

Aus der Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie mit dem
Arbeitsbereich Orthopädie der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchung der pharmakologischen Blockade der
Entzündungsreaktion mit einem neutralisierenden Anti-Komplement
Faktor B Antikörper im experimentellen Schädel-Hirn-Trauma Modell
in der Maus

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Michał Rozanski
aus Piła (Polen)

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. P. Stahel
2. Prof. Dr. med. W. Ertel
3. Prof. Dr. med. P. Biberthaler

Datum der Promotion: 23.06.2013

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
1. Einleitung	8
1.1 Definition und Klassifikation des Schädel-Hirn-Traumas	8
1.2 Epidemiologie	9
1.3 Pathophysiologie des SHT und Rolle des Komplementsystems	12
1.4 Aktuelle Therapiekonzepte	29
1.5 Charakterisierung des Anti-Faktor B Antikörpers (mAb 1379)	32
1.6 Hypothese / Fragestellung	33
2. Material und Methoden	34
2.1 C57BL/6 Mäuse	34
2.2 Versuchsgruppen	34
2.3 Experimentelles Traumamodell	34
2.4 Pharmakologische Therapie	37
2.5 Neurologisches Scoring	37
2.6 Gewebe	39
2.7 Komplementaktivität	39
2.8 Zelltodanalyse (Apoptose)	39
2.9 Immunhistochemie	41
2.10 Analyse der Genexpression	44
2.11 Statistik	55
3. Ergebnisse	56
3.1 Outcome	56
3.2 Aktivität des alternativen Komplementaktivierungsweges	57
3.3 Zelltod /Apoptose	58
3.4 Immunhistochemie	62
3.5 Real-time RT-PCR	67

4. Diskussion	71
5. Zusammenfassung	78
6. Literaturverzeichnis	80
7. Danksagung	88
8. Curriculum vitae	89
9. Erklärung	92

Abkürzungsverzeichnis

AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
ATP	Adenosintriphosphat
AVDO ₂	Arterio-venöse Sauerstoffdifferenz
bp	Basen Paare
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BSA	Bovine serum albumin (bovines Serumalbumin)
cDNA	komplementäre DNA
C ₁ -Inh	Komplementprotein C ₁ Inhibitor
C _{3a} R	Anaphylatoxin C _{3a} Rezeptor
C _{5a} R	Anaphylatoxin C _{5a} Rezeptor
COX-2	Cyclooxygenase 2
CPP	Zerebraler Perfusionsdruck
CR-1	Komplementrezeptor 1
CRASH	„Corticosteroid Randomization After Significant Head Injury“- Studie
Crry	Complement receptor type 1- related protein y (Komplementrezeptor 1 verwandte Protein y)
C _T	Schwellenwert-Zyklus (Treshold- Zyklus)
CT	Computertomographie
d	Tag bei den Zeitpunkten
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
DAF	Decay accelerating factor (CD55)
DAPI	4', 6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethyldicarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonukleinas
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol- bis (aminoethylether)- N,N,N',N'- tetraessigsäure
EEG	Elektroenzephalographie
FB	Faktor B
FCS	Fetal calf serum (fetales Kälberserum)

FEM	„Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin“
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCS	Glasgow Coma Scale
GFAP	Glial fibrillary acidic protein (saures Gliafaserprotein)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
i.p.	intraperitoneal
ICAM- 1	Inter-Cellular Adhesion Molecule 1 (CD54)
ICP	Intrakranieller Druck
IP3	Inositoltriphosphat
IgM	Immunglobulin M
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IL-18-BP	Interleukin-18 bindendes Protein
mAb 1379	Monoklonaler Anti-Faktor B Antikörper
mGluR	Glutamatrezeptor
mRNA	messenger RNA
MAC	Membrane Attack Complex (membranangreifender Komplex)
MAP	Mittlerer arterieller Druck
MASP	MBL- assoziierte Serinprotease
MBL	Mannose bindendes Lektin
MCP	Membran-Cofactor der Proteolyse (CD46)
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
NGF	Nerve growth factor (Nervenwachstumsfaktor)
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
NSS	„Neurological Severity Score“
paCO ₂	Arterieller Kohlendioxidpartialdruck
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonukleinas

RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
sCR-1	Löslicher Komplementrezeptor Typ 1
SAB	Subarachnoidalblutung
SAP	Serum Amyloid P component
SEM	Standardfehler des arithmetischen Mittels
SHT	Schädel-Hirn-Trauma
SLE	Systemischer Lupus Erythematoses
TNF	Tumor necrosis factor (Tumornekrosefaktor)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP-biotin nick end labeling
UNG	Uracil-N-Glycosylase
VCP	Vaccinia virus complement control protein
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WT	Wildtyp
ZNS	Zentralnervensystem

1. Einleitung

1.1 Definition und Klassifikation des Schädel-Hirn-Traumas

Das Schädel-Hirn-Trauma (SHT) stellt eine isolierte oder kombinierte Verletzung von Kopfschwarte, Schädel und Gehirn dar, welche durch äußere Gewalteinwirkung verursacht wird. Es gibt keine Klassifikation, die alle Faktoren, Ursachen sowie pathologische und klinische Erscheinungen des SHT umfasst. Möglich ist eine Klassifizierung anhand von pathomorphologisch-anatomischen Gesichtspunkten. Man unterscheidet Kopfschwartenverletzungen, Schädelprellungen, Frakturen, gedeckte und offene SHTs, sowie Hirngefäß- und Hirnnervenverletzungen. Unter dem Begriff offenes SHT wird die Verletzung mit einer Eröffnung der Dura mater verstanden. Beim geschlossenen SHT hingegen bleibt die Dura intakt. Die entscheidenden Informationen über das Ausmaß der intrakraniellen Verletzungen wie auch morphologischen Veränderungen nach Trauma liefert die bildgebende Diagnostik, hier vor allem die Computertomographie (CT). Sie ermöglicht weiterhin eine Klassifikation der Schäden und Einschätzung der Prognose. Die Tabelle 1 stellt die CT-Klassifikation des SHT nach Marshall dar [1].

Tab. 1 CT-Klassifikation des SHT nach Marshall.

Typ der Verletzung	Definition	Mortalität
Diffuse Verletzung I	Keine sichtbare Pathologie im CCT	10%
Diffuse Verletzung II	Basale Zisternen unauffällig, 0-5 mm Mittellinienverschiebung, keine parenchymatöse Läsion > 25ml	14%
Diffuse Verletzung III	Basale Zisternen komprimiert oder nicht sichtbar, 0-5 mm Mittellinienverschiebung, keine parenchymatöse Läsion > 25ml	34%
Diffuse Verletzung IV	Mittellinienverschiebung > 5mm, keine parenchymatöse Läsion > 25 ml	56%
Diffuse Verletzung V	Massenläsion/Hämatom chirurgisch evakuiert	
Diffuse Verletzung VI	Massenläsion/Hämatom nicht operiert	

Für die klinische Beurteilung des Patienten wird die Glasgow Coma Scale (GCS) benutzt [2]. Die Einstufung erfolgt anhand von 3 Kriterien und zwar Augenöffnen, verbaler sowie motorischer Antwort.

Tab. 2 Glasgow Coma Scale (GCS).

Untersuchte Reaktion	Beobachtete Reaktion	Punkte
Augenöffnen	Spontan	4
	Auf Aufforderung	3
	Auf Schmerzreiz	2
	keine	1
Beste verbale Antwort	Vollorientiert	5
	Unscharf orientiert	4
	Verwirrtheit	3
	Unverständliche laute	2
	keine	1
Beste motorische Antwort	Adäquat	6
	Gezielte Abwehr	5
	Ungezielte Abwehr	4
	Beugesynergismen	3
	Strecksynergismen	2
	Keine Bewegungen	1

Die Einteilung des SHT hinsichtlich des Schweregrads mittels der GCS wird allgemein akzeptiert und ist weit verbreitet [3]. Ein initialer GCS-Wert zwischen 13 und 15 bezeichnet ein leichtes SHT. Werte von 9 bis 12 werden als ein mittelschweres und unterhalb von 9 als ein schweres SHT eingestuft. Ein großer Vorteil der GCS liegt darin, dass der Wert relativ einfach erhoben werden kann und eine grobe klinische Einschätzung von Läsionen im Zentralen Nervensystem erlaubt. Mittels der GCS kann die Dynamik des klinischen Verlaufes,

eventuelle Verbesserungen oder auch Verschlechterungen objektiv kontrolliert und dokumentiert werden.

1.2 Epidemiologie

Die Daten über die Epidemiologie des SHT sind oft unzureichend. Vor allem in Europa fehlt es an nationalen und internationalen Studien, die präzise epidemiologische Informationen enthalten [3]. Die meisten Studien sind lokal begrenzt und beinhalten nur spezielle Gruppen von Patienten. Viele methodologische Probleme bei der Erhebung der Daten, sowie zeitliche und geographische Rahmenbedingungen, Ausschlusskriterien der Studien sowie zu niedrige Fallzahlen erschweren eine definitive Einschätzung von Inzidenz und Mortalität erheblich. Die in Krankenhäusern geführten Statistiken berücksichtigen oft nicht Patienten, die ein SHT erlitten und zur Zeit der Aufnahme keine neurologischen Ausfälle aufwiesen. Auf der anderen Seite gibt es auch Patienten, die sich in Privatpraxen vorstellen oder überhaupt nicht behandeln lassen [4].

Trotzdem kann aus den derzeit vorhandenen Studien durchaus der Schluss gezogen werden, dass das SHT ein wesentliches medizinisches und auch soziales Problem darstellt. Sowohl die Inzidenz als auch Mortalität sind im Vergleich zu anderen Krankheiten, wie zum Beispiel dem Schlaganfall, hoch. Das SHT wurde sogar als „leise Epidemie“ beschrieben [5, 6]. Die Inzidenz des SHT in Deutschland schätzt man auf 337/ 100 000, wovon 33,5/ 100 000 als schwerwiegendes SHT bezeichnet werden. Zum Vergleich beträgt die Inzidenz des Bronchialkarzinoms 60/100 000 [7]. Die Mortalität auf Grund eines SHT betrug im Jahr 2000 in Deutschland 9/100 000, was 7 567 Patienten entsprach [7]. Im Jahr 2000 sind 0,9% aller Todesfälle in Deutschland als direkte Folge eines SHT zu betrachten.

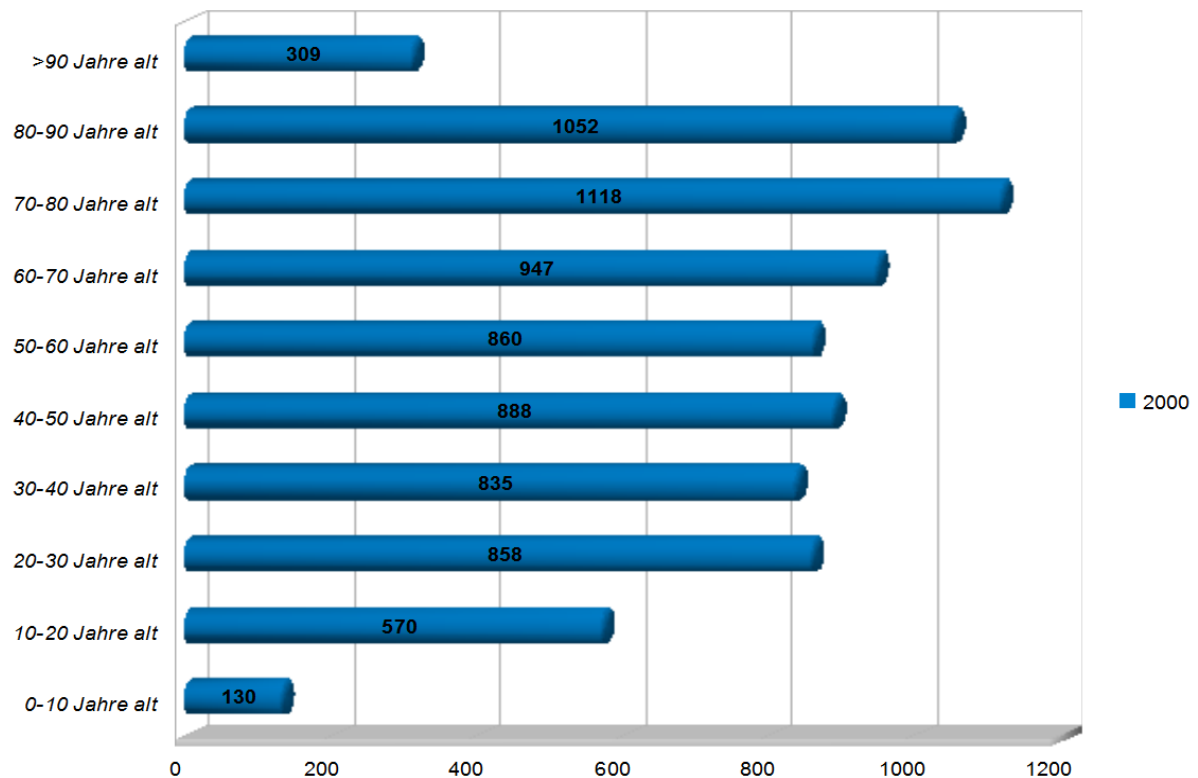
In den Vereinigten Staaten erleiden jedes Jahr ca. 1,7 Millionen Bewohner ein SHT, davon versterben 52 000. Etwa 275 000 werden stationär und 1,365 Millionen in der Notfallaufnahme behandelt [8]. In Bezug auf Kinder unter dem vierzehnten Lebensjahr sterben nach Schätzungen jedes Jahr über 2000, über 35 000 werden stationär behandelt und über 470 000 im Notfallaufnahme-

bereich versorgt [8]. In Großbritannien und Nordirland werden mehr als 150 000 Patienten jährlich mit einem SHT ins Krankenhaus eingewiesen [9]. Die Inzidenz in westeuropäischen Ländern und den Vereinigten Staaten variiert zwischen 132 und 430 /100 000 [7].

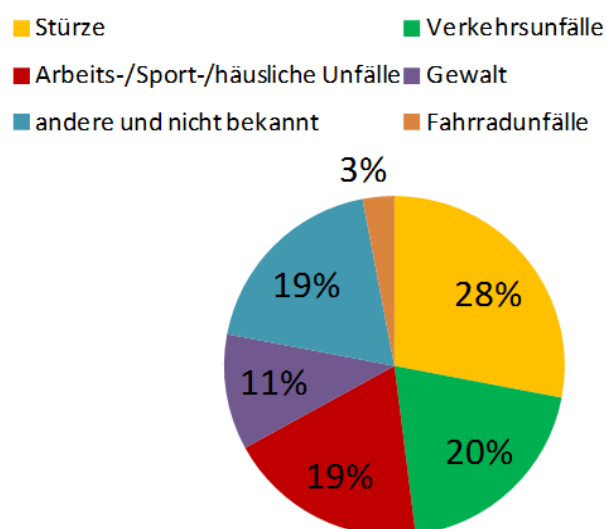
Der Zusammenhang zwischen dem Alter der Patienten und der Inzidenz eines SHT zeigt zwei Gipfel: in der Gruppe 10-29 Jahre und über 65 Jahre [4, 10]. Die Anzahl der Todesfälle nach einem SHT in verschiedenen Altersgruppen in Deutschland wird in Tabelle 4 beschrieben. Die höchste Mortalitätsrate wurde, in Hinblick auf eventuelle Vorerkrankungen und hohe Inzidenz, in der Gruppe der über 75-jährigen festgestellt [7]. Die hohe Mortalitätsrate in der Gruppe der jungen Menschen zwischen 15 und 25 Jahren soll nicht übersehen bleiben [7]. Weiterhin wird berichtet, dass das geschlossene SHT häufigste Todesursache und Hintergrund für schwere neurologische Beeinträchtigungen in der Altersgruppe unter 45 Jahren ist [10, 11]. Die Mortalitätsrate in Deutschland ist seit 1972 ständig gesunken. Eine kurzfristige Erhöhung trat nach der Wiedervereinigung der beiden deutschen Staaten auf [7].

Tab. 3 Mortalität in Deutschland im Jahr 2000 (Stuedel et al. 2005).

Todesfälle insgesamt	838797
Todesfälle nach SHT	7567 (0,9%)
SHT Todesfälle/Tod nach anderen traumatischen Ursachen	21,9%

Tab. 4 Todesfälle nach SHT in Deutschland in Abhängigkeit vom Alter (Studel et al. 2005).

Zu den häufigsten Ursachen eines SHT gehören: Verkehrsunfälle, Stürze, Schlägereien und Suizide, wobei die prozentuale Verteilung in Abhängigkeit von Studienkriterien, geographischen Rahmenbedingungen der Studien wie auch den kulturellen Gewohnheiten der untersuchten Population, variiert [4, 8, 9, 12]. Die Abbildung 1 illustriert die Ursachen eines SHT in den Verei-

**Abb. 1** Ursachen des SHT in den USA (Centers for Disease Control- CDC).

nigten Staaten in der Gesamtpopulation [8]. Verkehrsunfälle machen dort den größten Anteil in der Altersgruppe der 15 bis 45-jährigen aus, Stürze hingegen in der Altersgruppe über 45 Jahre [10]. Auch bei Kleinkindern unter 4 Jahren werden Stürze als dominierende Ursache des SHT genannt [8]. Als Risikogruppen können Männer (73-80% aller schweren bis mittelschweren SHT), kleine Kinder (0-4 Jahre) und Jugendliche im Alter von

15-19 Jahren angesehen werden [8, 9, 12].

Patienten, die ein SHT erlitten haben, leiden nicht nur unter den körperlichen Folgen der Verletzung (Paresen, Sensibilitätsstörungen, Koordinationsstörung, Hirnnervenausfälle, Schwindel, Kopfschmerzen, Epilepsien) sondern sind auch für psychische Störungen und Verhaltensauffälligkeiten prädisponiert [6, 13, 14].

Die Behandlung des SHT und vor allem der daraus folgenden Behinderung sowie vielfache Arbeitsunfähigkeit generieren jährlich enorme Kosten, sowohl in den Vereinigten Staaten als auch in Europa. Die jährlichen Kosten werden in den USA auf 60 Milliarden US Dollar geschätzt [3].

1.3 Pathophysiologie des SHT und Rolle des Komplementsystems

1.3.1 Aufteilung der pathologischen Prozesse nach SHT

Die pathophysiologischen Grundlagen des Schädel-Hirn-Traumas sind komplex und trotz der fortgeschrittenen Forschung auf diesem Gebiet noch nicht ausreichend geklärt [3, 15]. Die pathologischen Ereignisse nach einem SHT werden in primäre und sekundäre Hirnschäden aufgeteilt [3, 6, 14-16]. Die primären Hirnschäden beziehen sich auf unmittelbare mechanische Wirkungen der äußeren Kräfte auf das Neurocranium. Diese bedingen Schädelbrüche, intrakranielle sub- und epidurale Hämatome, intrazerebrale Kontusionsblutungen und diffuse axonale Schädigungen. Es ist nicht möglich diesen Schäden vorzubeugen [17]. Die schlechte Prognose des SHT bei Patienten, die ein initiales Trauma überlebt haben, hängt vom Ausmaß der sekundären Hirnschäden ab.

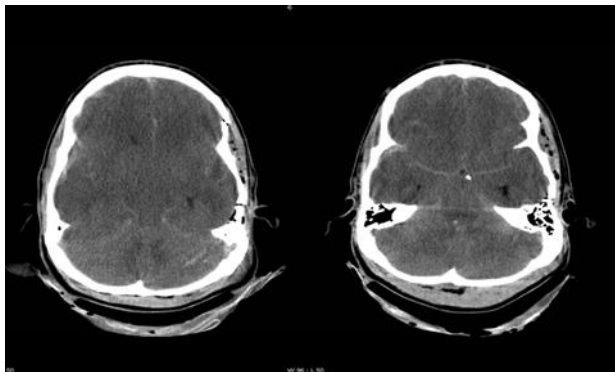
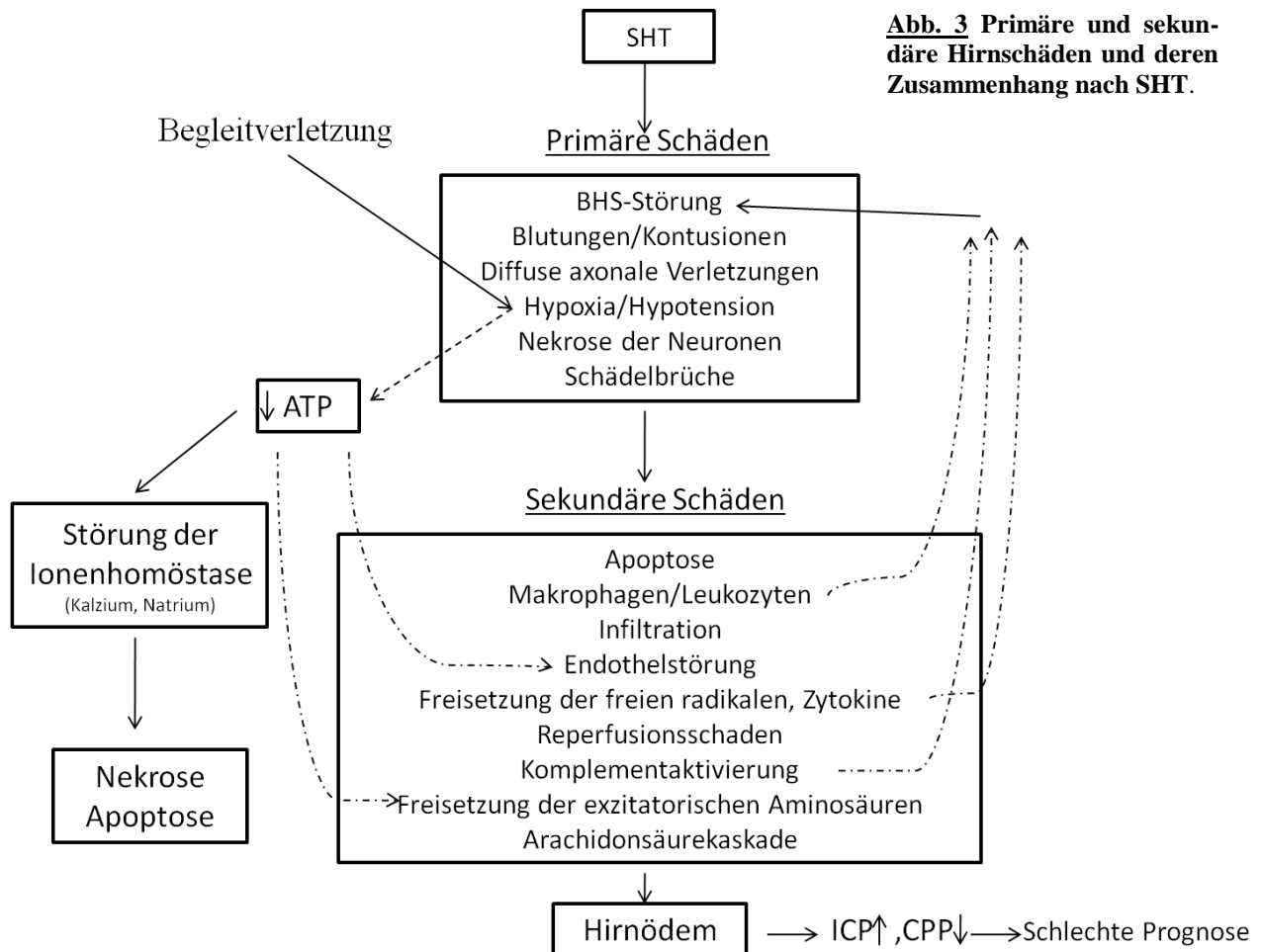


Abb. 2 Schädel-CT eines jungen Patienten 2 Stunden nach dem SHT. Ausgeprägtes Hirnödem, eine traumatische SAB und eine obere Einklemmung liegen vor (Aus der Sammlung von Prof. E. Hofmann, Fulda).

Sekundäre Hirnschäden sind Folge der primären Verletzungen und umfassen alle metabolischen und immunologischen Reaktionen, die im traumatisierten Hirn stattfinden. Hypoxie, Hypotension, Ischämie/Reperfusionsschäden, ausgeprägte Inflammation, die durch intrakranielle Komplementaktivierung verstärkt wird, Blut-Hirn-Schrankenstörung, Rekrutierung von Neutrophilen und Makrophagen, Freisetzung von Entzündungsmediatoren und Apoptose führen gemeinsam über verschiedene

Mechanismen zur Entwicklung eines Hirnödems, das für die ungünstige Prognose bei vielen Patienten verantwortlich ist und ein erhebliches Hindernis in der Behandlung des SHT darstellt

[15-18]. Es kommt hinzu, dass Patienten, die ein SHT erlitten haben, oft Begleitverletzungen wie akute Blutungen, einen hämorrhagischen Schock, Thoraxverletzungen und Knochenbrüche haben. Darüber hinaus lösen die hier genannten Verletzungen selbst eine akute immunologische Antwort des Organismus aus. Dabei werden Proteine der akuten Phase übermäßig produziert, sezerniert und tragen so zu Hypoxie wie auch schlechter Durchblutung des Gehirns bei [17, 19, 20].



1.3.2 Hypoxie und Hypoperfusion des Gehirnes nach SHT

Sowohl Hypoxie als auch Hypotonie und die daraus folgende Minderversorgung des Zentralnervensystems werden von vielen Autoren als wichtigste „letale“ Faktoren angesehen [18, 20]. Die Ursachen der Hypoxie und Hypotension liegen einerseits in den Begleitverletzungen des Patienten, andererseits sind sie bedingt durch ZNS-Kontusionen, verletzte zerebrale Gefäße, gestörte Autoregulation und Hämatom im Gehirn, die für erhöhten intrakraniellen Druck (ICP) und erniedrigte zerebrale Perfusionsdruck (CPP) -Werte sorgen [21-25]. Letztens durchgeführte Untersuchungen suggerieren eine hohe Vulnerabilität des verletzten Gehirns für Hypoxie und Hypo-

tension [18, 26]. Die Hypoxie und Hypotension führen zum erniedrigten Sauerstoffangebot für Zellen im ZNS. Das Gewebe stellt sich auf eine anaerobe ATP-Erzeugung um. Diese kann im Gehirn nur für wenige Minuten eine ausreichende ATP-Menge gewährleisten. Der Abfall des ATP-Spiegels und der Energiemangel führen zur Dysfunktion der Ionenpumpen und Depolarisation. Die cytoplasmatische Konzentrationen von Kalzium und Natrium steigen an, extrazelluläres Wasser dringt in die Zellen ein [27, 28]. Der Energiemangel löst die Freisetzung von exzitatorischen Aminosäuren wie Glutamat und Aspartat im Extrazellulärraum aus. Freigesetztes Glutamat aktiviert NMDA-, AMPA- und metabotrope Glutamatrezeptoren. Aktivierte NMDA- und AMPA-Rezeptoren ermöglichen einen weiteren Einstrom von Kalzium- und Natriumionen in die Neurone. Die metabotropen Rezeptoren wirken über IP3 und aktivieren Phospholipase C, was im Endeffekt zu einer zusätzlichen Mobilisation von Kalziumionen aus dem endoplasmatischen Retikulum führt. Da der Wiederaufnahmemechanismus des Glutamats aus dem zwischen-synaptischen Spalt hochaffin und energiebedürftig ist, fällt er bei ATP-Mangel aus. Dies führt zu einer dauernden Reizung seitens des Glutamats und zu anhaltendem Ioneneinstrom in die Zellen [16, 29]. In den ödematös veränderten Neuronen und Endothelzellen werden auf Grund von erhöhten Kalziumkonzentrationen nukleäre Prozesse in Gang gesetzt und Enzyme aktiviert: NO-Synthasen, Phospholipasen, Xanthinoxidasen und Proteasen. Es werden freie Sauerstoff- und Stickstoffradikale wie auch Arachidonsäuremetaboliten generiert [16, 27]. Diese potenten Moleküle haben bedeutenden Einfluss auf die Störung der Blut-Hirn-Schranke. Sie führen zu einer Exazerbation der intrakraniellen Entzündung, weiteren Funktionsausfällen der Zellmembran und Nekrosen von Zellen [16, 30-33].

1.3.3 Ischämie/Reperfusionsschäden

Ischämie/Reperfusionsschäden begleiten ein schweres SHT [15, 25, 34]. Die lokalen Effekte der Reperfusion können gewichtig zu einer schlechten Prognose und höheren Mortalitätsrate unter den Patienten mit Schlaganfall oder Schädel-Hirn-Trauma beitragen [27]. Die Ischämie als Folge der Hypotension, Hypoxie und des erhöhten intrakraniellen Druckes, kann durch eine eventuelle Wiederbelebung, Volumentherapie und möglichst frühe intensivmedizinische Maßnahmen beseitigt werden. Die Reperfusionsschäden entstehen als Folge der Normalisierung der Durchblutung und Sauerstoffversorgung des betroffenen, zuvor hypoxämischen Gewebes [27]. Sie sind durch Aktivierung, Mobilisation und Transmigration der Leukozyten, Produktion von freien Sauerstoffradikalen, möglicher Komplementaktivierung sowie Leukozyten- und Thrombozytenaggregation charakterisiert. In Endothelzellen werden vermehrt Adhäsionsmole-

küle, chemotaktische und proinflammatorische Mediatoren (Endotoxin, $\text{TNF}\alpha$, IL-6, IL-1, Komplementproteine), die eine lokale Entzündung verursachen, exprimiert. Vor allem bei gleichzeitigem Fehlen der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und P-Selektin konnte in den experimentellen Studien ein reduziertes Hirnödeme im Verlauf eines SHT gezeigt werden [27, 35]. Aktivierte Leukozyten infiltrieren die Basalmembran der Mikrogefäße, produzieren freie Sauerstoffradikale und verstärken vor Ort die entzündliche Reaktion. Sauerstoffradikale denaturieren die Membranproteine und schädigen die Zellen irreversibel [31, 32, 34]. Die natürlichen Schutzsubstanzen wie Antioxidanten, werden bei einem SHT unterreguliert und der Schutz des Endothels bleibt ineffektiv [31]. Die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke erhöht sich dramatisch, was den Einfluss und die Aktivierung von Komplementbestandteilen ermöglicht. Das Komplementsystem und seine Aktivierung tragen zum Ausmaß der Ischämie/Reperfusionsschäden bei [27]. Die Autoregulation der zerebralen Gefäße ist gestört und durch die reaktive Hyperämie verschlechtert sich das Hirnödeme erheblich [27].

1.3.4 Neuroinflammation

1.3.4.1 Komplement und seine Rolle im verletzten Gehirn

1.3.4.1.1 Aufbau des Komplementsystems

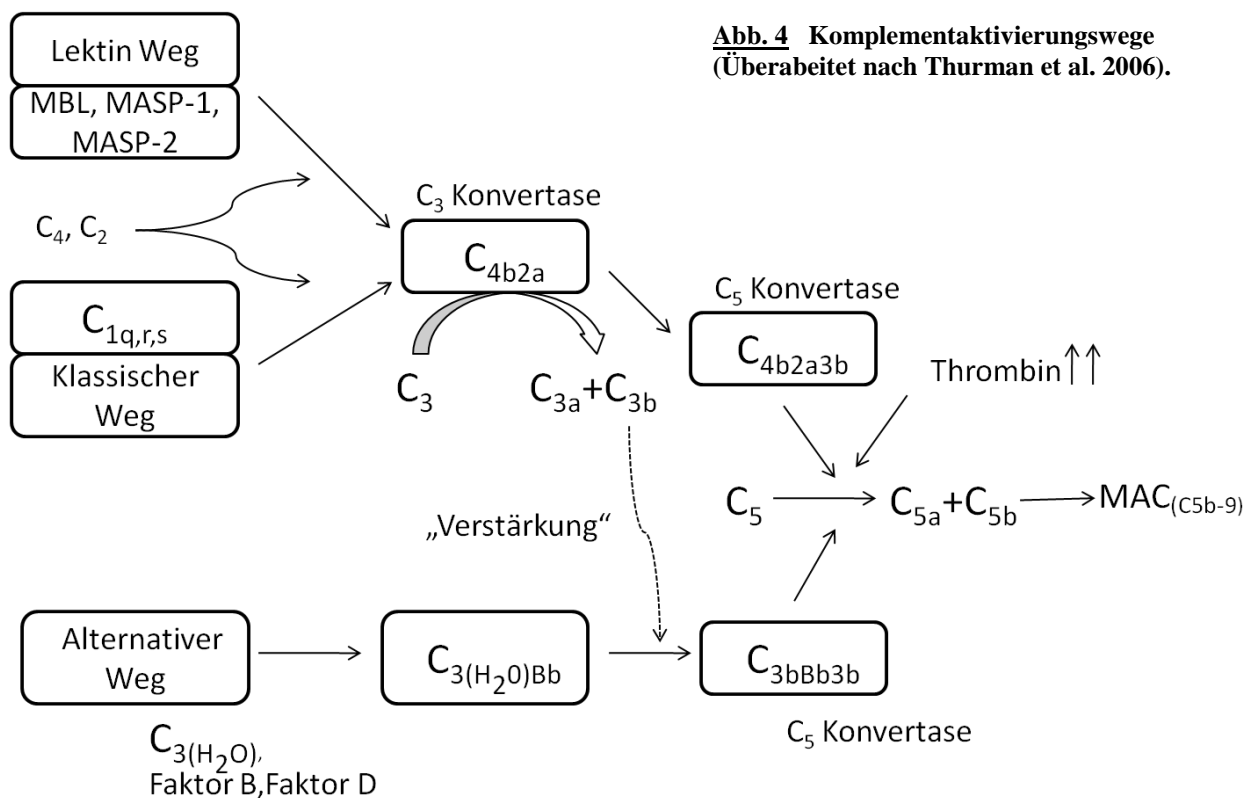
Das Komplementsystem gehört zur angeborenen Immunität. Es besteht aus ca. 40 Plasmaproteinen, Regulatoren und Rezeptoren, die miteinander interagieren können. Komplementproteine werden vorwiegend in der Leber synthetisiert, können aber in allen Geweben gefunden werden [36]. Auch andere Organe und Zellen sind im Stande Komplementproteine zu produzieren. Im Zentralnervensystem wurde diese Fähigkeit bei Neuronen, Mikroglia, Astrozyten und Oligodendrozyten nachgewiesen [36-38]. Die Hauptrolle des Komplementsystems liegt im Erkennen, Opsonierung und der Unterstützung der Phagozytose sowohl der Mikroorganismen als auch des erkrankten eigenen Gewebes. Die bei der proteolytischen Spaltung der Komplementproteine entstehende Anaphylatoxine, wie C_{3a} und C_{5a} , gehören zu den potentesten Entzündungsmediatoren. Die terminale Komplementkomponente, der sogenannte Membran Attack Komplex (MAC) kann durch die Ausbildung von Poren in Membranen zur Lyse der Krankheitserreger und Zellen ohne Hilfe von Phagozyten führen [36, 39-41].

1.3.4.1.2 Aktivierungswege des Komplements

Es gibt grundsätzlich 4 Komplementaktivierungswege:

- klassischer Weg
- Mannan-Bindungs-Lektin-Weg (MB-Lektin-Weg)
- alternativer Weg
- der vor kurzem beschriebene Weg der Spaltung des C₅ Proteins durch aktiviertes Thrombin.

Alle diese Wege führen zur Spaltung von C₅, Freisetzung von C_{5a} und Bildung des membranangreifenden Komplexes C_{5b}-C₉ (MAC) [36, 42].



Der klassische Weg wird durch Antigen-Antikörper-Komplex, IgM, komplementbindende IgG Isotypen, Proteine wie z.B. C-reaktives Protein oder Serum Amyloid Protein (SAP), ischämisch geschädigtes Endothel, apoptotische Zellen und Proteine des C₁-Komplexes des Komplements aktiviert [43, 44]. Der C₁-Komplex besteht aus dem C_{1q} Molekül und jeweils zwei C_{1r} und C_{1s} Molekülen. Die Bindung der C_{1q} Proteine an die Pathogenoberfläche verändert die Konformation im (C_{1r}:C_{1s})₂-Komplex. Auf diese Weise entsteht aktiviertes C_{1r}-Protein, das das C_{1s}-Protein spaltet. Das gespaltene C_{1s}-Protein ist eine aktive Serinprotease. Weitere Substrate für die so

entstandene Protease sind die Komplementbestandteile C_4 und C_2 . Die Spaltprodukte dieser Reaktion, C_{4b} und C_{2b} binden sich kovalent an die Pathogenoberfläche. Ein C_{4b} -Teil besitzt eine besonders hohe Affinität sich an die Oberfläche von Pathogenen zu heften. Der Komplex C_{4b2b} wird C_3 -Konvertase genannt, da er C_3 zu C_{3a} und C_{3b} spalten kann. Während C_{3a} eine lokale Entzündungsreaktion auslöst, bindet sich C_{3b} an der Erregeroberfläche und dem gebundenen C_{4b2b} . Das neue Enzym C_{4b2b3b} stellt die C_5 -Konvertase dar. Die C_5 -Konvertase spaltet in großen Mengen C_5 zu C_{5a} und C_{5b} [43-45]. Diese Ereignisse führen unmittelbar zur Bildung von MAC und zur Verstärkung der immunologischen Antwort gegenüber von Pathogenen. C_{1q} kann sich an die Oberfläche von Pathogenen auch ohne eine Antikörperbeteiligung binden und den klassischen Komplementaktivierungsweg in Gang setzen [43].

Der MB-Lektin-Weg startet die Komplementkaskade durch die Bindung der MBL-Proteine an die Pathogenoberfläche oder durch den IgM-MBL-Komplex, wie beispielsweise bei Ischämie/Reperfusionsschäden [46]. Der zugrunde liegende Mechanismus ist homolog zum klassischen Weg. Er basiert auf dem Mannan-bindenden Protein (MBL). Dieses Protein bindet sich spezifisch an Mannosereste, die auf der Oberfläche von zahlreichen Pathogenen vorkommen. Ähnlich wie beim klassischen Weg, bildet das MBL-Protein zusammen mit MASP-1, MASP-2 und MASP-3 Proteinen einen Komplex. Durch die proteolytischen Aktivitäten von MASP-1, -2 und -3 wird C_2 und C_4 gespalten und C_{4b2b} erzeugt [43-45].

Der alternative Komplementaktivierungsweg braucht initial weder eine Oberfläche noch einen Antikörper um die Komplementkaskade einzuleiten. Zum alternativen Komplementaktivierungsweg gehören Faktor B, D und Properdin. Die Besonderheit des alternativen Weges liegt darin, dass es zu einer spontanen C_3 Hydrolyse kommt. An $C_{3(H_2O)}$ kann Faktor B gebunden werden. Durch Faktor D wird jetzt Faktor B zu B_a und B_b gespalten, es entsteht $C_{3(H_2O)Bb}$, die instabile C_3 Konvertase der flüssigen Phase. Sollten auf diese Weise gespaltene C_{3b} Moleküle eine Oberfläche von Pathogenen oder Körperzellen, an die sie sich über ihre Thioestergruppe kovalent binden können, finden, werden weitere Faktor B Proteine gebunden und durch Faktor D gespalten. Das B_b -Fragment bindet sich an die C_{3b} Moleküle an der Oberfläche. Es besitzt proteolytische Aktivität und kann C_3 zu C_{3a} und C_{3b} spalten. Der C_{3bBb} -Komplex wird als C_3 Konvertase des alternativen Komplementaktivierungsweges bezeichnet. Wenn sie an der Oberfläche gebunden bleibt, ist sie als stabil zu sehen. Durch Ankoppelung des nächsten C_{3b} Fragmentes entsteht die C_5 Konvertase: C_{3bBb3b} . Properdin stabilisiert die Konvertase und verstärkt die Bindung an die Oberfläche [43, 44]. Der alternative Komplementaktivierungsweg gilt als „Verstärker“ für die aktivierte Komplementkaskade. Die an der Oberfläche gebundenen C_{3b}

Fragmente, die im Laufe des klassischen oder MB-Lektin- Aktivierungsweges entstanden sind, können Faktor B Moleküle binden. Im Beisein des Faktors D und des Properdin kommt es zu Spaltung des Faktors B und zur Generierung des C_{3bBb} - Komplexes und somit einer alternativen zusätzlichen C_3 - und weiter C_5 Konvertase [43].

In neuesten Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass die Generierung von C_{5a} und die Bildung von MAC auch in Abwesenheit von C_3 möglich ist. Die experimentellen Daten suggerieren die Existenz des vierten Aktivierungsweges. Es besteht offensichtlich eine Verbindung zwischen Gerinnungskaskade und Komplementaktivierung. Die Rolle der C_5 Konvertase kann durch Thrombin übernommen werden, wie bei $C_3^{-/-}$ Mäusen [42].

1.3.4.1.3 Regulation des Komplementsystems

Um die Aktivierung der Komplementkaskade unter physiologischen Bedingungen zu verhindern, wird das Komplementsystem durch eine Reihe von Plasma- und Membranproteinen reguliert. Die Regulation findet am häufigsten auf dem Niveau der C_3 Konvertase statt. Hier greifen DAF (Decay-Accelerating Factor, CD55), der Komplement-Rezeptor 1 (CR1), MCP (Membran-Cofactor der Proteolyse, CD46) und Faktor H. MCP und CR1 fungieren als Kofaktoren für Faktor I, der C_{3b} zur inaktiven Form iC_{3b} spaltet und C_{4b} inaktiviert. Faktor H gehört zu den Serumproteinen und bindet sich primär an nicht an der Pathogenoberfläche gebundene C_{3b} , dies ermöglicht eine C_{3b} -Spaltung durch Faktor I. DAF ist membrangebunden und für die Dissoziation der C_3 -Konvertase verantwortlich [47, 48]. Das C_{4b} -bindende Protein (C_4 -BP) reguliert den klassischen Weg. Das gebundene C_4 Protein kann nicht mehr die klassische C_3 -Konvertase bilden [48]. C_1 -Inhibitor (C_1 -Inh) verursacht die Dissoziation des aktiven C_1 -Komplexes und MASP2-Komplexes, inaktiviert Plasmakallikrein sowie den Faktor XII der Gerinnungskaskade und kann alternativ die C_3 -Konvertase durch reversible Bindung an C_{3b} Partikel inhibieren [49]. CD59 ist ein membranangebundenes Protein, welches den membranangreifenden Komplex (MAC) steuert. Durch CD59 wird die Bindung von C_9 an der Zellmembran verhindert und der Zellysevorgang gestoppt [48, 50]. In der Tabelle 5 sind die Rolle und das Vorkommen der Komplement-regulierenden Proteine zusammengefasst.

Tab. 5 Kontrollproteine des Komplementsystems.

Protein	Vorkommen	Funktion
MCP (CD46)	Zellmembran (vorwiegend Fibrozyten, Leukozyten, Endothelialzellen)	Verdrängung C_{3b} und C_{4b}
CR1	Zellmembran (vorwiegend myeloische Zellen)	Verdrängung C_{3b} und C_{4b}
C4BP	Serum	Inaktivierung C_4
Faktor H	Serum	Dissoziation C_3 Konvertasen (alternativ und klassisch)
C_1 -Inh	Serum	Dissoziation des C_1 Komplexes
DAF (CD55)	Zellmembran (fast alle Zellen)	Verdrängung C_{3b}
CD59	Zellmembran (fast alle Zellen)	Verhindert MAC Bildung
Faktor I	Serum	Spaltung C_{3b}

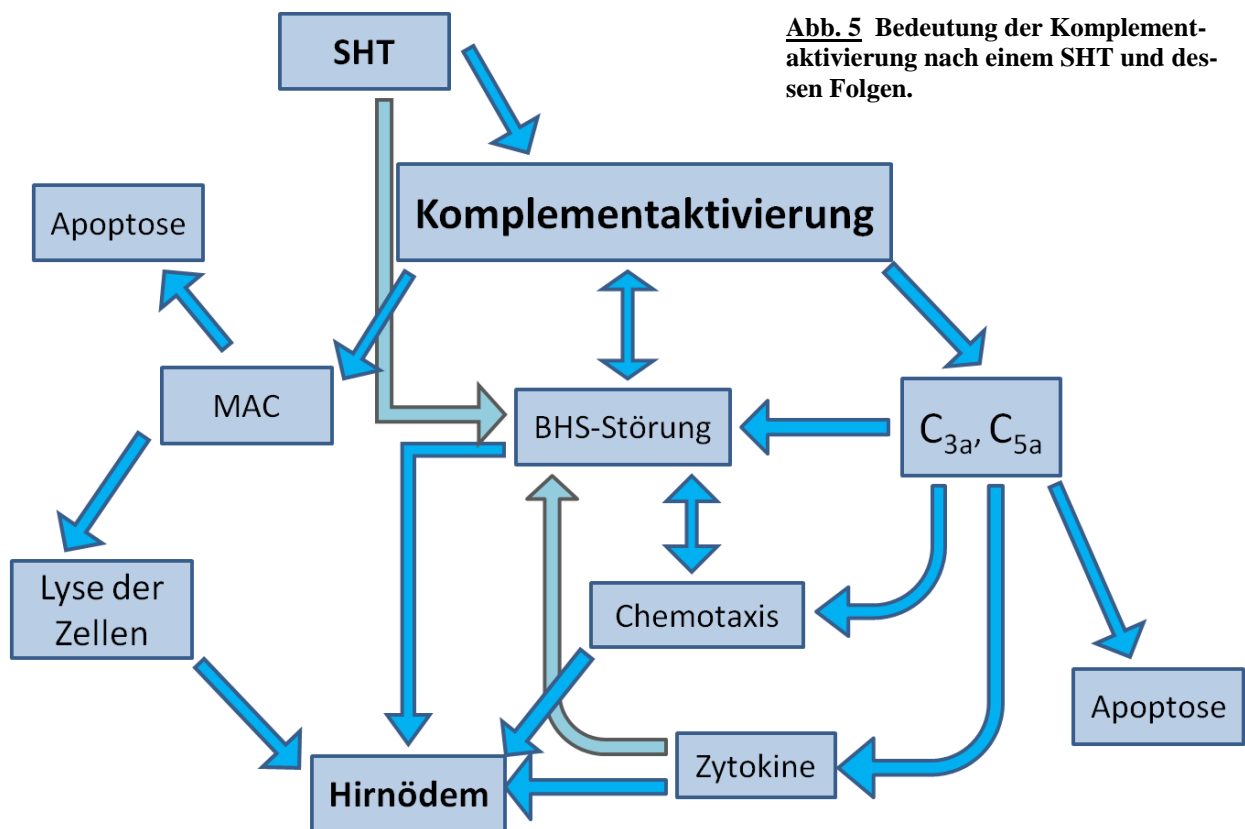
Bei den Mäusen gibt es ein zusätzliches Protein, das die Komplementaktivierung reguliert. Es handelt sich um das transmembrane Crry-Protein, das die Eigenschaften von MCP und DAF besitzt [47, 51]. Der wichtigste Regulator des alternativen Weges ist Faktor H. Er wird in dieser Rolle durch DAF, MCP und CR1 unterstützt [52].

Weitere Bestandteile des Komplementsystems sind die Rezeptoren. Die Hauptrolle dieser Rezeptoren liegt in der Vermittlung der Entzündung und Unterstützung der Phagozytose. Durch C_{5a} R und C_{3a} R werden Leukozyten chemotaktisch aktiviert. Die Wirkung des C_{5a} über C_{5a} R induziert die Produktion der proinflammatorischen Zytokine und verursacht eine Degranulation der Mastzellen. Der Komplement Rezeptor 1 (CR1) wird vorwiegend auf Leukozyten exprimiert. Seine Liganden sind C_{3b} , C_{4b} , C_{1q} und MBL. CR3 und CR4 sind auf polymorphkernigen Zellen vorhanden. Den Ligand für beide Rezeptoren stellt eine inaktive Form von C_{3b} (iC_{3b}) dar, welches an der Pathogenoberfläche anheftet. Alle 3 Rezeptoren erleichtern und ermöglichen wesentlich die Phagozytose von Pathogenen. Die CR2 Rezeptoren hingegen treten auf Lymphozyten B auf und verbinden somit die angeborene Immunität mit der adaptiven Immunantwort [15, 43, 47, 48].

1.3.4.1.4 Rolle des Komplementsystems im Schädel-Hirn-Trauma

Die Bedeutung des Komplementsystems in der Pathophysiologie der nicht infektiösen Erkrankungen wurde in der letzten Zeit schrittweise in klinischen und laborchemischen Studien bestätigt. Nach heutigem Wissensstand spielt die Komplementaktivierung eine besondere Rolle in Entitäten wie Rheumatoider Arthritis, Systemischer Lupus Erythematoses (SLE), Glomerulonephritis, Myocarditis, Polymyositis, Antiphospholipid-Syndrom, Asthma und Ischämie/Reperfusionsschäden [43, 44]. Das Komplementsystem leistet auch einen großen Beitrag zu vielen pathologischen Vorgängen im peripheren Nervensystem und dem ZNS. Eine Komplementaktivierung wurde bei der Multiplen Sklerose, der Alzheimer Krankheit, dem Schlaganfall, (ischämisch wie auch hämorrhagisch) festgestellt [38]. Die Zellen des ZNS: Neurone, Mikroglia, Astrozyten und Oligodendrozyten sind im Stande alle wesentlichen Komplementkomponenten und Rezeptoren herzustellen. Unter physiologischen Bedingungen ist die Expression dieser Komponenten auf sehr niedrigem Niveau [15, 16, 45, 53]. Das ZNS ist durch die Blut-Hirn-Schranke von Plasmaproteinen, darunter auch den Komplementbestandteilen, abgetrennt. Die Inkubation des Serumplasmas mit dem Liquor beim gesunden Patienten löst eine Komplementaktivierung aus [16, 54]. Weiterhin zeigten die Untersuchungen des Liquors bei Patienten nach SHT erhöhte Werte von C_{5b}-C₉, Faktor B und C₃ [16, 54, 55]. Experimentelle Untersuchungen an Raten haben den Nachweis erbracht, dass die C_{1q}-mRNA in der peritraumatischen Region gehäuft vorkommt und Ablagerungen des C_{1q}, C₃, C₄ und C_{3b} auf Neuronen gefunden wurden [45]. Die durch die geschädigte BHS ins ZNS gelangten Komplementpartikel sind eine Quelle für entzündliche Kaskaden. Inwiefern auch die lokale Komplementsynthese dazu beiträgt bleibt unklar. Nach dem SHT stellen die Neurone, die sich in der Penumbra befinden, das Ziel des Komplements dar [56]. Primäre Verletzungen des Gehirnes führen zu einer Schädigung der BHS. Dies ermöglicht den Komplementproteinen ein Eindringen in das ZNS. Beschädigte und sich unter ischämischen Bedingungen befindende Neurone, wie auch Zellteile dienen als Oberfläche zur Komplementaktivierung. Durch diese Aktivierung entstehen in großen Mengen die Anaphylatoxine C_{3a} und C_{5a}, die als potenteste Entzündungsmediatoren gelten. Sie locken Makrophagen, Neutrophile und Mikroglia an. Die wichtigsten Effekte dieser Aktivierung sind: Sezernieren von proinflammatorischen Zytokinen, weitere BHS Schädigung, Lyse der Neurone durch MAC, Apoptose [15-17, 37, 45, 57]. Die aktivierten Leukozyten und Mikroglia sind für die erhöhte Produktion der Zytokine wie TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8 und IL-18 verantwortlich. Zusammen mit den Endothelzellen sind sie die Hauptquelle der freien Stickstoff- und Sauerstoffra-

dikale und weisen eine neurotoxische Wirkung auf [15-17, 25, 31]. C_{5a} ist der wichtigste Effektor der Komplementaktivierung. Dieser kann direkt zur BHS-Öffnung führen und die Permeabilität der Gefäße verstärken. Durch die Stimulation von C_{5a} R/CD88 auf den Neuronen kann die Apoptose eingeleitet werden, dabei wird die P-Selektin Expression in Endothelzellen induziert [16, 17, 58, 59]. Diese Prozesse verstärken zum großen Teil die Entwicklung eines Hirnödems, einer Neuroinflammation und erhöhen somit das Ausmaß der sekundären Hirnschäden, die mit einer schlechten Prognose verbunden bleiben. Vereinfacht sind die Folgen und Zusammenhänge zwischen den pathologischen Ereignissen nach SHT in der Abbildung 5 dargestellt.



Die Rolle der Komplementaktivierung wird von experimentellen Studien unterstrichen, in denen komplementmodulierende Substanzen getestet worden sind bzw. genetisch modifizierte Tiere untersucht wurden. Beim Einsetzen des löslichen Komplementrezeptors Typ 1 (sCR1) vor Applikation eines Traumas ist die spätere Akkumulation der Neutrophilen im Gehirn von Raten deutlich erniedrigt [60]. Die Behandlung von Tieren nach einem experimentellen SHT und Rückenmarktrauma mit dem Vaccinia Virus Complement Control Protein (VCP), durch das sowohl der klassische und alternative Weg der Komplementkaskade als auch proinflammatorische Zytokine inhibiert werden, resultierte in verbesserten kognitiven Leistungen nach SHT, ernied-

rigter Infiltration der Traumastelle durch Makrophagen und einer besseren Integrität des Rückenmarkes nach dem Trauma [61, 62]. In einem Modell der zerebralen Ischämie bei Mäusen wurde die maßgebende Rolle der Komplementaktivierung in Ischämie/Reperfusionsschäden erforscht. Die mit C₁-Inh therapierten Tiere wiesen einen Abfall der proinflammatorischen Zytokine (TNF α , IL-18), ICAM-1, P-Selektin und Mikroglia-/Makrophageninfiltration auf. Diese Studie beweist nicht nur die Rolle des Komplements in einer Ischämie des ZNS sondern auch wichtige Funktionen des C₁-Inh [63]. Intrazerebrale Überexpression des löslichen C₃-Konvertaseinhibitors Crry bei transgenen Mäusen zeigte verbesserte neurologische Erholung und Schutz vor BHS-Schädigung nach SHT [64]. Ähnliche Wirkung wurde mit einer Behandlung der Tiere nach SHT mit dem modifizierten Crry tragenden Antikörper erzielt [65]. Darüber hinaus haben genetisch modifizierte Mäuse ohne das vor MAC schützenden CD59a Gen einen signifikant schlechteren Heilungsverlauf nach einem SHT im Vergleich zu normalen Mäusen. Dies konnte vor allem am klinischen Befund (NSS) beobachtet werden. Auch auf histologischer Ebene wurde eine schwächere Protektion vor dem neuronalen Zelluntergang im ZNS beschrieben [66]. Die Steuerung der Komplementregulatoren ist bis jetzt wenig erforscht worden. Die Expression von MCP, CD59 und CR1 ändert sich nicht im Verlauf der autoimmunologischen ZNS-Entzündung. Im Gegenteil wird DAF(CD55) in der chronischen Phase hochreguliert [67]. Diese Experimente beweisen die schädliche Wirkung der Komplementaktivierung auf das ZNS und eine hieraus folgende schlechtere neurologische Erholung und Prognose bei einem SHT.

1.3.4.1.5 Besondere Bedeutung des alternativen Weges

Die Versuche die Komplementkaskade zu blockieren, um deren schädlichen Einfluss auf das Gewebe zu unterbinden, deuten darauf hin, dass der alternative Komplementaktivierungsweg eine führende Rolle bei vielen pathologischen Zuständen übernimmt. Für die Entwicklung der Ischämie/Reperfusionsschäden in der Niere der Maus ist die Beteiligung des alternativen Weges notwendig. Bei Lupus Nephritis zeigte das Fehlen von Faktor B bzw. D eine nephroprotektive Wirkung, die im Ausmaß mit den schützenden Effekten bei C₃-Konvertase Inhibition mit Crry-tragendem Antikörper vergleichbar war. Ein ähnlicher Einfluss des alternativen Weges auf den Verlauf von Lungenerkrankungen oder Rheumatoide Arthritis wurde ebenfalls nachgewiesen [44, 52]. Dies gilt auch für Erkrankungen des ZNS. In dem experimentellen Multiple Sklerose Modell (Experimentelle Allergische Enzephalomyelitis) wird die Schwere des Verlaufs bei Faktor B defizienten Mäusen abgemildert [68]. Für ein SHT wurden überzeugende Daten durch Versuche an ebenfalls genetisch modifizierten Tieren (FB -/-) erbracht. Die FB-defizienten Mäuse

zeigten nach SHT im Vergleich zu FB +/+ Tieren signifikant reduzierte C_{5a} -Spiegel im Serum, reduzierte Raten des neuronalen Zelluntergangs und Apoptose, Zunahme der Expression der antiapoptotischen Proteine wie Bcl-2 und Abnahme des proapoptotischen Fas Proteins [69].

Der vermutlich bedeutende Beitrag des alternativen Komplementaktivierungsweges zur Pathophysiologie der nicht infektiösen Krankheiten liegt daran, dass er als Verstärker für die anderen Wege dient und Potenzial zur Selbstaktivierung besitzt. Darüber hinaus kann diese Aktivierung sowohl membrangebunden als auch in der flüssigen Phase verlaufen [44].

1.3.4.1.6 Neuroprotektive Effekte des Komplements in der ZNS Pathologie

Der MB-Lektin-Weg ist in seinen positiven Aspekten mit Neuroinflammation assoziiert. Ein Ausfall dieses Weges führt zu einer signifikanten Hirnatrophie gegenüber Wildtyp Mäusen [46]. Eine genaue Untersuchung des klassischen Weges ergab, dass er bei der Alzheimer Krankheit und dem Lupus Erythematodes des ZNS auch positive Effekte bewirkt. Oponisierung der geschädigten oder infolge von Apoptose untergehender Neurone beschleunigt die Elimination durch Phagozyten. Dies ist insofern wichtig, als zerfallene Neurone eine Quelle von exzitatorischen Aminosäuren sind, die neurotoxisches Potenzial haben. Charakteristisch ist ein schlechterer Verlauf des zentralen Lupus Erythematodes bei C_{1q} oder C_4 defizienten Mäusen, was ebenfalls für eine positive Rolle des klassischen Weges spricht [36]. Auch sollte die Rolle des Komplements bei der Abwehr von Pathogene nicht außer Acht gelassen werden. Wir wissen heute, dass andere Komplementkomponenten wie MAC, C_{3a} und C_{5a} unabhängig vom Infektionsschutz ebenfalls eine schützende Rolle besitzen [17, 62, 70, 71]. Sublytische MAC Konzentrationen bewirken Proteinsynthese und Neuroprotektion [62]. Die Haupteffektoren des Komplementsystems sind neben ihrer proinflammatorischen, schädlichen Funktion eng mit Neuroregeneration und neuroprotektiver Wirkung verknüpft. C_{5a} stimuliert die Produktion des Neurotrophins (NGF) und ist verantwortlich für den Schutz vor Glutamattoxizität. Es gibt ebenfalls Hinweise, dass die Aktivierung der Kaspasen im ZNS durch C_{5a} reduziert werden kann. Tiere mit hereditären Defekten des C_5 leiden unter massiver Neurodegeneration [17, 36, 62]. Die Bedeutung der Komplementaktivierung bezieht sich nicht nur auf die Exazerbation der Entzündung im ZNS, sondern auch auf feine Zusammenhänge und Regulationsmechanismen in der Neuroprotektion.

1.2.4.2 Die Rolle der Zytokine im SHT

Proteine, die durch verschiedene Zellen nach einem Aktivierungsreiz freigesetzt werden und aufgrund unterschiedlicher Mechanismen die immunologische Antwort modulieren, tragen die Bezeichnung Zytokine. Sie bedingen lokale Effekte wie z.B. Aktivierung des Endothels, Erhöhung der Permeabilität der Gefäßkapillaren oder örtliche Gewebeerstörung. Wenn sie in den Kreislauf gelangen, werden systemische Effekte wie Fieber, Schock oder Sezernierung von Akut-Phase-Proteinen ausgelöst. Zu den am meisten erforschten und untersuchten Zytokinen gehören TNF α , IL-1 sowie IL-6. Da die sekundären Hirnschäden nach einem SHT vor allem auf neuroinflammatorischer Ebene basieren, sind die Zytokine ein sehr wichtiger Bestandteil dieses Geschehens [15, 16]. Nach heutigem Wissensstand wird die Ausprägung der Inflammation im ZNS vor allem durch TNF α , IL-1, IL-6 und IL-18 bestimmt. Die Zytokine werden unter physiologischen Bedingungen im ZNS konstitutiv und niedrig exprimiert [17]. TNF α wird unmittelbar nach einem SHT freigesetzt. Das führt zu einer lokalen Zerstörung der BHS, einem Hirnödem und einem erhöhten neuronalen Zelluntergang [72]. Darüber hinaus induziert TNF α die Expression von Chemokinen, ihrer Rezeptoren und Adhensionsmolekülen, was zu einer Rekrutierung von Leukozyten und Mikroglia führt. Durch sein proinflammatorisches Profil wirkt TNF α neurotoxisch. Der Beitrag von TNF α zur Inflammation nach akutem SHT fand Bestätigung in experimentellen Versuchen, bei denen TNF α inhibiert wurde. Diese Inhibition geht mit der Schonung der BHS und einem verminderten Hirnödem einher [17, 72-75]. TNF α induziert auch die Expression des C_{5a} R auf Neuronen nach experimentellem SHT [76]. Erstaunlicherweise gibt es auch Studien die neuroprotektive Eigenschaften von TNF α in der späteren Phase nach SHT demonstrieren. Des Weiteren wiesen Tiere ohne TNF α und IL-6 Gene höhere Mortalitätsraten als Wildtyp Kontrollen auf [72].

Die Funktionen von IL-1 gestalten sich ähnlich wie die von TNF α . Es handelt sich um ein Protein mit breitem proinflammatorischem Wirkungsspektrum. Nach einem SHT kommt es zur raschen Überexpression von IL-1 in Gliazellen, Neuronen und Endothelzellen. IL-1 weist im Verlauf der Neuroinflammation nach dem SHT Neurotoxizität, Induktion der Cyclooxygenase-2 (COX-2), Stickstoffoxidsynthase, C₃-, IL-6- und VEGF Synthese sowie eine BHS Störung auf. Die BHS Dysfunktion kommt durch Induktion der Matrix-Metalloproteinasen zustande [15-17, 77-79]. Die Funktion und Wirkung von IL-1 wird in Anwesenheit von TNF α verstärkt [16]. Die Inhibition von IL-1 verbessert die neurologische Erholung und vermindert das Ausmaß der neuronalen Schäden nach SHT [80, 81].

IL-6 besitzt multiple Funktionen im ZNS und wird während einer Entzündung produziert. Es trägt zu einem schweren Verlauf der Entzündung im ZNS und einer verschlechterten Prognose in Experimenteller Autoimmunenkephalitis bei [82]. IL-6 wirkt bei Überexpression neurotoxisch. Wenn IL-6 über eine beschädigte BHS in den systemischen Kreislauf gelangt, stimuliert es die Synthese der Komplementkomponenten vor allem in der Leber. In klinischen und experimentellen Studien wurden erhöhte IL-6 Serum- und Liquorwerte gefunden [15, 17, 72]. Viele Studien belegen aber auch die protektive Rolle von IL-6 bei entzündlichen Erkrankungen des ZNS. Hier wurden schnellere Heilungsvorgänge, Mikrogliosis und Angiogenese in den Mäusen mit IL-6-Überexpression beobachtet. Die chronische Phase der Entzündung nach Kryotrauma in diesen Mäusen zeichnet sich durch eine niedrigere Makrophageninfiltration und wesentlich verminderte Apoptose aus. Die Apoptose wird zum Teil durch den oxidativen Stress ausgelöst und IL-6 induziert die Synthese von Antioxidanten wie Metallothionine [83].

Viele unbeantwortete Fragen bleiben bei IL-18. Dieses Zytokin stammt aus der IL-1 Familie und spielt eine wichtige Rolle sowohl bei akuten zerebralen Insulten wie Schlaganfall, Blutung oder Trauma, als auch bei chronischen Erkrankungen wie Alzheimer oder Multipler Sklerose [84]. IL-18 und die entsprechende Rezeptoren wurden auf Astrozyten, Mikroglia und Neuronen gefunden. Im Verlauf eines SHT in den experimentellen Tiermodellen oder klinischen Untersuchungen ist IL-18 im Liquor erhöht. IL-18 ist für die synaptische Glutamatfreisetzung verantwortlich [84]. Es wurde nachgewiesen, dass IL-18 sowohl eine Expression von Fas-Ligand bewirkt, als auch die Produktion von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen auslösen kann [17]. Mit einem experimentellen Einsatz des IL18-bindenden Proteins (IL18-BP) bei Mäusen nach einem SHT wurde ein besseres neurologisches Outcome erreicht. Ein Einfluss auf das begleitende Hirnödem blieb jedoch aus [85]. Die Ergebnisse einiger Versuche deuten darauf hin, dass im Gegensatz zu IL-1, dem der entscheidende Einfluss in der akuten Phase der Entzündung nach dem SHT zugeschrieben werden kann, IL-18 eher in der späteren, subakuten Phase seine Funktion erfüllt [17, 84].

Die oben dargestellten Erkenntnisse zeigen, dass ein Anteil der Zytokine neben proinflammatorischen und das ZNS destruierenden Auswirkungen auch eine wichtige protektive Wirkung hat. Die Prognose eines SHT wird sicherlich durch die diskreten Zusammenhänge und Regulationsmechanismen der Zytokine und anderen Faktoren beeinflusst [72].

1.3.4.3 Die Infiltration des ZNS durch Leukozyten und Makrophagen nach SHT

Die intrakranielle Entzündungsreaktion als Folge des SHT wird durch Leukozyten verstärkt. Sie gelangen durch eine gestörte BHS in den Subarachnoidalraum. Die Chemokine, bereits erwähnte Adhäsionsmoleküle, Komplementelemente wie C_{3a} , C_{5a} und Leukotriene locken die Leukozyten an und aktivieren die Makrophagen. Aktivierte Makrophagen, Neutrophile und Mikroglia setzen Proteasen, freie Sauerstoffradikale sowie proinflammatorische Zytokine frei. Die intrakranielle Inflammation wird in voller Ausprägung fortgesetzt. Es entwickeln sich eine Neuroinflammation und ein Hirnödem [3, 16, 17]. Die Aktivierung der inflammatorischen Zellen ist eng mit der Komplementkaskade verknüpft, da besonders C_{5a} eine starke Reizung aufweist [15]. Die Neutrophilen sind schon in der Frühphase (24 Stunden nach SHT) massiv im ZNS nachweisbar, Makrophagen dagegen erst nach 3-5 Tagen [16]. Die Leukozyteninfiltration geht laut vieler Studien mit der Zunahme der sekundären Hirnschäden und unzureichender neurologischer Erholung einher [15, 16]. Mit dem Einsatz von Substanzen, die das Komplement blockieren, kann der posttraumatische Einstrom der Leukozyten vermindert werden. Bei der Blockade der C_3 Konvertase mit Crry tragendem Antikörper wurde auch ein verbessertes neurologisches Outcome erreicht [60, 65].

1.3.5 Apoptose im Zentralnervensystem nach einem SHT

Ein SHT stellt, vor allem wegen der sekundären Hirnschäden, eine komplexe, neurodegenerative Erkrankung des ZNS dar [3, 15-17]. Auf verschiedene Art und Weise kommt es zu einem Untergang von Zellen des ZNS. Dieser Untergang findet nicht nur primär als direkte Folge des Traumas, sondern auch im weiteren, subakuten Verlauf statt. Die zu Nekrose und Apoptose führenden Vorgänge in den Neuronen und Gliazellen nach einem SHT wurden gezeigt [57]. Die genaue Differenzierung von Nekrose und Apoptose nach einem SHT ist nicht immer möglich. Es gibt Meinungen, dass der neuronale Zelluntergang Zeichen von beiden Vorgängen aufweisen kann [57]. Nekrose ist mit der unmittelbaren Gewaltauswirkung, der mechanischen Zellzerstörung, einem akuten ischämischen Schaden oder anderen externen Noxen verbunden. Die auf diese Weise irreversibel geschädigten Zellen werden durch enzymatische intrazelluläre Prozesse degradiert. Die Kontinuität der intrazellulären Membranen wird dabei frühzeitig unterbrochen, was einen wichtigen Unterschied im Vergleich zur Apoptose der Zellen darstellt [57, 86]. Die Apoptose wird, im Gegensatz zur Nekrose, als programmierter Zelltod definiert, die nach bestimmten Reizen oder Signalen, durch die Zelle selbst ausgeführt wird. Hier können zwei wichtigste Wege, die zu einem programmierten Zelltod führen, unterschieden werden. Erstens handelt

es sich um den sogenannten intrinsischen Weg, der mit einer Aktivierung der mitochondrialen Regulatoren einhergeht. Zu diesen Regulatoren zählen die Proteine der Familie Bcl-2, zu denen die antiapoptotischen (Bcl-2, Bcl-X1) sowie proapoptotischen (Bax, Bad, Bid) Moleküle gehören. Das Ungleichgewicht zwischen den o.g. Molekülen verhindert Apoptose oder setzt weitere enzymatische Vorgänge in Gang. Grundsätzlich führen die aktivierten, proapoptotischen Proteine zu einer Aktivierung der Kaspase-9 über Cytochrom-C, was wiederum eine Kaskade von anderen Kaspasen startet und mit dem Zelltod endet [86, 87]. Zweitens gibt es einen sogenannten extrinsischen Weg, durch den Apoptose initiiert werden kann. Die Voraussetzung dafür ist eine Rezeptor-Liganden Interaktion. Die wichtigste Rolle spielen hier Fas und TNF-Rezeptor mit ihren entsprechenden Liganden Fas-L und TNF [88, 89]. Die Interaktion zwischen Fas-Rezeptor und seinen Liganden Fas-L wurde sehr genau bei Lymphozyten beschrieben. Die Lymphozyten exprimieren Fas (CD95), das sich auf der Zellmembran befindet. Die Interaktion zwischen Fas und Fas-L löst eine Kaskade von intrazellulären Prozessen aus. Letztendlich wird durch den extrinsischen Weg Kaspase-8 aktiviert, anschließend kommt es zu Aktivierung der weiteren Kaspasen und zur Apoptose [90].

Laut neuesten Experimenten hat sich auch eine bedeutende Rolle der Apoptose in der Pathophysiologie des SHT offenbart. Sie ist als Hauptursache für den sekundären Zelltod im ZNS zu sehen [91]. Die apoptotische Zellen werden direkt und bis zu 1 Jahr nach einem SHT gefunden. Die Apoptose der Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten trägt zu schlechter neurologischer Erholung sowie stärkerer Ausprägung der fokalen neurologischen Defizite bei und erschwert die Rehabilitation [57, 92]. Die Apoptose wurde in Neuronen im Kortex in der Nähe der verletzten Strukturen und ebenfalls im Hippocampus nach einem SHT bei Ratten und Mäusen beobachtet [57, 91, 92]. Noch sind nicht alle Signale und mögliche Mechanismen, die zur Apoptose der Neurone führen können bekannt. Neben den schon erwähnten Proteinen und Rezeptorsystemen, die über Untergang oder Überleben der Neurone entscheiden können, werden die toxischen Substanzen, wie Glutamat, freie Radikale oder Störungen der Kalziumhomöostase im extra- und intrazellulären Raum als mögliche Auslöser des programmierten Zelltodes beschrieben [57].

Die Bedeutung der Proteine der Familie Bcl-2 für eine Apoptose wurde bereits angesprochen [93]. Nach dem heutigen Wissensstand findet nach SHT eine Regulation der Expression von Bcl-2 und Bax statt [91, 92, 94]. Bax wird bei Ischämie und Flüssigkeitsperkussionstrauma hochreguliert [92]. In experimentellen SHT-Modellen an Ratten werden sowohl Bax als auch Bcl-2 überexprimiert. Die Neurone, die durch eine Apoptose untergehen, zeichnen sich durch eine eindeutige Verschiebung des Bax/Bcl-2 Quotienten zugunsten des Bax aus, was die Rolle

der beiden Proteine unterstreicht [57, 91, 92, 94]. In den Neuronen, die Bcl-2 nach einem SHT aktiv produzieren, kommt es sehr selten zur Apoptose [91]. Die Expression des Bcl-2 Proteins wird bei Faktor B defizienten und mit C₃-Konvertase blockierendem, Crry tragendem Antikörper behandelten Mäusen, denen ein experimentelles SHT zugeführt wurde, mit kleinen Unterschieden in der Kinetik hochreguliert [65, 69]. Die Gehirne der Faktor B ^{-/-} Mäusen weisen auch eine deutlich niedrigere Apoptoserate auf.

Fas und Fas-L, die unter physiologischen Bedingungen im humanen Liquor nicht nachweisbar sind, werden bei Patienten, die ein SHT erlitten haben in hohen Konzentrationen gefunden. Der Fas-L-Spiegel korreliert mit der Schwere der Hirnverletzung [95]. Experimentelle Studien bestätigen diese Daten. Fas ist posttraumatisch auf Astrozyten und Neuronen vorhanden, Fas-L zusätzlich auf Mikroglia. Die Überexpression und Interaktion zwischen Fas und Fas-L leistet einen bedeutenden Beitrag zur Apoptose nach einem SHT [96]. Fas wird nach SHT bei Faktor B defizienten Mäusen ^{-/-} im Vergleich zu Wildtyp Mäusen unterreguliert [69]. Genaue Regulationsmechanismen der Expression von proapoptotischen und antiapoptotischen Proteinen nach einem SHT sind bisher nicht erforscht.

1.3.6 Circulus vitiosus

Ein SHT ist mit vielfältigen pathologischen, molekularen und immunologischen Aspekten verbunden. Das primäre Trauma verursacht Intrazerebrale Blutungen, eine BHS-Störung, axonale Verletzungen, sowie bei Begleitverletzungen oft Hypoxie und Hypotension [3, 16, 17]. Als Folge der genannten Verletzungen treten sekundäre pathophysiologische Vorgänge auf. Komplementaktivierung, Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine, Chemotaxis und Eindringen der polymorphkernigen Zellen sowie Makrophagen leiten einen pathologischen Circulus vitiosus in die Wege. Sekundäre Ereignisse führen zu einer vermehrten Permeabilität in der BHS und den Gefäßen. Die aktivierten Komplementpartikel verstärken die Entzündung, dabei kommt es zu einer weiteren Ausschüttung von Proteasen, freien Sauerstoff- und Stickstoffradikalen, Aktivierung der Arachidonsäurekaskade, NO Produktion, was wiederum zur Ausweitung der Schrankenstörung und der pathologischen Prozesse im ZNS führt [17]. Durch direkte oder indirekte Wirkung erwähnter Substanzen werden die primären Schäden nicht beseitigt sondern die sekundären erweitert. Eine Entzündungsverstärkung führt zu einer Zunahme des Hirnödems, was wiederum einen Anstieg des intrakraniellen Druckes und einer Verschlechterung der cerebralen Durchblutung verursacht. Die erwähnten Faktoren führen weiterhin mittelbar und unmittelbar zur Apoptose der Nervenzellen. Die Prognose des SHT ist vom Ausmaß der sekundären Hirn-

schäden abhängig [3, 17]. Darüber hinaus verfügen wir über kein pharmakologisches Mittel das den pathologischen Kreis unterbrechen und die Prognose des SHT verbessern kann [97].

1.4 Aktuelle Therapiekonzepte

1.4.1 Therapieprinzipien

Trotz des eindeutigen Erfolges der Senkung der Mortalität von Patienten mit schwerem und mittelschwerem SHT, verbesserter Prävention und Organisation von notärztlichen Prozeduren, bleibt das SHT eine der am schwierigsten zu behandelnden Erkrankungen des Zentralnervensystems und ist immer noch führende Todesursache bei jungen Männer in industrialisierten Ländern [3, 20, 98]. Aufgrund der Komplexität des SHT, sowie vielen verschiedenen pathologischen Erscheinungen und möglichen Komplikationen erfordert die Behandlung eines mittelschweren und schweren SHT ein adäquat ausgerüstetes Zentrum [20, 98]. Mit der Therapie und Diagnostik des SHT soll schon am Unfallort begonnen werden. Als absolute Priorität gilt hier die Sicherung der vitalen Funktionen, wenn nötig auch die kardio-pulmonale Wiederbelebung. Die Begleitverletzungen, die eine Ursache für einen bestehenden hypovolämischen Schock sein können, sollen sofort versorgt werden. Am Unfallort sollte ein GCS-Wert erhoben werden und die Pupillenreaktion, die einen Hinweis auf das Ausmaß zerebraler Schäden geben kann, geprüft werden. Zur Sicherung der Atemfunktion wird bei allen Patienten deren GCS 8 und weniger beträgt eine primäre Intubation empfohlen. Die Intubation sollte nach ausreichender Analgosedierung und Relaxierung erfolgen. Dazu eignen sich Etomidat, Propofol, Midazolam oder Ketamin, sowie als Analgetika Morphin oder Fentanyl [98, 99]. Als Relaxantien werden kurz wirksame Muskelrelaxantien wie Succinylcholin eingesetzt. Eine mechanische Beatmung gewährleistet die benötigte Oxygenierung. Im Fall einer Hypotension, die als Abfall des systolischen Blutdruckes unter 90 mmHg definiert wird, muss zur Korrektur eine unmittelbare Flüssigkeitszufuhr erfolgen, möglichst in Form isotoner Kochsalzlösung oder Ringer-(Lactat)-Lösung bis zu 2000ml. Wenn größere Mengen von Flüssigkeit verabreicht werden sollen, empfiehlt man gemischte Lösungen von isotoner Kochsalzlösung und 5% Albumin im Verhältnis 3-4:1 [20, 100]. Es können auch eine hypertone Kochsalzlösung oder kombinierte kristalloid-kolloidale Lösungen erwogen werden [98, 100]. Wenn der systolische Blutdruck nach erwähnten Maßnahmen unter 90 liegt, sollte die Gabe von Vasopressoren in Erwägung gezogen werden [101]. Es gilt die „goldene Stunde“ innerhalb der der Patient ins Zentrum bzw. Krankenhaus gebracht werden sollte, wo er endgültig diagnostiziert und therapeutisch versorgt werden kann [20, 98, 102]. Die stationäre Versorgung der Patienten nach einem SHT zielt im Wesentlichen auf eine Minimierung der se-

kundären Schaden durch entsprechende Korrekturen der Hyper/Hypoglykämie, Hypotension, Hypoxie, Hyperthermie sowie Elektrolytenentgleisungen [20, 102]. Nach Sicherung und Stabilisierung der vitalen Funktionen soll ein Schädel CT zum Ausschluss von akuten Blutungen angestrebt werden. Akute sub- und epidurale Hämatome erfordern eine operative Versorgung. Ein pathologisches CT, in dem außer Hämatomen, Hirnkontusionen, eine Komprimierung der basalen Zisternen und ein Hirnödem festgestellt werden kann, ist Indikation zur Anlage einer ICP-Sonde für ein Hirndruckmonitoring [11, 20, 98]. Hirndruckwerte über 20 mmHg, die länger als 5 Minuten andauern, erfordern eine schnelle Therapie. Hierbei richtet man sich nach dem CPP, der folgendermaßen berechnet wird: $CPP = MAP - ICP$, wobei MAP dem mittleren arteriellen Druck und ICP dem intrakraniellen Druck, also dem Hirndruck entspricht. Ein normaler zerebraler Perfusiondruck beträgt 90 mmHg. Bei erhöhtem intrakraniellen Druck sollte der CPP über 60mmHg gehalten werden, gleichzeitig sollte der ICP unter 20mmHg betragen [20, 98, 103]. Nach Angaben der deutschen Gesellschaft für Neurologie eignen sich folgende Maßnahmen zur Senkung des ICP und Aufrechterhalten von CPP:

- Oberkörperhochlagerung um 30°
- Tiefe Analgosedierung
- Ablassen von Liquor, im Fall einer intraventrikulären Platzierung der Sonde
- Applikation von Osmotherapeutika (Mannitol 0,25-1 g/kg im Bolus)
- Moderate Hyperventilation ($paCO_2$ 30-35 mmHg)
- Bei therapierefraktärem intrakraniellen Hochdruck: kurzfristige, forcierte Hyperventilation, Hochdosis-Barbiturattherapie, osteoklastische dekompressive Kraniotomie, durch die junge Patienten profitieren können [104-106].

Die entsprechende Ernährung, intensive medizinische Maßnahmen und ein engmaschiges Monitoring der anderen vitalen Funktionen sollten gewährleistet sein [98].

1.4.2 Wichtigste diagnostische Maßnahmen.

Die Patienten mit mittelschwerem und schwerem SHT sollten engmaschig überwacht werden, sodass eventuelle Komplikationen, Verschlechterungen und Veränderungen in der Hirnperfusion und Hirnoxxygenierung, hämodynamische und respiratorische Probleme möglichst früh erkannt und therapiert werden können. Indiziert sind eine intraarterielle Blutdruckmessung, Zentralvenöser Katheter, die Pulsoxymetrie, häufige Blutgasanalysen und Messungen der Elektrolyte und der Glucosespiegel, der Temperatur und des Gerinnungsstatus [20, 98]. Zum spezifischen Hirnmonitoring gehört eine regelmäßige Bewertung über die GCS und die

Pupillomotorikkontrolle. Ein CT des Schädels soll bei allen Patienten mit mittelschwerem und schwerem SHT, als sensitive und schnelle Methode für den Nachweis von intrakraniellen Blutungen durchgeführt werden [98]. Die bildgebende Diagnostik gibt in Zweifelsfällen wichtige Hinweise und Indikationen zum Hirndruckmonitoring [11]. Ein EEG kann die Anfallsaktivität, die bei 60% der Patienten mit einem SHT klinisch schwer zu erkennen ist, aufzeigen. Die Magnetresonanztomographie stellt die Methode der Wahl für den Nachweis von diffusen axonalen Verletzungen dar [107]. Aufschluss für eine mögliche traumatische Gefäßdissektion gibt eine Angio-MR oder auch eine Neurosonographie. Fakultativ, können auch arterio-venöse Sauerstoffdifferenzen gemessen werden (AVDO₂), wobei das pathologische Ergebnis auf die unzureichende Hirnoxxygenierung hinweisen kann. In der Mikrodialyse kann die Konzentration von Metaboliten wie Glucose, Aminosäuren, Laktat und Glycerol lokal gemessen werden. Die beiden zuletzt aufgezählten Methoden gehören gegenwärtig aus technischen und finanziellen Gründen nicht zum Standard und werden vorwiegend im experimentellen Bereich eingesetzt. Für sie konnten auch bis heute keine überzeugenden Vorteile nachgewiesen werden [20, 98]. Darüber hinaus hat es sich erwiesen, dass die Anwendung von Hypothermie keine Verbesserung der Prognose bei Hirnverletzungen bringt [108]. Ebenso scheint eine Hyperventilation eher schädlich zu sein, da sie vielmehr zur Vasokonstriktion und zur Senkung des Sauerstoffgehaltes im Gehirn führt [109].

1.4.3 Substanzen in klinischer und experimenteller Testung zur Behandlung von SHT

Bis jetzt existiert keine erfolgreiche pharmakologische Therapie für Patienten, die ein SHT erlitten haben. Es gibt viele Substanzen, die experimentell und klinisch getestet worden sind. Die Ergebnisse waren zumeist enttäuschend.

Die Glutamat-Antagonisten und NMDA (N-methyl-D-aspartat) -Kanal Rezeptor Modulatoren haben bis jetzt keine Verbesserung bei Patienten mit schwerem SHT bewirkt, obwohl Inhibitoren der Gruppe I des metabotropen Glutamatrezeptors (mGluR) im experimentellen SHT neuroprotektive Wirkung gezeigt haben [110]. Die klinischen Studien von Substanzen wie Selfotel, Traxoprodil und D-CCP-ene konnten keine signifikante Verbesserung des Zustandes der Patienten nachweisen. Für Magnesiumsulfat wurde sogar eine schädliche Wirkung nachgewiesen [97].

L-Typ spannungsempfindliche Kalziumkanal-Blocker wie Nimodipin zeigen in experimentellen Versuchen ebenso neuroprotektive Wirkung. N-Typ Kalziumkanal Blocker, wie SNX 111, werden wegen einer sehr starken Blutdruck senkenden Wirkung nicht eingesetzt [110]. Die posi-

tive Wirkung des Nimodipins wurde in Phase II Studien nur bei Patienten mit klarer SAB-Komponente bestätigt. Phase III Studien müssen derzeit noch abgewartet werden [97]. Eine Reihe von antiinflammatorisch wirkenden Substanzen wurde auf dem Gebiet des SHT untersucht. Bis jetzt hat sich herausgestellt, dass Prostacyclin als Inhibitor der leukozytären Adhärenz und Aggregation den neuronalen Zelltod im Neokortex bei Ratten reduziert. Die Bradykinin B2-Rezeptor Antagonisten vermindern außer neuroprotektiver Wirkung das vasogene Hirnödeme, was bei Ratten gezeigt werden konnte [110]. In klinischen Studien wurden mit dem B2 Antagonist Anatibant interessante Ergebnisse erzielt, jedoch umfasste die Studie nur eine sehr kleine Patientenzahl [97]. Es wurde nachgewiesen, dass Endocannabinoiden die Freisetzung von Glutamat, freien Sauerstoffradikalen und Zytokinen sowie die Aktivität von Endothelin 1 vermindern. Die viel versprechenden Daten aus den Phase I und II Studien wurden in der umfangreicheren Phase III Studie leider nicht bestätigt [97]. Hoffnungsvolle Ergebnisse brachten die Einsätze von Progesteron, wobei Phase III Studien einer großen Patientenzahl folgen werden [97].

Nach aktueller Datenlage ist die Gabe von Kortikosteroiden bei einem traumatisch bedingtem Hirnödeme kontraindiziert. Die CRASH Studie wurde frühzeitig abgebrochen, nachdem sich eine signifikant höhere Mortalitätsrate bei Patienten, die mit Methylprednisolon behandelt worden waren, erwiesen hat [111]. Die Studie zeigte die Ineffektivität der Paninhibition des Immunsystems bei einem SHT und darüber hinaus sogar dessen schädliche Folgen.

1.5 Charakterisierung des Anti-Faktor B Antikörpers (mAb 1379)

Es handelt sich um einen monoklonalen, spezifischen Anti-Faktor B Antikörper, der von Prof. V. M. Holers und Mitarbeitern mit der Bezeichnung „mAb 1379“ entwickelt wurde [112]. Er neutralisiert den Faktor B im Serum vollständig, indem er sich an die dritte SCR-Domäne des Faktor B Moleküls bindet. Die Effektivität des „mAb 1379“ Antikörpers wurde in den experimentellen Versuchen von Prof. V. M. Holers und seinen Mitarbeitern nachgewiesen [112-114]. Der Antikörper mAb 1379 reagiert mit Faktor B von den Spezies Maus, Ratte, Affe, Schwein und Pferd. Die pharmakokinetischen Eigenschaften des mAb1379 Antikörpers wurden von Herstellern untersucht, wobei es sich zeigte, dass eine Gabe von 1mg i.p. dieses Medikaments bei den Mäusen den alternativen Komplementaktivierungsweg für 48h blockiert [112].

1.6 Hypothese / Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung des Einflusses von pharmakologischer, selektiver Blockade des alternativen Komplementaktivierungsweges auf die neurologische Erholung, das Ausmaß der sekundären Schäden und die immunologische Antwort nach einem experimentellen SHT bei Mäusen. Angesichts des therapeutischen Versagens der Immunsuppression und des Wissens über die partielle neuroprotektive Funktion von Zytokinen und Komplement, scheint die Inhibition des alternativen Weges, dessen entscheidende Rolle in anderen Entitäten nachgewiesen wurde, sehr interessant zu sein. Die Versuche mit Faktor B-defizienten Mäusen zeigten hoffnungsvolle Ergebnisse.

Untersucht wird die neurologische Erholung nach einem SHT der mit mAb 1379 behandelten Tiere im Vergleich zur Placebo-Gruppe. Es wird davon ausgegangen, dass durch die Blockade des alternativen Komplementaktivierungsweges mit mAb 1379 eine signifikant bessere neurologische Erholung erreicht werden kann. Darüber hinaus wird angenommen, dass diese Behandlung die Apoptoserate und die sekundären Hirnschäden verringert, die Expression antiapoptotischen Bcl-2 Gens fördert und zu Unterregulation der IL-6 sowie IL-18 führt. Die Blockade der C₃ Proteine mit Crry tragendem Antikörper verursachte eine Hochregulation der Komplementregulatoren C₁-Inh, CD 55 und CD59. Es wird der Frage nachgegangen, ob durch eine Faktor B Blockade eine ähnliche Regulation beobachtet werden kann. Die klinische Verbesserung wird mittels NSS untersucht, die Expression der Gene wird durch real time RT-PCR bestimmt, die Apoptose wird im TUNEL nachgewiesen und zusätzlich werden immunhistochemische Färbungen angefertigt, um das Ausmaß der Schäden und Leukozyteninfiltration einzuschätzen. NSS wird zu den Zeitpunkten 1h, 4h, 24h und 7 Tagen nach dem Trauma erhoben. Molekularbiologische Bestimmungen und immunhistochemische Färbungen erfolgen zum Zeitpunkt 4h, 24h und 7 Tage nach SHT.

2. Material und Methoden

2.1 C57BL/6 Mäuse

Alle Experimente werden mit männlichen Wildtyp (WT) Mäusen, Stamm C57BL/6, durchgeführt. Die Tiere wurden von der Firma Jackson Laboratory (USA) bezogen und in den Forschungseinrichtungen für Experimentelle Medizin (FEM) gezüchtet. Die Haltung der Tiere erfolgt unter den Standardbedingungen: keimfreie Bedingungen, Lufttemperatur von 21°C, Luftfeuchtigkeit 60%, Beleuchtungsperiode von 6- 18 Uhr, Futter und ad libidum zur Verfügung stehendes Trinkwasser (pH 7) werden gewährleistet. Die den Experimenten unterzogenen Tiere werden einige Tagen vor Experiment vereinzelt. Die Tiere wiegen zwischen 25-32g und sind 15-17 Wochen alt.

2.2 Versuchsgruppen

Die Tiere werden wegen unterschiedlicher Behandlungsschemata in 4 Gruppen eingeteilt:

1. C57BL/6 Mäuse mit SHT und mAb 1379 Injektion („**mAb 1379**“ Gruppe)
2. C57BL/6 Mäuse mit SHT und Placebobehandlung („**Placebo**“ Gruppe)
3. C57BL/6 Mäuse die nach Narkoseeinleitung eine mediane Inzision der Haut ohne Trauma erhalten („**Sham**“ Gruppe)
4. Kontrollen, C57BL/6 Mäuse ohne Behandlung und jegliche Intervention („**Nil**“ Gruppe).

In jeder Gruppe mit Ausnahme der „Nil“ Gruppe werden molekularbiologische Analysen zu 3 bestimmten Zeitpunkten vorgenommen: 4 Stunden nach SHT (4h), 24 Stunden nach SHT (24h) und 7 Tage nach SHT (7d). Die Anzahl der Mäuse beträgt entsprechend n=6 pro Gruppe pro Zeitpunkt für die Genexpressionsanalyse, n=3 ebenfalls pro Gruppe pro Zeitpunkt für Immunhistochemie und TUNEL. Alle Tiere werden zusätzlich zu den erwähnten Zeitpunkten vor dem SHT sowie 1h danach gewogen und mittels NSS 1h nach dem SHT sowie zu den für die molekularbiologischen Analysen erwähnten Zeitpunkten getestet. In der „Nil“ Gruppe werden insgesamt 3 Tiere beobachtet.

2.3 Experimentelles Traumamodell

2.3.1 Traumagerät und die Durchführung des Traumas

Alle Experimente werden mittels des von Chen et al. entwickelten und standardisierten Traumamodells durchgeführt [115, 116]. Das Modell stellt ein „weight-drop device“ dar und wurde an die Experimente mit Mäusen angepasst. Das verwendete Modell ist in Abbildung 6 dar-

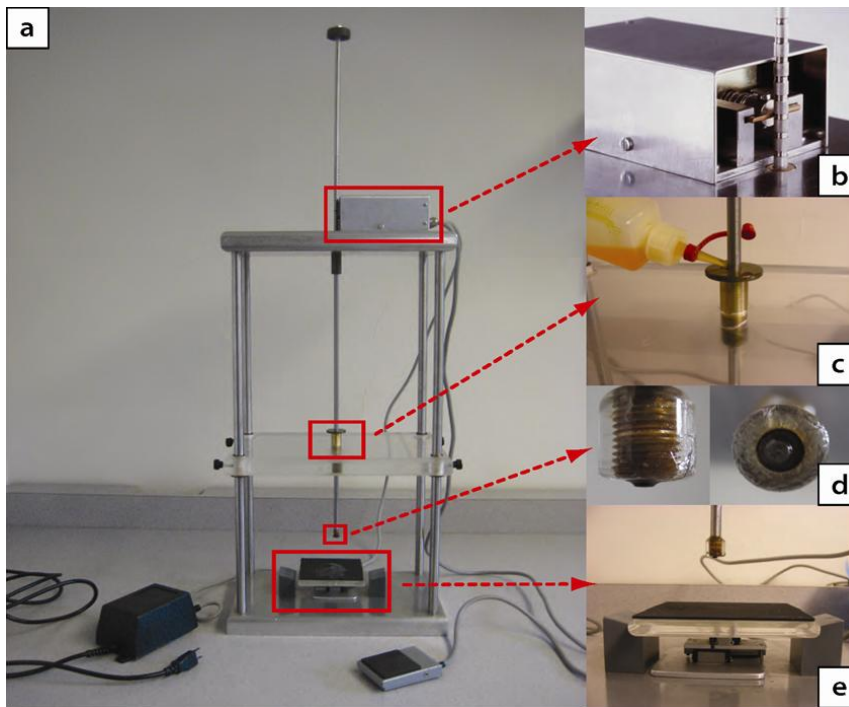


Abb. 6 Verwendetes Traumagerät (Flierl et al., 2009); a. Traumagerät b. Haltevorrichtung, elektronisch gesteuert c. Stabilisierung des Stapels d. Silikonspitze des Gewichts e. Tisch, auf den die zu traumatisierenden Tiere aufgelegt und gehalten werden.

gestellt. Das Prinzip beruht darauf, dass ein Gewicht von 333g, manuell ausgelöst, auf die freigelegte linke Seite der Schädelkalotte des Versuchstiers fällt und damit einen standardisierten traumatischen Impakt appliziert. Die Höhe aus der der Rundstab fällt wird auf 2-3 cm definiert. Das beschriebene Modell wurde bereits von Forschungsgruppen bei mehreren Studien eingesetzt und garantiert somit

die Vergleichbarkeit und Relevanz der Ergebnisse. Die früheren Experimente zeigen weitestgehend ähnliche pathologische Erscheinungen, wie sie bei einem echten Schädel-Hirn-Trauma auftreten können [85, 115, 117].

Vor der Durchführung des Traumas werden alle Tiere mittels einer Inhalationsnarkose betäubt, es werden 8 ml Isofluran in den Narkosetopf gegeben. Die Dauer einer einzelnen Narkose beträgt 2-5 Minuten und das Tier wird vom Experimentator überwacht. Nachdem das Tier betäubt ist, erfolgt die zusätzliche perioperative Analgesie durch eine subkutane Injektion von 0,2 ml Tramal® (10mg /kg), eine präoperative Gewichtsbestimmung und die mediane Inzision der Kopfweichteile in Längsrichtung bis zur Schädelkalotte, da die Darstellung der Schädelkalotte die Positionierung der Traumastelle auf der linken Kalottenseite wesentlich erleichtert.

Danach wird das Trauma durch den freien Fall eines 333g schweren, geführten Stempels aus einer Höhe von 2-3 cm auf die linke Kalottenseite appliziert. Die Versuchstiere werden mit 100%-igen Sauerstoff bis zum Erwachen unterstützt und ihren Käfigen zugeführt. Das Experiment ist vom „Landesamt für Arbeitsschutz und technische Sicherheit Berlin“ genehmigt worden (G0099/03).

2.3.2 Geräte und Chemikalien

Traumagerät	(Anfertigung innerhalb der Charité)
Waage	(Scaltec)
Skalpell	(Produkte für die Medizin AG)
Pinzette	(Roth)
Spritzen (1ml)	(Becton Dickinson)
Kanülen (0,45mm x12mm)	(Braun)
O ₂ -Druckluftflasche	(Linde)
Narkosetopf	
Guillotine	(Anfertigung innerhalb der Charité)
Neurological Severity Score Parcours	(Anfertigung innerhalb der Charité)
Ethanol	(J.T.Baker)
PBS Dulbecco	(Biochrom AG)
Medizinischer O ₂	(Linder)
Aqua dest	
2.3.3 Medikamente	
Forene® (Isofluran)	(Abbott GmbH & Co.KG)
Ampuwa® (Tramadol)	(Fresenius Kabi)
Miliseptol (Desinfektion)	(Braun)
Anti-Faktor B Antikörper (mAb 1379)	(Labor Prof. V. M. Holers Departments of Medicine and Immunology, University Colorado Health Sciences Center, Denver, USA)

2.4 Pharmakologische Therapie

Entsprechend der vorher festgelegten, zufälligen Zuteilung der Tiere zu verschiedenen Behandlungsgruppen werden Medikamente appliziert. Die Nil und Sham Gruppen bekommen bis auf Schmerztherapie bei der zweiten Gruppe keine Behandlung. Der mAb 1379 Gruppe wird 1mg mAb 1379 i.p. in 0,4 ml PBS 1h und 24h nach dem Trauma gespritzt. Die Tiere der Placebo Gruppe bekommen 0,4 ml PBS i.p. ebenfalls 1h und 24h nach dem Trauma. Die Zeitpunkte der Behandlungen wurden sorgfältig ausgewählt. Ziel war, dass das systemisch applizierte Medikament das ZNS erreichen kann. Bei diesem Traumamodell persistiert die BHS-Störung zwischen 1 Stunde (1h) und 24 Stunden (24h) nach dem Trauma [115].

2.5 Neurological Severity Score (NSS)

Um das Ausmaß der durch das Trauma hervorgerufenen zerebralen Schäden messen zu können, wurde ein Neurological Severity Score entwickelt [118]. Es enthält 10 Parameter, die eine objektive Beurteilung der neurologischen Ausfälle zulassen [85, 117, 118]. Das NSS beruht auf 10 Aufgaben, die die Tiere jeweils erfüllen müssen. Je nach Erfolg oder Misserfolg beim Erfüllen einzelner Aufgaben werden Punkte erteilt (Erfolg-0, Misserfolg-1). Der Test erlaubt eine objektive und einfache Bewertung der wichtigsten neurologischen Parameter, die mit der Schwere des Traumas und den traumabedingten Komplikationen einhergehen. Das maximal zu erreichende Ergebnis von 10 Punkten entspricht schwerwiegenden posttraumatischen Einschränkungen. Die Aufgaben und die Bewertung illustriert die Tabelle 6 (Seite 38).

Tab. 6 NSS (Neurological Severity Score) für Mäuse (Beni-Adani et al. 2001).

Aufgabe	Beschreibung	Beurteilung/Punkte
Austreten aus dem Kreis	Fähigkeit und Initiative einen Kreis (30cm Durchmesser) innerhalb von 3 Minuten zu verlassen.	0/1
Mono-/Hemiparese	Kontralaterale Parese von oberer und/oder unterer Extremität.	0/1
Geradeaus laufen	Motorische Fähigkeit und Initiative geradeaus zu laufen.	0/1
Schreckreflex	Reagieren auf lautes Händeklatschen (unbewusster Reflex).	0/1
Suchverhalten	Physiologisches Verhalten als Zeichen des Interesses an der Umgebung	0/1
Balancieren auf einem eckigen Balken	Fähigkeit auf einem Balken (7mm Breite) mindestens 10 Sek. zu balancieren	0/1
Balancieren auf dem runden Balken	Fähigkeit auf einem Balken (5mm Breite) mindestens 10 Sek. zu balancieren	0/1
Laufen auf dem 3cm Balken	Fähigkeit auf einem Balken von 30cm Länge und 3cm Breite zu laufen.	0/1
Laufen auf dem 2cm Balken	Gleicher Test, 2cm Breite des Balkens	0/1
Laufen auf dem 1cm Balken	Gleicher Test, 1cm Breite des Balkens	0/1

Bei einem NSS von 8 oder mehr Punkten wird der Versuch abgebrochen und das Tier der Euthanasie zugeführt.

Alle Tiere werden jeweils zu den folgenden Zeitpunkten durch einen erfahrenen Experimentator untersucht: 1h, 4h, 24h und 7 Tage (7d) nach Trauma. Diese Untersuchung ist für den Experimentator verblindet. Die Tiere werden bei dieser Gelegenheit jeweils gewogen. Das Gewicht und das NSS werden zu allen Zeitpunkten auf Bögen dokumentiert. Die Behandlung wurde jeweils nach dem NSS-Test durchgeführt.

2.6 Gewebe

Die Tiere werden zu bestimmten Zeitpunkten (4h, 24h, 7d) nach Überdosierung der Anästhesie dekapitiert und getötet. Es wird jeweils Blut entnommen. Die Gehirne werden in Kryoröhrchen eingepackt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Blut wird bei +4°C, 20 Minuten lang bei 7200 x g zentrifugiert, danach das Serum abpipetiert und ebenfalls umgehend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die längere Lagerung der Proben erfolgt bei -80°C.

2.7 Komplementaktivität

Die Quantifizierung der Aktivität des alternativen Komplementaktivierungsweges wurde durch die Arbeitsgruppe von Prof. V. M. Holers (Department of Medicine and Immunology, University of Colorado, Health Sciences Center, Denver, CO 80262, USA) durchgeführt [112]. Das Blut wurde bei allen Versuchstieren zu allen o.g. Zeitpunkten entnommen, abzentrifugiert, die Seren abpipetiert, aliquotiert, bei -80°C eingefroren und in diesem Zustand versandt. Nach dem Auftauen wurden 10µl Serum von jeder Probe entnommen und mit einem Zymosan Assay (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in Menge von 10⁹ inkubiert. Die Inkubation wurde bei einer Temperatur von 37°C in 5mM MgCl₂ und 10mM EGTA Lösung, die mit kalziumfreier PBS bis zum Gesamtvolumen von 100µl aufgefüllt wurde, durchgeführt. Der Nachweis von C₃ Ablagerungen als Marker der Aktivierung des alternativen Weges erfolgte mittels Antikörper gegen C₃, die mit FITC markiert wurden (Cappel, Durham, USA). Anschließend wurde eine Durchflusszytometrie durchgeführt. Die Komplementaktivität wurde für jede Probe aus der unten genannten Formel berechnet. [112, 119].

$$100 \times \frac{(\text{mittlere Fluoreszenz der Probe}) - \text{Hintergrund (kein Serum)}}{(\text{mittlere Fluoreszenz der positiven Kontrolle}) - \text{Hintergrund (kein Serum)}}$$

2.8 Zelltodanalyse (Apoptose)

2.8.1 Prinzip der Methode

TUNEL (Terminal-Desoxyribosyl-Transferase-Mediated dUTP Nick End Labeling) stellt eine Methode dar, die dem Nachweis einer frühen Apoptose dient. Die Methode basiert auf dem Erkennen von freien 3'-OH-Enden, die durch DNA-Strangbrüche entstehen, durch die terminale Desoxyribosyl-Transferase die ihnen fluoreszenzmarkierte Nukleotidderivate ankoppelt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop werden die apoptotische Zellkerne hell leuchtend dargestellt.

2.8.2 Durchführung

Die Vorbereitung der Kryoschnitte ist im Kapitel 2.9.2 (Seite 42) beschrieben. Die Kryoschnitte werden erst 12h in -20°C gelagert. Nach 30 Minuten Trocknen bei RT erfolgt die Fixierung in Formalinlösung über 10 Minuten. Jetzt folgt dreimaliges Waschen in PBS, jeweils ca. 3 Minuten. Die Fixierung der Schnitte wird 5 Minuten lang in Ethanol-Essigsäure bei -20°C vorgenommen, gefolgt von Waschen in PBS. Zur Permeabilisierung wird Triton-X100 für 1h bei RT eingesetzt. Es folgt Waschen in PBS. Die Positivkontrollen werden ausgenommen und mit der DNase-Verbrauchslösung 20 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend werden die Proben in PBS gewaschen. Ab diesem Zeitpunkt wird im Dunkeln gearbeitet. Alle Proben werden mit je $50\ \mu\text{l}$ TUNEL Reaktions Mixtur für 90 Minuten bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Inkubation der Negativkontrollen wird ohne Enzym Solution durchgeführt. Nach dem PBS Waschen erfolgt das Eindeckeln mit Vectorshield DAPI. Jetzt wird für die Auswertung das Fluoreszenzmikroskop eingesetzt. Es werden zwei Filter $460\ \text{nm}$ (für DAPI) und $520\ \text{nm}$ (für TUNEL) benutzt. Die Ergebnisse werden digital fotografiert und gespeichert.

2.8.3 Geräte und Chemikalien

Fluoreszenzmikroskop	(Zeiss, Axioskop 40)
PC Software	(Alpha digi doc 1201)
Inkubator	(Mettler)
Gefrierschrank -20°C	(Liebherr)
Parafilm	(American National Can)
Pipetten ($0,5\text{-}10\ \mu\text{l}$, $10\text{-}100\ \mu\text{l}$, $100\text{-}1000\ \mu\text{l}$)	(Eppendorf)
Färbebäder	
In situ cell detection kit, Fluorescein	(Roche #1168495910)
-Label Solution	$550\ \mu\text{l}$
-Enzym Solution	$50\ \mu\text{l}$
Vectorshield (4'-6'-Diamidino-2-phenylindole (DAPI))	(Vector)
BSA	(Vector)
MgCl_2	(Roth)
Tris HCl pH 7,5	(Roth)
Glycerol	(Roth)
37% Formalinlösung	(Roth)
PBS Dulbecco Instamed $9,55\ \text{g/l}$	(Biochrom AG)

Ethanol	(J.T.Baker)
Essigsäure	(Merck)
Triton X-100	(Acros)
DNase 1, grade I	(Roche)
Aqua dest	
Eis	

2.8.4 Lösungen

DNase grade I Stocklösung	20 000U/ml 50% Glycerol 20mM Tris HCl pH 7, 5 1mM MgCl ₂
DNase Puffer	50mM Tris HCl pH 7,5 10mM MgCl ₂ 1mg/ml BSA
DNase Verbrauchslösung	50µl DNase Puffer 1µl DNase Stocklösung
TUNEL Reaktions Mixtur	450µl Label Solution 50µl Enzym Solution
Negativkontrolle	100µl Label Solution
Formalinlösung	10%ig in PBS (pH-Wert 7,4)
Ethanol/Essigsäure	1:2
Triton X	3% in PBS

2.9 Immunhistochemie

2.9.1 Prinzip der Methode

Die Immunhistochemie stellt eine Methode zum Nachweis und zur Identifizierung der Antigene in situ dar. Unter dem Begriff Immunhistochemie werden verschiedene Techniken verstanden, die allerdings alle auf dem Prinzip der Bindung eines spezifischen Antikörpers an das gewünschte Antigen basieren. Die Visualisierung des Antigens erfolgt durch verschiedene mikroskopische Methoden.

2.9.2 Ausführung der Immunhistochemie

Es werden Proben aller Versuchsgruppen (Nil, Sham, Placebo, mAb 1379) und Versuchszeitpunkte (4h, 24h, 7d) untersucht.

Die in allen Experimenten verwendete Methode basiert auf einem Biotin- (Strept-) Avidin Detektionssystem. Es wird mit den Vectastain Elite ABC und Vectastain DAB Substrat Kits der Firma Vector gearbeitet. Die Durchführung richtet sich nach den Angaben des Herstellers der Kits.

Zum Einbetten der Gehirne wird Tissue Tec benutzt. Die eingebetteten Proben werden bei -80°C gelagert. Die eingebetteten Gehirne werden im gefrorenen Zustand koronar am Kryostat geschnitten und auf Deckgläser aufgebracht. Es werden Schnitte von der Traumastelle und dem Hippocampus angefertigt. Die Dicke der Kryoschnitten beträgt $8\ \mu\text{m}$. Die Schnitte werden über Nacht getrocknet. Alle Proben werden bis zur Färbung bei -80°C aufbewahrt.

Unmittelbar vor der Färbung wurden die Kryoschnitte 1h bei RT getrocknet und danach 10 Minuten in eiskaltem Aceton (-20°C) fixiert. Die einzelnen Schnitte werden mit dem Dako-Pen umrandet. Danach erfolgt das Waschen in PBS (5 Minuten). Die in eine feuchte Kammer gelegten Objektträger werden mit 0,3% H_2O_2 betropft und 30 Minuten inkubiert. Nach dem nächsten Waschschritt mit PBS werden die Schnitte mit einem 1:200 in PBS/FCS verdünnten Vectastain Normal Serum blockiert, damit unspezifische Proteinbindungsstellen abgesättigt und unspezifische Reaktionen vermieden werden. Nach dem Abgießen des Normal Serums und abermaligem PBS-Waschen werden die Präparate mit dem primären Antikörper in einer definierten Verdünnung (siehe Tabelle 7) 1h bei RT inkubiert. Nach dem 5-minütigen PBS Waschen werden die Schnitte bei RT 30 Minuten lang mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Danach erfolgt Waschen in PBS und eine 30-minütige Inkubation mit Vectastain Elite ABC Reagenz. Jetzt wird 5 Minuten lang mit PBS gespült. Anschließend werden die Schnitte für 5 Minuten bei RT mit dem Vectastain DAB Substrat Kit, das Chromogen enthält, versetzt. Die Reaktion wird 2 Minuten lang mit Aqua dest gestoppt, die Präparate werden über eine Alkoholreihe (70% Ethanol, 96% Ethanol, 100% Ethanol, Xylol) entwässert und mit Entellan konserviert. Nach dem Stoppen werden GFAP Proben zusätzlich 5 Minuten in Methylgrün gegengefärbt und danach 2 Minuten lang in Wasser gewaschen. Die mikroskopische Auswertung wird digital dokumentiert.

2.9.3 Geräte und Chemikalien

Cryostat HM 560	(Microm)
Mikroskop Olympus BX41	(Olympus)

Olympus DP Soft Software	(Olympus)
Digitalkamera Camedia C5050	(Olympus)
Objekträger	(Menzel-Gläser)
Deckgläser	(Menzel-Gläser)
Kühlschrank -20°C	(Liebherr)
pH Meter	(Fisher Scientific)
Pipetten (0,5-10µl; 10-100µl; 100-1000µl)	(Eppendorf)
Messer (Mikrotome Blade)	(Feather)
Pasteur Pipetten	(Roth)
Färbebeäder	
Pinzetten	(Roth)
Alufolie	(Folien GmbH Monheim)
Präparatekisten	(Ceeseem)
Tissue Tec	(Sakura)
DakoCytomation-Pen	(DakoCytomation)
Entellan®	(Merck)
Aceton	(J.T.Baker)
H ₂ O ₂	(Fluka)
Xylol	(J.T. Baker)
Methanol	(J.T.Baker)
Ethanol (70%, 96%, 100%)	(J.T.Baker)
PBS Dulbecco Instamed 9,55g/l	(Biochrom AG)
FCS	(Biochrom AG)
Methylgrün	
Aqua dest	
Vectastain Elite ABC Kit	(Alexis, Vector Laboratories)
a) Mouse Kit	(#PK 6102)
b) Rabbit Kit	(#PK 6101)
c) Rat Kit	(#PK 6105)
Vectastain DAB Substrat Kit	(Vector Laboratories)

Die Antikörper sind in der Tabelle 7 aufgelistet.

Tab. 7 Immunhistochemie, primäre Antikörper.

Antikörper	Firma	Verdünnung	Darstellung
Mouse anti neuronal nuclei (NeuN) monoclonal	Chemicon	1:2000	Neuronen
Rat anti mouse CD11b	Accuspecs	1:200	Makrophagen, polymorphkernige Zellen, Mikroglia
Rabbit anti glial fibrillary Acidic protein (GFAP)	Immunon	1:100	Gliazellen

2.9.4 Lösungen

H₂O₂ (0,3%) in Methanol

PBS/FCS 1:10

Blocking Serum aus Vectastain Elite ABC Kit 1:200 in PBS/FCS

Sekundärer Antikörper aus Vectastain Elite ABC Kit 1:100 in PBS/FCS

Vectastain Elite ABC-Reagenz 20µl A Reagenz

20µl B Reagenz

2960µl PBS/FCS

Vectastain DAB Substrat Kit 2,5ml Aqua dest

1 Tropfen Puffer

2 Tropfen DAB

1 Tropfen Hydrogenperoxid

1 Tropfen Nickel

2.10 Analyse der Genexpression

2.10.1 RNA Isolierung

2.10.1.1 Prinzip der Methode

Die Gehirne werden homogenisiert und die Zellen lysiert. Die ganze RNA wird extrahiert und gereinigt. Durch Reinigung werden genomische DNA und Proteine ausgewaschen.

2.10.1.2 Die Ausführung

Nach der Entnahme aus dem Tiefkühler (-80°C) werden die Gehirne sofort geteilt, gewogen und in 2ml vorgekühltes Qiazol überführt. Die linken und rechten Hirnhälften werden separat bearbeitet. Danach erfolgt eine Homogenisierung unter Eiskühlung jeweils 3x 10 sec. mit 30 sec.

Pause zwischen den Homogenisierungsschritten. Nach jeder Probe wird der Homogenisator 3x mit bidestilliertem Wasser, 100% Ethanol und 0,1% DEPC Wasser gespült. Die Lyse der Proben erfolgte durch eine 15-minütige Inkubation bei RT. Mit der weiteren Aufarbeitung der Proben wird anhand von Qiagen RNeasy Handbook verfahren. Es wird ein RNeasy Mini Kit benutzt. Die Proben werden mit 400µl Chloroform versetzt, ca. 15 sec. geschüttelt und für weitere 3 Minuten in RT inkubiert. Für die Phasentrennung wird die Lösung auf 2ml Reaktionsgefäße aufgeteilt und 15 Minuten, 8000 x g, bei 4°C zentrifugiert.

Die obere, wässrige Phase wird entnommen und auf der Qiagen Säule gereinigt, gemäß den Angaben der Firma Qiagen. Von jeder Probe werden ca. 1000µl gewonnen, davon 350µl in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 350µl 70% Ethanol versetzt, gemischt und auf eine Rneasy Säule gegeben. Der Rest der wässrigen Phase wird bei -80°C eingefroren. Die Säulen werden 15 sec., 7200 x g, bei RT zentrifugiert. Der gesamte Durchlauf wird verworfen. In den nächsten Schritten werden auf die Säule nacheinander Puffer RW1 (700µl) sowie 2x RPE (500µl) gegeben und jeweils 15 sec. lang bei 7200 x g und RT zentrifugiert. Der Durchlauf wird verworfen. Nach der zweiten Gabe von RPE Puffer erfolgt ein 2-minütiges Zentrifugieren bei RT und 7200 x g. Dann wird die an der Membran gebundene RNA 2x mit 35 µl RNase freiem Wasser gelöst. Die Säulen werden wieder jeweils nach der Gabe von RNase freiem Wasser abzentrifugiert (1Minute, 7200 x g, RT). Die Röhrchen mit der gesammelten RNA werden auf Eis gestellt, aliquotiert, bei -80°C eingefroren.

Zur Konzentrationsmessung wird 1:50 in DEPC-Wasser verdünnte RNA genutzt. Die gemessene Lösung enthält 2µl RNA-Lösung und 98µl 0,1%-iges DEPC-Wasser. Die Messung erfolgt im Spectrophotometer laut Gebrauchseinweisung (BioRad). Neben der Konzentration der RNA wird auch die Reinheit der Proben bestimmt.

$$RNA\ Konz. (\mu g/\mu l) = \frac{Extinktion_{260nm} \times 50(Verd.-Faktor) \times 40(RNA - Faktor)}{1000}$$

$$Reinheit = \frac{Extinktion\ 260nm}{Extinktion\ 280nm}$$

Die Extinktion soll im Bereich zwischen 0.2 und 1,5 liegen. Die Reinheit kann je nach Gerät und Lösemittel variieren, darf aber nicht weniger als 1,8 (BioRad, Gebrauchsanweisung) betragen.

Um die Qualität der RNA zu überprüfen, wird von jeder Probe 1µl RNA entnommen, auf 5µl RNase freies Wasser verdünnt und im Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) analysiert. Die

Vorbereitung und das Auftragen der Proben wird mit RNA 6000 Nano LabChip®Kit und laut Reagent Kit Guide (Agilent Technologies) durchgeführt. Die erzeugten Banden und Kurven wurden anschließend fotografiert und gespeichert.

2.10.1.3 Geräte und Chemikalien

Homogenizator Ultra TURRAX T25 basic	(IKA)
Zentrifuge 5417R	(Eppendorf)
Mikro 7 Zentrifuge	(Fisher Scientific)
Pipetten P1-P1000	(Gilson)
Pipettenspitzen mit Filter divers	(Art, Neo Lab)
Zentrifugenröhrchen mit Deckel	(Greiner)
Reaktionsgefäße 1,5 und 2.0ml	(Eppendorf)
4°C Kühlständer	(Eppendorf)
Spectrophotometer SmartSpec 3000	(BioRad)
Quartz Spectrometer Cell 10 mm	(BioRad)
Bioanalyzer Agilent 2100	(Agilent technologies)
Skalpelle	(Produkte für die Medizin AG)
Schere	(Dahlhausen)
Alufolie	(Folien GmbH Monheim)
Qiazol	(Qiagen)
Ethanol (100%)	(J.T. Baker)
Rnase AWAY	(Molecular BioProducts)
Chloroform (100%)	(Roth)
0,1% DEPC (in autoklaviertem Wasser)	(Sigma)
70% Ethanol (in 0,1% DEPC Wasser)	(J.T.Baker)
RNeasy Mini Kit	(Qiagen)
Rneasy Mini spin columns (2ml)	
Collection tubes (1,5ml)	
Collection tubes (2,0ml)	
Buffer RW1	
Buffer RPE	
RNase freies Wasser	

RNA 6000 Nano LabChip Kit	(Agilent Technologies)
RNA 6000 Marker für Quantifizierung der Proben von RNA	(Ambion)

2.10.2 cDNA Synthese

2.10.2.1 Das Prinzip der cDNA Synthese

Die gewonnene RNA wird jetzt mittels multifunktionaler Reverse Transcriptase zur komplementären DNA (cDNA) umgeschrieben. Durch Anwendung der entsprechenden Primer wird nur mRNA umgeschrieben.

2.10.2.2 Durchführung

Die weiteren Analysen der Proben werden nur mit der RNA der linken Hemisphären (Traumastelle) vorgenommen. Es wird mit Omniscript Kit gearbeitet und nach Anweisung des Herstellers vorgegangen (Omniscript® Reverse Transcription Handbook, Mai 2004). Die Menge des Startmaterials, welches in cDNA umgeschrieben wird, entspricht 2µg RNA. Alle Proben und Reagenzien werden auf Eis aufgetaut. Der RNase Inhibitor (geliefert 40U/µl) wird mittels RT1x Puffer 1:4 verdünnt und immer frisch vorbereitet. Oligo-dT Primer und Nonamer Primer werden in 1mM Tris Lösung (pH=7,0) gelöst. Die gevortexten und abzentrifugierten Lösungen werden in Reihenfolge und Mengen in 0,5ml Reaktionsgefäßen, wie in der Tabelle 8 aufgeführt, vorgelegt. Der ganze Vorgang findet auf Eis statt.

Tab. 8 Reagenzien der Reverse-Transkription Reaktion mit Volumina und Konzentrationen (Qiagen, Omniscript® Reverse Transcription Handbook, Mai 2004).

Komponenten	Volumen pro Reaktion	Endkonzentration
Master Mix		
10x Buffer RT	2 µl	1x
dNTP Mix (5 mM each dNTP)	2 µl	0.5 mM each dNTP
Oligo-dT Primer(10 µM)	2 µl	1 µM
Nonamer Primer (100µM)	2 µl	10 µM
RNase Inhibitor (10 units/µl)	1 µl	0,5U/µl
Omniscript Reverse Transcriptase	1 µl	0,2U/µl
RNase-freies Wasser	Variabel	
Template RNA		
Template RNA	Variabel nach Konz.	2 µg /20µl
Total volume	20 µl	

Die Proben werden anschließend bei 37°C 60 Minuten lang im Mastercycler inkubiert, dann sofort auf 4°C untergekühlt, mit RNase-freiem Wasser auf ein Endvolumen von 100µl verdünnt und bei 20°C gelagert.

2.10.2.3 Geräte und Chemikalien

Pipetten P1-P1000	(Gilson)
Pipettenspitzen mit Filter divers	(Art, Neo Lab)
Mastercycler	(Eppendorf)
Reaktionsgefäße (0,5ml)	(Eppendorf)
Mikro 7 Zentrifuge	(Fisher Scientific)
Heizblock; Dri-Block; DB 2D	(Techne)
Kühlbox Iso Freeze	(NeoLab)
Omniscript Kit:	(Qiagen #205113)
dNTPs	
Reverse Transcriptase	
10x RT Buffer	
Rnase freies Wasser	

Primers:	Oligo dT16 Primer	(Operon)
	Nonamer Primer	(Operon)
RNase Inhibitor (Rnasin 40U/ μ l)		(Promega)

2.10.3 Real-time RT-PCR

2.10.3.1 Prinzip der Methode

Der wichtigste Unterschied zwischen traditioneller PCR und real-time RT-PCR liegt darin, dass nicht die absolute Menge des PCR Produktes gemessen, sondern die PCR Kinetik genutzt wird. Bei real-time RT-PCR wird die Menge des Produktes in der exponentiellen Phase am Anfang der Reaktion gemessen (=Echtzeitbestimmung). Zu diesem Zeitpunkt kommt es zu einer genauen Verdopplung der Menge der DNA, wodurch die Messung quantifizierbar ist. Alle real-time RT-PCR Systeme basieren auf der Detektion und Quantifizierung eines fluoreszierenden Reporterfarbstoffs, dessen Signal direkt proportional zu der Menge an gebildetem PCR Produkt ist. Es wird ein Haushaltsgen benutzt, das immer gleich exprimiert wird. Das Vergleichen der Expression des Haushaltsgens und untersuchten Gens ermöglicht eine relative Quantifizierung der Ergebnisse. Als Richtwert zum Vergleich der Expression der untersuchten Gene wird eine Zykluszahl (C_T -Wert) bei dem die Fluoreszenz des Produktes deutlich vom Hintergrund abgehoben ist und ein für alle Gene gleiches Treshold erreicht hat, genommen. Die Menge des Produktes ist beim Erreichen des Tresholds für alle Proben gleich. Der C_T -Wert wird für jedes Gen bestimmt. Unter Annahme, dass die Reaktion exponentiell verläuft, kann man das Verhältnis zwischen der Menge des untersuchten Gens und des Haushaltsgens am Anfang der Reaktion berechnen.

2.10.3.2 Durchführung

Alle real-time-RT-PCR Experimente werden ausschließlich nach dem QuantiProbe Prinzip und mit dem QuantiTect Probe PCR Kit durchgeführt (Qiagen). Als Haushaltsgen gilt jeweils GAPDH. Zuerst werden Master Mix, Assays und cDNA auf Eis aufgetaut. Nach dem Vortexen werden die Reagenzien wie in der Tabelle 9 pipettiert.

Tab. 9 Reaktionskomponenten für PCR. QuantiTect Probe PCR MasterMix enthält HotStarTaq Polymerase, QuantiTcet Assay Mix enthält entsprechende Primer und Probesequenzen.

Komponenten	Volumen/Reaktion	Endkonzentration
2x QuantiTect Probe PCR MasterMix	12,5 µl	1x
10x QuantiTect Assay Mix	2,5 µl	1x
Master mix der cDNA		
RNase-freies Wasser	8µl	
Template cDNA	2µl	
Total volume	25 µl	

Bei allen Untersuchungen werden für jedes Gen negative Kontrollen (NTC) durchgeführt. Dabei wurde statt der cDNA ein gleichgroßes Volumen von RNase-freiem Wasser eingesetzt. Von jeder Probe wird jeweils ein Haushaltsgen gemessen. Die real-time RT-PCR wird am DNA Engine Opticon durchgeführt. Am Anfang wird jeweils ein UNG-Verdau, der eine carryover Kontamination der Proben verhindern soll, durchgeführt. Die real-time RT-PCR Konditionen werden laut der Vorschriften des Herstellers des Kits wie folgt eingestellt und bei allen Experimenten eingehalten:

Tab. 10 Real-time RT-PCR cycling Konditionen.
(QuantiTect™ Gene Expression Assay Handbook, Mai 2003)

Schritt	Zeit	Temperatur
PCR		
UNG Verdau	2	50°C
Aktivierungsschritt	15 Minuten	95°C
3-step-cycling		
Denaturierung	15 sec.	94°C
Annealing/Detektion	30 sec.	56°C
Extension	30 sec.	76°C
Anzahl der Zyklen	45	

2.10.3.3 Effizienzbestimmung der Assays

Da die Effizienz der einzelnen Primer großen Einfluss auf die Amplifikationsrate der Reaktion hat, wird sie für alle untersuchten Gene bestimmt. Dazu wird eine Verdünnungsreihe (unverdünnt, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000) von 2µl Template-DNA gemessen. Die C_T -Werte werden auf die Y-Achse und die Verdünnungen auf der X-Achse eingetragen (Standardkurve). Aus der erzeugten Kurve ($y=mx+b$) wird m (Steigung) berechnet. Die Effizienz wird aus der Gleichung erzeugt:

$$\text{Effizienz} = 10^{-1/m} - 1$$

2.10.3.4 Auswertung der real-time RT-PCR

Zur Auswertung der Daten wird die dem Opticon beigelegte und vom Hersteller empfohlene Software benutzt. Die digitale Analyse der während der PCR aufgenommenen Daten wird mittels erwähnter Software und Microsoft Excel durchgeführt. Bei allen Untersuchungen wird die relative Quantifizierung angewandt. Bei dieser Methode wird das untersuchte Gen relativ, in seiner Expression zu einem Haushaltsgen (nicht reguliertem Gen), ins Verhältnis gesetzt.

$$E = 2^{-\Delta C_T}, \text{ wobei } \Delta C_T = C_T(\text{Zielgen}) - C_T(\text{Haushaltsgen})$$

E – Ergebnis, C_T – Treshold – Zyklus

Mit Einbeziehung der Effizienz (E_H, E_{ZG}) der entsprechenden Zielgene muss die Formel wie folgt geändert werden:

$$E = (1 + E_H)^{C_H} \text{ für Haushaltsgen,}$$

oder: $E = (1 + E_{ZG})^{C_{ZG}}$ für Zielgen.

Die Expression der untersuchten Gene wird als Prozent der Expression des Haushaltsgens ausgedrückt. Es wird folgende Formel benutzt:

$$dC_T \% = \frac{(1+E_H)^{C_H}}{(1+E_{ZG})^{C_{ZG}}} \times 100\%$$

$dC_T\%$ - Expression des Zielgens als Prozentsatz der Expression des Haushaltsgens

E_H - Effizienz des Assays für das Haushaltsgen

E_{ZG} - Effizienz des Assays für das Zielgen

C_H - C_T Treshold des Haushaltsgens

C_{ZG} - C_T Treshold des Zielgens

Es werden für jede Probe Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Standardabweichung bei einem C_T zwischen 17 und 25 soll 0,25 nicht überschreiten, bei einem C_T zwischen 25 und 30 0,45 nicht überschreiten und C_T über 30 nicht über 0,7 liegen. Die Daten werden anschließend in Form von Diagrammen dargestellt.

2.10.3.5 Geräte und Chemikalien

Pipetten P1-P1000	(Gilson)
Pipettenspitzen mit Filter divers	(Art, Neo Lab)
Multipipette	(Eppendorf)
DNA Engine Opticon mit Software	(MJ Research)
Vortexer	(Scientific Industrie)
Low profile strip Tubes, 8 Strip, weiß, 0,2ml	(Biozym)
8 Strip Ultra Clear Caps	(Biozym)
Galaxy Minizentrifuge	(VWR)
QuantiTect Probe PCR Kit:	(#204345, Qiagen)
MasterMix (aliquotiert auf je 2ml)	
Rnase freies Wasser	
Primer :	Validated QuantiTect Gene Expression Assay (Qiagen, USA)
	(Tabelle 11, Seite 53)

Tab. 11 Auflistung der in real-time RT-PCR untersuchten Gene und benutzten Primer. T* bedeutet modifiziertes Thymin, das an Adenin stärker bindet und erhöht die Effektivität der PCR (QuantiTect™ Gene Expression Assay Handbook, Mai 2003).

Gen	Gen ID (NCBI)	Primer Sequenzen	Probe Sequenzen	Qiagen Produkt Nr.
GAPDH	14433	Validated Genexpression Assay QuantiTect Mm_GAPD		241012
Bcl-2	12043	Validated Genexpression Assay QuantiTect Mm_BCL-2		241118
Bax	12028	Validated Genexpression Assay QuantiTect Mm_BAX		241116
Fas	14102	Validated Genexpression Assay QuantiTect Mm_Tnfsf6		241122
Fas-L	14103	Validated Genexpression Assay QuantiTect Mm_Tnfsf6-L		241194
IL-6	16193	Validated Genexpression Assay QuantiTect Mm_IL-6		241042
IL-18	16173	Validated Genexpression Assay QuantiTect Mm_IL-18		241072
CD55	13136	5'-CAGTTAAAGTTTCAGCAACCCA-3' 5'-CTGTGTTAGGCTCTCCTTTGT-3'	CCAAGACAACAGT*ACG	Custom Assay
CD59a	12509	5'-GACTCTAAGATTGCAGATTTGG-3' 5'-GAAACAGTGGTAGCATGTGAGG-3'	TGGCTGTGT*T*CTGT*T*C	Custom Assay
C1-Inh	12258	5'-AACTTAGAACTCATCAACACCT-3' 5'-GTTATCTTCCACTTGGCACTC-3'	ACACCTGCCTCGTCCT	Custom Assay

Alle Primer sind komplementär zum Exon-Exon Übergang, so dass eine eventuelle genomische DNA von der Polymerase nicht abgelesen wird.

2.10.4 DNA Gelelektrophorese

2.10.4.1 Durchführung

Trotz der Spezifität der Sonden und Primer werden PCR Produkte zusätzlich exemplarisch mittels Gelelektrophorese geprüft. Es wurde ein 3%-iges Agarosegel verwendet. 4,5 g High Resolution Agarose wird dazu in 1x TAE Puffer gelöst. Die Lösung wird in der Mikrowelle gekocht, danach abgekühlt auf 70°C und in die Elektrophorese-Apparatur gegossen. Nach Abkühlung wird die Käme ausgezogen und das Gel in eine mit Laufpuffer (1x TAE) gefüllte Elektrophoresekammer eingelegt. Anschließend werden die Proben in die Taschen eingetragen. Für jede Probe gilt es 2µl des PCR Produktes + 2µl Farbstoff + 6µl TE 1x Puffer. Ein 100bp DNA Marker wurde in eine Menge 4µl mit 2 µl Farbstoff und 4µl TE 1x eingetragen. Die Elektrophorese wird mit 90 V, 120 Minuten lang durchgeführt. Zunächst wird das Gel in eine

Kammer mit destilliertem und einer Ethidiumbromid- Lösung versetzten Wasser umgelagert und 45 Minuten gewaschen. Die Banden werden unter UV Licht photographiert.

2.10.4.2 Geräte und Chemikalien

Pipetten	(Eppendorf)
Elektrophoresekammer,	(Bio Rad)
Power Pac 200	(Bio Rad)
UV-Lampe	(Biozym, Alpha I)
Videodokumentationsanlage	(Olympus)
Mikrowelle	(Sharp)
High Resolution Agarose	(Roth)
EDTA	(Sigma)
Tris-Cl	(Roth)
Tris	(Roth)
Ethidiumbromide 10mg/ml	(Roth)
100bp DNA Marker	(Promega)
Farbstoff (loading Buffer 6x)	(0.25% Bromphenol blau, 0.25% Xylene cyanol, 30% Glycerol)
Glycerol 99,5%	(Roth)
Xylene	(Roth)
Essigsäure 100%	(Merck)
Aqua dest	

2.10.4.4 Lösungen

TAE Puffer 1x	40mM TRIS-base 40mM Eisessig 1mM EDTA pH= 8,0
TE Puffer 1x	10mM Tris-HCl pH 7,5 1mM EDTA pH= 8,0

Auftragspuffer	0,25% Bromphenol blau 0,25% Xylene cyanol 30% Glycerol
Ethidiumbromid	400µl Aqua dest 20µl Ethidiumbromid

2.11 Statistik

Die statistischen Analysen der Ergebnisse werden mittels kommerziell erhältlicher Software SPSS 9.0 für Windows erstellt. Die Differenzen in intrazerebralen Genexpressionen werden durch unpaired Student's T-Test vorgenommen. Die Normalverteilung der Werte wird mithilfe des Kolmogorov-Smirnov Tests geprüft. Die Differenzen im NSS und Gewicht werden durch wiederholte Varianzanalysen (ANOVA) bestimmt. Die statistische Auswertung der Komplementaktivitätsmessung erfolgte mittels unpaired Student's T-Test. Als statistisch signifikant wird in allen Analysen $P < 0,05$ angenommen.

3. Ergebnisse

3.1 Outcome

Insgesamt wurden 89 Tiere geopfert. Hiervon wurde 59 Tieren ein experimentelles SHT zugeführt (Placebo und mAb 1379 Gruppe). Davon starben bzw. wurden, aufgrund eines $NSS \geq 8$, 5 Tiere (8,5%) euthanasiert. Diese Fälle traten unmittelbar nach dem Trauma oder nach den ersten NSS Testungen (1h) und vor der Gabe der Medikamente ein. Diese Tiere wurden von den weiteren Analysen ausgeschlossen. In den Sham und Nil Gruppen überlebten alle Tiere. In keiner Gruppe wurden Wundheilungsstörung, Wundinfektion oder Hinweise auf Abszess bzw. eitrige Meningitis festgestellt. Das Ausbleiben der letzteren konnte bei der Hirnentnahme makroskopisch gesichert werden.

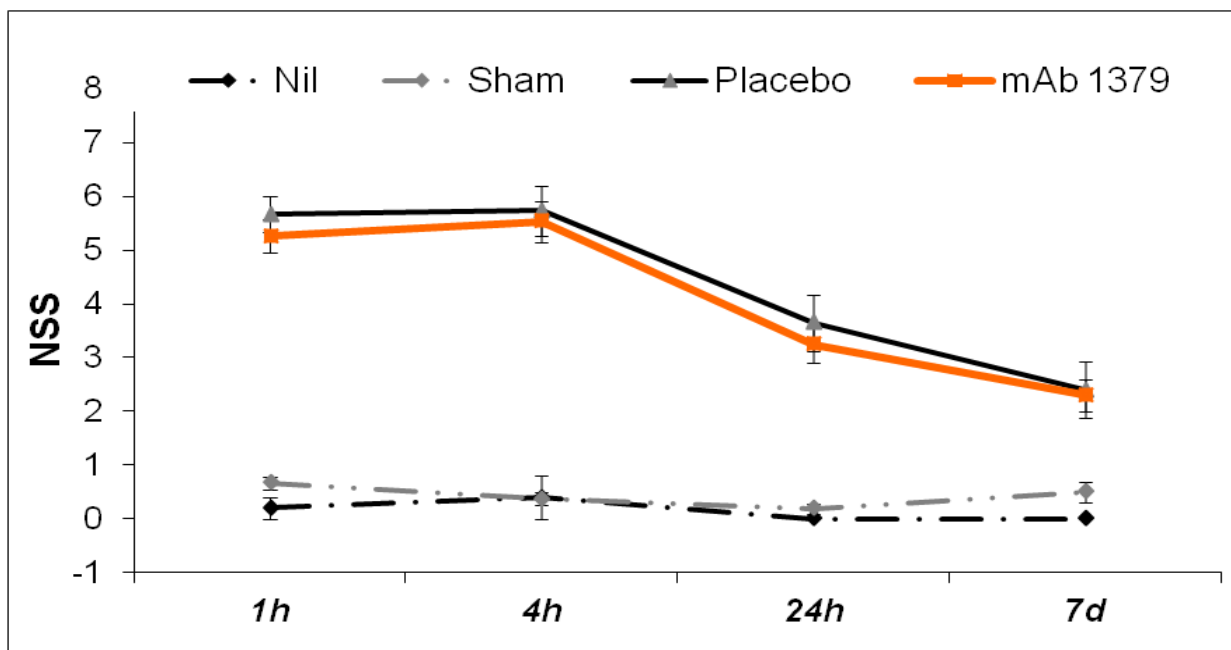


Abb. 7 Neurologische Erholung nach experimentellem SHT gemessen mittels NSS, Mittelwerte zu allen Zeitpunkten, in allen Versuchsgruppen. Verschlechterung des neurologischen Zustandes in den Placebo und mAb 1379 Gruppen gegenüber den Sham und Nil Gruppen. Die signifikanten Unterschiede blieben bis zu 7 Tage nach dem Trauma nachweisbar ($P < 0,05$, ANOVA). Zu keinem Zeitpunkt konnte der statistisch signifikante Unterschied zwischen den Placebo und mAb 1379 Gruppen gezeigt werden ($P > 0,05$, ANOVA).

Die Untersuchung der neurologischen Erholung zeigte bei den Tieren der Gruppen Nil und Sham zu allen vorgegebenen Zeitpunkten ein normales Verhalten mit einem Mittelwert zwischen 0 und 0,67 Punkten. Das NSS war bei den Tieren, denen ein SHT zugeführt wurde, im Vergleich zu den nicht traumatisierten Tieren zu allen Zeitpunkten bis Tag 7 des Experiments signifikant erhöht ($P < 0,05$).

Die NSS Mittelwerte ergaben zum Zeitpunkt 1h 5,27 (für die mAb 1379) und 5,67 für die Placebo Gruppe. Die nachfolgenden Untersuchungen zeigten eine neurologische Erholung beider Gruppen, denen ein SHT zugeführt wurde: zum Zeitpunkt 4h mit einem NSS Mittelwert von 5,53 und 5,73, zum Zeitpunkt 24h NSS Mittelwert von 3,25 und 3,65 und zum Zeitpunkt 7d mit einem NSS Mittelwert von 2,3 und 2,4 (Zeitpunkt 7d) entsprechend für die mAb 1379 Gruppe und Placebo. Der Vergleich der neurologischen Erholung, gemessen mittels NSS, zeigte zu keinem Zeitpunkt nach dem SHT signifikante Unterschiede zwischen der mAb 1379 und der Placebo Gruppe ($P > 0,05$). Die NSS Mittelwerte sowie die Gewichtsveränderungen in allen Gruppen zu allen Zeitpunkten wurden in den Abbildungen 7 und 8 illustriert.

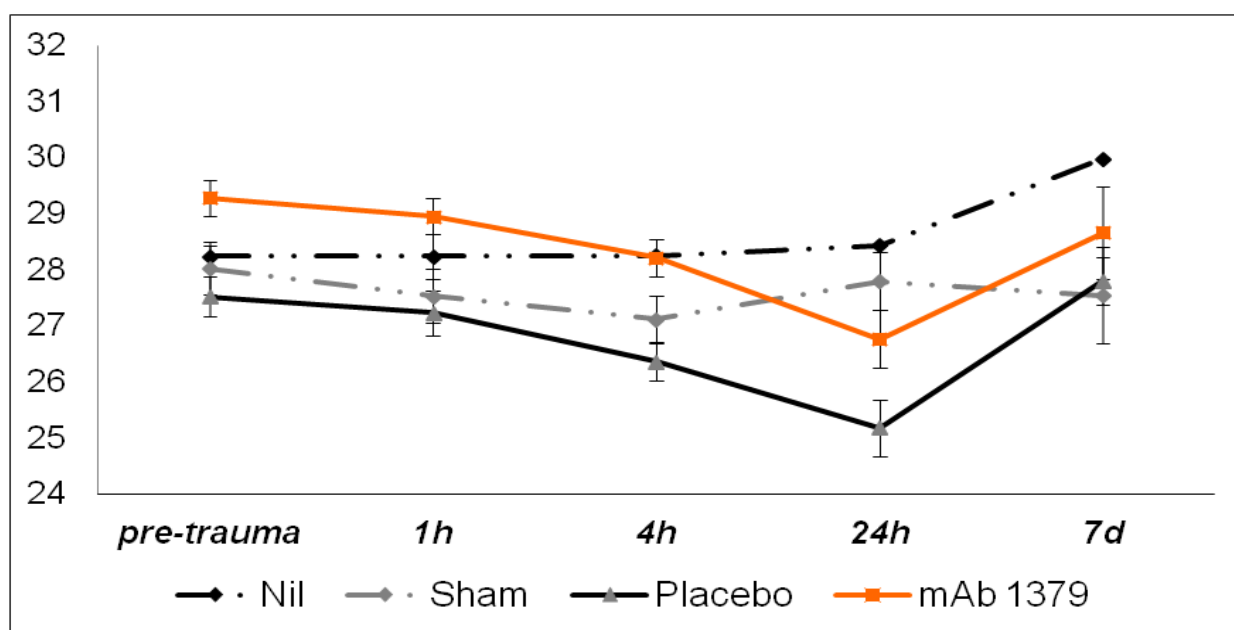


Abb. 8 Die Gewichte nach SHT in allen Versuchsgruppen. Es zeigt sich ein Abfall des Gewichtes in beiden Trauma Gruppen (Placebo, mAb 1379). Es konnten keine statistisch signifikante Unterschiede zwischen Placebo und mAb 1379 Gruppe nachgewiesen werden ($P > 0,05$, wiederholte ANOVA Messungen).

Es wurde kein nennenswerter Unterschied im Gewichtsverlust nach dem Trauma zwischen beiden Gruppen (Placebo und mAb 1379) festgestellt. Im Gegensatz zu den nicht traumatisierten Gruppen wurde bei den traumatisierten Tieren ein Gewichtsverlust von etwa 10% gemessen, der sich im weiteren Verlauf bis Tag 7 normalisierte.

3.2 Aktivität des alternativen Komplementaktivierungsweges

Die Aktivität des alternativen Komplementaktivierungsweges in Seren der Versuchstiere, die mit mAb 1379 behandelt wurden, war im Vergleich zu den Gruppen Sham und Placebo zum Zeitpunkt 4h und 24h signifikant reduziert ($P < 0,05$). Zum Zeitpunkt 7d zeigte sich keine signifikante Reduzierung dieser Aktivität ($P > 0,05$).

3.3 Zelltod /Apoptose

Die Beurteilung der intrazerebralen Apoptose nach dem SHT mittels TUNEL zeigte deutlich mehr apoptotische Zellen in den traumatisierten Tieren (Placebo und mAb 1379 Gruppe im Vergleich zu Sham Gruppe). Die Apoptose wurde im Kortex, jeweils an der Traumastelle und im ipsilateralen Hippocampus photographisch dokumentiert. Es zeigte sich, dass bei allen Tieren denen ein SHT zugeführt wurde, die apoptotischen Zellen bis zum Tag 7 nachgewiesen werden konnten. Bei den mit mAb 1379 behandelten Tieren war jedoch schon 4h nach der SHT-Zuführung die Anzahl der apoptotischen Zellen im Vergleich zur Placebo Gruppe reduziert, was auf den Abbildungen 9 und 10 (Seite 58 und 59) gut nachvollziehbar ist. Dieser Unterschied wurde sowohl an der Traumastelle im Kortex als auch im ipsilateralen Hippocampus sichtbar. Das Ausmaß der Apoptose zum 24h Zeitpunkt nahm in beiden traumatisierten Gruppen zu und der Unterschied war geringer als beim 4h Zeitpunkt. Aber auch hier wurden mehr apoptotisch veränderte Zellen in der Placebo Gruppe festgestellt. Den direkten Vergleich stellt die Abbildung 11 dar (Seite 59). Zu dem Zeitpunkt 7d hat die Zahl der apoptotischen Zellen in den beiden Versuchsgruppen deutlich abgenommen, allerdings zeichnete sich ein unverkennbarer Unterschied ab. Erneut war es die mAb 1379 Gruppe, in der deutlich weniger Apoptosen als in der Placebo Gruppe festgestellt worden sind (Abbildung 12, Seite 60).

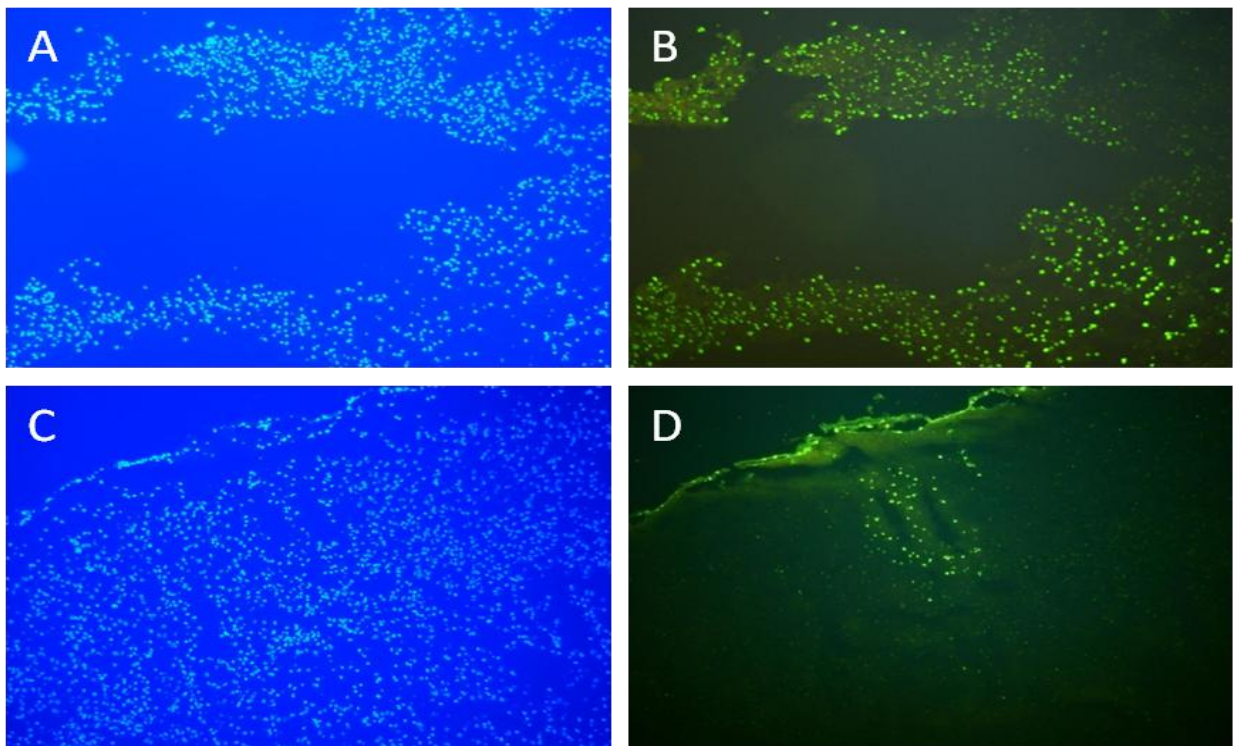


Abb. 9 Apoptose 4h nach SHT (TUNEL). Vergleich der Placebo (A, B) und mAb 1379 (C, D) Versuchsgruppen. DAPI Färbung in den Bildern A, C und TUNEL in B, D. Es zeigen sich deutlich mehr hell leuchtende, apoptotische Zellkerne in der Placebo Gruppe (B) als in der mAb 1379 Gruppe (D). Alle Bilder haben 100x Vergrößerung.

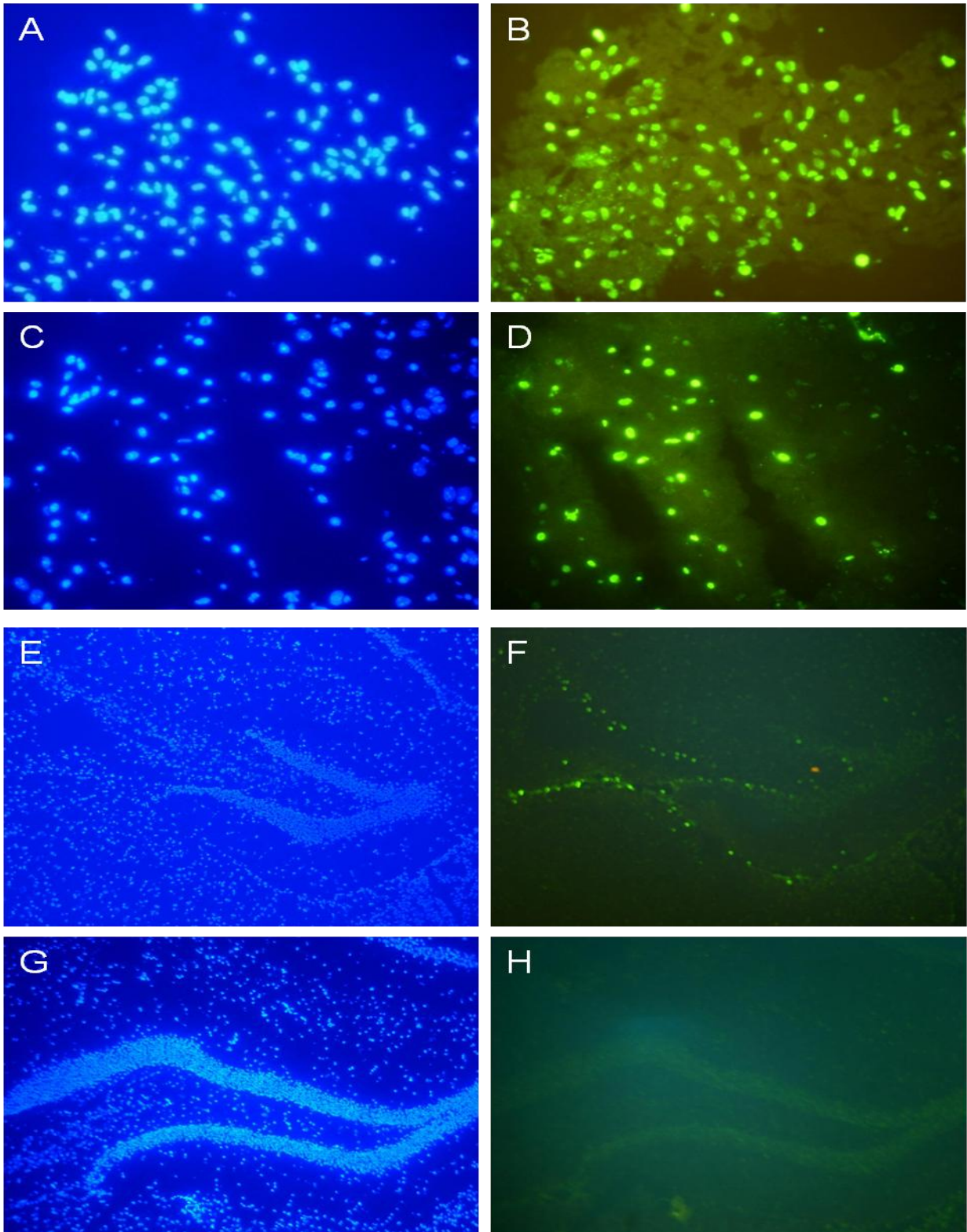


Abb. 10 Apoptose 4h nach SHT (TUNEL). Vergleich der Placebo (A, B, E, F) und mAb 1379 (C, D, G, H) Versuchsgruppen. DAPI Färbung in den Bildern A, C, E, G und TUNEL in B, D, F, H. Es zeigen sich deutlich mehr hell leuchtende, apoptotische Zellkerne in der Placebo Gruppe (B, F) als in der mAb 1379 Gruppe (D, H). Auf den Bildern A-D wird der fronto-parietale Kortex mit 400x Vergrößerung, auf E-H der Hippocampus mit 100x Vergrößerung dargestellt.

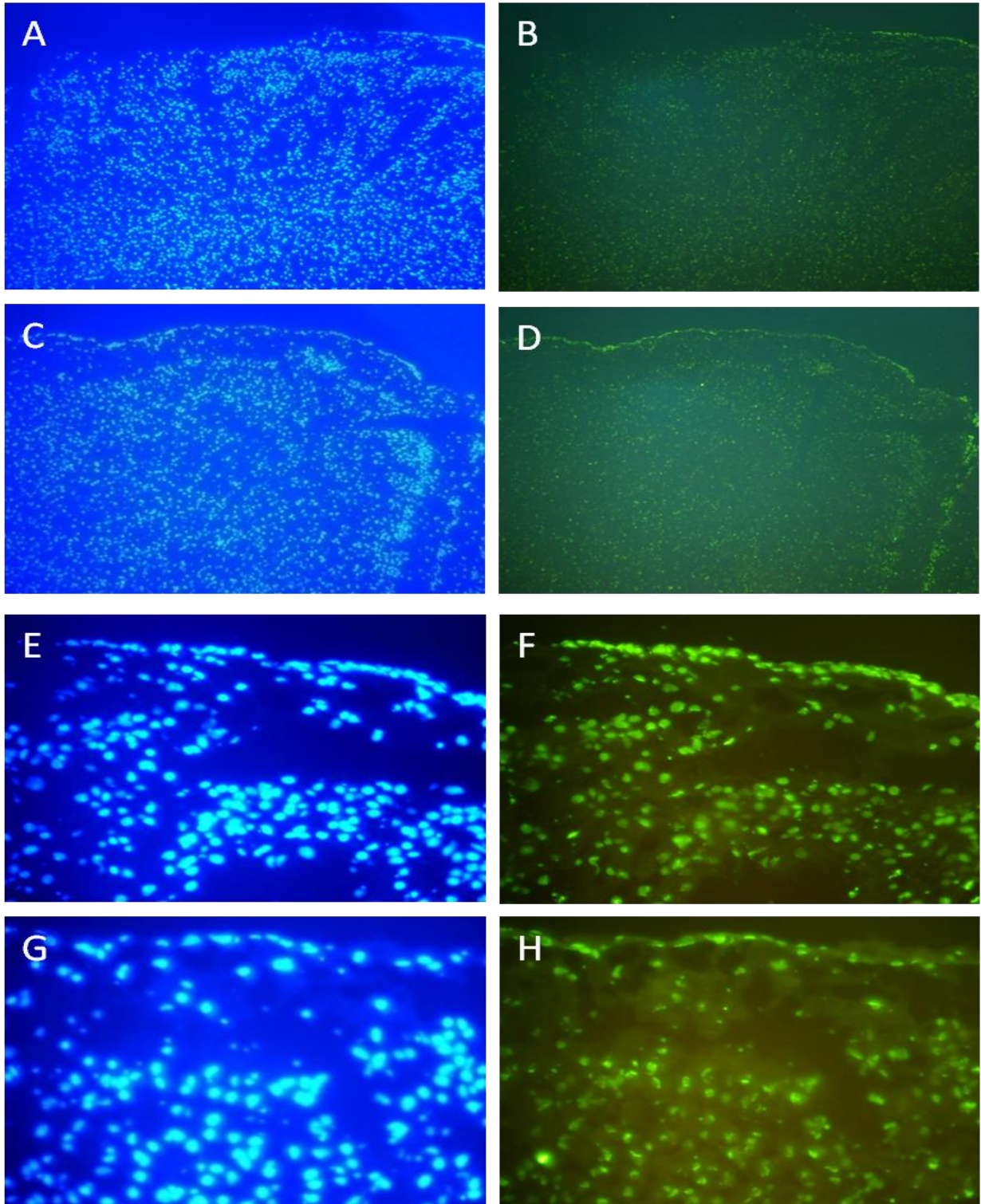


Abb. 11 Apoptose 24h nach SHT (TUNEL). Vergleich der Placebo (A, B, E, F) und mAb 1379 (C, D, G, H) Versuchsgruppen. DAPI Färbung in den Bildern A, C, E, G und TUNEL in B, D, F, H. Die Zahl der apoptotischen Zellkerne ist in der mAb 1379 etwas geringer als in der Placebo Gruppe 24 h. Der Unterschied kann besser in 400x Vergrößerung erkannt werden. Auf den Bildern A-D wird der fronto-parietale Kortex mit 100x Vergrößerung, auf E-H Kortex mit 400x Vergrößerung dargestellt.

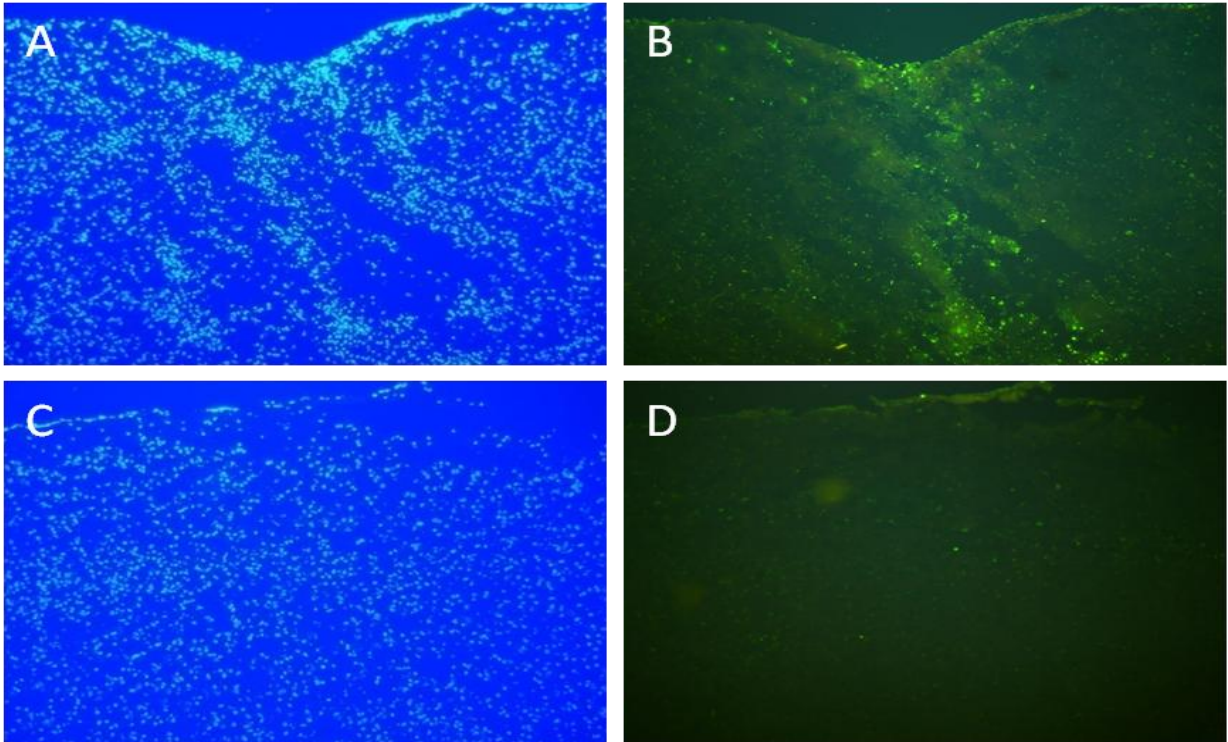


Abb. 12 Apoptose 7 Tage nach SHT in TUNEL Färbung. Gezeigt wird fronto-parietale Kortex in der Placebo Gruppe (A, B) und mAb 1379 Gruppe (C, D), wo deutlich weniger apoptotischen Zellkerne feststellbar sind. A, C- DAPI, B und D TUNEL Färbung, Vergrößerung 100x.

Durch DAPI-Färbung, zusätzliche immunhistochemische Färbungen für Neurone, Astrozyten, Mikroglia und Leukozyten sowie eine morphologische Analyse der Größe und Lage der Zellen in den entsprechenden Schnitten, wurden die Neurone als die vorwiegende Gruppe bestimmt, in der die Apoptose stattfand.

3.4 Immunhistochemie

In den Färbungen, die für Neuronkerne spezifisch sind (NeuN), zeigte sich eine eindeutige Zerstörung der Neurone, der kortikalen und subkortikalen Architektur des ZNS in beiden Gruppen mit Trauma im Vergleich zur Sham Gruppe (Abbildungen 13 und 14).

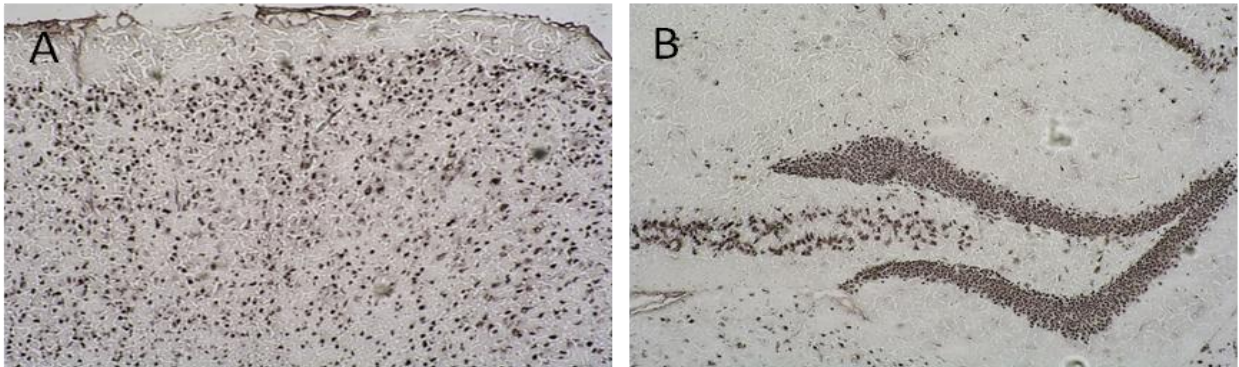


Abb. 13 Darstellung der Neurone im Kortex und Hippocampus in NeuN-Färbung zum Zeitpunkt 24h (Sham Gruppe). Es zeigt sich eine regelrechte Zytoarchitektur. Kortex, 100x Vergrößerung (A), Hippocampus, 100x Vergrößerung (B).

Eine etwas verminderte Neuronendichte konnte auch im Bereich des Hippocampus (Placebo und mAb 1379) beobachtet werden. Zum 4h Zeitpunkt war der Verlust der Neurone in der Placebo Gruppe nur minimal größer verglichen mit der mAb 1379 Gruppe. Die Beurteilung ist jedoch wegen deutlicher Gewebeerstörung erschwert.

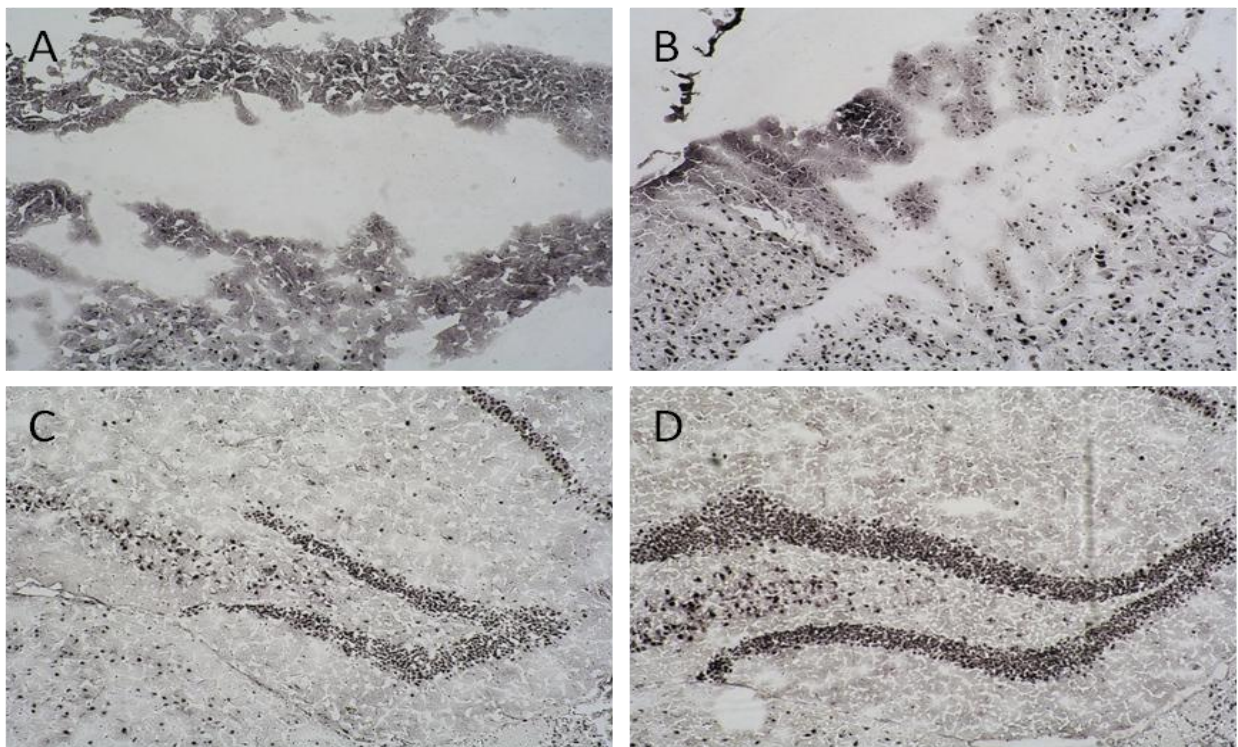


Abb. 14 Darstellung der Neurone 4h nach SHT (NeuN-Färbung). Kortex (Traumastelle) und ipsilateraler Hippocampus in der Placebo Gruppe (C), mit zerstörter subkortikaler, neuronaler Architektur (A). Im Gegensatz weisen die mit mAb 1379 behandelten Tiere (mAb 1379 4h Gruppe) ein geringeres Ausmaß der Schäden auf (B). Rarefizierung der Neuronkerne im Hippocampus der Placebo Gruppe (C) gegenüber der mAb 1379 Gruppe (D). Alle Bilder, 100x Vergrößerung.

Dieser Verlust war deutlich höher und besser erkennbar in der Placebo Gruppe als in der mAb 1379 Gruppe zu den Zeitpunkten 24h und 7d (Abbildungen 15 und 16). Die histologische Struktur des Kortex der mit mAb 1379 behandelten Tiere zeigte sich im Gegensatz zur Placebo Gruppe, wo es vermehrt zur Auflösung des Gewebes kam, ähnlich dem der Sham Gruppe und den normalen anatomischen Verhältnissen.

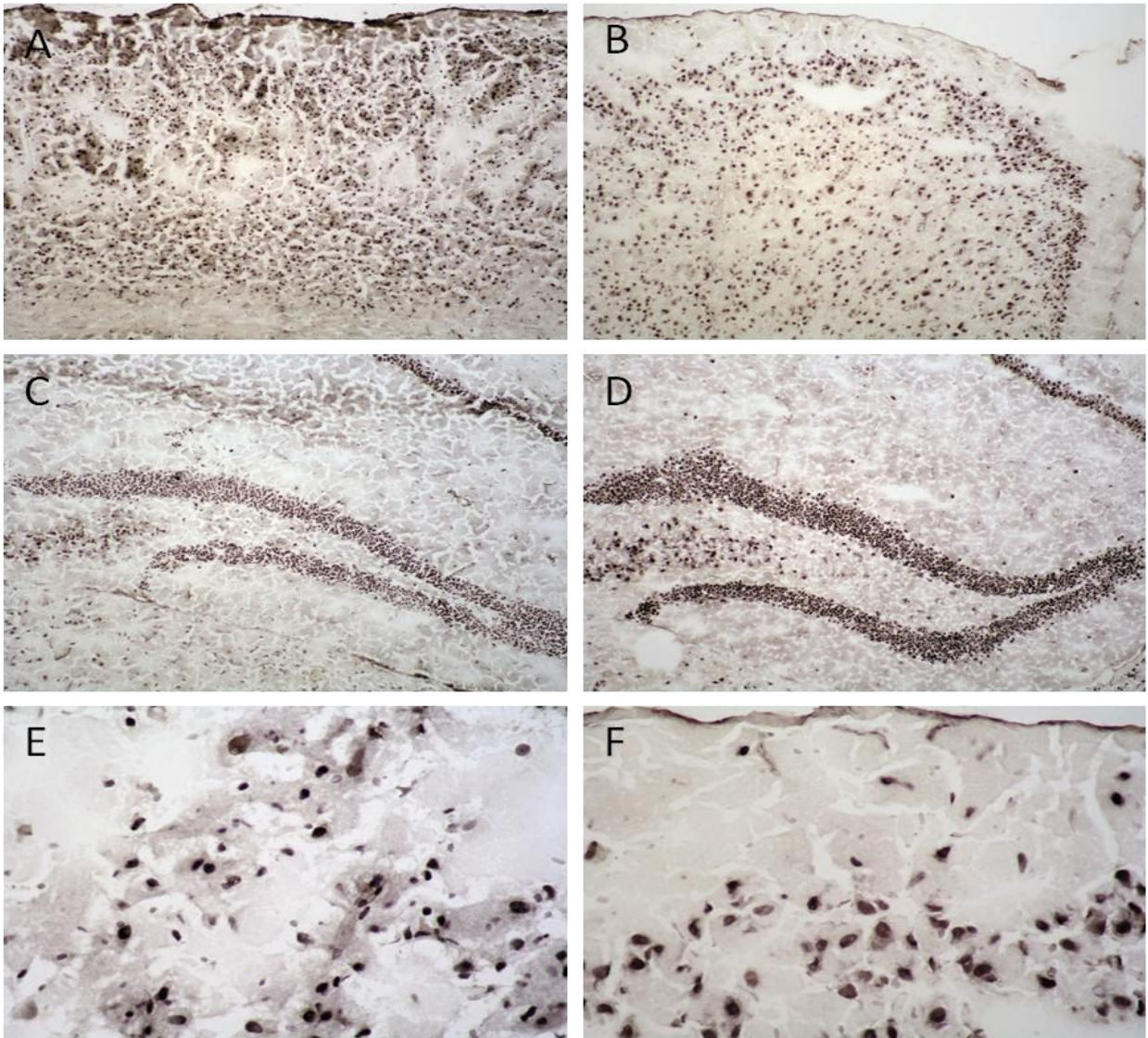


Abb. 15 NeuN-Färbung 24h nach SHT. Es zeigen sich mehr aufgelöste Gewebeverbände in der Placebo Gruppe (A) im Vergleich zur mAb 1379 Gruppe (B). Rarefizierung der Neuronkerne in der Placebo Gruppe (A, C) gegenüber der mAb 1379 Gruppe (B, D). A-D, 100x Vergrößerung. Die besser erhaltene Gewebearchitektur findet die Bestätigung in den Bildern des Kortex, 400x Vergrößerung, Placebo (E), mAb 1379 (F).

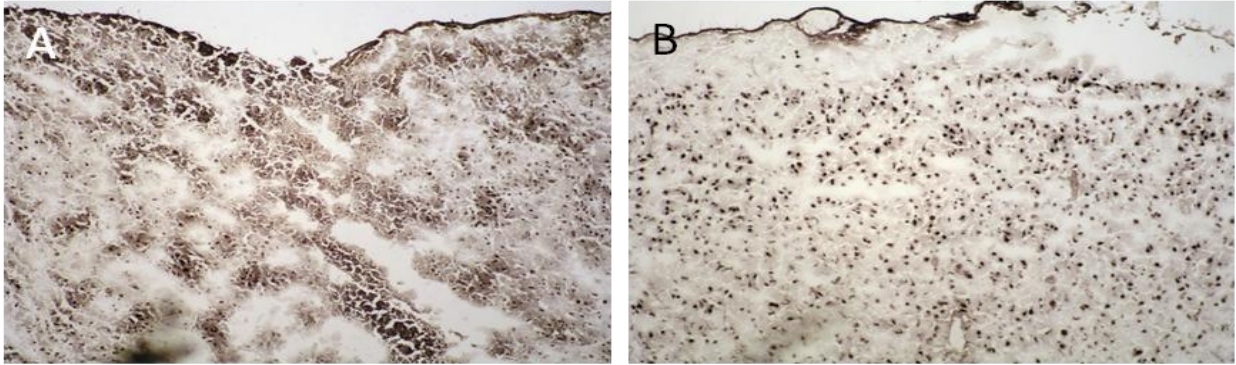


Abb. 16 NeuN-Färbung 7 Tage nach SHT. Placebo (A) gegenüber mAb 1379 (B), 100x Vergrößerung. Ähnlich wie in den früheren Zeitpunkten lässt sich hier bessere Integrität der Gewebe und etwas höhere Dichte der Neuronkerne in der mit mAb 1379 behandelten Gruppe erkennen (B).

Die spezifische Färbung gegen Gliazellen Antigen (GFAP) zeigte eine vergleichbare Dichte der Astrozyten in allen Gruppen zu den 4h und 24h Zeitpunkten (Abbildung 17). Auffallend waren wieder die morphologischen Veränderungen in den SHT Gruppen, wobei die Placebo Gruppe eine größere Ausprägung der Schäden aufwies.

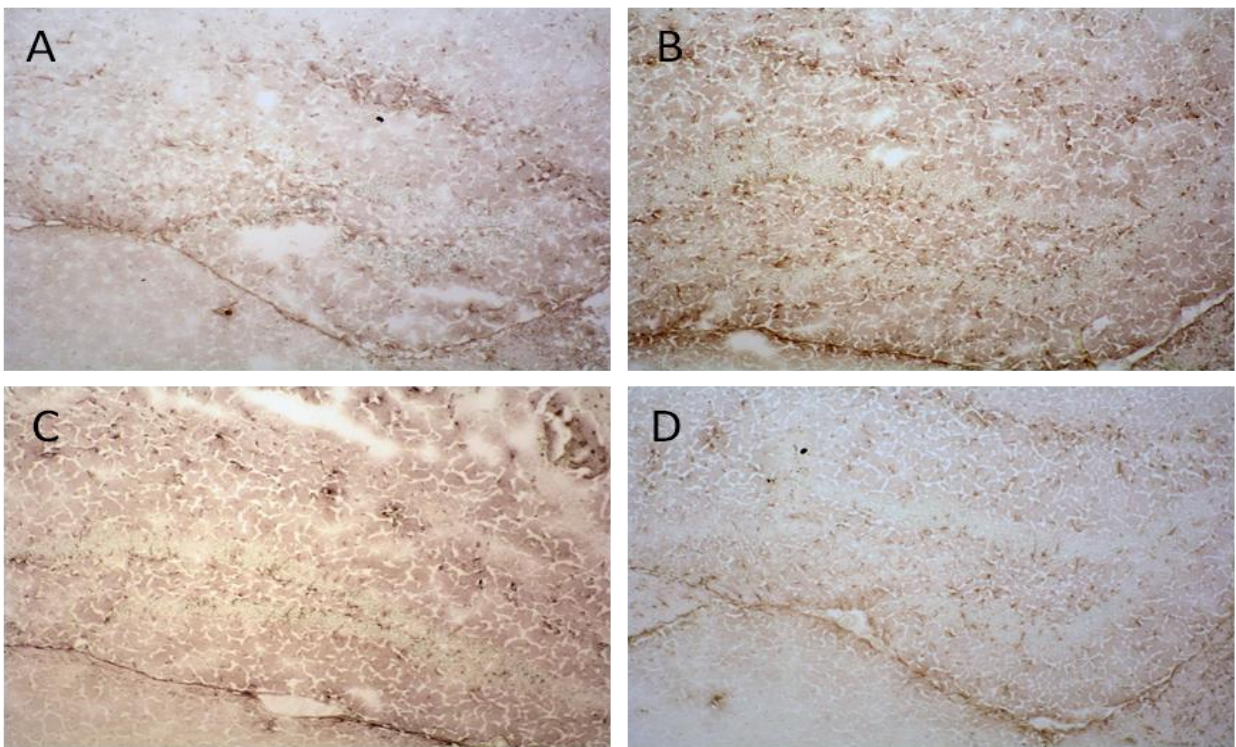


Abb. 17 Gliazellen spezifische Färbung, Zeitpunkt 4h, 24h (GFAP). Entsprechend Placebo 4h und 24h nach Trauma (A und C), mAb 1379 Gruppe 4h und 24h nach Trauma (B, D). Die Gewebeauflockerung ist in der Placebo Gruppe etwas ausgeprägter (A, C) als in mAb 1379 (B, D). Sichtbar ist eine vergleichbare Anzahl von Gliazellen in der Placebo und mAb 1379 Gruppen zu beiden Zeitpunkten. 100x Vergrößerung.

Mit der Färbung gegen CD11b wurde die Infiltration des ZNS durch Leukozyten nachgewiesen. Die SHT Gruppen unterschieden sich wesentlich von der Sham Gruppe, bei der nur vereinzelt Leukozyten sichtbar waren. Die Menge der infiltrierenden Leukozyten war zum Zeitpunkt 4h in der mAb 1379 Gruppe nur minimal kleiner als in der Placebo Gruppe (Abbildung 18).

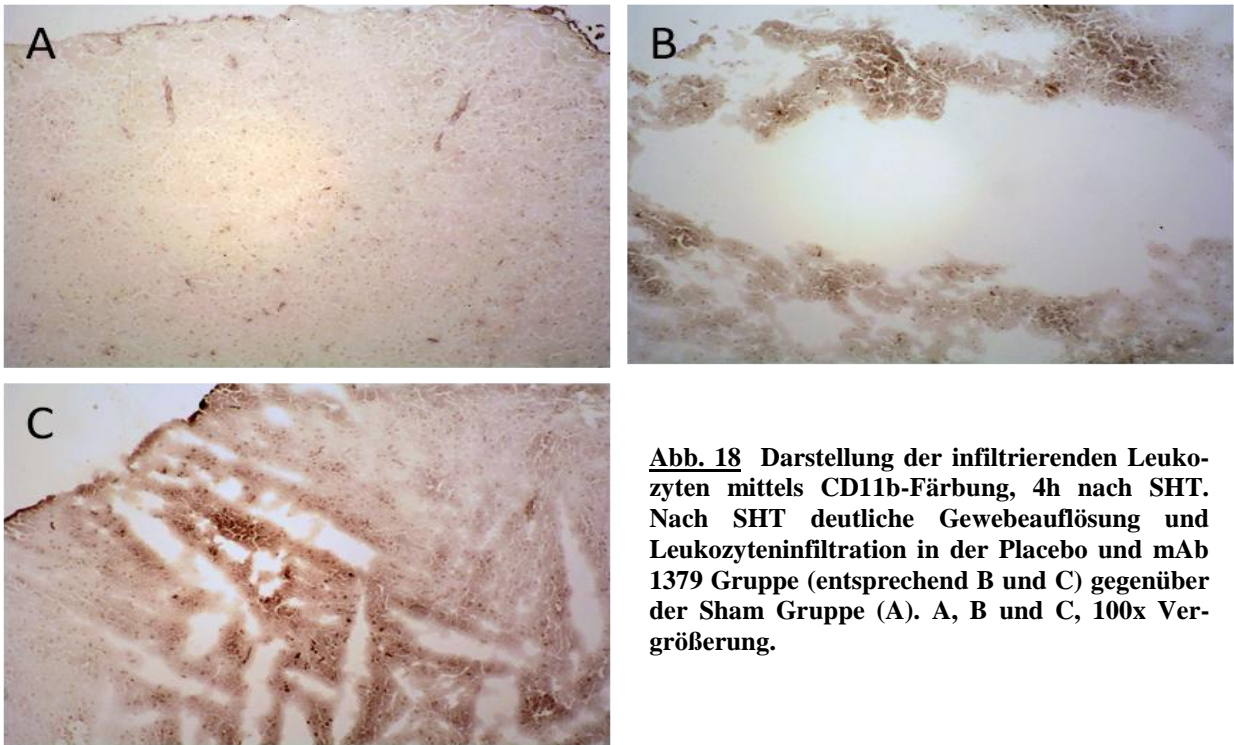


Abb. 18 Darstellung der infiltrierenden Leukozyten mittels CD11b-Färbung, 4h nach SHT. Nach SHT deutliche Gewebeauflösung und Leukozyteninfiltration in der Placebo und mAb 1379 Gruppe (entsprechend B und C) gegenüber der Sham Gruppe (A). A, B und C, 100x Vergrößerung.

Zu den Zeitpunkten 24h und 7 Tage war die Zahl der CD11b positiven Zellen in der Umgebung der Traumastelle in der mAb 1379 Gruppe gegenüber der Placebo Gruppe erheblich reduziert (Abbildung 19 und 20).

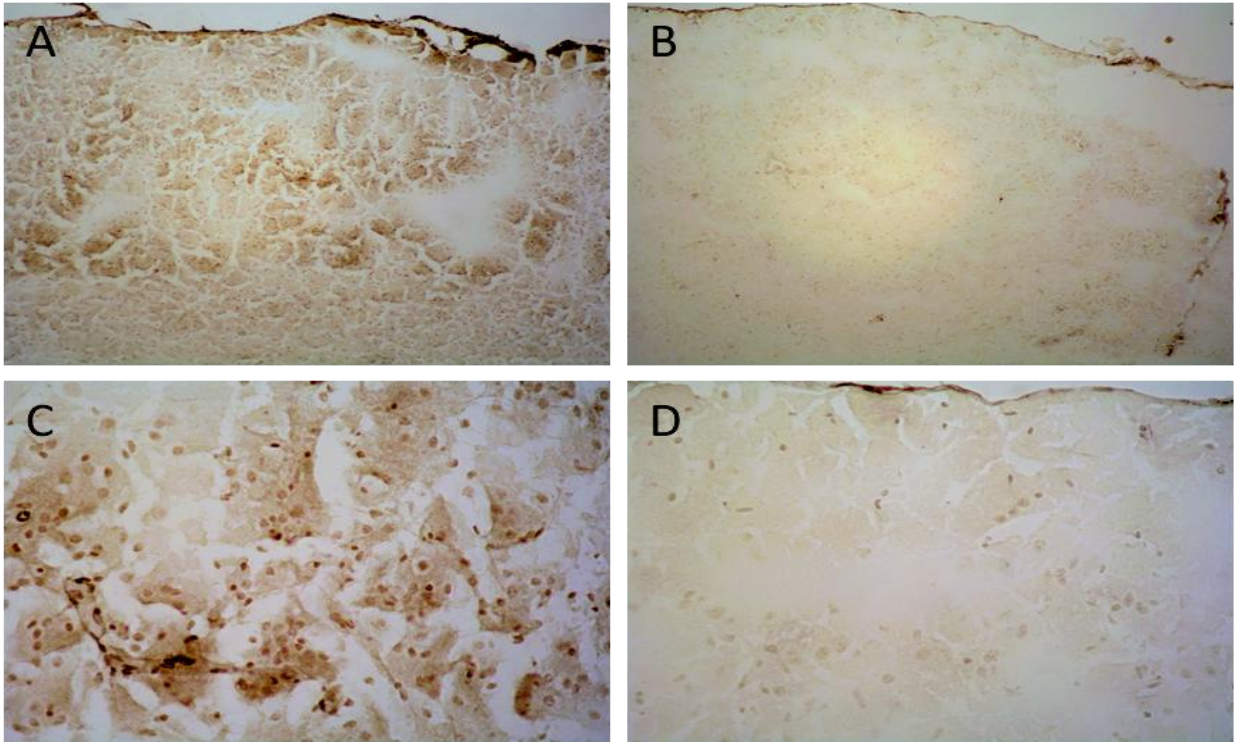


Abb. 19 Leukozyteninfiltration 24h nach SHT (CD11b-Färbung). Ausgeprägtere Infiltration der Hirngewebe durch Leukozyten in der Placebo Gruppe (A, C) gegenüber der mAb 1379 Gruppe (B, D). 100x Vergrößerung (A, B) und 400x (C, D).

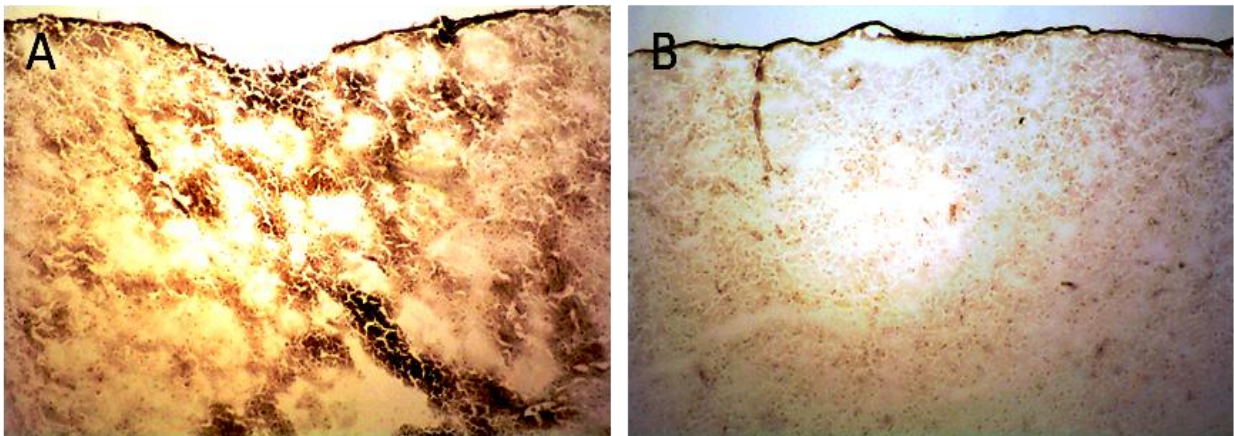


Abb. 20 CD 11b-Färbung 7 Tage nach SHT. Deutliche Infiltration durch Leukozyten in der Placebo Gruppe (A), eine relativ geringe Anzahl angefärbter Leukozyten in der mAb 1379 Gruppe (B). 100x Vergrößerung.

3.5 Real-time RT-PCR

3.5.1 Expression der Apoptose regulierenden Proteine

Die Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 wurde in der mAb 1379 Gruppe gegenüber den Nil, Sham und Placebo Gruppen signifikant hochreguliert ($P < 0,05$). Diese Regulation trat zu allen Zeitpunkten auf. Bcl-2 zeigte eine Tendenz zur erhöhten Expression in der Sham und Placebo Gruppe, und zwar ebenfalls zu allen Zeitpunkten. Zum 7d Zeitpunkt konnte in der Placebo Gruppe eine signifikante Hochregulation von Bcl-2 gegenüber der Sham Gruppe dokumentiert werden. Zu diesem Zeitpunkt war die Expression im Vergleich zur mAb 1379 Gruppe jedoch weiterhin signifikant niedriger ($P < 0,05$). Die Expression des Bax Genes war etwas erhöht in den Sham, Placebo und mAb 1379 Gruppen, ohne signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu allen drei Zeitpunkten.

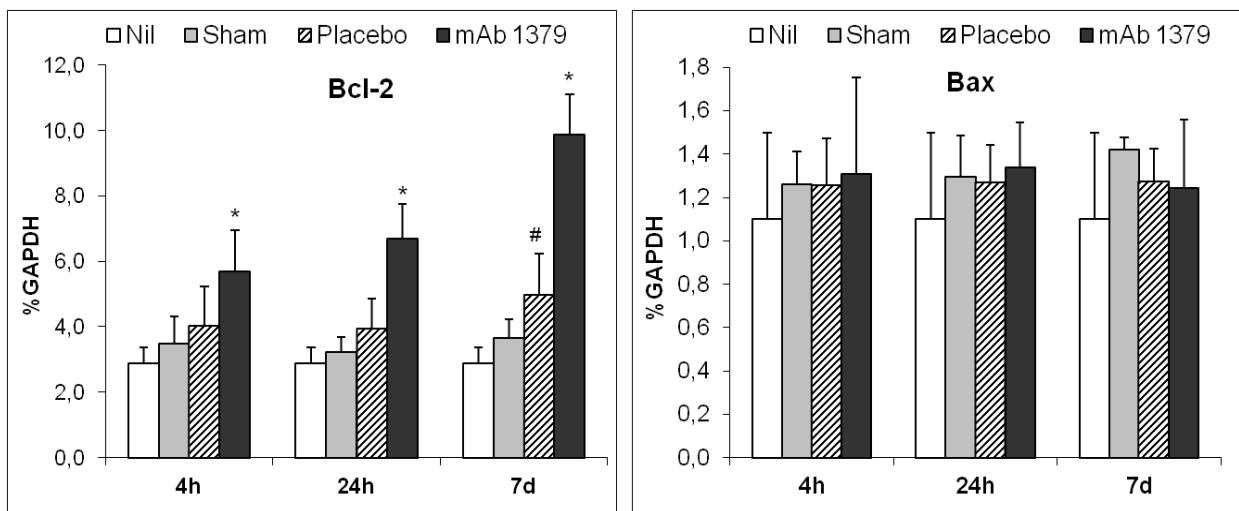


Abb. 21 Relative Expression der Apoptose-regulierenden Proteine Bcl-2 und Bax in real-time RT-PCR zu 4h, 24h und 7d nach SHT. Die Anzahl der Versuchstiere beträgt $n=3$ für Nil und $n=6$ für Sham, Placebo und mAb 1379 Gruppen, pro Zeitpunkt. * $P < 0,05$ für mAb 1379 gegenüber Placebo, # $P < 0,05$ für Placebo gegenüber Sham und Nil (unpaired Student's T-Test).

Eine andere Kinetik der Regulation wurde für Fas und Fas-L beobachtet. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 14 dargestellt. Fas wurde 4h nach SHT signifikant hochreguliert in den Placebo und mAb 1379 Gruppen gegenüber den Nil und Sham Gruppen ($P < 0,05$). Zwischen den beiden SHT Gruppen konnte jedoch kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Zum 24h Zeitpunkt wurde Fas in der mAb 1379 Gruppe gegenüber der Placebo Gruppe signifikant niedriger exprimiert und entsprach etwa der Sham Gruppe. Am Tag 7 war die Expression von Fas in der Placebo Gruppe weiterhin höher, diesmal aber nicht signifikant. Die Expression von Fas-L war in beiden SHT Gruppen (Placebo und mAb 1379) auf ähnlichem Niveau und signifikant höher als in den Nil und Sham Gruppen zum 4h Zeitpunkt. Fas-L wurde signifikant höher in der mAb Gruppe zum Zeitpunkt 24h und 7d als in der Placebo Gruppe exprimiert ($P < 0,05$).

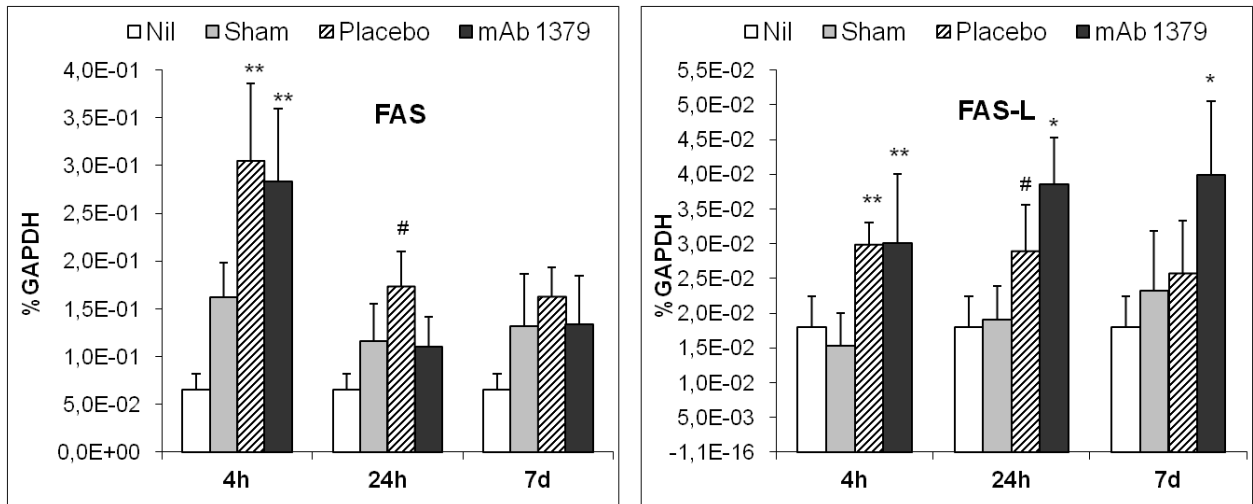


Abb. 22 Relative Expression der Apoptose-regulierenden Proteine Fas, Fas-L in real-time RT-PCR zu 4h, 24h und 7d nach SHT. Die Anzahl der Versuchstiere beträgt n=3 für Nil und n=6 für Sham, Placebo und mAb 1379 Gruppen, pro Zeitpunkt. * P < 0,05 für mAb 1379 gegenüber Placebo, # P < 0,05 für Placebo gegenüber mAb 1379 und Sham, ** P < 0,05 für Placebo und mAb 1379 gegenüber Sham, Fas war in der Nil Gruppe im Vergleich zu den restlichen Versuchsgruppen zu allen Zeitpunkten signifikant niedriger exprimiert (unpaired Student's T-Test). "E-02" bedeutet: x0,01, x0,1 für "-01" oder x0,001 für "-03".

3.5.2 Expression der Komplement-regulierenden Moleküle

Die Transkription des protektiven C₁-Inh Genes war bei den mit mAb 1379 behandelten Tieren gegenüber den Placebo, Sham und Nil Gruppen zum Zeitpunkt 4 h (P < 0,05) signifikant erhöht. Diese Regulation hielt zum 24h Zeitpunkt gegenüber der Sham Gruppe und zum 7d Zeitpunkt gegenüber allen Gruppen an. Die Expression von C₁-Inh in den mAb 1379 und Placebo Gruppen war zum 24h Zeitpunkt in beiden Gruppen ähnlich, jedoch gegenüber der Sham Gruppe signifikant höher. Sieben Tage nach dem Trauma wurde die C₁-Inh in der Placebo Gruppe signifikant höher als in der Sham Gruppe exprimiert (Abbildung 23).

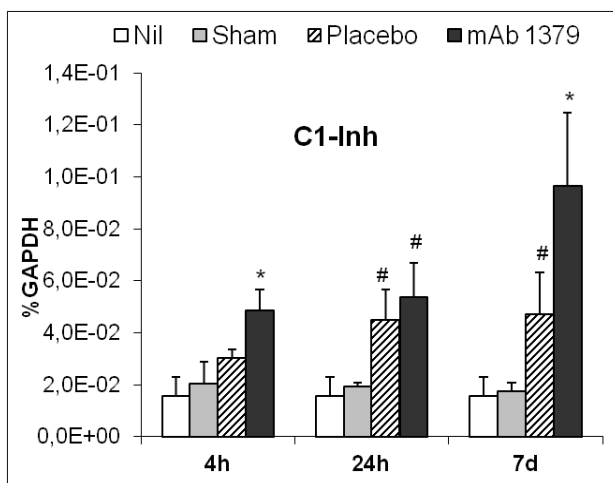


Abb. 23 Relative Expression von C₁-Inh in real-time RT-PCR zu 4h, 24h und 7 Tage nach SHT. Die Anzahl der Versuchstiere beträgt n=3 für Nil und n=6 für Sham, Placebo und mAb 1379 Gruppen, pro Zeitpunkt. * P < 0,05 für mAb 1379 Gruppe gegenüber allen Versuchsgruppen, # P < 0,05 für mAb 1379 und/oder Placebo Gruppe gegenüber Sham und Nil (unpaired Student's T-Test). "E-02" bedeutet: x0,01, für "E-01" x0,1.

Bei der Expression der CD55 und CD59 zeigten sich signifikant erhöhte Werte in den Sham, Placebo und mAb 1379 Gruppen gegenüber Nil, und zwar zu allen Zeitpunkten, mit Ausnahme von CD59, 24h und 7 Tage nach dem Trauma. Das Protein war tendenziell höher in der Placebo Gruppe 4h nach dem Trauma im Vergleich zu Sham und mAb 1379 Gruppen exprimiert. Zum Zeitpunkt 24h wurde eine statistisch signifikante Verstärkung der Expression von CD59 in der mAb 1379 Gruppe im Vergleich zu anderen Versuchsgruppen beobachtet (Abbildung 24).

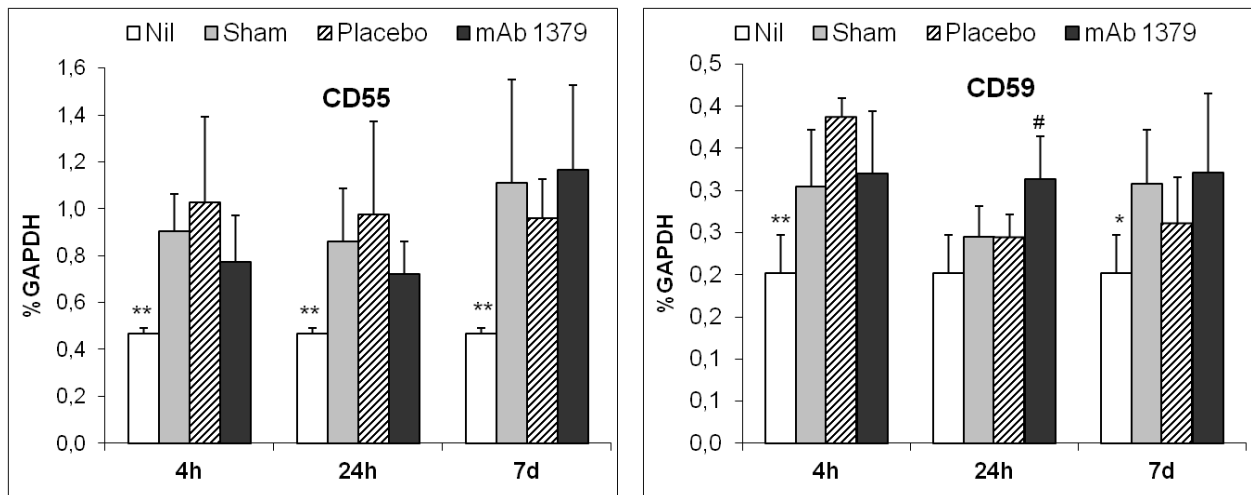


Abb. 24 Relative Expression der Komplement-regulierenden Proteine CD55, CD59a in real-time RT-PCR zu 4h, 24h und 7 Tage nach SHT. Die Anzahl der Versuchstiere beträgt n=3 für Nil und n=6 für Sham, Placebo und mAb 1379 Gruppen, pro Zeitpunkt. * P< 0,05 für Nil Gruppe gegenüber Sham und mAb 1379, # P< 0,05 für mAb 1379 Gruppe gegenüber Sham und Placebo, ** P< 0,05 für Nil gegenüber restlichen Gruppen (unpaired Student's T-Test).

3.5.3 Expression der Zytokine

IL-6 wies bereits 4h nach dem Trauma einen deutlichen, signifikanten Anstieg der Expression in den Placebo und mAb 1379 Gruppen gegenüber den Nil und Sham Gruppen auf. Es hat sich eine Tendenz zur erhöhten Expression von IL-6 in der mAb 1379 Gruppe gegenüber Placebo gezeigt ($P > 0,05$). Die Faktor B Blockade bewirkte eine signifikante, positive Regulation zu den Zeitpunkten 24h und 7d gegenüber allen anderen Versuchsgruppen ($P < 0,05$). Ein ebenfalls signifikanter Expressionsanstieg der IL-6 zu den 4h, 24h, und 7d Zeitpunkten wurde in der Placebo und Sham Gruppe gegenüber der Nil Gruppe festgestellt ($P < 0,05$).

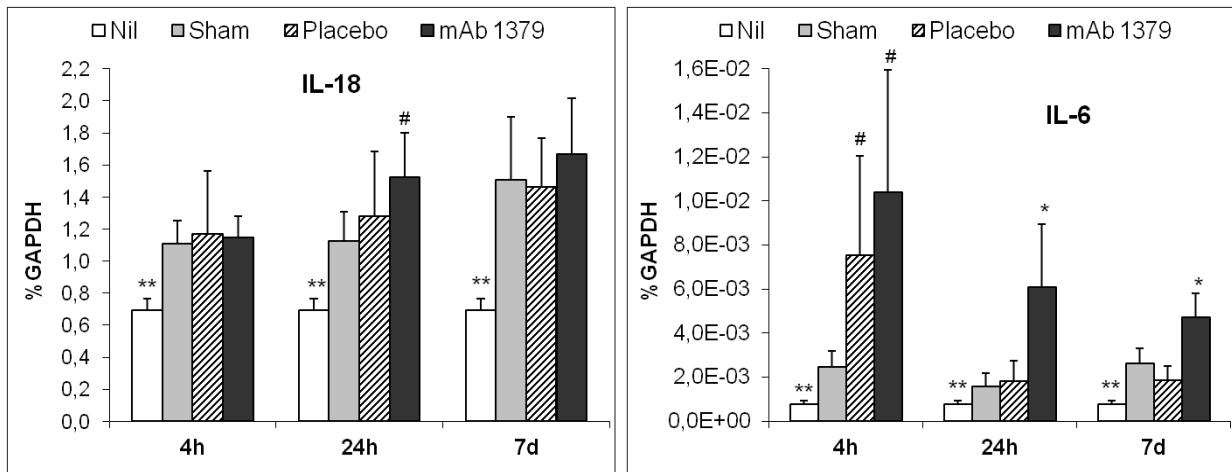


Abb. 25 Relative Genexpression von IL-18 und IL-6 nach experimentellem SHT in real-time RT-PCR zu den 4h, 24h und 7d Zeitpunkten. Die Anzahl der Versuchstiere beträgt n=3 für Nil und n=6 für Sham, Placebo und mAb1379 Gruppen, pro Zeitpunkt. * P< 0,05 für mAb 1379 Versuchsgruppe gegenüber Placebo, # P< 0,05 für Placebo und/oder mAb 1379 gegenüber Sham Gruppe, ** P< 0,05 für Nil Gruppe gegenüber Sham, Placebo und mAb 1379 (unpaired student's T-Test). "E-02" bedeutet: x0,01 oder x0,001 für "E-03".

Die Transkription des IL-18 war zu allen Zeitpunkten in den Sham-, Placebo- und mAb 1379-Gruppen gegenüber der Nil Gruppe signifikant erhöht (P< 0,05). Zum 24h Zeitpunkt zeigte sich in der mAb 1379 Gruppe ein signifikanter Anstieg der Expression von IL-18 im Vergleich zur Sham Gruppe (P< 0,05). Dieser Anstieg war jedoch nicht signifikant, wenn er mit der Placebo Gruppe verglichen wurde. In der Placebo Gruppe zeigte sich eine Tendenz zur erhöhten Expression gegenüber der Sham Gruppe. Die real-time RT-PCR-Daten zur relativen Expression der Interleukine stellt die Abbildung 25 dar.

4.Diskussion

Die Komplexität der pathologischen Erscheinungen nach einem SHT verhindert zurzeit eine erfolgreiche Therapie. Wir verfügen über keine pharmakologischen Mittel, die sich in klinischen Studien als wirkungsvoll durchgesetzt haben [97]. Die durch ein SHT und seine Begleitverletzungen hervorgerufene Hypoxie, Hypotension, BHS-Störung, Blutungen und axonale Schäden ziehen sekundäre inflammatorische Vorgänge, die Mortalität und schwere Behinderungen zu Folge haben, nach sich [3, 15, 16]. Im Verlauf der sekundären Neuroinflammation nach einem SHT bleibt, neben anderen Faktoren, die Rolle der Komplementaktivierung unumstritten. Die Komplementkaskade verstärkt fast alle pathologischen Vorgänge im verletzten Hirn [15-17, 45]. Die experimentellen SHT-Modelle und Versuche das Komplement zu blockieren brachten Hinweise darauf, dass eine pharmakologische Komplementblockade wirksam sein kann. Der Einsatz von sCR1 und die Blockade von C_{5a} waren mit einer verringerten Infiltration des ZNS durch Leukozyten nach dem Trauma verbunden [60, 120]. Die Blockierung aller Komplementaktivierungswege mit VCP oder mit Crry tragendem Antikörper korrelierte mit einem verbesserten neurologischen Outcome bei Mäusen [62, 65, 120, 121]. Die Entdeckung des entscheidenden Beitrags des alternativen Komplementaktivierungsweges zu den pathologischen Vorgängen in der Niere nach Ischämie/Reperfusionstrauma, bei Lupus Nephritis oder Asthma und die letzten durchgeführten SHT Versuche mit Faktor B defizienten Mäusen waren ermunternd zum Einsatz des mAb 1379 im experimentellen SHT Modell [44, 112-114].

Angesichts der Berichte über partielle protektive Wirkungen des Komplements nach SHT scheint die Paninhibition nicht optimal zu sein [36, 46, 122]. Es besteht eine Notwendigkeit für die gezielte und ausgewogene Regulation um ein gutes Ergebnis zu erzielen. Die Immunsuppression mit Kortikosteroiden zeigte keine erwartete Verbesserung der neurologischen Prognose. Im Gegenteil, sie hatte sogar den Anstieg der Mortalität zu Folge. Die CRASH-Studie unterstützte die wissenschaftlichen Daten über die protektive Wirkung des Immunsystems und bekräftigte die Frage nach der Einengung der Zieltherapie zu den entscheidenden Teilen der immunologischen Antwort nach dem SHT [111]. Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des klinischen Zustandes und der neurologischen Erholung nach experimentellem SHT in Mäusen, die mit einem neuen, selektiven Blocker des alternativen Komplementaktivierungsweges, Antikörper gegen Faktor B, mAb 1379 behandelt wurden.

Durch die Untersuchung der Seren der C57BL/6 Tiere, die dem Experiment unterzogen wurden, mittels Zymosan Assay konnte eine signifikante Reduktion der Aktivität des alternativen Komplementaktivierungsweges in den mit mAb 1379 behandelten Tieren gegenüber den Sham und Placebo Gruppen nachgewiesen werden. Diese Reduktion war kennzeichnenderweise jedoch nur signifikant zu den 4h und 24h Zeitpunkten und nicht zum 7d Zeitpunkt. Der Crry tragende Antikörper, der C₃ blockiert, erwirkte einen längeren Effekt [65]. Die Blockade des alternativen Komplementaktivierungsweges mit mAb 1379 stimmt mit dem signifikanten Abfall des C_{5a} Serumspiegels nach einem SHT überein und bestätigt die erwartete Wirkung des Antikörpers. Das Ausbleiben des klinischen Effektes könnte durch die nicht ausreichende Aktivitätsblockade des alternativen Komplementaktivierungsweges am Tag 7 oder einen möglichen kompensatorischen Anstieg der Faktor B Synthese in der subakuten Phase hervorgerufen worden sein [123].

Die pharmakologische Blockade des alternativen Komplementaktivierungsweges ergab keine Verbesserung des neurologischen Zustandes, getestet mittels NSS, 4h, 24h und 7 Tage nach dem Trauma. Trotz der deutlich verminderten Apoptoserate und Zerstörung der ZNS-Strukturen, die mittels immunhistochemischen Methoden nachgewiesen wurden, konnte der Erfolg der Blockade der C₃-Konvertase mit Crry tragendem Antikörper nicht wiederholt werden. Die Inhibition des Faktors B nach i.p. Gabe von mAb 1379 blieb für mindestens 48h erhalten. Die Kontrolle der Aktivität des alternativen Komplementaktivierungsweges in Seren der behandelten Mäusen zeigte, dass die ausreichende Inhibition für den 7 Tage Zeitpunkt nicht gewährleistet war. Dies kann den ausgebliebenen Erfolg bezüglich des neurologischen Outcomes erklären. Die Applikation von 1 mg des mAb 1379 täglich oder jeden zweiten Tag bis zum Tag 7 scheint aufgrund der hier präsentierten Daten sinnvoll. Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass das Zeitfenster für dieses Modell, in dem die BHS offen bleibt, zwischen 1 und 24 Stunden liegt [115, 124]. Aus diesem Grund könnte auch eine zweimalige Gabe von 2 mg mAb 1379 in zukünftigen Studien erwogen werden. Eine andere Ursache für das Ausbleiben der verbesserten neurologischen Erholung kann die Testmethode NSS sein. Obwohl dieser Test in SHT Experimenten etabliert ist, erscheint es wahrscheinlich, dass die kognitiven und komplexen neurologischen Defizite mit ihm nicht erfasst werden können [115, 124]. Bei deutlich verminderter neuronaler Apoptose nach Behandlung mit mAb 1379 ist es denkbar ein besseres neurologisches Outcome zu erreichen. Es wäre sicherlich sinnvoll die Testung des neurologischen Outcome zu einem späteren Zeitpunkt nach dem Trauma durchzuführen, da die chronische Phase der Neuroinflammation nach SHT bei Mäusen länger als 20 Tage dauert und ebenfalls Einfluss auf das Outcome haben kann [83]. Die

gezielte Blockade des alternativen Komplementaktivierungsweges kann letztendlich eine kompensatorische entzündliche Reaktion auslösen, und zwar die Freisetzung von Zytokinen wie $\text{TNF}\alpha$, IL-18, IL-1 β oder IL-6 [17, 84]. Die vermehrte Expression von IL-6 bei den Tieren die mit mAb 1379 behandelt wurden, würde diese Hypothese zum Teil bestätigen. Darüber hinaus gilt IL-6 als Zytokin, das die Expression der Komplementproteine in der Leber stimuliert [16, 125]. Eine negative Rückkopplung zwischen Faktor B oder der Aktivierung des alternativen Armes des Komplements und der IL-6 Produktion könnte vorstellbar sein. Sie muss jedoch vorsichtig interpretiert und auf jeden Fall durch weitere Experimente sowie andere zum Nachweis der Proteine bestimmte Methoden (Western Blot, ELISA) untersucht werden.

Die Analyse der TUNEL-Daten führt zu einem sehr eindrucksvollen Nachweis verminderter Apoptose nach experimentellem SHT in der mAb1379 Gruppe gegenüber Sham und Placebo. Der klare protektive Effekt der Blockade des Faktors B konnte zu allen drei Untersuchungszeitpunkten gezeigt werden (siehe Abbildungen 9 – 12). Dieses Ergebnis wurde durch die Experimente an Faktor B defizienten Mäusen unterstrichen [69].

Die Daten aus der intrazerebralen Expression von Bcl-2 und Bax bestätigten frühere Versuche [91, 92, 94]. Traumatisierte Tiere zeigten einen Anstieg der Expression von Bcl-2. Die Bax-Transkription war nicht wesentlich verändert. Ein leichter, nicht signifikanter Anstieg wurde bei den SHT und Sham Gruppen beobachtet. Die Versuche der anderen Forschungsgruppen haben mittels Hybridization in situ gezeigt, dass in den apoptotischen Zellen der Quotient Bax/Bcl-2 zugunsten Bax verschoben war [91, 92]. Die Annahme, dass die erwähnte Verschiebung zur Apoptose führt und das Wissen über vermehrte Bcl-2 Expression in überlebenden Zellen im Gehirn nach SHT erklären die Ergebnisse dieser Studie, sodass die RNA nicht nur von der Traumastelle sondern von ganzen Hemisphäre isoliert wurde. Die Überexpression des Bcl-2 in den nicht-apoptotischen Zellen kann möglicherweise die Unterregulation in betroffenen Bereichen überdecken. In der mAb 1379 Gruppe wurde die Expression von Bcl-2 signifikant gegenüber der Placebo Gruppe hochreguliert. Dies galt für alle Untersuchungszeitpunkte. Dieses Ergebnis bringt einen Hinweis auf eine mögliche Regulation der Bcl-2-Transkription durch den alternativen Komplementaktivierungsweg. Die Frage, ob es zu einer möglichen direkten oder indirekten Regulation kommt und ob ein bestimmtes Element der Komplementkaskade dafür verantwortlich ist, kann derzeit nicht beantwortet werden. Darüber hinaus wird die Hypothese, dass der alternative Komplementaktivierungsweg eine Rolle bei der Regulation von Bcl-2 spielt, durch die Experimente mit C_3 -Konvertase Blockierung mithilfe von Crry tragendem Antikörper bekräf-

tigt [65]. Mit Crry werden sowohl die alternative als auch die klassische Konvertase inhibiert. Crry tragender Antikörper bewirkt signifikante Hochregulation des Bcl-2 zum 4h Zeitpunkt, im Gegensatz zum mAb 1379, wo dieser Effekt bis auf Tag 7 ausgedehnt wird. Weiterhin zeigt die Behandlung mit mAb 1379 eine signifikante Inhibition der Expression von Fas gegenüber Placebo 24h nach Trauma. Die Erklärung für die Inhibition lediglich zu einem Zeitpunkt liegt ebenfalls am ehesten in der nicht ausreichenden Blockade des alternativen Komplementaktivierungsweges am Tag 7. Beide traumatisierte Gruppen hatten zum 4h Zeitpunkt deutlich erhöhte Fas-mRNA Werte, was mit den anderen Studien übereinstimmt [96]. Zum 24h Zeitpunkt konnte eine signifikante Hemmung der Fas-Expression in der mAb 1379 Gruppe nachgewiesen werden. Eine erniedrigte Konzentration von Fas wurde in den Faktor B defizienten Mäusen nach experimentellem SHT zuvor gefunden [69]. Dies bestätigt eine hohe Effizienz des angewandten Medikamentes. Gleichzeitig wird durch diese Daten eine mögliche Funktion des alternativen Komplementaktivierungsweges in der Regulation von Apoptose nach SHT angedeutet [57, 96]. Erwartungsgemäß war auch die Expression von Fas-L in den traumatisierten Tieren 4h und 24h nach dem Versuch wie in den früheren tierexperimentellen sowie klinischen Studien erhöht [95, 96]. Interessanterweise kam es zum signifikanten Anstieg der Transkription von Fas-L in der mAb 1379 Gruppe gegenüber Placebo zum Zeitpunkt 24h und 7 Tage. Diese Regulation kann eine vermehrte Aktivität von Mikroglia, Neuronen oder Astrozyten nach Blockade des Faktors B bedeuten, da alle diese Zellen Fas-L nach einem SHT exprimieren [96].

Durch die pharmakologische Blockade des alternativen Komplementaktivierungsweges kam es in diesem Experiment zur Schonung der kortikalen und subkortikalen Mikroarchitektur des ZNS gegenüber Placebo. Dies ist vermutlich ein Effekt der verminderten Apoptoserate und verminderten Infiltration der CD11b positiven Leukozyten in der traumatisierten Hemisphäre. Die größte Ausprägung dieses Unterschieds kann zum Zeitpunkt 24h und 7 Tage beobachtet werden (siehe Abbildungen 11, 12 und 16, 17). Diese Daten bestätigen die hohe protektive Funktion von mAb 1379. Ähnliche Ergebnisse wurden bei den Faktor B defizienten Mäusen festgestellt [69]. Die vor der Apoptose schützende Wirkung wurde für den Crry tragenden Antikörper, also einen Partikel, der alle drei Komplementaktivierungswege hemmt, bis jetzt nicht nachgewiesen. Es lässt vermuten, dass Faktor B bzw. der alternative Komplementaktivierungsweg eine wichtige Rolle in der Regulation und Initiierung der Apoptose nach zerebralem Trauma spielt. Die Hinweise dafür gaben ebenfalls die schon erwähnten Ergebnisse der Expression der Gene von Fas und Bcl-2. Die PCR-Daten finden ihre Bestätigung in den immunhistochemischen Ergebnissen.

Die mit mAb 1379 behandelten Mäuse wiesen neben der Abnahme der Apoptoserate eine erheblich verminderte posttraumatische Infiltration des ZNS durch die CD11b positiven Zellen vor allem 24h und 7 Tage nach dem Trauma auf. Die Infiltration der Leukozyten hat sehr große Bedeutung für die Fortsetzung und Ausprägung der Inflammation nach einem SHT [15-17]. Die experimentellen Behandlungen mit den löslichen CR1 oder C_{5a}R Blockern haben zum ersten Mal gezeigt, dass die Chemotaxis durch eine Komplementblockade verringert werden kann [60, 120]. Der Einsatz von mAb 1379 suggeriert eine Mitwirkung des alternativen Komplementaktivierungsweges oder die Rolle der Verstärkungsschleife in der Rekrutierung von Leukozyten nach SHT.

In beiden Gruppen, denen Traumata zugeführt wurden, stieg die Expression von IL-18 und IL-6, was schon in anderen Studien suggeriert wurde [15, 72]. Unmittelbar nach dem SHT und zum Zeitpunkt 4h war IL-6 signifikant höher in den Placebo- und mAb 1379 Gruppen als in den Nil und Sham Gruppen transkribiert. Diese Regulation hielt bei der mAb 1379 Gruppe bis zum Untersuchungszeitpunkt am Tag 7 an. Die Überexpression von IL-6 in der mAb 1379 Gruppe erwies sich, verglichen mit der Placebo Gruppe, signifikant zu den 24h und 7 Tage Zeitpunkten. Die Beurteilung der Expression von IL-18 in diesem Experiment bleibt erschwert, weil Isofluran oder Tramal bei der Sham Gruppe einen signifikanten Anstieg der Transkription zu allen Zeitpunkten bewirkten.

Wie erwartet zeigte sich ein signifikanter Anstieg in der Expression von IL-6 in der traumatisierten Hemisphäre unmittelbar nach dem SHT. Die Hochregulation in der mAb 1379 Gruppe ist eher unerwartet und könnte eine kompensatorische Verstärkung der Entzündung bei fehlender Komplementaktivierung durch den alternativen Weg oder eine Regulation der IL-6 Produktion durch Komplement sein. Es ist bekannt, dass IL-6 eine erhöhte Synthese der Komplementproteinen in der Leber stimuliert [16, 125]. Wie vorher bereits erwähnt, kann dieser Mechanismus als negative Rückkopplung bei unzureichender Komplementaktivierung zu einer vermehrten IL-6 Transkription führen. Diese Hypothese müsste allerdings in weiteren Versuchen geprüft werden. IL-6 wird neben einer proinflammatorischen auch eine protektive Rolle zugeschrieben [72, 83]. Sie liegt an der Aktivierung von Antioxidanten, z.B. Metallothioninen, gesteigerter Produktion von NGF und der Angiogenese nach SHT. Das Expressionsprofil von IL-6 in diesem Experiment stimmt mit der verminderten Apoptoserate, vor allem an den 24h und 7 Tage Zeitpunkten, überein. Es gibt aber auch überzeugende Beweise über Neurotoxizität von IL-6 nach SHT im Fall der Überexpression, was die Annahme erlaubt, dass das Ausbleiben einer besseren neurologischen

Erholung in der mAb 1379 Gruppe hierdurch bedingt war [15, 72]. Diese Hypothesen verlangen eine weitere experimentelle Abklärung der Zusammenhänge zwischen Komplementsystem und Regulation der IL-6 Expression nach SHT.

Die Untersuchung des Einflusses von mAb1379 auf die Expression von Komplementregulatoren zeigte einen starken, signifikanten Anstieg der Expression von C₁-Inh zu den 4h und 7 Tagen Zeitpunkten in der mAb 1379 Gruppe gegenüber der Placebo Gruppe. Die Expression zum 24h Zeitpunkt gestaltete sich auf ähnlichem Niveau. Die Überexpression von C₁-Inh in den Trauma Gruppen bestätigte frühere Ergebnisse. Im Gegensatz zu einer Blockade der C3- Konvertase mit Crry tragendem Antikörper führte mAb1379 zu einer signifikanten Hochregulation des C₁-Inh Genes auch in der chronischen Phase [65]. Da C₁-Inh unter anderem die Makrophagen- und Granulozyteninfiltration verhindert, unterstützt dieses Expressionsprofil die immunhistochemischen Daten mit Anti- CD11b Färbungen [49]. Die Daten zeigen einen eindeutigen Einfluss der Behandlung mit mAb1379 auf die Expression des protektiven C₁-Inh Proteins, enthüllen jedoch nicht die molekularen Mechanismen, die dieser Regulation zugrunde liegen können. CD55 zeigte keine wegweisende Veränderung der Expression nach der Injektion von mAb1379 und SHT. Hingegen war CD59 zum 24h Zeitpunkt leicht, dennoch signifikant überexprimiert. Diese Tendenz konnte für die anderen Zeitpunkte nicht nachgewiesen werden. Das Fehlen der Überexpression zum 7d Zeitpunkt lässt erneut an die nicht ausreichende Blockade des alternativen Komplementaktivierungsweges denken [123]. Die Experimente mit dem Einsatz von Crry tragendem Antikörper zeigten im Gegensatz zu den hier präsentierten Ergebnissen eine signifikant positive Regulation von CD55 zu allen Zeitpunkten [65]. Die Blockade des Faktors B scheint keinen Einfluss auf die Expression von CD55 zu haben, reicht aber aus, um eine ähnliche Überexpression von CD59 wie im Fall von Crry zu bewirken. CD59 verhindert die Bildung des membranangreifenden Komplexes auf autologen Zellen [48, 50]. Es spielt ebenfalls eine wichtige Rolle in der Neuroprotektion nach zerebraler Ischämie oder Trauma, was in experimentellen Studien nachgewiesen wurde [66, 126]. Zusätzlich konnten im Liquor der Patienten nach einem SHT erhöhte Werte von Proteinen, die MAC bilden, gezeigt werden [48, 50]. Eine Verbindung zwischen Initiierung der Apoptose und MAC wurde anhand von experimentellen Daten aus verschiedenen wissenschaftlichen Gebieten postuliert [127]. Ob ein Zusammenhang zwischen in diesem Experiment gezeigter niedrigerer Apoptoserate und CD59 Überexpression zum Zeitpunkt 24h besteht, kann nicht eindeutig beantwortet werden, da der Einfluss von Bcl-2, die Unterregulation von Fas sowie Überexpression von C₁-Inh nicht außer Acht gelassen

werden darf. Dieser Befund bestätigt allerdings, dass der alternative Komplementaktivierungsweg in der Regulation von CD59 eine wichtigere Rolle als der klassische Weg spielen könnte. Bemerkenswert bleibt die erhöhte Expression von beiden Proteinen in der Sham Gruppe, was zuvor auch beobachtet wurde [65].

In diesem Experiment wurden viele Gene in der Sham Gruppe gegenüber der Nil Gruppe hochreguliert. Dies betrifft die Expression von CD55, CD59, IL-18, IL-6 und Fas. Ähnliche Reaktionen für C_{5a} R, CD55, CD59 wurden bei diesem Modell, in früheren Versuchen ebenfalls beobachtet [65, 76]. Der Hautschnitt scheint als Ursache für die intrazerebrale Regulation der Gene unwahrscheinlich. Dies lenkt die Aufmerksamkeit auf Isofluran oder Tramal. Es ist sehr wichtig, weitere Untersuchungen zur Aufklärung des Einflusses von Anästhetika auf zerebrale Genexpressionen durchzuführen. Die Genexpressionsveränderungen, die durch Anästhetika bedingt sind, könnten auch Einfluss auf die neurologische Erholung nach SHT haben. Das konnte zwar in der Studie nicht demonstriert werden, sollte aber nicht außer Acht gelassen werden. Die Beantwortung der entstandenen Fragen kann den Einsatz der anderen Anästhetika erforderlich machen und in weiteren Versuchen die Interpretation der Ergebnisse erleichtern.

Trotz des Ausbleibens einer besseren neurologischen Erholung im Vergleich zur Placebo Gruppe erwies sich die Behandlung mit mAb 1379 nach experimentellem SHT bei Mäusen als neuroprotektiv. Sie offenbarte sich in einer verminderten Apoptoserate, deutlich weniger Zerstörungen in den kortikalen Strukturen sowie in der gesteigerten Expression der neuroprotektiven und antiapoptotischen Moleküle wie C₁-Inh, Bcl-2 oder CD59. Diese Arbeit zeigte außerdem einen möglichen Einfluss der Faktor B Blockade auf molekulare Regulationsmechanismen von IL-6, Bcl-2, Fas, Fas-L, CD59 und C₁-Inh. Die präsentierten Daten beweisen sowohl die hohe Spezifität der mAb 1379, verglichen mit Daten der Faktor B defizienten Mäuse als auch die Rolle, die der alternative Komplementaktivierungsweg in der Pathophysiologie des SHT spielt. Weitere Experimente mit den vorher erwähnten Modifikationen, wie die Verlängerung des Beobachtungszeitraums und eine veränderte Dosierung vom mAb 1379 sollten durchgeführt werden. Das Entdecken der komplexen Regulationsmechanismen und Zusammenhänge zwischen Komplementproteinen, Zytokinen und Apoptose kann für die Einführung einer erfolgreichen Therapie von Patienten mit SHT notwendig sein.

5. Zusammenfassung

Das Schädel-Hirn-Trauma gehört zu den häufigsten Todesursachen und führt zu lebenslangen neurologischen Beeinträchtigungen in der jungen Population. Es trägt ebenfalls wesentlich zur Mortalität der Patienten über 75 Jahre bei. Die Inzidenz des Schädel-Hirn-Traumas beträgt je nach Schweregrad zwischen 33 und 337/100 000. Die Mortalität in Deutschland als Folge des SHT erreichte im Jahr 2000 9/100 000. Die Behandlung der Verletzten und die oft folgende Arbeitsunfähigkeit verursachen hohe Kosten.

Die schlechte Prognose für die Patienten, die ein initiales Trauma überleben, hängt vor allem von sogenannten sekundären Hirnschäden ab. Die Pathophysiologie dieser Prozesse ist sehr komplex und vielfältig. Durch Hypoxie, Hypotonie und Blut-Hirn-Schranken Störung kommt es zu einer intrakraniellen Aktivierung von Komplement, einer Leukozyteninfiltration, der Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen, Anaphylatoxinen und der Freisetzung von freien Radikalen. Die toxische und proinflammatorische Wirkung dieser Substanzen führt einerseits zur Steigerung des Hirndruckes, somit zum Abfall des zerebralen Perfusionsdruckes und Vertiefung der Hypoxie des Zentralnervensystems, andererseits zur weiteren Beeinträchtigung der Funktion der Blut-Hirn-Schranke, der Endothelzellen, zu Apoptose und Nekrose der Neurone. Die Neuroinflammation nach Schädel-Hirn-Trauma wird somit verstärkt. Zurzeit gibt es keine kausale Therapie der sekundären Hirnschäden nach SHT. Randomisierte, multizentrische Studien zeigten keine vielversprechenden Ergebnisse, haben aber zusammen mit den experimentellen Daten Hinweise darauf gegeben, dass eher die gezielte Unterbrechung des neuroinflammatorischen circulus vitiosus als die Paninhibition der Neuroinflammation zum Erfolg führen kann. Sowohl experimentelle als auch klinische Daten weisen auf die Rolle des Komplementsystems, insbesondere des alternativen Aktivierungsweges, als Verstärker der Neuroinflammation nach SHT hin.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Wirksamkeit der pharmakologischen Blockade des alternativen Komplementaktivierungsweges mittels des spezifischen Anti-Faktor B Antikörpers mAb 1379 nach experimentellem SHT bei C57BL/6 Wildtypmäusen. Die Tiere wurden in vier Gruppen, mit und ohne Trauma sowie mit und ohne Behandlung aufgeteilt. Das klinische Outcome wurde mittels NSS 1h, 4h, 24h und 7d nach dem Trauma erhoben. Zusätzlich wurden zu den Zeitpunkten 4h, 24h und 7d molekularbiologische und immunhistochemische Analysen vorgenommen. Zur Darstellung der Apoptose nach SHT wurde TUNEL angewandt. Real time RT-PCR wurde zur Messung der Expression der pro- und antiapoptotischen Gene Bax, Fas, Fas-

L und Bcl-2 im Gehirn eingesetzt. Weiterhin wurde die Expression von Komplementregulatoren wie C₁-Inh, CD55 und CD59 und von Zytokinen IL-6, IL-18 bestimmt. Immunhistochemisch wurde die Leukozyteninfiltration sowie die Mikroarchitektur des Gehirns untersucht.

Es wurde angenommen, dass eine Behandlung mit dem mAb 1379 Antikörper zu einem besseren klinischen Outcome nach SHT sowie der Reduktion der Apoptose und sekundärer Hirnschäden führt. Weiterhin besteht die Vermutung, dass eine Faktor B Blockade die Hochregulation der protektiven Gene sowie Unterregulation der proapoptotischen Gene und proinflammatorischen Zytokine bewirken kann.

Die Aktivität des alternativen Schenkels des Komplementsystems wurde zu den Zeitpunkten 4h und 24h in den mit mAb 1379 behandelten Tieren signifikant inhibiert. Die Tiere, die dem experimentellen SHT unterzogen wurden, haben gegenüber den nicht traumatisierten Tieren ein signifikant schlechteres neurologisches Outcome. Die Wirksamkeit des mAb 1379 Antikörpers konnte im Bezug auf das NSS nicht bewiesen werden. Im Gegensatz zu diesem Ergebnis offenbarte sich eine eindeutige protektive Wirkung vom mAb 1379 in verminderter Apoptoserate bei behandelten Tieren in TUNEL. Die Mikroarchitektur der Gehirne war in dieser Gruppe im Vergleich zu nicht behandelten Tieren geschont. Die real time RT-PCR-Daten ließen erkennen, dass es nach der Injektion von mAb 1379 zu einer Hochregulation der neuroprotektiven Gene Bcl-2, C₁-Inh und CD59 kommt. Darüber hinaus zeichnete sich auch eine signifikante Unterregulation von Fas ab. Interessanterweise verursachte die Behandlung mit mAb 1379 eine Hochregulation der Expression von IL-6 und Fas-L.

Die Arbeit bestätigte die Haupthypothese nicht, da die Blockade des alternativen Komplementaktivierungsweges ohne signifikante Verbesserung des neurologischen Zustandes blieb. Trotzdem gelang es, einen Nachweis der protektiven Rolle des mAb 1379 in Form der deutlichen Reduktion der Apoptoserate zu erbringen. Die protektive Wirkung spiegelt sich in der Erhöhung der Expression von Bcl-2 und Unterregulation von Fas nach SHT wieder. Die überraschende Hochregulation von IL-6 kann als Folge der kompensatorischen, inflammatorischen Reaktion interpretiert werden. Als Ursache des ausgebliebenen klinischen Effektes der Faktor B Blockade könnte die erwähnte kompensatorische Entzündung und die zu niedrige Dosierung des Antikörpers diskutiert werden. Insgesamt belegen die in der Arbeit präsentierten Daten die neuroprotektive Wirkung vom mAb 1379 sowie die wichtige Rolle des alternativen Komplementaktivierungsweges in der Pathophysiologie des SHT. Gleichzeitig suggerieren die Ergebnisse gewisse molekulare Mechanismen im Verlauf der Neuroinflammation nach SHT, die durch weitere experimentelle Studien geklärt werden müssen.

6. Literaturverzeichnis

1. Marshall LF, Marshall SB, Klauber MR, et al. The diagnosis of head injury requires a classification based on computed axial tomography. *J Neurotrauma* 1992; 9 Suppl 1: S287-292.
2. Teasdale G and Jennett B, Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. *Lancet* 1974; 2(7872): 81-84.
3. Maas AI, Stocchetti N and Bullock R, Moderate and severe traumatic brain injury in adults. *Lancet Neurol* 2008; 7(8): 728-741.
4. McArthur DL, Chute DJ and Villablanca JP, Moderate and severe traumatic brain injury: epidemiologic, imaging and neuropathologic perspectives. *Brain Pathol* 2004; 14(2): 185-194.
5. Goldstein M, Traumatic brain injury: a silent epidemic. *Ann Neurol* 1990; 27(3): 327.
6. Scheid R, Cramon DY, Clinical findings in the chronic phase of traumatic brain injury: data from 12 years' experience in the Cognitive Neurology Outpatient Clinic at the University of Leipzig. *Dtsch Arztebl Int.* 2010; 107(12): 199-205.
7. Steudel WI, Cortbus F and Schwerdtfeger K, Epidemiology and prevention of fatal head injuries in Germany--trends and the impact of the reunification. *Acta Neurochir (Wien)* 2005; 147(3): 231-242.
8. Traumatic brain injury in the United States. Statistics. Atlanta, USA: Centers for Disease Control and Prevention 2007 (accessed December 12, 2009 at <http://www.cdc.gov/traumaticbraininjury/statistics.html>).
9. Thornhill S, Teasdale GM, Murray GD, et al. Disability in young people and adults one year after head injury: prospective cohort study. *BMJ* 2000; 320(7250): 1631-1635.
10. Masson F, Thicoipe M, Aye P, et al. Epidemiology of severe brain injuries: a prospective population-based study. *J Trauma* 2001; 51(3): 481-489.
11. Marshall LF, Head injury: recent past, present, and future. *Neurosurgery* 2000; 47(3): 546-561.
12. Murray GD, Teasdale GM, Braakman R, et al. The European Brain Injury Consortium survey of head injuries. *Acta Neurochir (Wien)* 1999; 141(3): 223-236.
13. Koponen S, Taiminen T, Portin R, et al. Axis I and II psychiatric disorders after traumatic brain injury: a 30-year follow-up study. *Am J Psychiatry* 2002; 159(8): 1315-1321.
14. DeKosky ST, Ikonovic MD and Gandy S, Traumatic brain injury--football, warfare, and long-term effects. *N Engl J Med* 2010; 363(14): 1293-1296.
15. Schmidt OI, Heyde CE, Ertel W and Stahel PF, Closed head injury-an inflammatory disease? *Brain Res Brain Res Rev* 2005 48(2): 388-399.
16. Stahel PF, Morganti-Kossmann MC and Kossmann T, The role of the complement system in traumatic brain injury. *Brain Res Brain Res Rev* 1998; 27(3): 243-256.
17. Schmidt OI, Leinhase I, Hasenboehler E, et al. The relevance of the inflammatory response in the injured brain. *Orthopäde*, 2007; 36(3): 248-258.

18. Stahel PF, Smith WR and Moore EE, Hypoxia and hypotension, the "lethal duo" in traumatic brain injury: implications for prehospital care. *Intensive Care Med* 2008; 34(3): 402-404.
19. Graham DI, McIntosh TK, Maxwell WL and Nicoll JA, Recent advances in neurotrauma. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000; 59(8): 641-651.
20. Maas AI, Dearden M, Servadei F, et al. Current recommendations for neurotrauma. *Curr Opin Crit Care* 2000; 6(4): 281-292.
21. Bayir H, Clark RS and Kochanek PM, Promising strategies to minimize secondary brain injury after head trauma. *Crit Care Med* 2003; 31(1 Suppl): S112-117.
22. Eisenberg HM, Gary HE, Jr., Aldrich EF, et al. Initial CT findings in 753 patients with severe head injury. A report from the NIH Traumatic Coma Data Bank. *J Neurosurg* 1990; 73(5): 688-698.
23. Chesnut RM, Marshall LF, Klauber MR, et al. The role of secondary brain injury in determining outcome from severe head injury. *J Trauma* 1993; 34(2): 216-222.
24. Golding EM, Sequelae following traumatic brain injury. The cerebrovascular perspective. *Brain Res Brain Res Rev* 2002; 38(3): 377-388.
25. Leker RR and Shohami E, Cerebral ischemia and trauma-different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities. *Brain Res Brain Res Rev* 2002; 39(1): 55-73.
26. Geeraerts T, Friggeri A, Mazoit JX, et al. Posttraumatic brain vulnerability to hypoxia-hypotension: the importance of the delay between brain trauma and secondary insult. *Intensive Care Med* 2008; 34(3): 551-560.
27. Eltzschig HK and Collard CD, Vascular ischaemia and reperfusion injury. *Br Med Bull* 2004; 70: 71-86.
28. Nedergaard M and Dirnagl U, Role of glial cells in cerebral ischemia. *Glia* 2005; 50(4): 281-286.
29. Seeburg PH, The TINS/TiPS Lecture. The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends Neurosci* 1993; 16(9): 359-365.
30. Lu J, Moochhala S, Kaur C and Ling EA, Cellular inflammatory response associated with breakdown of the blood-brain barrier after closed head injury in rats. *J Neurotrauma* 2001; 18(4): 399-408.
31. Shohami E, Gati I, Beit-Yannai E, et al. Closed head injury in the rat induces whole body oxidative stress: overall reducing antioxidant profile. *J Neurotrauma* 1999; 16(5): 365-376.
32. Shohami E, Beit-Yannai E, Horowitz M and Kohen R, Oxidative stress in closed-head injury: brain antioxidant capacity as an indicator of functional outcome. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997; 17(10): 1007-1019.
33. Bayir H, Kagan VE, Tyurina YY, et al. Assessment of antioxidant reserves and oxidative stress in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury in infants and children. *Pediatr Res* 2002; 51(5): 571-578.
34. Evans PH, Free radicals in brain metabolism and pathology. *Br Med Bull* 1993; 49(3): 577-587.

35. Whalen MJ, Carlos TM, Dixon CE, et al. Reduced brain edema after traumatic brain injury in mice deficient in P-selectin and intercellular adhesion molecule-1. *J Leukoc Biol* 2000; 67(2): 160-168.
36. Alexander JJ, Anderson AJ, Barnum SR, et al. The complement cascade: Yin-Yang in neuroinflammation--neuro-protection and -degeneration. *J Neurochem* 2008; 107(5): 1169-1187.
37. Nataf S, Stahel PF, Davoust N and Barnum SR, Complement anaphylatoxin receptors on neurons: new tricks for old receptors? *Trends Neurosci* 1999; 22(9): 397-402.
38. Morgan BP, Gasque P, Singhrao S and Piddlesden SJ, The role of complement in disorders of the nervous system. *Immunopharmacology* 1997; 38(1-2): 43-50.
39. Gasque P, Dean YD, McGreal EP, et al. Complement components of the innate immune system in health and disease in the CNS. *Immunopharmacology* 2000; 49(1-2): 171-186.
40. Ember JA and Hugli TE, Complement factors and their receptors. *Immunopharmacology* 1997; 38(1-2): 3-15.
41. Mollnes TE, Song WC and Lambris JD, Complement in inflammatory tissue damage and disease. *Trends Immunol* 2002; 23(2): 61-64.
42. Huber-Lang M, Sarma JV, Zetoune FS, et al. Generation of C_{5a} in the absence of C₃: a new complement activation pathway. *Nat Med* 2006; 12(6): 682-687.
43. Holers VM, The complement system as a therapeutic target in autoimmunity. *Clin Immunol* 2003; 107(3): 140-151.
44. Thurman JM and Holers VM, The central role of the alternative complement pathway in human disease. *J Immunol* 2006; 176(3): 1305-1310.
45. van Beek J, Elward K and Gasque P, Activation of complement in the central nervous system: roles in neurodegeneration and neuroprotection. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 992: 56-71.
46. Yager PH, You Z, Qin T, et al. Mannose binding lectin gene deficiency increases susceptibility to traumatic brain injury in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 2008; 28(5): 1030-1039.
47. Molina H, The murine complement regulator Crry: new insights into the immunobiology of complement regulation. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59(2): 220-229.
48. Gasque P, Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. *Mol Immunol* 2004; 41(11): 1089-1098.
49. Davis AE, 3rd, Mejia P and Lu F, Biological activities of C₁ inhibitor. *Mol Immunol* 2008; 45 (16):4057-4063.
50. Baalasubramanian S, Harris CL, Donev RM, et al. CD59a is the primary regulator of membrane attack complex assembly in the mouse. *J Immunol* 2004; 173(6): 3684-3692.
51. Kim YU, Kinoshita T, Molina H, et al. Mouse complement regulatory protein Crry/p65 uses the specific mechanisms of both human decay-accelerating factor and membrane co-factor protein. *J Exp Med* 1995; 181(1): 151-159.
52. Holers VM and Thurman JM, The alternative pathway of complement in disease: opportunities for therapeutic targeting. *Mol Immunol* 2004; 41(2-3): 147-152.

53. Morgan BP and Gasque P, Expression of complement in the brain: role in health and disease. *Immunol Today* 1996; 17(10): 461-466.
54. Stahel PF, Morganti-Kossmann MC, Perez D, et al. Intrathecal levels of complement-derived soluble membrane attack complex (sC_{5b-9}) correlate with blood-brain barrier dysfunction in patients with traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2001; 18(8): 773-781.
55. Kossmann T, Stahel PF, Morganti-Kossmann MC, et al. Elevated levels of the complement components C3 and factor B in ventricular cerebrospinal fluid of patients with traumatic brain injury. *J Neuroimmunol* 1997; 73(1-2): 63-69.
56. Bellander BM, von Holst H, Fredman P and Svensson M, Activation of the complement cascade and increase of clusterin in the brain following a cortical contusion in the adult rat. *J Neurosurg* 1996; 85(3): 468-475.
57. Raghupathi R, Cell death mechanisms following traumatic brain injury. *Brain Pathol* 2004; 14(2): 215-222.
58. Rink A, Fung KM, Trojanowski JQ, et al. Evidence of apoptotic cell death after experimental traumatic brain injury in the rat. *Am J Pathol* 1995; 147(6): 1575-1583.
59. Yakovlev AG, Knoblach SM, Fan L, et al. Activation of CPP32-like caspases contributes to neuronal apoptosis and neurological dysfunction after traumatic brain injury. *J Neurosci* 1997; 17(19): 7415-7424.
60. Kaczorowski SL, Schiding JK, Toth CA and Kochanek PM, Effect of soluble complement receptor-1 on neutrophil accumulation after traumatic brain injury in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 1995; 15(5): 860-864.
61. Reynolds DN, Smith SA, Zhang YP, et al. Vaccinia virus complement control protein reduces inflammation and improves spinal cord integrity following spinal cord injury. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1035: 165-178.
62. Kulkarni AP, Kellaway LA, Lahiri DK and Kotwal GJ, Neuroprotection from complement-mediated inflammatory damage. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1035: 147-164.
63. Storini C, Rossi E, Marrella V, et al. C₁-inhibitor protects against brain ischemia-reperfusion injury via inhibition of cell recruitment and inflammation. *Neurobiol Dis* 2005; 19(1-2): 10-17.
64. Rancan M, Morganti-Kossmann MC, Barnum SR, et al. Central nervous system-targeted complement inhibition mediates neuroprotection after closed head injury in transgenic mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003; 23(9): 1070-1074.
65. Leinase I, Schmidt OI, Thurman JM, et al. Pharmacological complement inhibition at the C₃ convertase level promotes neuronal survival, neuroprotective intracerebral gene expression, and neurological outcome after traumatic brain injury. *Exp Neurol* 2006; 199(2): 454-464.
66. Stahel PF, Flierl MA, Morgan BP, et al. Absence of the complement regulatory molecule CD59a leads to exacerbated neuropathology after traumatic brain injury in mice. *J Neuroinflammation* 2009; 6(1): 2.
67. van Beek J, van Meurs M, Hart BA, et al. Decay-accelerating factor (CD55) is expressed by neurons in response to chronic but not acute autoimmune central nervous system inflammation associated with complement activation. *J Immunol* 2005; 174(4): 2353-2365.

68. Nataf S, Carroll SL, Wetsel RA, et al. Attenuation of experimental autoimmune demyelination in complement-deficient mice. *J Immunol* 2000; 165(10): 5867-5873.
69. Leinase I, Holers VM, Thurman JM, et al. Reduced neuronal cell death after experimental brain injury in mice lacking a functional alternative pathway of complement activation. *BMC Neurosci* 2006; 7: 55.
70. van Beek J, Complement activation: beneficial and detrimental effects in the CNS. *Ernst Schering Res Found Workshop* 2004; (47): 67-85.
71. Wurznner R, Deficiencies of the complement MAC II gene cluster (C₆, C₇, C₉): is subtotal C₆ deficiency of particular evolutionary benefit? *Clin Exp Immunol* 2003; 133(2): 156-159.
72. Morganti-Kossmann MC, Rancan M, Stahel PF and Kossmann T, Inflammatory response in acute traumatic brain injury: a double-edged sword. *Curr Opin Crit Care* 2002; 8: 101-105.
73. Feuerstein GZ, Wang X and Barone FC, The role of cytokines in the neuropathology of stroke and neurotrauma. *Neuroimmunomodulation* 1998; 5(3-4): 143-159.
74. Shohami E, Bass R, Wallach D, Inhibition of tumor necrosis factor alpha (TNF α) activity in rat brain is associated with cerebroprotection after closed head injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996; 16(3): 378-384.
75. Shohami E, Gallily R, Mechoulam R, et al. Cytokine production in the brain following closed head injury: dexanabinol (HU-211) is a novel TNF- α inhibitor and an effective neuroprotectant. *J Neuroimmunol* 1997; 72(2): 169-177.
76. Stahel PF, Kariya K, Shohami E, et al. Intracerebral complement C_{5a} receptor (CD88) expression is regulated by TNF and lymphotoxin- α following closed head injury in mice. *J Neuroimmunol* 2000; 109(2): 164-172.
77. Quagliarello VJ, Wispelwey B, Long WJ Jr., and Scheld WM, Recombinant human interleukin-1 induces meningitis and blood-brain barrier injury in the rat. Characterization and comparison with tumor necrosis factor. *J Clin Invest* 1991; 87(4): 1360-1366.
78. Rothwell N, Interleukin-1 and neuronal injury: mechanisms, modification, and therapeutic potential. *Brain Behav Immun* 2003; 17(3): 152-157.
79. Ramilo O, Saez-Llorens X, Mertsola J, et al. Tumor necrosis factor alpha/cachectin and interleukin 1 beta initiate meningeal inflammation. *J Exp Med* 1990; 172(2): 497-507.
80. Tehranian R, Andell-Jonsson S, Beni SM, et al. Improved recovery and delayed cytokine induction after closed head injury in mice with central overexpression of the secreted isoform of the interleukin-1 receptor antagonist. *J Neurotrauma* 2002; 19(8): 939-951.
81. Toulmond S and Rothwell NJ, Interleukin-1 receptor antagonist inhibits neuronal damage caused by fluid percussion injury in the rat. *Brain Res* 1995; 671(2): 261-266.
82. Eugster HP, Frei K, Kopf M, et al. IL-6-deficient mice resist myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 1998; 28(7): 2178-2187.
83. Penkowa M, Giralt M, Lago N, et al. Astrocyte-targeted expression of IL-6 protects the CNS against a focal brain injury. *Exp Neurol* 2003; 181(2): 130-148.
84. Felderhoff-Mueser U, Schmidt OI, Oberholzer A, et al. IL-18: a key player in neuroinflammation and neurodegeneration? *Trends Neurosci* 2005; 28(9): 487-493.

85. Yatsiv I, Morganti-Kossmann MC, Perez D, et al. Elevated intracranial IL-18 in humans and mice after traumatic brain injury and evidence of neuroprotective effects of IL-18-binding protein after experimental closed head injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002; 22(8): p. 971-978.
86. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Cellular Adaptations, Cell Injury, and Cell Death. In: Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 7th ed. Philadelphia, USA: Elsevier Saunders, 2005: 3-46
87. Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL, et al. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol* 1999; 17: 331-67.
88. Ravagnan L, Roumier T, Kroemer G, Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *J Cell Physiol* 2002; 192(2): 131-7.
89. Cory S, Adams JM, The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2002;n2(9): 647-56.
90. Krammer PH, CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 2000; 407(6805): 789-795.
91. Clark RS, Chen J, Watkins SC, et al. Apoptosis-suppressor gene bcl-2 expression after traumatic brain injury in rats. *J Neurosci* 1997; 17(23): 9172-9182.
92. Wennersten A, Holmin S and Mathiesen T, Characterization of Bax and Bcl-2 in apoptosis after experimental traumatic brain injury in the rat. *Acta Neuropathol* 2003; 105(3): 281-288.
93. Burlacu A, Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *J Cell Mol Med* 2003; 7(3): 249-257.
94. Lu J, Moochhala S, Kaur C and Ling E, Changes in apoptosis-related protein (p53, Bax, Bcl-2 and Fos) expression with DNA fragmentation in the central nervous system in rats after closed head injury. *Neurosci Lett* 2000; 290(2): 89-92.
95. Ertel W, Keel M, Stocker R, et al. Detectable concentrations of Fas ligand in cerebrospinal fluid after severe head injury. *J Neuroimmunol* 1997; 80(1-2): 93-96.
96. Beer R, Franz G, Schopf M, et al. Expression of Fas and Fas ligand after experimental traumatic brain injury in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000; 20(4): 669-677.
97. Beauchamp K, Mutlak H, Smith WR, et al. Pharmacology of traumatic brain injury: where is the "golden bullet"? *Mol Med* 2008; 14(11-12): 731-740.
98. Deutsche Gesellschaft für Neurologie: Schweres Schädel-Hirn-Trauma, Leitlinien 2008 (accessed April 14, 2009 at <http://www.dgn.org>)
99. Citerio G and Cormio M, Sedation in neurointensive care: advances in understanding and practice. *Curr Opin Crit Care* 2003; 9(2): 120-126.
100. Cooper DJ, Myles PS, McDermott FT, Murray et al. Prehospital hypertonic saline resuscitation of patients with hypotension and severe traumatic brain injury: a randomized controlled trial. *JAMA* 2004; 291(11): 1350-1357.
101. Steiner LA, Johnston AJ, Czosnyka M, et al. Direct comparison of cerebrovascular effects of norepinephrine and dopamine in head-injured patients. *Crit Care Med* 2004; 32(4): 1049-1054.

102. Baranov D and Neligan P, Trauma and aggressive homeostasis management. *Anesthesiol Clin* 2007; 25(1): 49-63, viii.
103. Bullock R, Chesnut RM, Clifton G, et al. Guidelines for the management of severe head injury. Brain Trauma Foundation. *Eur J Emerg Med* 1996; 3(2): 109-127.
104. Albanese J, Leone M, Alliez JR, et al. Decompressive craniectomy for severe traumatic brain injury: Evaluation of the effects at one year. *Crit Care Med* 2003; 31(10): 2535-2538.
105. Wakai A, Roberts I and Schierhout G, Mannitol for acute traumatic brain injury. *Cochrane Database Syst Rev (Online)* 2007; (1): CD001049.
106. Stocchetti N, Maas AI, Chieregato A and van der Plas AA, Hyperventilation in head injury: a review. *Chest* 2005; 127(5): 1812-1827.
107. Hammoud DA and Wasserman BA, Diffuse axonal injuries: pathophysiology and imaging. *Neuroimaging Clin N Am* 2002; 12(2): 205-216.
108. Clifton GL, Miller ER, Choi SC, et al. Lack of effect of induction of hypothermia after acute brain injury. *N Engl J Med* 2001; 344(8): 556-563.
109. Carmona Suazo JA, Maas AI, van den Brink WA, et al. CO₂ reactivity and brain oxygen pressure monitoring in severe head injury. *Crit Care Med* 2000; 28(9): 3268-3274.
110. Royo NC, Shimizu S, Schouten JW, et al. Pharmacology of traumatic brain injury. *Curr Opin Pharmacol* 2003; 3(1): 27-32.
111. Roberts I, Yates D, Sandercock P, et al. Effect of intravenous corticosteroids on death within 14 days in 10008 adults with clinically significant head injury (MRC CRASH trial): randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2004; 364(9442): 1321-1328.
112. Thurman JM, Kraus DM, Girardi G, et al. A novel inhibitor of the alternative complement pathway prevents antiphospholipid antibody-induced pregnancy loss in mice. *Mol Immunol* 2005; 42(1): 87-97.
113. Taube C, Thurman JM, Takeda K, et al. Factor B of the alternative complement pathway regulates development of airway hyperresponsiveness and inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(21): 8084-8089.
114. Thurman JM, Royer PA, Ljubanovic D, et al. Treatment with an inhibitory monoclonal antibody to mouse factor B protects mice from induction of apoptosis and renal ischemia/reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17(3): 707-715.
115. Chen Y, Constantini S, Trembovler V, et al. An experimental model of closed head injury in mice: pathophysiology, histopathology, and cognitive deficits. *J Neurotrauma* 1996; 13(10): 557-568.
116. Flierl MA, Stahel PF, Beauchamp KM, et al. Mouse closed head injury model induced by a weight-drop device. *Nat Protoc* 2009; 4(9): 1328-1337.
117. Yatsiv I, Grigoriadis N, Simeonidou C, Erythropoietin is neuroprotective, improves functional recovery, and reduces neuronal apoptosis and inflammation in a rodent model of experimental closed head injury. *FASEB J* 2005; 19(12): 1701-1703.
118. Beni-Adani L, Gozes I, Cohen Y, et al. A peptide derived from activity-dependent neuroprotective protein (ADNP) ameliorates injury response in closed head injury in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 296(1): 57-63.

119. Quigg RJ, Kozono Y, Berthiaume D, et al. Blockade of antibody-induced glomerulonephritis with Crry-Ig, a soluble murine complement inhibitor. *J Immunol* 1998; 160(9): 4553-4560.
120. Sewell DL, Nacewicz B, Liu F, et al. Complement C₃ and C₅ play critical roles in traumatic brain cryoinjury: blocking effects on neutrophil extravasation by C_{5a} receptor antagonist. *J Neuroimmunol* 2004; 155(1-2): 55-63.
121. Hicks RR, Keeling KL, Yang MY, et al. Vaccinia virus complement control protein enhances functional recovery after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2002; 19(6): 705-714.
122. Cole DS, Hughes TR, Gasque P and Morgan BP, Complement regulator loss on apoptotic neuronal cells causes increased complement activation and promotes both phagocytosis and cell lysis. *Mol Immunol* 2006; 43(12): 1953-1964.
123. Leinhase I, Rozanski M, Harhausen D, et al. Inhibition of the alternative complement activation pathway in traumatic brain injury by a monoclonal anti-factor B antibody: a randomized placebo-controlled study in mice. *J Neuroinflammation* 2007; 4: 13.
124. Stahel PF, Shohami E, Younis FM, et al. Experimental closed head injury: analysis of neurological outcome, blood-brain barrier dysfunction, intracranial neutrophil infiltration, and neuronal cell death in mice deficient in genes for pro-inflammatory cytokines. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000; 20(2): 369-380.
125. Baumann H and Gauldie J, The acute phase response. *Immunol Today* 1994; 15(2): 74-80.
126. Harhausen D, Khojasteh U, Stahel PF, et al. Membrane attack complex inhibitor CD59a protects against focal cerebral ischemia in mice. *J Neuroinflammation* 2010; 7: 15
127. Nauta AJ, Daha MR, Tijssma O, et al. The membrane attack complex of complement induces caspase activation and apoptosis. *Eur J Immunol* 2002; 32(3): 783-792

7. Danksagung

Ich möchte mich vor allem bei Herrn Professor Philip Stahel für die Betreuung der experimentellen Arbeit und die Korrektur des Manuskriptes bedanken. Weiterhin danke ich Herrn Peter Wechselmann für die Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit, Frau Dr. rer. nat. Iris Leinhase und Claudia Conrad für die Einarbeitung und Zusammenarbeit im Labor. Ein spezieller Dank gilt Herrn Prof. V. M. Holers (Department of Medicine and Immunology, University of Colorado Health Sciences Center, Denver, Colorado, USA) für die Messungen der Komplementaktivität und zur Verfügungstellung des mAb 1379 Antikörpers.

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

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

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

9. Erklärung

Ich, Michal Rozanski, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Untersuchung der pharmakologischen Blockade der Entzündungsreaktion mit einem neutralisierenden Anti-Komplement Faktor B Antikörper im experimentellen Schädel-Hirn-Trauma Modell in der Maus“ 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. Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch nicht veröffentlicht. Teilergebnisse der Arbeit wurden in einem wissenschaftlichen Journal veröffentlicht. Die Arbeit wurde zitiert und ist im Curriculum vitae unter Publikationen aufgelistet.

Berlin, 6.03.2013

Michal Rozanski