

4. DISKUSSION

Weitestgehend gesichert ist die exzitotoxische Wirkung einer posttraumatisch erhöhten extrazellulären Glutamatkonzentration. Die Mechanismen, die zu dieser Erhöhung führen, wurden bereits in Kapitel 1.4.1. angeführt. Den glialen Glutamattransportern kommt hierbei die wesentliche Rolle der Aufnahme und des Transports von Glutamat in die Zelle zu. PACAP hingegen hat zahlreiche Wirkungen im gesamten Organismus der Säugetiere. Besonders interessant im Hinblick auf das Schädel-Hirntrauma ist allerdings seine Funktion als Regulator der Glutamattransporter und als Neuroprotektivum. In dieser Arbeit wurde das Verhalten von EAAT1, EAAT2, PACAP38 und PACAP27 im zeitlichen Verlauf nach Schädel-Hirntrauma an humanem Hirngewebe immunhistochemisch untersucht. Weiterhin beobachteten wir exemplarisch die gliale Reaktionen am Beispiel von GFAP-positiven Astrozyten und CNP-positiven Oligodendrozyten durch immunhistochemische Doppelmarkierung mit EAAT1, EAAT2, PACAP38 und PACAP27.

Die Expression von EAAT1 und EAAT2 nimmt nach Schädel-Hirntrauma im kontusionellen und perikontusionellen Gebiet deutlich ab.

Bisher gibt es keine Arbeiten, die das Verhalten der glialen Glutamattransporter nach humanem Schädel-Hirntrauma quantitativ morphometrisch untersuchen. Es existieren tierexperimentelle Studien: Nach CCII findet sich eine Downregulation von EAAT1 und EAAT2 innerhalb der ersten 6 bis 72 Stunden nach Trauma (Rao et al., 1998). In einer anderen Studie konnte durch morphometrische Analysen und Western-Blot-Analysen ebenfalls eine zeitabhängige posttraumatische Reduktion der EAAT1- und EAAT2-Expression nach CCII demonstriert werden, wobei die EAAT1-Expression stärker betroffen war (van Landeghem et al., 2001). Für das humane Trauma gibt es bisher nur eine Studie mit semiquantitativer Auswertung der EAAT2-Expression via Immunhistochemie: Dort finden sich nach einer sehr kurzen Überlebenszeit (kleiner 1 Stunde) eine schwache Anfärbung, nach einer kurzen Überlebenszeit (1 Stunde bis 1 Tag) eine starke, kontinuierliche Anfärbung und nach langer Überlebenszeit (größer 1 Tag) wieder eine schwächere Anfärbung (Ikematsu et al., 2002).

Wir fanden einen Rückgang der Expression von EAAT1 im Kontusionsgebiet, der in den Überlebensgruppen 0h-24h, >24h-7d und >7d-99d im Vergleich zu den Kontrollen signifikant war. Die vierte Überlebensgruppe unterschied sich nicht mehr signifikant von

den Kontrollen, allerdings auch nicht von den anderen Überlebensgruppen. Der Expressionsrückgang betrug in den vier Gruppen auf den Median bezogen zwischen 26% und 58%. Im Perikontusionsgebiet findet sich ein ähnliches Bild, allerdings ist der Expressionsrückgang mit 6% bis 21% (medianbezogen) deutlich schwächer ausgeprägt als in der Kontusion selbst. Tendenziell ist die Expressionsverminderung in der Perikontusion über die ersten drei Überlebensgruppen nahezu konstant, während sich in der Kontusion in der Gruppe >7d-99d die schwächste Expression findet.

Für EAAT2 findet sich ebenfalls ein Expressionsrückgang, der im Gegensatz zu EAAT1 im Kontusionsgebiet über alle vier Überlebensgruppen signifikant ist. Er beträgt 42% bis 89% (medianbezogen). In der letzten Überlebensgruppe kommt es wieder zu einem leichten Anstieg gegenüber den Gruppen zwei und drei. In der Perikontusion sind jedoch nur die ersten drei Überlebensgruppen signifikant vermindert, Gruppe vier nähert sich wieder den Kontrollen an. Der Rückgang beträgt zwischen 9% und 46% (medianbezogen).

Hypothetisch sollte es im direkten Kontusionsgebiet, in dem es per definitionem zu einem unmittelbaren Zell- und Gewebeverlust kommt, sofort nach Trauma einen fast vollständigen Verlust der Expression geben. Im zeitlichen Verlauf sollten aufgrund des irreversiblen Schadens keine wesentlichen Änderungen der Expression stattfinden. Für EAAT1 und EAAT2 ist diese Forderung fast erfüllt. Die letzte Überlebensgruppe zeigt bei beiden jedoch einen geringen Anstieg. Dies könnte damit begründet sein, dass sich bei den langen Überlebenszeiten post Trauma das ehemalige Kontusionsgebiet nur noch schlecht abgrenzen ließ. Deswegen lag das Gebiet, in dem ausgewertet wurde, eventuell in einem Übergangsbereich zwischen dem äußersten Rand der alten Kontusion und am Beginn des perikontusionellen Gebietes.

Insgesamt kommt es also posttraumatisch zu einer starken Reduktion der glialen Glutamattransporter, besonders ausgeprägt im Kontusionsgebiet, aber auch im perikontusionellen Gebiet sind EAAT1 und EAAT2 deutlich vermindert. Diese Ergebnisse stützen die These, dass die posttraumatisch erhöhte extrazelluläre Glutamatkonzentration auch auf einen Verlust der Glutamattransporter zurückzuführen ist und dies zu einer Zunahme des Sekundärschadens führt.

Differentielle Expression von PACAP38 und PACAP27 im Kontusionsgebiet und im Perikontusionsgebiet.

Bei der Beantwortung der Frage, wie PACAP nach Schädel-Hirntrauma exprimiert wird, findet man zwei gegensätzliche Studien. Nach Skoglosa kommt es zu einem prolongierten Anstieg der PACAP-mRNA (Skoglosa et al., 1999). Jaworski hingegen kann weder eine erhöhte Expression von PACAP-mRNA noch von PAC1-Rezeptor-mRNA demonstrieren (Jaworski, 2000). Es ist allerdings zu bedenken, dass PACAP nach Schädel-Hirntrauma durchaus, auch ohne korrespondierende mRNA-Erhöhung, erhöht sein könnte, denn dies wurde für andere Neuropeptide schon belegt (Ma and Bisby, 1999). Bisher war die Proteinexpression von PACAP nach humanem Schädel-Hirntrauma noch nicht Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen.

Wir konnten auf Proteinebene im Perikontusionsgebiet einen signifikanten Expressionsanstieg von PACAP38 und PACAP27 in allen Überlebensgruppen nach Schädel-Hirntrauma zeigen. Der Anstieg liegt auf den Median bezogen zwischen 34% und 119% für PACAP38 und zwischen 45% und 122% für PACAP27. Im Kontusionsgebiet hingegen ist die Expression von PACAP38 und PACAP27 bis zu Überlebenszeiten bis 99 Tage signifikant vermindert. Danach kommt es zu einer Angleichung an das Expressionsniveau der Kontrollfälle. Der Expressionsrückgang beträgt insgesamt für PACAP38 zwischen 12% und 50% und für PACAP27 zwischen 8% und 36% (beide medianbezogen).

Der Rückgang im Kontusionsgebiet erklärt sich, wie weiter oben bereits erwähnt, am ehesten durch den direkten mechanischen Schaden. Die Zunahme in der letzten Gruppe könnte durch die schlechte Abgrenzbarkeit des ehemaligen Kontusionsgebietes erklärbar sein. Der starke Expressionsanstieg im perikontusionellen Gebiet könnte als gegenregulatorische Reaktion dienen, um zum Beispiel eine Upregulation der Glutamattransporter zu erzielen und/ oder die inflammatorische Antwort auf das Trauma zu inhibieren und so einen prolongierten Untergang von Hirngewebe zu verhindern. Eventuell ist der geringere Expressionsverlust von EAAT1 und EAAT2 im Perikontusionsgebiet unter anderem auf eine vermehrte Wirkung von PACAP zurückzuführen. Dies könnte Gegenstand weiterer Arbeiten sein.

Ein großer Teil der CNP-positiven Oligodendrozyten exprimiert PACAP und die glialen Glutamattransporter.

Wir fanden eine Coexpression von EAAT1 in 63% bis 80% der CNP-positiven Oligodendrozyten, EAAT2 wurde in 53% bis 68% der Fälle coexprimiert. Diese Werte liegen höher als in einer vergleichbaren Arbeit (van Landeghem et al., unpublished). Dieser Unterschied kann in der geringen Fallzahl dieser Arbeit begründet sein und könnte in weiteren Arbeiten mit höheren Fallzahlen verifiziert werden. Für Oligodendrozyten der weißen Substanz konnte in vitro eine Expression von EAAT1 und EAAT2 auf mRNA- und Proteinebene gezeigt werden. Die EAAT1-Expression in diesen Zellen überwog die von Astrozyten und Mikroglia (Kondo et al., 1995). Unterstützt werden diese Ergebnisse durch die Demonstration der schnellen D-Aspartat-Aufnahme durch Oligodendrozyten in dissoziierten gemischten Zellkulturen aus fetalem Mäusehirn (Reynolds and Herschkowitz, 1986).

Eine PACAP38-Coexpression sahen wir in 77% bis 90% der CNP-positiven Oligodendrozyten. Eine PACAP27-Coexpression fanden wir in 55% bis 81% der Fälle. Diese Ergebnisse stimmen gut mit einer Arbeit über die globale Hypoxie überein (van Landeghem et al., unpublished) und sind der erste Hinweis auf eine PACAP-Expression in Oligodendrozyten. Der relative Anteil von CNP/PACAP-doppelmakrierten Oligodendrozyten an allen CNP-positiven Oligodendrozyten nimmt im Kontusions- und Perikontusionsgebiet zu. Für PACAP konnte bereits eine regulative Funktion für die Aktivität von Neuronen und Gliazellen in verschiedenen Gehirnregionen wie Neocortex (Pellegrini et al., 1998), Hippocampus (Kondo et al., 1997) und Hypothalamus (Nomura et al., 1999) gezeigt werden. In primären Astrozytenzellkulturen von Mäusen, genauso wie in Rattengehirnen, induziert PACAP38 die Glutamataufnahme und die Expression von Glutamattransportern (Figiel and Engele, 2000; Schluter et al., 2002). In einem Modell der transienten globalen Ischämie an Ratten bewirkte exogenes PACAP38 eine Verlängerung der Überlebenszeit von CA1-Neuronen (Uchida et al., 1996). Unsere Daten unterstützen die Hypothese, dass CNP-positiv Oligodendrozyten als Modulatoren von Neuronen und Gliazellen in vivo fungieren und neuroprotektive Effekte besitzen.

CNP/EAAT-doppelmarkierte Oligodendrozyten und CNP/PACAP-doppelmarkierte Oligodendrozyten verhalten sich im Perikontusionsgebiet unterschiedlich.

Die Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung korrelieren gut mit der lichtmikroskopischen: Für mit EAAT1 und EAAT2 doppelmarkierte CNP-positive Oligodendrozyten findet man einen Zellzahlrückgang im kontusionellen (um 41% bis 64% und um 35% bis 62%) und perikontusionellen (um 12% bis 37% und um 11% bis 38%) Gebiet. Dieser ist im Kontusionsgebiet stärker ausgeprägt und hält deutlich bis in die Überlebensgruppe >7d an. Im Perikontusionsgebiet hingegen kommt es nach initialem Abfall, schon ab einem Überlebensintervall >24h post Trauma, zu einem Anstieg der Zellzahlen, der jedoch immer unter dem Kontrollniveau bleibt. Diese Daten unterstützen die Annahme, dass auch Oligodendrozyten an der Glutamataufnahme beteiligt sind und diese Aufnahme nach Schädel-Hirntrauma erheblich gestört ist, mit konsekutiver Erhöhung der extrazellulären Glutamatkonzentrationen und den bekannten exzitotoxischen Auswirkungen. Diese Ergebnisse stimmen auch mit anderen Studien überein, die zeigen konnten, dass Oligodendrozyten der weißen und grauen Substanz gegenüber Ischämien und Traumata mindestens ebenso vulnerabel sind wie Neuronen (Dewar et al., 2003). Diese hohe Empfindlichkeit der Oligodendrozyten gegenüber Energiedepriavation, oxidativem Stress und Hypoxie bzw. Ischämie (Lyons and Kettenmann, 1998; McDonald et al., 1998; Yoshioka et al., 2000) kann durch verschiedene Mechanismen bedingt sein. Hoher Fett- und Eisengehalt, starke Vulnerabilität gegenüber AMPA/Kainate-Rezeptor-vermitteltem exzitotoxischem Zelltod und eine eingeschränkte antioxidativen Kapazität im Vergleich zu anderen Gliazellen (McDonald et al., 1998) werden hypothetisiert (Back et al., 2002; Juurlink et al., 1998; Patneau et al., 1994; Oka et al., 1993; Thorburne and Juurlink, 1996) Die AMPA/Kainate-Rezeptor-vermittelte Exzitotoxizität muss nach einer neuen Untersuchung beim Menschen jedoch in Frage gestellt werden, da humane Oligodendrozyten offenbar hierauf nicht so empfindlich reagieren wie bisher angenommen (Wosik et al., 2004).

Im Vergleich zu den glialen Glutamattransportern findet sich für mit PACAP38 und PACAP27 doppelmarkierte Oligodendrozyten im Kontusionsgebiet ebenfalls ein bis in die letzte Überlebensgruppe reichender Zellzahlrückgang (um 20% bis 43% und um 6% bis 28%). Im Perikontusionsgebiet hingegen findet sich nach einem initialen leichten Rückgang der Zellzahlen (um 12% und um 11%) ein Wiederansteigen, welches in der zweiten Überlebensgruppe über das Niveau der Kontrollfälle hinausreicht (um 5% und

um 25%). Der Anstieg ist bei PACAP27 ausgeprägter. In der dritten Gruppe sind die Zellzahlen den Kontrollen nahezu wieder angeglichen. Diese Ergebnisse können als gegenregulatorische Reaktion gedeutet werden, die dazu dient, den Sekundärschaden in der Perikontusion möglichst gering zu halten. Sie unterstützen die Annahme, dass auch den Oligodendrozyten eine neuroprotektive Funktion nach Schädel-Hirntrauma zukommt.

GFAP-positive Astrozyten coexprimieren die glialen Glutamattransporter und PACAP.

Wir fanden eine Coexpression von EAAT1 in 29% bis 70% der GFAP-positiven Astrozyten, EAAT2 wurde hingegen nur in 24% bis 53% coexprimiert. Die Coexpression nimmt im Kontusions- und Perikontusionsgebiet in allen Gruppen ab. Ob dies einer echten Downregulation entspricht, kann nur in Untersuchungen mit großen Fallzahlen beantwortet werden. Astrozyten wird allgemein die Hauptrolle bei der Aufrechterhaltung der Glutathomöostase via Glutamattransporter zugesprochen. Unsere Ergebnisse unterstützen diese Auffassung. Warum EAAT2 bei unseren Auswertungen deutlich weniger als EAAT1 exprimiert wird, lässt sich an dieser Stelle nicht beantworten. Auch hier sind nachfolgende Arbeiten mit größeren Fallzahlen und der Nachweis auf mRNA-Ebene sinnvoll, um statistisch aussagefähige Ergebnisse zu erhalten. Weiterhin fanden wir bei den GFAP-positiven Astrozyten eine Coexpression von PACAP38 in 49% bis 94% und von PACAP27 in 52% bis 100% der Fälle. Der relative Anteil von GFAP/PACAP-doppelmarkierten Astrozyten an allen GFAP-positiven Astrozyten steigt im perikontusionellen Gebiet deutlich an, dies kann, sollten sich diese Ergebnisse in weiteren Untersuchungen bestätigen, ein Hinweis auf eine weitere neuroprotektive Funktion von GFAP-positiven Astrozyten sein. Im Kontusionsgebiet dagegen nimmt die Coexpression ab.

GFAP/EAAT-doppelmarkierte Astrozyten und GFAP/PACAP-doppelmarkierte Astrozyten verhalten sich im Perikontusionsgebiet unterschiedlich.

Für GFAP-positive Astrozyten finden sich sehr ähnliche Ergebnisse wie für die CNP-positiven Oligodendrozyten. Im Kontusionsgebiet kommt es zu einem prolongierten Rückgang der Zellzahlen bis in die dritte Überlebensgruppe. Bei GFAP/EAAT1-doppelmarkierten Zellen beträgt dieser 21% bis 76%, bei GFAP/EAAT2-doppelmarkierten Zellen 57% bis 73%. GFAP/PACAP38-doppelmarkierte Zellen

nehmen um 22% bis 45% ab, GFAP/PACAP27-doppelmarkierte Zellen um 33% bis 52%. In der vierten Gruppe findet sich ein leichter Anstieg, die Zellzahlen bleiben jedoch deutlich unter denen der Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse zeigen die Irreversibilität des Schadens im Kontusionsgebiet: Erheblich gestörte Glutamataufnahme durch gliale Glutamattransporter und fehlende Modulation durch PACAP scheinen Ausdruck dieses schweren Schadens zu sein. Im Perikontusionsgebiet kommt es initial ebenfalls zu einem Zellzahlrückgang von GFAP/EAAT1-doppelmarkierten Zellen um 13% bis 36% und von GFAP/EAAT2-doppelmarkierten Zellen um 9% bis 45%. Jedoch findet schon in der zweiten Gruppe ein Wiederansteigen statt. In der dritten Gruppe ist das Kontrollniveau nahezu wieder erreicht. Für GFAP/PACAP38- und GFAP/PACAP27-doppelmarkierte Zellen fanden wir perikontusionell einen Anstieg der Zellzahlen über das Kontrollniveau in allen drei Gruppen (um 14% bis 90% und 17% bis 90%). Die höchsten Zellzahlen wurden in der zweiten Überlebensgruppe gefunden. Offenbar findet im perikontusionellen Gebiet eine Erholung des Glutamattransportes durch GFAP/EAAT-doppelmarkierte Astrozyten statt, die in der Gruppe >7d fast vollständig ist. Gleichzeitig kommt es zu einer deutlichen Vermehrung der GFAP/PACAP-doppelmarkierten Astrozyten. Inwieweit PACAP hier Einfluss auf die Expression der glialen Glutamattransporter ausübt, muss in weiteren Arbeiten geklärt werden. Hierfür bieten sich standardisierte Tiermodelle an.

Insgesamt konnten wir in dieser Arbeit zeigen, dass es nach Schädel-Hirntrauma zu einem deutlichen Rückgang der glialen Glutamattransporter EAAT1 und EAAT2 vor allem im Kontusionsgebiet kommt. Konsekutiv wird die extrazelluläre Glutamatkonzentration in diesem Bereich erhöht sein und über seine exzitotoxische Wirkung erheblich zum Sekundärschaden beitragen. Besonders auffällig war eine verstärkte Expression von PACAP im Perikontusionsgebiet. Wir denken, dass es sich um eine neuroprotektive Gegenregulation handelt. Ein prolongierter Untergang von Hirngewebe soll so verhindert werden. Mögliche Mechanismen sind eine Upregulation der Glutamattransporter und/ oder eine antiinflammatorische Reaktion durch PACAP. Es bleibt die Frage offen, wodurch diese Expressionszunahme gesteuert wird. Verschiedene Mechanismen wären denkbar, zum Beispiel der Verlust der Glutamattransporter, die erhöhte Glutamatkonzentration oder ein Zusammenspiel verschiedener Milieuänderungen nach Schädel-Hirntrauma und vielen anderen

vergleichbaren pathologischen Zuständen wie Morbus Alzheimer, multipler Sklerose und amyotropher Lateralsklerose.

Wichtigster Kritikpunkt an unseren Ergebnissen ist wohl die schlechte Standardisierbarkeit humaner Proben. Unsere Fälle stammen aus der Gerichtsmedizin, über bisherige Klinik und Lebensgeschichte der Patienten ist in der Regel nicht viel bekannt. Konsequenterweise kann im Einzelnen nicht ausgeschlossen werden, dass neben unterschiedlichen Entstehungsmechanismen der Schädel-Hirntraumata noch andere Faktoren, die den Status der glialen Glutamattransporter beeinflussen (zum Beispiel chronischer Alkoholabusus oder Morbus Alzheimer), vorlagen. Dennoch glauben wir, diesem Problem mit einer ausreichend hohen Fallzahl in der lichtmikroskopischen Auswertung begegnet zu sein. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung muss als Trend verstanden und durch fortführende Arbeiten überprüft werden.

Möglicherweise ist es zukünftig möglich, die Expression der Glutamattransporter pharmakologisch auch beim Menschen zu beeinflussen. Dass es hierfür eventuell bereits potente Medikamente gibt, konnte eine aktuelle in-vitro-Studie von Rothstein et al. zeigen. Ceftriaxon, ein β -Lactam-Antibiotikum, bewirkte in einem Tiermodell (Maus) der amyotrophen Lateralsklerose (ALS) einen geringeren Neuronenuntergang, verzögerte den Verlust der Muskelkraft und erhöhte die Überlebensrate der Versuchstiere. β -Lactam-Antibiotika erhöhen via Genaktivierung die Expression von EAAT2 und ferner die biochemische und funktionelle Aktivität dieses Glutamattransporters in vitro (Rothstein et al., 2005). Ob sich dadurch ein klinischer Nutzen ziehen lässt, bleibt abzuwarten. Gleiches gilt für die Zufuhr von exogenem PACAP als neuroprotektive Strategie. Bis dahin kann die Letalität und die Prognose des schweren Schädel-Hirntraumas nur durch eine enge Verzahnung von Klinik und Forschung zum Nutzen des Patienten gesenkt beziehungsweise verbessert werden.