Aus der Klinik für Neurochirurgie

mit Arbeitsbereich Pädiatrische Neurochirurgie

der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

## DISSERTATION

# Charakterisierung von Immunreaktionen nach traumatischer kortikaler Kontusion und Gabe von Ubiquitin im Tiermodell

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Leonie Gölz

aus Bonn

## Gutachter: 1. PD Dr. med. U.-W. Thomale

- 2. Prof. Dr. Dr. L. Schilling
- 3. Univ.-Prof. Dr. med. O. Kempski

Datum der Promotion: 3. Juni 2012

## INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung
1.1	Epidemiologie des Schädel-Hirn-Traumas
1.2	Das Schädel-Hirn-Trauma
1.2.1	Einteilung
1.2.2	Leitliniengerechte Therapie des Schädel-Hirn-Traumas
1.2.2.	1 Präklinische Versorgung
1.2.2.	2 Klinische Versorgung
1.2.3	Pathophysiologie
1.2.3.	1 Zytokinexpression
1.2.3.	1.1 TNF-α-Expression
1.2.3.	1.2 IL-1β- und IL-1ra-Expression
1.2.3.	1.3 IL-6-Expression
1.2.3.	1.4 IL-10-Expression
1.2.3	2 Immunzellinfiltration
123	2 1 Neutrophile Granulozyten
123	2.2 Mikrogliazellen
1.2.3	2.3 Astrozvten
1.2.3	3 Apoptose
1.3	Ubiquitin
14	Fragestellung
2	Material und Methoden
2 1	Vorsushetiere
2.1	Traumamadall
2.2	Controlled Cortical Impact Injung
2.2.1	Aufbau dan Traumagarätan
2.2.2	Aulbau des Traumagerates.
2.3	Nerkoon und Überwechung
2.3.1	Anlago oines zentralvenäsen Kathetere
2.3.2	Kraniala Dränaration
2.3.3	
2.3.4	ICF-MESSUIIY
2.3.3	Diulgasariaiyse
2.3.0	Trauma
2.3.7	Ussarer und kutaner verschluss
2.3.0	nimenmanme.
2.4	
2.5	Immunnistochemie
2.0.1	Herstellung und Prozessierung der Z4-Stunden-Gewebeproben
2.3.2	rierstenung und Frozessierung der 7-räge-Gewebeproben
2.0.3	Calbully util Gewebeplobell
2.0.4	TdT modiated dLTD biatin pick and labelling
2.0	Tu T-meulaleu uu TP-biolin mick enu labelling
2.1	
2.1.1	Substanz und Plazebo
2.1.2	versucrisaurchtunrung
2.8	Statistische Methoden
3	Ergebnisse
3.1	Erhobene Daten, Messwerte und Beobachtungen
3.1.1	Tiergewichte
3.1.2	ICP-Messung
3.1.3	pH-Wert, Basenüberschuss, Hämoglobingehalt, pCO <sub>2</sub> , pO <sub>2</sub>
3.1.4	Kontusionsstärke
3.2	Mortalität
3.3	RT-PCR

3.3.1	TNF-α-Expression	45
3.3.1.1	4 Stunden	45
3.3.1.2	72 Stunden	45
3.3.2	IL-1β- Expression	46
3.3.2.1	4 Stunden	47
3.3.2.2	72 Stunden	47
3.3.3	IL-1ra- Expression	47
3.3.3.1	4 Stunden	48
3.3.3.2	72 Stunden	48
3.3.4	IL-6- Expression	49
3.3.4.1	4 Stunden	49
3.3.4.2	72 Stunden	49
3.3.5	IL-10- Expression	50
3.3.5.1	4 Stunden	50
3.3.5.2	72 Stunden	50
3.4 Ir	nmunhistochemie	51
3.4.1	HIS48-Färbung	52
3.4.2	MPO-Färbung	52
3.4.2.1	24 Stunden	53
3.4.2.2	7 Tage	53
343	OX-42-Färhung	56
3/31	2/ Stunden	57
2/22	7 Tago	57
0.4.0.2		58
3.4.4	ED1-Farbung	58
3.4.4.1	24 Stunden	59
3.4.4.2	7 Tage	59
3.4.5	GFAP-Färbung	62
3.5 T	dT-mediated dUTP-biotin nick end labeling	64
4	Diskussion	66
4.1 Mo	odellversuche an der Ratte	66
4.2 Au	Iswahl des Traumamodells	67
4.3 Na	arkose	69
4.3.1	Wirkung von Isofluran im Allgemeinen	70
4.3.2	Wirkung von Isofluran im ZNS	70
4.3.3	Wirkung von Lachgas im Allgemeinen	72
4.3.4	Wirkung von Lachgas im ZNS	73
4.3.5	Bupivacain hydrochlorid	73
4.4 Th	nerapiestudie	74
4.4.1	Zeitpunkt der Injektion	74
4.4.2	Physiologische Parameter	75
4.4.2.1	Gewichtsverlust	75
4.4.2.2	pH-Wert, Basenüberschuss, Hämoglobingehalt, pCO <sub>2</sub> , pO <sub>2</sub>	75
4.4.2.3	ICP	77
4.4.2.4	Kontusionsstärke	77
4.4.3	RT-PCR	77
4.4.3.1	TNF-α-Expression	77
4.4.3.2	IL-1β- und IL-1ra-Expression	78
4.4.3.3	IL-6-Expression	70
4.4.3.4	IL-10-Expression	20
4.4.4	Immunhistochemie	80 81
4441	Neutrophile Granulozyten	01 Q1
ΔΔΛ <b>Ͻ</b>	Perinhere mononukleäre Blutzellen/Mikroalia	01 02
<u>т.т.</u> ДДЛ 2		0Z 01
7.7.7.J 115	TdT_mediated dl ITP_hintin nick and labaling	04 0 <i>5</i>
т. <del>т</del> .5 ЛЛА	Abschließende Überlegungen	00
4.4.0 E		00
5		88
C	Literaturverzeichnis	89

1

## EINLEITUNG

## 1.1 Epidemiologie des Schädel-Hirn-Traumas

In den "National Burden of Disease Studies" von 2001 der WHO (World Health rangiert das Schädel-Hirn-Trauma (SHT) Organization) nach den Rückenmarksverletzungen an zweiter Stelle der Traumata, die den höchsten Grad und die längste Dauer der Behinderung nach sich ziehen (Victorian Burden of Disease Study, 2001). In der Tat haben Schädel-Hirn-Traumata weitreichende Folgen für die Patienten und ihre Angehörigen. Zunächst stehen Bewusstseinsstörungen, Bewegungsstörungen, Sprach- und Sprechstörungen und auch epileptische Anfälle im Vordergrund (Oder und Wurzer, 2006). Später dominieren dann kognitive und psychopathologische Störungen, die eine Wiederaufnahme beruflicher und sozialer Aktivitäten gefährden (Oder und Wurzer, 2006). 2007 wurden in Deutschland 220.534 Männer (56 %) und Frauen (44 %) wegen intrakraniellen Verletzungen vollstationär im Krankenhaus behandelt (Statistisches Bundesamt, 2007). Insgesamt wird mit einer Inzidenz von 180-323 pro 100.000 Einwohner pro Jahr in Deutschland (Rickels et al., 2006) und den USA (Bruns und Hauser, 2003) gerechnet. Besonders gefährdet durch schwere Schädel-Hirn-Traumata sind Jugendliche und junge Erwachsene mit einem Altersgipfel um 42 Jahre (Kirchberger und Wingenfeld, 1992). Bei den unter 45-Jährigen ist das schwere SHT sogar die häufigste Todesursache (Rickels, Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie, DGNC, 2004). Lediglich 25% der Betroffenen sind älter als 65 Jahre (Kirchberger und Wingenfeld, 1992). Aus dieser Altersverteilung und der oftmals resultierenden Arbeitsunfähigkeit nach SHT folgt, dass das SHT einen großen sozioökonomischen Einfluss in Deutschland und weltweit hat. Die gesamtgesellschaftlichen Kosten durch Schädel-Hirn-Traumata belaufen sich in Deutschland auf ca. 2,8 Milliarden Euro/Jahr (Rickels et al., 2006).

## 1.2 Das Schädel-Hirn-Trauma

## 1.2.1 Einteilung

Die Einteilung des SHT erfolgt nach dem Ausmaß der neurologischen Beeinträchtigung anhand der Glasgow Coma Scale sowie nach der Intaktheit der harten Hirnhaut (Dura mater) in offenes und geschlossenes SHT.

Eine Commotio cerebri (Gehirnerschütterung) liegt vor bei nur kurzzeitiger Bewusstseinstrübung von weniger als 15 Minuten (Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie, 2008). Bei einer Contusio cerebri (Gehirnprellung) kommt es zu einer Bewusstlosigkeit von bis zu 60 min, und eine Compressio cerebri (Gehirnquetschung), liegt ab einer Bewusstlosigkeit von über 60 min vor (Müller, 2008/09). Neben der Dauer der Bewusstlosigkeit wird heute vor allem die Glasgow Coma Scale (GCS) zur Beurteilung von Schädel-Hirn-Traumata herangezogen (Tab. 1). Diese wird nach dem schlechtesten erzielten Wert innerhalb von 48 Stunden nach dem SHT eingeteilt (Wallesch, 2005). Die Einschätzung von Augenöffnung, Körpermotorik und verbaler Reaktion ergibt einen Punktwert zwischen 3 und 15 (Teasdale und Jennett, 1974). Demnach liegt ein leichtes SHT bei Werten von 15-13, ein mittelschweres bei 12-9 und ein schweres SHT bei 8-3 Punkten vor (Wallesch et al., 2005).

Punkt	Augenöffnung	Körpermotorik	Verbale Reaktion
WGIL			
6		Auf Aufforderung	
5		Gezielt auf Schmerzreiz	Orientiert
4	Spontan	Flexion auf Schmerzreiz	Desorientiert
3	Auf Ansprache	Abnormale Flexionsbewegung auf	Inadäquate verbale
		Schmerzreize und spontan	Antworten
		(Dekortikationshaltung =	
		Beugesynergismen)	
2	Auf Schmerzreiz	Extension auf Schmerzreiz und spontan	Unverständliche Laute
		(Dezerebrationshaltung =	
		Strecksynergismen)	
1	Keine	Keine	keine
	Augenöffnung		

Tab. 1. Glasgow-Coma-Scale nach Müller (2008/09)

Darüber hinaus erfolgt eine grobe Aufteilung nach dem Verletzungsmuster in offene und geschlossene/gedeckte Schädel-Hirn-Traumata, wobei ein offenes SHT bei Eröffnung der Dura mater vorliegt (Oder und Wurzer, 2006).

## 1.2.2 Leitliniengerechte Therapie des Schädel-Hirn-Traumas

In der Therapie eines SHT gilt es vor allem, die sekundären Schäden zu mindern und wenn möglich zu verhindern, da die primären Schäden durch den Unfall keiner therapeutischen Maßnahme mehr zugänglich sind. Die DGNC hat aus diesem Grunde 2006 überarbeitete Leitlinien zur Therapie des SHT erstellt.

## 1.2.2.1 Präklinische Versorgung

Patienten mit erloschenen Schutzreflexen bzw. einem GCS < 8 sollten intubiert werden. Hiermit kann auch eine ausreichende Ventilation ermöglicht und somit für eine Normoxie und Normokapnie gesorgt werden. Auch normotone Blutdruckwerte von systolisch >90mmHg sind zur Sicherstellung der zerebralen Perfusion unabdingbar. Daher sind Blutstillung und Substitution von Flüssigkeitsverlusten und signifikanten Blutverlusten notwendig. Zur Einschätzung des Zustandes des Patienten wird ein erster GCS-Wert am Unfallort bestimmt und die Pupillenfunktion untersucht. Die einmalige Gabe von Mannitol kann bei Verdacht auf einen erhöhten ICP (intracranial pressure) erwogen werden, bei Anzeichen einer unteren Einklemmung mit Pupillendilatation und Strecksynergismen kommt eine Hyperventilation in Frage. Die Wirksamkeit beider Maßnahmen ist allerdings noch nicht abschließend gesichert und ihr Einsatz sollte wegen der Gefahr der Vasokonstriktion infolge einer Hypokapnie nur vorübergehend erfolgen (Leitlinien der DGNC).

## 1.2.2.2 Klinische Versorgung

Nach der Primärversorgung und ausreichender Stabilisierung des Patienten sollte zunächst eine Computertomographie (CT) durchgeführt werden. Nach Ausschluss einer Wirbelsäulenverletzung kann die 30° Oberkörperhochlagerung ICP-Spitzen verringern. Stellt sich ein raumfordernder Prozess in der Bildgebung dar, kann eine Notfalloperation indiziert sein. Die Wirksamkeit von Entlastungskraniektomien bei Entwicklung eines großen Hirnödems sind noch nicht abschließend untersucht und daher kein fester Bestandteil in der Primärtherapie der Leitlinie. Neben den präklinisch durchführbaren Maßnahmen und Medikationen kommt bei unruhigen Patienten eine Sedierung in Frage, um die Atmung zu beruhigen und zu kontrollieren.

Die ICP-Messung ist ein weiterer wichtiger Bestandteil des SHT-Managements. Aus der Differenz des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAD) und dem ICP lässt sich der zerebrale Perfusionsdruck (CPP = cerebral perfusion pressure) berechnen. Dieser sollte auf Werten von 50-70 mmHg gehalten werden. Bei darstellbaren Ventrikeln bietet sich die Anlage einer Ventrikeldrainage an, womit sowohl eine Senkung als auch die Messung des ICP erzielt werden kann. Im Verlauf sollte an die Gabe von Antikonvulsiva gedacht werden, die epileptische Anfälle in den ersten zwei Wochen nach SHT verhindern sollen. Eine routinemäßige Gabe nach SHT ist in Deutschland jedoch nicht Standard. Bei Anzeichen einer Infektion ist eine breitgefächerte, aggressive antibiotische Therapie indiziert, um Blutdruckabfälle, Hypoxie und weiteren Symptomen einer Infektion bzw. Sepsis vorzubeugen.

Letztlich ist für die Langzeitprognose wahrscheinlich entscheidend, ob und welche frührehabilitativen Maßnahmen eingeleitet wurden (Leitlinien der DGNC).

#### 1.3 Pathophysiologie

Ein SHT entsteht durch äußere Gewalteinwirkung auf den Schädelknochen (Kalotte) oder das Gehirn direkt (Rickels, DGNC, 2004). Generell sind Traumen des Kopfes durch Impressionskräfte von außen und solche durch abrupte Akzeleration und Dezeleration zu unterscheiden. Das Impressionstrauma entsteht beim Aufprall einer kleineren Masse auf den fixierten Schädels. Die resultierende Quetschung erfolgt vornämlich am Ort der Gewalteinwirkung und nur ausnahmsweise am Gegenpol. Rotationen bedingen Scherbewegungen zwischen Schädel und Gehirn. Durch diese entstehen Gewebezerreißungen und Schäden an Gefäßen mit intra- und extrazerebralen Blutungen. Dahingegen bedingt die lineare Beschleunigung entlang des Schwerpunktes des Kopfes (sagittal) bei der Translation einen Unterdruck am Gegenpol der Krafteinwirkung. Dieser führt vor allem zu einer dem Stoß abgewandten Läsion ("Contrecoup") an Ventrikeln, Balken und Stammganglien. Durch eine Akzeleration entlang des längsten Schädeldurchmesser kommt es eher zu inneren zerebralen Traumen an Balken, Fornix, Hippokampus und anderen Hirnstrukturen (Rumpl, 2006).

Statistisch gesehen ist mittlerweile die Anzahl der Opfer durch Verkehrsunfälle rückläufig (Bundesministerium für Verkehr, Bau und Stadtentwicklung, BMVBS, 2008), was sich auch in den Unfallursachen des Schädel-Hirn-Traumas niederschlägt. So sind mit 51,4 % Stürze verantwortlich für die meisten Schädel-Hirn-Traumata, allerdings verursachen Verkehrsunfälle immer noch die schwersten Formen des Schädel-Hirn-Traumas unter anderem mit Compressio cerebri (Rickels und Unterberg, 2008).

Die Schäden nach SHT lassen sich in primäre und sekundäre Traumafolgen einteilen. Primäre Traumafolgen entstehen unmittelbar durch die Gewalteinwirkung und zeigen Kopfplatzwunden, Galeahämatome, Skalpierungsverletzungen, sich als Fremdkörpereinschlüsse, Schädelfrakturen, Gefäßverletzungen mit Hämatomen, venös-thrombotische Abflussbehinderungen mit konsekutiver Ischämie und Hirnödem und Zerreißungen der Dura mater mit Liquorleck, Pneumatozephalus oder Hirnprolaps (Rickels und Unterberg, 2008). Sekundäre Traumafolgen entstehen durch komplexe biochemische und physikalische Prozesse im zeitlichen Verlauf nach SHT. Es kommt neben der Ausbildung intrakranieller Hämatome zu einem vasogenen Ödem mit weiterem Anstieg des intrakraniellen Druckes; Minderperfusion von Hirngewebe durch Hypotension, intrakraniellem Druck und Vasospasmen; Hyperkapnie oder Hypokapnie; Hyperglykämie, Infektionen und letztlich zu Einklemmungssymptomatik und Gewebsuntergang (Berlit, 2007; Ziegenfuß, 2007). Letztlich kommt es durch diese pathophysiologischen Konstellationen auch zum Auftreten immunologischer Reaktionen. Während der ersten Stunden und Tage werden im Rahmen der Neuroinflammation lösliche Faktoren wie Chemokine, Zytokine und Komplement ausgeschüttet. Neutrophile Granulozyten, Monozyten/Makrophagen, Lymphozyten und Gliazellen sind ebenfalls an dieser Akutphase beteiligt. Es kommt dabei unter anderem zu einer Aggravation des Hirnödems, zur Störung der BHS (Blut-Hirn-Schanke), zu Phagozytose und Apoptose. In den weiteren Tagen bis Wochen nach dem traumatischen Ereignis beginnen regenerative Prozesse, während denen vielfach auch die an der Neuroinflammation beteiligten Faktoren und Zellen aktiv sind. Die Beseitigung von Detritus, die Entstehung einer astroglialen Narbe und neuroprotektive

Vorgänge z.B. in Form der Bildung von Antioxidanzien oder auch NGF (Nerve growth factor) sind die Folge (Wallesch et al., 2005). In der vorliegenden Studie wurde die Pathophysiologie anhand der Interleukinexpression, der Immunzellinfiltration und des programmierten Zelltodes (Apoptose) näher untersucht.

## 1.3.1 Zytokinexpression

Wegen der starken inflammatorischen Antwort im Verlauf nach Schädel-Hirn-Traumata werden auch die Botenstoffe des Immunsystems in ihrer Konzentration und Zusammensetzung im Gehirn beeinflusst (Morganti-Kossman et al., 1997). Im gesunden Organismus sind Zytokine im ZNS (Zentrales Nervensystem) nicht oder nur minimal nachweisbar und steigen dann nach Trauma innerhalb von Minuten bis Stunden an (Kadhim et al., 2008). Zytokine sind lösliche Polypeptide, die im Rahmen der angeborenen und erworbenen Immunantwort aus fast allen Zellen des ZNS sezerniert werden können und pleiotrope, also vielfältige Funktionen besitzen, die entweder nur lokal oder auch systemisch in Erscheinung treten (Kadhim et al., 2008; Neumann, 2008). Eine Gruppe davon, bestehend aus 33 Molekülen, wird auch Interleukine (IL) genannt. Diese sind speziell an der Immunabwehr, an Entzündungsreaktionen, der Hämatopoese (Blutbildung) und Apoptose beteiligt (Löffler, 2008). Eine grobe Einteilung der Interleukine erfolgte weiterhin lange Zeit in pro- und antiinflammatorische Moleküle. Interleukine wie z.B. IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$  (Tumor-Nekrose-Faktor) zählen eher zu den proinflammatorischen und IL-10, IL-4 und IL-13 zu den antiinflammatorischen Zytokinen (Kadhim et al., 2008). Heute wird diese Ansicht ergänzt, da z.B. beobachtet wurde, dass klassische proinflammatorische Zytokine wie IL-6 und TNF- $\alpha$  zusätzlich auch protektive Effekte auf Gewebe und Organismen ausüben können (Um et al., 2004; Wang et al., 2009). Auch im ZNS sind vielfältige IL-Rezeptoren vorhanden, was den Einfluss von Interleukinen nach Trauma oder während anderer Erkrankungen des ZNS verdeutlicht; Interleukin-Wirkungen und -Interaktionen können pathologische Zustände schüren oder lindern, je nachdem, in welchem Kontext, in welcher Intensität oder zu welchem Zeitpunkt, an welchem Rezeptor und an welcher Zelle sie wirken (Kadhim et al., 2008).

Die in dieser Studie betrachteten Interleukine sind TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1 Rezeptorantagonist (IL-1ra), IL-6 und IL-10 und gehören zu den am häufigsten untersuchten Interleukine im Gehirn (Harting et al., 2008).

#### 1.3.1.1 TNF- $\alpha$ -Expression

TNF- $\alpha$  ist eines der früh ansteigenden Interleukine nach SHT, dessen Konzentration nach dem Trauma innerhalb von Stunden wieder abfällt, aber auch noch mehrere Tage später über dem Basalniveau nachweisbar bleibt (Kadhim et al., 2008). Es verfügt über eine  $\beta$ -Faltblattstruktur ("long-chain- $\beta$ -sheet cytokine") in Form eines Ringes bzw. Zylinders ( $_{\mu}\beta$ -jelly-roll") und ist als Trimer aus drei Untereinheiten aufgebaut. Die Rezeptoren für TNF- $\alpha$ , TNF- $\alpha$  R1 und R2, gehören zur Klasse-III-Zytokinrezeptoren. Diese besitzen lange extrazelluläre Anteile aus 40 Aminosäuren und sechs Zysteinresten. Der TNF- $\alpha$  R1 besitzt auch eine "death domain" im intrazellulären Teil, die ihre Funktion im Apoptoseprozess hat (siehe hierzu 1.2.3.3). Auch die TNF-α-Rezeptoren, wie auch alle anderen Rezeptoren dieser Klasse, bilden nach Bindung eines Liganden Trimere aus. Sie können, wie schon beschrieben, im Falle des TNF- $\alpha$ R1 über ihre "death domain" Apoptose induzieren oder auch wie beide TNF- $\alpha$ -Rezeptoren durch die Aktivierung von NF-κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells) den im folgenden beschriebenen Signalweg aktivieren (Löppnow, 2001). Über diesen NF-κB-Signalweg kommt es meist zur verstärkten Transkription von Zytokinen, Chemokinen, Adhäsionsmolekülen, weiteren Transkriptionsfaktoren und Akut-Phase-Proteinen, weshalb dieser Signalweg auch an den immunologischen Abläufen während Entzündungen, Zellproliferation und Zelltod von Bedeutung ist (Löffler, 2003). Beide TNF- $\alpha$ -Rezeptoren werden auf den Zellmembranen von Gliazellen und Neuronen exprimiert, können allerdings aus dieser gebundenen Form durch die Metalloprotease TNF- $\alpha$ -Converting-Enzym (TACE) in eine lösliche Form (sTNF- $\alpha$ -R = soluble TNF- $\alpha$ -Rezeptor) überführt werden (Hehlgans und Pfeffer, 2005). Beim SHT wird angenommen, dass TNF- $\alpha$  unter anderem die Synthese von IL-1, IL-6 und IL-18 induziert und die Expression von Zell-Adhäsions-Molekülen (CAMs, cell adhesion molecules) und Chemokinen steigert, um die Einwanderung von Leukozyten zu ermöglichen. Außerdem steigert es die Spiegel an Matrix-Metallo-Proteinasen (MMP), was zu einem Gewebeschaden führt mit Zusammenbruch der BHS und verstärkter Kapillarpermeabilität. Es fördert zudem die Konstriktion kleiner Kapillaren der weichen Hirnhaut (Pia mater) und schädigt das Myelin. Nekrose und Apoptose werden durch TNF- $\alpha$  unterstützt, die Proliferation von Astrozyten wird induziert und die NO-Synthase (NOS) aktiviert was die NO-Produktion verstärkt. Darüber hinaus werden auch das Komplementsystem und Rezeptoren für das Anaphylaxin C5a auf Neuronen aktiviert (Kadhim et al., 2008). Ob alle diese TNF- $\alpha$  induzierten Effekte immer zum sekundären Gewebeuntergang beitragen und wann sie möglicher Weise Heilungsprozesse nach Traumata fördern können, ist für das SHT noch nicht abschließend geklärt.

## 1.3.1.2 IL-1 $\beta$ - und IL-1ra-Expression

Auch bei der IL-1-Familie handelt es sich um  $\beta$ -Faltblatt-Zytokine allerdings in Form eines Kleeblatts ( $\beta$ -Kleeblatt/"trefoil"-Struktur). Ähnlich wie TNF- $\alpha$  erfüllt auch IL-1 $\beta$ seine Funktion in der Immunregulation, nachdem es durch Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, neutrophile Granulozyten, Lymphozyten, Eosinophile, Mastzellen und auch Astrozyten, Mikroglia und noradrenerge Neurone sezerniert wurde (Nashan und Luger, 1999). Auch IL-1β besitzt pleiotrope Funktionen, die über Rezeptoren der Klasse IV der vermittelt werden. Sie verfügen über drei extrazelluläre Domänen, die den Immunglobulinen ähnlich sind, und einen intrazellulären Anteil. Die IL-1-Rezeptoren 1 und 2 (IL-1-RI und -RII) sind membranständige Rezeptoren, von denen aber nur IL-1-RI Signale in das Innere der Zelle weiterleiten kann (Löppnow, 2001). Die Signaltransduktion beginnt mit einer Konformationsänderung des Rezeptor-Liganden-Komplexes. Daraufhin bindet der Komplex an das IL-1 Rezeptor accessory protein (IL-1 RAcP). Über einige Redoxsysteme aus Kinasen und Proteasen wird das Signal weitergeleitet. Weiterhin involviert in der Signaltransduktion sind GTP (Guanosintriphosphat), Phospholipide, Adenylatcyclase, IL-1 receptor associated kinase (IRAK), Serin- und Threonin-Anteile und die Aktivierung der mitogen activated protein kinase cascade (MAP Kinase). Letztlich wird auch hierbei häufig der NF-κB-Signalweg aktiviert; die weitere Signaltransduktion und die biologischen Funktionen ausgehend von der Bindung intrazellulärer Rezeptordomänen des IL-1-RI sind jedoch noch nicht vollständig verstanden. Darüber hinaus kommen lösliche Formen beider Rezeptoren vor, häufiger wird jedoch der extrazelluläre Anteil von IL-1-RII abgespalten. Diese löslichen Formen tragen dazu bei, die IL-1-Antwort einzuschränken (Nashan und Luger, 1999).

Der IL-1-Rezeptor-Antagonist (IL-1ra) ist ein natürlich vorkommender Antagonist, der durch Bindung an IL-1-RI die Auslösung eines intrazellulären Signals verhindern kann (Kadhim et al., 2008). Er kommt in Monozyten, neutrophilen Granulozyten, Makrophagen, Lymphozyten und Endothelzellen vor und ist auch im Gehirn nachweisbar. Häufig kommt es zur gleichzeitigen Aktivierung von IL-1 und IL-1ra unter pathophysiologischen Umständen; das Gleichgewicht zwischen IL-1 und IL-1ra hängt dann vom auslösenden Stimulus ab. Darüber hinaus kommt IL-1ra als intrazelluläre Variante vor. Besonders stark bindet IL-1ra an den membranständigen und löslichen IL-1-RI. Da kein Komplex mit IL-1 R-AcP entsteht, wird die IL-1-Funktion schließlich inhibiert (Nashan und Luger, 1999).

Nach einem SHT trägt IL-1 $\beta$  dazu bei, dass Astrozyten und Mikroglia TNF- $\alpha$  und IL-6 produzieren. Außerdem kann es die Synthese des NGF und "ciliary neurotrophic factor" (CNTF) stimulieren, NOS induzieren und Neurotransmitter und neuronale Reaktionen auf Neurotransmitter verändern. Darüber hinaus scheint IL-1β auch am Untergang hippokampaler Neurone nach SHT beteiligt zu sein, da die intraventrikuläre Gabe von IL-1ra diesen Zelluntergang vermindern kann (Kadhim et al., 2008). Auch nach zerebralen Ischämien werden IL-1 und IL-1ra sezerniert, wobei IL-1ra später ansteigt und länger nachweisbar bleibt, was möglicher Weise einen Anhalt über das Schädigungsausmaß geben kann (Kadhim et al., 2008). Aufgrund seiner IL-1βantagonistischen Wirkung, verbesserte ein Anstieg von IL-1ra in vivo signifikant das Outcome nach SHT beim Menschen, weshalb IL-1ra letztlich als neuroprotektives Zytokin einzuordnen ist (Hutchinson et al., 2007). Zusammenfassend fördert IL-1ß zwar selbst und über TNF- $\alpha$  sowie IL-6 die posttraumatische Entzündungsreaktion mit Neuronenuntergang, stimuliert jedoch auch die Regeneration und Proliferation von Neuronen über NGF und CNTF womöglich während einer späteren sub- bzw. postakuten Phase nach SHT.

#### 1.3.1.3 IL-6-Expression

Das Zytokin IL-6 gehört zu den langkettigen  $\alpha$ -helikalen Zytokinen und wird als Antwort auf IL-1 und TNF- $\alpha$  durch T-Zellen, Astrozyten, Mikroglia und Neuronen sezerniert (Folkersma et al., 2008). Es bindet zwischen den beiden extrazellulären Domänen an Klasse-I-Zytokinrezeptoren den IL-6-Rezeptoren (IL-6R). Diese liegen zytokinspezifisch als  $\beta$ -Rezeptoren vor. Ein  $\beta$ -Rezeptor, der verschiedenen Zytokinen zur Verfügung steht und gp 130- (Glykoprotein-130-) Moleküle beinhaltet, wird zudem noch für die Signaltransduktion benötigt. Zur vollständigen Bindung und Signaltransduktion muss demnach ein Komplex aus IL-6/IL-6R an zwei gp-130-Molekülen entstehen (Löppnow, 2001). Während gp 130 auf der Oberfläche fast aller Körperzellen vermutet wird, wurde IL-6R bisher nur auf Hepatozyten und einigen Leukozyten nachgewiesen (Taga, 1997). Der zudem vorhandene lösliche IL-6-Rezeptor (sIL-6R) kann nicht nur IL-6 abfangen und binden, der Komplex slL-6R/IL-6 kann außerdem direkt an gp-130-Moleküle binden und so trotz Fehlen des IL-6R auf den meisten Zellen ein Signal auslösen (Peters et al., 1998). Während der Signaltransduktion werden Janus-Kinasen (JAK) und Tyrosinkinasen benötigt. Durch die Aktivierung der JAK1 und 2 können diese Tyrosinreste des IL-6R phosphorylieren. An die gleiche Stelle des Rezeptors können daraufhin z.B. STAT3 und1 (signal transducer and activator of transcription), Proteine mit SH2 (src homology 2)-Domäne, binden. Auch die STAT-Moleküle werden Tyrosinphosphoryliert und verlassen dann den Rezeptorkomplex. Schließlich wandern die STAT-Komplexe als Dimere in den Nucleus, binden an die DNS und beeinflussen dadurch die Transkription. IL-6 beeinflusst Gene, die an der Akutphasereaktion, der Hämatopoese, Differenzierung und Wachstum von B- und T-Zellen und der neuronalen Differenzierung beteiligt sind (Löffler, 2003).

Ein starker Anstieg von IL-6 im CSF (cerebrospinal fluid) von Patienten innerhalb der ersten Tage nach SHT nachgewiesen (Morganti-Kossman et al., 1997), mit einem Höchstwert innerhalb der ersten 48 Stunden (Kadhim et al., 2008). Wie schon beschrieben gilt IL-6 als proinflammatorisches Zytokin, das durch die Entzündungsreaktion zu einem gewissen Zellschaden, Demyelinisierung und Astrogliose nach SHT beiträgt (Campbell et al., 1993; Woiciechowsky et al. 2004). Erhöhte IL-6-Spiegel wurden jedoch nach SHT auch mit einem besseren GCS-Wert und

Überlebensrate einer verbesserten während eines sechs-monatigen Überwachungszeitraums in Verbindung gebracht (Winter et al., 2004), die unter anderem möglicher Weise auf die Funktionen von IL-6 als neurotrophischer und neuroprotektiver Faktor zurückzuführen sind (Penkowa et al., 2003). IL-6 stimuliert allerdings auch die Synthese proinflammatorischer Akutphaseproteine und kann selbst als endogenes Pyrogen die Körpertemperatur nach SHT steigern. Dies hat zur Folge, dass die biochemischen Kaskaden im Rahmen des sekundären Hirnschadens verstärkt und beschleunigt ablaufen (Kadhim et al., 2008). Eine andere Studie zeigte daher, dass IL-6 auch als positiver prädiktiver Faktor für infektiöse Komplikationen nach SHT gelten kann und in der Kurzzeitprognose, d.h. 24 Stunden nach SHT, den GCS-Wert senkt und die Mortalität steigert (Woiciechowsky et al., 2002). Somit können für IL-6 pathophysiologisch neurotoxische Prozesse nachvollzogen werden. Die klinischexperimentelle Erfahrung zeigt jedoch sowohl die kurzfristig neurotoxischen Eigenschaften wie auch die langfristig protektive Funktion von IL-6 nach SHT.

## 1.3.1.4 IL-10-Expression

IL-10 ist ein weiteres Zytokin mit α-helikaler Struktur, jedoch mit längerer Molekülkette als IL-6. Die Produktion von IL-10 erfolgt vor allem stimuliert durch TNF-α und cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) durch so genannte T-Helferzellen, Monozyten/Makrophagen, B-Zellen, Eosinophile und Mastzellen. Anders als IL-6 sind die IL-10-Rezeptoren 1 und 2 (IL-10R 1/2) Zytokinrezeptoren der Klasse-II. IL-10R 1 wurde bisher auf T-Zellen, Fibroblasten und hämatopoetischen Zellen nachgewiesen und ist regulierbar in seiner Expression z.B. durch Endotoxine. IL-10R2 wird auf fast allen Zellen konstitutiv exprimiert, trägt allerdings wegen seiner geringen Affinität zu IL-10 wenig zu dessen Bindung bei, sondern ist hauptsächlich für die Rekrutierung von JAK zuständig (Moore et al., 2001). Die Signaltransduktion beginnt mit einer Konformationsänderung des IL-10/IL-10R-Komplexes. Danach läuft die Signalkaskade über JAK 1, STAT 1 und 3 wie bei IL-6 ab. Die Wirkungen von IL-10 sind besonders im immunologischen Bereich vielfältig. Es hemmt die Produktion von IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\beta$  (Interferon- $\beta$ ), IL-12, IL-8 und NO (Stickstoffmonoxid) und verhindert die ordentliche Antigenpräsentation durch die verantwortlichen Zellen. Gleichzeitig stimuliert IL-10 die Produktion von IL-1ra und sTNF-α-R, die zytotoxische Aktivität von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und die Mastzellaktivierung.

Somit ist IL-10 den vorwiegend antiinflammatorischen Zytokinen, die Entzündungsreaktionen eindämmen und beenden können, zuzuordnen (Asadullah et al., 1999). Auch während der proinflammatorischen Phase in den ersten Tagen nach SHT ist IL-10 im CSF erhöht (Csuka et al., 1999; Buttram et al., 2007). Dabei zeigte sich eine Abhängigkeit der IL-10-Produktion vom Alter der traumatisierten Patienten; eine stärkere IL-10-Produktion wurde z.B. bei Kindern unter vier Jahren gemessen (Bell et al., 1997). Außerdem kann anhand der Menge an IL-10 im CSF drei Tage nach SHT eine Aussage über das Verletzungsausmaß getroffen werden, da eine Korrelation zwischen dem intrathecalen IL-10-Spiegel und der Mortalität des Patienten besteht (Bell et al., 1997). Darüber hinaus wurde festgestellt, dass die Erhöhung des intrakraniellen Druckes im Rahmen eines Schädel-Hirn-Traumas z.T. auch über die Aktivierung des Sympathikus und die Ausschüttung von Adrenalin erfolgt (Woiciechowsky und Volk, 2005). Die intravenöse IL-10-Applikation 30 min vor und eine Stunde nach SHT zeigte eine Verbesserung der neurologischen Erholung (Knoblach und Faden, 1998). Im Gegensatz dazu führte eine IL-10-Gabe 30 Minuten nach SHT zur Aufhebung der protektiven Effekte einer moderaten Hypothermie von 30-32°C (Kline et al., 2002). Letztlich wird vermutet, dass die IL-10-Exkretion nach SHT nicht nur die Wirkung proinflammatorischer Zytokine eindämmt, sondern möglicherweise auch zur Immunodepression nach SHT beiträgt und somit das posttraumatische Infektionsrisiko erhöht (Woiciechowsky und Volk, 2005; Woiciechowsky et al., 1998).

## 1.2.3.2 Immunzellinfiltration

An der Immunantwort nach SHT sind neben Zytokinen auch die zum Teil durch die Zytokine angezogenen Immunzellen beteiligt. Im gesunden Gehirn mit intakter BHS können wenige Immunzellen nur im geringen Maße im Hirngewebe nachgewiesen werden. Bei akuter Schädigung gelingt es Immunzellen hingegen sogar, bei intakter BHS in das Gehirn einzudringen (Gebicke-Haerter et al., 1998). In der vorliegenden Studie werden reaktive Mikrogliazellen, die als periphere monozytäre Blutzellen die BHS erreichen und erst intrazerebral zu reaktiven Mikrogliazellen werden, und neutrophile Granulozyten betrachtet. Neben der Infiltration des Hirngewebes kommt es durch ein SHT allerdings auch zur Aktivierung residenter Immunzellen. Im Weiteren werden daher auch aktivierte Mikrogliazellen und Astrozyten untersucht.

## 1.2.3.2.1 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten, PMNs (polymorphkernige neutrophile Granulozyten), wurden benannt nach den in ihnen enthaltenen Granula aus Elastase, Kollagenase, Cathepsin G, Lysozym und weiteren Hydrolasen. Diese werden zur Phagozytose von Mikroorganismen, anderen Zellen und Zellbestandteilen verwendet. Bei ihrer Reifung im Knochenmark wird die Myeloperoxidase (MPO) gebildet, die sie von anderen Zellen unterscheidet (Löffler, 2003). Innerhalb der ersten vier bis acht Stunden nach SHT erfolgt die Invasion von Neutrophilen ins Hirngewebe vermutlich aus dem Plexus Choroideus, den leptomeningealen Gefäßen und den Gefäßen innerhalb der Kontusion (Carlos et al., 1997). Geleitet werden Neutrophile dabei durch verschiedene Chemokine wie CINC-1 (cytokine-induced neutrophil chemoattractant) aus den Gefäßen in das Interstitium in unmittelbarer Nähe der Läsion. Von dort migrieren die Neutrophilen schließlich in das verletzte Hirnparenchym (Carlos et al., 1997; Chodobski et al., 2003; Szmydynger-Chodobska et al., 2009). Zur Überquerung der BHS sind Selektine und Integrine notwendig, die nach SHT wie beispielsweise das P-Selektin ICAM-1 (interzelluläres Adhäsionsmolekül) in Blutgefäßen der geschädigten Hemisphäre exprimiert werden, jedoch nicht vermehrt in Gefäßen der kontralateralen Hemisphäre nachgewiesen werden können (Carlos et al., 1997). Die Selektine an Endothelzellen verlangsamen den Fluss der Neutrophilen im Blutplasma, und die Integrine sorgen für die feste Anheftung an das Endothel, was schließlich das Durchwandern dieser Barriere ermöglicht (Löffler, 2003). Dadurch wird die Permeabilität der BHS verstärkt und somit ein vasogenes Hirnödem entwickelt bzw. ausgedehnt (Schoettle et al., 1990). Über eine Anhebung des transendothelialen elektrischen Widerstandes (TEER = Transendothelial electrical resistance) können Neutrophile in Abhängigkeit von ihrem Abstand zum Endothel jedoch die Permeabilität der BHS auch verringern. Dies erreichen neutrophile Granulozyten über eine Ausschüttung von Adenosin und/oder freien Radikalen wie Superoxide und Hydrogenperoxid; Adenosin hebt rezeptorvermittelt die Permeabilität der BHS an während freie Radikale indirekt über das Abfangen von Faktoren, die die

Permabilität sonst verstärken, wirken (Inglis et al., 2004). Ihren Einfluss auf die BHS üben Neutrophile zusätzlich durch den vascular endothelial growth factor (VEGF) aus, der auch von Astrozyten und Endothelzellen produziert werden kann (Chodobski et al., 2003). Letztlich wurde die Bildung besonders reaktionsfreudiger Moleküle genannt freie Radikale wie Peroxinitrite, die die Fähigkeit haben andere Moleküle zu oxidieren, durch Neutrophile und Makrophagen in einigen Studien auch mit einer Zunahme des zytotoxischen Hirnödems nach SHT in Verbindung gebracht (Hall, 1997; Leker und Shohami, 2002). Ob der Einfluss neutrophiler Granulozyten im Endeffekt zum Schaden nach SHT beiträgt, ist jedoch noch nicht abschließend geklärt.

## 1.2.3.2.2 Mikrogliazellen

Die Gliazellen des Gehirns sind verantwortlich für den Schutz, die metabolische, strukturelle und trophische Unterstützung von Neuronen. Die Funktion der Mikroglia ist komplex und noch nicht vollständig aufgeklärt; im Allgemeinen werden sie jedoch als die ersten zur Immunantwort zur Verfügung stehenden Zellen des Gehirns vor Ort beschrieben (Streit, 2005).

Mikroglia sind lokal im Gehirn anzutreffende Mitglieder in der Familie der Monozyten/Makrophagen (PMBC = periphere mononuclear blood cells) mit typischer Morphologie. Sie wandern während der Entwicklung in utero ins Gewebe ein und machen letztlich 10-20% der Gliazellen im gesunden Gehirn aus (Bruce-Keller, 1999). Ruhende Mikroglia sind gekennzeichnet durch ihre feinen Fortsätze. Ihre Aktivierung zu reaktiven Mikroglia bedingt ihre Umwandlung in vergrößerte Zellen mit breiten, kurzen Fortsätzen (Streit, 2000), die die Zelle sich nach SHT aktiv in Richtung Läsion bewegen lassen (Carbonell et al., 2005; Davalos et al., 2005), damit z.B. beschädigte Neuronen umhüllt und mit neurotrophischen Faktoren versorgt werden können (Streit, 2005). Auch ein Umhüllen von infiltrierenden PMNs durch Mikroglia nach zerebraler Ischämie wurde beschrieben und scheint geschädigte Neuronen möglicherweise vor weiterer Zerstörung durch die PMNs zu schützen (Neumann et al., 2008). Vielfältige Stimuli, wie sie auch beim SHT vorkommen, sind für die Aktivierung verantwortlich: veränderte extrazelluläre Kaliumkonzentrationen und freigesetztes ATP (Adenosintriphosphat) oder Adenosin nach Zelltod, Überreaktivität von Neuronen verbunden mit Verschiebungen von Ionengleichgewichten und verstärkter Ausschüttung von Neurotransmittern und

kalziumabhängige Wachstumsfaktoren, z.B. PGE<sub>2</sub> (Prostaglandin-E2) oder TNF- $\alpha$ , die die Proliferation der Mikroglia hervorrufen. Bleiben die Mikroglia im aktivierten Zustand, so können sie zytoprotektive Faktoren wie TGF- $\beta$  (transformig growth factor) und zytotoxische Metabolite wie z.B. Sauerstoffradikale bilden und Zelldetritus phagozytieren, woraufhin Reparatur- und Regenerationsprozesse eingeleitet werden können. Das Stadium der Phagozytose, in dem die Mikroglia morphologisch kaum von den runden Makrophagen mit zellulären Einschlüssen zu unterscheiden sind, wird nur bei extensivem neuronalem Schaden erreicht. Im Anschluss an die Phagozytose können Mikroglia Antigene präsentieren und so die adaptive Immunantwort anstoßen (Gebicke-Harter, 1998). Danach folgt vermutlich durch Apoptose die Elimination dieser Mikrogliazellen, um die lokale Immunantwort einzudämmen (Bruce-Keller, 1999). Scheinbar können Mikroglia sowohl neurotoxisch als auch neurotrophisch in vivo wirken; je nachdem, ob ein Neuron leichter beschädigt ist und seine Funktion wiedererlangen kann oder schon z.B. durch Expression bestimmter Moleküle auf seiner Zellmembran, den Todesdomänen ("death domains"), signalisiert, dass es im Absterben begriffen ist (Streit, 2000; Breuhahn und Brand, 2008). Auch die Art des Stimulus spielt eine Rolle, denn die mikrogliale Reaktion auf mikrobielle und virale Stimuli ist weitaus heftiger und mit stärkerem neuronalem Schaden verbunden (Neumann et al., 2008). Eine Überaktivierung oder Dysfunktion der Mikroglia, wie sie spontan, im Rahmen autoimmuner Prozesse oder im Rahmen einer viralen Infektion z.B. mit dem human immunodeficiency Virus auftreten kann, könnte jedoch auch zu größeren neuronalen Schäden nach SHT und chronisch-degenerativen Zuständen wie der Alzheimer-Krankheit oder Multiplen-Sklerose führen (Gebicke-Haerter, 1998; Bruce-Keller, 1999).

## 1.2.3.2.3 Astrozyten

Astrozyten oder Astroglia sind mit einem Anteil von ca. 50% an der Gesamtzellpopulation die am weitesten verbreiteten Zellen des Gehirns (Seeger et al., 2006). Morphologisch sind Astrozyten erkennbar durch ihre sternförmigen Fortsätze und immunhistochemisch durch das glial fibrillary acidic protein (GFAP = saures Gliafaserprotein), dem am häufigsten verwendeten spezifischen Marker für Astrozyten (Barral und Croibier, 2008). Es gibt zwei Formen von Astrozyten mit verschiedenem Vorkommen im Gehirn. Protoplasmatische Astrozyten liegen hauptsächlich in der

grauen Substanz. Sie strecken lange Fortsätze zu Blutgefäßen, bilden am Kortex eine Gliagrenzmembran oder fassen mehrere Neurone zu Neuronenverbänden zusammen. Fibrillenreiche Astrozyten kommen eher in der weißen Substanz vor. Auch sie erreichen dort Blutgefäße und die Kortexoberfläche (Welsch, 2006). Astrozyten erfüllen Clearance-Funktionen im Gehirn, denn sie sind beteiligt an der Kalium- und Protonenhomöostase der Neurone, der Wiederaufnahme von Glutamat und anderen Neurotransmittern aus dem synaptischen Spalt, dem Wassertransport im Gehirn und der Abgabe von neuronalen Wachstumsfaktoren sowie Zytokinen (Chen und Swanson, 2003) und kommunizieren bzw. interagieren mit Neuronen (Fellin und Carmignoto, 2004).

Ab dem ersten Tag nach SHT steigt die Anzahl an Astrozyten im ipsilateralen Thalamus im Rahmen einer reaktiven Astrogliose auf bis zu 3.5-fach höhere Werte und bleibt für mindestens zwei Wochen so stark erhöht (Raghavendra Rao et al., 2000). Im Gegensatz zu dieser Proliferation kann in den frühen Stadien nach SHT ein Verlust von Astrozyten im ipsilateralen Hippokampus nachgewiesen werden (Zhao et al., 2003). Mehrere Studien haben sowohl protektive Effekte von Astrozyten als auch deren Neurotoxizität gezeigt. Zunächst kann die Astrogliose neben der Wiederherstellung der Hirnstruktur auch die Regeneration der Neuronen wie eine Art Narbe behindern (Bush et al., 1999). Darüber hinaus kommt es zur osmotischen Schwellung der Zellkörper der Astrozyten als Reaktion auf ein SHT, was maßgeblich zur Entwicklung eines Hirnödems beiträgt (Kimelberg et al., 1995). Durch das Anschwellen der Astrozyten kommt es außerdem über noch ungeklärte Signalwege zur Freisetzung exzitatorischer Aminosäuren wie Glutamat und Aspartat aus ihren Zellkörpern (Kimelberg et al., 1995). Der Anstieg dieser Neurotransmitter im Extrazellulärraum wird zusätzlich verstärkt durch einen Ausfall der Natrium- abhängigen Glutamattransporter auf der Zellmembran der Astrozyten, welche für die Wiederaufnahme von Glutamat in die Astrozyten verantwortlich sind. Der Ausfall dieser Transportet wird auf die zerebrale intrazelluläre Laktatazidose und Natriumüberladung der Zellen zurückgeführt (Gemba et al., 1994). Da somit das abgegebene Glutamat durch die Astrozyten nicht wiederaufgenommen werden kann und stattdessen in die Neurone gelangt, kommt es letztlich zum Anstoß exzitatorischer, Kalzium vermittelter, neurotoxischer Prozesse (Gemba et al., 1994; Lau und Tymianski, 2010). Astrozyten sind mit ihren Fortsätzen zudem am Aufbau der BHS beteiligt (Hayashi et al., 1997) und können folglich auch durch Kontrolle des Flusses über diese Barriere und vor allem über ihre aktiven Wasser- und Natriumtransporter, die Aquaporine 4 (Nagelhus et al., 1999)., die Entstehung von vasogenen Hirnödemen beeinflussen. Andererseits wurde gezeigt, dass der neuronale Schaden nach moderatem SHT bis zu 60% größer ist, wenn sich teilende reaktive Astrozyten zuvor mit der antiviralen Substanz Ganciclovir ausgeschaltet wurden (Myer et al., 2006). Im Verlauf der subakuten und chronischen Phase nach SHT tragen aktivierte Astrozyten zur Bildung von Narbengewebe bei (Wallesch et al., 2005). Sie können demyeliniserte Nervenfasern mit Bezug zu der Narbe teilweise reparieren und mit einer dünnen Myelinschicht versehen (Wallesch et al., 2005). Die Funktion von Astrozyten ist jedoch differenziert zu betrachten und stark vom Stadium der Schädigung bzw. Regeneration abhängig, da die astrozytäre Narbe auch das axonale Wachstum hemmen und zur Waller-Degeneration stark verletzter Neurone beitragen kann (Wallesch et al., 2005).

#### 1.2.3.3 Apoptose

Auf zellulärer Ebene spielt sich der neuronale Gewebeuntergang in verschiedenen Prozessen und zeitlich gestaffelt voneinander ab. Direkt nach einem SHT kommt es bei Überschreitung einer gewissen Traumaintensität zu nekrotischem Zelltod (Wong et al., 2005). Auch Hypoxie, Hypothermie und Toxine können zur Nekrose, der schwersten Form des Zelluntergangs, führen. Während der Entstehung einer Nekrose schwellen Organellen an und es erfolgt die Kondensation des Chromatins. Außerdem nimmt die Permeabilität der Zellmembran der absterbenden Zelle schnell zu, so dass Zellbestandteile in den Extrazellulärraum austreten können. Im betroffenen Gewebe aktivieren die austretenden Zellbestandteile Immunzellen wie Mikroglia und es kommt zu einer Entzündungsreaktion, die durch die Bildung proinflammatorische Substanzen wie TNF- $\alpha$  in Astrozyten und Mikroglia vermittelt wird (Breuhahn und Brand, 2008; Daniel, 2008). Zusammenfassend reagiert im Gegensatz zum programmierten Zelltod, der Apoptose, die spezifische Immunantwort bei der Nekrose mit von Immunzellen z.B. T-Lymphozyten über die Erkennung der durch Botenstoffen wie IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ besonders stark und führt schließlich zur vollständigen Auflösung von Zellmembran und Zellinhalt (Daniel, 2008).

Nach dieser ersten höchst akuten Phase des Zelluntergangs nach SHT kommt es etwas verspätet zu einer zweiten Phase des Zelltodes durch Apoptose (Wong, et al., 2005). Im Gegensatz zur Nekrose kommt es bei der Apoptose erst zu einem späteren Zeitpunkt zur Degradation der Zellmembran. Prinzipiell gibt es zwei Wege, durch die eine Zelle das Stadium der Apoptose erreichen kann: der extrinsische Weg durch exogene Faktoren und der intrinsische Weg durch endogene Faktoren (Breuhahn und Brand, 2008). Exogene Faktoren sind z.B. Botenstoffe wie das Interleukin TNF- $\alpha$ , die durch Bindung an ihre Rezeptoren die Zelloberfläche so verändern, dass so genannte "death domains" entstehen. An diese "death domains" binden wiederum weitere Moleküle, unter anderem die Procaspase-8, wodurch letztlich Effektor-Moleküle entstehen (z.B. Effektor-Caspasen), deren Substrate für die Stabilität der Zelle mitverantwortlich sind (Breuhahn und Brand, 2008). Endogene Faktoren wie DNS-Schäden verändern die Zusammensetzung der mitochondrialen Membranen durch Proteine der Familie Bcl-2 (B-cell lymphoma 2). Überwiegen proapoptotische Moleküle dieser Familie z.B. Bax (Bcl-2-associated X protein) und Bad (Bcl-2-Antagonist-of-Cell-Death), gegenüber den antiapoptotischen wie Bcl-2 und Bcl-xL/Bcl2-L-1 (Bcl-2-like protein 1) verlässt mehr Cytochrom C (Cyt-C) die Mitochondrien. Dieses bildet mit Apaf-1 (apoptotische Protease-Aktivierungsfaktor-1) und ATP dann ein so genanntes Apoptosom, das wiederum über Effektor-Caspasen die Zellstabilität angreift (Breuhahn und Brand, 2008). Morphologisch ist eine apoptotische Zelle gekennzeichnet durch ein Schrumpfen von Zelle und Zellkern, den Verlust interzellulärer Kontakten, die Vakuolisierung von Zellorganellen, die Fragmentierung der DNS und die Schrumpfung des Zellkerns (Karyopyknose) (Breuhahn und Brand, 2008; Daniel, 2008). Phagozyten erkennen letztlich die apoptotischen Zellen an Molekülen, die sich normaler Weise auf der zytosolischen Seite der Zellmembran befinden, nehmen die apoptotischen Zellen auf und verhindern somit eine Entzündungsreaktion (Daniel, 2008).

#### 1.3 Ubiquitin

Ubiquitin ist ein kleines, thermostabiles, hoch konserviertes Protein, das in allen eukaryontischen Zellen vorhanden ist (Goldstein et al., 1975; Majetschak et al., 2003; Kutty et al., 2005). Es besteht aus 76 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von

insgesamt 8.5 kDa (kilo Dalton). Für lange Zeit wurde Ubiquitin nur im Zusammenhang mit Degradationsprozessen im Proteasomenkomplex betrachtet (Yao et al., 2007). Allmählich konnte jedoch gezeigt werden, dass Ubiquitin viele nicht-proteolytische Funktionen erfüllt, indem es als Zytokin-artiger Mediator mit z.T. antiinflammatorischen Eigenschaften während verschiedener Pathologien fungiert (Zedler und Faist, 2006). So zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der Höhe der Ubiquitinlevel und dem Verletzungsausmaß bei Brand- und Traumaopfern. Patienten mit höheren Ubiquitinwerten zeigten ein geringeres Risiko eine Sepsis oder ein Multiorganversagen zu entwickeln (Majetschak et al., 2008). Darüber hinaus konnte eine Ubiquitingabe die postischämische Zytokinantwort in der Lunge beeinflussen. Es zeigte sich, dass durch die Zufuhr von Ubiquitin die Zytokine der Th2-Antwort, IL-4, IL-10 und IL-13, vermehrt gebildet wurden (Garcia-Covarrubias et al., 2008). In vitro konnte durch exogenes Ubiquitin zudem die TNF- $\alpha$ -Produktion stimulierter Blutmonozyten verringert werden (Majetschak et al., 2003). Eine weitere immunmodulatorische Eigenschaft von Ubiquitin besteht in dessen Beteiligung an der Steuerung apoptotischer Vorgänge; das Wachstum verschiedener Zellen bzw. Organismen wurde über einen Eingriff in die Mitose unterdrückt und über Caspasen eine Verstärkung apoptotischer Vorgänge beobachtet (Daino et al., 2000; Kutty et al., 2005; Broemer und Meier, 2009). Auch in einem Transplantationsmodell zeigte exogenes Ubiguitin einen therapeutischen Effekt. Durch die Hemmung der Reaktivität spezifischer Leukozyten der Empfänger, konnte das Überleben von Hauttransplantaten in einem Mausmodell signifikant verlängert werden (Earle et al., 2006). Außerdem scheint sich exogenes Ubiquitin auf Kapillarpermeabilitäten auszuwirken. Zum Beispiel konnte die Ubiquitingabe nach Polytrauma den Flüssigkeitsbedarf bei Schweinen signifikant senken (Majetschak et al., 2004a). Auch in Modellen zum SHT wurde ein starker Anstieg von Ubiquitin im Liquor nach dem Trauma sowie nach spontanen Subarachnoidealblutungen registriert. Der Ubiquitinanstieg dauerte bei besonders schweren Verletzungen bis zum Tod des Patienten an (Majetschak et al., 2005). Ubiquitin zeigte anschließend in der Therapie des SHT viel versprechende modulatorische Effekte. Intravenös appliziertes Ubiquitin überquerte nach SHT die BHS und reduzierte die Ödembildung im Hirnparenchym und in der Lunge in vivo (Earle et al., 2005). Zudem zeigte auch die genaue Quantifizierung des Kontusionsvolumens nach SHT im Rattenmodell eine Reduktion des Schädigungsausmaßes durch eine posttraumatische Ubiquitingabe (Griebenow et al.,

2007). Schließlich wurde zudem beobachtet, dass exogenes Ubiquitin in vitro höchst wahrscheinlich über einen spezifischen, membranständigen Rezeptor in Monozyten und möglicher Weise auch andere Körperzellen aufgenommen werden kann (Majetschak et al., 2006). Alles in allem wurden exogenem Ubiquitin immunmodulatorische Eigenschaften mit Auswirkungen auf Zytokinexpressionen und apoptotische Kaskaden nachgewiesen. Potentiell positive therapeutische Effekte konnten bei Polytrauma- und Brandverletzten (Majetschak et al., 2008), in einem Transplantationsmodell (Earle et al, 2006) sowie nach Lungenischämie (Garcia-Covarrubias et al., 2008) beobachtet werden. Schließlich ergaben sich Hinweise auf potenziell neuroprotektive Eigenschaften nach SHT (Earle et al, 2005; Griebenow et al., 2007).

## 1.4 Fragestellung

In den letzten Jahren ergaben sich vermehrt Hinweise auf die vielfältigen immunmodulatorische Eigenschaften von exogenem Ubiquitin. In diesem Zusammenhang konnte Ubiquitin verschiedenfach mit therapeutischem Ansatz eingesetzt werden (siehe hierzu 1.3). Auch beim SHT zeigten sich potentielle Einsatzmöglichkeiten und positive Eigenschaften der Substanz, die sich in einer Stabilisierung der BHS und Reduktion des Kontusionsvolumens zeigten (Earle et al, 2005; Griebenow et al., 2007). Trotz vieler Studien zur Wirkung von exogenem Ubiquitin blieben die möglicher Weise neuroprotektiven Mechanismen dieser Substanz bisher ungeklärt. Um diese Vorgängen näher zu beleuchten, untersuchten wir den Einfluss von Ubiquitin auf drei Teilaspekte der Immunreaktion im Rattenhirn nach SHT. Wir stellten die Hypothese auf, dass exogenes Ubiquitin die Zytokinexpression, Immunzellinfiltration und/oder die Apoptoserate nach SHT modulieren könnte. Zur Untersuchung dieser Annahme wandten wir das "Controlled Cortical Impact Injury" (CCII) Modell (Lighthall, 1988) bei männlichen Sprague-Dawley-Ratten an. Anschließend wurden die Auswirkungen von Ubiquitin auf die Expression von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-6 und IL-10 zu verschiedenen Zeitpunkten nach SHT untersucht. Danach erfolgte der Nachweis der Infiltration des Hirnparenchyms durch Makrophagen/Mikroglia, neutrophile Granulozyten und Astrozyten bzw. deren Aktivierung durch immunhistochemische Methoden zu weiteren Zeitpunkten. Abschließend folgte die Untersuchung von Auswirkungen der Ubiquitingabe auf die Apoptoserate nach SHT. Zusammenfassend untersucht die vorliegende Arbeit die Frage, ob exogenes Ubiquitin neuroprotektive, immunomodulative Wirkungen nach SHT ausübt.

## 2 Material und Methoden

## 2.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden in dieser Studie 82 männliche Sprague Dawley Ratten (Charles River Deutschland, Sulzfeld) mit einem Gewicht von 300-400 g verwendet.

## 2.2 Traumamodell

Zur Erzeugung eines standardisierten und reproduzierbaren Schädel-Hirn-Traumas verwendeten wir das "Controlled Cortical Impact" Modell (Thomale 2001). Alle Operationen wurden zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit von einem Operateur durchgeführt.

## 2.2.1 Controlled Cortical Impact Injury (CCII)

Die Entwicklung des "Controlled Cortical Impact" Modells geht auf Versuche bis das Jahr 1988 zurück. James Lighthall etablierte damals dieses Modell, welches es ermöglicht, durch eine pneumatische Bolzenkonstruktion ein definiertes SHT am exponierten Kortex zu erzeugen. Dabei ist die unabhängige Kontrolle von Kontaktgeschwindigkeit und Deformation durch eine bestimmte verstellbare Eindringtiefe möglich. Er beobachtete, dass das entstandene Trauma den Schäden nach geschlossenem, mittleren bis schweren SHT im klinischen Alltag ähnelte. Dabei traten offensichtliche lokal betonte anatomische Läsionen wie Subduralhämatome, Subarachnoidealblutungen, Kontusionen und auch diffuse axonale Schäden auf (Lighthall, 1988). Das neue Modell ergänzte so andere Modelle wie das zu diesem Zeitpunkt häufig verwendete "Fluid Percussion" Modell. Bei diesem Modell wurde die Injektion von Flüssigkeit in den Schädel zur Erzeugung eines SHT verwandt. Dabei konnten jedoch weniger klar reproduzierbare und unzureichend steuerbare Schädel-Hirn-Traumata Schweregrade von simuliert werden, da das Schädigungsausmaß unter anderem von der individuellen Gehirngeometrie abhängig war und durch die unkontrollierbare Ausbreitung der Druckwelle infolge der Flüssigkeitsinjektion ein diffuseres und schlechter quantifizierbares Trauma entstand (Lighthall et al., 1989).

## 2.2.2 Aufbau des Traumagerätes

Eine schematische Abbildung des Traumagerätes findet sich in Abbildung 1, eine Fotographie der Konstruktion ist in Abbildung 2 dargestellt.



Abb. 1: CCII-Traumagerät. Das Gerät besteht aus Kontusionseinheit, Datenerfassungseinheit und pneumatischer Einheit

Der grobe Aufbau gliedert sich in die Kontusionseinheit, eine pneumatische Einheit und die computerisierte Datenerfassung. Die Kontusionseinheit besteht aus einer Plattform (a), auf dem das Versuchstier (b) gelagert wird. Die Oberfläche der Plattform ist verschiebbar, neigbar und höhenverstellbar. Das Versuchstier wird nach der

Offenlegung der Dura mater positioniert und mittels einer stereotaktischen Halterung (c) an beiden Meati acustici externi (äußeren Gehörgängen) und den Incisivi (Schneidezähnen) immobilisiert. Der Kontusionsschlitten (d = f, g, h und i) ist in einer stählernen Vorrichtung (e) fixiert und kann darin im Winkel zum Kortex verändert eine werden. Ein Druckzylinder (f), Kontusionsstange (g), eine Datentransformationseinheit (h) und ein auswechselbarer Schlagbolzen (i) bilden diesen Kontusionsschlitten. Die Gewinde an Schlagbolzen und Kontusionsstange und eine Gegenmutter zur Fixierung ermöglichen die Einstellung der longitudinalen Position des Bolzens und damit der Eindringtiefe des Schlagbolzens in den Kortex. Dabei entspricht eine Umdrehung um 360° einer Positionsänderung von genau einem Millimeter, was zur Standardisierung des Traumas beiträgt. Die Oberfläche des Schlagbolzens ist konvex, um die Unversehrtheit der Dura mater möglichst zu gewähren. Die Kontusionsstange hat eine Beweglichkeit über 5 cm und wird durch ihren Anschluss an den Druckzylinder bewegt. Innerhalb des Druckzylinders entsteht über die obere Verbindung vom Zylinder zur pneumatischen Konstruktion (j) ein Hochdruck, der die schnelle Bewegung in Richtung Kortex erlaubt. Die untere Verbindung (k), das Niederdrucksystem, bedingt das langsame Heraufziehen der Kontusionsstange. Innerhalb der Gasflasche befindet sich Stickstoff (N<sub>2</sub> PLUS 5.0, N<sub>2</sub> 99.9%; AGA Gas GmbH, Hamburg, BRD), der über einen weiteren Schlauch (I) die pneumatische Kontrolleinheit (m) erreicht. An der Kontrolleinheit können Hoch- und Niederdruck sowie die Kontaktdauer mit der Dura mater festgelegt werden. Das Trauma wird schließlich durch einen Kippschalter (n), der an eine magnetische Steuerung gekoppelt ist, ausgelöst. Die in dieser Arbeit verwendeten Einstellungen des Traumagerätes sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tab	. 2: Einstellungen	des Traumagerätes	für die vorliege	nde Studie	(mm = Millime	ter, ms = M	lillisekunde,
m/s	= Meter pro Seku	nde, psi = pounds pe	er square inch).				

Bolzen-	Kompressions-	Dura-	Bolzengeschwindigkeit	Bolzengeschwindigkeit bei
durchmesser	tiefe	kontaktzeit	bei Auslösung	Rückholbewegung
5 mm	1.5 mm	150 ms	7 m/s ( = 100 psi = 6.89 bar)	2.1 m/s ( = 30 psi = 2.07 bar)

## 2.3 Präparation der Versuchstiere

## 2. 3.1 Narkose und Überwachung

Zunächst wurden die Versuchstiere mit Isofluran (Forene, Abbott GmbH & Co KG, Wiesbaden, BRD) in einem 2:1 N<sub>2</sub>O (Lachgas)/O<sub>2</sub> (Sauerstoff) Gemisch aus einem Narkosegerät (Sulla 808, Dräger, Lübeck, BRD) über eine Inhalationsmaske anästhesiert. Die Einleitung erfolgte in einem verschlossenen, gasdurchströmten Plastikbehälter für ca. 3 Minuten mit 5% Isofluran in 2 L/min in N<sub>2</sub>O und 1 L/min O<sub>2</sub>. Daraufhin wurde das Versuchstier auf dem Operationstisch in Rückenlage positioniert und die Narkose über eine Maske und 3% Isofluran in 2 L/min in N<sub>2</sub>O und 1 L/min O<sub>2</sub> aufrecht erhalten. Im weiteren Verlauf konnte die Narkose auf bis zu 2% Isofluran reduziert werden. Die Spontanatmung und Normoventilation blieben auch während der Narkose erhalten. Außerdem wurde die rektale Temperatur der Versuchstiere über einen Monitor (Hellige Servomed, Freiburg, BRD) gemessen und durch eine elektrische Heizdecke auf  $37^{\circ}$ C  $\pm$  0.5°C gehalten. Dies ist im Hinblick auf sekundäre Schäden nach SHT zu beachten, da eine Hypothermie, eine Hypoxie, aber auch eine durch Hypokapnie bedingte Vasokonstriktion das Ausmaß des Gewebeschadens beeinflussen kann.

Die narkotisierten Tiere wurden gewogen um eine genaue Applikation des Lokalanästhetikums und von exogenem Ubiquitin oder NaCl (Natriumchlorid) 0.9% abhängig vom Gewicht jedes Versuchstieres zu gewährleisten.

Bei den narkotisierten Tieren wurde zusätzlich kurz vor Operationsbeginn noch eine Lokalanästhesie im vorgenommen, um Reaktionen durch chirurgische Stimulation trotz Inhalationsnarkose zu vermeiden und die Tiere möglichst nicht vermeidbaren Schmerzreizen auszusetzen. Das verwendete Lokalanästhetikum Bupivacain hydrochlorid (0.5%; DeltaSelect, Pfullingen, BRD) kam in einer Dosierung von 1 ml/kgKG (ml pro kg Körpergewicht) mit einer Konzentration von 1mg/ml durch subkutane Injektion im Bereich der Leiste und intramuskulär in den Musculus temporalis zum Einsatz.

## 2.3.2 Anlage eines zentralvenösen Katheters

Nach einer kurzen Einwirkzeit der Lokalanästhesie konnte dann durch einen ca. 2.5 cm langen Hautschnitt mit der Präparation der linken Vena femoralis begonnen werden.

Dieser und alle weiteren operativen Schritte erfolgten unter mikroskopischer Sicht (OPMI6-SFC, Carl Zeiss Meditec AG, Jena, BRD). Die Vene wurde inzidiert, mit einem Polyethylenkatheter (PE-50, 0.28 mm ID, 0.61 mm OD, Portex, Hythe, Kent, UK) versehen, und die Lage des Katheters wurde durch Anspülen mit 0.9% NaCl (B. Braun, Melsungen, BRD) kontrolliert. Die Haut wurde wieder mit Nahtmaterial (Prolene 3/0; Ethicon, Norderstedt, BRD) verschlossen und der Katheter damit fixiert. Über den Katheter wurden den Versuchstieren innerhalb von 15 Minuten nach dem SHT Ubiquitin bzw. 0.9% NaCl in der Plazebogruppe injiziert.

## 2.3.3 Kraniale Präparation

In Bauchlage konnten die Versuchstiere nun wieder über die äußeren Gehörgänge in einer stereotaktischen Halterung (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA) fixiert werden. Die Hautinzision konnte nun in der Medianlinie des Kopfes mit einer Länge von ca. 3 cm erfolgen (Abb. 2).



Abb. 2: Hautinzision von 3 cm (links), Freilegung der Schädelnähte und Trepanation eines 7 x 7 mm großen Sechseckes, darunter die unversehrte Dura mater (rechts) (modifiziert nach Thomale 2001).

Die stumpfe Mobilisation der Haut ermöglichte die Resektion des linken Musculus temporalis. Um den Blutverlust zu minimieren, wurde mittels bipolarer Koagulation die bestmögliche Blutstillung angestrebt. Nun konnte die Kalotte eingesehen werden. Links parietotemporal bei der Sutura saggitalis median (Abb. 3a), der Sutura coronalis frontal (Abb. 3b), der Sutura lamboidalis okzipital (Abb. 3c) und dem Arcus zygomaticus temporobasal (Abb. 3d) wurde eine ca. 7 x 7 cm lange osteoklastische Trepanation mit einem kleinen Handbohrer (Minimot 40, Proxxon, Niersbach, BRD) unter mikroskopischer Sicht vorgenommen und unter Schonung der Dura mater ausgelöst.



Abb. 3: Trepanation des Rattenschädels mit Schädelnähten von oben (oben) und der Seite (unten); a = Sutura saggitalis, b = Sutura coronalis, c = Sutura lamboidea, d = Arcus zygomaticus (modifiziert nach Institut II für Anatomie, Klinikum der Universität zu Köln).

## 2.3.4 ICP-Messung

In den 7-Tages-Gruppen wurde exemplarisch der intrakranielle Druck kurz vor dem Trauma, nach dem Trauma, nach Substanzgabe und vor Hirnentnahme gemessen.

Eine intraparenchymatöse Drucksonde (Codman, Johnson & Johnson Professional, Inc., Raynham, MA, USA) wurde durch ein Bohrloch auf der kontralateralen Seite 1 mm frontal der Koronarnaht und 1 mm lateral der Saggitalnaht eingeführt. Um verlässliche Messwerte zu erhalten wurde die Messung wiederholt und möglichst zügig durchgeführt um den ICP vor der vollständigen Druckentlastung über das Bohrloch bestimmen zu können. Die Messungen wurden über den gleichen Monitor wie auch die Körpertemperatur aufgenommen (Hellige Servomed, Freiburg, BRD).

## 2.3.5 Blutgasanalyse

Zur Darstellung des Verlaufes der Blutgase und die Beeinflussung durch Trauma und Substanzgabe wurde in den 7-Tages-Gruppen arterielle Blutgasanalysen (BGAs) durchgeführt. Analog zur Präparation der V. femoralis (siehe hierzu 2.3.2), wurde die Arteria femoralis freipräpariert und ein Polyethylenkatheter (PE-50, 0.28 mm ID, 0.61 mm OD, Portex, Hythe, Kent, UK) eingeführt. Über diesen Zugang konnte vor dem Trauma, nach dem Trauma, nach Substanzgabe und vor der Hirnentnahme arterielles Blut für die BGAs entnommen werden.

## 2.3.6 Trauma

Auf dem Kontusionstisch wurde das Versuchstier wie in 2.2.2 beschrieben in Bauchlage an seinen äußeren Gehörgängen und Schneidezähnen fixiert und weiterhin über eine Maske narkotisiert. Kontusionstisch und Kontusionsschlitten wurden so ausgerichtet, dass sich der Schlagbolzen im 90° Winkel zur Tangente der Konvexität des Kortex befand (Abb. 4). Dann wurde der Kontusionsschlitten manuell maximal elongiert und die Konstruktion wieder so ausgerichtet, dass der Kontusionsschlitten in dieser Position die Dura mater gerade leicht berührt. Das Niederdrucksystem wurde anschließend auf 30 psi (pound-force per square inch) eingestellt, so dass die Kontusionsstange langsam zurückgezogen wurde. In dieser Position konnte dann die Eindringtiefe auf 1.5 mm durch 1.5 Drehungen des Schlagbolzens (= 540°) festgelegt werden. Das Trauma wurde durch den Kippschalter ausgelöst, wobei der Schlagbolzen mit 7 m/s (= 100 psi) auf den Kortex auftraf.



Abb. 4: Koronarer Schnitt durch das Rattenhirn (Bregma -3.3 mm). Auftreffen des Schlagbolzens im rechten Winkel zum Kortex. Dort Entstehung eines direkten Einschlagschadens (schwarz) und weiterer Schädigungszonen (grau) unter anderem durch sekundäre Hirnschäden (Paxinos und Watson, 1996).

Innerhalb der nächsten 15 Minuten erfolgte die Substanzgabe über den intravenösen Katheter (siehe hierzu 2.7).

## 2.3.7 Ossärer und kutaner Verschluss

Unmittelbar vor dem Verschluss der Kraniektomie wurde die Kontusionsstärke makroskopisch und mikroskopisch beurteilt; Stärke der Kontusion, Zustand der Dura mater und Ausmaß des Subduralhämatoms wurden eingeschätzt und dokumentiert. Es folgte der Verschluss der Kalotte durch das zuvor entfernte Knochenstück. Um möglichst realistische ICP-Werte entsprechend einem geschlossenen Schädel-Hirn-Trauma messen zu können, wurde das Knochenstück mit Zahnzement (Harvard Dental GmbH, Berlin, BRD) mit der Kalotte versiegelt. Letztlich konnte die Inzision am Kopf mit einer fortlaufenden Hautnaht verschlossen werden (Prolene 3/0; Ethicon, Norderstedt, BRD). Der Venenkatheter in der Vena femoralis wurde gekürzt und durch eine erhitzte Pinzette verschlossen, so dass der Stumpf unter die Haut versenkt werden konnte. Nach weiteren 3 Minuten bei einem O2-Fluss von 2 L/min über die Maske konnten die Versuchstiere bis zur weiteren Evaluation wieder in ihre Käfige gesetzt werden.

## 2.3.8 Hirnentnahme

Die Tiere der einzelnen Gruppen wurden nach vier Stunden, 24 Stunden, 72 Stunden und sieben Tagen wieder, wie in 2.3.1. beschrieben, in einem Plastikgefäß narkotisiert. Dann wurden die Tiere erneut gewogen.

Bei den Tieren der 7-Tages-Gruppen erfolgten zunächst in Bauchlage auf dem Operationstisch die letzte ICP-Messung und Bestimmung der Blutgase. Es folgte anschließend bei allen Tieren in Rückenlage ein ca. 5 cm großer medianer Bauchschnitt beginnend auf Höhe des Sternums nach distal. Im nächsten Schritt wurden Peritoneum um Pleura eröffnet, so dass die Lungen des Versuchstieres kollabierten und die Atmung sistierte. Zusätzlich wurde die Aorta abdominalis punktiert und die Tiere somit durch Exsanguination geopfert.

Nun konnte die Kopfhaut eröffnet und vom Schädel stumpf abpräpariert werden. Die Kalotte wurde dann großflächig vom Foramen magnum aus mit Hilfe des Bohrers abgelöst. Vor Entnahme des Großhirns mussten das Cerebellum abgesetzt und die Nervi optici, Bulbi olfactorii und weiteren Nervi cranialis durchtrennt werden. Das gewonnene Organ wurde sofort in einer Lösung aus 80% Ethanol fixiert.

#### 2.4 Quantitative reverse Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Während einer PCR wird ein Teil eines DNS-Stranges selektiv amplifiziert. Hierzu werden die DNS (Desoxyribonukleinsäure) mit dem relevanten Abschnitt, eine ausreichende Menge an Oligonukleotid-Primer, die Anfang und Ende des zu amplifizierenden Abschnitts festlegen, eine DNS-Polymerase, die den Abschnitt auch bei hohen Temperaturen replizieren kann, Nukleotide als Bausteine für die neuen DNS-Stränge und magnesiumhaltiger Puffer benötigt (Bruhn et al., 2007). Soll statt eines DNS-Stranges jedoch ein RNS-(Ribonukleinsäure) Strang bzw., wie im vorliegenden Fall, die mRNS (messenger RNS) vervielfältigt werden, muss die RNS durch eine retrovirale reverse Transkriptase (RT) in die doppelsträngige cDNS (copy DNS) umgeschrieben werden. PCR und RT-PCR erfolgen in drei Schritten: Denaturierung bei hohen Temperaturen um 95°C zur Separation der DNS in Einzelstränge, beim Annealing/Abkühlen auf ca. 50°C härten die Einzelstränge aus, die Primer lagern sich an, und in der DNS-Synthese-Phase bei ca. 70°C werden ausgehend von den Primern die elongierten Einzelstränge beim Vorhandensein aller Komponenten durch die DNS-Polymerasen repliziert, so dass wieder doppelsträngige DNS entsteht. Dieser Zyklus wird vielfach (ca. 30x) wiederholt, wodurch dank der spezifischen Primer der Anteil des gewünschten kurzen DNS-Abschnittes im Endprodukt steigt (Dettmer et al., 2005).

Für die RT-PCR wurden nach vier und nach 72 Stunden jeweils acht Versuchstiere pro Gruppe geopfert und die Hirne entnommen wie in 2.3.8 dargestellt. Der frontale Pol inklusive eines Teiles der Kontusion mit kortikalen und subkortikalen Anteilen wurde vom Rest des Großhirns abgetrennt. Davon wurde ein 2 mm dicker Schnitt von ca. 150 mg aus der Kontusion in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Die Gesamt-RNS wurde mit Hilfe des TRIzol Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe, BRD) aus dem Gewebe isoliert. Gewebehomogenisierung, Isopropanol-Prezipitation (Fluka, Schweiz) und Waschungen mit Ethanol absolut (Riedel-de Haën, Seelze, BRD) wurden gemäß den Herstellerempfehlungen durchgeführt. Das durch Zentrifugieren (3K15, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, BRD) gewonnene Pellet wurde dann an der Luft getrocknet, bevor es wieder in Nuklease-freiem Wasser (Ambion, Austin, TX, USA) aufgelöst wurde. Auch nach diesem Schritt konnte die RNS bei -80° C aufbewahrt werden.

Die RNS-Konzentration wurde anschließend photometrisch (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg, BRD) bei einer Wellenlänge von 260 nm für jede Probe bestimmt, und eine Gelelektrophorese mit Agarose diente zur Überprüfung des Reinheitsgrades der Proben. Anhand des Bandenmusters konnten mRNS, Kontamination durch DNS und degradierte RNS unterschieden werden.

Anschließend wurde ein Thermocycler (Eppendorf, Hamburg, BRD) für die cDNS-Synthese verwendet. 2 µg RNS, 1 µg Oligo(dT)15 Primer (Metabion, Martinsried, BRD) und Nuklease-freies Wasser wurden 10 Minuten bei 75° C inkubiert. Danach wurden Reverse-Transkriptase-Puffer (Promega, Mannheim, BRD), Nuklease-freies Wasser, dNTP (Desoxyribonukleosidtriphosphate; Promega, Mannheim, BRD), DNAse (Desoxyribonuklease, 4 U, (Ambion, Austin, TX, USA) und Ribonuklease-Inhibitor (RI, 20 U; Promega, Mannheim, BRD) hinzugefügt und 30 Minuten bei 37° C und weitere 5 Minuten bei 75° C inkubiert. Die DNAse wurde hinzugefügt, um etwaige Kontaminationen mit DNS zu beseitigen. Im nächsten Schritt wurden RT (200 U; Promega, Mannheim, BRD) und RI (40 U) zugeführt und der Mix bei 42° C für 60 Minuten inkubiert, gefolgt von einer Erhitzung auf 94° C zur Inaktivierung der RT. Als Kontrolle wurden gleichzeitig Lösungen ohne RT hergestellt.

Für die eigentliche RT-PCR verwendeten wir Primermixe für IL-1 $\beta$ , IL-1ra IL-6, IL-10 und TNF- $\alpha$  (Metabion, Martinsried, BRD). In 96-Lochplatten (ABgene, Epsom, Großbritannien) mixten wir vorsichtig je 2 µl der gewonnen cDNS, 6.25 µl eines fertigen qPCR Mastermixes (Eurogentec S.A., Seraing, Belgien) bestehend aus DNS-Polymerase, dNTPs und einem speziellen PCR-Puffer, 3 µl des Primermixes und 0.5 µl Reporterfluoreszenz (Metabion, Martinsried, BRD). Aufgefüllt wurde die Mischung bis auf 13 µl mit Nuklease-freiem Wasser. Auf jeder präparierten Platte wurde stets eine Serie mit  $\beta$ -Actin (Metabion, Martinsried, BRD) als Referenzmolekül für alle Replikationen angelegt. Die 96-Loch Platten wurden in den iCycler (Bio-Rad, CA, USA) zur Replikation nach unserem Standardprotokoll gelegt: 1 x 2 Minuten bei 50°C, 1 x 10 Minuten bei 95°C, 40 x 15 Sekunden bei 95° C und 1 Minute bei 60°C.

Nach der RT-PCR wurden die Zytokinlevel relativ zu den  $\beta$ -Actin-Leveln für jede Probe berechnet. Pro Zytokin und Gewebeprobe erhielten wir je zwei Konzentrationswerte (ct1 und ct2) durch die quantitative RT-PCR. Aus diesen Werten bildeten wir den Mittelwert (ct average) und subtrahierten davon den Mittelwert von  $\beta$ -Actin: ct average (Zytokin) – ct average ( $\beta$ -Actin) =  $\Delta$ ct. Die relativen mRNS-Level ergaben sich dann aus 2<sup>-,ct</sup>.

## 2.5 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie (IHC) ist eine histopathologische Methode, um Makromoleküle wie Proteine in Zellen und Geweben für die mikroskopische Betrachtung sichtbar zu machen. Bei der in dieser Arbeit verwandten indirekten Methode wird ein erster spezifischer Antikörper in einem zweiten Schritt durch einen weiteren Antikörper gegen die Immunglobuline des Primärantikörpers gebunden. Der Sekundärantikörper ist mit einem Detektormolekül, wie hier Biotin, versehen, das durch weitere Substrate sichtbar gemacht wird (Büttner und Thomas, 2003).

Für die IHC wurden je acht Versuchstiere pro Gruppe nach 24 Stunden und sieben Tagen wie in 2.3.8 beschrieben geopfert und die Gehirne in Ethanol 80% aufbewahrt. Der okzipitale Anteil des Großhirns wurde dann mit Hilfe einer Matrix für Rattenhirne (Brain Blocker, AgnTho's AB, Lidingö, Sweden) durch einen koronaren Schnitt durch das Zentrum der Kontusion vom frontalen Pol abgetrennt.

## 2.5.1 Herstellung und Prozessierung der 24-Stunden-Gewebeproben

Die Gewebeproben der 24-Stunden-Gruppen wurden anschließend sofort in einem gewebeschonenden Medium (Jung, Leica Microsystems Nussloch GmbH, BRD) mit Hilfe von flüssigem Stickstoff (Air Liquide, Düsseldorf, BRD) zu Kryo-Proben schockgefroren und bei -80°C bis zur weiteren Aufbereitung gelagert. Koronare Schnitte wurden mit einer Stärke von 8 µm bei Bregma -1.8-(-5.8) aus dem Zentrum der Kontusion mit einem Kryostate (HM 500 OM, Microm, Walldorf, BRD) herausgeschnitten und auf Glasobjektträger (SuperFrostPlus, Menzel-Gläser, Braunschweig, BRD) aufgebracht. Die Objektträger wurden zuvor mit (3-Aminopropyl)triethoxysilane (APTES; Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD) überzogen, um eine bessere Haftung der Gewebeproben zu gewährleisten. Die folgende Fixierung erfolgte für 10 Minuten in Aceton (J.T. Baker, Deventer, Niederlande) bei -20° C. Nach einer Trocknungszeit von weiteren 60 Minuten bei Raumtemperatur (RT) konnten die Proben bis zur weiteren Verarbeitung bei -20° C gelagert werden. Zur Weiterbearbeitung trockneten die Proben 20 Minuten bei RT und wurden dann gemeinsam mit den 7-Tage-Proben bearbeitet.
# 2.5.2 Herstellung und Prozessierung der 7-Tage-Gewebeproben

Die Proben der 7-Tages-Gruppen wurden in 96%igem Ethanol (Herbeta, Arzneimittel, Berlin) fixiert und in Paraffin (Sherwood Medical Co., St. Louis, MO, USA) eingebettet. Wie für die Kryo-Proben beschrieben wurden aus dem Zentrum der Kontusion in den Paraffinblöcken 3-4 µm starke koronare Schnitte mit einem Schlittenmikrotom (HM 355 Cold Cut, Microm, Walldorf, BRD) hergestellt und auf die vorbehandelten Objektträger aufgebracht. Die Proben mussten anschließend in einem Ofen (Heraeus, Hanau, BRD) über 24 Stunden bei 37°C getrocknet werden. Im Weiteren wurden die Proben 2 x 20 Minuten in Xylol (Merck KGaA, Darmstadt, BRD) entparaffiniert und danach in einer absteigenden Ethanolverdünnungsreihe für je 5 Minuten rehydriert (Ethanol 100%, 95% und 75%; Herbeta, Berlin, BRD). Die Weiterbearbeitung erfolgte zusammen mit den Kryo-Proben.

# 2.5.3 Färbung der Gewebeproben

Alle Gewebeproben wurden in TBS-Tween (TBST), einer Lösung aus Tris gepuffertem Salz (tris buffered saline = TBS), bestehend aus 50 mM Tris-HCI (= Tris-Chlorwasserstoff; Trizma, Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD) Puffer mit pH 7.6 in 0.9% NaCl und 1mL 0.1% igem Tween (Merck KGaA, Darmstadt, BRD), gewaschen. Jede Probe wurde mit einer Proteinblockierungslösung aus TBST, 1%igem bovinen Serumalbumin (BSA; Fluka, Schweiz) und 5%igem fetalen bovinen Serum (FBS; Cambrex, East Rutherford, NJ, USA) bedeckt, um unspezifische Bindungen von Immunglobulinen (Ig) zu vermeiden. Nun wurden die primären Antikörper (AK) in TBS mit 20% Blockierungslösung verdünnt. Es wurden in dieser Arbeit fünf verschiedene AK verwendet: der ED1-AK ist ein monoklonaler AK der Klasse IgG1 aus der Maus (AbD Serotec, Düsseldorf, BRD), der an das dem CD68- (Cluster of Differentiation 68) Antigen (AG) des Menschen entsprechende ED1-AG reaktiver PMBC wie Makrophagen und auf Mikroglia von Ratten bindet; der OX-42-AK ist ein monoklonaler AK der Klasse IgG2a aus der Maus (AbD Serotec, Düsseldorf, BRD), der an das dem CD11b-AG entsprechende AG aktivierter Mikroglia der Ratte bindet; der HIS48-AK ist ein monoklonaler IgM-AK der Maus (AbD Serotec, Düsseldorf, BRD) und bindet an Granulozyten; der MPO-AK ist ein polyklonaler IgG-AK des Kaninchens (DakoCytomation, Glostrup, DenmarkDako), der an die Myeloperoxidase neutrophiler Granulozyten bindet; der GFAP-AK der Klasse IgG ist ein polyklonaler AK des

Kaninchens (DakoCytomation, Glostrup, DenmarkDako), der an GFAP bindet, was hauptsächlich in Astrozyten vorkommt. Die AK gegen ED1, OX-42 und MPO können für paraffinierte und gefrorene Proben verwendet werden; der HIS48-AK arbeitet nur auf gefrorenen Gewebeproben. Die GFAP-Färbung kann auch an gefrorenen und paraffinierten Gewebeproben durchgeführt werden. In dieser Arbeit wurde allerdings von einer Verwendung für die gefrorenen Proben der 24-Stunden-Gruppen abgesehen, da uns aus vorherigen Versuchsreihen bekannt war, dass die Anfärbung GFAPpositiver aktivierter Astrozyten erst zu späteren Zeitpunkten ausreichend gelingt. Für die Verdünnungen der jeweiligen primären AK wird auf Tabelle 3 verwiesen. Die verdünnten AK wurden anschließend über Nacht bei 4°C auf den Gewebeproben inkubiert. Als sekundäre AK wurden biotinylierte AK benutzt. Zur Markierung der monoklonalen Maus-AK wurde ein Pferde-Anti-Maus-AK (Vector Laboratories) verwendet, gegen die polyklonalen Kaninchen-AK kam ein Ziegen-Anti-Kaninchen-AK (DakoCytomation, Glostrup, DenmarkDako) zum Einsatz. Die Verdünnungen erfolgten in TBS mit 10% Blockierungslösung und finden sich in Tabelle 3.

	ED1	HIS48	OX-42	МРО	GFAP	
Verdünnung 1. AK	1:100	1:10	1:75	1:500	1:250	
	biotinylierter Pferde-Anti-Maus-			biotinylierter Ziegen-Anti-		
		Antikörpe	r	Kaninchen-Antikörper		
Verdünnung 2. AK	1:100	1:100	1:75	1:250	1:250	

Tab. 3: Verdünnung der primären und sekundären Antikörper für die Immunhistochemie.

Nach 1 Stunde Inkubationszeit bei RT wurden die sekundären AK mit TBST abgewaschen. Es folgte die Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität der Gewebeproben durch 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol (Merck, Darmstadt, BRD) für die Kryo-Proben und durch 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol für die Paraffin-Proben für 20 Minuten bei RT. Dann wurden die Proben wieder gewaschen und mit dem AB-Komplex/HRP (Avidin-Biotin-Peroxidase Komplex/horseradish peroxidase = konjugiert an Meerettich Peroxidase; DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) für 30 Minuten bei RT inkubiert und danach wieder gewaschen. Die Gewebeproben wurden 5 Minuten mit AEC-(3-Amino-9-Ethylcarbazol-) Substrat-Chromogen (DakoCytomation) bei RT bedeckt und dann in Aqua destillata (Braun, Melsungen, BRD) gewaschen. Zur Kontrastfärbung wurden die Proben mit Hämatoxylin nach Mayer bedeckt (Fluka, Schweiz), dann erst mit TBS und danach mit Leitungswasser gewaschen und schließlich mit Aquatex (Merck, Darmstadt, BRD) und gläsernen Deckplättchen (Menzel-Gläser, Braunschweig, BRD) verklebt. Als Positivkontrolle zur Sicherstellung eines erfolgreichen Färbeprozesses dienten Gewebeproben aus der Rattenmmilz, die physiologisch immer sehr viele Immunzellen enthält.

# 2.5.4 Quantifizierung positiv gefärbter Zellen

Positiv gefärbte Zellen wurden mit Hilfe eines Mikroskops (BX 40, Olympus, Hamburg, BRD) bei 200-400x Vergrößerungen in definierten Bereichen des Rattenhirns manuell ausgezählt: in der Kontusion, im perikontusionellen Kortex (PC), im ipsilateralen Hippokampus, im ipsilateralen Alveus hippocampus, und im kontralateralen Kortex, Hippokampus und Alveus (Abb. 5 A-G). Die Ergebnisse wurden in Zellen pro mm<sup>2</sup> (Zellen/mm<sup>2</sup>) ausgedrückt. Zusätzlich wurden Fotographien (C-404020 Zoom Lens, Olympus, Hamburg, BRD) beider Hemisphären in verschiedenen Vergrößerungen angefertigt.



Abb. 5: Bestimmung positiver Zellen nach immunhistochemischer Färbung. A = Kontusion, B = perikontusioneller Kortex, C = ipsilateraler Hippokampus, D = ipsilateraler Alveus hippocampus, E = kontralateraler Kortex, F = kontralateraler Hippokampus, G = kontralateraler Alveus hippocampus (modifiziert nach Paxinos und Watson, 1996).

# 2.6 TdT-mediated dUTP-biotin nick end labelling (TUNEL)

Die Methode des TdT-mediated dUTP-biotin nick end labelling ist hilfreich, um die DNS-Fragmentation, als indirekten Nachweis der Apoptose, darzustellen. Die TUNEL-Reaktion beruht auf drei grundlegenden Schritten: (1) eine Proteinase kommt an der Zellmembran zum Einsatz, um das Angebot an Substrat und terminaler Nukleotidyltransferase (TdT) zu erhöhen, (2) das TdT katalysiert die Markierung der DNS-Fragmente mit Biotin-16-dUTP, (3) dieser Marker wird durch eine Peroxidasereaktion detektiert (Turksen, 2009).

Für die Bestimmung der Anzahl apoptotischer Zellen wurden 18 Versuchstiere nach 72 Stunden, wie in 2.3.8 beschrieben, geopfert und das Großhirn entnommen. Die Hirne wurden, wie schon in 2.5.2 beschrieben fixiert, geschnitten, in Paraffin eingebettet und durch koronare Schnitte von 8 µm im Zentrum der Kontusion auf Objektträger gebracht. Nun wurde das Gewebe, wie in 2.5.2 dargelegt, entparaffiniert, rehydriert; dann wurde wie in 2.5.3 die endogene Peroxidaseaktivität geblockt. Die spezifischen Lösungen für die TUNEL-Färbung (Enzymlösung, Markierungslösung, Konverter-POD) entstammten dem "In Situ Cell Death Detection Kit" (Roche, Mannheim, BRD).

Anschließend wurden die Proben in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS = phosphate buffered saline) (Biochrome, Berlin, BRD) gewaschen. Es folgte die Permeabilisation in 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD) und 0.1% Natriumzitrat (Merck KGaA, Darmstadt, BRD) in Aqua destillata (Braun, Melsungen, BRD) für acht Minuten bei 4° C. Nach einer weiteren Waschung in PBS wurde eine Lösung aus Tris-HCl 0.1 M mit pH 7.5, 3% BSA und 20% FBS zur Proteinblockierung verwendet. Der TUNEL Reaktionsmix aus Enzymlösung und Markierungslösung im Verhältnis 1:100 wurde noch weiter mit dem TUNEL Verdünnungspuffer (Roche, Mannheim, BRD) 1:25 verdünnt und dann 60 Minuten bei RT auf den Gewebeproben inkubiert. Gewebeproben für die Negativkontrollen erhielten nur die Markierungslösung während der Inkubation. Die Proben wurden wieder gewaschen und dann 30 Minuten bei RT mit Konverter-POD (Peroxidase) bedeckt. Nach einer erneuten Waschung in PBS kamen wie in 2.5.3 das AEC-Substrat-Chromogen, Hämatoxilin nach Mayer und Aquatex zur Fertigstellung der Färbung zum Einsatz.

Auch die Auszählung und Fotographie positiv gefärbter Zellen erfolgte wie für die IHC dargestellt.

# 2.7 Therapiestudie mit exogenem Ubiquitin

# 2.7.1 Substanz und Plazebo

Für exogenes Ubiquitin konnte gezeigt werden, dass es die BHS zu überqueren vermag. (Earle et al., 2005). Eine exogene, intravenöse Gabe wurde daher bereits in verschiedenen Studien praktiziert. Protektive Eigenschaften von Ubiquitin wurden nach schwerem Trauma (Majetschak et al., 2004a), letaler Endotoxämie (Majetschak et al., 2004b), nach Transplantation (Earle et al., 2006) und nach SHT (Earle et al., 2005; Griebenow et al., 2007) nachgewiesen. In diesen Studien wurde Ubiquitin überwiegend in Dosen von 1.3 oder 1.5 mg/kg Körpergewicht an Schweinen und Ratten getestet. Diese Dosis wurde ursprünglich gewählt, um zumindest fünffach erhöhte Serumlevel 180 Minuten nach intravenöser Gabe zu erreichen. Schwerwiegende unerwünschte Wirkungen wurden in diesen Studien nicht beobachtet, die Dosis reichte jedoch aus, um den jeweiligen protektiven Effekt zu erzielen. Zusätzlich ist bekannt, dass nach CCII ohnehin ein vierfacher Anstieg von Ubiquitin im CSF zu verzeichnen ist (Majetschak et al., 2005). Für die vorliegende Arbeit wurden ebenfalls 1.5 mg/kg Körpergewicht Ubiquitin im Bolus eingesetzt, um eine deutliche Anhebung der endogenen Ubiquitinproduktion nach CCII zu erzielen.

Das erworbene Ubiquitin (Boston Biochem, Cambridge, MA) wurde bei -20° C gelagert. Es wurde nur für die Versuche am Operationstag entnommen, mit 0.9% NaCl (Braun AG, Melsungen, BRD) verdünnt und auf Eis bis zur Injektion gelagert.

Als Plazebo wurde das gleiche Volumen an 0.9% NaCl verwendet, was ein Tier mit dem gleichen Körpergewicht in der Verumgruppe erhalten hätte.

# 2.7.2 Versuchsdurchführung

Die Versuche wurden an 82 Sprague-Dawley Ratten wie in 2.3 aufgeführt in Inhalationsnarkose durchgeführt. Innerhalb von 15 Minuten nach Applikation des Traumas erfolgte die Ubiqutin- bzw. Plazebogabe im Bolus intravenös über die rechte Vena femoralis. Die Einteilung der Versuchstiere für die in 2.4-2.6 erläuterten Methoden ist in Tabelle 4 dargestellt.

	IHC		TUNEL	RT-	PCR	
	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5	
Ubiquitin a	24 h (n = 8)	7 Tage (n = 8)	72 h (n = 9)	4 h (n = 8)	72 h (n = 8)	=∑ 41
Plazebo b	24 h (n = 8)	7 Tage (n = 8)	72 h (n = 9)	4 h (n = 8)	72 h (n = 8)	=∑ 41
	= <u>∑</u> 32		= ∑ 18	=∑ 32		= ∑ 82

Tab. 4: Verteilung der Versuchstiere. Die Tiere (n = 82) wurden auf zehn verschiedene Gruppe nach Methode und Zeitraum (Gruppe 1a-5b; a = Ubiquitin, b = Plazebo) aufgeteilt.

Körpertemperatur und Atmung wurden überwacht und im Normbereich gehalten. Nach Ausleitung der Narkose wurden die Tiere mit 100% Sauerstoff nachoxygeniert und anschleißend in den Käfig zurückgesetzt. Ein vollständiges Schema der Versuchsdurchführung kann Abbildung 6 entnommen werden.



Abb. 6: Zeitlicher Ablauf der Versuchsdurchführung. a = Ubiquitin, b = Plazebo, Gruppe 1 = IHC nach 24 Stunden, Gruppe 2 IHC nach 7 Tagen, Gruppe 3 = TUNEL nach 72 Stunden, Gruppe 4 = RT-PCR nach 4 Stunden , Gruppe 5 = RT-PCR nach 72 Stunden.

Bei allen Tiere wurde der Thorax eröffnet und die Tiere zusätzlich via Aorta abdominalis entblutet. Dann folgte die Hirnentnahme. Bei 32 Tieren (Gruppe 1a, 1b, 2a und 2b) wurden IHCs für fünf Antikörper (ED1, HIS48, OX-42, MPO, GFAP) nach 24 Stunden und sieben Tagen durchgeführt. Bei weiteren 32 Tieren (Gruppe 4a, 4b, 5a, und 5b) erfolgte die Quantifizierung der Zytokin-mRNS (IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ ) durch RT-PCR nach vier Stunden und 72 Stunden. TUNEL wurde bei 18 Tieren (Gruppe 3a und 3b) nach 72 Stunden durchgeführt. Die Versuchstiere für die drei Methoden gliedern sich für jeden Zeitpunkt in Verum-(a) und Plazebo-(b)Gruppe auf (Tab. 4, Abb. 6).

## 2.8 Statistische Methoden

Die statistischen Berechnungen, die den Graphen und Tabellen zugrunde liegen, wurden mit GraphPad PRISM 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, USA) für Windows XP durchgeführt. Die Daten wurden als arithmetisches Mittel ± Standardabweichung (SD = standard deviation) angegeben. Ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5% wurde von der Signifikanz der Ergebnisse ausgegangen. Das Signifikanzniveau wurde bei Vergleichen eines Merkmals zu mehreren Zeitpunkten durch die Bonferroni-Korrektur angepasst und entsprechend angegeben.

Die erhobenen Rohdaten wurden vor Auswahl des statistischen Tests zunächst auf Normalverteilung geprüft. Ein nichtparametrischer Test (U-Test; Mann-Whitney) kam zum Einsatz, um zwei Gruppen einmalig bezüglich eines Parameters zu vergleichen. Die einseitige Varianzanalyse für wiederholte Messungen (ANOVA; One Way Repeated Measures Analysis of Variance) wurde kombiniert mit dem Post-Hoc-Test nach Turkey zum Vergleich aller Spalten (ICP, pH, pCO<sub>2</sub>, base excess = BE, Hämoglobin = Hb). Die Testverfahren sind an entsprechender Stelle angegeben. 3

# ERGEBNISSE

# 3.1 Erhobene Daten, Messwerte und Beobachtungen

Die Protokolle über Narkosedauern, Injektionszeitpunkte und Gewichtsverluste der Versuchstiere in den einzelnen Gruppen während der Operation und Hirnentnahme sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Die Narkosedauer bis zur Applikation des Traumas betrug für die 4-Stunden-Gruppen  $43 \pm 4$  min in der Ubiquitingruppe und  $37 \pm 4$  min in der Plazebogruppe. Die Dauer bis zur Injektion von Ubiquitin bzw. Plazebo lag in diesen Gruppen bei  $6 \pm 2$  min bzw.  $4 \pm 2$  min. Die gesamte Narkosedauer betrug  $66 \pm 16$  min in der 4-Stunden-Ubiquitingruppe und  $55 \pm 3$  min in der Plazebogruppe. Es kam über den Versuchszeitraum von vier Stunden zu einem Gewichtsverlust von  $-11 \pm 3.5$  g in der Ubiquitin- und  $-7.5 \pm 3.4$  g in der Plazebogruppe. Die Narkosedauer bis zum Zeitpunkt der Hirnentnahme nach vier Stunden lag bei  $19 \pm 4$  und  $19 \pm 6$  min.

In den 24-Stundengruppen wurden die Tiere bis zur Applikation des Traumas 46  $\pm$  4 min in der Ubiquitingruppe und 51  $\pm$  8 min in der Plazebogruppe narkotisiert. Bis zur Injektion von Ubiquitin vergingen in dieser Gruppe 6  $\pm$  1 min und von Plazebo 3  $\pm$  1 min. Die Gesamtdauer der Narkose belief sich auf 68  $\pm$  9 min in der Ubiquitingruppe und 60  $\pm$  4 min in der Plazebogruppe. Innerhalb von 24 Stunden kam es in der Ubiquitingruppe zu einem Gewichtsverlust von –18  $\pm$  8 g und –17  $\pm$  13 g in der Plazebogruppe. Vor der Hirnentnahme wurden die Tiere erneut für 16  $\pm$  2 min bzw. 14  $\pm$  1 min narkotisiert.

Die Tiere der 3-Tages-Gruppen erhielten initial eine Narkose mit einer Dauer von 54  $\pm$  17 min in der Ubiquitingruppe und 51  $\pm$  24 min in der Plazebogruppe vor der Traumatisierung. Für diese Gruppen wurden 8  $\pm$  1 min und 5  $\pm$  4 min bis zur Injektion von Ubiquitin bzw. Plazebo benötigt. Insgesamt erhielten die Ubiquitin-Tiere die Narkose über 73  $\pm$  18 min und die Plazebo-Tiere über 68  $\pm$  25 min. Nach drei Tagen wurde ein um -15  $\pm$  7 g geringeres Gewicht in der Ubiquitingruppe und um -18  $\pm$  5 g in der Plazebogruppe registriert. Vor der Hirnentnahme wurden die Tiere erneut narkotisiert über 27  $\pm$  4 min in der Ubiquitingruppe und 29  $\pm$  6 min in der Plazebogruppe.

Für die 7-Tagesgruppen betrug die Narkosedauer bis zur Applikation des Traumas 71  $\pm$  4 min in der Ubiquitingruppe und 70  $\pm$  9 min in der Plazebogruppe. Die Dauer bis zur

Injektion von Ubiquitin bzw. Plazebo lag in diesen Gruppen bei 10  $\pm$  2 min bzw. 9  $\pm$  3 min. Die gesamte Narkosedauer betrug 102  $\pm$  13 min in der 7-Tages-Ubiquitingruppe und 100  $\pm$  9 min in der Plazebogruppe. Es kam über den Versuchszeitraum von sieben Tagen zu einem Gewichtsverlust von  $-22 \pm 19$  g in der Ubiquitingruppe und  $-16 \pm 10$  g in der Plazebogruppe. Die Narkosedauer bis zum Zeitpunkt der Hirnentnahme nach sieben Tagen lag bei 32  $\pm$  4 und 31 $\pm$  6 min. Der ICP vor Hirnentnahme betrug 9  $\pm$  2 in der Ubiquitin- und 8  $\pm$  1 in der Plazebogruppe.

Tab. 5: Erhobene Daten während Operation und Hirnentnahme. Kein statistisch signifikanter Unterschied des Gewichtsverlusts zwischen den Gruppen.

	Narkosedauer bis zum Trauma (min)	Dauer bis zur Injektion (min)	Narkosedauer gesamt (min)	Gewichts- verlust (g)	Narkosedauer bis Hirnentnahme (min)
Ubiquitin 4 h	43 ± 4	6 ± 2	66 ± 16	-11 ± 3.5	19 ± 4
Plazebo 4 h	37 ± 4	4 ± 2	55 ± 3	-7.5 ± 3.4	19 ± 6
Ubiquitin 24 h	46 ± 4	6 ± 1	68 ± 9	-18 ± 8	16 ± 2
Plazebo 24 h	51 ± 8	3 ± 1	60 ± 4	-17 ± 13	14 ± 1
Ubiquitin 3 d	54 ± 17	8 ± 1	73 ± 18	-15 ± 7	27 ± 4
Plazebo 3 d	51 ± 24	5 ± 4	68 ± 25	-18 ± 5	29 ± 6
Ubiquitin 7 d	71 ± 12	10 ± 2	102 ± 13	-22 ± 19	32 ± 4
Plazebo 7d	70 ± 9	9 ± 3	100 ± 9	-16 ± 10	31 ± 6

Tabelle 6 gibt die Verläufe von ICP, Blutgasanalyse und Hämoglobinwert in den 7 Tagesgruppen wieder.

Vor dem Trauma betrug der ICP in der Ubiquitingruppe 7.3  $\pm$  1.1 mmHG. Nach dem Trauma lag er bei 9.6  $\pm$  3.7 mmHG, nach Substanzgabe bei 7.0  $\pm$  1.4 mmHg und vor Hirnentnahme bei 9.0  $\pm$  2.1 mmHg. In der Plazebogruppe stieg der ICP von 7.2  $\pm$  1.6 mmHg vor dem Trauma leicht an auf 7.6  $\pm$  1.5 mmHg nach dem Trauma. Nach Substanzgabe lag er bei 6.8  $\pm$  2.3 mmHg und vor Hirnentnahme bei 8.4  $\pm$  1.4 mmHg.

Die Entwicklung des pH-Wertes began bei 7.43  $\pm$  0.04 vor dem Trauma und lief über 7.41  $\pm$  0.05 nach dem Trauma, 7.41  $\pm$  0.04 nach Substanzgabe und 7.49  $\pm$  0.02 vor Hirnentnahme. In der Plazebogruppe lag der pH-Wert zunächst bei 7.44  $\pm$  0.02 und fiel nach dem Trauma auf 7.42  $\pm$  0.02 sowie 7.41  $\pm$  0.03 nach Substanzgabe. Vor Hirnentnahme lag der pH bei 7.46  $\pm$  0.06.

In der Ubiquitingruppe wurde der pCO<sub>2</sub> auf 38.5  $\pm$  3.1 mmHg bestimmt. Nach dem Trauma lag er bei 39.3  $\pm$  4.9 mmHg, nach Substanzgabe bei 39.9  $\pm$  4.2 mmHg und vor Hirnentnahme bei 36.2  $\pm$  2.2 mmHg. Der Ausgangs- *pCO*<sub>2</sub> der Plazebogruppe betrug

 $39.2 \pm 3.2$  mmHg vor dem Trauma,  $40.6 \pm 2.4$  mmHg nach dem Trauma,  $39.3 \pm 4.6$  mmHg und vor Hirnentnahme  $37.5 \pm 5.2$  mmHg.

Der pO<sub>2</sub> fiel in der Ubiquitingruppe von zunächst 160.5 ± 18.8 mmHg auf 155.8 ± 22.9 mmHg nach dem Trauma. Nach Substanzgabe lag der pO<sub>2</sub> noch bei 134.1 ± 25.1 und vor Hirnentnahme bei 150.7 ± 9.1 mmHg. In der Plazebogruppe betrug der Ausgangs -  $pO_2$  144.0 ± 12.8 mmHg. Nach dem Trauma lag er bei 154.9 ± 20.7 mmHg, nach Substanzgabe 143.3 ± 25.7 mmHg und vor Hirnentnahme bei 150.6 ± 17.5 mmHg.

Vor dem Trauma ergab die Messung des Base-Excess in der Ubiquitingruppe 1.3  $\pm$  1.62 mmol/l. Nach dem Trauma lag er bei 0.22  $\pm$  1.28 mmol/l, nach Substanzgabe bei 0.87  $\pm$  2.21 mmol/l und vor Hirnentnahme bei 3.93  $\pm$  1.44 mmol/l. In der Plazebogruppe betrug der Ausgangswert 2.16  $\pm$  1.0 mmol/l. Nach dem Trauma sank er leicht auf 1.34  $\pm$  0.87 mmol/l und nach Substanzgabe auf 0.33  $\pm$  1.14 mmol/l. Vor der Hirnentnahme betrug der Base-Excess 2.78  $\pm$  2.1 mmol/l

Vor dem Trauma fand sich ein Hämoglobinwert (Hb) von  $13.0 \pm 1.7$  g/dl in er Ubiquitingruppe. Nach dem Trauma lag der Hb bei  $12.3 \pm 2.0$  g/dl, nach Substanzgabe bei  $12.0 \pm 1.8$  g/dl und vor Hirnentnahme bei  $12.8 \pm 1.4$  g/dl. In der Plazebogruppe lag der Ausgangs-Hb bei  $13.3 \pm 0.6$  g/dl. Nach dem Trauma betrug der Hb  $12.8 \pm 0.8$  g/dl. Nach Substanzgabe lag der Hb noch bei  $12.2 \pm 0.7$  g/dl und war damit gegenüber dem Ausgangswert vor dem Trauma hoch signifikant verringert (p < 0.001) und verglichen mit dem Wert nach dem Trauma signifikant geringer (p < 0.05). Vor Hirnentnahme betrug der Hb  $12.2 \pm 0.9$  g/dl und war somit hoch signifikant verringert gegenüber dem Ausgangswert (p < 0.01). Tab. 6: Physiologische Parameter der BGAs und Ergebnisse der ICP-Messung der 7-Tages-Gruppen mit signifikantem Hb-Abfall in der Plazebogruppe (bT = vor dem Trauma, aT = nach dem Trauma, aS = nach Substanzgabe, bHE = vor Hirnentnahme,  $pCO_2 = CO_2$ -Partialdruck,  $pO_2$  = Sauerstoffpartialdruck, BE = base Excess = Basenüberschuss; ANOVA One Way Repeated Measures Analysis of Variance; \*\*\* p < 0.001, \*\* p < 0.01, \* p < 0.05).

	Ubiquitin						Plazebo					
	ICP mmHg	рН	pCO₂ mmHg	pO <sub>2</sub> mmHg	BE mmol/l	Hb g/dl	ICP mmHg	рН	pCO₂ mmHg	pO₂ mmHg	BE mmol/l	Hb g/dl
bT	7.3 ±	7.43 ±	38.5 ±	160.5	1.3 ±	13.0 ±	7.2 ±	7.44 ±	39.2 ±	144.0 ±	2.16 ±	13.3 ±
	1.1	0.04	3.1	± 18.8	1.62	1.7	1.6	0.02	3.2	12.8	1.0	0.6***/**
aT	9.6 ±	7.41 ±	39.3 ±	155.8	0.22 ±	12.3 ±	7.6 ±	7.42 ±	40.6 ±	154.9 ±	1.34 ±	12.8 ±
	3.7	0.05	4.9	± 22.9	1.28	2.0	1.5	0.02	2.4	20.7	0.87	0.8 *
aS	7.0 ±	7.41 ±	39.9 ±	134.1	0.87 ±	12.0 ±	6.8 ±	7.41 ±	39.3 ±	143.3 ±	0.33 ±	12.1 ±
	1.4	0.04	4.2	± 25.1	2.21	1.8	2.3	0.03	4.6	25.7	1.14	0.7 ***/*
bHE	9.0 ± 2.1	7.49 ± 0.02	36.2 ± 2,2	150.7 ± 9.1	3.93 ± 1.44	12.8 ± 1.4	8.4 ± 1.4	7.46 ± 0.06	37.5 ± 5.2	150.6 ± 17.5	2.78 ± 2.1	12.2 ± 0.9 **

## 3.1.1 Tiergewichte

Präoperativ betrug das Gewicht der Ratten in der Verumgruppen im Mittel  $353 \pm 22$  g und in der Plazebogruppe  $354 \pm 18$  g und ist somit in beiden Gruppen vergleichbar. Der Gewichtsverlust aller Tiere unterschied sich nicht signifikant zwischen den Verum- und Plazebotieren (-10 ± 18 g in den Ubiquitingruppen vs. -11 ± 14 g in den Plazebogruppen). Betrachtet man die Gewichtsverluste der Tiere der einzelnen Gruppen, so zeigte sich auch hier kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

## 3.1.2 ICP-Messung

Die ICP-Werte befanden sich zu allen Messzeitpunkten im physiologischen Bereich, von  $6.8 \pm 2.3$  bis  $9.6 \pm 3.7$  mmHg.

Im Verlauf bewegte sich der ICP in der Ubiquitingruppe zwischen 7 und 9.6 mmHg und in der Plazebogruppe zwischen 6.8 und 8.4 mmHg. Die leichten ICP-Anstiege nach dem Trauma von  $7.3 \pm 1.1$  mmHg auf  $9.6 \pm 3.7$  mmHg in der Ubiquitingruppe und von

 $7.2 \pm 1.6$  mmHg auf  $7.6 \pm 1.5$  mmHg in der Plazebogruppe und vor Hirnentnahme auf  $9.0 \pm 2.1$  mmHg bzw.  $8.4 \pm 1.4$  mmHg (Tab. 6, ICP) waren nicht signifikant und es fanden sich auch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

#### 3.1.3 pH-Wert, Basenüberschuss, Hämoglobingehalt, pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub>

Die Werte der arteriellen BGA blieben zu allen Untersuchungszeitpunkten im physiologischen Bereich. Außerdem bestand zwischen den Ubiquitin- und Plazebogruppen zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied in pH-Wert, pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub>, Basenüberschuss oder Hämoglobingehalt.

Der Hämoglobinwert war in der Plazebogruppe vom Ausgangswert vor dem Trauma hoch signifikant verringert nach Substanzgabe (p < 0.001; Abb. 7) und hoch signifikant verringert verglichen mit dem Wert vor der Hirnentnahme (p < 0.005; Abb. 7). Nach Substanzgabe war der Hb-Wert signifikant geringer als nach dem Trauma (p < 0.05; Abb. 7). In der Ubiquitingruppe unterschied sich der Hb-Wert nicht signifikant zu den verschiedenen Messzeitpunkten, der Verlauf der Hb-Werte zeigte jedoch das gleiche Muster wie in der Plazebogruppe.



Abb. 7: Hb-Verlauf in den 7-Tages-Gruppen mit signifikantem Hb-Abfall in der Plazebogruppe (bT = vor Trauma, aS = nach Substanzgabe, aT = nach dem Trauma, bHE = vor der Hirnentnahme; ANOVA One Way Repeated Measures Analysis of Variance; \*\*\* p < 0.001,\*\* p < 0.01). \*p < 0.05).

### 3.1.4 Kontusionsstärke

Die grobe Beurteilung der Traumaintensität zeigt Tabelle 7. Insgesamt unterschied sich die Ausprägung der Kontusion zwischen den Verum- und Plazebotieren nicht und wurde als eher stark beschrieben. Auch das Subduralhämatom war bei den Tieren ähnlich mit mittelstarkem Ausmaß. Die Dura riss durch die Kontusion bei 17 von 36 Verumtieren (47%) und bei 13 von 20 Tieren (39%) der Plazebotiere ein.

Tab. 7: Unmittelbare Schäden durch das Trauma nach subjektiver Einschätzung durch den Operateur: Kontusion (1 = moderat, 2 = stark, 3 = sehr stark), Durariss (vorhanden in %), Subduralhämatom (1 = klein, 2 = mittel, 3 = groß).

	Kontusion (Grad 1 - 3)	Durariss	Subduralhämatom (Grad 1 - 3)
Gesamt Ubiquitin	1.6 ± 0.6	47%	2 ± 0.7
Gesamt Plazebo	1.6 ± 0.6	39%	2.3 ± 0.6

#### 3.2 Mortalität

Es kam zu zwei interventionsbedingten Todesfällen in der 72-Stunden-Gruppe. Eines der Tiere der Plazebogruppe verstarb nach Reimplantation des Knochenstückes ohne ersichtlichen Grund. Das andere Versuchstier verstarb noch vor der Randomisierung und Applikation des Traumas an einem Atemstillstand durch vermutliche Überdosierung von Isofluran. Trauma bedingte Todesfälle wurden nicht beobachtet.

## 3.3 RT-PCR

## 3.3.1 TNF- $\alpha$ -Expression

3.3.1.1 4 Stunden

In die Auswertung der relativen TNF- $\alpha$ -mRNS vier Stunden nach dem Trauma flossen Ergebnisse von jeweils neun RNS-Proben (n = 9) der Verum- und Plazebogruppe ein. Die relative mRNS-Expression lag in der Ubiquitingruppe bei 2 <sup>e-3</sup>  $\pm$  0.953 <sup>e-3</sup> relative mRNS vs. 1.752 <sup>e-3</sup>  $\pm$  0.536 <sup>e-3</sup> relative mRNS in der Plazebogruppe ohne statistischen Unterschied (Abb. 8).

### 3.3.1.2 72 Stunden

In die Berechnungen der Werte zum Zeitpunkt nach 72 Stunden nach Trauma gingen von den vorhandenen RNS-Proben fünf (n= 5) in die Plazebogruppe und sieben (n = 7) in die Ubiquitingruppe ein. Zunächst zeigten sich hoch signifikant geringere TNF- $\alpha$ -Level im zeitlichen Verlauf zwischen den 72-Stunden-Gruppen und ihren korrespondierenden 4-Stunden-Gruppen (Plazebo: 1.752 <sup>e-3</sup> ± 0.536 <sup>e-3</sup> relative mRNS nach vier Stunden vs. 0.093<sup>e-3</sup> ± 0.044 <sup>e-3</sup> relative mRNS nach 72 Stunden, p <0,01; Ubiquitin: 2 <sup>e-3</sup> ± 0.953 <sup>e-3</sup> relative mRNS nach vier Stunden vs. 0.22 <sup>e-3</sup> ± 0.109 <sup>e-3</sup> relative mRNS nach 72 Stunden, p = 0.001,  $\alpha$  = 0.025, Abb. 8).

Zwischen der Ubiquitingruppe und der Plazebogruppe zeigte sich außerdem ein Trend zu höheren TNF- $\alpha$ -Leveln in der Ubiquitingruppe (0.22 <sup>e-3</sup> ± 0.109 <sup>e-3</sup> vs. 0.093<sup>e-3</sup> ± 0.044 <sup>e-3</sup> relativer mRNS; p = 0,06,  $\alpha$  = 0.025, Abb. 8).



Abb. 8: Relative TNF- $\alpha$ -mRNS-Expression vier und 72 Stunden nach dem Trauma. Tendenziell höhere TNF- $\alpha$ -Level in der Ubiquitingruppe 72 Stunden nach dem Trauma (p = 0.06,  $\alpha$  = 0.025). \*\* = Hoch signifikant geringere TNF- $\alpha$ -Level nach 72 Stunden in der Ubiquitingruppe verglichen mit der 4-Stunden-Ubiquitingruppe und in der 72-Stunden-Plazebogruppe verglichen mit der 4-Stunden-Plazebogruppe (p < 0.001,  $\alpha$  = 0.025, U-Test, Mann-Whitney; Bonferroni-Korrektur).

## 3.3.2 IL-1 $\beta$ -Expression

### 3.3.2.1 4 Stunden

In die 4-Stunden-Gruppe von IL-1 $\beta$  flossen neun Proben (n = 9) der Plazebogruppe und sieben (n = 7) Proben der Ubiquitingruppe ein. Der Mittelwert der relativen IL-1 $\beta$ mRNS lag bei 18.46<sup>e-3</sup> ± 6.517<sup>e-3</sup> für die Ubiquitingruppe und bei 19.08<sup>e-3</sup> ± 8.547<sup>e-3</sup> für die Plazebogruppe. Dieser geringe Unterschied zwischen den Gruppen war statistisch nicht signifikant (Abb. 9).

### 3.3.2.2 72 Stunden

Aus den 72-Stunden-Gruppen gingen fünf (n= 5) in die Plazebogruppe und acht (n = 8) in die Ubiquitingruppe ein. Der Vergleich mit den Ergebnissen der 4-Stunden-Gruppen zeigte hoch signifikant geringere IL-1 $\beta$ -mRNS-Level in der Ubiquitin- und Plazebogruppe nach 72 Stunden (Plazebo: 19.08<sup>e-3</sup> ± 8.547 relative mRNS nach vier Stunden vs. 2.971<sup>e-3</sup> ± 1.571<sup>e-3</sup> relative mRNS nach 72 Stunden, p < 0.002,  $\alpha$  = 0.025; Ubiquitin: 18.46<sup>e-3</sup> ± 6.517<sup>e-3</sup> relative mRNS nach vier Stunden vs. 4.339<sup>e-3</sup> ± 3.863<sup>e-3</sup> relative mRNS nach 72 Stunden, p = 0.006,  $\alpha$  = 0.025, Abb. 9). Der Unterschied zwischen der Ubiquitin- und Plazebogruppe nach 72 Stunden war jedoch nicht signifikant (4.339<sup>e-3</sup> ± 3.863<sup>e-3</sup> relative mRNS in der Ubiquitingruppe vs. 2.971<sup>e-3</sup> ± 1.571<sup>e-3</sup> relative mRNS in der Ubiquitingruppe vs. 2.971<sup>e-3</sup> ± 1.571<sup>e-3</sup> relative mRNS in der Ubiquitingruppe vs. 2.971<sup>e-3</sup> ± 1.571<sup>e-3</sup> relative mRNS in der Plazebogruppe, Abb. 9).



Abb. 9: Relative IL-1- $\beta$ -mRNS-Expression vier und 72 Stunden nach dem Trauma. \*\* = Hoch signifikant geringere IL-1- $\beta$ -Level nach 72 Stunden in der Ubiquitingruppe verglichen mit der 4-Stunden-Ubiquitingruppe und in der Plazebogruppe mit der 4-Stunden-Plazebogruppe (p < 0.01,  $\alpha$  = 0.025, U-Test, Mann-Whitney, Bonferroni-Korrektur).

## 3.3.3 IL-1ra-Expression

#### 3.3.3.1 4 Stunden

Zur Auswertung der IL-1ra-mRNS kamen acht (n = 8) Gewebeproben der Plazebogruppe und sieben (n= 7) der Ubiquitingruppe.  $7.441^{e-3} \pm 4.762^{e-3}$  relative mRNS fanden sich im Mittel in der Verumgruppe und  $10.16^{e-3} \pm 5.965^{e-3}$  relative mRNS in der Plazebogruppe (Abb. 10). Dieser Unterschied war allerdings nicht statistisch signifikant.

### 3.3.3.2 72 Stunden

Aus der 72-Stunden-Gruppen wurden fünf (n = 5) Proben der Plazebogruppe und sieben (n = 7) Proben der Ubiquitingruppe in die Auswertung eingeschlossen. Verglichen mit der korrespondierenden 4-Stunden-Gruppe lag das IL-1ra-mRNS-Level nach 72 Stunden in der Ubiquitingruppe höher (7.441<sup>e-3</sup> ± 4.762<sup>e-3</sup> relative mRNS nach vier Stunden vs.  $15.92^{e-3} \pm 9.566$  nach 72 Stunden, p = 0.09,  $\alpha$  = 0.025, Abb. 10) In der Plazebogruppe ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied im Zeitverlauf (10.16<sup>e-3</sup> ± 5.965<sup>e-3</sup> nach vier Stunden vs. 16.57<sup>e-3</sup> ± 10.07<sup>e-3</sup> relative mRNS nach 72 Stunden, Abb. 10).



Abb. 10: Relative IL-1ra-mRNS-Expression vier und 72 Stunden nach dem Trauma. Tendenziell höhere IL-1ra-Level in der Ubiquitingruppe nach 72 Stunden verglichen mit der 4-h-Gruppe (p = 0.09,  $\alpha$  = 0.025, U-Test, Mann-Whitney, Bonferroni-Korrektur).

#### 3.3.4 IL-6-Expression

#### 3.3.4.1 4 Stunden

Die Auswertung der Plazebo- und Ubiquitingruppe erfolgte unter Einschluss von 8 (n = 8) bzw. neun (n = 9) Gewebeproben. Der Mittelwert lag in der Plazebogruppe bei 12.19  $e^{-3} \pm 8.862 e^{-3}$  relativer mRNS und in der Ubiquitingruppe (8.208  $e^{-3} \pm 3.956 e^{-3}$  relative mRNS, was keinen statistisch signifikanten Unterschied ergab (Abb. 11).

#### 3.3.4.2 72 Stunden

72 Stunden nach dem Trauma kam es zu einem deutlichen Abfall der mRNS-Konzentration in beiden Gruppen. In der 4-Stunden-Plazebogruppe entstand ein hoch signifikanter Unterschied zu der 72-Stunden-Gruppe (12.19<sup>e-3</sup> ± 8.862<sup>e-3</sup> relative mRNS vs. 0.2837<sup>e-3</sup> ± 0.1505<sup>e-3</sup> relative mRNS; p <0,01,  $\alpha$  = 0.025, Abb. 11). Zwischen den Ubiquitingruppen war dieser Unterschied zwischen vier und 72 Stunden sogar noch ausgeprägter (8.208<sup>e-3</sup> ± 3.956<sup>e-3</sup> relative mRNS vs. 0.8416<sup>e-3</sup> ± 0.8792<sup>e-3</sup> relative mRNS; p <0,001,  $\alpha$  = 0.025, Abb. 11). Der Vergleich zwischen der Verum- und Plazebogruppe nach 72 Stunden ergab keinen signifikanten Unterschied der IL-6mRNS-Level (0.8416<sup>e-3</sup> ± 0.8792<sup>e-3</sup> relative mRNS in der Verumgruppe vs. 0.2837<sup>e-3</sup> ± 0.1505<sup>e-3</sup> relative mRNS in der Plazebogruppe, Abb. 11).



Abb. 11: Relative IL-6-mRNS-Expression vier und 72 Stunden nach dem Trauma. **\*\*** = Hoch signifikant geringere IL-6-Level nach 72 Stunden in der Plazebogruppe verglichen mit der 4-Stunden-Plazebogruppe (p = 0.004,  $\alpha = 0.025$ ). **\*\*\*** = Höchst signifikant geringere IL-6-Level nach 72 Stunden in der Ubiquitingruppe verglichen mit der 4-Stunden-Ubiquitingruppe (p = 0.0006,  $\alpha = 0.025$ , U-Test, Mann-Whitney Bonferroni-Korrektur).

#### 3.3.5 IL-10

### 3.3.5.1 4 Stunden

Zur Bestimmung der mittleren mRNS-Konzentration in beiden Gruppen wurden mRNS-Messungen von acht (n = 8) Versuchstieren der Plazebogruppe und fünf (n = 5) Tieren der Verumgruppe statistisch ausgewertet. Dabei wurden für die Ubiquitingruppe IL-10mRNS-Konzentrationen von 0.0447 <sup>e-3</sup>  $\pm$  0.0359 <sup>e-3</sup> und für die Plazebogruppe von 0.0337 <sup>e-3</sup>  $\pm$  0.0177 <sup>e-3</sup> aufgefunden. Dieser Unterschied zwischen den Gruppen war nicht statistisch signifikant (Abb. 12).

#### 3.3.5.2 72 Stunden

Die Auswertung nach 72 Stunden ergab einen Abfall der IL-10-mRNS in der Verumgruppe von 0.0447<sup>e-3</sup> ± 0.0359<sup>e-3</sup> nach vier Stunden relativer mRNS auf 0.0106<sup>e-3</sup> ± 0.0061 (p = 0.04,  $\alpha$  = 0.025, Abb. 12). In der Plazebogruppe kam es nicht zu einem signifikanten Abfall der IL-10-Level (0.0337<sup>e-3</sup> ± 0.0177<sup>e-3</sup> relativer mRNS nach vier Stunden auf 0.0227<sup>e-3</sup> ± 0.0124<sup>e-3</sup> relative mRNS nach 72 Stunden, Abb. 12). Auch der Unterschied zwischen der 72-Stunden-Verum und der 72-Stunden-Plazebogruppe erreichte das Signifikanzniveau; die IL-10-mRNS-Konzentration war mit 0.0106<sup>e-3</sup> ± 0.00609 in der Ubiquitingruppe geringer als die der Plazebogruppe (0.0227<sup>e-3</sup> ± 0.0124<sup>e-3</sup> relative mRNS; p = 0.02,  $\alpha$  = 0.025, Abb. 12).



Abb. 12: Relative IL-10-mRNS-Expression vier und 72 Stunden nach dem Trauma. Tendenziell geringere IL-10-Level nach 72 Stunden in der Ubiquitingruppe verglichen mit der 4-Stunden-Ubiquitingruppe (p = 0.04,  $\alpha = 0.025$ ). \* = Signifikant geringere IL-10-Level nach 72 Stunden in der Ubiquitingruppe verglichen mit der Plazebogruppe (p = 0.02,  $\alpha = 0.025$ , U-Test, Mann-Whitney, Bonferroni-Korrektur).

#### 3.4 Immunhistochemie

#### 3.4.1 HIS48-Färbung

Die Färbung mit HIS48 wurde bei allen gefrorenen Proben der 24-Stunden-Gruppen durchgeführt. Von den neun gefärbten Proben der Ubiquitingruppe konnten auch nach wiederholten Versuchen nur sechs in die Auswertung einfließen (n = 6), da wegen starker Zerstörung des Gewebes im Bereich der Kontusion und des perikontusionellen (PC) Kortex keine Auszählung der Zellen möglich war. Im Falle der Plazebogruppe waren aus diesem Grund drei (n = 3) der neun gefärbten Proben für die Auszählung verwendbar.

Im PC Kortex war kein signifikanter Unterschied in der Anzahl HIS48-positiver Zellen zwischen der Ubiquitin-  $(5 \pm 5 \text{ Zellen/mm}^2)$  und der Plazebogruppe  $(11 \pm 7 \text{ Zellen/mm}^2)$ nach 24 Stunden feststellbar (Abb. 13, PC Kortex). Auch in der Kontusion konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden (8 ± 10 Zellen/mm<sup>2</sup>) in der Ubiquitingruppe versus 8  $\pm$  6 Zellen/mm<sup>2</sup> in der Plazebogruppe; Abb. 13, Kontusion). Im ipsilateralen Hippokampus fanden sich 5  $\pm$  6 Zellen/mm<sup>2</sup> in der Verumgruppe und 4  $\pm$  2 Zellen/mm<sup>2</sup> in der Plazebogruppe und somit auch hier kein statistisch relevanter Unterschied (Abb. 13, Hippokampus).. In den gesamten Alvei hippocampi wurde kein signifikanter Unterschied ipsilateral mit 31 ± 40 Zellen in der Ubiquitingruppe und  $34 \pm 24$  Zellen in der Plazebogruppe und kontralateral mit  $0 \pm 1$ Zelle in der Verumgruppe vs. 6 ± 12 Zellen in der Plazebogruppe gefunden. Bei der Auszählung in der kontralateralen Hemisphäre wurden jeweils nur sehr vereinzelt, d.h. 0 bis maximal fünf HIS48-positive Zellen in der gesamten Hemisphäre aufgefunden. Es kann daher festgehalten werden, dass die Kontusion einen Anstieg HIS48-positiver Zellen gegenüber dem kontralateralen, HIS48-negativem Kortex verursachte. Sowohl in der Ubiguitin- als auch in der Plazebogruppe wiesen der ipsilaterale Kortex sowie der ipsilaterale Hippocampus hoch signifikant mehr HIS48-positive Zellen auf als jeweils die kontralateralen Areale (p<0.01).



Abb. 13: Graphische Darstellung HIS48-positiver Zellen im perikontusionellen Kortex, der Kontusion, dem ipsilateralen Kortex und in der kontralateralen Hemisphäre 24 Stunden nach dem Trauma. \*\* = hoch signifikant mehr HIS48-positive Zellen im ipsilateralen Kortex und Hippokampus beider Gruppen gegenüber ihren kontralateralen Arealen (p<0.01, U-Test, Mann-Whitney).

## 3.4.2 MPO-Färbung

Nach 24 Stunden und sieben Tagen wurde die MPO-Färbung an den Gewebeproben der Ubiquitin- und Plazebogruppe durchgeführt.

## 3.4.2.1 24 Stunden

Bei den 24-Stunden-Tieren ließen sich die Proben der Plazebogruppe problemlos anfärben (n = 9). Sechs der gefärbten Proben der Ubiquitingruppe flossen in die Auswertung ein (n = 6) und drei fielen wegen der in 3.4 genannten Problematik weg. Die Auszählung des PC Kortex ergab für die Ubiquitingruppe 19 ± 8 Zellen/mm<sup>2</sup>, was verglichen mit der Plazebogruppe (27 ± 14 Zellen/mm<sup>2</sup>) keinen statistisch signifikanten Unterschied ergab (Abb. 14A, PC Kortex). Auch die Anzahl MPO-positiver Zellen in der Kontusion (33 ± 14 Zellen/mm<sup>2</sup> Ubiquitin vs. 28 ± 11 Zellen/mm<sup>2</sup> Plazebo) und im ipsilateralen Hippokampus (14 ± 8 Zellen/mm<sup>2</sup> Ubiquitin vs. 11 ± 6 Zellen/mm<sup>2</sup> Plazebo) zeigte keinen signifikanten Unterschied der Ubiquitingruppe gegenüber der Plazebogruppe (Abb. 14A Kontusion, Hippokampus). Insgesamt lässt sich kein signifikanter Unterschied in der Anzahl MPO-positiver Zellen in der Ubiquitingruppe verglichen mit der Plazebogruppe für die betrachteten Bereiche erkennen (23 ± 13 Zellen/mm<sup>2</sup> Ubiquitin gesamt vs. 22 ± 13 Zellen/mm<sup>2</sup> Plazebo gesamt; Abb. 14A gesamt). In der kontralateralen Hemisphäre fand sich in beiden Gruppen im Mittel eine sehr geringe Zelldichte, weshalb auf eine Auswertung in Zellen/mm<sup>2</sup> verzichtet wurde. Mit 10  $\pm$  6 Zellen in der Placebogruppe und 9  $\pm$  6 Zellen in der Ubiquitingruppe in Kortex und Hippokampus zusammen ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Auch die Gegenüberstellung der Alvei hippocampi ipsilateral und kontralateral ergab keine statistische Relevanz(ipsilateral: 57 ± 25 Zellen vs. 49 ± 23 Zellen; kontralateral: 5 ± 5 Zellen vs. 3 ± 3 Zellen). Auch die MPO-Färbung zeigt eine Zunahme MPO-positiver Zellen in der verletzten Hemisphäre verglichen mit der unverletzten, kontralateralen Hemisphäre. In der Plazebogruppe kam es zu einem hoch signifikanten Anstieg MPO-positiver Zellen im PC Kortex (27 ± 14 vs. 9 ± 6) und der Kontusion (28  $\pm$  11 vs. 9  $\pm$  6) im Vergleich zur kontralateralen Hemisphäre (p<0.01). Im ipsilateralen Hippocampus blieb diese Zunahme MPO-positiver Zellen aus. In der Ubiquitingruppe kam es zu einer signifikanten Zunahme MPO-positiver Zellen im PC Kortex durch das Trauma gegenüber der kontralateralen Hemisphäre ( $19 \pm 8$  vs.  $10 \pm 6$ ; p<0.05). Dieser Anstieg war in der Kontusion sogar hoch signifikant ( $33 \pm 14$  vs.  $10 \pm 6$ ; p<0.01). Auch in der Ubiquitingruppe kam es zu keiner signifikanter Zunahme MPOpositiver Zellen im ipsilateralen Hippocampus gegenüber der unverletzten Hemisphäre.



Abb. 14: A Graphische Darstellung MPO-positiver Zellen im PC Kortex, der Kontusion, dem ipsilateralen Kortex, in diesen Bereichen insgesamt und in der kontralateralen Hemisphäre 24 Stunden nach dem Trauma. Hoch signifikant mehr MPO-positive Zellen im PC Kortex und der Kontusion der Plazebogruppe gegenüber der kontralateralen Hemisphäre (\*\* p<0.01). Signifikant mehr MPO-positive Zellen im PC Kortex der Ubiquitingruppe und hoch signifikant mehr MPO-positive Zellen in der Kontusion der Ubiquitingruppe verglichen mit der kontralateralen Hemisphäre (§ p<0.05, §§ p<0.01; U-Test, Mann-Whitney). B Graphische Darstellung MPOpositiver Zellen im PC Kortex, der Kontusion, dem ipsilateralen Kortex und in diesen Bereichen insgesamt 7 Tage nach dem Trauma. Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (U-Test, Mann-Whitney). C Graphische Darstellung MPO-positiver Zellen im kontralateralen Kortex, kontralateralen Hippokampus und der ipsilateralen Hemisphäre 7 Tage nach dem Trauma. Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, jedoch signifikant höhere Anzahl MPO-positiver Zellen in PC Kortex und Kontusion gegenüber der kontralateralen U-Test, Hemisphäre der Ubiquitingruppe (\*p<0.05; Mann-Whitney)

### 3.4.2.2 7 Tage

Drei der Gewebeproben der Plazebogruppe sieben Tage nach dem Trauma zeigten technisch bedingt keine ausreichende Anfärbung und können daher nicht in die Auswertung einfließen. In der Ubiquitingruppe war dies nur bei zwei Proben der Fall. Es flossen daher sechs (n = 6) Versuchstiere der Plazebogruppe und acht (n = 8) der Ubiquitingruppe in die Auswertung ein.

Im PC Kortex fanden sich in der Ubiquitingruppe 19  $\pm$  37 Zellen/mm<sup>2</sup> vs. 5  $\pm$  5 Zellen/mm<sup>2</sup> in der Plazebogruppe (Abb. 14B, PC Kortex). Aufgrund der starken Variabilität der Ergebnisse erreichte dieser Unterschied jedoch keine statistische Signifikanz. In der Kontusion und im ipsilateralen Hippokampus verhielt es sich ähnlich; dort fanden sich 11  $\pm$  12 Zellen/mm<sup>2</sup> vs. 8  $\pm$  11 Zellen/mm<sup>2</sup> in der Kontusion und 1  $\pm$  1 Zelle/ mm<sup>2</sup> vs. 0  $\pm$  0 Zellen/mm<sup>2</sup> im ipsilateralen Hippokampus (Abb. 14B, Kontusion). Insgesamt bedingt dies eine Verteilung von 10  $\pm$  23 Zellen/mm<sup>2</sup> in der Ubiquitingruppe vs. 4  $\pm$  7 Zellen/mm<sup>2</sup> in der Plazebogruppe für alle ausgezählten Bereiche in der ipsilateralen Hemisphäre (Abb. 14B, gesamt). Auch die Alvei hippocampi zeigten ipsilateral und kontralateral keinen signifikanten Unterschied zwischen der Ubiquitin-und Placebogruppe (3  $\pm$  4 Zellen vs. 5  $\pm$  5 Zellen ipsilateral und 2  $\pm$  4 Zellen vs. 4  $\pm$  4 Zellen kontralateral).

Kontralateral fanden sich deutlich weniger MPO-positive Zellen. Im ausgezählten kontralateralen Kortex waren es gleich viele Zellen in der Verum- und Plazebogruppe (1  $\pm$  1 Zelle/mm<sup>2</sup> vs.1  $\pm$  1 Zelle/mm<sup>2</sup>; Abb. 14C kontralat. Kortex). Auch im kontralateralen Hippokampus fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (1  $\pm$  1 Zelle/mm<sup>2</sup> vs. 0  $\pm$  0 Zellen/mm<sup>2</sup>; Abb. 14C kontralat. Hippokampus). Über die gesamte kontralaterale Hemisphäre betrachtet, ergab sich kein Unterschied zwischen den MPO-positiven Zellen beider Gruppen (1  $\pm$  1 Zelle/mm<sup>2</sup> vs. 1  $\pm$  1 Zellen/mm<sup>2</sup>). In der Ubiquitingruppe war der Unterschied an MPO-positiven Zellen im PC Kortex und der Kontusion noch signifikant höher als im kontralateralen Kortex (p<0.05). Die Anzahl MPO-positiver Zellen von ipsi- und kontralateralem Hippocampus in der Ubiquitingruppe

unterschieden sich jedoch nicht. In der Plazebogruppe zeigten sich weder im Kortex noch im Hippocampus signifikant verschiedene Zellzahlen zwischen ipsi- und kontralateraler Hemisphäre.

### 3.4.3 OX-42-Färbung

Die OX-42-Färbung wurde24 Stunden und nach sieben Tagen an Ubiquitin- und Plazeboproben durchgeführt.

### 3.4.3.1 24 Stunden

Bei den 24-Stunden-Tieren ließen sich die neun Proben der Plazebogruppe problemlos anfärben. Von den neun gefärbten Proben der Ubiguitingruppe flossen sechs in die Auswertung ein (n = 6). Im PC Kortex fanden sich 15  $\pm$  13 Zellen/mm<sup>2</sup> in der Ubiquitingruppe und 25 ± 18 Zellen/mm<sup>2</sup> (Abb. 15 PC Kortex). Die Auswertung der Kontusion ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen (26 ± 27 Zellen/mm<sup>2</sup> in der Ubiquitingruppe versus  $35 \pm 36$  Zellen/mm<sup>2</sup> in der Plazebogruppe; Abb. 15 Kontusion) und auch im ipsilateralen Kortex unterschieden sich die Gruppen nicht signifikant (10 ± 9 Zellen/mm<sup>2</sup> Verum vs. 17 ± 28 Zellen/mm<sup>2</sup> Plazebo; Abb. 15 Hippokampus). Im Alveus der ipsilateralen Hemisphäre fanden sich 39 ± 33 Zellen in der Verumgruppe und 26 ± 20 Zellen in Plazebogruppe, ohne statistische Signifikanz zu erreichen. Im kontralateralen Alveus unterschied sich die Anzahl OX-42-positiver Zellen nicht (4 ± 4 Zellen vs. 3 ± 4 Zellen). Auch für OX-42 ergab die Auszählung der Zellen im kontralateralen Kortex und Hippokampus mit einem Maximum von insgesamt vier Zellen pro Hemisphäre sehr geringe Zelldichten Das Trauma verursachte somit deutlich einen Anstieg OX-42-positiver Zellen in der ipsilateralen Hemisphäre gegenüber dem kontralateralen Kortex. In der Plazebogruppe waren hoch signifikant mehr OX-42positive Zellen im ipsilateralen gegenüber dem kontralateralen Kortex vorhanden (p<0.01, Abb. 15). Der Unterschied zwischen ipsi- und kontralateralem Hippokampus in dieser Gruppe war ebenfalls signifikant (p<0.05, Abb. 15). Auch in der Ubiquitingruppe waren signifikant mehr OX-42-positive Zellen im ipsilateralen Kortex und Hippokampus gegenüber den kontralateralen Arealen vorhanden (p<0.05, Abb. 15).



Abb. 15: Graphische Darstellung OX-42-positiver Zellen im perikontusionellen Kortex, der Kontusion, dem ipsilateralen Kortex und in den kontralateralen Arealen 24 Stunden nach dem Trauma. \*\* = Hoch signifikant mehr OX-42-positive Zellen im ipsilateralen Kortex der Plazebogruppe verglichen mit ihrem kontralateralen Kortex (p<0.01). \* = signifikant mehr OX-42-positive Zellen im ipsilateralen Kortex der Ubiquitingruppe gegenüber dem kontralateralen Kortex (p<0.05). § = signifikant höhere Anzahl OX-42-positiver Zellen in den ipsilateralen Hippokampi beider Gruppen gegenüber ihren kontralateralen Hippokampi (p<0.05, U-Test, Mann-Whitney)

## 3.4.3.2 7 Tage

Die Färbung OX-42-positiver Zellen nach sieben Tagen stellte sich in beiden Hemisphären wie die der kontralateralen Hemisphären der 24-Stunden-Gruppen dar. Da sich in allen auszuzählenden Bereichen insgesamt maximal fünf positive Zellen pro Schnitt fanden, können die 7-Tages-Gruppen für Ubiquitin und Plazebo als OX-42negativ gelten ohne jeglichen Unterschied der Gruppen untereinander.

## 3.4.4 ED1-Färbung

Die Färbung ED1-positiver Zellen wurde 24 Stunden nach dem Trauma an zuvor gefrorenen und sieben Tage nach dem Trauma an paraffinierten Proben durchgeführt.

### 3.4.4.1 24 Stunden

Sechs der Gewebeproben aus der Verumgruppe (n = 6) konnten ausgewertet werden, drei Proben konnten wegen ausgeprägten Zerreißungen des Gewebes im Bereich der Kontusion und des PC Kortex nicht ausgezählt werden. In der Plazebogruppe waren aus diesem Grund nur drei (n = 3) der neun gefärbten Proben für die Auszählung verwendbar.

Die Gewebeproben sowohl der Ubiquitin als auch der Plazebogruppe waren ED1negativ. Vereinzelt wurde bis zu eine positiv gefärbte Zelle in den betrachteten Bereichen aufgefunden. Auf eine graphische Auswertung wurde deswegen verzichtet.

### 3.4.4.2 7 Tage

Die Plazebogruppe floss mit acht (n = 8) der neun gefärbten Gewebeproben und die Verumgruppe mit neun (n = 9) der zehn Gewebeproben in die Auswertung ein.

Die Auszählung des PC Kortex ergab eine signifikant geringere Zelldichte in der Plazebogruppe gegenüber der Ubiquitingruppe (823  $\pm$  182 Zellen/mm<sup>2</sup> vs. 607  $\pm$  189 Zellen/mm<sup>2</sup>; p = 0.036; Abb. 16 PC Kortex). Die makroskopische und mikroskopische Darstellung der Abbildungen 17 A-F bestätigt dieses Ergebnis zusätzlich. In der Kontusion war der Unterschied zwischen den Gruppen nicht signifikant (1388  $\pm$  271 Zellen/mm<sup>2</sup> vs. 1350  $\pm$  389 Zellen/mm<sup>2</sup>; Abb. 16 Kontusion). Der Unterschied in der Zelldichte ED1-positiver Zellen zwischen den ipsilaterale Hippokampi zeigte tendenziell das gleiche Bild wie der PC Kortex: 54  $\pm$  29 Zellen/mm<sup>2</sup> vs. 27  $\pm$  23 Zellen/mm<sup>2</sup>; p = 0.08; Abb. 16 Hippokampus). Betrachtet man die ipsilaterale Hemisphäre insgesamt, erhält man für die Ubiquitingruppe 734  $\pm$  578 Zellen/mm<sup>2</sup> vs. 661  $\pm$  602 Zellen/mm<sup>2</sup> in der Plazebogruppe (Abb. 16 gesamt). Kontralateral konnten bei keiner der Gewebeproben aus beiden Gruppen ED1-positive Zellen aufgefunden werden, was auch für ED1 eine starke Zunahme der Zelldichte durch die Kontusion zeigt. Der kontralaterale Kortex und Hippokampus beider Versuchsgruppen gilt daher als ED1negativ und ist in Abbildung 18 exemplarisch dargestellt. Die Anzahl ED1-positiver Zellen der ipsilateralen Hemisphäre sowohl der Ubiquitin- als auch der Plazebogruppe war somit gegenüber der Anzahl innerhalb der kontralateralen Hemisphären höchst signifikant erhöht (p≤0.0001). Darüber hinaus erreichte der Unterschied ED1-positiver Zellen im ipsilateralen Alveus hippocampus der Ubiquitingruppe gegenüber der Plazebogruppe keine statistische Signifikanz (24 ± 16 Zellen vs. 19 ± 9 Zellen). Auch im kontralateralen Alveus hippocampus gab es keinen Unterschied zwischen den Gruppen (1 ± 2 Zellen vs. 1 ± 2 Zellen).



Abb. 16: Graphische Darstellung ED1-positiver Zellen im PC Kortex, der Kontusion, dem ipsilateralen Hippokampus und in diesen Bereichen insgesamt 7 Tage nach dem Trauma;  $\star$  = signifikant mehr ED1-positive Zellen im PC Kortex der Ubiquitingruppe (p = 0.04; U-Test, Mann-Whitney).



Abb. 17: ED1-Färbung 7 Tage nach dem Trauma ipsilateral. A: Koronarer Schnitt (nativ) der Ubiquitingruppe. B: Koronarer Schnitt (nativ) der Plazebogruppe. C: Mikroskopische Ansicht der Kontusion (Plan) in der Ubiquitingruppe. D: Mikroskopische Ansicht der Kontusion (Plan) in der Plazebogruppe. E: Mikroskopische Ansicht des PC Kortex (40x) in der Ubiquitingruppe. F: Mikroskopische Ansicht des PC Kortex (40x) in der Plazebogruppe. Die makroskopische und mikroskopische Übersicht bestätigt eine größere Anzahl ED1-positiver Zellen (rote Färbung) im PC Kortex der Ubiquitingruppe (A, C, E).



Abb. 18: Kontralateraler Kortex und Hippokampus nach ED1-Färbung (Plan). Es sind keine ED1-positiven (roten) Zellen vorhanden.

# 3.4.5 GFAP

Die GFAP-Färbung wurde an neun Gewebeproben sieben Tage nach dem Trauma durchgeführt. Es standen acht (n = 8) Gewebeproben der Plazebogruppe und neun (n = 9) Proben der Ubiquitingruppe zur Betrachtung zur Verfügung.

Zur Auswertung GFAP-positiver Zellen wurde neben den Zellzahlen auch die Morphologie der gefärbten Zellen herangezogen. Diese unterschied sich deutlich in der ipsilateralen von der kontralateralen Hemisphäre: die aktivierten Astrozyten der ipsilateralen Hemisphäre zeigten in beiden Gruppen deutlich verkürzte und verbreiterte Zellfortsätze an einem verdickten Zellkörper (Abb. 19 A). Im ipsilateralen Kortex bleiben die Astrozyten klein mit feinen Fortsätzen (Abb. 19 B).



Abb. 19: Morphologie GFAP-positiver Zellen in 40x Vergrößerung. A = aktivierte Astrozyten im PC Kortex der ipsilateralen Hemisphäre und B = ruhende Astrozyten des kontralateralen Kortex.

Zwischen dem PC Kortex der Verumgruppe (178  $\pm$  28 Zellen/mm<sup>2</sup>) und der Plazebogruppe (189  $\pm$  39 Zellen/mm<sup>2</sup>) ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich der GFAP-positiven Zellen (Abb. 20, PC Kortex). Auch im kontralateralen Kortex wurde mit 115  $\pm$  28 Zellen/mm<sup>2</sup> in der Ubiquitin- und 102  $\pm$  46 Zellen/mm<sup>2</sup> in der Plazebogruppe kein signifikanter Unterschied gefunden (Abb. 20, Kontralat. Kortex). Vergleicht man die Zelldichte des PC Kortex der Ubiquitingruppe mit dem kontralateralen Kortex der gleichen Gruppe, so findet man signifikant mehr Zellen im PC Kortex (178  $\pm$  29 Zellen/mm<sup>2</sup> ipsilateral vs. 115  $\pm$  28 Zellen/mm<sup>2</sup> kontralateral; p<0.01; Abb. 20). Beim entsprechenden Vergleich der Kortizes innerhalb der Plazebogruppe ergibt sich der gleiche Unterschied (189  $\pm$  39 Zellen/mm<sup>2</sup> ipsilateral vs. 102  $\pm$  46 Zellen/mm<sup>2</sup> kontralateral; p<0.01; Abb. 20). Die Auszählung der ipsilateralen Hippokampi zeigte eine mittlere Zelldichte von 192  $\pm$  20 Zellen/mm<sup>2</sup> in der Ubiquitingruppe vs. 188  $\pm$  32 Zellen/mm<sup>2</sup> in der Plazebogruppe (Abb. 20, ipsilat. Hippokampus). Kontralateral lag die mittlere Astrozytendichte beider Gruppen etwas weiter auseinander, jedoch war auch dieser Unterschied nicht statistisch signifikant (170  $\pm$  20 Zellen/mm<sup>2</sup> vs. 148  $\pm$  49 Zellen/mm<sup>2</sup>; Abb. 20, kontralat. Hippokampus). Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von p = 0.065 zeigte sich für den Vergleich der Hippokampi der ipsilateralen Hemisphäre der Plazebogruppe mit den Hippokampi der kontralateralen Hemisphäre (188  $\pm$  32 Zellen/mm<sup>2</sup> ipsilateral vs. 148  $\pm$  49 Zellen/mm<sup>2</sup> kontralateral; Abb. 20). Für die Ubiquitingruppe lag bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von p = 0.054 ebenso eine tendenziell höhere Astrozytendichte im ipsilateralen Hippokampus vor (192  $\pm$  20 Zellen/mm<sup>2</sup> ipsilateral vs. 170  $\pm$  20 Zellen/mm<sup>2</sup> kontralateral; Abb. 20). Die starke astrozytäre Reaktion ipsilateral zeigt sich wie schon beschrieben auch im mikroskopischen Vergleich der Kortizes beider Hemisphären (Abb. 20).



Abb. 20: Quantifizierung der GFAP-positiven Zellen im perikontusionellen Kortex, dem kontralateralen Kortex, dem ipsilateralen Hippokampus und in dem ipsilateralen Hippokampus 7 Tage nach dem Trauma. (\*\* p <0.01 GFAP-positive Zellen im PC Kortex beider Gruppen versus kontralateralen Kortex; Mann-Whitney-Test). Tendenziell weniger GFAP-positive Zellen in den kontralateralen Hippokampi verglichen mit den ipsilateralen Hippokampi der jeweiligen Gruppe (p = 0.054 bzw. 0.065; U-Test, Mann-Whitney).

Wie aus Abbildung 21 hervorgeht, wurden innerhalb der Kontusion aufgrund fibrotischer Umwandlung keine GFAP-positiven Zellen aufgefunden. Auch in den Alvei hippocampi waren keine Astrozyten vorhanden.



Abb. 21: Fibrotische Umwandlung des Kontusionsareals (Plan). Innerhalb der Kontusion waren aufgrund der fibrotischen Reaktion (Pfeil) keine GFAP-positiven Zellen vorhanden.

## 3.5 TdT-mediated dUTP-biotin nick end labelling (TUNEL)

Die TUNEL-Färbung wurde an acht Gewebeproben der Ubiquitingruppe (n = 8) und sechs Proben der Plazebogruppe (n = 6) 72 Stunden nach dem Trauma angewandt. Alle Proben konnten zur Auswertung herangezogen werden. Der perikontusionelle Kortex zeigte keinen Unterschied in der Apoptoserate zwischen den Gruppen (16 ± 8 Zellen/mm<sup>2</sup> in der Verumgruppe vs. 16 ± 8 Zellen/mm<sup>2</sup> in der Plazebogruppe). Auch in der Kontusion ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Anzahl apoptotischer Zellen in der Ubiquitin- und Plazebogruppe (18 ± 12 Zellen/mm<sup>2</sup> vs. 26 ± 21 Zellen/mm<sup>2</sup>, Abb. 22 Kontusion). Die apoptotischen Zellen im ipsilateralen Hippokampus unterschieden sich ebenfalls nicht signifikant zwischen den Gruppen (4 ± 3 Zellen/mm<sup>2</sup> Verumgruppe vs. 2 ± 2 Zellen/mm<sup>2</sup> Plazebogruppe; Abb. 22 Hippokampus). Kontralateral fanden sich kaum apoptotische Zellen, weshalb der Vergleich zwischen den Gruppen und Zellen pro Areal erfolgte. Es fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (5  $\pm$  3 Zellen in der Ubiquitin- vs. 9  $\pm$  5 Zellen in der Plazebogruppe im kontralateralen Kortex; 4  $\pm$  4 Zellen vs. 7  $\pm$  7 Zellen im kontralateralen Hippokampus). Der Vergleich zwischen den ipsilateralen Kortizes und Hippokampi mit den jeweiligen kontralateralen Kortizes und Hippocampi innerhalb der Ubiquitin- und Plazebogruppe zeigte jedoch eine höchst signifikante Hochregulierung der Apoptoserate innerhalb der ipsilateralen Hemisphären (Abb. 22, p<0.001).



Abb. 22: Graphische Darstellung apoptotischer Zellen 72 Stunden nach dem Trauma im perikontusionellen Kortex, der Kontusion, dem ipsilateralen Hippokampus und in den kontralateralen Arealen. \*\*\* = Höchst signifikant mehr apoptotische Zellen im ipsilateralen Kortex und Hippokampus gegenüber dem kontralateralem Kortex und Hippokampus der Ubiquitin- und Plazebogruppe (p<0.001, U-Те s t , Μ а n n W h itn ey) .

4

# DISKUSSION

In dieser Studie wurden die Auswirkungen von exogenem Ubiquitin auf Teilaspekte der zerebralen Immunreaktion im Controlled Cortical Impact Modell untersucht.

Im Rahmen von Therapiestudien wird während der präklinischen Erprobung häufig auf Tierversuche zurückgegriffen. Ziel ist es hierbei, entweder einzelne Aspekte eines Krankheitsbildes zu untersuchen oder aber eine möglichst umfassende Darstellung des Krankheitsbildes zu gewährleisten. Unter Umständen kann auch der Einsatz verschiedener, sich ergänzender Tiermodelle nötig werden, da jedes Tiermodell nur einige aber niemals alle Aspekte eines pathophysiologischen Vorganges oder Zustandes beim Menschen simulieren kann. Bei der Auswahl des am besten Geeigneten spielen neben der Fragestellung und Übertragbarkeit auch praktische, ökonomische und ethische Überlegungen eine Rolle.

### 4.1 Modellversuche an der Ratte

In der vorliegenden Arbeit entschieden wir uns für männliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem Gewicht von 300-400 Gramm, was einem Alter von ca. 73-80 Tagen entspricht (Fa. Charles-River, Wilmington, MA, USA). Es handelte sich also um junge und gleichzeitig ausgewachsene Tiere, die daher bezogen auf das Alter typische Opfer des Schädel-Hirn-Traumas beim Menschen simulieren (Kirchberger und Wingenfeld, 1992). Wegen ihres im Vergleich zu Mäusen größeren Rumpfes und Kopfes ist die Handhabung während Narkose und Operation einfacher, da unter anderem für die Präparation von Gefäßen und Schädel ein größeres Operationsfeld zur Verfügung steht. Darüber hinaus sind Ratten wenig anfällig für Infektionen nach Operationen (Rigalli und Di Loreto, 2009). Außerdem sind sowohl labortechnische Normwerte als auch umfassende Beschreibungen des normalen Verhaltens von Ratten bekannt (Suckow et al., 2004). Komplettiert wurde die Beschreibung der Ratte durch die Entschlüsselung des Rattengenoms durch Gibbs et al. (2004). Auch aufgrund dieser Erkenntnisse ist es heute möglich, spezielle Knock-out-Varianten zu züchten und die Auswirkungen des fehlenden Gens bei diesen Ratten zu untersuchen. Schließlich ist auch die Anschaffung benötigter Ratten-kompatibler Lösungen wie beispielsweise Antikörper wegen der weiten Verbreitung der Ratte als Versuchstier problemlos möglich

66

und die Kompatibilität mit den gängigen Laborprotokollen daher gewährleistet. Trotz der genannten Vorteile birgt die Durchführung von Tierversuchen an Ratten auch einige Nachteile. Im Vergleich zum Menschen gibt es neuroanatomische Unterschiede und andere Größenrelationen v.a. im Kopf-Hirn-Bereich. Die Behandlungs- und Untersuchungsmethoden müssen zudem an die geringere Größe des Tieres angepasst werden, und tiefgehende neuropsychologische Untersuchungen sind an der Ratte nicht durchführbar (Dixon et al., 1997). Alles in allem sind Versuchsmodelle mit Sprague-Dawley-Ratten international anerkannt und akzeptiert, weshalb schließlich auch in der vorliegenden Arbeit auf diese Versuchstiere zurückgegriffen wurde.

#### 4.2 Auswahl des Traumamodells

Die existierenden Traumamodelle können nach den von ihnen simulierten primären Schädigungsmuster beim SHT eingeteilt werden. Hauptsächlich sind die zerebrale Ischämie und Hypoxie, ein Hirnödem vasogener und zytotoxischer Genese durch Störung der BHS bzw. Zellschwellung von Neuronen und Gliazellen, zerebrale Blutungen (subdural, subarachnoidal und intrazerebral), Schädigungen der weißen Substanz bzw. diffuse Axonschäden und natürlich die fokale Kontusion beteiligt (Wallesch et al., 2005).

Schädel-Hirn-Traumata wurden ursprünglich durch Anlegen eines kalten Metallstempels auf den exponierten Kortex im Modell der kortikalen Kälteläsion erzeugt (Klatzo et al., 1958). Dadurch entstanden eine lokale Nekrose mit Neuronenuntergang und aufgrund der fokalen Schädigung der BHS ein vasogenes Ödem (Reulen et al., 1977). Verglichen mit einem realen SHT beim Menschen und dem in dieser Studie verwandten CCII-Modell fehlt im Modell der kortikalen Kälteläsion vor allem die mechanisch bedingte Kontusion. Daraus folgend kommt es auch nicht zu subduralen oder subarachnoidalen Blutungen und Axonschäden. Des Weiteren bedingt die fehlende mechanische Einwirkung auch ein Fehlen oder zumindest ein geringeres Ausmaß an zytotoxischem Ödem. Hierbei bedingt die Aufnahme osmotisch wirksamer Substanzen in Neuronen und Gliazellen oder der Abbau von Makromolekülen wie z.B. Taurin und N-Acetylaspartat zu kleineren Osmolen in diesen Zellen ein Anschwellen (Wallesch et al., 2005). Zu diesen Vorgängen kommt es vor allem durch mechanische Gewalteinwirkungen wie bei einem Unfall mit SHT oder simuliert auch im Weight-Drop-Injury-, Fluid-Percussion und CCII-Modell (Unterberg et al., 1997). Im Fluid-Percussion-Modell konnten erstmals sowohl diffuse als auch fokale Schäden erzeugt werden. Dafür stößt ein Pendel an einen flüssigkeitsgefüllten Zylinder, so dass abrupt Kochsalzlösung in den geschlossenen Schädel injiziert wird. Durch die Flüssigkeit erfolgt die Kraftübertragung und Traumatisierung des exponierten Kortex (McIntosh et al., 1989). Histopathologisch entstehen dadurch Blutungen intraventrikulär, subarachnoidal und intraparenchymatös. Außerdem kommt es zu einem Neuronenverlust und konsekutiver Nekrose. Auch ein Hirnödem entsteht mit einer maximalen Ausdehnung nach 48 Stunden. Die diffusen Schäden am Großhirn, wie sie auch beim unfallbedingten SHT bei Menschen vorkommen, stellen einerseits einen Vorteil gegenüber der kortikalen Kälteläsion dar, andererseits sind sie nicht nur auf das Großhirn begrenzt, sondern auch auf den Hirnstamm ausgedehnt. So kann es zur Bradykardie und Hypotension bis hin zur Apnoe kommen (Ling et al., 2004). Da hier bei die Gefahr des Versterbens der Versuchstiere besteht, ist es im SHT-Modell eher nicht erwünscht und stellt somit eine Schwäche dieses Modells dar. Darüberhinaus ist eine Hirnstammschädigung als Teil eines SHT beim Menschen eher selten.

Das Weight-Drop-Modell als Modell für ein geschlossenes SHT wurde später entwickelt als die anderen Modelle. Mit diesem Modell zielten die Untersucher darauf ab, ausschließlich diffuse Schäden intrazerebral an Neuronen, Axonen und Gefäßen zu erzeugen; ein Gewicht wird an einer Führungsschiene auf den geschlossenen Schädel fallen gelassen (Marmarou et al., 1994). Hierbei kommt es zur neuronalen Nekrose, diffusem Axonschaden, mikrovaskulären Blutungen und glialer Schwellung mit resultierendem zytotoxischem Ödem (Engelborghs et al., 1998). Insgesamt kann das Ausmaß der Schädigung nur schwer quantifiziert werden, weshalb eine Reproduzierbarkeit nur schwerer messbar ist.

Wie bereits in 2.2 beschrieben kann im CCII-Modell das Ausmaß der Schädigung genau festgelegt und anschließend morphometrisch, z.B. mit Tetrazoliumchlorid (TTC) oder Cresyl violett, quantifiziert werden. Daraus resultiert eine gute Reproduzierbarkeit des Traumas. Mit den von uns gewählten Parametern (Bolzendurchmesser 5 mm, Durakontaktzeit 150 ms, Bolzengeschwindigkeit bei Auslösung 7 m/s, Bolzengeschwindigkeit bei Rückholbewegung 2.1 m/s) kann bei einer Kompressionstiefe von 1.0 mm im Mittel ein Kontusionsvolumen von 33-39.6  $\pm$  6.2 mm<sup>3</sup> (Thomale, 2001; Thomale et al., 2004; Sakowitz et al., 2006) und bei der von uns gewählten Kompressionstiefe von 1.5 mm von 43.96  $\pm$  4.56 mm<sup>3</sup> sieben Tage nach dem
Trauma erzielt werden (Griebenow et al., 2007). Der Schwerpunkt liegt beim CCII-Modell auf der mechanischen Krafteinwirkung auf den exponierten Kortex und nicht auf einer diffusen Schädigung. Daher finden sich alle Blutungstypen abhängig von der Traumaintensität aber nur ein geringer Axonschaden im perikontusionellen Kortex. Wie bereits erwähnt kommt es im CCII-Modell schon zwei Stunden nach dem Trauma sowohl zum vasogenen als auch zum zytotoxischen Hirnödem, welche in der Gesamtheit durch die Analyse des hemisphärischen Wassergehaltes quantifiziert werden können (Unterberg et al., 1997). Durch eine kortikale Kontusion werden im CCII-Modell gezielt Kortex mit grauer Substanz, subkortikale Marklager mit weißer Substanz, ipsilateraler Hippokampus und Thalamus geschädigt. Eine Contre-coup-Läsion tritt nur bei sehr hoher Traumaintensität auf (Thomale 2001; Griebenow 2007). Darüber hinaus kommt es vier Stunden nach dem Trauma perikontusionell zu einer Hypoperfusion mit Absinken der Flussrate um 40% aufgrund von Vasokonstriktion und mikrovaskulärer Stase, die Teil der sekundären Schädigung sind. Zwischen 24 und 48 Stunden nach dem Trauma sind eine kompensatorische Vasodilation und ein verstärkter Blutfluss messbar; sie bedingen somit eine Hyperperfusion mit dreifach erhöhten Flussraten verglichen mit den Ausgangswerten (Thomale et al., 2002).

Die Nachteile des CCII-Modells sind ebenfalls schon lange bekannt und wurden von Dixon und Hayes zusammengefasst: der Einschlagwinkel zwischen Bolzen und Kortexoberfläche ist nicht standardisiert; Größe und Lokalisation der Kraniotomie können nur subjektiv vom Operateur abgeschätzt werden und hängen von der Größe des Kraniums ab; die "Nullposition" des Schlagbolzens auf der Kortexoberfläche hängt vom Druck ab, mit der der Bolzen an den Kortex herangeführt und gehalten wird; Narkoseprotokoll und Beatmung der Versuchstiere beeinflussen die Ergebnisse zusätzlich (Dixon und Hayes, 1997). Zur Eingrenzung der Schwächen des Modells und Steigerung der Reproduzierbarkeit wurden alle Operationen von demselben Operateur, mit exakt denselben Einstellungen durchgeführt. Vor Beginn der Operationen wurde zudem ein festes Versuchsprotokoll mit Angaben zu Narkose, Beatmung, und Geräteeinstellungen vorgenommen.

### 4.3 Narkose

Verschiedene Narkotika können die physiologischen Parameter von Versuchstieren so verändern, dass schließlich die Versuchsergebnisse allein durch die Narkose verfälscht werden können. Im Folgenden wird der Einfluss der unter 2.3.1 beschriebenen Narkose auf die vorliegenden Ergebnisse diskutiert.

## 4.3.1 Wirkung von Isofluran im Allgemeinen

Die Vorteile des volatilen Anästhetikums Isofluran (rac-Difluoromethoxy-1-chlor-2,2,2trifluorethan) können wie folgt zusammengefasst werden (Larsen, 2006):

1. Einfache Handhabung des nicht brennbaren Gases

2. Geringer Blut/Gas-Verteilungskoeffizient und somit schnelle Narkoseeinleitung und kurze Aufwachphase

3. nur minimale hepatische (0.2%), hauptsächlich respiratorische Elimination und daher keine Leber- oder Nephrotoxizität

4. bei jüngeren Patienten keine Beeinflussung von Herzfrequenz und Herzzeitvolumen

5. gute Relaxation der Skelettmuskulatur.

Nachteilig können sich hingegen folgende Eigenschaften auswirken (Larsen, 2006):

1. dosisabhängige Vasodilation mit Abnahme des arteriellen Mitteldruckes und Zunahme der Koronarperfusion mit verringertem Sauerstoffverbrauch

2. gering negativ inotrope Wirkung am Herzmuskel

3. dosisabhängige Atemdepression, zum Teil wieder durch die chirurgische Stimulation antagonisiert

Zu einer potentiellen Verfälschung der Ergebnisse durch diese negativen Eigenschaften könnte es durch den Abfall des MAD und die dadurch bedingte zerebrale Hypoperfusion kommen. Wie in 4.3.2. näher ausgeführt wird der Abfall des MAD jedoch teilweise durch die verstärkte zerebrale Perfusion kompensiert. Auch eine etwaige Atemdepression könnte über veränderte Blutgaswerte und insbesondere über einen Anstieg des arteriellen CO<sub>2</sub>-Partialdruckes (aPCO<sub>2</sub>) die Hirnperfusion beeinflussen. Unter den von uns verwendeten Einstellungen zeigten die BGAs in den 7-Tages-Gruppen (3.1, Tab. 6), dass unter dem auch hier verwandten Narkoseprotokoll keine Entgleisungen von MAD, pCO<sub>2</sub> und pH vorkommen (Griebenow, 2007).

# 4.3.2 Wirkung von Isofluran im ZNS

Auch im ZNS hat Isofluran vielfältige Wirkungen. Isofluran führt über eine Vasodilatation der intrazerebralen Gefäße (Matta et al., 1999) zu einer verstärkten Hirnperfusion, die

theoretisch der posttraumatischen Hypoperfusion entgegenwirken könnte. Da das gesteigerte Blutvolumen allerdings auch zu einem Anstieg des ICP führt, wird wohl der potentiell positive Effekt der verbesserten Perfusion durch den schädigenden und ggf. ödemfördernden Anstieg des ICP möglicherweise ausgeglichen. Der Hirnstoffwechsel und mit ihm der zerebrale Sauerstoffverbrauch ist unter Isoflurannarkose zudem verringert (Larsen, 2006). Trotz dieser bekannten Wirkungen von Isofluran bleiben unter Verwendung unsers Narkose- und Beatmungsprotokolls ICP und CPP im physiologischen Bereich (3.1, Tab. 6; Griebenow, 2007).

Vielfach wurden auch die neuroprotektive Eigenschaften von Isofluran untersucht. So konnte gezeigt werden, dass Isoflurannarkosen vor zerebraler Ischämie Gewebeschäden im Hirngewebe reduzieren können (Edmands und Hall, 2009; Kim et al., 2009). Allerdings scheint dieser Effekt nur bei männlichen Versuchstieren aufzutreten (Kitano et al., 2007). Auch nach CCII wurde eine Reduktion des Schädigungsausmaßes durch Isofluran im Hippokampus beobachtet (Statler et al., 2000, Statler et al., 2006). Darüber hinaus konnten für Isofluran antikonvulsive Wirkungen, die auf einer Verstärkung der GABAergen (Gamma-aminobutyric acid) Hemmung während der synaptischen Übertragung im Hippokampus beruhen, nachgewiesen werden (Isaeva, 2009). Demgegenüber wurde jedoch auch beobachtet, dass Isofluran sekundär generalisierte Krampfanfälle verstärken kann (Veronesi et al., 2008). Neben den positiven und neuroprotektiven Eigenschaften zeigte Isofluran auch supprimierende Fähigkeiten gegenüber neuronalen Progenitorzellen (Sall et al., 2009). Im ZNS von neonatalen Mäusen wirkte Isofluran neurotoxisch über die Reduktion von Synapsen und die Induktion apoptotischer Kaskaden (Head et al., 2009; Xie et al., 2008). Dem entgegengesetzt steht die schon erwähnte Isofluran-Präkonditionierung. Es wird vermutet, dass Isofluran das Schädigungsausmaß nach zerebraler Ischämie durch eine Reduktion der Apoptoserate begrenzt (Li et al., 2008; Li und Zuo, 2009). Es ist daher noch ungeklärt, ob Isofluran apoptotische Prozesse induzieren und/oder supprimieren kann und möglicherweise neuroregenerative Vorgänge behindert. Des Weiteren können schon geringe Dosen von 1% Isofluran die BHS im Thalamus öffnen, bei höhere Dosen von 3% öffnen sie sich auch im Kortex (Tetrault et al., 2008). Somit ist auch die Beteiligung an bzw. Verstärkung der Entwicklung eines vasogenen Ödems Isofluran Isoflurangabe durch möglich. Die kann außerdem Neurotransmitterausschüttungen und -konzentrationen beeinflussen. Eine verstärkte Ausschüttung von Azetylcholin (Gomez et al., 2000) und erhöhte Glutamatspiegel nach

vierstündiger Isoflurannarkose (Stover et al., 2000) wurden gemessen. Zudem kann es über die Suppression präsynaptischer NMDA-(N-Methyl-D-Aspartat-) Rezeptoren auch zu einer verringerten Dopaminfreisetzung kommen (Keita et al., 1999). Auch diese Verschiebung der sensiblen Konzentrationsgleichgewichte zwischen den einzelnen Neurotransmittern und die Erhöhung ihrer Konzentrationen müssen bei der Verwendung von Isofluran als Anästhetikum in der experimentellen Neurochirurgie berücksichtigt werden. Ein erhöhter Glutamatspiegel beispielsweise könnte im ZNS aufgrund seiner exzitatorischen Effekte durchaus zum sekundären Schaden eines SHT beitragen. Da dieser Effekt allerdings erst nach einer Narkosedauer von vier Stunden auftrat, war mit diesem Effekt bei den Operationen für die vorliegende Studie mit einer durchschnittlichen Narkosedauer von ca. 60-90 Minuten nicht zu rechnen.

Alles in allem muss von einer Beeinflussung der Versuchsergebnisse durch Isofluran ausgegangen werden. Um die Vergleichbarkeit zwischen den Gruppen der Therapiestudie zu gewährleisten, ist daher die Auswertung der genauen Narkosedauer jeder Operation notwendig. Für diese Studie wurde eine durchschnittliche Gesamtnarkosedauer von 78  $\pm$  21 Minuten (66 bis 102 Minuten) in der Verumgruppe und von 71  $\pm$  22 Minuten (55 bis 100 Minuten) in der Plazebogruppe ermittelt (siehe hierzu 3.1). Eine Verfälschung der Versuchsergebnisse durch unterschiedliche Narkoseregime ist durch diesen geringen Unterschied unwahrscheinlich, kann allerdings nicht vollkommen ausgeschlossen werden.

### 4.3.3 Wirkung von Lachgas im Allgemeinen

Lachgas (Stickoxydul, N<sub>2</sub>O) besitzt verglichen mit anderen volatilen Anästhetika nur geringe narkotische Potenz und wird daher nur additiv zur Dosiseinsparung anderer Anästhetika verwandt. Folglich werden so auch die unerwünschten Wirkungen dieser Anästhetika reduziert. Wie Isofluran wird N<sub>2</sub>O nicht metabolisiert, sondern wieder ganz über die Lunge abgeatmet. Aufgrund seiner geringen Löslichkeit, flutet es dort schnell während der Einleitung an, die Wirkung lässt umgekehrt auch genauso schnell wieder nach. Die kardiovaskulären Wirkungen von N<sub>2</sub>O bestehen aus negativer Inotropie und zentraler Sympathikusstimulation mit MAD-, Herzfrequenz- und Herzzeitvolumen-Steigerung. Da diese Wirkungen jedoch sehr gering sind, werden sie in der klinischen Situation selten bemerkt. Auch auf die Atmung wirkt N<sub>2</sub>O maximal gering depressiv. Toxische Wirkungen des Gases sind nicht bekannt (Larsen, 2006).

#### 4.3.4 Wirkung von Lachgas im ZNS

Im Gehirn wirkt sich der NMDA-Antagonist N<sub>2</sub>O (David et al., 2006) auf die metabolische Rate zentraler Hirnstrukturen aus (Reinstrup et al., 2008). Außerdem zeigte sich, dass N<sub>2</sub>O bei längerer Verabreichung eine entzündliche Reaktion mit erhöhter Anzahl von Leukozyten und neutrophilen Granulozyten auslöst (Lehmberg et al., 2008). Hervorzuheben sind auch die beobachteten neurotoxischen Eigenschaften dieses Gases. Erst kommt es zu einer reversiblen Vakuolisierung in Neuronen und bei längerer Exposition ( $\geq$  acht Stunden) mit höheren N<sub>2</sub>O-Konzentrationen zum Absterben der Neurone (Jevtovic-Todorovic et al., 2003). Das neurotoxische Potenzial von N<sub>2</sub>O wird seiner NMDA-Blockade zugeschrieben. Dem entgegengesetzt konnte jedoch auch die Fähigkeit des Gases zur Neuroprotektion in Ischämiemodellen nachgewiesen werden (Haelewyn et al., 2008). Im Kortex konnte in einem Modell mit Okklusion der A. cerebri media somit der Neuronenverlust um 70% reduziert werden (David et al., 2003). Zusammengefasst muss also auch mit einer Beeinflussung von Verum- und Plazebogruppe durch den Zusatz von N<sub>2</sub>O gerechnet werden, sollte allerdings wegen der in 4.3.2 genannten Gründe die Therapiestudie nicht verfälschen.

### 4.3.5 Bupivacain hydrochlorid

lokale Anästhetikum Bupivacain (1-Butyl-N-(2,6-dimethylphenyl)-2-Das piperidinecarboxamide) kommt beim Menschen vornehmlich bei Spinal- und Periduralanästhesien zum Einsatz und wird somit besonders in der Geburtsmedizin eingesetzt. Es ist um ein Vielfaches wirksamer als z.B. Lidocain, damit allerdings auch nebenwirkungsreicher. Diese kardiotoxischen und neurotoxischen Wirkungen der Substanz entstehen durch die anhaltende Blockade von Natriumkanälen der Zellen (Larsen, 2006). Letztlich kommt es zum apoptotischen Zelltod und dadurch zum Gewebeschaden (Unami et al., 2003). In der vorliegenden Studie wurde das Lokalanästhetikum subkutan und intramuskulär in einer Dosis von 1mg/kgKG und einer Konzentration von 0.1% injiziert. Dies stellt auch für den Menschen eine eher geringe Dosis dar bei empfohlener Maximaldosis von ca. 2-3mg/kgKG. Allerdings muss nur bei sehr hohen Injektionsdosen davon ausgegangen werden, dass eine merkliche Resorption aus Haut, Fett- und Muskelgewebe stattfindet (Larsen, 2006). Daher ist mit systemischen Wirkungen und Nebenwirkungen, entsprechend denen bei spinaler, periduraler oder intravasaler Injektion, in dieser Studie nicht zu rechnen.

### 4.4 Therapiestudie

#### 4.4.1 Zeitpunkt der Injektion

Bezüglich des Zeitpunktes der Injektion sind einerseits die realistische Nachahmung des Unfallmanagements und andererseits die maximale Wirkungsfähigkeit des Therapeutikums zu beachten. In der vorliegenden Studie wurde exogenes Ubiquitin innerhalb von 15 Minuten im Bolus i.v. verabreicht, um möglichst früh in die sekundären Schädigungsprozesse nach SHT einzugreifen. In der klinischen Situation trifft ein Krankenwagen in Deutschland nach Alarmierung jedoch erst nach 11 Minuten am Unfallort ein (Deutscher Verkehrssicherheitsrat e.V., 2007). Weitere Zeit vergeht bereits, bis nach einem Unfall der Notruf abgesetzt wird, wobei vor allem bei unbemerkten Unfällen in der eigenen Wohnung mit einer langen Alarmierungszeit zu rechnen ist.

Es ist bekannt, dass die inflammatorischen Prozesse nach SHT zwar unmittelbar nach dem Trauma beginnen, allerdings bleiben sie anschließend zum Teil mehrere Tage bis Wochen nach dem Trauma nachweisbar. Die frühsten Veränderungen der hier untersuchten immunologischen Faktoren zeigen die Zytokine; erste Spuren von IL-1mRNS sind beispielsweise schon 15 Minuten nach dem Trauma nachweisbar, erreichen ihre maximale Expression nach drei bis vier Stunden und kehren innerhalb von 48 Stunden wieder auf Basiswerte zurück (Ransohoff und Benveniste, 2006). Andere Faktoren wie ED1-positive periphere mononukleäre Blutzellen und Mikrogliazellen erreichen das Hirnparenchym später und zeigen ihre maximale Konzentration erst vier bis sieben Tage nach dem Trauma (Streit et al., 1999). Aufgrund der hier exemplarisch dargestellten Kinetik der untersuchten Prozesse kann von einem adäquaten Zeitpunkt der Ubiquitininjektion in dieser Studie ausgegangen werden. Darüber hinaus erscheint es möglich, dass die Applikation von exogenem Ubiquitin auch nach mehr als 15 Minuten durchaus noch Einfluss auf immunologische Prozesse nach SHT haben kann. Weitere Studien zur verzögerten Therapie mit Ubiquitin wären an dieser Stelle sinnvoll. Aufgrund der Halbwertzeit von Ubiguitin von 2-2.5 Stunden (Hanna et al., 2003) erscheint es auch angebracht, die mehrmalige Gabe und Dauerinfusion von Ubiquitin zu untersuchen.

### 4.4.2 Physiologische Parameter

### 4.4.2.1 Gewichtsverlust

Die Analyse der Gewichtsverluste zu allen Zeitpunkten zeigt, dass die Tiere der Verumgruppen keinen signifikant höheren Gewichtsverlust aufwiesen. Diese Analyse gibt einen Anhalt für die geringe Toxizität bzw. das geringe Nebenwirkungsprofil von exogenem Ubiquitin und steht im Einklang mit allen anderen Therapiestudien zu exogenem Ubiquitin (Majetschak et al., 2004b; Earle et al., 2005, 2006; Griebenow et al., 2007; Garcia-Covarrubias et al., 2008). Es wurden bisher keine nachteiligen Effekte oder Schäden durch den Einsatz der Substanz nachgewiesen.

4.4.2.2 pH-Wert, Basenüberschuss, Hämoglobingehalt, pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub>

Die Auswertung der arteriellen Blutgasanalyse zeigte die Normoventilation der Versuchstiere zu allen Untersuchungszeitpunkten. Die Gabe von Ubiquitin veränderte die Parameter der Blutgasanalyse gegenüber den Werten nach Injektion isotoner Kochsalzlösung nicht.

Die Plasmahämoglobinkonzentration wurde nur in der 7-Tages-Plazebogruppe signifikant beeinflusst. Nach dem Trauma sank der Hb-Wert in beiden Gruppen ab (p > 0.05). Dieser Effekt wird auf den Blutverlust während der Präparation der Versuchstiere zurückgeführt. Nach Substanzgabe kam es dann in der Plazebogruppe zu einer signifikanten Reduktion der Hb-Konzentration gegenüber dem Ausgangswert und zu einer geringer signifikanten Reduktion gegenüber dem Wert nach dem Trauma (Tab.6). Dieser Abfall kann auf den "Verdünnungseffekt" durch die Injektion von NaCl 0.9% zurückgeführt werden. In der Ubiquitingruppe kann dieser Hb-Verlauf auch nachvollzogen werden; statistisch signifikante Reduktionen der Hb-Konzentration durch Gabe eines zur NaCl-Injektion äquivalenten Volumens an exogenem Ubiquitin wurden jedoch nicht beobachtet. Bei der Auswertung der Hb-Werte in der Ubiguitingruppe ist zu beachten, dass sich die Molekülgrößen beider Testsubstanzen voneinander unterscheiden. Exogenes Ubiquitin trägt als Makromolekül mit einer Molekülmasse von 8.5 kDA im Gegensatz zu NaCl 0.9% zum kolloidosmotischen Druck des Plasmas bei. Dies kann zu einem leichten Flüssigkeitsübertritt nach intravasal führen (Klinke und Silbernagel, 2001). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass exogenes Ubiquitin über gefäßstabilisierende Wirkungen verfügt, die den diffusen Flüssigkeitsstrom ins

Interstitium nach Polytrauma verringern (Majetschak et al., 2004a). Möglicher Weise kam es daher aufgrund des Flüssigkeitseinstroms entlang des osmotischen Gradientens nach intravasal und der Gefäßstabilisierung nach dem Trauma zu einem Verdünnungseffekt durch die Substanz, so dass die Hb-Werte in der Ubiguitingruppe nicht signifikant niedriger lagen als bei Plazebotieren vor dem Trauma, nach dem Trauma und nach Substanzgabe. Diese fehlende signifikante Hb-Reduktion infolge der Substanzgabe lässt einerseits durch ein geringes Applikationsvolumen erklären, sowie mit der auffallend höheren Standardabweichung in der Ubiquitingruppe erklären. Diese bewegte sich in der Ubiquitingruppe zwischen  $\pm$  1.4 und  $\pm$  2.0, wohingegen sie in der Plazebogruppe nur zwischen  $\pm$  0.6 und  $\pm$  0.9 lag. Außerdem ist nicht auszuschließen, dass weitere individuelle Faktoren die Hb-Konzentration beeinflussten und somit eine höhere Standardabweichung verursachten. Es ist daher anzunehmen, dass auch die Injektion des in NaCl 0.9% gelösten exogenen Ubiquitins den gleichen "Verdünnungseffekt" hervorrief wie das gleiche Volumen an reinem NaCl 0.9%, dass dies allerdings aufgrund der hohen Standardabweichung in dieser Gruppe nicht bewiesen werden kann.

Die Messungen kurz vor der Hirnentnahme ergaben eine nicht signifikante Erholung der Hb-Werte in beiden Gruppen gegenüber den Werten nach dem Trauma. In der Plazebogruppe blieb der Hb-Wert gegenüber dem Ausgangswert noch signifikant verringert. Aus diesem Verlauf lässt sich ableiten, dass es innerhalb der sieben Tage nach dem Trauma zu einer Anregung der Erythropoese kam, und somit der Hb-Wert allmählich wieder anstieg. Die Neubildung von Erythrozyten, die aufgrund des intialen Abfalls in beiden Gruppen einsetzte scheint in der Ubiquitingruppe etwas früher oder schneller erfolgt zu sein, da an Tag 7 ein um 0.8 mg/dl höherer mittlerer Hb-Gehalt in der Verumgruppe gemessen wurde, was zumindest der physiologischen Neubildungsrate von 1% Erythrozyten pro Tag entspricht (Klinke und Silbernagel, 2001). In der Plazebogruppe wurde die physiologische Neubildungsrate innerhalb der siebentägigen Untersuchungsdauer nicht erreicht. Hierbei ist zu beachten, dass unter anderem die nach CCII erhöhten TNF- $\alpha$ -Level die Proliferation hämatopoetischer Progenitor- und Stammzellen supprimieren können (Turgeon, 2004). Bezogen auf die vorliegende Studie bliebe dann allerdings unklar warum dieser Effekt trotz tendenziell geringerer TNF- $\alpha$ -Spiegel in der Plazebogruppe nach 72 Stunden deutlicher in Erscheinung trat. Zudem wurde beobachtet, dass exogenes Ubiquitin einen supprimierenden Effekt auf hämatopoetische Stammzellen in vitro ausüben kann (Daino et al., 1996). Ob diese Suppression auch TNF- $\alpha$ -abhängig ist, wurde noch nicht untersucht und auch in unserer Studie ergab sich kein Hinweis auf eine Hämatosuppression durch exogenes Ubiquitin. Schließlich bleibt zu beachten, dass sowohl die Hämatopoese als auch die Vorgänge nach CCII und die Wirkungen von TNF- $\alpha$  und exogenem Ubiquitin äußerst komplex sind. Daher ist es durchaus möglich, dass die Erkenntnisse bezüglich jeder dieser Faktoren so bald diese im CCII-Modell in vivo zusammentreffen, so nicht mehr zutreffen sind.

### 4.4.2.3 ICP

Die ICP-Werte lagen zu allen Messzeitpunkten im physiologischen Bereich. Es konnte exogenem Ubiquitin außerdem keine ICP-senkende oder -erhöhende Eigenschaft nachgewiesen werden, da keine Unterschiede zwischen der Verum- und Plazebogruppe festgestellt wurden.

### 4.4.2.4 Kontusionsstärke

Ausgehend von unserer vorherigen Studie mit dem CCII-Modell (Griebenow et al., 2007) sollte auch in der vorliegenden Studie eine moderates Trauma durch eine Eindringtiefe des Schlagbolzens von 1.5 mm erzeugt werden (Anderson et al., 2008). Die makroskopische Beurteilung der Kontusionsstärke und des Subduralhämatoms sowie die mikroskopische Untersuchung der Dura mater auf Einrisse durch das Trauma zeigten eine sehr gute Vergleichbarkeit der Schäden in beiden Gruppen. Außerdem wird die schon zuvor beschriebene gute Reproduzierbarkeit des CCII-Modells (Thomale, 2001) auch durch diese Arbeit unterstützt.

# 4.4.3 RT-PCR

# 4.4.3.1 TNF- $\alpha$ -Expression

Ein Anstieg von TNF- $\alpha$  kann 30 min nach SHT gemessen werden. Maximale TNF- $\alpha$ -Level werden 3-8 Stunden danach erreicht, und Basiswerte liegen 24 Stunden nach dem Trauma wieder vor (Ransohoff und Benveniste, 2006). Auch in der vorliegenden Studie wurde eine verstärkte TNF- $\alpha$ -Expression vier Stunden nach CCII gemessen. Zu diesem Zeitpunkt bestand kein signifikanter Unterschied zwischen der Ubiquitin- und der Plazebogruppe. Verglichen mit den 4-Stunden-Gruppen zeigten sich nach 72 Stunden signifikant geringere TNF--mRNS-Level in beiden Gruppen. Diese Level können anhand der beschriebenen Kinetik der TNF-α-Expression als Basislevel beider Gruppen bezeichnet werden. Zudem fielen die TNF- $\alpha$ -mRNS-Level in der Plazebogruppe auf tiefere Werte ab, so dass nach 72 Stunden ein Trend mit höheren TNF- $\alpha$ -Werten in der Ubiquitingruppe bestand (p<0.1). Die Auswirkungen einer verstärkten TNF- $\alpha$ -Expression nach SHT sind noch nicht eindeutig geklärt. In der akuten Phase des Traumas scheint TNF- $\alpha$  unter anderem zum Hirnödem, zum Zerfall der BHS und zu hippokampalem Zelltod beizutragen (Shohami et al., 1997). Andererseits führt ein völliges Fehlen von TNF- $\alpha$  vier Wochen nach SHT zu einem größeren Verlust an Kortexmasse und einer schlechteren Regeneration motorischer Funktionen (Scherbel et al., 1999). Dies könnte beispielsweise auf die Fähigkeit von TNF- $\alpha$  zurückzuführen sein, welche dazu beitragen Makrophagen anzulocken und Mikroglia zu aktivieren, um Aufräumarbeiten und regenerative Vorgänge zu gewährleisten (Cheng et al., 1992). Außerdem vermittelt die Bindung von TNF- an den TNF-R2 neuroprotektive Mechanismen (Fontaine et al., 2002). Darüber hinaus induziert ein Anstieg von TNF- $\alpha$  neuronales Wachstum über den NF-kB- oder C/EBPb-(CCAAT/enhancer-binding-protein beta-) Signalweg und konsekutiver Ausschüttung von BDNF aus Astrozyten (Saha et al., 2006). Zusammenfassend kann Ubiquitin die TNF-α-Expression nicht unmittelbar nach CCII beeinflussen und so zu einer Aggravation oder Milderung der inflammatorischen Reaktion beitragen. Die etwas stärkere TNF- $\alpha$ -Expression 72 Stunden nach CCII in der Ubiguitingruppe geht jedoch mit einer verstärkten Mikrogliaaktivierung einher und trägt so möglicher Weise zur Verbesserung der immunologischen Situation mit Neuroprotektion und -Regeneration im Verlauf nach SHT bei, was sich beispielsweise in einer Reduktion des Kontusionsvolumens sieben Tage nach CCII widerspiegelt (Griebenow et al., 2007). Weitere Studien zum längerfristigen Verlauf des TNF- $\alpha$ -Spiegels und dem neurologischen Outcome nach CCII und Ubiguitingabe könnten die klinische Einsetzbarkeit näher beleuchten.

4.4.3.2 IL-1 $\beta$ - und IL-1ra-Expression

Die Expression der IL-1 $\beta$ -mRNS erreichte sowohl vier Stunden als auch 72 Stunden nach CCII deutlich höhere Werte als die von TNF- $\alpha$ . Wie schon für TNF- $\alpha$  beschrieben sanken auch die IL-1 $\beta$ -Level in beiden Gruppen von vier Stunden auf 72 Stunden

signifikant ab. Auch in vorherigen Studien wurde ein sehr früher Anstieg von IL-1 $\beta$ -mRNS innerhalb von 15 Minuten beobachtet. Die maximale Expression lag bei drei bis vier Stunden und ein Abfall auf Basislevel wurde 24-48 Stunden nach dem Trauma erreicht (Ransohoff und Benveniste, 2006). Es ergaben sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen nach vier oder nach 72 Stunden. Daher wurde geschlussfolgert, dass exogenes Ubiquitin nicht in die IL-1 $\beta$ -Expression nach CCII eingreift.

Es ist bekannt, dass die Expression des IL-1-Rezeptorantagonists signifikant mit der IL-1 $\beta$ -Expression korreliert (Hutchinson et al., 2007). In der vorliegenden Studie konnte diese Korrelation für die Ubiquitingruppe nach 72 Stunden nur tendenziell nachvollzogen werden. Aus den vorliegenden Ergebnissen kann entnommen werden, dass die IL-1ra-Expression erst ansteigt, nachdem schon ein gewisser IL-1 $\beta$ -Spiegel erreicht wurde, um die IL-1 $\beta$ -Wirkung durch Antagonisierung zu regulieren. Diese Studie zeigt, dass exogenes Ubiquitin das Verhältnis IL-1 $\beta$ -IL-1ra nicht merklich verschieben kann.

### 4.4.3.3 IL-6-Expression

Innerhalb von vier Stunden nach CCII zeigte die relative IL-6-mRNS-Expression beider Gruppen deutlich erhöhte Werte. Im Vergleich dazu sank sie bis zum Zeitpunkt 72 Stunden nach CCII signifikant ab. Benveniste und Ransohoff (2006) fassten zuvor zusammen, dass die maximale IL-6-Expression nach SHT ein altersabhängiges Maximum 8 Stunden nach dem Trauma erreicht, wobei das höhere Alter bei Ratten mit höheren IL-6-Spiegeln assoziiert war. Daher muss bei der Auswertung der vorliegenden Ergebnisse beachtet werden, dass der Einfluss des Alters der Ratten die Streuung der Daten verstärkt haben kann.

Darüber hinaus zeigte diese Studie, dass die Gabe von exogenem Ubiquitin keinen signifikanten Einfluss auf die IL-6-mRNS-Produktion weder nach vier noch nach 72 Stunden hat. Möglicherweise hätte die Untersuchung weiterer Zeitpunkte nach CCII zu einem signifikanten Unterschied geführt, insbesondere wenn berücksichtigt wird, dass die tendenziell erhöhten TNF- $\alpha$ -Level unter anderem die IL-6-Synthese verstärken können (Kadhim et al., 2008). Die Ergebnisse der IL-6-Quantifizierung werfen eine ähnliche Diskussion wie die Ergebnisse der TNF- $\alpha$ -Quantifizierung auf. Es ist bekannt, dass ein Überschuss an IL-6 zu einem dauerhaften Entzündungszustand führt, der auf

der Überaktivierung von Astrozyten, Mikroglia, Leukozyten und weiteren inflammatorische Zytokinen basiert (Campbell el al., 1993). Es wurde allerdings auch festgestellt, dass IL-6 oxidativen Stress und apoptotischen Zelltod verringern (Penkowa et al., 2003) und sogar die neuronale Proliferation anregen kann (Knezevic-Cuca et al., 2000). Darüber hinaus unterstützen erhöhte IL-6-Level die TNF- $\alpha$ -getriggerte Aktivierung residenter Mikroglia bzw. die Umwandlung dieser in Makrophagen (Hutchinson et al., 2007). Dies unterstützt die Annahme, dass die vermehrte Anzahl ED1-positiver Zellen sieben Tage nach dem Trauma im perikontusionellen Kortex der Ubiquitingruppe zu großen Anteilen durch die vermehrte Produktion dieser proinflammatorischen Zytokine bedingt war. Letztlich wird davon ausgegangen, dass sich auch die Ubiquitin-vermittelte verstärkte IL-6-Expression nicht negativ auf das Outcome nach CCII in der Ratte auswirkt, da keine unmittelbaren Anzeichen einer Toxizität der Substanz in dieser und vorherigen Studien beobachtet wurde. Im Gegenteil, die Studienlage deutet darauf hin, dass exogenes Ubiquitin ein potentiell wirksames Therapeutikum sein könnte, was Kontusionsvolumen und Flüssigkeitsübertritte nach SHT verringert (Griebenow et al., 2007; Earle et al., 2005).

### 4.4.3.4 IL-10-Expression

Die Quantifizierung der IL-10-Expression vier Stunden nach CCII ergab zwar eine Erhöhung gegenüber den Werten nach 72 Stunden, allerdings lagen die relativen mRNS-Level im Vergleich zu denen der anderen Zytokine viel tiefer. Der Abfall der IL-10-Level von vier nach 72 Stunden erreichte außerdem keine statistische Signifikanz. Auch aus einer früheren Zytokinstudie unserer Arbeitsgruppe, die die pathophysiologischen Auswirkungen verschiedener Traumaintensitäten im CCII-Modell untersuchte, wird ersichtlich, dass die IL-10-Expression nach CCII bei moderaten Traumata im Vergleich zu den anderen betrachteten Zytokinen gering ausfällt und von vier auf 24 Stunden wieder abfällt (Thomale, 2006). Des Weiteren hatte exogenes Ubiquitin keinen signifikanten Einfluss auf die IL-10-mRNS-Expression vier Stunden nach dem Trauma. Nach 72 Stunden hingegen lagen die IL-10-Level in der Ubiquitingruppe signifikant tiefer als in der Plazebogruppe. Zu diskutieren bleiben nun die potentiellen Auswirkungen dieser Modulation durch exogenes Ubiquitin. Traditionell als antiinflammatorisches Zytokin bekannt, zeigte sich IL-10 auch als ein Zytokin, das das neurologische Outcome nach SHT verbessern kann (Knoblach und Faden, 1998).

Die antiinflammatorische Wirkung von IL-10 basiert zum Teil auf dessen Gleichgewicht mit TNF- $\alpha$ ; ein Anstieg von TNF- $\alpha$  bedingt ein Absinken der IL-10-Konzentration (Csuka et al., 1999), hingegen verursacht der Anstieg von IL-10 eine Reduktion der TNF- $\alpha$ -Sekretion (Knoblach und Faden, 1998). Außerdem korrelieren die IL-10-Level mit der Traumaintensität, d.h. die höchsten IL-10-Level werden bei besonders schweren Schädel-Hirn-Traumata während der ersten 24 Stunden erreicht (Stensballe et al., 2009). Neben der Beeinflussung der TNF- $\alpha$ -Spiegel wirkt IL-10 auch hemmend auf Antigen präsentierende Zellen, indem es die MHC-(Major Histocompatibility Complex-)II-Moleküle auf deren Zelloberfläche herunter reguliert (de Waal Malefyt et al., 1991). Aus diesen Erkenntnissen zu IL-10 erschließt sich, dass die verringerten IL-10-Level 72 Stunden nach CCII in der Ubiquitingruppe im Einklang mit den vorliegenden Ergebnissen zu Makrophagen/Mikroglia und TNF- $\alpha$  steht. Erhöhte TNF- $\alpha$ -Spiegel bedingen ein Absinken der IL-10-Level in der Ubiguitingruppe. Diese IL-10-Reduktion wiederum erlaubt die volle Funktionsfähigkeit bzw. Aktivierung von Makrophagen und Mikroglia, die dann die Antigenpräsentation und Phagozytose nach CCII übernehmen können. Alles in allem kommt es neben einem ersten Anstieg an IL-10 im Liguor in den ersten Tagen nach SHT zu einem weiteren, kleineren Anstieg in der zweiten Woche nach SHT (Csuka et al., 1999). In dieser Spätphase übt es einen hemmenden Effekt auf die TNF- $\alpha$ -Produktion aus, hemmt jedoch auch die Aktivierung der Zellen, die unter anderem für den Abtransport von Detritus im Hirnparenchym benötigt werden (Knoblach und Faden, 1998; de Waal Malefyt et al., 1991). Exogenes Ubiquitin könnte diese Aufräumfunktion durch Makrophagen und Mikroglia möglicherweise über eine partielle Suppression der IL-10-Produktion als potentiellen neuroprotektiven Effekt der Spätphase ermöglichen.

### 4.4.4 Immunhistochemie

### 4.4.4.1 Neutrophile Granulozyten

Die immunhistochemischen Färbungen durch die Antikörper HIS48, MPO nach 24 Stunden und nach sieben Tagen ergab keine statistisch relevanten Unterschiede zwischen den Ubiquitin- und Plazebogruppen. Auch die Färbung OX-42-positiver Zellen, die neben Makrophagen, Mikroglia und dendritischen Zellen auch Granulozyten färbt, ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. Die Studie zeigt daher, dass exogenes Ubiquitin die Infiltration durch neutrophile Granulozyten sowohl 24 Stunden als auch sieben Tage nach CCII nicht modifiziert.

Ablesbar aus den Ergebnissen bleibt jedoch die typische Vermehrung neutrophiler Granulozyten in der Kontusion, dem perikontusionellen Kortex und dem ipsilateralen Hippokampus gegenüber der kontralateralen Hemisphäre, da diese nach dem Trauma die für die Neutrophileninfiltration nötigen Selektine und Integrine nicht exprimiert (Carlos et al., 1997). Darüber hinaus wird das Maximum der Infiltration durch Neutrophile nach 24-96 Stunden abhängig von der Art des Traumamodelles erreicht (Carlos et al., 1997; Whalen et al., 1998; Thomale et al., 2006); im CCII-Modell zeigte sich ein Anstieg neutrophiler Granulozyten (HIS-48) in der Kontusion nach 24 und 72; sieben Tage nach dem Trauma war die Anzahl HIS-48-positver Zellen wieder etwas verringert in den untersuchten Bereichen (Thomale et al., 2007). Auch in der vorliegenden Studie waren HIS48- und MPO-positive Zellen 24 Stunden nach CCII stark erhöht und fielen dann auf niedrigere Werte nach sieben Tagen wieder ab, ohne jedoch die Werte der Basisinfiltration der kontralateralen Hemisphäre während des Untersuchungsrahmens wieder zu erreichen.

### 4.4.4.2 Periphere mononukleäre Blutzellen (PMBC)/ Mikroglia

Die Färbung peripherer mononukleärer Blutzellen wie Makrophagen und von aktivierten Mikroglia erfolgte hauptsächlich durch ED1 und etwas unspezifischer durch OX-42. Die OX-42-Färbung ergab 24 Stunden nach CCII keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen und die ED1-Färbung galt 24 Stunden nach dem Trauma als negativ. Alles in allem moduliert exogenes Ubiquitin die Infiltration von PMBC bzw. die Aktivierung von lokalen Mikroglia 24 Stunden nach dem Trauma nicht. Nach sieben Tagen waren nur wenige OX-42-positive Zellen vorhanden, allerdings war die Anzahl ED1-positiver Zellen stark angestiegen. Dies ist eine bekannte Reaktion auf ein SHT, nach dem Mikroglia zunächst hypertrophieren und anschließend deutlich proliferieren (Streit et al., 1999). Ihre Aktivierung ermöglicht es den Astrozyten wie in 1.2.3.2.3 beschrieben, aktive Bewegungen in Richtung der Läsion auszuführen. Die Arbeitsgruppe Streit et al. beobachtete 1999, dass die maximale Anzahl aktivierter Mikroglia/PMBC vier bis sieben Tage nach dem Trauma erreicht wird und, dass auch noch nach 14 Tagen ED1-positive Zellen nachweisbar bleiben (Raghavendra Rao et al., 2000). Außerdem ist zu bemerken, dass die Aktivierung von Mikroglia bzw. die PMBC-Infiltration höchst selektiv auf die verletzte Hemisphäre begrenzt ist, da keine ED1positiven Zellen im kontralateralen Kortex sieben Tage nach dem Trauma aufgefunden wurden. Aus dieser Selektivität lässt sich schließen, dass es sich bei der Mehrzahl ED1positiver Zellen möglicherweise um aktivierte Mikroglia gehandelt hat, da eine lokale Aktivierung regional selektiver erfolgen kann als das Anlocken peripherer Blutzellen. Auch der Vergleich mit der zwar geringen aber doch deutlich vorhandenen Infiltration neutrophiler Granulozyten in der kontralateralen Hemisphäre bestätigt diese Annahme. Zudem stellten weitere Arbeitsgruppen fest, dass aktivierte Mikroglia mit höherer Wahrscheinlichkeit im Rattenhirn aufzufinden sind als aktivierte periphere Blutzellen (Imai et al., 1997) und, dass sich die meisten in geschädigtem Gewebe aufgefundenen Makrophagen aus lokalen Mikroglia entwickeln (Schilling et al., 2003). Darüber hinaus wird die Infiltration des Hirngewebes durch PMBC unter anderem durch interzelluläre Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 ermöglicht. Nach CCII kommt es daher auch zur verstärkten Bildung von ICAM-1 in Blutgefäßen (Thomale et al., 2006). Allerdings wird die maximale Anzahl dieser Moleküle schon nach 24-72 Stunden erreicht und liegt 7 Tage nach dem Trauma wieder deutlich tiefer, was einer verstärkten Infiltration durch PMBC 7 Tage nach dem Trauma eher widerspricht (Thomale et al., 2006). Somit gehen auch wir in unserem CCII-Modell davon aus, dass es sich bei den ED1-positiven Zellen hauptsächlich um nach SHT aktivierte Mikrogliazellen handelte.

Weiterhin zeigte sich bei dem Vergleich der Plazebo- und der Ubiquitingruppe eine signifikant stärkere Aktivierung von Mikroglia in der Verumgruppe sieben Tage nach dem Trauma. Diese vermehrte Mikrogliaaktivierung könnte unter anderem auf die verstärkte TNF- $\alpha$ -mRNS-Expression 72 Stunden nach dem Trauma in der Ubiquitingruppe zurückzuführen sein, da TNF- $\alpha$  einen bekannten Stimulus der Mikrogliaaktivierung darstellt (Gebicke-Harter, 1998). Des Weiteren könnten die vermehrt aktiven Mikroglia aufgrund ihrer höheren Anzahl und dadurch insgesamt stärkeren IL-6-Synthese, die vermehrte IL-6-mRNS-Expression in der Ubiquitingruppe erklären (Folkersma et al., 2008). Es bleibt nun die Frage zu klären, ob aktivierte Mikroglia nach SHT protektive oder eher destruktive Effekte zeigen. Wie bereits dargestellt können Mikroglia innerhalb der ersten Tage nach SHT unter anderem Neurotoxine produzieren und den sekundären Zellschaden verstärken (Stoll et al., 1998; Lünemann et al., 2006; Streit et al., 2002). Allerdings scheint die Funktion von

Mikrogliazellen stark vom Zeitpunkt ihrer Aktivierung und vom Zustand der Neurone nach dem Trauma abhängig zu sein; denn es wurden ihnen in letzter Zeit auch neuroprotektive Eigenschaften nachgewiesen, die zum Beispiel zur Remyelinisierung beschädigter Neurone in den ersten zwei bis vier Tagen nach dem Trauma beitragen und oxidativen Stress vermindern (Streit et al., 2000; Streit et al., 2005; Armbrust et al., 2008). Die Ergebnisse dieser Studie legen nahe, dass aktivierte Mikroglia in der akuten Phase des Schädel-Hirntraumas hauptsächlich phagozytierende und zytotoxische Funktionen als Reaktion auf die Schwere des primären Gewebeschadens erfüllen (Gebicke-Harter, 1998). Während der subakuten Phase steigert exogenes Ubiquitin die Mikrogliaaktivierung möglicherweise, um regenerative Prozesse und den Schutz überlebender Neurone einzuleiten (Streit, 2000).

An dieser Stelle muss weiterhin diskutiert werden, dass eine hohe Anzahl an Immunzellen wie Makrophagen und Mikroglia in der Kontusion und im PC Kortex zu Fehlern in der Auswertung des Kontusionsvolumens mittels 2,3,5, Triphenyl, 2H-Tetrazoliumchlorid (TTC) führen kann (Liszczak et al., 1984). TTC wird zur Färbung gesunder Zellen mit intakten Mitochondrien eingesetzt (Joshi et al., 2004). In der Kontusion kommt es daher nicht zur Anfärbung des zerstörten Nervengewebes, allerdings können aktive Immunzellen sehr wohl angefärbt werden (Liszczak et al., 1984), was schließlich zu einer Unterschätzung des Kontusionsvolumens führen könnte. Um abschließend zu klären ob exogenes Ubiquitin tatsächlich neuroprotektive Eigenschaften mit Reduktion des Kontusionsvolumens nach SHT besitzt (Griebenow et al., 2007), wäre daher eine erneute Auswertung des Kontusionsvolumens nach Cresylviolet oder Hämatoxylin-Eosin-Färbung angebracht.

### 4.4.4.3 Astrozyten

Durch GFAP angefärbte Astrozyten waren in beiden Gruppen sieben Tage nach CCII im perikontusionellen Kortex hoch signifikant gegenüber dem kontralateralen Kortex vermehrt. In den ipsilateralen Hippokampi zeichnete sich im Vergleich zu den kontralateralen Hippokampi die gleiche Tendenz ab. Zudem ließ die Morphologie der Astrozyten auf ihre Aktivierung in der ipsilateralen Hemisphäre einhergehend mit der Verkürzung ihrer Fortsätze und der Verdickung ihrer Zellkörper schließen. In der Kontusion fanden sich vor allem nekrotisches und fibrotisches Gewebe, infiltrierende und aktivierte Immunzellen und nur vereinzelt Neurone aber keine Astrozyten. Die reaktive Astrogliose bzw. astrozytäre "Narbe" nach SHT ist bekannt und bereits gut charakterisiert. Zunächst kommt es durch die unmittelbaren Auswirkungen des Traumas zu einem maximalen Verlust an Astrozyten nach 24 Stunden (Zhao et al., 2003). Anschließend proliferieren sie innerhalb von 14 Tagen nach CCII und übertreffen die Anzahl der Astrozyten der kontralateralen Hemisphäre wie auch in der vorliegenden Arbeit (Raghavendra Rao et al., 2000). Aus den GFAP-Färbungen ergab sich kein Anhaltspunkt für eine Beeinflussung der Astrozytenzahl durch exogenes Ubiquitin und auch die Astrozytenmorphologie zeigte keinen Unterschied zwischen den Gruppen.

### 4.4.5 TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling

Die Färbung mit Hilfe des "In Situ Cell Death Detection Kit" zeigte erheblich mehr apoptotische Zellen in der verletzten Hemisphären als kontralateral 72 Stunden nach CCII. Dabei waren jedoch keine signifikanten Unterschiede in den ausgezählten Bereichen zwischen der Ubiquitin- und der Plazebogruppe feststellbar. Allerdings ist zu bemerken, dass die TUNEL-Methode neben der Apoptose auch nekrotische Formen der DNS-Fragmentation markieren kann (Minambres et al., 2008). Dabei muss berücksichtigt werden, dass apoptotische und nekrotische Prozesse innerhalb eines Neurons simultan aktiv sein können (Ünal-Çevik et al., 2004) und dass die Nekrose bis zu 27% der sekundären Schäden 72 Stunden nach SHT ausmachen kann (Minambres et al., 2008). So ist zu vermuten, dass auch in dieser Studie sowohl apoptotische als auch nekrotische Zellen angefärbt wurden. Da außerdem gezeigt werden konnte, dass Ubiquitin einen erheblichen Einfluss auf Zelltodmechanismen ausüben kann (Broemer und Meier, 2009), ist anzunehmen, dass die Apoptoserate trotz der hier dargestellten Ergebnisse durch exogenes Ubiquitin beeinflusst werden kann. Für eine abschließende Klärung müsste die apoptotische Signalkaskade im CCII-Modell genauer untersucht werden. Anschließend könnte die Expression bzw. Aktivierung involvierten Gene und Proteine quantifiziert werden, um somit auf den Einfluss von exogenem Ubiquitin auf das Maß der Aktivierung apoptotischer Prozesse im Rahmen des Zelltodes nach CCII zu schließen.

Darüber hinaus ist bekannt, dass apoptotische Zellen 30 min bis 72 Stunden nach dem Trauma aufgefunden werden (Andersson et al., 2006) und, dass die maximale neuronale Degradation nach 24-72 Stunden in Kortex und Hippokampus auftritt (Sato et al., 2001). Um eine umfassende Aussage über den Einfluss von Ubiquitin auf die

Apoptoserate nach CCII treffen zu können, sollten in weiteren Studien auch frühere Zeitpunkte als 72 Stunden in die Untersuchungen einbezogen werden.

### 4.4.6 Abschließende Überlegungen

In der vorliegenden Arbeit wurden modulatorische Effekte des exogenen Proteins Ubiquitin auf die Makrophageninfiltration bzw. Mikrogliaaktivierung und die Expression von IL-10 und höchst wahrscheinlich auch auf die der TNF-α-mRNS nach Controlled Cortical Impact Injury in der Ratte beschrieben. Die Ergebnisse früherer Therapiestudien zu Ubiquitin nach SHT (Earle et al., 2005; Griebenow et al., 2007), konnten durch die untersuchten Parameter jedoch noch nicht zweifelsfrei erklärt werden. Trotz neuer Erkenntnisse über die Wirkungen von Immunzellen, Apoptose und Zytokinen nach SHT kann letztlich keine eindeutige Aussage bezüglich des therapeutischen Potentials von exogenem Ubiquitin anhand der beobachteten Veränderungen durch die Substanz gemacht werden.

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass i.v. verabreichtes, exogenes Ubiquitin vornehmlich in der Spätphase nach SHT Auswirkungen auf die beobachteten Parameter, Immunzellinfiltration und Zytokinexpression, ausübt. Sieben Tage nach CCII führte die Gabe von exogenem Ubiquitin zu einer signifikant verstärkten Aktivierung bzw. Infiltration von Mikroglia bzw. Makrophagen (ED1-positiv) gegenüber der Plazebogruppe. Außerdem zeigten wir, dass exogenes Ubiquitin die IL-10-Expression 72 Stunden nach dem Trauma verglichen mit Plazebo signifikant verringert. Schließlich konnte als weitere Veränderung eine tendenziell erhöhte TNF- $\alpha$ -Expression in der Ubiquitingruppe 72 Stunden nach CCII gemessen werden.

Weitere Erkenntnisse könnten sich aus Langzeitstudien mit mehrmaliger oder andauernder Gabe verschiedener Ubiquitinmengen und Beobachtung des neurologisch funktionellen Verhaltens ergeben. Darüber hinaus wären Studien zum Einfluss von exogenem Ubiquitin auf das Überleben von Neuronen in Kortex und hippokampalen Arealen interessant, um die etwaige Neuroprotektivität des Proteins aufzuklären. Auch diese Fragestellung müsste über einen längeren Zeitraum durch wiederholte Cresylviolet-Färbungen untersucht werden, da sekundäre Schädigungsmechanismen über eine Dauer von mehreren Wochen Neurone abtöten können und das Risiko erhöhen später eine neurodegenerativen Erkrankung zu erleiden (Wallesch et al., 2005). Des Weiteren würden Untersuchungen mit Fluorescein-markiertem Ubiquitin Hinweise auf die molekularen Abläufe nach Ubiquitingabe geben, da zwar die Aufnahme in Monozyten in vitro beschrieben wurde (Majetschak et al., 2006), aber vergleichbare Ergebnisse für intrazerebrale Zellen fehlen und der potentielle Rezeptor für die Aufnahme in Zellen bisher unbekannt blieb. Außerdem ist zu beachten, dass die gewählte Menge von 1.5 mg/kgKG Ubiquitin aus vorherigen Studien mit der Substanz übernommen wurde und somit eine Dosis- Eskalationsstudie zur Einschätzung der vielfältigen Wirkungen, der therapeutischen Breite und zum vollständigen Ausschluss der Toxizität von exogenem Ubiquitin nach wie vor für das Trauma Modell fehlt.

Alles in allem kann davon ausgegangen werden, dass exogenes Ubiquitin wie auch die endogene, intrazelluläre Substanz mannigfaltige Wirkungen und Funktionen besitzt, die Proteine, Metabolismus, Signaltransduktion, Gentranskription, DNS-Replikation und –Reparatur modifiziert (Sun, 2008). In diesem Zusammenhang bleibt es zu hoffen und daran weiterhin zu arbeiten, dass auch in Zukunft weitere Erkenntnisse zu den komplexen immunologischen Prozessen im Hirngewebe und im Besonderen nach SHT gesammelt werden können, um therapeutische Ansätze zu bieten und Wirkmechanismen existierender oder neuer Substanzen nachzuvollziehen und zu g e z i e l t e i n s e t z e n z u können. 5

### ZUSAMMENFASSUNG

*Fragestellung:* Exogenes Ubiquitin verringert signifikant das kortikale Kontusionsvolumen und reduziert tendenziell die Hirnödementwicklung nach standardisiertem Schädel-Hirn-Trauma (Controlled Cortical Impact Injury = CCII) bei Ratten. Die genauen Abläufe dieser Effekte sind weiterhin ungeklärt. Einige Studien zeigten Ubiquitins immumodulatorische Eigenschaften; daher stellten wir die Hypothese auf, dass Ubiquitin die lokale, angeborene Immunantwort nach CCII beeinflusst.

*Material und Methoden:* Sprague-Dawley Ratten wurden mit dem CCII-Modell traumatisiert. Anschließend wurde ihnen randomisiert entweder 1.5 mg/kg Ubiquitin oder 0.9% NaCl intravenös innerhalb von 5 Minuten nach CCII appliziert. IL-1 $\beta$ -, IL-6-, IL-10-, TNF- $\alpha$ - und IL-1ra-Level wurden durch rt-PCR quantifiziert.Immunezellen wurden histochemisch mit OX-42, MPO, HIS48, ED1 und GFAP angefärbt. Die Apoptoserate wurde mittels TUNEL analysiert.

*Ergebnisse:* Die IL-10-Expression nach 3 Tagen war significant niedriger in der Verumgruppe ( $1.0651e^5 \pm 0.60931e^5$  vs.  $2.2661e^5 \pm 1.2441e^5$  relative messenger RNA; p = 0.02) und die TNF- $\alpha$ -Level waren tendenziell höher in der Verumgruppe ( $22.011e^5 \pm 10.871e^5$  vs.  $9.341e^5 \pm 4.441e^5$  relative messenger RNA; p = 0.06). Im perikontusionellen Kortex fanden sich signifikant mehr ED1-positive Zellen in der Ubiquitin-Gruppe 7 Tage nach dem Trauma ( $823 \pm 182$  cells/mm2 vs.  $607 \pm 189$  cells/mm2; p = 0.04). Die Quantifizierung apoptotischer Zellen ergab keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

*Diskussion:* Exogenes Ubiquitin moduliert die Immunantwort durch seinen Einfluss auf die Infiltration von Makrophagen oder aktivierte Mikroglia und die Expression von IL-10 und womöglich auch TNF- $\alpha$  nach CCII. Die Auswirkungen dieser veränderten Immunantwort auf posttraumatische neurodegenerative Prozesse bleiben jedoch vorerst ungeklärt.

*Schlagwörter:* Schädel-Hirn-Trauma, extrazelluläres Ubiquitin, Zytokine, Apoptose, Immunreaktion, Immunzellen

6

#### LITERATURVERZEICHNIS

Leichtes Schädel-Hirn-Trauma. (2008). Georg Thieme Verlag Stuttgart.

"Zahl der Verkehrstoten 2007 erstmals unter 5000". (2008). BMVBS. Berlin.

Anderson, K. J., Scheff, S. W., Miller, K. M., et al. (2008). "The phosphorylated axonal form of the neurofilament subunit NF-H (pNF-H) as a blood biomarker of traumatic brain injury." J Neurotrauma 25(9): 1079-85.

Andersson, B., Bjelke, B., Syková, E. (2006). "Temporal profile of ultrastructural changes in cortical neurones after a compression lesion." Physiol Res.;55(3):339-48.

Armbrust, E. und Rohl, C. (2008). "Time- and activation-dependency of the protective effect of microglia on astrocytes exposed to peroxide-induced oxidative stress." Toxicol In Vitro 22(5): 1399-404.

Asadullah, K., Docke, W. D., Sabat, R., Ebeling, M., Volk, H. D., Sterry, W. (1999). "[Interleukin-10 in dermatology]." Hautarzt 50(1): 12-9.

Bandmann, P. M. (2007). "Leistungsanalyse des Rettungsdienstes in Deutschland". D. V. e.V.

Barral, J.-P. und Croibier, A. (2008). "Manipulation kranialer Nerven. "München, Elsevier.

Bell, M. J., Kochanek, P. M., Doughty, L. A., et al. (1997). "Interleukin-6 and interleukin-10 in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury in children." J Neurotrauma 14(7): 451-7.

Bensadoun, J. C., de Almeida, L. P., Dreano, M., Aebischer, P., Deglon, N. (2001). "Neuroprotective effect of interleukin-6 and IL6/IL6R chimera in the quinolinic acid rat model of Huntington's syndrome." Eur J Neurosci 14(11): 1753-61.

Berlit, P. (2007). "Basiswissen Neurologie. " Berlin Heidelberg, Springer.

Breuhahn, K. und Brand, K. (2008). "Molekulare klinische Zellbiologie. " Berlin Heidelberg, Springer.

Broemer, M. und Meier, P. (2009). "Ubiquitin-mediated regulation of apoptosis." Trends Cell Biol 19(3): 130-40.

Bruce-Keller, A. J. (1999). "Microglial-neuronal interactions in synaptic damage and recovery." J Neurosci Res 58(1): 191-201.

Bruhn, O., Regenhard, P., Michalek, M., Paul, S., Gelhaus, C., Jung, S., Thaller, G., Podschun, R., Leippe, M., Grötzinger, J., Kalm, E. (2007). "A novel horse alpha-defensin: gene transcription, recombinant expression and characterization of the structure and function." Biochem J. 15;407(2):267-76.

Bruns, J., Jr. und Hauser, W. A. (2003). "The epidemiology of traumatic brain injury: a review." Epilepsia 44 Suppl 10: 2-10.

Bundesministerium für Verkehr, Bau und Stadtentwicklung (2008).

Büttner, R. und Thomas, C. (2003). Allgemeine Pathologie, Schattauer.

Bush, T. G., Puvanachandra, N., Horner, C. H., et al. (1999). "Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice." Neuron 23(2): 297-308.

Buttram, S. D., Wisniewski, S. R., Jackson, E. K., et al. (2007). "Multiplex assessment of cytokine and chemokine levels in cerebrospinal fluid following severe pediatric traumatic brain injury: effects of moderate hypothermia." J Neurotrauma 24(11): 1707-17.

Campbell, I. L., Abraham, C. R., Masliah, E., et al. (1993). "Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6." Proc Natl Acad Sci U S A 90(21): 10061-5.

Carbonell, W. S., Murase, S., Horwitz, A. F., Mandell, J. W. (2005). "Migration of perilesional microglia after focal brain injury and modulation by CC chemokine receptor 5: an in situ time-lapse confocal imaging study." J Neurosci 25(30): 7040-7.

Carlos, T. M., Clark, R. S., Franicola-Higgins, D., Schiding, J. K., Kochanek, P. M. (1997). "Expression of endothelial adhesion molecules and recruitment of neutrophils after traumatic brain injury in rats." J Leukoc Biol 61(3): 279-85.

Chen, Y. und Swanson, R. A. (2003). "Astrocytes and brain injury." J Cereb Blood Flow Metab 23(2): 137-49.

Cheng, J., Turksen, K., Yu, Q. C., Schreiber, H., Teng, M., Fuchs, E. (1992). "Cachexia and graft-vs.-host-disease-type skin changes in keratin promoter-driven TNF alpha transgenic mice." Genes Dev 6(8): 1444-56.

Chodobski, A., Chung, I., Kozniewska, E., et al. (2003). "Early neutrophilic expression of vascular endothelial growth factor after traumatic brain injury." Neuroscience 122(4): 853-67.

Csuka, E., Morganti-Kossmann, M. C., Lenzlinger, P. M., Joller, H., Trentz, O., Kossmann, T. (1999). "IL-10 levels in cerebrospinal fluid and serum of patients with severe traumatic brain injury: relationship to IL-6, TNF-alpha, TGF-beta1 and blood-brain barrier function." J Neuroimmunol 101(2): 211-21.

Daino, H., Matsumura, I., Takada, K., et al. (2000). "Induction of apoptosis by extracellular ubiquitin in human hematopoietic cells: possible involvement of STAT3 degradation by proteasome pathway in interleukin 6-dependent hematopoietic cells." Blood 95(8): 2577-85.

Daino, H., Shibayama, H., Machii, T., Kitani, T. (1996). "Extracellular ubiquitin regulates the growth of human hematopoietic cells." Biochem Biophys Res Commun 223(2): 226-8.

Daniel, P. (2008). "Molekulare Grundlagen der Apoptose. " Berlin Heidelberg, Springer.

Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., et al. (2005). "ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo." Nat Neurosci 8(6): 752-8.

David, H. N., Ansseau, M., Lemaire, M., Abraini, J. H. (2006). "Nitrous oxide and xenon prevent amphetamine-induced carrier-mediated dopamine release in a memantine-like fashion and protect against behavioral sensitization." Biol Psychiatry 60(1): 49-57.

David, H. N., Leveille, F., Chazalviel, L., et al. (2003). "Reduction of ischemic brain damage by nitrous oxide and xenon." J Cereb Blood Flow Metab 23(10): 1168-73.

Dettmer, U., Folkerts, M., Kächler, E. (2005). "Intensivkurs Biochemie. "München, Elsevier.

Deutscher Verkehrssicherheitsrat e.V., 2007.

de Waal Malefyt, R., Haanen, J., Spits, H., et al. (1991). "Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigenspecific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression." J Exp Med 174(4): 915-24.

Dixon, C. E., Clifton, G. L., Lighthall, J. W., Yaghmai, A. A., Hayes, R. L. (1991). "A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat." J Neurosci Methods 39(3): 253-62.

Dixon, C. E., Flinn, P., Bao, J., Venya, R., Hayes, R. L. (1997). "Nerve growth factor attenuates cholinergic deficits following traumatic brain injury in rats." Exp Neurol 146(2): 479-90.

Dixon, C. E., Hayes, R. L. (1997). "Fluid percussion and cortical impact models of traumatic brain injury." Narayan RK, Wilberger JE, Povlishock JT, (eds.), Neurotrauma, New York: McGraw Hill, 1337-1346.

Earle, S. A., El-Haddad, A., Patel, M. B., Ruiz, P., Pham, S. M., Majetschak, M. (2006). "Prolongation of skin graft survival by exogenous ubiquitin." Transplantation 82(11): 1544-6.

Earle, S. A., Proctor, K. G., Patel, M. B., Majetschak, M. (2005). "Ubiquitin reduces fluid shifts after traumatic brain injury." Surgery 138(3): 431-8.

Edmands, S. D. und Hall, A. C. (2009). "Role for metallothioneins-I/II in isoflurane preconditioning of primary murine neuronal cultures." Anesthesiology 110(3): 538-47.

Engelborghs, K., Verlooy, J., Van Reempts, J., Van Deuren, B., Van de Ven, M., Borgers, M. (1998). "Temporal changes in intracranial pressure in a modified experimental model of closed head injury." J Neurosurg 89(5): 796-806.

Fellin, T. und Carmignoto, G. (2004). "Neurone-to-astrocyte signalling in the brain represents a distinct multifunctional unit." J Physiol 559(Pt 1): 3-15.

Ferrer, I. (2006). "Apoptosis: future targets for neuroprotective strategies." Cerebrovasc Dis 21 Suppl 2: 9-20.

Folkersma, H., Breve, J. J., Tilders, F. J., Cherian, L., Robertson, C. S., Vandertop, W. P. (2008). "Cerebral microdialysis of interleukin (IL)-1beta and IL-6: extraction efficiency and production in the acute phase after severe traumatic brain injury in rats." Acta Neurochir (Wien) 150(12): 1277-84; discussion 1284.

Fontaine, V., Mohand-Said, S., Hanoteau, N., Fuchs, C., Pfizenmaier, K., Eisel, U. (2002). "Neurodegenerative and neuroprotective effects of tumor Necrosis factor (TNF) in retinal ischemia: opposite roles of TNF receptor 1 and TNF receptor 2." J Neurosci 22(7): RC216.

Garcia-Covarrubias, L., Manning, E. W., 3rd, Sorell, L. T., Pham, S. M., Majetschak, M. (2008). "Ubiquitin enhances the Th2 cytokine response and attenuates ischemia-reperfusion injury in the lung." Crit Care Med 36(3): 979-82.

Gebicke-Haerter, P. J., Lieb, K., Illes, P., Berger, M. (1998). "[Microglia: mechanisms of activation and significance in pathogenesis of neuropsychiatric illnesses]." Nervenarzt 69(9): 752-62.

Gemba, T., Oshima, T., Ninomiya, M. (1994). "Glutamate efflux via the reversal of the sodium-dependent glutamate transporter caused by glycolytic inhibition in rat cultured astrocytes." Neuroscience 63(3): 789-95.

Gibbs, R. A., Weinstock, G. M., Metzker, M. L., et al. (2004). "Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution." Nature 428(6982): 493-521.

Gold, R., Schmied, M., Giegerich, G., et al. (1994). "Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of in situ tailing and nick translation techniques." Lab Invest 71(2): 219-25.

Goldstein, G., Scheid, M., Hammerling, U., Schlesinger, D. H., Niall, H. D., Boyse, E. A. (1975). "Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells." Proc Natl Acad Sci U S A 72(1): 11-5.

Gomez, R. S., Gomez, M. V., Prado, M. A. (2000). "The effect of isoflurane on the release of [(3)H]-acetylcholine from rat brain cortical slices." Brain Res Bull 52(4): 263-7.

Griebenow, M. (2007). "Einfluss der Gabe von HyperHAES\_ und N-Acetylcystein© auf die kortikale Perfusion und den sekundären Hirnschaden nach 'controlled cortical impact injury' bei der Ratte. " Neurochirurgie. Berlin, Charité –Universitätsmedizin.

Griebenow, M., Casalis, P., Woiciechowsky, C., Majetschak, M., Thomale, U. W. (2007). "Ubiquitin reduces contusion volume after controlled cortical impact injury in rats." J Neurotrauma 24(9): 1529-35.

Haelewyn, B., David, H. N., Rouillon, C., et al. (2008). "Neuroprotection by nitrous oxide: facts and evidence." Crit Care Med 36(9): 2651-9.

Hall, E. D. (1997). "Brain attack. Acute therapeutic interventions. Free radical scavengers and antioxidants." Neurosurg Clin N Am. 8(2):195-206.

Hanna, J., Leggett, D. S., Finley, D. (2003). "Ubiquitin depletion as a key mediator of toxicity by translational inhibitors." Mol Cell Biol 23(24): 9251-61.

Harting, M.T., Jimenez, F., Adams, S.D., Mercer, D.W., Cox, C.S. Jr. (2008). "Acute, regional inflammatory response after traumatic brain injury: Implications for cellular therapy." Surgery. 144. 803-813.

Hauwel, M., Furon, E., Canova, C., Griffiths, M., Neal, J., Gasque, P. (2005). "Innate (inherent) control of brain infection, brain inflammation and brain repair: the role of microglia, astrocytes, "protective" glial stem cells and stromal ependymal cells." Brain Res Brain Res Rev 48(2): 220-33.

Hayashi, Y., Nomura, M., Yamagishi,S., et al. (1997). "Induction of various blood-brain barrier properties in non-neural endothelial cells by close apposition to co-cultured astrocytes." Glia 19(1): 13-26.

Head, B. P., Patel, H. H., Niesman, I. R., Drummond, J. C., Roth, D. M., Patel, P. M. (2009). "Inhibition of p75 neurotrophin receptor attenuates isoflurane-mediated neuronal apoptosis in the neonatal central nervous system." Anesthesiology 110(4): 813-25.

Hehlgans, T. und Pfeffer, K. (2005). "The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games." Immunology 115(1): 1-20.

Hofmann, K. (2009). "Ubiquitin-binding domains and their role in the DNA damage response." DNA Repair (Amst) 8(4): 544-56.

Hutchinson, P. J., O'Connell, M. T., Rothwell, N. J., et al. (2007). "Inflammation in human brain injury: intracerebral concentrations of IL-1alpha, IL-1beta, and their endogenous inhibitor IL-1ra." J Neurotrauma 24(10): 1545-57.

Hyder, A. A., Wunderlich, C. A., Puvanachandra, P., Gururaj, G., Kobusingye, O. C. (2007). "The impact of traumatic brain injuries: a global perspective." NeuroRehabilitation 22(5): 341-53.

Imai, F., Sawada, M., Suzuki, H., et al. (1997). "Migration activity of microglia and macrophages into rat brain." Neurosci Lett 237(1): 49-52.

Inglis, V. I., M. P. Jones, Tse, A. D. Y., Easton, A. S. (2004). "Neutrophils both reduce and increase permeability in a cell culture model of the blood-brain barrier." Brain Res 998(2): 218-29.

Isaeva, E. V. (2009). "Mechanism of antiseizure effect of isoflurane in the immature rat hippocampus." Fiziol Zh 55(1): 57-60.

Jennett, B. (1996). "Epidemiology of head injury." J Neurol Neurosurg Psychiatry 60(4): 362-9.

Jevtovic-Todorovic, V., Beals, J., Benshoff, N., Olney, J. W. (2003). "Prolonged exposure to inhalational anesthetic nitrous oxide kills neurons in adult rat brain." Neuroscience 122(3): 609-16.

Joshi, C. N., Jain, S. K., Murthy, P. S. (2004). "An optimized triphenyltetrazolium chloride method for identification of cerebral infarcts." Brain Res Brain Res Protoc.;13(1):11-7.

Kadhim, H. J., Duchateau, J., Sebire, G. (2008). "Cytokines and brain injury: invited review." J Intensive Care Med 23(4): 236-49.

Keita, H., Henzel-Rouelle, D., Dupont, H., Desmonts, J. M., Mantz, J. (1999). "Halothane and isoflurane increase spontaneous but reduce the N-methyl-D-aspartate-evoked dopamine release in rat striatal slices: evidence for direct presynaptic effects." Anesthesiology 91(6): 1788-97.

Kim, J. A., Li, L., Zuo, Z. (2009). "Isoflurane induces a postconditioning effect on bovine pulmonary arterial endothelial cells exposed to oxygen-glucose deprivation." Eur J Pharmacol 615(1-3): 144-9.

93

Kimelberg, H. K., E. Rutledge, Goderie, S., Charniga, C. (1995). "Astrocytic swelling due to hypotonic or high K+ medium causes inhibition of glutamate and aspartate uptake and increases their release." J Cereb Blood Flow Metab 15(3): 409-16.

Kirchberger, S. und Wingenfeld, K. (1992). "Expert opinion on the care of patients with severe TBI in North Rhine-Westphalian hospitals." Partner Druck, Ahlen.

Kirchhoff, C., Buhmann, S., Bogner, V. (2008). "Cerebrospinal IL-10 concentration is elevated in non-survivors as compared to survivors after severe traumatic brain injury." Eur J Med Res 13(10): 464-8.

Kitano, H., Young, J. M., Cheng, J., Wang, L., Hurn, P. D., Murphy, S. J. (2007). "Gender-specific response to isoflurane preconditioning in focal cerebral ischemia." J Cereb Blood Flow Metab 27(7): 1377-86.

Klatzo, I., Piraux, A., Laskowski, E. J. (1958). "The relationship between edema, blood-brain-barrier and tissue elements in a local brain injury." J Neuropathol Exp Neurol 17(4): 548-64.

Kline, A. E., Bolinger, B. D., Kochanek, P. M., Carlos, T. M., Yan H. Q., Jenkins, L. W., Marion, D. W., Dixon, C. E. (2002). "Acute systemic administration of interleukin-10 suppresses the beneficial effects of moderate hypothermia following traumatic brain injury in rats." Brain Res 24;937(1-2):22-31.

Klinke, R. und Silbernagel, S. (2001). "Lehrbuch der Physiologie. " Stuttgart, Thieme Verlag.

Knezevic-Cuca, J., Stansberry, K. B., Johnston, G., et al. (2000). "Neurotrophic role of interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptors in N1E-115 neuroblastoma cells." J Neuroimmunol 102(1): 8-16.

Knoblach, S. M. und Faden, A. I. (1998). "Interleukin-10 improves outcome and alters proinflammatory cytokine expression after experimental traumatic brain injury." Exp Neurol 153(1): 143-51.

Kutty, B. C., Pasupathy, K., Mishra, K. P. (2005). "Effects of exogenous ubiquitin on cell division cycle mutants of Schizosaccharomyces pombe." FEMS Microbiol Lett 244(1): 187-91.

Laird, M. D., Vender, J. R., Dhandapani, K. M. (2008). "Opposing roles for reactive astrocytes following traumatic brain injury." Neurosignals 16(2-3): 154-64.

Langlois, J. A., Rutland-Brown, W., Wald, M. M. (2006). "The epidemiology and impact of traumatic brain injury: a brief overview." J Head Trauma Rehabil 21(5): 375-8.

Larsen, R. (2006). "Anästhesie. " München, Elsevier.

Lau, A., Tymianski, M. (2010). "Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration." Pflugers Arch. 460(2):525-42.

Lehmberg, J., Waldner, M., Baethmann, A., Uhl, E. (2008). "Inflammatory response to nitrous oxide in the central nervous system." Brain Res 1246: 88-95.

Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie (2008).

Leitlinien SHT DGNC (2006).

Leker, R. R. und Shohami, E. (2002). "Cerebral ischemia and trauma-different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities." Brain Res Brain Res Rev 39(1): 55-73.

Leon, S. und Haguenauer-Tsapis, R. (2009). "Ubiquitin ligase adaptors: regulators of ubiquitylation and endocytosis of plasma membrane proteins." Exp Cell Res 315(9): 1574-83.

Li, L., Peng, L., Zuo, Z. (2008). "Isoflurane preconditioning increases B-cell lymphoma-2 expression and reduces cytochrome c release from the mitochondria in the ischemic penumbra of rat brain." Eur J Pharmacol 586(1-3): 106-13.

Li, L. und Zuo, Z. (2009). "Isoflurane preconditioning improves short-term and long-term neurological outcome after focal brain ischemia in adult rats." Neuroscience 164(2): 497-506.

Lighthall, J. W. (1988). "Controlled cortical impact: a new experimental brain injury model." J Neurotrauma 5(1): 1-15.

Lighthall, J. W., Dixon, C. E., Anderson, T. E.. (1989). "Experimental models of brain injury." J Neurotrauma 6(2): 83-97.

Ling, G. S., E. Y. Lee, Kalehua, A. N. (2004). "Traumatic brain injury in the rat using the fluid-percussion model." Curr Protoc Neurosci Chapter 9: Unit 9 2.

Liszczak, T. M., Hedley-Whyte, E. T., Adams, J. F., Han, D. H., Kolluri, V. S., Vacanti, F. X., Heros, R. C., Zervas, N. T. (1984). "Limitations of tetrazolium salts in delineating infarcted brain." Acta Neuropathol.;65(2):150-7.

Löffler, G. (2003). "Biochemie & Pathobiochemie. " Berlin Heidelberg, Springer.

Löffler, G. (2008). "Basiswissen Biochemie. " Berlin Heidelberg, Springer.

Löppnow, H. (2001). "[Cytokines: classification, receptors, mechanisms of action]." Internist (Berl) 42(1): 13-4, 17-27.

Lünemann, A., Ullrich, O., Diestel, A., et al. (2006). "Macrophage/microglia activation factor expression is restricted to lesion-associated microglial cells after brain trauma." Glia 53(4): 412-9.

Majetschak, M., Cohn, S. M., Nelson, J. A., Burton, E. H., Obertacke, U., Proctor, K. G. (2004b). "Effects of exogenous ubiquitin in lethal endotoxemia." Surgery 135(5): 536-43.

Majetschak, M., Cohn, S. M., Obertacke, U., Proctor, K. G. (2004a). "Therapeutic potential of exogenous ubiquitin during resuscitation from severe trauma." J Trauma 56(5): 991-9; discussion 999-1000.

Majetschak, M., King, D. R., Krehmeier, U., et al. (2005). "Ubiquitin immunoreactivity in cerebrospinal fluid after traumatic brain injury: clinical and experimental findings." Crit Care Med 33(7): 1589-94.

Majetschak, M., Krehmeier, U., Bardenheuer, M., et al. (2003). "Extracellular ubiquitin inhibits the TNF-alpha response to endotoxin in peripheral blood mononuclear cells and regulates endotoxin hyporesponsiveness in critical illness." Blood 101(5): 1882-90.

Majetschak, M., Ponelies, N., Hirsch, T. (2006). "Targeting the monocytic ubiquitin system with extracellular ubiquitin." Immunol Cell Biol 84(1): 59-65.

Majetschak, M., Zedler, S., Hostmann, A., et al. (2008). "Systemic ubiquitin release after blunt trauma and burns: association with injury severity, posttraumatic complications, and survival." J Trauma 64(3): 586-96; discussion 596-8.

Marmarou, A., Foda, M. A., van den Brink, W., Campbell, J., Kita, H., Demetriadou, K. (1994). "A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics." J Neurosurg 80(2): 291-300.

Matta, B. F., Heath, K. J., Tipping, K., Summors, A. C. (1999). "Direct cerebral vasodilatory effects of sevoflurane and isoflurane." Anesthesiology 91(3): 677-80.

McIntosh, T. K., Vink, R., Noble, L. (1989). "Traumatic brain injury in the rat: characterization of a lateral fluid-percussion model." Neuroscience 28(1): 233-44.

Minambres, E., Ballesteros, M. A., Mayorga, M. (2008). "Cerebral apoptosis in severe traumatic brain injury patients: an in vitro, in vivo, and postmortem study." J Neurotrauma 25(6): 581-91.

Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L., O'Garra, A. (2001). "Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor." Annu Rev Immunol 19: 683-765.

Morganti-Kossman, M. C., Lenzlinger, P. M., Hans, V., et al. (1997). "Production of cytokines following brain injury: beneficial and deleterious for the damaged tissue." Mol Psychiatry 2(2): 133-6.

Müller, M. (2008/09). "Chirurgie. " Breisach, Medizinische Verlags- und Informationsdienste.

Myer, D. J., Gurkoff, G. G., Lee, S. M., Hovda, D. A., Sofroniew, M. V. (2006). "Essential protective roles of reactive astrocytes in traumatic brain injury." Brain 129(Pt 10): 2761-72.

Nagelhus, Horio, Y., Inanobe, A., et al. (1999). "Immunogold evidence suggests that coupling of K+ siphoning and water transport in rat retinal Muller cells is mediated by a coenrichment of Kir4.1 and AQP4 in specific membrane domains." Glia 26(1): 47-54.

Nashan, D. und Luger, T. A. (1999). "Interleukin 1: Teil 1: Grundlagen und Pathophysiologie " Hautarzt 50: 680-688.

Neumann, J., Sauerzweig, S., Ronicke, R., et al. (2008). "Microglia cells protect neurons by direct engulfment of invading neutrophil granulocytes: a new mechanism of CNS immune privilege." J Neurosci 28(23): 5965-75.

Neumann, J. (2008). "Immunbiologie, " Springer-Verlag.

Oder, W. und Wurzer, W. (2006). Klinische Neuropsychologie, Springer Vienna.

Palin, K., Verrier, D., Tridon, V., et al. (2004). "Influence of the course of brain inflammation on the endogenous IL-1beta/IL-1Ra balance in the model of brain delayed-type hypersensitivity response to bacillus Calmette-Guerin in Lewis rats." J Neuroimmunol 149(1-2): 22-30. Patel, M. B., Proctor, K. G., Majetschak, M. (2006). "Extracellular ubiquitin increases in packed red blood cell units during storage." J Surg Res 135(2): 226-32.

Paxinos, G., Watson, C. (1996). "The rat brain in stereotaxic coordinates, Compact 3rd edition." Academic Press, San Diego.

Penkowa, M., Giralt, M., Lago, N., et al. (2003). "Astrocyte-targeted expression of IL-6 protects the CNS against a focal brain injury." Exp Neurol 181(2): 130-48.

Peters, M., Muller, A. M., Rose-John, S. (1998). "Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor: direct stimulation of gp130 and hematopoiesis." Blood 92(10): 3495-504.

Pinteaux, E., Rothwell, N. J., Boutin, H. (2006). "Neuroprotective actions of endogenous interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) are mediated by glia." Glia 53(5): 551-6.

Raghavendra Rao, Dogan, A., Bowen, K. K., Dempsey, R. J. (2000). "Traumatic brain injury leads to increased expression of peripheral-type benzodiazepine receptors, neuronal death, and activation of astrocytes and microglia in rat thalamus." Exp Neurol 161(1): 102-14.

Ransohoff, R. M. und Benveniste, E. N. (2006). "Cytokines and the CNS." Boca Raton, Florida, CRC Taylor & Francis.

Reinstrup, Ryding, E., Ohlsson, T., et al. (2008). "Regional cerebral metabolic rate (positron emission tomography) during inhalation of nitrous oxide 50% in humans." Br J Anaesth 100(1): 66-71.

Reulen, H. J., Graham, R., Spatz, M., Klatzo, I. (1977). "Role of pressure gradients and bulk flow in dynamics of vasogenic brain edema." J Neurosurg 46(1): 24-35.

Rickels, DGNC. (2004).

Rickels, E. und Unterberg, A. (2008). "Trauma. " Berlin Heidelberg, Springer.

Rickels, E., K. von Wild, Wenzlaff, P., Bock, W. J. (2006). "Schädel-Hirn-Verletzung. Epidemiologie und Versorgung. Ergebnisse einer prospektiven Studie. "München-Wien-New York, Zuckschwerdt - Verlag.

Rigalli, A. und Di Loreto, V. E. (2009). "Experimental Surgical Models in the Laboratory Rat." CRC Press Inc.

Rumpl, E. (2006). "Schädel-Hirn-Trauma. " Berlin Heidelberg, Springer.

Sall, J. W., Stratmann, G., Leong, J., McKleroy, W., Mason, D., Shenoy, S., Pleasure, S. J., Bickler, P. E. (2009). "Isoflurane inhibits growth but does not cause cell death in hippocampal neural precursor cells grown in culture." Anesthesiology.;110(4):826-33.

Saha, R. N., Liu, X., Pahan, K. (2006). "Up-regulation of BDNF in astrocytes by TNF-alpha: a case for the neuroprotective role of cytokine." J Neuroimmune Pharmacol 1(3): 212-22.

Sakowitz, O. W., Schardt, C., Neher, M., Stover, J. F., Unterberg, A. W., Kiening, K. L. (2006). "Granulocyte colonystimulating factor does not affect contusion size, brain edema or cerebrospinal fluid glutamate concentrations in rats following controlled cortical impact." Acta Neurochir Suppl.;96:139-43.

Sato, M., Chang, E., Igarashi, T., Noble, L. J. (2001). "Neuronal injury and loss after traumatic brain injury: time course and regional variability." Brain Res. 26;917(1):45-54.

Scherbel, U., Raghupathi, R., Nakamura, M., et al. (1999). "Differential acute and chronic responses of tumor necrosis factor-deficient mice to experimental brain injury." Proc Natl Acad Sci U S A 96(15): 8721-6.

Schilling, M., Besselmann, M., Leonhard, C., Mueller, M., Ringelstein, E. B., Kiefer, R. (2003). "Microglial activation precedes and predominates over macrophage infiltration in transient focal cerebral ischemia: a study in green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice." Exp Neurol 183(1): 25-33.

Schoettle, R. J., Kochanek, P. M., Magargee, M. J., Uhl, M. W., Nemoto, E. M. (1990). "Early polymorphonuclear leukocyte accumulation correlates with the development of posttraumatic cerebral edema in rats." J Neurotrauma 7(4): 207-17.

Schröder, H., Wevers, A. (2005). "Topographische Anatomie des Rodentia-Schädels (Ratte, Maus)." Wissenschaftliches Projekt im Rahmen des Modellstudiengangs Humanmedizin SS 2005. Institut für Anatomie, Klinikum der Universität zu Köln

Seeger, J., Hoffmann, A., Kacza, J., Stahl, T. (2006). "Histologische Übungen für die Tiermedizin. " Schlütersche.

Shohami, E., Gallily, R., Mechoulam, R., Bass, R., Ben-Hur, T. (1997). "Cytokine production in the brain following closed head injury: dexanabinol (HU-211) is a novel TNF-alpha inhibitor and an effective neuroprotectant." J Neuroimmunol 72(2): 169-77.

Statler, K. D., Alexander, H., Vagni, V., et al. (2006). "Isoflurane exerts neuroprotective actions at or near the time of severe traumatic brain injury." Brain Res 1076(1): 216-24.

Statler, K. D., Kochanek, P. M., Dixon, C. E., et al. (2000). "Isoflurane improves long-term neurologic outcome versus fentanyl after traumatic brain injury in rats." J Neurotrauma 17(12): 1179-89.

Stensballe, J., Christiansen, M., TØnnesen, E., Espersen, K., Lippert, F. K., Rasmussen, L. S., et al. (2009). "The early IL-6 and IL-10 response in trauma is correlated with injury severity and mortality." Acta Anaesthesiologica Scandinavica 53(4): 515-521.

Stoll, G., Jander, S., Schroeter, M.(1998). "Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions." Prog Neurobiol.;56(2):149-71. Review.

Stover, J. F., Kroppenstedt, S. N., Thomale, U. W., Kempski, O. S., Unterberg, A. W. (2000). "Isoflurane doubles plasma glutamate and increases posttraumatic brain edema." Acta Neurochir Suppl 76: 375-8.

Streit, W. J., Walter, S. A., Pennell, N. (1999). "Reactive microgliosis." Progress in Neurobiology 57:563 -58.

Streit, W. J. (2000). "Microglial response to brain injury: a brief synopsis." Toxicol Pathol 28(1): 28-30.

Streit, W. J. (2002). "Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS." Glia 40(2): 133-9.

Streit, W. J. (2005). "Microglia and neuroprotection: implications for Alzheimer's disease." Brain Res Brain Res Rev 48(2): 234-9.

Suckow, M. A., Weisbroth, S. H., Franklin, C.L. (2004). "The Laboratory Rat. " Academic Press.

Sun, S.C. (2008). "Deubiquitylation and regulation of the immune response". Nat Rev Immunol 8(7): 501-11.

Szmydynger-Chodobska, Strazielle, N., Zink, B. J., Ghersi-Egea, J. F., Chodobski, A. (2009). "The role of the choroid plexus in neutrophil invasion after traumatic brain injury." J Cereb Blood Flow Metab.

Taga, T. (1997). "GP130 And The Interleukin-6 Family of Cytokines." Annu. Rev. Immunol. 15:797-819.

Teasdale, G. und Jennett B. (1974). "Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale." Lancet 2(7872): 81-4.

Tetrault, S., Chever, O., Sik, A., Amzica, F. (2008). "Opening of the blood-brain barrier during isoflurane anaesthesia." Eur J Neurosci 28(7): 1330-41.

Thomale, U. (2001). "Evaluation des tierexperimentellen Modells einer traumatischen kortikalen Kontusion (Controlled Cortical Impact Injury) für Therapiestudien. " Neurochirurgie. Berlin, Humboldt-Universität.

Thomale, U. W., Kroppenstedt, S. N., Beyer, T. F., Schaser, K. D., Unterberg, A. W., Stover, J. F. (2002). "Temporal profile of cortical perfusion and microcirculation after controlled cortical impact injury in rats." J Neurotrauma 19(4): 403-13.

Thomale, U. W., Griebenow, M., Kroppenstedt, S. N., Unterberg, A. W., Stover, J. F. (2004). "Small volume resuscitation with HyperHaes improves pericontusional perfusion and reduces lesion volume following controlled cortical impact injury in rats." J Neurotrauma 21(12): 1737-46.

Thomale, U. (2006). "Posttraumatische Veränderungen nach experimenteller kortikaler Kontusion und deren Bedeutung für Therapiestudien." Medizinischen Fakultät Charité Universitätsmedizin Berlin. Berlin, Charité. PD: 50.

Thomale, U. W., Griebenow, M., Mautes, A., et al. (2007). "Heterogeneous regional and temporal energetic impairment following controlled cortical impact injury in rats." Neurol Res 29(6): 594-603.

Thomale, U. W., Bendera, M., Casalis, P., et al. (2007). "Tacrolimus depresses local immune cell infiltration but fails to reduce cortical contusion volume in brain-injured rats." Immunobiology 212(7): 567-576.

Titus, R. G., Sherry, B., Cerami, A. (1989). "Tumor necrosis factor plays a protective role in experimental murine cutaneous leishmaniasis." J Exp Med 170(6): 2097-104.

Turgeon, M. L. (2004). "Clinical Hematology: Theory and Procedures." Lippincott Williams & Wilkins.

Turksen, K. (2009). "Epidermal Cells: Methods and Protocols. " Human Press.

Um, H. D., Cho, Y. H., Kim, D. K., et al. (2004). "TNF-alpha suppresses dendritic cell death and the production of reactive oxygen intermediates induced by plasma withdrawal." Exp Dermatol 13(5): 282-8.

Ünal-Çevik, I., Kilinc, M., Can, A., Gursoy-Ozdemir, Y., Dalkara, T. (2004). "Apoptotic and necrotic death mechanisms are concomitantly activated in the same cell after cerebral ischemia." Stroke 35(9): 2189-94.

Unami, A., Shinohara, Y., Ichikawa, T., Baba, Y. (2003). "Biochemical and microarray analyses of bupivacaine-induced apoptosis." J Toxicol Sci 28(2): 77-94.

Unterberg, A. W., Stroop, R., Thomale, U. W., Kiening, K. L., Pauser, S., Vollmann, W. (1997). "Characterisation of brain edema following "controlled cortical impact injury" in rats." Acta Neurochir Suppl 70: 106-8.

Veronesi, M. C., Kubek, D. J., Kubek, M. J. (2008). "Isoflurane exacerbates electrically evoked seizures in amygdalakindled rats during recovery." Epilepsy Res 82(1): 15-20.

Victorian Burden of Disease Study (2001).

Wallesch, C.-W., Unterberg, A., Dietz, V. (2005). "Neurotraumatologie. " Georg Thieme Verlag.

Wang, X. Q., Peng, Y. P., Lu, J. H., Cao, B. B., Qiu, Y. H. (2009). "Neuroprotection of interleukin-6 against NMDA attack and its signal transduction by JAK and MAPK." Neurosci Lett 450(2): 122-6.

Welsch, U. (2006). "Sobotta Lehrbuch Histologie. " München, Urban & Fischer.

Whalen, M. J., Carlos, T. M., Kochanek, P. M., Heineman, S. (1998). "Blood-brain barrier permeability, neutrophil accumulation and vascular adhesion molecule expression after controlled cortical impact in rats: a preliminary study." Acta Neurochir Suppl 71: 212-4.

Winter, C. D., Pringle, A. K., Clough, G. F., Church, M. K. (2004). "Raised parenchymal interleukin-6 levels correlate with improved outcome after traumatic brain injury." Brain 127(Pt 2): 315-20.

Woiciechowsky, C., Asadullah, K., Nestler, D., Eberhardt, B., Platzer, C., Schöning, B., Glöckner, F., Lanksch, W. R., Volk, H. D., Döcke, W. D. (1998). "Systemic activation triggers systemic interleukin-10 release in immunodepression induced by brain injury." Nature Med 4:808-813.

Woiciechowsky, C., Schöning, B., Cobanov, J., Lanksch, W. R., Volk, H. D., Döcke, W. D. (2002). "Early IL-6 plasma concentrations correlate with severity of brain injury an pneumonie in brain-injured patients. J Trauma 52:339-345.

Woiciechowsky, C., Schöning, B., Stoltenburg, G., Stockhammer, F., Volk, H. D. (2004). "Brain-IL-1beta induces astrogliosis through induction of IL-6: Inhibition by propranolol and IL-10. Med Sci Monit 10:BR325-330.

Woiciechowsky, C., Volk, H. D. (2005). "Increased intracranial pressure induces a rapid systemic interluekin-10 release through activation of the sympathic nervous system." Acta Neurochir Supp 95:373-376.

Wong, J., Hoe, N. W., Zhiwei, F., Ng, I. (2005). "Apoptosis and traumatic brain injury." Neurocrit Care 3(2): 177-82.

Xie, Z., Culley, D. J., Dong, Y., et al. (2008). "The common inhalation anesthetic isoflurane induces caspase activation and increases amyloid beta-protein level in vivo." Ann Neurol 64(6): 618-27.

Yao, X., Liu, J., McCabe, J. T. (2007). "Ubiquitin and ubiquitin-conjugated protein expression in the rat cerebral cortex and hippocampus following traumatic brain injury (TBI)." Brain Res 1182: 116-22.

Zedler, S., Faist, E. (2006). "The impact of endogenous triggers on trauma-associated inflammation." Curr Opin Crit Care 12(6):595-601.

Zhao, X., Ahram, A., Berman, R. F., Muizelaar, J. P., Lyeth, B. G. (2003). "Early loss of astrocytes after experimental traumatic brain injury." Glia 44(2): 140-52.

Ziegenfuß, T. (2007). "Traumatologische Notfälle. " Berlin Heidelberg, Springer.

### ABSTRACT

*Objective:* Exogenous ubiquitin reduces cortical contusion volume and tends to reduce brain water content after controlled cortical impact injury Controlled Cortical Impact Injury (CCII) in rats. The mechanisms how exogenous ubiquitin exerts these effects remain unclear. Some studies revealed ubiquitin's immune modulatory abilities; therefore, we hypothesized that ubiquitin influences the local innate inflammatory response after CCII.

*Materials and Methods:* Sprague-Dawley rats were exposed to CCII and randomized to either 1.5 mg/kg ubiquitin or 0.9% NaCI intravenously within 5 minutes after CCII. Levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ \_, and IL-1ra were quantified using rt-PCR. Immune cells were immunohistochemically stained with OX-42, MPO, HIS48, ED1, and GFAP. Apoptosis was analyzed by TUNEL.

*Results:* IL-10 expression after 3 days was significantly lower in the verum group  $(1.0651e^5 \pm 0.60931e^5 \text{ vs. } 2.2661e^5 \pm 1.2441e^5 \text{ relative messenger RNA expression; p} = 0.02)$  and TNF- $\alpha$ -levels tended to be higher in the verum group (22.011e<sup>5</sup> ± 10.871e<sup>5</sup> vs.  $9.341e^5 \pm 4.441e^5$  relative messenger RNA; p = 0.06). ED1-positive cells were significantly increased in the pericontusional cortex after ubiquitin treatment at day 7 (823 ± 182 cells/mm2 vs. 607 ± 189 cells/mm2; p = 0.04). Quantification of apoptotic cells did not differ between the groups.

*Conclusion:* Exogenous ubiquitin modulates the immune response by influencing the infiltration of macrophages or activated microglia and the expression of IL-10 and possibly TNF- $\alpha$  after CCII. The effects of these changes in immune response on posttraumatic neurodegeneration still need to be clarified.

*Key Words:* controlled cortical impact, immune response, apoptosis, exogenous ubiquitin, cytokines.

### ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abb. 1: CCII-Traumagerät.
- Abb. 2: Hautinzision, Freilegung der Schädelnähte und Trepanation.
- Abb. 3: Trepanation des Rattenschädels mit Schädelnähten.
- Abb. 4: Koronarer Schnitt durch das Rattenhirn (Bregma -3.3 mm).
- Abb. 5: Bestimmung positiver Zellen nach immunhistochemischer Färbung.
- Abb. 6: Zeitlicher Ablauf der Versuchsdurchführung.
- Abb. 7: Hb-Verlauf in den 7-Tages-Gruppen.
- Abb. 8: Relative TNF- $\alpha$ -mRNS-Expression 4 und 72 Stunden nach dem Trauma.
- Abb. 9: Relative IL-1- $\beta$ -mRNS-Expression 4 und 72 Stunden nach dem Trauma.
- Abb. 10: Relative IL-1ra-mRNS-Expression 4 und 72 Stunden nach dem Trauma.
- Abb. 11: Relative IL-6-mRNS-Expression 4 und 72 Stunden nach dem Trauma.
- Abb. 12: Relative IL-10-mRNS-Expression 4 und 72 Stunden nach dem Trauma.
- Abb. 13: Graphische Darstellung HIS48-positiver Zellen im perikontusionellen Kortex, der Kontusion, dem ipsilateralen Kortex und in der kontralateralen Hemisphäre 24 Stunden nach dem Trauma.
- Abb. 14: Graphische Darstellung MPO-positiver Zellen im PC Kortex, der Kontusion, dem Α ipsilateralen Kortex, in diesen Bereichen insgesamt und in der kontralateralen 24 Hemisphäre Stunden nach dem Trauma. Graphische Darstellung MPO-positiver Zellen im PC Kortex, der Kontusion, dem В ipsilateralen Kortex und in diesen Bereichen insgesamt 7 Tage nach dem Trauma. С Graphische Darstellung MPO-positiver Zellen im kontralateralen Kortex, kontralateralen Hippokampus und der ipsilateralen Hemisphäre 7 Tage nach dem Trauma.
- Abb. 15: Graphische Darstellung OX-42-positiver Zellen im perikontusionellen Kortex, der Kontusion, dem ipsilateralen Kortex und in den kontralateralen Arealen 24 Stunden nach dem Trauma.

- Abb. 16: Graphische Darstellung ED1-positiver Zellen im PC Kortex, der Kontusion, dem ipsilateralen Hippokampus und in diesen Bereichen insgesamt 7 Tage nach dem Trauma.
- Abb. 17: ED1-Färbung 7 Tage nach dem Trauma ipsilateral. A: Koronarer Schnitt (nativ) der Ubiquitingruppe. B: Koronarer Schnitt (nativ) der Plazebogruppe. C: Mikroskopische Ansicht der Kontusion (Plan) in der Ubiquitingruppe. D: Mikroskopische Ansicht der Kontusion (Plan) in der Plazebogruppe. E: Mikroskopische Ansicht des PC Kortex (40x) in der Ubiquitingruppe. F: Mikroskopische Ansicht des PC Kortex (40x) in der Plazebogruppe.
- Abb. 18: Kontralateraler Kortex und Hippokampus nach ED1-Färbung (Plan).
- Abb. 19: Morphologie GFAP-positiver Zellen in 40x Vergrößerung. A = aktivierte Astrozyten im PC Kortex der ipsilateralen Hemisphäre und B = ruhende Astrozyten des kontralateralen Kortex.
- Abb. 20: Graphische Darstellung GFAP-positiver Zellen im perikontusionellen Kortex, dem kontralateralen Kortex, dem ipsilateralen Hippokampus und in dem ipsilateralen Hippokampus 7 Tage nach dem Trauma.
- Abb. 21: Fibrotische Umwandlung des Kontusionsareals (Plan).
- Abb. 22: Graphische Darstellung apoptotischer Zellen 72 Stunden nach dem Trauma im perikontusionellen Kortex, der Kontusion, dem ipsilateralen Hippokampus und in den kontralateralen Arealen.
#### TABELLENVERZEICHNIS

- Tab. 1: Glasgow-Coma-Scale nach Müller (2008/09)
- Tab. 2: Einstellungen des Traumagerätes für die vorliegende Studie
- Tab. 3: Verdünnung der primären und sekundären Antikörper für die Immunhistochemie.
- Tab. 4: Verteilung der Versuchstiere.
- Tab. 5: Erhobene Daten während Operation und Hirnentnahme.
- Tab. 6: Physiologische Parameter der BGAs und Ergebnisse der ICP-Messung der 7-Tages-Gruppen.
- Tab. 7: Unmittelbare Schäden durch das Trauma nach subjektiver Einschätzung durch den Operateur.

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

3- Aminopropyl)tr iethoxysilane	APTES	CAMs	cell adhesion molecules
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol	CCII	Controlled Cortical Impact Injury
AB- Komplex/HRP	Avidin-Biotin-Peroxidase Komplex/horseradish peroxidase	CD	Cluster of Differentiation
AG	Antigen	cDNS	Copy DNS
AK	Antikörper	C/EBPb	CCAAT/enhancer-binding-protein beta
Apaf-1	apoptotische Protease- Aktivierungsfaktor-1	CINC-1	cytokine-induced neutrophil chemoattractant
aPCO <sub>2</sub>	arteriellen CO <sub>2</sub> -Partialdruck	CNTF	ciliary neurotrophic factor
aPO <sub>2</sub>	arteriellen O <sub>2</sub> -Partialdruck	CPP	cerebral perfusion pressure = zerebraler Perfusionsdruck
ATP	Adenosintriphosphat	CSF	cerebrospinal fluid
Bad	Bcl-2-Antagonist-of-Cell-Death	СТ	Computertomographie
Bax	Bcl-2-associated X protein	Cyt-C	Cytochrom C
Bcl-2	B-cell lymphoma 2	DGNC	Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie
Bcl-xL/Bcl2-L- 1	Bcl-2-like protein 1	DNase	Desoxyribonuklease
BGA	Blutgasanalyse	DNS	Desoxyribonukleinsäure
BHS	Blut-Hirn-Schranke	dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
BMVBS	Bundesministerium für Verkehr, Bau und Stadtentwicklung	FBS	Fetales bovines Serum
BSA	Bovines Serum Albumin	GABA	Gamma-aminobutyric acid
Bupivacain	1-Butyl-N-(2,6-dimethylphenyl) 2-piperidinecarboxamide	GCS	Glasgow Coma Scale
cAMP	Cyclisches AMP	GFAP	Glial fibrillary acidic protein

gp 130	Glykoprotein 130	MHC	Major Histocompatibility Complex
GTP	Guanosintriphosphat	MMP	Matrix-Metallo-Proteinasen
Hb	Hämoglobin	MPO	Myeloperoxidase
HCI	Chlorwasserstoff	mRNS	Messenger RNS
ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül	MTBI	"mild traumatic brain injury", leichtes SHT
lclL-1ra	intrazellulärer IL-1ra	$N_2$	Stickstoff
		N <sub>2</sub> O	Lachgas
ICP	intracranial pressure = intrakranieller Druck	NaCl	Natriumchlorid
lg	Immunglobuline	n/aS	Nach (after) Substanzgabe
IHC	Immunhistochemie	n/aT	Nach (after) dem Trauma
IL	Interleukin	NGF	nerve growth factor"
IL-1-RI und –RII	IL-1-Rezeptoren 1 und 2	NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain- enhancer of activated B-cells
IL-1ra	Interleukin 1 Rezeptorantagonist	NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
IL-1ra IL-1 RAcP	Interleukin 1 Rezeptorantagonist IL-1 Rezeptor accessory protein	NK-Zellen NMDA	Natürliche Killerzellen N-Methyl-D-Aspartat
IL-1ra IL-1 RAcP IL-6R	Interleukin 1 Rezeptorantagonist IL-1 Rezeptor accessory protein IL-6-Rezeptor	NK-Zellen NMDA NO	Natürliche Killerzellen N-Methyl-D-Aspartat Stickstoffmonoxid
IL-1ra IL-1 RAcP IL-6R IL-10R 1 und 2	Interleukin 1 Rezeptorantagonist IL-1 Rezeptor accessory protein IL-6-Rezeptor IL-10-Rezeptoren 1 und 2	NK-Zellen NMDA NO NOS	Natürliche Killerzellen N-Methyl-D-Aspartat Stickstoffmonoxid NO-Synthase
IL-1ra IL-1 RAcP IL-6R IL-10R 1 und 2 IFN-γ	Interleukin 1 Rezeptorantagonist IL-1 Rezeptor accessory protein IL-6-Rezeptor IL-10-Rezeptoren 1 und 2 Interferon-γ	NK-Zellen NMDA NO NOS	Natürliche Killerzellen N-Methyl-D-Aspartat Stickstoffmonoxid NO-Synthase Sauerstoff
IL-1ra IL-1 RAcP IL-6R IL-10R 1 und 2 IFN-γ IRAK	Interleukin 1 Rezeptorantagonist IL-1 Rezeptor accessory protein IL-6-Rezeptor IL-10-Rezeptoren 1 und 2 Interferon-γ IL-1 receptor associated kinase	NK-Zellen NMDA NO NOS	Natürliche Killerzellen N-Methyl-D-Aspartat Stickstoffmonoxid NO-Synthase Sauerstoff Perikontusioneller Kortex
IL-1ra IL-1 RAcP IL-6R IL-10R 1 und 2 IFN-γ IRAK JAK	Interleukin 1 Rezeptorantagonist IL-1 Rezeptor accessory protein IL-6-Rezeptor IL-10-Rezeptoren 1 und 2 Interferon-γ IL-1 receptor associated kinase Janus-Kinase	NK-Zellen NMDA NO NOS O2 PC PGE2	Natürliche Killerzellen N-Methyl-D-Aspartat Stickstoffmonoxid NO-Synthase Sauerstoff Perikontusioneller Kortex Prostaglandin-E2
IL-1ra IL-1 RAcP IL-6R IL-10R 1 und 2 IFN-γ IRAK JAK kDAIRAK	Interleukin 1 Rezeptorantagonist IL-1 Rezeptor accessory protein IL-6-Rezeptor IL-10-Rezeptoren 1 und 2 Interferon-γ IL-1 receptor associated kinase Janus-Kinase Kilo DaltonIL-1 receptor associated kinase	NK-Zellen NMDA NO NOS O2 PC PGE2 PMBC	Natürliche Killerzellen N-Methyl-D-Aspartat Stickstoffmonoxid NO-Synthase Sauerstoff Perikontusioneller Kortex Prostaglandin-E2 Periphere mononuclear blood cells
IL-1ra IL-1 RAcP IL-6R IL-10R 1 und 2 IFN-γ IRAK JAK kDAIRAK KG	Interleukin 1 Rezeptorantagonist IL-1 Rezeptor accessory protein IL-6-Rezeptor IL-10-Rezeptoren 1 und 2 Interferon-γ IL-1 receptor associated kinase Janus-Kinase Kilo DaltonIL-1 receptor associated kinase Körpergewicht	NK-Zellen NMDA NO NOS O2 PC PGE2 PMBC PBS	Natürliche KillerzellenN-Methyl-D-AspartatStickstoffmonoxidNO-SynthaseSauerstoffPerikontusioneller KortexProstaglandin-E2Periphere mononuclear blood cellsphosphat buffered saline = phosphatgepufferter Salzlösung
IL-1ra IL-1 RAcP IL-6R IL-10R 1 und 2 IFN-γ IRAK JAK kDAIRAK KG	Interleukin 1 Rezeptorantagonist IL-1 Rezeptor accessory protein IL-6-Rezeptor IL-10-Rezeptoren 1 und 2 Interferon-γ IL-1 receptor associated kinase Janus-Kinase Kilo DaltonIL-1 receptor associated kinase Körpergewicht	NK-Zellen NMDA NO NOS O2 PC PGE2 PMBC PBS	Natürliche KillerzellenN-Methyl-D-AspartatStickstoffmonoxidNO-SynthaseSauerstoffPerikontusioneller KortexProstaglandin-E2Periphere mononuclear blood cellsphosphat buffered saline = phosphatgepufferter SalzlösungPolymerase-Ketten-Reaktion
IL-1ra IL-1 RAcP IL-6R IL-10R 1 und 2 IFN-γ IRAK JAK kDAIRAK KG MAD MAP Kinase	Interleukin 1 Rezeptorantagonist IL-1 Rezeptor accessory protein IL-6-Rezeptor IL-10-Rezeptoren 1 und 2 Interferon-γ IL-1 receptor associated kinase Janus-Kinase Kilo DaltonIL-1 receptor associated kinase Körpergewicht Mittlerer arterieller (Blut-)Druck mitogen activated protein kinase	NK-Zellen NMDA NO NOS O2 PC PGE2 PMBC PBS PCR PCR	Natürliche KillerzellenN-Methyl-D-AspartatStickstoffmonoxidNO-SynthaseSauerstoffPerikontusioneller KortexProstaglandin-E2Periphere mononuclear blood cellsphosphat buffered saline = phosphatgepufferter SalzlösungPolymerase-Ketten-ReaktionPolymorphkernige neutrophile Granulozyten

pound-force per square inch	TBST	Tris buffered saline + Tween
Ribonuklease-Inhibitor	TdT	terminaler Nukleotidyltransferase
Ribonukleotidsäure	TEER	Transendothelial electrical resistance
Raumtemperatur/reverse Transkriptase	TGF-β	transformig growth factor
Standardabweichung (standard deviation)	TNF-α	Tumornekrose-Faktor $\alpha$
Schädel-Hirn-Trauma	TNF- $\alpha$ -R1 und –R2	Tumornekrose-FaktorRezeptor 1 und 2
src homology 2	TTC	2,3,5, Triphenyl, 2H- Tetrazoliumchlorid
soluble IL-1ra	TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labelling
soluble IL-6R	v/bHE	Vor (before) Hirnentnahme
signal transducer and activator of transcription 1und 3	v/bT	Vor (before) dem Trauma
soluble TNF- $\alpha$ -Rezeptor	VEGF	Vascular endothelial growth factor
TNF- $\alpha$ - Converting-Enzym	WHO	World Health Organization
Tris buffered saline	ZNS	Zentrales Nervensystem
	pound-force per square inchRibonuklease-InhibitorRibonukleotidsäureRaumtemperatur/reverse TranskriptaseStandardabweichung (standard deviation)Schädel-Hirn-Traumaschädel-Hirn-Traumasrc homology 2soluble IL-1rasoluble IL-6Rsignal transducer and activator of transcription 1und 3soluble TNF-α-RezeptorTNF- α- Converting-EnzymTris buffered saline	pound-force per square inchTBSTRibonuklease-InhibitorTdTRibonukleotidsäureTEERRaumtemperatur/reverse TranskriptaseTGF-βStandardabweichung (standard deviation)TNF-αSchädel-Hirn-TraumaTNF-α-R1 und -R2src homology 2TTCsoluble IL-1raV/bHEsignal transducer and activator of transcription 1 und 3V/bTsoluble TNF-α-RezeptorVEGFTNF-α-Converting-EnzymZNS

#### DANKSAGUNG

Ich danke meiner ganzen Familie für ihre Unterstützung während meines bisherigen Werdeganges und der Fertigstellung dieser Arbeit. Meinen Eltern, die zugleich Vorbilder und Vertraute für mich sind, danke ich besonders. Danke auch an meine ältere Schwester, die stets den Weg für mich ebnete und mir immer eine Vertraute und gute Beraterin war.

Meinem Freund danke ich für seine Liebe, grenzenlose Geduld und Unterstützung während meines ganzen Studiums.

Herrn PD Dr. Ullrich Thomale verdanke ich meine Begeisterung für die Neurochirurgie und die Ermöglichung dieser Arbeit in seiner Arbeitsgruppe. Er gewährte mir die Freiheiten meine Arbeitsabläufe selbst zu gestalten, war aber immer auch bereit Hilfestellungen zu leisten. Danke für diese persönliche Betreuung!

Herrn Dr. Martin Misch möchte ich dafür danken, dass er mich teilhaben lies an dem von ihm begonnen Projekt. Er trieb die Arbeit durch Weiterführung der operativen Anteile des Projekts immer wieder voran, unterstützte mich beim Verfassen wissenschaftlicher Arbeiten und fand auch sonst die Zeit mich wenn nötig zu unterstützen.

Mein großer Dank gilt auch Herrn Pablo A. Casalis. Als guter Freund und Berater lehrte er mich alles was ich über das experimentelle Arbeiten im Labor weiß. Auch er opferte immer wieder Zeit um mich geduldig bei der Arbeit an diesem Projekt zu unterstützen. <u>¡Muchas</u> gracias por tu paciencia!

### EIDESTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, Leonie Gölz, an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema "Charakterisierung von Immunreaktionen nach traumatischer kortikaler Kontusion und Gabe von Ubiquitin im Tiermodell" selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, den 14.11.2011

# CURRICULUM VITAE

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