kortex gesetzt wurde. An jedem der oben genannten Zeitpunkte verglichen wir die Kontusionsvolumina, die mit TTC- und der Nissl Methode gefärbt sowie planimetrisch gemessen wurden und setzten diese in Korrelation zur Immunhistochemie mittels des CD68+ sensitiven (Monozyten und aktivierte Microglia) Antikörpers ED-1.

Für TTC wurden 1 - 2 mm dicke Gewebsschnitte angefertigt und mit 2%TTC in 0,2M Phosphatpuffer (pH 7,4) zur Bestimmung des Läsionsvolumens behandelt. Für Kontusionsvolumenmessungen mittels der Nissl (Cresyl Violet)-Methode wurden 30µm dicke Kryo- und für die IHC 8µm dicke Paraffinschnitte angefertigt.

Ergebnisse: Mit TTC konnten maximale Kontusionsvolumina am 2. Tag ($47,81 \pm 16,61 \text{mm}^3$) nach CCI gemessen werden, gefolgt von kontinuierlich abnehmenden Werten am 3. ($46,2 \pm 21,48 \text{mm}^3$), 5. ($24,53 \pm 5,81 \text{mm}^3$) und schließlich dem 7. ($20,68 \pm 12,10 \text{mm}^3$) Tag nach dem Trauma. Während mit der Nissl-Methode vergleichbare Werte am 2. ($42,77 \pm 10,59 \text{mm}^3$) und 3. ($43,12 \pm 3,55 \text{mm}^3$) Tag nach dem Trauma erzielt wurden, wichen die Ergebnisse des 5. ($48,46 \pm 5,2 \text{mm}^3$) und 7. ($48,43 \pm 9,43 \text{mm}^3$) Tages nach dem Trauma signifikant ($p < 0,05$) von den TTC-Werten an diesen Zeitpunkten ab.

In der IHC zeichnete sich am 3. Tag ($61,26 \pm 18,32 \text{cells/mm}^2$) eine signifikante Zunahme ED-1 positiver Zellen mit weiterem Anstieg bis hin zum 5. Tag ($910,53 \pm 129,1 \text{ cells/mm}^2$), um

schließlich eine maximale Zelldichte am 7. Tag ($1073 \pm 449,6$ cells/mm²) nach dem Trauma zu erreichen.

Schlussfolgerung: Die signifikanten Unterschiede der Messergebnisse der Kontusionsvolumina mit den Methoden nach Nissl und TTC am 5. und 7. Tag nach CCI sowie die in diesen Zeitpunkten dazu parallel stattfindende massive Infiltration von Immunzellen, suggerieren einen deutlichen Einfluss des enzymatischen Metabolismus von Immunzellen auf die TTC-Messmethode. Diesbezüglich sind die Untersuchungen der Entwicklung des Kontusionsvolumens durch die TTC-Methode nur bis zum 3. Tag nach einem Schädel-Hirn-Trauma zuverlässig. An späteren Zeitpunkten wird die Verwendung histologischer Methoden empfohlen.

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | EINLEITUNG | 7 |
| 1.1 | Schädel-Hirn-Trauma | 7 |
| 1.2 | Die Entwicklung der tierexperimentellen Neurotraumatologie | 9 |
| 1.3 | Posttraumatischer Zelluntergang und Immunzellantwort | 11 |
| 1.4 | 2,3,5 – Triphenyltetrazolium Chlorid (TTC) | 13 |
| 1.5 | Studienziel | 15 |
| 2 | MATERIAL UND METHODEN | 17 |
| 2.1 | Versuchstiere | 17 |
| 2.2 | Chirurgie und Anästhesie | 17 |
| 2.3 | Controlled Cortical Impact-Injury (CCII) | 18 |
| 2.4 | Histologie | 21 |
| 2.4.1 | Nissl-Färbung | 23 |
| 2.4.2 | TTC-Färbung | 23 |
| 2.4.3 | Immunhistologie (ED1) | 24 |
| 2.5 | Statistik | 27 |
| 3 | ERGEBNISSE | 28 |
| 3.1 | TTC-Färbung | 28 |
| 3.2 | Nissl-Färbung | 31 |
| 3.3 | Immunhistologie (ED1) | 33 |
| 3.4 | Morphometrische Bestimmung der Hemisphärenschwellung | 35 |
| 4 | DISKUSSION | 37 |
| 4.1 | Allgemeine Beobachtungen | 37 |
| 4.2 | Sekundärer Hirnschaden | 38 |
| 4.2.1 | Zerebraler Stoffwechsel nach Schädel-Hirn-Trauma | 38 |
| 4.2.2 | Zelluntergang | 42 |
| 4.2.2.1 | Nissl-Färbung | 48 |
| 4.2.3 | Hirnödem | 53 |
| 4.2.3.1 | Vasogenes Hirnödem | 54 |
| 4.2.3.2 | Zytotoxisches Hirnödem | 58 |
| 4.2.4 | Immunzellantwort | 61 |
| 4.2.4.1 | Immunhistologie (ED1) | 64 |
| 4.3 | TTC | 68 |
| 4.3.1 | Methodik und Entwicklung | 68 |
| 4.3.2 | Der Einsatz von TTC in der tierexperimentellen Neurotraumatologie | 71 |
| 4.3.3 | TTC-Färbung | 73 |
| 4.4 | TTC-Färbung vs. Immunhistologie | 73 |
| 4.5 | TTC- vs. Nissl-Färbung | 74 |
| 4.6 | Konklusion | 75 |

Meinen Eltern gewidmet

1.1 Schädel-Hirn-Trauma

„In den letzten zwanzig Jahren konnten die evidenzbasierten Richtlinien zur Behandlung des Schädel-Hirn-Traumas deutlich vereinheitlicht werden. Hierbei sind sowohl die Qualität der einzelnen Trauma-Zentren als auch die Behandlungsprotokolle sukzessiv standardisiert und optimiert worden. Dies wiederum lässt für die Zukunft hoffen, vor allem die Prognose schwer Schädel-Hirn traumatisierter Patienten, durch die Zuweisung in Stufe I- und Stufe II Trauma-Zentren, zu verbessern“. So heißt es laut einem im Jahr 2007 veröffentlichten Bericht der Brain Trauma Foundation, als Resultat einer in den größten Trauma-Zentren der U.S.A. durchgeführten Umfrage bezüglich der Richtlinien zum Management Schädel-Hirn traumatisierter Patienten (Hesdorffer, 2007).

Laut einer 2006 veröffentlichten Studie zählt das SHT mit einem jährlichen Auftreten aller Schweregrade von 248.000 Patienten in der Bundesrepublik Deutschland zu einer der häufigsten Krankheitsursachen. Hiervon versterben etwa 2800 Patienten. Insgesamt muss pro Jahr von 332 Patienten mit Schädelhirnverletzungen pro 100.000 Einwohner ausgegangen werden, wovon etwa 91% als leicht, 4% als mittel und 5% als schwer einzustufen sind (Rickels et al., 2006). Das SHT kann klinisch in drei Schweregrade eingeteilt werden, wobei sich die Glasgow Coma Scale (GCS) als Standardmethode zur Klassifizierung etabliert hat. Anhand der Parameter: beste verbale Reaktion, beste motorische Reaktion und Augenöffnen kann in einer Skala von 3 bis 15 (15 bedeutet normalen neurologischen Status) ein mildes (GCS 15-12), mittelschweres (GCS 12-9) und schweres SHT (GCS 8-3) unterschieden werden.

Epidemiologische Daten aus industriellen Ländern belegen insbesondere für das schwere SHT, mit Bewusstlosigkeit über 48 Stunden, eine enorme sozioökonomische Bedeutung. Hierbei zeigen Schädel-Hirn traumatisierte Patienten eine abhängig vom Lebensalter vorliegende, 10 bis 100mal höhere Letalität im Vergleich zu Patienten mit kürzerer Bewusstlosigkeit (Firsching & Frowein, 1990; Frowein et al, 1992). In Deutschland betragen die gesamtgesellschaftlichen Kosten alleine für das SHT etwa 2,8 Milliarden Euro pro Jahr (Rickels et al, 2006).

In den letzten Jahren veröffentlichte Übersichtsarbeiten zeigen eine abhängig von den Screening Kriterien vorliegende Mortalität des schweren und mittelgradigen SHT zwischen

23 und 40%. Etwa 42 bis 60% der Patienten werden konservativ auf der Intensivstation behandelt, 16 bis 20% haben nach 6 Monaten schwere Behinderungen und etwa 3% bleiben im vegetativen Status (Hukkelhoven et al., 2003, Murray et al., 1999, Unterberg et al., 1999). Hinsichtlich dieser Zahlen verdeutlicht das einleitende Zitat lediglich die positive Entwicklung bezüglich der Standardisierung der Behandlungsprotokolle in den jeweiligen Trauma-Zentren.

Diese basiert hauptsächlich auf den in den letzten 20 Jahren vorgenommenen Bemühungen, vor allem die Langzeitprognose schwer Schädel-Hirn traumatisierter Patienten, durch Etablierung standardisierter Behandlungsmaßnahmen, zu verbessern. Hierzu veröffentlichten die Association of American Neurological Surgeons (AANS), das European Brain Injury Consortium (EBIC) und die Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC) in den Jahren 1995 – 1997 Therapierichtlinien auf der Grundlage der Auswertung bis dahin veröffentlichter Therapiestudien (Bullock et al., 1996; Teasdale et al., 1997; Jantzen und Piek, 1997; Maas et al., 1997, Fakhry et al., 2004).

Zur Verbesserung der Langzeitprognose war es auch entscheidend den Behandlungsschwerpunkt auf die Langzeitfolgen des SHT's auszulegen, was hauptsächlich mit der gehirnspezifischen Reaktivität auf exogene Noxen begründet ist. Folglich war es notwendig klinisch fassbare Parameter, respektive morphologische Kriterien für therapeutische Ansätze zu definieren.

Diesbezüglich unterscheidet man zwischen primärer und sekundärer Hirnschädigung. Die initiale, mechanische Gewalteinwirkung auf das Gehirn ist bezüglich Intensität, Lokalisation, Beschleunigung u.a. Faktoren unvorhersehbar und der kurativen Therapie nicht zugänglich. Die hieraus resultierende direkte Hirnschädigung oder primäre Hirnkontusion, wird definitionsgemäß als zerebraler Primärschaden bezeichnet.

Unter einem sekundären Hirnschaden versteht man die aus einer primären Läsion resultierenden, indirekten pathophysiologischen und –morphologischen Veränderungen im und um das Kontusionsareal. Hierbei werden verschiedene im Gewebe ablaufende und mediatorvermittelte Kaskaden angestoßen, die zeit- und lokalisationsabhängig zu einer Vervielfachung des primären Kontusionsvolumens und schließlich zum ausgedehnten Zelluntergang führen können (Ommaya et al., 1966; Klatzo, 1967; Saatman et al., 2006; Khan et al., 2009).

Ungeachtet der zahlreichen, zum Teil auch vielversprechenden Versuche eine direkte und auf Zellebene ausgerichtete Therapieoption zu etablieren, orientieren sich die oben erwähnten Therapierichtlinien bestenfalls an der indirekten Beeinflussung der Traumafolgen. Zu den

hieraus resultierenden, klinisch fassbaren Zielen zählen die Vermeidung von Hypoxie und der arteriellen Hypotension sowie die Reduktion des erhöhten intrazerebralen Drucks (intracranial pressure, ICP) (Baethmann et al., 1989). Hierbei werden z.B. das Osmodiuretikum Mannitol und Barbiturate rein symptomatisch, zur Senkung des intrakraniellen Drucks eingesetzt (Kassell et al., 1980). Nach wie vor hängt die Prognose jedoch neben der operativen Therapie hauptsächlich von basistherapeutischen Maßnahmen auf der Intensivstation ab. Hierzu zählen die kardiopulmonale Stabilisierung des Patienten sowie die Vermeidung von Hyperthermie und von Elektrolytentgleisungen. Somit steht die Erforschung der Dynamik der pathophysiologischen Vorgänge auf zellulärer Ebene, wie sie im Rahmen des sekundären Hirnschadens ablaufen, im Mittelpunkt heutiger neurotraumatologischer Studien.

1.2 Die Entwicklung der tierexperimentellen Neurotraumatologie

Ziel der experimentellen Forschung ist es die traumatische Hirnläsion an verschiedenen tierexperimentellen Modellen zu simulieren und die daraus gewonnenen Informationen als Grundlage für die Erprobung neuroprotektiver Strategien am Menschen zu nutzen. Bis Mitte der 60-er Jahre waren es hauptsächlich tierexperimentelle Studien an Primaten, anhand welcher grundlegende Erkenntnisse bezüglich der Art des zugrunde liegenden Traumas und der pathomorphologischen Auswirkungen auf das Gehirn gewonnen werden konnten. Zum einen wurde bewiesen, dass sich das Ausmaß des Läsionsvolumens direkt proportional zur Beschleunigung der primären Gewalteinwirkung auf das Gehirn verhält (Denny-Brown, 1945; Denny-Brown und Russel, 1945). Zum anderen konnte der Schwellenwert jener Traumastärke ermittelt werden, bei der eine Kontusion und eine Contrecoup-Kontusion verursacht wird (Gurdjian et al., 1954). Des Weiteren wurden erste Erkenntnisse bezüglich der Auswirkungen des SHT's auf den intrakraniellen Druck, den zerebralen Stoffwechsel und histopathologische Veränderungen gewonnen (Ommaya et al., 1966).

Später wurde die Primatenforschung verlassen. Man erkannte, dass experimentelle Studien an Kleintieren, insbesondere an Nagern, entscheidende Vorteile gegenüber der Primatenforschung bieten. Zu den wichtigsten zählen die einfache chirurgische und anästhetische Handhabung der Versuchsdurchführung, eine hohe Resistenz gegenüber Infektionen, die gute Kompatibilität von histopathologischen Methoden, genaue Angaben über Alter, Gewicht und Geschlecht sowie der ökonomische und effiziente Einsatz von Pharmaka (Dixon und Hayes, 1997). Hierdurch konnten anhand der besseren Vergleichbarkeit

der einzelnen Modelle auch genauere Einblicke in die Komplexität des sekundären Hirnschadens gewonnen werden. Das morphologisch fassbare Korrelat des traumatischen Hirnschadens kann histologisch und immunhistologisch in einzelne Teilaspekte unterteilt werden. Zu diesen Teilaspekten gehören u.a. der Zusammenbruch der Blut-Hirnschranke (BHS) und konsekutiv die Ausbildung des Hirnödems, der neuronale Zelltod durch Nekrose und Apoptose, die Astrozytose, die immunzellvermittelte Komponente sowie die sekundäre, mediatorvermittelte Neurodegeneration.

Als 1967 Klatzo das Modell der kortikalen Kältenekrose bei der Ratte vorstellte, wurde es in den darauffolgenden Jahren als Standard in der tierexperimentellen SHT-Forschung verwendet (Unterberg et al., 1994; von Berenberg et al., 1994). Hierbei wurde fokal auf das freigelegte Rattengehirn durch einen Kältestempel eine Nekrosezone induziert, die von einer Grenzzone, der Penumbra, mit gestörter Blut-Hirn-Schranken (BHS) - Funktion umgeben ist. Zum einen kommt es hierdurch zur Ausbildung des vasogenen Hirnödems, dessen Dynamik bezogen auf den Fluss des kolloidosmotisch wirksamen Exsudats (hauptsächlich Albumin) aus dem Intravasalraum in das Hirngewebe anhand der Starling-Gleichung veranschaulicht werden kann: $J_v(\text{Flow}) = L_p [(P_{\text{Plasma}} - P_{\text{Gewebe}}) - \sigma (\Pi_{\text{Plasma}} - \Pi_{\text{Gewebe}})]$.

Zum anderen kommt es durch die erhöhte Permeabilität der BHS zu einem Elektrolytungleichgewicht mit ungehindertem Natrium-Einstrom in die Hirnzellen, Dysfunktion der ATP-abhängigen Natrium / Kalium-Pumpe und Aufhebung des Membranpotentials, gefolgt von Funktionsverlust der aktiven Ionen-Pumpen und zur Ausbildung des intrazellulären, so genannten zytotoxischen Hirnödems (Baethmann et al., 1988). In diesem Zusammenhang wurde man auch auf die große Bedeutung der Astrozyten, bezüglich ihrer regulativ-homöostatisch wirksamen Funktion, aufmerksam (Bullock et al., 1991; Kimelberg und Ransom, 1986). Der größte Nachteil der kortikalen Kältenekrose bestand in der mangelnden klinischen Reproduzierbarkeit aufgrund der fehlenden mechanischen Komponente des Traumas. Als Lindgren 1965 das Fluid Percussion-Modell oder LFP (lateral fluid percussion) einführte, konnte dieser Nachteil ausgeglichen werden. In der experimentellen Neurotraumatologie haben sich inzwischen die Modelle der fokalen oder globalen Ischämie (Lindgren et al., 1965; Tamura et al., 1981), die Modelle des subduralen oder intrazerebralen Hämatoms (Bullock et al., 1984; Miller et al., 1990) sowie in jüngster Zeit das Weight Drop- (Marmarou et al., 1994) und das Controlled Cortical Impact (CCI) Injury-Modell (Dixon et al., 1991; Lighthall, 1988) durchgesetzt. Das Prinzip des CCI-Modells beruht auf einer pneumatisch gesteuerten, mechanischen Kontusion, wie sie erstmals als Modell des spinalen Traumas durch Andersen 1982 und Kearney 1988 vorgestellt wurde. Die durch Lighthall

erarbeitete Variante der traumatischen Hirnläsion beim Frettchen hat Dixon zur traumatischen Hirnläsion bei der Ratte modifiziert. Durch einstellbare Daten wie Aufschlaggeschwindigkeit, Penetrationstiefe und Kontaktzeit der Trauma-Applikation wird eine für die verschiedenen klinischen Belange erforderliche, gute Steuerbarkeit gewährleistet (Thomale, 2001; Saatman et al., 2006). Im Gegensatz zu den anderen Modellen zeichnet sich das CCII vor allem durch die gut quantifizierbare fokale Läsion aus. Die so generierte Hirnkontusion bietet relativ komfortable Ausgangsbedingungen für morphometrische Analysen der einzelnen Teilaspekte der sekundären Hirnschädigung. Neben dem bereits erwähnten Hirnödem wurden wichtige Erkenntnisse der neurodegenerativen und immunzellvermittelten Komponente des sekundären Hirnschadens, respektive ihres zeitabhängig unterschiedlichen Distributionsmusters nach SHT, erzielt.

1.3 Posttraumatischer Zelluntergang und Immunzellantwort

Bezüglich der *neurodegenerativen Komponente* bestehen zwar diskrepante Auffassungen über den Anteil des primären, mechanisch induzierten Zelluntergangs (auch als so genannte "Mechanoporation" beschrieben), doch ist man sich einig über den im weiteren Zeitverlauf nach SHT das Kontusionsvolumen prägenden sekundären, nekrotisch bedingten und apoptotisch induzierten Zelltod (Povlishock, 1992; Maxwell et al., 1993; Sutton et al., 1993; Graham und Gennarelli, 1997; Hall et al., 2005; Saatman et al., 2006). Es gibt unterschiedliche Pathomechanismen, die zum progressiven posttraumatischen Zelluntergang führen. Die mediatorinduzierten Kaskaden nehmen nach heutiger Auffassung hierbei eine zentrale Rolle ein. Zu den wichtigsten unkontrolliert freigesetzten Mediatorsubstanzen zählen freie Radikale, Glutamat, Stickoxyd, Arachidonsäure und inflammatorische Mediatoren, wie z.B. die Chemokine. Diese liegen in der posttraumatischen Nekroserandzone (Penumbra) in erhöhter Konzentration vor. Durch die anschließende Glutamat-induzierte Aktivierung von N-Methyl-D-Asparat (NMDA), α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazol-Propionat (AMPA) oder Quisqualat – Rezeptoren strömen Natrium und Kalzium ungehindert in die Zellen, wo sie wesentlich zur Vergrößerung der Nekrosezone und konsekutiv des Kontusionsvolumens führen (Smith et al., 1994; Stoffel et al., 2002; Schubert und Piasecki, 2001). Demnach wird eine kontinuierliche Zunahme der Nekrosezone selbst noch Wochen nach SHT beobachtet (Cortez et al., 1989; Sutton et al., 1993; Raghupathi et al., 2002; Saatman et al., 2006).

Die Komplexität des sekundären Hirnschadens wird zusätzlich durch den immunzellvermittelten Teilaspekt verdeutlicht. Dieser ist ebenfalls nur teilweise verstanden.

Die an der Immunreaktion des ZNS beteiligten Zellen umfassen verschiedene Zelltypen. Im Einzelnen sind es die aus dem Systemkreislauf einwandernden neutrophilen Granulozyten und Monozyten, die im ZNS subendothelial (außerhalb der BHS) liegenden Macrophagen sowie die gehirnspezifischen Microgliazellen. Die zuletzt genannten machen etwa 13-15% der Zellen der weißen Hirnsubstanz aus (Cross et al., 2001). Zwar wird von manchen Autoren eine gewisse Eigenständigkeit dieser Komponente der sekundären Hirnschädigung zugeschrieben (Soares et al., 1995), trotzdem darf sie im Zusammenhang mit der Vielfalt der interzellulären Interaktionen im und um das Kontusionsareal nicht als separater Teilaspekt verstanden werden. Diesbezüglich belegen gut differenzierte morphometrische Analysen des Kontusionsareals ein zeitabhängig unterschiedliches Distributionsmuster der einzelnen Immunzelltypen nach SHT (Cross et al., 2001; Chen et al., 2002; Thomale et al., 2007).

Zum einen muss die direkte, mechanische Komponente der Hirnläsion berücksichtigt werden. Die ersten nachweisbaren immunkompetenten Zellen im und um das Kontusionsareal sind die neutrophilen Granulozyten. Dies ist zum größten Teil durch die direkt auf die BHS schädigende Wirkung der Noxe bedingt. Die neutrophilen Granulozyten können schon in den ersten Stunden im Kontusionsareal beobachtet werden, spielen jedoch an Zeitpunkten > 72 Stunden eine eher untergeordnete Rolle im gesamten Entzündungsgeschehen (Chen et al., 2002; Thomale et al., 2007). Ferner kommt es zur Infiltration hämatogen lokalisierter Macrophagen zum Kontusionsareal hin. Die frühen Veränderungen der Morphologie des Kontusionsareals sind somit als unmittelbare Folge des Traumas zu werten, vor allem die zu diesen frühen Zeitpunkten stattfindende Invasion der Macrophagen (geschädigte BHS und rupturierter Subarachnoidalraum).

Zum anderen ist der kontinuierliche Zuwachs aktivierter Immunzellen im und um das Kontusionsareal an späteren Zeitpunkten nach SHT hauptsächlich auf mediatorvermittelte Mechanismen zurückzuführen. Zu den wichtigsten immunmodulatorisch wirksamen Botenstoffen zählt das Interleukin-1 (IL1). Neben der mechanischen Komponente kommt es hierdurch zur Aktivierung ruhender Microglia- und Transformation in immunkompetente Zellen (Aihara et al., 1995; Kreutzberg et al., 1996; Chen et al., 2002). Hierdurch werden entzündlich bedingte Zellschäden im weiteren Zeitverlauf nach primärer Hirnläsion potentiell vergrößert. Des Weiteren bestehen direkte Zusammenhänge zwischen dem Grad der IL1-vermittelten Aktivität der Immunzellen und der Astrozytose, also der gehirnspezifischen Narbenbildung (Saatman et al., 2006).

Das bildmorphologische Korrelat des sekundären, hauptsächlich neurodegenerativ- und immunzellvermittelten Gewebeschadens ist somit eine kontinuierliche Zunahme des Kontusionsvolumens im zeitlichen Verlauf der ersten Stunden bis Tage nach SHT (Cortez et al., 1989; Chen et al., 2002; Hall et al., 2005; Saatman et al., 2006). Zum besseren Verständnis der komplexen, sekundär bedingten histomorphologischen Alterationen sowie des zeitabhängig unterschiedlichen Distributionsmusters verschiedener Zelltypen im und um das Kontusionsareal, ist eine differenzierte Erfassung dieser Teilaspekte im Rahmen des SHT entscheidend. Hierfür bietet die feingewebliche Diagnostik optimale Ausgangsbedingungen. Diesbezüglich kann heute anhand spezialisierter histologischer, immunhistologischer und DNA-basierter Untersuchungsmethoden eine differenzierte Visualisierung der einzelnen Zelltypen erzielt werden. Zu den heute am häufigsten verwendeten histologischen Basismethoden zählen z.B. die Hämatoxilin & Eosin (H&E)- sowie die Nissl (Touloidin blau)-Färbungen. Anhand ihrer Spezifität bestimmte basische und basophile Bestandteile der Zellen (DNA, raues endoplasmatisches Retikulum und Proteine) zu markieren, können somit z.B. neurodegenerative Prozesse gut erfasst bzw. sichtbar gemacht werden. Immunhistologische Analysen umfassen verschiedene Immunzell-spezifische Marker, z.B. OX-42, ED1, His48 und MPO. Manche sind für einen bestimmten Zelltyp spezifisch, z.B. MPO und His48 für neutrophile Granulozyten und Ox-42 für Microglia. Andere hingegen, z.B. ED1, zeigen keine besondere Spezifität auf phagozytierende Zellen, sodass mehrere Zelltypen gleichzeitig erfasst werden.

In den letzten Jahrzehnten hat sich zunehmend auch 2,3,5 – Triphenyltetrazolium Chlorid (TTC), ein wasserlöslicher Redox-Indikator, zur Visualisierung ischämisch- und traumatisch-induzierter neuronaler Schäden durchgesetzt. Anhand der aktuell hierzu vorliegenden Datenlage ist jedoch eine mögliche Verfälschung des tatsächlich vorliegenden Gewebeschadens mittels der TTC-Methode an späteren Zeitpunkten (> 72 h) nach SHT anzunehmen (Baskaya et al., 2000; Chen et al., 2002; Hall et al., 2005; Saatman et al., 2006).

1.4 2,3,5 – Triphenyltetrazolium Chlorid (TTC)

Die Spezifität von TTC beruht auf der Fähigkeit das Gewebe vom metabolischen Aspekt her, energieabhängig zu markieren. Es interagiert mit der mitochondrialen Succinat – Dehydrogenase (SDH), wobei der rote Farbstoff Formazan gebildet wird. Der grob-visuelle

bzw. makroskopische Kontrast zwischen markierten und unmarkierten Arealen bietet hierbei somit die Grundlage zur Differenzierung geschädigten Gewebes.

Seit 1958 wurde TTC für Quantifizierungen von Infarktarealen an unterschiedlichen Geweben bei Säugetieren verwendet. Bei Hunden konnten z.B. präzise Ergebnisse in der Darstellung irreversibler ischämischer Gewebeschäden am Herzen erzielt werden (Sandritter et al., 1958; Lie et al., 1975; Kloner et al., 1981). Im Rahmen der laborchemischen Gewebesanalysen erkannte man zudem schnell die Vorteile von TTC gegenüber den konventionell-histologischen Untersuchungsmethoden. TTC ist relativ praktikabel in der Versuchsdurchführung, kostengünstig und wenig zeitaufwendig. So fand TTC zunehmende Akzeptanz auch in den anderen Fachgebieten. In den Neurowissenschaften konnte zunächst eine gute Korrelation von TTC, Nissl und H&E bei der Visualisierung ischämisch bedingter Hirnschäden bei Mäusen und Ratten, zwischen 12 und 72 Stunden nach Gefäßokklusion, gezeigt werden (Bederson et al., 1984; Lin et al., 1993). Bei den Versuchsdurchführungen erkannte man zudem die gute Steuerbarkeit von TTC bezüglich der Visualisierung einer adäquat zur Ischämiestärke bzw. Okklusionszeit der Arterie (i.d.R. der Arteria cerebri media) vorliegenden Hirnläsion (Liszcak et al., 1984; Aronowski et al., 1997; Du et al. 1995; Tureyen et al., 2004; Benedek et al., 2006;). Je nach gewählter postischämischer Reperfusionzeit können unterschiedliche Ausmaße der Läsionsvolumina gemessen werden, was TTC ebenfalls adäquat wiedergeben kann. Schließlich ist TTC auch viel sensitiver bezüglich der Erfassung sehr früher ischämischer Gewebeschäden, was durch elektronenmikroskopische bzw. ultrastrukturelle Vergleichsanalysen bestätigt wird (Liszcak et al., 1984; Liu et al., 2009).

Auf der anderen Seite wurden aber auch entscheidende Nachteile von TTC im Vergleich zu den feingeweblichen Verfahren gezeigt. Aufgrund der erforderlichen größeren Schichtdicke TTC – behandelter Gewebeschnitte ist eine mikroskopische Analyse nicht möglich.

Die aus der Schlaganfallforschung erhobenen Erkenntnisse bei der Anwendung von TTC sind aufgrund der zugrundeliegenden, primären Hirnläsion, nicht direkt auf die Neurotraumatologie übertragbar. Dennoch konnten gewisse Parallelen bezüglich der Visualisierung ischämisch- und traumatisch bedingter Gewebeschäden mittels TTC bis zu 48 Std. nach initialer Läsion gezogen werden. Demnach wurde die gute Steuerbarkeit von TTC i.S. eines entsprechend der gewählten Intensität der primären Läsion angezeigten Gewebeschadens bis zu 48 h nach SHT bestätigt (Perri et al., 1997). Des Weiteren sind die anhand konventionell-histologischer Methoden und TTC erhobenen Kontusionsvolumina im Zeitfenster 12 bis 48 Std. nach primärer Hirnläsion vergleichbar.

In diesem Zusammenhang fehlen bisher jedoch direkte Vergleichsstudien von TTC und konventionellen histologischen Methoden zur Visualisierung traumatisch bedingter Hirnschäden an Zeitpunkten > 48 Std. nach primärer Läsion. Anhand des indirekten Vergleichs bestehen jedoch Diskrepanzen über das Ausmaß des Kontusionsvolumens, respektive der zeitlichen Entwicklung desgleichen bis zum 7. Tag nach SHT (Baskaya et al., 2000; Chen et al., 2002; Saatman et al., 2006). Demnach wird mittels TTC eine kontinuierliche Abnahme des Kontusionsvolumens zwischen 48 Std. und dem 7. Tag nach SHT indiziert (Baskaya et al., 2000). Der so gemessene Verlauf steht im Gegensatz zur allgemein bekannten, postkontusionellen Dynamik des progredienten sekundären Hirnschadens (Chen et al., 2002; Saatman et al., 2006; Thomale et al., 2007).

Die Spezifität von TTC beruht auf der Visualisierung des energetischen Metabolismus und nicht des tatsächlich vorliegenden neuronalen Zellschadens, weswegen insbesondere die immunzellvermittelte Komponente einen entscheidenden und limitierenden Faktor bei der Visualisierung später Hirnschäden darzustellen scheint (Aihara et al., 1995; Chen et al., 2002). Hierbei soll hauptsächlich die metabolische Aktivität der immigrierenden Immunzellen für die Maskierung der tatsächlich vorliegenden Gewebeschädigung > 72h nach SHT verantwortlich sein.

1.5 Studienziel

Die Erforschung der postkontusionellen, sekundären Hirnschädigung stellt große Anforderungen an die experimentelle Neurotraumatologie. Zum besseren Verständnis der hierdurch angestoßenen neurophysiologischen und pathomorphologischen Veränderungen ist die Vielschichtigkeit des sekundären Hirnschadens zu berücksichtigen.

Das bildmorphologische Korrelat, das s.g. Kontusionsvolumen, wird in der feingeweblichen Diagnostik anhand histologischer und immunhistologischer Untersuchungsmethoden in einzelne Teilaspekte unterteilt. Diese können zwar in der Endauswertung nicht strikt als eigenständige Komponenten verstanden werden, dessen separate Erfassung im zeitlichen Verlauf nach SHT ist jedoch vom großen Vorteil, z.B. bei der Erprobung potentiell neuroprotektiver Substanzen. In den letzten Jahrzehnten hat sich zunehmend TTC zur Visualisierung ischämisch- und traumatisch bedingter Hirnschäden durchgesetzt. Diese kostengünstige, wenig zeitaufwendige und einfach zu handhabende Untersuchungsmethode hat sich bei der Erfassung früher, im Zeitraum zwischen 12 und 72 Std. nach initialer Läsion

vorliegender Hirnschäden bewährt. Aufgrund der Spezifität von TTC könnte die tatsächlich vorliegende Gewebeschädigung durch den metabolischen Einfluss der Immunzellen an späteren Zeitpunkten nach SHT (>72 Std.) maskiert werden.

Das hierbei verwendete CCI-Modell des tierexperimentellen SHT's zeichnet sich vor allem durch die Erzeugung einer vergleichsweise fokalen Hirnläsion sowie die gute Steuerbarkeit der Traumaapplikation aus. Die Nissl-Methode steht als histologische Methode zur Verfügung, welche sich bei der Visualisierung hauptsächlich neurodegenerativer Prozesse bewährt hat. Des Weiteren kann bei den mikroskopischen Gewebeanalysen indirekt der Grad der Infiltration immunkompetenter Zellen beurteilt werden. Den zeitlichen Verlauf der Immunzellaktivierung und -Infiltration werden anhand des Panmarkers ED1 verfolgt. Dieser ist im Stande sowohl die eingewanderten neutrophilen Granulozyten und Monozyten als auch die gehirnspezifischen Mikrogliazellen darzustellen und damit das nahezu komplette Spektrum der immunzellvermittelten posttraumatischen Reaktionskomponente wiederzugeben.

Ziel diese Studie ist es daher die Korrelation der morphometrischer Quantifizierung des zerebralen Kontusionsvolumens gemessen anhand der Schnittgewebefärbung TTC und Nissl-Methode und unter dem Einfluss der in der Immunhistologie dargestellten immigrierenden Immunzellen in der zeitlichen Entwicklung bis zu 7 Tage nach fokaler zerebraler Kontusion, ausgelöst durch das CCI Modell, zu untersuchen. Damit soll auch ein Arbeitsprotokoll erarbeitet werden, um den sinnvollen Einsatz der TTC Färbung in der neurotraumatologischen Forschung, bzw. dessen zeitabhängig bedingten Einschränkungen zur der Visualisierung des tatsächlichen neuronalen Gewebeschadens zu charakterisieren.

2.1 Versuchstiere

Prospektive, randomisierte tierexperimentelle Studie. Es wurden 36 männliche Sprague Dawley Ratten (250 - 350 g), entsprechend der für die Kontusionsvolumenbestimmungen gewählten Untersuchungszeitpunkte, in vier Gruppen unterteilt: 48 Stunden, 72 Stunden, 5 und 7 Tage nach dem Trauma.

2.2 Chirurgie und Anästhesie

Die Anästhesie erfolgte mit Isofluran 2-5 % vol. in N₂O (1-2 l/min) und O₂ (0,5-1 l/min) durch eine Gesichtsmaske bei spontan atmenden Tieren. Nach dem Wiegen der Tiere erfolgten körperabgestimmte Dosierungen von Carprofen (5 mg/ml) als anhaltende systemische Analgesie und Bupivacain (0,25 %) als Lokalanästhetikum durch subkutane Injektionen. Bei Bupivacain durfte die Maximaldosis von 1 mg/kg KG nicht überschritten werden. Bei Carprofen (0,25 %) durfte die Maximaldosis von 10 µl/kg KG nicht überschritten werden.

Die Ratten wurden auf ein durch einen Feedback-Mechanismus reguliertes Heizkissen positioniert. Dies ermöglichte die Erhaltung einer konstanten Körpertemperatur bei ca. 37° C. Die Rektaltemperatur wurde kontinuierlich, über den gesamten Zeitraum der Operationen gemessen.

Unter aseptischen Bedingungen erfolgte eine Inzision der Kopfhaut über der Mittellinie, lateral erfolgte die Teilresektion des Musculus temporalis und nachfolgend wurde eine 8 x 8mm bemessende Kraniotomie links parietal zwischen Bregma und Lambda, innerhalb der Koronar und Lambdanaht, durch einen Diamantbohrer durchgeführt (Thomale, 2001; Abb.1).

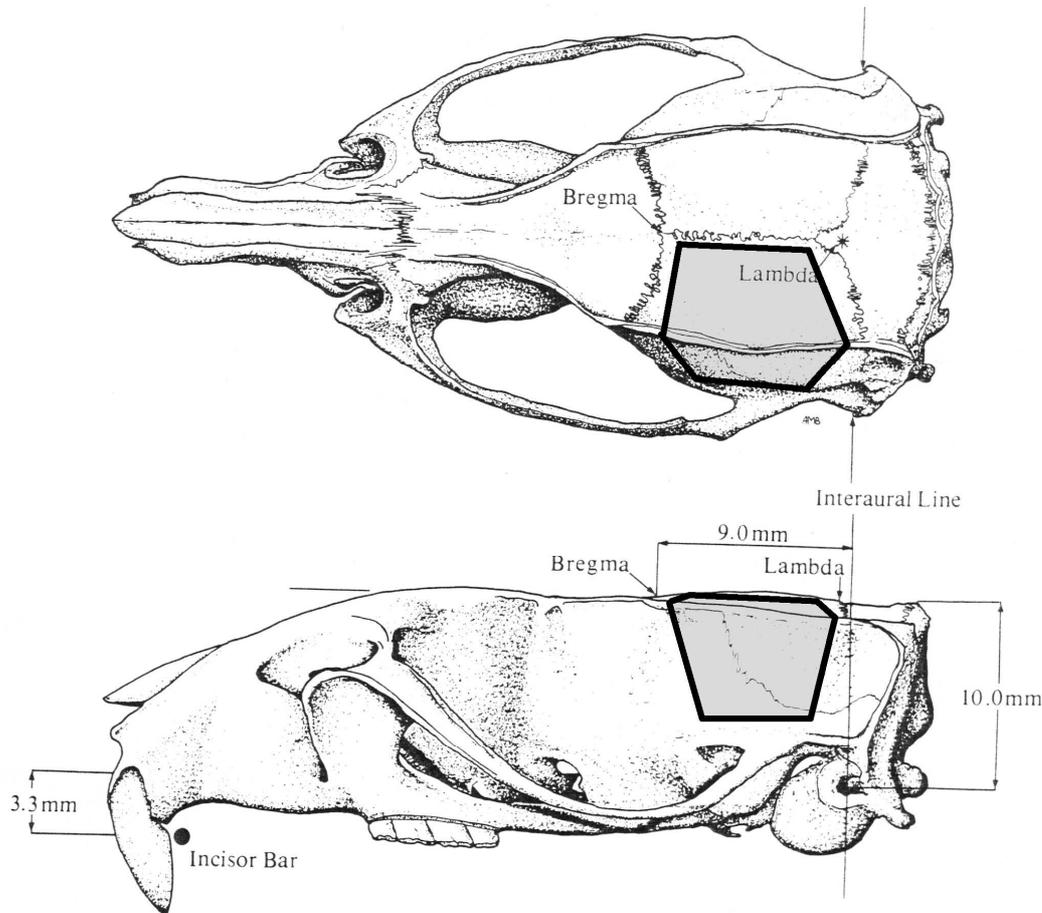


Abb. 1 Schematische Darstellung der Schädelanatomie der Ratte. Die Kraniotomiefläche ist grau unterlegt.

Der Knochenkeil wurde für die Reimplantation konserviert und die Dura mater mit mikrochirurgischen Watten sorgfältig bedeckt um einer Vertrocknung vorzubeugen. Wie unter 2.3 beschrieben erfolgte nun die standardisierte Applikation des Traumas auf die intakte Dura. Nach dem Trauma erfolgte die Reimplantation des Knochens durch Acrylzement (dental Acryl-Zement) und die Kopfhaut wurde fortlaufend mit Prolene 3-0 vernäht.

2.3 Controlled Cortical Impact Injury

Das Controlled Cortical Impact Injury (CCII, oder auch CCI) wurde am Biomedical Science Department der General Motors Laboratorien, USA, entwickelt, am Bioengineering Department des Medical College of Virginia realisiert und unter der wissenschaftlichen Leitung von Edward Dixon bei der Ratte erstmals angewendet (Dixon et al., 1991; Lighthall, 1988).

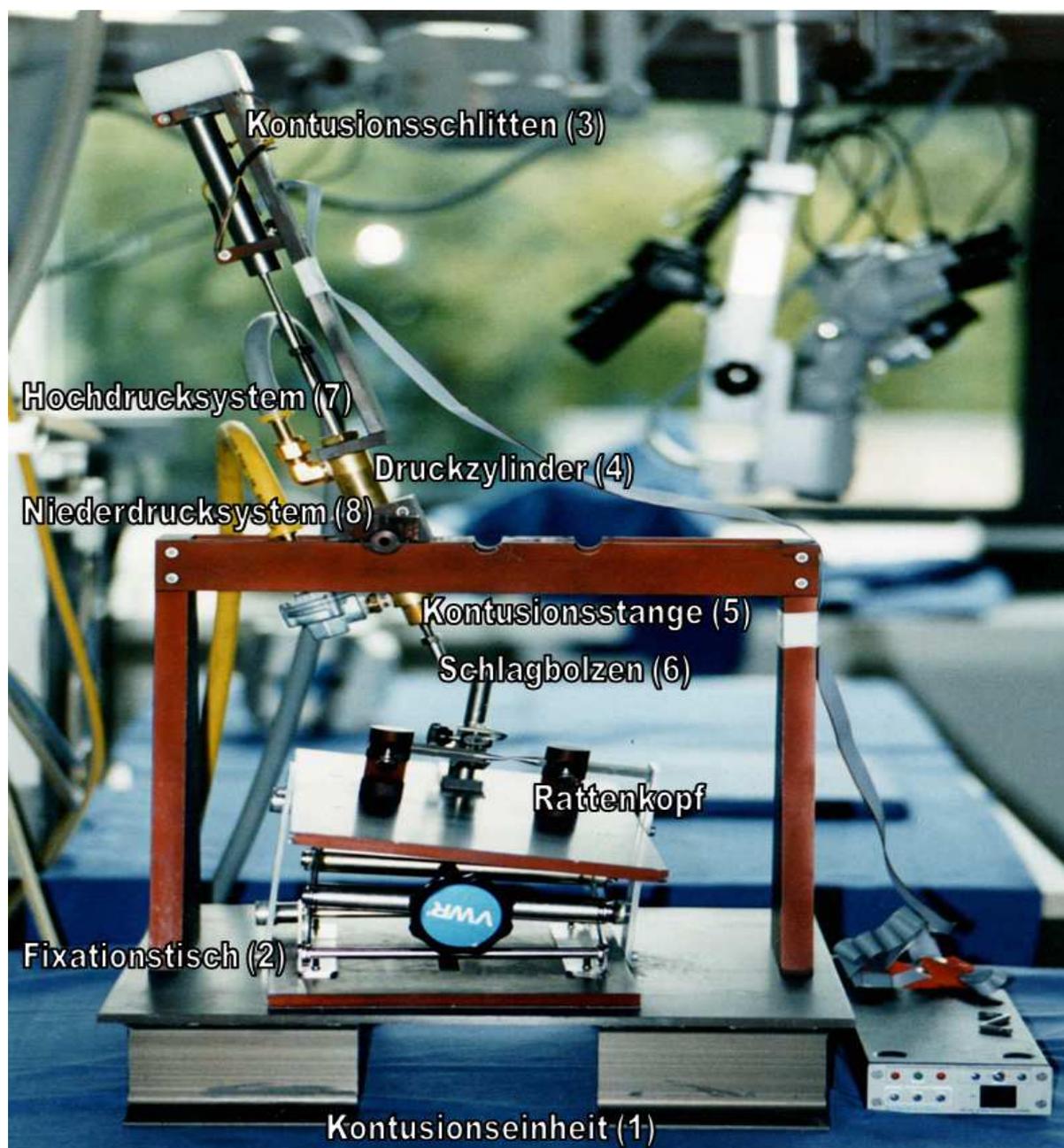


Abb. 2: Die Kontusionseinheit (1) des Controlled Cortical Impact Injury (CCII) mit Fixationstisch (2) und Kontusionsschlitten (3). Der 7 mm–dicke Schlagbolzen (6) ist am unteren Ende in einem Gewinde montiert, dessen konvexe Oberfläche zum Zeitpunkt des Traumas auf die Dura trifft. Die Druckübertragung erfolgt über ein Hoch- (7) und Niederdrucksystem (8), welche je über die Kontrollstation reguliert werden. Dabei ist das Hochdrucksystem mit dem oberen Teil und das Niederdrucksystem mit dem unteren Teil des Zylinders (4) verbunden. Das Hochdrucksystem verursacht die schnelle Abwärtsbewegung der Kontusionsstange (5) und das Niederdrucksystem die langsamere Aufwärtsbewegung.

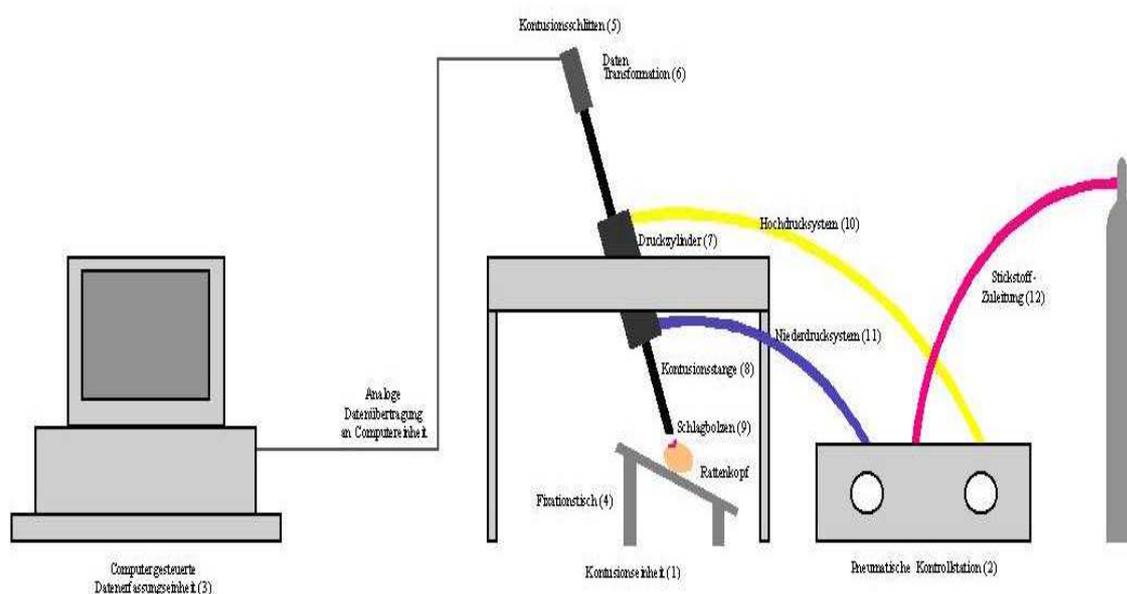


Abb. 3 Schematischer Aufbau des CCI-Modells (Thomale, 2001).

Das Trauma-Gerät besteht aus einer Kontusionseinheit, die sich aus einem Fixationstisch, einer pneumatischen Kontrollstation und den an einem Stahlrahmen fixierten Kontusionsschleifen zusammensetzt. Nach chirurgischer Präparation werden die Tiere an einer stereotaktischen Halterung fixiert. Diese ist auf dem Fixationstisch montiert, der höhenverstellbar ist und dessen Oberflächenneigung variabel eingestellt werden kann. Über dem Fixationstisch ist ein Stahlrahmen montiert, an dem der Kontusionsschleife befestigt ist. Dabei ist dieser im seitlichen Winkel angebracht und regulierbar. Der Kontusionsschleife wiederum setzt sich aus einer analogen Daten-Transformationseinheit, einem Druckzylinder, einer 19,75 cm – langen Kontusionsstange und einem Schlagbolzen, zusammen. Der 7 mm–dicke Schlagbolzen ist am unteren Ende in einem Gewinde montiert, dessen konvexe Oberfläche zum Zeitpunkt des Traumas auf die Dura trifft. Das Anbringen des Schlagbolzens an ein Gewinde ermöglicht es die Eindringtiefe genau einzustellen. Die Höhenregulierung des Bolzens ist hierbei mit 1 mm Höhenverschiebung pro Umdrehung genormt. Schließlich kann mit einer gegenläufigen Mutter die endgültige Position fixiert werden. Hierdurch ist die Deformationstiefe des Bolzens in das Hirngewebe bei Auftreffen des Bolzens regulierbar (Thomale, 2001).

Die Kontusionsstange ist linear über 5 cm frei beweglich und mündet in der Mitte in einen Druckzylinder. Die eigentlichen Einstellungen der einzelnen Traumamodalitäten (Geschwindigkeit des Schlagbolzens und die Dauer der Kontaktzeit mit der Dura) werden an

der pneumatischen Kontrollstation vorgenommen. Diese ist durch zuführende Schläuche mit dem in zwei Druckkammern unterteilten Zylinder der Kontusionseinheit verbunden. Über diese Verbindung nehmen diese Kammern kurzandauernde Druckveränderungen auf. Somit dienen diese Verbindungen zwischen der Kontrollstation und der Kontusionseinheit der eigentlichen Übertragung der Bewegung auf die Kontusionsstange.

Die Druckübertragung erfolgt über ein Hoch- und Niederdrucksystem, welche je über die Kontrollstation reguliert werden. Dabei sind das Hochdrucksystem mit dem oberen Teil und das Niederdrucksystem mit dem unteren Teil des Zylinders verbunden. Das Hochdrucksystem verursacht die schnelle Abwärtsbewegung der Kontusionsstange und das Niederdrucksystem die langsamere Aufwärtsbewegung. Zusätzlich ist das System durch einen dritten Schlauch mit einer Stickstoffflasche verbunden. Dadurch bezieht das System hochgereinigten Stickstoff als Druckmedium (PLUS 5.0, N₂ 99,9% / Fa. AGA Gas GmbH, Hamburg). Die Einstellung verschiedener Druckstufen im Hoch- bzw. im Niederdrucksystem kann somit an der Kontrollstation für die gewünschte Schlaggeschwindigkeit moduliert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde der Hochdruck mit 100 pounds per square inch (psi) und der Niederdruck mit 8 psi festgelegt (100 psi = 5,3 bar). Letztendlich kann durch die Einstellung variabler Auslösezeiten der Druckfreisetzung die Kontaktzeit des Bolzens mit der Dura reguliert werden. Sie wurde bei den aktuellen Versuchen mit 300 ms festgelegt. Mittels einer magnetischen Steuerung wird der Schlag dann manuell ausgelöst.

An das obere Ende der Kontusionsstange ist eine analoge Daten-Transformationseinheit angeschlossen (6; Fa. R.C. Electronics, Texas, USA). Durch diese Verbindung werden die analogen Daten der Schlagbewegung an eine computergesteuerte Datenerfassungseinheit weitergeleitet. Dies ermöglicht die Registrierung der Position des Bolzens. Dadurch kann die Geschwindigkeit der Bolzenbewegung überwacht werden. Die Schlaggeschwindigkeit unter 100psi im Hochdrucksystem entspricht dabei einer Geschwindigkeit von 7,2 m/s (Thomale, 2001).

2.3 Histologie

Die 36 Ratten wurden 48, 72 Stunden, 5 und 7 Tage nach CCI unter tiefer Narkose und Analgosedierung durch Exsanguination getötet. Das Gehirn wurde anschließend transkardial durch einen Phosphat-puffer 0,2 M (pH 7,4) perfundiert. Dieser Schritt diente der Beseitigung

des Blutes sowie der Blutkomponenten, welche mit den Untersuchungsmethoden unerwünscht interagieren könnten.

Es wurden für die jeweiligen, histologischen Untersuchungsmethoden TTC und Nissl die gleichen, nacheinander entsprechend behandelte Hirnschnitte verwendet.

Zunächst wurden die entnommenen Hirne (n=24) durch Isopentan bei -30°C schockgefroren. Nachfolgend wurden sie durch eine spezielle Rattenhirnmatrix in 8, jeweils 1,2 mm dicke, koronare plane Stücke geschnitten. Anschließend wurden sie in einem 2%-igem TTC - Phosphatpuffergemisch (0.2M, pH 7.4) bei 37°C für ca. 30 Minuten inkubiert. Um eine möglichst gleichmäßige Verteilung des TTC's zu gewährleisten wurde diese Prozedur jeweils 15 Minuten durch Wenden an beiden Seiten der Präparate durchgeführt.

Nach ausreichender Färbung der Hirnschnitte erfolgte die Fotodokumentation jeder Schnittfläche. Da bei dem ersten und letzten Schnitt nur die Innenfläche dokumentiert wurde, wurden 14 Abbildungen angefertigt. Die Fotos wurden digitalisiert und durch ein Computerprogramm (Image J I.33u, Wayne Rasband, NIH USA) ebenfalls von beiden Seiten analysiert. Die Quantifizierung der Läsionsareale erfolgte hierbei planimetrisch, anhand des farblichen Kontrasts zwischen dem gesunden, rot-imponierendem Gewebe und der an den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten nicht gefärbt demarkierten Kontusionszone. Die endgültigen Ergebnisse wurden als Summation der 14 Schnitte rechnerisch dargestellt.

Um die Gewebeswellung die durch das mögliche Hirnödeme zustande kommt rechnerisch auszugleichen, wurde folgende Formel zur Korrektur angewandt:

$C_{corr.} = (C \times R)/L$ ($C_{corr.}$ = korrigierte Kontusionsfläche, C= absolute Kontusionsfläche, R= rechte- und L= linke Hemisphärenfläche).

Das gesamt Kontusionsvolumen berechnet sich dementsprechend durch die Addition der mittleren korrigierten Kontusionsflächen unter Multiplikation der Schichtdicke von 1,2mm:

$C_{gesamt} = (A1+A2)*1,2+(B1+B2)*1,2 \dots+(H1+H2)*1,2$

Die aufgrund der Dekortikation verursachten zystischen Defekte der Kontusionsareale am 7. Tag wurden jeweils entsprechend der physiologischen Gehirnkongevitäten nachgezeichnet und anhand der gleichen Korrekturrechnung für das Gehirnödeme wie an den Zeitpunkten 2., 3. Und 5. Tag berücksichtigt.

Nach allen für die TTC-Methode benötigten Schritten wurden die Schnitte in flüssigem Stickstoff (-80°C) eingefroren. Anschließend wurden 20-30µm dicke Kryoschnitte für die Nissl-Histologie angefertigt. Wiederum, um Volumenmasse zu errechnen, wurde jedes der

mittleren 6 Kryoschnitte von beiden Seiten, während das erste und letzte jeweils von der Innenfläche angeschnitten. Es erfolgte erneut die Fotodokumentation der Nissl-gefärbten Hirnschnitte mittels makroskopischer Digitalaufnahmen. Die Messung und Berechnung des Kontusionsvolumens erfolgte hierbei nach gleichem Prinzip wie bei TTC.

2.3.1 TTC- Färbung

1. Anfertigung von 500 ml 2%-iger TTC Lösung in einem 0,2 M Phosphat-Gemisch:
95 ml KH_2PO_4 0,2 M + 405 ml Na_2HPO_4 0,2 M.
2. Dabei gelten folgende Molekulargewichte [M]:
M von KH_2PO_4 = 136,09 g/mol
M von Na_2HPO_4 = 268,03 g/mol
3. Die Umrechnung in Gramm (g) erfolgte dabei folgendermaßen:
 $G = \text{g/mol} * \text{mol/l} * l$
4. Dementsprechend gilt für KH_2PO_4 :
 $136,09 * 0,2 * 0,095 = 2,585 \text{ g}$
5. Dementsprechend gilt für Na_2HPO_4 :
 $268,03 * 0,2 * 0,405 = 21,71 \text{ g}$
6. Zur Herstellung einer 2%-igen TTC Lösung gilt folgendes:
 $2\% \text{ TTC} = 2/100 \text{ (g/ml)} = 10/500 \text{ (g/ml)} = 10\text{g TTC}$

2.3.2 Nissl-Färbung (Kresylviolett-Färbung)

1. Inkubation der Schnitte in TBS für 5 Minuten bei Zimmertemperatur (ca. 21° Celsius).
2. Trocknung der Schnitte für 30 Minuten bei Zimmertemperatur.
3. Auswaschen des TTC mittels Ethanol 100% für 5 Minuten.
4. Trocknung der Schnitte für 30 Minuten bei Zimmertemperatur.
5. Inkubation in Xylol 2* 5 Minuten, dabei Verwendung jeweils frischen Xylols.
6. Inkubation in Ethanol 100% 2* 5 Minuten, dabei Verwendung jeweils frischen Ethanols.
7. Trocknung der Schnitte für 20 Minuten bei Zimmertemperatur.
8. Inkubation in Kresylviolett für 5 Minuten.

9. Auswaschen der Schnitte (Differenzierung, dabei erfolgte die Qualitätskontrolle unter dem Mikroskop) mit Essigsäure (0,00025% in Ethanol 95%) für ca. 3,5 Minuten. Dieser Schritt diente der Eliminierung des Überstandes an Nissl, somit war eine genauere Quantifizierung möglich.
10. Stoppen der Reaktion mit Leitungswasser – jeweils 3*2 Sekunden in frischem Wasser.
11. Inkubation der Schnitte in Ethanol 100% - jeweils 2* 2 Sekunden in frischem Ethanol.
12. Inkubation der Schnitte in Xylol für 2 Minuten.
13. Fixierung mit Deckgläsern.

Beschichtung der Objektträger. Die für die Gewebsschnitte verwendeten nativen Objektträger wurden für eine bessere Praktikabilität sowie eine sichere Haftungsstabilität mittels einer Aminosilanlösung beschichtet. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen:

1. Herstellung der Beschichtungslösung – für die Anzahl von ca. 100 Objektträgern Herstellung einer Aminosilanmischung (5ml Aminosilan + 200 ml Aceton)
2. Inkubation der Objektträger in der Aminosilanlösung für 2 Minuten.
3. Inkubation der Objektträger in destilliertem Wasser (Aq. dest.) 2*2 Minuten in jeweils frischem Wasser.
4. Trocknung der Schnitte für 1 Stunde bei 50-60° C

2.3.3 Immunhistologie (ED1)

Für die Immunhistologie wurden gesondert Schnitte repräsentativer Gehirnareale der 12 weiteren männlichen Sprague-Dawley-Ratten verwendet (n=12). Die Gehirne wurden ebenfalls transkardial durch einen Phosphat-puffer 0,2 M (pH 7,4) perfundiert, zwecks der Beseitigung des Blutes sowie der Blutkomponenten. Die entnommenen Gehirne wurden nacheinander zunächst in Ethanol (70%) und anschließend in einer Saccharose Lösung (30%) inkubiert um Fettkomponenten zu entfernen, die mit der Immunhistologie interagieren könnten. Danach erfolgte die Fixierung in Paraformaldehyd (PFA). Anschließend wurden zunächst 8µm dicke Paraffinschnitte angefertigt und nachfolgend die immunhistologischen Analysen mittels des CD68-positiven Antikörpers ED-1 durchgeführt:

1. Deparaffinisierung der Gewebsschnitte –2 x 20 Minuten in jeweils frischem Xylol.

2. Rehydrierung der Gewebeschnitte – Eintupfern der Präparate für jeweils 10 Sekunden in folgender Reihenfolge – 100%, 95% und 75% Ethanol sowie anschließend in destilliertem Wasser.
3. Waschen der Schnitte in TBST (TBS mit Tween 20[®]) 0,1% für 10 Minuten.
4. Präparation des 1. Antikörpers – der erste Antikörper wurde in einem 20%-igen Protein-Blockungsgemisch (in TBS) gelöst.
5. Inkubation der Schnitte mit dem 1. Antikörper für die Dauer einer Nacht (ca. 12 Stunden) bei 4° Celsius.
6. Waschen der Schnitte mit TBST (TBS mit Tween 20[®]) 2 x 5 Minuten, dabei Verwendung jeweils frischer TBST-lösungen.
7. Präparation des 2. Antikörpers (dieser nun mit Biotin als Marker konjugiert) - der zweite Antikörper wurde in einem 10%-igen Protein-Blockungsgemisch (in TBS) gelöst.
8. Inkubation der Schnitte mit dem 2. Antikörper für 2 Stunden bei Zimmertemperatur (ca. 20° Celsius).
9. Waschen der Schnitte mit TBST (TBS mit Tween 20[®]) 2 x 5 Minuten, dabei Verwendung jeweils frischer TBST-Lösungen.
10. Waschen der Schnitte mit TBS für 5 Minuten.
11. Blockade der Gewebeperoxidasen – Präparation von H₂O₂ 3% in Methanol und Inkubation der Schnitte für 20 Minuten bei Zimmertemperatur.
12. Waschen der Schnitte mit TBS 2 x 5 Minuten, dabei Verwendung jeweils frischer TBS-Lösungen.
13. Inkubation der Schnitte mit AB-complex/HRP für 30 Minuten bei Zimmertemperatur.
14. Waschen der Schnitte mit TBS 2 x 5 Minuten, dabei Verwendung jeweils frischer TBS-Lösungen.
15. Inkubation der Schnitte mit AEC Substrate-Chromogen[®] für 5 Minuten bei Zimmertemperatur.
16. Waschen der Schnitte mit destilliertem Wasser 2 x 5 Minuten, dabei Verwendung jeweils frischen Wassers.
17. Präparation der Schnitte mit Hämatoxin (Meyer[®]) für 3 Minuten.
18. Waschen der Schnitte mit TBS 2 x 5 Minuten, dabei Verwendung jeweils frischer TBS-Lösungen.
19. Waschen der Schnitte mit Leitungswasser für 10 Sekunden.
20. Präparation der Schnitte mit Aquatex und anschließend Fixierung mit Deckgläsern.

Es wurden jene Schnitte für die Auszählungen verwendet, dessen Querschnitt möglichst genau der schematischen Vorlage in Abb. 4 entspricht. Der abgebildete koronare Gehirnquerschnitt zeigt das Zentrum der Kontusion, demnach etwa 3,8 mm occipital der Bregmanht. Als anatomische Leitstruktur diente hierbei der Hippocampus, der komplett mit den jeweiligen Teilkomponenten, im Einzelnen den Ammonshörnern (lat.: cornu ammonis, CA) 1-4 und dem Gyrus dentatus (DG) zur Darstellung kommen sollte.

Der Infiltrationsgrad ED1-positiver Zellen, demnach aktivierter Microglia, Macrophagen und Monozyten sowie in sehr geringem Ausmaß auch der neutrophilen Granulozyten, wurde durch manuelle Auszählung der so markierten Zellen in vorher festgelegten Messbereichen, demnach dem Kontusions- und perikontusionellem Kortex ermittelt (Abb. 4). Die Analyse der einzelnen Gewebeschnitte erfolgte hierbei bei 40-facher Vergrößerung, anhand einer auf die kontusionierten Gehirnhemisphären gelegten Gittermatrix mit jeweils 1x1 mm messenden Quadranten. Die jeweils entlang der Grenzen angeordneten und mittels ED1-markierten Immunzellen wurden entsprechend ihrer größeren planen Ausdehnungen den jeweiligen Quadranten zugeordnet.

3.1 TTC-Färbung

Die zeitliche Entwicklung der Kontusionsvolumina mittels der TTC-Färbung ist als Quantifizierung (Abb. 5) und in der Morphologie (Abb. 6) dargestellt. Auf Grundlage der TTC-Färbung wurden demnach maximale Ausmaße der Läsionen am 2. Tag nach CCI gemessen - $47,81 \pm 6,7 \text{ mm}^3$. Bei annähernd gleichen Werten am 3. Tag - $46,2 \pm 8,8 \text{ mm}^3$, wurde am 5. Tag eine Verringerung der Kontusionsvolumina mit $24,53 \pm 2,4 \text{ mm}^3$ und mit niedrigsten Werten am 7. Tag nach dem Trauma mit $20,68 \pm 3,9 \text{ mm}^3$ gemessen.

Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) dieser gemessenen Kontusionsvolumina wurden beim Vergleich der Werte am 2. Tag mit den Werten am 7. Tag erzielt ($p = 0.045$). Die größte Reduktion des gemessenen Kontusionsvolumens konnte vom 3. auf den 5. Tag beobachtet werden. Die Werte der Kontusionsvolumina am 2. sowie am 3. Tag nach dem Trauma waren mehr als doppelt so hoch wie jene am 7. Tag. Während die Farbe der nicht gefärbten (unkontusionierten) Areale bis zum 3. Tag nahezu Weiß erschien, wechselte der Farbton am 5. Tag zunehmend in einen rötlichen Ton (Abb. 6).

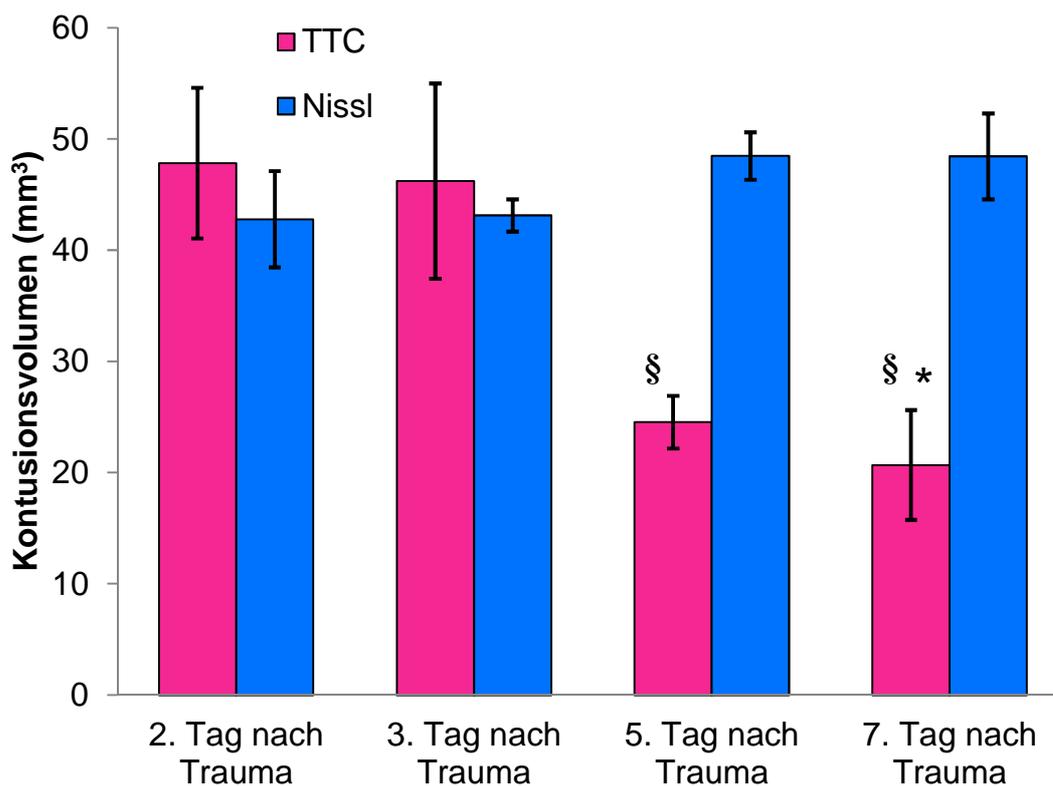


Abb. 5: Dargestellt wird der zeitliche Verlauf der Entwicklung der insgesamt erhobenen Messergebnisse der Kontusionsvolumina an den jeweiligen Messzeitpunkten: 2, 3, 5 sowie 7 Tage nach Controlled Cortical Impact (CCI) anhand der Färbungen 2,3,5-Triphenyltetrazolium Chlorid (TTC, magenta) sowie Kresylviolett (Nissl, blau). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den TTC-gemessenen Kontusionsvolumina konnten beim Vergleich des 2. mit dem 7. Tag (* vs. Tag 2) berechnet werden. Zwischen den Nissl-gemessenen Kontusionsvolumina wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede im Zeitverlauf nach CCI beobachtet. Die anhand der TTC-Färbung erhobenen Kontusionsvolumina an den Tagen 5 und 7 waren zu den anhand der Nissl-Färbung ermittelten Werten aller Zeitpunkte statistisch signifikant unterschiedlich (§ vs. Nissl, einfaktorielles Varianzanalyse, posthoc Scheffé-Prozedur).

Parallel dazu wurde eine recht ausgeprägte Reduktion des Kontusionsvolumens gemessen. Am 7. Tag nach CCI schließlich waren die meisten kontusionierten Areale rot bis dunkelrot markiert. Am 7. Tag nach CCI konnte ein zystischer Parenchymdefekt als fortgeschrittener Entwicklungszustand der Nekrose im Bereich des kontusionierten Kortex beobachtet werden. Die Korrekturrechnung, die für den volumetrisch wirksamen Einfluss des Hirnödems an den vor allem relevanten Tagen 2, 3 und 5 erfolgte. Während am Tag 7 das Kontusionsareal durch Segmentierung des zystischen Defektes durch Nachzeichnung der fehlenden Konvexität quantifiziert wurde, erfolgte die Bestimmung der hemisphäriellen Schwellung durch dieselbe Formel unter Einbeziehung dieses Defektes.

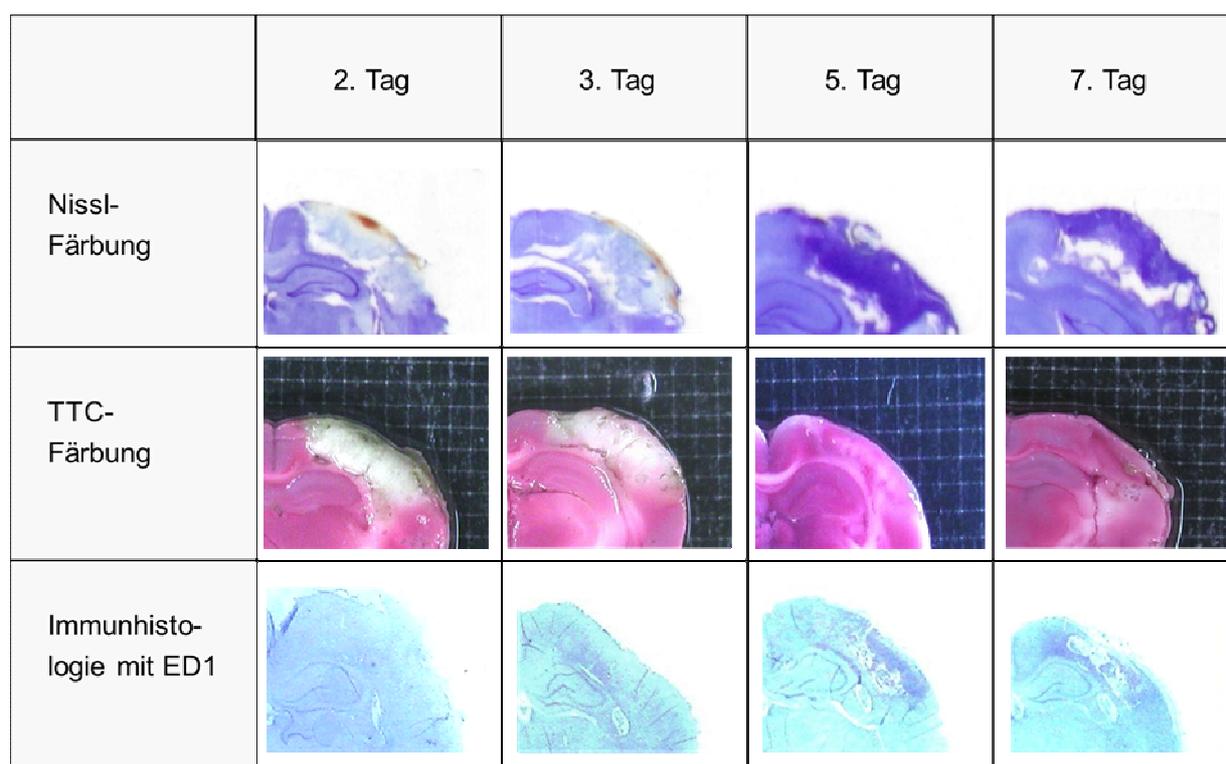


Abb. 6: Dargestellt wird exemplarisch der zeitliche Verlauf der Entwicklung der 2,3,5-Triphenyltetrazolium Chlorid (TTC - magenta, Bildmitte)- sowie Kresylviolett-Färbungen (Nissl – blau, obere Bildreihe) zur Visualisierung der Kontusionsareale an den jeweiligen Messzeitpunkten: 2, 3, 5 sowie 7 Tage nach Controlled Cortical Impact (CCI). In der unteren Bildreihe wurden ebenfalls die makroskopischen Übersichten der immunhistologisch-markierten Kontusionsareale an den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten, als Korrelation zu den Messmethoden Nissl und TTC, miteingefügt. Hierbei zeigen sich vor allem am 5. und 7. Tag mittels ED1-angefärbte Läsionsbereiche, die über jene der TTC-markierten Areale hinausreichen.

3.2 Nissl – Färbung (Kresylviolett)

Die zeitliche Entwicklung der Kontusionsvolumina mittels der Nissl-Färbung ist als Quantifizierung (Abb. 5) und in der Morphologie (Abb. 6) dargestellt. Die niedrigsten Kontusionsvolumenwerte wurden am 2. Tag gemessen - $42,77 \pm 4,3 \text{ mm}^3$. Während der Wert am 3. Tag vergleichbar war ($43,12 \pm 1,5 \text{ mm}^3$), wurde am 5. Tag ein leichter Anstieg mit $48,46 \pm 2,1 \text{ mm}^3$ und ein dazu annähernd unveränderter Wert am 7. Tag nach CCI mit $48,43 \pm 3,9 \text{ mm}^3$ gemessen. Die Unterschiede im zeitlichen Verlauf waren zueinander nicht signifikant ($p > 0,05$). Zwischen den Färbemethoden TTC und Nissl konnten statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der Kontusionsvolumina zu den Zeitpunkten 2. Tag des gemessenen Kontusionsvolumens anhand der Nissl-Färbung im Vergleich mit dem Kontusionsvolumen gemessen anhand der TTC Färbung am 5. ($p = 0,016$) und 7. Tag ($p = 0,003$) berechnet werden. Des Weiteren wurden statistisch signifikante Unterschiede beim Vergleich der Kontusionsvolumina der Nissl-Färbung am 3. Tag und der TTC-Färbung am 5. ($p = 0,014$) und 7. Tag ($p = 0,003$) erzielt. Genauso waren die Werte am 7. Tag in der Nissl-Färbung signifikant unterschiedlich zu den Werten am 5. ($p = 0,001$) sowie 7. Tag ($p = 0,0002$) der TTC-Färbung (Abb. 5).

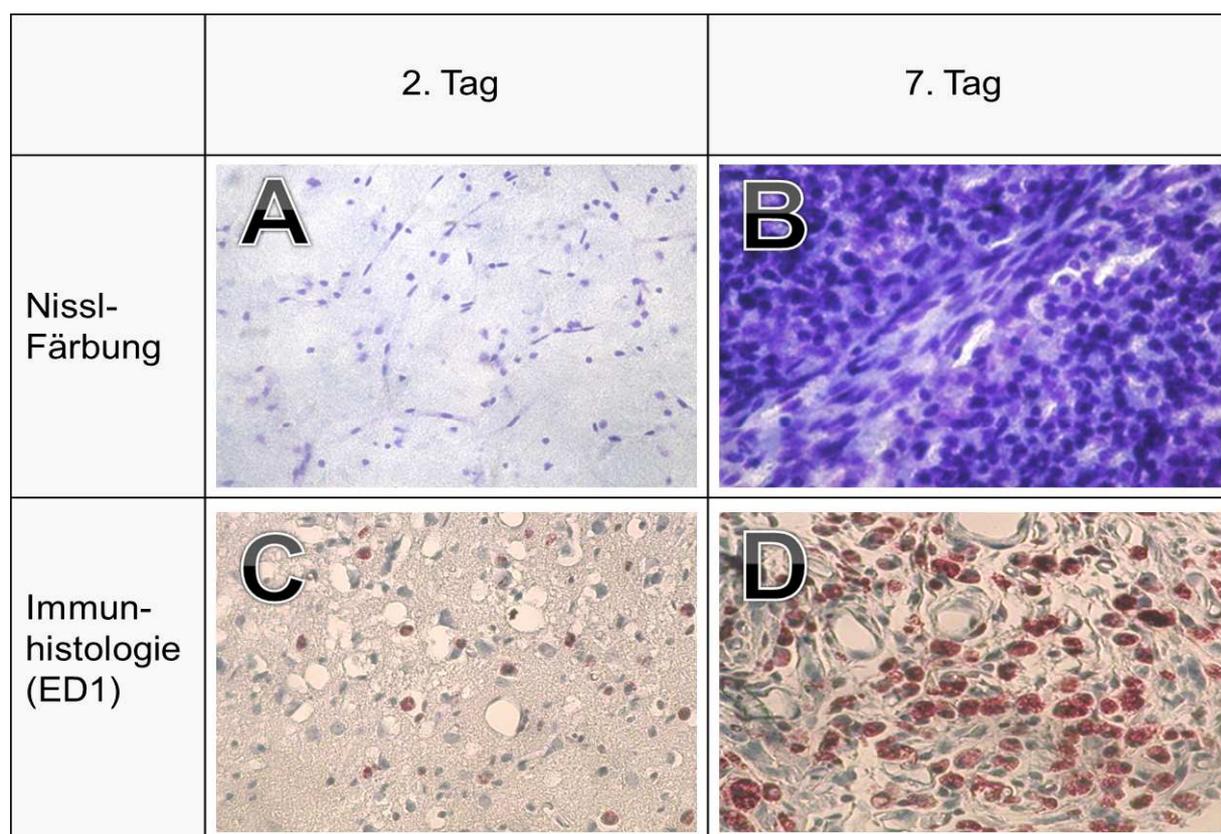


Abb. 7.: In der oberen Zeile sind jeweils Ausschnitte der zentralen Kontusionsareale am 2. (A) und 7. Tag (B) gegenübergestellt, die anhand der Nissl-Methode angefärbt wurden. Der schräg verlaufende Bereich verminderter Zelldichte am 7. Tag entspricht hierbei einem Gefäß. Die untere Zeile zeigt korrelierend hierzu ebenfalls Ausschnitte zentraler Bereiche der Kontusionsareale am 2. (C) und 7. Tag (D) nach CCI (20x), die anhand des Markers ED1 angefärbt wurden. Durch ED1 können diese Zellen, die anhand der Nissl-Methode am 7. Tag markiert wurden, aktivierten Immunzellen zugeordnet werden (D, 20x). Die Gefäße sind hierbei jeweils quer getroffen.

Während am 2. und 3. Tag nach dem Trauma die Kontusionsflächen ungefärbt imponierten, wechselte der Farbton zum 5. und 7. Tag im Vergleich zum normalen, unkontusionierten Gewebe, in einen dunkelblauen Ton. In der mikroskopischen Inspektion der Kontusionsareale am 2. und 3. Tag nach CCI fällt zunächst die deutlich reduzierte absolute Zelldichte auf. Richtige Zellstrukturen lassen sich nur noch vereinzelt erkennen, hingegen zeigen sich viele Zellrestbestandteile (Abb. 7A).

Bei der Gegenüberstellung der jeweiligen Übersichtsvergrößerungen zentraler Bereiche der Kontusionsareale am 2. und 7. Tag (Abb. 7A und B, 20x) wird deutlich, dass der makroskopische Farbumschlag zugunsten eines dunkelblauen Farbtons am 5. und 7. Tag (Abb. 6), auf die massive Zunahme der absoluten Zelldichten zurückgeführt werden kann. Diese Zellen können in Korrelation zur immunhistologischen Färbung mittels ED1 am 7. Tag

größtenteils aktivierten Immunzellen zugeordnet werden (Abb. 7D). Allerdings ist hierbei die Zuordnung zu den jeweiligen Immunzelltypen bestenfalls indirekt möglich.

3.3 Immunhistologie (ED1-Färbung)

Die Auszählungen ED1-positiver Zellen erfolgte an schematisch prädefinierten Arealen, was die Differenzierung zwischen dem Kontusions- und perikontusionellen Kortex erlaubte (Abb. 4).

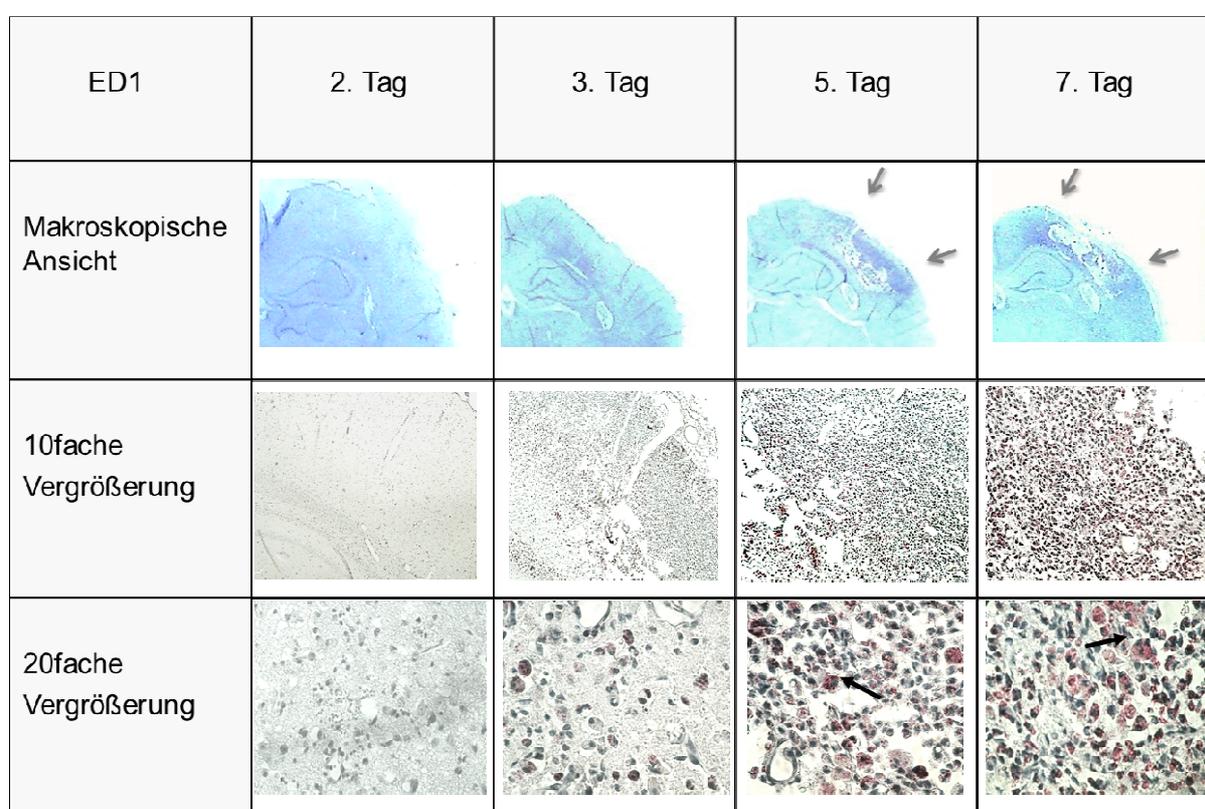


Abb. 8.: Die zeitliche Entwicklung der Zellinfiltration ED1- positiver Zellen am 2., 3., 5. und 7. Tag nach CCI. Parallel hierzu wird in der oberen Zeile auch eine makroskopisch-sichtbare Zunahme des Läsionsvolumens am 5. und 7. Tag beobachtet (graue Pfeile; zur besseren Hervorhebung der Kontusionsareale wurde hier der Farbton entsprechend geändert). Die schwarzen Pfeile in der unteren Zeile markieren exemplarisch aktivierte Microglia und/oder hämatogen immigrierte Macrophagen, demnach die am 5. und 7. Tag prädominierenden Immunzelltypen. Es können ebenfalls nebeneinander verschiedene Stadien der Immunzellaktivierung beobachtet werden, so dass parallel sowohl kleine und schwach angefärbte als auch große und intensiv markierte, demnach metabolisch hochaktive Immunzellen (20x, hier v.a. am 5. und 7. Tag) zur Darstellung kommen.

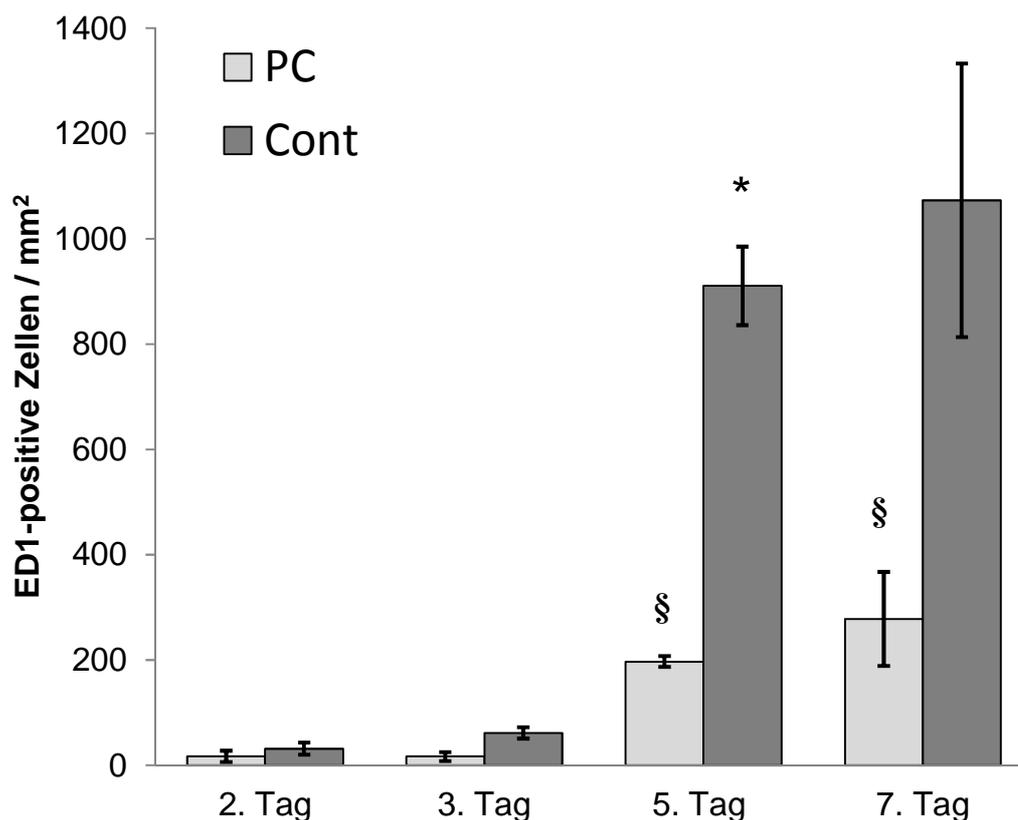


Abb. 9.: Zeitlicher Verlauf der quantifizierten Zellen an den jeweiligen Messzeitpunkten: 2, 3, 5 sowie 7 Tage nach CCI, welche mit dem CD 68-sensitiven Antikörper ED1 (aktivierte Microglia, Monozyten und partiell auch neutrophile Granulozyten) markiert werden können. Alle Messungen beziehen sich auf den ipsilateralen Kortex, wobei eine Trennung zwischen dem Kontusionsareal (*Cont*, dunkelgrau) und dem perikontusionellen Kortex (*PC*, hellgrau) vorgenommen wurde. Am 5. Tag kommt es zur starken Konzentrationszunahme der Immunzellen sowohl im Kontusionsareal als auch im perikontusionellen Kortex mit darauf folgender leichter Zunahme der Werte bis hin zum 7. Tag. Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) konnten beim Vergleich der Kontusionsareale zwischen dem 2. und 5. Tag sowie 3. und 5. Tag (* vs. 2. und 3. Tag) erreicht werden. Beim Vergleich ED1-positiver Zellen in den perikontusionellen Messbereichen hingegen konnten statistisch signifikante Unterschiede beim Vergleich der Messergebnisse des 2. Tages sowohl mit dem 5. als auch dem 7. Tag erzielt werden (§ vs. 2. Tag, univariante Varianzanalyse, posthoc Tests nach Games-Howell und Scheffé-Prozedur).

Am 2. Tag wurden $31,48 \pm 11,69$ Zellen/ mm^2 im Zentrum und $16,82 \pm 10,45$ Zellen/ mm^2 im perikontusionellen Kortex gezählt. Am 3. Tag zeichnete sich ein leichter Anstieg der Konzentration im Zentrum der Kontusion mit $61,26 \pm 10,58$ Zellen/ mm^2 ab, während die Anzahl der ED1-positiven Zellen im perikontusionellem Kortex annähernd unverändert blieb ($16,53 \pm 8,3$ Zellen/ mm^2). 5 Tage nach dem Trauma zeichnete sich ein prominenter Zuwachs

der ED1-positiven Zellen sowohl im Kontusionsareal ($910,3 \pm 74,6$ Zellen/ mm^2) als auch im perikontusionellen Kortex ($196,7 \pm 10,4$ Zellen/ mm^2) ab. Ein weiterer Zuwachs der Zelldichte wurde am 7. Tag nach CCI im Kontusionsareal ($1073 \pm 259,6$ Zellen/ mm^2) und im perikontusionellen Kortex ($277,8 \pm 89,1$ Zellen/ mm^2) gemessen.

Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) konnten beim Vergleich der Kontusionsareale zwischen dem 2. und 5. Tag ($p = 0.016$) sowie zwischen dem 3. und 5. Tag ($p = 0.017$) erreicht werden.

Die fehlende Signifikanz der Werte vom 2. und 3. Tag mit den Werten am 7. Tag ($p = 0.137$ und 0.144) resultiert hierbei aus der großen Varianz der Standardfehler der Mittelwerte (SEM) am 7. Tag. Diese wiederum ist zum Teil bedingt durch die vor allem am 7. Tag zu beobachtende partielle Dekavitation des Kontusionsareals. Im Gegensatz zu den planimetrischen Analysen der Nissl- und TTC-Färbungen, konnte dieser Nachteil nicht durch die Nachzeichnung der physiologischen Gehirnkonvexität beglichen werden. Beim Vergleich ED1-positiver Zellen in den perikontusionellen Messbereichen hingegen, konnten statistisch signifikante Unterschiede beim Vergleich der Messergebnisse des 2. und 7. Tages ($p = 0.024$) sowie des 3. und 7. Tages ($p = 0.024$) erzielt werden (Abb. 9, univariante Varianzanalyse, posthoc Tests nach Games-Howell und Scheffé-Prozedur). Der größte Zuwachs der Dichte ED1-positiver Zellen wurde vom 3. auf den 5. Tag nach CCI beobachtet (Abb. 8, 9).

Abb. 8 zeigt sowohl die makroskopischen als auch die unter 10 - 20-fachen Vergrößerung sichtbaren Kontusionsareale an allen Zeitpunkten. ED1-positive Zellen erkennt man am weiten und roten Zytoplasmasaum und kann sie entsprechend der Sensivität dieses Antikörpers, aber auch der Morphologie diese Zellen zu den Microglia bzw. den Macrophagen zuordnen.

3.4 Morphometrische Bestimmung der Hemisphärenschwellung

Anhand der TTC-präparierten Gewebeschnitte konnte auch die prozentuale Schwellung der kontusionierten Hemisphären an den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten, als indirekter Ausdruck des Hirnödems quantifiziert werden (Abb. 10). Die jeweiligen prozentualen Schwellungswerte betragen in zeitlicher Reihenfolge: 12,5%, 11,9%, 7,1% und 6,3% nach CCI. Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) zwischen den einzelnen Gruppen konnten sowohl beim Vergleich der Zeitpunkte 2. Tag mit dem 5. ($p = 0.036$) und 7. Tag ($p = 0.018$) als auch beim Vergleich des 3. Tages mit den 7. Tag ($p = 0.035$) berechnet werden (Abb. 10).

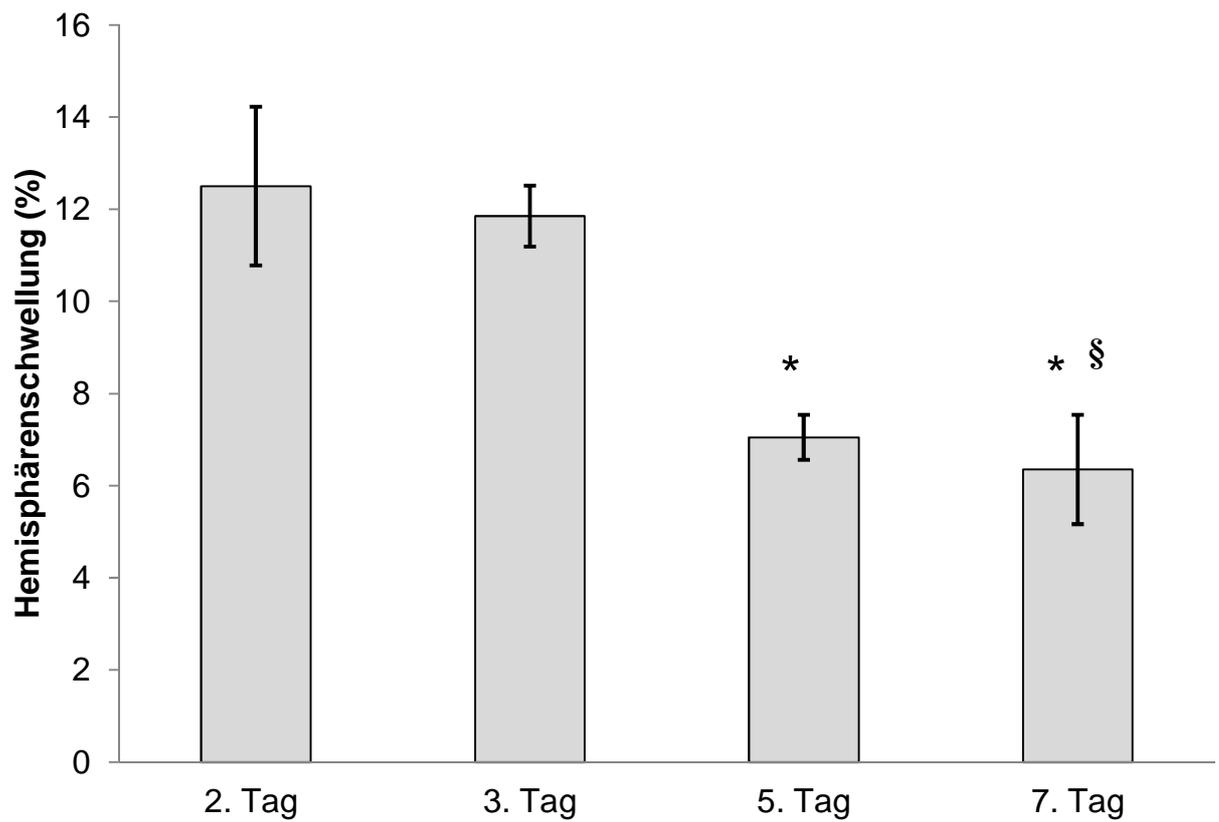


Abb. 10.: Zeitliche Dynamik der morphometrisch ermittelten Hemisphärenschrwellung als indirekter Ausdruck der jeweiligen Ödementwicklung an den Tagen 2, 3, 5 und 7 nach CCI. Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) zwischen den einzelnen Gruppen konnten beim Vergleich der Zeitpunkte 2. Tag mit dem 5. und 7. Tag (* vs. 2. Tag) sowie beim Vergleich des 3. Tages mit dem 7. Tag berechnet werden (§ vs. 3. Tag, einfaktorische Varianzanalyse, posthoc Scheffé-Prozedur).

4.1 Allgemeine Beobachtungen

Die zeitabhängigen histomorphologischen Alterationen des Kontusionsvolumens, wie sie in der vorliegenden Arbeit anhand der TTC-, der Nissl-Färbung und der ED1-Immunhistologie dargestellt wurden, zeigen in erster Linie, dass nicht die Spezifität der Untersuchungsmethode als solche, sondern vor allem der Zeitfaktor einen limitierenden Faktor bei der Visualisierung der tatsächlich vorliegenden Gewebeschädigung darstellt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die absoluten Volumenwerte der kortikalen Kontusion TTC-markierter Gehirnareale aufgrund der energieabhängigen Visualisierung des Gewebes durch die metabolische Präsenz der Immunzellen > 72 Stunden nach primärer Hirnkontusion entscheidend beeinflusst werden. Unter der Annahme entzündlich verändertes und infiltrierte Gewebe als geschädigt zu interpretieren, versagte TTC an späteren Zeitpunkten nach SHT diesen Einfluss adäquat widerzuspiegeln. Dem gegenüber zeigte sich im Zeitfenster 48 bis 72 Stunden nach SHT eine gute Korrelation zwischen TTC und Nissl bei der Darstellung des Kontusionsvolumens. Hier überwiegt jedoch auch die neurodegenerative Komponente der sekundären Hirnschädigung, wohingegen nur vereinzelte Immunzellen im Kontusions- und perikontusionellen Kortex nachgewiesen werden konnten.

Die Qualität einer Methode definiert sich über ihre Reliabilität bzw. die formale Genauigkeit des Untersuchungsprozesses an sich. Demnach ist die Aussagekraft der endgültigen Auswertung von Untersuchungsergebnissen, im Rahmen der zugrundeliegenden Fragestellung, wesentlich von der Auswahl einer adäquaten Untersuchungsmethode abhängig. Im Idealfall müsste das gewählte Untersuchungsverfahren alle zu erwartenden Variablen bei der Versuchsdurchführung erfassen können. In der feingeweblichen Diagnostik des postkontusionellen Hirnschadens ist jedoch nicht nur die Vielschichtigkeit der sekundären Hirnschädigung als solche allein zu berücksichtigen. Vielmehr bedingt das zeitabhängig verschiedene Distributionsmuster der verschiedenen Zelltypen eine dynamische Variabilität, die so mittels einer einzigen bzw. spezifischen Untersuchungsmethode nicht erfasst werden kann. Somit ist der gezielte Einsatz verschiedener Untersuchungsmethoden von besonderer Bedeutung, z.B. bei der Testung neuroprotektiver Substanzen.

Die genaue Erforschung der Komplexität der sekundären Hirnschädigung stand nicht im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit. Hierfür wäre der Einsatz vieler weiterer

Untersuchungsmethoden notwendig, des Weiteren müsste die Zeitspanne erheblich weiter gefasst werden müssen. Schließlich müssten auch die Auswirkungen einer Vielzahl potentiell neuroprotektiv wirksamer Substanzen untersucht werden. Effektiver ist es jedoch einzelne Teilaspekte der komplexen posttraumatischen Vorgänge herauszugreifen und diese gezielt mit einer Fragestellung zu beantworten.

Das primäre Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, zeitlich definierte Einschränkungen der TTC-Färbung bei der Darstellung eines tatsächlich vorliegenden Hirnschadens zu untersuchen bzw. den zeitlichen Rahmen für verlässliche Untersuchungsergebnisse zu bestimmen. Diesbezüglich erfolgt zunächst eine genauere Analyse der drei hier untersuchten Teilaspekte der sekundären Hirnschädigung. Diese sind die posttraumatische Neurodegeneration, das Gehirnödem und die immunzellvermittelte Komponente. Im Anschluss werden die hieraus resultierenden Auswirkungen auf die TTC-Messmethode diskutiert.

4.2 Sekundärer Hirnschaden

4.2.1 Zerebraler Stoffwechsel nach Schädel-Hirn-Trauma

Laut zahlreichen sowohl tierexperimentellen als auch klinischen Berichten scheinen nach heutiger Auffassung hauptsächlich die Mitochondrien eine zentrale Stellung bei der Initialisierung nekrotisch- und apoptotisch bedingter Zellschäden in vielen neurologischen Erkrankungen einzunehmen, hierunter nach Schlaganfall und SHT (Ankarcrona et al., 1995; Albensi et al., 2000; Wang, 2001; Sullivan et al., 2005; Lifshitz et al., 2004). In diesem Zusammenhang kommt es auf zellulärer Ebene zum komplexen Zusammenspiel zwischen der Exzitotoxizität, dem oxidativen Stress und proteolytischen Mechanismen, wovon wiederum ein Großteil durch Dysfunktion mitochondrialer Stoffwechselwege getriggert wird. Des Weiteren initialisiert der mitochondriale Schaden im so genannten `mitochondrialen Weg` der Apoptose den neuronalen Zelluntergang, durch Freisetzung von Cytochrom c und anderen pro-apoptotischen Faktoren (Sullivan et al., 2005; Teheranian et al., 2008).

Unter Berücksichtigung der Eigenschaft der TTC-Färbung den energetischen Metabolismus der Zellen durch Interaktion mit der mitochondrialen Succinatdehydrogenase darzustellen,

werden nachfolgend zunächst die Auswirkungen des SHT's auf den intrazellulären Stoffwechsel etwas genauer beschrieben. Anschließend werden überleitend die hierdurch direkt und indirekt hervorgerufenen interzellulären Interaktionen veranschaulicht.

Die Schlüsselfunktion der Mitochondrien im Zusammenhang der intra- und interzellulären, postkontusionellen Alterationen im zerebralen Stoffwechsel. Mitochondrien (*mitos*, gr.: Faden; *chondros*, gr.: Granulum) sind ubiquitär, also in jeder sauerstoffverbrauchenden Zelle des Organismus vorzufinden. Die Mitochondrienmembran ist zweischichtig aufgebaut. Die innere Membran ist stark gefaltet und funktionell hochspezifisch konstruiert. Sie enthält die Komplexe I bis IV der Atmungskette und der oxidativen Phosphorylierung, Ubichinon als Redoxüberträger sowie an der Außenseite das Hämprotein Cytochrom c, ein Mitglied der proapoptischen Faktoren. Die zentrale Stellung der Mitochondrien im zellulären Energiestoffwechsel erklärt sich hauptsächlich dadurch, dass in der mitochondrialen Matrix u.a. die Enzymsysteme des Citratzyklus, des Abbaus vieler Aminosäuren, partieller Teile der Hämbiosynthese sowie der β -Oxidation der Fettsäuren vorzufinden sind (Löffler G & Petrides PE, Biochemie und Pathobiochemie, 2003). Der Citratzyklus (nach dem Deutsch-Englischen Biochemiker Hans Adolf Krebs auch Krebs-Zyklus genannt) ist als einziges heute identifiziertes Bindeglied zwischen der oxidativen Endstrecke des Substratstoffwechsels und oxidativer Phosphorylierung eingeschaltet. Durch die Zerlegung eines Moleküls Acetat werden hier in einem Durchgang zwei Moleküle Kohlendioxid und acht Protonen (H^+) gebildet. Diese wiederum werden in Form der beiden reduzierten (-H) Cosubstrate NAD (Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid) und FAD (Flavin-Adenin-Dinukleotid) auf die Komplexe I bis IV der Atmungskette übertragen (Abb. 11).

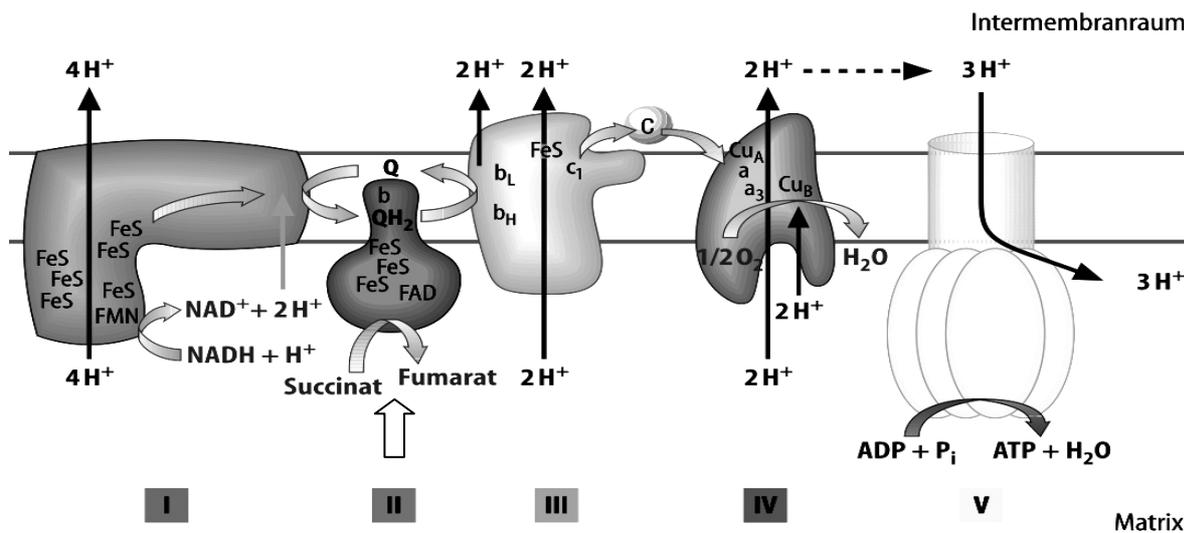


Abb. 11 Reaktionsfolgen der Atmungskette (modifiziert nach Löffler G, Springer-Lehrbuch Online, Basiswissen Biochemie, 2005, S. 267-292). Der weiße Pfeil markiert jenen Reaktionsschritt, in dem Succinat unter Abgabe von Reduktionsäquivalenten durch die Succinat-Dehydrogenase (SDH) zu Fumarat reduziert wird. Im gleichen Reaktionsschritt wird TTC unter der Bildung des roten Farbstoffs Formazan durch die SDH reduziert.

In stark exergonischen Reaktionen werden hierbei Sauerstoffmoleküle zu Wasser oxidiert:

$\text{H}_2 + \frac{1}{2} \text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}; \Delta G = - 235 \text{ kJ/mol}$. Die hieraus frei werdende Energie wird zum Transport von Protonen (H^+) aus der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum genutzt. Die so generierte transmembranöse, mitochondriale Potentialdifferenz ($\Delta\Psi_m$) ist wiederum treibende Kraft für die $\text{F}_1\text{-F}_0\text{-ATP-Synthase}$ zur ATP-Synthese aus Adenosinmonophosphat (ADP) und Phosphat. Der Begriff *oxidative Phosphorylierung* bezieht sich somit auf die energetische Kopplung dieser beiden Vorgänge. Die Zellatmung unterliegt komplizierten Regulationsmechanismen, so werden z.B. bei ATP-Mangel bzw. Energiedefizit mit konsekutiv erhöhten AMP- und ADP- Konzentrationen katabole Stoffwechselreaktionen getriggert und umgekehrt. Das Gehirn kann im Gegensatz zu den anderen Geweben normalerweise nur Glucose als Energiequelle verwenden. In diesem Zusammenhang ergibt sich die Sonderstellung des ZNS hauptsächlich aus zwei Gründen: *erstens* verbraucht die Cytochrom-oxidase der Atmungskette etwa 90% des absoluten vom Organismus aufgenommenen Sauerstoffs und *zweitens* liefert hierbei die Oxidation von Kohlenhydraten den Hauptanteil des Energiebedarfs der Zellen. Unter normalen Bedingungen beträgt die Energieausbeute 30 Mol ATP pro Mol Glucose in der aeroben Glykolyse. Der s.g. Pasteureffekt (nach Louis Pasteur) bewirkt, dass unter anaeroben Bedingungen nur 2 Mol ATP pro Mol Glucose gebildet werden können (Löffler G & Petrides PE, Biochemie und

Pathobiochemie, 2003). Etwa 80% des durch die Atmungskette verbrauchenden Sauerstoffs werden für die ATP-Synthese verwendet. 7-10% des hierbei anfallenden ATP's müssen für die Gluconeogenese bereitgestellt werden (Rolfe und Brown, 1997). Jegliche endo- bzw. exogene Noxen, wie z.B. auch im Rahmen des SHT's, die das Gleichgewicht des Citratzyklus, der Glykolyse und konsekutiv der Atmungskette beeinflussen, wirken sich in den Nervenzellen somit erheblich schneller als in den anderen Geweben aus (Kawamata et al., 1995; Casey et al., 2008). So kommt es bereits in den ersten Minuten bis Stunden nach CCI zur Erhöhung der zerebralen Laktatkonzentrationen (Brooks et al., 2001; Schuhmann et al., 2003; Thomale et al., 2007). Diese resultiert hauptsächlich aus der posttraumatisch gesteigerten anaeroben Glykolyse durch den Sauerstoffmangel, den vermehrt anfallenden Mengen an AMP und ADP sowie den oxidativ-bedingten Schäden der Schlüsselenzyme der Atmungskette (Kochanek et al., 2006; Opii et al., 2007; Robertson et al., 2007). Im späteren Verlauf tragen ebenfalls die infiltrierenden Macrophagen und reaktive Astrozyten zur Erhöhung der intrazerebralen Laktatkonzentration bei (Schuhmann et al., 2003; Soustiel et al., 2005). Humane Langzeitstudien haben ergeben, dass erhöhte Laktatkonzentrationen mit erheblichen neurologischen Defiziten selbst noch Jahre nach initialer Läsion assoziiert sind (Ashwal et al., 2000; Brooks et al., 2001; Brenner et al., 2003; Marino et al., 2007). Das posttraumatische Energiedefizit hat ebenfalls erhebliche Auswirkungen auf ATP-abhängige Biosynthese- und enzymatisch-katalysierte Reaktionen. In diesem Zusammenhang werden von der Gesamtmenge des anfallenden ATP's etwa 25-30% für die Proteinbiosynthese benötigt. Ferner beanspruchen ATP-katalysierte Prozesse jeweils 19-28% (Na^+/K^+ -ATPase), 4-8% (Ca^{2+} -ATPase) und 3% (Actinomyosin) des ATP's (Rolfe und Brown, 1997).

Die akute, mechanische Gewalteinwirkung im Rahmen des SHT's führt somit zur bioenergetischen Entkopplung physiologischer Reaktionsmechanismen, hauptsächlich durch fehlendes Substratangebot bei erhöhtem Energiebedarf. Dadurch wird das Transmembranpotential aufgehoben, das wiederum zur Induktion der pathologischen mitochondrialen Permeabilität (engl.: mitochondrial permeability transition, mTP) führt (Zoratti & Szabo, 1995; Halestrap et al., 2002; Tsujimoto and Shimizu, 2007). Die mTP ist als pathologischer Anstieg der Permeabilität der inneren Mitochondrienmembran für Lösungen mit einer molaren Masse unter 1500 Dalton (Da) zu verstehen. Es wird vermutet, dass diese direkt durch die Öffnung eines Megakanals, des s.g. permeablen Transitionsporus (Engl.: permeability transition pore, PTP), vermittelt wird (Zoratti & Szabo, 1995). Die wichtigsten Teilkomponenten des PTP sind der spannungsabhängige Anionenkanal (Engl.: voltage-dependent anion channel, VDAC), der Adenin Nukleotid Translokator (ANT) und

Cyclophilin-D (Cyp-D) (Sullivan et al., 2005; Tsujimoto and Shimizu, 2007; Mazzeo et al., 2009). Diese Mechanismen sind nur teilweise erforscht. Insgesamt kommt es hierdurch zum Integritätsverlust der äußeren Mitochondrienmembran und im Endeffekt zur Einleitung des irreversiblen Zelluntergangs (Zoratti & Szabo, 1995; Tsujimoto & Shimizu, 2007).

4.2.2 Zelluntergang

Die posttraumatische Neurodegeneration muss als Resultat vielfältiger Einflussfaktoren verstanden werden. So wird zum einen grundsätzlich zwischen zwei Formen des Zelltods, der *Nekrose* und *Apoptose*, unterschieden. Diese resultieren aus prinzipiell verschiedenartigen, zugrundeliegenden Pathomechanismen. Zum anderen werden primäre und sekundäre Prozesse für den postkontusionellen Neuronenverlust verantwortlich gemacht.

Die *Nekrose* charakterisiert zunächst definierte morphologische Veränderungen der Kernstruktur, im Einzelnen als Karyolyse, Pyknose und Karyorrhesis bezeichnet. Zytoplasmatische Veränderungen umfassen in zeitlicher Reihenfolge die Azidophilie, den Strukturverlust und schließlich die Fragmentation. Eine zerklümmte Kernstruktur und der Verlust des Zytoplasmas weisen auf die Irreversibilität des Prozesses hin (Kreutzberg et al., 1997). Den mikroskopisch sichtbaren liegen sowohl ultrastrukturelle Veränderungen, wie z.B. der Zusammenbruch des Zytoskeletts, die Verdichtung und Schrumpfung der Mitochondrien sowie verschiedene metabolische Störungen zugrunde, hierunter hauptsächlich die gestörte Proteinbiosynthese (Auer et al., 1985).

Die *Apoptose* (*apo*, gr. - von, *ptosis*, gr. – der Fall) wird unter Berücksichtigung des physiologischen Aspektes auch als programmierter Zelltod bezeichnet. Diese Form des Zelluntergangs führt unter Normalbedingungen u.a. zur Zerstörung funktionsloser Neurone und autoreaktiver T – Lymphozyten in der Embryonalphase. Des Weiteren wird durch den programmierten Zelltod der Zellzuwachs speziell in jenen Organen geregelt, die einer reversiblen Expansion unterliegen. Hierzu zählt z.B. das Epithel der Brustdrüse und der Prostata (Löffler G & Petrides PE, Biochemie und Pathobiochemie, 2003). Somit ist die Apoptose als physiologischer Regulationsmechanismus zur Eliminierung nicht benötigter Zellen zu verstehen und unterliegt einer genauen genetischen Kontrolle, was mit einer nachweisbaren de-novo-Synthese von Regulationsproteinen verbunden ist (Kreutzberg et al., 1997; Busse et al., 1998). Die verschiedenen Stadien umfassen zunächst die Ausbildung von Pseudopodien der Kernmembran (Karyokinesis), die Fragmentation der DNA durch Kondensation

des Kern-Chromatins sowie typische, sogenannte `apoptotic bodies`. Nach heutiger Auffassung scheint postkontusionell hauptsächlich der so genannte `mitochondriale Weg` der Apoptose für diese Form der Neurodegeneration verantwortlich zu sein (Sullivan et al., 2005; Teheranian et al., 2008). Die Existenz apoptotischer Zellen im Zeitverlauf nach Schädel-Hirn-Trauma konnte anhand verschiedener tierexperimenteller Modelle nachgewiesen werden (Raghupathi et al., 2003; Teheranian et al., 2008). Zu den wichtigsten pro-apoptotischen Faktoren zählen die Mitglieder der bcl-2 (engl.: B-cell lymphoma 2) Familie Bax (engl: bcl-2 associated protein X) und Bid (engl.: Bcl-2 homology 3 interacting domain death agonist) sowie das an die innere Mitochondrienmembran gebundene Cytochrom c. Im aktivierten Zustand kommt es zur Ausbildung eines dreidimensional konfigurierten Kanals, groß genug, um Cytochrom c, den Apoptose-Induktionsfaktor (engl.: apoptosis inducing factor, AIF) und weitere pro-apoptotische Faktoren in das Zytosol übertreten zu lassen (Saito et al, 2000). Es wird angenommen, dass hauptsächlich dieser Mechanismus ebenfalls entscheidend zur Ausbildung der pathologischen Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran (engl.: mitochondrial outer membrane permeabilization, MOMP) beiträgt (Antonsson et al., 2000). Im Zytosol bindet Cytochrom c an den heterodimeren Apoptose-Protease-Aktivationsfaktor (engl.: apoptotic protease activating factor-1, Apaf-1), was zur Ausbildung einer radförmigen Konfiguration, des sogenannten *Apoptosoms* führt. Daran wiederum bindet die Caspase 9, die ihrerseits die Caspase 3 und weitere Caspasen aktiviert. Diese so genannten Effektor-Caspasen sind hochpotente Cysteinproteasen mit einer Spezifität für Asparaginsäure in einer Polypeptidsequenz, wie sie als solche in vielen zellulären Membranstrukturen vorkommt und vermitteln somit direkt die apoptotisch-initialisierten Zellschäden (Löffler & Petrides, Biochemie und Pathobiochemie, 2003). Der genaue Anteil der Apoptose am gesamten sekundären Hirnschaden sowie die Bedeutung potentieller therapeutischer Ansatzpunkte sind bis heute Gegenstand vieler Diskussionen (Raghupathi et al., 1998; Hall et al., 2005; Teheranian et al., 2008).

Die Einteilung in primäre und sekundäre posttraumatische, neurodegenerative Prozesse war bereits in der Vergangenheit Gegenstand vieler Diskussionen. So postulierten 1997 Graham und Gennarelli, dass die mechanische Gewalteinwirkung für den unmittelbaren bzw. primären Neuronenverlust verantwortlich sein soll. Hingegen wird von anderen Autoren der direkte Neuronenverlust als ein eher ungewöhnliches Phänomen beschrieben (Povlishock, 1992; Maxwell et al., 1993). Ungeachtet der früher und heute bestehenden Diskrepanzen sind die Versuche einer systematischen Einteilung der postkontusionellen Veränderungen auf die Etablierung therapeutischer Ansatzpunkte ausgerichtet. Die diesbezüglich in den letzten

Jahren vorgenommenen intensiven Bemühungen belegen, dass sich primäre und sekundäre Prozesse gegenseitig beeinflussen und sowohl die Nekrose als auch die Apoptose in sehr frühen und späten Zeitpunkten nach SHT, in unterschiedlichem Ausmaß und Verteilung, für die Neurodegeneration verantwortlich gemacht werden können (Raghupathi et al., 1998; Halestrap et al., 2002; Sullivan et al., 2005; Tsujimoto and Shimizu, 2007; Tehranian et al., 2008). Demnach erscheint die tendentiell zu beobachtende Einteilung der posttraumatischen, pathomorphologischen Veränderungen in *frühe*, in den ersten Minuten und Stunden auftretende, und *spätere* Ereignisse nach SHT zutreffender. So werden in den ersten Minuten Kaskaden angestoßen, die für den prolongierten Neuronenverlust selbst noch Wochen nach SHT verantwortlich sind (Chen et al., 2002; Tehranian et al., 2008). Die zugrundeliegenden Pathomechanismen umfassen neben der mechanischen Komponente hauptsächlich respiratorische, hämodynamische und metabolische Einflussfaktoren (Povlishock, 1985; Sutton et al., 1993; Saatman et al., 2006).

Abb. 12 zeigt in einer vereinfachten, schematischen Skizze, die posttraumatischen intra – und interzellulären Membranprozesse (aus Mazzeo et al., 2009).

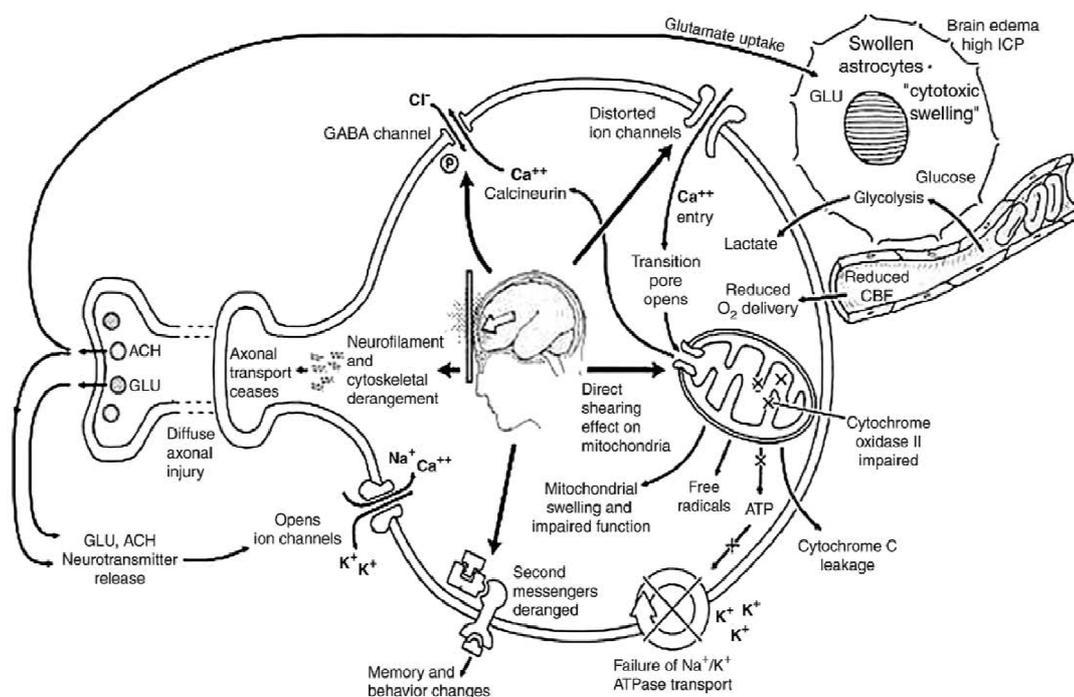


Abb. 12 Vereinfachte, bildliche Übersicht der posttraumatischen Membranprozesse (aus Mazzeo et al., 2009).

Calcium. Nach ischämischem Insult und SHT wird eine massive Zunahme der intrazellulären Kalziumkonzentration beobachtet (Xiong et al., 1997; Sullivan et al., 2005). Diese gelten als Mediatoren vielfältiger intrazellulärer, autodestruktiver Prozesse.

In diesem Zusammenhang sind exzitatorische Aminosäuren, hauptsächlich Glutamat, entscheidend an der Erhöhung der postkontusionellen, intrazellulären Kalziumkonzentration beteiligt (Shapira et al., 1990; Palmer et al., 1993; Sullivan et al., 1998; Jiang et al., 2001). Erhöhte, extrazelluläre Glutamatkonzentrationen im Rahmen des SHT's sind auf verschiedene Pathomechanismen zurückzuführen. Hierzu zählen die vermehrte Freisetzung des intrazellulären Glutamats im Rahmen des Zelluntergangs, eine gesteigerte präsynaptische Freisetzung und die Störung der Wiederaufnahme des Glutamats durch den Einfluss posttraumatischer Mediatorsubstanzen (Stover et al., 1999; Rao et al., 2001; van Landeghem et al., 2006). Die Glutamat-bedingte Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration wird durch unkontrollierte Aktivierung der Glutamat-Rezeptoren vermittelt. Hierzu zählen der NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-, der AMPA (α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazolpropionat)- und der Quisqualat-Rezeptor. So kommt es durch Bindung von Glutamat an den NMDA-Rezeptor zur Öffnung eines spannungsabhängigen Ionenkanals; folglich wird die spannungsabhängige Blockierung des Kanals durch Mg^{2+} aufgrund der Depolarisation der Nervenzelle aufgehoben und es können Ca^{2+} und Na^+ unkontrolliert in die Zellen strömen.

Die Bindung an den AMPA-Rezeptor bewirkt wiederum die Aktivierung des hiermit assoziierten, spannungsunabhängigen Kationenkanals und den Einstrom von Na^+ gegen K^+ , was mit gleichem Resultat wie oben beschrieben die Depolarisation der Zelle zur Folge hat (Young & Fagg, 1990). Schließlich kommt es durch die Bindung von Glutamat an den Quisqualat-Rezeptor zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC), die indirekt über die Produktion von Inositoltriphosphat (IP₃) die Freisetzung intrazellulär gebundenen Kalziums bewirkt. Für den Abtransport des intrazellulären Kalziums ist hauptsächlich der in der Zellmembran verankerte Na^+ / Ca^{2+} – Transporter zuständig. Es ist ein energieabhängiger Ionenkanal (Na^+ / Ca^{2+} – ATPase), der aktiv überschüssige Kalziumionen aus der Zelle pumpt. Für dessen regelrechte Funktion werden wiederum hohe Konzentrationen von ATP benötigt (Rolfe & Brown, 1997; Jiang et al., 2001). Durch die postkontusionelle Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung mit konsekutivem ATP-Mangel kann die oben genannte, hauptsächlich Glutamat-vermittelte Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration nicht mehr kompensiert werden. Nach heutiger Auffassung scheint Kalzium auch den Adenin Nukleotid Translokator (ANT), der für den Transport von intramitochondralem ATP im Austausch gegen zytosolisches ADP zuständig ist, zu beeinflussen und konsekutiv zum

postkontusionellem ATP-Defizit sowie zur Induktion des mTP und somit zum irreversiblen Zelluntergang zusätzlich beitragen (Halestrap et al., 2002; Opii et al., 2007).

Die mitochondriale Kalziumfreisetzung scheint somit einen der entscheidenden, limitierenden Faktoren für das postkontusionelle Überleben der Nervenzellen darzustellen (Sullivan et al., 2005). So wird die hierdurch verursachte Schwellung der Mitochondrien bereits 10 Minuten nach SHT beobachtet und scheint bis zu jenem Zeitpunkt reversibel zu sein, an dem 1. die zellulären Reparaturmechanismen noch intakt sind und 2. der mTP geschlossen bleibt (Sullivan et al., 1999)

Des Weiteren werden durch Kalzium Enzyme aktiviert, die eine Vielzahl intrazellulärer Strukturen zerstören. Proteasen, hierunter hauptsächlich die Calpaine, greifen direkt strukturell- und funktionell wichtige Proteine an (ATP-asen, Neurofilament, Myelin, Superoxiddismutase) (Faden et al., 1987; Seddick & Habib, 1991; Hall et al., 2005). Durch aktivierte Phospholipasen werden strukturelle Membran-Phospholipide gespalten. Aus der so freigesetzten Arachidonsäure bilden sich wiederum inflammatorische Prostaglandine und Leukotriene (Young, 1992). Nukleasen schließlich schädigen direkt die zelluläre DNA (Pitman et al., 1993).

Oxidativer Stress. Der oxidative Stress trägt zusätzlich zur Vergrößerung des postkontusionellen Läsionsvolumens bei. Die im Rahmen des SHT's zu beobachtende Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung und der Zusammenbruch der Integrität beider Mitochondrienmembranen (mTP, MOMP) zieht die unkontrollierte Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies in das Zytosol nach sich (Friberg & Wieloch, 2002). Dieser Mechanismus scheint insbesondere in den ersten Minuten bis Stunden nach SHT für zelluläre Schäden verantwortlich zu sein. Zu den weiteren Ursachen für die Entstehung freier Radikale zählen unter anderem die Arachidonsäure-Kaskade (Prostaglandin-Synthetase, 5-Lipoxygenase-Aktivität), die Xanthin-Oxidase-Aktivität und die Oxidation des nach extravasal übergetretenen Hämoglobins (Hall, 1997; Löffler G & Petrides PE, Biochemie und Pathobiochemie, 2003).

Oxidoreduktasen werden in Dehydrogenasen, Oxidasen, Dioxigenasen und Monooxygenasen eingeteilt. Zu den schädlichsten reaktiven Sauerstoffspezies zählt das Superoxidradikal ($O_2^{\cdot-}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und das äußerst reaktivfreudige Hydroxylradikal ($OH\bullet$). So konnte am CCI-Model des SHT's ein Höchstwert dieser Radikale 5 – 15 Minuten nach dem Trauma gemessen werden. Des Weiteren wird ein kontinuierlicher Anstieg der oxidativen Degradation von Lipiden, der so genannten Lipidperoxidation, im Verlauf der ersten

postkontusionellen Stunde beobachtet (Smith et al., 1994). Hierbei werden durch das Hydroxylradikal Elektronen von Membranlipiden abgespalten, wodurch eine Kettenreaktion ausgelöst wird und schließlich zum Zelluntergang führt (Hall, 1997).

An späteren Zeitpunkten schließen sich eine Vielzahl weiterer Mechanismen an, die einerseits zur prolongierten Lipidperoxidation, aber auch zur Störung der Blut-Hirn-Schranke, der anterograden axonalen Degeneration (so genannte `Waller'sche` Degeneration, s.u.), zu einer direkten Schädigung zellulärer Membranen und zur enzymatischer Autooxidation biogener Amine (Dopamin, Noradrenalin und Serotonin) führen (Hall, 1997; Lewen et al., 2000). In diesem Zusammenhang werden oxidative Zellschäden an Zeitpunkten >36 h nach SHT hauptsächlich durch den Einfluss immunkompetenter Zellen (aktivierte Microglia, neutrophile Granulozyten und Macrophagen) aufrechterhalten und potenziert (Hall, 1997; Khan et al., 2009). Die oben erwähnten Prozesse greifen vielschichtig ineinander über. So triggern zum Beispiel freie Radikale die Freisetzung exzitatorischer Aminosäuren, umgekehrt kann Glutamat auch die Produktion von Hydroxyl-Radikalen induzieren. Das im Rahmen der Arachidonsäure-Kaskade freigesetzte Kalzium potenziert enzymatisch katalysierte Oxidationen und die Radikal-induzierte Lipidperoxidation, die ihrerseits wiederum eine weitere Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration verursacht (Hall, 1997).

Die *Nekrose*, *Apoptose*, *oxidativer Stress* und weitere hiermit direkt und indirekt verbundene Pathomechanismen dürfen keinesfalls als separate, voneinander unabhängige Prozesse verstanden werden. Vielmehr laufen diese postkontusionell parallel ab und beeinflussen sich gegenseitig. So wird z.B. angenommen, dass unter bestimmten Voraussetzungen nekrotisch imponierende Zellschäden durch apoptotisch-induzierte Pathomechanismen, hauptsächlich via den Tumor-Nekrosefaktor- α (TNF α) verursacht werden können (Degterev et al., 2005).

Eine differenzierte Erfassung der verschiedenen Formen der Neurodegeneration und der entgleisten pathophysiologischen Vorgänge stand nicht im Mittelpunkt der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen. Anhand der Nissl- und TTC-Färbungen sowie der Immunhistologie ist es jedoch gelungen, die Grundlagen der jeweiligen Teilaspekte der sekundären Hirnschädigung (Neurodegeneration, Gehirnödem und Immunzellantwort) und die Dynamik dieser Mechanismen in den ersten 7 Tagen nach SHT zu veranschaulichen. Nachfolgend werden zunächst die hier erzielten Ergebnisse der Nissl-Färbungen mit den hierzu vorliegenden Arbeiten diskutiert und anschließend sowohl mit den anderen hier verwendeten Färbungen als auch anderen Untersuchungsmethoden aus zuvor publizierten Studien verglichen.

4.2.2.1 Nissl-Färbung

Die Bezeichnung `Nissl` - Histologie leitet sich von der Fähigkeit dieser basischen Untersuchungsmethode ab, die basophilen und auch als s.g. Nissl-Schollen (oder auch Tiroid) bezeichneten Strukturen innerhalb der Nervenzellkörper, selektiv erfassen zu können. Diese werden auch nach deren Erstentdecker Franz Nissl benannt. `Kresyl-Violet` und `Toulidin-Blau` werden hierbei als Synonyma verwendet. Als Nissl-Schollen werden wiederum dichtgepackte, entweder membrangebundene Ergastoplasma-Zisternen oder auch frei im Zytoplasma vorliegende Ribosomenansammlungen bezeichnet. Die Nervenzellfortsätze werden hierbei nicht erfasst, weswegen nur die Zellkörper zur Darstellung kommen. Die Spezifität bezieht sich jedoch nicht nur auf Nervenzellen. Vielmehr können z.B. auch Entzündungsprozesse, aufgrund des hiermit verbundenen gesteigerten Energieumsatzes, indirekt erfasst werden. Unter Berücksichtigung der Vielschichtigkeit der sekundären Hirnschädigung ergeben sich aufgrund dieser Eigenschaft der Nissl-Färbung sowohl Vor- als auch Nachteile. Der größte Nachteil resultiert hierbei aus der fehlenden Möglichkeit der Differenzierung zwischen dem tatsächlichen Ausmaß der Neurodegeneration und der sekundären Immunzellantwort im späteren Zeitverlauf (> 72 h) nach SHT. Auf der anderen Seite kann mit der Nissl-Färbung ein breiteres Spektrum der sekundären Hirnschädigung simultan erfasst werden, so dass sich hierdurch bei gewissen Fragestellungen auch ein Vorteil gegenüber anderen Untersuchungsmethoden (zum Beispiel TTC) ergibt. Die H&E-Methode zeigt hierzu sehr ähnliche Eigenschaften. Es gibt eine Vielzahl weiterer, mehr oder weniger selektiver Untersuchungsmethoden, die jeweils verschiedene Teilaspekte der neurodegenerativen Komponente der sekundären Hirnschädigung erfassen können. In diesem Zusammenhang erlauben z.B. die Olmos-Silberimprägnation oder Fluoro-Jade B (FJB) eine selektive Darstellung der postkontusionellen, neurodegenerativen Prozesse (de Olmos et al., 1994, Switzer et al., 2000; Hall et al., 2005; Liu et al., 2009). FJB ist eine anionische und fluorisierende Verbindung, mit der selektiv eine bis heute unbekannte basische Substanz untergehender Nervenzellen angefärbt wird. Die Olmos-Silberimprägnation ist eine Technik zur selektiven Darstellung untergehender Nerven- und Gliazellen sowie von argyrophilen Bindegewebefasern. Eine Differenzierung zwischen der Nekrose und Apoptose ist anhand beider Methoden jedoch nicht möglich.

Die im Rahmen der Apoptose stattfindende Fragmentation der Desoxy-Ribonukleinsäure (DNA, deoxy ribonucleine acid) wird zum Beispiel durch die TUNEL-Methode (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end-labeling) selektiv erfasst (Raghupathi et al.,

1998, 2002, 2003; Tehranian et al, 2008). Ferner können in einer Reihe komplizierter, laborchemischer Verfahren ebenfalls selektiv sowohl Zellen mit erhöhter Aktivität proapoptotischer (Bax, Bad, Bim und Bok) als auch anti-apoptotischer Mitglieder der bcl-2-Familie (bcl-2, bcl-x und mcl-1) markiert werden (WESTERN und SOUTHERN-Blot, primärer Anti-Bax-Antikörper etc.). Nachfolgend werden die hier erhobenen Ergebnisse beschrieben und mit den hierzu vorliegenden Studien verglichen.

Abb. 5 zeigt zunächst den Verlauf der makroskopisch ermittelten, absoluten Kontusionsvolumenwerte sowohl Nissl- als auch TTC-präparierter Gewebeschnitte im Zeitverlauf nach CCI. Insgesamt werden zwar keine nennenswerten Volumenschwankungen der Nissl-markierten Läsionsvolumina an den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten beobachtet, dennoch ist eine leichte progressive Tendenz zu verzeichnen. Die Kontusionsareale imponieren am zweiten und dritten Tag nach CCI teilweise weiß, teilweise hellblau. Des Weiteren fällt der makroskopisch sichtbare Farbumschlag zwischen dem 3. und 5. Tag zugunsten eines intensiven, dunkelblauen Farbtons auf. In der mikroskopischen Inspektion am 2. und 3. Tag fällt in erster Linie die starke Reduktion der absoluten Zelldichte auf (Abb. 7A). Die Zellen imponieren wiederum stark geschrumpft, teilweise deutlich kompaktiert, i.S. einer Pyknose. In einigen Bereichen lassen sich jedoch auch überhaupt keine zellulären Strukturen mehr feststellen. Eine Unterteilung in Apoptose und Nekrose ist hierbei nicht möglich. Am 5. und 7. Tag zeigt sich eine parallel zum makroskopisch-sichtbaren Farbumschlag vorliegende, massive Zunahme der absoluten Zelldichte (Abb.6, 7B). Eine Unterteilung zwischen verschiedenen Zellformen ist hierbei nicht möglich, allerdings konnten diese Zellen in der Immunhistologie ED1-positiven Immunzellen (v.a. Microglia und Monozyten) zugeordnet werden (Abb. 7).

Der hier gezeigte, makroskopisch ermittelte Verlauf stimmt mit den publizierten Studien weitgehend überein. So wird zunächst eine progressive Zunahme des Läsionsvolumens anhand der Nissl-Methode bis hin zum 7. Tag nach initialer Läsion beobachtet (Chen et al., 2002; Saatman et al., 2006). Hierbei werden auch differente Zeitverläufe nach unterschiedlichen, initialen Traumastärken verzeichnet (Saatman et al., 2006). So wird nach 0.5 mm starker Einschlagtiefe nur eine bis zum 4. Tag nach CCI progressive Zunahme des Läsionsvolumens beobachtet mit nachfolgender, rückläufiger Tendenz (Saatman et al., 2006). Hingegen zeigen sich bei 1.0 mm starker Läsion sowohl insgesamt größere Ausmaße der

Läsionsvolumina als auch eine im Zeitverlauf progressive Entwicklungstendenz der absoluten Kontusionsvolumenwerte (Saatman et al., 2006).

Die in der vorliegenden Arbeit zu beobachtenden, unterschiedlichen Erscheinungsbilder der Nissl-markierten Kontusionsareale im Zeitverlauf nach CCI decken sich mit den Ergebnissen von Chen. Hierbei kommt es ebenfalls bereits am vierten Tag nach CCI zur deutlichen Zunahme der absoluten Zelldichte im gesamten Kontusionsareal (Chen et al., 2002).

Diese konnte Chen als OX-42-positive Immunzellen identifizieren (v.a. Microglia). Hingegen wurden diese Veränderungen in der vorliegenden Arbeit ebenfalls mit ED-1 sehr gut erfasst (Microglia/Macrophagen, im sehr geringen Umfang auch neutrophile Granulozyten). Interessanterweise wird eine progressive Zunahme sowohl des Kontusionsvolumens als auch der Dichte OX-42-positiver Zellen im Thalamus bis hin zum 28. Tag nach primärer Läsion beobachtet. Allerdings muss hierbei angemerkt werden, dass zu diesen Zeitpunkten auch eine ausgeprägte Dekortikation der Kontusionsareale zu beobachten ist (Chen et al., 2002). Das CCI-Modell des SHT's erzeugt demnach zwar primär eine fokale, klar abgrenzbare Hirnläsion. Im Rahmen der sekundären Hirnschädigung werden jedoch ebenfalls tiefere Gehirnareale in neurodegenerative Prozesse miteingebunden, hauptsächlich die CA1- und CA3- Bereiche des Hippocampus sowie die Granulär- und Molekularschichten des Gyrus dentatus (Carbonell et al., 1999; Chen et al., 2002; Saatman et al., 2006). Ähnliches wurde ebenfalls für das LFP (lateral fluid percussion)- Modell des SHT's beschrieben (Soares et al., 1995; Raghupathi et al., 2003).

Die in den Arbeiten von Saatman, Chen sowie in der vorliegenden Studie gezeigte, kontinuierliche Zunahme des Kontusionsvolumens mittels der Nissl-Histologie bis hin zum 7. Tag nach CCI berücksichtigt somit den Einfluss der Immunzellen auf das Ausmaß des kortikalen Läsionsareals. Der zwischen dem 3. und 5. Tag zu beobachtende dunkelblaue, makroskopische Farbumschlag, mit weiterer Vergrößerung des so imponierenden Kontusionsareals bis hin zum 7. Tag, findet sein entsprechendes, mikroskopisches Korrelat in Form massiver Dichtezunahme microglia-ähnlicher Zellen (Abb. 7B, D). Auf der anderen Seite ist aufgrund der immunzellvermittelten Komponente eine separate Erfassung der Neurodegeneration in diesem zeitlichen Umfang mit den Nissl- und H&E- Methoden eingeschränkt möglich. Anhand der immunhistologischen Analyse durch ED-1 konnten hier jedoch jene Zeitpunkte ermittelt werden, an welchen die immunzellvermittelte Komponente der sekundären Hirnschädigung das Kontusionsvolumen bestimmt, demnach zwischen dem 5. und 7. Tag nach CCI.

Anhand der bereits erwähnten Olmos-Silberimprägung kann die posttraumatische Neurodegeneration auch selektiver erfasst werden (de Olmos et al., 1994; Hall et al., 2005). So wird eine zeitabhängig uneinheitliche Distribution neurodegenerativer, sowohl ipsi- als auch kontralateraler Gehirnareale nach CCI, beobachtet (Hall et al., 2005). Im Einzelnen wird eine kontinuierliche Zunahme Olmos-positiver Zellen im Kontusionsareal, Hippocampus, dorsolateralem Thalamus und in partiellen Arealen des visuellen Kortex zwischen 6 Stunden und 3 Tagen verzeichnet. Nachfolgend kommt es bis hin zum 7. Tag nach CCI zur inkompletten Rückbildung der Olmos-positiven Neuronen sowohl im Kontusionskortex als auch im Hippocampus (Hall et al., 2005). An diesem Zeitpunkt kommt es ebenfalls zum Nachweis stark Olmos-positiver Areale sowohl im kontralateralen Kortex und CA1-Bereich des Hippocampus als auch im Thalamus und Anteilen des Corpus callosum. Dieser späte Nachweis neurodegenerativer Areale in kontralateralen Gehirnarealen ist in erster Linie auf die antero- und partiell retrograde Degeneration, via Corpus callosum und über kommissurale Projektionen, zurückzuführen. Die anterograde Neurodegeneration ist ein nach dem eigentlichen Trauma fortschreitender Untergang der distal vom geschädigten Nervenzellkörper gelegenen Nervenanteile. Dieses Phänomen wird nach dessen Erstbeschreiber Augustus Volney Waller (1816-1870) auch als Waller'sche Degeneration bezeichnet. Die retrograde Neurodegeneration beschreibt den umgekehrten Fall, wenn es bei distaler Nervenläsion zum somagerichteten Untergang der Nervenzellanteile kommt. Bei der Waller'schen Degeneration scheinen sowohl die Nekrose als auch die Apoptose eine Rolle zu spielen (Hall et al., 2005; Tehranian et al., 2008). Der genaue Anteil beider Formen des Zelltods an der antero- und retrograden Degeneration ist jedoch unklar (Raghupathi et al., 2003; Hall et al., 2005; Teheranian et al. 2008). Diesbezüglich zeigen sich bei transgenetisch veränderten Mäusen mit Überexpression von bcl-2 (einem der anti-apoptotischen Faktoren, s.o.) insgesamt weniger stark ausgeprägte Ausmaße der Läsionsvolumina als bei Wildtyp (WT)- Mäusen, gemessen mit der H&E-Methode an allen Zeitpunkten nach CCI (Raghupathi et al., 1998). Zudem werden vergleichbare Ausmaße der Läsionsvolumina am 2. und 7. Tag bei transgenen Mäusen im Gegensatz zur progressiven Zunahme der Kontusionsareale bis hin zum 7. Tag nach primärer Läsion bei den WT-Tieren beobachtet (Raghupathi et al., 1998). Demnach werden von der Apoptose nicht nur einzelne Zellen, sondern konventionell-histologisch (H&E) verifizierbare Gehirnareale im Zeitverlauf nach CCI betroffen. Tehranian et al. untersuchten diese Zusammenhänge bei transgenen, Bax (einem Mitglied der pro-apoptotischen Faktoren der Bcl-2-Familie, s.o.)-negativen Mäusen anhand der TUNEL-Technik. So konnten die unter diesem Aspekt markierten Zellen in den CA1- und CA3-

Regionen des ipsi- und kontralateralen Hippocampus bereits 24 h nach CCI, mit insgesamt stärkerer Ausprägung bei WT-Mäusen beobachtet werden (Tehrani et al., 2008). In der histologischen Untersuchung dieser Regionen am 21. Tag nach dem Trauma mittels der Nissl-Färbung wurde ein insgesamt weniger ausgeprägter Nervenschwund bei den bax-negativen Tieren verzeichnet (Tehrani et al., 2008). Im Zeitverlauf nach SHT werden demnach sowohl direkt dem primären Trauma ausgesetzte Gehirnareale als auch tiefere und in der kontralateralen Gehirnhemisphäre (Waller'sche Degeneration) nachzuverfolgende Bereiche von der Apoptose betroffen (Tehrani et al., 2008).

Diesbezüglich konnten auch interessante Zusammenhänge zwischen den verschiedenen, für die progrediente Neurodegeneration verantwortlichen Pathomechanismen und der Immunzellinfiltration durch den Einsatz von S-Nitrosoglutathion (GSNO) sowie die gezielte Blockade der katalytischen Untereinheit gp91^{phox} (Glykoprotein 91-phagozytäre Oxidase) der NADPH-Oxidase (Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphatoxidase, ein hauptsächlich in leukozytären Zellen vorhandenes, für die Produktion von Sauerstoffradikalen verantwortliches Enzym) am CCI – Modell des SHT's beobachtet werden (Khan et al., 2009; Dohi et al., 2010). GSNO ist ein physiologischer Metabolit von Glutathion und NO. Es dient u.a. als Vermittler endogener Nitrosilierungen und scheint um ein vielfaches potenter gegenüber Glutathion bezüglich der Minimierung oxidativ bedingter Schäden durch reaktive Stickstoffradikale (engl.: reactive nitrogen species, RNS), hierunter hauptsächlich Peroxynitrit (ONOO⁻), zu sein (Rauhala et al., 1998). So wird bei GSNO-bandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe eine deutlich reduzierte Dichte ED-1-positiver Zellen im ebenfalls insgesamt kleiner ausfallenden Kontusionsareal (H&E), bis zum 3. Tag nach CCI beobachtet. Parallel hierzu zeigt sich auch eine signifikante Reduzierung der apoptotisch-induzierten Neurodegeneration in der kortikalen Penumbrazone (TUNEL-Staining) (Khan et al., 2009). Bei gp91^{phox}-negativen Tieren reduziert sich das Ausmaß apoptotisch-induzierter Nervenzellschäden im Kontusionskortex sogar auf bis zu ein Drittel im Vergleich zur Kontrollgruppe (Dohi et al., 2010). Insgesamt zeigen diese Beobachtungen zum einen, dass apoptotisch bedingte, neurodegenerative Prozesse sowohl an frühen als auch späteren Zeitpunkten nach CCI wesentlich zum posttraumatischen Zelluntergang beitragen und keinesfalls auf den Kortex beschränkt bleiben. Zum anderen können konventionelle histologische Methoden (z.B. H&E und Nissl) sowohl die neurodegenerative- als auch immunzellvermittelte Komponente der sekundären Hirnschädigung in gewissem Umfang indirekt und teilweise unspezifisch wiedergeben.

4.2.3 Hirnödeme

Die besondere anatomische Lage des Gehirns, im Vergleich zu den anderen Organsystemen, ist mit einer Vielzahl sowohl struktureller als auch funktioneller Eigenschaften verbunden, woraus sich eine gewisse Sonderstellung auch in Bezug auf die postischämische und postkontusionelle Ödemausbildung ergibt. Die starre Begrenzung des Schädelknochens verhindert eine kompensatorische Volumenexpansion nach außen, folglich manifestieren sich akute intrakranielle, hierunter intra- und extrazerebrale Massenzunahmen, z.B. im Rahmen der akuten Epidural- oder intrazerebralen Massenblutung, direkt in Form eines erhöhten intrakraniellen Drucks (ICP, intracranial pressure).

Das Hirnödem per se kann zunächst generell als Erhöhung des Hirngewebewassergehalts mit konsekutiver Erhöhung des Hirngewebevolumens verstanden werden (Papius, 1974). Im Rahmen des experimentellen SHT's werden unabhängig von der initialen Traumastärke und dem SHT - Modell, maximale Ausmaße des Hirnödems etwa 24 bis 48h nach initialer Läsion gemessen (Shapira et al., 1993; Kroppenstedt et al., 1999; Baskaya et al., 1997; 2000; Thomale et al., 2002). Die nachfolgende Abnahme des Gehirnödems bis hin zum 7. Tag wird in einer überwiegenden Mehrheit der hierzu vorliegenden Studien beobachtet (Assaf, 1997; Baskaya et al., 1997; 2000; van Putten, 2005). Die im Rahmen der Ödemausbildung auftretenden Volumenschwankungen können zunächst, primär als Ausdruck der hämorrhagischen Läsion, durch kompensatorische Verschiebungen zwischen den vier intrakraniellen Kompartimenten, im Einzelnen dem Intrazellulärraum, extrazellulärem Gewebeanteil, dem Blutvolumen und schließlich dem Liquorsystem, im gewissen Umfang ausgeglichen werden, führen im weiteren Verlauf, bei Ausschöpfung der Kompensationsmechanismen, jedoch ebenfalls zur intrakraniellen, Behandlungsbedürftigen Drucksteigerung (Kellie, 1824; Monroe, 1783; Kroppenstedt et al., 1999; Taya et al., 2009). Zudem scheint das Gehirngewebe als solches stärker vulnerabel gegenüber ödematös-bedingten Schäden als andere Gewebe zu sein, was die Behandlungsbedürftigkeit pathologischer, intrakranieller Drucksteigerungen zusätzlich bekräftigt (Hindmann et al., 1990).

Die heute übliche Einteilung in das so genannte `vasogene` und zelluläre bzw. `zytotoxische` Hirnödem wurde primär durch den Neuropathologen Igor Klatzo eingeführt (Klatzo, 1967).

Der Einfluss der jeweiligen Anteile beider Ödemyten auf das Gesamtvolumen des Gehirnödems im zeitlichen Verlauf nach tierexperimentellem SHT ist Gegenstand vieler

Diskussionen, zudem müssen die unterschiedlichen Formen der Traumaapplikationen der einzelnen SHT-Modelle auf die zeitliche Dynamik des postkontusionellen Hirnödems, respektive der hiermit verbundenen unterschiedlichen Distribution immunkompetenter Zellen im späteren Verlauf nach SHT, berücksichtigt werden.

4.2.3.1 Vasogenes Hirnödem

Die Ausbildung des vasogenen Hirnödems ist direkt auf den Integritätsverlust der physiologischen Passagebarriere zwischen Intravasalraum und Gehirngewebe, der so genannten Blut-Hirn-Schranke (BHS) zurückzuführen. So können Plasmaproteine und Wasser ungehindert in das Gehirngewebe eintreten und führen so zur Zunahme des extrazellulären Wassergehalts des Hirngewebes. Eine intakte BHS ist nur an bestimmten, physiologischen Stellen, bedingt durchlässig: der Plexus choroideus, das Organum vasculosum der Lamina terminalis, die Glandula pinealis und die Neurohypophyse (Giulian et al., 1989). Unter Normalbedingungen können z.B. nur lipidlösliche Moleküle bis zu einer gewissen Masse (bis zu 400 bis 500 g·mol⁻¹) ungehindert die Barriere überwinden. Hingegen werden wasserlösliche Moleküle, z.B. Glucose, durch spezielle Transportsysteme durchgeschleust. Diese sind wiederum so spezifisch, dass nur die D-Stereoisomere der Glucose transportiert werden. Ferner können Kaliumionen, die in exzitatorische Prozesse eingreifen, im Zellinneren transportiert und durch die membrangebundene Na⁺ / K⁺ - ATPase hinausgepumpt werden. Diesen hochspezifischen, funktionellen Eigenschaften liegen ultrastrukturelle Besonderheiten zugrunde, zunächst der dreischichtige Aufbau der Passagebarriere bestehend aus *Kapillarendothel*, *Basallamina* und *Membrana perivascularis gliae*, das Vorhandensein von kontinuierlichen *tight-junctions* zwischen den Endothelzellen und schließlich dem Fehlen eines transzellulären, vesikulären Transportsystems (Akert, 1973).

Infolge der primären Gewalteinwirkung sowie im späteren Verlauf nach Schädel-Hirn-Trauma durch sekundäre, mediatorvermittelte Mechanismen kommt es zur Schädigung der endothelialen Struktur und zum Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke (Klatzo et al., 1967; Unterberg et al., 1984; Khan et al., 2009). Unter diesen Bedingungen können auch osmotisch wirksame Plasmaproteine (wie zum Beispiel Albumin) ungehindert aus dem Blut in das Gehirngewebe übertreten (Klatzo et al., 1967). Anhand der Starling-Gleichung kann die Dynamik des vasogenen Hirnödems veranschaulicht werden (Klatzo, 1994):

$$J_v(\text{Flow}) = L_p [(P_{\text{Plasma}} - P_{\text{Gewebe}}) - \sigma (\Pi_{\text{Plasma}} - \Pi_{\text{Gewebe}})]$$

J_v beschreibt hierbei den Fluss zwischen Intravasalraum und Hirngewebe. L_p spiegelt den Permeabilitäts-Status der BHS wieder, welche zum einen direkt proportional von der Differenz des hydrostatischen Drucks des Plasma (P_{Plasma}) und Gewebes (P_{Gewebe}) abhängt. Zum anderen ist die Entstehung und Erhaltung des Hirnödems von der Differenz des kolloid-osmotischen Drucks von Plasma (Π_{Plasma}) und Hirngewebe (Π_{Gewebe}) abhängig.

So kann klinisch der Gewebedruck annäherungsweise durch den intrakraniellen Druck gemessen werden, hingegen spiegelt sich der Druck des Intravasalraums im mittleren arteriellen Blutdruck wieder (Klatzo et al., 1967; 1994; Thomale, 2001). Kurz gefasst bewirkt der Zusammenbruch der BHS, dass freie Plasmaproteine zusammen mit Wasser in das Hirngewebe übertreten und so zur unkontrollierten Ödemausbildung führen. In diesem Zusammenhang ist der Einfluss einer Reihe von Mediatorsubstanzen an der Entstehung und Aufrechterhaltung der vasogenen Komponente des posttraumatischen Hirnödems zu berücksichtigen. Hierzu zählen die im Rahmen des oxidativen Stresses erhöhten Konzentrationen der Arachidonsäure und freier Radikale in der Ödemflüssigkeit (Staub et al., 1994; Smith et al., 1994; Khan et al., 2009), das Bradykinin als aktiver Metabolit des Kallikrein-Kinin-Systems, die biogenen Amine (Serotonin, Histamin) sowie Matrix-Metalloproteinasen (v.a. MMP-9) im weiteren Verlauf nach SHT, hauptsächlich als Folge der Immunzellinfiltration (Unterberg et al., 1984; Khan et al., 2009).

Einfluss der vasogenen Komponente am Gesamtanteil des Hirnödems im Zeitverlauf nach SHT. Fluoreszenzmikroskopische Analysen der Extravasation des Farbstoffs Evans Blue oder der immunhistologische Nachweis von Immunglobulin-G (IgG) erlauben Aussagen über den Einfluss der vasogenen Komponente auf die zeitliche Entwicklung des Hirnödems nach SHT. Hierbei wird in der Regel eine Stunde vor der jeweils gewählten Untersuchungszeit Evans Blue intraarteriell injiziert, um eine möglichst ausreichende Perfusion des Gehirns zu gewährleisten. Das Ausmaß der anschließenden, intrazerebralen Anreicherung wird als Maß zur Beurteilung der BHS-Funktion herangezogen. Eine intensive Anreicherung demnach indiziert eine gestörte Funktion mit entsprechendem Übertritt von Evans Blue bzw. IgG in das Hirnparenchym. So wird am CCI-Modell des SHT's ein insgesamt biphasischer Verlauf der Schrankenstörung beobachtet, mit erstem Anstieg 3-6 h gefolgt vom zweiten, maximalen Anstieg 24-48 h nach CCI (Duvdevani et al., 1995; Baskaya et al., 1997). Durch die Bestimmung des spezifischen Gehirngewichts kann ein maximales Ausmaß des Hirnödems 24 h nach Trauma gemessen werden, was ebenfalls gut mit der prozentualen Ausrechnung des

volumetrischen Wassergehalts, als Ausdruck des Hirnödems, mit maximalen Werten 24 h nach CCI korreliert (Baskaya et al., 1997; 2000). Hierbei ist der zweite Anstieg der EB-Extravasation nicht mit einem erneuten Anstieg des Hirnödems verbunden, was u.a. auf die zu diesem Zeitpunkt bereits stattfindende Ödemresolution zurückgeführt werden könnte. Hingegen wird am Weight Drop-Modell (WD) des SHT's ein maximaler Anstieg der EB-Extravasation 4 h nach dem Trauma mit anschließender Wiederaufnahme der physiologischen Schrankenfunktion bis hin zum 7. Tag beobachtet (Shapira et al., 1993). Diese Tendenz konnte auch Saatman verzeichnen mit der Einschränkung, dass nur zwei Untersuchungspunkte der IgG-Extravasation, 4 h und 7 d nach CCI, gewählt wurden (Saatman et al., 2006). Diesbezüglich wurde auch der Einfluss der Immunzellen auf die Ausbildung des vasogenen Hirnödems untersucht. So konnte Soares am LFP-Modell des SHT's eine kontinuierliche Zunahme der BHS-Permeabilität bis hin zum 3. Tag nach initialer Läsion, mit hierzu paralleler Infiltration neutrophiler Granulozyten und Macrophagen entlang der von der Schrankenstörung betroffenen Areale, beobachten (Soares et al., 1995). Diese umfassten 4 h nach dem Trauma primär oberflächliche Kortexareale sowie eine entlang den Gefäßen nahezu lineare Anordnung neutrophiler Granulozyten und Macrophagen. Zwischen 48 und 72 Std. wurde schließlich eine massive Zunahme hauptsächlich der Macrophagen sowohl im Kontusionskortex als auch im Hippocampus verzeichnet. Diese Beobachtungen werden teilweise durch die immunhistologischen Untersuchungen von Chen et al. gestützt. Demnach zeigt sich ein kontinuierlicher Anstieg OX-42-positiver Zellen (Microglia, teilweise auch neutrophile Granulozyten) zwischen 24 h und 4 d nach CCI im Kortex, Corpus callosum, Thalamus und CA3-Bereich des Hippocampus (Chen et al., 2002).

Therapeutisch konnte diesbezüglich eine signifikante Minimierung der BHS-Störung durch S-Nitroso-Glutathion (GSNO) gezeigt werden (Khan et al., 2009). Diese protektive Wirkung von GSNO auf die BHS scheint auf mindestens zwei Mechanismen zu beruhen: *erstens* der GSNO-vermittelten Nitrosylierung der Untereinheit p65 von NF- κ B (engl.: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells, einem spezifischen Transkriptionsfaktor, der vor allem eine große Rolle in Entzündungsreaktionen spielt) und hierdurch bedingten, verminderten Expression von ICAM-1 (engl.: inter cellular adhesion molecule-1, einem Mediator der endothelialen Aktivierung mit hieraus resultierender Schrankenstörung) sowie MMP-9 (Matrix-Metalloproteinase 9, einer hochpotenten, vor allem durch aktivierte Immunzellen produzierten Proteinase, die wichtige Strukturproteine, unter anderem der BHS, zersetzen kann) (Khan et al., 2009) und *zweitens* der GSNO-vermittelten Suppression der

iNOS (induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase, engl.: inducible nitric oxide synthetase). Die iNOS ist ein Enzym, das unter anderem in neutrophilen Granulozyten und Macrophagen vorkommt und entscheidend zur posttraumatisch erhöhten Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) beim Menschen verantwortlich zu sein scheint (Orihara et al., 2001). So kommt es durch GSNO zur Unterbindung der diffusionsabhängigen Generierung von Peroxynitrit (ONOO⁻) über NO und Sauerstoffradikale (O₂⁻): $O_2^- + NO > ONOO^-$ (Fabian et al., 1995; Lewen et al., 2001). Peroxynitrit wiederum ist ein sehr reaktionsfreudiges, reaktives Stickstoffradikal (engl.: reactive nitrogen species, RNS), der direkte Membranschäden verursacht (Lipidperoxidation). So wird eine bis zu 72 h nach CCI deutlich reduzierte EB-Extravasation bei gleichzeitig erniedrigten Konzentrationen der Hirnschranken-spezifischen Marker ZO-I (lat.: Zonula Occludens) und Occludin (Strukturproteine, die für die Verankerung der *tight junctions* am Zytoskelett der Endothelzellen, folglich für die endotheliale Zellstabilität, verantwortlich sind) beobachtet. Parallel hierzu wird ebenfalls sowohl eine verminderte Immunreaktivität von ICAM-1 als auch eine deutliche Abnahme ED1- positiver Zellen und derer Metaboliten ONOO⁻ und MMP-9 im Vergleich zur Kontrollgruppe verzeichnet (Khan et al., 2009). Des Weiteren zeigt sich bei GSNO-behandelten Tieren eine drastische Abnahme des volumetrisch gemessenen Wassergehalts 24 Stunden nach CCI im Vergleich zur Kontrollgruppe (Khan et al., 2009). Diesbezüglich konnte auch der therapeutische Effekt von Minozac (Mzc) gezeigt werden. Die anti-inflammatorische Wirkung von Mzc beruht auf der selektiven Herunterregulierung der Produktion pro-inflammatorischer Chemokine: Interleukin (IL)-1 β , IL-6 und Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- α (Lloyd et al., 2008). So wird bei Mzc-behandelten Tieren ebenfalls eine signifikante Reduzierung des posttraumatischen Hirnödems 24 h nach CCI beobachtet (Lloyd et al., 2008).

Dies lässt zwei sich gegenseitig beeinflussende Schlussfolgerungen zu: erstens den direkten, schädigenden Einfluss der Immunzellen auf die BHS bis zu 3 Tagen nach SHT und umgekehrt die hierdurch bedingte starke Begünstigung der Infiltration immunkompetenter Zellen durch die aufgehobene Schrankenfunktion.

4.2.3.2 Zytotoxisches Hirnödem

Das zytotoxische Ödem wird synonym auch als zelluläres Ödem bezeichnet und beschreibt unter reinen Bedingungen den Zustand, in welchem die intrazelluläre Schwellung mit gleichzeitiger Abnahme des extrazellulären Wassergehalts bei intakter BHS einhergeht (Klatzo, 1967). Tatsächlich wird im zeitlichen Verlauf nach SHT ein paralleles Vorhandensein beider Komponenten des Hirnödems beobachtet. Zytotoxisch muss somit generell als ein Einfluss der zellulären Schwellung auf das posttraumatische Hirnödem verstanden werden (Shapira et al., 1993; Soares et al., 1995; Unterberg et al., 1997; Baskaya et al., 1997; 2000; Hall et al., 2002; Saatman et al., 2006; Taya et al., 2010). Die zelluläre, posttraumatische Schwellung resultiert hierbei primär aus der Entkopplung der Atmungskette und dem damit verbundenen Energiedefizit sowie folglich der Aufhebung der Integrität zellulärer Membranstrukturen. So kommt es zum unkontrollierten Einstrom osmotisch wirksamer Natriumionen in das Zellinnere, die aufgrund des Energiedefizits nicht mehr aktiv aus der Zelle gepumpt werden können (Na^+ / K^+ -ATPase). Die hierdurch bedingte Aufhebung des Membranpotentials führt zum Funktionsverlust weiterer Transportsysteme, so dass der pathologische Regelkreis aufrechterhalten wird und den osmotisch bedingten Nachstrom von Wasser zur Folge hat (Baethmann et al., 1988; Halestrap et al., 2002; Opii et al., 2007; Ates et al., 2007). In diesem Zusammenhang kommt es unter anderem durch die gesteigerte anaerobe Glykolyse mit erhöhten Lactatwerten auch zur Ausbildung einer Azidose, hauptsächlich in einer späten Reperfusionphase (Thomale et al., 2007). Die hierbei vermehrt anfallenden Protonen (H^+) können nicht mehr durch die H^+ / Na^+ -Pumpe ausgeschleust werden, was mit einer weiteren Akkumulation der intrazellulären Natriumionen verbunden ist (Staub et al., 1994; Opii et al., 2007; Casey et al., 2008). Zusätzlich verstärken exzitatorische Aminosäuren wie Glutamat durch Kopplung an den Glutamatrezeptor oder die posttraumatisch zu beobachtende verstärkte Freisetzung freier Radikale, hierunter reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffradikale (ROS/RNS, s.o.), die intrazelluläre Natriumkonzentration (Smith et al., 1994; Hall et al., 1997). Schließlich kommt es durch den Einfluss von Matrix-Metallproteinasen im späteren Verlauf nach SHT als Folge der Immunzellinfiltration zu direkten Membranschäden (Chen et al., 2002; Saatman et al., 2006; Khan et al., 2009). Somit kann das Energiedefizit bedingte Natrium-Ungleichgewicht als *die* treibende Kraft für die Ausbildung des zellulären Hirnödems betrachtet werden. Am CCI-Modell des SHT's konnte Taya diesbezüglich einen direkten Zusammenhang zwischen der zerebralen Natriumkonzentration und dem Gehirnwassergehalt feststellen (Taya et al., 2010).

Einfluss der zytotoxischen Komponente am Gesamtanteil des Hirnödems im Zeitverlauf nach SHT. Eine annäherungsweise spezifische Bestimmung der zytotoxischen Komponente des Hirnödems kann durch die Magnetresonanztomographie mittels diffusionsgewichteter (DWI, diffusion weighted imaging) Sequenzen erreicht werden. Anhand des so genannten `apparent water diffusion coefficient` (ADC) kann die molekulare Bewegung von Wasser dargestellt werden. Ein niedriger ADC wird hierbei als Hinweis für die intrazelluläre Wasserlokalisierung, demnach als Ausdruck des zellulären Ödems, gewertet. Demgegenüber indizieren hohe ADC-Werte eine extrazelluläre Wassereinlagerung. Das Ausmaß der intrazerebralen Wasseransammlung als Ausdruck des gesamten Hirnödems kann wiederum anhand der T2-Wichtung bestimmt werden. Ein hyperintenses Signal weist hierbei auf eine vermehrte Wasseransammlung hin. Mehrere hierzu vorliegende Studien belegen einen bis zu 24 h nach primärer Läsion zunehmenden, prädominanten Anteil der zytotoxischen Komponente am gesamten Gehirnödem (Assaf et al., 1997; Stroop et al., 1998; Unterberg et al., 1997; van Putten et al., 2005). Im weiteren Zeitverlauf nach WD- (Assaf) und CCI-Trauma (van Putten) wird sowohl eine Abnahme der Intensitätswerte in T2-gewichteten Sequenzen als Ausdruck der Ödemresolution als auch ansteigende ADC-Werte als Hinweis für die zunehmende extrazelluläre Wasserverschiebung verzeichnet (Assaf et al., 1997; van Putten et al., 2005).

Zusammen mit den o.g. Beobachtungen werden anhand unterschiedlicher Ödemquantifizierungs-Methoden und der verschiedenen Formen der primären Traumaapplikation in den jeweiligen SHT - Modellen der tierexperimentellen kortikalen Kontusion insgesamt maximale Ausmaße des Hirnödems 24 – 48 h nach primärer Hirnläsion, mit nachfolgender, zunehmender Ödemresolution bis hin zum 7. Tag gemessen. Aufgrund der innerhalb der ersten 24 h zu beobachtenden, parallelen Zunahme sowohl der pathologischen BHS-Permeabilität als auch der Immunzellinfiltration kann ein direkter Einfluss der Immunzellen auf beide Komponenten des Hirnödems spekuliert werden. Hierbei begünstigen sowohl die Immunzellen als auch der oxidative Stress hauptsächlich die Ausbildung der zytotoxischen Komponente des Hirnödems, was mit der drastischen Reduzierung des volumetrischen Wasseranteils 24 h nach initialer Läsion durch Blockierung aktiver Metabolite (ONOO⁻, MMP-9) sowie die niedrigen ADC-Werte des Gehirnödems zu diesem Zeitpunkt, begründet werden kann (Assaf et al., 1997; Khan et al., 2009). Die nachfolgende, parallele Zunahme der Infiltration ED-1-positiver Zellen und BHS-Störung bis zu 72 h ist mit keiner erneuten Ödemzunahme vergesellschaftet. Somit scheint die späte Immunzellinfiltration

ebenfalls reparative Aufgaben übernehmen zu können, während die frühe Zellinfiltration potentiell neurotoxisch zu sein scheint.

Die *Ödemresolution* kann generell über drei Mechanismen erfolgen:

1. Über einen vom Parenchyndruck abhängigen Massenstrom in Richtung der Liquorräume (Ohata et al., 1990);
2. Über die zelluläre Aufnahme von Plasmaproteinen in Neurone, Astrozyten und Immunzellen (Klatzo et al., 1980);
3. Über den retrograden, vesikulären Abtransport extrazellulärer Plasmaproteine durch die Endothelzellen zurück in das Gefäßlumen (Vorbrodts et al., 1985).

In der vorliegenden Arbeit wurde die zeitliche Dynamik des posttraumatischen Ödems als prozentuale Differenz zwischen der ipsi- und kontralateralen Hemisphärenschwellung anhand repräsentativer TTC-Gewebeschnitte indirekt verfolgt. Abb.10 zeigt eine kontinuierliche Abnahme der so gemessenen, ödem-assoziierten Hirnschwellung zwischen dem 2. und 7. Tag nach CCI. Der so gemessene zeitliche Verlauf der posttraumatischen Ödemresolution deckt sich gut mit früheren Untersuchungen (Shapira et al., 1993; Assaf et al., 1997; Baskaya et al., 1997; 2000; van Puten et al., 2005). So zeigen auch Untersuchungen des zeitlichen Verlaufs des gravimetrisch ermittelten Hirnödems eine hierzu vorliegende gute Korrelation (Shapira et al., 1993; Baskaya et al., 1997). Allerdings normalisiert sich das spezifische Gehirngewicht bereits am 4. posttraumatischen Tag am WD-Modell des SHT's (Shapira et al., 1993), hingegen erst nach 7 Tagen am CCI-Modell (Baskaya et al., 1997). Dies könnte durch die unterschiedliche Traumaapplikation und die daraus resultierende, fehlende Vergleichbarkeit der Läsionsmuster zurückgeführt werden. So zeigt sich in der Studie von Shapira auch eine ab 4 h nach Trauma zunehmende Wiederaufnahme der physiologischen Schrankenfunktion, was von der biphasischen Schrankenstörung am CCI-Modell sowie der zwischen 4 – 72 h kontinuierlichen Zunahme der pathologischen Permeabilität der BHS am LFP-Modell abweicht (Shapira et al., 1993; Soares et al., 1995; Baskaya et al., 1997).

Ungeachtet dessen können die TTC-präparierten Gewebeschnitte relativ sicher für volumetrische Analysen zur indirekten Einschätzung des insgesamt vorliegenden Hirnödems im Zeitverlauf nach SHT verwendet werden. Vor allem, um bei der korrekten Berechnung des Kontusionsvolumens durch fälschlich erhöhte Werte im Rahmen eines schwellungsbedingten

Gewebevermehrung und dessen Ausgleich ermöglichen zu können. Obwohl sich die Schwellung verringert, wären z.B. jedoch volumetrische Berechnungen des direkten, kontusionellen Anteils anhand TTC-präparierter Gewebeschnitten an Zeitpunkten > 72 h nach SHT nicht verlässlich, aufgrund der ab da zu beobachtenden, massiven Immunzellinfiltration und der hiermit verbundenen Verfälschung des Kontusionsvolumens.

4.2.4 Immunzellantwort

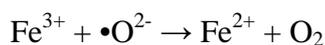
In den vorherigen Kapiteln wurden bereits die Zusammenhänge zwischen den posttraumatischen, neurodegenerativen Prozessen, der Ausbildung des Gehirnödem sowie der parallel dazu stattfindenden Immunzellinfiltration kurz angesprochen. Die immunzellvermittelte Komponente der sekundären Hirnschädigung ist laut den aktuellsten hierzu vorliegenden Studien mit einer Vielzahl weiterer, sowohl struktureller als auch funktioneller Veränderungen assoziiert (Cross et al., 2001; Chen et al., 2002; Saatman et al., 2006; Lloyd et al., 2008; Khan et al., 2009; Dohi et al., 2010). Die an der posttraumatischen Immunantwort beteiligten Zellen umfassen die intrazerebral-lokalisierten Microglia, also die gehirnspezifischen Immunzellen. Des Weiteren zählen hierzu die subendothelial, außerhalb der BHS gelegenen und entlang der zerebralen Gefäße angeordneten Macrophagen sowie die intravasal zirkulierenden, neutrophilen Granulozyten und Monozyten (Kreutzberg et al., 1996; Cross et al., 2001). Durch endogene, z.B. im Rahmen des Schlaganfalls, oder exogene Noxen, wie sie als solche zum Beispiel im Rahmen des SHT's durch die mechanische Gewalteinwirkung stattfindet, wird eine Reihe ineinander übergreifender Kaskaden angestoßen, was u.a. zunächst zur Aktivierung der primär inaktiven, ruhenden Microgliazellen sowie zur chemotaktisch vermittelten Infiltration der subendothelial gelegenen Macrophagen und der hämatogenen, neutrophilen Granulozyten und Monozyten in das Hirnparenchym, führt. Des Weiteren werden im Zeitverlauf nach SHT weitere Zelltypen in immunvermittelte Prozesse mit eingebunden, hierunter die Astrozyten (*Astrozytose*) und Fibroblasten, sowie die Endothelzellen (Cross et al., 2001; Dohi et al., 2010).

Microglia/Macrophagen. Microglia sind die gehirnspezifischen, in der gesamten weißen Hirnsubstanz verteilten Immunzellen und machen etwa 13 – 15 % der absoluten Gehirnmasse aus (Cross et al., 2001). Sie können in verschiedene Subtypen unterteilt werden: zum einen die amöboiden Zellen in der Wachstumsphase mit den bereits typischen Eigenschaften

monozytärer Zellen, also der Fähigkeit zur Phagozytose und Antigenpräsentation. Zum anderen die ausgereiften Microglia, welche ein kleiner Zellkörper und viele Zellausläufer charakterisieren. Eine weitere Subpopulation von Macrophagen ist perivaskulär subendothelial lokalisiert. Im Gegensatz zu den parenchymalen Microglia unterliegen diese einer ständigen Regeneration aus dem Knochenmark und bedürfen keiner zusätzlichen Stimulation um Antigene zu präsentieren (Kreutzberg et al., 1996; Carbonell et al., 1999; Cross et al., 2001). Es können prinzipiell zwei Aktivierungswege unterschieden werden: erstens der so genannte `klassische Weg`, hauptsächlich über Interferon- γ (IFN- γ) und zweitens die `alternative` Aktivierung über die Interleukine (IL) IL-4 und IL-13 (Streit, 2006). Hierdurch werden sowohl die morphologische Transformation in nunmehr geschwollen-imponierende Zellen mit parallelem Verlust der Zellausläufer (Abb.7) als auch die metabolische Aktivierung der Microglia angestoßen. Es wird angenommen, dass die über den `klassischen` Weg aktivierten Microglia hauptsächlich an jenen mediatorvermittelten Mechanismen beteiligt sind, die zur Aufrechterhaltung und Potenzierung der Entzündungskaskade beitragen. Hingegen sollen über den `alternativen` Weg v.a. antiinflammatorische Mechanismen, die Fibrose und die Rekonstruktion der extrazellulären Matrix gefördert werden (Ohtaki et al., 2008). Zu den wichtigsten, durch die klassisch aktivierten Microglia exprimierten, *proinflammatorischen* Chemokinen zählen der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), IL-1 α/β und IL-6. So können bereits wenige Stunden nach der primären Hirnläsion erhöhte Serum- und Liquorwerte von TNF- α und IL-1 gemessen werden (Ross et al., 1994; Fan et al., 1996). TNF- α hat einen direkten zytotoxischen Effekt. Dies gilt hauptsächlich für die myelinbildenden Oligodendrozyten, die Neuronen und die BHS. Zudem wirkt es selbst chemotaktisch sowohl auf weitere Microglia als auch die Macrophagen und neutrophile Granulozyten. IL-1 β wiederum ist ein pluripotenter Wachstumsfaktor, der sowohl die *Astrozytose* als auch die Neovaskularisation stimuliert (Kreutzberg et al., 1996; Goss et al., 1998; Cross et al., 2001). Des Weiteren ist IL-1 β neben IFN- γ , TNF- α und IL-4 entscheidend an der Induktion der Expression von Fc- und C3b-Rezeptoren beteiligt (diese vermitteln die Internalisierung der durch die Antikörper opsonierten Antigene in die Zellen sowie die alternative Aktivierung des Komplements). Schließlich tragen die hauptsächlich durch die proinflammatorisch-aktiven Immunzellen im Überschuss generierten, reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffradikale (ROS/RNS, hierunter v.a. das Superoxidradikal: O_2^- und Peroxynitrit: ONOO $^-$) sowie die Matrix-Metallo-Proteinasen (MMP, v.a. MMP-9) zur posttraumatischen Lipidperoxidation im Zeitverlauf nach SHT bei. In diesem Zusammenhang konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass der für die Generierung von ROS

hauptverantwortliche Multienzymkomplex der NADPH-Oxidase nicht nur in peripheren, zirkulatorischen neutrophilen Granulozyten, sondern auch in Nerven-, Oligodendroglia- und intrazerebralen Gefäßendothelzellen, in hohen Konzentrationen vorzufinden ist (Kazama et al., 2004; Abramov et al., 2005). Die hierdurch nunmehr posttraumatisch im Überschuss produzierten ROS (O_2^-) können nicht mehr durch die natürlichen Radikalfänger, wie z.B. Glutathion oder Ascorbinsäure, abgefangen werden. Durch die parallel hierzu stark erhöhte, nicht regulierte NO-Synthese durch die macrophagenspezifische, induzierbare NO-Synthase (iNOS) werden in einer diffusions-abhängigen Reaktion direkt ONOO⁻ Radikale aus O_2^- und NO unkontrolliert, im Überschuss produziert: $O_2^- + NO > ONOO^-$. Das Gehirngewebe als solches ist aufgrund der hohen Konzentration ungesättigter Fettsäuren sowie dem hohem Eisengehalt besonders anfällig gegenüber oxidativen Schäden, was anhand der so genannten Haber-Weiss-Reaktion (nach Fritz Haber und Joseph Joshua Weiss) veranschaulicht werden kann (Kehrer, 2000; Lewen et al., 2001):

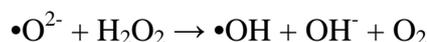
1. Reduzierung von Fe^{3+} - zu Fe^{2+} -Ionen durch das Sauerstoffradikal (O_2^-):



2. Fenton-Reaktion:



3. Netto-Reaktionsgleichung:



Zusammenfassend werden somit über den Zwischenschritt der O_2^- -vermittelten Reduzierung von Fe^{3+} zu Fe^{2+} im Endeffekt die hochreaktiven Hydroxylradikale ($\bullet OH$) gebildet.

Diese komplexen Wechselwirkungen zwischen den einzelnen, an der posttraumatischen Immunantwort beteiligten Zelltypen und derer direkt zytotoxisch wirksamer Metabolite (O_2^- , ONOO⁻, MMP-9, TNF- α) sowie der hierdurch direkt und indirekt verursachten, gravierenden extra- und intrazellulären Strukturschäden, können am besten durch drei aktuelle, hierzu vorliegende Studien, veranschaulicht werden.

In den Kapiteln `Zelluntergang` und `Hirnödem` wurde bereits der protektive Effekt von S-Nitroso-Glutathion (GSNO), einem Modulator des NO-Systems sowohl auf die Integrität der BHS und der hiermit verbundenen deutlichen Abnahme der posttraumatischen Ödemausbildung als auch der Immunzellinfiltration und Neurodegeneration am CCI-Modell

des SHT's besprochen (Khan et al., 2009). Die GSNO-vermittelte Herunterregulierung von ICAM-1 ist demnach mit einer signifikanten Reduzierung der Dichte ED-1-positiver Immunzellen assoziiert. Des Weiteren wird bei GSNO-behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe eine verminderte Expression von iNOS und MMP-9 sowie insgesamt kleiner ausfallende Kontusionsareale zwischen dem 3. und 7. Tag nach CCI beobachtet.

Die gezielte Blockierung der katalytischen Untereinheit gp91^{phox} der NADPH-Oxidase und der Einsatz des immunmodulatorisch wirksamen, antiinflammatorischen Mikromoleküls Minoxac (MzC) scheinen weitere interessante therapeutische Ansatzpunkte darzustellen (Lloyd et al., 2008; Dohi et al., 2010). Demnach kann bei gp91^{phox}-negativen Tieren eine im Vergleich zur Kontrollgruppe deutliche Abnahme der Expression proinflammatorischer Chemokine (IFN- γ , IL-4, IL-10), eine signifikant verminderte Produktion von ROS und RNS sowie verminderte Immunreaktivität der Astrozyten (via GFAP, **g**lial **f**ibrillary **a**cidic **p**rotein) und Microglia (via des Antikörpers CD11b) bis zu 48 h nach CCI festgestellt werden. In der histopathologischen Untersuchung zeigt sich eine hierzu parallel vorliegende, deutliche Verminderung sowohl des Läsionsvolumens (via TTC) als auch der absoluten Dichte apoptotisch-Markierter Zellen, bzw. fragmentierter Zellbestandteile (via TUNEL) (Dohi et al., 2010). Der therapeutische Effekt von Mzc beruht auf der direkten, immunmodulatorischen Reduzierung der proinflammatorischen Chemokine (Dohi et al., 2008). So wird bei Mzc-behandelten Tieren eine drastische Reduzierung der Expression dieser Chemokine bis zu 12 h nach CCI sowohl im Kontusions- und perikontusionellem Kortex als auch im Hippocampus beobachtet. Parallel hierzu zeigt die am 28. Tag nach CCI vorgenommene, histopathologische Untersuchung eine deutlich reduzierte Immunreaktivität von Astrozyten (via S100b, astrocyte-derived protein). Schließlich wird auch ein wesentlich günstigeres, im Vergleich zur Sham-Gruppe vorliegendes, neurologisches outcome beobachtet (Dohi et al., 2008).

4.2.4.1 Immunhistologie (ED1)

Die an der posttraumatischen Immunantwort beteiligten Zellen umfassen, wie oben ausführlicher beschrieben, eine Vielzahl primär nicht – pathologisch miteinander interagierender Zelltypen. Für eine möglichst selektive, visuelle Erfassung der einzelnen, an der sekundären Immunantwort beteiligten Immunzelltypen sowie ihrer im Zeitverlauf nach SHT unterschiedlichen Distribution im und um das Kontusionsareal, werden hierfür verschiedene Oberflächenmarker bzw. immunzellspezifische Antikörper eingesetzt.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Grad der Immunzellaktivierung- und Infiltration mittels des CD68+ Antikörpers ED1 untersucht, weil in den hierzu publizierten Studien zu sehen war, dass zu den relevanten Zeitpunkten (bis 7 Tage nach SHT) vor allem ED1-positive Zellen einwandern und gerade diese die TTC-Färbung beeinflussen könnten. ED1 ist jedoch insofern unspezifisch, dass er sowohl im Stande ist die gehirnspezifischen Microglia als auch die primär subendothelial, entlang der zerebralen Gefäße angeordneten Macrophagen und die zirkulatorischen Monozyten, insgesamt darzustellen. Hingegen werden hierdurch die neutrophilen Granulozyten nur partiell markiert.

Leider ist der diesbezüglich vorgenommene Versuch, die neutrophilen Granulozyten selektiv, anhand der Myelo-peroxidase-Reaktion (MPO) zu erfassen, missglückt, weswegen hier eine nur bestenfalls indirekte Aussage über den Einfluss dieser Zellen am gesamten Entzündungsgeschehen möglich ist. Zu anderen relevanten Immunzellmarkern zählen des Weiteren z.B. OX42 (Macrophagen, Microglia), His-48 (neutrophile Granulozyten), GFAP und S100B (Astrozyten).

Abb. 9 Zeigt die absoluten, mikroskopisch ermittelten Zelldichten ED1-positiver Zellen im Kontusions- und perikontusionellem Kortex im Zeitverlauf nach CCI anhand repräsentativer Gewebeschnitte. Zunächst fällt die massive und statistisch signifikante Zunahme der so markierten Zellen sowohl im Kontusions- als auch perikontusionellem Kortex zwischen dem 3. und 5. Tag nach CCI auf. Die nachfolgende, weniger stark ausgeprägte Dichtezunahme bis hin zum 7. Tag erreicht aufgrund der größeren Varianz der Standardfehler der Mittelwerte der einzelnen Dichtewerte keine statistische Signifikanz. So kann auch aufgrund der markertypischen Rotfärbung der CD68+-Zellen eine hierzu parallele Zunahme des makroskopisch sichtbaren Läsionsvolumens im Zeitverlauf nach CCI verzeichnet werden (Abb.8). In der Übersichtsvergrößerung (20x) des Kontusionskortex am 2. und 3. Tag nach CCI zeigt sich eine homogene, lockere Verteilung ED1-positiver Zellen (Abb.8). In starker Vergrößerung (40x) können diese anhand ihrer Morphologie prinzipiell in zwei Zelltypen unterteilt werden: *erstens* die insgesamt relativ kompakt imponierenden, teilweise rundlich, teilweise auch ausgezogen konfigurierten Zellen mit mehrfach gelappten Zellkernen (Abb.7, 8). Laut den bildmorphologischen Kriterien dürfte es sich hierbei in erster Linie um neutrophile Granulozyten handeln; *zweitens* die großen Zellen mit teilweise schaumig-aufgetriebenem Zytoplasma, überwiegend rundlich- oder oval-imponierendem Zellkern und teilweise multiplen, intrazytoplasmatischen Einschlüssen (Abb.7). Diese Zellen wiederum können am ehesten den Macrophagen/Monozyten zugeordnet werden. Basierend auf den oben

genannten, bildmorphologischen Kriterien konnte hier eine relativ gleichmäßige und äquivalente Verteilung beider Immunzelltypen bis zu 72 h nach CCI beobachtet werden (Abb. 7, 8). Am 5. und etwas deutlicher am 7. Tag nach CCI überwiegen hingegen hauptsächlich monozytär-imponierende Zellen sowohl im Kontusions- als auch perikontusionellem Kortex. Der infiltrative Charakter der sekundären, posttraumatischen Immunantwort sowohl zirkulatorischer, neutrophiler Granulozyten und Monozyten als auch der subendothelial-gelegenen Macrophagen, kann in der vorliegenden Arbeit indirekt, durch das parallele Vorhandensein dieser Zellen entlang der zerebralen Gefäße, erfasst werden (Abb. 7C, D). Hierbei kann wiederum nicht sicher zwischen den Blutmonozyten und den primär subendothelial gelegenen, sekundär infiltrierenden Makrophagen, unterschieden werden (Abb. 7). Des Weiteren müssen auch die verschiedenen Stadien der Immunzellaktivierung berücksichtigt werden. So können nebeneinander parallel sowohl blass erscheinende Zellen mit klarer Zytoplasmastruktur als auch stark angefärbte Immunzellen, als Ausdruck einer adäquat zum Aktivierungsgrad vorliegenden Immunreaktivität, mit multiplen intrazytoplasmatischen Einschlüssen, am ehesten als Ausdruck phagozytierter Partikel, beobachtet werden (Abb. 7, 8). Bei der Untersuchung tiefer gelegener Gehirnareale, vor allem entlang des Hippocampus, konnten nur vereinzelte, ED1-positive Zellen, hauptsächlich am 5. Und 7. Tag nach CCI, identifiziert werden (Bilder nicht gezeigt).

Die makro- und mikroskopisch sichtbare, massive Zunahme der absoluten Zelldichte, hier zwischen dem 3. und 5. Tag nach CCI, kann zunächst als solche auch in der Nissl-Histologie beobachtet werden (Abb. 7). Im Gegensatz zur Immunhistologie ist hierbei eine Differenzierung zwischen den einzelnen Immunzelltypen jedoch nicht sicher möglich (Abb. 7).

Generell kann der hier gemessene Zeitverlauf der posttraumatischen Immunzellantwort gut mit anderen, hierzu vorliegenden Studien, verglichen werden (Aihara et al., 1995; Chen et al., 2002; Thomale et al., 2007). Die zu beobachtenden Unterschiede in der Verteilung sowohl der jeweiligen Immunzelltypen als auch sekundär in den Entzündungsprozess involvierten, primär nicht-immunologisch aktiven Zellen, ergeben sich hierbei hauptsächlich durch den Einsatz verschiedener Marker. So wird zunächst eine in vielen Arbeiten übereinstimmende, im Zeitverlauf nach SHT, progrediente Zunahme der Immunzellinfiltration ED1-, His48- und/oder OX42-positiver Zellen bis zu 72 h, bzw. 96 h nach CCI (Chen et al., 2002; Thomale et al., 2007; Khan et al., 2009; Li et al., 2009; Dohi et al., 2010) und LFP (lateral fluid

percussion) beobachtet (Soares et al., 1995; Aihara et al., 1995). Im weiteren Zeitverlauf zeigt sich zwar eine progressive, zunehmende Zelldichte ED1-positiver Zellen (Aihara et al., 1995; Thomale et al., 2007), der Infiltrationsgrad OX42 (Chen et al., 2002)- und His48 (Thomale et al., 2007)- markierter Immunzellen (Microglia und neutrophile Granulozyten) zeigt jedoch eine ab 72 h nach SHT rückläufige Tendenz.

Diese Beobachtungen bestätigen somit direkt die hier gezeigte Dynamik der insgesamt vorliegenden, posttraumatischen Immunzellinfiltration. Der diesbezüglich vorliegende, tatsächliche Anteil der aktivierten ortsständigen Microglia gegenüber der hämatogenen Macrophagen und der neutrophilen Granulozyten an den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten kann demgegenüber nur indirekt beschrieben werden .

Parallel hierzu wird eine Reihe weiterer Zelltypen in den posttraumatischen Entzündungsprozess miteingebunden. So wird eine in der Regel um den 3. – 4. Tag nach SHT am stärksten ausgeprägte Immunoreaktivität der Astrozyten, eine *Astrozytose*, sowohl im Kontusionskortex als auch in tieferen Gehirnstrukturen (Hippocampus und Thalamus) beobachtet (Chen et al., 2002; Saatman et al., 2006; Lloyd et al., 2008; Dohi et al., 2010; Li et al., 2009;). Hierbei wird von einigen Autoren eine im Zeitverlauf progressive Zunahme der Astrozytose in tieferen Gehirnarealen, sogar bis zu mehreren Wochen nach SHT, verzeichnet (Chen et al., 2002; Lloyd et al., 2008). Die durch Endothelzellen vermittelte Rekrutierung der zirkulierenden Immunzellen kann ebenfalls direkt immunhistologisch als eine erhöhte Immunoreaktivität des Endothels nachgewiesen werden. Schließlich wird auch eine Aktivierung des Neurofilaments beobachtet (Chen et al., 2002; Saatman et al., 2006; Thomale et al., 2007; Lloyd et al., 2008; Dohi et al., 2010).

Die im Zeitverlauf progressive Zunahme der posttraumatischen Entzündungsprozesse und der hierdurch entscheidend mitbedingten Expansion des Kontusionsvolumens an Zeitpunkten > 72 bzw. 96 Std. nach SHT ist demnach hauptsächlich auf eine kontinuierliche Infiltration der Macrophagen und Monozyten sowie Aktivierung ruhender Microgliazellen zurückzuführen. Die neutrophilen Granulozyten scheinen demgegenüber nur an früheren Zeitpunkten (< 72 Std.) nach SHT äquivalent am gesamten Entzündungsgeschehen beteiligt zu sein und spielen im weiteren Verlauf eine eher untergeordnete Rolle.

Die Miteinbeziehung der Astrozyten (*Astrozytose*), Endothelzellen und des Neurofilaments in den Entzündungsprozess ist direkt mit einer zusätzlichen Hochregulierung des zellulären Metabolismus verbunden, wie sie als solche allein schon deutlich durch die Immunzellpräsenz

per se bedingt wird, was insgesamt wiederum entscheidend energieabhängige Untersuchungsmethoden, wie z.B. TTC, im Zeitverlauf nach SHT beeinflusst.

4.3 TTC

4.3.1 Methodik und Entwicklung

TTC wurde 1894 synthetisiert (von Pechman & Runge 1894). Die Spezifität dieser quartären Ammoniumverbindung beruht auf der Fähigkeit als Redox-Indikator das Gewebe vom funktionellen Aspekt her, energieabhängig zu differenzieren. Nach dem Prinzip der Strukturkonformität wird TTC in den enzymatischen Energiestoffwechsel der Zellen miteingebunden bzw. eingeschleust. Es dient als Protonenakzeptor gegenüber einer Vielzahl mitochondrialer Dehydrogenasen, hierunter der Succinatdehydrogenase (SDH, s. Abb. 11) (Glenner, 1960, 1969). TTC wird hierbei analog des Succinats oxidiert, wobei der rote Farbstoff Formazan entsteht. Somit erfolgt in geschädigten Gewebearealen, in dem die Aktivität der Dehydrogenasen aufgrund des Energiedefizits reduziert ist, keine Anfärbung. Die Differenzierung zwischen metabolisch aktivem und inaktivem Gewebe erfolgt somit makroskopisch, durch den grob-visuell sichtbaren Kontrast; die wiederum bei der Oxidation von Succinat zu Fumarat anfallenden Reduktionsäquivalente werden direkt auf das Ubichinon der Atmungskette (Komplex II) übertragen (Abb. 11). Durch die anschließende, oxidative Phosphorylierung werden die Energieträger des Organismus gebildet – Adenosin-Triphosphat (ATP) (Löffler & Petrides, Biochemie und Pathobiochemie, 2003). Diese Interaktion von TTC mit der SDH spiegelt somit im gewissen Umfang den energetischen Metabolismus des Gewebes wieder.

Diese Eigenschaft von TTC bzw. der Tetrazoliumsalze (einer Gruppe strukturell verwandter Mono- und Di-Tetrazolium-Verbindungen) machte man sich primär zur Aktivitätsmessung verschiedenartiger Dehydrogenasen sowie Beurteilung der Qualität von Saatgut zunutze (Glenner et al., 1960, 1969). Seit den 50-er Jahren des vergangenen Jahrhunderts wurde TTC auch zunehmend in der tierexperimentellen Forschung, zunächst zur Visualisierung ischämisch bedingter Herzschäden bei Säugetieren, eingesetzt (Sandritter et al., 1958; Lie et al., 1975; Kloner et al., 1978, 1981). Die mitunter hierbei gewonnen Erkenntnisse haben einen entscheidenden Beitrag zum Verständnis der kritischen, zum irreversiblen Gewebeuntergang

führenden, ischämischen Zeitperioden geliefert. Im Gegensatz zu den konventionellen histologischen Methoden kann TTC bereits sehr frühe Stadien des Energiedefizits betroffener Kardiomyozyten erfassen; der zu beobachtende, bereits nach 1 – 2 h sichtbare und im Zeitverlauf nach dem initialen Gefäßverschluss kontinuierliche Intensitätsverlust des ischämischen Areals geht mit einem hierzu parallelen, elektronenmikroskopisch ermittelten, bzw. ultrastrukturellen Gewebeschaden einher (Kloner et al., 1981). Eine gute Korrelation zur konventionellen Histologie (H&E) zeigt sich erst zwischen 12 – 24 h, demnach zu jenen Zeitpunkten, an denen der ultrastrukturelle Schaden eine histologische Evidenz erreicht. Aufgrund hauptsächlich dieser Beobachtungen wurde TTC auch eine gewisse Verlässlichkeit bezüglich der Visualisierung eines zum ultrastrukturell vorliegenden Gewebeschadens auch adäquat visualisierten Energiedefizits zugeschrieben. So fand TTC zunehmende Akzeptanz ebenfalls in den anderen Fachdisziplinen, hierunter auch den Neurowissenschaften. In der tierexperimentellen Schlaganfallforschung kann zunächst ebenfalls eine gute Korrelation von TTC und der konventionellen Histologie bei der Visualisierung ischämischer Gehirnläsionen, zwischen 12 – 24 h nach initialem Gefäßverschluss, z.B. der A. cerebri media (MCA, middle cerebral artery), beobachtet werden (Bose et al., 1984; Bederson et al., 1984; Liu et al., 1989; Lin et al., 1993; Aronowski et al., 1997; Tureyen et al., 2004). Des Weiteren ist TTC im Stande ebenfalls sehr frühe Stadien des Energiedefizits des Nervengewebes, bereits 1,5 Std. nach primärem Ereignis entsprechend seiner Spezifität wiederzugeben (Liszcak et al., 1984; Liu et al., 2009). So können elektronenmikroskopisch ermittelte ultrastrukturelle Schäden ebenfalls an diesen frühen Zeitpunkten festgestellt werden, wohingegen die konventionelle Histologie erst zwischen 12 – 24 h einen hierzu adäquaten, grob-strukturellen Nachweis liefern kann (Liszcak et al., 1984; Bederson et al., 1984). Ferner konnten mitunter durch TTC wichtige Erkenntnisse über den entscheidenden Einfluss des s.g. Reperfusionsschadens auf das Ausmaß irreversibler, postischämischer Gewebeveränderungen gewonnen werden (Aronowski et al., 1997). In diesem Zusammenhang kann die Intensität der ischämischen Läsion prinzipiell durch zwei Parameter moduliert werden: zum einen über die initiale *Ischämiezeit*, zum anderen über die postischämische *Reperusionszeit*. Zahlreiche hierzu vorliegende, tierexperimentelle Studien belegen, dass eine mindestens 60-minütige Ischämieperiode mit irreversiblen, morphologischen und elektrophysiologischen Veränderungen, einhergeht (Hossmann et al., 1971; Arsenio-Nunes et al., 1973; Du et al., 1995; Liszcak et al., 1984; Bederson et al., 1984). Des Weiteren bedingt der Reperfusionsschaden als solcher eine zusätzliche Vergrößerung des postischämischen Läsionsvolumens, sogar auf bis zu über die Hälfte des Ausgangswerts (Aronowski et al.,

1997; Benedek et al., 2006). TTC kann auch diese komplexen Zusammenhänge relativ verlässlich und übereinstimmend mit konventioneller Histologie wiedergeben (Aronowski et al., 1997).

In einer aktuellen, hierzu vorliegenden Studie wurde die zeitliche Entwicklung des postischämischen Läsionsvolumens nach 90 – minütiger Ischämiezeit und nachfolgender Reperfusion anhand der TTC-Methode, FJ (Fluoro-Jade B) und NeuN (neuronal nuclear antigen), bis zu 7 d nach initialem Gefäßverschluss verfolgt (Liu et al., 2009). FJ wird zunehmend durch seine Spezifität sich an bestimmte basische Zellbestandteile von Nervenzellen binden zu können, zur Visualisierung neurodegenerativer Prozesse verwendet. NeuN scheint ebenfalls hochspezifisch, durch seine immunhistochemische Aktivitätsbestimmung, ausschließlich den Grad der neuronalen Degeneration wiederzugeben (Wolf et al., 1996). So wird hierbei anhand der TTC-Methode eine kontinuierliche Zunahme des Läsionsvolumens bis zu 24 h nach Gefäßverschluss mit nachfolgend unverändertem Ausmaß der so gemessenen Kontusion im Zeitverlauf nach Gefäßokklusion, bis hin zum 7. Tag, beobachtet. Parallel hierzu zeigt auch der histologisch ermittelte Zeitverlauf der Neurodegeneration eine im Vergleich zu TTC vorliegende, gute Korrelation der postischämischen Dynamik dieser Prozesse. Allerdings kann man bei der Betrachtung mitabgebildeter TTC-Präparate einen zwischen dem 3. und 7. Tag auffälligen Intensitätsverlust der so markierten Ischämiezone feststellen. Das Kontusionsareal ist zwar noch gut vom gesunden Gewebe differenzierbar, die Grenzen sind jedoch stärker verwaschen und der am 3. Tag zu beobachtende, klare Weißton des ischämischen Areals wechselt am 7. Tag zugunsten einer eher blass-rot, bzw. pink imponierenden Kontusion. Zwar berichten Du et al. über eine im Zeitverlauf nach primärer Ischämie zunehmende Tendenz des TTC-markierten Läsionsvolumens zwischen dem 3. und 14. Tag, die dazwischen liegenden Zeitpunkte wurden jedoch nicht erfasst und es konnte eine am 14. Tag ausgeprägte zystische Umformung als Dekavitation des Läsionsareals beobachtet werden. Zudem wurden keine immunhistologischen Analysen durchgeführt (Du et al., 1995).

Ungeachtet dessen hat sich TTC als variable Messmethode zur Visualisierung früher ischämischer Gewebeschäden in der tierexperimentellen Schlaganfallforschung durchgesetzt. Diesen Ruf verdankt TTC ebenfalls der guten Korrelation zur konventionellen Histologie zwischen 12 – 24, bzw. 72 h sowie der Darstellung eines adäquat zur primären Ischämiestärke vorliegenden Kontusionsvolumens (Bose et al., 1984; Bederson et al., 1984; Liu et al., 1989; Lin et al., 1993; Aronowski et al., 1997; Tureyen et al., 2004). Man erkannte zudem die

praktischen Vorteile von TTC gegenüber der konventionellen Histologie bezüglich der laborchemischen Handhabung. Wie man hier aus der dargestellten Verfahrensweise in der Methodik entnehmen kann, werden die frisch entnommenen Gehirne im ersten Schritt schockgefroren, um eine möglichst präzise und gleichmäßige Partialisierung der Gewebeschnitte zu erreichen. Dieser Schritt nimmt etwa 10 Minuten ein. Für die homogene Verteilung des TTC's werden die einzelnen Gewebeschnitte nach 10 Min. Inkubation für weitere 10 Min. umgedreht. Erfahrungsgemäß ist das eine für den kompletten chemischen Reduktionsprozess erforderliche, bzw. ausreichende Zeitspanne. Insgesamt werden mit TTC demnach in der Regel 30 Minuten dafür benötigt. Im Anschluss werden noch die planimetrischen Aufnahmen, jeweils von beiden Seiten angefertigt, um in der Endauswertung volumetrische Läsionswerte zu erreichen. Für die Nissl-Histologie (ähnliches gilt auch für die H&E-Histologie) werden demgegenüber bis zu mehrere Stunden und weitaus aufwendigere Verfahrensschritte benötigt.

Sicherlich werden in den jeweiligen Arbeitsgruppen hiervon abweichende Protokolle zur Gewebepräparation verwendet. Die mögliche Variabilität der konventionell-histologischen Protokolle wird jedoch durch die starren, zeitlichen Vorgaben der verschiedenen Präparationsschritte entscheidend limitiert. In diesem Zusammenhang ist auch der Kostenfaktor zu Gunsten der TTC Färbung zu berücksichtigen.

4.3.2 Der Einsatz von TTC in der tierexperimentellen Neurotraumatologie

Bis heute wurde TTC nur in einer sehr überschaubaren Anzahl von Studien zur Quantifizierung des posttraumatischen Läsionsvolumens eingesetzt (Perri et al., 1997; Assaf et al., 1997; Baskaya et al., 2000; Chen et al., 2000; Thomale et al., 2007; Dohi et al., 2010). Perri und Assaf waren hierbei die ersten Autoren, die TTC zur Bestimmung traumatisch bedingter Gehirnläsionen anhand unterschiedlicher SHT-Modelle eingeführt haben. So konnte zunächst die gute, auch in der Schlaganfallforschung zu beobachtende Steuerbarkeit von TTC bezüglich der Visualisierung eines adäquat zur primären Traumastärke vorliegenden Läsionsvolumens, am LFP (lateral fluid percussion injury) – und CCI Modell des SHT's, bis zu 48 h nach initialer Läsion, bestätigt werden (Perri et al., 1997; Baskaya et al., 2000). Des Weiteren zeigt sich eine gute Korrelation zwischen TTC und der H&E-Methode am FUS (focussed ultrasonic lesion) – Modell des SHT's in den ersten 4 h nach initialer Traumaapplikation (Chen et al., 2000). Hierbei korrelieren auch die konventionell-

histologisch- und durch die TTC-Methode ermittelten Verläufe gut mit den ultrastrukturellen, elektronenmikroskopisch sichtbaren Veränderungen. Des Weiteren scheint TTC auch ein zur tatsächlich vorliegenden Ausprägung der Neurodegeneration adäquates Läsionsvolumen, bis zu 72 h nach CCI, demarkieren zu können (Dohi et al., 2010). So wird bei gp91^{phox}-behandelten Tieren eine deutlich verminderte Dichte TUNEL-positiver Zellen im Kontusionskortex mit hierzu paralleler Reduktion des TTC-negativen, absoluten Läsionsvolumens beobachtet. Assaf beschreibt zwar eine gute Korrelation der Kontusionsvolumina zwischen TTC und verschiedenen Sequenzen des MRT's am 7. Tag nach SHT, es fehlen jedoch präzise Angaben über den zeitlichen Verlauf der histologisch-ermittelten Läsionswerte und genaue Volumenangaben (Assaf et al., 1997).

Abgesehen von den oben genannten Gemeinsamkeiten lassen sich keine weitere Parallelen zu den Ischämie Modellen feststellen. Die wohl bedeutendste Studie, anhand welcher Große Zweifel an der Sensitivität von TTC bezüglich der Erfassung von späteren, über 72 h nach der primären und im Rahmen der sekundären Hirnschädigung ablaufenden, hauptsächlich morphologischen Veränderungen aufkamen, war die von Baskaya (Baskaya et al., 2000). Baskaya führte als erster die TTC-Messmethode zur Bestimmung des posttraumatischen Kontusionsvolumens am Controlled Cortical Impact (CCI)- Modell des SHT's ein. Hierbei wurde die posttraumatische Dynamik des so gemessenen Läsionsvolumens anhand jeweils 5 verschiedener Untersuchungszeitpunkte eingefangen: 24 h, 48 h, 72 h sowie 4 und 7 Tage nach CCI. Parallel hierzu wurden auch verschiedene Stärken der initialen Traumaapplikation gewählt: 1, 2 und 3 mm Penetrationstiefe. Die Bestimmung des absoluten Kontusionsvolumens erfolgte hierbei nach der gleichen Korrekturrechnung für den volumetrisch wirksamen Einfluss der Hemisphärenschwellung wie in der vorliegenden Arbeit. So konnten sowohl nach 2 mm-, als auch 3 mm- starker, primärer Penetrationstiefe, maximale Ausmaße der Kontusionsvolumina 24 h nach CCI mit nachfolgendem, bis hin zum 7. Tag kontinuierlichem Abfall der Werte, beobachtet werden. Der so gemessene Verlauf steht somit im Gegensatz zur posttraumatischen Dynamik der sekundären Hirnschädigung. Diese Schlussfolgerung wird sowohl durch eine Vielzahl hierzu vorliegender Studien als auch die konventionell-histologischen und immunhistochemischen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigt. Die Gemeinsamkeiten und Unterschiede zur vorliegenden Arbeit werden nochmal im nächsten Unterpunkt besprochen.

4.3.3 TTC-Färbung

Die Spezifität von TTC wurde bereits in der Einleitung dieses Kapitels erläutert. Es sollen nachfolgend die hier erzielten Ergebnisse etwas genauer mit denen von Baskaya verglichen werden.

Abb. 5 zeigt den zeitlichen Verlauf der anhand TTC-demarkierter und volumetrisch berechneter Kontusionsvolumenwerte an den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten nach CCI in Form eines Balkendiagramms. So fällt zunächst der kontinuierliche Abfall der absoluten Volumenwerte zwischen dem 2. und 7. Tag nach CCI auf. Ein statistisch signifikanter Abfall wird hierbei beim Vergleich der absoluten Volumenwerte des 2. und 7. Tags verzeichnet. Beim Vergleich der jeweiligen korrigierten Volumenwerte der Kontusionsareale an repräsentativen Untersuchungszeitpunkten (2., 3. und 7. Tag) fallen die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Werte insgesamt höher aus: 2. Tag - 47 vs. 40 mm³ bei Baskaya; 3. Tag - 46 vs. 36 mm³; 7. Tag - 20 vs. 27 mm³. Zudem sind hier auch die Werte aus der 2.0 mm-Traumagruppe vs. 1.5 mm in der vorliegenden Arbeit gegenübergestellt. Zum einen könnten z.B. messtechnische Unterschiede hierfür verantwortlich sein. Dies wären die Kriterien, anhand welcher die Grenze des gesunden zum kontusionierten Gewebe bestimmt wird. Abb. 6 zeigt die repräsentativen, TTC-präparierten Gewebeschnitte an den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten. So kann am 3. Tag noch ein vom gesunden bzw. rot-markierten Gewebe klar abgrenzbares, fast weiß-imponierendes Kontusionsareal differenziert werden. Hingegen werden die Grenzen bis zum 7. Tag zunehmend verwaschener und das Kontusionsareal selbst erscheint nun blass-rot. Zum anderen könnte die gewählte Aufschlaggeschwindigkeit hierfür mitverantwortlich sein: 7 m/sec vs. 3 m/sec bei Baskaya. So zeigt sich auch ein parallel hierzu (bzw. zwischen dem 3. und 5. Tag bei mir) vorliegender, größter Abfall der Volumenwerte zwischen dem 3. und 4. Tag bei Baskaya.

4.4 TTC-Färbung vs. Immunhistologie

Die Abbildungen 5, 8 und 9 zeigen die jeweiligen Zeitverläufe der TTC-Histologie und der Immunhistologie nach CCI. Der zwischen dem 3. und 5. Tag zu beobachtende, stärkste und statistisch signifikante Abfall der TTC-demarkierten Läsionsvolumina ist direkt mit einer hierzu parallelen, ebenfalls am stärksten ausgeprägten Dichtezunahme ED-1 positiver Zellen zwischen den beiden Zeitpunkten, sowohl im Kontusions- als auch perikontusionellem

Kortex, assoziiert. Im weiteren Verlauf kommt es zur weiteren, zwar diskreten, dennoch sichtbaren Zunahme der Immunzellinfiltration. Hingegen erreichen die mittels der TTC-Histologie ermittelten Kontusionsvolumina einen Tiefststand am 7. Tag. Diese direkten Zusammenhänge verdeutlichen die ausgeprägte metabolische Abhängigkeit der Messmethode TTC. Hierdurch wird das Kontusionsareal nahezu komplett maskiert, die einzige hierbei bestehende Möglichkeit, das infiltrierte vom gesunden Gewebe am 5. und 7. Tag nach CCI unterscheiden zu können, beruht auf der grob-visuellen Differenzierung der jeweiligen Intensitätsunterschiede. Wie man der Abb. 6 entnehmen kann, kann sich dies jeweils schwierig gestalten. Zudem ist eine mikroskopische Beurteilung des Kontusionsareals, aufgrund der erforderlichen, groben Schichtdicke TTC-behandelter Gewebeschnitte, überhaupt nicht möglich.

Unter der Annahme infiltrierte sowie reaktiv entzündliches Gewebe als geschädigt zu betrachten, versagt TTC somit bei der Erfassung dieser Komponente der sekundären Hirnschädigung an Zeitpunkten > 72 h nach CCI, was in der vorliegenden Arbeit durch die massive Präsenz von aktivierten Microgliazellen sowie eingewanderten Monozyten im Kontusions- sowie perikontusionellem Kortex am 5. und 7. Tag nach CCI belegt werden kann (Abb. 6, 7, 8). Der hier ermittelte Zeitverlauf der posttraumatischen Immunzellinfiltration stimmt auch mit den hierzu vorliegenden Studien überein (Aihara et al., 1995; Chen et al., 2002; Thomale et al., 2007).

4.5 TTC- vs. Nissl-Färbung

In den Abbildungen 5 und 6 sind auch die jeweiligen Untersuchungsergebnisse der TTC- und Nissl-Methoden im Zeitverlauf nach CCI gegenübergestellt. Es fällt zunächst eine prinzipiell differente Dynamik der jeweils durch TTC- und Nissl- ermittelten Kontusionsvolumenwerte auf. So zeigen zwar beide Methoden annähernd vergleichbare Werte am 2. und 3. Tag. Die Nissl-markierte Läsionszone nimmt im Gegensatz zur TTC-demarkierten jedoch bis hin zum 7. Tag nach CCI diskret aber dennoch kontinuierlich zu. Die mikroskopische Inspektion Nissl-präparierter Gewebeschnitte zeigt eine zwischen dem 3. und 5. Tag nach CCI massive Zunahme der absoluten Zelldichte mit einem hierzu parallelem, makroskopischen Farbumschlag der Kontusionsareale mit weiterer, leichter Zunahme der nun so imponierenden Kontusion bis hin zum 7. Tag (Abb. 7). Diese Zellen konnten anhand der Immunhistologie als reaktive Microglia sowie Macrophagen, im geringeren Umfang auch neutrophile

Granulozyten, identifiziert werden und Nissl konnte diesen Zusammenhang adäquat indirekt wiedergeben. Im Gegensatz zu TTC waren die Bestimmungen der Kontusionsareale mittels der Nissl-Histologie an allen Zeitpunkten relativ einfach, obwohl der Farbton, entsprechend der Immunzellpräsenz, zunehmend, v.a. am 7. Tag zu dunkelblau wechselte. Letztendlich erreichen die mit Nissl gemessenen Kontusionsvolumina am 7. Tag nach CCI mehr als doppelt so hohe Werte als mit TTC. Der hier gemessene Verlauf der Kontusionsvolumenentwicklung mittels der Nissl-Methode ist ebenfalls gut mit den hierzu vorliegenden Studien vergleichbar (Aihara et al., 1995; Chen et al., 2002; Saatman et al., 2006).

4.6 Konklusion

Das primäre Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die zeitabhängigen morphologischen Veränderungen des Kontusionsareals nach tierexperimentellen SHT anhand unterschiedlich spezialisierter Untersuchungsmethoden zu analysieren, um die hieraus resultierenden Einflussfaktoren, hauptsächlich im Rahmen der immunzellvermittelten Komponente der sekundären Hirnschädigung, explizit auf die Messmethode TTC zu veranschaulichen. Aufgrund seiner Spezifität, die auf dem energetischen Metabolismus und nicht tatsächlich vorliegendem Gewebeschaden beruht, wird TTC durch reaktive und infiltrierende Immunzellen an Zeitpunkten > 72 Stunden nach SHT wesentlich beeinflusst, sodass relevante Ergebnisse nur bis zum 3. Tag nach dem initialen Trauma durch TTC erzielt werden können. An späteren Zeitpunkten wird die Quantifikation mittels konventionellen histologischen Methoden (z.B. Nissl) empfohlen.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | | | |
|----------------|---|----------------|--|
| µg | Mikrogramm | H | Wasserstoff |
| µl | Mikroliter | HE | Hämatoxilin-Eosin |
| µm | Mikrometer | ICAM | Interzelluläres Adhäsionsmolekül |
| C | Kontusionskortex | ICP | intrakranieller Druck |
| °C | Grad Celsius | IHC | Immunhistochemie |
| $\Delta\Psi_m$ | mitochondriale Potentialdifferenz | IgG | Immunglobulin G |
| A. | Arteria | IL | Interleukin |
| AANS | American Association of Neurological Surgeons | INF- α | Interferon Gamma |
| Abb. | Abbildung | IP3 | Inositoltriphosphat |
| ADC | apparent water diffusion coefficient | Jv | Flussgradient des Ödem-Exsudats |
| AMPA | (Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolprionat | K | Kalium |
| ANT | Adenin Nukleotid Translokator | kg | Kilogramm |
| Apaf-1 | Apoptose-Protease-Aktivationsfaktor 1 | KG | Körpergewicht |
| atm | Atmosphären | kJ | Kilojoule |
| ADP | Adenosindiphosphat | l | Liter |
| ATP | Adenosintriphosphat | LFP | lateral fluid percussion |
| BHS | Blut-Hirn-Schranke | Lp | hydraulische Leitfähigkeit |
| bzw. | beziehungsweise | M | molare Lösung (1mol/l) |
| c | Kontusionskortex | MCA | middle cerebral artery |
| Ca | Kalzium | MCAO | middle cerebral artery-occlusion |
| ca. | circa | MMP | Matrix-Metallo-Proteinase |
| CBF | zerebraler Blutfluss | MPO | Myeloperoxidase |
| CCII | Controlled Cortical Impact Injury | m/s | Meter pro Sekunde |
| Ccorr. | Korrigierte Kontusionsfläche | MAD | mittlerer arterieller Blutdruck |
| CD | Cluster of Differentiation | Mg | Magnesium |
| cm | Zentimeter | Min. | Minute |
| CPP | zerebraler Perfusionsdruck | ml | Milliliter |
| Cyp-D | Cyclophilin-D | mm | Millimeter |
| d.h. | das heißt | mmHg | Millimeter Quecksilbersäule |
| DGNC | Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie | MOMP | mitochondrial outer membrane permeability |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure | MRT | Magnetresonanztomographie |
| DWI | diffusionsgewichtete Bildgebung | ms | Millisekunden |
| EB | Evans Blue | mTP | pathologische mitochondriale Permeabilität |
| EBIC | European Brain Injury Consortium | Mzc | minozac |
| Fa. | Firma | n | Anzahl der Versuchstiere |
| FJ | Fluoro-Jade B | N ₂ | Stickstoff |
| GCS | Glasgow Koma Skala | Na | Natrium |
| GFAP | glial fibrillary acidic protein | NAA | N-acetyl Aspartat |
| ggf. | gegebenenfalls | NaCl | Natriumchlorid |
| GSNO | S-Nitrosoglutathion | NAD | Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid |
| | | NADH | reduziertes NAD |

| | | | |
|-----------------------------|--|---------------|---|
| NADPH | reduziertes Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat | s.u. | siehe unten |
| NeuN | neuraler nuklearer Antikörper | SDH | Succinatdehydrogenase |
| ng | Nanogramm | SHT | Schädel-Hirn-Trauma |
| NMDA | N-methyl-D-Aspartat | s.g. | sogenannt |
| NO | Stickoxyl | TBI | traumatic brain injury |
| O ₂ ⁻ | Hydroxylradikal | TNF- α | Tumornekrosefaktor Alpha |
| OH | Hydroxyl | TTC | 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid |
| OONO | Peroxyinitrit | TUNEL | in situ dUridintriphosphat end labeling |
| P | hydrostatischer Druck | u.a. | unter anderem |
| PC | perikontusioneller Kortex | v.a. | vor allem |
| pH | Wasserstoffionenkonzentration (-log[H ⁺]) | VDAC | spannungsabhängiger Ionenkanal |
| PTP | permeabler Transitionsporus | vs. | versus |
| RNS | reaktive Stickstoffradikale | WD | weight drop |
| ROS | reaktive Sauerstoffradikale | WT | Wildtyp |
| s | Sekunde | z.B. | zum Beispiel |
| s.o. | siehe oben | ZNS | zentrales Nervensystem |

LITERATURVERZEICHNIS

- Abramov AY, Duchen MR (2005): The role of an astrocytic NADPH oxidase in the neurotoxicity of amyloid beta peptides. *Philos Trans R Soc Land B Biol Sci*, Vol. 360: 2309-2314.
- Aihara N, Hall JJ, Pitts LH, Fukuda K, Noble LJ (1995): Altered immunoexpression of microglia and macrophages after mild head injury. *J Neurotrauma*, Vol. 12(1): 53-63.
- Akert K (1973): Dynamic aspects of synaptic ultrastructure. *Brain Res*, 49:511-518.
- Albensi BC, Sullivan P, Thompson MP (2000): Cyclosporin ameliorates traumatic brain-injury-induced of hippocampal synaptic plasticity. *Exp. Neurology*, Vol. 162: 385-389.
- Andersen TE (1982): A controlled pneumatic technique for experimental spinal cord contusion. *J Neurosci Meth*, Vol. 6: 327-333.
- Ankarcrona M, Dypbukt JM, Bonfoco M, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, Nicotera P (1995): Glutamate-induced neuronal death; a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron*, Vol. 15: 961-973
- Antonsson B, Montessuit S, Lauper S et al. (2000): Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem J*, Vol. 345 (pt2): 271-278.
- Aronowski J, Strong R, Grotta JC: Reperfusion injury (1997): demonstration of brain damage produced by reperfusion after transient focal ischemia in rats. *J Cerebral Blood Flow & Metabolism*, Vol. 17 (10): 1048-56.
- Arsenio-Nunes ML, Hossmann KA, Farkas-Bargeton E (1973): Ultrastructural and histochemical investigation of the cerebral cortex of cat during and after complete ischemia. *Acta Neuropathol (Berl)*, Vol. 26: 329-344.
- Ashwal S, Holshouser BA, Shu SK, Simmons PI, Perkin RM, Tomasi LG, Knierim DS, Sheridan C, Craig K, Andrews GH, Hinshaw DB (2000): Predictive value of proton magnetic resonance spectroscopy in pediatric closed head injury. *Pediatr Neurol*, Vol. 23: 114-125.

- Assaf Y, Beit-Yannai E, Shohami E, Berman E, Cohen Y (1997): Diffusion- and T2 weighted MRI of closed head injury in rats: a time course study and correlation with histology. *Magn. Res. Imag.*, Vol. 15: 77-85.
- Ates O, Cayli S, Gurses I, Yucel N, Altinoz E, Iraz M, Kocak A, Yologlu S (2007): Do sodium channel blockers have neuroprotective effect after onset of ischemic insult? *Neurol Res*, Vol. 29: 317-323.
- Auer RN, Kalmino H, Olsson Y, Siesjö BK (1985): The temporal evolution of hypoglycemic brain damage. Light and electron microscopic findings in the rat cerebral cortex. *Acta Neuropathol*, Vol. 67:13-24.
- Baethmann A, Maier-Hauff K, Schürer L (1989): Release of glutamate and free fatty acids in vasogenic brain edema. *J Neurosurg*, Vol. 70:578-591.
- Baethmann A, Maier-Hauff K, Kempfski O, Unterberg A, Wahl M, Schürer L (1988): Mediators of brain edema and secondary brain damage. *Crit Care Med*, Vol. 16: 972-978.
- Baskaya MK, Dogan A, Temiz C, Dempsey RJ (2000): Application of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride staining to evaluate injury volume after controlled cortical impact brain injury: role of brain edema in evolution of injury volume. *J Neurotrauma*, Vol. 17 (1): 93-9.
- Baskaya MK, Rao AM, Dogan A, Donaldson D, Dempsey RJ (1997): The biphasic opening of the blood-brain barrier in the cortex and hippocampus after traumatic brain injury in the rats. *Neurosci. Lett*, Vol. 226: 33-36.
- Bederson JB, Pitts LH, Germano SM, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski MH (1984): Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats; *Stroke*; Vol. 17(6):1304-8.
- Benedek A, Moricz K, Juranyi Z, Gigler G, Levay G, Harsing LG Jr, Matyus P, Szenasi G, Albert M (2006): Use of TTC staining for the evaluation of tissue injury in the early phase of reperfusion after focal cerebral ischemia in rats; *Brain Research*, 16952339.
- Bose LB, Jewell LO, Berry R (1984): A reproducible experimental model of a focal cerebral ischemia in the cat. *Brain Res*, Vol. 311: 385-391.

- Brenner T, Freier MC, Holshouser BA, Burley T, Ashwal S (2003): Predicting neuropsychologic outcome after traumatic brain injury in children. *Pediatr Neurol*, Vol. 28: 104-114.
- Brooks WM, Friedman SD, Gasparovic C (2001): Magnetic resonance spectroscopy in traumatic brain-injury. *J Head Trauma Rehabil*, Vol. 16: 149-164.
- Bullock R, Mendelow AD, Teasdale GM, Graham DI (1984): Intracranial haemorrhage induced at arterial pressure in the rat. Part 1: Description of technique, ICP changes and neuropathological findings. *Neurol Res*, Vol. 6: 184-8.
- Bullock R, Maxwell WL, Graham DI (1991): Glial swelling followig cerebral contusion: an ultrastructural study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, Vol. 54:427-434.
- Bullock R, Chesnut RM, Clifton G (1996): Guidelines for the management of severe head injury. *J Neurotrauma*, Vol. 13: 639-734.
- Busse R, van Landegehm FKH, Thomale UW, Kroppenstedt SN, Unterberg AW, Stoltenburg-Didinger G (1998): Apoptosis and necrosis following controlled cortical impact injury in rats. *Clin Neuropath*, Vol. 17 :286-287.
- Carbonell WS, Grady MS (1999): Regional and temporal characterization of neural, glial and axonal response after traumatic brain injury in the mouse. *Acta Neuropathol*, Vol. 98: 396-406.
- Casey PA, McKenna MC, Fiskum G, Saraswati M, Robertson CL (2008): Early and Sustained Alterations in Cerebral Metabolism after Traumatic Brain Injury in Immature Rats. *J Neurotrauma*, Vol. 25: 603-614.
- Chen L, Bouley D, Harris B, Butts K (2000): MRI study of immediate cell viability in focused ultrasound lesions in the rabbit brain. *J Magn Reson*, Vol 13 (1): 23-30.
- Chen S, Pickard JD, Harris NG (2002): Time course of cellular pathology after controlled cortical impact injury. *Experimental Neurology*, Vol. 182: 87-102.
- Cortez SC, McIntosh TK and Noble LJ (1989): Experimental fluid percussion brain injury: vascular disruption and neuronal and glial alterations. *Brain Research*, Vol. 482: 271-282.

- Cross AK, Woodroffe MN (2001): Immunoregulation of Microglial Functional Properties. *Microscopy Research and Technique*, Vol. 54: 10-17.
- De Olmos JS, Beltramino CA, De Olmos, De Lorenzo S (1994): Use of an amino-cupric-silver Technique for the detection of early and semiacute neuronal degeneration by neurotoxicants, hypoxia and physical trauma. *Neurotoxicol Teratol*, Vol.16: 545-561.
- Degterev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, Cuny GD, Mitchison TJ, Moskowitz, MA, Yuan J (2005): Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol*, Vol. 1: 112-119.
- Dixon CE, Clifton GL, Lighthall JW, Yaghai AA, Hayes RL (1991): A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat. *J. Neurosci. Methods*, Vol. 39: 253-262.
- Dixon CE, Hayes RL (1997): Fluid percussion and cortical impact models of traumatic brain injury. in: Narayan RK, Wilberger JE, Povlishock JT, (eds.). *J Neurotrauma*, New York: McGraw Hill, 1337-1346.
- Denny-Brown D (1945): Cerebral concussion. *Physiol Rev*, 25: 296.
- Denny-Brown D, Russel WR (1941): Experimental cerebral concussion. *Brain*, 64:93.
- Dohi K, Ohtaki H, Nakamachi T, Yofu S, Satoh K, Miyamoto K, Song D, Tsunawaki S, Shioda S, Aruga T (2010): Gp91phox (NOX2) in classically activated microglia exacerbates brain injury. *J Neuroinflammation*, 7:41.
- Du C, Hu R, Csernansky CA, Hsu CY and Choi DW (1995): Very Delayed Infarction After Mild Focal Cerebral Ischemia: A Role for Apoptosis? *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, Vol. 16: 195-201.
- Duvdevani R, Roof RL, Fulop Z, Hoffman SW, Stein DG (1995): Blood-brain barrier breakdown and edema formation following frontal cortical contusion: does hormonal status play a role? *J Neurotrauma*, Vol. 12: 65-75.
- Fabian RH, DeWitt DS, Kent TA (1995): In vivo detection of superoxide anion production by the brain using a cytochrome c electrode. *J Cereb Blood Flow Metab*, 15:242-247.

- Faden AI, Chan PH, Longar S (1987): Alteration in lipid metabolism, Na⁺/K⁺ ATPase activity and tissue water content of spinal cord following experimental traumatic injury. *J Neurochem*, Vol. 48: 1809-1816.
- Fakhry S. M, Trask AL, Waller MA und Watts D.D (2004): Management of brain-injured patients by an evidence-based medicine protocol improves outcomes and decreases hospital charges, *J Trauma*, Vol. 56 [3]: 492-9; discussion 499-500.
- Fan L, Young P, Barone F, Feuerstein G, Smith D, McIntosh T (1996): Experimental brain injury induces differential expression of tumor necrosis factor-alpha mRNA in CNS. *Mol Brain Res*, Vol. 36: 287-291.
- Firsching R & Frowein RA (1990): Multimodality evoked potentials and early prognosis in comatose patients, *Neurosurg Rev*, Vol. 13(2): 141-146.
- Friberg H, Wieloch T (2002): Mitochondrial permeability transition in acute neurodegeneration. *Biochimie*, Vol. 84: 241-250.
- Frowein RA, Terhaag D, auf der Haar K, Richard KE, Firsching R (1992): Rehabilitation after severe head injury. *Acta Neurochir Suppl (Wien)*, Vol. 55: 72-74.
- Giulian D, Chen J, Ingeman JE, George JK and Noponen M (1989): The Role of Mononuclear Phagocytes in Wound Healing After Traumatic Injury to Adult Mammalian brain. *The Journal of Neuroscience*, Vol. 9(12): 4416-4429.
- Glennier GG (1969): Tetrazolium salts. In: Little RD (ed): *H.J. Conn's Biological Stains*. Baltimore: Williams & Wilkins, pp: 154-162.
- Glennier GG, Weissbach H, Redfield BG (1960): The histochemical demonstration of enzymatic activity by a nonenzymatic redox reaction. Reduction of tetrazolium salts by indolyl-3-acetaldehyde. *J Cytochem Histochem*, Vol. 8:258-61.
- Goss JR, O'Malley ME, Zou L, Styren SD, Kochanek PM and DeKosky ST (1997): Astrocytes Are the Major Source of Nerve Growth Factor Upregulation Following Traumatic Brain Injury in the Rat. *Experimental Neurology*, Vol. 149: 301-309.

- Graham DI, Gennarelli TA (1997): Trauma in: Graham DI, Lantos PL, (eds.), Greenfield's Neuropathology, London, Sydney, Auckland: Arnold, 197-262.
- Gurdjian ES, Lissner HP, Webster HP, Latimer FR, Haddad BF (1954): Studies on experimental concussion relation of physiologic effect time duration of intracranial pressure increase at impact. *Neurology*, Vol. 4:674-681.
- Halestrap AP, McStay GP, Clarke SJ (2002): The permeability transition pore complex: another view. *Biochemie*, Vol. 84: 153-166.
- Hall ED (1997): Injury mechanisms and therapies: Free radicals and lipid peroxidation. in: Narayan RK, Wilberger JE, Povlishock JT, (eds.), *Neurotrauma*, New York: McGraw Hill, 1405-1419.
- Hall ED, Sullivan PG, Bibson TR, Pavel KM, Thompson BM, Scheff SW (2005): Spatial and Temporal Characteristics of Neurodegeneration after Controlled Cortical Impact in Mice: More than a Focal Brain Injury; *Journal of Neurotrauma*, Vol 22.
- Hesdorffer DC, Ghajar J (2007): Marked Improvement in Adherence to Traumatic Brain Injury Guidelines in United States Trauma Centers. *The Journal of Trauma*, Vol. 63: 841-848.
- Hindman BJ, Funatsu N, Cheng DCH, et al. (1990): Differential effects of oncotic pressure on cerebral and extracerebral water content during cardiopulmonary bypass in rabbits. *Anaesthesiology*, Vol. 73: 951-957.
- Hossmann KA, Sato K (1971): Effect of ischemia on the function of the sensorimotor cortex in cat. *Electroencephalography Clin Neurophysiol*, Vol. 30: 535-545.
- Hukkelhoven CW, Steyerberg EW, Rampen AJ, Farace E, Habbema JD, Marshall LF, Murray GD, Maas AI: Patient age and outcome following severe traumatic brain injury: an analysis of 5600 patients. *J Neurosurg*, Vol. 99(4): 666-673.
- Jantzen JP, Piek J (1997): Leitlinien zur Primärversorgung von Patienten mit Schädel-Hirn-Trauma. *Anästhesiologie und Intensivmedizin*, Vol. 2: 89-93.
- Jiang D, Sullivan PG, Sensi SL, Steward O, Weiss JH (2001): Zn(2+) induces permeability transition pore opening and release of pro-apoptotic peptides from neuronal mitochondria. *J Biol Chem*, Vol. 276: 47524-47529.

- Kassell NF, Hitchon PW, Gerk MK (1980): Alterations in cerebral blood flow, oxygen metabolism, and electrical activity produced by high dose thiopental. *Neurosurgery*, Vol. 7: 598-603.
- Kawamata T, Katayama Y, Hovda DA, Yoshino A, Becker DP (1995): Lactate accumulation following concussive brain injury: the role of ionic fluxes induced by excitatory amino acids. *Brain Res*, Vol. 674: 196-204.
- Kazama K, Anrather J, Zhou P, Gitrouard H, Frys K, Milner TA, Iadecola C (2004): Angiotensin II impairs neurovascular coupling in neocortex through NADPH oxidase-derived radicals. *Circ Res*, Vol. 95: 1019-1026.
- Kearney PA, Ridella SA, Viano DC, Andersen TW (1988): Interaction of contact velocity and cord compression in determining the severity of spinal cord injury. *J Neurotrauma*, Vol. 5: 187-208.
- Kehrer JP (2000): The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*, 149 (1): 43–50.
- Kellie G (1824): The kind of appearances observed in the dissection of two or three individuals with some reference to the pathology of the brain. *Trans Med Chi Edin*, Vol. 1: 84-169.
- Khan M, Im, YB, Shunmugavel A, Gilg AG, Dhindsa RK, Singh AK, Singh I (2009): Administration of S-nitrosoglutathione after traumatic brain injury protects the neurovascular unit and reduces secondary injury in a rat model of controlled cortical impact. *Journal of Neuroinflammation*, Vol. 6:32.
- Kimmelberg HK, Ransom BR (1986): Physiological and pathological aspects of astrocytic swelling. In: Fedoroff S, Vernadakis A, (eds.), *Astrocytes*, Orlando, Fla. Academic Press, 129-166.
- Klatzo I (1967): Neuropathological aspects of brain edema. *J Neuropath Exp Neurol*, Vol. 26:1-14.
- Klatzo I (1994): Evolution of brain edema concepts. *Acta Neurochir Suppl* Vol. 60: 3-6.
- Klatzo I, Chui E, Fujiwara K, Spatz M (1980): Resolution of vasogenic brain edema. *Adv Neurol*, Vol. 28: 359-374.

- Kloner RA, Darsee JR, DeBoer LWV, Carlson N (1981): Early pathological detection of acute myocardial infarction. *Arch Pathol Lab Med*, Vol. 105: 403-406.
- Kloner RA, Braunwald E, Maroko PR (1978): Long-term preservation of ischemic myocardium in the dog by hyaluronidase. *Circulation*, Vol. 58: 220-226.
- Kochanek AR, Kline AE, Gao WM, Chadha M, Lai Y, Clark RS, Dixon CE, Jenkins LW (2006): Gel-based hippocampal proteomic analysis 2 weeks following traumatic brain injury to immature rats using controlled cortical impact. *Dev Neurosci*, Vol. 28: 410-419.
- Kreutzberg GW (1996): Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in Neurosciences*, Vol. 19: 312-318.
- Kreutzberg GW, Blakemore WF, Graeber MB (1997): Cellular pathology of the central nervous system. in: Graham DI, Lantos PL, (eds.), *Greenfield's Neuropathology*, London, Sydney, Aukland: Arnold, 85-156.
- Kroppenstedt S-N, Kern M, Thomale U-W, Schneider G-H, Lanksch WR, Unterberg AW (1999): Effect of cerebral perfusion pressure on contusion volume following impact injury. *J Neurosurg*, Vol. 90: 520-526.
- Lewen A, Skoglosa Y, Clausen F, Marklund N, Chan PH, Lindholm D, Hillered L (2001): Paradoxical increase in neuronal DNA fragmentation after neuroprotective free radical scavenger treatment in experimental traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*, Vol. 21: 344-350.
- Li B, Mahmood A, Lu D, Wu H, Xiong Y, Qu C, Chopp M (2009): Simvastatin attenuates microglial cells and astrocyte activation and decreases interleukin-1 β level after traumatic brain injury. *Neurosurgery*, Vol. 65: 179-186.
- Li F, Irie K, Anwer MS, Fisher M (1997): Delayed Triphenyltetrazolium Chloride Staining Remains Useful for Evaluating Cerebral Infarct Volume in a Rat Stroke Model. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, Vol. 17: 1132-1135;
- Lie JT, Parolero PC, Holley KE, Titus JL (1975): Macroscopic enzyme-mapping verification of large, homogeneous experimental myocardial infarctions of predictable size and location in dogs. *J Thor Cardiovasc Surg*, Vol. 69: 599-605.

- Lifshitz J, Sullivan PG, Hovda DA, Wieloch T, McIntosh TK (2004): Mitochondrial damage and dysfunction in traumatic brain injury. *Mitochondrion*, Vol. 4: 705-713.
- Lighthall JW: Controlled cortical impact (1988): a new experimental brain injury model. *Journal of Neurotrauma*, Vol. 5(1): 1-15.
- Lin TN, He YY, Wu G, Khan M, Hsu CY (1993): Effect of brain edema on infarct volume in afocal cerebral ischemia model in rats. *Stroke*, Vol. 24: 117-121.
- Lindgren S, Rinder L (1965): Experimental studies of head injury I. Some factors influencing results of model experiments. *Biophysik*, Vol. 2: 20-329.
- Liszcak TM, Hedley-Whyte ET, Adams JF et al. (1984): Limitations of tetrazolium salts in delineating infarcted brain. *Acta Neuropath*, Vol. 65: 150-157.
- Liu F, Schafer DP, McCullough LD (2009): TTC, Fluoro-Jade B and NeuN staining confirm evolving phases of infarction induced by Middle Cerebral Artery Occlusion. *Journal of Neuroscience Methods*, Vol. 179 (1): 1-8.
- Liu TH, Beckmann JS, Freeman BS, Hogan EL, Hsu CY (1989): Polyethylene glycol-conjugated superoxide dismutase and catalase reduce ischemic brain injury. *Am J Physiol*, Vol. 256: H589-H593.
- Lloyd E, Somera-Molina K, Van Eldik LJ, Watterson DM, Wainwright MS (2008): Suppression of acute proinflammatory cytokine and chemokine upregulation by post-injury administration of a novel small molecule improves long-term neurologic outcome in a mouse model of traumatic brain injury. *Journal of Neuroinflammation*, 5:28.
- Löffler G, Petrides PE (2003), *Biochemie und Pathobiochemie*. 7. Auflage, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.
- Löffler G, Springer-Lehrbuch Online, Basiswissen Biochemie, 2005, S. 267-292
- Maas AI, Dearden M, Teasdale GM, et al. (1997): EBIC-guidelines for management of severe head injury in adults. European Brain Injury Consortium. *Acta Neurochir*, Vol. 139: 286-94.

- Marino S, Zei E, Battaglini M, Vittori C, Buscalferri A, Bramanti P, Federico A, De Stefano N (2007): Acute metabolic brain changes following traumatic brain injury and their relevance to clinical severity and outcome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, Vol. 78: 501-507.
- 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*, Vol. 80: 291- 300.
- Maxwell WL, Watts C, Graham DI (1993): Ultrastructural evidence of axonal shearing as a result of lateral acceleration of the head in non human primates. *Acta Neuropath*, Vol. 86:136-144.
- Mazzeo AT, Beat A, Singh A, Bullock MR (2009): The role of mitochondrial transition pore, and its modulation, in traumatic brain injury and delayed neurodegeneration after TBI. *Experimental Neurology*, Vol. 218: 363-370.
- Miller JD, Bullock R, Graham DI, Chen MH, Teasdale GM (1990): Ischemic brain damage in a model of acute subdural hematoma. *Neurosurgery*, Vol. 27: 433-9.
- Monroe A (1783): Observation on the structure and function of the nervous system; in: Creech and Johnson, Edinburgh: 5-6.
- Murray GD, Teasdale GM, Braakman R, Cohadon F, Dearden M, Iannotti F, Karimi A, Lapierre F, Maas A, Ohman J, Persson L, Servadei F, Stocchetti N, Trojanowski T, Unterberg A (1999): The European Brain Injury Consortium survey of head injuries. *Acta Neurochir (Wien)*, Vol. 141(3): 223-236.
- Ohata K, Marmarou A, Povlishock JT (1990): An immunocytochemical study of protein clearance in brain infusion edema. *Acta Neuropathol*, Vol. 81: 162-177.
- Ohtaki H, Ylostalo JH, Foraker JE, Robinson AP, Reger RL, Shioda S, Prockop DJ (2008): Stem/progenitor cells from bone marrow decrease neuronal death in global ischemia by modulation of inflammation/immune responses. *Proc Natl Acad Sci*, Vol. 105: 14638-14643.
- Ommaya AK, Hirsch AE, Flamm ES, Mahone RS (1966): Cerebral concussion in the monkey: An experimental model. *Science*, Vol. 153:211.

- Opii WO, Nukala VN, Sultana R, Pandya JD, Day KM, Merchant ML, Klein JB, Sullivan PG, Butterfield DA (2007): Proteomic identification of oxidized mitochondrial proteins following experimental traumatic brain injury. *J Neurotrauma*, Vol. 24: 772-789.
- Orihara Y, Ikematsu K, Tsuda R, Nakasono I (2001): Induction of nitric oxide synthase by traumatic brain injury. *Forensic Sci Int*, 123:142-149.
- Palmer AM, Marion DW, Botscheller ML, Swedlow PE, Styren SD, DeKosky ST (1993): Traumatic brain injury-induced excitotoxicity assessed in a controlled cortical impact model. *J Neurochem*, Vol. 61: 2015-2024.
- Pappius HM (1974): Fundamental aspects of brain edema. in: Vinken PJ, Bruyn GW, (eds.), *Handbook Clin Neurol*, American Elsevier, 167-185.
- Perri BR, Smith DH, Murai H (1997): Metabolic quantification of lesion volume following experimental traumatic brain injury in the rat. *J. Neurotrauma*, Vol. 14: 15-22.
- Pittman RN, Wang S, DiBenedetto AJ, Mills JC (1993): A system of characterizing cellular and molecular events in programmed neuronal cell death. *J Neurosci*, Vol. 13: 3669-3680.
- Povlishock JT (1985): The morphopathologic responses to experimental head injuries of varying severity. In: Becker DP, Povlishock JT, (eds.), *Central nervous system trauma status report-1985*. NINCDS Publication, 443-452.
- Povlishock JT (1992): Traumatically induced axonal injury: pathology and pathobiological implications. *Brain Pathol*, Vol. 2: 1-12.
- Raghupathi R, Fernandez SC, Murai H, Trusko SP, Scott RW, Nishioka WK, McIntosh TK (1998): BCL-2 Overexpression Attenuates Cortical Cell Loss After Traumatic Brain Injury in Transgenic Mice; *J Cereb Blood Flow Metab*. Vol. 18(11): 1259-69.
- Raghupathi R, Conti AC, Graham DI, Krajewski S, Reed JC, Grady MS, Trojanowski JQ, McIntosh TK (2002): Mild Traumatic Brain Injury Induces Apoptotic Cell Death in the Cortex That is Preceded by Decreases in Cellular Bcl-2 Immunoreactivity. *Neuroscience*, Vol. 110, No. 4: 605-616.

- Raghupathi R, Strauss KI, Zhang C, Krajewski S, Reed JC, McIntosh TK (2003): Temporal Alterations in Cellular Bax:Bcl-2 Ratio following Traumatic Brain Injury in the Rat. *J Neurotrauma*, Vol. 20(5): 421-435.
- Rao, VL, Dogan A, Bowen KK, Todd K G und Dempsey R J (2001): Antisense knockdown of the glial glutamate transporter GLT-1 exacerbates hippocampal neuronal damage following traumatic injury to rat brain. *Eur J Neurosci*, Vol. 13 [1]: 119-28.
- Rauhala P, Lin AM, Chiueh CC (1998): Neuroprotection by S-nitrosoglutathione of brain dopamine neurons from oxidative stress. *Faseb J*, 12:165-173.
- Rickels E, von Wild K, Wenzlaff P, Bock WJ (2006): Schädel-Hirn-Verletzung. Epidemiologie und Versorgung. Ergebnisse einer prospektiven Studie. München-Wien-New York, Zuckschwerdt-Verlag.
- Robertson CL, Saraswati M, Fiskum G (2007): Mitochondrial dysfunction early after traumatic brain injury in immature rats. *J Neurochem*, Vol. 101: 1248-1257.
- Rolfe DF and Brown GC (1997): Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol Rev*, Vol. 77: 731-758.
- Ross S, Halliday M, Campbell G, Byrnes D, Rowlands B (1994): The presence of tumor necrosis factor in CSF and plasma after severe head injury. *Br J Neurosurg*, Vol. 8: 419-425.
- Saatman KE, Feeko KJ, Pape RL, Raghupathi R: Differential Behavioral and Histopathological Responses to Graded Cortical Impact Injury in Mice. *J Neurotrauma*, Vol 23, 2006.
- Saito M, Korsmeyer SJ, Schlesinger PH (2000): BAX-dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes. *Nat Cell Biol*, Vol. 2: 553-555.
- Sandritter W, Jestadt R (1958): Triphenyltetrazoliumchloride (TTC) als Reduktionsindikator zur makroskopischen Diagnose des frischen Herzinfarktes. *Verh Dtsch Ges Pathol*, Vol. 41: 165-177.
- Schubert D, Piasecki D (2001): Oxidative glutamate toxicity can be a component of the excitotoxicity cascade. *J Neurosci*, Vol. 21(19): 7455-62.

- Schuhmann MU, Stiller D, Skardelly M, Bernarding J, Klinge PM, Samii A, Samii M, Brinker T (2003): Metabolic changes in the vicinity of brain contusions: a proton magnetic resonance spectroscopy and histology study. *J Neurotrauma*, Vol. 20: 725-743.
- Seddick Z, Habib YA (1991): The prognostic value of the brain sodium potassium ATPase enzyme concentration in head injury. *Childs Nerv Syst*, Vol. 7: 135-138.
- Shapira Y, Yadid G, Cotev S, Niska A, Shohami E (1990): Protective effect of MK801 in experimental brain injury. *J Neurotrauma*, Vol. 7: 131-139.
- Shapira Y, Setton D, Artru AA, Shohami E (1993): Blood-Brain barrier Permeability, Cerebral Edema, and Neurologic Function After Closed head Injury in Rats. *Anaesthesia Analg*. Vol. 77: 141-148.
- Smith SL, Andrus PK, Zhang JR, Hall ED (1994): Direct measurement of hydroxyl radicals, lipid peroxidation, and blood-brain barrier disruption following unilateral cortical impact head injury in the rat. *J Neurotrauma*, Vol. 11: 393-404.
- Soares HD, Hicks RR, Smith D, McIntosh TK (1995): Inflammatory Leukocytic Recruitment and Diffuse Neuronal Degeneration Are Separate Pathological Processes Resulting from Traumatic Brain Injury. *The Journal of Neuroscience*, Vol. 15(12): 8223-8233.
- Soustiel JF, Larisch S (2010): Mitochondrial Damage: A target for New Therapeutic Horizons. *The American Society of Experimental Neuro Therapeutics*, Vol. 7: 13-21.
- Soustiel JF, Glenn TC, Shik V, Boscardin J, Mahamid E, Zaaroor M (2005): Monitoring of cerebral blood flow and metabolism in traumatic brain injury. *J Neurotrauma*, Vol. 22: 955-965.
- Staub F, Winkler A, Peters J, Kempfski OS, Kachel V, Baethmann A (1994): Swelling, acidosis and irreversible damage of glial cells from exposure to arachidonic acid in vitro. *J Cereb Blood Flow Metab*, Vol. 14: 1030-1039.
- Stoffel, M.; Plesnila, N.; Eriskat, J.; Furst, M. und Baethmann, A. (2002): Release of excitatory amino acids in the penumbra of a focal cortical necrosis, *J Neurotrauma*, Vol. 19 [4]: 467-77.

- Stover, J. F.; Morganti-Kosmann, M. C.; Lenzlinger, P. M.; Stocker, R.; Kempfski, O. S. und Kossmann, T. (1999): Glutamate and taurine are increased in ventricular cerebrospinal fluid of severely brain-injured patients. *J Neurotrauma*, Vol. 16 [2]: 135-42.
- Streit WJ (2006): Microglial senescence: does the brain's immune system have an expiration date? *Trends Neurosci*, 29: 506-510.
- Stroop R, Thomale U-W, Pauser S, et al. (1998): Magnetic resonance imaging studies with cluster algorithm for characterization of brain edema after controlled cortical impact injury (CCII). *Acta Neurochir Suppl*, Vol. 71:303-305.
- Sullivan PG, Keller JN, Mattson MP, Scheff SW (1998): Traumatic brain injury alters synaptic homeostasis: Implications for Impaired mitochondrial and transport function. *J Neurotrauma*, Vol. 15: 789-798.
- Sullivan PG, Thompson MB, Schdeff SW (1999): Cyclosporin attenuates acute mitochondrial dysfunction following traumatic brain injury. *Exp Neurol*, Vol. 160: 226-234.
- Sullivan PG, Rabchevsky AG, Waldmeier PC, Springer JE (2005): Mitochondrial permeability transition in CNS trauma: cause or effect of neuronal cell death? *J Neurosci Res*, Vol. 79: 231-239.
- Sutton RL, Lescaudron L, Stein DG (1993): Unilateral cortical contusion injury in the rat: vascular disruption and temporal development of cortical necrosis. *J Neurotrauma*, Vol. 10:135-149.
- Swanson RA, Morton MT, Tsao-Wu G, Savalos RA, Davidson C, Sharp FR (1990): A semiautomated method for measuring brain infarct volume. *Journal of Cerebral Blood Flow And Metabolism*, Vol. 10(2): 290-3.
- Switzer RC, III (2000): Application of neurodegeneration stains for neurotoxicity testing. *Toxicol Pathol*, Vol. 28: 70-83.
- Tamura A, Graham DI, McCullough J (1981): Focal cerebral ischemia in the rat: II. Regional cerebral blood flow determined by ¹⁴C-iodantipyrine autoradiography following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blod Flow Metab*, Vol. 1:61-69.

- Taya K, Marmarou CR, Okuno K, Prieto R, Marmarou A (2009): Effect of secondary insults upon Aquaporin-4 water channels following experimental cortical contusion in rats. *J Neurotrauma*, Vol. 27: 229-239.
- Teasdale, G. M.; Braakman, R.; Cohadon, F.; Dearden, M.; Iannotti, F.; Karimi, A.; Lapierre, F.; Maas, A.; Murray, G.; Ohman, J.; Persson, L.; Servadei, F.; Stocchetti, N.; Trojanowski, T. und Unterberg, A. (1997): The European Brain Injury Consortium. Nemo solus satis sapit: nobody knows enough alone, *Acta Neurochir (Wien)*, Vol. 139 [9]: 797-803.
- Tehrani R, Rose ME, Vagni V, Pickrell AM, Griffith RP, Liu H, Clark RSB, Dixon CE, Kochanek PM, Graham SH (2008): Disruption of Bax Protein Prevents Neuronal Cell Death but Produces Cognitive Impairment in Mice following Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma*, Vol. 25: 755-767.
- Thomale UW (2001): Evaluation des tierexperimentellen Modells einer traumatischen kortikalen Kontusion (Controlled Cortical Impact Injury) für Therapiestudien. Dissertation.
- Thomale UW, Kroppenstedt SN, Beyer TF, Schaser KD, Unterberg AW and Stover JF (2002): Temporal profile of cortical perfusion and microcirculation after controlled cortical impact injury in rats. *J Neurotrauma*, Vol. 19, N. 4.
- Thomale UW, Griebenow M, Mautes A, Beyer TF, Dohse NK, Stroop R, Sakowitz OW, Unterberg AW, Stover JF (2007): Heterogeneous regional and temporal energetic impairment following controlled cortical impact injury in rats. *Neurological Research*, Vol. 29:594-603.
- Thomale UW, Bender M, Casalis P, Rupprecht S, Griebenow M, Neumann K, Woiciechowsky C, Unterberg AW, Stover JF (2007): Tacrolimus depresses local immune cell infiltration but fails to reduce cortical contusion volume in brain-injured rats. *Immunobiology*, Vol. 212: 567-576.
- Tsujimoto Y Shimizu S (2007): Role of the mitochondrial permeability transition in cell death. *Apoptosis*, Vol. 12: 835-840.
- Tureyen K, Vemuganti R, Sailor KA, Dempsey RJ (2004): Infarct volume quantification in mouse focal cerebral ischemia: a comparison of triphenyltetrazolium chloride and cresyl violet staining techniques. *J Neurosci Met*, Vol. 139(2): 203-7.

- Unterberg A, Wahl M, Baethmann A (1984): Effects of bradykinin on permeability and diameter of pial vessels in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab*, Vol. 4: 574-585.
- Unterberg AW, Sarrafzadeh AS, Lanksch WR (1999): (Skull-brain injury in polytrauma--results of neurosurgery). *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*, Vol 34 Suppl 1: 13-19.
- Unterberg A, Schneider GH, Gottschalk J, Lanksch WR (1994): Development of traumatic brain edema in old versus young rats. *Acta Neurochir Suppl*, Vol. 60: 431-433.
- Unterberg AW, Stroop R, Thomale U-W, Kiening KL, Päuser S, Vollmann W (1997): Characterization of brain edema following controlled cortical impact injury in rats. *Acta Neurochir Suppl*, Vol. 70: 106-108.
- Van Landeghem, F. K.; Weiss, T.; Oehmichen, M. und von Deimling, A. (2006): Decreased expression of glutamate transporters in astrocytes after human traumatic brain injury. *J Neurotrauma*, Vol. 23 [10]: 1518-28.
- Van Putten HP, Bouwhuis MG, Mizelaar jp, Lyeth BG, Berman RF (2005): Diffusion-weighted imaging of edema following traumatic brain injury in rats: effects of secondary hypoxia. *J Neurotrauma*, Vol. 22: 857-872.
- Von Berenberg P, Unterberg A, Schneider GH, Lanksch WR (1994): Treatment of traumatic brain edema by multiple doses of mannitol. *Acta Neurochir Suppl*, Vol. 60: 531-533.
- Vorbrodt AW, Lossinsky AS, Wisniewski HM, et al. (1985): Ultrastructural observations on the transvascular route of protein removal in vasogenic brain edema. *Acta Neuropathol*, Vol. 66: 265-273.
- Wahl M, Unterberg A, Baethmann A, Schilling L (1988): Mediators of blood-brain-barrier dysfunction and formation of vasogenic brain edema. *J Cereb Blood Flow Metab*, Vol. 8: 621-634.
- Wang X (2001): The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*, Vol. 15: 2922-2933
- Wolf HK, Buslei R, Schmidt-Kastner R, Schmidt-Kastner PK, Pietsch T, Wiestler OD, Blumcke I. NeuN (1996): a useful neuronal marker for diagnostic histopathology. *J Histochem*, Vol. 44: 1167-1171.

Xiong Y, Gu Q, Peterson PI, Muizelaar JP, Lee CP (1997): Mitochondrial dysfunction and calcium perturbation induced by traumatic brain injury. *J Neurotrauma*, Vol. 14: 23-34.

Young W (1992): Role of calcium in central nervous system injuries. *J Neurotrauma*, Vol. 9:9-25.

Young AB, Fagg G (1990): Excitatory amino acid receptors in the brain: Membrane binding and autoradiographic approaches. *Trends Pharmacol Sci*, Vol. 2: 126-133.

Zoratti M, Szabo I (1995): The mitochondrial permeability transition. *Biochem Biophys Acta*, Vol. 241: 139-176.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, daß die Dissertation von mir selbst und ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfaßt wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."