

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik
der Ludwig-Maximilians Universität München
Klinikum Innenstadt
Direktor: Prof. Dr. med. Wolf E. Mutschler

**ANALYSE IMMUNKOMPETENTER
ZELLEN UND MEDIATOREN IM LIQUOR
NACH SCHWEREM SCHÄDEL-HIRN-
TRAUMA**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Tom Müller
aus
Nordhausen
2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. P. Biberthaler

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. H. J. Schneider
Prof. Dr. med. M. Vogeser

Promovierter Betreuer: Dr. med. C. Kirchhoff

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 21.10.2010

Für André († 2003)

Inhalt

1	Einleitung und Hintergrund.....	1
1.1	Pathophysiologie des SHT	5
1.1.1	Primärer Hirnschaden.....	5
1.1.2	Sekundärer Hirnschaden	8
1.2	Blut-Hirn-Schranke	10
1.3	Funktionalität der Blut-Hirn-Schranke.....	12
1.4	Inflammation nach SHT	13
1.5	Immunkompetente Zellen	16
1.5.1	B-Lymphozyten.....	19
1.5.2	T-Lymphozyten	20
1.5.3	Monozyten.....	23
1.6	Interleukinrezeptor-Antagonist (IL-1ra)	24
1.7	N-terminales proBrain Natriuretic Peptide (NTpro-BNP).....	28
2	Fragestellung.....	30
3	Patienten und Methoden.....	31
3.1	Studiendesign	31
3.1.1	Ein- und Ausschlusskriterien	32
3.1.2	Kontrollgruppe	33
3.2	Gewinnung der Liquor- und Blutproben.....	34
3.3	Methoden.....	35
3.3.1	Analyse der zellulären Subpopulationen.....	35
3.3.2	Analyse von IL1-ra.....	39
3.3.3	Analyse von NT-pro-BNP.....	40
3.4	Funktion der Blut-Hirn-Schranke.....	40
3.5	Statistische Auswertung	41
4	Ergebnisse	42
4.1	Klinische Daten	42
4.2	Quantifizierung der Blut-Hirn-Schranke.....	45
4.3	Durchflusszytometrische Analysen.....	46
4.3.1	B-Lymphozyten.....	46
4.3.2	T-Helferzellen	48
4.3.3	T-Killerzellen	54
4.3.4	Natürliche Killerzellen	58
4.4	IL-1ra.....	60
4.5	NT-Pro-BNP.....	63
5	Diskussion	66
5.1	Patienten- und Probandenkollektiv	67

5.2	Durchflusszytometrische Analysen.....	68
5.2.1	B-Lymphozyten.....	68
5.2.2	T-Lymphozyten.....	71
5.2.3	NK-Zellen.....	73
5.3	Analyse von IL-1ra.....	73
5.4	NT-Pro-BNP.....	77
6	Zusammenfassung.....	80
7	Literaturverzeichnis.....	83
8	Abkürzungsverzeichnis.....	97
9	Lebenslauf.....	99
10	Danksagung.....	101

1 EINLEITUNG UND HINTERGRUND

Das schwere Schädel-Hirn-Trauma (SHT) ist die häufigste Todesursache in der Altersgruppe zwischen 15 und 30 Jahren. In den USA erleiden schätzungsweise 500.000 Patienten pro Jahr ein SHT (180). 1990 führten Unfälle weltweit zu 5.563.000 intrakraniellen Verletzungen (125). Unter einem Schädel-Hirn-Trauma wird eine dauerhafte oder vorübergehende Schädigung des Gehirns infolge stumpfer oder penetrierender Gewalteinwirkung verstanden. Das Verletzungsmuster kann ausgesprochen vielfältig sein. So können Verletzungen der Kopfschwarte, Frakturen des Schädelsknochens, gedeckte und offene Hirnverletzungen sowie Gefäßverletzungen resultieren.

Die Mortalität des schweren Schädel-Hirn-Traumas wurde in einer prospektiven Untersuchung der *Traumatic Coma Data Bank* (TCDB) in den USA untersucht. In dieser Kohorte betrug die Mortalität etwa 37% (96). Diese Zahl entspricht im Wesentlichen der aus anderen Studien mit geringeren Patientenzahlen (25;117). Nach retrospektiven Erhebungen der *Centers of Disease Control* (CDC) in den USA ist die Mortalität in den vergangenen 15 Jahren um über 20% gesunken (164).

Für Deutschland liegen derzeit keine exakten epidemiologischen Daten zur Häufigkeit, Schwere und Art von Schädel-Hirnverletzungen vor, insbesondere, wenn diese in Verbindung mit anderen schwerwiegenden Schädigungen im Rahmen eines Polytraumas auftreten. Dies ist bei ca. 90% der Mehrfachverletzten der Fall. Aus Erhebungen des Bundesamtes für Statistik geht hervor, dass 1994 ca. 10.000 Patienten an den Folgen eines schweren SHTs starben. Untersuchungen des Traumaregisters der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie zufolge erleiden ca. 200-300 Patienten pro 10.000 Einwohner ein Schädel-Hirn-Trauma unabhängig vom Schweregrad. Hauptursache stellen die stumpfen Gewalteinwirkungen bei Verkehrs-, Sport- und Freizeitunfällen dar. In der Gruppe der schweren Schädel-Hirn-Traumen zeigt nur jeder vierte Patient eine gute Erholung ohne oder mit nur geringen

neurologischen Defiziten wie moderate kognitive Einschränkungen. In 15 % der Fälle resultiert ein permanenter vegetativer Zustand bzw. Invalidität.

Über die volkswirtschaftlichen Auswirkungen in Deutschland kann nur spekuliert werden, da hierzu bislang keine hinreichende statistische Auswertung vorliegt.

Dagegen wurde in Nordamerika die Verteilung der Leistungen von der Primärversorgung über die stationäre Behandlung bis hin zur anschließenden Rehabilitation bei SHT gut untersucht. Diesen Studien zufolge werden jährlich etwa 38 Milliarden US-Dollar für die Behandlung von Patienten mit schwerem SHT aufgewendet. Dabei entstehen ca. 12 % der Kosten direkt durch die Therapie und ca. 88 % durch die Rehabilitation und andere Folgekosten (112).

Zusammengefasst stellt das schwere SHT für Betroffene und die Gesellschaft ein erhebliches medizinisches und sozial relevantes Problem dar.

Hinsichtlich der klinischen Einteilung des SHTs hat sich der 1974 von Jennett und Teasdale, zwei Neurochirurgen an der Universität Glasgow, eingeführte *Glasgow-Coma-Scale* (GCS) international durchgesetzt (77). Der GCS dient sowohl zur initialen Beurteilung sowie als Verlaufsparemeter der Schwere des SHTs. Die Ursache spielt dabei keine Rolle. Nachteile werden bei intubierten, sedierten bzw. alkoholisierten sowie bei Patienten mit Augenschädigungen angegeben. In der Akutbeurteilung eines Komats inkl. traumatischer Genese ist der GCS unbestritten.

Anhand dreier leicht zu beurteilender Parameter (Augenöffnen, beste verbale Reaktion und beste motorische Reaktion) kann der GCS an jedem Ort und zu jeder Zeit bestimmt werden. Die Punkte werden für jede einzelne Rubrik vergeben (siehe **Tabelle 1**) und anschließend addiert. Die maximale Punktzahl ist 15 (bei vollem Bewusstsein), die minimale 3 (tiefes Koma oder Tod). Bei 8 oder weniger Punkten muss von einer schweren Funktionseinschränkung des Gehirns ausgegangen werden. Aufgrund fehlender oder

verminderter Schutzreflexe muss eine Atemwegssicherung durch endotracheale Intubation in Betracht gezogen werden.

<i>Augenöffnen</i>	spontan	4
	auf Ansprechen	3
	auf Schmerzreiz	2
	keine Reaktion	1
<i>Motorische Reaktion</i>	befolgt Aufforderung	6
	gezielte Schmerzabwehr	5
	ungezielte Schmerzabwehr	4
	Beugesynergismen	3
	Strecksynergismen	2
	keine Reaktion	1
<i>Verbale Reaktion</i>	orientiert	5
	desorientiert	4
	inadäquate Antwort	3
	unverständliche Laute	2
	keine Reaktion	1

Tabelle 1: Glasgow-Coma-Scale nach Jenett und Teasdale (77)

Basierend auf der GCS erfolgt die Unterscheidung in:

- Leichtes SHT (13 – 15 Punkte)
- Mittelschweres SHT (9 – 12 Punkte)
- Schweres SHT (3 - 8 Punkte)

Das schwere Schädel-Hirn-Trauma definiert sich somit durch einen GCS zwischen 3 und 8 Punkten und eine begleitende fassbare Hirnsubstanzschädigung.

Die im Zusammenhang mit der Rehabilitation und der Prognoseabschätzung am häufigsten verwendete Skala ist der *Glasgow-Outcome-Score* (GOS). Dieser wurde erstmals im Jahre

1975 von Jennett und Bond beschrieben (66). Ziel war es, die Beurteilung von geistigen und körperlichen Fähigkeiten im Verlauf der Erkrankung zu objektivieren und eine Aussage über das Outcome treffen zu können. Außerdem spielten sozioökonomische Überlegungen eine wesentliche Rolle. Die Skala wurde in fünf Abschnitte unterteilt, wobei die maximale Punktzahl das optimale Outcome des Patienten beschreibt. Der Tod des Patienten wird mit einem Punkt beurteilt. Therapeutische Maßnahmen können daraufhin optimal angepasst werden. Als Kritikpunkte gelten einerseits die Reduktion eines komplexen Krankheitsbildes auf fünf Abschnitte, andererseits seine fehlende Sensibilität gegenüber dem Verlauf der Remission (70).

Die Prognose für das schwere SHT konnte in den letzten 20 Jahren erheblich verbessert werden. So ist gemäß Erhebungen der *Centers of Disease Control* (CDC) in den USA die Mortalität des schweren SHT's in den vergangenen 15 Jahren um über 20% gesunken (165). Dies wird u.a. auf erhöhte Verkehrssicherheit und die verbesserte Qualität in der posttraumatischen Versorgung zurückgeführt. Dabei spielen die Fortschritte in der präklinischen Notfallrettung mit erheblich verkürzten Rettungszeiten sowie die Verzahnung mit der Schockraum- und Intensivversorgung eine herausragende Rolle. Eine Verringerung der Mortalität in der Frühphase ist demnach vor allem durch einen schnellen Transport der Patienten, die zeitliche Optimierung von Handlungsabläufen und einen allgemeinen hohen Standard in der Notfallmedizin möglich (160). Je schneller die Patienten den neurochirurgischen Kliniken zugeführt werden, desto eher können lebensrettende Operationen durchgeführt werden. Die Verringerung der Mortalität durch Verbesserung der postoperativen Therapie setzt genaue Kenntnisse der zerebralen pathophysiologischen Zusammenhänge voraus. Darauf wird im folgenden Kapitel eingegangen.

1.1 Pathophysiologie des SHT

Unter dem Begriff SHT werden Kopfverletzungen zusammengefasst, welche im Gegensatz zu äußeren Verletzungen von Weichteilen des Kopfes (Gesichtsweichteile und Kopfschwarte) den Schädel, das Gehirn und dessen Häute betreffen. SHTs entstehen meist aufgrund direkter oder indirekter mechanischer Gewalteinwirkung. Bei direkter Einwirkung wird je nach Querschnittfläche des Gegenkörpers zwischen stumpfer und scharfer Gewalteinwirkung unterschieden, wodurch geschlossene oder gedeckte bzw. offene Hirnverletzungen erzeugt werden können.

Als direkte klinische Folgen eines Schädel-Hirn-Traumas müssen zwei große Schadensgruppen, der primäre sowie der sekundäre Hirnschaden, unterschieden werden, die in zeitlicher Abfolge aber auch parallel zueinander auftreten können. Deren Ausprägungen terminieren letztendlich die Prognose des Patienten. Die pathophysiologischen Grundlagen des primären und sekundären Hirnschadens werden im Folgenden kurz skizziert.

1.1.1 Primärer Hirnschaden

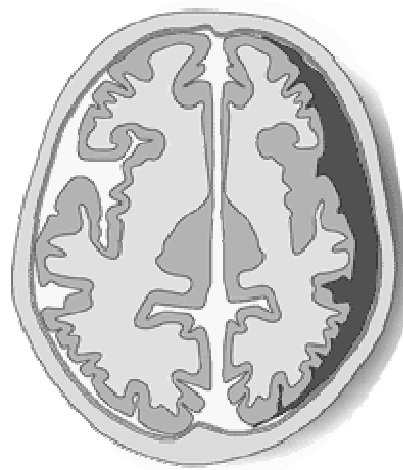
Durch die unmittelbare Einwirkung von äußerer Gewalt auf den Schädel und das Gehirn kann es zur irreversiblen Schädigung kommen, welche als primäre Hirnschädigung bezeichnet wird. Der primäre Hirnschaden wird in fokale und diffuse Schädigungen unterteilt. Fokale Läsionen umfassen Einblutungen in das Hirnparenchym, Verletzungen an Gefäßen, kontusionelle Schäden etc. Außerdem kann es nach schwerem Akzelerations- und anschließendem Dezelerationstrauma zu diffusen Schädigungen des Hirnparenchyms durch Scherkräfte an den Axonen (*diffuse axonal injuries*) aufgrund mikroskopischer axonaler Überdehnung und Membranschädigung kommen. Dies hat intra-axonale Ionenverschiebungen (v.a. von Kalziumionen) und Depolarisation zur Folge. In der Magnetresonanztomographie (MRT) können sich als radiologisches Korrelat kleinste punktförmige Blutungen u.a. im Bereich des Balkens und des dorsolateralen Hirnstamms nachgewiesen werden. Die initiale

kraniale Computertomographie (CCT) divergiert häufig aufgrund nur geringer Veränderungen von der eindrucksvollen Klinik mit tiefer Bewusstlosigkeit.

Nachfolgend abgebildet ist eine schematische Zeichnung eines axialen Schnittes durch den Schädel, die die beiden wesentlichen Blutungstypen darstellt.



Abbildung 1: Epidurale Blutung



Subdurale Blutung

In diesem Zusammenhang muss auf die anatomischen Besonderheiten des Schädels und die Monroe-Kellie-Doktrin eingegangen werden. Diese basiert auf der Tatsache, dass der Schädel ein starrer Hohlraum ist, dessen Volumen immer konstant bleibt. Mokri veröffentlichte 2001 eine interessante Übersichtsarbeit zu diesem Thema (120). Folgende Gleichung verdeutlicht die pathophysiologische Besonderheit, dass die Summe der drei Kompartimente (Hirngewebe, Liquor und Blut) stets konstant bleiben muss, um den intrakraniellen Druck konstant zu halten.

$$\text{Volumen}_{\text{intrakraniell}} = \text{Volumen}_{\text{Hirn}} + \text{Volumen}_{\text{Liquor}} + \text{Volumen}_{\text{Blut}}$$

Die Monroe-Kellie-Hypothese drückt somit eine Volumenabnahme eines Kompartiments als Folge einer Zunahme eines anderen aus. Beispielsweise führt somit eine intrakranielle

Blutung zu einer Volumenabnahme des Gehirns mit konsekutiver Druckerhöhung. Aufgrund der Anatomie des Schädels und dessen Funktion als knöcherner Begrenzung resultiert das Anschwellen von Hirngewebe in einem Abfall der cerebralen Perfusion. Dies kann bereits nach kürzester Zeit zu irreversiblen Schädigungen führen. Als Reservevolumen fungiert im Wesentlichen nur der Liquor bzw. die Liquorräume, der aus Ventrikeln, Zisternen und Gehirnfurchen ausgepresst und rasch in den etwas besser dehnbaren spinalen Raum verschoben werden kann.

Abbildung 2 verdeutlicht die Änderung der Hirnkompartimente bei intrakranieller Raumforderung.

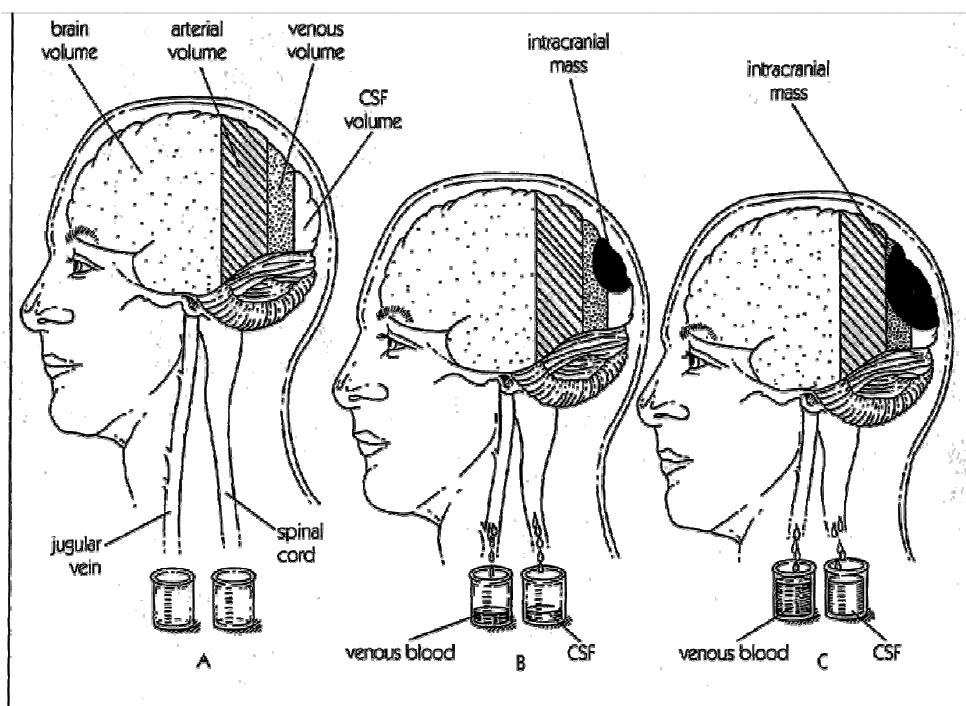


Abbildung 2: Monro-Kellie-Doktrin: Konstanz des intrakraniellen Volumens bestehend aus den drei Kompartimenten: Hirn, Liquor und Blut.

1.1.2 Sekundärer Hirnschaden

Im weiteren zeitlichen Verlauf nach Trauma treten intra- und extrakraniell bedingte Sekundärschäden auf. Der sekundäre Hirnschaden ist bei ca. 90% der verstorbenen SHT-Patienten histopathologisch nachzuweisen (116). Stein et al. zeigen, dass bei moderater primärer Gewalteinwirkung der sekundäre Hirnschaden als unabhängige prognostische Variable für die Letalität eingeht (170).

Pathophysiologisch kommt es zu ödem- oder blutungsbedingten Hirnschwellungen mit nachfolgendem Anstieg des intrakraniellen Druckes (ICP) daraus resultierender Kompression der Ventrikelsysteme und zur Minderperfusion des Gehirns. Hypotonie und Hypoxie beeinflussen den sekundären Schaden als extrakranielle Faktoren ebenfalls.

Der sekundäre Hirnschaden wird einerseits durch die physiologischen Reaktionen der zerebralen Gefäßversorgung auf das Trauma, andererseits durch die Ausbildung einer akuten Entzündungsreaktion im Areal des geschädigten Gewebes verursacht. Er kann sich dadurch über das Areal der primären Läsion ausdehnen (13).

Nach heutiger Erkenntnis stellen die lokale Ischämie und Hypoxie von primär vitalem Gewebe die Hauptursache für sekundäre Hirnschäden dar. Die Voraussetzung zur Vermeidung einer zerebralen Ischämie ist die Kenntnis der möglichen Ursachen, die in **Tabelle 1** aufgeführt sind.

	Systemische Ursachen	Intrakranielle Ursachen
<i>Eingeschränkte O₂-Versorgung</i>	Hypoxämie	Erhöhter ICP
	Hypotonie	Vasospasmus
	Anämie	Verlust der Autoregulation
<i>Erhöhter O₂-Verbrauch</i>	Pyrexie	Krämpfe
<i>Azidose</i>	Hyperglykämie	
	Hyperkapnie	

Tabelle 1: Die häufigsten Ursachen der zerebralen Ischämie nach einem schwerem SHT (*modifiziert nach:* (34))

Lokale Ischämie und Hypoxie verursachen im weiteren Verlauf die Ödembildung, den Ablauf inflammatorischer Kaskaden und Störungen der Mikrozirkulation. Der sekundäre Hirnschaden ist aus diesen Gründen nicht nur von der primär einwirkenden Gewalt, sondern auch von Faktoren, welche die lokale Ischämie und Hypoxie verursachen oder verstärken, abhängig. In diesem Zusammenhang werden Zusatzverletzungen, die einen hämorrhagischen Schock oder generelle Hypoxie bedingen, diskutiert. Andererseits ist der intrakranielle Druckanstieg bedingt durch Hämatome und Hirnödem mit resultierender Gewebskompression ein überaus wichtiger Faktor, der Einfluss auf Ischämie und Hypoxie nimmt. Mehrere Studien weisen auf eine Korrelation von ICP und klinischem Outcome hin (130;145).

Für die lokale Durchblutung des Hirngewebes ist der zerebrale Perfusionsdruck (CPP) von entscheidender Bedeutung. Dieser errechnet sich aus der Differenz des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) in der Arteria carotis interna und des intrazerebralen Druckes (ICP).

$$\text{zerebraler Perfusionsdruck(CPP)} = \text{arterieller Mitteldruck (MAP)} - \text{intrakranieller Druck (ICP)}$$

(wobei $MAP = P_{dia} + 1/3 (P_{sys} - P_{dia})$; Messung des MAP in Ohrhöhe)

Bei längerer Unterschreitung des Wertes von 60-70 mmHg kommt es zu einer bedrohlichen Minderperfusion des Gehirns mit deutlichem Anstieg der Letalität. Diese insuffiziente Durchblutung führt zu ausgeprägter Schädigung des Zellstoffwechsels mit Elektrolytverschiebungen sowie Freisetzung von Sauerstoffradikalen und anderen toxischen neurochemischen Substanzen (13). Ein ausreichend hoher CPP ist somit ein wichtiges Therapieziel in der Akutversorgung der Patienten und entscheidend für die Minimierung sekundärer Hirnschäden (147). Die folgende Abbildung zeigt die Komplexität der Zusammenhänge bei der Entstehung des sekundären Hirnschadens mit letztlich erhöhtem intrakraniellen Druck und einige therapeutische Möglichkeiten, auf die im Rahmen dieser Arbeit nicht eingegangen werden soll.

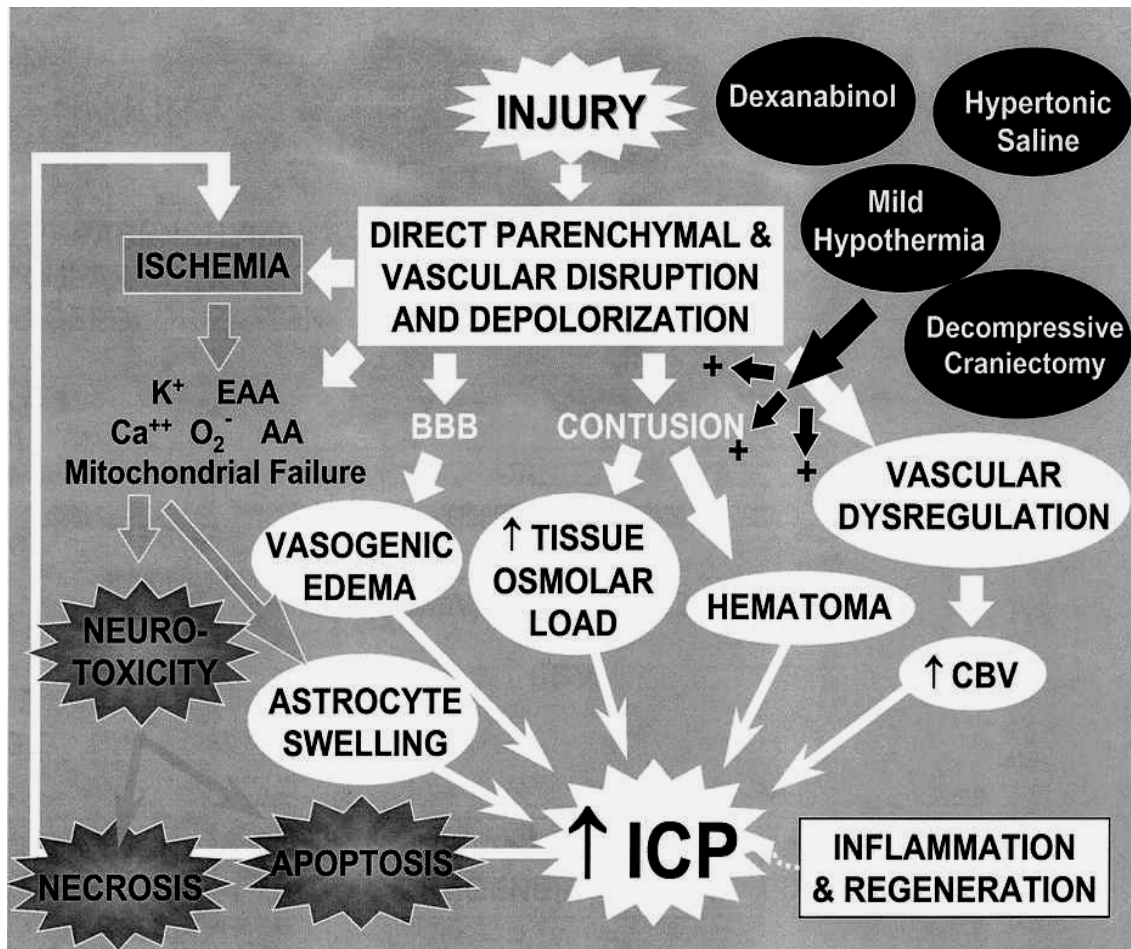


Abbildung 3: Systematik des sekundären Hirnschadens und experimentelle Therapieansätze (aus (13))

1.2 Blut-Hirn-Schranke

Paul Ehrlich beobachtete im Jahre 1895, dass die intravenöse Injektion bestimmter Farbstoffe bei Versuchstieren zu einer Färbung aller Organe mit Ausnahme des Gehirns führte. Er nannte diese Barriere zwischen Gehirn und Blut Blut-Hirn-Schranke (BHS). Bei Wirbeltieren mit geschlossenem Blutkreislaufsystem wird sie von Astrozytenfortsätzen, den Endothelzellen der Kapillaren und der Basalmembran gebildet (Abbildung 4). Des Weiteren beinhaltet ihre Funktionalität auch eine metabolische Schranke, die durch die endothelialen Enzyme gebildet wird. Die Endothelzellen schotten das Kapillarlumen gegen das Interstitium des Gehirns ab, da sie im Gegensatz zu den Kapillarendothelien anderer Organe kaum transzelluläre Poren besitzen und untereinander mit Tight junctions verbunden sind.

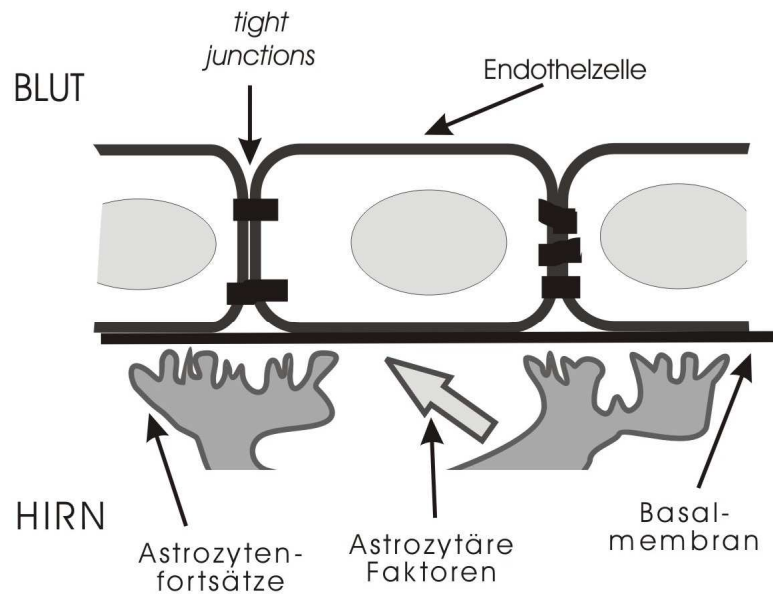


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Blut-Hirn-Schranke (nach (150))

Aufgrund dieser anatomischen Besonderheit ist die Endothelschranke für lipidlösliche Substanzen durchlässig. Metabolite wie Glucose und einige Aminosäuren werden mittels Transportproteinen in der inneren und äußeren Endothelzellmembran durch die BHS geschleust. Fabry sowie Lassmann et al. zeigen, dass Serumbestandteile, Antikörper und immunkompetente Zellen nur einen sehr eingeschränkten Zutritt zum Hirngewebe haben (47;93). Obwohl Tight junctions im Kapillarendothel die Regel sind, ist ein kleiner Anteil der Hirnkapillaren fenestriert, und zwar im Bereich der Plexus choroidei und zirkumventrikulärer Organe. In diesem Fall liegt die Barriere im nahe gelegenen Ependym. Dies ist die sogenannte Blut-Liquor-Schranke. Die Liquorbildung erfolgt hauptsächlich in den Plexus choroidei, in geringerem Maße auch an den Kapillaren der Blut-Hirn-Schranke. Die Ionenkonzentrationen des Liquor cerebrospinalis werden physiologisch in besonders engen Grenzen konstant gehalten. Dies ist für die Funktionalität des Gehirns unerlässlich.

Während bei der Produktion des Liquors die Zusammensetzung der gebildeten Flüssigkeit exakt reguliert wird, ist eine solche Selektivität bei der Resorption nicht festzustellen. Die Resorption erfolgt in den Wurzelaschen der Hirn- und Spinalnerven sowie in den Arachnoidalvilli der zerebralen Sinus. Ausschlaggebend ist der hydrostatische Druckgradient

zwischen Liquor und hirnvenösem Blut. Die Arachnoidalvilli erfüllen dabei eine Klappenfunktion. Dieser Resorptionsmodus bedingt eine erhöhte Liquorresorption bei erhöhtem Hirndruck.

1.3 Funktionalität der Blut-Hirn-Schranke

Die BHS ist im eigentlichen Sinne eine morphologisch definierte Struktur. Die entscheidende Funktion für die Liquordiagnostik hat die Blut-Liquor-Schranke. Sie beschreibt pauschal das Verhältnis der Proteinkonzentrationen zwischen venösem und (lumbalen) Liquor und schließt somit zusätzlich zur BHS dynamische Prozesse ein, die mit einer rein morphologischen Definition nicht erfasst werden können. Dabei handelt es sich u.a. um den Liquorfluss (141). Neben der Vielfalt der oben beschriebenen morphologischen Strukturen, die den Diffusionsweg der Moleküle zwischen Blut und Liquor bestimmen, hat die zusätzliche Wirkung des Liquorflusses dazu geführt, dass für den Zusammenhang zwischen Proteinen im Liquor und Blut von einer Blut-Liquor-Schrankenstörung gesprochen wird (141).

Hansotto Reiber entwickelte ein Quotientendiagramm zur Analyse von Immunglobulinen im Liquor im Rahmen der Diagnostik neurologischer Erkrankungen (139;140). Dabei werden jeweils Quotienten aus den Konzentrationen des Albumins und der Immunglobuline in Serum und Liquor gebildet und grafisch gegeneinander aufgetragen. Daraus ist ersichtlich, ob bestimmte Immunglobuline im Körper oder im Bereich des zentralen Nervensystems gebildet werden. Diese Diagramme sind bei der Diagnostik entzündlicher Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS) hilfreich.

Durch die Bildung eines Liquor/Serum-Quotienten wird der Einfluss der individuellen Blutkonzentration eines Proteins auf seine Liquorkonzentration eliminiert. Bei der dadurch errechneten normalisierten Liquorkonzentration handelt es sich um einen dimensionslosen Quotienten mit Werten zwischen 0 und 1 (140).

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Quantifizierung der Blut-Hirn-Schranke nur der Liquor-Serum-Quotient für Albumin bestimmt. Nach Arbeiten von Tibbling und Link aus dem Jahr 1977 bildet der Albuminquotient den funktionellen Zustand der BHS sehr gut ab (98;99). Da Albumin ausschließlich in der Leber synthetisiert wird, erfüllt es die Voraussetzungen für eine Testsubstanz, die im ZNS selbst nicht gebildet wird. Auch unter pathologischen Umständen stammt das Albumin im Liquor ausschließlich aus dem Blut. Aus diesem Grund lässt der Liquor-Serum-Albuminquotient eine individuelle Aussage über die BHS-Funktion zu (143;144). Die richtige Interpretation setzt voraus, dass die Probenentnahmen aus Blut und Liquor zum gleichen Zeitpunkt stattfinden. Liegt eine erhöhte Konzentration im Liquor bei unveränderter Serumkonzentration vor, so spricht dies für eine erhöhte Durchlässigkeit der BHS. In diesem Fall lässt sich ein erhöhter Albuminquotient nachweisen. Felgenhauer und Reiber sehen die Ursache für eine gestörte BHS-Funktion in der gesteigerten Gefäßpermeabilität an den Grenzschichten des Liquorkompartments (142).

1.4 Inflammation nach SHT

Die posttraumatische Entzündungsreaktion ist maßgeblich an der Ausbildung sekundärer Hirnschäden beteiligt und spielt damit eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie des SHTs. Entzündungsreaktionen dienen dem Körper zum Schutz gegen innere und äußere Angriffe. Ziel der Inflammation ist es, den Körper in eine erhöhte Abwehrbereitschaft zu versetzen, was mit einer gesteigerten Immunantwort verbunden ist. Inflammation ist eine Antwort des Körpers auf Trauma, Gewebischämie, Autoimmunreaktionen oder Infektionen. Entzündungsreaktionen haben im Allgemeinen einen akuten Verlauf. Chronifizierend wirkt eine unzureichende Elimination des auslösenden Agens oder verselbstständigte Autoimmunreaktionen (58). Außerhalb des Gehirns ist die Entzündung durch Schwellung, Ödem, Rötung, Erwärmung des betroffenen Gebietes charakterisiert. Aktuellere Definitionen schließen die Einwanderung von immunkompetenten Zellen sowie die Induktion bzw.

Aktivierung von spezifischen Mediatoren wie Kinine, Produkte der Cyclooxygenase und Zytokine ein (104).

Das zentrale Nervensystem (ZNS) galt lange Zeit als immunprivilegierte Region, in der kein Austausch zwischen den Zellen des Immunsystems und den Zellen der Nervensystems stattfindet (171;172). Dies liegt einerseits daran, dass sich innerhalb des Gehirns kein Lymphsystem befindet. Arachnoidea und Virchow-Robin-Raum stellen hier Ausnahmen dar. Andererseits unterscheidet sich das Gehirn von anderen Organen durch das Vorhandensein der BHS. Neue Studien konnten jedoch zeigen, dass es Wechselwirkungen zwischen Gehirn und Immunsystem gibt (72;92). Aufgrund der Funktionalität der BHS haben Serumbestandteile, immunkompetente Zellen sowie Antikörper aus der Körperperipherie nur in geringem Maße Zutritt zum Hirngewebe (47;93). Es ist weiterhin unbestritten, dass sich das Gehirn von anderen Geweben sowie der Antwort auf pathophysiologische Einwirkungen wie Infektion oder Inflammation von diesen Geweben unterscheidet. Beispielhaft sei die verzögerte und milde Einschwemmung von Leukozyten in das betroffene Gebiet im Gegensatz zur sofortigen Rekrutierung in vielen systemischen Organen genannt.

Tabelle 2 gibt einen kleinen Überblick über die Pathophysiologie der Inflammation im ZNS:

→ Aktivierung der Mikroglia
→ Ödembildung
→ MHC Expression
→ Systemische Inflammation mit Synthese von Akutphase-Proteinen
→ Synthese von inflammatorischen Mediatoren (Zytokine, freie Radikale, Prostaglandine)
→ Expression von Adhäsionsmolekülen
→ Invasion von immunkompetenten Zellen

Tabelle 2: Pathophysiologische Folgen der ZNS-Inflammation

Das Risiko einer Schädigung von außen wird durch die strenge Selektion der den Liquorraum überwachenden Immunzellen so gering wie möglich gehalten. Im ZNS ist dies besonders wichtig, da hier kleine Schädigungen bereits schwerwiegende Folgen haben können und die neuronale Regenerationsfähigkeit sehr begrenzt ist. Trotz dieser Schutzmaßnahmen werden im ZNS inflammatorische Prozesse beobachtet. Werden beispielsweise Neurone schädigenden mechanischen oder biochemischen Einflüssen ausgesetzt, startet eine inflammatorische Kaskade, die zum neuronalen Zelltod führen kann (104). Diskutiert werden diesbezüglich die Freisetzung von Neurotransmittern, Störungen in der Ionenverteilung sowie der Verlust von wichtigen Membranpotenzialen. Beispielsweise werden große Mengen exzitatorischer Neurotransmitter bei veränderter Kalzium-Homöostase ausgeschieden. Halliwell et al. beschreiben eine intraneurale Bildung toxischer Sauerstoffradikale, die Folge der Bindung an ionotropen Glutamatrezeptoren ist (67;84). Diese Sauerstoffradikale können mit neuronalen Makromolekülen reagieren und unter den Bedingungen des Primärschadens toxisch wirksam kumulieren. Daraufhin wird eine Vielzahl proinflammatorischer Faktoren freigesetzt, die eine schnelle Aktivierung immunkompetenter Zellen nach sich ziehen (57).

Einen großen Einfluss auf Auslösung, Regulation und Suppression haben aktivierte Mikrogliazellen, welche als intrinsische Gehirnmakrophagen fungieren. Diese sind primär für die Entzündungsreaktion verantwortlich. Dabei kommt es zur Einwanderung ins geschädigte Gewebe und nachfolgend zur dortigen Aktivierung (11;29;86). Durch die Produktion einer Vielzahl von Substanzen wie Zytokine, Chemokine, Adhäsionsmoleküle und Sauerstoffradikale greifen Mikrogliazellen entscheidend in alle Stadien der Neuroinflammation ein und sind an Auslösung, Steuerung und Suppression der Immunantwort maßgeblich beteiligt. (54;69;136). Infolge der Faktoren, die im Prozess der Neuroinflammation von Mikrogliazellen und anderen emigrierten Immunzellen wie z.B. T-Zellen und peripheren Leukozyten gebildet werden können, entsteht die sekundäre Neurodegeneration, die entweder parallel oder zeitlich versetzt zum Primärschaden initiiert

wird. Dabei werden Neurone, die den Primärschaden initial überlebt haben, abgetötet, so dass sich das Gebiet des sekundären Hirnschaden im Vergleich zum Primärschaden ausdehnen kann. Der neuronale Gewebsschaden, der paradoxerweise durch die immunkompetenten Zellen getriggert wird, ist durch die Produktion zytotoxischer Komponenten eben dieser infiltrierten Immunzellen begründet (48;123). Der Verlauf einer Neuroinflammation ist immer vom auslösenden Reiz, der Anzahl eingewanderter und aktivierter Mikrogliazellen und auch von der Anzahl und Art anderer immunkompetenten Zellen abhängig (132;158).

Therapeutische Maßnahmen konzentrieren sich, basierend auf den geschilderten Erkenntnissen, auf die Stimulation der neuronalen Regeneration, soweit diese beeinflussbar ist (32;129) sowie auf die Neuroprotektion initial überlebender Neurone, indem die Immunantwort der in das Schadensgebiet eingewanderten Zellen unterdrückt werden soll (18;123).

1.5 Immunkompetente Zellen

Im Gehirn sind Mikrogliazellen die wichtigsten intrinsischen immunkompetenten Zellen, die für eine Entzündungsreaktion verantwortlich sind (3;87). Sie werden deshalb auch als Makrophagen des ZNS bezeichnet. Im Gesunden liegen Mikrogliazellen deaktiviert vor, besitzen aber das Potenzial phagozytotisch aktiviert zu werden. Es gibt *in vivo* keine Beweise dafür, dass Mikroglia gesunde Neurone schädigt oder zerstört (87).

Erst bei neuropathologischen Prozessen weisen Mikrogliazellen viele Gemeinsamkeiten mit Gewebsmakrophagen aber auch mit neutrophilen Granulozyten aus der Körperperipherie auf. Neutrophile Granulozyten werden bei einer Entzündung schnell mobilisiert und aus dem Knochenmark freigesetzt. Adhärenz an Endothelzellen, Durchwandern von Gefäßwänden (Diapedesis) und gezielte Migration durch Chemotaxis sind essenzielle Funktionen, die zur Ansammlung von neutrophilen und anderen Leukozyten am Entzündungsherd beitragen (58). Die Entfernung untergehender Granulozyten erfolgt in der Körperperipherie über die

nachströmenden Makrophagen. Diese sollen die unerwünschte Freisetzung gewebsschädigender Enzyme verhindern (154). Im nicht entzündeten Gewebe besteht die Aufgabe von Gewebsmakrophagen in der Beseitigung gealterter Zellen und der Produktion einer großen Anzahl löslicher Faktoren, die für die Kommunikation innerhalb des Immunsystems wichtig sind. Bei Entzündungsreaktionen werden residente Makrophagen zu einer erhöhten Funktionsfähigkeit stimuliert und aktiviert. Makrophagen gehören zu den sekretorisch aktivsten Zellen des Organismus (127).

Neutrophile Granulozyten, aktivierte Mikrogliazellen und Gewebsmakrophagen sind bedeutende Zellen der unspezifischen Abwehr. Alle drei Subpopulationen besitzen die ausgeprägte Fähigkeit zur Phagozytose. Außerdem sind sie in der Lage, proteolytische Enzyme wie Lysozym, saure Hydroasen (Kathepsine) und Kollagenasen zu produzieren. Über die Integrine sind sie zur Migration in Entzündungsgebiete befähigt (56). Die Zellen setzen zytotoxische Substanzen wie Sauerstoffmetaboliten frei und besitzen Rezeptoren für TNF- α , IL-6 und IL-1. Unter den Phagozyten sind die neutrophilen Granulozyten die potentesten Produzenten von reaktiven Sauerstoffmetaboliten (58).

Mikroglia und Makrophagen haben im Gegensatz zu neutrophilen Granulozyten eine höhere Lebensdauer von mehreren Monaten und besitzen einen ausgeprägten Syntheseparat zur Erneuerung verbrauchter Proteine. Zusätzlich weisen sie ein größeres Spektrum an produzierbaren Mediatoren, Rezeptoren und Zytokinen wie TNF- α , IL-1, IL-6 auf. Des Weiteren besitzen Mikrogliazellen/Makrophagen die Fähigkeit zur Immunregulation durch Kooperation mit Lymphozyten über eine Antigenprozessierung und Antigenpräsentation (58).

Mikrogliazellen und Makrophagen greifen in alle Stadien der Neuroinflammation ein und sind maßgeblich an der Auslösung, der Regulation, aber auch an der Suppression der Neuroinflammation beteiligt. Außerdem sind sie in der Lage, die notwendigen Heilungsprozesse im Gewebe nach einer Entzündung zu unterstützen.

Zu den erwiesenen pathophysiologischen Mechanismen nach SHT, aber auch nach ischämischem Insult, gehören:

- Aktivierung von Mikrogliazellen im Gehirn
- Aktivierung von Makrophagen aus dem Blutkreislauf
- Invasion der Zellen in das vorgeschädigte Gebiet
- Freisetzung freier Radikale und toxischer Zytokine

All diese Vorgänge führen insgesamt zur Ausbildung massiver sekundärer Schädigungen. Prinzipiell lässt sich die Immunabwehr in spezifische und unspezifische Mechanismen unterteilen. Zur unspezifischen Abwehr gehören Oberflächenbarrieren (Schleimhäute, Haut), Phagozytose (Granulozyten, Makrophagen) und Mediatoren der Entzündungsreaktion (Komplement, Zytokine, Prostaglandine, Leukotriene). Unter spezifischer Abwehr werden auf humoraler Ebene antigenspezifische Antikörper und auf zellulärer Ebene ausdifferenzierte B- sowie T-Lymphozyten subsumiert.

Grundlegende Konzepte zellulärer Immunreaktivität im Nervensystem wurden zunächst am Modell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) entwickelt. Die EAE wird in geeigneten Versuchstieren durch autoantigenspezifische CD4-T-Helferzellen vermittelt. Sie dient in Teilaspekten als Tiermodell der humanen Multiplen Sklerose (134). Es konnte gezeigt werden, dass es im Akutstadium der Erkrankung zu einer ausgeprägten Infiltration von Lymphozyten und Monozyten in das ZNS kommt (72). T-Lymphozyten exprimieren proinflammatorischer Zytokine wie Interferon (IFN)- γ , Interleukin-2 (IL-2) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) (185). Diese proinflammatorischen Zytokine exprimieren auf zerebralen Endothelzellen Adhäsionsmoleküle, welche an Integrinen auf der Oberfläche aktivierter Leukozyten binden (166). Über diesen Mechanismus erfolgen die Adhäsion und schließlich die Migration ins ZNS (30;191). Hier lösen sie eine pathogene Effektorkaskade aus, an der sowohl Gliazellen als auch hämatogen rekrutierte Makrophagen beteiligt sind (12).

Wie erwähnt, fungiert die EAE als Modell für die humane Multiple Sklerose. Trotz vieler Parallelen gibt es entscheidende histopathologische Unterschiede, welche differenzierte Untersuchungen an MS-Patienten unerlässlich gemacht haben. Die wesentlichen Strukturmerkmale der MS sind chronisch-entzündliche Entmarkungsherde, die mit Entzündung, astrozytärer Gliose und variabler Axondestruktion assoziiert sind (71). Die Läsionen sind durch ein entzündliches Zellinfiltrat, bestehend aus aktivierten T-Zellen, B-Zellen, Plasmazellen und Mikrogliazellen, charakterisiert. Den T-Zellen wird eine besondere Bedeutung bei der gerichteten Immunantwort gegen das ZNS zugesprochen (9).

Die humorale Immunantwort durch B-Zellen in der Pathogenese der MS zeigt sich in der erhöhten intrathekalen Immunglobulin-G(IgG)-Antikörperproduktion und dem Nachweis oligoklonaler Banden im Liquor, was für diagnostische Zwecke genutzt wird (121).

Die eben genannten Untersuchungen lassen die besondere Bedeutung immunkompetenter Zellen bei der Pathogenese zahlreicher neurologischer Erkrankungen erkennen.

Im Folgenden soll auf Zellgruppen eingegangen werden, die in der vorliegenden Arbeit von besonderem Interesse sind. Es handelt sich dabei um B-Lymphozyten (CD19), T-Lymphozyten (CD3) sowie um natürlichen Killerzellen (CD56).

1.5.1 B-Lymphozyten

B-Lymphozyten gehören zu den Leukozyten und bilden mit den T-Lymphozyten den entscheidenden Anteil am adaptiven Immunsystem. Charakteristisch ist ein großer rundlicher Zellkern, welcher einen hohen Chromatingehalt aufweist. Die funktionelle Prägung findet größtenteils außerhalb des Knochenmarks im lymphatischen Gewebe statt. Lymphknoten und Thymus sind exemplarisch erwähnt. Bezüglich ihrer Funktionalität und Immunphänotypisierung sind die Lymphozyten äußerst heterogen (159). Aufgabe der im Blut zirkulierenden B-Lymphozyten ist, die an beliebiger Stelle in den Körper eingedrungenen pathogenen Umweltkeime möglichst schnell zu detektieren und zu eliminieren. Dazu wandern

sie in Lymphknoten und Milz ein, reifen zu Plasmazellen heran, welche anschließend Antikörper sezernieren (115). Der erste Schritt besteht in der B-Zellaktivierung, welche entweder unabhängig von T-Zellen durch bakterielle Polysaccharide stattfindet oder mithilfe von T-Helferzellen (51;193). Dabei wird durch antigenpräsentierende Zellen der Kontakt zwischen antigenspezifischen T- und B-Zellen hergestellt. Hierfür sind sowohl die Erkennung durch T- und B-Zellrezeptor als auch Zytokine (IL-2, IL-6) und Moleküle zur Costimulation und Zelladhäsion notwendig (22;45).

B-Zellen tragen auf ihrer Oberfläche eine Reihe von funktionell wichtigen Eiweißen, welche auch zur Identifizierung der B-Zellen verwendet werden können. Es handelt sich dabei um die sogenannten Oberflächenmarker, zu denen neben den membranständigen Immunglobulinen sogenannte *Cluster of Differentiation (CD)* gehören. Dieser Begriff bezeichnet Gruppen immunphänotypischer Oberflächenmerkmale von Zellen. Diese Gruppen lassen sich nach funktionellen und biochemischen Kriterien ordnen. Charakteristisches Merkmal aller B-Zellen ist die Expressierung von CD19 auf ihrer Oberfläche. Das Molekül hat verschiedene Funktionen in der B-Zell-Hämöostase, wirkt als B-Zell-Corezeptor und ist essenziell für die Aktivierung und Differenzierung der Zellen (177).

Vorangegangene Forschungsarbeiten konnten zeigen, dass aktivierte B-Zellen und Autoantikörper eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der MS, der EAE und des Lupus erythematodes (SLE) spielen (41;59;74). Ähnliche Relevanz konnte Ankeny et al. im Rahmen von tierexperimentellen Untersuchungen bei Wirbelsäulentraumata belegen (4). Bislang gibt es keine Untersuchungen, die die Rolle der B-Zellen in der Pathogenese der Neuroinflammation nach traumatischem Hirnschaden untersuchen.

1.5.2 T-Lymphozyten

T-Lymphozyten nehmen in der Immunabwehr eine zentrale Rolle ein. Sie regulieren das spezifische sowie das unspezifische Immunsystem. T-Zellen befinden sich wie die B-Zellen

zum Teil im Blut und zum Teil in den sekundären Lymphorganen. Nach antigener Stimulation proliferieren sie und differenzieren entweder zu T-Effektorzellen oder T-Gedächtniszellen. Humane T-Zellen werden in T-Helfer und zytotoxische T-Zellen unterteilt. T-Helferzellen tragen den Marker CD4 auf ihrer Oberfläche und werden entsprechend als CD4-positive T-Zellen bezeichnet. Zytotoxische T-Zellen sind durch den Oberflächenmarker CD8 charakterisiert. Aufgrund ihres Zytokinprofils werden T-Helferzellen in TH1- und TH2-Zellen unterteilt. Im Folgenden wird auf die Subpopulationen der T-Zellen genauer eingegangen.

T-Helferzellen

T-Helferzellen fördern die Differenzierung von B-Zellen zu antikörperproduzierenden Plasmazellen und erfüllen somit bei der Induktion der Immunantwort eine wichtige regulatorische Aufgabe. Ruhende TH-Zellen können sich durch Stimulation bestimmter Zytokine in 3 Subtypen differenzieren. TH1-Zellen sezernieren ihrerseits IL-2, TNF- α , Tumor-Nekrose-Faktor-beta (TNF- β) und Interferon-Gamma (IFN- γ). TH2-Zellen sind durch die Freisetzung von Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-5 (IL-5), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8), Interleukin-10 (IL-10) und Interleukin-13 (IL-13) charakterisiert. Einige weitere Zytokine können von beiden Subtypen sezerniert werden. TH3-Zellen produzieren als Leitzytokin den Transforming-Growth-Factor-beta (TGF- β), der sowohl die Entwicklung von TH1- als auch von TH2-Zellen hemmen kann (124).

Zytotoxische T-Zellen

Zytotoxische T-Zellen (T-Killerzellen) töten körpereigene Zellen, an deren Oberfläche ein Fremdantigen auftritt. Zusätzlich müssen noch MHC-I-Moleküle auf der Zelloberfläche vorhanden sein. Nur wenn diese Kombination vorhanden ist, binden die T-Killerzellen mit ihrem T-Zell-Rezeptor, ihrem CD8-Protein und anderen Liganden an der Zielzelle. Das führt

zur lokalen Freisetzung von Perforinen und folglich zu einer irreversiblen Schädigung der Zielzelle. Außerdem produzieren und sezernieren T-Killerzellen Proteine wie das Interferon- γ , welches in benachbarten Zellen die Produktion von MHC-I fördert. Letzteres führt zu einer stärkeren Präsentation von intrazellulär abgebauten Peptiden.

In der vorliegenden Arbeit wurde für die T-Helfer- und T-Killerzellen eine potentielle frühe Aktivierung durch Analyse der Expression von CD69 untersucht. CD69 wird besonders früh nach Aktivierung der Zellen exprimiert und wird daher auch frühes Aktivierungs-Antigen (*early activation antigen*) genannt. Das Molekül besteht aus zwei unterschiedlich glykosylierten Untereinheiten, welche durch eine Disulfidbrücke zu einem Homo- bzw. Heterodimer verbunden sind (101;183). CD69 gehört zu den frühesten Aktivierungsmarkern auf B- und T-Lymphozyten sowie NK-Zellen, Makrophagen, Neutrophilen und Eosinophilen (103;179).

NK-Zellen

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) wurden in den 70er Jahren als dritte eigenständige Lymphozyten-Population neben den B- und T-Zellen entdeckt. Sie machen ca. 15 Prozent der peripher zirkulierenden Lymphozyten aus und gelten als Effektoren der angeborenen Immunität. Zu den Zellen der angeborenen Immunität gehören darüber hinaus die myeloiden Zellen wie Granulozyten, Monozyten und Makrophagen. NK-Zellen zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus, Zielzellen ohne antigene Aktivierung lysieren zu können. Auf diese Weise können sie unmittelbar Tumorzellen sowie virusinfizierte Zellen abtöten und diese kontrollieren, bis das spezifische Immunsystem adäquat reagieren kann. Daher wurden sie bald als „natürliche“ Killerzellen bezeichnet (79;80). Neben dem zirkulierenden Anteil wurden NK-Zellen auch in der Leber, dem Gastrointestinaltrakt, der Milz und der Lunge gefunden (106). Im Thymus und Lymphknoten gibt es dagegen nur sehr wenige NK-Zellen (186).

NK-Zellen und T-Zellen besitzen gemeinsame Vorläuferzellen, aus denen sich beide Populationen aber keine B-Zellen entwickeln können (31). Daraus resultiert, dass NK- sowie T-Zellen ähnliche Mechanismen der *Target-Zell-Lyse* besitzen. Im Gegensatz zu den T-Lymphozyten können NK-Zellen Zielzellen ohne spezifische Sensibilisierung angreifen. NK-Zellen unterscheiden ihre Zielzellen mit Hilfe spezieller Rezeptoren, die mit den MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Oberfläche der Zielzellen interagieren. Sie müssen nicht aktiviert werden, dennoch lässt sich die Aktivität durch Zytokine oder Interferone steigern.

Da diese Zellen aufgrund ihrer Unabhängigkeit eine Sonderstellung in der zellulären Immunantwort einnehmen, sind sie für die im Rahmen dieser Arbeit vorgenommene Studie von besonderer Bedeutung.

1.5.3 Monozyten

Zahlreiche Untersuchungen konnten belegen, dass die unspezifische zelluläre Immunabwehr eine herausragende Rolle in der posttraumatischen Entzündungsreaktion spielt (49;110). Den Monozyten wird dabei besondere Bedeutung zugeschrieben. Sie fungieren als Vorläufer der Gewebsmakrophagen sowie von Teilen der dendritischen Zellen, zirkulieren im peripheren Blut und sind mit einem Durchmesser von 12-20 μm die größten Blutzellen des menschlichen Organismus. Sie werden im Knochenmark von Stammzellen gebildet und halten sich etwa 8 bis 72 Stunden in der Blutbahn auf. Durch chemotaktische Stimuli angelockt, können Monozyten im Rahmen einer Entzündung die Gefäßwand durchwandern. Dies gelingt aufgrund der amöboiden Beweglichkeit, die Diapedese genannt wird. Danach siedeln sie sich am Ort der Entzündung an. Ihr Zellkern ist annähernd nierenförmig. Ihre Aufgaben sind einerseits die Zerstörung körperfremder Strukturen und andererseits die Antigenpräsentation mit nachfolgender Aktivierung des angeborenen Immunsystems. Unter Zytokineinfluss differenzieren sie zu dendritischen Zellen, die Antigene präsentieren (33). Monozyten bilden in der Haut, im Darm und in der Lunge eine erste Barriere gegen mikrobielle und parasitäre

Infektionen (8). Sie haben einen Anteil von ca. 7% an der Gesamtpopulation der Leukozyten. Monozyten sind keine homogene Zellpopulation. Neben den für Monozyten typischen Oberflächenmarker CD14 gibt es Subpopulationen, die den Oberflächenmarker CD16 tragen. Monozyten nehmen aufgrund der Antigenpräsentation und der Ausschüttung von Zytokinen eine zentrale Rolle in der Immunantwort von T- und B-Lymphozyten ein (184;192). Außerdem sind sie in der Lage unter dem Einfluss diverser Modulatoren zu Makrophagen zu differenzieren. Posttraumatische Fehlregulationen des Monozyten/Makrophagen Systems führen zur Unfähigkeit der Antigenpräsentation und in dessen Folge zum kompletten Versagen der zellulären Immunantwort (40). Monozyten bilden einen kompetitiven Inhibitor für Interleukin-1 (IL-1), der strukturell dem IL-1 entspricht aber biologisch inaktiv ist (43). Es handelt sich dabei um den IL-1 Rezeptorantagonist (IL-1ra). Darauf wird im folgenden Kapitel gesondert eingegangen.

1.6 Interleukinrezeptor-Antagonist (IL-1ra)

Zytokine sind Schlüsselregulatoren der angeborenen und erworbenen Immunantwort und werden von Monozyten, Lymphozyten, Makrophagen sowie natürlichen Killerzellen produziert und sezerniert. Sie werden in der Effektorphase der Immunantwort gebildet. Es handelt sich dabei um Polypeptide mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 20 KD. In der erstmaligen Beschreibung wurden diese Mediatoren als „Lymphokine“ oder auch als „Monokine“ beschrieben. Diese Nomenklatur basierte auf ihren zellulären Ursprung. Neuere Erkenntnisse zeigten, dass die Zytokine von fast allen zellkernhaltigen Zellen produziert werden, was zum aktuell benutzen Namen führte (44). Wesentliche Funktionen der Zytokine sind die direkte Kommunikation der Zellen untereinander und die Förderung der Hämatopoese. Sie sind an der Zellaktivierung und der Differenzierung im Rahmen der spezifischen und unspezifischen Immunantwort beteiligt. Die Zytokinwirkung erfolgt über Oberflächenrezeptoren auf den Zielzellen und führt zu einer zellulären Antwort in Form einer

Änderung der Proteinsynthese. Zytokine können ihre Synthese gegenseitig fördern oder hemmen. Ihre Wirkung auf die Zielzellen kann synergistisch aber auch antagonistisch sein (61).

Nach schwerem SHT kommt es zur Aktivierung proinflammatorischer Kaskaden, welche zur Ausbildung des sekundären Hirnschadens beitragen und letztendlich entscheidenden Einfluss auf das Outcome der Patienten nehmen. Die Erforschung der Beteiligung von Entzündungsmediatoren an der Ausbildung sekundärer Hirnschädigungen ist Gegenstand aktueller Forschung. Bei Patienten mit schwerem SHT lässt sich eine starke Präsenz von Zytokinen nicht nur im Plasma sondern auch im Liquor, nachweisen. Zu den am besten untersuchten Zytokinen gehören der Tumornekrosefaktor TNF- α (62;63), das Interleukin IL-6 (83;113) sowie IL-1 (63;113).

Interleukin-1 (IL-1) gilt als ein zentraler Mediator im Zytokinnetzwerk und übt unzählige Funktionen im Rahmen physiologischer und pathologischer Vorgänge aus (42). IL-1 wird neben TNF- α als Prototyp des proinflammatorischen Zytokins beschrieben (44). Es gibt zwei funktionell gleichwertige Hauptformen des IL-1, nämlich IL-1 α und IL-1 β , die durch zwei verschiedene Gene kodiert werden (7;102). Beide Formen binden an den gleichen membranständigen Rezeptor auf den Zielzellen und zeigen daher nahezu identische biologische Wirkungen (88;181).

Jüngste Untersuchungen haben gezeigt, dass letztendlich nur IL-1 β biologische Relevanz hat, da IL-1 α nur in zu vernachlässigenden Mengen synthetisiert wird (14). Die Freisetzung aus Monozyten, Makrophagen und Endothelzellen wird durch Ischämie, Hämorrhagie und mikrobielle Substanzen sowie durch inflammatorische Mediatoren, wie C5a und TNF induziert (42). Die Hauptwirkung von IL-1 β ist die Stimulation von T-Helferzellen zur Produktion von IL-2 und Expression von IL-2-Rezeptoren.

Neugebauer et al. vermuten, dass neuronales IL-1 am Informationstransfer aus der Peripherie beteiligt ist, wohingegen IL-1 aus Gliazellen die Wundheilung, neuronales Wachstum und Reparaturmechanismen vermittelt (128).

Abbildung 5 fasst die vielfältigen Effekte von IL-1 im Rahmen eines SHTs zusammen.

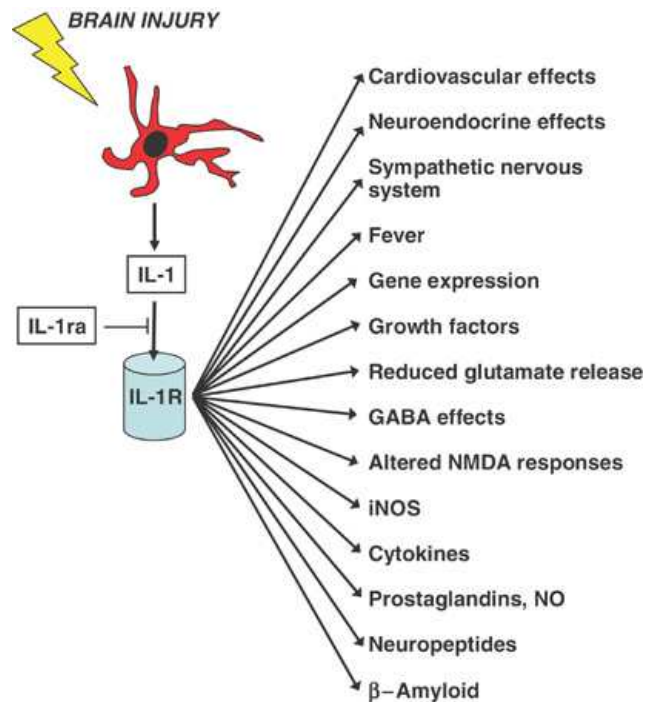


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Effekte von IL-1 im Rahmen eines SHT's, entnommen aus (104)

Der Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist (IL-1ra) ist ein weiteres Mitglied der Familie, welches um den IL-1 Rezeptor I konkurriert (43). IL-1ra, ein 23-25 Kilodalton (KD) schweres glykosiertes Protein, wird von Monozyten, Fibroblasten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, Endothelzellen, Hepatozyten sowie Gliazellen produziert. IL-1ra wirkt den biologischen Effekten von IL-1 entgegen, in dem er an den IL-1-Rezeptor bindet, ohne eine Signaltransduktion zu initiieren. Durch die Bindung an den Rezeptor wird das Andocken von IL-1 α und IL-1 β an den IL-1 Rezeptor verhindert. Somit inhibiert IL-1ra die proinflammatorische Wirkung von IL-1. Dies wurde durch eine Vielzahl von Studien belegt

(28;34;111). Diese Arbeiten konnten außerdem zeigen, dass IL-1ra eine höhere Affinität zum IL-1 Rezeptor als IL-1 α und IL-1 β hat.

Mathiesen et al. untersuchten den Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist bei Patienten nach subarachnoidaler Blutung (SAB). Tierexperimentelle Studien konnten zuvor signifikant erhöhte Werte von IL-1ra bei Ischämie detektieren. Außerdem wurde die Studie durch frühere Untersuchungen von IL-6 nach SAB motiviert, in denen Mathiesen signifikant erhöhte Werte dieses proinflammatorischen Zytokins nachweisen konnte (111). Experimentelle Studien kommen zu dem Schluss, dass IL-1 Zellschaden vermittelt (100). Im Gegensatz dazu reduziert IL-1ra den Hirnschaden nach Episoden temporärer Ischämien, wie Feuerstein et al 1994 zeigen (52). Mathiesen untersuchte daraufhin 22 Patienten mit SAB, indem er bei den Patienten täglich IL-1ra im Liquor mittels ELISA bestimmte. Als Kontrollgruppe fungierten 10 Probanden. Ziel dieser Studie war es, den Einfluss der SAB auf möglicherweise erhöhte Mediatorwerte im Liquor zu eruieren. Die Einteilung der Schweregrade erfolgte mittels der neurologischen Einteilung von Hunt und Hess. Das Outcome wurde durch den *Glasgow-outcome-score* (GOS) quantifiziert. Mathiesen konnte zeigen, dass die IL-1ra Werte bei Patienten, die in einem kritischen Zustand aufgenommen wurden, signifikant höher gegenüber denen mit leichter Schädigung waren. Außerdem stiegen die Werte während verzögerter Ischämieepisodes und nach chirurgischen Eingriffen bei Patienten in klinisch kritischem Zustand (Hunt und Hess Stadium III bis IV). Bei Patienten in stabilem Zustand gemäß des neurologischen Status konnten keine Anstiege von IL-1ra gefunden werden. Diese Ergebnisse lassen schließen, dass Patienten in schlechten neurologischen Zustand einen labilen biochemischen Status im Gehirn aufweisen, der sich in erhöhten Zytokinwerten nach dem chirurgischen Eingriff zeigt. In der Studie von Mathiesen et al. konnte gezeigt werden, dass erhöhte Werte von IL-1ra mit der Hirnschädigung korrelieren. Da bekannt ist, dass IL-1 sowie TNF- α Fieber, Leukozytose sowie die Synthese von Nitritoxid induzieren können, ist der

Schluss nahe liegend, dass diese Mediatoren sehr wahrscheinlich zum sekundären Hirnschaden und der dazu gehörenden Neuroinflammation beitragen.

1.7 N-terminales proBrain Natriuretic Peptide (NTpro-BNP)

Das Säugerherz synthetisiert und sezerniert eine Reihe verwandter Peptidhormone, die kardialen natriuretischen Hormone (169). Es handelt sich dabei um eine Gruppe von Eiweißen, die sich in ihrem Synthese- und Sekretionsmuster, ihrer Rezeptorspezifität und ihren Halbwertszeiten unterscheiden. Sie sind an der Regulation des Flüssigkeitshaushaltes und des Blutdrucks beteiligt. Gleichzeitig interagieren sie mit dem Hormon- und Nervensystem. Die Hauptvertreter der natriuretischen Peptide sind ANP (atrial natriuretic peptide) und BNP (B-type natriuretic peptide).

BNP wurde im Jahre 1987 von Sudoh erstmals als weiteres natriuretisches Peptid beschrieben. Namensgebend war die Tatsache, dass es zunächst im Hirngewebe von Schweinen nachgewiesen wurde (174). Bald darauf gelang der Nachweis in höheren Konzentrationen im Myokard. Dies hatte die Änderung der Nomenklatur in „B-type natriuretic peptide“ zur Folge (190). BNP entsteht durch proteolytische Spaltung aus prä-proBNP (134 Aminosäuren). Durch Abspaltung eines Signalpeptids entsteht dann die aus 108 Aminosäuren bestehende Hormonvorstufe proBNP. Während der Sekretion wird proBNP durch eine Endoprotease in das physiologisch aktive BNP und in das inaktive aminoterminal Peptid NT-proBNP (76 Aminosäuren; 8,5 kD) gespalten (75). Die Halbwertszeit (HWZ) beider Spaltprodukte ist deutlich unterschiedlich. Während BNP schon nach 20 Minuten zur Hälfte eliminiert ist, verbleibt das inaktive Spaltprodukt NT-proBNP mit einer HWZ von ca. 120 Minuten sehr viel länger im Blut. Bei gesunden und herzinsuffizienten Patienten konnte eine Korrelation zwischen BNP im Plasma und dem linksventrikulär-enddiastolischen Druck und der Ejektionsfraktion als Marker für die linksventrikuläre Funktion nachgewiesen werden

(68;108). NT-proBNP hat sich in der Vergangenheit als valider laborchemischer Parameter zur Diagnostik und Quantifizierung der Herzinsuffizienz erwiesen (114).

In der Pathophysiologie des sekundären Hirnschadens spielen die Ausbildung des Hirnödems und die Hirnschwellung eine herausragende Rolle. Wie schon erwähnt sind die genauen Mechanismen, die zur Ausbildung und Triggerung des sekundären Hirnschaden führen, noch nicht vollständig geklärt. In diesem Zusammenhang wurden in der Vergangenheit potentielle Aktivatoren der sekundären Hirnschwellung identifiziert, die mit der Dysregulation der zerebralen Wasser-Natrium-Homöostase in Verbindung stehen (107). Studien am tierexperimentellen Modell des Schädel-Hirn-Traumas zeigen, dass die Dysregulation der zerebralen Wasserhomöostase möglicherweise durch die Sekretion von ANP in die systemische Zirkulation und von BNP in den Liquor beeinflusst wird (55). Außerdem wurde durch Berendes et al. bei Patienten nach nichttraumatischer Subarachnoidalblutung eine signifikante Korrelation zwischen intrakraniellm Druck (ICP) und BNP-Werten im Serum ermittelt (19).

Obwohl diese Ergebnisse den Schluss nahe legen, dass Erkenntnisse über die Funktion von BNP bei der Entwicklung des Hirnödems einen detaillieren Einblick in die pathophysiologischen Zusammenhänge des sekundären Hirnschadens geben könnten, ist die Sekretion bislang quantitativ und qualitativ nicht charakterisiert.

Aus diesem Grund ist ein Ziel der in die vorliegende Abhandlung inbegriffenen Studie die Bestimmung der intrathekalen Konzentration von NT-proBNP in Korrelation zum intrazerebralen Druck.

2 FRAGESTELLUNG

Die Ursachen für das Auftreten des sekundären Hirnschadens sind bislang noch nicht vollständig geklärt. Bei entzündlichen Erkrankungen wurde gezeigt, dass immunkompetente Zellen in den Liquorraum oder ins Hirnparenchym einwandern und vielfältige Auswirkungen auf die neuroinflammatorischen Kaskaden haben (94;122). Andererseits ist der Einfluss von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen auf die Prognose des sekundären Schadens unbestritten. Unklar ist aber bisher, ob Subpopulationen der Immunzellen in den Liquor emigrieren. Außerdem gibt es nur Vermutungen bzw. anschauliche Theorien über die Herkunft der im Liquor von Patienten nach SHT identifizierten und quantifizierten Mediatoren (122).

Ziel der Arbeit ist es daher, die Quantität der Subpopulationen der Immunzellen und wichtige Mediatoren, denen eine große Rolle bei der Ausbildung des sekundären Schadens zugeschrieben wird, in der Initialphase des schweren Schädel-Hirn-Traumas genauer zu erfassen.

Daraus ergeben sich die Einzelziele der Studie:

1. Quantifizierung der zellulären Subpopulation humaner Immunzellen (B-Lymphozyten, T-Helferzellen, T-Killerzellen, natürliche Killerzellen) im Liquor von Patienten nach schwerem SHT in der Initialphase nach Trauma
2. Analyse des antiinflammatorischen Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist (IL-1ra) im Liquor
3. Analyse des NT-proBNP im Liquor von Patienten nach SHT als Pilotstudie
4. Korrelation der Ergebnisse mit der Funktionalität der Blut-Hirn-Schranke

3 PATIENTEN UND METHODEN

3.1 Studiendesign

Nach Genehmigung durch die lokale Ethikkommission (AZ 330/03) wurde die Studie von Januar bis Dezember 2004 an der *Chirurgischen Klinik, Campus Innenstadt, Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München* durchgeführt.

Prospektiv wurden alle Patienten mit isoliertem schweren SHT eingeschlossen, denen nach Anlage einer ICP-Sonde im Schockraum sowie sequenziell 12h, 24h, 48h und 72h nach Trauma Liquor und Blutproben abgenommen wurden (**Abbildung 6**).

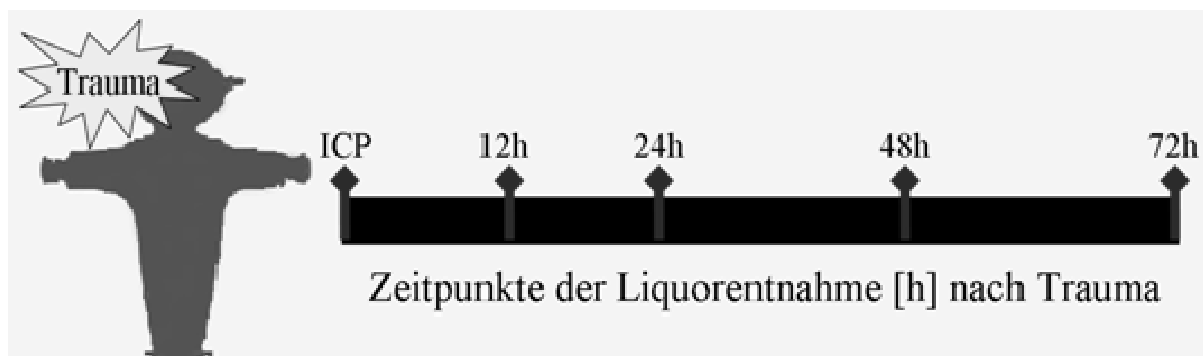


Abbildung 6: Zeitachse der sequenziellen Liquor- und Blutabnahmen.

Aufgrund der klinischen Situation beim Eintreffen in unsere Klinik (Bewusstlosigkeit, Intubation, Sedierung), war es nicht möglich, die Einverständniserklärung vor der Probenentnahme einzuholen. In enger Absprache mit der Ethikkommission ist es für eine solche Situation geregelt, dass diese im Nachhinein nach Erreichen der kognitiven Fähigkeiten eingeholt werden kann. Kam es aufgrund der Schwere der Verletzungen zu unzureichender kognitiver Remission, wurde die Einwilligung von Familienangehörigen oder von einem vom Gericht eingesetzten Betreuer eingeholt.

Als Kontrollgruppe dienten Liquorproben 10 gesunder Normalprobanden, die im Rahmen einer Spinalanästhesie gewonnen wurden.

3.1.1 Ein- und Ausschlusskriterien

Die in diese Studie eingeschlossenen Patienten hatten ein schweres SHT erlitten. Ein schweres SHT liegt definitionsgemäß bei einem GCS von acht oder weniger Punkten vor. Des Weiteren musste jeweils eine klare Indikation zur sofortigen Anlage einer ICP-Sonde bestehen. Zeigten sich in der initialen kraniellen Computertomografie intrakranielle Blutungen sowie ggf. radiologische Hirndruckzeichen, wie Mittellinienshift, Konturverlust der Gyri und Sulci, komprimierte Ventrikel, wurde bei den Patienten eine frühe Anlage der Sonde angestrebt. Da das Ziel der Studie die Analyse inflammatorischer Kaskaden ausschließlich in der Frühphase nach Trauma ist, stellt die kurze Intervallzeit zwischen Trauma und Anlage der ICP-Sonde von maximal 90 Minuten ein weiteres Einschlusskriterium dar.

Ausgeschlossen wurden Patienten, welche innerhalb der ersten 72 Stunden nach Trauma verstarben, sowie Patienten, die an einer entzündlichen oder neurologischen Grunderkrankung litten, welche Einfluss auf die Liquoreigenschaften haben könnte. Des Weiteren wurden Schwangere und Strafgefangene nicht in die Studie aufgenommen.

Nach der Stabilisierung und Diagnostik im Schockraum, den entsprechend der Verletzungsmuster notwendigen Operationen, wurden die Patienten auf der chirurgischen Intensivstation aufgenommen und dort gemäß der Leitlinien der Brain Trauma Foundation behandelt (50). Das bedeutet im Einzelnen:

- der CPP wurde durchschnittlich zwischen 50 und 70 mmHg gehalten
- der ICP wurde unter 20 mmHg gehalten
- das Prinzip der milden Hyperventilation wurde angewandt ($p_a\text{CO}_2$ 30-35 mmHg, Beginn frühestens 24 Stunden nach Trauma)
- Bolusgaben von Mannitol 20%, 0,25-1 g/kgKG

Steroide kamen bei unserem Patientenkollektiv nicht zum Einsatz. Zur tiefen Sedierung wurde Phenobarbital verwendet (1).

Einschlusskriterien:

- Vorliegen eines Schädel-Hirn-Traumas mit einem GCS \leq 8 Punkten
- Intrakranielle Blutung
- Intervall: Trauma und Aufnahme in den Schockraum \leq 90min.
- Mindestalter: 18 Jahre
- Vorliegen einer schriftlichen Einwilligung

Ausschlusskriterien:

- Strafgefangene, Schwangere und Patienten mit bekannter Betreuung
- entzündliche Grunderkrankung wie: Sepsis, Meningitis, HIV, Hepatitiden etc.
- neurologisch-psychiatrische Grunderkrankung
- Patienten, welche innerhalb der ersten 72h an den Traumafolgen verstarben

3.1.2 Kontrollgruppe

Als Kontrollgruppe wurden Patienten eingeschlossen, die im Rahmen eines elektiven Eingriffs ein spinalanästhesiologisches Verfahren erhielten. Keiner der Probanden litt an einer neurologischen oder infektiösen Grunderkrankung.

Bei dieser Form der Anästhesie fallen normalerweise ca. 3 ml Liquor an, die in der Regel nach der Punktion verworfen werden. Dieser Liquor wurde als Negativkontrolle aufgefangen und den identischen Verarbeitungen unterzogen. Die Abnahme des Liquors erfolgte nur nach entsprechender Aufklärung und schriftlicher Einwilligung der Patienten.

3.2 Gewinnung der Liquor- und Blutproben

Nach der ersten Stabilisierung im Schockraum werden bei Patienten mit Verdacht auf Schädel-Hirn-Trauma oder Polytrauma standardisiert eine CT-Untersuchung des Schädels, Thorax und Abdomen im Sinne einer sogenannten „Polytraumaspirale“ angefertigt.

Nach zeitnaher Anlage der ICP-Sonde (Trauma-Cath[®]; Integra[®] Neurosciences, Plainsboro, NJ), ist neben der Liquorgewinnung eine kontinuierliche Hirndruckdiagnostik möglich (**Abbildung 7**). Die ICP-Sonde wird über ein Bohrloch in den Ventrikel eingeführt, der weiter von der Verletzung entfernt ist (89).

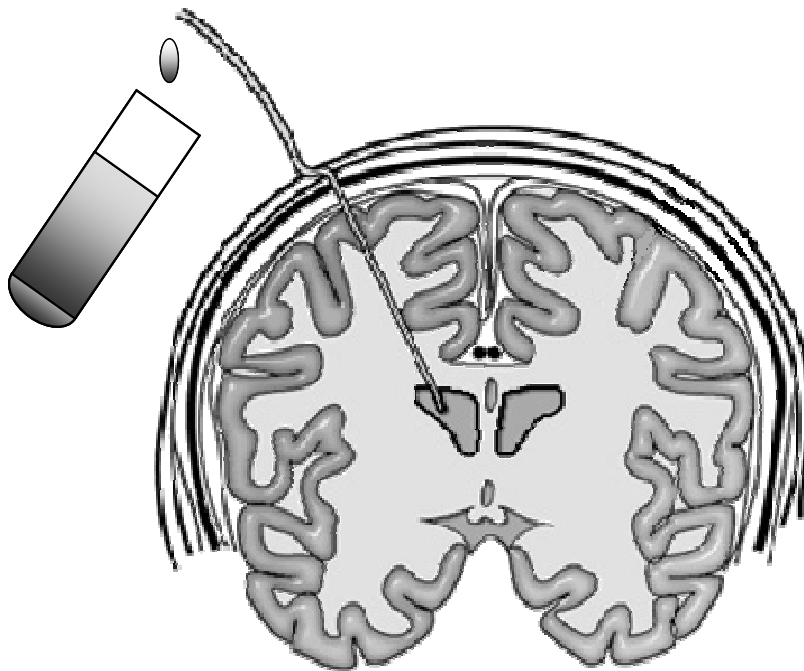


Abbildung 7: Schematische Darstellung der intrathekalen Lage der ICP-Sonde (89)

Die Liquorabnahmen über diese Sonde erfolgen direkt nach ICP-Anlage sowie 12h, 24h, 48h und 72h nach Trauma. Circa 3 bis 4 ml Liquor werden entnommen und gekühlt sofort ins Labor zur weiteren Verarbeitung gebracht. Zur Bestimmung des Standardzellprofils und des Albuminspiegels im Liquor werden 500 µl ebenfalls ins Labor gegeben. Zeitgleich werden dem Patienten jeweils ein EDTA- und ein Serum-Röhrchen Blut abgenommen, welche für die

Bestimmungen von Differenzialblutbild (DiffBB) und der Albuminkonzentration im Labor den notwendigen diagnostischen Verfahren zugeführt werden.

3.3 Methoden

Der Liquor wurde in der durchgeführten Studie drei verschiedenen diagnostischen Verfahren unterzogen. Die Analyse der Zellpopulation erfolgt mittels der anerkannten Methode der Durchflusszytometrie, die Bestimmung der Quantität des antiinflammatorischen Zytokins IL-1ra erfolgt mit Hilfe der ELISA-Technik und schließlich wird der Überstand zur Bestimmung von NT-proBNP durch die Immunoassay-Methode dem Routinelabor übergeben. Im Folgenden werden die verwendeten Methoden kurz erläutert.

3.3.1 Analyse der zellulären Subpopulationen

Die Untersuchung der Proben mittels Durchflusszytometrie lässt sich in drei Phasen unterteilen:

a. Fluoreszenzfärbung

Nach Zentrifugation des Liquors mit 1200 Umdrehungen pro Minute (RPM) bei 4°C über 10 Minuten wird der Überstand abpipettiert, in ein neues Falcon überführt, mit Patientenummer, Datum der Abnahme versehen und bei -80°C für die späteren Zytokinbestimmungen gelagert. Das entstandene Zellpellet wird mit 200µl FC Puffer (0,01 M PBS; PH 7,2, 1%Bovines Serum Albumin, 5% FCS, 0,02% NaN₃) resuspendiert. Im Anschluss wird jeweils 20µl der Zellsuspension in ein FACS-Röhrchen überführt, welches entsprechend des folgenden Färbeprotokolls zu beschriften ist (**Tabelle 4**).

T-Helferzellen	T-Killerzellen	B-Lymphozyten	NK-Zellen
CD3, CD4, (CD69)	CD3, CD8, (CD69)	CD19	CD56

Tabelle 4: Oberflächenfärbung der entsprechenden immunkompetenten Zellen

Die Zellsuspensionen werden dann mit 3µl des jeweiligen Antikörpers (Caltag Laboratories GmbH, Hamburg, Germany) versehen. Diese binden an den spezifischen Antigenen, welche von dem jeweiligen Immunzelltyp exprimiert und auf der Oberfläche dargestellt werden. Nach einer 20-minütigen und verdunkelten Inkubationsphase auf Eis, werden die Röhrchen mit 500µl FACS Lysing Antikörpers (Caltag Laboratories GmbH, Hamburg) Solution resuspendiert und weitere 10 Minuten inkubiert, um die im Zellpelett befindlichen Erythrozyten zu zerstören.

Im direkten Anschluss folgen zwei Waschvorgänge inklusive Zentrifugation mit 1200 RPM bei 4°C über 10 Minuten mit PBS (0,5/FCS).

Damit ist die Aufbereitung der Proben vollständig abgeschlossen, so dass die Messungen am FACS-Gerät durchgeführt werden können.

b. Messung

Für diese Messungen wird ein EPICS XL MCL Durchflusszytometer (Beckman- Coulter, Krefeld) verwendet. Das Gerät ist ausgestattet mit einem 15-mW 488nm Argon-Ionen-Laser und besitzt vier Kanäle (**Abbildung 8**). Die Filter für Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC) waren auf 530 nm, für Phycorhithrin (PE) auf 585 nm und für Phycoerythrin-Cyanin-5 (PC5) auf größer 650 nm eingestellt.

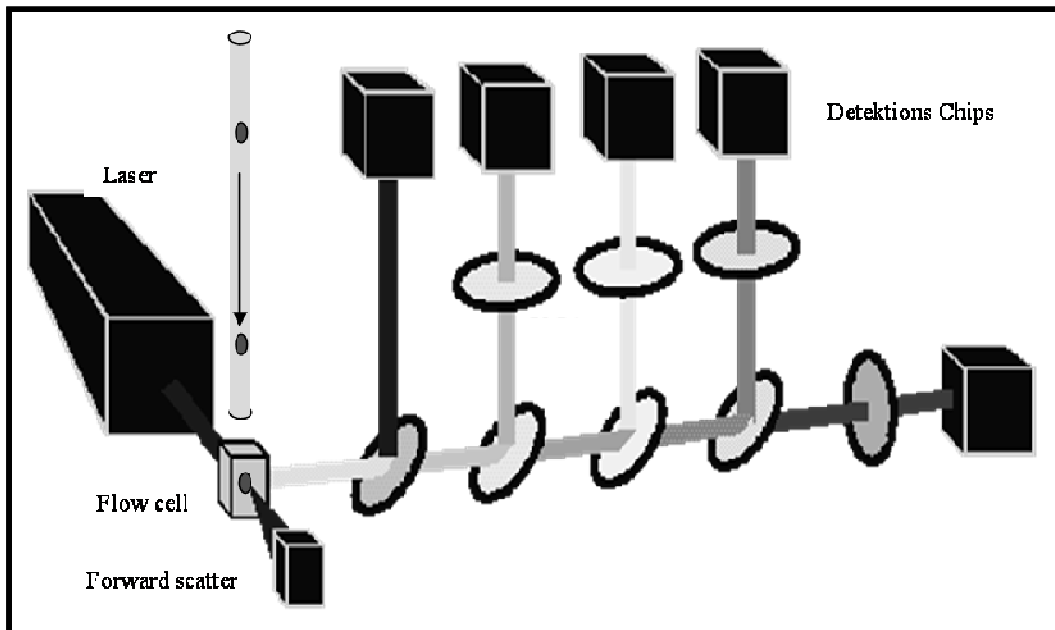


Abbildung 8: Prinzip der Funktion der durchflusszytometrischen Analyse: Zuerst wird ein Multispektrallicht auf die Zielsuspension emittiert. Die Fluoreszenzträger in der Zielsuspension emittieren auf Anregung verschiedene charakteristische Spektralwellen, die durch halbdurchlässige Spiegel hindurchtreten. Ein hochauflösender Detektor zählt das für jeden Fluoreszenzfarbstoff spezifische Signal. Als Lichtquelle wird im Durchflusszytometer (FACS) ein luftgekühlter Argonlaser mit einer Wellenlänge von 488 nm eingesetzt. Es besitzt vier Fluoreszenzdetektions-Kanäle, die simultan die Farben Blau, Grün, Gelb und Orange-Rot messen können.

Die Datenaquisition erfolgte an der EPICS System Station mit der Expo 32 Software (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland). Vor jeder Messung werden die System- und Filtereinstellungen überprüft und die Stabilität der Lichtspektren mit Fluoreszenz-Beads (FlowCheck, Beckman-Coulter) validiert.

Zunächst erfolgt die Oberflächencharakterisierung mittels Scatter-Analyse gemäß den dreidimensionalen Eigenschaften der Zellen. Zuerst wird entsprechend Größe und Zelldichte die zu untersuchende Zellreihe als *region of interest* markiert. Aus diesen werden dann beispielsweise die CD19+ B-Lymphozyten über den PC-5-Detektionskanal sortiert. Bei den T-Zellen werden zunächst die CD3+-Zellen markiert. Aus dieser Population werden daran anschließend entweder die CD4+(T-Helferzellen)- bzw. die CD8+(T-Killer)-Zellen markiert.

Zuletzt werden die CD69+-Zellen detektiert. Bei CD69 handelt es sich um den Aktivierungsmarker der T-Zellen.

In jeder Analyse zählt die Software standardisiert 5000 der zu untersuchenden Zellen.

c. Auswertung

Für die Auswertungen der Daten wird das Analyseprogramm der Firma Beckman-Coulter benutzt. Beispielhaft ist in der folgenden Abbildung die Unterscheidung von Granulozyten und Monozyten durch die scatter-Analyse, bei der zunächst die Leukozyten als *region of interest* markiert und im Folgenden über den PC-5-Detektionskanal die CD14+Monozyten isoliert wurden (**Abbildung 9**).

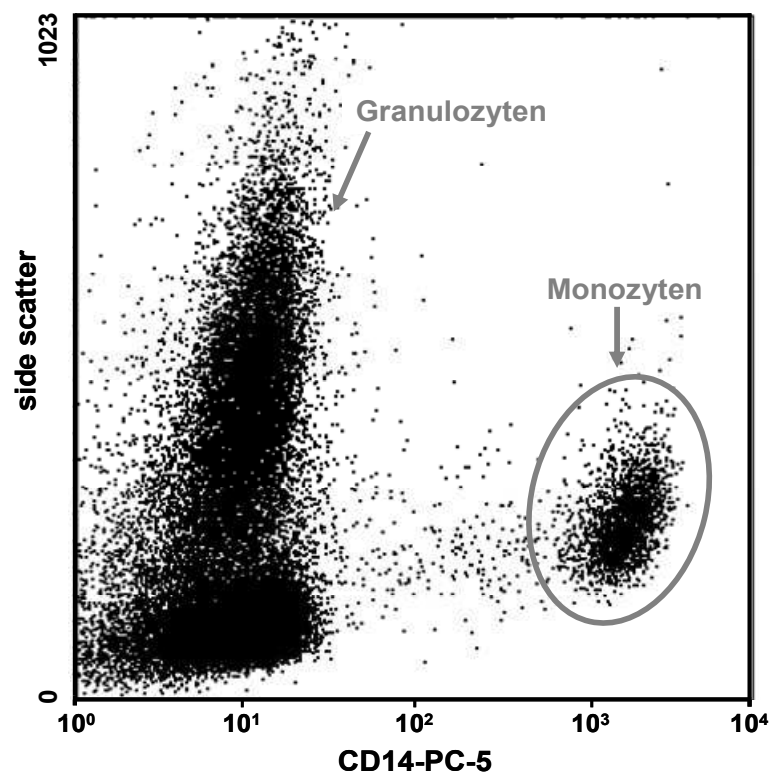


Abbildung 9: Unterscheidung Granulozyten-Monozyten Auf der y-Achse ist der side scatter, auf der x-Achse das Oberflächenepitop CD14 im PC-5-Konjugat aufgetragen. Die sichere Unterscheidung zwischen CD14+ Monozyten und CD14+ Granulozyten ist möglich

3.3.2 Analyse von IL1-ra

Zusätzlich zu den oben beschriebenen Untersuchungen wird zu jedem Zeitpunkt der Liquorabnahme eine geringe Menge Überstand nach Zentrifugation (ca. 3ml) gesichert, tiefgefroren und mit etablierter ELISA-Technologie die Konzentration von IL1-ra entsprechend den Angaben des Herstellers (Milenia Biotech, Bad Nauheim) bestimmt.

Die Konzentrationen von IL1-ra werden anhand von spezifischen, sogenannten *sandwich ELISAs* gemessen. Dabei werden die einzelnen Vertiefungen („wells“) einer Mikrotiterplatte mit einem spezifischen gegen das Antigen gerichteten, monoklonalen Antikörper beschichtet. Die das Antigen enthaltenden Proben (in dieser Studie: Liquorüberstand) sowie verschiedene Verdünnungen des bekannten Standards werden in die einzelnen Vertiefungen pipettiert.

Während der Inkubationszeit werden die vorhandenen Proteinmoleküle an den „immobilisierten“ Antikörper gebunden. Nach einem Waschvorgang, der alle ungebundenen Proteine entfernte, wird nun ein zweiter, enzymkonjugierter, poly- oder monoklonaler Antikörper dazugegeben, der gegen ein anderes Epitop auf der Moleküloberfläche gerichtet ist („Sandwich“). Nach einem erneuten Waschvorgang erfolgt die Zugabe einer chromogengebundenen Substratlösung. Die daraufhin auftretende Farbentwicklung wird dann gestoppt und die optische Dichte aller Proben in einem Spektrophotometer (ELISA Reader) bei einer definierten Wellenlänge gemessen. Die Werte werden anschließend mit Hilfe des integrierten Computerprogramms analysiert, indem zunächst aus den Antigenkonzentrationen der Standardlösungen eine Standardkurve erzeugt wird. Anschließend werden die unbekannt Konzentrationen der Proben durch Interpolation bestimmt.

3.3.3 Analyse von NT-pro-BNP

Die Konzentrationen von pro-BNP im Liquor der Patienten werden mittels der Elektrochemiluminescence-Immunoassay-Methode (ECLIA, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) bestimmt. Der Test läuft nach folgendem Schema ab:

- Im ersten Inkubationsschritt werden ein biotinylierter polyklonaler Antikörper und ein mit Ruthenium-Komplex markierter ebenfalls polyklonaler Antikörper mit 20µl der Probe versetzt und bilden einen Sandwich-Komplex.
- Der Antigen-Antikörper-Komplex bildet über Biotin eine kovalente Bindung mit beschichteten magnetisierbaren Mikropartikeln. Dadurch wird das Antigen sicher an die Festphase der Mikropartikel gebunden.
- Das Reaktionsgemisch wird in die Messzelle überführt, in der die Mikropartikel durch magnetische Wirkung auf die Oberfläche der Elektrode fixiert werden. Danach werden mit einer Waschlösung die ungebundenen Substanzen entfernt. Durch Anlegen einer Spannung wird die Chemilumineszenzemission induziert und mit dem Photomultiplier gemessen.
- Die Ergebnisse werden anhand einer Kalibrationskurve ermittelt. Diese wird durch eine 2-Punkt-Kalibration und eine über den Reagenzbarcode mitgelieferte Masterkurve gerätespezifisch generiert.

3.4 Funktion der Blut-Hirn-Schranke

Um Teilaspekte der Studie bezüglich der Herkunft von immunkompetenten Zellen und Mediatoren zu klären bzw. signifikante Anstiege durch Störung der BHS zu begründen, ist die Quantifizierung der Funktion der Blut-Hirn-Schranke unerlässlich. Dafür wird die von Reiber erstmals beschriebene Berechnung des Verhältnisses von Albumin im Liquor zu den Werten im Serum (Q_a) angewendet. Diese Ratio ist ein anerkannter Marker für die Funktion der BHS.

Um die Funktionalität quantifizieren zu können, werden die Ergebnisse in vier Gruppen aufgeteilt. Q_a -Werte < 0.007 verweisen dabei auf eine normale Schrankenfunktion, Werte zwischen 0.007 und 0.01 stellen eine milde, Werte zwischen 0.01 und 0.02 eine moderate und Werte über 0.02 eine schwere Dysfunktion dar. In der vorliegenden Arbeit werden jeweils zwei Gruppen zusammengefasst. Normalwerte und die milde Schrankenstörung werden zur Gruppe BHS intakt zugeordnet. Die moderate sowie die schwere Schrankenstörung werden zur Gruppe BHS gestört subsumiert. Albumin wird im klinisch-chemischen Labor mit Hilfe der Turbidimetrie (Cobas Integra[®] Albumin; Roche[®] Diagnostik) bestimmt.

3.5 Statistische Auswertung

Alle statistischen Analysen werden mit Sigma Stat[®] 3.0 (SPSS[®] Inc., Chicago) durchgeführt. Die prozentualen Subpopulationen der Immunzellen sowie die Konzentrationen von IL1-ra und pro-BNP werden als Mittelwerte \pm SEM (standard error of the mean) angegeben. Die Werte werden mittels Analysis of Variance (ANOVA) on Ranks für nichtverbundene Stichproben gegenüber den Kontrollgruppen, sowie dem initialen Wert bei Aufnahme in die Klinik verglichen und durch den Student-Neumann-Keuls-Test (SNK) als post-hoc Verfahren innerhalb der Gruppe entlang der Zeitachse analysiert. Die Signifikanzniveaus werden mit $p \leq 0.05$ festgesetzt. Der Spearman-Test wurde angewandt, um Korrelationen zu berechnen. Die Diagramme wurden mit dem Programm Sigma Plot[®] erstellt (SPSS[®] Inc., Chicago).

4 ERGEBNISSE

4.1 Klinische Daten

In diese Studie wurden 15 Patienten mit einem schweren SHT eingeschlossen. In den meisten Fällen handelt es sich um Verkehrsunfälle oder Stürze aus größerer Höhe auf den Schädel. Das Alter dieser 5 weiblichen und 10 männlichen Patienten lag zwischen 20 und 82 Jahren (47 ± 5 Jahre). Drei dieser Patienten erlagen im weiteren Verlauf ihren schweren Verletzungen (33 ± 6 Jahre).

Die Patienten werden gemäß dem Liquor-Serum-Albuminquotienten in zwei Subgruppen getrennt. In Gruppe I mit intakter BHS sind neun Patienten zwischen 20 und 82 Jahren (43 ± 6 Jahre) subsumiert. Es handelt sich bei ihnen um zwei weibliche und sieben männliche Patienten. Gruppe II werden sechs Patienten zwischen 27 und 69 Jahren (53 ± 7 Jahre) zugeordnet. In dieser Gruppe mit gestörter BHS befinden sich jeweils drei männliche und drei weibliche Patienten. Zwei der verstorbenen Patienten sind aus der Gruppe mit intakter BHS.

Als Kontrollgruppe wurden 10 Normalprobanden (6 Männer, 4 Frauen) mit einem durchschnittlichen Alter von 55 ± 6 Jahren eingeschlossen. Es handelt sich bei ihnen um Patienten, die sich einem elektiven Eingriff an der unteren Extremität unterziehen mussten.

Als Narkoseverfahren wurde eine Spinalanästhesie gewählt.

Die detaillierten Daten der eingeschlossenen Patienten inklusive Geschlecht und Alter der Patienten, durchschnittlichem ICP, Albuminquotienten, Verletzungsmuster und operativen Interventionen sind in der folgenden Tabelle (**Tabelle 5**) zusammengefasst.

Gruppe	Pat.	Alter	Geschlecht	ICP (mmHg)	Q _{Albumin} x 10 ³	Initiales Verletzungsmuster	Interventionen	Überlebt
BHS intakt	I	32	W	10,8±2,2	1,8 ± 0,8	SAB, SDH	-	ja
	II	82	M	6,4±1,1	6,8 ± 2,5	Felsenbeinlängs#, SAB, Kontusionsblutung, SDH	-	ja
	III	23	M	11,8±2,5	7,0 ± 3,3	SAB, Kontusionsblutung, Impressions#, intrakranielle Fremdkörper	Osteoklastische Trepanation	nein
	IV	50	W	30,4±13,1	5,8 ± 3,4	Kalotten#, SAB, Parenchymlutung	Osteoklastische Trepanation	nein
	V	20	M	17,4±1,3	3,0 ± 0,7	ICB, Mittelgesichts#	Frakturversorgung	ja
	VI	43	M	17,8±1,6	7,6 ± 3,1	EDB, SAB, Rindenkontusionsherde	Osteoklastische Trepanation Hämatomentfernung	ja
	VII	34	M	11,2±1,7	2,0 ± 0,6	SAB, Kalotten#, Felsenbeinlängs#	-	ja
	VIII	48	M	8,8 ± 2,0	2,8 ± 0,3	Kleinhirn ICB, SHD	Occipitale Kraniotomie	ja
	IX	54	M	14,2±1,9	1,5 ± 0,5	SAB	-	ja
BHS gestört	X	27	W	22,2±2,7	13,0 ± 6,1	SDB, SAB, Kalotten#, Mastoid#, Kontusionsblutung	Osteoklastische Trepanation	nein
	XI	62	M	9,2±0,2	45,6 ± 10,1	SDB, EDB, SAB, Schädel#, Parenchymläsion	Osteoklastische Trepanation	ja
	XII	50	M	21,4±1,2	10,1 ± 2,9	Impressions# Parenchymlutung, SAB	Osteoklastische Trepanation	ja
	XIII	41	W	17,6±2,2	17,0 ± 2,1	SAB, SDH, Schädelbasis#	-	ja
	XIV	67	M	25,7±8,7	13,7 ± 3,3	Schädelbasis#, Os occipitale#, Felsenbein#, EDB, ICB, SAB	Osteoklastische Kraniotomie, SDH-Entfernung	ja
	XV	69	W	14,6±0,9	20,1 ± 9,2	ICB, SAB	Osteoklastische Trepanation	ja

Tabelle 5: Demografische und klinische Daten, SAB= Subarachnoidalblutung, EDB=Epiduralblutung, ICB=Intrazerebrale Blutung, SDB= Subduralblutung, # =Fraktur, SEM=Standarderror of mean, (ICP und Q_{Albumin} als Mittelwerte±SEM)

Folgende Abbildung zeigt das Patientenkollektiv gemäß dem maximalen intrakraniellen Druck aufgeteilt in zwei Gruppen (**Abbildung 10**). Auf der X-Achse sind die Abnahmezeitpunkte aufgetragen, auf der Y-Achse der quantitative Wert des intrakraniellen Drucks in mmHg. Ersichtlich wird, dass zu jedem Abnahmezeitpunkt, ausgenommen 24 Stunden nach Trauma, ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen besteht. Die Werte in der Gruppe II zeigen zudem eine Tendenz mit ansteigenden ICP-Werten über die Zeit und erreichen bei 72 Stunden nach Trauma ihr Maximum ($30,62 \pm 8,62$). Bei Aufnahme betrug der ICP in Gruppe I $9 \pm 1,8$ mmHg gegenüber Gruppe II mit $17,8 \pm 1,9$ mmHg. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant. Nach 12 Stunden zeigt sich keine Dynamik: Gruppe I $11,7 \pm 1,1$ mmHg, Gruppe II $17 \pm 2,4$ mmHg. Die Unterschiede nach 24, 48 und 72 Stunden sind jeweils wiederum statistisch signifikant. Am Ende des Untersuchungszeitraumes nach 72 Stunden beträgt der ICP in Gruppe I $9,9 \pm 1,8$ mmHg und in Gruppe II $30,1 \pm 8,9$ mmHg.

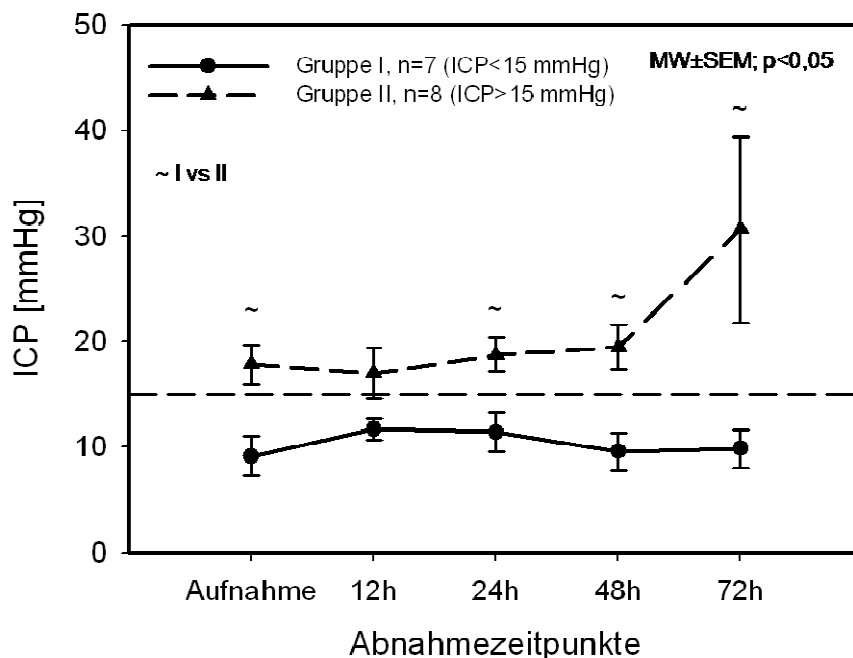


Abbildung 10: ICP-Verlauf von Aufnahme bis 72 Stunden nach Trauma. Auf der x-Achse sind die Abnahmezeitpunkte, auf der y-Achse der ICP in mmHg aufgetragen. Gruppe I zeigt die Patienten mit einem ICP<15, Gruppe II die Patienten mit ICP>15. ICP als Mittelwerte \pm SEM, ~ = p<0,05.

4.2 Quantifizierung der Blut-Hirn-Schranke

Abbildung 11 zeigt den Verlauf der Funktionalität der Blut-Hirn-Schranke von der Aufnahme bis 72 Stunden nach Trauma. Die Patienten werden in zwei Gruppen abhängig von der Höhe des intrakraniellen Druckes eingeteilt. Es soll geprüft werden, ob zwischen Höhe des ICP und der Funktion der Blut-Hirn-Schranke ein statistisch signifikanter Zusammenhang besteht. In Anlehnung an die Arbeiten von Reiber et al. (138) werden Albuminquotienten unter 0.007 als Normalbefunde definiert. Q_a -Werte von 0.007-0.01 repräsentieren eine milde, 0.01-0.02 eine moderate Schrankenstörung und Werte über 0.02 implizieren eine schwere Dysfunktion der Blut-Hirn-Schranke. Normalbefunde und milde Schrankenstörung werden zusammengefasst und als intakte Blut-Hirn-Schranke deklariert (BHS intakt). Entsprechend wird bei moderater und schwerer Schrankenstörung verfahren (BHS gestört).

In der Kontrollgruppe beträgt der Albuminquotient $0,008 \pm 0,01$. Bei Aufnahme beträgt der Quotient in Gruppe I $0,015 \pm 0,009$; in Gruppe II $0,019 \pm 0,006$. Ein statistisch signifikanter Unterschied besteht folglich nicht. Während des Beobachtungszeitraums zeigt sich eine Tendenz zur Verbesserung der initial stärker geschädigten BHS (72 h: Gruppe I $0,055 \pm 0,001$; Gruppe II $0,05 \pm 0,001$). Statistisch lässt der Trend sich aber wiederum nicht belegen: Es gibt zu keinem Zeitpunkt eine statistische Signifikanz zwischen den beiden Gruppen, des Weiteren zeigt sich über die ersten 72h keine signifikante Dynamik.

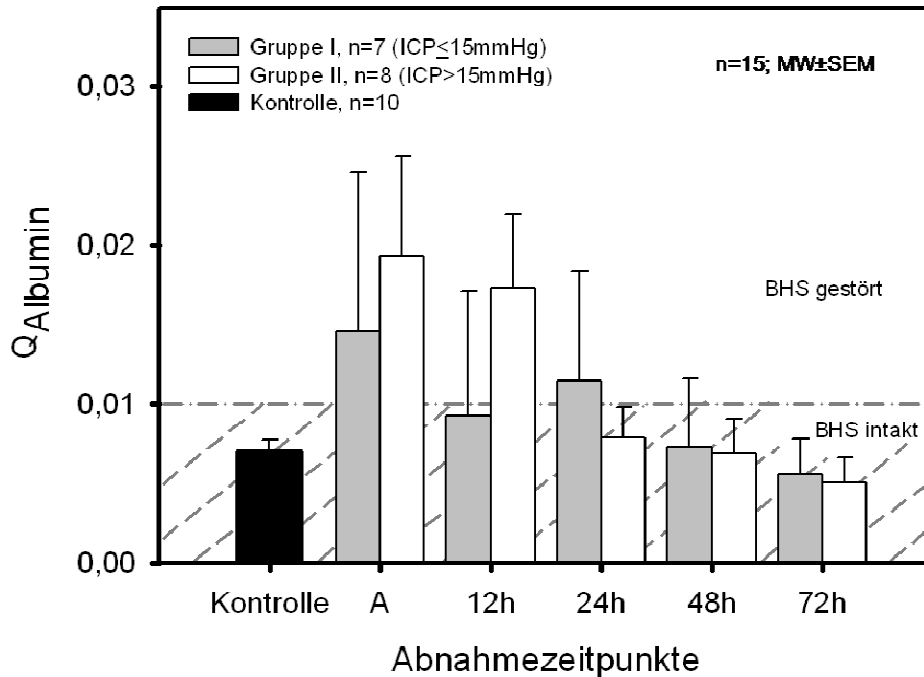


Abbildung 11: Q_{Albumin} (Q_a) in Gruppe I ($n=7$) und in Gruppe II ($n=8$) zum Aufnahmezeitpunkt, nach 12h, 24h, 48h sowie nach 72h. Q_a kleiner als 0,01 sind als Normalbefund definiert. Q_a größer 0,01 repräsentieren eine gestörte Funktion der BHS, $MW \pm SEM$.

4.3 Durchflusszytometrische Analysen

4.3.1 B-Lymphozyten

Die durchflusszytometrischen Ergebnisse der CD19⁺-Lymphozyten sind in der folgenden Grafik dargestellt. Ab 12 Stunden nach Aufnahme ($4,08 \pm 1,01$) erreichen die Zellen signifikant höhere Werte gegenüber der Kontrollgruppe ($0,23 \pm 0,07$). Einen signifikanten Anstieg gegenüber dem Aufnahmewert erreichen die CD19⁺-Zellen erst nach 48 Stunden ($6,14 \pm 1,18$). Dieser besteht ebenso 72 Stunden nach Beginn der Messung ($9,93 \pm 1,64$) (**Abbildung 12**).

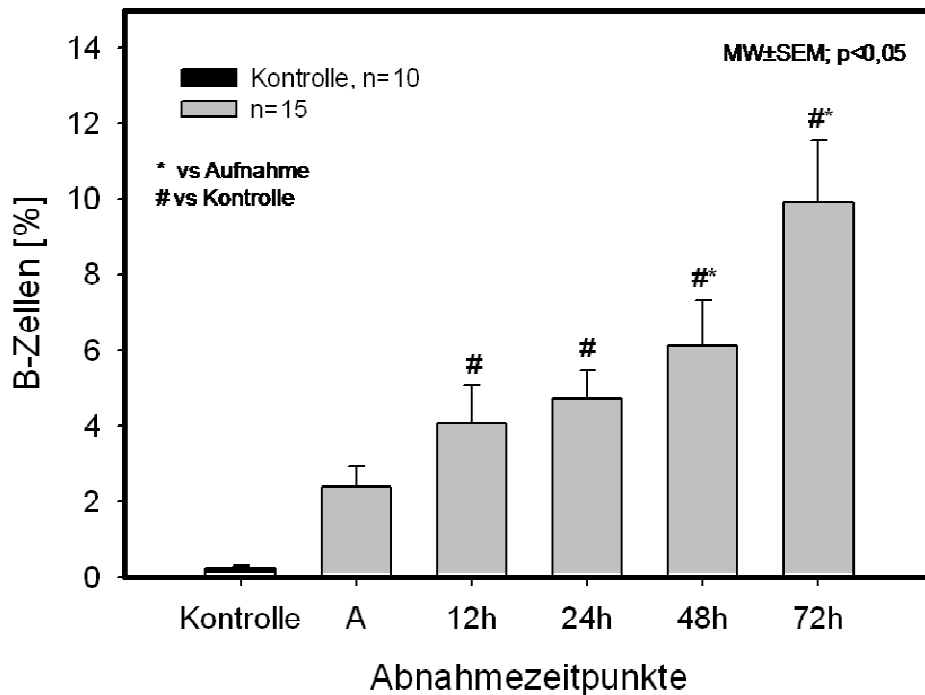


Abbildung 12: Prozentualer Anteil der CD19+Lymphozyten von der Gesamtzellpopulation. Auf der x-Achse sind jeweils die Entnahmezeitpunkte aufgetragen, auf der y-Achse der prozentuale Anteil an der Gesamtzellzahl im Liquor. Werte als Mittelwerte±SEM. #,* = p<0,05.

Der Graph in **Abbildung 13** zeigt den prozentualen Anteil der CD19+ B-Lymphozyten in Bezug auf die gesamte Leukozytenpopulation im Liquor in Abhängigkeit zur Funktion der Blut-Hirn-Schranke. In Gruppe I werden die Patienten mit einer intakten, in Gruppe II die Patienten mit einer Störung der Blut-Hirn-Schranke dargestellt. Wie bereits erwähnt werden in dieser Arbeit die normale Schrankenfunktion und die milde Schrankenstörung zu einer Gruppe zusammengefasst (BHS intakt). Ebenso sind die moderate und schwere Störung der Blut-Hirn-Schranke in einer Gruppe subsumiert (BHS gestört). Nach Aufnahme besteht ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen (Gruppe I: $0,32 \pm 0,07$ gegenüber Gruppe II: $1,97 \pm 0,41$). Nach 12 Stunden bis zum Ende der Messungen ist dieser Unterschied nicht mehr nachweisbar. Ein signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrollgruppe ist

unabhängig von der BHS-Funktion nach 24 Stunden vorhanden. Gegenüber der Aufnahme (Gruppe I: $0,31 \pm 0,07$; Gruppe II: $1,97 \pm 0,41$) steigen die B-Lymphozyten in Gruppe I signifikant ab 24 Stunden ($4,15 \pm 0,64$). In Gruppe II ist ein signifikanter Anstieg allerdings erst ab 72 Stunden zu verzeichnen ($6,63 \pm 1,31$).

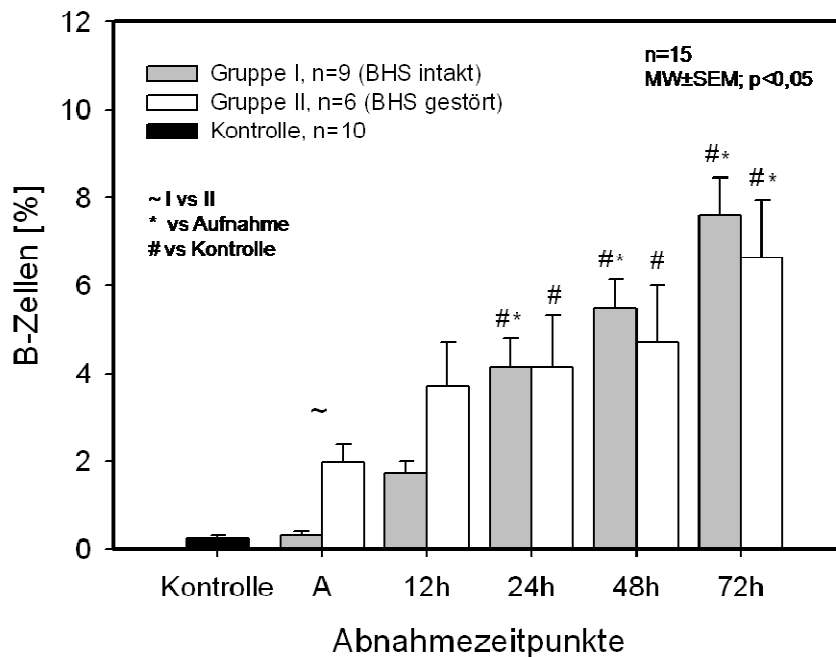


Abbildung 13: Prozentualer Anteil der CD19+Lymphozyten von der Gesamtzellpopulation, abhängig von der Funktion der Blut-Hirn-Schranke (BHS), Auf der x-Achse sind jeweils die Entnahmezeitpunkte aufgetragen, auf der y-Achse der prozentuale Anteil an der Gesamtzellzahl im Liquor. Ab der Aufnahme sind links die Patienten mit intakter BHS (grau) und rechts die mit gestörter BHS (weiß) aufgetragen. Mittelwerte±SEM; *,#,~p<0,05

4.3.2 T-Helferzellen

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchungen der T-Helfer-Zellen (CD3/4) und der T-Killer-Zellen (CD3/8) dargestellt. Des Weiteren diente zur Kontrolle der Aktivierung der Oberflächenmarker (CD69). Einführend zeigt der folgende Graph (**Abbildung 14**) die Gesamtpopulation der T-Lymphozyten (CD3).

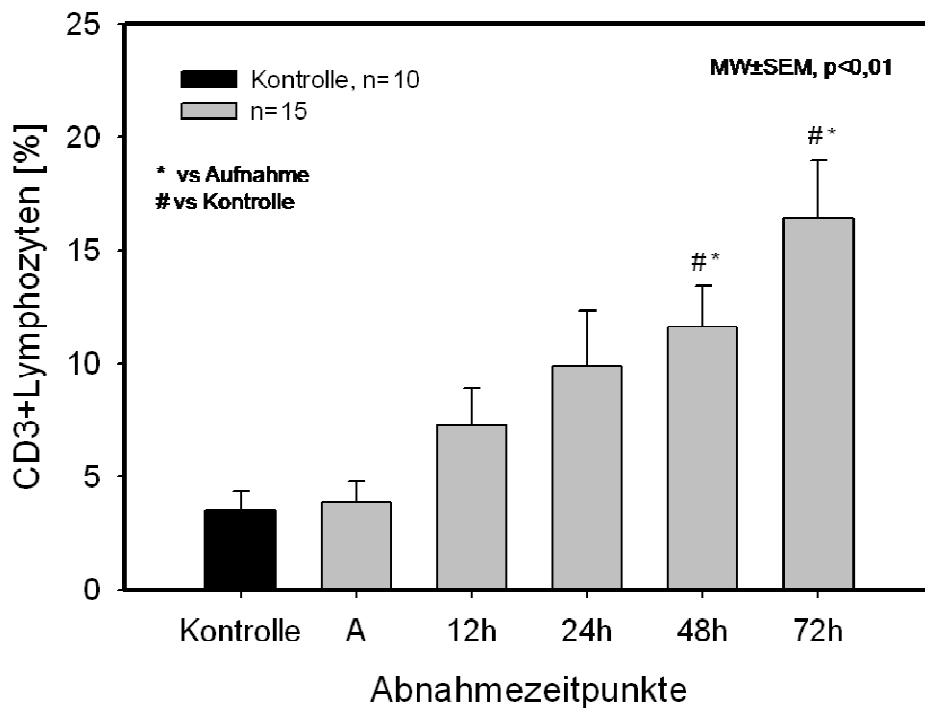


Abbildung 14: Prozentualer Anteil der T-Lymphozyten (CD3+) unabhängig von der BHS-Funktion. Auf der X-Achse sind jeweils die Entnahmezeitpunkte aufgetragen, auf der y-Achse der prozentuale Anteil an der Gesamtzellzahl im Liquor. Werte als Mittelwerte±SEM. #,* = p<0,05.

Tendenziell ist ein Anstieg im Verlauf zu erkennen. Ein signifikanter Anstieg der T-Lymphozyten gegenüber der Kontrollgruppe (3,49±0,89) und dem Aufnahmewert (3,83±0,94) ist allerdings erst ab 48 Stunden (11,54±1,84) zu verzeichnen.

Die Aufteilung in die zwei Gruppen ist in folgender Abbildung dargestellt. Zu keinem Zeitpunkt ist ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen zu verzeichnen (**Abbildung 15**). Interessanterweise besteht bei 48h ein signifikanter Unterschied der Gruppe I (13,21±2,7) zur Kontrolle (3,49±0,89) und zur Aufnahme (3,82±1,56), wohingegen der Anstieg in Gruppe II (9,84±2,7) vs. Aufnahme (3,53±1,56) bis dahin nicht signifikant ist.

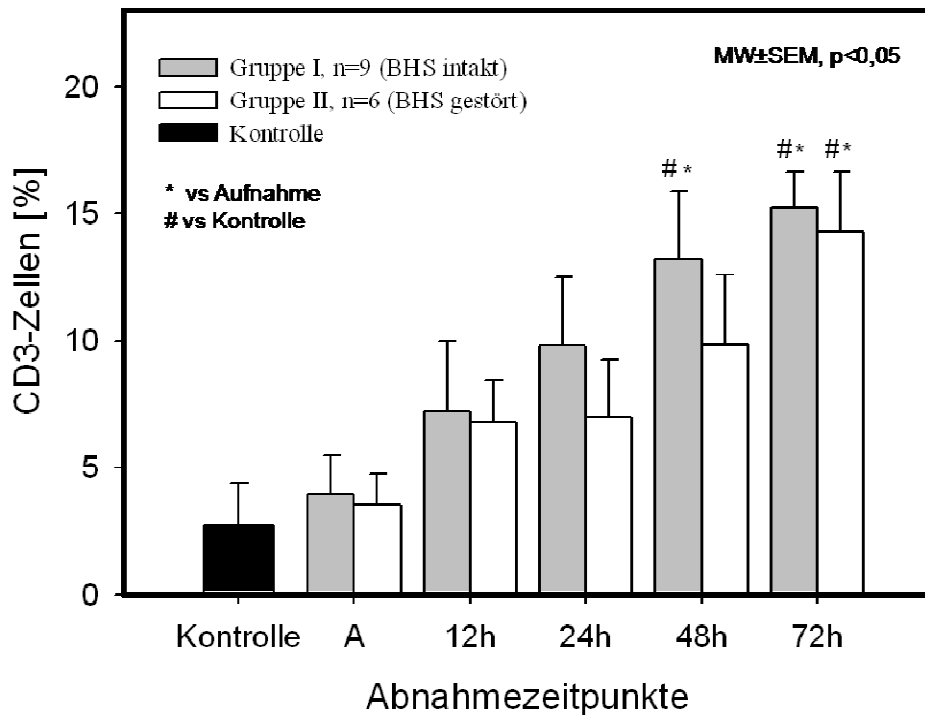


Abbildung 15: Prozentualer Anteil der CD3+T-Lymphozyten von der Gesamtzellpopulation, abhängig von der Funktion der Blut-Hirn-Schranke (BHS). Auf der x-Achse sind jeweils die Entnahmezeitpunkte aufgetragen, auf der y-Achse der prozentuale Anteil an der Gesamtzellzahl im Liquor. Ab der Aufnahme sind links die Patienten mit intakter BHS (grau) und rechts die mit gestörter BHS (weiß) aufgetragen. Mittelwerte±SEM; *,# =p<0,05

Durch die Oberflächenmarkierung mit den Antikörpern CD3 und CD4 werden die T-Helferzellen im Liquor bestimmt. Der folgende Graph (**Abbildung 16**) zeigt die Ergebnisse von allen 15 Patienten und der Kontrollgruppe. 72 Stunden nach Aufnahme ($67,72 \pm 4,07$) besteht ein signifikanter Anstieg der T-Helferzellen gegenüber der Kontrollgruppe ($38,11 \pm 7,03$) und dem Wert nach Anlage der ICP-Sonde ($47,12 \pm 2,63$).

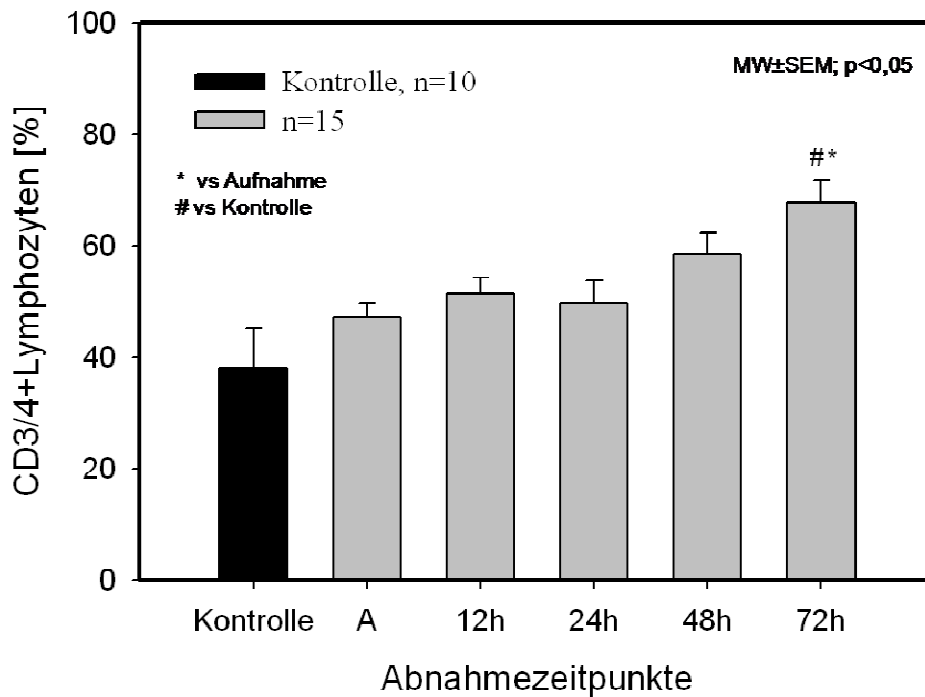


Abbildung 16: Prozentualer Anteil der T-Helferzellen (CD3/4+) unabhängig von der BHS-Funktion. Auf der x-Achse sind jeweils die Entnahmezeitpunkte aufgetragen, auf der y-Achse der prozentuale Anteil an der Gesamtzellzahl der T-Zellen im Liquor. Werte als Mittelwerte±SEM. #, * = p<0,05.

Der signifikante Anstieg gegenüber Kontrolle und Aufnahme lässt sich nur in der Gruppe verzeichnen, welche die Patienten mit der intakten Blut-Hirn-Schranke beinhaltet. Dies wird aus folgender Abbildung ersichtlich (**Abbildung 17**). Nach 72 Stunden erreichen die T-Helferzellen in Gruppe I einen prozentualen Anteil von $68,7 \pm 4,8$. Wie erwähnt ist dieser Anstieg gegenüber der Kontrollgruppe ($38,1 \pm 7,1$) und dem Aufnahmewert in Gruppe I ($43,8 \pm 4,4$) statistisch signifikant. In Gruppe II hingegen war der angedeutete Trend nicht bedeutsam. Bei Aufnahme betrug hier der prozentuale Anteil $51,1 \pm 2,3$. Dieser stieg im Beobachtungszeitraum auf $64,3 \pm 8,1$ an.

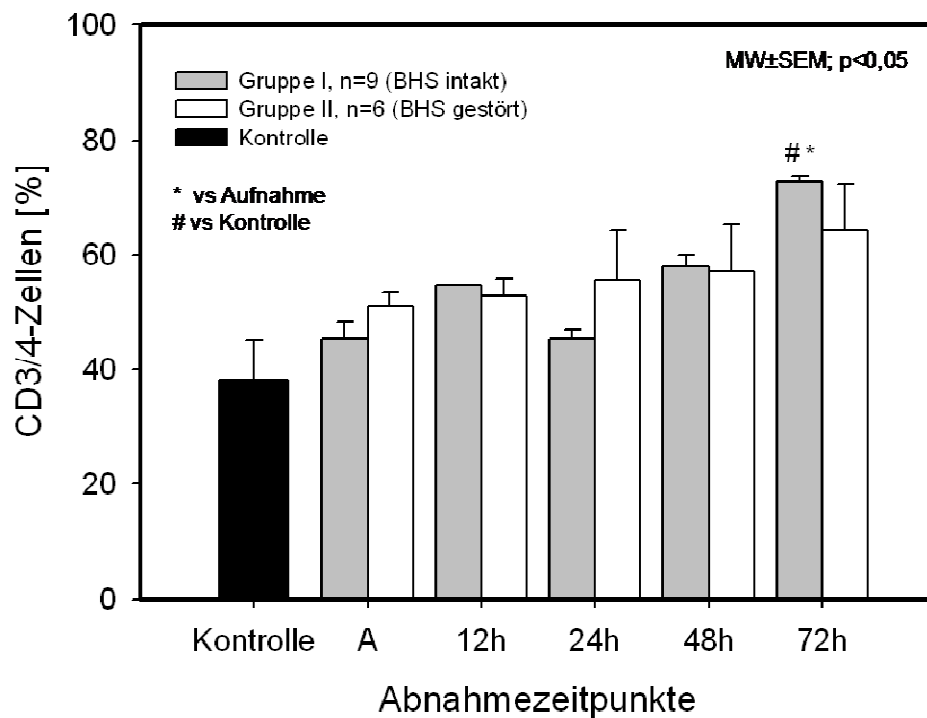


Abbildung 17: Prozentualer Anteil der T-Helfer-Zellen (CD3/4+) von der Gesamtzellpopulation, abhängig von der Funktion der Blut-Hirn-Schranke (BHS). Auf der x-Achse sind jeweils die Abnahmezeitpunkte aufgetragen, auf der y-Achse der prozentuale Anteil an der Gesamtzellzahl der T-Zellen im Liquor. Ab der Aufnahme sind links die Patienten mit intakter BHS (grau) und rechts die mit gestörter BHS (weiß) aufgetragen. Mittelwerte \pm SEM; *,# = $p < 0,05$

Abbildung 18 zeigt den prozentualen Anteil der aktivierten T-Helferzellen in Abhängigkeit von allen T-Helferzellen. Wie zu erwarten, wurden in der Kontrollgruppe keine aktivierten Zellen gemessen ($0,06 \pm 0,06$). Ein signifikanter Anstieg gegenüber dieser Gruppe wird ab 12 Stunden ($2,29 \pm 0,48$) bis 72 Stunden ($4,96 \pm 0,83$) nach Aufnahme gemessen. Ein signifikanter Unterschied zum Aufnahmewert ($0,98 \pm 0,25$) besteht allerdings erst nach 48 Stunden ($2,97 \pm 0,49$).

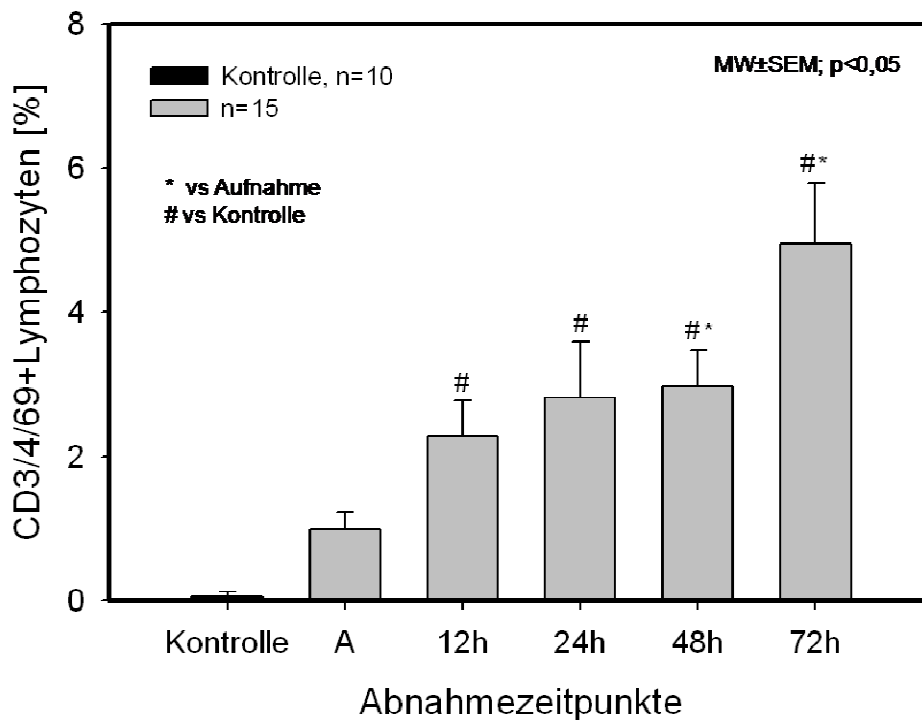


Abbildung 18: Prozentualer Anteil der aktivierten T-Helferzellen (CD3/4/69+) unabhängig von der BHS-Funktion. Auf der X-Achse sind jeweils die Entnahmezeitpunkte aufgetragen, auf der y-Achse der prozentuale Anteil an der Gesamtzellzahl der T-Zellen im Liquor. Werte als Mittelwerte±SEM. #, * = p<0,05.

Die aktivierten T-Helferzellen sind als prozentualer Anteil aller T-Helferzellen in **Abbildung 19** dargestellt. Unabhängig von der BHS-Funktion zeigt sich ein signifikanter Anstieg der Population gegenüber der Kontrollgruppe ($0,06 \pm 0,06$) ab 12 Stunden (Gruppe I: $2,05 \pm 0,78$; Gruppe II: $2,42 \pm 0,65$) nach Aufnahme (Gruppe I: $0,76 \pm 0,26$; Gruppe II: $1,29 \pm 0,53$). Es finden sich über den ganzen Zeitraum keine statistisch signifikanten Unterschiede in beiden Gruppen. In Gruppe II ist lediglich eine steigende Tendenz ab dem Aufnahmewert zu beobachten. Statistisch signifikant ist diese jedoch nicht. Im Gegensatz dazu zeigt Gruppe I ab 48 Stunden ($3,45 \pm 0,79$) bis 72 Stunden ($4,66 \pm 1,16$) einen statistisch relevanten Anstieg gegenüber dem Wert bei Aufnahme ($0,76 \pm 0,25$).

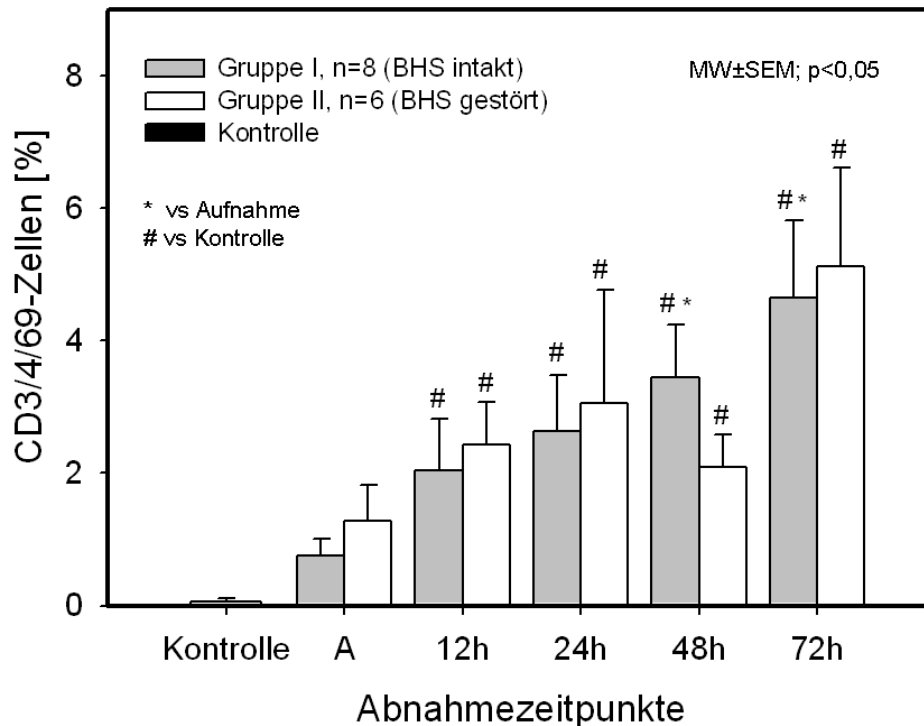


Abbildung 19: Prozentualer Anteil der aktivierten T-Helfer-Zellen (CD3/4/69+) von der Gesamtpopulation der T-Helferzellen, abhängig von der Funktion der Blut-Hirn-Schranke (BHS). Auf der x-Achse sind jeweils die Abnahmezeitpunkte aufgetragen, auf der y-Achse der prozentuale Anteil an der Gesamtzellzahl der T-Zellen im Liquor. Ab der Aufnahme sind links die Patienten mit intakter BHS (grau) und rechts die mit gestörter BHS (weiß) aufgetragen. Mittelwerte \pm SEM; *,# = $p < 0,05$

4.3.3 T-Killerzellen

In diesem Abschnitt werden analog zu den T-Helferzellen die Ergebnisse der T-Killerzellen dargelegt. Der folgende Graph zeigt die T-Zellen, welche mit den Oberflächenmarkern CD 3 und CD 8 gefärbt wurden (**Abbildung 20**). Bereits nach Aufnahme zeigen sich deutlich höhere Werte gegenüber der Kontrollgruppe ($2,04 \pm 0,68$). Die Differenz ist zu jedem Messzeitpunkt statistisch signifikant und erreicht nach 72 Stunden ($57,44 \pm 3,44$) ihr Maximum. Nach 24 Stunden ($44,03 \pm 2,29$) besteht außerdem eine statistisch relevante Differenz zum Aufnahmewert ($33,09 \pm 3,11$).

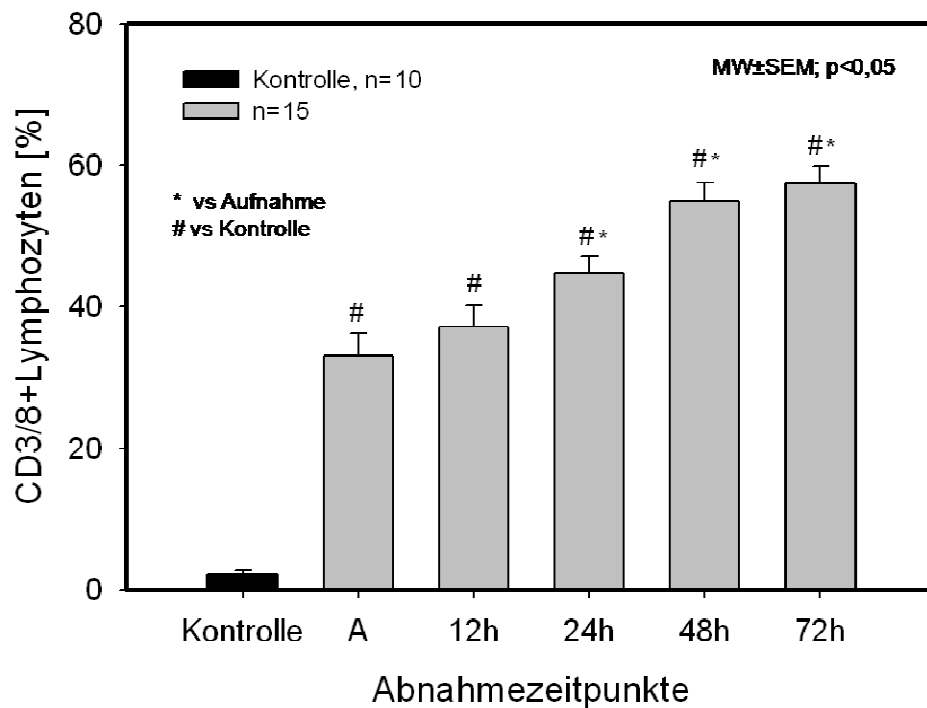


Abbildung 20: Prozentualer Anteil der T-Killerzellen (CD3/8+) unabhängig von der BHS-Funktion. Auf der x-Achse sind jeweils die Entnahmezeitpunkte aufgetragen, auf der y-Achse der prozentuale Anteil an der Gesamtzellzahl der T-Zellen im Liquor. Werte als Mittelwerte \pm SEM. #,* = $p < 0,05$.

Die Aufteilung der Daten nach der BHS-Funktion zeigt zu keinem Zeitpunkt einen statistischen Unterschied zwischen den Gruppen (**Abbildung 21**). Beide Gruppen zeigen zu jedem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied gegenüber der Kontrollgruppe. Beide Gruppen folgen der steigenden Tendenz. Statistisch relevant wird diese aber in Gruppe I ab 24 Stunden ($44,18 \pm 4,06$) nach Aufnahme ($28,08 \pm 3,09$), in Gruppe II erst ab 48 Stunden ($57,48 \pm 7,12$) gegenüber dem Aufnahmewert ($38,58 \pm 5,03$).

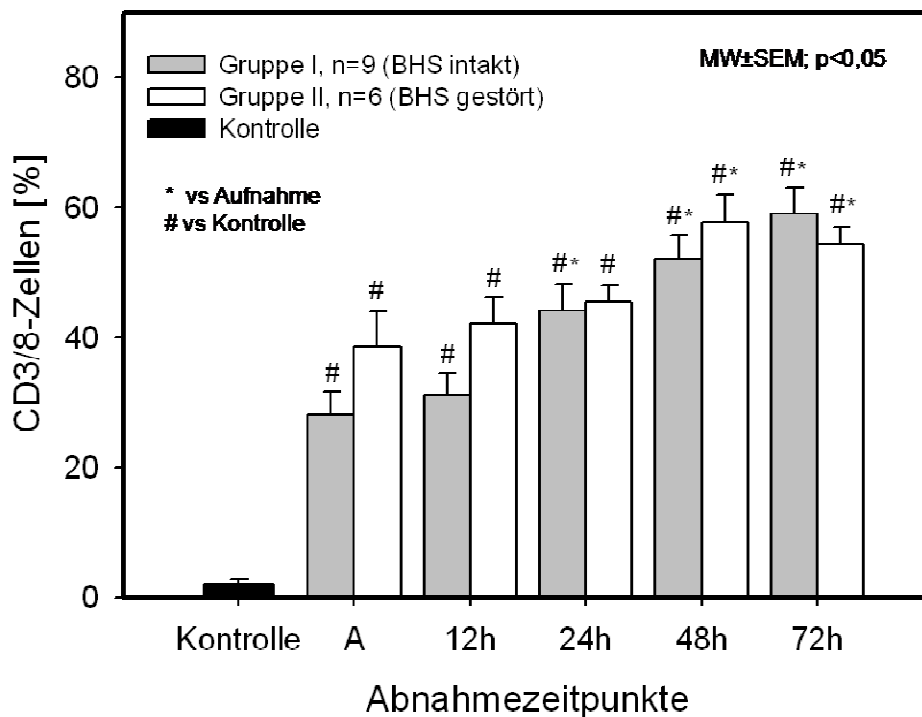


Abbildung 21: Prozentualer Anteil der T-Killer-Zellen (CD3/8+) von der Gesamtpopulation der T-Zellen, abhängig von der Funktion der Blut-Hirn-Schranke (BHS). Auf der x-Achse sind jeweils die Abnahmezeitpunkte aufgetragen, auf der y-Achse der prozentuale Anteil an der Gesamtzellzahl der T-Zellen im Liquor. Ab der Aufnahme sind links die Patienten mit intakter BHS (grau) und rechts die mit gestörter BHS (weiß) aufgetragen. Mittelwerte±SEM; *,# =p<0,05

Abschließend werden wiederum die aktivierten Zellen (CD69) dargestellt. Im folgenden Graphen sind die Ergebnisse unabhängig von einer potentiellen Schrankenstörung abgebildet (**Abbildung 22**). Es zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei den T-Helferzellen mit einem Anstieg über den Beobachtungszeitraum sowie der fehlenden Aktivierung in der Kontrollgruppe. Ab 12 Stunden ($1,29 \pm 0,36$) findet sich eine statistisch signifikante Differenz gegenüber der Kontrollgruppe ($0,02 \pm 0,02$), nach 24 Stunden gegenüber dem Aufnahmewert ($0,42 \pm 0,09$).

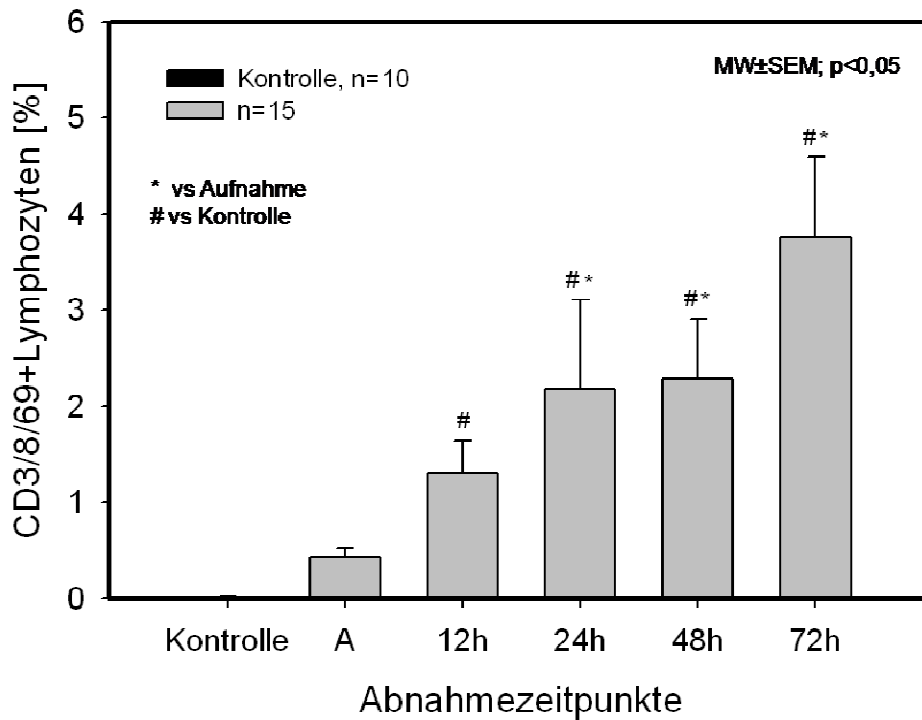


Abbildung 22: Prozentualer Anteil der aktivierten T-Killerzellen (CD3/8/69+) unabhängig von der BHS-Funktion. Auf der x-Achse sind jeweils die Entnahmezeitpunkte aufgetragen, auf der y-Achse der prozentuale Anteil an der Gesamtzellzahl der T-Zellen im Liquor. Werte als Mittelwerte±SEM. #,* = p<0,05.

Abbildung 23 zeigt die aktivierten T-Killerzellen abhängig von der BHS-Funktion. In beiden Gruppen sind die Werte nach Aufnahme bis 72 Stunden signifikant erhöht gegenüber der Kontrollgruppe. Lediglich 48 Stunden nach Aufnahme besteht ein signifikanter Unterschied zwischen Gruppe I ($3,07 \pm 1,02$) und Gruppe II ($1,01 \pm 0,51$). Nach 72 Stunden ist diese Differenz nicht mehr nachzuweisen. Die Ergebnisse in Gruppe II zeigen keine statistische Signifikanz gegenüber dem Aufnahmewert. Im Gegensatz dazu zeigt Gruppe I bei 48 Stunden ($3,07 \pm 1,02$) und 72 Stunden ($3,83 \pm 0,76$) einen statistisch signifikanten Unterschied gegenüber der Aufnahme ($0,49 \pm 0,15$).

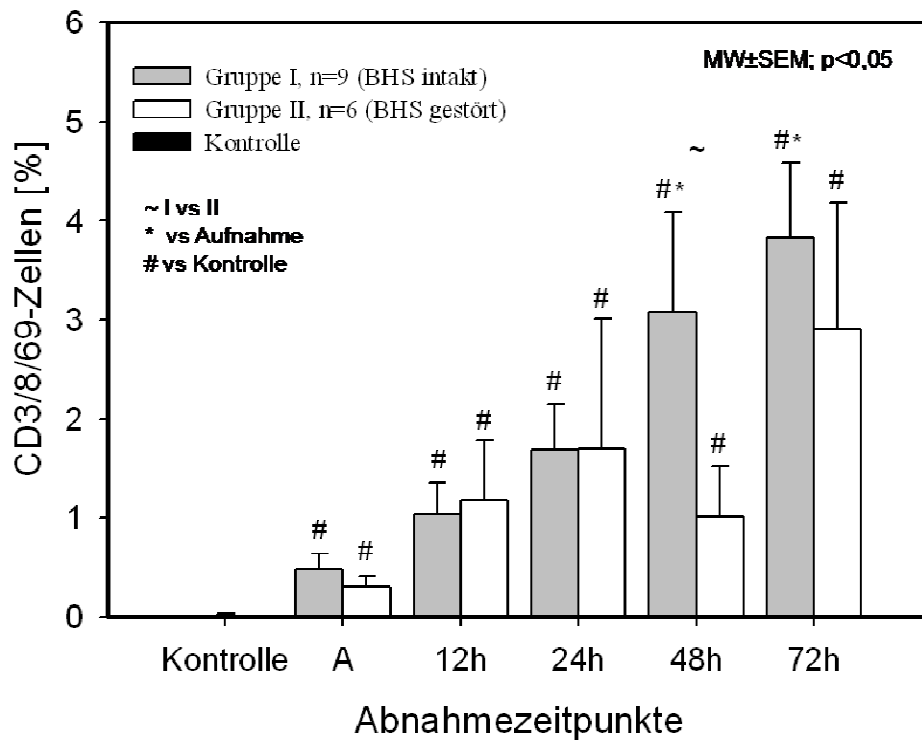


Abbildung 23: Prozentualer Anteil der aktivierten T-Killer-Zellen (CD3/8/69+) von der Gesamtpopulation der T-Helferzellen in Abhängigkeit von der Funktion der Blut-Hirn-Schranke (BHS). Auf der x-Achse sind jeweils die Abnahmezeitpunkte aufgetragen, auf der y-Achse der prozentuale Anteil an der Gesamtzellzahl der T-Zellen im Liquor. Ab der Aufnahme sind links die Patienten mit intakter BHS (grau) und rechts die mit gestörter BHS (weiß) aufgetragen. Mittelwerte±SEM; *,#,~ =p<0,05

4.3.4 Natürliche Killerzellen

Die folgende Abbildung illustriert die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analysen der natürlichen Killerzellen (CD56). Hier zeigt sich im Gegensatz zu den vorangegangenen Ergebnissen ein Abfall über die 72 Stunden. Alle Ergebnisse sind gegenüber der Kontrollgruppe (1,28±0,3) statistisch signifikant erhöht. Der Abwärtstrend allerdings wird erst ab 24 Stunden (35,79±2,08) statistisch signifikant (**Abbildung 24**)

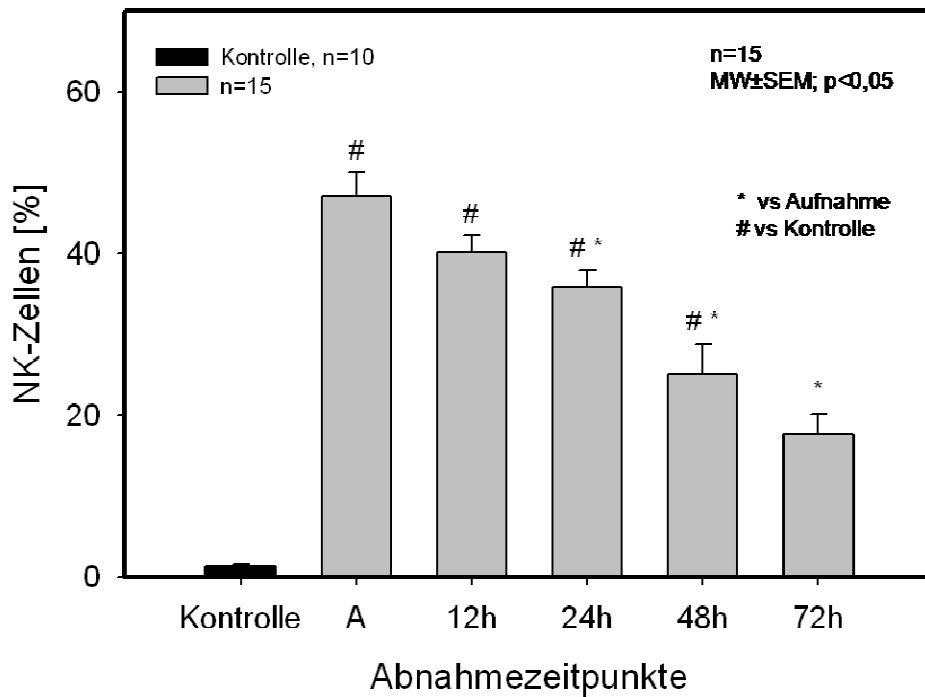


Abbildung 24: Prozentualer Anteil der natürlichen-Killerzellen (CD56+) unabhängig von der BHS-Funktion. Auf der x-Achse sind jeweils die Entnahmezeitpunkte aufgetragen, auf der y-Achse der prozentuale Anteil an der Gesamtzellzahl der T-Zellen im Liquor. Werte als Mittelwerte±SEM. #,* = $p < 0,05$.

Die Auftrennung der Daten nach der Funktion der Blut-Hirn-Schranke liefert keine statistischen Erkenntnisse, die auf einen signifikanten Unterschied in beiden Gruppen hindeuten (**Abbildung 25**). In Gruppe I besteht schon ab 24 Stunden ($35,98 \pm 2,57$) ein signifikanter Abfall gegenüber dem Aufnahmewert ($51,04 \pm 3,58$). In Gruppe II ist dieser erst ab 48 Stunden ($23,6 \pm 3,55$ gegenüber $43,11 \pm 4,83$ bei Aufnahme) zu verzeichnen.

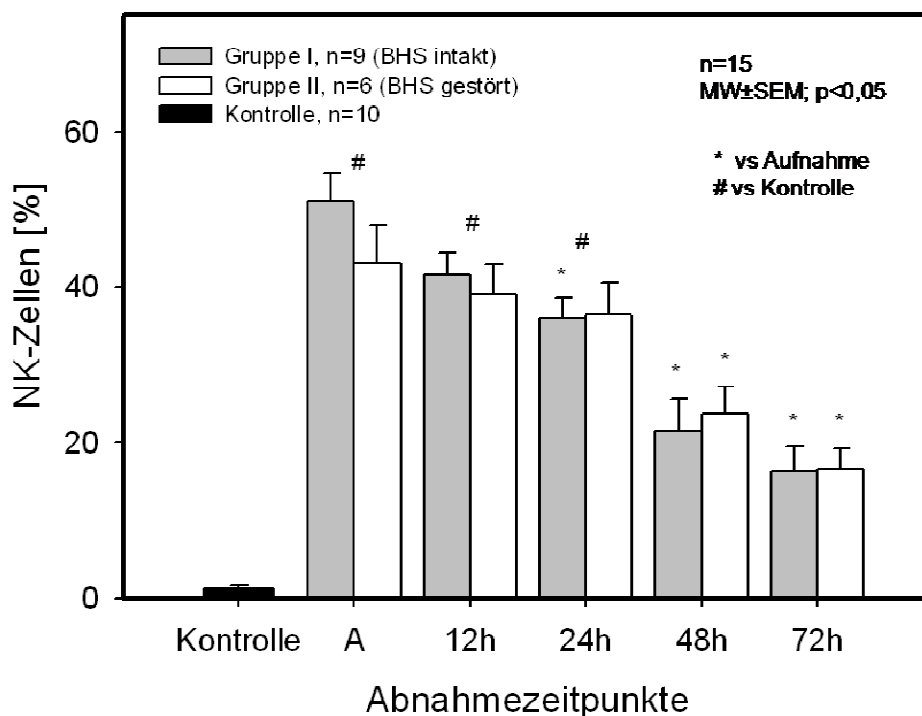


Abbildung 25: Prozentualer Anteil der natürlichen Killerzellen (CD56+) an der Gesamtzellpopulation, in Abhängigkeit von der Funktion der Blut-Hirn-Schranke (BHS). Auf der x-Achse sind jeweils die Abnahmezeitpunkte aufgetragen, auf der y-Achse der prozentuale Anteil an der Gesamtzellzahl der T-Zellen im Liquor. Ab der Aufnahme sind links die Patienten mit intakter BHS (grau) und rechts die mit gestörter BHS (weiß) aufgetragen. Mittelwerte±SEM; *,# =p<0,05

4.4 IL-1ra

Folgende Abbildung zeigt die Konzentration von IL-1ra bei der Kontrollgruppe sowie bei den Patienten. Auf der x-Achse sind die Kontrollgruppe sowie die definierten Abnahmezeitpunkte, auf der y-Achse die IL-1ra Konzentration in pg/ml aufgetragen. Die Konzentration von IL-1ra im Liquor war zum Aufnahmezeitpunkt ($839,73 \pm 193,78$) sowie wiederum nach 72 Stunden ($664,86 \pm 111,21$) gegenüber der Kontrollgruppe ($42 \pm 5,88$) signifikant erhöht.

Allerdings war keine statistisch signifikante Dynamik innerhalb der ersten 72 Stunden nach Trauma zu beobachten (**Abbildung 26**).

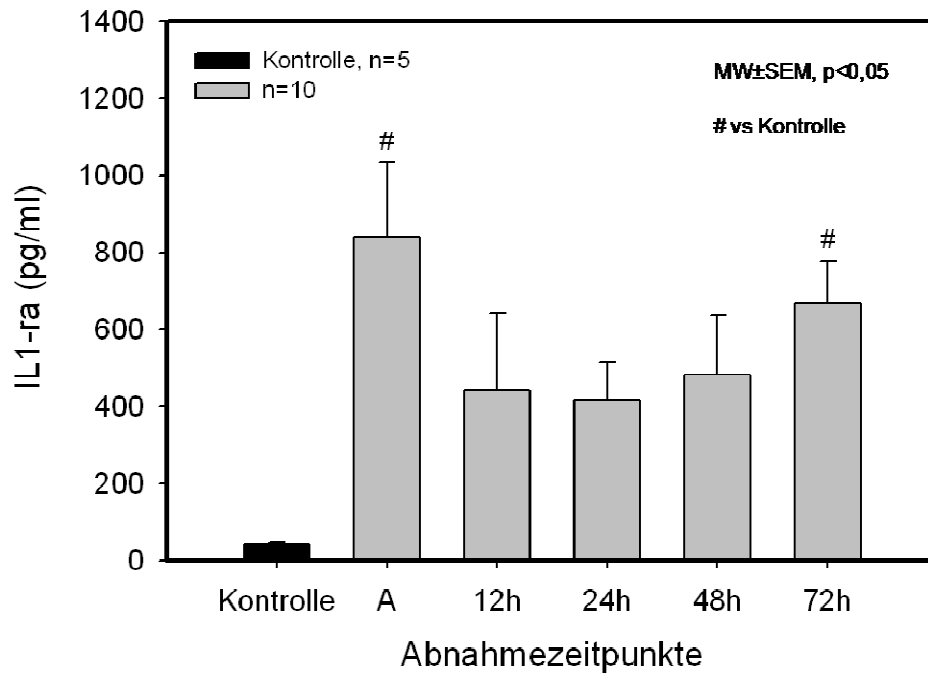


Abbildung 26: Konzentration von IL-1ra im Liquor. Auf der x-Achse sind jeweils die Abnahmezeitpunkte aufgetragen, auf der y-Achse die Konzentration von IL-1ra der Kontrollgruppe sowie der Patienten in pg/ml. Werte als Mittelwerte \pm SEM. # = $p < 0,05$.

Die gruppierten Ergebnisse von IL-1ra sind im folgenden Graphen dargestellt. Auffallend ist ein starker Abfall in der Gruppe mit intakter BHS von der Aufnahme ($678,16 \pm 176,81$) bis 12 Stunden nach Trauma ($174,47 \pm 62,83$). Dieser Unterschied ist statistisch signifikant. In Gruppe II ist über den Beobachtungszeitraum keine statistisch signifikante Dynamik zu verzeichnen, tendenziell ist jedoch ein früher Abfall mit nachfolgender Erholung von IL-1ra zu beobachten (**Abbildung 27**).

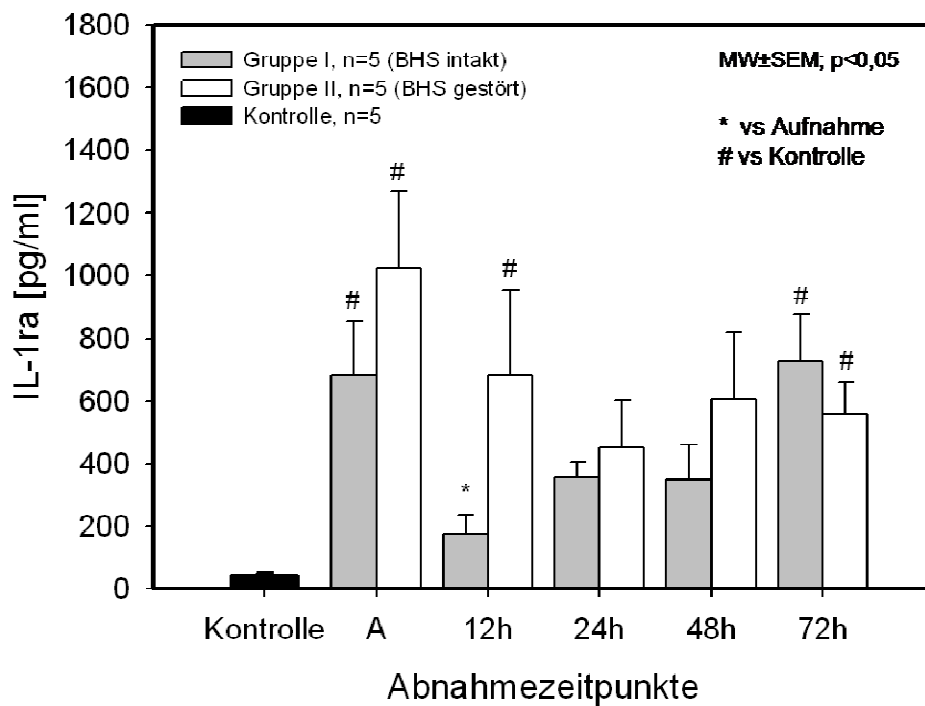


Abbildung 27: Konzentration von IL-1ra im Liquor, abhängig von der Funktion der Blut-Hirn-Schranke (BHS). Auf der x-Achse sind jeweils die Abnahmezeitpunkte aufgetragen, auf der y-Achse die Konzentration von IL-1ra in pg/ml. Ab der Aufnahme sind links die Patienten mit intakter BHS (grau) und rechts die mit gestörter BHS (weiß) aufgetragen. Mittelwerte±SEM; *,# =p<0,05

Auf der Grafik in **Abbildung 28** sind die CD14+Monozyten als prozentualer Anteil der Gesamtzellzahl dargestellt. Hier besteht im Gegensatz zu den Ergebnissen von IL-1ra, erst ab 72 Stunden nach Anlage der ICP ein signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrollgruppe ($2,6 \pm 0,68$). Außerdem spiegelt sich hier eine zeitliche Dynamik in Form eines statistisch signifikanten Anstieges ab 72 Stunden $6,48 \pm 0,84$ gegenüber dem Aufnahmewert ($2,32 \pm 0,64$) wider.

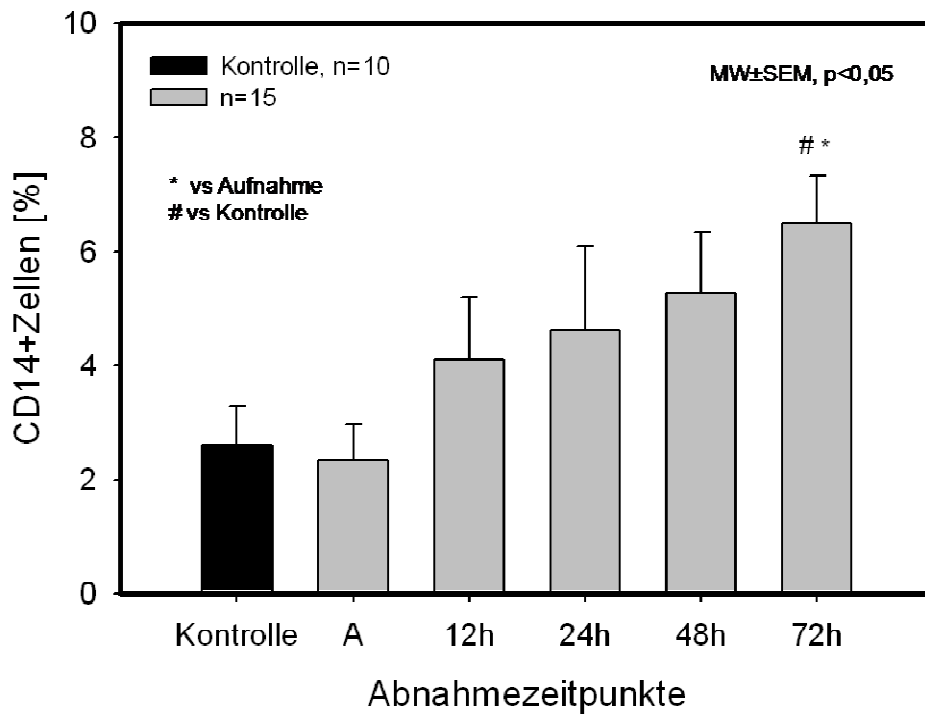


Abbildung 28: Prozentualer Anteil der Monozyten (CD14+). Auf der x-Achse sind jeweils die Entnahmezeitpunkte aufgetragen, auf der y-Achse der prozentuale Anteil an der Gesamtzellpopulation im Liquor. Werte als Mittelwerte±SEM. #,* = p<0,05

4.5 NT-Pro-BNP

Der folgende Graph (**Abbildung 29**) zeigt die Konzentrationen von NT-proBNP im Liquor des gesamten Patientenkollektivs und der Kontrollgruppe. Zu jedem Zeitpunkt ist NT-proBNP signifikant gegenüber der Kontrollgruppe ($18,4 \pm 3,4$) erhöht. Eine statistisch signifikante Dynamik ist über die 72 Stunden des Beobachtungszeitraumes nicht zu erkennen. Tendenziell fällt NT-proBNP aber nach der Aufnahme ($70,3 \pm 18,1$) etwas ab, um nach 24 und 48 Stunden wieder anzusteigen. Am Ende des Beobachtungszeitraumes erreicht NT-proBNP sein Maximum mit $88,7 \pm 19,2$. Die Trennung der Daten nach Funktion der Blut-Hirn-Schranke ist in der nachfolgenden Abbildung dargestellt.

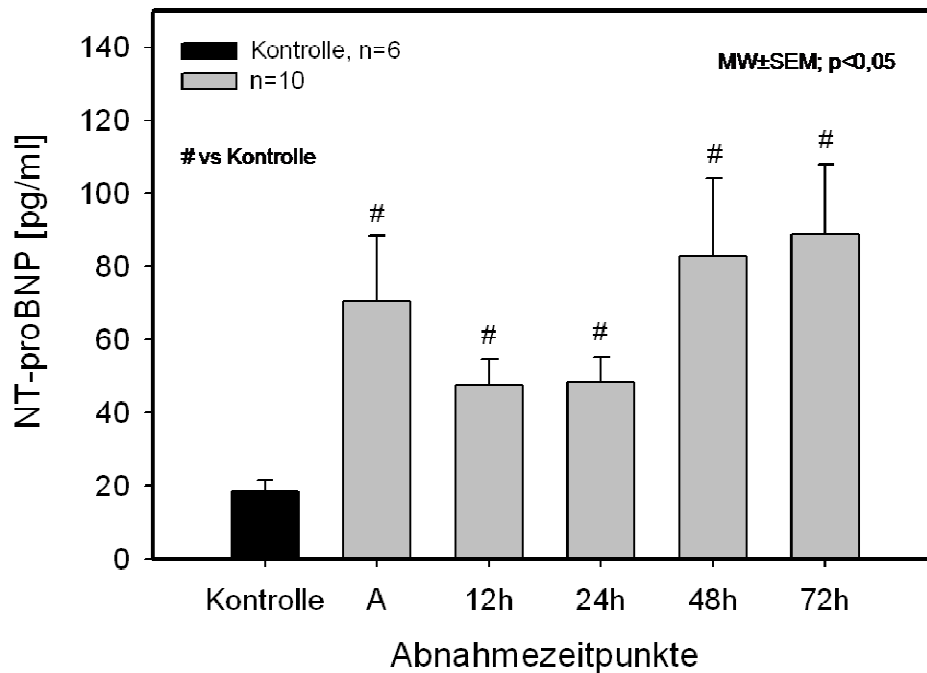


Abbildung 29: Konzentration von NT-proBNP im Liquor. Auf der x-Achse sind jeweils die Abnahmezeitpunkte aufgetragen, auf der y-Achse die Konzentration von NT-proBNP der Kontrollgruppe sowie der Patienten in pg/ml. Werte als Mittelwerte±SEM. # = $p < 0,05$.

In **Abbildung 30** ist die Konzentration von NT-proBNP im Liquor getrennt nach der BHS-Funktion über die Zeitachse dargestellt. Die Kontrollgruppe zeichnet sich durch Durchschnittswerte von $18 \pm 3,4$ pg/ml aus. Die Konzentrationen der Patienten aus Gruppe I waren direkt nach Aufnahme signifikant erhöht ($80,6 \pm 84,4$). Über den weiteren Beobachtungszeitraum war gegenüber dem Aufnahmewert keine statistisch signifikante Dynamik nachzuweisen. Tendenziell fiel der Wert nach Aufnahme wieder ab, um nach 48h erneut anzusteigen. Während der letzten Untersuchung 72h ($87,9 \pm 35,1$) nach Trauma war der Wert wieder signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht.

In Gruppe II konnte ebenfalls keine statistisch signifikante Dynamik über den Beobachtungszeitraum detektiert werden. 12 sowie 48 und 72 Stunden nach Trauma sind die

Konzentrationen gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht. Tendenziell fällt auch hier der Wert nach Aufnahme ab, um nach 48h und nochmals nach 72 Stunden nach Trauma anzusteigen. Eine statistisch signifikante Differenz zwischen beiden Gruppen ($35,2 \pm 6,9$ vs. $60,2 \pm 8,5$) war 12 Stunden nach Trauma vorhanden.

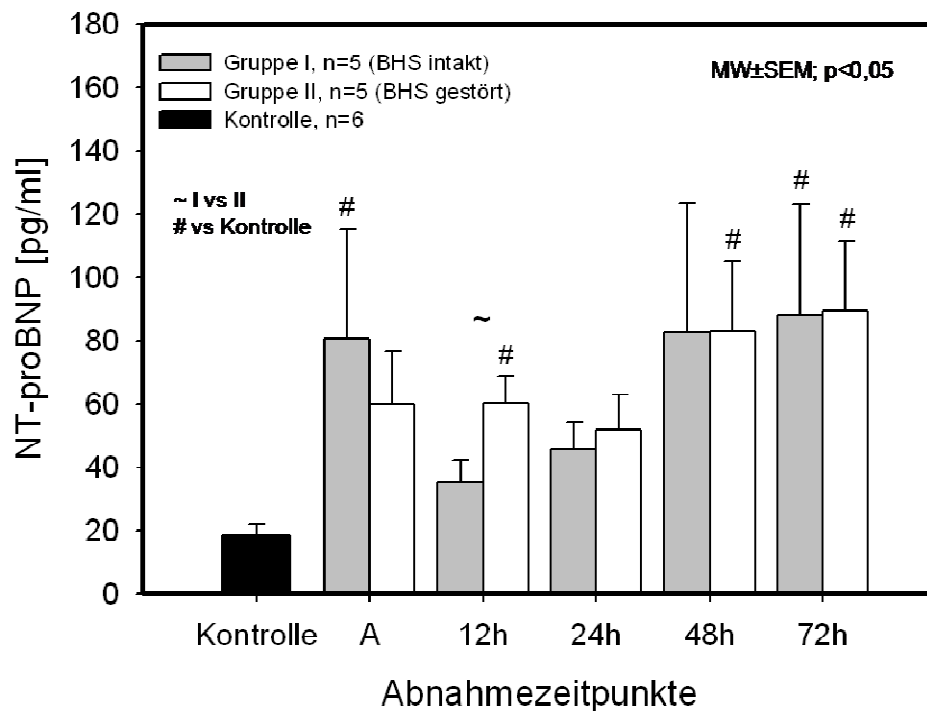


Abbildung 30: Konzentration von NT-proBNP im Liquor, abhängig von der Funktion der Blut-Hirn-Schranke (BHS). Auf der x-Achse sind jeweils die Abnahmezeitpunkte aufgetragen, auf der y-Achse die Konzentration von NT-proBNP in pg/ml. Ab der Aufnahme sind links die Patienten mit intakter BHS (grau) und rechts die mit gestörter BHS (weiß) aufgetragen. Mittelwerte±SEM; ~,# =p<0,05

5 DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit demonstriert erstmals zelluläre Veränderungen und die Dynamik von NT-proBNP und IL-1ra im Liquor von Patienten in der direkten posttraumatischen Phase nach schwerem SHT.

Der Schwerpunkt dieser Studie liegt einerseits in der quantitativen Analyse von Subpopulationen immunkompetenter Zellen andererseits in der Erforschung der frühen Dynamik des antiinflammatorischen Mediators IL-1ra und von NT-proBNP.

Gezeigt werden konnte, dass der prozentuale Anteil der immunkompetenten Zellen im Liquor in der direkten posttraumatischen Phase einer teilweise statistisch signifikanten Dynamik unterliegt. Unsere Ergebnisse liefern außerdem Hinweise für die These, dass die BHS einen geringen Einfluss auf die die zellulären Konzentrationen der Immunzellen und damit auf die Pathogenese des sekundären Hirnschadens zu haben scheint.

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analysen werden zu einem späteren Zeitpunkt einzeln näher beleuchtet und diskutiert. IL-1ra, ein antiinflammatorisches Zytokin, welches kompetitiv die Bindungsstelle von IL-1 blockiert, wurde u.a. im Liquor von Patienten nach nichttraumatischer Subarachnoidalblutung detektiert und quantifiziert (111). Es stellte sich deshalb die Aufgabe, dieses Zytokin im Liquor nach schwerem SHT zu bestimmen und die Ergebnisse mit vorangegangenen Studien zu vergleichen und zu diskutieren. BNP und sein N-terminales Fragment NT-proBNP wurde in mehreren Studien im Liquor bestimmt. Ähnliche Untersuchungen in denen ebenfalls NT-proBNP analysiert wurde, kamen teilweise zu diskrepanten Ergebnissen und Schlussfolgerungen. Ziel des Teilprojekts der Analyse von NT-proBNP in der vorliegenden Arbeit war ein Beitrag zur aktuellen Diskussion, um offene Fragen beantworten zu können.

5.1 Patienten- und Probandenkollektiv

In die Studie sind Patienten eingeschlossen, die ein schweres Schädel-Hirn-Trauma erlitten und innerhalb von maximal 90 Minuten den Schockraum zur Diagnostik und Initialtherapie erreichten. Die geschlechterspezifische Verteilung von 2:1 (männlich: weiblich) spiegelt das bekannte Kollektiv für Traumapatienten in Mitteleuropa wider. In einer großen Multicenterstudie an polytraumatisierten Patienten liegt der Anteil der männlichen Patienten bei 63%, in unserer Studie sind Männer mit 66% vertreten (152).

Die Dokumentation der präklinischen und klinischen Daten erfolgte entsprechend den Richtlinien der *Europäischen Konsensuskonferenz zur Aufnahme von Daten polytraumatisierter Patienten* (151). Das Studiendesign und die in der Klinik etablierten Methoden ermöglichten die Aufnahme der Patienten in diesem engen Zeitfenster. Die Probengewinnung in der Frühphase nach Trauma ist durch zahlreiche Voruntersuchungen an SHT-Patienten begründet. Eine Vielzahl von Studien hat sich mit der Analyse von pro- und antiinflammatorischen Mediatoren in der Initialphase nach Trauma beschäftigt. Diese Arbeiten zeigen klar, dass eine statistisch signifikante Dynamik vieler relevanter Mediatoren zu verzeichnen ist (37;122;167). Die Analyse in der unmittelbaren posttraumatischen Phase beruht auf einer Reihe von Studien, die eine ausgeprägte Dysfunktion humaner Immunzellen des unspezifischen Immunsystems in diesem Zeitraum detektieren konnten (24;49). Aus diesem Grund wurden standardisierte Abnahmezeitpunkte gewählt, auch in Anlehnung an etablierte Untersuchungen in der Arbeitsgruppe von Biberthaler und Bogner, die sich mit der Initialphase nach Polytrauma beschäftigen (21;23;81;168). Da es sich um ein Patientengut handelt, welches diversen Limitationen unterliegt, ist die Forderung nach einem größeren Kollektiv aus statistischer Sicht einleuchtend und legitim aber logistisch schwer umzusetzen. Für weiterführende Studien ist eine Zusammenarbeit verschiedener Traumazentren hinsichtlich der logistischen und organisatorischen Machbarkeit kritisch zu prüfen.

Als Kontrollgruppe wurde Liquor von 10 Patienten verwendet, die sich im Rahmen eines elektiven Eingriffs an der unteren Extremität einer Spinalanästhesie als Regionalverfahren unterzogen. Vor Einschluss in die Kontrollgruppe wurde eine neurologische oder entzündliche Grunderkrankung anamnestisch ausgeschlossen.

5.2 Durchflusszytometrische Analysen

Die Durchflusszytometrie ist ein etabliertes Verfahren zur Analyse zellulärer Oberflächenantigene. Als Beispiele sind die Messung der Monozytenpopulation in der Sepsisdiagnostik, die immunologische Diagnostik bei HIV (CD4/CD8-Ratio) sowie die Messung der CD34-positiven Zellen in der Stammzelltransplantation genannt (65;105). Weiterhin spielt die Durchflusszytometrie in der Untersuchung von Immundefekten und der Bestimmung von HLA-B27 in der Rheumadiagnostik eine herausragende Rolle (38;90). In der Pulmonologie wird die Durchflusszytometrie standardmäßig zur Quantifizierung der Lymphozytenpopulation in der bronchoalveolären Lavage eingesetzt (163). Gerade in der Diagnostik der interstitiellen Lungenerkrankungen liefert diese Methode durch Bestimmung der CD4/CD8-Ratios wegweisende Ergebnisse (36). Aufgrund dieser vielfältigen Anwendungsgebiete der Durchflusszytometrie im klinischen Alltag und im Rahmen experimentellen Studien entzündlicher neurologischer Erkrankungen ist eine Validierung dieser etablierten Methode nicht erforderlich.

5.2.1 B-Lymphozyten

In dieser Studie wird erstmals ein früher Anstieg der CD19+ B-Zellen im Liquor von Patienten in der Initialphase nach schwerem Schädel-Hirn-Trauma gezeigt. 48 bzw. 72 Stunden nach Trauma zeigt sich ein signifikanter Anstieg unabhängig von der Funktion der Blut-Hirn-Schranke; bis 12h nach Trauma besteht ein signifikanter Unterschied zwischen der

Gruppe ohne BHS-Schädigung und der Gruppe mit BHS-Schädigung. In der Literatur gibt es bislang keine vergleichbaren Daten nach Schädel-Hirn-Trauma.

Es ist bisher nicht bekannt, ob B-Lymphozyten und Autoantikörper eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie des ZNS-Traumas spielen. Vergangene Studien geben Hinweise dafür, dass B-Zellen die Remyelinisierung nach axonalem Schaden unterstützen (73;146;156). Aufgrund der divergenten Funktionen von B-Zellen führten Ankeny et al. 2006 eine experimentelle Studie an Mäusen durch, welchen unter kontrollierten Bedingungen ein Wirbelsäulentrauma zugeführt wurde. Ankeny untersuchte die B-Lymphozyten im Liquor der Versuchstiere (4). Ziel war es, die pathophysiologischen Zusammenhänge von Wirbelsäulentrauma und B-Zellaktivierung zu beleuchten. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass das Wirbelsäulentrauma tief greifende und dauerhafte Veränderungen in der Funktion der B-Zellen im Knochenmark, in der Milz und im Rückenmark hervorruft (4). Das Wirbelsäulentrauma hat nach diesen Erkenntnissen einen entscheidenden Einfluss auf systemische und intraspinale B-Zellaktivierung mit nachfolgender B-Zell-abhängiger organspezifischer und systemischer Autoimmunantwort. Die Ergebnisse der Studie lieferten Hinweise darauf, dass aktivierte B-Zellen Autoantikörper produzieren, welche neuronale Proteine und zelluläre Antigene insbesondere RNA und DNA binden und letztendlich ein hohes neurotoxisches Potenzial besitzen.

Dieser Arbeit sind verschiedene Studien voraus gegangen, welche Hinweise und Beweise dafür liefern konnten, dass aktivierte B-Lymphozyten und Autoantikörper ursächlich für neuropathologische Mechanismen beim systemischen Lupus erythematodes (SLE), im Rahmen der Multiplen Sklerose (MS) und experimentieller Autoimmunenzephalomyelitis (EAE) verantwortlich sind (74;85;135). Obwohl die Ätiologie des SLE weitgehend unbekannt ist, konnte belegt werden, dass anti-DNA-Antikörper mit neurogenen Antigenen und Glutaminrezeptoren kreuzreagieren und folglich für Exzitoxizität mit daraus resultierender

kognitiver Beeinträchtigung verantwortlich sind (41;85). Im Liquor von Patienten mit MS konnten erhöhte Titer von Antikörpern gegen Myelin detektiert werden, was mit progressiver Demyelinisierung und neurologischen Defiziten assoziiert ist. In den Studien zur EAE konnten eindeutige Beweise für die These gefunden werden, dass die B-Zellaktivierung und die Synthese von Autoantikörpern ursächlich für die Demyelinisierung sind (59;135;188). Die zytotoxischen Effekte der Antikörper auf die Neurone beruhen auf der Aktivierung des Komplementsystems, der Phagozytenstimulation sowie der Freisetzung von Zytokinen, oxidativen Metaboliten und Proteasen aus Mikroglia und Makrophagen (2;20;26;35;64;157;189).

Mit der vorliegenden Arbeit wird erstmals ein Beitrag zur Quantifizierung der B-Lymphozyten mittels Durchflusszytometrie im Liquor von Patienten nach schwerem Schädel-Hirn-Trauma geleistet. Gezeigt wird, dass sich der Anteil der CD19+ Lymphozyten in der Initialphase nach Trauma gegenüber der Kontrollgruppe und dem Aufnahmewert signifikant verändert. Diese Ergebnisse ähneln den oben zitierten Arbeiten, die sich mit Neuroinflammation nach Wirbelsäulentrauma, MS und EAE beschäftigten (4;119). Außerdem wird im Kapitel 4.3 dargestellt, dass die Blut-Hirn-Schranke wahrscheinlich keinen Einfluss hat. Dafür wäre die Ursache in einer von der Blut-Hirn-Schranke unabhängigen Migration der Immunzellen zu suchen. Um die Mechanismen der potentiellen aktiven Migration immunkompetenter Zellen in den Liquorraum detaillierter klären zu können, sind weiterführende Studien essenziell. Dabei sollten intrathekale und systemische Analysen vorgenommen werden, um den Einfluss der Blut-Hirn-Schranke genauer erforschen zu können. Darüber hinaus ist die Bestimmung von Antikörpern zu fordern, um das neurotoxische Potenzial beschreiben und die Daten mit vorangegangenen Studien besser vergleichen zu können. Trotz dieser fehlenden Daten und vorliegenden Unzulänglichkeiten erlauben die in der vorliegenden Studie erhobenen Daten die Aufstellung der These, dass das

schwere Schädel-Hirn-Trauma ähnlich wie das experimentelle Wirbelsäulentrauma die normale Immunregulation durchbricht und es zu einer inadäquaten Immunantwort kommt. Weiterführende Studien werden die Mechanismen der Aktivierung der B-Lymphozyten sowie der Antikörpersynthese nach Trauma aufklären müssen. Daraus lassen sich sicherlich in Zukunft therapeutische Strategien zur Modulation der Neuroinflammation ableiten.

5.2.2 T-Lymphozyten

Ein Ziel der Studie ist die quantitative Bestimmung relevanter Subpopulationen der T-Lymphozyten. Es gibt eine Vielzahl von Studien, die sich mit der zellvermittelten Immunantwort im Liquor von Patienten mit entzündlichen Erkrankungen beschäftigen. Beispielsweise untersuchen Bueno et al. immunkompetente Zellen bei Patienten mit Neurozystizerkose mittels Durchflusszytometrie (27). Diese Daten zeigen, dass die Durchflusszytometrie ein probates Analyseverfahren zur Diagnose und zum Verständnis der zellvermittelten Immunantwort im Rahmen dieser Erkrankung darstellt. Die Multiple Sklerose ist eine häufige neurologische Erkrankung, die Gegenstand vieler Studien ist, welche sich mit der Aufklärung pathophysiologischer Zusammenhänge der Neuroinflammation beschäftigen. Bezüglich der zellvermittelten Immunantwort nach schwerem Schädel-Hirn-Trauma gibt es allerdings noch wenige Daten. Daher war es das Ziel, durch die Analyse der Subpopulationen ausgewählter immunkompetenter Zellen einen Beitrag zum Verständnis der Inflammation im Rahmen des sekundären Hirnschadens nach schwerem Schädel-Hirn-Trauma zu leisten.

Die T-Helferzellen, die T-Killerzellen sowie die natürlichen Killerzellen als prozentualen Anteil von der Gesamtzellzahl und jeweils aufgetrennt nach Funktionalität der Blut-Hirn-Schranke wurden im Rahmen der Studie bestimmt. Allen T-Zellen gemeinsam ist die Oberflächenmarkierung mit CD3. Es wurde gezeigt, dass die T-Zellen über die ersten 72 Stunden nach Trauma stetig ansteigen. Einen signifikanten Unterschied gegenüber der Kontrollgruppe und dem Aufnahmewert konnten wir allerdings erst nach 48 Stunden

ermitteln. Die Trennung der Daten nach Blut-Hirn-Schranke zeigte keinen Unterschied in beiden Gruppen. Dieses Ergebnis, welches auch in anderen Substudien dieser Arbeit gezeigt wurde, unterstützt die These, dass die immunkompetenten Zellen unabhängig von der Blut-Hirn-Schranke in das intrazerebrale Gewebe immigrieren.

Die T-Helferzellen, welche durch die Oberflächenmarker CD3 und CD4 charakterisiert sind, zeigen eine ähnliche Dynamik mit steigender Tendenz. Allerdings finden sich hier erst ab 72 Stunden signifikante Unterschiede gegenüber Kontrollgruppe und Aufnahmewert. Dieser Unterschied besteht nur bei den Patienten, welche eine intakte Blut-Hirn-Schranke hatten. Eine Aktivierung der T-Helferzellen wird durch die Expressierung von CD69 an der Oberfläche charakterisiert. Bei diesen Zellen ist eine frühe Signifikanz zu erkennen. Bereits 12 Stunden nach Trauma ist der prozentuale Anteil dieser Zellen gegenüber der Kontrollgruppe und nach 48 Stunden gegenüber dem Aufnahmewert erhöht. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es über den frühen Beobachtungszeitraum zu einem signifikanten Anstieg der T-Helferzellen kommt, wobei die Aktivierung des zellulären Immunsystems bereits einige Stunden nach Trauma initiiert wird.

Die Ergebnisse bei den T-Killerzellen sind prinzipiell ähnlich. Auffällig ist, dass bereits nach Aufnahme ein signifikant höherer Anteil gegenüber unseren Normalprobanden besteht. Nach 24 bzw. 48 Stunden erreicht der tendenzielle Anstieg seit Einschluss der Patienten einen statistisch signifikanten Unterschied gegenüber der Aufnahme. Es konnte ebenfalls kein relevanter Einfluss der Blut-Hirn-Schranke auf die Ergebnisse über den Beobachtungszeitraum detektiert werden. 48 Stunden nach Aufnahme zeigen die Daten eine statistisch signifikante Differenz zwischen beiden Gruppen, welche im weiteren Verlauf nicht mehr zu errechnen war. Deshalb lässt dieses Einzelergebnis keine Erkenntnisse bzgl. eines möglichen Einflusses der BHS zu.

5.2.3 NK-Zellen

Abschließend seien hier die Ergebnisse der natürlichen Killerzellen diskutiert. Es handelt sich dabei neben den T- und B-Zellen um die dritte eigenständige Lymphozytenpopulation der zellulären Immunabwehr. Ihr Anteil im peripheren Blut liegt bei 5-15 %. Die Hauptfunktion der NK-Zellen im Rahmen der zellulären Immunabwehr ist die Abtötung virusinfizierter Zellen und die sogenannte Immunsurveillance gegenüber Tumoren (133). Bei diesen Zellen war sofort nach Aufnahme ein signifikant erhöhter Wert gegenüber der Kontrollgruppe zu verzeichnen. Im Gegensatz zu den anderen analysierten immunkompetenten Zellen fiel der prozentuale Anteil jedoch im weiteren Beobachtungszeitraum stetig ab. Nach 48 Stunden war dieser Abfall statistisch signifikant. Diese Ergebnisse sind sehr kritisch einzuschätzen, da die Auswertung der NK-Zellen im Vergleich zu den anderen von uns untersuchten Subpopulationen extrem schwierig war. Eine für markierte Zellen typische „Wolkenbildung“ ist in diesem Fall nur angedeutet. Ziel der Arbeitsgruppe ist die nochmalige Analyse der NK-Zellen in weiterführenden Studien, um mögliche Fehlerquellen bzw. Ursachen dieser Probleme zu erforschen. Möglicherweise führt eine zusätzliche Färbung mit CD16 zu präziseren Daten. CD16 ist neben CD56 ein Oberflächenmarker, der ebenfalls auf natürlichen Killerzellen exprimiert wird (131). Dadurch wird eine genauere Quantifizierung erreicht und der Einfluss der NK-Zellen auf die Pathophysiologie der Neuroinflammation möglicherweise geklärt.

5.3 Analyse von IL-1ra

Interleukin-1 (IL-1) ist ein typisches proinflammatorisches Zytokin mit verschiedenen biologischen Eigenschaften, welche an proinflammatorischen Reaktionen einer Zelle beteiligt sind. IL-1 induziert und fördert die Bildung von Cyclooxygenase 2 und die der induzierbaren Stickoxid-Synthase. Zellen, die mit IL-1 versetzt sind, bilden daher Prostaglandin E2 und

Stickoxid. Weiterhin bewirkt IL-1 die Bildung von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen und anderen Zellen. IL-1ra ist ein im Körper vorkommender endogener Antagonist. Er hemmt die Wirkung von IL-1, indem er am IL-1-Rezeptor bindet und ihn damit blockiert. Dadurch verhindert IL-1ra die proinflammatorische Wirkung von IL-1 (15).

In dieser Substudie wurden die intrathekalen Konzentrationen von IL-1ra sowie die Population der CD14+ Monozyten untersucht. Die Monozyten gelten als primärer Ursprung von IL-1ra (5). Die Untersuchungen wurden mittels ELISA (IL-1ra) und Durchflusszytometrie (Monozyten) durchgeführt. In der Untersuchung konnten wir erstmals einen signifikanten Anstieg von IL-1ra im Liquor von Patienten bei Aufnahme ($839,73 \pm 193,78$) im Vergleich zur Kontrollgruppe ($42 \pm 5,88$) nachweisen. Nach 72 Stunden bestand ebenfalls ein signifikanter Unterschied ($664,86 \pm 111,21$). Im weiteren posttraumatischen Verlauf konnte keine statistisch signifikante Dynamik der Messwerte detektiert werden. Nach Trennung der Daten bezüglich der Funktion der Blut-Hirn-Schranke fällt ein signifikanter Abfall der IL-1ra-Konzentration nach Aufnahme ($678,16 \pm 176,81$) gegenüber dem Wert nach 12 Stunden ($174,47 \pm 62,83$) in der Gruppe der intakten Schrankenfunktion auf. Am Ende des Beobachtungszeitraums ist statistisch kein Unterschied zwischen beiden Gruppen zu verzeichnen. Die Werte in Gruppe II zeigen nur tendenziell eine Erholung nach frühem Abfall der IL-1ra-Konzentration.

Vergangene Studien berichten über signifikant erhöhte Werte von IL-1ra bei Patienten, die eine nichttraumatische SAB erlitten haben. Mathiesen et al konnten zeigen, dass IL-1ra ab dem vierten Tag signifikant gegenüber dem Aufnahmewert erhöht war. In der Arbeit von Mathiesen werden die Patienten in zwei Gruppen nach ihrer klinischen Verfassung objektiviert durch den GOS unterteilt. Die Patienten mit einem günstigen Outcome zeigten keine signifikanten Anstiege von IL-1ra, wohingegen der Liquor der Patienten mit einer ungünstigen Prognose signifikant erhöhte Werte ab dem vierten Tag nach

Subarachnoidalblutung aufwies (27;111). Die Werte der vorliegenden Untersuchungen in der Kontrollgruppe sind vergleichbar mit denen von Mathiesen. Der bei den 10 Probanden der durchgeführten Studie ermittelte Wert beträgt $42 \pm 5,88$ pg/ml. In der zitierten SAB-Arbeit von Mathiesen wurde für die Kontrollgruppe ein Wert von 40 pg/ml bestimmt. Dies lässt den Schluss zu, dass die angewandten Methoden hinsichtlich der Durchführung und Auswertung ähnlich sind. Mathiesen konnte zeigen, dass lediglich in der Gruppe mit schlechtem GOS die Werte signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht sind. Außerdem bestand in der Arbeit zwischen den beiden Gruppen ein statistisch signifikanter Unterschied. Möglicherweise lassen sich dadurch zwei wichtige Thesen ableiten. Erstens kann die Vermutung aufgestellt werden, dass bei den Patienten in der vorliegenden Arbeit im weiteren Verlauf über den Beobachtungszeitraum hinweg ebenfalls ein statistisch signifikanter Anstieg zu beobachten ist. Das Protokoll der Studie endet bei 72 Stunden nach Trauma, Mathiesen belegt hingegen erst ab dem vierten Tag einen Anstieg (111). Zweitens zeigt er, dass bei Patienten, die sich einer chirurgischen Intervention unterziehen mussten, höhere Werte von IL-1ra gemessen wurden. Diese Auftrennung wurde bei unserem Patientenkollektiv aufgrund der geringen Anzahl nicht vorgenommen.

In vivo wird IL-1ra vorrangig von Monozyten, Neutrophilen, Keratinozyten und anderen Epithelzellen gebildet (5;126). Im Rahmen der durchflusszytometrischen Untersuchungen immunkompetenter Zellen wurden die CD14-positiven Zellen ebenfalls bestimmt. CD14 ist ein Oberflächenmarker, der für Monozyten charakteristisch ist. Die CD14+Monozyten zeigen ab 72 Stunden ($6,48 \pm 0,84$) eine signifikante Dynamik in Form eines Anstieges gegenüber dem Aufnahmewert ($2,32 \pm 0,64$) und der Kontrollgruppe ($2,6 \pm 0,68$). Daraus lässt sich vermuten, dass ein nicht unerheblicher Anteil von IL-1ra unabhängig von den Monozyten in den Liquorraum immigriert ist. Es ist festzuhalten, dass CD14 als Oberflächenmarker nicht spezifisch für Monozyten ist, sondern eine Vielzahl von Zellen wie Makrophagen und

neutrophile Granulozyten charakterisiert (8). Um die Subpopulation der Monozyten genauer quantifizieren zu können, ist es sinnvoll, neben CD14 auch CD16 als Oberflächenmarker zu benutzen, da beide spezifisch für Monozyten sind. Auch bei diesen Ergebnissen ist eine Ausweitung des Patientenkollektivs vonnöten, um genauere und präzisere Aussagen bzgl. Dynamik und Statistik treffen zu können.

IL-1 spielt in der Pathophysiologie der Inflammation im Rahmen des sekundären Hirnschadens eine entscheidende Rolle, aber die genauen Mechanismen, die zur endgültigen Gewebsschädigung führen sind noch nicht hinreichend untersucht (149). Die Aktivität von IL-1 wird größtenteils durch den IL-1-Rezeptor gesteuert. IL-1ra ist ein kompetitiver Antagonist an diesem Rezeptor und fungiert als Inhibitor der IL-1-Funktion antiinflammatorisch. Vergangene Arbeiten konnten zeigen, dass IL-1ra bei Subarachnoidalblutungen vermehrt exprimiert wird (111).

Die vorliegende Arbeit weist erstmals das antiinflammatorische Zytokin IL-1ra in der Frühphase nach schwerem SHT im Liquor der Patienten nach. Möglicherweise ist IL-1ra in der Lage, das neurologische und klinische Outcome der Patienten durch Inhibition der proinflammatorischen Wirkungen von IL-1 zu verbessern. Eine Arbeit von Nigel et al konnte dies in einem Tierexperiment bereits nachweisen (78). Weiterhin konnte sogar gezeigt werden, dass es bei einer Überexpression von IL-1ra zu keinem signifikanten Anstieg proinflammatorische Mediatoren wie IL-1, TNF- α und IL-6 kommt. Diese interessanten Ergebnisse wurden von Tehranian et al 2002 publiziert und basieren auf Forschungen an einem tierexperimentellen Modell des geschlossenen SHT (178). Rekombinanter IL-1ra wird seit einiger Zeit bereits in der Therapie der rheumatoider Arthritis verwendet (60). Weitere Studien mit einer hohen Patientenzahl müssen folgen, um die Thesen dieser Pilotstudie beweisen zu können.

5.4 NT-Pro-BNP

In dieser Substudie wurden erstmals die Konzentration von NT-Pro-BNP im Liquor in der Frühphase nach schwerem SHT bestimmt. Über den Beobachtungszeitraum der ersten 72 Stunden nach Trauma wurden signifikant erhöhte Werte gegenüber der Kontrollgruppe gefunden.

BNP ist an der Salz- und Wasserhomöostase sowie der Regulation des Blutdrucks beteiligt und wurde in der Inneren Medizin als ein Marker für Herzinsuffizienz beschrieben (187). Außerdem wurden erhöhte Werte bei Patienten mit akuter linksventrikulärer Dysfunktion und beim akuten Cor Pulmonale im Rahmen einer Lungenembolie erfasst (39). Es wird von Myokardzellen des Ventrikels infolge eines Dehnungsreizes in die Blutbahn ausgeschüttet. Ursprünglich wurde BNP im Gehirn von Schweinen sowie im humanen Hypothalamus und kardialen Gewebe identifiziert (153;176). Nach zellulärer Freisetzung einer proaktiven Form von proBNP (108 Aminosäuren) wird dieses in aktives BNP (32 Aminosäuren) und sein N-terminales Fragment NT-proBNP (76 Aminosäuren) gespalten. Letzteres ist am Rezeptor für BNP unwirksam, kommt aber in viel höherer Konzentration im Plasma bzw. Serum vor und hat eine deutlich längere Halbwertszeit (76). Es kann deshalb mit größerer Genauigkeit gemessen werden. Seitdem bekannt ist, dass BNP und NT-proBNP in ihrer Dynamik korrelieren, hat sich die Bestimmung von NT-proBNP als ein laborchemischer Marker der Herzinsuffizienz aufgrund der sensitiveren Messmethoden und deutlich längeren Halbwertszeit in den letzten Jahren stetig etabliert (91). In der dieser Arbeit zugrundeliegenden Studie wurde deshalb auch das N-terminale Fragments NT-proBNP analysiert. Erhöhte Werte an NT-proBNP bei Patienten im Rahmen eines schweren Schädel-Hirn-Traumas gegenüber der Kontrollgruppe wurden gefunden.

Die Ergebnisse diesbezüglich sind konträr gegenüber Analysen von Espiner et al., die keine signifikanten Unterschiede der Werte von BNP bei Patienten nach SAB gegenüber der

Kontrollgruppe feststellen konnten (46). Ursächlich für diese Diskrepanz kommen verschiedene Faktoren in Frage, wie zum Beispiel die höhere Sensitivität der Bestimmung von NT-proBNP gegenüber der BNP-Analyse in der zitierten Studie. Das unterschiedliche Studiendesign wird sich auf die Ergebnisse auswirken, sodass ein direkter Vergleich der Daten nur mit Vorsicht zu führen ist.

Kirchhoff et al. führten ebenfalls Analysen von NT-proBNP nach dem gleichen zeitlichen Abnahmeprotokoll bei Patienten nach schweren SHT durch. In dieser Arbeit wurden die Patienten nach der Höhe des durchschnittlichen intrazerebralen Druckes aufgeteilt. Dieses Vorgehen zeigte ebenfalls signifikant höhere Werte gegenüber der Kontrollgruppe. Die Patienten mit einem durchschnittlichen ICP > 15 mmHg über den gesamten Beobachtungszeitraum hatten signifikant höhere Werte als die Gruppe mit dem niedrigen intrazerebralen Druck (82). In der zitierten Arbeit hat die Funktion der Blut-Hirn-Schranke ebenfalls keinen statistischen Einfluss auf die Werte von NT-proBNP. Da es sich bei der hier vorgestellten Arbeit um die gleichen Testmethoden im gleichen Labor und dasselbe Abnahmeprotokoll handelt, sind die beiden Studien nach Ansicht des Autors gut vergleichbar und lassen den Schluss zu, dass NT-proBNP im Liquor von Patienten nach schwerem SHT signifikant erhöht ist. In der zitierten Arbeit von Kirchhoff hat die Funktion der Blut-Hirn-Schranke keinen statistischen Einfluss auf die Konzentration von NT-proBNP. Es zeigen sich keine Veränderungen in den Gruppen und keine Korrelation zwischen der BHS-Funktion und erhöhten Werten von NT-proBNP. Kirchhoff konnte nachweisen, dass eine verbesserte Funktion der Blut-Hirn-Schranke nach 72 Stunden mit dem höchsten Spiegel von NT-proBNP über den kompletten Beobachtungszeitraum einher ging. Dies bekräftigt die Hypothese, dass NT-proBNP im Hirngewebe angereichert sein muss. Die sekundäre Hirnschädigung nach schwerem SHT geht u.a. mit vaskulären Schäden und der Freisetzung

von vasoaktiven Substanzen einher. Dies wird in einigen Studien in der aktuellen Literatur beschrieben (6;123).

Unter Berücksichtigung dieser Daten ist der Schluss nahe liegend, dass der initiale Gefäßschaden für die Freisetzung von NT-proBNP im Hypothalamus verantwortlich sein könnte. Levin et al. konnten nachweisen, dass BNP im Hypothalamus synthetisiert wird, und dass die Produktion durch Katecholamine getriggert und induziert wird (95).

Alle diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass es im Rahmen der sekundären Hirnschädigung mit zerebraler Ischämie zur verstärkten Synthese und Freisetzung von NT-proBNP aus ischämischen Hirngewebe speziell aus dem Hypothalamus kommt. Aufgrund der geringen Patientenzahl sind weitere Studien nötig, um dies zu belegen. Dabei sollte das Patientenkollektiv so groß sein, dass eine Aufteilung der Traumata in verschiedene Entitäten sinnvoll erscheint. In einigen Arbeiten konnten signifikant erhöhte Werte von BNP im Serum von Patienten nach schweren SHT gemessen werden (19;82;175). Deshalb sollten außerdem parallel Bestimmungen im Liquor und im Serum erfolgen, um die These der intrathekalen Synthese unabhängig von der BHS-Funktion zu beweisen und die pathophysiologische Rolle von NT-proBNP im sekundären Hirnschaden näher beleuchten zu können.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Bei einem schweren Schädel-Hirn-Trauma kommt es neben der primären Schädigung mit sofortigem Gewebsuntergang im weiteren Verlauf häufig zu einer ödematösen Hirnschwellung mit nachfolgend erhöhtem intrakraniellen Druck und Minderperfusion des Gehirns. Dies konnte in mehreren Arbeiten wissenschaftlich belegt werden (122;123). Es kommt folglich zur Freisetzung von intrazellulären Mediatoren aus zerstörten Zellen. (109;118;140). Aus Untersuchungen zu anderen inflammatorischen Erkrankungen des ZNS ist bekannt, dass es dabei möglicherweise zur Immigration von immunkompetenten Zellen in den Liquor und in das zerebrale Gewebe kommt. Daraus resultiert eine Aktivierung des Immunsystems auf zellulärer und humoraler Ebene (16;53;148). Diese Immunaktivierung führt neben den physiologischen Effekten wie der Phagozytose des zerstörten Gewebes zu weiteren sekundären Schäden und reaktiver Gliose. Nicht zuletzt stellt die nicht kontrollierbare Hirnschwellung mit nachfolgender Herniation lebensnotwendiger Hirnstrukturen die wichtigste Todesursache der betroffenen Patienten dar (97;123;162). Über die immunpathologischen Mechanismen, welche diesen Folgereaktionen zugrunde liegen, ist bisher noch wenig bekannt. In der Literatur wird lediglich über die Quantifizierung einiger Mediatoren berichtet (10;123). Außerdem wird in diesem Zusammenhang eine Störung der Blut-Hirn-Schranken-Funktion diskutiert. Verschiedene Studien belegen, dass die Funktion der Blut-Hirn-Schranke quantifiziert durch den Reiber-Quotienten signifikant mit der systemischen Entzündungsreaktion nach SHT im Sinne einer Angleichung der systemischen und lokal im Liquor gemessenen Zytokine korreliert (53;97). Es ließen sich in verschiedenen Arbeiten pro- und antiinflammatorische Mediatoren im Liquor nach schwerem SHT nachweisen (16;162). Außerdem fanden sich Hinweise darauf, dass es unabhängig von der Entwicklung eines Multiorganversagens bzw. einer signifikanten Störung der BHS zu schwerer sekundärer Hirnschädigung nach SHT kommt (109). Erkenntnisse aus Forschung an

chronisch entzündlichen Erkrankungen des ZNS wie beispielsweise Multiple Sklerose (MS) und Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) brachten Hinweise auf eine funktionelle Beteiligung körpereigener Abwehrzellen an der Entwicklung sekundärer Hirnschäden zutage (118;161;182). In diesen Arbeiten wurden im Liquor der Patienten humane Immunzellen wie Monozyten/Makrophagen oder T-Lymphozyten detektiert, denen eine zentrale Rolle bei der Ausbildung lokaler inflammatorischer Prozesse angeschuldigt wird (155;173). Diese Zellen besitzen aufgrund ihrer enzymatischen Ausstattung mit Proteasen erhebliches pathologisches Potenzial zur Entfaltung gewebständiger Entzündungsprozesse, welche wiederum letztendlich das Ödem verursachen können (17;137).

Die zellulären Sub-Populationen, denen ein erhebliches Potenzial zur Ausbildung sekundärer Hirnschäden bescheinigt wird, sind bei Patienten nach schwerem SHT bislang nur unzureichend, bzw. in der Frühphase nach Trauma noch gar nicht charakterisiert. Ebenfalls bislang nicht untersucht ist eine mögliche Emigration immunkompetenter Zellen in den Liquorraum nach Trauma.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher:

1. Analyse der Subpopulationen immunkompetenter Zellen im Liquor nach SHT
2. Analyse pro- und antiinflammatorischer Zytokine
3. Korrelation der Ergebnisse mit der Funktion der Blut-Hirn-Schranke

In der Studie konnte erstmals eine Reihe von Subpopulationen immunkompetenter Zellen im Liquor von Patienten nach schwerem SHT mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden. Die Probengewinnung entsprach einem standardisierten Abnahme- und Zeitprotokoll. Über die ersten 72 Stunden nach Trauma wurden zu fest definierten Entnahmezeitpunkten Liquor- und Blutproben vom Patienten gewonnen und nach Aufbereitung der jeweiligen Untersuchungsmethode (Durchflusszytometrie, ELISA, Routinelabor) zugeführt. Die durchflusszytometrische Analyse zur Quantifizierung von B-Lymphozyten, T-Lymphozyten,

Monozyten und NK-Zellen wurde durchgeführt und die Dynamik über die ersten 72 Stunden nach Trauma dargestellt. Gezeigt werden konnte, dass es zu einem signifikanten Anstieg aller gemessenen immunkompetenten Zellen gegenüber den Kontrollwerten kam.

Bezüglich des Einflusses der Funktion der Blut-Hirn-Schranke ließ sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Subpopulationen zeigen. Die Ergebnisse ähneln Daten aus vorangegangenen Studien an chronisch entzündlichen Erkrankungen des ZNS.

Eine Substudie beinhaltete die Analyse des antiinflammatorischen Zytokins IL-1ra. IL-1ra ist bereits nach Aufnahme signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht. Im Gegensatz zu früheren Studien an nichttraumatischen SAB war in der Frühphase allerdings keine statistisch signifikante Dynamik detektierbar. In diesem Zusammenhang ist jedoch zu erwähnen, dass sich der Beobachtungszeitraum der Studie auf die ersten 72 Stunden nach Trauma beschränkt. Möglicherweise kommt es im weiteren Verlauf zu ähnlichen Ergebnissen wie in der Arbeit von Mathiesen et al. Außerdem wurde dargestellt, dass IL-1ra unabhängig von Monozyten, welche als primärer Ursprung für IL-1ra gelten, ansteigt.

Die vorliegende Arbeit unterstützt somit die These, dass immunkompetente Zellen eine herausragende Rolle in der Entwicklung sekundärer Hirnschäden spielen könnten. Weiterführende Studien müssen die zugrunde liegenden Mechanismen der möglicherweise von der Blut-Hirn-Schranke unabhängigen Emigration immunkompetenter Zellen in Zusammenschau mit der Sekretion pro- und antiinflammatorischer Mediatoren aufklären. Detailliertere Daten lassen möglicherweise Schlussfolgerungen für therapeutische Konzepte bezüglich eines sekundären Hirnschadens insbesondere der Neuroinflammation zu.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- (1) The Brain Trauma Foundation. The American Association of Neurological Surgeons. The Joint Section on Neurotrauma and Critical Care. Recommendations for intracranial pressure monitoring technology. *J Neurotrauma* 2000; 17(6-7):497-506.
- (2) Abdul-Majid KB, Stefferl A, Bourquin C, Lassmann H, Linington C, Olsson T et al. Fc receptors are critical for autoimmune inflammatory damage to the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Scand J Immunol* 2002; 55(1):70-81.
- (3) Aloisi F. Immune function of microglia. *Glia* 2001; 36(2):165-179.
- (4) Ankeny DP, Lucin KM, Sanders VM, McGaughy VM, Popovich PG. Spinal cord injury triggers systemic autoimmunity: evidence for chronic B lymphocyte activation and lupus-like autoantibody synthesis. *J Neurochem* 2006; 99(4):1073-1087.
- (5) Arend WP, Smith MF, Jr., Janson RW, Joslin FG. IL-1 receptor antagonist and IL-1 beta production in human monocytes are regulated differently. *J Immunol* 1991; 147(5):1530-1536.
- (6) Armstead WM. Role of endothelin in pial artery vasoconstriction and altered responses to vasopressin after brain injury. *J Neurosurg* 1996; 85(5):901-907.
- (7) Auron PE, Webb AC, Rosenwasser LJ, Mucci SF, Rich A, Wolff SM et al. Nucleotide sequence of human monocyte interleukin 1 precursor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81(24):7907-7911.
- (8) Autissier P, Soulas C, Burdo TH, Williams KC. Evaluation of a 12-color flow cytometry panel to study lymphocyte, monocyte, and dendritic cell subsets in humans. *Cytometry A* 2010.
- (9) Babbe H, Roers A, Waisman A, Lassmann H, Goebels N, Hohlfeld R et al. Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J Exp Med* 2000; 192(3):393-404.
- (10) Baethmann A, Chapuis D, Wirth A. System analysis of patient management during the pre- and early clinical phase in severe head injury. *Acta Neurochir Suppl* 1999; 73:93-97.
- (11) Banati RB, Gehrmann J, Schubert P, Kreutzberg GW. Cytotoxicity of microglia. *Glia* 1993; 7(1):111-118.
- (12) Bauer J, Huitinga I, Zhao W, Lassmann H, Hickey WF, Dijkstra CD. The role of macrophages, perivascular cells, and microglial cells in the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glia* 1995; 15(4):437-446.

- (13) Bayir H, Clark RS, Kochanek PM. Promising strategies to minimize secondary brain injury after head trauma. *Crit Care Med* 2003; 31(1 Suppl):S112-S117.
- (14) Bayne EK, Rupp EA, Limjuco G, Chin J, Schmidt JA. Immunocytochemical detection of interleukin 1 within stimulated human monocytes. *J Exp Med* 1986; 163(5):1267-1280.
- (15) Beekhuizen H, Blokland I, Corsel-van Tilburg AJ, Koning F, van Furth R. CD14 contributes to the adherence of human monocytes to cytokine-stimulated endothelial cells. *J Immunol* 1991; 147(11):3761-3767.
- (16) Bell MJ, Kochanek PM, Doughty LA, Carcillo JA, Adelson PD, Clark RS et al. Interleukin-6 and interleukin-10 in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury in children. *J Neurotrauma* 1997; 14(7):451-457.
- (17) Bellander BM, Singhrao SK, Ohlsson M, Mattsson P, Svensson M. Complement activation in the human brain after traumatic head injury. *J Neurotrauma* 2001; 18(12):1295-1311.
- (18) Benveniste EN. Role of macrophages/microglia in multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis. *J Mol Med* 1997; 75(3):165-173.
- (19) Berendes E, Walter M, Cullen P, Prien T, Van Aken H, Horsthemke J et al. Secretion of brain natriuretic peptide in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Lancet* 1997; 349(9047):245-249.
- (20) Beuche W, Friede RL. Myelin phagocytosis in Wallerian degeneration of peripheral nerves depends on silica-sensitive, bg/bg-negative and Fc-positive monocytes. *Brain Res* 1986; 378(1):97-106.
- (21) Biberthaler P, Bogner V, Baker HV, Lopez MC, Neth P, Kanz KG et al. Genome-wide monocytic mRNA expression in polytrauma patients for identification of clinical outcome. *Shock* 2005; 24(1):11-19.
- (22) Bishop GA, Hostager BS. B lymphocyte activation by contact-mediated interactions with T lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 2001; 13(3):278-285.
- (23) Bogner V, Keil L, Kanz KG, Kirchhoff C, Leidel BA, Mutschler W et al. Very early posttraumatic serum alterations are significantly associated to initial massive RBC substitution, injury severity, multiple organ failure and adverse clinical outcome in multiple injured patients. *Eur J Med Res* 2009; 14(7):284-291.
- (24) Bone RC. Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). *Ann Intern Med* 1996; 125(8):680-687.
- (25) Bowers SA, Marshall LF. Outcome in 200 consecutive cases of severe head injury treated in San Diego County: a prospective analysis. *Neurosurgery* 1980; 6(3):237-242.
- (26) Bruck W, Friede RL. The role of complement in myelin phagocytosis during PNS wallerian degeneration. *J Neurol Sci* 1991; 103(2):182-187.

- (27) Bueno EC, Vaz AJ, Oliveira CA, Machado LR, Livramento JA, Mielli SR et al. Analysis of cells in cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis by means of flow cytometry. *Cytometry* 1999; 38(3):106-110.
- (28) Calich AL, Domiciano DS, Fuller R. Osteoarthritis: can anti-cytokine therapy play a role in treatment? *Clin Rheumatol* 2010.
- (29) Campanella M, Sciorati C, Tarozzo G, Beltramo M. Flow cytometric analysis of inflammatory cells in ischemic rat brain. *Stroke* 2002; 33(2):586-592.
- (30) Cannella B, Cross AH, Raine CS. Upregulation and coexpression of adhesion molecules correlate with relapsing autoimmune demyelination in the central nervous system. *J Exp Med* 1990; 172(5):1521-1524.
- (31) Carlyle JR, Michie AM, Cho SK, Zuniga-Pflucker JC. Natural killer cell development and function precede alpha beta T cell differentiation in mouse fetal thymic ontogeny. *J Immunol* 1998; 160(2):744-753.
- (32) Caroni P, Schwab ME. Two membrane protein fractions from rat central myelin with inhibitory properties for neurite growth and fibroblast spreading. *J Cell Biol* 1988; 106(4):1281-1288.
- (33) Cavaillon JM, Adib-Conquy M. Monocytes/macrophages and sepsis. *Crit Care Med* 2005; 33(12 Suppl):S506-S509.
- (34) Chesnut RM. Secondary brain insults after head injury: clinical perspectives. *New Horiz* 1995; 3(3):366-375.
- (35) Chouchakova N, Skokowa J, Baumann U, Tschernig T, Philippens KM, Nieswandt B et al. Fc gamma RIII-mediated production of TNF-alpha induces immune complex alveolitis independently of CXC chemokine generation. *J Immunol* 2001; 166(8):5193-5200.
- (36) Costabel U. CD4/CD8 ratios in bronchoalveolar lavage fluid: of value for diagnosing sarcoidosis? *Eur Respir J* 1997; 10(12):2699-2700.
- (37) Csuka E, Morganti-Kossmann MC, Lenzlinger PM, Joller H, Trentz O, Kossmann T. IL-10 levels in cerebrospinal fluid and serum of patients with severe traumatic brain injury: relationship to IL-6, TNF-alpha, TGF-beta1 and blood-brain barrier function. *J Neuroimmunol* 1999; 101(2):211-221.
- (38) Darke C, Coates E. One-tube HLA-B27/B2708 typing by flow cytometry using two "Anti-HLA-B27" monoclonal antibody reagents. *Cytometry B Clin Cytom* 2010; 78(1):21-30.
- (39) de Lemos JA, McGuire DK, Drazner MH. B-type natriuretic peptide in cardiovascular disease. *Lancet* 2003; 362(9380):316-322.
- (40) De AK, Laudanski K, Miller-Graziano CL. Failure of monocytes of trauma patients to convert to immature dendritic cells is related to preferential macrophage-colony-stimulating factor-driven macrophage differentiation. *J Immunol* 2003; 170(12):6355-6362.

- (41) DeGiorgio LA, Konstantinov KN, Lee SC, Hardin JA, Volpe BT, Diamond B. A subset of lupus anti-DNA antibodies cross-reacts with the NR2 glutamate receptor in systemic lupus erythematosus. *Nat Med* 2001; 7(11):1189-1193.
- (42) Dinarello CA. The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *FASEB J* 1994; 8(15):1314-1325.
- (43) Dinarello CA. Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. *Int Rev Immunol* 1998; 16(5-6):457-499.
- (44) Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest* 2000; 118(2):503-508.
- (45) Duchosal MA. B-cell development and differentiation. *Semin Hematol* 1997; 34(1 Suppl 1):2-12.
- (46) Espiner EA, Leikis R, Ferch RD, MacFarlane MR, Bonkowski JA, Frampton CM et al. The neuro-cardio-endocrine response to acute subarachnoid haemorrhage. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2002; 56(5):629-635.
- (47) Fabry Z, Raine CS, Hart MN. Nervous tissue as an immune compartment: the dialect of the immune response in the CNS. *Immunol Today* 1994; 15(5):218-224.
- (48) Faden AI. Experimental neurobiology of central nervous system trauma. *Crit Rev Neurobiol* 1993; 7(3-4):175-186.
- (49) Faist E, Schinkel C, Zimmer S. Update on the mechanisms of immune suppression of injury and immune modulation. *World J Surg* 1996; 20(4):454-459.
- (50) Faul M, Wald MM, Rutland-Brown W, Sullivent EE, Sattin RW. Using a cost-benefit analysis to estimate outcomes of a clinical treatment guideline: testing the Brain Trauma Foundation guidelines for the treatment of severe traumatic brain injury. *J Trauma* 2007; 63(6):1271-1278.
- (51) Fearon DT, Locksley RM. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 1996; 272(5258):50-53.
- (52) Feuerstein GZ, Liu T, Barone FC. Cytokines, inflammation, and brain injury: role of tumor necrosis factor-alpha. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1994; 6(4):341-360.
- (53) Finnie J. Animal models of traumatic brain injury: a review. *Aust Vet J* 2001; 79(9):628-633.
- (54) Floyd RA. Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999; 222(3):236-245.
- (55) Fukui S, Fazzina G, Amorini AM, Dunbar JG, Marmarou A. Differential effects of atrial natriuretic peptide on the brain water and sodium after experimental cortical contusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003; 23(10):1212-1218.
- (56) Gahmberg CG, Valmu L, Fagerholm S, Kotovuori P, Ihanus E, Tian L et al. Leukocyte integrins and inflammation. *Cell Mol Life Sci* 1998; 54(6):549-555.

- (57) Gehrman J. Colony-stimulating factors regulate programmed cell death of rat microglia/brain macrophages in vitro. *J Neuroimmunol* 1995; 63(1):55-61.
- (58) Gemsa D. *Immunologie* 3. Auflage, Thieme-Verlag, S. 124-143. 1991.
- (59) Genain CP, Cannella B, Hauser SL, Raine CS. Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. *Nat Med* 1999; 5(2):170-175.
- (60) Goldbach-Mansky R. Blocking interleukin-1 in rheumatic diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1182:111-123.
- (61) Goldbach-Mansky R, Kastner DL. Autoinflammation: the prominent role of IL-1 in monogenic autoinflammatory diseases and implications for common illnesses. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 124(6):1141-1149.
- (62) Goodman JC, Robertson CS, Grossman RG, Narayan RK. Elevation of tumor necrosis factor in head injury. *J Neuroimmunol* 1990; 30(2-3):213-217.
- (63) Gourin CG, Shackford SR. Production of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta by human cerebral microvascular endothelium after percussive trauma. *J Trauma* 1997; 42(6):1101-1107.
- (64) Griot-Wenk M, Griot C, Pfister H, Vandevelde M. Antibody-dependent cellular cytotoxicity in antimyelin antibody-induced oligodendrocyte damage in vitro. *J Neuroimmunol* 1991; 33(2):145-155.
- (65) Gutensohn K, Magens M, Kruger W, Kroger N, Kuhn P. Comparison of flow cytometry vs. a haematology cell analyser-based method to guide the optimal time-point for peripheral blood stem cell apheresis. *Vox Sang* 2006; 90(1):53-58.
- (66) Hall K, Cope DN, Rappaport M. Glasgow Outcome Scale and Disability Rating Scale: comparative usefulness in following recovery in traumatic head injury. *Arch Phys Med Rehabil* 1985; 66(1):35-37.
- (67) Halliwell B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* 2001; 18(9):685-716.
- (68) Hammerer-Lercher A, Neubauer E, Muller S, Pachinger O, Puschendorf B, Mair J. Head-to-head comparison of N-terminal pro-brain natriuretic peptide, brain natriuretic peptide and N-terminal pro-atrial natriuretic peptide in diagnosing left ventricular dysfunction. *Clin Chim Acta* 2001; 310(2):193-197.
- (69) Hanisch UK. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* 2002; 40(2):140-155.
- (70) Hellawell DJ, Signorini DF. The Edinburgh Extended Glasgow Outcome Scale (EEGOS): rationale and pilot studies. *Int J Rehabil Res* 1997; 20(4):345-354.
- (71) Hemmer B, Kieseier B, Cepok S, Hartung HP. New immunopathologic insights into multiple sclerosis. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2003; 3(3):246-255.

- (72) Hickey WF, Hsu BL, Kimura H. T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J Neurosci Res* 1991; 28(2):254-260.
- (73) Huang DW, McKerracher L, Braun PE, David S. A therapeutic vaccine approach to stimulate axon regeneration in the adult mammalian spinal cord. *Neuron* 1999; 24(3):639-647.
- (74) Huerta PT, Kowal C, DeGiorgio LA, Volpe BT, Diamond B. Immunity and behavior: antibodies alter emotion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(3):678-683.
- (75) Hunt PJ, Richards AM, Nicholls MG, Yandle TG, Doughty RN, Espiner EA. Immunoreactive amino-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-PROBNP): a new marker of cardiac impairment. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1997; 47(3):287-296.
- (76) James SK, Lindahl B, Siegbahn A, Stridsberg M, Venge P, Armstrong P et al. N-terminal pro-brain natriuretic peptide and other risk markers for the separate prediction of mortality and subsequent myocardial infarction in patients with unstable coronary artery disease: a Global Utilization of Strategies To Open occluded arteries (GUSTO)-IV substudy. *Circulation* 2003; 108(3):275-281.
- (77) Jennett B, Bond M. Assessment of outcome after severe brain damage. *Lancet* 1975; 1(7905):480-484.
- (78) Jones NC, Prior MJ, Burden-Teh E, Marsden CA, Morris PG, Murphy S. - Antagonism of the interleukin-1 receptor following traumatic brain injury in the mouse reduces the number of nitric oxide synthase-2-positive cells and improves anatomical and functional outcomes.(1):72-8.): -8.
- (79) Kiessling R, Klein E, Pross H, Wigzell H. "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur J Immunol* 1975; 5(2):117-121.
- (80) Kiessling R, Klein E, Wigzell H. "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol* 1975; 5(2):112-117.
- (81) Kirchhoff C, Leidel BA, Kirchhoff S, Braunstein V, Bogner V, Kreimeier U et al. Analysis of N-terminal pro-B-type natriuretic peptide and cardiac index in multiple injured patients: a prospective cohort study. *Crit Care* 2008; 12(5):R118.
- (82) Kirchhoff C, Stegmaier J, Bogner V, Buhmann S, Mussack T, Kreimeier U et al. Intrathecal and systemic concentration of NT-proBNP in patients with severe traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2006; 23(6):943-949.
- (83) Kossmann T, Hans VH, Imhof HG, Stocker R, Grob P, Trentz O et al. Intrathecal and serum interleukin-6 and the acute-phase response in patients with severe traumatic brain injuries. *Shock* 1995; 4(5):311-317.
- (84) Koutsilieri E, Scheller C, Grunblatt E, Nara K, Li J, Riederer P. Free radicals in Parkinson's disease. *J Neurol* 2002; 249 Suppl 2:II1-II5.

- (85) Kowal C, DeGiorgio LA, Nakaoka T, Hetherington H, Huerta PT, Diamond B et al. Cognition and immunity; antibody impairs memory. *Immunity* 2004; 21(2):179-188.
- (86) Kreutzberg GW. Microglia, the first line of defence in brain pathologies. *Arzneimittelforschung* 1995; 45(3A):357-360.
- (87) Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 1996; 19(8):312-318.
- (88) Kroggel R, Martin M, Pingoud V, Dayer JM, Resch K. Two-chain structure of the interleukin 1 receptor. *FEBS Lett* 1988; 229(1):59-62.
- (89) Krotz M, Linsenmaier U, Kanz KG, Pfeifer KJ, Mutschler W, Reiser M. Evaluation of minimally invasive percutaneous CT-controlled ventriculostomy in patients with severe head trauma. *Eur Radiol* 2004; 14(2):227-233.
- (90) Kuhne M, Erben U, Schulze-Tanzil G, Kohler D, Wu P, Richter FJ et al. HLA-B27-restricted antigen presentation by human chondrocytes to CD8+ T cells: potential contribution to local immunopathologic processes in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 2009; 60(6):1635-1646.
- (91) Lainchbury JG, Campbell E, Frampton CM, Yandle TG, Nicholls MG, Richards AM. Brain natriuretic peptide and n-terminal brain natriuretic peptide in the diagnosis of heart failure in patients with acute shortness of breath. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42(4):728-735.
- (92) Lassmann H. Basic mechanisms of brain inflammation. *J Neural Transm Suppl* 1997; 50:183-190.
- (93) Lassmann H, Zimprich F, Rossler K, Vass K. Inflammation in the nervous system. Basic mechanisms and immunological concepts. *Rev Neurol (Paris)* 1991; 147(12):763-781.
- (94) Lenzlinger PM, Hans VH, Joller-Jemelka HI, Trentz O, Morganti-Kossmann MC, Kossmann T. Markers for cell-mediated immune response are elevated in cerebrospinal fluid and serum after severe traumatic brain injury in humans. *J Neurotrauma* 2001; 18(5):479-489.
- (95) Levin ER, Gardner DG, Samson WK. Natriuretic peptides. *N Engl J Med* 1998; 339(5):321-328.
- (96) Levin HS, Saydjari C, Eisenberg HM, Foulkes M, Marshall LF, Ruff RM et al. Vegetative state after closed-head injury. A Traumatic Coma Data Bank Report. *Arch Neurol* 1991; 48(6):580-585.
- (97) Lewczuk P, Reiber H, Ehrenreich H. Prothrombin in normal human cerebrospinal fluid originates from the blood. *Neurochem Res* 1998; 23(8):1027-1030.
- (98) Link H, Tibbling G. Principles of albumin and IgG analyses in neurological disorders. II. Relation of the concentration of the proteins in serum and cerebrospinal fluid. *Scand J Clin Lab Invest* 1977; 37(5):391-396.

- (99) Link H, Tibbling G. Principles of albumin and IgG analyses in neurological disorders. III. Evaluation of IgG synthesis within the central nervous system in multiple sclerosis. *Scand J Clin Lab Invest* 1977; 37(5):397-401.
- (100) Liu T, McDonnell PC, Young PR, White RF, Siren AL, Hallenbeck JM et al. Interleukin-1 beta mRNA expression in ischemic rat cortex. *Stroke* 1993; 24(11):1746-1750.
- (101) Llera AS, Viedma F, Sanchez-Madrid F, Tormo J. Crystal structure of the C-type lectin-like domain from the human hematopoietic cell receptor CD69. *J Biol Chem* 2001; 276(10):7312-7319.
- (102) Lomedico PT, Gubler U, Hellmann CP, Dukovich M, Giri JG, Pan YC et al. Cloning and expression of murine interleukin-1 cDNA in *Escherichia coli*. *Nature* 1984; 312(5993):458-462.
- (103) Lopez-Cabrera M, Santis AG, Fernandez-Ruiz E, Blacher R, Esch F, Sanchez-Mateos P et al. Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of the human earliest lymphocyte activation antigen AIM/CD69, a new member of the C-type animal lectin superfamily of signal-transmitting receptors. *J Exp Med* 1993; 178(2):537-547.
- (104) Lucas SM, Rothwell NJ, Gibson RM. The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br J Pharmacol* 2006; 147 Suppl 1:S232-S240.
- (105) Lukaszewicz AC, Griénay M, Resche-Rigon M, Pirracchio R, Faivre V, Boval B et al. Monocytic HLA-DR expression in intensive care patients: interest for prognosis and secondary infection prediction. *Crit Care Med* 2009; 37(10):2746-2752.
- (106) Luo D, Vanderkerken K, Bouwens L, Kuppen PJ, Crabbe E, Wisse E. The number and distribution of hepatic natural killer cells (pit cells) in normal rat liver: an immunohistochemical study. *Hepatology* 1995; 21(6):1690-1694.
- (107) Ma KK, Banas K, de Bold AJ. Determinants of inducible brain natriuretic peptide promoter activity. *Regul Pept* 2005; 128(3):169-176.
- (108) Maeda K, Tsutamoto T, Wada A, Hisanaga T, Kinoshita M. Plasma brain natriuretic peptide as a biochemical marker of high left ventricular end-diastolic pressure in patients with symptomatic left ventricular dysfunction. *Am Heart J* 1998; 135(5 Pt 1):825-832.
- (109) Maier B, Schwerdtfeger K, Mautes A, Holanda M, Muller M, Steudel WI et al. Differential release of interleukines 6, 8, and 10 in cerebrospinal fluid and plasma after traumatic brain injury. *Shock* 2001; 15(6):421-426.
- (110) Mannick JA, Rodrick ML, Lederer JA. The immunologic response to injury. *J Am Coll Surg* 2001; 193(3):237-244.
- (111) Mathiesen T, Edner G, Ulfarsson E, Andersson B. Cerebrospinal fluid interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor-alpha following subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* 1997; 87(2):215-220.

- (112) Max W, Rice DP, MacKenzie EJ. The lifetime cost of injury. *Inquiry* 1990; 27(4):332-343.
- (113) McClain C, Cohen D, Phillips R, Ott L, Young B. Increased plasma and ventricular fluid interleukin-6 levels in patients with head injury. *J Lab Clin Med* 1991; 118(3):225-231.
- (114) McCullough PA, Nowak RM, McCord J, Hollander JE, Herrmann HC, Steg PG et al. B-type natriuretic peptide and clinical judgment in emergency diagnosis of heart failure: analysis from Breathing Not Properly (BNP) Multinational Study. *Circulation* 2002; 106(4):416-422.
- (115) Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* 1997; 9(1):4-9.
- (116) Miller JD. Head injury. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1993; 56(5):440-447.
- (117) Miller JD, Butterworth JF, Gudeman SK, Faulkner JE, Choi SC, Selhorst JB et al. Further experience in the management of severe head injury. *J Neurosurg* 1981; 54(3):289-299.
- (118) Mix E, Olsson T, Correale J, Baig S, Kostulas V, Olsson O et al. B cells expressing CD5 are increased in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Clin Exp Immunol* 1990; 79(1):21-27.
- (119) Mizrachi Y, Ohry A, Aviel A, Rozin R, Brooks ME, Schwartz M. Systemic humoral factors participating in the course of spinal cord injury. *Paraplegia* 1983; 21(5):287-293.
- (120) Mokri B. The Monro-Kellie hypothesis: applications in CSF volume depletion. *Neurology* 2001; 56(12):1746-1748.
- (121) Monson NL, Brezinschek HP, Brezinschek RI, Mobley A, Vaughan GK, Frohman EM et al. Receptor revision and atypical mutational characteristics in clonally expanded B cells from the cerebrospinal fluid of recently diagnosed multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol* 2005; 158(1-2):170-181.
- (122) Morganti-Kossmann MC, Rancan M, Otto VI, Stahel PF, Kossmann T. Role of cerebral inflammation after traumatic brain injury: a revisited concept. *Shock* 2001; 16(3):165-177.
- (123) Morganti-Kossmann MC, Rancan M, Stahel PF, Kossmann T. Inflammatory response in acute traumatic brain injury: a double-edged sword. *Curr Opin Crit Care* 2002; 8(2):101-105.
- (124) Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996; 17(3):138-146.
- (125) Murray CJ, Lopez AD. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 1997; 349(9063):1436-1442.

- (126) Muzio M, Re F, Sironi M, Polentarutti N, Minty A, Caput D et al. Interleukin-13 induces the production of interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) and the expression of the mRNA for the intracellular (keratinocyte) form of IL-1ra in human myelomonocytic cells. *Blood* 1994; 83(7):1738-1743.
- (127) Nathan CF. Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* 1987; 79(2):319-326.
- (128) Neugebauer E, Hensler T, Rose S, Maier B, Holanda M, Raum M et al. [Severe craniocerebral trauma in multiple trauma. An assessment of the interaction of local and systemic mediator responses]. *Unfallchirurg* 2000; 103(2):122-131.
- (129) Neumann S, Woolf CJ. Regeneration of dorsal column fibers into and beyond the lesion site following adult spinal cord injury. *Neuron* 1999; 23(1):83-91.
- (130) Ng I, Lim J, Wong HB. Effects of head posture on cerebral hemodynamics: its influences on intracranial pressure, cerebral perfusion pressure, and cerebral oxygenation. *Neurosurgery* 2004; 54(3):593-597.
- (131) Ojo E, Wigzell H. Natural killer cells may be the only cells in normal mouse lymphoid cell populations endowed with cytolytic ability for antibody-coated tumour target cells. *Scand J Immunol* 1978; 7(4):297-306.
- (132) Piehl F, Lidman O. Neuroinflammation in the rat--CNS cells and their role in the regulation of immune reactions. *Immunol Rev* 2001; 184:212-225.
- (133) Puccetti P, Santoni A, Riccardi C, Herberman RB. Cytotoxic effector cells with the characteristics of natural killer cells in the lungs of mice. *Int J Cancer* 1980; 25(1):153-158.
- (134) Raine CS. Biology of disease. Analysis of autoimmune demyelination: its impact upon multiple sclerosis. *Lab Invest* 1984; 50(6):608-635.
- (135) Raine CS, Cannella B, Hauser SL, Genain CP. Demyelination in primate autoimmune encephalomyelitis and acute multiple sclerosis lesions: a case for antigen-specific antibody mediation. *Ann Neurol* 1999; 46(2):144-160.
- (136) Raivich G, Bohatschek M, Kloss CU, Werner A, Jones LL, Kreutzberg GW. Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res Brain Res Rev* 1999; 30(1):77-105.
- (137) Raivich G, Jones LL, Werner A, Bluthmann H, Doetschmann T, Kreutzberg GW. Molecular signals for glial activation: pro- and anti-inflammatory cytokines in the injured brain. *Acta Neurochir Suppl* 1999; 73:21-30.
- (138) Reiber H. Flow rate of cerebrospinal fluid (CSF)--a concept common to normal blood-CSF barrier function and to dysfunction in neurological diseases. *J Neurol Sci* 1994; 122(2):189-203.
- (139) Reiber H. Cerebrospinal fluid--physiology, analysis and interpretation of protein patterns for diagnosis of neurological diseases. *Mult Scler* 1998; 4(3):99-107.

- (140) Reiber H. Dynamics of brain-derived proteins in cerebrospinal fluid. *Clin Chim Acta* 2001; 310(2):173-186.
- (141) Reiber H. Proteins in cerebrospinal fluid and blood: barriers, CSF flow rate and source-related dynamics. *Restor Neurol Neurosci* 2003; 21(3-4):79-96.
- (142) Reiber H, Felgenhauer K. Protein transfer at the blood cerebrospinal fluid barrier and the quantitation of the humoral immune response within the central nervous system. *Clin Chim Acta* 1987; 163(3):319-328.
- (143) Reiber H, Otto M, Trendelenburg C, Wormek A. Reporting cerebrospinal fluid data: knowledge base and interpretation software. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39(4):324-332.
- (144) Reiber H, Thompson EJ, Grimsley G, Bernardi G, Adam P, Monteiro dA et al. Quality assurance for cerebrospinal fluid protein analysis: international consensus by an Internet-based group discussion. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41(3):331-337.
- (145) Resnick DK, Marion DW, Carlier P. Outcome analysis of patients with severe head injuries and prolonged intracranial hypertension. *J Trauma* 1997; 42(6):1108-1111.
- (146) Rodriguez M, Lennon VA. Immunoglobulins promote remyelination in the central nervous system. *Ann Neurol* 1990; 27(1):12-17.
- (147) Rosner MJ, Rosner SD, Johnson AH. Cerebral perfusion pressure: management protocol and clinical results. *J Neurosurg* 1995; 83(6):949-962.
- (148) Roth P, Farls K. Pathophysiology of traumatic brain injury. *Crit Care Nurs Q* 2000; 23(3):14-25.
- (149) Rothwell N. - Interleukin-1 and neuronal injury: mechanisms, modification, and therapeutic potential.(3):152-7.): -7.
- (150) Rubin LL, Staddon JM. The cell biology of the blood-brain barrier. *Annu Rev Neurosci* 1999; 22:11-28.
- (151) Ruchholtz S, Nast-Kolb D, Waydhas C, Lefering R. [The trauma register of the 'Polytrauma' Committee of the German Society of Trauma Surgery as the basis for quality management in the management of severely injured patients]. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd* 1997; 114:1265-1267.
- (152) Rutledge R, Hoyt DB, Eastman AB, Sise MJ, Velky T, Canty T et al. Comparison of the Injury Severity Score and ICD-9 diagnosis codes as predictors of outcome in injury: analysis of 44,032 patients. *J Trauma* 1997; 42(3):477-487.
- (153) Saito Y, Nakao K, Itoh H, Yamada T, Mukoyama M, Arai H et al. Brain natriuretic peptide is a novel cardiac hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 158(2):360-368.
- (154) Savill JS, Wyllie AH, Henson JE, Walport MJ, Henson PM, Haslett C. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the

neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J Clin Invest* 1989; 83(3):865-875.

- (155) Scarano JJ. White blood cells and cerebrospinal fluid. *Pediatrics* 1996; 97(6 Pt 1):929.
- (156) Schnell L, Schwab ME. Axonal regeneration in the rat spinal cord produced by an antibody against myelin-associated neurite growth inhibitors. *Nature* 1990; 343(6255):269-272.
- (157) Schwab C, McGeer PL. Complement activated C4d immunoreactive oligodendrocytes delineate small cortical plaques in multiple sclerosis. *Exp Neurol* 2002; 174(1):81-88.
- (158) Schwartz M. Macrophages and microglia in central nervous system injury: are they helpful or harmful? *J Cereb Blood Flow Metab* 2003; 23(4):385-394.
- (159) Schwartz-Albiez R, Monteiro RC, Rodriguez M, Binder CJ, Shoenfeld Y. Natural antibodies, intravenous immunoglobulin and their role in autoimmunity, cancer and inflammation. *Clin Exp Immunol* 2009; 158 Suppl 1:43-50.
- (160) Sefrin P. Current level of prehospital care in severe head injury--potential for improvement. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 1993; 57:141-144.
- (161) Shahani N, Nalini A, Gourie-Devi M, Raju TR. Reactive astrogliosis in neonatal rat spinal cord after exposure to cerebrospinal fluid from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* 1998; 149(1):295-298.
- (162) Siren AL, McCarron R, Wang L, Garcia-Pinto P, Ruetzler C, Martin D et al. Proinflammatory cytokine expression contributes to brain injury provoked by chronic monocyte activation. *Mol Med* 2001; 7(4):219-229.
- (163) Smith PA, Kohli LM, Wood KL, Hage CA, Twigg HL, III, Knox KS. Cytometric analysis of BAL T cells labeled with a standardized antibody cocktail correlates with immunohistochemical staining. *Cytometry B Clin Cytom* 2006; 70(3):170-178.
- (164) Sosin DM, Sniezek JE, Waxweiler RJ. Trends in death associated with traumatic brain injury, 1979 through 1992. Success and failure. *JAMA* 1995; 273(22):1778-1780.
- (165) Sosin DM, Sniezek JE, Waxweiler RJ. Trends in death associated with traumatic brain injury, 1979 through 1992. Success and failure. *JAMA* 1995; 273(22):1778-1780.
- (166) Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994; 76(2):301-314.
- (167) Stahel PF, Kossmann T, Joller H, Trentz O, Morganti-Kossmann MC. Increased interleukin-12 levels in human cerebrospinal fluid following severe head trauma. *Neurosci Lett* 1998; 249(2-3):123-126.

- (168) Stegmaier JC, Kirchhoff C, Bogner V, Matz M, Kanz KG, Mutschler W et al. Dynamics of neutrophilic NF-kB translocation in relation to IL-8 mRNA expression after major trauma. *Inflamm Res* 2008; 57(11):547-554.
- (169) Stein BC, Levin RI. Natriuretic peptides: physiology, therapeutic potential, and risk stratification in ischemic heart disease. *Am Heart J* 1998; 135(5 Pt 1):914-923.
- (170) Stein SC, Spettell C, Young G, Ross SE. Delayed and progressive brain injury in closed-head trauma: radiological demonstration. *Neurosurgery* 1993; 32(1):25-30.
- (171) Streilein JW. Immune privilege as the result of local tissue barriers and immunosuppressive microenvironments. *Curr Opin Immunol* 1993; 5(3):428-432.
- (172) Streilein JW. Unraveling immune privilege. *Science* 1995; 270(5239):1158-1159.
- (173) Subira D, Castanon S, Aceituno E, Hernandez J, Jimenez-Garofano C, Jimenez A et al. Flow cytometric analysis of cerebrospinal fluid samples and its usefulness in routine clinical practice. *Am J Clin Pathol* 2002; 117(6):952-958.
- (174) Sudoh T, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H. A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature* 1988; 332(6159):78-81.
- (175) Svirgi GE, Soustiel JF, Zaaroor M. Alteration in brain natriuretic peptide (BNP) plasma concentration following severe traumatic brain injury. *Acta Neurochir (Wien)* 2006; 148(5):529-533.
- (176) Takahashi K, Totsune K, Sone M, Ohneda M, Murakami O, Itoi K et al. Human brain natriuretic peptide-like immunoreactivity in human brain. *Peptides* 1992; 13(1):121-123.
- (177) Tedder TF. CD19: a promising B cell target for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2009; 5(10):572-577.
- (178) Tehranian R, Andell-Jonsson S, Beni SM, Yatsiv I, Shohami E, Bartfai T 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.
- (179) Testi R, D'Ambrosio D, De Maria R, Santoni A. The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. *Immunol Today* 1994; 15(10):479-483.
- (180) Thurman DJ, Alverson C, Dunn KA, Guerrero J, Sniezek JE. Traumatic brain injury in the United States: A public health perspective. *J Head Trauma Rehabil* 1999; 14(6):602-615.
- (181) Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF, Merryweather J, Wolpe S, Milsark IW et al. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* 1986; 234(4775):470-474.
- (182) Travlos A, Anton HA, Wing PC. Cerebrospinal fluid cell count following spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil* 1994; 75(3):293-296.

- (183) Vance BA, Wu W, Ribaud RK, Segal DM, Kearse KP. Multiple dimeric forms of human CD69 result from differential addition of N-glycans to typical (Asn-X-Ser/Thr) and atypical (Asn-X-cys) glycosylation motifs. *J Biol Chem* 1997; 272(37):23117-23122.
- (184) Walsh DS, Siritongtaworn P, Pattanapanyasat K, Thavichaigarn P, Kongcharoen P, Jiarakul N et al. Lymphocyte activation after non-thermal trauma. *Br J Surg* 2000; 87(2):223-230.
- (185) Weinberg AD, Lemon M, Jones AJ, Vainiene M, Celnik B, Buenafe AC et al. OX-40 antibody enhances for autoantigen specific V beta 8.2+ T cells within the spinal cord of Lewis rats with autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res* 1996; 43(1):42-49.
- (186) Westermann J, Pabst R. Distribution of lymphocyte subsets and natural killer cells in the human body. *Clin Investig* 1992; 70(7):539-544.
- (187) Wieczorek SJ, Wu AH, Christenson R, Krishnaswamy P, Gottlieb S, Rosano T et al. A rapid B-type natriuretic peptide assay accurately diagnoses left ventricular dysfunction and heart failure: a multicenter evaluation. *Am Heart J* 2002; 144(5):834-839.
- (188) Willenborg DO, Prowse SJ. Immunoglobulin-deficient rats fail to develop experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 1983; 5(2):99-109.
- (189) Yasojima K, Schwab C, McGeer EG, McGeer PL. Up-regulated production and activation of the complement system in Alzheimer's disease brain. *Am J Pathol* 1999; 154(3):927-936.
- (190) Yasue H, Yoshimura M, Sumida H, Kikuta K, Kugiyama K, Jougasaki M et al. Localization and mechanism of secretion of B-type natriuretic peptide in comparison with those of A-type natriuretic peptide in normal subjects and patients with heart failure. *Circulation* 1994; 90(1):195-203.
- (191) Yednock TA, Cannon C, Fritz LC, Sanchez-Madrid F, Steinman L, Karin N. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature* 1992; 356(6364):63-66.
- (192) Zedler S, Bone RC, Baue AE, von Donnersmarck GH, Faist E. T-cell reactivity and its predictive role in immunosuppression after burns. *Crit Care Med* 1999; 27(1):66-72.
- (193) Zubler RH. Key differentiation steps in normal B cells and in myeloma cells. *Semin Hematol* 1997; 34(1 Suppl 1):13-22.

8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ANP	Atrial natriuretic peptid
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BNP	Brain natriuretic peptid
CCT	cranielle Computer tomografie
CD	Cluster of Differentiation
CDC	Centers of Disease Control
CPP	zerebraler Perfusionsdruck
CSF	Cerebro-Spinal Fluid
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EDB	Epidurale Blutung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked-immunosorbent assay
FACS	Fluorescence activated cell sorter
GCS	Glasgow Coma Scale
GOS	Glasgow outcome score
HWZ	Halbwertszeit
ICB	intracerebrale Blutung
ICP	Intracerebral pressure
IgG	Immunglobulin G
INF- γ	Interferon-gamma
IL	Interleukin
IL-1ra	Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist
kD	Kilodalton
m	männlich
MAP	mittlerer arterieller Blutdruck
MHC	Major Histocompatibility Complex
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
MW	Mittelwert
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NT-proBNP	N-terminales pro brain natriuretic peptide

p	statistische Wahrscheinlichkeit
Q _a	Albuminquotient
SAB	Subarachnoidalblutung
SDB	Subdurale Blutung
SEM	standard error of mean
SHT	Schädel-Hirn-Trauma
Tab.	Tabelle
TCDB	Traumatic Coma Data Bank
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
w	weiblich
ZNS	Zentrales Nervensystem

9 LEBENSLAUF

Persönliche Daten:

Name: Tom Müller

Geburtsdatum: 03.04.1976

Geburtsort: Nordhausen

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Wohnort: Schillerstraße 2/3
89077 Ulm

Schulische Ausbildung:

1990 – 1994 Wilhelm-von-Humboldt-Gymnasium in Nordhausen

1994 Abitur

Militärische Ausbildung:

01.07.1994 – 30.06.1995 Grundwehrdienst

01.07.1995 – 30.09.1996 Ausbildung zum Offizier der Marine

01.07.2009 Wiedereinstieg in die Bundeswehr als Sanitätsoffizier

Studium:

1996 – 2000 Studium der Informatik an der Universität der Bundeswehr in München, Abschluss als Diplom-Informatiker

2000 – 2005 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München

2005 – 2006	Praktisches Jahr an Lehr- und Universitätskrankenhäusern der Ludwig-Maximilians-Universität, München
2006	3. Staatsexamen, Approbation
2007 – 2008	Assistenzarzt am Institut für Anästhesie und Intensivmedizin im Klinikum Ingolstadt
2008 – Juni 2009	Assistenzarzt in der Klinik für Internistische Akutmedizin und Prävention im Krankenhaus München-Harlaching
Juli 2009-heute	Assistenzarzt in der Abteilung für Anästhesie und Intensivmedizin am Bundeswehrkrankenhaus Ulm

10 DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich dem Direktor der Chirurgischen Klinik und Poliklinik- Innenstadt der LMU Herrn Prof. Dr. Wolf. Mutschler für die Überlassung des Themas und der Bereitstellung der technischen und organisatorischen Ressourcen danken.

Des Weiteren gebührt besonderer Dank meinem Betreuer Herrn PD Dr. Bibertaler für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Förderung und stets geduldige Unterstützung bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit.

Ich danke Herrn Dr. Chlodwig Kirchhoff, der dieses Teilprojekt der Arbeitsgruppe „Polytrauma“ mit großem Engagement übernommen und mich fortwährend bei der Durchführung der Untersuchungen unterstützt, beraten und motiviert hat.

PD Dr. Bibertaler und Dr. Kirchhoff führten mich mit Professionalität und Geduld an die Grundsätze der wissenschaftlichen Arbeit heran. Mir bleibt nur, mich an dieser Stelle bei beiden für Überlassung des Themas und die lehrreichen Jahre in der Arbeitsgruppe zu bedanken.

Meinem Ko-Doktoranden Herrn Christoph Egginger möchte ich an dieser Stelle für die gute und freundschaftliche Zusammenarbeit in den vergangenen Jahren danken. Letztendlich war die gegenseitige Motivation vor allem in schwierigen Phasen ausschlaggebend für den Erfolg des Projekts.

Abschließend möchte ich meinen Eltern und meinen Freunden für die stete moralische Unterstützung sowie die vielen aufmunternden und motivierenden Worte danken.