

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung der Universität München
komm. Vorstand: Prof. Dr. med. A. Baethmann

Das sekundäre Wachstum einer fokalen Hirnparenchymnekrose bei der Maus

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

vorgelegt von
Ronen Sircar
aus
Köln

Jahr
2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. K. Meßmer
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. W. Lange
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. J. Müller-Höcker Prof. Dr. med. R. Haberl
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. J. Eriskat
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	22.04.2004

Das Gehirn ist das Organ, mit dem wir denken, dass wir denken.

Ambrose Bierce (1842-1914)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
2	Material und Methoden	8
2.1	Versuchstiere	8
2.2	Versuchsanordnung	8
2.2.1	Anästhesie	8
2.2.2	Blutdruckmonitoring - Arteria carotis communis	9
2.2.3	Blutdruckmonitoring - Schwanzarterie	9
2.2.4	Blutgasanalyse	10
2.2.5	Fokale Kälteläsion der Hirnrinde	11
2.2.6	Posttraumatische Phase	12
2.3	Histologie	12
2.3.1	Fixation und Gewebeentnahme	12
2.3.2	Histologische Gewebeaufbereitung	13
2.3.3	Anfertigung von Serienschnitten	13
2.3.4	Nissl-Färbung	14
2.4	Morphometrie	14
2.4.1	Messung der Nekrosefläche	14
2.4.2	Bestimmung des Nekrosevolumens	15
2.5	Semiquantitative Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	16
2.5.1	Maßnahmen im Umgang mit RNA	17
2.5.2	Gewebeentnahme	17
2.5.3	Gewebehomogenisierung	18
2.5.4	Isolierung der Gesamt-RNA	18
2.5.5	Bestimmung der RNA-Menge über die optische Dichte	19
2.5.6	RNA - Elektrophorese	19
2.5.7	Reverse Transkription	20
2.5.8	Entwicklung der Primer	21
2.5.9	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	22
2.5.10	Gelelektrophorese der PCR-Produkte	23
2.5.11	Ausschluss von potentiellen Fehlerquellen	23

2.5.12	Semiquantitative RT-PCR	24
2.6	Versuchsgruppen	25
2.6.1	Anästhesie	25
2.6.2	Traumaparameter	27
2.6.2	Nekrosewachstum Akut bis 24 Stunden	27
2.6.3	Nekrosewachstum Akut bis 168 Stunden	27
2.6.4	MCSF - RT-PCR	27
2.7	Statistik	28
3	Ergebnisse	29
3.1	Kreislaufverhältnisse der Versuchstiere unter Anästhesie	29
3.1.1	Blutdruck	29
3.1.2	Blutgase	30
3.2	Auswirkungen der fokalen Kälteläsion	32
3.2.1	Makroskopische Veränderungen des Gehirns	32
3.2.2	Histologische Befunde	32
3.2.3	Abhängigkeit der Primärläsionsgröße von der Dauer der Kälteexposition	37
3.3	Wachstumskinetik der Hirnparenchymnekrose nach Läsion	38
3.3.1	Akut bis 24 Stunden nach Läsion	38
3.3.2	Akut bis 168 Stunden nach Läsion	41
3.4	Expression von <i>Macrophage Colony Stimulating Factor</i> nach Läsion	43
3.4.1	Positivkontrolle der MCSF-Primer	43
3.4.2	Nekroseareal	43
3.4.3	Penumbra	45
3.4.4	Entfernt liegendes Gewebe	46
4	Diskussion	47
4.1	Versuchsordnung	47
4.1.1	Versuchstiere	47
4.1.2	Anästhesie	48
4.1.3	Fokale Kälteläsion als Modell	50
4.1.4	Alternative Modelle	51
4.2	Histologie	54
4.2.1	Fixation	54

4.2.2	Färbung	55
4.3	Planimetrie und Volumenbestimmung	56
4.4	Reverse Transkriptase - Polymerase Kettenreaktion	58
4.5	Sekundäres Nekrosewachstum nach Kälteläsion	59
4.6	Einfluss der Gewebeschwellung	61
4.7	Mechanismen des Nekrosewachstums	62
4.7.1	Regionale Durchblutung	62
4.7.2	Mediator-Mechanismen	63
4.7.3	Nekrose vs. Apoptose	67
4.8	Die Rolle der Mikroglia	68
4.9	Mikrogliaaktivierung unter pathologischen Bedingungen	69
4.10	MCSF als Aktivator der Mikroglia	71
4.11	MCSF-Expression bei der fokalen Kälteläsion	72
5	Zusammenfassung	73
6	Klinischer Bezug - Ausblick	75
7	Literaturverzeichnis	77
8	Anhang	108
8.1	Arbeitsanleitungen für die histologische Gewebeaufarbeitung	108
8.2	Arbeitsanleitung für die Isolierung von Gesamt-RNA mit Qiagen Rneasy Mini Kit	109
9	Danksagung	110
10	Lebenslauf	111

1 Einleitung

Das Schädel-Hirntrauma ist die häufigste Todesursache junger Erwachsener unter 45 Jahre (Statistisches Bundesamt, 1993). Bei einer Analyse zur Todesursache von über 49.000 Patienten in 95 amerikanischen Traumazentren konnte festgestellt werden, dass Kopfverletzungen am häufigsten, nämlich bei 60%, für den tödlichen Verlauf nach Unfällen aller Art verantwortlich sind, obwohl sie nur bei etwa 33% der Patienten vorlagen (Gennarelli et al., 1989). Dies wiegt umso schwerer, als sich der Häufigkeitsgipfel des schweren Schädel-Hirntraumas, also ein Trauma mit einem initial erhobenen bzw. bis 24 Stunden nach Unfall auf unter 8 gefallenem *Glasgow Coma Score*, im Alter von 15-25 Jahren findet. Allein im Jahr 1999 starben in Deutschland 7.705 Patienten an den Folgen dieser schweren Verletzung, so dass von einer Gesamtzahl von 12.630 Unfallopfern mit schwerem Schädel-Hirntrauma in diesem Jahr ausgegangen werden kann (Baethmann et al., 2002).

Neben der hohen Mortalität des schweren Schädel-Hirntraumas, die nach Ergebnissen der in den Vereinigten Staaten geführten *Traumatic Coma Data Bank* bei etwa 33% liegt, ist auch der Prozentsatz der Patienten mit schwerwiegendem Residualschaden bis zum vegetativen Zustand sehr hoch - 42%. Weitere 18% der verunfallten Menschen bleiben nach der *Glasgow Outcome Scale* mäßig behindert, nur 7% der Patienten erholen sich funktionell zufriedenstellend (Marshall et al., 1983). Der damit verbundene volkswirtschaftliche Schaden ist immens, die hohe psychosoziale Belastung der überlebenden Patienten sowie deren Angehöriger lässt sich nicht quantifizieren.

Die Primärläsionen des Gehirns sofort nach Trauma sind irreversibel. Sie lassen sich nur durch Prävention verhindern bzw. beeinflussen. Sie bestehen aus Kontusionen, oft verbunden mit hämorrhagischen Nekrosen (Adams, 1984), dem diffusen Axonschaden, i.e. Zerreißung von Nervenfasern in der weißen Substanz (Adams et al., 1977), und Gefäßschäden (Baethmann und Kempfski, 1992). Ursachen hierfür sind abrupte Akzeleration/Dezeleration des Schädels oder direkte Gewalteinwirkung mit oder ohne Schädelfraktur mit Massenbewegungen des Gehirns relativ zum knöchernen Schädel. Diese können zu Kontusionen an der Stelle der Gewalteinwirkung führen sowie zu einem "contre coup" auf der gegenüberliegenden Seite. Entlanggleiten des bewegten Gehirns an der Schädelbasis kann zu schwersten Verletzungen v.a. im Bereich der Temporallappen führen (*gliding contusions*). Rotationsbeschleunigungen sowie Scher- und Zugkräfte führen zu Gefäßzerreißungen, oft verbunden mit einer subarachnoidalen Blutung, und

dem diffusen Axonschaden (*stretch injury*). Neben nachfolgender Blutung und Ischämie markiert vor allem die Eröffnung der Blut-Hirnschranke den Beginn der Entwicklung von sekundären Vorgängen, unter anderem die Ausbildung des vasogenen Hirnödems, die Steigerung des intrakraniellen Drucks, Störungen der Mikrozirkulation und ggf. die mesenzepale Einklemmung im Tentoriumspalt oder des Hirnstammes im Foramen magnum. Diese Vorgänge fasst man unter dem Begriff des sekundären Hirnschadens zusammen (Baethmann et al., 1982).

Klinische und experimentelle Befunde belegen, dass die Prognose der Patienten nach Schädel-Hirntrauma entscheidend von den sekundären Mechanismen mitbestimmt wird (Graham et al., 1978; Marshall et al., 1983; Miller, 1986; Baethmann et al., 1988; Statham et al., 1989; Stein et al., 1993; Lynch und Dawson, 1994; Bazan et al., 1995; Gale et al., 1995; Luchter und Walz, 1995; McIntosh et al., 1998). Dies erscheint umso bedeutsamer, als diese Vorgänge prinzipiell einer therapeutischen Intervention zugänglich sind. Sie entwickeln sich in einem zeitlichen Fenster, in dem die Patienten in der Regel bereits medizinisch versorgt werden - Stunden bis Tage nach Trauma. Die bestmögliche Therapie begrenzt somit den Schaden auf den Nervenzellverlust durch das primäre Trauma, während der zusätzliche Untergang von Gewebe und Funktion durch Modulation der sekundären Mechanismen verhindert werden könnte.

Eine Vielzahl der Arbeiten zu diesem Thema beschäftigt sich mit der Pathophysiologie und Therapie des Hirnödems, der Hirndurchblutung und anderen Manifestationen des sekundären Hirnschadens. Dabei bleibt der Nekrosevorgang selbst oft außer Acht. Die entscheidende Frage hierbei u.a. ist, ob die bisher bekannten Mechanismen an der Entstehung und Ausbreitung der Parenchymnekrose beteiligt sind (Abb. 1.1). Unsere Arbeitsgruppe hat sich schon früh mit dieser Fragestellung befasst und konnte zeigen, dass sich eine experimentelle, hochstandardisiert induzierte fokale Nekrose der Hirnrinde des Kaninchens innerhalb von 6 Stunden in der Ausdehnung nahezu verdoppelt und nach 24 Stunden auf 300% ihrer Ausgangsgröße zunimmt (Wyrwich, 1994). Auch im Rattenmodell konnte dieses Phänomen des sekundären Nekrosewachstums beobachtet werden, die Zunahme betrug 45% in 24 Stunden. Dabei konnte auch gezeigt werden, dass die primär im Randbereich der Nekrose überlebenden Nervenzellen eine massiv gesteigerte Proteinbiosynthese zeigen, bevor sie dann im weiteren Verlauf zugrunde gehen (Vonhof, 1997). Es war jedoch lange unklar, ob dieses Nekrosewachstum nach Trauma ein verzögert ablaufender, primärer, irreversibler Prozess ist, oder als Sekundärvorgang durch Hemmung zugrundeliegender Pathomechanismen verhindert werden kann. Die therapeutische Hemmbarkeit des sekundären Nekrosewachstums konnte erstmals mit Hilfe eines iNOS-Inhibitors

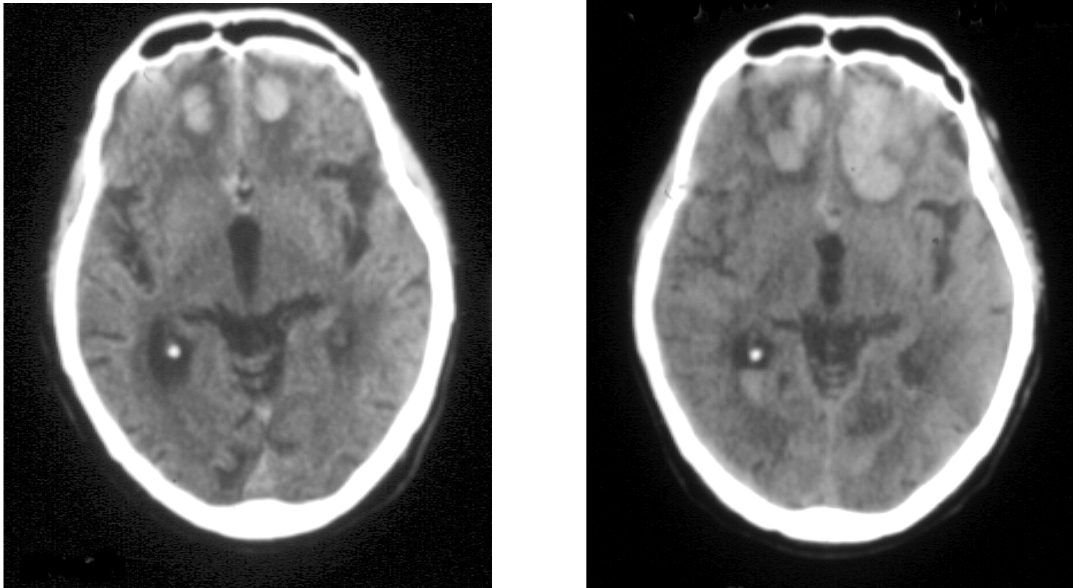


Abb. 1.1: Computertomographische Verlaufsuntersuchung eines 61-jährigen Patienten mit frontaler Kontusion nach Treppensturz. Das linke Bild wurde bei Klinikaufnahme (ca. 3 Std. nach Unfall), das rechte 24 Stunden danach aufgenommen. Auffallend ist die deutliche Vergrößerung der Kontusion innerhalb dieses Zeitraums. Weiterhin kann man auch Zeichen eines gesteigerten intrakraniellen Drucks erkennen. Die Ventrikel und Zisternen sind verkleinert, die Gyri und Sulci verstrichen.

gezeigt werden (Stoffel et al., 2001).

Durch den Fortschritt in der molekularbiologischen Forschung mit hochsensitiven Nachweisverfahren, aber auch durch die zunehmende Kenntnis der Gene, die für einzelne Faktoren kodieren, lässt sich nun seit kurzer Zeit die Funktion einzelner Moleküle bei den verschiedensten pathophysiologischen Fragestellungen mit bislang unerreichter Präzision untersuchen. Als Versuchstiere werden hierbei Mäuse verwendet, bei denen das Gen für einen entsprechenden Faktor funktionsuntüchtig gemacht wurde, sog. *knock-out* Mäuse (Bernstein und Breitman, 1989; Roemer et al., 1991). Durch die völlige Abwesenheit des Faktors im Versuchstier kann seine Rolle im Vergleich zum Wildtyp studiert werden. Mittlerweile sind eine ganze Reihe von Stämmen mit Deletionen für verschiedenste Faktoren charakterisiert und verfügbar. Diese Möglichkeiten sollten in Zukunft für Projekte zur Untersuchung der zugrundeliegenden Mechanismen des sekundären Nekrosewachstums in der Arbeitsgruppe zur Verfügung stehen. Ein Themenbereich, der dabei näher beleuchtet werden soll, ist die Frage, inwiefern das hirneigene Immunsystem, v.a. die Astro- und Mikroglia am sekundären Nekrosewachstum beteiligt ist. Ein erster Schritt wurde mit der Untersuchung zur Expression eines die Mikroglia aktivierenden Zytokins unternommen.

Ziel dieser Arbeit war, ein Modell zur Applikation einer fokalen Hirnparenchymnekrose bei der Maus zu etablieren und das Verhalten dieser Nekrose im Zeitverlauf zu beobachten. Dazu gehörte

die Etablierung einer geeigneten Anästhesie bei der Maus, die Ermittlung geeigneter Parameter zur Induktion einer reproduzierbaren, standardisierten Nekrose sowie die quantitative Erfassung des Parenchymschadens. Das u.U. auftretende Nekrosewachstum sollte dabei in seiner Dynamik charakterisiert werden. In einer weiteren Studie sollte dieses Nekrosewachstum mit der Expression des Zytokins und Mikrogliaaktivators *Macrophage Colony Stimulating Factor* korreliert werden.

2 Material und Methoden

Die Versuche wurden im Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität in der Zeit von September 1999 bis Oktober 2000 mit Unterstützung durch den Förderverbund “Neurotraumatologie und Neuropsychologische Rehabilitation” des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (FKZ 9030911) durchgeführt.

2.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden männliche C57/BL6 Mäuse (Charles River, Sulzfeld) mit einem Körpergewicht von 20-25g verwendet. Die Mäuse hatten freien Zugang zu Futter und Wasser und waren einem 12 Stunden Licht/Dunkel Zyklus ausgesetzt.

2.2 Versuchsanordnung

2.2.1 Anästhesie

Bislang wurde in der Arbeitsgruppe nicht mit Mäusen gearbeitet, so dass zuerst das Anästhesieverfahren etabliert werden musste. Die Narkose der Tiere wurde in einem geschlossenen Gefäß durch Zuleitung eines Gasgemisches aus 4% Halothan (Eurim-Pharm, Piding), 70% Lachgas (Fluss: 2 l/min) und 30% Sauerstoff (Fluss: 0,6 l/min) eingeleitet. Die Halothankonzentration konnte mit Hilfe eines Verdampfers (Halothan Vapor 19.3, Drägerwerk, Lübeck) stufenlos geregelt werden. Zwei Minuten später wurde die Halothankonzentration auf 1,5% verringert und die spontan atmenden Tiere nun mittels einer dichtsitzenden Maske über die Schnauze mit dem Narkosegas versorgt. Die Maske verfügte über einen abführenden Schenkel, über den die Ausatemluft und das Gasgemisch wieder abgesaugt wurden (Fluss: 2,6 l/min). Nach weiteren drei Minuten wiederum wurde die Konzentration des Halothans auf die Erhaltungsdosis von 0,9% für die restliche Zeit des Versuchs verringert. Die Narkosetiefe wurde regelmäßig durch Setzen eines Schmerzreizes am Hinterlauf überprüft und die Halothankonzentration gegebenenfalls kurzfristig um 0,2% erhöht. Bei Beendigung des Versuchs wurden Halothan- und Lachgaszufuhr abgestellt und den Tieren bis zum Erwachen reiner Sauerstoff angeboten (2 l/min). Die Körpertemperatur wurde während des gesamten Zeitraums auf 37-38°C konstant gehalten. Dafür wurde eine Heizplatte verwendet (Effenberger, München), die über eine rektale Temperatursonde rückgekoppelt war.

2.2.2 Blutdruckmonitoring - Arteria carotis communis

Zur kontinuierlichen Überwachung des arteriellen Blutdrucks in der Anästhesie-Versuchsgruppe (siehe 2.6.1) wurde ein arterieller Zugang über die Arteria carotis communis geschaffen. Hierzu wurde ein Polyäthylenkatheter (Portex Polythene Tubing, SIMS Portex Ltd., Hythe, England; Innendurchmesser 0,28 mm, Außendurchmesser 0,61 mm) über die Spitze einer Injektionskanüle der Stärke Gr. 20 (Sterikan, Braun Melsungen, Melsungen) geschoben. An den Konnektor der Kanüle wurde über einen Dreiwegehahn eine Mikroliter-Spritze mit isotoner Kochsalzlösung zur Spülung, sowie der Druckaufnehmer (Gould P23 ID, Statham, USA) angeschlossen. Über einen paramedianen Hautschnitt am Hals wurde die linke Arteria carotis communis dargestellt, doppelt angeschlungen, distal ligiert, proximal abgeklemmt und mit einer Mikrogefäßschere eröffnet. Das freie Katheterende wurde eingeführt, nach Entfernen der Klemme 5 mm weiter in das Gefäßlumen nach proximal vorgeschoben und mit dem proximalen Faden fixiert. Das vom Druckwandler aufgenommene arterielle Drucksignal wurde nach entsprechender Verstärkung (Sirecust 304D, Siemens, München) alle 5 Minuten aufgezeichnet. Der arterielle Mitteldruck (MAP) wurde aus systolischem (P_{sys}) und diastolischem Druck (P_{dia}) nach Formel 2.1 berechnet (Witzleb, 1987):

$$MAP = P_{dia} + \frac{P_{sys} - P_{dia}}{3} \quad (2.1)$$

2.2.3 Blutdruckmonitoring - Schwanzarterie

Für etwaige spätere Versuchsreihen sollte in Zukunft ein weniger invasiver Zugang für die Messung des MAP zur Verfügung stehen, der auch ein Wiederaufwachen der Versuchstiere nach Versuchsende erlaubt. Deshalb wurde bei den Tieren in der Anästhesie-Versuchsgruppe (siehe 2.6.1) anschließend auch ein arterieller Zugang über die Schwanzarterie geschaffen, um die entsprechenden Messwerte mit denen aus der Arteria carotis communis zu korrelieren und validieren. Hierzu wurde das Ende eines PE-Katheters (Portex Polythene Tubing, s.o.) unter Hitzeeinwirkung ausgezogen, um den Aussendurchmesser auf 0,35-0,4 mm zu verringern. Dies wurde unter Beibehaltung des Innendurchmessers erreicht. Anschließend wurde das andere Ende wie beim Karotiszugang über eine Injektionskanüle (Sterikan, Gr. 20) geschoben und über einen Dreiwegehahn an Spüleinrichtung und Druckaufnehmer mit entsprechendem Verstärker angeschlossen. Die Schwanzarterie wurde nach ventromedianer Hautinzision präpariert und dargestellt, doppelt angeschlungen und distal ligiert. Nach Eröffnung der Arterie wurde das ausgezogene Katheterende in das Lumen eingeführt, bis 10 mm nach proximal vorgeschoben und mit dem proximalen Faden fixiert. Aufzeichnung und Berechnung der Messwerte wurden ebenfalls entsprechend der o.g. Vorgehensweise durchgeführt.

2.2.4 Blutgasanalyse

Zur Erfassung der Blutgaswerte in der Anästhesie-Versuchsgruppe wurden jedem Versuchstier viermal arterielle Blutproben aus der Arteria carotis communis entnommen (siehe 2.6.1). Mehr Entnahmen hätten zu einer starken Hämodilution mit Veränderungen der Homöostase geführt (Dalkara et al., 1995). Über den arteriellen Zugang wurde eine heparinisierte Glaskapillare (60 μ l, Bayer Diagnostics, Fernwald) befüllt und die Proben mit Hilfe eines Blutgasanalysegerätes (Chiron Diagnostics Serie 860, Ciba Corning, Fernwald) untersucht. Das Blutvolumen wurde nach der jeweiligen Entnahme durch Kochsalzlösung ersetzt.



Abb. 2.1: Kältesonde zur Applikation der Kortexläsion. Sie bestand aus einem Kupferhohlzylinder, der konisch auf die eigentliche Kontaktspitze zulief. Diese (1,5 mm \varnothing) wurde, nach Befüllen des Zylinders mit Trockeneis und Azeton und Abkühlung, mit dem Kortex in Berührung gebracht.

2.2.5 Fokale Kälteläsion der Hirnrinde

Zur Induktion der kortikalen Nekrose wurde eine fokale Kälteläsion erzeugt (Clasen et al., 1953; Klatzo et al., 1958). Nach Fixierung des Kopfes des Versuchstiers in einer stereotaktischen Halterung (David Kopf Instruments, Tujunga, USA) wurden die Kopfhaut und das Periost median inzidiert, dann stumpf zur Seite präpariert und mit Nähten außerhalb des Präparationsbereiches fixiert. Die Trepanationsstelle konnte dann mit einem Mikromanipulator (David Kopf Instruments) 2 mm rechts lateral und 2 mm kaudal des Bregmas am rechten Os parietale markiert werden. Unter mikroskopischer Kontrolle (OPMI 1, Carl Zeiss, Oberkochen) wurde mit Hilfe eines feinmechanischen Bohrgerätes (Paggen, Starnberg) unter ständiger Kühlung mit physiologischer Kochsalzlösung ein rundes Knochenfenster von 2,5 mm Durchmesser ausgefräst. Dabei wurde die Dura mater nicht verletzt. Nach vorsichtiger Entfernung des Knochendeckelchens wurde die freigelegte Dura mit körperwarmer physiologischer Kochsalzlösung ständig feucht gehalten.

Die Kältesonde (Effenberger, München, Abb. 2.1) wurde zunächst ungekühlt zur Probe mit Hilfe des Mikromanipulators unter Mikroskopsicht der Dura mater plan aufgesetzt. Die Position der Sonde zur Induktion der Läsion wurde durch dieses Verfahren in ihren Koordinaten festgelegt. Nach Entfernung vom Kortex wurde die Sonde durch Befüllen des Hohlzylinders mit einem Gemisch aus Azeton und Trockeneis abgekühlt. Die Mischung hat eine Temperatur von -80°C . Frühere Messungen haben gezeigt, dass hierdurch eine Temperatur von -68°C an der Sondenspitze erreicht wird (Maier-Hauff et al., 1984). Nach Abwarten von fünf Minuten, einem Zeitraum, in dem die Kältemischung und die Sonde eine konstante Temperatur erreichen, wurde die Sonde entsprechend der jeweiligen Versuchsgruppe für einen definierten Zeitraum (vier und sechs

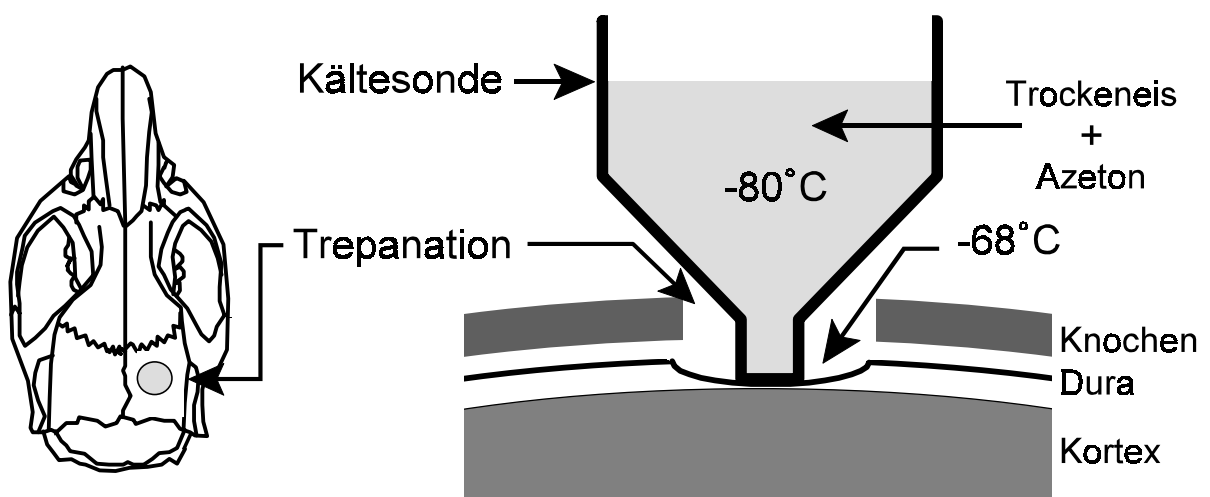


Abb.2.2: Mausschädel in der Aufsicht (Schema links). Mit einem Bohrgerät wurde eine Trepanation über dem rechten Os parietale angelegt, 2 mm lateral und kaudal vom Bregma. Über diese konnte die abgekühlte Kältesonde durch die intakte Dura auf den Kortex zur Applizierung der Läsion aufgesetzt werden, unter Verdrängung des subarachnoidalen Liquorkissens (Schema rechts).

Sekunden, siehe 2.6.2) auf die Dura aufgesetzt. Zur Verdrängung der Liquorschicht zwischen Dura mater und Kortexoberfläche wurde die Sonde einen halben Millimeter unter die zuvor festgelegte Koordinatenposition abgesenkt (Abb. 2.2). Die Kontaktfläche der Sonde mit der Kortexoberfläche hatte einen Durchmesser von 1,5 mm.

Zur besseren Standardisierung der Läsion wurde ein computergesteuerter Mikromanipulator verwendet. Mit Hilfe eines eingebauten Schrittmotors konnte, nach Voreinstellung der Position, der Kontaktzeit der Sonde mit der Kortexoberfläche sowie der zusätzlichen Absenkung zur Verdrängung des Liquorkissens, die Applikation der Kälteläsion exakt durchgeführt werden (Eriskat, 2000).

2.2.6 Posttraumatische Phase

Im Anschluss an die Kälteläsion wurde bei allen Versuchstieren, sofern sie nicht einer Akutgruppe angehörten, die Kopfhaut mit Einzelknopfnähten verschlossen. Nach Erwachen aus der Narkose, wurden die Tiere in Einzelkäfige verbracht und für eine Stunde bei 32°C Umgebungstemperatur - bis zum sicheren Einsetzen der körpereigenen Thermoregulation - gehalten. Die verbleibende posttraumatische Überlebenszeit verbrachten die Tiere bei normalen Raumtemperaturen (20°C) und freiem Zugang zu Futter und Wasser.

2.3 Histologie

2.3.1 Fixation und Gewebeentnahme

Die Versuchstiere wurden fünf Minuten, beziehungsweise 4, 12, 24, 48, 96 oder 168 Stunden nach Trauma durch transaortale Perfusionsfixation getötet. Für diesen Zweck wurden sie erneut durch Zuleitung eines Gasgemisches aus Halothan, Lachgas und Sauerstoff anästhesiert; die Tiere der Akutgruppe hingegen blieben in Narkose. Über einen Oberbauchquerschnitt wurde das Diaphragma dargestellt und entlang des Rippenbogens eröffnet. Das perikardiale Fettgewebe wurde entfernt und die Wand des linken Ventrikels mit einer Mikroschere inzidiert, ohne die Kammer dabei zu perforieren. Eine rundgeschliffene, stumpfe Stahlkanüle (Sterikan, Gr. 20) wurde durch die Inzision in den linken Ventrikel und weiter in die Aorta ascendens vorgeschoben und mit einer Klemme fixiert. Bereits vorher wurde die Perfusion mit 0,9% Kochsalzlösung gestartet, um Embolien durch Luftblasen aus der Kanüle zu vermeiden und eine gleichmäßige Perfusion des Gewebes zu gewährleisten. Unmittelbar nach Punktion des linken Ventrikels wurde das rechte Herzohr eröffnet. Sobald die austretende Flüssigkeit überwiegend klar erschien - 30 bis 40 Sekunden später - wurde

die Infusion über einen Dreiwegehahn auf gepufferte Paraformaldehydlösung (4%, pH 7,4) umgeschaltet. Die Perfusionsflaschen hingen in 120 cm Höhe über dem Präparationstisch. Vorversuche mit einem Druckwandler ergaben einen Perfusionsdruck von 90-100 mmHg (Eriskat, 2000). Das Fixativ wurde über den aortalen Katheter über einen Zeitraum von 30 Minuten infundiert. Die hypoxische Phase zwischen Eröffnung des Diaphragmas und Start der Perfusion dauerte maximal 20 Sekunden.

Anschließend wurde zur Entnahme des Gehirns die Schädelkalotte entfernt. Durch Einschnitte unmittelbar vor den Frontalhirnpolen und kaudal vom Cerebellum konnte das Gehirn vorsichtig mobilisiert und die Hirnnerven an der Schädelbasis mit einem Spatel durchtrennt werden. Das Gehirn wurde entnommen und für mindestens 24 Stunden in Paraformaldehyd fixiert.

2.3.2 Histologische Gewebeaufbereitung

Die fixierten Präparate wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Schema als Tab. 7.1 im Anhang) entwässert, anschließend im Wärmeschrank bei 60°C für 24 Stunden in Paraplast eingelegt; das Paraffin wurde nach 12 Stunden einmal gewechselt. Das Gehirn wurde daraufhin luftblasenfrei mit Paraffin in einer Metallform eingebettet und härtete über Nacht bei 4°C aus.

2.3.3 Anfertigung von Serienschnitten

Die Nekroseausdehnung wurde in Serienschnitten ermittelt, die in koronarer Schnittrichtung nach einem festen Schema angefertigt waren. Ausgehend vom Okzipitalpol wurden 5 µm Schnitte mit einem Rotationsmikrotom (Reichert-Jung Typ 2030, Cambridge Instruments, Nußloch) bis zum Frontalpol angefertigt. Jeweils vier aufeinander folgende Schnitte wurden auf einen Objektträger aufgebracht und 46 Schnitte verworfen. Damit wurde erreicht, dass die Oberflächen der jeweils ersten Schnitte der aufeinander folgenden Objektträger genau $(4 + 46) \times 5 \mu\text{m}$ also 250 µm Abstand voneinander hatten. Sobald die Schnittebene den Beginn der Nekrose erreicht hatte, wurde die Anzahl der verworfenen Schnitte auf 16 verringert, so dass nun der Abstand der ersten Schnitte auf den aufeinander folgenden Objektträgern $(4 + 16) \times 5 \mu\text{m}$ also 100 µm betrug. Dies erlaubte eine höhere Anzahl an Schnitten durch die Nekrose und damit eine höhere Auflösung bei der anschließenden Berechnung. Sobald die Schnittebene die Nekrose verlassen hatte, wurde der Abstand wieder auf 250 µm vergrößert, indem wiederum 46 Schnitte verworfen wurden.

2.3.4 Nissl-Färbung

Für die Nissl-Färbung wurde Kresylviolett als 1%ige Lösung wie folgt zubereitet: Ein Gramm Kresylviolett (Merck, Darmstadt) wird in 20 ml Ethanol (100%, Nr. 932, Merck, Darmstadt) gelöst, mit Aqua destillata auf 100 ml verdünnt, die Flüssigkeit nach vorsichtigem Erhitzen abfiltriert und vor Gebrauch mindestens 24 Stunden kühl und dunkel gelagert. Mit dieser klassischen Färbung (Schema als Tab 7.2 im Anhang) für Nervengewebe (Nissl et al., 1926) erscheint der Zellkern zart blau mit kräftig gefärbtem Nucleolus, Nissl-Schollen, i.e. das endoplasmatische Retikulum dunkel, und das Zellplasma sowie Markscheiden hellblau.

2.4 Morphometrie

2.4.1 Messung der Nekrosefläche

In den histologischen Präparaten (Abb. 3.11) ist das Nekroseareal gegenüber dem normalen Gewebe gut abgrenzbar. Dies ist sofort nach Trauma als auch zu den späteren Zeitpunkten zweifelsfrei zu erkennen. Das Trauma wurde so gewählt, dass die Nekrose - auch bei ihrer Maximalausdehnung zum späteren Zeitpunkt - auf den Kortex beschränkt blieb, um die Bildung eines vasogenen Hirnödems bei Einbeziehung der weißen Substanz weitgehend zu verhindern. Eine

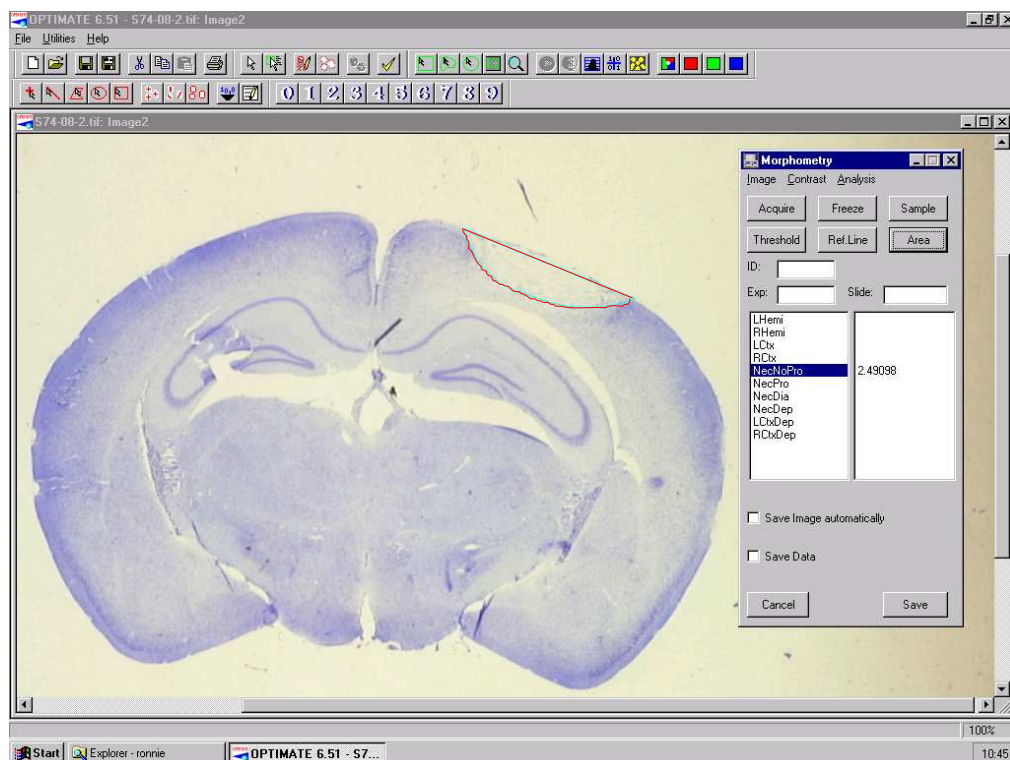


Abb. 2.3: Messung der Nekrosefläche. Sie wurde durch Umfahren des Nekroseareals auf dem digital aufgenommenen histologischen Schnitt mit dem Mauszeiger markiert und mit Hilfe der Software nach Eichung errechnet.

korrekte morphologische Erfassung wäre dann unmöglich geworden. Das sich im histologischen Befund präsentierende Nekroseareal wurde mit der folgenden Methode planimetriert.

Die histologischen Schnitte wurden im Durchlichtverfahren mit einer hochauflösenden digitalen Farbkamera aufgenommen (Fuji Digital Camera HC-300Z, Fuji, Tokio, Japan) und auf einen Computer überspielt (IBM AT 686 kompatibel, F&P, München). Mit Hilfe einer Bildanalyse-Software (Optimate 6.51, Media Cybernetics Inc., Silver Spring, USA) konnte nun die Nekrosekontur auf dem Bildschirm mit dem Mauszeiger umfahren werden (Abb. 2.3). Die Nekrosegrenze wurde mikroskopisch mit Hilfe der morphologischen Nekrosekriterien für Neuronen kontrolliert (siehe 3.2.2): Neuronen mit Chromatinverklumpung und Kernpyknose wurden innerhalb des Nekroseareals durch die Linienführung eingeschlossen. Alle vitale Neuronen, die kein solches Kriterium erfüllten, wurden ausgeschlossen (siehe Abb. 3.10). Dieses Vorgehen verhinderte eine falsche Abgrenzung aufgrund von zeitweilig auftretenden Färbeartefakten bei rein makroskopischer Planimetrie (siehe Abb. 3.12). Die Nekrosegrenze an der Kortexoberfläche wurde einer Geraden angenähert, um das Ergebnis nicht durch eventuell vorhandene Substanzverluste im Nekrosekern oder einen Schwellungsartefakt zu verfälschen, die sich entweder durch Fehlen einer Oberflächenbegrenzung im Nekrosebereich oder Protrusion über die Oberflächenbegrenzung der übrigen Hirnrinde hinaus bemerkbar gemacht hätten. Aus den Konturkoordinaten errechnete das Programm die Nekrosefläche. Um die ermittelte Fläche in Quadratmillimetern quantifizieren zu können, wurde das System vor jeder Sitzung mit einem Mikromaßstab (1mm-Gitter, Zeiss, Oberkochen) geeicht.

2.4.2 Bestimmung des Nekrosevolumens

Das Nekrosewachstum wurde nicht nur zweidimensional als maximale Nekroseausdehnung erfasst, sondern - mittels des Nekrosevolumens - auch dreidimensional. Hierzu gibt es verschiedene morphometrische Verfahren, um das Nekrosevolumen unter Verwendung der in den Serienschnitten ermittelten Nekroseflächen zu berechnen (Abb. 2.4). Nach ausführlicher Testung dieser Verfahren (Eriskat, 2000) wird der *Basic Volume Estimator* (Cavalieri-Prinzip, Formel 2.2) in unserer Arbeitsgruppe zur Volumenberechnung eingesetzt:

$$V = d \sum_{nec=1}^n A_{nec} \quad (2.2)$$

Mit Hilfe dieser Formel wird das Volumen V aus den Nekroseflächen A_{nec} und dem Abstand d zwischen diesen Flächen berechnet. Das konstante Intervall d betrug bei den Serienschnitten mit

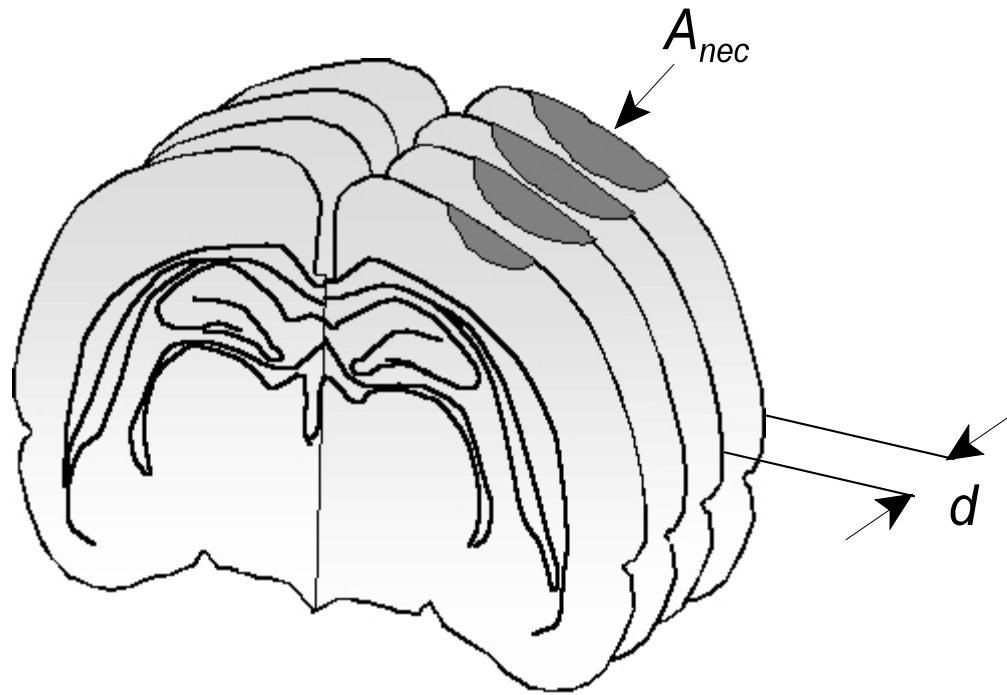


Abb. 2.4: Schema zur Berechnung des Nekrosevolumens aus den Nekroseflächen A_{nec} und dem Abstand d .

einer Nekrosefläche $100\mu\text{m}$.

2.5 Semiquantitative Reverse Transkriptase - Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Diese Methode wurde gewählt, um das Ausmaß der zum jeweiligen Zeitpunkt in der Zelle aktivierten - "in Produktion befindlichen" - Zytokine zu bestimmen; in der vorliegenden Untersuchung des Zytokins *Macrophage Colony Stimulating Factor* (MCSF).

Bei der Bildung von Proteinen in eukaryotischen Zellen spielen sich vereinfacht folgende Schritte ab:

Nach Aktivierung bestimmter Gene durch Transkriptionsfaktoren werden zunächst im Zellkern Kopien des entsprechenden Gens in Form von RNA erstellt (= Transkription). Diese *messenger* RNA (mRNA) wird ins Zytosol der Zelle transportiert, um dort als Matrize für die eigentliche Proteinproduktion zu dienen (= Translation). Die Anzahl der gebildeten mRNA Moleküle bestimmt hierbei direkt die spätere Menge des kodierten Proteins. Die semiquantitative RT-PCR detektiert die Menge der zu einem bestimmten Zeitpunkt in der Zelle kursierenden mRNA-Moleküle für dieses Protein und lässt damit eine Aussage über das Ausmaß der Bildung des Proteins in Relation zu einem sogenannten *housekeeping gene* (siehe 2.5.11) zu.

2.5.1 Maßnahmen im Umgang mit RNA

Da RNA den ubiquitär vorhandenen RNA'sen, die dieses Molekül sofort abbauen, ausgesetzt und zusätzlich im Vergleich zu DNA instabiler ist, war besondere Sorgfalt im Umgang mit dem Gewebe und den daraus gewonnenen molekularbiologischen Proben notwendig. Alle Tätigkeiten wurden an einem eigens eingerichteten Arbeitsplatz verrichtet, der regelmäßig vor und nach Benutzung mit einer RNA'se abbauenden Lösung dekontaminiert wurde (RNase Free!, Continental Laboratory Products, Upland, USA). Im weiteren wurden gesondert gelagerte, eigens für den Umgang mit RNA bestimmte Verbrauchsmaterialien und gesondert gereinigtes Arbeitsgerät zur Gewebeentnahme und Laborarbeit verwendet. Es wurden jederzeit Einmalhandschuhe getragen, die zusätzlich regelmäßig gewechselt wurden.

Neben den RNA'se-abbauenden Substanzen in den verwendeten Reagenzien, wurde das verwendete Wasser mit Dimethyl-Dicarbonat versetzt (DMDC-H₂O), um RNA'sen zu inaktivieren.

2.5.2 Gewebeentnahme

Entsprechend der Versuchsgruppe (siehe 2.6.4) wurden die Tiere 8, 24, 96 oder 168 Stunden nach

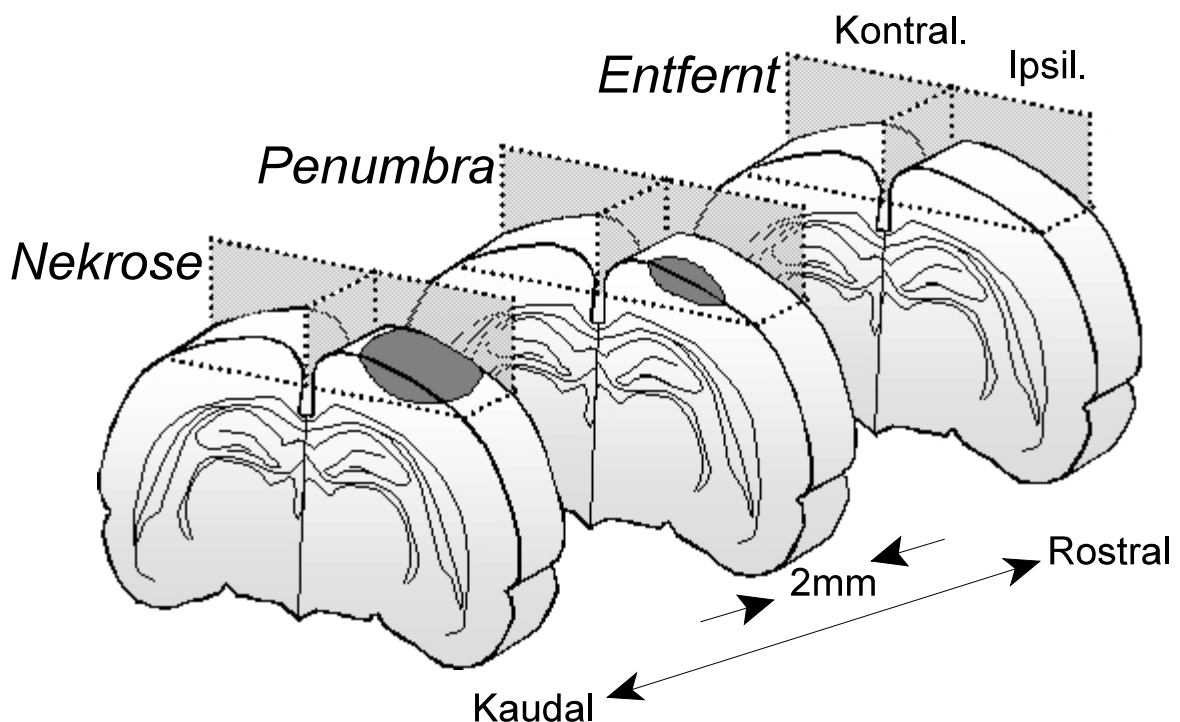


Abb. 2.5: Schematische Darstellung der Gewebeentnahme für die RT-PCR. Aus den drei aufeinander folgenden Schnitten (2 mm Dicke) wurden Kortexprouben aus den ipsilateralen und korrespondierenden kontralateralen Hemisphären entnommen. Dabei wurden die Schnitte so angelegt, dass jeweils Nekrose, Penumbra und gesundes Gewebe in definiertem Abstand vom Zentrum der Nekrose repräsentiert sind.

Trauma durch Zuleitung von Halothan, Lachgas und Sauerstoff erneut narkotisiert und nach Oberbauchquerschnitt und Eröffnung des Diaphragmas durch Abschneiden der Herzspitze entblutet.

Unmittelbar nach Entbluten wurde das Gehirn, wie bereits unter 2.3.1 beschrieben, in toto entnommen. Das Zerebellum und der Hirnstamm wurden anschließend durch einen transversalen Schnitt in Höhe des Vorderrandes der Pons entfernt. Das Großhirn wurde in eine Metallform eingebracht (HSE-Harvard, March-Hugstetten), in dem mittig das Relief der basalen Anteile des Gehirns ausgespart war und 2 mm dicke Koronarschnitte mit Hilfe von Rasierklingen durch entsprechend vorhandene Führungsschlitze angefertigt (Abb. 2.5). Dabei wurde beachtet, dass der erste Schnitt das Zentrum der äußerlich sichtbaren Nekrose mittig beinhaltete. Der rostral benachbarte Schnitt verfügte über den Randbereich der Nekrose und die Penumbra, der wiederum daran rostral anschließende Schnitt gesundes Gewebe in exakt definierter Entfernung vom Zentrum der Nekrose, i.e. 4-5 mm. In einem weiteren Schritt wurde eine transversale Schnittebene oberhalb des Corpus Callosum durch den Kortex gelegt und nun die insgesamt sechs abgetrennten Kortexareale von traumatisierter (ipsilateraler) und nicht-traumatisierter (kontralateraler) Hemisphäre einzeln in Aufbewahrungsröhrchen in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Bis zur Weiterverarbeitung wurden diese Gewebeproben bei -80°C gelagert.

2.5.3 Gewebhomogenisierung

Zum Lysieren wurde ein elektrischer Gewebhomogenisator verwendet (OMNI 2000, Omni International, Waterbury, USA), der mechanisch die Zellen des Gewebes zerreißt und die Zellbestandteile freisetzt. Er wurde vor jedem neuen Arbeitsgang für jeweils 20 Sekunden in drei verschiedenen, mit 500ml sterilem Aqua ad iniectibilia gefllten, RNA´se-freien Glasgefäßen durch Einschalten gereinigt. Dabei war wichtig, dass die drei Gefäße immer in der gleichen Reihenfolge verwendet wurden, um eine absteigende Konzentration an Verunreinigung zu erreichen. Zusätzlich wurde der Apparat vor und nach jeder Sitzung chemisch von RNA´sen dekontaminiert (RNase Free!). Zu jeder tiefgefrorenen Gewebeprobe wurden 600µl RLT-Puffer (Lysis-Puffer, Rneasy Mini Kit 250, Qiagen, Hilden), vermischt mit 6µl β -Mercaptoethanol, hinzu pipettiert und für 20 bis 40 Sekunden homogenisiert. Die so hergestellten Gewebslysate konnten nun weiterverarbeitet oder bei -80°C zwischengelagert werden.

2.5.4 Isolierung der Gesamt-RNA

Für die Isolierung der Gesamt-RNA wurde ein kommerziell erhältlicher Kit verwendet, der RNA

nach einem patentierten Verfahren an eine Membran bindet, während andere Moleküle durch verschiedene chemische Verfahren gelöst und abzentrifugiert werden (Rneasy Mini Kit 250, Qiagen, Hilden). Anschließend kann die reine Gesamt-RNA wieder von der Membran in Lösung gebracht werden (Schema unter 7.2 im Anhang).

2.5.5 Bestimmung der RNA-Menge über die optische Dichte

Da die isolierte Gesamt-RNA-Menge abhängig von der ursprünglichen Zellzahl in der Probe und der Sorgfalt der RNA-Isolierung variiert, mußte für jede Probe individuell der RNA-Gehalt bestimmt werden, um in den weiteren Schritten identische RNA-Mengen verwenden zu können. RNA kann bei 260 nm photometrisch quantifiziert werden. Eine OD_{260} -Einheit (*optical density*) entspricht dabei einer Konzentration von $40\mu\text{g/ml}$ Einzelstrang-RNA. Zusätzlich kann über das Verhältnis aus den Absorptionswerten bei 260 nm und 280 nm (*absorbance ratio*) eine Aussage über die Reinheit und somit über die Qualität der isolierten Gesamt-RNA getroffen werden. RNA absorbiert bei 260 nm, DNA bei 280 nm Wellenlänge. Lag das Verhältnis dieser Werte über 2,0 oder unter 1,8 konnte von einer Verunreinigung durch DNA bzw. andere Stoffe ausgegangen werden und die Probe wurde ausgeschlossen.

Für die Messung wurde eine Mikroliter-Quarzküvette (QS-10mm, Hellma, Müllheim) verwendet. Das Photometer (DU 7500, Beckman Coulter, Fullerton, USA) wurde zunächst mittels der mit $100\mu\text{l}$ reinem DMDC- H_2O gefüllten Küvette auf einen Nullwert kalibriert. Für die Messung wurde eine Verdünnung der Gesamt-RNA-Probe in DMDC- H_2O von 1:50 verwendet ($2\mu\text{l}$ Proben-Aliquot auf $98\mu\text{l}$ DMDC- H_2O). Der RNA-Gehalt C der Probe rechnet sich wie folgt aus der Anzahl der Dichteeinheiten x (Formel 2.4):

$$C = x_{OD_{260}} \cdot 50 \cdot 40\mu\text{g} / \text{ml} \quad (2.4)$$

Jede Probe wurde dreimal gemessen und der Mittelwert berechnet, um in den folgenden Arbeitsschritten, abhängig von der Konzentration der Proben, nun $0,5$ bzw. $1\mu\text{g}$ Gesamt-RNA einzusetzen. Nach jedem Messvorgang wurde die Quarzküvette mit DMDC- H_2O mehrfach gespült.

2.5.6 RNA - Elektrophorese

Neben der *absorbance ratio* gibt die RNA-Elektrophorese Auskunft über die Integrität der Gesamt-RNA-Probe. $0,5\mu\text{g}$ jeder Probe wurden zusammen mit einem Farbstoff auf ein Agarose-Gel aufgetragen und mittels angelegter Spannung elektrophoretisch aufgetrennt.

Über 80% der Gesamt-RNA besteht aus ribosomaler RNA (rRNA). Diese wiederum hat in eukaryotischen Zellen vier charakteristische Untereinheiten, 5s, 5,8s, 18s und 28s. Zwei von den vier Untereinheiten der rRNA, die 28s und die 18s Untereinheit, können als zwei charakteristische Banden in der Gelelektrophorese beurteilt werden. Sind diese Untereinheiten nicht intakt, also z.B. schon teilweise fragmentiert, kommt es zu einer unscharfen Abgrenzung mit Verschleierung bis zu einem völligen Fehlen dieser Banden. Vom Zustand dieser Untereinheiten wird dann auf den Zustand der gesamten RNA rückgeschlossen, da die mRNA selber, aufgrund ihrer unterschiedlichen Länge und der kleinen Menge, nicht direkt beurteilt werden kann.

Zur Herstellung des Gels wurden 500mg Agarose mit 50 ml TAE-Puffer (2M Tris-Azetat + 0,05M EDTA, pH 8,3) unter Rühren zum Kochen gebracht, bis die Lösung klar wurde. Nach Abkühlen auf etwa 60°C wurden 2,5 µl Ethidiumbromid-Lösung hinzu pipettiert und vermischt. Das Gel wurde in die passende Elektrophoresekammer (Blue Marine/Blue Power System, Serva, Heidelberg) gegossen und Plastikformen zur Schaffung der Schlitz für die Aufnahme der Proben angebracht. Nach Aushärtung wurden 0,5 µg RNA-Probe mit 2 µl Farbstoff (Loading Dye, MBI Fermentas, St. Leon-Rot) in die jeweiligen Gelschlitze eingebracht, die Kammer mit TAE-Puffer aufgefüllt, bis das Gel mit einem Flüssigkeitsfilm bedeckt war, und für 30 Minuten einer Gleichstromspannung von 70 mV ausgesetzt. Anschließend wurden die Banden im Gel durch die Bindung von RNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid unter UV-Licht (Fluo.Link, Bachofer, Reutlingen) sichtbar, mit Hilfe einer CCD-Kamera (Sony, Tokyo, Japan) digital abfotografiert und auf einen Computer (IBM AT 586) überspielt.

2.5.7 Reverse Transkription

Durch die Reverse Transkription wird von sämtlichen mRNA-Strängen der Probe mit Hilfe des Enzyms *Reverse Transkriptase* eine DNA-Kopie (*Template*) erstellt. Erst diese *copy* DNA (cDNA) kann in der Polymerase Kettenreaktion von der DNA-*Polymerase* vervielfältigt werden. Darüber hinaus ist die cDNA als Molekül weitaus stabiler als RNA und kann somit sicherer und länger gelagert werden. Durch ihr spezifisches Ende aus vielen Adenin-Basen (Poly-A-Sequenz) lässt sich die mRNA im Gegensatz zu anderen RNA-Formen selektiv durch Verwendung eines Oligonukleotids (Primer) aus Thymidin-Basen (Oligo-dT) vermehren. Dieser lagert sich aufgrund der spezifischen Basenpaarungen an diese Poly-A-Sequenz an. Hier kann die Reverse Transkriptase ansetzen, um den DNA-Strang komplementär zu vervollständigen. Zur Synthese von 30 µl cDNA aus mRNA wurde folgendermaßen vorgegangen:

Das errechnete Volumen der Probe für 1 µg Gesamt-RNA wurde entsprechend mit DMDC-H₂O auf 15,7 µl in einem Reaktionsgefäß verdünnt und anschließend für 3 Minuten bei 75°C inkubiert.

Anschließend wurde die in Tab. 2.1 aufgeführte Mischung an Reagenzien hinzu pipettiert.

Diese Gesamtmischung von nun 30 µl wurde in einem Thermocycler (DNA Thermal Cycler 480, Perkin-Elmer, Norwalk, USA) für 60 Minuten bei 37°C zur cDNA-Synthese inkubiert, anschließend für 10 Minuten bei 95°C zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase. Die vorliegende cDNA konnte wiederum bei -80°C gelagert werden.

Tab. 2.1: Reagenzien zur cDNA-Synthese

Reagenz	Hersteller	Menge
45 µM Oligo p(dT) ₁₅ -Primer	Roche, Mannheim	1,0 µl
5 x First-strand-buffer	Invitrogen, Karlsruhe	6,0 µl
0,1 M DTT	Invitrogen, Karlsruhe	3,0 µl
dNTP-Mix (jew. 10mM)	Eppendorf, Köln	1,5 µl
RNA ^{se} Inhibitor (40 U/µl)	Roche, Mannheim	0,8 µl
M-MLV-Reverse Transkriptase (200 U/µl)	Roche, Mannheim	2,0 µl
		14,3 µl

2.5.8 Entwicklung der Primer

Für die folgende Vermehrung desjenigen cDNA-Abschnittes in der Polymerase Kettenreaktion, der vorher als mRNA die Information für das gesuchte Protein kodiert hat, *Macrophage Colony Stimulating Factor* (MCSF), mußten eigens zwei Primer entworfen werden, die sich wie unter 2.5.7 beschrieben an einen spezifischen Abschnitt der für MCSF kodierenden DNA anlagern können. Während der eine Primer sich an die spezifische komplementäre Basensequenz des einen DNA-Stranges anlagert, heftet sich der andere in 5'-3'-Richtung weiter stromabwärts an die des Komplementärstranges.

Die mRNA-Sequenz von MCSF bei der Maus wurde bereits 1988 beschrieben (Ladner et al., 1988). Es handelt sich um einen Abschnitt von 3922 Basenpaaren (bp). Diese Basenabfolge als komplementäre DNA wurde in ein Internet-basiertes Computerprogramm (Primer3, Whitehead Institute for Biomedical Research-Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, USA; http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi) zur Analyse und Ermittlung der am besten geeigneten Primersequenzen eingegeben. Sie sind in Tab. 2.2 aufgeführt. Die Produktlänge, die sich aus der Entfernung der Primerregionen zueinander ergibt, betrug 236 bp. 0,01 µM der jeweiligen Primersequenzen wurden in größtmöglicher Reinheit hergestellt (MWG-Biotech, Ebersberg).

Zusätzlich wurde als interner Standard die Aktivität von β -Actin untersucht (s.u.). Die entsprechenden Primer (Alonso et al., 1986) sind in Tab. 2.3 charakterisiert. Die gesamte mRNA hat eine Länge von 1109 bp, das Produkt eine Länge von 366 bp.

Tab. 2.2: Charakteristik der ermittelten MCSF-Primer

MCSF	Primersequenz	Position	Länge	T (° C)
Vorwärts	5'-GACCCTCGAGTCAACAGAGC-3'	936-955	20 bp	59,99
Rückwärts	5'-TGTCAGTCTCTGCCTGGATG-3'	1171-1152	20 bp	59,98

Tab. 2.3: Charakteristik der β -Actin-Primer

β -Actin	Primersequenz	Position	Länge	T (° C)
Vorwärts	5'GGACTCCTATGTGGGTGACGAGG-3'	72-94	23 bp	74
Rückwärts	5'-GGGAGAGCATAGCCCTCGTAGAT-3'	437-425	23 bp	72

2.5.9 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Durch Verwendung der spezifischen Primer als Anlagerungspunkt des Enzyms *Polymerase* kann nun in der Polymerase Kettenreaktion der ausgesuchte Abschnitt von 236 bzw. 366 bp exponentiell vervielfältigt (amplifiziert) werden, um dann durch Farbmarkierung und Gelelektrophorese sichtbar zu werden.

Pro PCR-Zyklus erstellt die Polymerase eine Kopie von jedem markierten DNA-Strang, so dass bei anfänglich n cDNA Strängen nach z.B. 25 Zyklen theoretisch n^{24} Kopien vorliegen. In einem Reaktionsgefäß auf Eis wurden die in Tab. 2.4 aufgeführten Reagenzien als Mischung von 47 μ l vorgelegt.

Tab. 2.4 Verwendete Reagenzien für die PCR

Reagenz	Hersteller	Menge
10 x Puffer	Roche, Mannheim	5,0 μ l
Vorwärts-Primer	MWG-Biotech, Ebersberg	1,0 μ l
Rückwärts-Primer	MWG-Biotech, Ebersberg	1,0 μ l
dNTP-Mix (jew. 10mM)	Eppendorf, Köln	1,0 μ l
Taq DNA-Polymerase (5U/ μ l)	Roche, Mannheim	0,2 μ l
DMDC-H ₂ O		38,8 μ l
		47,0 μ l

Die Gesamtmenge von 50 μ l wurde, nach Pipettierung von 3 μ l cDNA zur Mischung und Überschichten mit 1-2 Tropfen Mineralöl zur Verhinderung von Evaporation und Kondensation im Reaktionsgefäß, in einen Thermocycler (Robocycler Gradient 40, Stratagene, Heidelberg) gegeben und nach Tab 2.5 amplifiziert. Nach Beenden der Amplifizierung wurde das Produkt bei 4°C gelagert.

Tab. 2.5: PCR-Temperaturprofile und Anzahl der PCR-Zyklen

Zyklusabschnitt	Zeitdauer	T (° C)	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	60 s	94	
Denaturierung	45 s	94	25 / 30
Annealing	45 s	59,0 (MCSF)	30
		64,0 (β -Actin)	25
Elongation	60 s	72	25 / 30
Ende	10 min	72	
Konservierung		4	

2.5.10 Gelelektrophorese der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden, wie unter 2.5.6 beschrieben, mittels Elektrophorese aufgetrennt. 5 μ l Produkt wurden mit 2 μ l Farbstoff (MBI-Fermentas) in die Gelschlitze gegeben. Zusätzlich wurde an den Anfang jeder Gelzeile 1 μ l eines Molekulargewichts-Standards (GeneRuler, MBI-Fermentas), der alle 100 bp zwischen 100 und 1000 bp eine Bande ergibt, zur Ermittlung der Produktgrößen mit aufgetragen. Für die semiquantitative Auswertung wurden die Produkte von MCSF und β -Actin einer jeden Probe gleichzeitig auf dem Gel ausgewertet. Visualisierung und Archivierung erfolgte ebenfalls wie unter 2.5.6 erläutert.

2.5.11 Ausschluss von potentiellen Fehlerquellen

Entsprechend der großen Anzahl der Schritte vom Tierexperiment zum eigentlichen Ergebnis der RT-PCR bietet diese Methode eine Vielzahl von Fehlermöglichkeiten. Durch sorgfältiges Arbeiten lassen sich die meisten minimieren, jedoch nie ganz ausschließen. Es wurden daher mehrere Kontrollen zu verschiedenen Zeitpunkten des Arbeitsablaufes eingeführt.

β-Actin als Kontrolle

Ein geringerer Reinheitsgrad der isolierten RNA oder eine geringere Zellzahl der Gewebeprobe führt zur Verringerung der eingesetzten RNA-Menge, was sich in einer geringeren Intensität der PCR-Produkt-Banden äußert. Daher wurde neben der Amplifikation von MCSF auch eine PCR von β-Actin durchgeführt. β-Actin ist in eukaryotischen Zellen ein Protein des Zytoskeletts, dessen konstitutive Expressierung durch externe Einflüsse nicht verändert wird (*housekeeping gene*). Eine schwache Zytokin-Bande muss relativiert werden, wenn deren zugehörige β-Actin-Bande ebenfalls schwach ist - oder umgekehrt.

Negativkontrolle

Pro Versuch wurde bei der PCR ein Reaktionsgefäß randomisiert - anstatt mit cDNA - mit RNA befüllt. Bei Verunreinigungen mit DNA in den isolierten RNA-Proben könnte die PCR u.U. ein unspezifisches Produkt ergeben. Diese Probe durfte kein MCSF- oder β-Actin-Produkt als Bande im Gel zeigen.

Positivkontrolle

Als Positivkontrolle für die Funktion des entwickelten MCSF-Primers diente Milzgewebe zweier mit Lipopolysaccharid (LPS, Endotoxin) behandelte männlicher C57/BL6 Mäuse. 2 Stunden nach intraperitonealer Injektion von 5 µg LPS in 0,2 ml Kochsalzlösung wurden die Tiere mit Halothan, Lachgas und Sauerstoff narkotisiert und die Milz nach Oberbauchquerschnitt, Eröffnen des Diaphragmas und Entbluten durch Abschneiden der Herzspitze, entnommen. Aus dem Milzgewebe dieser behandelten Mäuse, sowie dem einer unbehandelten C57/BL6 Maus wurde wie bereits beschrieben die RNA gewonnen, daraus cDNA hergestellt und mit dem MCSF-Primer amplifiziert.

Mehrfachversuche

Es wurden jeweils 6 Experimente pro Versuchsgruppe durchgeführt, um die Produkte der einzelnen Proben mitteln und Abweichungen erkennen zu können.

2.5.12 Semiquantitative RT-PCR

Um die Banden der unterschiedlichen Proben quantitativ miteinander vergleichen zu können, wurden die digitalen Bilder der einzelnen Gele im Computer mit Hilfe einer Software weiter analysiert (BioCapt 7.0, Vilber-Lourmet, Marne, Frankreich). Dabei konnte den einzelnen Banden unter Berücksichtigung der Belichtung ein Dichtewert zugeordnet werden (Densitometrie, Abb. 2.6). Um Werte (V) unabhängig von der schwankenden Güte der RNA-Präparation und cDNA-Synthese zu erhalten, wurde das Verhältnis des Dichtewerts der MCSF-Bande (V_{MCSF}) zum

Dichtewert der entsprechenden β -Actin-Bande ($V_{\beta\text{-Actin}}$) gebildet (Formel 2.5). Proben mit schlechter RNA-Ausbeute oder verminderter cDNA-Synthese und entsprechend schwachen MCSF-Banden, aber auch schwachen β -Actin-Banden, blieben somit einerseits vergleichbar mit Proben besserer Ausbeute, andererseits konnten nun auch Proben miteinander verglichen werden, die nicht auf demselben Gel visualisiert wurden.

$$V = \frac{V_{MCSF}}{V_{\beta\text{-Actin}}} \quad (2.5)$$

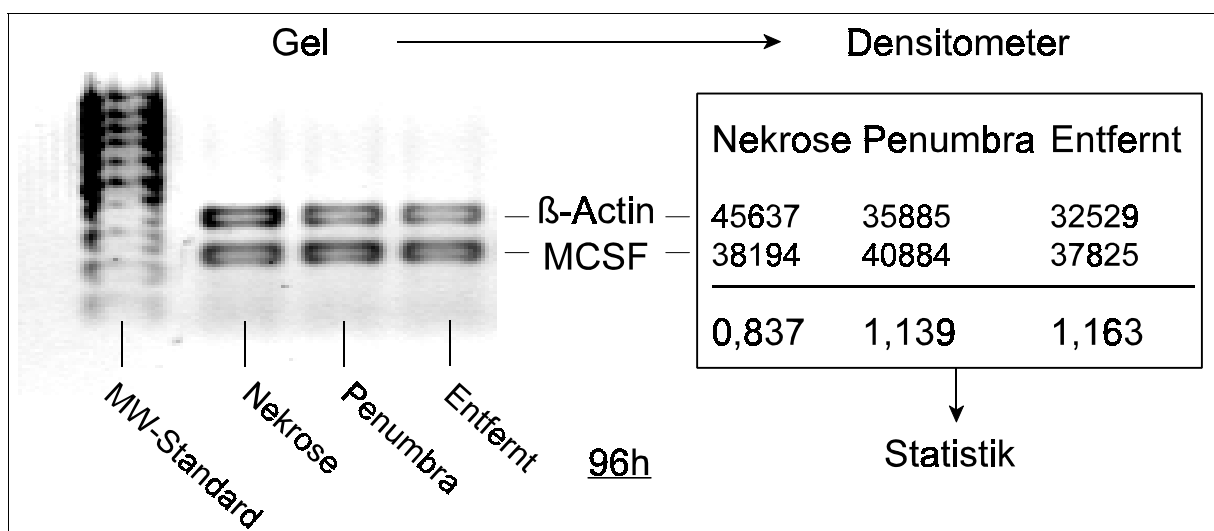


Abb. 2.6: Verfahren der Densitometrie am Beispiel dreier Proben (Nekrose, Penumbra, Entfernt) 96 Std. nach Trauma. Den einzelnen Banden auf dem Gel werden Dichtewerte zugeordnet. Aus dem Verhältnis der Dichtewerte von MCSF-Produkt und dem internen Standard β -Actin konnte eine semiquantitative Erfassung und Statistik erfolgen.

2.6 Versuchsgruppen

2.6.1 Anästhesie

Um festzustellen, ob unter der gewählten Anästhesie physiologische Kreislaufverhältnisse bei den Versuchstieren vorliegen, wurde eine eigene Versuchsgruppe von 8 Tieren gebildet, bei der über einen Zeitraum von 3 Stunden der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) und die arteriellen Blutgase kontrolliert wurden. Der MAP wurde bereits nach Präparation des Karotiskatheters 30 Minuten nach Einleitung aufgezeichnet. 60 Minuten nach Einleitung konnte der Blutdruck sowohl in der Arteria carotis als auch in der Schwanzarterie gemessen werden. Hierbei sollten die Messungen in der Schwanzarterie mit den "Goldstandard"-Werten des Karotiszugangs korreliert werden, um diese Möglichkeit der Blutdruckmessung zu validieren. Ebenfalls ab 60 Minuten wurden bis 180

Minuten nach Einleitung 4 Blutgasproben pro Versuchstier zu den orientierenden Zeitpunkten 75, 105, 135 und 165 Minuten entnommen, wobei die jeweiligen Einzelmessungen bis zu 15 Minuten von diesen abweichen durften. Analysiert wurden der Sauerstoffpartialdruck (pO_2), der Kohlendioxidpartialdruck (pCO_2), sowie der pH. Um den Einfluß von Manipulationen auf diese Parameter zu untersuchen, wurden die Tiere nach 130 Minuten im stereotaktischen Rahmen fixiert und nach 160 Minuten - nach Trepanation - mittels fokaler Kälteläsion traumatisiert. Jeweils 5 Minuten später standen die festgelegten Blutgasabnahmen an (Abb. 2.7). In allen weiteren Versuchsgruppen wurde auf die Anlage von Kathetern verzichtet und nach Einleitung der Narkose und Fixation im stereotaktischen Rahmen direkt mit der Präparation und Applikation der Kälteläsion fortgefahren (Abb. 2.8).

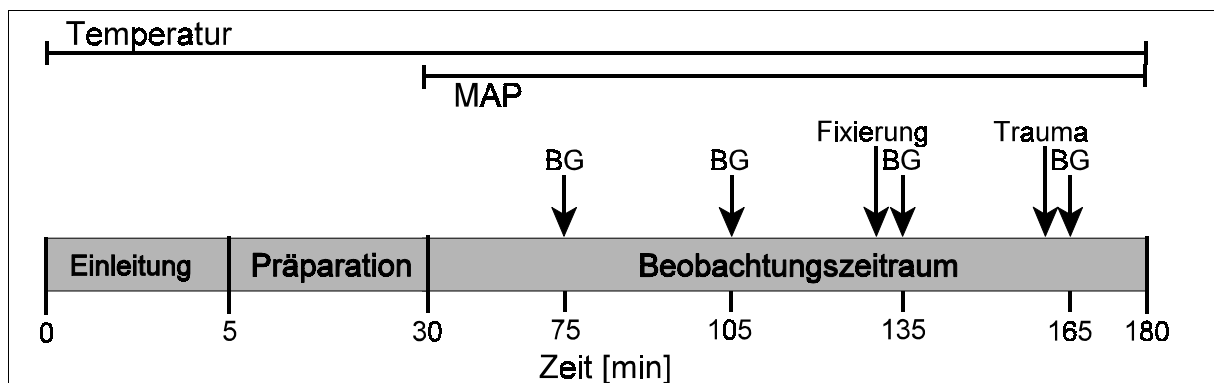


Abb. 2.7: Versuchsablauf in der Anästhesie-Versuchsgruppe. Nach Einleitung der Narkose und Präparation der arteriellen Zugänge wurde ab 30 Minuten der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) in der Arteria carotis communis gemessen. Zu den Zeitpunkten 75, 105, 135 und 165 Minuten wurden arterielle Blutgasproben (BG) entnommen. Jeweils 5 Minuten vor den beiden letzten Entnahmen wurden die Tiere stereotaktisch fixiert sowie das Trauma appliziert.

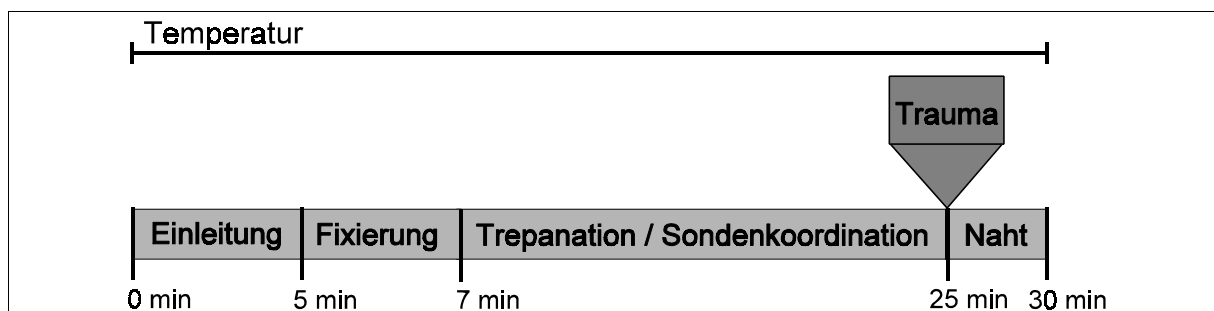


Abb. 2.8: Versuchsablauf in allen anderen Versuchsgruppen. Nach Einleitung der Narkose wurde sofort mit der stereotaktischen Fixierung des Kopfes sowie der Präparation in Vorbereitung zur Applikation der Nekrose fortgefahren. Nach Koordination der Kältesonde wurde diese abgekühlt und das Trauma anschließend induziert. Nach Naht der Kopfhaut konnte die Narkose 30 Minuten nach Einleitung beendet werden.

2.6.2 Traumaparameter

Grundsätzlich lässt sich das Ausmaß der Primärläsion durch zwei Parameter steuern: Den Durchmesser der Sonde, die mit dem Kortex in Berührung kommt und die Zeitdauer, für die diese Sonde auf den Kortex aufgesetzt wird. Der Durchmesser wurde, aufgrund der Erfahrungen im Rattenmodell übertragen auf die Größe des Mausgehirns, mit 1,5 mm festgelegt. Für die Ermittlung der optimalen Zeitdauer wurden zwei Versuchsgruppen mit 4 Sekunden (n=6) und 6 Sekunden (n=7) Kontaktdauer gebildet.

2.6.2 Nekrosewachstum Akut bis 24 Stunden

Zur Quantifizierung des Nekrosewachstums durch Auswertung der maximalen Nekrosefläche und des Nekrosevolumens nach 24 Stunden, wurden eine Versuchsgruppe akut (i.e. 5 min, n=8) und eine mit 24 Stunden (n=9) Überlebenszeit nach fokaler Kälteläsion miteinander verglichen. Die Versuchstiere wurden nach Applikation der Läsion den Versuchsgruppen randomisiert zugeteilt und die entsprechende Histologie blind ausgewertet.

2.6.3 Nekrosewachstum Akut bis 168 Stunden

Zur weiteren Charakterisierung der Dynamik der Nekroseexpansion auch über diesen Zeitraum hinaus, wurden weitere Gruppen gebildet. Hier wurden von Akut nach Trauma (n=11) über 4 (n=7), 12 (n=8), 24 (n=8), 48 (n=9), 96 (n=11) bis zu 168 Stunden (n=14) nach Trauma maximale Nekrosefläche und Nekrosevolumen untersucht. Randomisierung und Auswertung erfolgten wie unter 2.6.2.

2.6.4 MCSF - RT-PCR

Für die Ermittlung der MCSF-Expression im zeitlichen Verlauf nach Trauma, wurden zu vier Zeitpunkten nach fokaler Kälteläsion Gewebeproben entnommen. Die Tiere wurden nach Tab. 2.6 den verschiedenen Versuchsgruppen nach Trepanation randomisiert zugeteilt. Zusätzlich wurde zum jeweiligen Zeitpunkt auch eine Sham-operierte Gruppe angelegt.

Tab. 2.6 Versuchsgruppen für MCSF - RT-PCR

Überlebenszeit	Gruppe	Anzahl
8 Stunden	Versuch	n=6
	Sham	n=3
24 Stunden	Versuch	n=6
	Sham	n=3
96 Stunden	Versuch	n=6
	Sham	n=3
168 Stunden	Versuch	n=6
	Sham	n=3

2.7 Statistik

Für die statistische Prüfung der Ergebnisse wurde eine Varianzanalyse für unverbundene Stichproben durchgeführt. Die Nullhypothese wurde mit einer Wahrscheinlichkeit unter 5% verworfen. Der Vergleich mehrerer unabhängiger Stichproben bei angenommener Nichtnormalität der Stichprobenverteilung erfolgte nach Kruskal-Wallis (Theodorsson, 1986), anschließend erfolgte die Anwendung des U-Tests nach Mann-Whitney. Für die Korrelation wurde der Test nach Pearson verwendet. Soweit nicht abweichend vermerkt, sind in Text und Abbildungen stets der Mittelwert \pm Standardfehler des arithmetischen Mittels (SEM) der Stichproben dargestellt. Die Durchführung der statistischen Tests erfolgte mit Hilfe eines Computerprogramms (Sigma Stat 2.0, SPSS Science, Chicago, USA) auf einem IBM AT kompatiblen Rechner.

3 Ergebnisse

3.1 Kreislaufverhältnisse der Versuchstiere unter Anästhesie

3.1.1 Blutdruck

Abb. 3.1 zeigt bei der Anästhesie-Versuchsgruppe den in der Arteria carotis alle 5 Minuten gemessenen MAP im Verlauf der Zeit. Er befand sich vom Beginn der Messungen, 30 Minuten nach Einleitung, bis zum Ende des Beobachtungszeitraums nach 180 Minuten im Bereich von $79 \pm 10,6$ mmHg, ohne signifikante Abweichungen. Eine statistisch signifikante Beeinflussung des MAP durch Einbringung des Kopfes in den stereotaktischen Rahmen nach 130 Minuten oder die Induktion des Traumas nach 160 Minuten ergab sich ebenfalls nicht.

Die ab 60 Minuten nach Einleitung gemessenen MAP-Werte in der Schwanzarterie wurden mit den zeitgleich gemessenen Werten in der Arteria carotis verglichen. Abb. 3.2 zeigt eine Einzelpunkt-Korrelation dieser Werte bei 4 Tieren. Die statistische Auswertung ergab einen Korrelationskoeffizienten von unter 0,5 ($r=0,443$) und Signifikanz ($p<0,001$). Auffällig ist eine systematische Verschiebung der gemessenen Blutdruckwerte in der Schwanzarterie. Die Regressionsgerade wurde mit $y=0,658x + 15,935$ angegeben. Dies bedeutet, dass die in der Schwanzarterie gemessenen Werte durchschnittlich um 15,9 mmHg niedriger lagen als die entsprechenden Werte in der Arteria carotis. Die tatsächliche Schwankungsbreite im Einzeltier aber reichte von -40 bis +15 mmHg gegenüber dem in der Karotis gemessenen Wert.

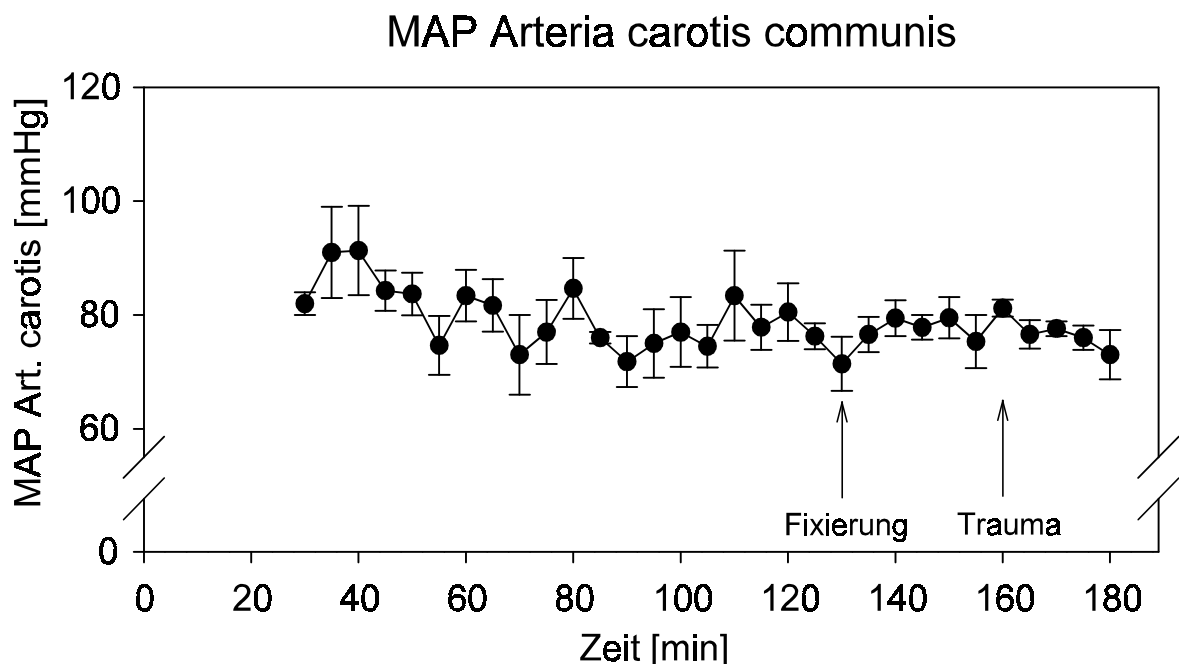


Abb. 3.1: Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) im Verlauf der Zeit

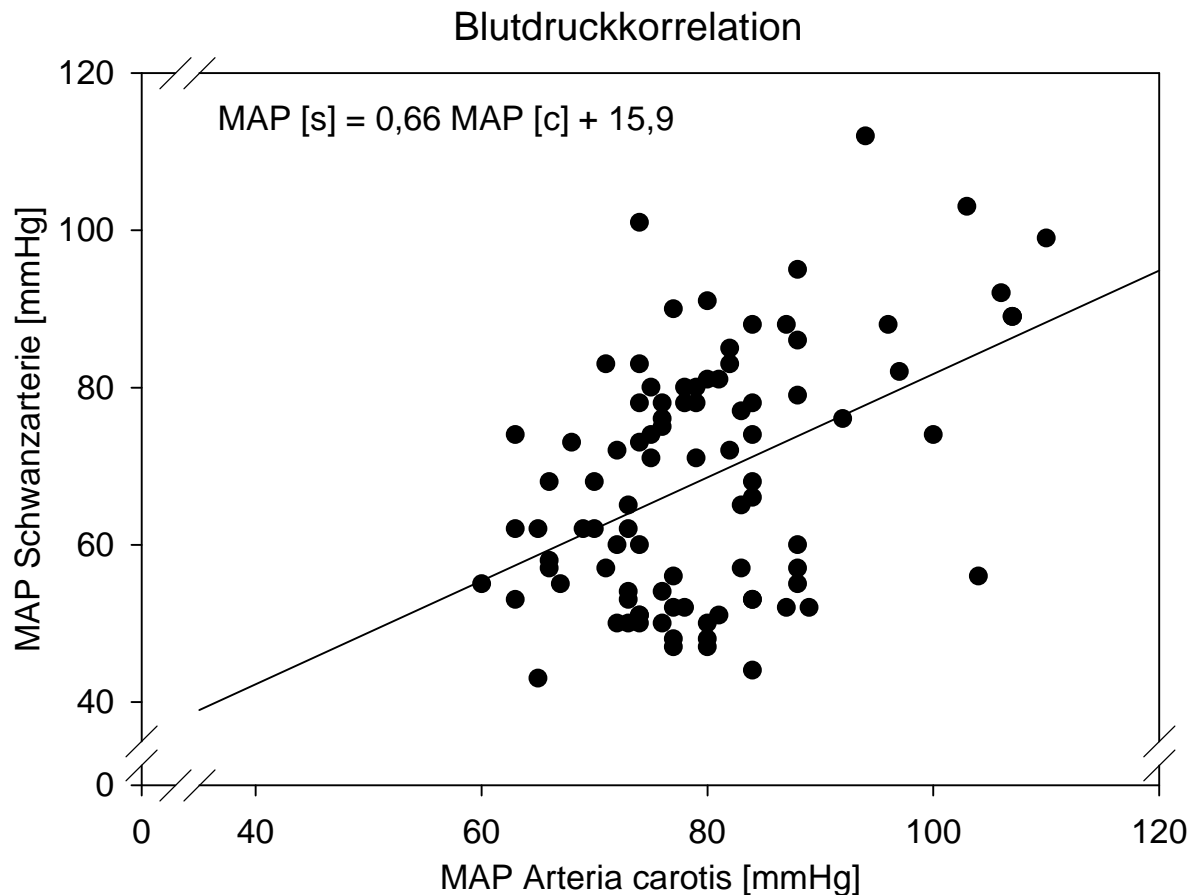


Abb. 3.2: Einzelpunktkorrelation der gemessenen Blutdruckwerte von Arteria carotis communis und Schwanzarterie. Der Korrelationskoeffizient lag bei 0,443. Die in der Schwanzarterie gemessenen Werte lagen im Schnitt 15,9 mmHg unter den Standardwerten der Arteria carotis.

3.1.2 Blutgase

Der arterielle Sauerstoffpartialdruck (pO_2) ist in Abb. 3.3 im Verlauf der Zeit aufgetragen. 75 Minuten nach Einleitung der Narkose mit dem Gasmisch lag er bei $157 \pm 3,6$ mmHg und fiel dann im Laufe der Zeit über $143 \pm 9,6$ mmHg nach 105 Minuten auf $127 \pm 9,3$ mmHg nach 135 Minuten ab. Zum Zeitpunkt 165 Minuten befand er sich bei $136 \pm 7,2$ mmHg.

Der Kohlendioxidpartialdruck (pCO_2) lag zu denselben Zeitpunkten bei $44,0 \pm 1,8$ mmHg, $43,0 \pm 1,6$ mmHg, $48,7 \pm 2,3$ mmHg und $48,1 \pm 3,3$ mmHg (Abb. 3.4). Dieser Anstieg des pCO_2 im Verlauf der Zeit war nicht signifikant.

Dementsprechend befand sich der pH bei $7,25 \pm 0,02$ nach 75 Minuten, $7,24 \pm 0,02$ nach 105 Minuten, $7,20 \pm 0,03$ nach 135 Minuten und $7,20 \pm 0,02$ nach 165 Minuten (Abb. 3.5), erklärbar durch die zunehmende respiratorische Azidose bei Hypoventilation der spontan atmenden Versuchstiere. Die Atemfrequenz betrug 160-180/min. Auch dieser Abfall des pH im Verlauf der Zeit erreichte kein Signifikanzniveau. Weder die Fixierung im stereotaktischen Rahmen noch die Induktion des Traumas führten damit zu einer signifikanten Veränderung der Werte.

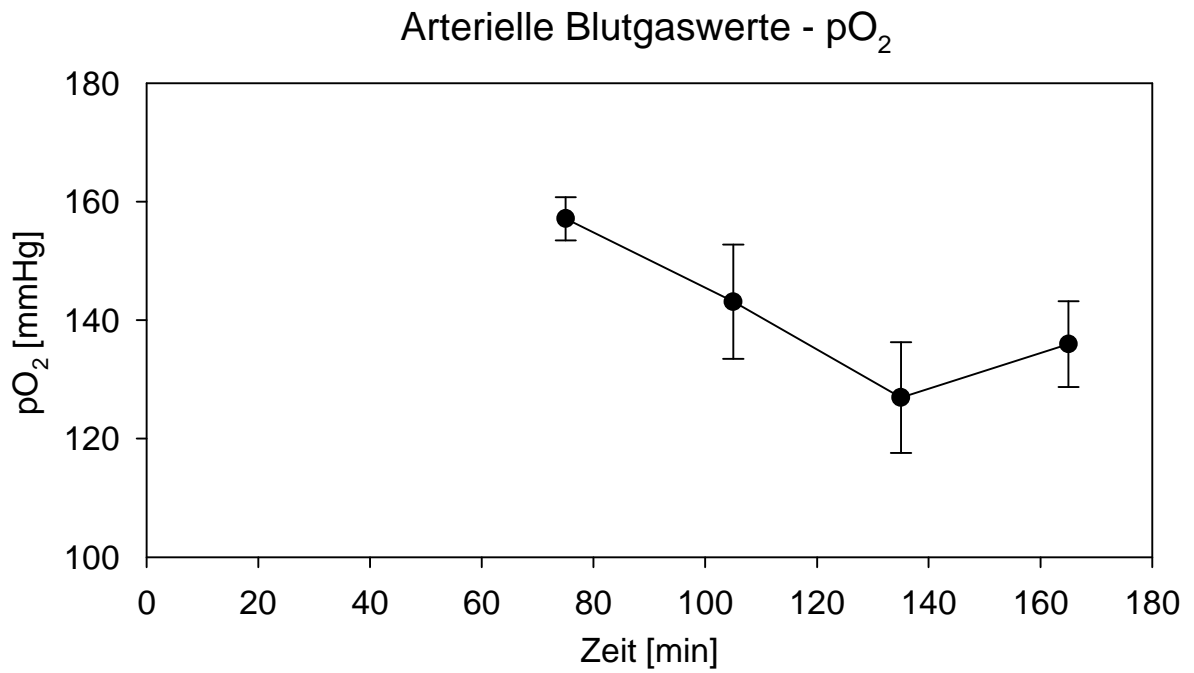


Abb. 3.3: Im arteriellen Blut gemessener Sauerstoffpartialdruck (pO₂, Art. carotis) der Anästhesie-Versuchsgruppe im Verlauf der Zeit.

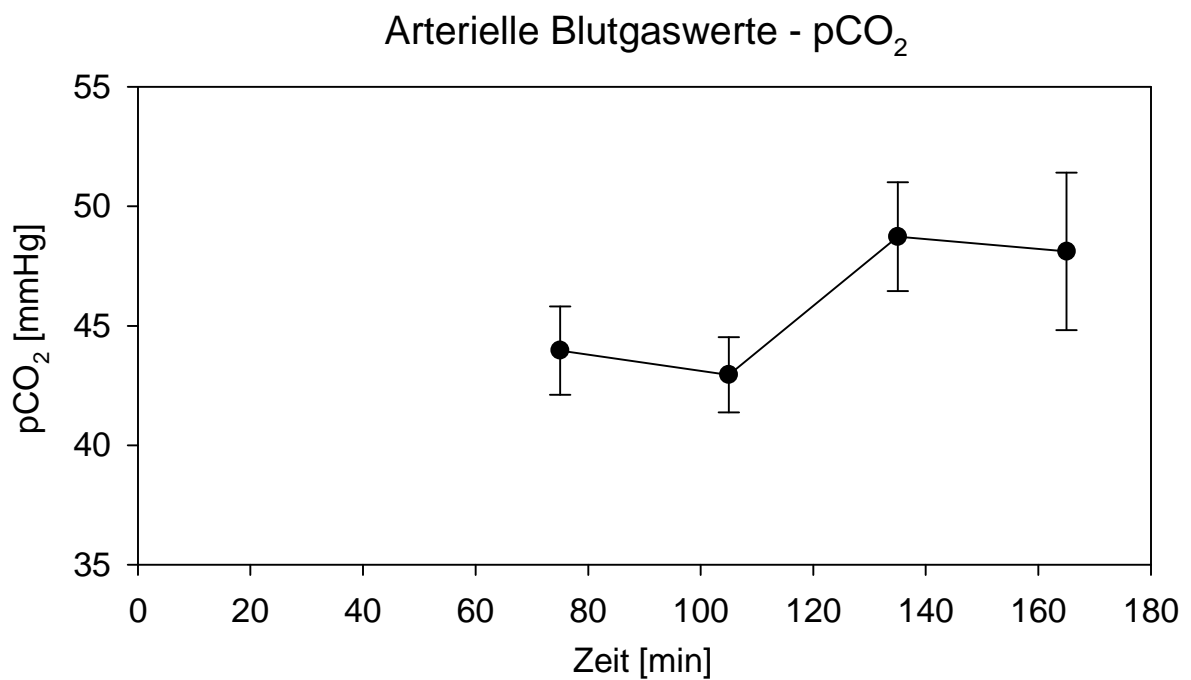


Abb. 3.4: Im arteriellen Blut gemessener Kohlendioxidpartialdruck (pCO₂, Art. carotis) der Anästhesie-Versuchsgruppe im Verlauf der Zeit.

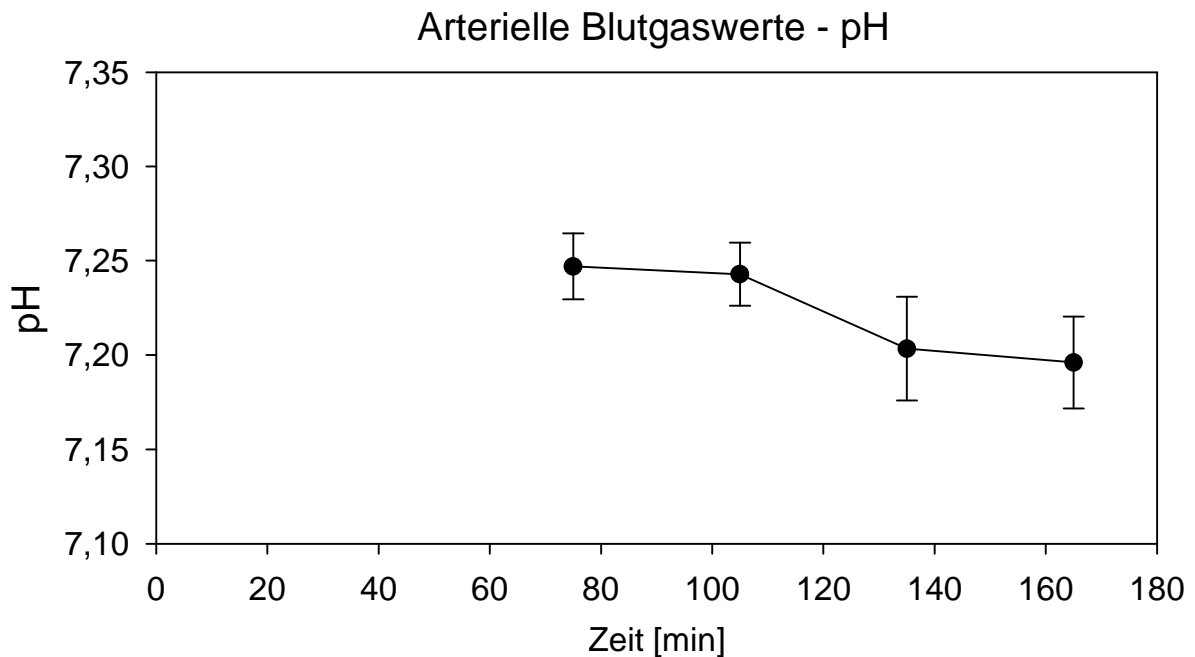


Abb. 3.5: Im arteriellen Blut gemessener pH (Art. carotis) im Verlauf der Zeit.

3.2 Auswirkungen der fokalen Kälteläsion

In diesen Untersuchungen wurde eine fokale Kälteläsion der Hirnrinde mit einer Metallsonde (1,5 mm \varnothing) und verschiedenen Kontaktzeiten (4 und 6 Sekunden) erzeugt, wobei im Verlauf ein Standard (1,5 mm \varnothing , 4 s) entwickelt wurde, der für die Untersuchungen zum Nekrosewachstum und zur MCSF-Expression verwendet wurde. Die Tiere hatten bereits 30 Minuten nach Aufwachen aus der Narkose und Lagerung in warmer Umgebung wieder ein normales Schlaf-, Such- und Freßverhalten ohne erkennbare neurologische Defizite.

3.2.1 Makroskopische Veränderungen des Gehirns

Die Standardläsion führte zu folgenden Veränderungen:

Es kam 5 Minuten nach Trauma zu einer diskreten runden Nekrose der Hirnrinde, ohne dass nennenswerte Hämorrhagien makroskopisch erkennbar waren. Das Nekroseareal hatte einen Durchmesser von etwa 2,0 mm.

3.2.2 Histologische Befunde

Kontralaterale, unverletzte Hemisphäre

Die Neuronen der Kontrollhemisphäre zeigen eine für die NISSL-Färbung typische Morphologie: einen runden, mittelständigen, zart gefärbten Kern mit dunklem, zentralen Nucleolus umgeben von einem schmalen, dunklen Zytoplasmasaum mit kräftig gefärbten NISSL-Schollen. Das Neuropil ist hell und homogen. Die Gefäßlumina sind leer, Erythrozyten oder Leukozyten sind nicht

nachzuweisen (Abb. 3.6).

Traumahemisphäre

Die hier gefundenen histopathologischen Veränderungen im traumatisierten Parenchym entsprechen früheren Beobachtungen (Clasen et al., 1953; Balthasar, 1957; Klatzo et al., 1958). Die Kälteläsion resultiert in einer scharf umschriebenen Gewebsnekrose mit Chromatinverklumpungen in den Neuronen, Kernpyknosen der Gliazellen und diskreter Extravasation von Erythrozyten. Das Neuropil im nekrotischen Fokus erscheint spongiös aufgelockert, im perifokalen Gewebe dagegen unverändert (Abb.3.7). Häufig können im Bereich des nekrotischen Fokus durch die Präparation und histologische Verarbeitung ausgeprägte Substanzdefekte festgestellt werden. Bereits vier Stunden nach Trauma kommt es zu Karyorrhesis der Neurone im primär nekrotischen Areal. Um Blutgefäße erkennt man Exsudation von Ödemflüssigkeit und neutrophile Granulozyten (Abb. 3.8). Die Exsudation nimmt zu und erreicht 24 Stunden nach Trauma die größte Ausdehnung. Viele Zellen im Nekroserandbereich haben einen perinukleären Hof. Nach 12 Stunden ist die Zelldichte im Fokus bereits deutlich reduziert, als Residuen, deren Zellkerne sich nicht mehr anfärben lassen werden *Ghost cells* erkennbar (Abb. 3.9). Die Gefäße sind dilatiert. Diese pathologischen Veränderungen setzen sich im Zeitverlauf fort. 24 Stunden nach Läsion ist nur noch im Randbereich des fokalen Nekroseareals Zelldebris zu erkennen. Das perifokale Parenchym insbesondere zwischen Läsion und Balken ist etwas ödematös verändert, das Neuropil spongiös (Abb. 3.10). 168 Stunden nach Läsion lassen sich im nun zusammengezogenen und verdichteten Nekroseareal deutliche Leukozytenansammlungen feststellen (Abb 3.11).

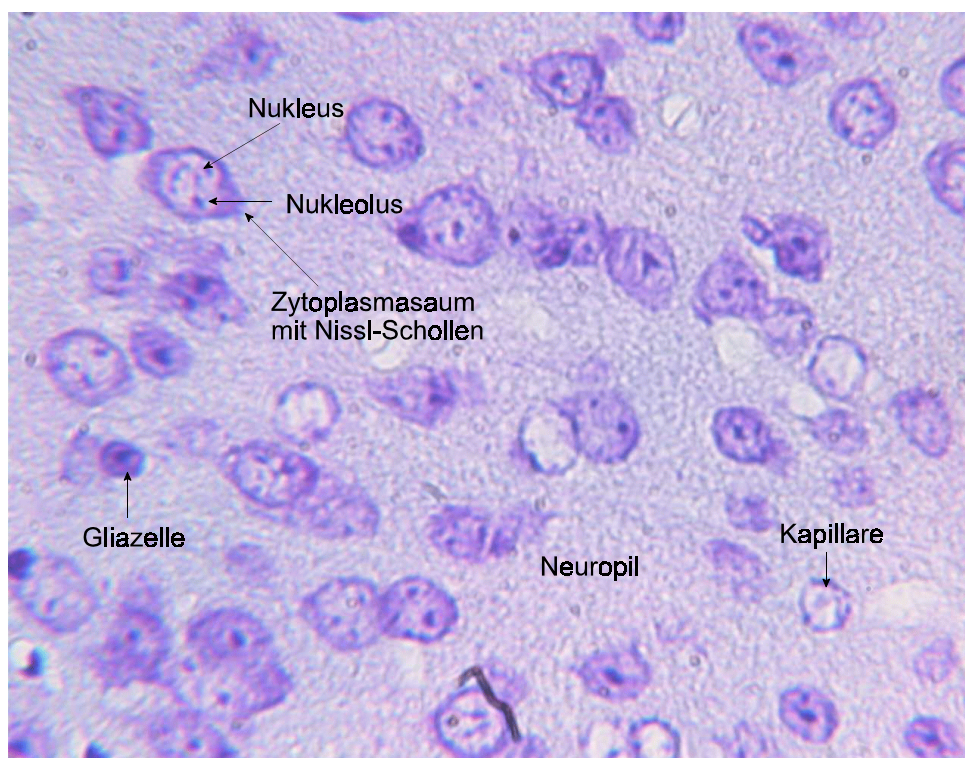


Abb. 3.6: Histologisches Präparat der Kontrollhemisphäre eines Akuttiers mit Normalbefund (400 x).

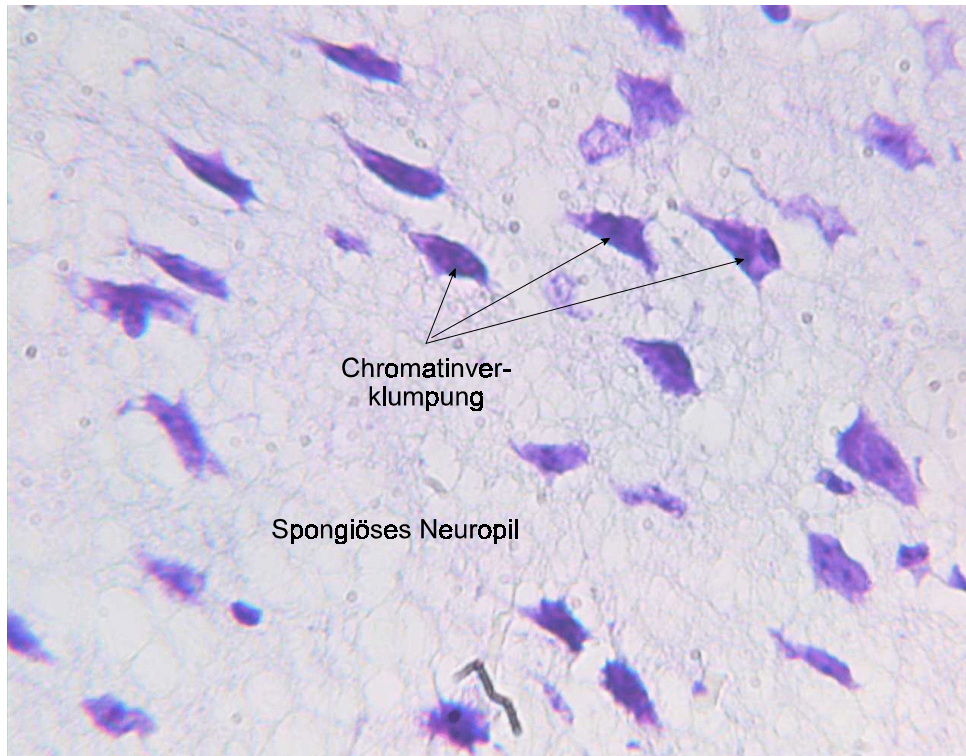


Abb. 3.7: Histologisches Präparat des Nekroseareals 5 Minuten nach Trauma (400 x).

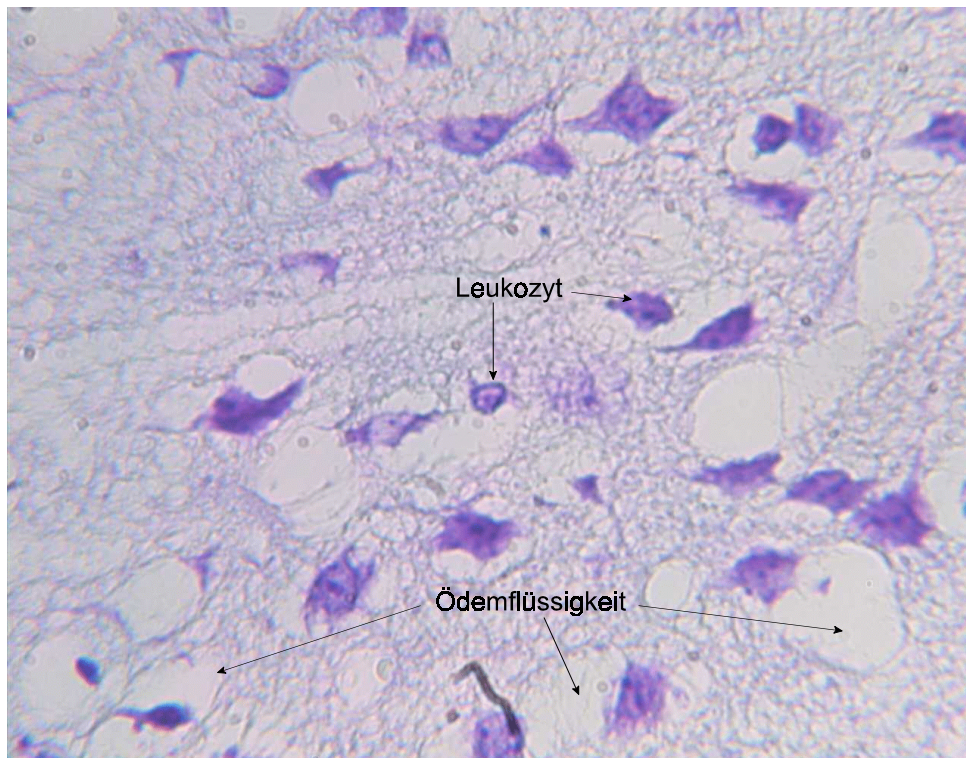


Abb. 3.8: Histologie eines Nekroseareals von einem Versuchstier mit 4 Std. Überlebenszeit (400 x). Weitere Erläuterungen im Text.

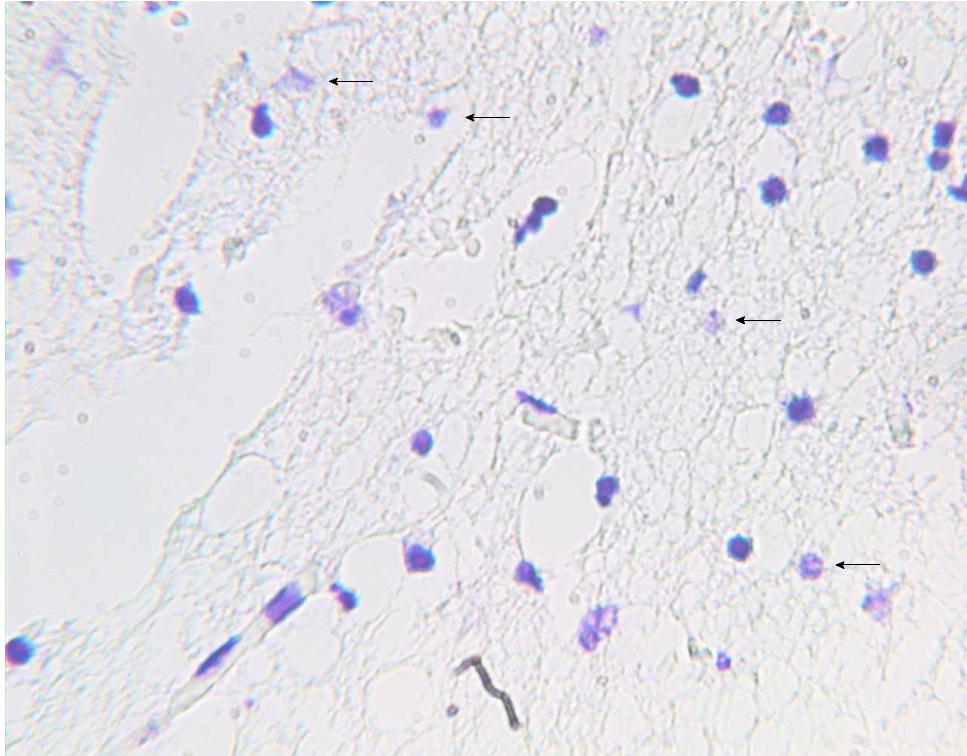


Abb. 3.9: Histologie des Nekroseareals von einem Versuchstier mit 12 Std. Überlebenszeit nach Trauma (400 x). Die Reduktion der Nervenzellzahl ist deutlich erkennbar, "Ghost cells" sind zu sehen (-).

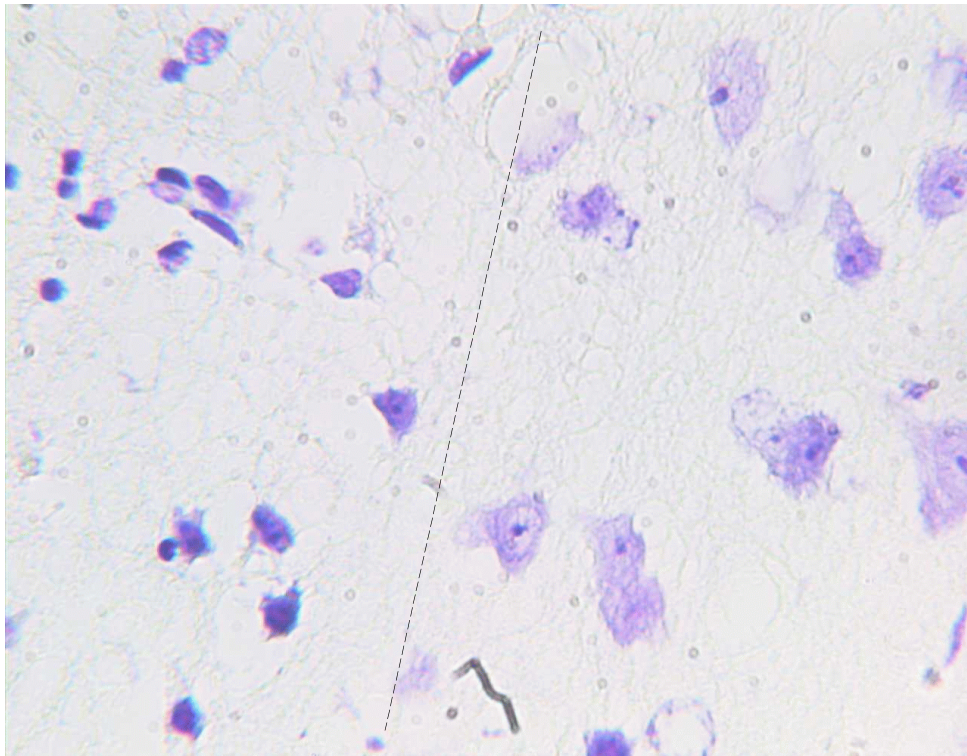


Abb. 3.10: Nekroserandbereich des selben Präparats (siehe Abb.3.9). Hier ist das perifokale Parenchym ödematös verändert, das Neuropil ist spongios. Die Linie markiert die Grenze zwischen nekrotischen und vitalen Neuronen (siehe 2.4.1).

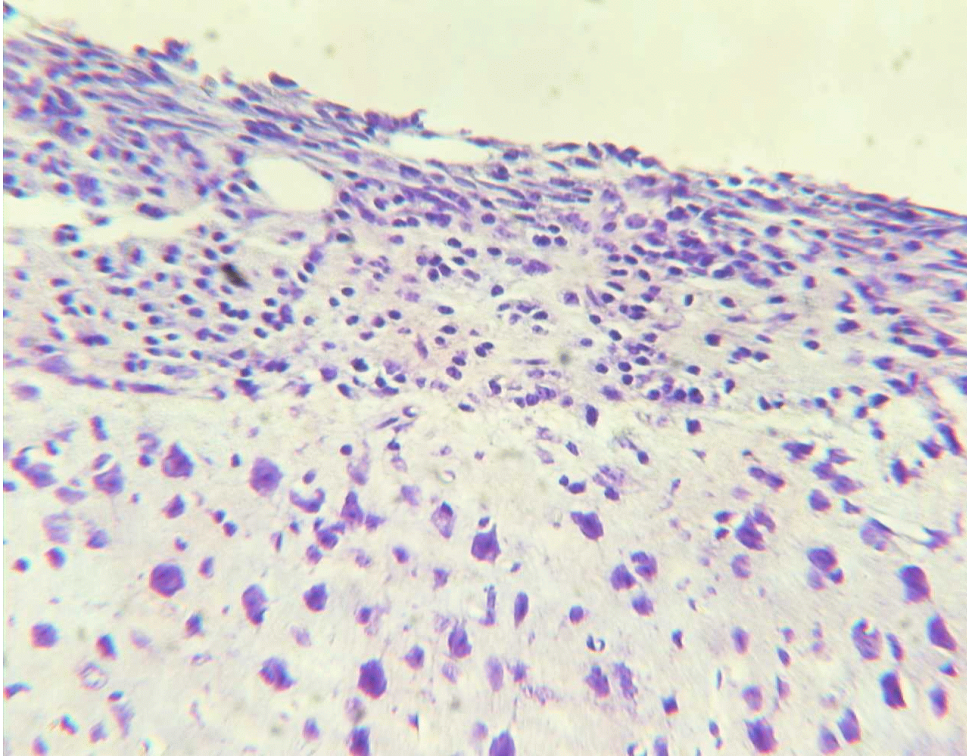


Abb. 3.11: Histologisches Präparat des Nekroseareals 168 Stunden nach Trauma (160 x). Eine deutliche Verdichtung des Gewebes mit ausgeprägter Leukozytose ist erkennbar. Die Abgrenzung zum erhaltenen, darunter angrenzenden Nervengewebe ist ersichtlich.

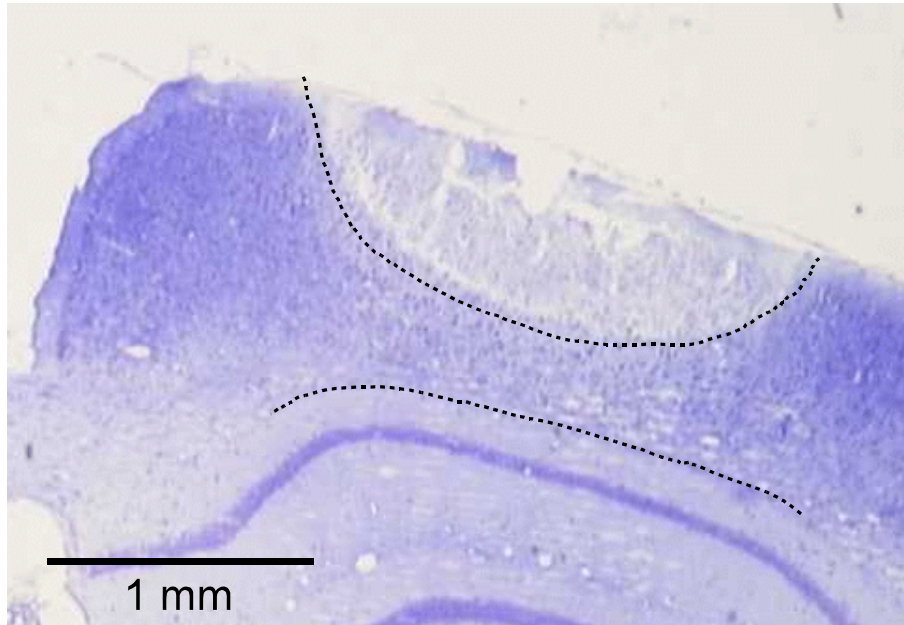


Abb. 3.12: Koronarer histologischer Schnitt durch die maximale Ausdehnung der Nekrose eines Versuchstieres, 5 Minuten nach Läsion mit 4 Sekunden Kontaktdauer von Sonde und Kortex. Der Rand der Nekrose sowie die Grenze von Kortex zu weißer Substanz (Corpus Callosum) sind als gepunktete Linien markiert. Substanzdefekte im Nekrosekern sind zu erkennen (siehe 2.4.1).

3.2.3 Abhängigkeit der Primärläsionsgröße von der Dauer der Kälteexposition

Zur Ermittlung der idealen Primärläsionsgröße im Kortex wurden in einer Gruppe 4 (n=6), in einer anderen 6 Sekunden (n=7) als Kontaktdauer der Sonde mit der Hirnoberfläche verwendet. Die Primärläsion sollte histologisch folgendermaßen charakterisiert sein: gut abgrenzbar gegenüber dem übrigen Gewebe, auf den Kortex beschränkt, mit ausreichend Raum für die sekundäre Expansion innerhalb des Kortex, sowohl vertikal (ein Drittel der Kortextiefe) als auch horizontal. Die Nekrosegrenze wurde mikroskopisch kontrolliert (siehe 2.4.1). Abb. 3.12 zeigt im histologischen Ausschnitt die Hirnrindennekrose eines Tieres 5 Minuten nach Läsion mit 4 Sekunden, Abb. 3.13 mit 6 Sekunden Kontaktdauer. Wie ersichtlich, erfüllte die 4-Sekunden-Läsion die geforderten Kriterien mit einer Tiefe der Nekrose von etwa 0,7 mm (bei 1 mm Kortexdicke), während die 6-Sekunden-Läsion primär schon so groß ausfiel, dass der Rand der Nekrose bereits an die weiße Substanz des Corpus Callosum heranreichte. Der geforderte Abstand von einem Drittel der Kortexdicke zwischen Nekrose- und Kortexrand konnte nicht eingehalten werden. Eine Begrenzung auf den Kortex bei zusätzlichem sekundärem Nekrosewachstum erschien hier unwahrscheinlich. Diese Ergebnisse konnten bei Vergleich der übrigen Versuche der beiden Gruppen (siehe 2.6.2) bestätigt werden. Aus diesem Grund wurde eine Zeit von 4 Sekunden als ideale Kontaktdauer der Sonde mit dem Kortex zur Induktion der Primärläsion als Standard definiert.

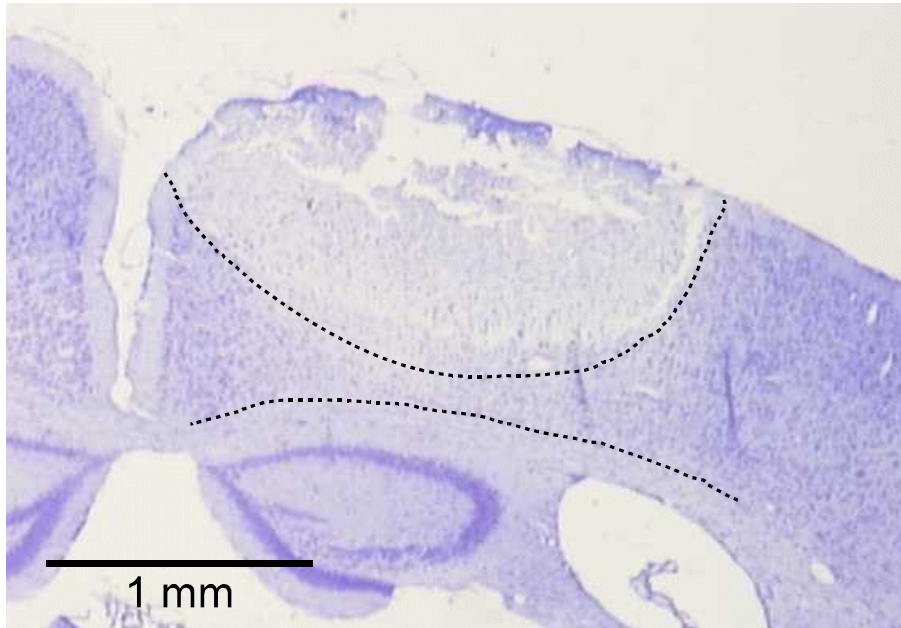


Abb. 3.13: Koronarer histologischer Schnitt durch die maximale Ausdehnung der Nekrose eines Versuchstieres 5 Minuten nach Läsion mit 6 Sekunden Kontaktdauer. Auch hier sind Nekroserand und Kortexgrenze markiert. Die Linie zur Abgrenzung der Nekrose wurde mikroskopisch kontrolliert, um Fehler durch Färbeartefakte zu vermeiden. Auch hier sind Substanzdefekte im Fokus der Nekrose erkennbar (siehe 2.4.1).

3.3 Wachstumskinetik der Hirnparenchymnekrose nach Läsion

3.3.1 Akut bis 24 Stunden nach Läsion

Abb. 3.14 zeigt einen histologischen Serienschnitt von einem Versuchstier 5 Minuten nach Trauma. Auch hier ist noch einmal deutlich zu erkennen, dass die Standardläsion zu einer gut abgrenzbaren, kompakten Nekrose führt, die ungehindert innerhalb des Kortex expandieren kann. Das übrige Hirnparenchym erscheint unauffällig.

Auch im weiteren Verlauf war die Nekrose - bei Beschränkung auf die graue Substanz - deutlich vom intakten kortikalen Parenchym abgrenzbar, in der Ausdehnung allerdings nun vergrößert. Dies zeigt ein Serienschnitt eines Tiers mit 24 Stunden Überlebenszeit (Abb. 3.15). Die perifokale Substanz unterhalb der Läsion erscheint etwas blasser als das entsprechende Areal der kontralateralen Hemisphäre, allerdings nicht vergrößert oder ödematös. Auch der Balken wirkt nicht verbreitert, was für ein nur gering vorhandenes Hirnödem in der weißen Substanz spricht.

Abb. 3.16 zeigt die Nekroseflächen der Tiere mit 5 Minuten und 24 Stunden Überlebenszeit nach Läsion. Die im Diagramm gezeigten Koordinaten orientieren sich an der geometrischen Mitte des Nekroseareals. Auf der Abszisse ist die Lage des histologischen Serienschnitts auf die Nekrosemitte bezogen angegeben. Bei -0,7 mm ist dieser Darstellung zufolge die am weitesten rostral gelegene Fläche wiedergegeben, bei +0,9 mm die am weitesten kaudal gelegene.

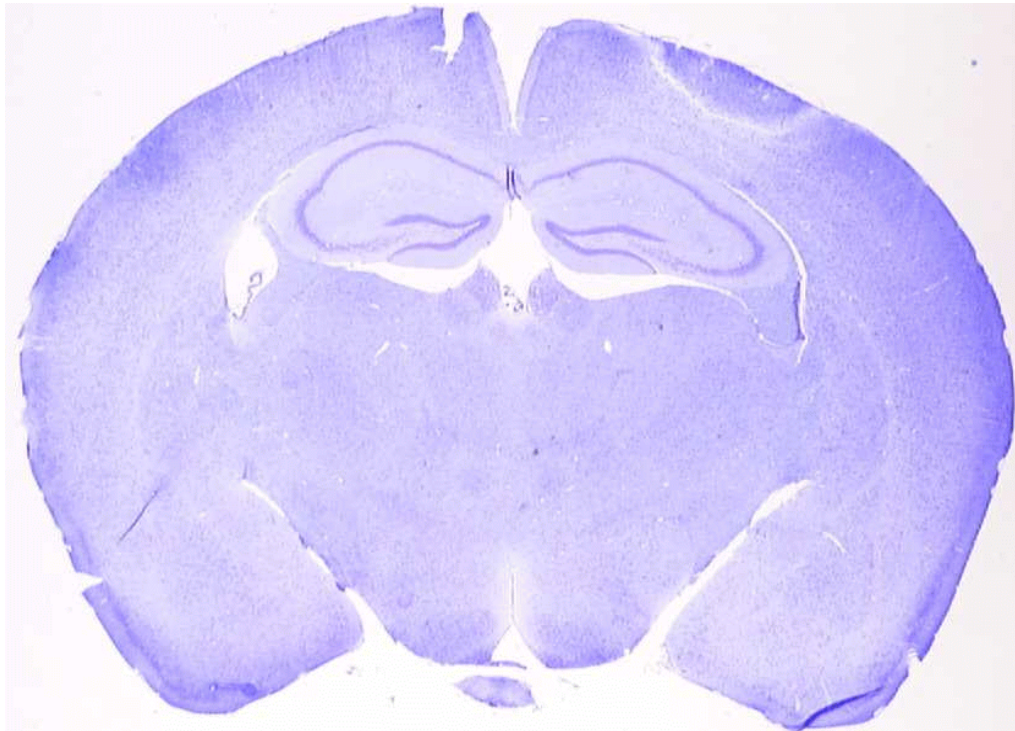


Abb. 3.14: Koronarschnitt durch die maximale Nekroseausdehnung 5 Minuten nach Standardläsion.

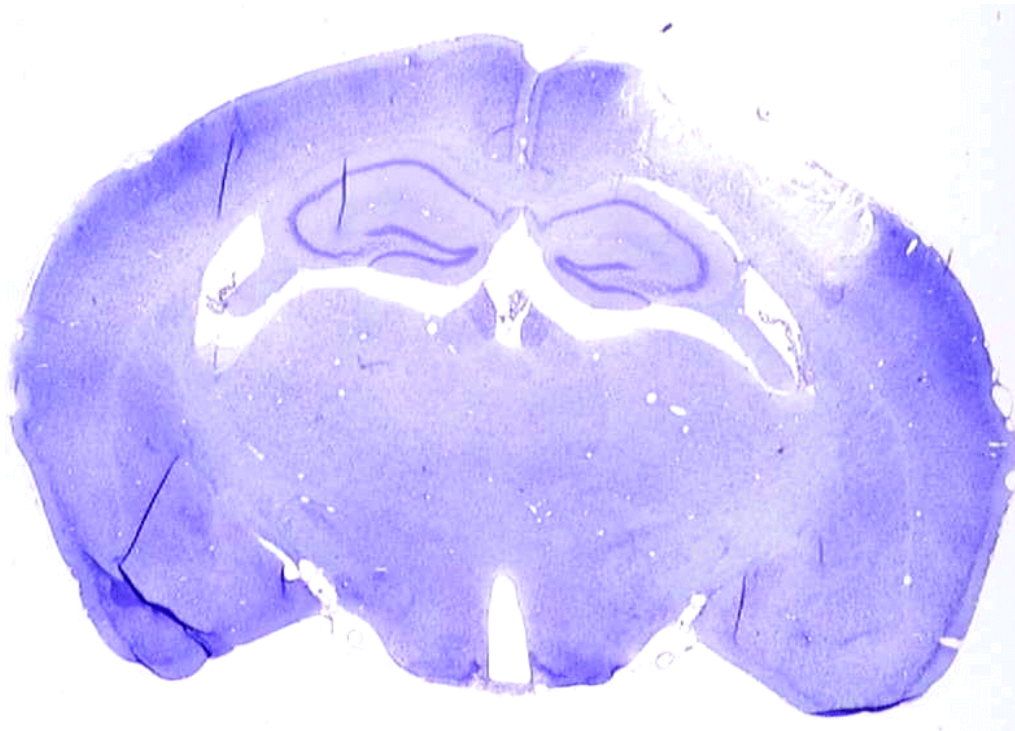


Abb. 3.15: Koronarschnitt durch die maximale Nekroseausdehnung 24 Stunden nach Standardläsion. Makroskopisch ist hier fast der gesamte Nekrosefokus durch die Präparation verloren gegangen. Bei mikroskopisch höherer Auflösung konnte jedoch ein umfassender Nekroserandbereich ohne Unterbrechung vorgefunden werden, so dass eine zuverlässige Planimetrie möglich war (siehe 2.4.1 und 4.3)

Die Fläche mit dem Nekrosemaximum ist bei 0,0 eingezeichnet. Auf der Ordinate ist die mittlere Nekrosefläche in mm^2 aufgetragen. Die untere Kurve zeigt die Gruppe mit 5 Minuten Überlebenszeit nach Trauma ($n=8$), die obere mit 24 Stunden ($n=9$). Die Nekroseflächen der 24-Stunden-Gruppe sind in allen Abschnitten größer als die der Akutgruppe. Diese Art der Darstellung lässt auch erkennen, dass sich das im zeitlichen Verlauf auftretende Nekrosewachstum nicht nur in jedem betroffenen Schnitt, sondern auch in rostrokaudaler Richtung gleichförmig nach lateral ausbreitete. Nach 24 Stunden weisen nun auch Serienschritte 0,7 mm rostral und 0,9 mm kaudal der Nekrosemitte eine Nekrosefläche auf.

In Abb. 3.17 ist diese Expansion im zeitlichen Verlauf nach Trauma am Beispiel der maximalen Nekroseflächen dargestellt. Die maximale Nekrosefläche von $1,47 \pm 0,13 \text{ mm}^2$ 5 Minuten nach Trauma vergrößerte sich im Verlauf von 24 Stunden signifikant auf $1,95 \pm 0,20 \text{ mm}^2$ ($p<0,01$). Dies entsprach einer Zunahme um 33%.

Die aus den Nekroseflächen errechneten Nekrosevolumina (Abb. 3.18) vergrößerten sich signifikant, von $1,30 \pm 0,12 \text{ mm}^3$ nach 5 Minuten auf $2,01 \pm 0,23 \text{ mm}^3$ ($p<0,01$). Dies entsprach einer Zunahme um 55%.

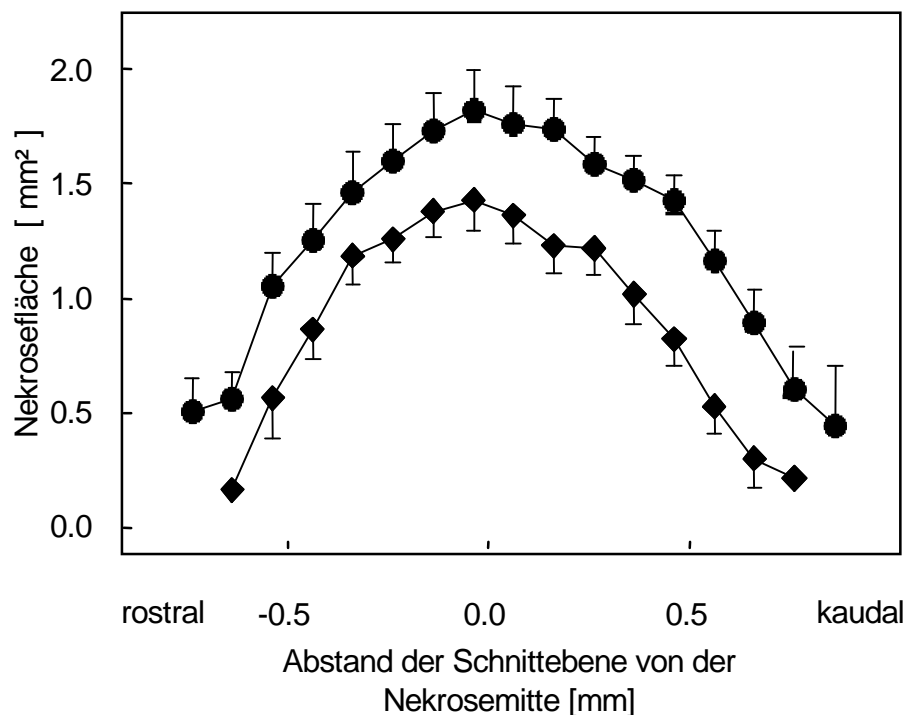


Abb. 3.16: Vergleich der Nekroseflächen von Akutgruppe (Rauten) und 24h-Gruppe (Kreise) in den Serienschritten von rostral nach kaudal.

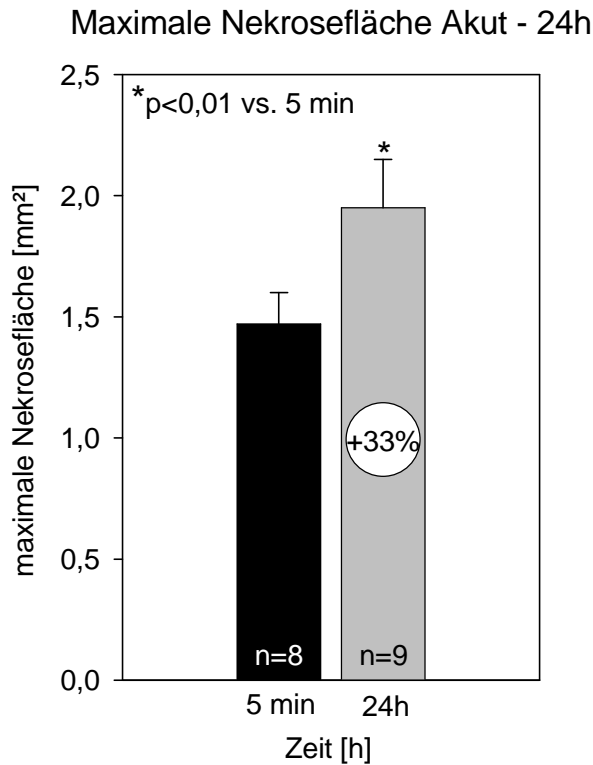


Abb. 3.17: Maximale Nekroseausdehnung akut und 24h nach Läsion

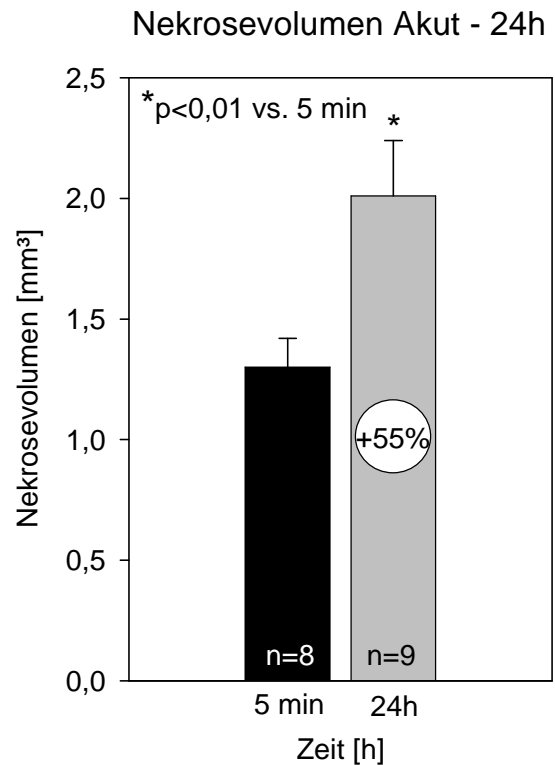


Abb. 3.18: Nekrosevolumen akut und 24h nach Läsion

3.3.2 Akut bis 168 Stunden nach Läsion

Abb. 3.19 zeigt wiederum die maximalen Nekroseflächen der einzelnen Versuchsgruppen. Ausgehend von $1,53 \pm 0,11 \text{ mm}^2$ 5 Minuten nach Läsion über $1,64 \pm 0,14 \text{ mm}^2$ nach 4 Stunden, dehnte sie sich auf $1,67 \pm 0,15 \text{ mm}^2$ nach 12 Stunden aus, bis sie mit $1,87 \pm 0,12 \text{ mm}^2$ nach 24 Stunden ihr Maximum fand. All diese Werte erreichten aufgrund der Streuung der Daten kein Signifikanzniveau. Die Zunahme im Verlauf betrug 7% in den ersten 4 Stunden und weitere 2% in den folgenden 8 Stunden, insgesamt also 9% nach 12 Stunden. In den anschließenden 12 Stunden nahm die Fläche um weitere 13% auf nun insgesamt 22% zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Trauma zu. Danach nahm die maximale Nekrosefläche im Verlauf der Zeit wieder ab. Nach 48 Stunden betrug sie $1,52 \pm 0,14 \text{ mm}^2$, weitere 48 Stunden später nur noch $1,36 \pm 0,12 \text{ mm}^2$ und 168 Stunden nach Trauma $0,83 \pm 0,04 \text{ mm}^2$. Die Veränderungen nach 96 Stunden ($p < 0,01$) und 168 Stunden ($p < 0,001$) erreichten Signifikanz gegenüber der Maximalausdehnung nach 24 Stunden. Prozentual erreichte die Nekrose ihre ursprüngliche Ausdehnung wieder nach 48 Stunden (0%) und schrumpfte daraufhin um weitere 11% (96 Stunden) auf 46% (168 Stunden). Die Nekrosevolumina (Abb. 3.20) errechneten sich wie folgt: $1,44 \pm 0,16 \text{ mm}^3$ nach 5 Minuten, $1,75 \pm 0,09 \text{ mm}^3$ (+ 21%) nach 4 Stunden, $1,88 \pm 0,22 \text{ mm}^3$ (+ 31%) nach 12 Stunden, $1,99 \pm 0,15 \text{ mm}^3$ (+ 38%) nach 24

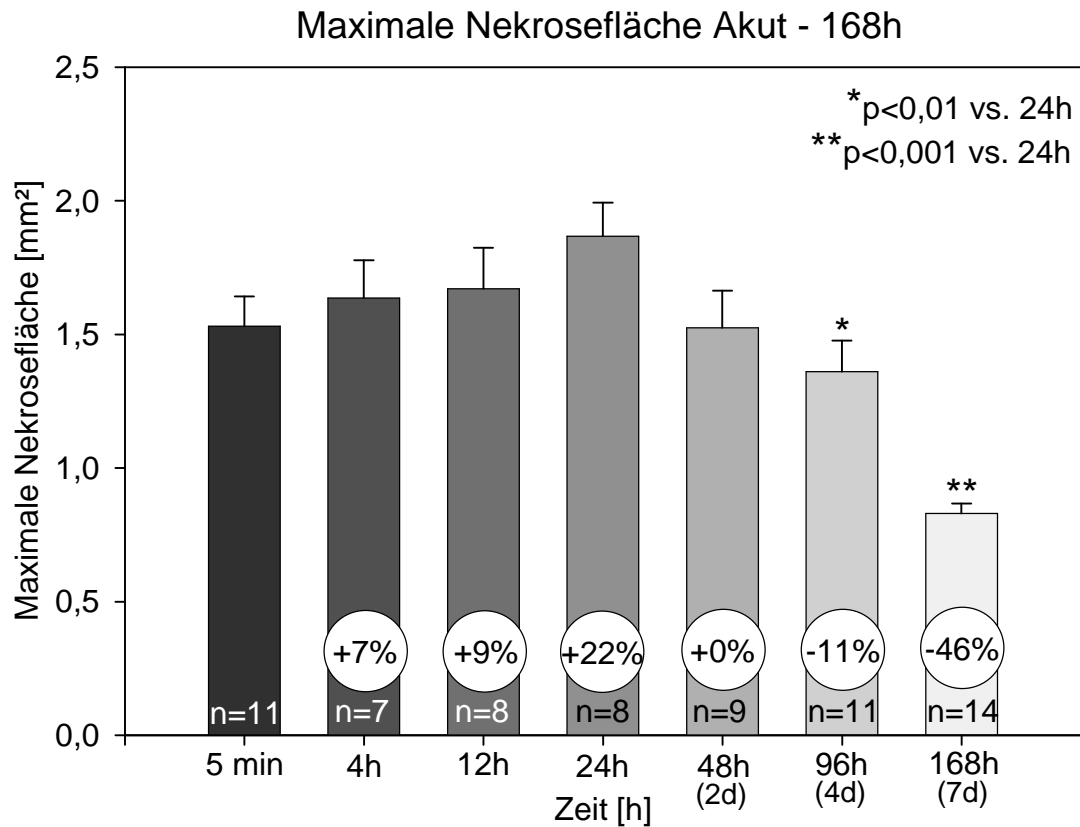


Abb. 3.19: Maximale Nekrosefläche im Verlauf bis 168 h (7 d) nach Standardläsion.

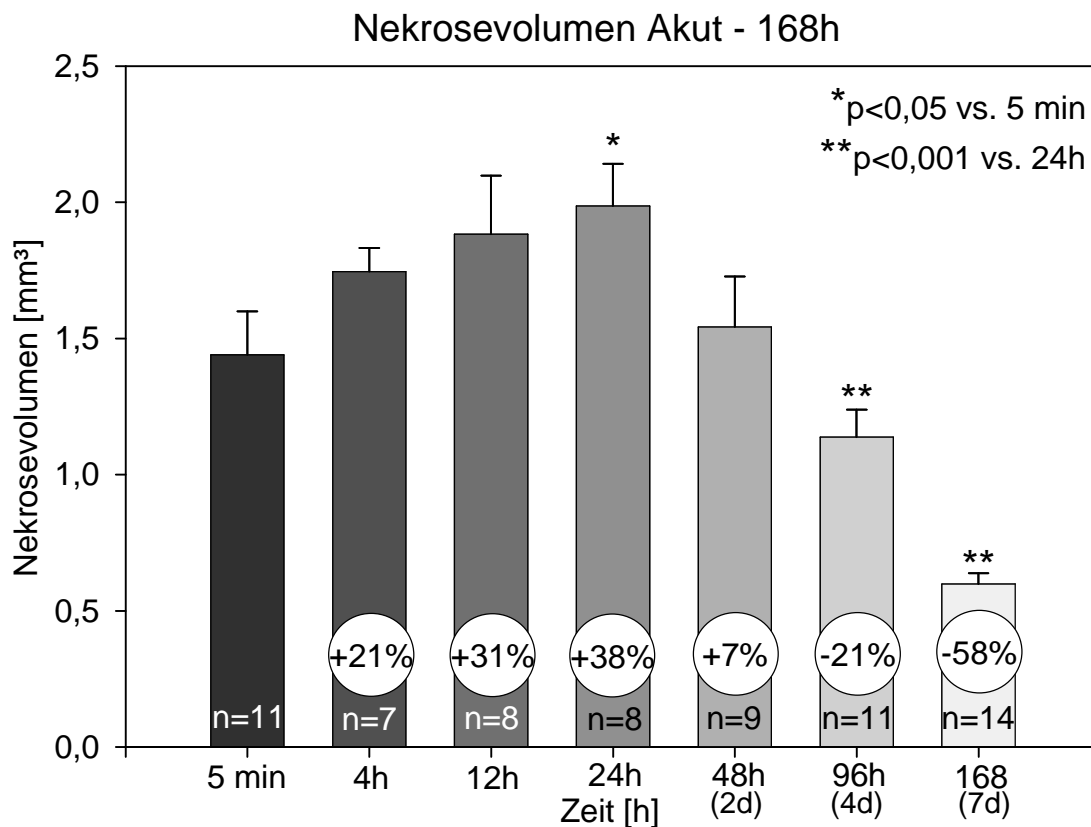


Abb. 3.20: Nekrosevolumen im Verlauf bis 168h (7 d) nach Standardläsion.

Stunden, $1,54 \pm 0,19 \text{ mm}^3$ (+ 7%) nach 48 Stunden, $1,14 \pm 0,10 \text{ mm}^3$ (-21%) nach 96 Stunden und $0,60 \pm 0,04 \text{ mm}^3$ (- 58%) nach 168 Stunden. Mit dieser Berechnung erreichte die Nekrose bei ihrem Maximum nach 24 Stunden Signifikanz ($p < 0,05$) gegenüber der Akutnekrose. Auch die Schrumpfung nach 96 bzw. 168 Stunden war gegenüber der Maximalausdehnung nach 24 Stunden signifikant ($p < 0,001$).

3.4 Expression von *Macrophage Colony Stimulating Factor* nach Läsion

Keine der verwendeten Proben zeigte in der RNA-Gelelektrophorese eine Fragmentierung der RNA. In allen Versuchsröhrchen, die zum Ausschluss von Verunreinigung durch DNA in den RNA-Proben bei der PCR mit RNA befüllt wurden, konnte kein Produkt von β -Actin oder MCSF und damit keine Verunreinigung durch DNA nachgewiesen werden.

3.4.1 Positivkontrolle der MCSF-Primer

Zur Überprüfung der Funktion der neuentwickelten MCSF-Primer wurde eine Amplifizierung mit einer Positivkontrolle durchgeführt. Hierfür diente mit Endotoxin vorbehandeltes Milzgewebe (siehe 2.6.11). Abb. 3.21 zeigt (oben) neben dem Molekulargewichtsstandard und der Negativkontrolle links die Bande des Produkts aus einer behandelten Milz nach Amplifizierung mit den β -Actin-Primern, rechts davon die Bande des Produkts einer unbehandelten Milz. Sie entsprechen der Zielgröße des β -Actin-Produkts (366 bp). Ebenfalls zu sehen sind (unten) die entsprechenden Banden nach Amplifizierung mit den neuentwickelten MCSF-Primern. Auch diese zwei Banden entsprechen der errechneten Zielgröße des MCSF-Produkts (236 bp). Die Bande des vorbehandelten Gewebes ist von deutlich höherer Intensität als die Bande aus dem unbehandelten Gewebe. Bei etwa gleicher Intensität der β -Actin-Banden ließ sich also eine deutlich höhere Anzahl von mRNA-Kopien im vorbehandelten Milzgewebe feststellen, damit konnte auch eine höhere Synthese von MCSF-Protein angenommen werden.

3.4.2 Nekroseareal

In Abb. 3.22 ist die Expression von MCSF im ipsilateralen Nekroseareal und dem zugehörigen kontralateralen Areal der Versuchsgruppe ($n=6$), sowie im entsprechenden ipsilateralen Areal der Sham-operierten Gruppe ($n=3$) im Verlauf der Zeit aufgetragen. 8 Stunden nach Trauma ließ sich eine diskrete Erhöhung der Expression im Nekroseareal gegenüber der Kontrollhemisphäre beobachten, die aber nach 24 Stunden sowie im weiteren Verlauf nicht mehr festgestellt werden

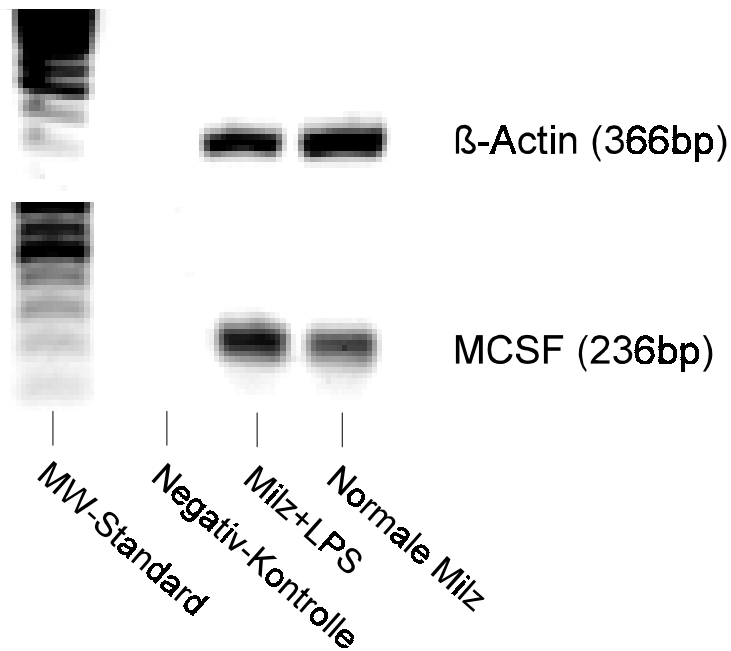


Abb. 3.21: Positivkontrolle der entwickelten MCSF-Primer. Während β -Actin konstant exprimiert wird (obere Reihe), kann eine diskrete Erhöhung der MCSF-Antwort im Lipopolysaccharid-behandelten Milzgewebe gegenüber der Kontrolle (untere Reihe) festgestellt werden.

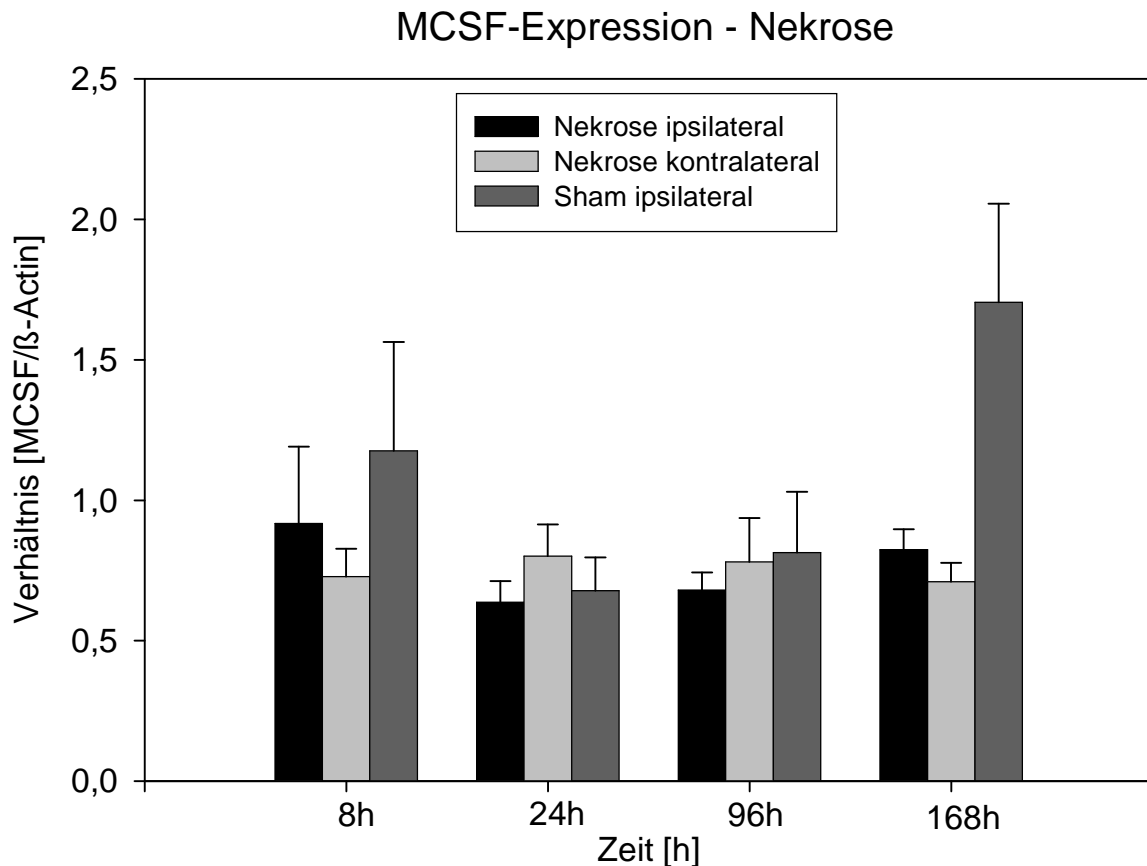


Abb. 3.22: MCSF-Expression im Nekroseareal verglichen mit dem korrespondierenden kontralateralen Areal und einer Sham-operierten Gruppe (ipsilateral) in Abhängigkeit von der Zeit nach Trauma.

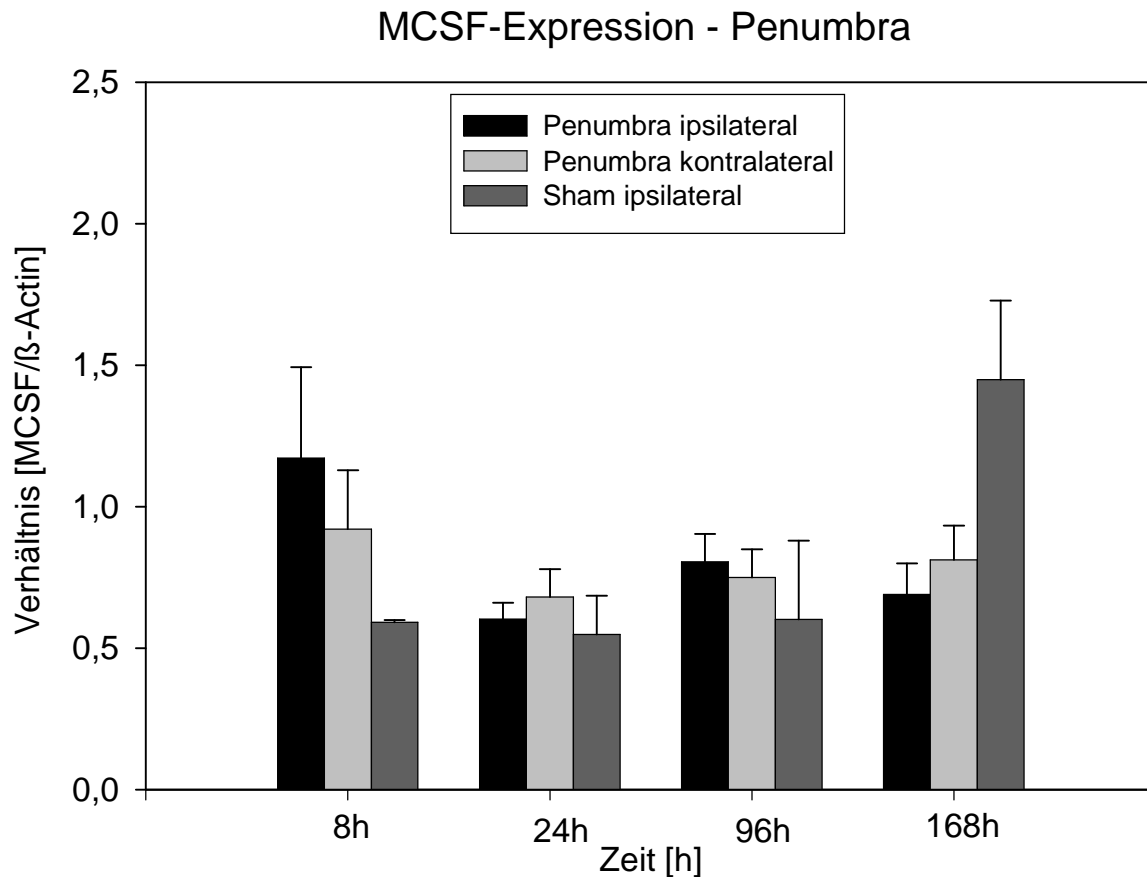


Abb. 3.23: MCSF-Expression in der Penumbra verglichen mit dem korrespondierenden kontralateralen Areal und einer Sham-operierten Gruppe (ipsilateral) in Abhängigkeit von der Zeit nach Trauma.

konnte. In der Shamgruppe war die erhöhte MCSF-Expression nach 8 Stunden deutlicher ausgeprägt, auch hier ging sie im weiteren Verlauf auf das Niveau der Kontrollhemisphäre zurück, bis 168 Stunden nach Sham-Operation (Trepanation) wiederum eine vermehrte Expression gemessen wurde. All diese Veränderungen waren allerdings nicht signifikant.

3.4.3 Penumbra

In den Gewebeproben, die die Penumbra beinhalteten, ließen sich folgende Veränderungen beobachten. Abb. 3.23 zeigt die MCSF-Expression in der ipsilateralen Penumbra und dem zugehörigen kontralateralen Gewebe, sowie das entsprechende ipsilaterale Areal der Shamgruppe. Analog zum Nekroseareal war die Expression von MCSF in der Penumbra nach 8 Stunden verglichen zur Kontrollhemisphäre ebenfalls erhöht, im weiteren Verlauf aber nicht. Eine Erhöhung in der Sham-Gruppe konnte zu diesem Zeitpunkt nicht nachgewiesen werden. Lediglich nach 168 Stunden war wieder eine vermehrte Expression auffällig. Auch hier erreichten diese diskreten Veränderungen kein Signifikanzniveau.

3.4.4 Entfernt liegendes Gewebe

Auch in dem Gewebe, das vom Zentrum der Läsion 4-5 mm entfernt lag, konnten keine signifikanten Veränderungen in der MCSF-Expression nachgewiesen werden. Abb. 3.24 zeigt die Werte dieses ipsilateralen Areals gegenüber der entsprechenden Kontrollseite und denen des ipsilateralen Areals aus der Sham-Gruppe. Auch hier kam es im gesamten Zeitverlauf zu keiner Zunahme. Wie bei den anderen Arealen konnte bei der 168-Stunden-Shamgruppe eine nicht signifikante Vermehrung der MCSF-mRNA beobachtet werden.

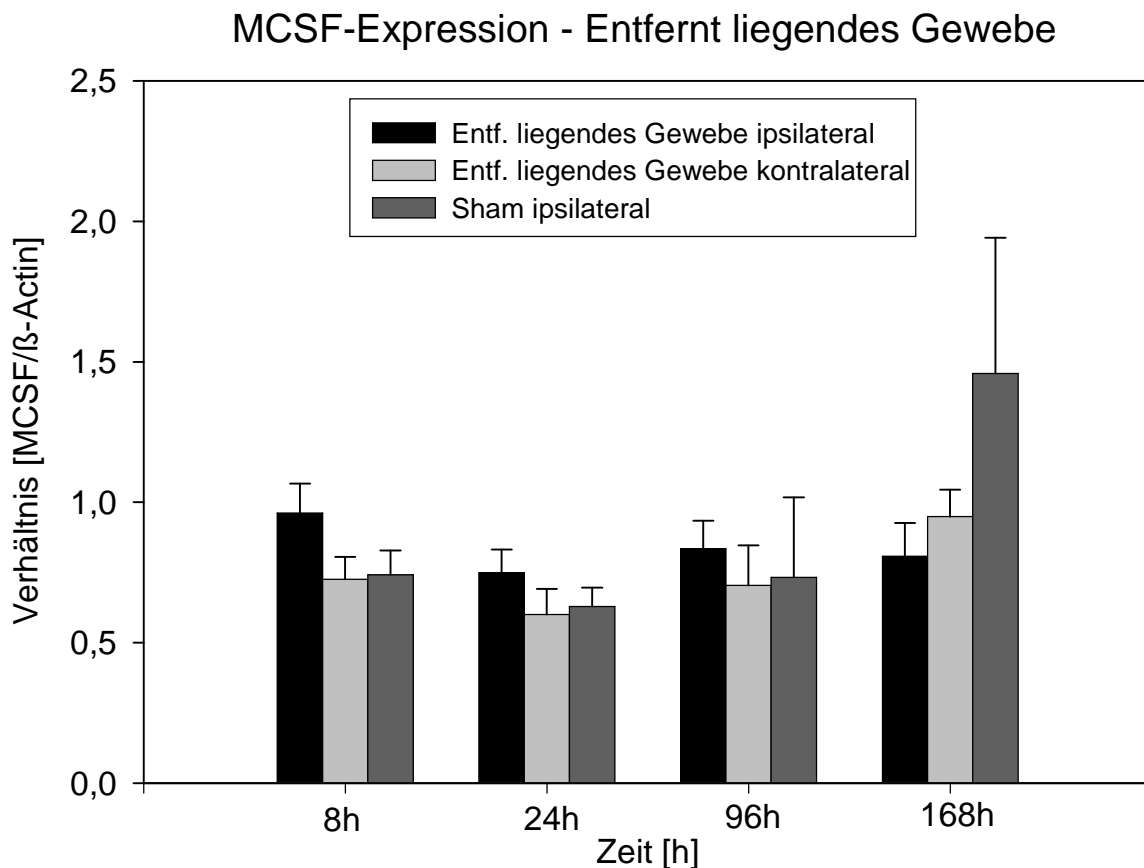


Abb. 3.24: MCSF-Expression im gesunden Gewebe (4-5 mm Entfernung vom Zentrum der Nekrose) verglichen mit dem korrespondierenden kontralateralen Areal und einer Sham-operierten Gruppe (ipsilateral).

4 Diskussion

4.1 Versuchsanordnung

4.1.1 Versuchstiere

Bislang wurden in unserer Arbeitsgruppe Kaninchen und Ratten für Untersuchungen zu Mechanismen des sekundären Hirnschadens verwendet. Nach der Erstetablierung des Modells der fokalen Kälteläsion am Kaninchen sollte im weiteren dieses Phänomen des sekundären Nekrosewachstums auch in der Ratte bestätigt und untersucht werden. Neben einer anderen Wachstumskinetik der fokalen Nekrose in der Ratte (siehe 1 und 4.5), die Vergleichsstudien zur Bedeutung verschiedener Mechanismen mit den zwei Tiermodellen ermöglicht, hat sich ihre Verwendung auch durch eine Reihe von Vorteilen bewährt. So gestaltet sich die Narkoseführung bei Ratten erfahrungsgemäß einfacher und Therapiestudien sind, gerade bei intravenöser Applikation, mit weniger Aufwand verbunden. Es wurde auch festgestellt, dass sich bei Kaninchen die Läsion zu einer hämorrhagischen Kolliquationsnekrose umwandelt (Wyrwich, 1994), was mit erheblichen Schwierigkeiten bei der histologischen Erfassung der Nekroseausdehnung verbunden ist. Bei Ratten besteht dieses Problem nicht. Sie sind auch weitaus resistenter gegen Stress als Kaninchen, was natürlich neben der geringeren Größe und emotionalen Bindung an diese Tierart zur Minimierung ethischen Konfliktpotentials beiträgt.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine neue Spezies eingeführt, um wiederum das Phänomen des sekundären Nekrosewachstums nachzuweisen und neben den bereits genannten Vorteilen in der Zukunft einen wichtigen weiteren Nutzen zu können. Bei Mäusen lassen sich einerseits selektiv genetische Deletionen für bestimmte Faktoren erzeugen, andererseits sind auch eine Reihe von natürlichen Deletionen charakterisiert. Mittlerweile ist eine Vielzahl an solchen *knock-out* Stämmen verfügbar, an ihnen kann die Rolle von einzelnen Faktoren bei verschiedensten pathophysiologischen Situationen in Ergänzung zu den etablierten molekularbiologischen Methoden gezielter untersucht werden.

Aus diesem Grund wurde das in unserer Arbeitsgruppe bereits seit langem verwendete Modell der fokalen Kälteläsion des Gehirns zur Untersuchung des sekundären Nekrosewachstums nun erstmals bei Mäusen angewendet.

4.1.2 Anästhesie

Bei der Erarbeitung des Anästhesieverfahrens wurde einerseits auf die Erfahrungen mit Inhalationsnarkosen bei Ratten in der eigenen Arbeitsgruppe, andererseits auf etablierte Narkoseprotokolle aus der Literatur, zurückgegriffen.

Grundsätzlich muss bei einer generellen Analgesie mit Ausschaltung des Bewusstseins immer von einer Beeinflussung der physiologischen Homöostase ausgegangen werden. Dabei muss sichergestellt sein, dass es durch die gewählten Narkosemittel zu keiner signifikanten Beeinträchtigung der physiologischen Schlüsselparameter wie arterieller Blutdruck und arterielle Blutgaswerte kommt.

Neben einer Inhalations- oder Intubationsnarkose mit volatilen Anästhetika kann auch die intraperitoneale (i.p.) Injektion von beispielsweise Chloralhydrat (Stoffel, 1997) nach entsprechender Prämedikation zu einer gut verträglichen Anästhesie führen. Auch eine intravenöse (i.v.) oder subkutane (s.c.) Applikation ist denkbar. Die Entscheidung für die Inhalationsnarkose mit Halothan beruhte auf mehreren Überlegungen. Einmal wurde die Narkosedauer für die geplanten Versuche mit 30 Minuten relativ kurz angelegt (siehe Abb. 2.8). Daraus ergab sich die Notwendigkeit für eine gut steuerbare Narkose mit möglichst kurzer Einleitungs- und Aufwachphase. Hier ergibt sich ein eindeutiger Vorteil für die Inhalationsnarkose gegenüber der i.p.- und s.c.-Applikation. Zusätzlich sollte die Thermoregulation bei den Versuchstieren nach Aufwachen möglichst schnell wieder funktionieren. Auch hier kommt es nach den Erfahrungen unserer Arbeitsgruppe zu einer schnelleren Erholung nach Inhalationsnarkose. Einzig die i.v.-Applikation gewährleistet eine ähnlich flexible Steuerung der Narkose, kann aber erst nach Anlage eines venösen Zugangs begonnen werden, was wiederum kurzfristig eine Inhalations- oder i.p.-Narkose erforderlich machen würde. Sie besäße sonst keine Vorteile gegenüber der Inhalationsnarkose und würde die Narkosezeit wegen der notwendigen Katheteranlage nur unnötig verlängern. Nicht zuletzt aus diesen Gründen hat sich die Inhalationsnarkose bei Mäusen für kurze Eingriffe als Standard durchgesetzt (Tang et al., 1997; Hata et al., 1998; Clark et al., 1999).

Die bekanntesten volatilen Anästhetika sind Lachgas, Halothan, Isofluran und Sevofluran. In der eigenen Arbeitsgruppe wurde festgestellt, dass es bei der Verwendung sowohl von Halothan als auch bei Isofluran und Sevofluran zu einer mäßigen zerebralen Vasodilatation kommt. Dieser Effekt tritt langsam und über 1-2 Stunden auf. Angesichts der erheblich kürzeren Narkosedauer in diesen Versuchen, als auch der Tatsache, dass der Effekt gleichmäßig in allen Versuchsgruppen auftreten würde, relativiert sich allerdings dessen Bedeutung. Der Einfluss von Halothan auf den restlichen Organismus wurde vielfach, vor allem in Langzeitstudien zur Zelltoxizität, untersucht. So

ließen sich bei Versuchstieren nach chronischer Inhalation von Halothan im subanästhetischen Bereich im Gegensatz zu Isofluran und Sevofluran vermehrt Leberzellnekrosen nachweisen (Stevens et al., 1975; Chang, 1977). Auch in der Klinik ist die "Halothanhepatitis" beschrieben (Neuberger, 1998). Allerdings wurden diese Beobachtungen ausschließlich bei Applikation über mehrere Stunden bis Tage gemacht. Dies konnte aufgrund der kurzen Narkosedauer in diesem Modell ausgeschlossen werden, so dass Halothan verwendet wurde. In Kombination mit Lachgas werden die erforderliche Narkose und Analgesie erreicht, ohne durch ausgeprägte Muskelrelaxation die Spontanatmung der Versuchstiere zu gefährden.

Die Parameter zur Validierung der Narkose waren im vorliegenden Falle der MAP, sowie der $p\text{CO}_2$. Der MAP mußte, zum Ausschluss von sekundären ischämischen Ereignissen bei der Untersuchung des Verhaltens der Hirnparenchymnekrose, im physiologischen Bereich liegen. Der $p\text{CO}_2$ war der wichtigste Parameter, um die Suffizienz der Spontanatmung der Mäuse zu beurteilen. Die Tiefe der Narkose wurde durch Setzen eines Schmerzreizes regelmäßig kontrolliert (siehe 2.2.1).

Die ermittelten Daten in der Anästhesie-Versuchsgruppe korrelieren teilweise mit Ergebnissen von anderen Arbeitsgruppen. Der MAP lag bei diesen Experimenten die ganze Beobachtungszeit über bei $79 \pm 10,6$ mmHg. Dieser Bereich wird bei der Maus als physiologisch betrachtet (Bernstein, 1966; Sarin et al., 1990; Barbee et al., 1992; Dalkara et al., 1995).

Die in der Schwanzarterie gemessenen MAP-Werte korrelierten zwar schwach ($r=0,443$) mit den in der A. carotis gemessenen "Goldstandard"-Werten, so dass man annehmen könnte, durch Verwendung eines Korrekturfaktors verwendbare Werte zu erhalten. Die zum Teil jedoch extremen Schwankungen bei den Messungen erlaubten allerdings keine validen Aussagen über die aktuellen Druckverhältnisse im Einzelversuch, es kann damit von keiner sicheren Überwachung des MAP über diesen Zugang ausgegangen werden. Sekundärischämische Ereignisse durch Hypotonie sind also nicht ausgeschlossen, so dass von der invasiven Überwachung des MAP über die Schwanzarterie in der Maus Abstand genommen werden sollte.

Die Auswertung der Blutgasanalysen zeigte, beginnend 75 Minuten nach Einleitung der Narkose, zunehmend eine respiratorische Azidose, gekennzeichnet durch einen hohen Kohlendioxidpartialdruck bei fallendem pH und einem Sauerstoffpartialdruck zwischen 125 und 160 mmHg. Der *base excess* war bei der ersten Messung nach 75 Minuten unauffällig, danach zunehmend negativ. Dabei erscheint allerdings schwierig, das Ausmaß der Azidose zu bestimmen, da keine Einigkeit über den Normalwert des arteriellen pH bei der Maus besteht. Während einige Autoren von einem pH-Wert nahe oder gleich 7,4 ausgehen (Bernstein, 1966; Weaver und Scott, Jr., 1984; Rosenblum, 1990; Rosenblum et al., 1992), setzen andere den Wert tiefer an, bei 7,2 bis 7,3 (Lahiri, 1975; Siemann und Hill, 1983; Barone et al., 1993). Dabei scheinen zwei Faktoren für

die große Varianz verantwortlich zu sein, genetische Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen und Umwelteinflüsse wie Ernährung und Umgebungstemperatur - bei gleichbleibender Körpertemperatur (Weir, 1949).

Obgleich bei den ermittelten Blutgasen in diesem Zusammenhang nur bedingt von physiologischen Werten ausgegangen werden kann, ist die Verwendung dieses Anästhesieverfahrens auch unter den folgenden Gesichtspunkten zulässig. Die Kreislaufparameter während des Narkosezeitraums von bis zu 30 Minuten bei den später durchgeführten Versuchen (Abb. 2.8) konnten in der Anästhesie-Versuchsreihe aus technischen Gründen (Katheteranlage) nicht erfasst werden (Abb. 2.7). Die nach Katheteranlage gemessenen MAP-Werte waren im physiologischen Bereich. Die ersten Blutgasuntersuchungen konnten erst nach 60 Minuten erfolgen, die späteren eigentlichen Traumaversuche dauerten insgesamt maximal 30 Minuten. Insofern erschienen stabile physiologische Parameter während der Narkosedauer als sicher gegeben, auch eingedenk der Tatsache, dass die normalerweise langsam auftretende respiratorische Azidose zu diesem Zeitpunkt nicht oder nicht ausgeprägt bestehen konnte. Später durchgeführte Versuche in der eigenen Arbeitsgruppe, bei denen in derselben Narkose bereits nach 15 Minuten Blutgasproben untersucht wurden, bestätigen diese Annahme (M. Gröger, pers. Mitteilung).

Bei exzellenter Steuerbarkeit mit kurzen Einleitungs- und Ausleitungsphasen, großer Sicherheit und einfacher Handhabung, ist die Inhalationsanästhesie mit Halothan, Lachgas und Sauerstoff bei spontan atmenden Tieren für Kurznarkosen bis zu 75 Minuten Dauer sicher und vorzüglich geeignet. Für experimentelle Anforderungen über diesen Zeitraum hinaus erscheint das Verfahren aber unsicher und sollte dann mit Intubation und kontrollierter Beatmung kombiniert werden, um eine höhergradige respiratorische Azidose zu vermeiden.

4.1.3 Fokale Kälteläsion als Modell

Die fokale Kälteläsion des Gehirns, d.h. die Vereisung des zerebralen Kortex zur Erzeugung eines nekrotischen Gewebsareals, wurde erstmals von Clasen et al. (Clasen et al., 1953) und Klatzo et al. (Klatzo et al., 1958) systematisch beschrieben. Sie gilt als klassisches Modell zur Erzeugung einer kortikalen Nekrose mit Bildung eines vasogenen Hirnödems. Das schnelle Gefrieren des Hirngewebes mit einer Metallsonde führt zu einer sofortigen Parenchymschädigung (Jensen et al., 1981). Dem Gewebe wird durch Bildung von Eiskristallen Wasser entzogen, was zu einer Schädigung durch die nun erhöhte Solutkonzentration mit Denaturierung der Zellmembran führt. Bei Wiedererwärmung kommt es zur Nekrose von Nerven-, Glia- und Endothelzellen (Meryman, 1956). Im Randbereich der fokalen Nekrose entwickelt sich unter Mitwirkung von

Mediatorsubstanzen eine Störung der Blut-Hirnschrankenfunktion (Baethmann et al., 1988). Es kommt zur Extravasation eines eiweißreichen Plasmaexsudats in das Interstitium des Hirnparenchyms, damit zu einem vasogenen Hirnödem mit Erweiterung des Extrazellulärums. Durch die damit einhergehende Störung der Homöostase entwickelt sich auch ein zytotoxisches Hirnödem - die Schwellung von Glia- und Nervenzellfortsätzen, die bei jedem primär vasogenen Hirnödem beobachtet werden kann (Baethmann, 1979). Die Ausbreitung des vasogenen Hirnödems durch *bulk flow* erfolgt vor allem in der weißen Substanz. Hierunter wird die Ausbreitung der Ödemflüssigkeit entlang des hydrostatischen Druckgradienten im Interstitium, vom Ort der Schädigung in das periphere Parenchym, verstanden (Reulen, 1976; Reulen et al., 1977; Reulen et al., 1978). Der erhöhte Wassergehalt bzw. die Zellschwellung bewirken eine Volumenzunahme des Hirnparenchyms, nach Erschöpfung der intrakraniellen Kompensationsmechanismen kann es dann zum Anstieg des intrakraniellen Drucks kommen. Eine Folge ist die Verschlechterung der Durchblutung. Darüber hinaus führt die fokale Kälteläsion zu einer Vielzahl lokaler und allgemeiner pathologischer Veränderungen im Gehirn und intrakraniellen Raum. Hierzu zählen elektrophysiologische und metabolisch-biochemische Störungen (Baethmann et al., 1980; Go, 1986; Schürer, 1987; Baethmann et al., 1988; Hanstock et al., 1988; Cohadon et al., 1989; Pappius, 1991; Husz et al., 1992) sowie strukturelle Veränderungen auf licht- und elektronenmikroskopischer Ebene (Klatzo et al., 1958; Lossinsky et al., 1983; Moore et al., 1987; Hammersen et al., 1988).

Die fokale Kälteläsion ist, vor allem durch die hohe Reproduzierbarkeit und Standardisierung der Gewebläsion in den bestehenden Tiermodellen, vorzüglich dazu geeignet, die Mechanismen des vasogenen Hirnödems oder die pathophysiologisch-biochemischen Vorgänge der Ausdehnung einer traumatischen Kontusionsnekrose zu untersuchen. Dabei kann als Vorteil betrachtet werden, dass weitere beim Schädel-Hirntrauma vorkommende Manifestationen des primären oder sekundären Hirnschadens nicht im Vordergrund stehen oder induziert werden. Bei diskreter Läsion treten keine intrakraniellen Blutungen auf, auch keine ausgeprägten Erhöhungen des intrakraniellen Drucks oder diffuse Axonschädigungen. Hierfür gibt es andere Modelle (siehe 4.1.4).

4.1.4 Alternative Modelle

Das Ziel experimenteller Modelle des Schädel-Hirntraumas ist, die verschiedenen Aspekte der Pathophysiologie der Hirnverletzung beim Menschen zu reproduzieren. Hierzu müssen Vereinfachungen akzeptiert werden, einzelne Mechanismen von besonderer klinischer Bedeutung werden isoliert untersucht. Die eingesetzten Modelle können sich hierbei erheblich unterscheiden

hinsichtlich Versuchstierspezies, Verletzungsmechanismus oder Applikationsregion.

Von den Modellen mit thermischer Einwirkung ist die von Clasen und Klatzo etablierte Kälteläsion das am häufigsten verwendete (Clasen et al., 1953; Klatzo et al., 1958). Bei einem weiteren Modell wird eine auf 70° C erhitzte Sonde der Dura aufgesetzt zur Induktion einer fokalen Nekrose des exponierten Hirnareals (Pappius, 1991). Diese Variante einer thermischen Läsion hat jedoch keine breite Anwendung gefunden, da sich vorzugsweise eine Kolliquationsnekrose ausbildet, die morphologisch schwer zu quantifizieren ist.

Mechanische Traumen unterscheiden sich vor allem durch unterschiedliche Lokalisationen der Induktion: Gehirn, Dura, Schädel. Bei einem von Kingman et al. beschriebenen Modell (*Intracerebral Mass*) simuliert ein stereotaktisch in das Hirnparenchym eingebrachter Ballon eine intrazerebrale Raumforderung, z.B. nach Blutung (Kingman et al., 1988). Beim *Fluid-Percussion*-Modell wird das exponierte Gehirn bei intakter Dura einem standardisierten Stoß ausgesetzt (Lindgren und Rinder, 1966; Dixon et al., 1987; Sutton et al., 1993; Hicks et al., 1996; Carbonell et al., 1998). Die Versuchsanordnung ist ein flüssigkeitsgefüllter Zylinder, dessen eine Öffnung mit einem Korken verschlossen und die andere mit dem Trepanationsloch als geschlossenes System verbunden ist. Durch Herabschwingen eines schweren Metallpendels auf den Korken aus definierter Höhe wird ein im Zylinder generierter Druckpuls über die Trepanation auf die Dura übertragen. Neben allgemeinen systemischen und neurologisch-funktionellen Veränderungen kann das Trauma in Abhängigkeit vom dosierbaren Schweregrad zu subarachnoidalen und intraparenchymalen Blutungen, zu einem diffusen Axonschaden oder einem vornehmlich vasogenen Hirnödem führen. Der Nachteil dieses Modells liegt in einer hohen akuten Mortalität durch Hirnstammverletzungen bei Applikation höhergradiger Druckpulstraumen. Das Ausmaß des Parenchymschadens ist nicht zuletzt wegen der subarachnoidalen und intrazerebralen Blutungen weniger gut reproduzier- und quantifizierbar als bei der Kälteläsion.

Beim *Controlled Cortical Impact*-Modell verursacht ein durch Druckluft beschleunigter Bolzen eine fokale Läsion. Vorteil dieser Methode ist eine hohe Reproduzierbarkeit und Standardisierung durch Kontrolle aller wichtigen biomechanischen Parameter wie Kraft, Geschwindigkeit, Eindringtiefe und Verweildauer (Anderson, 1982; Lighthall, 1988; Dixon et al., 1991). Bislang konnte jedoch keine Apparatur entwickelt werden, die das Nachpendeln des Bolzens und damit weitere kleine Traumata nach der eigentlichen Traumaapplikation verhindert. Ein weiterer Nachteil gegenüber der Kälteläsion sind fehlende Studien zur Nekroseexpansion.

Beim *Weight Drop*-Modell führt ein auf die freigelegte Dura herabfallendes Gewicht zu kontusionsartigen Läsionen. Der Kopf des Versuchstiers ist dabei in einem stereotaktischen Rahmen fixiert (Feeney et al., 1981). Am Ort der Gewalteinwirkung entsteht eine auf Hirnrinde und

darunter liegende weiße Substanz begrenzte hämorrhagische Nekrose, die sich im Verlauf von bis zu 14 Tagen vergrößert. Bei Läsionierung des Motorkortex lassen sich gut mess- und reproduzierbare funktionelle Defizite erzeugen, aufgrund der Ödembildung aber keine quantifizierbare fokale Nekrose.

An diesen Versuchsaufbau angelehnt ist ein Modell zur Erzeugung eines diffusen Hirnschadens (Foda und Marmarou, 1994; Marmarou et al., 1994). Hier fällt ein Gewicht auf ein auf der intakten Kalotte angebrachtes Stahlplättchen, um eine Fraktur zu vermeiden. Der Kopf des Versuchstieres liegt auf einer Schaumstoffunterlage mit definierten mechanischen Eigenschaften. Dadurch gelingt es, sowohl die durch direkte Gewalteinwirkung als auch durch rotatorische Akzeleration/Dezeleration hervorgerufenen pathophysiologischen Veränderungen zu simulieren. Mit diesem Modell ist es möglich, die vielfältigen Merkmale eines geschlossenen Schädel-Hirntraumas unterschiedlichen Schweregrads gut zu reproduzieren, Mechanismen des sekundären Nekrosewachstum lassen sich aufgrund des eher diffusen Schadensmusters aber nur schwer untersuchen.

Bei dem Beschleunigungs-Modell von Ommaya und Gennarelli wird eine Linear- und Rotationsbeschleunigung über einen festsitzenden Helm auf das Versuchstier übertragen (Ommaya und Gennarelli, 1974). Auf diese Weise fallen die Kontaktphänomene des Aufpralls weg, wodurch der isolierte Einfluss dieser Kräfte in Abhängigkeit vom Ausmaß untersucht werden kann. Für die vorliegende Fragestellung würde daher das morphologische Korrelat in Form einer fokalen Nekrose fehlen.

Es gibt demnach kein Modell für die Reproduktion aller vorhandenen Pathomechanismen beim Schädel-Hirntrauma, sondern allenfalls Modelle, die einzelne Mechanismen in diesem multimodalen Geschehen isoliert hervorheben. Es muss für jede spezifische Fragestellung also das am besten geeignete Modell gewählt werden. Die fokale Kälteläsion hat für die Untersuchung des sekundären Nekrosewachstums besondere Vorzüge:

- Die durch Läsion erzeugte Parenchymnekrose ist wegen einer schmalen Übergangszone vom umgebenden intakten Gewebe besonders gut abgrenzbar.
- Die Primärläsion betrifft alle Zellelemente.
- Das Trauma ist durch die Geometrie der Kühlsonde, die Kontaktdauer zwischen Sonde und Kortex und die verwendete Temperatur sehr genau dosierbar. Man kann durch entsprechende Anpassungen der Parameter Parenchymläsionen jeden gewünschten Schweregrades erzeugen.

- Durch Verwendung eines stereotaktischen Mikromanipulators mit automatischer Steuerung zur Führung der Kältesonde kann höchste Präzision bei der Induktion des Traumas erreicht werden.
- Regulationszentren des Gehirns, vor allem der Hirnstamm, werden nicht geschädigt. Es kommt nur sehr selten zu einer Beeinflussung von systemischen Parametern und extrakraniellen Komplikationen.

4.2 Histologie

4.2.1 Fixation

Die Qualität des histologischen Befundes hängt u.a. entscheidend von der Gewebefixation ab. Um sekundäre, post mortem entstehende morphologische Veränderungen zu vermeiden, wurde das Gehirn in Anlehnung an ein von Brown und Brierley beschriebenes Verfahren perfusionsfixiert (Brown und Brierley, 1968). Die Perfusion erfolgte orthograd über die Aorta ascendens. Da bei Verwendung von Glutaraldehyd in Verbindung mit Formaldehyd über Färbeartefakte berichtet worden ist (Allen et al., 1982), wurde auf Glutaraldehyd verzichtet.

Während Einigkeit darüber besteht, dass die Perfusionsfixation die Qualität des histologischen Präparats verbessert (Brown und Brierley, 1968; McGee-Russell et al., 1970; Kalimo et al., 1977; Garman, 1990), ist die Diskussion über dadurch bedingte Fixationsartefakte nicht abgeschlossen. Cammermeyer, Brierley und Garman interpretieren das Auftreten von geschrumpften Nervenzellen (*dark neurons*) als typischen Artefakt eines schlecht fixierten Hirngewebes (McGee-Russell et al., 1970; Brierley et al., 1973; Cammermeyer, 1978; Garman, 1990), während autoradiographische Studien darauf hindeuten, dass sich diese Zellen in einer Art Ruhezustand mit reduziertem Stoffwechsel befinden (Frohlich et al., 1982).

Garcia und Eke et al. beschreiben solche Zellen als "Typ IV Neuronen", die sich in einem Endstadium der ischämischen Strukturveränderung, entsprechend einer irreversiblen Schädigung, befinden. (Garcia et al., 1978; Eke et al., 1990). Ingvar und Mitarbeiter haben solche Neuronen im Hippocampus, Thalamus und Neokortex beim experimentellen Status epilepticus bei Ratten gefunden. Sie berichten dabei, dass im weiteren Verlauf nur noch wenige *dark neurons* vorhanden waren, der größte Teil der Zellen habe sich erholt (Ingvar et al., 1988). Da in der Arbeit keine Angaben über die Zahl intakter Neuronen gemacht wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei *dark neurons* um apoptotische Zellen handelt (siehe 4.7.3). In den Untersuchungen mit Elektronenmikroskopie fehlen jedoch eindeutige Zeichen wie Chromatinmargination oder *apoptotic*

bodies (Brierley et al., 1973; Garcia et al., 1978), so dass es insgesamt unwahrscheinlich ist, dass es sich bei *dark neurons* um apoptotische Zellen handelt.

In den vorliegenden Untersuchungen war die kontralaterale, unverletzte Hemisphäre das “interne” Referenzgewebe. Hier kam es nicht zur Bildung von *dark neurons*, sondern nur in der exponierten Hemisphäre. Deshalb deuten wir das Auftreten dieser Zellen als Folge der Läsion.

Die Bildung von Vakuolen wird hinsichtlich ihrer pathologischen Bedeutung ebenfalls kontrovers diskutiert. Obgleich eine Schwellung von Dendriten, Astrozytenfortsätzen, Axonlamellen und Zellorganellen im histologischen Präparat als Vakuole imponieren kann, interpretiert Garman Vakuolen als Fixationsartefakt, nicht aber als Zeichen einer Zellschädigung (Garman, 1990). Andere Autoren sehen die Bildung von Vakuolen als typische Folge einer anoxisch-ischämischen Zellschädigung an (Brown und Brierley, 1968; McGee-Russell et al., 1970; Brierley et al., 1973; Kalimo et al., 1977; Pulsinelli et al., 1982; Garcia et al., 1983; Kalimo et al., 1997). Ultrastrukturelle Untersuchungen des Gehirns von Rindern haben ergeben, dass die Vakuolisierung eine ödematöse Schwellung darstellt (Bestetti, 1978), die u.a. auch durch Intoxikation induziert werden kann (Lampert et al., 1973; Graham et al., 1976; Maxwell und Le Quesne, 1979). Elektronenmikroskopische Befunde bei anoxisch-ischämischen Strukturveränderungen des Gehirns ergaben, dass Mikrovakuolen vor allem das morphologische Korrelat geschwollener Zellelemente bzw. Zellfortsätze darstellen, aber keinen Fixationsartefakt (Brierley et al., 1973; Garcia et al., 1983).

4.2.2 Färbung

Für den histopathologischen Befund ist die Färbung des Präparats ebenso wichtig, wie die Fixierung des Organs. Wir haben bei den vorliegenden Untersuchungen die Färbung mit Kresylviolett nach Nissl als klassische Methode zur Beurteilung von Nervenzellen verwendet (Nissl et al., 1926). Erfahrungen mit Experimenten über die Entwicklung der Hirngewebsnekrose nach Kälteläsion bei Kaninchen (Wyrwich, 1994), sprachen dafür, dass Vitalitätsmarker wie Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) oder Säurefuchsin keine reproduzierbare und spezifische Anfärbung von vitalen bzw. avitalen Zellen gewährleisten. Mit TTC konnte erst 24 Stunden nach Läsion eine Nekrose zuverlässig dargestellt werden (Isayama et al., 1991). Diese Färbung ist deshalb zur Untersuchung der Wachstumskinetik der Nekrose nicht geeignet. Die Verwendung der Säurefuchsin-Färbung für das Rattengehirn bei Kainat-Läsion ergab erst sechs Stunden nach Trauma eine zuverlässige Anfärbung (Lees, 1989). Zusammengefasst erschien die Färbung nach Nissl für die Abgrenzung des Nekroseareals und die Beurteilung der Zellvitalität anhand

morphologischer Kriterien am besten geeignet.

4.3 Planimetrie und Volumenbestimmung

Die Planimetrie hat bei der Quantifizierung von Strukturen in histologischen Präparaten schon lange einen festen Platz (Haug, 1986). Zur Erfassung von Strukturen bzw. Flächen von makroskopischen oder mikroskopischen Schnitten wurden früher Quadrate mit Millimeterpapier ausgezählt, oder es wurden histologische Konturen auf Papier übertragen und ausgemessen. In moderneren Verfahren wurden hierfür Videokamera, Computer und Digitalisierbrett eingesetzt (Oja und Collan, 1983; Curcio und Sloan, Jr., 1986). Mit den hier zitierten Methoden wurde auch die Ausdehnung von Nekrosearealen nach einer fokalen Läsion ermittelt (Laurent et al., 1982; Gibson, 1983; Wyrwich, 1994). Eine weitere wichtige Verwendung stellt die Infarktmorphometrie in experimentellen therapeutischen Studien dar (Bose et al., 1984; Osborne et al., 1987; Avendano et al., 1995). Die in der vorliegenden Untersuchung angewandte Flächenmessung entspricht im Prinzip dem o.g. Verfahren mit Millimeterpapier, ist mindestens ebenso präzise, jedoch komfortabler und zeitsparender. Durch die Verwendung einer hochauflösenden digitalen Farbbildkamera konnten die histologischen Schnitte nach Digitalisierung mit herausragender Auflösung und Detailschärfe auf dem Computerbildschirm dargestellt werden. Die Verwendung einer speziell zur Ausmessung von Flächen in digitalisierten Bildern entwickelte Software trug neben der hohen Bildqualität zur Genauigkeit bei. Die Möglichkeit der Verfälschung durch Veränderungen der Bildgeometrie bei Aufnahme und digitaler Weiterverarbeitung konnte durch gleichzeitige Aufnahme eines Millimeter-Standardgitters und nachfolgende Eichung der Software auf die entsprechenden Längen dieses Gitters ausgeschaltet werden. Die statistische Fehlergröße war in dieser Studie bei wiederholten Messungen kleiner als 5%. Alle Schnitte wurden von demselben Untersucher verblindet ausgewertet.

Nach histologischer Aufarbeitung zeigten grosse Teile der untersuchten Serienschnitte Substanzverluste im Nekrosebereich. Bemerkenswert ist, dass in der überwiegenden Mehrheit der Fälle zwar Teile des fragilen Nekrosekerns verloren gegangen sind, jedoch ein breiter Nekroserandbereich mit den daran angrenzenden Parenchymzonen in Gänze zur Darstellung kam. Präparate, die selten Substanzdefekte auch im für die Untersuchungen wichtigen Nekroserandbereich aufwiesen, wurden ausgeschlossen. Dadurch, dass in jeder Schnittebene vier Präparate gewonnen wurden, konnte in allen Fällen ein geeignetes unter den verliehenen drei Präparaten gefunden werden (siehe 2.3.3). Ebenso entscheidend für die exakte morphometrische Auswertung war ein exakt aufgezogenes Präparat ohne Faltenbildung oder Verziehungen. Dies war

in allen Fällen ebenfalls gewährleistet. Der Substanzverlust wurde bei der Berechnung der Nekrosefläche wie in 2.4.1 beschrieben nach gängiger Praxis durch Annäherung einer Geraden an die Kortexoberfläche sowie die volle Berechnung der Fläche innerhalb des beschriebenen Linienverlaufs der Nekrosegrenze sowie der Geraden ausgeglichen (Abb. 2.3).

Die Kriterien zur Auswahl des Verfahrens für die Volumenberechnung aus histologischen Schnitten sind in unserer Arbeitsgruppe bereits eingehend definiert worden (Eriskat, 2000). Beim *Basic Volume Estimator* handelt es sich um ein in der Literatur schon lange bekanntes Standardverfahren, das immer weiter verfeinert wurde (Wennerstrand et al., 1967; Cruz-Orive und Myking, 1981; Uylings et al., 1986; Garcia et al., 1995). Das zugrundeliegende mathematische Konzept stammt von dem italienischen Mathematiker BONAVENTURA CAVALIERI (1598-1647) (Gundersen et al., 1988). Er konnte zeigen, dass das Volumen eines beliebigen Körpers abgeschätzt werden kann, indem man die Summe von parallelen Schnittflächen des Körpers $\sum a$ mit ihrem konstanten Abstand t multipliziert. Um das Nekrosevolumen damit berechnen zu können, mußten die Serienschnitte zwei Bedingungen erfüllen:

- die Serienschnitte mußten gleiche Dicke und Abstand voneinander haben, und
- mußten die Nekrose in ihrer Ausdehnung vollständig erfassen.

Beide Forderungen waren erfüllt. Es konnte auch gezeigt werden, dass 20 Schnitte ausreichen, um das Volumen einer irregulär begrenzten anatomischen Struktur zuverlässig zu ermitteln (Zilles et al., 1982).

In früheren Studien unserer Arbeitsgruppe konnte in der Genauigkeit bei der Ermittlung des Nekrosezuwachses nach fokaler Kälteläsion allerdings kein Vorteil durch Verwendung der Volumenberechnung anstelle der einfachen Nekroseflächenanalyse festgestellt werden. Bei dieser einfacheren Variante wird einfach die jeweils maximale Flächenausdehnung auf dem entsprechenden Serienschnitt im Zentrum der Nekrose mit denen der anderen Versuchstiere verglichen. Die Erklärung hierfür war eine bei Ratten sekundäre Zunahme der Nekrose vor allem im Bereich der maximalen Nekroseausdehnung an der Polkappe vertikal in die Tiefe, während im Randbereich wenig Wachstum zu verzeichnen war. Somit konnte eine Einbeziehung dieser Serienschnitte in die Analyse nicht zur Erhöhung der Empfindlichkeit beitragen (Eriskat, 2000). In der vorliegenden Studie kamen beide Verfahren zur Anwendung, um einen möglichen Unterschied zur Wachstumskinetik im Rattenmodell zu erfassen.

4.4 Reverse Transkriptase - Polymerase Kettenreaktion

Grundsätzlich kann der Nachweis bei der Suche nach einem Faktor auf verschiedenen Ebenen seiner Synthese erbracht werden:

- durch Nachweis des entsprechenden Gens im Erbgut der Zelle,
- durch Nachweis seiner Expressierung mit dem Transkriptionsprodukt mRNA,
- oder durch Nachweis des eigentlichen Proteins.

Hierbei zeichnet sich die zweitgenannte Methode durch Verwendung des Verfahrens der RT-PCR (siehe 2.5) durch einige Vorteile aus. Während der Nachweis des Gens lediglich die Fähigkeit der Zelle zur Bildung des Proteins bestätigt, kann durch Nachweis der mRNA oder des eigentlichen Proteins eine Aussage über die Synthese des Faktors in dem untersuchten Gewebe zu diesem Zeitpunkt gemacht werden. Neben einer qualitativen Antwort erhält man also auch eine quantitative Aussage, wobei das Verfahren der PCR nur eine relative, semiquantitative Erfassung bietet. Jedoch waren zum Zeitpunkt der Untersuchungen keine funktionierenden Antikörper für Maus-MCSF und andere in diesem Zusammenhang interessante Faktoren für einen direkten Nachweis im Western Blot erhältlich. Zusätzlich bietet die RT-PCR einen ausschlaggebenden Vorteil gegenüber dem direkten Proteinnachweis, nämlich die Möglichkeit, die Expression von vielen anderen Faktoren ebenfalls zu untersuchen - wenn erst einmal die cDNA gebildet wurde.

Die durchgeführten Kontrollen zum Ausschluss von potentiellen Fehlerquellen während der vielen Arbeitsschritte wurden bereits ausführlich beschrieben (siehe 2.5.11). Die Methodik an sich ist weitgehend Standard. Ein kritischer Punkt aber ist die Entwicklung und Funktionsprüfung des entsprechenden Primers. Die einzigen zwei Parameter, die sicherstellen, dass das im Gel aufgetrennte Produkt wirklich aus den MCSF-Abschnitten der cDNA amplifiziert wurde, sind einerseits der Nachweis, dass der Primer eine bekannte Menge an MCSF-Templates in der Positivkontrolle zuverlässig detektiert, andererseits die Größe des Produkts, die der errechneten Produktgröße entsprechen muss. In der vorliegenden Studie wurden die Primer für die Amplifizierung von MCSF neu entwickelt, da in der Literatur bis zu diesem Zeitpunkt keine veröffentlicht worden waren. Zur Überprüfung der Funktion musste also als Positivkontrolle Gewebe dienen, das ausreichend MCSF zum Zeitpunkt der Entnahme exprimiert. Roth et al. konnten zeigen, dass die MCSF-Expression in der Milz bei Mäusen nach Behandlung mit Lipopolysaccharid (Endotoxin) 8 Stunden nach i.p.-Applikation etwa doppelt so hoch war, als bei unbehandelten, normalen Tieren. Dabei war die Steigerung in der Milz gegenüber der in anderen Organen, z.B. der Nieren oder der Leber, relativ diskret (Roth et al., 1997). Diese diskrete

Veränderung der Expression konnte in unseren Versuchen mit den neuen Primern korrekt nachvollzogen werden (siehe 3.4.1), auch die Produktgröße stimmte mit den Berechnungen überein, so dass an der Eignung der neuentwickelten Primer und der Validität der Ergebnisse kein Zweifel besteht.

4.5 Sekundäres Nekrosewachstum nach Kälteläsion

Experimentelle Studien bestätigen, dass sich eine primäre Hirnparenchymnekrose im posttraumatischen Verlauf ausdehnt. Solche Beobachtungen wurden bei zerebralen Ischämie, dem Laser-induzierten Trauma oder nach *Fluid-Percussion*-Verletzung gemacht (Eggert et al., 1985; Dietrich et al., 1986; Grome et al., 1988; Frerichs et al., 1990; Toulmond et al., 1993). Mit der fokalen Kälteläsion ist dieses Phänomen ebenfalls näher untersucht worden (Wyrwich, 1994; Vonhof, 1997). Eriskat konnte nach diesen ersten Untersuchungen durch Vonhof bestätigen, dass die Zunahme des Nekrosevolumens nach 24 Stunden bei der Ratte bei 45% ihres Primärvolumens liegt (Eriskat et al., 1994; Eriskat, 2000). Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde erwartet, dass die Volumenzunahme bei der Maus mit angepassten Traumaparametern in ähnlicher Weise ausfallen würde, so dass die Primärnekrose nicht mehr als zwei Drittel der Kortextiefe betreffen sollte, um auf den Kortex beschränkt zu bleiben. Da das Volumen mit der dritten Potenz bei Zunahme eines Längenparameters wächst, beinhaltete diese Festlegung genügend Spielraum für Abweichungen. Ebenso sollte das Nekrosewachstum über einen längeren Zeitraum beobachtet werden, so dass auch von einer Zunahme des Volumens nach 24 Stunden ausgegangen werden musste. Diese Forderungen konnten mit der Festlegung der Sondengröße (1,5mm Durchmesser) und der Kontaktdauer der Sonde mit dem Kortex (4 Sekunden) erfüllt werden.

Die vorliegenden Ergebnisse zur Wachstumskinetik nach dieser Standardläsion bestätigen zum ersten Mal das Phänomen des sekundären Nekrosewachstums nach fokalem Trauma bei der Maus. Demnach erreicht die Ausdehnung der Nekrose nach 24 Stunden mit einer Volumenzunahme um 38% bzw. 55% ihr Maximum. Danach schrumpft die Nekrose sukzessive zusammen. Was - bereits 48 Stunden nach Trauma beginnend – durch reine Betrachtung der ermittelten Nekroseflächen bzw. -volumina als Rückbildung der Nekrose oder vielleicht Erholung des geschädigten Gewebes gedeutet werden kann, stellt sich bei histologischer Begutachtung anders dar.

Vielmehr können bereits früh nach Abschluss des Nekrosewachstums Veränderungen im Bereich der Nekrose festgestellt werden, die im weiteren durch die Organisation der Nekrose, Abbau des Zelldebris und Glianarbenbildung die flächige Repräsentation des zugefügten und sekundär vergrößerten Schadens beeinträchtigen (siehe Abb. 3.11). Dies ist eine Beobachtung, die unsere

Arbeitsgruppe schon vor vielen Jahren gemacht hat. Veröffentlichte Daten, die diesen Sachverhalt genauer beschreiben, gibt es nicht. Die Planimetrie als Messverfahren für das Ausmass dieses Schadens ist nun ungeeignet. Insofern ist das verwendete Verfahren lediglich in der Akutphase der ersten 24 bis 48 Stunden nach Trauma nutzbar, dem Zeitraum, in dem hier das sekundäre Nekrosewachstum stattfindet. Bestätigt werden auch frühere Ergebnisse in anderen Spezies, wonach die Nekrose besonders in den ersten Stunden nach Trauma schubhaft zunimmt (Eriskat et al., 1994). In dieser Studie lag der Volumenzuwachs allein in den ersten vier Stunden bei 21%.

Die Diskrepanz zwischen den beiden Versuchsreihen hinsichtlich der Volumenzunahme (38% vs. 55% nach 24 Stunden) ist folgendermaßen erklärbar. Jede der beiden Versuchsreihen wurde in kurzem Zeitraum begonnen und abgeschlossen, allerdings in unterschiedlichen Jahreszeiten. Während die kleine Reihe mit den zwei Gruppen "Akut" und "24 Stunden Überlebenszeit" im April 2000 durchgeführt wurde, lag der Zeitraum für die große Reihe mit den sieben Versuchsgruppen "Akut" bis "168 Stunden Überlebenszeit" im Spätsommer und Herbst (August bis September 2000). Vorangegangene Untersuchungen aus der Arbeitsgruppe von Kempfski (unveröffentlicht) sprachen dafür, dass das Ausmaß eines Hirnödems nach fokaler Kälteläsion jahreszeitlichen Schwankungen unterliegt. Befunde von v. Andrian zeigten, dass auch der Wassergehalt des Gehirns von Kontrolltieren diesen Schwankungen unterliegt. Der Wassergehalt des normalen (nicht-traumatisierten) Rattengehirns war zwischen Mai und August signifikant höher, als in den übrigen Monaten (Andrian, 1992). Auch wenn diese Befunde nicht als Beweis dieser Abhängigkeit bei der Maus gewertet werden können, geben sie Anlass zu der Vermutung, dass Versuche, die nicht zur gleichen Jahreszeit durchgeführt werden, nur bedingt vergleichbar sind. Auch aus diesem Grund war und ist die Durchführung von Kontrollversuchen randomisiert zu den jeweiligen Versuchsgruppen wichtig. Weiterhin mußte die Spitze der Kältesonde zwischen den beiden Versuchsreihen wegen Beschädigung ausgetauscht werden, so dass - möglicherweise durch geänderte thermophysikalische Eigenschaften der Sonde - eine Veränderung des Ausmaßes der Primärläsion beobachtet werden konnte ($1,30 \pm 0,12 \text{ mm}^3$ in der kleinen Reihe vor Austausch vs. $1,44 \pm 0,16 \text{ mm}^3$ in der großen Reihe nach Austausch der Spitze).

Bei Vergleich der zwei Verfahren zur Berechnung des Nekrosewachstums ergab sich ebenfalls ein Unterschied. Während die einfache Berechnung mit Hilfe der maximalen Nekrosefläche im Rattenmodell vergleichbare Ergebnisse ergibt wie die genauere und aufwändigere Berechnung des Volumens, so liegen die Zuwachsraten hier deutlich unterhalb derer aus der Volumenberechnung. Dieser Unterschied liegt an einer anderen Verteilung des Nekrosezuwachses bei der Maus im Vergleich zur Ratte. Während die Nekrosezunahme bei der Ratte fast ausschließlich an der Polkappe vertikal in die Tiefe stattfindet (siehe auch 4.3; Eriskat, 2000), kommt es im Mausmodell

zu einer gleichmäßigen Zunahme in allen Bereichen der Nekrose, also auch nach horizontal in den Randbereich (Abb. 3.16). Diese Charakteristik der Zunahme bei der Maus verhindert eine adäquate Erfassung des Nekrosewachstums mit der einfacheren Methode.

Die vorliegenden Ergebnisse basieren auf planimetrischen Messungen und Berechnungen von histologischen Präparaten mit Fixierung, Entwässerung, Einbettung, die geschnitten und gefärbt wurden und daher einer Schrumpfung unterliegen können. Solche Einflüsse wären besonders relevant, wenn nekrotisches oder ödematöses Gewebe sich anders verhielte, als intaktes Parenchym. Bei einem einheitlichen Schrumpfungsprozess, würden die Ergebnisse die reale Nekroseausdehnung relativ, aber quantitativ genau widerspiegeln. Barone et al. konnten zeigen, dass konventionelle Histologie mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) bei der Bestimmung der Infarktausdehnung mit magnetresonanztomographischen Auswertungen eng ($r=0,95$) korreliert (Barone et al., 1991). Auch Untersuchungen aus der eigenen Arbeitsgruppe konnten keine signifikanten Unterschiede in der Schrumpfung zwischen kontralateralem "Referenzgewebe" und Traumagewebe durch Messung vor und nach Fixierung feststellen (Eriskat, 2000). Insofern kann kein Zweifel an der Richtigkeit der quantitativen histologischen Auswertung als Spiegel der Veränderungen in vivo bestehen.

4.6 Einfluss der Gewebeschwellung

Ein bei der planimetrischen Analyse zu berücksichtigender wichtiger Aspekt ist die Schwellung durch das vasogene Hirnödem. Es geht dabei um die Frage, in welchem Ausmaß die Nekroseausdehnung durch die Schwellung des Hirngewebes beeinflusst wird. Ein wesentlicher Beitrag des Phänomens auf die Ausdehnung der Nekrose kann durch folgende Überlegung ausgeschlossen werden. Eine Manifestation der Schwellung, die Protrusion der Nekrose über das Niveau der Hirnoberfläche, wurde in den vorliegenden Untersuchungen bei der Flächenbestimmung durch Festlegung der Hirnoberfläche als Gerade eliminiert. Bei den Mäusen kam es nicht zu einer stärkeren Einblutung in die Nekrose - im Gegensatz zu Kaninchen. Gegen einen bevorzugt schwellungsbedingten Mechanismus der Nekroseausdehnung sprechen auch die Ergebnisse von Zählungen klar kategorisierter vitaler bzw. avitaler Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach fokaler Kälteläsion in den einzelnen Kortexschichten. Hier konnte klar ein zusätzlicher Untergang von Neuronen in den der Nekrose angrenzenden Bezirken im Verlauf der Zeit nachgewiesen werden, was ein echtes "Wachstum" der Nekrose bedeutet (Eriskat, 2000).

4.7 Mechanismen des Nekrosewachstums

Die dem Nekrosewachstum zugrundeliegenden Mechanismen sind bisher nicht bekannt. Es sind vermutlich verschiedene Vorgänge daran beteiligt, sowohl initial einsetzende Abläufe, die den Hirnparenchymuntergang in den ersten vier Stunden nach Trauma bewirken, als auch verzögert einsetzende Prozesse als Ursache des weiteren Nekrosewachstums nach dieser Akutphase.

Wahrscheinlich sind Störungen der Mikrozirkulation in der Nachbarschaft der Nekrose durch Schädigung der hier verlaufenden, die Randzone versorgenden Gefäße beteiligt (siehe 4.7.1), sowie die Aktivierung von nekrobiotischen Prozessen durch die Freisetzung und Akkumulation toxischer Mediatorsubstanzen wie Glutamat in der Nekrose und ihr Transport in die perifokale Randzone (Baethmann et al., 1989; siehe 4.7.2). Auch die Aktivierung von Mechanismen zum programmierten Zelltod (Apoptose) wird diskutiert (siehe 4.7.3). Zusätzlich könnten aktivierte Makrophagen, Mikroglia (siehe 4.8-4.11) und Astrozyten durch ihr zytotoxisches Potential zum Sekundärschaden beitragen. Es werden somit Durchblutungs- und Mediatorabhängige Mechanismen sowie zellvermittelte Vorgänge als am Nekrosewachstum beteiligte Faktoren postuliert.

4.7.1 Regionale Durchblutung

Für das Auftreten von sekundären Durchblutungsstörungen als Ursache des Untergangs von perifokalem Parenchym sprechen folgende Befunde. In zahlreichen experimentellen Untersuchungen wurde eine insbesondere perifokal ausgeprägte Minderdurchblutung nach Hirnläsion beobachtet (Frei et al., 1973; Lindsberg et al., 1991; Yamakami und McIntosh, 1991; Vinas et al., 1995). Die Blutversorgung der Hirnrinde erfolgt durch piale Arteriolen der Hirnoberfläche (Go, 1991). Durch die Läsion kommt es zur Schädigung dieser Blutgefäße und damit zur Mangelperfusion darunterliegender Kortexareale. Dabei ist anzunehmen, dass die regionale Durchblutung unter einen kritischen Schwellenwert absinkt ("Infarktschwelle"), deren Unterschreiten zum Parenchymuntergang führt (Jones et al., 1981; Garcia et al., 1983; Symon, 1986). Bei der fokalen zerebralen Ischämie der Ratte korreliert das Infarktvolume mit der perifokalen Durchblutungsverminderung (Soriano et al., 1997). Eine Thrombosierung der das perifokale Gewebe versorgenden Gefäße könnte an der Mangelperfusion beteiligt sein. Beide Phänomene, die Durchblutungsabnahme durch Schädigung von Gefäßen im Nekroseareal als auch die Gefäßthrombosierung könnten gegebenenfalls therapeutisch gehemmt werden. Erste Untersuchungen konnten eine vorübergehende Verbesserung der perifokalen Durchblutung durch i.v.-Applikation von hypertonen/hyperonkotischen Lösungen nach fokaler Kälteläsion zeigen. Das

sekundäre Nekrosewachstum wurde dadurch aber nicht beeinflusst (Friedrich et al., 2000).

4.7.2 Mediator-Mechanismen

Die Befunde über Mediatoren, die nach einem primären traumatischen oder ischämischen Insult sekundäre Mechanismen in Gang setzen oder verstärken, haben zum Verständnis der zugrundeliegenden Pathophysiologie wesentlich beigetragen. Sekundärvorgänge können z.B. Störungen der Mikrozirkulation sein (Mchedlishvili, 1986) oder die Eröffnung der Blut-Hirnschranke mit Einstrom von vasogener Ödemflüssigkeit in das Interstitium (Baethmann et al., 1982), die zytotoxische Schwellung von Glia- und Nervenzellen und schließlich der weitere progressive Untergang von Hirnparenchym (Baethmann et al., 1988). Diese Sekundärvorgänge bestimmen das Ausmaß des Sekundärschadens und damit entscheidend die Überlebenschancen und funktionelle Erholungsfähigkeit der betroffenen Patienten (Graham et al., 1978; Baethmann et al., 1988; Statham et al., 1989; Andrews et al., 1990; Lobato et al., 1991; Stein et al., 1993; Gale et al., 1995). Es sind dabei Moleküle wie z.B. Glutamat, Kinine oder Arachidonsäurederivate beteiligt, die als Mediatoren entweder im primären Nekroseherd freigesetzt werden, oder mit der vasogenen Ödemflüssigkeit aus dem Intravasalraum in das Hirnparenchym übertreten (Baethmann et al., 1988; Lynch und Dawson, 1994; Bazan et al., 1995; McIntosh et al., 1998). Dabei erscheint eine Schrankenstörung alleine für die Entwicklung eines Hirnödems nicht ausreichend. Durch Infusion hyperosmolarer Lösungen in die Arteria carotis interna kommt es zwar zu einer reversiblen Eröffnung der Blut-Hirnschranke, aber nicht zu einer Zunahme des zerebralen Wasser- und Na⁺-Gehalts und damit zu keinem Hirnödem (Nagy et al., 1979; Rapoport und Robinson, 1986). Hierfür muss wohl die Kombination aus Schrankenschaden und nekrotischem Gewebefokus vorhanden sein.

Durch die Aktivierung proteolytischer Enzyme wie saure Phosphatase oder Glukosaminidase (Clendenon et al., 1978) oder die Wirkung neurotoxischer Substanzen wie Glutamat, die in der Nekrose freigesetzt werden, könnte vitales Gewebe in der Umgebung der Nekrose geschädigt werden (Mchedlishvili, 1986; Baethmann et al., 1988). Im Nekroseherd ist die Blut-Hirnschranke eröffnet. Auch dadurch könnten mit der Ödemflüssigkeit diese toxischen Mediatoren in das Parenchym eindringen, die unter Normalbedingungen die Schranke nicht passieren. Im vitalen, das Nekroseareal umgebenden Gewebe (Penumbra) könnten sie die bereits durch Störung der Mikrozirkulation vorgeschädigten Nervenzellen endgültig abtöten (Astrup et al., 1981; Memezawa et al., 1992). Dadurch würde der Zelluntergang fortschreiten mit Ausbreitung des Nekroseareals und weiterer Freisetzung von Mediatoren (Maier-Hauff et al., 1984; Baethmann, 1985).

Folgende Bedingungen müssen erfüllt sein, damit eine Substanz als Mediator des zerebralen Sekundärschadens wirksam ist (Baethmann et al., 1988):

- Die Substanz muss Hirngewebe schädigen.
- Die Substanz muss nach Trauma in pathologischen Konzentrationen oder in Kompartimenten vorhanden sein, in denen sie unter Normalbedingungen nicht nachgewiesen werden kann.
- Die Hemmung der Freisetzung oder Aktivierung dieser Substanz bzw. die Antagonisierung ihrer Wirkung muss zur Hemmung oder Verringerung des Sekundärschadens führen.

Das Kallikrein-Kinin-System

Viele Substanzen und Metabolite werden als Mediatoren des zerebralen Sekundärschadens diskutiert. Ein Nachweis ist bislang u.a. für das Kallikrein-Kinin-System gelungen (Unterberg und Baethmann, 1984; Unterberg et al., 1986; Wahl et al., 1996; Rodell, 1996).

Kinine werden durch das Enzym Kallikrein aus Kininogenen freigesetzt. Die Aktivierung von Kallikrein erfolgt unter physiologischen Bedingungen u.a. in der Gerinnungskaskade durch Hageman-Faktor, in pathophysiologischen Situationen darüber hinaus bei der Verletzung von Gewebe, entzündlichen Prozessen etc. Kinine rufen eine Vasodilatation mit folgender arterieller Hypotension hervor, gleichzeitig aber auch eine Kontraktion der glatten Muskulatur im Bronchialsystem, eine Erhöhung der Kapillarpermeabilität und der Nozizeption durch Stimulation von Schmerzrezeptoren. Die Inaktivierung von Kininen erfolgt durch Kininasen. Früh wurde die Bedeutung des Kallikrein-Kinin-Systems als Mediator beim vasogenen Hirnödem untersucht. So konnte durch ventrikulo-cisternale Perfusion des Gehirns der Ratte mit homologem Plasma ein Hirnödem induziert werden, wobei es während der Ventrikelpassage des Perfusats zum Verbrauch von Plasmakininogenen und damit zur Bildung von Kininen gekommen war (Oettinger et al., 1976). Diese pathophysiologische Rolle der Kininzunahme konnte in weiteren Untersuchungen auch beim Hund bestätigt werden. In der gleichen Studie wurde zusätzlich gezeigt, dass auch die Perfusion mit isoliertem Bradykinin mit der Entwicklung eines vasogenen Hirnödems verbunden war, andere Plasmafaktoren konnten als Ursache damit ausgeschlossen werden (Unterberg und Baethmann, 1984). Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der Kortexoberfläche in vivo ergaben, dass durch Superfusion mit Bradykinin eine Gefäßdilataion mit Eröffnung der Blut-Hirnschranke hervorgerufen wird (Baethmann et al., 1983; Unterberg et al., 1984). Mittlerweile konnte eine Erhöhung der interstitiellen Bradykininkonzentration bei verschiedenen pathologischen Bedingungen nachgewiesen werden, u.a. nach fokaler Kälteläsion. Auch die posttraumatische Schwellung nach Kälteläsion oder Ischämie konnte durch Kallikrein-Inhibitoren und Bradykinin B2

Rezeptor-Antagonisten verringert werden (Wahl et al., 1996; Schulz et al., 2000).

Glutamat

Die Aminosäure Glutamat erfüllt ebenfalls die o.g. Bedingungen als Mediator (Choi, 1987; Baethmann et al., 1988).

Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter des Gehirns (Curtis und Watkins, 1963; Mayer und Westbrook, 1987). Die Aminosäure ist streng intrazellulär kompartimentiert, bei einer Konzentration von 10 mmol/kg Hirngewebe (Feuchtwicht) beträgt der extrazelluläre Anteil unter 10-20 μM (Faden et al., 1989). Der steile Konzentrationsgradient wird v.a. durch aktive Transportmechanismen von Gliazellen aufrechterhalten. Dabei wird Glutamat zusammen mit zwei Natriumionen in diese Zellen aufgenommen (Henn et al., 1974).

Die extrazelluläre Freisetzung von Glutamat z.B. im synaptischen Spalt bewirkt durch Rezeptormechanismen eine Erhöhung der Membranpermeabilität der Neuronen für Natriumionen als Grundlage der physiologischen Transmitterwirkung. Dieser Vorgang kann bei pathologisch massiver extrazellulärer Freisetzung von Glutamat, in Ergänzung zu den schon erwähnten Transportmechanismen, aufgrund der dabei erfolgenden Flüssigkeitsverschiebung Ursache für eine generelle Zellschwellung werden (Ames, III et al., 1967; Harvey und McIlwain, 1968). Perfusion des Ventrikels mit Glutamat - zur Umgehung der Blut-Hirnschranke - führt zu einem zytotoxischen (intrazellulären) Hirnödem, bei Anstieg des Natriumgehalts und gleichzeitigem Kaliumverlust (Baethmann, 1979; Baethmann et al., 1982). Drei Rezeptorklassen für Glutamat sind bislang bekannt, benannt nach ihren potentesten Agonisten: N-methyl-d-aspartat (NMDA), Kainat und AMPA/Quisqualat (Watkins und Olverman, 1987; Hollmann und Heinemann, 1994; Dingledine et al., 1999). Die Bindung von Glutamat an diese Rezeptoren öffnet für Na^+ und K^+ durchlässige Kanäle. Die von NMDA-Rezeptoren gesteuerten Kanäle haben zusätzlich eine hohe Permeabilität für Ca^{++} -Ionen (MacDermott et al., 1986).

Die *akute* Zellschwellung durch Aktivierung der rezeptorgesteuerten Kanäle der Neuronen und die damit verbundene Flüssigkeitsverschiebung - wie oben beschrieben - ist ein Schädigungsmechanismus, der zum sekundären Untergang von Hirnparenchym beiträgt. Dieser kann auch durch depolarisierende Substanzen nachgeahmt werden (Olney, 1986; Olney et al., 1986). Ein weiterer Schädigungsmechanismus ist durch *verzögerten* Untergang von Neuronen gekennzeichnet. Dabei spielt der vom NMDA-Rezeptor gesteuerte Ca^{++} -Influx wohl die entscheidende Rolle (Choi, 1987). Wahrscheinlich dominiert dieser zweitgenannte Vorgang; er wird bereits durch wesentlich niedrigere Glutamatkonzentrationen aktiviert (Choi et al., 1988)

Bei pathologischen Glutamatkonzentrationen im Extrazellulärraum werden durch Aktivierung von

Membranrezeptoren neben Na⁺ und Ca⁺⁺ auch Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃) und Diazylglyzerol (DAG) intrazellulär akkumuliert (Sladeczek et al., 1985; Nicoletti et al., 1986) (Sugiyama et al., 1987). Durch Akkumulation all dieser Metabolite kommt es zu beträchtlichen Veränderungen intrazellulärer Regulationsprozesse (Chang et al., 1997; Ringel et al., 1997). Unter anderem konnten einige Autoren durch die gestörte Kalziumhomöostase eine Fehlfunktion der Mitochondrien (Kristian und Siesjo, 1998; Siesjo et al., 1999) und des endoplasmatischen Retikulums (Paschen und Doutheil, 1999) beobachten. Diese Fehlfunktion kann zum Untergang von Nervenzellen beitragen.

Pathologische Glutamatkonzentrationen im Extrazellulärraum konnten bei der fokalen Kälteläsion mit Hilfe der Mikrodialyse-Technik festgestellt werden (Baethmann et al., 1989; Stoffel et al., 2002). In anderen Modellen des Schädel-Hirntraumas (*fluid percussion injury, controlled cortical impact*) wurde ebenfalls eine erhöhte interstitielle Glutamatkonzentration (Mikrodialyse) gefunden (Butcher et al., 1990; Katayama et al., 1990; Bullock et al., 1991; Palmer et al., 1993; Globus et al., 1995).

Durch Antagonisierung des NMDA-Rezeptors konnte nach Schädel-Hirntrauma im Tierexperiment eine Verbesserung des neurologischen Status erreicht werden (Faden et al., 1989). Eine Reduzierung des sekundären Nekrosewachstums durch Antagonisierung des AMPA-Rezeptors gelang jedoch nicht (Eriskat, 2000). Auch in klinischen Versuchsreihen konnte bislang kein positiver Effekt durch Glutamatantagonisten beobachtet werden (Bullock und Fujisawa, 1992; Bullock, 1995). Das therapeutische Potential ist somit unklar (Clausen und Bullock, 2001).

Andere Mediatoren

Auch die hochungesättigte Arachidonsäure und ihre Metabolite spielen höchstwahrscheinlich eine Rolle als Mediatoren des zerebralen Sekundärschadens (Unterberg et al., 1987; Staub et al., 1994; Wahl et al., 1995; Dhillon et al., 1997). Es ist anzunehmen, dass eine Vielzahl an weiteren Substanzen als Mediatoren pathophysiologisch wirksam sind, wie z.B. lysosomale Enzyme, biogene Amine wie Serotonin oder Histamin, andere Aminosäuren oder Zytokine (Lipton, 1993; Lynch und Dawson, 1994; Baethmann et al., 1996; McIntosh et al., 1998).

Eine spezifische Antagonisierung der Freisetzung und/oder Aktivierung solcher Mediatoren sollte eine effektive Therapie durch Begrenzung des sekundären posttraumatischen Schadens darstellen. Dies erscheint allerdings bislang schwierig, wahrscheinlich durch Interaktion und Potenzierung von Wirkungen der einzelnen Mediatorensysteme.

4.7.3 Nekrose vs. Apoptose

Apoptose ist eine Form des Zelltodes, bei dem die Zelle selbst aktiv ihren Untergang mit herbeiführt (Kerr et al., 1972). Dieses Phänomen ist ein integraler und notwendiger Vorgang bei der Entwicklung des Zentralnervensystems. Das Interesse an den zugrundeliegenden Mechanismen dieses "programmierten" Zelltodes mit Aktivierung von Genen und Induktion von Faktoren hat stark zugenommen, da Apoptose auch unter pathophysiologischen Bedingungen beobachtet wird, u.a. bei der fokalen zerebralen Ischämie und Exzitotoxizität (Kerr et al., 1972; Bredesen, 1995). Eine Hemmung dieses Prozesses könnte den zusätzlichen Zelluntergang verhindern.

Apoptose wird anhand von morphologischen Kriterien von der Zellnekrose unterschieden (Kerr et al., 1972). Die ersten Veränderungen werden im Zellkern beobachtet - Chromatin kondensiert und wandert an den Kernrand (Chromatinmargination). Der Zellkern fragmentiert. Die Zellkernmembran entwickelt Ausstülpungen, sogenannte *Blebs*, die dann - mit oder ohne Zellkernbestandteilen - als *apoptotic bodies* abgeschnürt werden. Die Zellmembran und die Organellen sind zu diesem Zeitpunkt noch intakt. Im Gegensatz zur Nekrose kommt es nicht zum Austreten von Zytoplasma in den Extrazellulärraum und wohl deshalb nicht zu einer ausgeprägten Entzündungsreaktion.

Auf molekularbiologischer Ebene ist die DNA-Fragmentierung in den internukleosomalen Regionen ein wichtiges Merkmal der Apoptose (Wyllie et al., 1980). Diese Strangbrüche können mit Hilfe der TUNEL-Färbung (*Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated Uridine 5'-triphosphate-biotin Nick End Labeling*) nachgewiesen werden. So konnten TUNEL-positive Zellen bei Ratten nach fokaler zerebraler Ischämie beobachtet werden (Li et al., 1995; Chopp und Li, 1996; Li et al., 1998). In Therapieversuchen mit Antikörpern gegen Adhäsionsmoleküle konnte in diesem Modell eine Verringerung der TUNEL-positiven Zellen festgestellt werden (Chopp et al., 1996). Eine Schlüsselfunktion bei der Apoptose haben bestimmte Enzyme, die aktiviert werden - Caspasen (Namura et al., 1998). Durch spezifische Hemmung dieser Enzyme kann eine Hemmung der Infarktausdehnung nach fokaler zerebraler Ischämie erreicht werden (Hara et al., 1997). Es lassen sich auch synergistische Effekte von Caspaseninhibitoren und NMDA-Antagonisten feststellen (Ma et al., 1998).

Nach fokaler Kälteläsion wurden ebenfalls TUNEL-positive Zellen beobachtet (Tominaga et al., 1992; Murakami et al., 1998). Bislang ist jedoch nicht bekannt, ob das sekundäre Nekrosewachstum nach fokaler Läsion durch Hemmung der Apoptosemechanismen reduziert werden kann.

4.8 Die Rolle der Mikroglia

Die Bedeutung der Mikroglia und ihrer Aktivierung ist für das anschließende pathophysiologische Geschehen nach Schädel-Hirntrauma bislang völlig ungeklärt, obgleich ihre Existenz und Morphologie schon seit Anfang des letzten Jahrhunderts bekannt ist.

Sie zählt neben Nervenzellen, Astrozyten, Oligodendrozyten und Ependymzellen zum hirneigenen Gewebe, dabei stellt sie 10-20% der glialen Zellpopulation. PIO DEL RIO-HORTEGA benannte erstmals die Mikroglia und beschrieb die charakteristische morphologische Veränderung dieser Zellen von der ruhenden (ramifizierten) Zelle zu einem aktivierten amöboiden Monozyten als Antwort auf pathologische Ereignisse (Del Rio-Hortega, 1932). Über die Herkunft dieser Zelllinie bestand lange Zeit Uneinigkeit. Die Mehrheit der Meinungen geht allerdings von einer ontogenetischen Verwandtschaft mit den Zellen des mononukleären Phagozytensystems aus, was sie von den anderen Zelllinien des Zentralnervensystems unterscheidet und neben der morphologischen Ähnlichkeit zu peripheren Monozyten nach Aktivierung auch ihre immunologische Funktion erklärt (Hickey et al., 1992; Ling und Wong, 1993; Priller et al., 2001). Von einigen Autoren wird auch eine Herkunft aus dem Neuroektoderm diskutiert (Berezovskaya et al., 1995).

Die Aktivierung der Mikroglia, bei der die Zellen diesen charakteristischen Prozess der Veränderung ihres Aussehens durchlaufen (siehe 4.9), erfolgt zu einem sehr frühen Zeitpunkt als Antwort auf ein pathologisches Geschehen, oft früher als bei allen anderen Zellfamilien im Gehirn (McGeer et al., 1988; Perry et al., 1993; Gehrman et al., 1995). Dabei scheint die Mikroglia schon auf sehr diskrete Veränderungen der Homöostase mit Aktivierung zu reagieren, bevor Schäden auch histologisch nachweisbar sind (Gehrman et al., 1993). Es gibt kaum einen Pathomechanismus im Gehirn, der nicht mit einer Aktivierung der Glia, v.a. der Mikroglia verbunden ist (Perry et al., 1993). Diese schnelle Reaktion auf verschiedenste Einflüsse lässt daher vermuten, dass die ruhende, weit verzweigte Mikrogliazelle einen Zustand der Wachsamkeit auf Veränderungen im extrazellulären Milieu widerspiegelt (Kreutzberg, 1996).

Mikroglia spielt eine wichtige Rolle bei Reparationsvorgängen nach Verletzung, ähnlich wie Makrophagen im peripheren Gewebe. Synergistische Effekte von Mikroglia und Astroglia sind vonnöten, um entsprechende Aufgaben erfüllen zu können, wie z.B. Wiedererlangung der Funktion der Blut-Hirnschranke oder die Kontrolle der Invasion von hämatogenen Zellen. Als zur Phagozytose befähigte Zellen kann sie Mikroorganismen zerstören, Zelldebris abbauen, und zur Rückkehr zur Homöostase durch Sezernierung von Faktoren zur Wundheilung beitragen (Kreutzberg, 1996).

Gerade ihre Fähigkeit zur Bildung zytotoxischer Substanzen lässt aber die Frage nach möglicherweise schädigenden Einflüssen auf verletzte, aber überlebensfähige Neuronen im Anschluss an komplizierte pathologische Ereignisse zu. So ist die Mikroglia in der Lage, nach Aktivierung neben einer Reihe von Proteasen auch freie Sauerstoffradikale, Arachidonsäurederivate, exzitatorische Aminosäuren, Interleukin 1, Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF α) und *Amyloid Precursor Protein* (APP) zu sezernieren, deren neurotoxische Eigenschaften in verschiedenen Modellen nachgewiesen wurden (Relton und Rothwell, 1992; They et al., 1993; Banati et al., 1993b; Banati et al., 1995; Toulmond und Rothwell, 1995; Bruce et al., 1996; Kreutzberg, 1996; Uno et al., 1997; Panegyres und Hughes, 1998; Yang et al., 1998; Morita-Fujimura et al., 1999).

Andererseits gibt es auch Anhaltspunkte für neuroprotektive Eigenschaften, durch Sezernierung von Faktoren mit vermutlich neuroprotektiver Funktion, wie z.B. *Nerve Growth Factor* (NGF), Interleukin (IL)-6 oder Neurotrophin (NT)-3 (Mallat et al., 1989; Elkabes et al., 1996). Antiinflammatorische Moleküle wie *Transforming Growth Factor Beta-1* (TGF β 1) können den Gewebeschaden verringern (Kiefer et al., 1995). In vivo-Studien konnten ebenfalls neuroprotektive Eigenschaften nachweisen. So verbessert Implantation von aktivierter Mikroglia das Axonwachstum im verletzten Rückenmark (Prewitt et al., 1997; Rabchevsky und Streit, 1997) und bei Blockierung der Aktivierung von Mikroglia in MCSF knock-out Mäusen (siehe 4.10) kommt es zum vermehrten Neuronenuntergang nach Ischämie (Berezovskaya et al., 1995).

Raivich et al. postulieren als Erklärung für diese widersprüchlichen Erkenntnisse und das äußerst stereotype Verhaltensmuster der Mikroglia bei der Reaktion auf all diese verschiedenen Pathomechanismen, dass die hirneigene Immunantwort durch die Glia und Mikroglia entwicklungsgeschichtlich letztlich auf die Bekämpfung von Infektionen optimiert ist. Die ursprünglich noch in Amphibien vorhandene hohe Neuroplastizität und Fähigkeit zur nervalen Regeneration nach Trauma, die mit anderen "Programmen" in der Zell-Zell Interaktion verbunden ist, ist bei Vertebraten und anderen höheren Lebensformen, auch durch verbesserten Schutz des Zentralnervensystems in der Wirbelsäule und im Schädel bedingt, verloren gegangen. Somit ist das gliale Zellsystem mit seiner Reaktion eher auf die andere große Gefahr - Infektionen - ausgerichtet, was gerade die Fähigkeit zur Sezernierung dieser Vielzahl an toxischen Substanzen begründet (Raivich et al., 1999).

4.9 Mikrogliaaktivierung unter pathologischen Bedingungen

Wie bereits erwähnt, durchläuft die Mikroglia bei ihrer Aktivierung mehrere Stadien, die durch

spezifische morphologische Charakteristika definiert sind. Die ruhende Zelle ist durch lange, weitverzweigte (ramifizierte) Ausläufer gekennzeichnet, die in der weißen Substanz parallel zu den Neuriten, in der grauen Substanz stellar, ausgerichtet sind. Dabei kann eine einzige Zelle ein Gebiet von 30-40 μm Durchmesser abdecken, ein Hinweis auf die immunologische Überwachungsfunktion (Raivich et al., 1999).

Als erster Schritt in der Aktivierungskaskade zeigt die Zelle eine Verringerung der Ramifizierung durch "Zurückziehen" ihrer verzweigten Ausläufer und Vergrößerung des Zellsomas mit Verdickung der proximalen Ausläufer. Neben dieser ersten morphologischen Veränderung kommt es zur Expression von spezifischen Oberflächenmarkern, wie dem Komplementrezeptor $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ -Integrin oder ICAM1, ein Adhäsionsmolekül für verschiedene Leukozytenzelllinien (Werner et al., 1998; Kloss et al., 1999). Zu diesem Zeitpunkt kann bereits die Expression von APP nachgewiesen werden (Banati et al., 1993a; Banati et al., 1995).

In einem zweiten Schritt bewegt sich die nun mobile Mikrogliazelle zur mutmaßlich beschädigten Struktur, dem Neuron oder seinem Neuriten, und adhärert. Dabei kommt es morphologisch zu einer weiteren Verringerung der Ramifizierung. Die initial vermehrt exprimierte Moleküle $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ -Integrin und ICAM1 werden nun wieder herunter reguliert, dafür kommt es in der Maus zu einer Hochregulation anderer Integrine wie $\alpha\text{5}\beta\text{1}$ oder $\alpha\text{6}\beta\text{1}$ (Kloss et al., 1999) und Zytoskelettproteinen wie Vimentin, als Ausdruck der starken morphologischen Veränderungen (Graeber et al., 1988a). Mit Adhäsion an das beschädigte Neuron werden synaptische Verbindungen unterbrochen, das sogenannte *Synaptic stripping*, und die Zelle dadurch isoliert (Blinzinger und Kreutzberg, 1968). Anschließend werden jetzt Rezeptoren für die potenten Mitogene *Macrophage Colony Stimulating Factor* (MCSF) und *Granulocyte-MCSF* (GMCSF) gebildet (Raivich et al., 1991; Raivich et al., 1998), die Zellen beginnen zu proliferieren (Sjostrand, 1966; Graeber et al., 1988b). Bei peripherer Axotomie des Fazialisnervs der Maus konnte im Anschluss eine Versechsfachung der Mikrogliazellen im entsprechenden Kerngebiet beobachtet werden, die an die Zellsomata der axotomierten Neuronen adhärten (Raivich et al., 1994b). Gleichzeitig konnte auch MHC1 nachgewiesen werden (Streit und Kreutzberg, 1988; Raivich et al., 1993). Diese "Versiegelung" und Isolierung der verletzten Neuronen durch die proliferierende aktivierte Mikroglia, bei gleichzeitiger Expression der genannten immunologischen Marker, könnte auf eine wichtige Funktion hinweisen, nämlich die Abdichtung von Membranlecks - eine häufige Manifestation bei beschädigten Zellen - und gleichzeitige Präsentation der so aufgenommenen Moleküle an infiltrierende Lymphozyten (Raivich et al., 1999).

Kommt es nun zum Tod der beschädigten Nervenzelle, transformiert die umgebende Mikroglia umgehend zu phagozytotischen Zellen und baut den Debris ab (Streit et al., 1988). Dieses Verhalten

wird auch beim Abräumen von diskonnektierten Axonen während der Waller'schen Degeneration und Myelin bei demyelinisierenden Erkrankungen wie Enzephalomyelitis disseminata beobachtet (Trapp et al., 1998). Dabei wird eine massive Hochregulation vieler verschiedenster Marker beobachtet (Kloss et al., 1999) sowie eine zusätzliche weiträumige Aktivierung der bislang ruhenden Mikroglia, die die phagozytierenden Foci umgibt.

Nach Abschluss der Phagozytose bzw. bei Überleben des Neurons verringert sich die Anzahl der Mikrogliazellen wieder, die Aktivierungsmarker werden herunter reguliert und die verbleibenden Zellen kehren wieder in den morphologischen Ruhezustand zurück.

4.10 MCSF als Aktivator der Mikroglia

Über die Einzelheiten der Zell-Zell-Interaktionen während der Aktivierungsphasen ist noch nicht viel bekannt. Gerade die Signalwege am Anfang der Aktivierungskaskade sind momentan Gegenstand intensiver Forschung. Immer mehr hat sich in letzter Zeit aber die Bedeutung von ein paar Faktoren für die Koordination der Mikrogliaaktivierung herauskristallisiert. Neben $\text{TNF}\alpha$, IL-6 und $\text{TGF}\beta 1$ scheint gerade MCSF eine Schlüsselrolle zuzukommen (Raivich et al., 1999).

MCSF ist ein homodimeres Glykoprotein (45-90 kDa), das als potentes Mitogen für Monozyten-Vorläuferzellen im peripheren Gewebe und ramifizierte Mikroglia dient (Suzumura et al., 1990; Roth und Stanley, 1992; Kloss et al., 1997). Es wird während der Entwicklung und auch im adulten Gehirn konstitutiv exprimiert (Thery et al., 1990; Chang et al., 1994). Während der zugehörige MCSF-Rezeptor (MCSFR, CD 115) ursprünglich nur auf Mikroglia vermutet wurde (Raivich et al., 1991; Raivich et al., 1998), konnte seine Existenz kürzlich auch auf Neuronen nachgewiesen werden (Wang et al., 1999). Obwohl die Aussagen über vermehrte Expression von MCSF nach verschiedenen pathologischen Stimuli etwas differieren (Hulkower et al., 1993; Du et al., 1997; Fedoroff et al., 1997; Streit et al., 1998; Raivich et al., 1998; Takeuchi et al., 2001), kommt es bei allen bislang studierten Pathomechanismen zu einer starken und selektiven Induktion des MCSF-Rezeptors (Raivich et al., 1991; Hulkower et al., 1993; Akiyama et al., 1994; Raivich et al., 1998).

Durch die Verwendung osteopetrotischer Mäuse, die eine natürliche Frameshift-Mutation in dem für MCSF kodierenden Gen tragen, konnten weitere Erkenntnisse über die Rolle von MCSF bei der Aktivierung von Mikroglia gewonnen werden (Yoshida et al., 1990). Diese Mutation führt zu einer völligen Abwesenheit des Faktors in homozygoten Tieren (Wiktor-Jedrzejczak et al., 1990). Man kann eine Verringerung der Proliferation der Mikroglia um 70-80%, eine stark beeinträchtigte Expression von Oberflächenmarkern der frühen Aktivierungsstadien ($\alpha\text{M}\beta 2$ -Integrin, MCSFR; siehe 4.9) sowie ultrastrukturelle Veränderungen beobachten, was einen schweren Defekt in der

allgemeinen Aktivierungskaskade bedeutet (Raivich et al., 1994a; Raivich et al., 1996; Sasaki et al., 2000). Dies führt bei Ischämie zu einer Vergrößerung des Infarktvolumens. Nach Applikation von rekombinantem MCSF aber kommt es zur Aktivierung der Mikroglia und einer Aufhebung der Zunahme des Infarktvolumens (Berezovskaya et al., 1995).

4.11 MCSF-Expression bei der fokalen Kälteläsion

In dieser Studie konnte keine Erhöhung der MCSF-Expression zu den untersuchten Zeitpunkten nach fokaler Kälteläsion des Kortex nachgewiesen werden, weder im Nekrosegewebe noch in der angrenzenden Penumbra. Die Expression im entfernten gesunden Gewebe blieb konstant. Dies erscheint überraschend, muss doch bei dem Ausmaß der zugefügten Läsion und der üblicherweise hohen Sensitivität dieser Zellen von einer Aktivierung der Mikroglia mit Expression des Faktors im perifokalen Bereich ausgegangen werden. Angesichts der Veränderungen der Nekrose und Penumbra 8 Stunden nach Trauma, die allerdings nicht signifikant sind, kann es aber durchaus vor diesem ersten Messzeitpunkt zu einer Erhöhung der Expression von MCSF gekommen sein. Als potentestes Mitogen der Mikroglia erscheint eine akute Erhöhung wahrscheinlich, allerdings auch eine längerfristige Erhöhung des Expressionsniveaus. Takeuchi et al. konnten zeigen, dass die MCSF-Expression im umgebenden Gewebe nach stereotaktischer Injektion von Ethanol in das Corpus Striatum biphasisch erhöht ist, mit einer akuten Spitze in der ersten Stunde und einer zweiten breiten von 6 bis 72 Stunden nach Injektion (Takeuchi et al., 2001). Über die Expression in der Akutphase kann auf Grund der vorliegenden Daten keine Aussage getroffen werden, ein Anstieg im weiteren Verlauf wurde nicht beobachtet. Raivich et al. konnten bei peripherer Axotomie des Fazialisnervs erst im Bereich von Tagen eine erhöhte Expression von MCSFR beobachten, wobei MCSF selber in seiner konstitutiven Menge normal weiter exprimiert wurde (Raivich et al., 1998). Die Regulierung des Rezeptors wurde hier nicht untersucht.

Auffallend bei den vorliegenden Ergebnissen ist eine gemessene Erhöhung der MCSF-Expression in der Sham-operierten Population 168 Stunden nach Trauma, die allerdings nicht signifikant ausfiel. Bei diesen drei Tieren wurde sowohl ipsi- als auch kontralateral in allen drei Gewebsarealen eine Erhöhung festgestellt. Die Tatsache, dass diese auch im kontralateralen Gewebe gemessen wurde, als auch die kleine Gruppengröße ließ uns von einem Artefakt ausgehen.

5 Zusammenfassung

Die beim Schädel-Hirntrauma auftretenden pathophysiologischen Prozesse, das Hirnödem, Blutungen, Störungen der Mikrozirkulation und des Hirnstoffwechsels zusammen mit der Freisetzung und Akkumulation von neurotoxischen Mediatoren im Gewebe führen im posttraumatischen Verlauf zum weiteren Untergang von zunächst vitalem Hirnparenchym im perifokalen Bereich. Von experimentellen Befunden ausgehend, dass eine traumatische Hirnparenchymnekrose sich innerhalb von 24 Stunden bei Kaninchen um 300%, bei Ratten um 45% ausdehnt, wurden die vorliegenden Untersuchungen durchgeführt, um das Phänomen dieses Wachstums auch bei der Maus zu bestätigen und dann dessen Dynamik im zeitlichen Verlauf zu charakterisieren. Nach Etablierung des Anästhesieverfahrens wurde zur Induktion einer reproduzierbaren Nekrose das Modell der fokalen Kälteläsion auf die Maus übertragen und die geeigneten Parameter zur Applikation der Primärläsion ermittelt. Das Gehirn der Versuchstiere wurde zu definierten Überlebenszeitpunkten perfusionsfixiert und für die histomorphometrische Analyse präpariert.

In einer weiteren Studie wurde, durch Entnahme frischer Gewebeproben aus definierten Kortexarealen (Nekrose, Penumbra, entferntes gesundes Gewebe) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Läsion, Isolierung der RNA und nachfolgende Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion, die Expression des Zytokins *Macrophage Colony Stimulating Factor* untersucht.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

1. Das Anästhesieverfahren mit einer Maskeninhalationsnarkose aus Halothan, 70% Lachgas und 30% Sauerstoff, wie unter 2.2.1 beschrieben, gewährleistet stabile physiologische Parameter für den erforderlichen Zeitraum von 30 Minuten- sogar bis zu 75 Minuten lang (siehe 3.1 und 4.1.2).
2. Die optimale Größe der kortikalen Primärläsion, definiert mit einer Tiefenausdehnung von zwei Dritteln der Kortextiefe, lässt sich mit einer Sonde von 1,5 Millimeter Durchmesser und einer Applikationsdauer von 4 Sekunden erreichen. Das Primärvolumen beträgt $1,30 \pm 0,12 \text{ mm}^3$ bzw. $1,44 \pm 0,16 \text{ mm}^3$ (siehe 3.2.3, 3.3.1, 3.3.2 und 4.5).
3. Diese Standardläsion führt nach 24 Stunden zu einer maximalen Ausdehnung der Parenchymnekrose auf 140-160 % ihres initialen Volumens (siehe 3.3.1, 3.3.2 und 4.5) .

4. Die Nekrose breitet sich gleichmäßig in alle Richtungen aus, sowohl in die Tiefe als auch horizontal im Randbereich.
5. Ein Großteil des Nekrosewachstums erfolgt in den ersten 4 Stunden. Diesem schnellen anfänglichen Wachstum und der anschließend kontinuierlichen Expansion können unterschiedliche Mechanismen zugrunde liegen (siehe 4.7, 4.10 und 4.11).
6. Nach 24 Stunden schrumpft die Nekrose kontinuierlich über den weiteren Beobachtungszeitraum bis 168 Stunden nach Läsion zusammen (siehe 4.5).
7. Weder im Nekroseareal, noch im perinekrotischen Bereich und gesunden Gewebe lässt sich zu den vier untersuchten Zeitpunkten nach Trauma statistisch signifikant eine vermehrte Expression von MCSF nachweisen.
8. Eine Tendenz bezüglich vermehrter Expression von MCSF kann 8 Stunden nach Trauma festgestellt werden.
9. Durch die hochgradige Standardisierung und Reproduzierbarkeit ist das experimentelle Modell - auch bei Verwendung von *knock-out*-Stämmen - bevorzugt geeignet für Untersuchungen von am Nekrosewachstum beteiligten Pathomechanismen.

6 Klinischer Bezug - Ausblick

Die Aufklärung der zum sekundären Nekrosewachstum führenden Prozesse hat große klinische Bedeutung. Experimentelle wie klinische Absicht ist, das Wachstum der traumatischen Nekrose therapeutisch zu verhindern. Grundsätzlich sollte in Zukunft die Prognose von Patienten mit Schädel-Hirntrauma nur noch von Art und Ausmaß des Primärschadens abhängen, nicht mehr vom sekundären Hirnschaden. Wie bereits diskutiert, sprechen experimentelle Untersuchungen für eine Vielzahl von Mechanismen beim sekundären Hirnschaden, die zerebrale Ischämie, der intrakranielle Druck und Freisetzung/Bildung neurotoxischer Mediatoren stehen jedoch wahrscheinlich im Vordergrund. Hochauflösende Messungen der zerebralen Durchblutung (PET, SPECT, Xenon-CT) zeigen besonders häufig eine ausgeprägte perifokale Durchblutungsabnahme bei Patienten mit Kontusionen (Bullock et al., 1992b; Schroder et al., 1995). Die Zonen der Minderdurchblutung dehnen sich dabei über die morphologisch sichtbare Läsion aus als Indiz für die Einbeziehung des perifokalen Hirngewebes. Untersuchungen mit Mikrodialyse von Patienten mit Subarachnoidalblutung (Persson et al., 1996) oder Schädel-Hirntrauma (Bullock et al., 1995) zeigten einen Anstieg von exzitotoxischen Aminosäuren und Laktat im Extrazellulärraum des Hirngewebes. Die Veränderungen waren bei Patienten mit Kontusionen und Episoden mit sekundärer Ischämie besonders ausgeprägt.

In den letzten Jahren erzielte experimentelle Ergebnisse und klinische Beobachtungen haben zu Therapieansätzen geführt, die in umfangreichen multizentrischen klinischen Studien geprüft werden. Dazu gehören Glutamatantagonisten (Bullock et al., 1992a), Inhibitoren der Lipidperoxidation wie Tirilazad (Marshall et al., 1998) sowie Hypothermie (Clifton et al., 1993). Eine Verbesserung der Prognose nach Schädel-Hirntrauma bzw. Hemmung des zerebralen Sekundärschadens ist jedoch damit bisher nicht erreicht worden. Um diesem Ziel näher zu kommen, müssen alle wichtigen am sekundären Hirnschaden beteiligten Mechanismen identifiziert werden. Tierexperimentelle Untersuchungen sind dafür unverzichtbar, insbesondere für die Aufklärung sofort einsetzender pathophysiologischer Prozesse, die der klinischen Untersuchung nicht zugänglich sind. Mit Hilfe gut reproduzierbarer Modelle können wichtige Manifestationen des primären Hirnschadens imitiert werden.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde das bereits lange verwendete und anerkannte Modell der fokalen Kälteläsion bei einer neuen Tierspezies etabliert - der Maus. Mit ihm ist es möglich, das sekundäre Wachstum einer Hirnparenchymnekrose präzise zu quantifizieren. Die Läsion entspricht einer Nekrose des Kortex mit Blut-Hirnschrankenstörung. Das Modell zeichnet sich durch gute

Reproduzierbarkeit und Fehlen von systemischen Nebenwirkungen aus. Es ist daher besonders geeignet, mit geeigneten Monitoringverfahren die Erfassung von Veränderungen verschiedenster Parameter mit dem Verhalten des Parenchymschadens *in vivo* zu korrelieren, sowie die Wirksamkeit therapeutischer Interventionen zu überprüfen.

Durch die nun eröffnete Möglichkeit der Verwendung von knock-out Mäusen, kann in Zukunft die Rolle einzelner Faktoren in diesem komplexen Geschehen präziser erforscht werden, in Ergänzung zu den etablierten molekularbiologischen Methoden.

Ein erster Schritt zur Beleuchtung der Rolle von aktivierter Mikroglia beim sekundären Nekrosewachstum wurde mit der Untersuchung zur Expression des Zytokins *Macrophage Colony Stimulating Factor* unternommen. Dabei konnte keine Erhöhung der Expression im Verlauf der Zeit nach Trauma in den verschiedenen Kortexarealen nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen sind vonnöten, um die Charakteristik der Mikrogliaaktivierung im vorliegenden Modell zu beschreiben. Dabei sind neben einer zusätzlichen Erfassung der MCSF-Expression in den ersten 8 Stunden nach Trauma und etwaig der Expression des zugehörigen Rezeptors auch immunhistologische Studien im zeitlichen Verlauf zum Nachweis aktivierter Mikroglia notwendig, um dann in einem weiteren Schritt die Dynamik der Nekroseexpansion bei verminderter/fehlender Mikrogliaaktivierung im Knock-out Modell untersuchen zu können. Auch andere Faktoren sollten in diesem Geschehen näher betrachtet werden, sowie die Funktion anderer Zelllinien, vor allem der Astroglia.

7 Literaturverzeichnis

- Adams, H., Mitchell, D.E., Graham, D.I., Doyle, D.** (1977). Diffuse Brain Damage of Immediate Impact Type. Its Relationship to 'Primary Brain-Stem Damage' in Head Injury. *Brain* 100:489-502
- Adams, J.H.** (1984). Head Injury. In *Greenfield's Neuropathology* (Hume-Adams, J., Corsellis, J.A.N., Duchen, L.W., eds.), S. 85-124. Edward Arnold, London, 5. Edition
- Akiyama, H., Nishimura, T., Kondo, H., Ikeda, K., Hayashi, Y., McGeer, P.L.** (1994). Expression of the Receptor for Macrophage Colony Stimulating Factor by Brain Microglia and Its Upregulation in Brains of Patients With Alzheimer's Disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Brain Res* 639:171-174
- Allen, I.V., Scott, R., Tanner, J.A.** (1982). Experimental High-Velocity Missile Head Injury. *Injury* 14:183-193
- Alonso, S., Minty, A., Bourlet, Y., Buckingham, M.** (1986). Comparison of Three Actin-Coding Sequences in the Mouse; Evolutionary Relationships Between the Actin Genes of Warm-Blooded Vertebrates. *J Mol Evol* 23:11-22
- Ames, A., III, Tsukada, Y., Nesbett, F.B.** (1967). Intracellular Cl⁻, Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, and P in Nervous Tissue; Response to Glutamate and to Changes in Extracellular Calcium. *J Neurochem* 14:145-159
- Anderson, T.E.** (1982). A Controlled Pneumatic Technique for Experimental Spinal Cord Contusion. *J Neurosci Methods* 6:327-333
- Andrews, P.J., Piper, I.R., Dearden, N.M., Miller, J.D.** (1990). Secondary Insults During Intrahospital Transport of Head-Injured Patients. *Lancet* 335:327-330

- Andrian, U.v.** (1992). Das experimentelle vasogene Hirnödeme der Ratte: Behandlungseffekte von Dexamethason, Eglin C, Glutamat und Phosphoserin. Dissertation, Med. Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität, München
- Astrup, J., Siesjo, B.K., Symon, L.** (1981). Thresholds in Cerebral Ischemia - the Ischemic Penumbra. *Stroke* 12:723-725
- Avendano, C., Roda, J.M., Carceller, F., Diez-Tejedor, E.** (1995). Morphometric Study of Focal Cerebral Ischemia in Rats: a Stereological Evaluation. *Brain Res* 673:83-92
- Baethmann, A.** (1979). [Brain Edema Due to Mechanical, Circulatory, Osmotic, Metabolic and Toxic Causes]. *Klin Anasthesiol Intensivther* 19:56-75
- Baethmann, A.** (1985). Steroids and brain function. In *Brain Insults in Infants and Children: Pathophysiology, Diagnosis and Acute Management* (James, H.E., Anas, N.G., Perkin, R.M., eds.), S. Grune & Stratton, Orlando
- Baethmann, A., Kempfski, O.** (1992). Biochemical factors and mechanisms of secondary brain damage in cerebral ischemia and trauma. Neurochemical Correlates of Cerebral Ischemia. In *Advances in Neurochemistry* (Bazan, N.G., Braquet, P., Ginsberg, M.D., eds.), S. Plenum Press, New York, 7. Edition
- Baethmann, A., Kempfski, O., Plesnila, N., Staub, F.** (1996). Mechanisms of Secondary Brain Damage in Cerebral Ischemia and Trauma. *Acta Neurochir Suppl* 66
- Baethmann, A., Kempfski, O., Unterberg, A., Maier-Hauff, K., Lange, M., Schürer, L.** (1982). [Origin and Therapy of Secondary Cerebral Damage]. *MMW Münch Med Wochenschr* 124:941-944
- Baethmann, A., Maier-Hauff, K., Kempfski, O., Unterberg, A., Wahl, M.** (1983). Therapeutic Considerations in Blood-Brain Barrier Disturbances. *Acta Neuropathol Suppl (Berl)* 8:119-

- Baethmann, A., Maier-Hauff, K., Kempfski, O., Unterberg, A., Wahl, M., Schürer, L.** (1988). Mediators of Brain Edema and Secondary Brain Damage. *Crit Care Med* 16:972-978
- Baethmann, A., Maier-Hauff, K., Schürer, L., Lange, M., Guggenbichler, C., Vogt, W., Jacob, K., Kempfski, O.** (1989). Release of Glutamate and of Free Fatty Acids in Vasogenic Brain Edema. *J Neurosurg* 70:578-591
- Baethmann, A., Oettinger, W., Rothenfusser, W., Kempfski, O., Unterberg, A., Geiger, R.** (1980). Brain Edema Factors: Current State With Particular Reference to Plasma Constituents and Glutamate. *Adv Neurol* 28:171-195
- Baethmann, A., Wirth, A., Schlesinger-Raab, A.** (2002). Prospective System Analysis of the Pre- and Early Hospital Care in Severe Head Injury in Bavaria at a Population-Based Level. *Eur Surg Res* 34:42-46
- Balthasar, K.** (1957). Gezielte Kälteschäden in der Großhirnrinde der Katze. *Dtsch Z Nervenheilkd* 176:173-199
- Banati, R.B., Gehrman, J., Czech, C., Monning, U., Jones, L.L., König, G., Beyreuther, K., Kreutzberg, G.W.** (1993a). Early and Rapid De Novo Synthesis of Alzheimer Beta A4-Amyloid Precursor Protein (APP) in Activated Microglia. *Glia* 9:199-210
- Banati, R.B., Gehrman, J., Schubert, P., Kreutzberg, G.W.** (1993b). Cytotoxicity of Microglia. *Glia* 7:111-118
- Banati, R.B., Gehrman, J., Wiessner, C., Hossman, K.A., Kreutzberg, G.W.** (1995). Glial Expression of the Beta-Amyloid Precursor Protein (APP) in Global Ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 15:647-654

- Barbee, R.W., Perry, B.D., Re, R.N., Murgo, J.P.** (1992). Microsphere and Dilution Techniques for the Determination of Blood Flows and Volumes in Conscious Mice. *Am J Physiol* 263:R728-R733
- Barone, F.C., Clark, R.K., Feuerstein, G., Lenkinski, R.E., Sarkar, S.K.** (1991). Quantitative Comparison of Magnetic Resonance Imaging (MRI) and Histologic Analyses of Focal Ischemic Damage in the Rat. *Brain Res Bull* 26:285-291
- Barone, F.C., Knudsen, D.J., Nelson, A.H., Feuerstein, G.Z., Willette, R.N.** (1993). Mouse Strain Differences in Susceptibility to Cerebral Ischemia Are Related to Cerebral Vascular Anatomy. *J Cereb Blood Flow Metab* 13:683-692
- Bazan, N.G., Rodriguez de Turco, E.B., Allan, G.** (1995). Mediators of Injury in Neurotrauma: Intracellular Signal Transduction and Gene Expression. *J Neurotrauma* 12:791-814
- Berezovskaya, O., Maysinger, D., Fedoroff, S.** (1995). The Hematopoietic Cytokine, Colony-Stimulating Factor 1, Is Also a Growth Factor in the CNS: Congenital Absence of CSF-1 in Mice Results in Abnormal Microglial Response and Increased Neuron Vulnerability to Injury. *Int J Dev Neurosci* 13:285-299
- Bernstein, A., Breitman, M.** (1989). Genetic Ablation in Transgenic Mice. *Mol Biol Med* 6:523-530
- Bernstein, S.E.** (1966). Physiological characteristics. In *Biology of the Laboratory Mouse* (Green, E.L., ed.), S. 337-348. McGraw-Hill, New York
- Bestetti, G.** (1978). [Cerebral Edema and Cerebral Cortex Necrosis in Cattle. Light and Electron Microscopy Studies]. *Schweiz Arch Tierheilkd* 120:433-445
- Blinzinger, K., Kreutzberg, G.** (1968). Displacement of Synaptic Terminals From Regenerating Motoneurons by Microglial Cells. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 85:145-157

- Bose, B., Osterholm, J.L., Berry, R.** (1984). A Reproducible Experimental Model of Focal Cerebral Ischemia in the Cat. *Brain Res* 311:385-391
- Bredesen, D.E.** (1995). Neural Apoptosis. *Ann Neurol* 38:839-851
- Brierley, J.B., Meldrum, B.S., Brown, A.W.** (1973). The Threshold and Neuropathology of Cerebral "Anoxic-Ischemic" Cell Change. *Arch Neurol* 29:367-374
- Brown, A.W., Brierley, J.B.** (1968). The Nature, Distribution and Earliest Stages of Anoxic-Ischaemic Nerve Cell Damage in the Rat Brain As Defined by the Optical Microscope. *Br J Exp Pathol* 49:87-106
- Bruce, A.J., Boling, W., Kindy, M.S., Peschon, J., Kraemer, P.J., Carpenter, M.K., Holtsberg, F.W., Mattson, M.P.** (1996). Altered Neuronal and Microglial Responses to Excitotoxic and Ischemic Brain Injury in Mice Lacking TNF Receptors. *Nat Med* 2:788-794
- Bullock, R.** (1995). Strategies for Neuroprotection With Glutamate Antagonists. Extrapolating From Evidence Taken From the First Stroke and Head Injury Studies. *Ann N Y Acad Sci* 765:272-278
- Bullock, R., Butcher, S.P., Chen, M.H., Kendall, L., McCulloch, J.** (1991). Correlation of the Extracellular Glutamate Concentration With Extent of Blood Flow Reduction After Subdural Hematoma in the Rat. *J Neurosurg* 74:794-802
- Bullock, R., Fujisawa, H.** (1992). The Role of Glutamate Antagonists for the Treatment of CNS Injury. *J Neurotrauma* 9 Suppl 2:S443-S462
- Bullock, R., Kuroda, Y., Teasdale, G.M., McCulloch, J.** (1992a). Prevention of Post-Traumatic Excitotoxic Brain Damage With NMDA Antagonist Drugs: a New Strategy for the Nineties. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 55:49-55

- Bullock, R., Sakas, D., Patterson, J., Wyper, D., Hadley, D., Maxwell, W., Teasdale, G.M.** (1992b). Early Post-Traumatic Cerebral Blood Flow Mapping: Correlation With Structural Damage After Focal Injury. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 55:14-17
- Bullock, R., Zauner, A., Myseros, J.S., Marmarou, A., Woodward, J.J., Young, H.F.** (1995). Evidence for Prolonged Release of Excitatory Amino Acids in Severe Human Head Trauma. Relationship to Clinical Events. *Ann N Y Acad Sci* 765:290-297
- Butcher, S.P., Bullock, R., Graham, D.I., McCulloch, J.** (1990). Correlation Between Amino Acid Release and Neuropathologic Outcome in Rat Brain Following Middle Cerebral Artery Occlusion. *Stroke* 21:1727-1733
- Cammermeyer, J.** (1978). Is the Solitary Dark Neuron a Manifestation of Postmortem Trauma to the Brain Inadequately Fixed by Perfusion? *Histochemistry* 56:97-115
- Carbonell, W.S., Maris, D.O., McCall, T., Grady, M.S.** (1998). Adaptation of the Fluid Percussion Injury Model to the Mouse. *J Neurotrauma* 15:217-229
- Chang, L.W.** (1977). Pathologic Changes Following Chronic Exposures to Halothane: a Review. *Environ Health Perspect* 21:195-210
- Chang, R.C., Plesnila, N., Ringel, F., Gronlinger, C., Staub, F., Baethmann, A.** (1997). Role of Protein Kinase C in Acidosis Induced Glial Swelling--Current Understanding. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 70:225-227
- Chang, Y., Albright, S., Lee, F.** (1994). Cytokines in the Central Nervous System: Expression of Macrophage Colony Stimulating Factor and Its Receptor During Development. *J Neuroimmunol* 52:9-17
- Choi, D.W.** (1987). Ionic Dependence of Glutamate Neurotoxicity. *J Neurosci* 7:369-379

- Choi, D.W., Koh, J.Y., Peters, S.** (1988). Pharmacology of Glutamate Neurotoxicity in Cortical Cell Culture: Attenuation by NMDA Antagonists. *J Neurosci* 8:185-196
- Chopp, M., Li, Y.** (1996). Apoptosis in Focal Cerebral Ischemia. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 66:21-26
- Chopp, M., Li, Y., Jiang, N., Zhang, R.L., Probst, J.** (1996). Antibodies Against Adhesion Molecules Reduce Apoptosis After Transient Middle Cerebral Artery Occlusion in Rat Brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 16:578-584
- Clark, W.M., Rinker, L.G., Lessov, N.S., Hazel, K., Eckenstein, F.** (1999). Time Course of IL-6 Expression in Experimental CNS Ischemia. *Neurol Res* 21:287-292
- Clasen, R.A., Brown, D.V., Leavitt, S., Hass, G.M.** (1953). The Production by Liquid Nitrogen of Acute Closed Cerebral Lesions. *Surg Gynecol Obstet* 96:605-616
- Clausen, T., Bullock, R.** (2001). Medical Treatment and Neuroprotection in Traumatic Brain Injury. *Curr Pharm Des* 7:1517-1532
- Clendenon, N.R., Allen, N., Ito, T., Gordon, W.A., Yashon, D.** (1978). Response of Lysosomal Hydrolases of Dog Spinal Cord and Cerebrospinal Fluid to Experimental Trauma. *Neurology* 28:78-84
- Clifton, G.L., Allen, S., Barrodale, P., Plenger, P., Berry, J., Koch, S., Fletcher, J., Hayes, R.L., Choi, S.C.** (1993). A Phase II Study of Moderate Hypothermia in Severe Brain Injury. *J Neurotrauma* 10:263-271
- Cohadon, F., Rigoulet, M., Averet, N., Arrigoni, E.** (1989). Membrane Damage in Acute Brain Trauma. *Ital J Neurol Sci* 10:147-155
- Cruz-Orive, L.M., Myking, A.O.** (1981). Stereological Estimation of Volume Ratios by

Systematic Sections. *J Microsc* 122:143-157

Curcio, C.A., Sloan, K.R., Jr. (1986). Computer-Assisted Morphometry Using Video-Mixed Microscopic Images and Computer Graphics. *Anat Rec* 214:329-337

Curtis, D.R., Watkins, J.C. (1963). Amino Acids With Strong Excitatory Actions on Mammalian Neurones. *J Physiol* 166:1-14

Dalkara, T., Irikura, K., Huang, Z., Panahian, N., Moskowitz, M.A. (1995). Cerebrovascular Responses Under Controlled and Monitored Physiological Conditions in the Anesthetized Mouse. *J Cereb Blood Flow Metab* 15:631-638

Del Rio-Hortega, P. (1932). Microglia. In *Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System* (Penfield, W., ed.), S. 481-534. Hoeber, New York

Dhillon, H.S., Dose, J.M., Scheff, S.W., Prasad, M.R. (1997). Time Course of Changes in Lactate and Free Fatty Acids After Experimental Brain Injury and Relationship to Morphologic Damage. *Exp Neurol* 146:240-249

Dietrich, W.D., Ginsberg, M.D., Busto, R., Watson, B.D. (1986). Photochemically Induced Cortical Infarction in the Rat. 1. Time Course of Hemodynamic Consequences. *J Cereb Blood Flow Metab* 6:184-194

Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., Traynelis, S.F. (1999). The Glutamate Receptor Ion Channels. *Pharmacol Rev* 51:7-61

Dixon, C.E., Clifton, G.L., Lighthall, J.W., Yaghmai, A.A., Hayes, R.L. (1991). A Controlled Cortical Impact Model of Traumatic Brain Injury in the Rat. *J Neurosci Methods* 39:253-262

Dixon, C.E., Lyeth, B.G., Povlishock, J.T., Findling, R.L., Hamm, R.J., Marmarou, A.,

- Young, H.F., Hayes, R.L.** (1987). A Fluid Percussion Model of Experimental Brain Injury in the Rat. *J Neurosurg* 67:110-119
- Du, Y.S., Zhu, H., Fu, J., Yan, S.F., Roher, A., Tourtellotte, W.W., Rajavashisth, T., Chen, X., Godman, G.C., Stern, D., Schmidt, A.M.** (1997). Amyloid-Beta Peptide-Receptor for Advanced Glycation Endproduct Interaction Elicits Neuronal Expression of Macrophage-Colony Stimulating Factor: a Proinflammatory Pathway in Alzheimer Disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:5296-5301
- Eggert, H.R., Kiessling, M., Kleihues, P.** (1985). Time Course and Spatial Distribution of Neodymium: Yttrium-Aluminum-Garnet (Nd:YAG) Laser-Induced Lesions in the Rat Brain. *Neurosurgery* 16:443-448
- Eke, A., Conger, K.A., Anderson, M., Garcia, J.H.** (1990). Histologic Assessment of Neurons in Rat Models of Cerebral Ischemia. *Stroke* 21:299-304
- Elkabes, S., DiCicco-Bloom, E.M., Black, I.B.** (1996). Brain Microglia/Macrophages Express Neurotrophins That Selectively Regulate Microglial Proliferation and Function. *J Neurosci* 16:2508-2521
- Eriskat, J.** (2000). Wachstumskinetik der Parenchymnekrose des Gehirns nach fokalem Trauma. Dissertation, Med. Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität, München
- Eriskat, J., Schürer, L., Kempfski, O., Baethmann, A.** (1994). Growth Kinetics of a Primary Brain Tissue Necrosis From a Focal Lesion. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 60:425-427
- Faden, A.I., Demediuk, P., Panter, S.S., Vink, R.** (1989). The Role of Excitatory Amino Acids and NMDA Receptors in Traumatic Brain Injury. *Science* 244:798-800
- Fedoroff, S., Berezovskaya, O., Maysinger, D.** (1997). Role of Colony Stimulating Factor-1 in Brain Damage Caused by Ischemia. *Neurosci Biobehav Rev* 21:187-191

- Feeney, D.M., Boyeson, M.G., Linn, R.T., Murray, H.M., Dail, W.G.** (1981). Responses to Cortical Injury: I. Methodology and Local Effects of Contusions in the Rat. *Brain Res* 211:67-77
- Foda, M.A., Marmarou, A.** (1994). A New Model of Diffuse Brain Injury in Rats. Part II: Morphological Characterization. *J Neurosurg* 80:301-313
- Frei, H.J., Wallenfang, T., Poll, W., Reulen, H.J., Schubert, R., Brock, M.** (1973). Regional Cerebral Blood Flow and Regional Metabolism in Cold Induced Oedema. *Acta Neurochir (Wien)* 29:15-28
- Frerichs, K.U., Lindsberg, P.J., Hallenbeck, J.M., Feuerstein, G.Z.** (1990). Platelet-Activating Factor and Progressive Brain Damage Following Focal Brain Injury. *J Neurosurg* 73:223-233
- Friedrich, D.H., Plesnila, N., Eriskat, J., Stoffel, M., Baethmann, A.** (2000). Cerebral Blood Flow and the Secondary Growth of Brain Tissue Necrosis After Trauma. *Acta Neurochir Suppl* 76:257-259
- Frohlich, J., Rummelfanger, H., Pohle, W.** (1982). [Autoradiographic Detection of ³H-Labelled Glycoproteins in "Light" and "Dark" Neurons of Gray Matter of the Rat Brain Following Intraventricular Application of ³H-Fucose. Preliminary Report]. *Acta Histochem* 71:153-160
- Gale, S.D., Johnson, S.C., Bigler, E.D., Blatter, D.D.** (1995). Trauma-Induced Degenerative Changes in Brain Injury: a Morphometric Analysis of Three Patients With Preinjury and Postinjury MR Scans. *J Neurotrauma* 12:151-158
- Garcia, J.H., Lossinsky, A.S., Kauffman, F.C., Conger, K.A.** (1978). Neuronal Ischemic Injury: Light Microscopy, Ultrastructure and Biochemistry. *Acta Neuropathol (Berl)* 43:85-95

- Garcia, J.H., Mitchem, H.L., Briggs, L., Morawetz, R., Hudetz, A.G., Hazelrig, J.B., Halsey, J.H., Jr., Conger, K.A.** (1983). Transient Focal Ischemia in Subhuman Primates. Neuronal Injury As a Function of Local Cerebral Blood Flow. *J Neuropathol Exp Neurol* 42:44-60
- Garcia, J.H., Wagner, S., Liu, K.F., Hu, X.J.** (1995). Neurological Deficit and Extent of Neuronal Necrosis Attributable to Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats. Statistical Validation. *Stroke* 26:627-634
- Garman, R.H.** (1990). Artifacts in Routinely Immersion Fixed Nervous Tissue. *Toxicol Pathol* 18:149-153
- Gehrmann, J., Matsumoto, Y., Kreutzberg, G.W.** (1995). Microglia: Intrinsic Immuneffector Cell of the Brain. *Brain Res Brain Res Rev* 20:269-287
- Gehrmann, J., Mies, G., Bonnekoh, P., Banati, R., Iijima, T., Kreutzberg, G.W., Hossmann, K.A.** (1993). Microglial Reaction in the Rat Cerebral Cortex Induced by Cortical Spreading Depression. *Brain Pathol* 3:11-17
- Gennarelli, T.A., Champion, H.R., Sacco, W.J., Copes, W.S., Alves, W.M.** (1989). Mortality of Patients With Head Injury and Extracranial Injury Treated in Trauma Centers. *J Trauma* 29:1193-1201
- Gibson, P.H.** (1983). A Quantitative Method for Comparing the Distribution of Cerebral Trauma in Closed-Head Injuries With and Without Tentorial Herniation. *Neuropathol Appl Neurobiol* 9:135-148
- Globus, M.Y., Alonso, O., Dietrich, W.D., Busto, R., Ginsberg, M.D.** (1995). Glutamate Release and Free Radical Production Following Brain Injury: Effects of Posttraumatic Hypothermia. *J Neurochem* 65:1704-1711
- Go, K.G.** (1986). Disturbances of extracellular homeostasis after a primary insult as a mechanism

of secondary brain damage. In *Mechanisms of Secondary Brain Damage* (Baethmann, A., Go, K.G., Unterberg, A., eds.), S. 127-137. Plenum Press, New York, London

Go, K.G. (1991). *Cerebral pathophysiology. An integral approach with some emphasis on clinical implications*. S. 208-276. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1. Edition.

Graeber, M.B., Streit, W.J., Kreutzberg, G.W. (1988a). The Microglial Cytoskeleton: Vimentin Is Localized Within Activated Cells in Situ. *J Neurocytol* 17:573-580

Graeber, M.B., Tetzlaff, W., Streit, W.J., Kreutzberg, G.W. (1988b). Microglial Cells but Not Astrocytes Undergo Mitosis Following Rat Facial Nerve Axotomy. *Neurosci Lett* 85:317-321

Graham, D.I., Adams, J.H., Doyle, D. (1978). Ischaemic Brain Damage in Fatal Non-Missile Head Injuries. *J Neurol Sci* 39:213-234

Graham, D.I., de Jesus, P.V., Pleasure, D.E., Gonatas, N.K. (1976). Triethyltin Sulfate-Induced Neuropathy in Rats. Electrophysiologic, Morphologic, and Biochemical Studies. *Arch Neurol* 33:40-48

Grome, J.J., Gojowczyk, G., Hofmann, W., Graham, D.I. (1988). Quantitation of Photochemically Induced Focal Cerebral Ischemia in the Rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 8:89-95

Gundersen, H.J., Bendtsen, T.F., Korbo, L., Marcussen, N., Moller, A., Nielsen, K., Nyengaard, J.R., Pakkenberg, B., Sorensen, F.B., Vesterby, A. (1988). Some New, Simple and Efficient Stereological Methods and Their Use in Pathological Research and Diagnosis. *APMIS* 96:379-394

Hammersen, F., Unterberg, A., Hammersen, E. (1988). The Ultrastructural Basis of Interactions Between Leukocytes and Endothelium. *Adv Exp Med Biol* 242:77-84

- Hanstock, C.C., Boisvert, D.P., Bendall, M.R., Allen, P.S.** (1988). In Vivo Assessment of Focal Brain Lactate Alterations With NMR Proton Spectroscopy. *J Cereb Blood Flow Metab* 8:208-214
- Hara, H., Friedlander, R.M., Gagliardini, V., Ayata, C., Fink, K., Huang, Z., Shimizu-Sasamata, M., Yuan, J., Moskowitz, M.A.** (1997). Inhibition of Interleukin 1beta Converting Enzyme Family Proteases Reduces Ischemic and Excitotoxic Neuronal Damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:2007-2012
- Harvey, J.A., McIlwain, H.** (1968). Excitatory Acidic Amino Acids and the Cation Content and Sodium Ion Flux of Isolated Tissues From the Brain. *Biochem J* 108:269-274
- Hata, R., Mies, G., Wiessner, C., Fritze, K., Hesselbarth, D., Brinker, G., Hossmann, K.A.** (1998). A Reproducible Model of Middle Cerebral Artery Occlusion in Mice: Hemodynamic, Biochemical, and Magnetic Resonance Imaging. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:367-375
- Haug, H.** (1986). History of Neuromorphometry. *J Neurosci Methods* 18:1-17
- Henn, F.A., Goldstein, M.N., Hamberger, A.** (1974). Uptake of the Neurotransmitter Candidate Glutamate by Glia. *Nature* 249:663-664
- Hickey, W.F., Vass, K., Lassmann, H.** (1992). Bone Marrow-Derived Elements in the Central Nervous System: an Immunohistochemical and Ultrastructural Survey of Rat Chimeras. *J Neuropathol Exp Neurol* 51:246-256
- Hicks, R., Soares, H., Smith, D., McIntosh, T.** (1996). Temporal and Spatial Characterization of Neuronal Injury Following Lateral Fluid-Percussion Brain Injury in the Rat. *Acta Neuropathol (Berl)* 91:236-246
- Hollmann, M. Heinemann, S.** (1994). Cloned Glutamate Receptors. *Annu Rev Neurosci* 17:31-

- Hulkower, K., Brosnan, C.F., Aquino, D.A., Cammer, W., Kulshrestha, S., Guida, M.P., Rapoport, D.A., Berman, J.W.** (1993). Expression of CSF-1, C-Fms, and MCP-1 in the Central Nervous System of Rats With Experimental Allergic Encephalomyelitis. *J Immunol* 150:2525-2533
- Husz, T., Joo, F., Antal, A., Toldi, J.** (1992). Late Consequences of Cryogenic Brain Lesion in Rat; an Electrophysiological Study. *Neuroreport* 3:51-54
- Ingvar, M., Morgan, P.F., Auer, R.N.** (1988). The Nature and Timing of Excitotoxic Neuronal Necrosis in the Cerebral Cortex, Hippocampus and Thalamus Due to Flurothyl-Induced Status Epilepticus. *Acta Neuropathol (Berl)* 75:362-369
- Isayama, K., Pitts, L.H., Nishimura, M.C.** (1991). Evaluation of 2,3,5-Triphenyltetrazolium Chloride Staining to Delineate Rat Brain Infarcts. *Stroke* 22:1394-1398
- Jensen, M., Heber, U., Oettmeier, W.** (1981). Chloroplast Membrane Damage During Freezing: the Lipid Phase. *Cryobiology* 18:322-335
- Jones, T.H., Morawetz, R.B., Crowell, R.M., Marcoux, F.W., FitzGibbon, S.J., DeGirolami, U., Ojemann, R.G.** (1981). Thresholds of Focal Cerebral Ischemia in Awake Monkeys. *J Neurosurg* 54:773-782
- Kalimo, H., Garcia, J.H., Kamijyo, Y., Tanaka, J., Trump, B.F.** (1977). The Ultrastructure of "Brain Death". II. Electron Microscopy of Feline Cortex After Complete Ischemia. *Virchows Arch B Cell Pathol* 25:207-220
- Kalimo, H., Kaste, M., Haltia, M.** (1997). Vascular Diseases. In *Greenfield's Neuropathology* (Graham, D.I., Lantos, P.L., eds.), S. 315-396. Arnold, London, Sydney, Auckland, 6. Edition.

- Katayama, Y., Becker, D.P., Tamura, T., Hovda, D.A.** (1990). Massive Increases in Extracellular Potassium and the Indiscriminate Release of Glutamate Following Concussive Brain Injury. *J Neurosurg* 73:889-900
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R.** (1972). Apoptosis: a Basic Biological Phenomenon With Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics. *Br J Cancer* 26:239-257
- Kiefer, R., Streit, W.J., Toyka, K.V., Kreutzberg, G.W., Hartung, H.P.** (1995). Transforming Growth Factor-Beta 1: a Lesion-Associated Cytokine of the Nervous System. *Int J Dev Neurosci* 13:331-339
- Kingman, T.A., Mendelow, A.D., Graham, D.I., Teasdale, G.M.** (1988). Experimental Intracerebral Mass: Description of Model, Intracranial Pressure Changes and Neuropathology. *J Neuropathol Exp Neurol* 47:128-137
- Klatzo, I., Piraux, A., Laskowski, E.J.** (1958). The Relationship Between Edema, Blood-Brain Barrier and Tissue Elements in a Local Brain Injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 17:548-564
- Kloss, C.U., Kreutzberg, G.W., Raivich, G.** (1997). Proliferation of Ramified Microglia on an Astrocyte Monolayer: Characterization of Stimulatory and Inhibitory Cytokines. *J Neurosci Res* 49:248-254
- Kloss, C.U., Werner, A., Klein, M.A., Shen, J., Menuz, K., Probst, J.C., Kreutzberg, G.W., Raivich, G.** (1999). Integrin Family of Cell Adhesion Molecules in the Injured Brain: Regulation and Cellular Localization in the Normal and Regenerating Mouse Facial Motor Nucleus. *J Comp Neurol* 411:162-178
- Kreutzberg, G.W.** (1996). Microglia: a Sensor for Pathological Events in the CNS. *Trends Neurosci* 19:312-318
- Kristian, T., Siesjo, B.K.** (1998). Calcium in Ischemic Cell Death. *Stroke* 29:705-718

- Ladner, M.B., Martin, G.A., Noble, J.A., Wittman, V.P., Warren, M.K., McGrogan, M., Stanley, E.R.** (1988). CDNA Cloning and Expression of Murine Macrophage Colony-Stimulating Factor From L929 Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:6706-6710
- Lahiri, S.** (1975). Blood Oxygen Affinity and Alveolar Ventilation in Relation to Body Weight in Mammals. *Am J Physiol* 229:529-536
- Lampert, P., O'Brien, J., Garrett, R.** (1973). Hexachlorophene Encephalopathy. *Acta Neuropathol (Berl)* 23:326-333
- Laurent, J.P., Lawner, P., Simeone, F.A., Fink, E., Rorke, L.B.** (1982). Qualitative Measurement of Cerebral Infarction Using Ultraviolet Fluorescence. *Surg Neurol* 17:320-324
- Lees, G.J.** (1989). In Vivo and in Vitro Staining of Acidophilic Neurons As Indicative of Cell Death Following Kainic Acid-Induced Lesions in Rat Brain. *Acta Neuropathol (Berl)* 77:519-524
- Li, Y., Chopp, M., Jiang, N., Zhang, Z.G., Zaloga, C.** (1995). Induction of DNA Fragmentation After 10 to 120 Minutes of Focal Cerebral Ischemia in Rats. *Stroke* 26:1252-1257
- Li, Y., Powers, C., Jiang, N., Chopp, M.** (1998). Intact, Injured, Necrotic and Apoptotic Cells After Focal Cerebral Ischemia in the Rat. *J Neurol Sci* 156:119-132
- Lighthall, J.W.** (1988). Controlled Cortical Impact: a New Experimental Brain Injury Model. *J Neurotrauma* 5:1-15
- Lindgren, S. Rinder, L.** (1966). Experimental Studies in Head Injury. II. Pressure Propagation in "Percussion Concussion". *Biophysik* 3:174-180
- Lindsberg, P.J., Frerichs, K.U., Burris, J.A., Hallenbeck, J.M., Feuerstein, G.** (1991). Cortical

- Microcirculation in a New Model of Focal Laser-Induced Secondary Brain Damage. *J Cereb Blood Flow Metab* 11:88-98
- Ling, E.A., Wong, W.C.** (1993). The Origin and Nature of Ramified and Amoeboid Microglia: a Historical Review and Current Concepts. *Glia* 7:9-18
- Lipton, S.A.** (1993). Molecular Mechanisms of Trauma-Induced Neuronal Degeneration. *Curr Opin Neurol Neurosurg* 6:588-596
- Lobato, R.D., Rivas, J.J., Gomez, P.A., Castaneda, M., Canizal, J.M., Sarabia, R., Cabrera, A., Munoz, M.J.** (1991). Head-Injured Patients Who Talk and Deteriorate into Coma. Analysis of 211 Cases Studied With Computerized Tomography. *J Neurosurg* 75:256-261
- Lossinsky, A.S., Vorbrodt, A.W., Wisniewski, H.M.** (1983). Ultracytochemical Studies of Vesicular and Canalicular Transport Structures in the Injured Mammalian Blood-Brain Barrier. *Acta Neuropathol (Berl)* 61:239-245
- Luchter, S. Walz, M.C.** (1995). Long-Term Consequences of Head Injury. *J Neurotrauma* 12:517-526
- Lynch, D.R., Dawson, T.M.** (1994). Secondary Mechanisms in Neuronal Trauma. *Curr Opin Neurol* 7:510-516
- Ma, J., Endres, M., Moskowitz, M.A.** (1998). Synergistic Effects of Caspase Inhibitors and MK-801 in Brain Injury After Transient Focal Cerebral Ischaemia in Mice. *Br J Pharmacol* 124:756-762
- MacDermott, A.B., Mayer, M.L., Westbrook, G.L., Smith, S.J., Barker, J.L.** (1986). NMDA-Receptor Activation Increases Cytoplasmic Calcium Concentration in Cultured Spinal Cord Neurons. *Nature* 321:519-522

- Maier-Hauff, K., Baethmann, A.J., Lange, M., Schürer, L., Unterberg, A.** (1984). The Kallikrein-Kinin System As Mediator in Vasogenic Brain Edema. Part 2: Studies on Kinin Formation in Focal and Perifocal Brain Tissue. *J Neurosurg* 61:97-106
- Mallat, M., Houlgatte, R., Brachet, P., Prochiantz, A.** (1989). Lipopolysaccharide-Stimulated Rat Brain Macrophages Release NGF in Vitro. *Dev Biol* 133:309-311
- Marmarou, A., Foda, M.A., van den, B.W., Campbell, J., Kita, H., Demetriadou, K.** (1994). A New Model of Diffuse Brain Injury in Rats. Part I: Pathophysiology and Biomechanics. *J Neurosurg* 80:291-300
- Marshall, L.F., Maas, A.I., Marshall, S.B., Bricolo, A., Fearnside, M., Iannotti, F., Klauber, M.R., Lagarrigue, J., Lobato, R., Persson, L., Pickard, J.D., Piek, J., Servadei, F., Wellis, G.N., Morris, G.F., Means, E.D., Musch, B.** (1998). A Multicenter Trial on the Efficacy of Using Tirilazad Mesylate in Cases of Head Injury. *J Neurosurg* 89:519-525
- Marshall, L.F., Toole, B.M., Bowers, S.A.** (1983). The National Traumatic Coma Data Bank. Part 2: Patients Who Talk and Deteriorate: Implications for Treatment. *J Neurosurg* 59:285-288
- Maxwell, I.C., Le Quesne, P.M.** (1979). Conduction Velocity in Hexachlorophane Neuropathy: Correlation Between Electrophysiological and Histological Findings. *J Neurol Sci* 43:95-110
- Mayer, M.L., Westbrook, G.L.** (1987). The Physiology of Excitatory Amino Acids in the Vertebrate Central Nervous System. *Prog Neurobiol* 28:197-276
- McGee-Russell, S.M., Brown, A.W., Brierley, J.B.** (1970). A Combined Light and Electron Microscope Study of Early Anoxic-Ischaemic Cell Change in Rat Brain. *Brain Res* 20:193-200
- McGeer, P.L., Itagaki, S., McGeer, E.G.** (1988). Expression of the Histocompatibility

Glycoprotein HLA-DR in Neurological Disease. *Acta Neuropathol (Berl)* 76:550-557

- Mchedlishvili, G.** (1986). Role of cerebral microcirculation in secondary brain damage. In *Mechanisms of Secondary Brain Damage* (Baethmann, A., Go, K.G., Unterberg, A., eds.), S. 295-302. Plenum Press, New York, London
- McIntosh, T.K., Saatman, K.E., Raghupathi, R., Graham, D.I., Smith, D.H., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q.** (1998). The Dorothy Russell Memorial Lecture. The Molecular and Cellular Sequelae of Experimental Traumatic Brain Injury: Pathogenetic Mechanisms. *Neuropathol Appl Neurobiol* 24:251-267
- Memezawa, H., Minamisawa, H., Smith, M.L., Siesjo, B.K.** (1992). Ischemic Penumbra in a Model of Reversible Middle Cerebral Artery Occlusion in the Rat. *Exp Brain Res* 89:67-78
- Meryman, H.T.** (1956). Mechanisms of Freezing in Living Cells and Tissue. *Science* 124:515-515
- Miller, J.D.** (1986). The relevance of primary and secondary brain damage for outcome of head injury. In *Mechanisms of Secondary Brain Damage* (Baethmann, A., Go, K.G., Unterberg, A., eds.), S. 323-328. Plenum Press, New York, London
- Moore, I.E., Buontempo, J.M., Weller, R.O.** (1987). Response of Fetal and Neonatal Rat Brain to Injury. *Neuropathol Appl Neurobiol* 13:219-228
- Morita-Fujimura, Y., Fujimura, M., Kawase, M., Murakami, K., Kim, G.W., Chan, P.H.** (1999). Inhibition of Interleukin-1beta Converting Enzyme Family Proteases (Caspases) Reduces Cold Injury-Induced Brain Trauma and DNA Fragmentation in Mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 19:634-642
- Murakami, K., Kawase, M., Kondo, T., Chan, P.H.** (1998). Cellular Accumulation of Extravasated Serum Protein and DNA Fragmentation Following Vasogenic Edema. *J Neurotrauma* 15:825-835

- Nagy, Z., Pappius, H.M., Mathieson, G., Huttner, I.** (1979). Opening of Tight Junctions in Cerebral Endothelium. I. Effect of Hyperosmolar Mannitol Infused Through the Internal Carotid Artery. *J Comp Neurol* 185:569-578
- Namura, S., Zhu, J., Fink, K., Endres, M., Srinivasan, A., Tomaselli, K.J., Yuan, J., Moskowitz, M.A.** (1998). Activation and Cleavage of Caspase-3 in Apoptosis Induced by Experimental Cerebral Ischemia. *J Neurosci* 18:3659-3668
- Neuberger, J.** (1998). Halothane Hepatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 10:631-633
- Nicoletti, F., Wroblewski, J.T., Novelli, A., Alho, H., Guidotti, A., Costa, E.** (1986). The Activation of Inositol Phospholipid Metabolism As a Signal-Transducing System for Excitatory Amino Acids in Primary Cultures of Cerebellar Granule Cells. *J Neurosci* 6:1905-1911
- Nissl, F., Schröder, P., Ranke, O.** (1926). Nervensystem. In *Enzyklopädie der mikroskopischen Technik* (Krause, R., ed.), S.1636-1654. Urban und Schwarzenberg, Berlin, 3. Auflage
- Oettinger, W., Baethmann, A., Rothenfusser, W., Geiger, R., Mann, K.** (1976). Tissue and Plasma Factors in Cerebral Edema. In *Dynamics of Brain Edema* (Pappius, H.M., Feindel, W., eds.), S. 161-163. Springer, Berlin/Heidelberg/New York
- Oja, E., Collan, Y.** (1983). Basic Principles of Image Analysis by a Computer. *Acta Stereol* 2:250-261
- Olney, J.W.** (1986). Inciting Excitotoxic Cytocide Among Central Neurons. *Adv Exp Med Biol* 203:631-645
- Olney, J.W., Price, M.T., Samson, L., Labruyere, J.** (1986). The Role of Specific Ions in Glutamate Neurotoxicity. *Neurosci Lett* 65:65-71

- Ommaya, A.K., Gennarelli, T.A.** (1974). Cerebral Concussion and Traumatic Unconsciousness. Correlation of Experimental and Clinical Observations of Blunt Head Injuries. *Brain* 97:633-654
- Osborne, K.A., Shigeno, T., Balarsky, A.M., Ford, I., McCulloch, J., Teasdale, G.M., Graham, D.I.** (1987). Quantitative Assessment of Early Brain Damage in a Rat Model of Focal Cerebral Ischaemia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 50:402-410
- Palmer, A.M., Marion, D.W., Botscheller, M.L., Swedlow, P.E., Styren, S.D., DeKosky, S.T.** (1993). Traumatic Brain Injury-Induced Excitotoxicity Assessed in a Controlled Cortical Impact Model. *J Neurochem* 61:2015-2024
- Panegyres, P.K., Hughes, J.** (1998). The Neuroprotective Effects of the Recombinant Interleukin-1 Receptor Antagonist RhIL-1ra After Excitotoxic Stimulation With Kainic Acid and Its Relationship to the Amyloid Precursor Protein Gene. *J Neurol Sci* 154:123-132
- Pappius, H.M.** (1991). Brain Injury: New Insights into Neurotransmitter and Receptor Mechanisms. *Neurochem Res* 16:941-949
- Paschen, W., Douthel, J.** (1999). Disturbances of the Functioning of Endoplasmic Reticulum: a Key Mechanism Underlying Neuronal Cell Injury? *J Cereb Blood Flow Metab* 19:1-18
- Perry, V.H., Andersson, P.B., Gordon, S.** (1993). Macrophages and Inflammation in the Central Nervous System. *Trends Neurosci* 16:268-273
- Persson, L., Valtysson, J., Enblad, P., Warne, P.E., Cesarini, K., Lewen, A., Hillered, L.** (1996). Neurochemical Monitoring Using Intracerebral Microdialysis in Patients With Subarachnoid Hemorrhage. *J Neurosurg* 84:606-616
- Prewitt, C.M., Niesman, I.R., Kane, C.J., Houle, J.D.** (1997). Activated Macrophage/Microglial Cells Can Promote the Regeneration of Sensory Axons into the Injured Spinal Cord. *Exp*

- Priller, J., Flügel, A., Wehner, T., Boentert, M., Haas, C.A., Prinz, M., Fernandez-Klett, F., Prass, K., Bechmann, I., de Boer, B.A., Frotscher, M., Kreutzberg, G.W., Persons, D.A., Dirnagl, U.** (2001). Targeting Gene-Modified Hematopoietic Cells to the Central Nervous System: Use of Green Fluorescent Protein Uncovers Microglial Engraftment. *Nat Med* 7:1356-1361
- Pulsinelli, W.A., Brierley, J.B., Plum, F.** (1982). Temporal Profile of Neuronal Damage in a Model of Transient Forebrain Ischemia. *Ann Neurol* 11:491-498
- Rabchevsky, A.G., Streit, W.J.** (1997). Grafting of Cultured Microglial Cells into the Lesioned Spinal Cord of Adult Rats Enhances Neurite Outgrowth. *J Neurosci Res* 47:34-48
- Raivich, G., Bluethmann, H., Kreutzberg, G.W.** (1996). Signaling Molecules and Neuroglial Activation in the Injured Central Nervous System. *Keio J Med* 45:239-247
- Raivich, G., Bohatschek, M., Kloss, C.U., Werner, A., Jones, L.L., Kreutzberg, G.W.** (1999). Neuroglial Activation Repertoire in the Injured Brain: Graded Response, Molecular Mechanisms and Cues to Physiological Function. *Brain Res Brain Res Rev* 30:77-105
- Raivich, G., Gehrman, J., Graeber, M.B., Kreutzberg, G.W.** (1993). Quantitative Immunohistochemistry in the Rat Facial Nucleus With [125I]-Iodinated Secondary Antibodies and in Situ Autoradiography: Non-Linear Binding Characteristics of Primary Monoclonal and Polyclonal Antibodies. *J Histochem Cytochem* 41:579-592
- Raivich, G., Gehrman, J., Kreutzberg, G.W.** (1991). Increase of Macrophage Colony-Stimulating Factor and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Receptors in the Regenerating Rat Facial Nucleus. *J Neurosci Res* 30:682-686
- Raivich, G., Haas, S., Werner, A., Klein, M.A., Kloss, C., Kreutzberg, G.W.** (1998). Regulation

of MCSF Receptors on Microglia in the Normal and Injured Mouse Central Nervous System: a Quantitative Immunofluorescence Study Using Confocal Laser Microscopy. *J Comp Neurol* 395:342-358

Raivich, G., Moreno-Flores, M.T., Möller, J.C., Kreutzberg, G.W. (1994a). Inhibition of Posttraumatic Microglial Proliferation in a Genetic Model of Macrophage Colony-Stimulating Factor Deficiency in the Mouse. *Eur J Neurosci* 6:1615-1618

Raivich, G., Moreno-Flores, M.T., Möller, J.C., Kreutzberg, G.W. (1994b). Regulation of Microglial Proliferation: Colony-Stimulating Factors and Their Receptors. *Neuropathol Appl Neurobiol* 20:209-211

Rapoport, S.I., Robinson, P.J. (1986). Tight-Junctional Modification As the Basis of Osmotic Opening of the Blood-Brain Barrier. *Ann N Y Acad Sci* 481:250-267

Relton, J.K., Rothwell, N.J. (1992). Interleukin-1 Receptor Antagonist Inhibits Ischaemic and Excitotoxic Neuronal Damage in the Rat. *Brain Res Bull* 29:243-246

Reulen, H.J. (1976). Vasogenic Brain Oedema. New Aspects in Its Formation, Resolution and Therapy. *Br J Anaesth* 48:741-752

Reulen, H.J., Graham, R., Spatz, M., Klatzo, I. (1977). Role of Pressure Gradients and Bulk Flow in Dynamics of Vasogenic Brain Edema. *J Neurosurg* 46:24-35

Reulen, H.J., Tsuyumu, M., Tack, A., Fenske, A.R., Prioleau, G.R. (1978). Clearance of Edema Fluid into Cerebrospinal Fluid. A Mechanism for Resolution of Vasogenic Brain Edema. *J Neurosurg* 48:754-764

Ringel, F., Plesnila, N., Chang, R.C., Peters, J., Staub, F., Baethmann, A. (1997). Role of Calcium Ions in Acidosis-Induced Glial Swelling. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 70:144-147

- Rodell, T.C.** (1996). The Kallikrein/Kinin System and Kinin Antagonists in Trauma. *Immunopharmacology* 33:279-283
- Roemer, K., Johnson, P.A., Friedmann, T.** (1991). Knock-in and Knock-Out. Transgenes, Development and Disease: A Keystone Symposium Sponsored by Genentech and Immunex, Tamarron, CO, USA, January 12-18, 1991. *New Biol* 3:331-335
- Rosenblum, W.I.** (1990). Control of Brain Microcirculation by Endothelium. *Keio J Med* 39:137-141
- Rosenblum, W.I., Nishimura, H., Ellis, E.F., Nelson, G.H.** (1992). The Endothelium-Dependent Effects of Thimerosal on Mouse Pial Arterioles in Vivo: Evidence for Control of Microvascular Events by EDRF As Well As Prostaglandins. *J Cereb Blood Flow Metab* 12:703-706
- Roth, P., Bartocci, A., Stanley, E.R.** (1997). Lipopolysaccharide Induces Synthesis of Mouse Colony-Stimulating Factor-1 in Vivo. *J Immunol* 158:3874-3880
- Roth, P., Stanley, E.R.** (1992). The Biology of CSF-1 and Its Receptor. *Curr Top Microbiol Immunol* 181:141-167
- Sarin, S.K., Sabba, C., Groszmann, R.J.** (1990). Splanchnic and Systemic Hemodynamics in Mice Using a Radioactive Microsphere Technique. *Am J Physiol* 258:G365-G369
- Sasaki, A., Yokoo, H., Naito, M., Kaizu, C., Shultz, L.D., Nakazato, Y.** (2000). Effects of Macrophage-Colony-Stimulating Factor Deficiency on the Maturation of Microglia and Brain Macrophages and on Their Expression of Scavenger Receptor. *Neuropathology* 20:134-142
- Schröder, M.L., Muizelaar, J.P., Bullock, M.R., Salvant, J.B., Povlishock, J.T.** (1995). Focal Ischemia Due to Traumatic Contusions Documented by Stable Xenon-CT and

Ultrastructural Studies. *J Neurosurg* 82:966-971

Schulz, J., Plesnila, N., Eriskat, J., Stoffel, M., Pruneau, D., Baethmann, A. (2000). LF16-0687
a Novel Non-Peptide Bradykinin B2 Receptor Antagonist Reduces Vasogenic Brain Edema
From a Focal Lesion in Rats. *Acta Neurochir Suppl* 76:137-139

Schürer, L. (1987). Hirnstoffwechsel und -funktion beim experimentellen Schädel-Hirntrauma.
Dissertation, Med. Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität, München

Siemann, D.W., Hill, R.P. (1983). Quantitative Changes in the Arterial Blood Gases of Mice
Following Localized Irradiation of the Lungs. *Radiat Res* 93:560-566

Siesjo, B.K., Hu, B., Kristian, T. (1999). Is the Cell Death Pathway Triggered by the
Mitochondrion or the Endoplasmic Reticulum? *J Cereb Blood Flow Metab* 19:19-26

Sjostrand, J. (1966). Studies on Glial Cells in the Hypoglossal Nucleus of the Rabbit During
Nerve Regeneration. *Acta Physiol Scand Suppl* 270:1-17

Sladeczek, F., Pin, J.P., Recasens, M., Bockaert, J., Weiss, S. (1985). Glutamate Stimulates
Inositol Phosphate Formation in Striatal Neurons. *Nature* 317:717-719

Soriano, M.A., Sanz, O., Ferrer, I., Planas, A.M. (1997). Cortical Infarct Volume Is Dependent
on the Ischemic Reduction of Perifocal Cerebral Blood Flow in a Three-Vessel Intraluminal
MCA Occlusion/Reperfusion Model in the Rat. *Brain Res* 747:273-278

Statham, P.F., Johnston, R.A., Macpherson, P. (1989). Delayed Deterioration in Patients With
Traumatic Frontal Contusions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 52:351-354

Statistisches Bundesamt (1993). Sterbefälle beim Schädel-Hirntrauma durch Schädelfraktur (ICD
800-804) und intrakranielle Verletzungen (ICD 850-854). *Fachserie 12-Gesundheitswesen,
Reihe 4-Todesursachen*. Metzler-Poeschel, Stuttgart

- Staub, F., Winkler, A., Peters, J., Kempfski, O., Kachel, V., Baethmann, A.** (1994). Swelling, Acidosis, and Irreversible Damage of Glial Cells From Exposure to Arachidonic Acid in Vitro. *J Cereb Blood Flow Metab* 14:1030-1039
- Stein, S.C., Spettell, C., Young, G., Ross, S.E.** (1993). Delayed and Progressive Brain Injury in Closed-Head Trauma: Radiological Demonstration. *Neurosurgery* 32:25-30
- Stevens, W.C., Eger, E.I., White, A., Halsey, M.J., Munger, W., Gibbons, R.D., Dolan, W., Shargel, R.** (1975). Comparative Toxicities of Halothane, Isoflurane, and Diethyl Ether at Subanesthetic Concentrations in Laboratory Animals. *Anesthesiology* 42:408-419
- Stoffel, M.** (1997). Das experimentelle vasogene Hirnödeme: Therapeutische Hemmung durch den CL-Transportblocker Torasemid, den Neuropeptid-Y-Antagonisten PP56 und alpha-Tocopherol. Dissertation, Med. Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität, München
- Stoffel, M., Plesnila, N., Eriskat, J., Fürst, M., Baethmann, A.** (2002). Release of Excitatory Amino Acids in the Penumbra of a Focal Cortical Necrosis. *J Neurotrauma* 19:467-477
- Stoffel, M., Rinecker, M., Plesnila, N., Eriskat, J., Baethmann, A.** (2001). Role of Nitric Oxide in the Secondary Expansion of a Cortical Brain Lesion From Cold Injury. *J Neurotrauma* 18:425-434
- Streit, W.J., Graeber, M.B., Kreutzberg, G.W.** (1988). Functional Plasticity of Microglia: a Review. *Glia* 1:301-307
- Streit, W.J., Kreutzberg, G.W.** (1988). Response of Endogenous Glial Cells to Motor Neuron Degeneration Induced by Toxic Ricin. *J Comp Neurol* 268:248-263
- Streit, W.J., Semple-Rowland, S.L., Hurley, S.D., Miller, R.C., Popovich, P.G., Stokes, B.T.** (1998). Cytokine mRNA Profiles in Contused Spinal Cord and Axotomized Facial Nucleus Suggest a Beneficial Role for Inflammation and Gliosis. *Exp Neurol* 152:74-87

- Sugiyama, H., Ito, I., Hirono, C.** (1987). A New Type of Glutamate Receptor Linked to Inositol Phospholipid Metabolism. *Nature* 325:531-533
- Sutton, R.L., Lescaudron, L., Stein, D.G.** (1993). Unilateral Cortical Contusion Injury in the Rat: Vascular Disruption and Temporal Development of Cortical Necrosis. *J Neurotrauma* 10:135-149
- Suzumura, A., Sawada, M., Yamamoto, H., Marunouchi, T.** (1990). Effects of Colony Stimulating Factors on Isolated Microglia in Vitro. *J Neuroimmunol* 30:111-120
- Symon, L.** (1986). Progression and irreversibility in brain ischemia. In *Mechanisms of Secondary Brain Damage* (Baethmann, A., Go, K.G., Unterberg, A., eds.), S. 221-237. Plenum Press, New York, London
- Takeuchi, A., Miyaishi, O., Kiuchi, K., Isobe, K.** (2001). Macrophage Colony-Stimulating Factor Is Expressed in Neuron and Microglia After Focal Brain Injury. *J Neurosci Res* 65:38-44
- Tang, Y.P., Noda, Y., Hasegawa, T., Nabeshima, T.** (1997). Effects of VA-045 on Learning and Memory Deficits in Traumatic Brain Injury (TBI)-Induced Retrograde and Anterograde Amnesic Mice. *Br J Pharmacol* 122:257-264
- Theodorsson, N.E.** (1986). Kruskal-Wallis Test: Computer Program to Perform Nonparametric One-Way Analysis of Variance and Multiple Comparisons on Ranks of Several Independent Samples. *Comp Meth Prog Biomed* 23:57-62
- They, C., Chamak, B., Mallat, M.** (1993). Neurotoxicity of Brain Macrophages. *Clin Neuropathol* 12:288-290
- They, C., Hetier, E., Evrard, C., Mallat, M.** (1990). Expression of Macrophage Colony-Stimulating Factor Gene in the Mouse Brain During Development. *J Neurosci Res* 26:129-133

- Tominaga, T., Kure, S., Yoshimoto, T.** (1992). DNA Fragmentation in Focal Cortical Freeze Injury of Rats. *Neurosci Lett* 139:265-268
- Toulmond, S., Duval, D., Serrano, A., Scatton, B., Benavides, J.** (1993). Biochemical and Histological Alterations Induced by Fluid Percussion Brain Injury in the Rat. *Brain Res* 620:24-31
- Toulmond, S., Rothwell, N.J.** (1995). Interleukin-1 Receptor Antagonist Inhibits Neuronal Damage Caused by Fluid Percussion Injury in the Rat. *Brain Res* 671:261-266
- Trapp, B.D., Peterson, J., Ransohoff, R.M., Rudick, R., Mork, S., Bo, L.** (1998). Axonal Transection in the Lesions of Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 338:278-285
- Uno, H., Matsuyama, T., Akita, H., Nishimura, H., Sugita, M.** (1997). Induction of Tumor Necrosis Factor-Alpha in the Mouse Hippocampus Following Transient Forebrain Ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 17:491-499
- Unterberg, A., Baethmann, A.J.** (1984). The Kallikrein-Kinin System As Mediator in Vasogenic Brain Edema. Part 1: Cerebral Exposure to Bradykinin and Plasma. *J Neurosurg* 61:87-96
- Unterberg, A., Dautermann, C., Baethmann, A., Muller-Esterl, W.** (1986). The Kallikrein-Kinin System As Mediator in Vasogenic Brain Edema. Part 3: Inhibition of the Kallikrein-Kinin System in Traumatic Brain Swelling. *J Neurosurg* 64:269-276
- Unterberg, A., Wahl, M., Baethmann, A.** (1984). Effects of Bradykinin on Permeability and Diameter of Pial Vessels in Vivo. *J Cereb Blood Flow Metab* 4:574-585
- Unterberg, A., Wahl, M., Hammersen, F., Baethmann, A.** (1987). Permeability and Vasomotor Response of Cerebral Vessels During Exposure to Arachidonic Acid. *Acta Neuropathol (Berl)* 73:209-219

- Uylings, H.B., van Eden, C.G., Hofman, M.A.** (1986). Morphometry of Size/Volume Variables and Comparison of Their Bivariate Relations in the Nervous System Under Different Conditions. *J Neurosci Methods* 18:19-37
- Vinas, F.C., Dujovny, M., Hodgkinson, D.** (1995). Early Hemodynamic Changes at the Microcirculatory Level and Effects of Mannitol Following Focal Cryogenic Injury. *Neurol Res* 17:465-468
- Vonhof, S.** (1997). Die zerebrale Proteinbiosynthese nach Schädel-Hirntrauma: eine experimentelle Untersuchung zur Quantifizierung der sekundären Hirngewebsnekrose. Dissertation, Med. Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität, München
- Wahl, M., Schilling, L., Unterberg, A., Baethmann, A.** (1995). Autacoids as mediators of vasogenic brain edema. In *New Concepts of a Blood-Brain Barrier* (Greenwood, J., ed.), S. 147-157. Plenum Press, New York
- Wahl, M., Whalley, E.T., Unterberg, A., Schilling, L., Parsons, A.A., Baethmann, A., Young, A.R.** (1996). Vasomotor and Permeability Effects of Bradykinin in the Cerebral Microcirculation. *Immunopharmacology* 33:257-263
- Wang, Y., Berezovskaya, O., Fedoroff, S.** (1999). Expression of Colony Stimulating Factor-1 Receptor (CSF-1R) by CNS Neurons in Mice. *J Neurosci Res* 57:616-632
- Watkins, J.C., Olverman, H.J.** (1987). Agonists and Antagonists for Excitatory Amino Acid Receptors. *Trends Neurosci* 10:265-272
- Weaver, T.E., Scott, W.J., Jr.** (1984). Acetazolamide Teratogenesis: Interaction of Maternal Metabolic and Respiratory Acidosis in the Induction of Ectrodactyly in C57BL/6J Mice. *Teratology* 30:195-202
- Weir, J.A.** (1949). Blood-PH As a Factor in Genetic Resistance to Mouse Typhoid. *J Infect Dis*

- Wennerstrand, J., Corral-Gutierrez, J.F., Sarby, B.** (1967). Histologic and Volumetric Study of Intracerebral Cold Lesions. *Acta Neurol Scand* 43:451-463
- Werner, A., Kloss, C.U., Walter, J., Kreutzberg, G.W., Raivich, G.** (1998). Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) in the Mouse Facial Motor Nucleus After Axonal Injury and During Regeneration. *J Neurocytol* 27:219-232
- Wiktor-Jedrzejczak, W., Bartocci, A., Ferrante, A.W., Jr., Ahmed-Ansari, A., Sell, K.W., Pollard, J.W., Stanley, E.R.** (1990). Total Absence of Colony-Stimulating Factor 1 in the Macrophage-Deficient Osteopetrotic (Op/Op) Mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:4828-4832
- Witzleb, E.** (1987). Funktion des Gefäßsystems. In *Physiologie des Menschen* (Schmidt, R.F., Thews, G., eds.), S. 505-572. Springer, Berlin, Heidelberg, New York
- Wyllie, A.H., Kerr, J.F., Currie, A.R.** (1980). Cell Death: the Significance of Apoptosis. *Int Rev Cytol* 68:251-306
- Wyrwich, W.** (1994). Die Entwicklung einer sekundären Hirngewebsnekrose nach primärem Trauma. Methodische Ansätze ihrer Quantifizierung. Dissertation, Med. Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität, München
- Yamakami, I., McIntosh, T.K.** (1991). Alterations in Regional Cerebral Blood Flow Following Brain Injury in the Rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 11:655-660
- Yang, G.Y., Gong, C., Qin, Z., Ye, W., Mao, Y., Bertz, A.L.** (1998). Inhibition of TNFalpha Attenuates Infarct Volume and ICAM-1 Expression in Ischemic Mouse Brain. *Neuroreport* 9:2131-2134

Yoshida, H., Hayashi, S., Kunisada, T., Ogawa, M., Nishikawa, S., Okamura, H., Sudo, T., Shultz, L.D., Nishikawa, S. (1990). The Murine Mutation Osteopetrosis Is in the Coding Region of the Macrophage Colony Stimulating Factor Gene. *Nature* 345:442-444

Zilles, K., Schleicher, A., Pehlemann, F.W. (1982). How Many Sections Must Be Measured in Order to Reconstruct the Volume of a Structure Using Serial Sections? *Microsc Acta* 86:339-346

8 Anhang

8.1 Arbeitsanleitungen für die histologische Gewebeaufarbeitung

Tab. 7.1 Entwässerung der Präparate zum Einbetten in Paraplast

Ethanol 50% I + II	jew. 2 Stunden
Ethanol 60% I + II	jew. 2 Stunden
Ethanol 70% I	2 Stunden
Ethanol 70% II	14 Stunden
Ethanol 80%	2 Stunden
Ethanol 95%	2 Stunden
Ethanol absolut	4 Stunden
Methylsalicylat I + II	jew. 24 Stunden
Rotihistol I + II + III	jew. 15 Minuten

Tab. 7.2 Arbeitsschritte für die NISSL-Färbung

Entparaffinieren	
Rotihistol I	10 Minuten
Rotihistol II	10 Minuten
Absteigende Alkoholreihe	
Ethanol absolut	2 Minuten
Ethanol 95%	2 Minuten
Ethanol 70%	2 Minuten
Ethanol 50%	2 Minuten
Färbung	
Kresylviolett	10 Minuten
Aqua destillata	kurz spülen
Rotihistol II	5 Minuten

Differenzieren, aufsteigende Alkoholreihe

Ethanol 70% + 0,2 ml Eisessig	kurz spülen
Ethanol 70%	kurz spülen
Ethanol 90%	kurz spülen
Ethanol 95%	kurz spülen
Ethanol 100%	kurz spülen
Isopropanol 100%	2 Minuten
Rotihistol I	2 Minuten

Einbettung mit Eukitt

8.2 Arbeitsanleitung für die Isolierung von Gesamt-RNA mit Qiagen Rneasy Mini Kit

1. Zentrifugieren des Zellysates bei 14000 U/min für 3 Minuten
2. Abpipettieren des Überstandes und Übertrag in neues Röhrchen, gefüllt mit 600 µl Ethanol 70%. Umgehendes Mischen durch Pipettieren.
3. Übertragen von max. 700 µl der Mischung auf eine Rneasy-Minisäule (RNA-Filter) mit 2 ml Auffangröhrchen. Verschließen der Säule und Zentrifugieren bei 14000 U/min für 15 Sekunden. Das Filtrat wird verworfen. Dieser Schritt kann wiederholt werden, bis die gesamte Mischung durch dieselbe Säule zentrifugiert wurde.
4. Hinzufügen von 700 µl RW1-Puffer auf die Minisäule und Zentrifugation bei 14000U/min für 15 Sekunden. Anschließend wird das Filtrat mit dem Auffangröhrchen verworfen und die Säule in ein Neues gesetzt.
5. Pipettierung von 500 µl RPE-Lösung auf die Säule und Zentrifugation bei 14000 U/min für 15 Sekunden. Das Filtrat wird verworfen.
6. Erneut Pipettierung von 500 µl RPE-Lösung auf die Säule und Zentrifugation bei 14000 U/min für 2 Minuten, um die Membran zu trocknen. Filtrat und Auffangröhrchen werden anschließend verworfen. Wichtig ist hierbei, dass die Säule beim Entfernen nicht mit dem Filtrat in Berührung kommt. Falls doch, erneute Zentrifugation.
7. Platzieren der Säule in einem 1,5 ml Eppendorff-Röhrchen (Eppendorff, Köln).
8. Lösen der membrangebundenen RNA durch direktes Pipettieren von 30 µl Rna^{se}-freien Wassers auf die Membran und Zentrifugation bei 14000U/min für 1 Minute.
9. Lagerung der gelösten Gesamt-RNA bei -80° C bis zur Weiterverarbeitung.

9 Danksagung

Nach Abschluß der vorliegenden Arbeit gilt mein herzlicher Dank vielen Menschen:

Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. Konrad Meßmer für die freundliche Aufnahme in das Institut für Chirurgische Forschung. Die wissenschaftliche Ausbildung und Förderung, die ich hier - wie viele andere zuvor - erhielt, prägte mich mit Sicherheit für den Rest meines Lebens.

Prof. Dr. med. Alexander Baethmann für die Überlassung dieser sehr interessanten Fragestellung und die Aufnahme in sein "erlauchtes kleines" Neuroteam. Der neugierige und spielerische Umgang mit Wissenschaft und Forschung nahm uns sämtliche falsche Scham und Ehrfurcht im Umgang mit den anderen wissenschaftlichen Größen auf diesem Gebiet. Neben der unschätzbaren Förderung seiner "Familienmitglieder", war gerade der Einsatz für die sozialen Anlässe starkes Zeichen seiner Persönlichkeit. Mit ihm würde ich jederzeit wieder singen.

Bei beiden möchte ich mich für die vielfältigen Erfahrungen (Auslandsaufenthalte, Kongresse, Symposien) bedanken, die ich aufgrund ihres Einsatzes machen konnte.

Dr. med. Nikolaus Plesnila für die unschätzbare Hilfe beim Endspurt. Die Wellenlänge und der Humor stimmte immer.

Dr. rer. biol. hum. Dipl. Phys. Jürgen Peters. Der ruhende Fels in der Brandung. Immer da, immer hilfsbereit, mit einer Engelsgeduld.

Dr. rer. nat. Martina Dörger und Prof. Dr. med. Georg Enders für ihre wertvolle Hilfe bei Anwendung der molekularbiologischen Techniken und ihren Rat bei der Entwicklung des Modells zur Gewebesentnahme.

Monika Fürst, Veronika Bischoff, Mei Ping Wu und Bärbel Lorenz für die unschätzbare Hilfe bei der Anfertigung der histologischen Schnitte und der RT-PCR.

Dr. med. Jörg Eriskat für die Hilfe bei der Einarbeitung in die Thematik.

Allen Assistenten und Doktoranden des Neuroteams für sehr viel Spass und manch geteiltes Leid und allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Chirurgische Forschung für eine schöne und prägende Zeit.

Der speziellste Dank gilt meinen Eltern und Geschwistern für alles - wie es war, ist und sein wird.

10 Lebenslauf

Name: Ronen Sircar
Geburtsdatum: 28. Juni 1974
Geburtort: Köln/Porz am Rhein
Eltern: Arup Sircar, Dipl. Ing.
Doris Sircar, geb. Klenert

Ausbildung:

1981-1985 Grundschole Holzkirchen/ Obb.
1985-1994 Musisches Pestalozzi- Gymnasium, München; Abitur
1994-1995 Zivildienst, Johanniter-Unfall-Hilfe, München; Ausbildung zum Rettungssanitäter
1996-2002 Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität, München
Famulaturen in Richmond (USA), Kalkutta (Indien), Zittau und München

Praktisches Jahr:

PJ-Programm der LMU München-Harvard Medical School Alliance for Medical Education 2001.

Innere Medizin:

- Core Clerkship (3 Monate), Department of Medicine (Chair: R. Moellering, MD), Beth Israel Deaconness Medical Center, Harvard Medical School, Boston
- Subinternship, Department of Medicine (Dir: Ch. Hatem, MD), Mount Auburn Hospital, Harvard Medical School, Boston

Chirurgie:

- Subinternship, Surgical Critical Care–Trauma/Burn Unit (Dir: S. Rogers, MD), Brigham & Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston
- Subinternship, Division of Plastic Surgery (Chair: E. Eriksson, MD), Brigham & Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston
- Subinternship, Head & Neck Service (Chair: J. Shah, MD), Memorial Sloan Kettering Cancer Center, Weill Medical College of Cornell University, New York
- Subinternship, Neurosurgery Service (Chair: P. Gutin, MD), Memorial Sloan Kettering Cancer Center, Weill Medical College of Cornell University, New York

Neurologie:

Neurologische Klinik und Poliklinik (Dir: Prof. Dr. Dr. Th. Brandt),
Klinikum der LMU München - Großhadern

Berufliche Tätigkeit:

- | | |
|---------------|---|
| 9/2002-2/2004 | Arzt im Praktikum, Neurochirurgische Universitätsklinik (Ärztl. Dir.: Prof. Dr. J. Zentner), Neurozentrum des Universitätsklinikums Freiburg, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg |
| Seit 3/2004 | Assistenzarzt, Neurochirurgische Universitätsklinik (Ärztl. Dir.: Prof. Dr. J. Zentner), Neurozentrum des Universitätsklinikums Freiburg, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg |