

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

**ANALYSE VON S100-B, IMMUNKOMPETENTER
ZELLEN UND PMN-ELASTASE IM LIQUOR
SCHÄDEL-HIRN-TRAUMATISierter PATIENTEN**

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

vorgelegt von
Christoph Rudolf Albert Egginger
aus
Simbach am Inn
2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

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

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Uwe Koedel
Priv. Doz. Dr. Alexander Faußner
Prof. Dr. Joerg-Christian Tonn
Prof. Dr. Dr. h.c. Karl-Walter Jauch

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Chlodwig Kirchhoff

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

Tag der mündlichen Prüfung: 21.10.2010

Gewidmet meinen Eltern

1.	EINLEITUNG UND HINTERGRUND	1
1.1.	Definition und Klassifikation des Schädel-Hirn-Traumas	2
1.2.	Pathophysiologie des Schädel-Hirn-Traumas	3
1.2.1.	Primärer Hirnschaden	4
1.2.2.	Sekundärer Hirnschaden	5
1.3.	Zerebrale Veränderungen nach SHT	8
1.3.1.	Inflammation und SHT	8
1.3.2.	Blut-Hirn-Schranke	12
1.4.	Mechanismen auf zellulärer Ebene	14
1.4.1.	S100-B	14
1.4.2.	CD-14+ und CD-15+ Zellen: Zwei Leukozyten-Vertreter in der posttraumatischen Inflammation	18
1.4.3.	PMN-Elastase	20
1.5.	Aktuelle Therapieansätze nach SHT	21
2.	ZIELSETZUNG	23
3.	PATIENTEN UND METHODEN	25
3.1.	Studiendesign	25
3.2.	Ein- und Ausschlusskriterien	26
3.3.	Kontrollgruppe	28
3.4.	Probengewinnung	28
3.4.1.	Gewinnung des Liquors	28
3.4.2.	Gewinnung und Analyse von Blutproben	30
3.5.	Messverfahren und Methodik	30
3.5.1.	Durchflusszytometrische Analyse	30
3.5.2.	Analyse der Konzentration von PMN-Elastase im Liquor mittels ELISA	36
3.5.3.	Analyse der Konzentration von S100-B im Liquor	37
4.	ERGEBNISSE	41
4.1.	Patienten und Kontrollkollektiv	41
4.2.	Analyse von S100-B	44
4.2.1.	Ergebnisse von S100-B im Liquor (CSF)	44
4.2.2.	Dynamik von S100-B im Liquor in Abhängigkeit der Blut-Hirn-Schranke (BBB)	45
4.3.	Durchflusszytometrische Analyse	47
4.3.1.	Häufigkeit und Dynamik der CD-14+ Monozyten (MØ)	47
4.3.2.	Dynamik der CD-14+ Monozyten in Abhängigkeit der BBB-Funktion	50
4.3.3.	Häufigkeit und Dynamik der CD-15+ Granulozyten (Gα)	51
4.3.4.	Dynamik der CD-15+ Granulozyten in Abhängigkeit der BBB-Funktion	53
4.4.	Polymorph-Nukleäre-Elastase (PMN-Elastase)	55
4.4.1.	Dynamik der PMN-Elastase im Liquor	55
4.4.2.	Dynamik der PMN-Elastase im Liquor in Abhängigkeit der BBB-Funktion	56

5.	DISKUSSION	58
5.1.	Patienten und Kontrollkollektiv	59
5.2.	Probengewinnung	60
5.3.	S100-B	62
5.4.	Durchflusszytometrische Analyse	66
5.4.1.	CD-14+ Monozyten	66
5.4.2.	CD-15+ Granulozyten	68
5.5.	PMN-Elastase	69
6.	ZUSAMMENFASSUNG	71
7.	LITERATUR	76
8.	GLOSSAR	89
9.	LEBENS LAUF	92
10.	DANKSAGUNG	93

1. Einleitung und Hintergrund

Das Schädel-Hirn-Trauma (SHT) stellt trotz des in den letzten Jahren deutlich verbesserten Traumamanagements und neuester wissenschaftlicher Erkenntnisse in der Grundlagenforschung und vielversprechender Therapiestrategien ein seit Jahrzehnten unverändert großes Problem für das Überleben gerade der jungen Bevölkerung dar (1-5).

Im Jahr 2004 verstarben in Deutschland insgesamt 33309 Menschen an Folgen äußerer Ursachen, darunter meist Straßenunfälle und Stürze. Die für die Letalität dieser Unfälle verantwortlichen Traumata waren in 13963 Fällen Verletzungen des Schädels, was einem Anteil von 41,9% entspricht (Stat. Bundesamt 2004). Das SHT bleibt somit mit einer Sterberate zwischen 37% und 60% die führende Ursache der Mortalität verunglückter Patienten (Stat. Bundesamt 2004) (6, 7). Doch nicht nur die Mortalitätsrate selbst ist in diesem Zusammenhang zu erwähnen, auch die überlebenden SHT-Patienten, die nicht selten unter neurokognitiven Defekten und schweren Behinderungen mit anschließender Pflegebedürftigkeit leiden, bedeuten eine nicht unerhebliche finanzielle Belastung für unser Gesundheitssystem und stellen ein ernstzunehmendes soziales Problem dar (8-10). Schätzungen zufolge geht man derzeit von 200 – 300 SHTs pro 100.000 Einwohner aus (11). Beschränkt man sich auf die schweren SHTs, ergibt das für die BRD eine Zahl zwischen 27.000 bis 40.000 Verunglückten pro Jahr (10).

Um einen effektiven Ansatz zur Reduzierung der Folgen des SHTs zu finden, ist es von großer Bedeutung, genaue Kenntnisse über die Pathophysiologie des SHT zu erlangen. Dabei spielt die Einteilung in primären und sekundären Hirnschaden eine wesentliche Rolle. Die dabei beteiligten Mechanismen und Grundlagen werden im Folgenden näher erläutert.

1.1. Definition und Klassifikation des Schädel-Hirn-Traumas

Als Schädel-Hirn-Trauma werden Verletzungen bezeichnet, bei denen meist aufgrund eines stumpfen oder penetrierenden Traumas das Gehirn dauerhaft oder temporär geschädigt wird.

Eine heute international verwendete Einteilung zur Beurteilung des Schweregrades eines SHTs wird durch den 1974 von *Teasdale und Jennett* eingeführten „*Glasgow Coma Scale*“ (GCS), der auf dem initial nach Unfall festgestellten neurologischen Status des Patienten basiert, vorgenommen (siehe **Tabelle 1**) (12).

Schweregrad des SHT	GCS (Punkte)
1. Grad = leichtes SHT	15 - 13
2. Grad = mittelschweres SHT	12 - 09
3. Grad = schweres SHT:	8 \geq

Tabelle 1: Klassifikation des Schädel-Hirn-Traumas (SHT) mittels Glasgow-Coma-Scale (GCS)

Der GCS ist als dynamische Messgröße zu betrachten und ist ein wichtiger Parameter zur Verlaufskontrolle. Ausgedehnte prospektive Studien konnten zudem eine signifikante Korrelation zwischen dem initialen GCS und dem Outcome der SHT-Patienten nachweisen (13-16).

Zur Charakterisierung der morphologischen Schädigung wird der „Marshall Score“ (siehe **Tabelle 2**) verwendet, der anhand im CT gewonnener Bilder eine Schweregradeinteilung der Verletzung ermöglicht. *Marshall et al.* konnten hierbei einen signifikanten Zusammenhang zwischen den im CT erhobenen morphologischen Daten und der Prognose der Patienten erheben (17-21). Nachdem allerdings häufig deutliche Unterschiede zwischen dem morphologisch erkennbaren Hirnschaden und der vom Patienten dargebotenen Klinik zu erkennen waren, findet diese Methode im klinischen Alltag nur selten Anwendung. Sie wird

hauptsächlich in wissenschaftlichen Arbeiten zur Objektivierung des vorhandenen Hirnschadens angewandt (17).

CT Klassifikation nach Marshall	Definition	Mortalität
Diffuse Injury (DI) I	Normaler CT Befund (klinische Diagnose)	
Diffuse Injury (DI) II	Basale Zysternen offen, Kontusion/Hämatom < 25 ccm	
Diffuse Injury (DI) III	Basale Zysternen komprimiert, Kontusion/Hämatom < 25 ccm	
Diffuse Injury (DI) IV	Basale Zysternen verschlossen, Kontusion/Hämatom < 25 ccm	
Evacuated mass lesion (EML)	Chirurgisch evakuiertes intrakranielles Hämatom (SDH, EDH)	
Non-evacuated mass lesion (NEML)	Kontusion/Hämatom > 25 ccm, nicht chirurgisch evakuiert	

Tabelle 2: Klassifikation des CT-morphologischen Schweregrades der Schädel-Hirn-Verletzung nach Marshall (17)

1.2. Pathophysiologie des Schädel-Hirn-Traumas

Spricht man von einem Schädel-Hirn-Trauma, muss man zwei wesentliche Aspekte beachten. Zum einen den direkt durch den initialen traumatischen Impact („1st hit“) hervorgerufenen „primären Hirnschaden“, der eine mechanische Zerstörung des Hirngewebes hervorruft. Dieser stellt einen meist irreversiblen Zustand dar, wird jedoch nicht als die wesentliche Ursache der hohen Sterblichkeit angesehen. Zum anderen der durch diese primäre Schädigung getriggerte „sekundäre Hirnschaden“, der vielmehr für das meist negative Outcome nach SHT verantwortlich ist (3, 4, 22, 23).

Um die hohen Sterblichkeitsrate zu senken ist es von enormer Wichtigkeit die Ursachen dieses Sekundärschadens und die genauen Abläufe der zugrunde liegenden Pathophysiologie zu kennen und zu verstehen (24).

Die folgende Abbildung soll einen Überblick über die Vorgänge nach Schädel-Hirn-Trauma geben (siehe **Abbildung 1**).

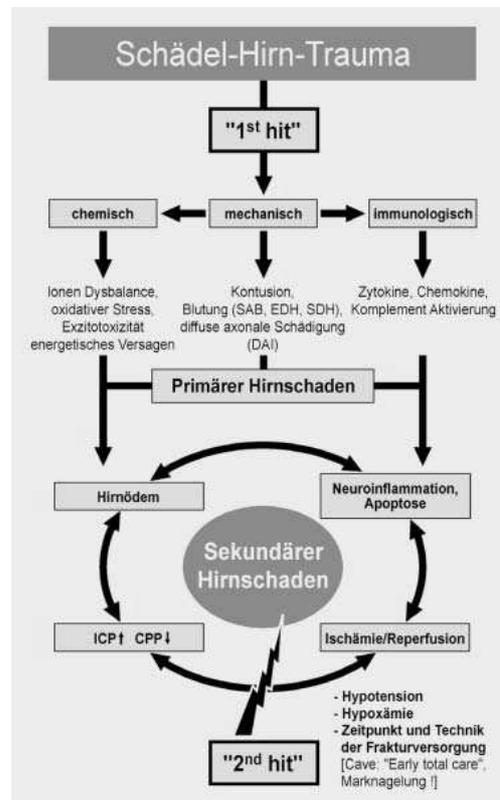


Abbildung 1: Pathophysiologie des SHT: Mechanismen der primären und sekundären Hirnschäden aus ((25))

1.2.1. Primärer Hirnschaden

Zum Zeitpunkt des Traumas erfährt das Gehirn eine direkte, meist durch stumpfe oder penetrierende Gewalt von außen bedingte, mechanische Krafteinwirkung auf den Schädel und das Neurokranium. Dies führt u.a. durch cerebrale Kontusionen und Scherverletzungen von Neuronen und Blutungen zu fokalen und diffusen Schädigungen des Gehirns. Die fokalen Schäden äußern sich in erster Linie durch fronto-temporale Rindenprellungsherde mit Kontusionszonen und Markblutungen, die nicht immer mit einem schlechten Outcome verbunden sind. Im Gegensatz dazu ist die durch indirekt einwirkende Scherkräfte hervorgerufene diffuse Schädigung axonaler Strukturen, die „diffuse axonal injury“ (DAI), mit einer äußerst schlechten Prognose assoziiert (26, 27). Allgemein ergibt sich bei der direkten Schädigung zum einen ein Untergang der Zellen durch Disruption der Zellmembran

und Zerstörung des Zytoskeletts. Andererseits stellt sich durch eine erhöhte Permeabilität der Zellmembran ein stärkerer Ionenfluß in und aus der Zelle ein, was v.a. durch einen erhöhten Kalziumeinstrom für den Zelluntergang mitverantwortlich ist (28-31). Aufgrund der begrenzten Regenerationsfähigkeit des Nervengewebes stellt die primäre Schädigung einen wichtigen Faktor bei der Prognoseeinschätzung dar (32).

1.2.2. Sekundärer Hirnschaden

Entgegen der allgemein angenommenen Meinung, dass der traumatische Schaden per se für die hohe Sterblichkeit nach SHT verantwortlich ist, ist vielmehr der zeitlich verzögert auftretende und durch den Primärschaden getriggerte „sekundäre Hirnschaden“ der Grund für die schlechte Prognose (27).

Bereits *Miller et al.* konnten nachweisen, dass durch den kumulativen Effekt der Sekundärläsion die Ausdehnung des funktionellen Hirnschadens wesentlich mitbestimmt und dadurch das neurologische Outcome negativ beeinflusst werden kann (33-36). Charakterisiert wird dieser sekundäre Hirnschaden durch eine intrakranielle Entzündungsreaktion, die zu einer verzögerten Entwicklung eines posttraumatischen Hirnödems führen kann (**siehe Abbildung 2**).

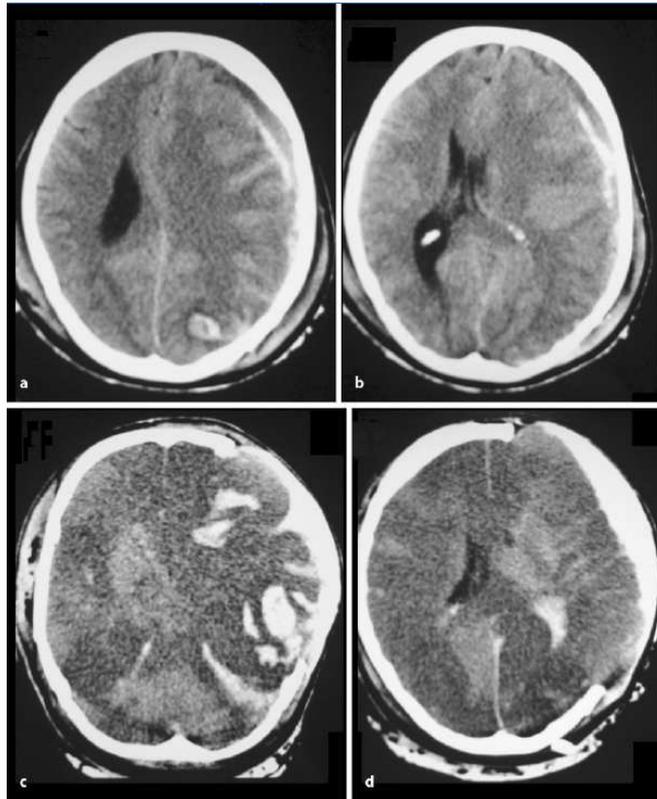


Abbildung 2: Posttraumatisches Hirnödeme nach geschlossenem SHT mit Subduralhämatom, okzipitaler Kontusionsblutung und ausgeprägtem Hemisphärenödem mit Mittellinienverlagerung und Kompression des lateralen Ventrikels mit anschließender Kraniektomie (aus (25))

Der durch das Ödem bedingte intrakranielle Druckanstieg, welcher mit einer Reduktion des zerebralen Blutflusses und einer Störung der Blut-Hirn-Schranke assoziiert ist und letztendlich zu einer sekundären zerebralen Ischämie und zum neuronalen Zelltod führt, stellt den zugrunde liegenden Mechanismus der hohen Sterblichkeit nach SHT dar (1, 5, 25, 37-41). *Graham et al.* konnten bereits 1978 durch Sektionen an Patienten, die an einem Schädel-Hirn-Trauma verstorben sind, eine Inzidenz an zerebralen Ischämien von 92% nachweisen (42).

Die Tabelle 3 zeigt systemische und intrakranielle Ursachen einer zerebralen Ischämie (**siehe Tabelle 3**):

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

Tabelle 3: Die häufigsten Ursachen der zerebralen Ischämie nach einem schweren Schädel-Hirn-Trauma (modifiziert nach: R.M. Chesnut (1995): „Secondary brain insults after head injury: clinical perspectives“ New-Horiz 3(3): 366-75) (43)

In diesem Zusammenhang sollte an die anatomischen Besonderheiten des Schädels gedacht werden, aufgrund derer alle posttraumatischen Veränderungen zu einer enormen Zunahme des ICP führen. Die *Monroe-Kellie-Doktrin* stellt die zugrunde liegende Gleichung dar (**siehe Abbildung 3**).

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

Abbildung 3: Gleichung der Monroe-Kellie-Doktrin

Die Arbeitsgruppe um *Changaris et al.* konnte u.a. eine direkte Korrelation zwischen dem Anstieg des ICP und der Letalität nachweisen (44, 45). Der sinkende zerebrale Perfusionsdruck (CPP) stellt dabei eine wichtige einflussnehmende Komponente dar. Die folgende Formel erläutert die Berechnung des CPP (**siehe Abbildung 4**):

$$\text{Zerebraler Perfusionsdruck (CPP) = arterieller Mitteldruck (MAP) – intrakranieller Druck (ICP)}$$
$$(\text{MAP} = P_{\text{dia}} + 1/3 (P_{\text{sys}} - P_{\text{dia}}))$$

Abbildung 4: Formel zur Berechnung des zerebralen Perfusionsdruckes (CPP)

Zusätzlich zu dem kraniellen Schaden sind die SHT-Patienten in bis zu 90 % der Fälle von extrakraniellen Begleitverletzungen betroffen. Dazu zählen neben der Hypoxie und Hypotonie auch Frakturen, die meist operativ versorgt werden müssen (46-52). Sollte bei der Versorgung der Verletzungen die neuroinflammatorische Pathophysiologie nicht genau beachtet werden, kann es zu Sekundärinsulten („2nd hit“) kommen, die durch ihren kumulativen Effekt zusammen mit der Inflammation für die schlechte Prognose verantwortlich sind (48, 53, 54). Die durch eine Verminderung des zerebralen Blutflusses verursachte Hypoperfusion des Gehirns ist dem Verlust endogener Vasodilatoren (z.B. Nitrid Oxide) und einer gleichzeitigen Zunahme von Vasokonstriktoren (z.B. Endothelin-1) zuzuschreiben (55-58).

1.3. Zerebrale Veränderungen nach SHT

1.3.1. Inflammation und SHT

Die überschießende intrakranielle Entzündungsreaktion ist als der zentrale pathophysiologische Prozess für die Entstehung des sekundären Hirnschadens nach SHT anzusehen (40, 59). Es ist somit von enormer Bedeutung schnellstmöglich ein Gleichgewicht in der posttraumatischen Inflammation herzustellen (60, 61).

Die folgende Abbildung soll einen Eindruck der Vorgänge bei der posttraumatischen Inflammation geben (siehe **Abbildung 5**).

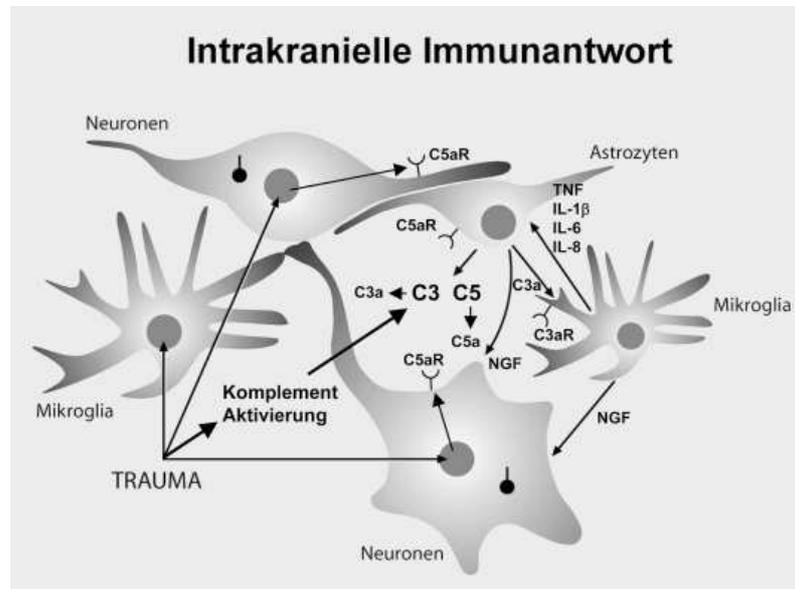


Abbildung 5: Allgemeine Vorgänge der Neuroinflammation nach SHT (aus (25))

Eine Entzündung wird als eine vitale Reaktion im Sinne eines Schutzmechanismus auf innere oder äußere Angriffe, die eine potentielle Bedrohung für den Körper darstellen, verstanden. Dies können neben Infektionen und Autoimmunreaktionen auch posttraumatisch entstandene Strukturschäden des Körpers sein. Im Bezug auf das zentrale Nervensystem ging man davon aus, dass es sich um ein immunprivilegiertes System handelt. Zum einen wurde dies mit einem fehlenden Lymphsystem, wobei die Arachnoidea und der Virchow-Robin-Raum Ausnahmen darstellen, zum anderen durch das Vorhandensein der Blut-Hirn-Schranke (BBB) und somit einer Abgrenzung vom peripheren Immunsystem, begründet. Verschiedene Arbeiten haben mittlerweile gezeigt, dass Gliazellen und Neuronen selbst eine wichtige Quelle für inflammatorische Mediatoren darstellen (62-68). Kommt es zu einer Schädigung des Gehirns (z.B. traumatische oder toxische Verletzungen) reagiert das Gewebe, ausgehend vom *Mononukleären Phagozytensystem* (MPS), innerhalb von Sekunden bis Minuten durch die Aktivierung des Komplementsystems mit einer neuropathologischen Reaktion, der sog.

Gliose. Bei diesen Prozessen, als „*first line of defense*“ bezeichnet, werden durch Ausschüttung spezieller Komplementanaphylatoxine, C_{3a} und C_{5a}, proinflammatorische (u.a. TNF, IL-1) und chemotaktische Zytokine freigesetzt (62, 69). Die Anaphylatoxine C_{3a} und C_{5a} induzieren die hepatische Akutphasereaktion durch eine Geninduktion wichtiger inflammatorischer Transkriptionsfaktoren und proinflammatorischer Mediatoren. Das Ganze führt zu einer Aufrechterhaltung und Exazerbation der systemischen und intrakraniellen Inflammation (14, 70, 71). *Sedgwick et al.* gelang es eine durch TNF, IL-8 und C_{5a} getriggerte und Chemokin vermittelte Rekrutierung der bei der Inflammationsreaktion maßgeblich beteiligten Leukozyten darzustellen (72). Die folgende Tabelle soll einen kurzen Überblick über die allgemeinen pathophysiologischen Folgen nach einer posttraumatischen Inflammation im Bereich des ZNS geben (**siehe Tabelle 4**).

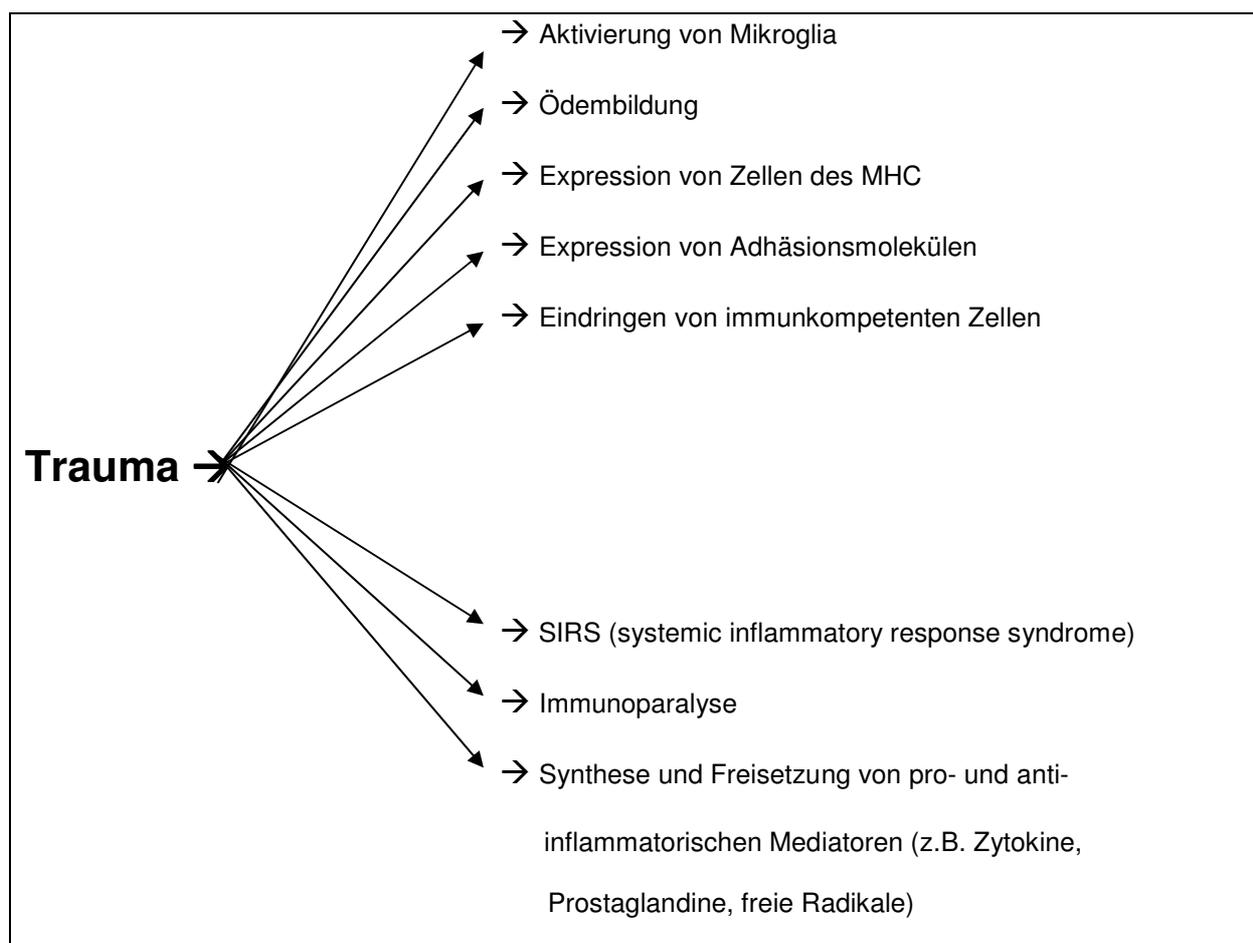


Tabelle4: Pathophysiologie bei Inflammation des ZNS nach Trauma

Die Unterscheidung in proinflammatorische und anti-inflammatorische Zytokine spielt in der posttraumatischen Inflamationsreaktion eine wichtige Rolle. Hierbei werden die sog. proinflammatorischen Zytokine, welche als Vorstufen von Proteinen, den sog. „*precursor proteins*“, intrazellulär gespeichert sind in der direkten posttraumatischen Phase ausgeschüttet. Erst als Folge kommt es zur Freisetzung der bereits erwähnten anti-inflammatorischen Zytokine. Dabei zeigen sich die Zytokine nicht direkt für den Zelltod verantwortlich, sondern sie bedingen die Produktion von Molekülen mit einer proapoptischen Wirkung. Betrachtet man z.B. das Zytokin IL-18, welches auch als „*interferon- γ inducing factor*“ bezeichnet wird und unter traumatischen Umständen in Folge der entstehenden Inflamationsreaktion hochreguliert wird, erkennt man, dass es u.a. eine Induktion des für den Zelltod verantwortlichen Moleküls Fas und Fas-Ligand bewirkt (73). Diese gehören zu den Rezeptoren des Tumor Nekrose Faktors (TNF), einem entscheidenden Zytokin der posttraumatischen Entzündungsreaktion (37, 74, 75). Die Folge dieser Zytokinfreisetzung in Verbindung mit der gleichzeitigen Ausschüttung von Adhäsionsmolekülen (z.B. CD8/CD11, ICAM-1, ELAM-1) und Chemokinen bedingt das Fortschreiten einer inflammatorischen Kaskade. An dieser Stelle werden u.a. eine Störung der Ionenverteilung sowie der Verlust wichtiger Membranpotentiale diskutiert. Unter dieser Kaskade stellen sich eine Neurodegeneration und eine Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke (BBB) ein (69). Als weiteres Kennzeichen der neuronalen Inflammation kommt es zu einer IL-1 getriggerten Ödembildung des ZNS. IL-1 spielt durch eine Ausschüttung des „*vascular endothelial growth factor*“ (VEGF) eine wichtige Rolle. Im weiteren Verlauf erfolgt eine durch chemotaktische Faktoren getriggerte Rekrutierung von Leukozyten an den Herd der zerebralen Schädigung. Durch ein Ungleichgewicht des transzellulären Ionengradienten und der daraus folgenden Ausschüttung exzitatorisch wirkender Aminosäuren, erhöht sich der intrazelluläre Anteil an Wasserstoffionen (H^+), wodurch es neben einer Azidose zu einem Einstrom von extrazellulärem Calcium kommt. Die von *Barone et al.* beschriebene Calcium-

Toxizität führt neben einem Mangel an Energie in Form von ATP und durch ein gesteigertes Ausschütten von Transmittern, wie z.B. Glutamat, zu einem weiteren Untergang neuronaler Zellen (76). Neben den erwähnten negativen Effekten aktiviert die posttraumatische Entzündungsreaktion auch neuroreparative und neuroregenerative Mechanismen durch Induktion von Neurotrophinen wie den „*nerve growth factor*“ (NGF) in Gliazellen und Neuronen (65, 77, 78). Diese antiinflammatorische Bedeutung einiger ebenso proinflammatorischer Zytokine, wie TNF oder IL 6, wird als „dualer Effekt“ bezeichnet.

1.3.2. Blut-Hirn-Schranke

Bereits 1885 konnten *Paul Ehrlich* und später *Edwin Goldman* aufzeigen, dass sich zwischen dem Blutkreislauf des Körpers und dem des ZNS eine physiologische Barriere befindet. Entdeckt wurde dieses Phänomen, als *Ehrlich* bemerkte, dass sich das Gehirn bei Injektion saurer Farbstoffe in den mit Liquor gefüllten Raum anfärben ließ, nicht jedoch bei peripherer intraarterieller Applikation dieses Farbstoffes. Er bezeichnete diese natürlich vorliegende Begrenzung zwischen peripherem Blut-Kreislauf und Blut-Kreislauf des Gehirns als „*Blut-Hirn-Schranke*“ (*BBB*). Dieses komplexe System setzt sich aus zerebralen Endothelzellen, Zellen der Astroglia, den Perizyten, perivaskulären Makrophagen und einer Basalmembran zusammen (79). Hauptverantwortlich für die Schrankenfunktion sind die Endothelzellen, die im Vergleich zu den Endothelzellen der Peripherie drei wesentliche Unterschiede aufweisen:

- 1. tight junctions**
- 2. fehlende pinozytische Aktivität mit dadurch geringem transzellulärem Transport**
- 3. spezifisches Carrier- und Transportsystem**

Funktioniert diese Barriere, ist ein unspezifischer Transport von Stoffen unterbunden und das Gehirn kann vor Milieuschwankungen der Peripherie bewahrt werden (80-83).

Die folgende Abbildung soll den Aufbau der BBB verdeutlichen (**siehe Abbildung 6**):

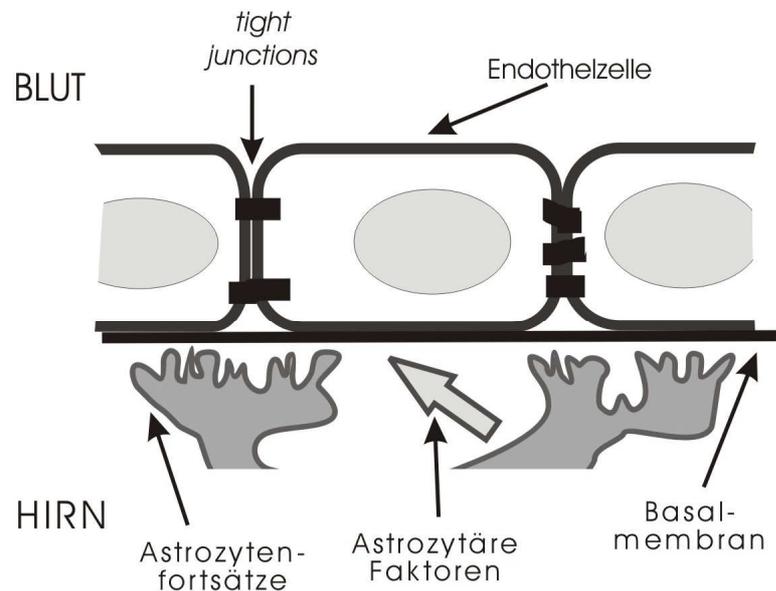


Abbildung 6: Vereinfachte Darstellung der BBB nach Rubin *et al* (79, 79).

An dieser Stelle sollte kurz auf eine weitere im Bereich des ZNS vorhandene physiologische Barriere eingegangen werden, die *Blut-Liquor-Schranke*. Da durch eine Fenestrierung im Bereich der subarachnoidalen Gefäße im Gegensatz zu den Gefäßen des restlichen ZNS eine potentielle Gefahr des Übertritts von schädlichen Stoffen in das Gehirn besteht und die Zusammensetzung des Liquors zur Funktionalität des Gehirns in engen Grenzen gehalten werden muss, bedarf auch dieser Bereich einer engen Kontrolle durch eine vorhandene Schranke (84-86).

Jedes schwere Trauma beeinflusst die Integrität der BBB durch eine systemische Entzündungsreaktion. Dabei ist es unerheblich, ob es sich dabei um ein peripheres Ereignis mit oder ohne SHT handelt (40). Dadurch kommt es zu einer bidirektionalen Kommunikation zwischen Mediatoren des systemischen und intrakraniellen Immunsystems. Das Ganze führt zu einer Störung der intrazerebralen Homöostase, zum anderen induzieren

intrathekal synthetisierte Entzündungsmediatoren eine systemische Immunantwort, was neue Ansätze zur genauen Diagnostik und Therapie nach SHT dringend erforderlich macht (14, 71, 87, 88).

1.4. Mechanismen auf zellulärer Ebene

1.4.1. S100-B

Das Protein, das 1965 von *Moor et al.* in bovinem Nervengewebe gefunden wurde ist ein saures, Kalzium bindendes Polypeptid von ca. 10 kDa, das v.a. in den Zellen der Astroglia und den Schwannschen Zellen vorkommt (89). Es moduliert gliale Proteine und reguliert die Umwandlung intermediärer Filamente in neuronale oder gliale Zellen. Außerdem soll es eine Rolle in der Regulation des Energiestoffwechsels spielen und ist zudem bei der Zellkontraktion und der intrazellulären Signaltransduktion beteiligt (90, 91). Bei genaueren Untersuchungen fand man heraus, dass es bei einem normalen pH-Wert in einer mit 100% Ammoniumsulfat gesättigten Lösung in einem löslichen („soluble“) Zustand vorliegt. Aus diesen Beobachtungen heraus wurde es als „Protein S100“ bezeichnet. Bis heute konnten in dieser Familie 16 verschiedene Typen differenziert werden, wobei die Proteine mit der Bezeichnung *S100-A1* und *S100-B* am häufigsten zu finden sind (92). Die S100-Proteine kann man v.a. im Liquor, in geringeren Mengen auch im Blut und Urin nachweisen. Die im Serum angegebenen Werte für gesunde Leute betragen zwischen 0,02 und 0,15 µg/l. Geschlechts- und altersspezifische Unterschiede sind nicht als relevant beschrieben. Deutliche Unterschiede gibt es allerdings bei Jugendlichen, Kindern und Neugeborenen, wo bei Untersuchungen Mediane bis zu 1,45 µg/l gefunden wurden (93-96) (**siehe Abbildung 7**).

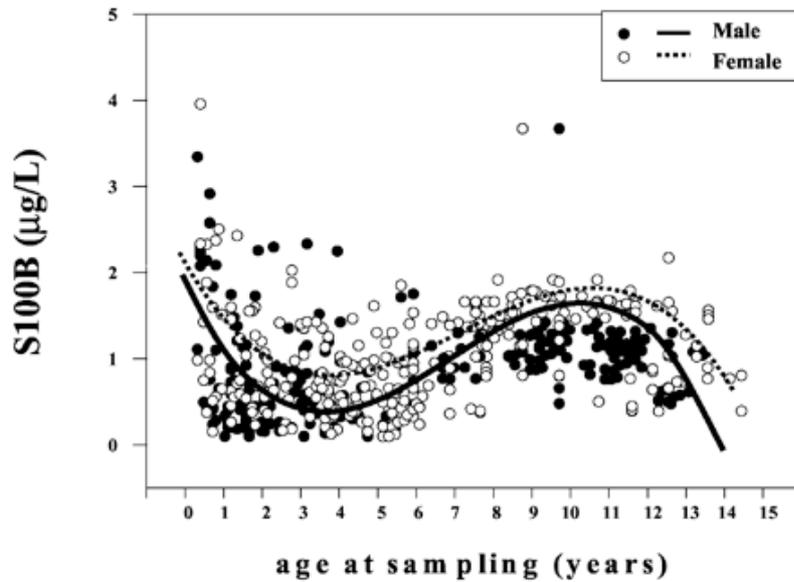


Abbildung 7: S100-B Konzentrationen bei Kindern aus (96)

Durch diverse Studien der letzten Jahre wurde S100-B als ein wichtiger Parameter im Rahmen der klinischen Diagnostik etabliert. Die folgende Tabelle zeigt einen Zusammenhang zwischen S100-B als biochemischen Marker und dem Verlauf diverser Krankheiten sowie eine Verwendung im klinischen Alltag verschiedener Fachrichtungen:

- **AIDS**
- **Kardiochirurgie**
- **Down-Syndrom**
- **Ischämischer Hirninfarkt**
- **Herz-Kreislauf-Stillstand**
- **Neurochirurgie**

Das Protein S100-B stellt eine vor allem hirnspezifische Gruppe dar, lässt sich aber ebenso in renalem Gewebe, Knochen-, Knorpel, Fettgewebe und den Genitalorganen nachweisen (91, 97). Bereits seit vielen Jahren hat man einen Zusammenhang zwischen dem Ansteigen des Proteins und einer traumatischen Hirnschädigung vermutet. Doch erst mit der Weiterentwicklung genauerer Messmethoden konnte man S100-B als wichtigen biochemischen Marker zur Erhebung des Ausmaßes eines SHT verwenden. Die Arbeitsgruppe um *Biberthaler et al.* konnte die Relevanz von S100-B im Bezug auf die Identifikation von Hochrisikopatienten nach leichtem SHT aufzeigen (98, 99). Eine Korrelation zwischen einem Anstieg des Proteins im Liquor, einem Ansteigen des ICP und dem Ausmaß des fokalen Hirnschadens konnte von *Hayakata et al.* analysiert werden (100). In diversen Studien konnte man im Rahmen der SHT Diagnostik ein entscheidendes Problem aufzeigen. So lässt sich anhand der initialen kranialen CT Diagnostik, innerhalb von 1-2 Stunden nach Trauma nicht das endgültige Ausmaß der intrakraniellen Blutung einschätzen (101, 102). Da sich mit Hilfe neuester Immunoassays die Proteinkonzentration im Serum mittlerweile in weniger als 40 Minuten messen lässt, hat sicherlich die Praktikabilität im Rahmen der frühzeitigen Diagnostik in diesem Zusammenhang deutlich an Bedeutung gewonnen (103-108).

Seither wurde in mehreren Arbeiten ein Zusammenhang zwischen dem Ansteigen des Proteins im Serum, wie auch im Liquor, und einer neurologischen Störung aufgezeigt. Darüber hinaus konnte einerseits eine direkte Verbindung zwischen der Höhe des Anstiegs und des Ausmaßes der Hirnschädigung gefunden werden (109-112). Bei Patienten mit nur geringen Folgeschäden wurde andererseits ein Rückgang in den Normbereich innerhalb 48 Stunden nachgewiesen, wobei bei schwerer traumatisierten Patienten mit Folgeschäden eine kontinuierlich erhöhte Konzentration zu erkennen war (110). Eine weitere wichtige und interessante Anwendung findet das Protein im Rahmen der Krebsforschung, wo es bei Patienten mit Hirnmetastasen als Parameter zur Messung der Funktion der Blut-Hirn-

Schranke dient, was sicherlich auch bei der Diagnostik und Verlaufskontrolle von SHT-Patienten einen wichtigen Aspekt darstellt. Aufgrund der erwähnten Unterschiede bezüglich der verschiedenen Reaktionen des Proteins bei leichter- bis schwerverletzten Patienten nach SHT, wurde zur Planung weiterer Therapiestrategien eine genaue Definition des pathologischen Schwellenwertes erforderlich. Bisher gelten Werte über 0,50 µg/l als pathologisch, es gibt allerdings auch Empfehlungen ab einem Wert von 0,18 µg/l die Patienten einer genaueren bildgebenden Diagnostik zu unterziehen. Bei Werten über 2,0 µg/l wird bisher von einem sicherlich negativen Verlauf für die Patienten ausgegangen (113-115). Darüber hinaus konnte eine erhöhte Konzentration an S100-B auch in Patientengruppen gemessen werden, die nicht nur isolierte Schädelverletzungen, sondern schwer- und mehrfachverletzt wurden. Als Ursprung vermutet man neben den bereits erwähnten extrakraniellen Quellen, wie z.B. Fett-, Muskel- und Knochengewebe, auch eine Freisetzung aus dem ZNS durch eine schockinduzierte Mikroperfusionsstörung (110, 116).

Betrachtet man die große Vielfalt der Anwendungsmöglichkeiten von S100-B im Rahmen der SHT Diagnostik ist es von großer Bedeutung, das bisher begrenzte Wissen über die Dynamik des Proteins im Liquor wie auch im Serum der SHT-Patienten zu erweitern und die gewonnenen Ergebnisse genau zu analysieren.

1.4.2. CD-14+ und CD-15+ Zellen: Zwei Leukozyten-Vertreter in der posttraumatischen Inflammation

Um den Körper vor fremden Organismen zu schützen verfügt das menschliche Immunsystem über zwei verschiedene Abwehrmechanismen. Das *spezifische Immunsystem* setzt sich aus zwei unterschiedlichen Komponenten zusammen. Die humorale Ebene dient der Bildung spezifischer Antikörper, wohingegen auf zellulärer Ebene spezifische T- und B-Lymphozyten gebildet werden. Demgegenüber steht das *unspezifische System*. Dieses besitzt neben physiologischen Barrieren (wie z.B. den Schleimhäuten), unspezifische humorale Faktoren (wie z.B. das Komplementsystem), phagozytierende Zellen (wie z.B. Monozyten/Makrophagen) und neutrophile Granulozyten.

Unabhängig vom Abwehrsystem des peripheren Systems können sämtliche Zelltypen des ZNS proinflammatorische Mediatoren und auch Komplementfaktoren synthetisieren sowie proinflammatorische und chemotaktischer Zytokine freisetzen und dadurch eine posttraumatische Entzündungsreaktion induzieren (27, 63-65, 68). Potente chemotaktische Faktoren (z.B. IL-8), das Komplement-Anaphylatoxin C_{5a} und das von *Rancan et al.* analysierte Fractalkine (CX₃CL₁) sind zudem in der Lage die neuroinflammatorische Antwort durch eine Rekrutierung und Aktivierung von Leukozyten zu verstärken (27, 66, 68, 117-120).

Neutrophile Granulozyten (CD-15+) stammen dem unspezifischen Immunsystem ab und machen ca. 40-50% der Leukozytenpopulation aus. Die Aktivierung der Granulozyten durch proinflammatorische Zytokine erfolgt in den ersten 24 Stunden nach Trauma. Neben dem Abwehrmechanismus durch die in den Granula enthaltenen Defensine, Proteasen und Elastase und durch die Anaphylatoxin C_{5a} getriggerte Bildung reaktiver Sauerstoffmetabolite, den sog. „*reactive oxygen intermediates*“ (ROI) sind sie in der Lage infektiöse Mikroorganismen abzutöten („oxidative burst“) (121). Um einen durch posttraumatische Hypoxie und-/oder

Ischämie bedingten Mangel an Sauerstoff, der bei diesen Vorgängen von großer Bedeutung ist, abzuwenden, kommt es zu einer durch TNF und IL-8 induzierten Stimulation von Granulozyten, worunter es zu einer gesteigerten O_2^- - und H_2O_2 Synthese kommt (122). Diese Sauerstoffradikale und Proteasen können durch Lipidperoxidation biologische Membranen aufbrechen und zusammen mit den durch Mastzellen freigesetzten vasoaktiven Mediatoren (z.B. Histamin) die Membranpermeabilität erhöhen. Dieses als „capillary leak“ bezeichnete Ereignis verstärkt das gefürchtete posttraumatische Hirnödem (123-125).

Die ebenfalls dem unspezifischen System zugehörigen Monozyten entstammen dem Mononukleären Phagozytärem System (MPS) und werden in der späteren Phase (> 24h nach Trauma) aktiviert. Sie stammen den CD-34+ myeloiden Vorläuferzellen des Knochenmarks ab und stellen die Vorläuferzellen der Makrophagen dar. Durch ihre hohe chemotaktische Aktivität weisen sie ein ausgeprägtes Phagozytosepotential auf. Aus der Blutbahn gelangen die Zellen u.a. in die Mikroglia des Gehirns, wo sie sich schließlich durch die Wirkung verschiedener Zytokine und dem Makrophagenkolonie - stimulierenden Faktor (M-CSF) zu ortsständigen und gewebsspezifischen Makrophagen ausbilden. Als Schnittstelle zum spezifischen Immunsystem sind sie in der Lage neben der Produktion von Zytokinen, durch eine sehr potente Phagozytose fremder Antigene, diese über HLA-DR Moleküle, einem Genprodukt des MHC Klasse II Komplexes, den CD-4+ Lymphozyten zu präsentieren und ebenfalls eine Entzündungsreaktion zu starten (126). Um körpereigenes Gewebe nicht anzugreifen und zu phagozytieren liegen diese Zellen ursprünglich in einem inaktivierten Zustand vor und werden erst durch bestimmte Zytokine, wie TNF, Interleukinen und LPS, ein Lipopolysaccharid aus der Zellwand gram-negativer Bakterien, aktiviert. Dabei docken die Zytokine an den für Monozyten charakteristischen Rezeptor CD-14 an und starten eine intrazelluläre Signalkaskade, die eine Transkription induziert, welche über die Ausschüttung verschiedener Zytokine zur Aktivierung der Monozyten führt. Diese Vertreter des humanen Immunsystems spielen bei der posttraumatischen Inflammationsreaktion nach SHT eine

entscheidende Rolle. Leider ist bisher nur wenig über die Dynamik und Verteilung in der frühen posttraumatischen Phase bekannt.

1.4.3. PMN-Elastase

Granulozyten spielen als primäre Abwehrzellen bei Schutzreaktionen des Körpers eine besondere Rolle. Die in den Granula der Granulozyten vorhandene Elastase gehört zu den Serinproteasen und unterstützt durch ihre Fähigkeit Amide und Ester zu spalten diese Abwehrfunktion. Die Proteinase wird von den Neutrophilen zur primären Abtötung fremder Mikroorganismen verwendet. Liegen diese extrazellulär vor wird deren Aktivität durch den α 1-Proteinase Inhibitor (α 1-PI) reguliert. Kommt es durch eine starke Entzündungsreaktion zu einer vermehrten Freisetzung der Elastase, kann das Potential des beschriebenen Inhibitionsmechanismus überschritten werden und es kommt in Kombination mit der Produktion von Oxidantien (u.a. H_2O_2 , O_2 -Radikale) zu Gewebeschäden. Außerdem konnte von *Porteu et al.* gezeigt werden, dass die Proteasen an der Freisetzung eines für die Bindung von Liganden zuständigen Fragmentes der TNF-Rezeptoren beteiligt zu sein scheinen (127). Um diese Vorgänge nach einer vermehrten Freisetzung abzuwenden, liefert der Organismus zusätzliche α 1-Proteinase Inhibitor-Komplexe um die freiwerdende und nicht gebundene Elastase zu binden. Die Konzentration des *PMN-Elastase/ α 1-Proteinase Inhibitor-Komplexes* korreliert mit der Menge an freigesetzter Elastase, dient als Aktivitätsmarker der neutrophilen Granulozyten und wird zur Verlaufsbestimmung nach Trauma eingesetzt (128).

1.5. Aktuelle Therapieansätze nach SHT

Der sekundäre Hirnschaden als gefürchtete Komplikation nach einem Schädel-Hirn-Trauma stellt ein großes gesundheitliches und soziales Problem dar. Umso wichtiger ist es wirkungsvolle Therapieansätze zu entwickeln. Das Ziel muss sein Strategien zu entwerfen, die das Entstehen der Sekundärfolgen verhindern oder wenigstens so gering wie möglich halten. Die bisherigen Therapieansätze basieren auf der Behandlung oder Prävention der posttraumatischen Inflammationsreaktion, als den entscheidenden Faktor zur Entstehung des sekundären Hirnschadens. Demgegenüber stehen Methoden zur Behandlung des primären Hirnschadens und zur Prävention dessen Exazerbation. Hierbei sind u.a. *operative* Therapieoptionen, wie das Legen einer Liquordrainage oder die Entlastungskraniotomie, zu erwähnen. Andererseits stehen als *konservative* Therapieoptionen seit langem bekannte Methoden, wie die Oberkörperhochlagerung, die osmotische Diurese und die Hyperventilation zur Verfügung. Das Ziel ist einer Hirnschwellung und somit einem intrakraniellen Druckanstieg entgegenzuwirken. Neuere Ansätze in der Therapie zielen nicht nur auf eine Behandlung bereits eingetretener Schäden oder Folgen nach SHT ab, sondern setzen bereits bei der Entstehung der posttraumatischen Inflammation als entscheidenden Faktor bei der Entwicklung des Sekundärschadens an. In vielen Studien der jüngeren Vergangenheit versucht man Ansätze zu entwickeln um proinflammatorische Faktoren zu unterdrücken. *Shohami et al.* konnten nachweisen, dass *Dexanabinol*, ein Cannaboid ohne psychotische Wirkung, einen inhibitorischen Effekt auf das proinflammatorische Zytokin TNF ausübt. Ebenso wurde beschrieben, dass eine Behandlung mit milder Hypothermie einen Abfall von Interleukin-1 β im Liquor und Interleukin-6 im Plasma erreichen kann (129-131). Die folgende Tabelle stellt bekannte proinflammatorische Mediatoren und bekannte Inhibitoren gegenüber (**siehe Tabelle 5**).

Proinflammatorische Mediatoren	Inhibitoren
TNF α	Dexanabinol, Antikörper
IL-1, IL-6	Milde Hypothermie, IL-1ra, Antikörper
Prostaglandine	COX-Hemmer

Tabelle 5: Proinflammatorische Mediatoren und mögliche Inhibitoren – aktuelle Therapieansätze

Ein weiterer Ansatz zielt auf den alternativen Komplementweg als wichtigen Faktor der Neuropathologie nach SHT ab. Die Hemmung des im posttraumatischen Liquor erhöhten Faktor B soll dabei eine Möglichkeit der Therapie darstellen (124, 132). Die lange angewandte Behandlung mit Steroiden und dessen positiven Effekt konnte durch die Ergebnisse der „CRASH-Studie“ („Corticosteroid randomization after significant head injury“) widerlegt werden. Es wurde sogar gezeigt, dass eine Pan-Inhibition negative Auswirkungen hat, was nicht zuletzt an dem „Dualen Effekt“ der Inflammation liegt (133). Neben den erwähnten therapeutischen Ansätzen gibt es eine Reihe weiterer aktueller Bemühungen eine geeignete Therapie zu finden. Die komplexen und multifaktoriellen Ursachen des SHT machen dies allerdings zu einer äußerst schwierigen Aufgabe und machen eine strukturierte Kenntnis der pathophysiologischen Vorgänge unabdingbar (134, 135).

2. Zielsetzung

Entgegen der allgemein angenommenen Meinung, dass der traumatische Schaden per se für die schlechte Prognose nach SHT verantwortlich ist, weiß man, dass eigentlich der zeitlich verzögert auftretende sekundäre Hirnschaden für das negative Outcome ausschlaggebend ist. Wie in der vorangegangenen Einleitung gezeigt wurde, ist die überschießende intrakranielle Entzündungsreaktion als der zentrale pathophysiologische Prozess für die Entstehung dieses sekundären Hirnschadens nach SHT verantwortlich zu machen (40, 59). Durch die neuroinflammatorische Reaktion mit ihren Folgereaktionen, u.a. einer sekundären zerebralen Ischämie, kommt es schließlich zu dem gefürchteten Hirnödem und einer Ausweitung der Hirnschädigung in primär nicht betroffene Gebiete, was letztendlich den limitierenden Faktor darstellt. Weiterhin weiß man, dass es sich bei dem ZNS nicht wie ursprünglich angenommen um ein immunprivilegiertes System handelt, sondern das verletzte Gehirn selbst eine wichtige Quelle inflammatorischer Mediatoren darstellt. Trotzdem gibt es einen signifikanten Zusammenhang zwischen der systemischen Entzündungsreaktion nach isoliertem SHT und der Inflammationsreaktion im ZNS im Sinne einer Angleichung der im Plasma und im Liquor vorliegenden Zytokine. Eine Störung der Blut-Hirn-Schranke als zusätzlich Einfluss nehmender Faktor ist in diesem Zusammenhang unbedingt zu berücksichtigen (136).

Experimentelle Untersuchungen an Patienten mit chronisch entzündlichen Erkrankungen des ZNS zeigten eine funktionelle Beteiligung von Monozyten/Makrophagen oder T-Lymphozyten an der Entstehung des sekundären Hirnschadens, was v.a. an ihrer zentralen Rolle an der Ausbildung lokaler inflammatorischer Prozesse liegt (137-140). Neben diesen Erkenntnissen hat man mit dem Protein S100-B einen wichtigen und v.a. leicht zu bestimmenden biochemischen Marker, mit dem sich die schwere, bzw. das Ausmaß der zerebralen Schädigung nach SHT bestimmen lässt.

Leider gibt es derzeit noch keine genauen Kenntnisse über die Dynamik von S100-B im Liquor, sowie im Serum bei Patienten mit schwerem SHT, speziell in der frühen Phase der ersten Stunden nach Trauma. Außerdem sind die an der Ausbildung des sekundären Hirnschadens potentiell beteiligten zellulären Sub-Populationen des humanen Immunsystems bislang nur unzureichend charakterisiert. Genaue Erkenntnisse über die pathophysiologischen Grundlagen der Entstehung des sekundären Hirnschadens und die Beteiligung humaner Immunzellen, in Abhängigkeit von der Schwere des Traumas, sind allerdings von erheblicher Relevanz, um therapeutische Strategien zur Prävention des immunologisch vermittelten sekundären Hirnschadens zu entwickeln.

Daraus formulieren sich die Einzelziele der vorliegenden Untersuchung:

- I. Analyse der Dynamik von S100-B im Liquor von Patienten mit SHT
- II. Quantifizierung zellulärer Sub-Populationen humaner Immunzellen (CD-14 + Monozyten, CD-15 + Granulozyten) im Liquor von Patienten nach schwerem Schädel-Hirn-Trauma (SHT III°) mittels durchflusszytometrischer Analyse (FACS) und Darstellen der Dynamik in der posttraumatischen Frühphase
- III. Messung von PMN-Elastase, einem wichtigen Faktor bei der Zerstörung neuronaler Zellen mittels ELISA
- IV. Korrelation der gewonnenen Ergebnisse mit der Funktion der Blut-Hirn-Schranke (BBB) der untersuchten Patienten

3. Patienten und Methoden

3.1. Studiendesign

Es handelt sich bei der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit um eine prospektive Studie, die von der Ethikkommission genehmigt (AZ 330/03) und anschließend an der Chirurgischen Klinik und Poliklinik, Klinikum Innenstadt (Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München), sowie der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie (LMU München) unter Mithilfe der Chirurgischen und Neurochirurgischen Kliniken in München-Großhadern (LMU München) und der Klinik für Anästhesiologie (LMU München) durchgeführt wurde. In dem Zeitraum von Januar 2004 bis Mai 2005 wurden dafür insgesamt 15 Patienten eingeschlossen, die unter einem schweren Schädel-Hirn-Trauma litten. Ihnen wurden direkt nach Einlieferung in den Schockraum, sowie zu definierten Zeitpunkten standardisiert Liquorproben über eine eingebrachte intrakranielle Drucksonde entnommen und anschließend durchflusszytometrisch vermessen. Ebenso wurde den Patienten zu den gleichen Zeitpunkten eine Blut-, bzw. eine Serumprobe entnommen.

3.2. Ein- und Ausschlusskriterien

Die 15 in die Studie aufgenommenen Patienten haben alle ein isoliertes, schweres Schädel-Hirn-Trauma erlitten. Sie wiesen somit nach der seit 1974 verwendeten und gültigen Einteilung von *Teasdale und Jenette* einen GCS-Wert von ≤ 8 Punkten auf und durften keine weiteren Begleitverletzungen haben (**siehe Tabelle 6**).

Glasgow-Coma-Scale					
Augenöffnen		Verbale Antwort		Motorische Antwort	
				Aufforderung	6
		Orientiert	5	Gezielt (Schmerz)	5
Spontan	4	Verwirrt	4	Ungezielt (Schmerz)	4
Aufforderung	3	Inadäquat	3	Beugekrämpfe	3
Schmerz	2	Unverständlich	2	Streckkrämpfe	2
Keine	1	Keine	1	Keine	1

Tabelle 6: Bestimmung des Punktwertes des GCS nach den gemessenen Parametern

Die Patienten mussten sich eine intrakranielle Verletzung mit der Indikation zur sofortigen Anlage einer intrakraniellen Hirndrucksonde (ICP-Sonde), mit der sie bereits initial im Schockraum versorgt wurden, zugezogen haben. Als weiteres Kriterium durfte das Zeitintervall zwischen erlittenem Trauma, Einlieferung in den Schockraum und Anlage der ICP-Sonde nicht länger als 45 min betragen. Weiterhin mussten die Patienten das 18. Lebensjahr erreicht haben. Strafgefangene, schwangere Patientinnen und entmündigte Patienten mit einer eingerichteten Betreuung wurden aus der Studie ausgeschlossen. Ebenso sollte bei den Patienten keine neurologisch-psychiatrische Grunderkrankung vorliegen. Als weiteres Ausschlusskriterium galten entzündliche Grunderkrankungen, wie z.B. Meningitiden, Hepatitiden oder eine generelle Sepsis. Sofern wir eine dieser Erkrankungen erst mit einer gewisser zeitlichen Verzögerung diagnostiziert hatten, wurden die Patienten nachträglich aus der Studie herausgenommen und die bis dahin gewonnenen Ergebnisse verworfen.

Wie von der Ethikkommission vorgeschrieben, haben wir versucht von allen Patienten eine schriftliche Einverständniserklärung für die Durchführung der Versuche einzuholen. Leider war dies aufgrund der initialen Bewusstseinslage der Patienten (Bewusstlosigkeit, Koma, Analgosedierung, etc.) nicht immer möglich. So haben wir mit den Angehörigen gesprochen, sie über das Ziel und den genauen Ablauf der Studie und deren Nutzen informiert und anschließend das Einverständnis eingeholt. Sobald die Patienten von ihrem Bewusstseinszustand her wieder in der Lage waren, selbst über die Studie aufgeklärt zu werden, wurde dies unverzüglich nachgeholt. Die folgende Tabelle stellt noch einmal die Ein- bzw. Ausschlusskriterien der Studie gegenüber (**siehe Tabelle 7**):

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
Intervall zw. Trauma und Aufnahme in den Schockraum \leq 45 min	Strafgefangene, Schwangere und Patienten mit bekannter Betreuung
Mindestalter 18 Jahre	Entzündliche Grunderkrankungen: z.B. Sepsis, Meningitis, HIV, Hepatitiden etc.
Isoliertes, schweres SHT mit einem GCS \leq 8	Neurologisch oder psychiatrische Grunderkrankungen
Vorhandensein einer intrakraniellen Blutung und subsequente Anlage einer ICP – Sonde	Innerhalb der ersten 72 Stunden verstorbene Patienten
Vorliegen einer unterschriebenen Einverständniserklärung	

Tabelle 7: Auflistung der Ein- und Ausschlusskriterien laut des Ethikantrages

3.3. Kontrollgruppe

Als Kontrolle dienten uns bei dieser Studie 10 Patienten, die im Rahmen eines elektiven operativen Routineeingriffs mit einer Spinalanästhesie versorgt wurden. Routinetechnisch fällt bei diesem Vorgehen eine Menge von ca. 3ml Liquor an, das unter normalen Umständen verworfen wird. Dieser Liquor wurde als Negativ-Kontrolle aufgefangen und in identischer Weise zu den Patienten-Proben aufgearbeitet. Bei den Liquorproben konnte man von Normalwerten ausgehen, da die Patienten nachweislich unter keinen neurologischen oder entzündlichen Erkrankungen gelitten haben. Dies wurde auch durch eingehende laborchemische Untersuchungen kontrolliert.

3.4. Probengewinnung

3.4.1. Gewinnung des Liquors

Nachdem die Patienten in den Schockraum eingeliefert worden waren, die erste Stabilisierungsphase abgeschlossen werden konnte und die zur Diagnosefindung notwendigen Untersuchungen durchgeführt waren, wurde bei den Patienten mit intrakranieller Blutung und drohendem Anstieg des Hirndruckes eine intrakranielle Hirndrucksonde (Trauma-Cath[®]; Integra[®] Neurosciences, Plainsboro, NJ), wie es die **Abbildung 8** veranschaulicht, in üblicher Weise gelegt.

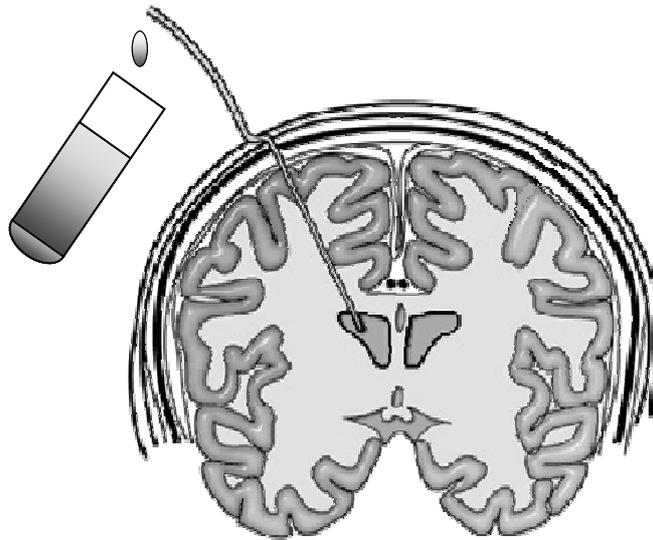


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Anlage einer intrakraniellen Drucksonde (ICP-Sonde)

Anschließend wurden über diese Sonde standardisiert Liquorproben entnommen. Die Abnahmen erfolgten zu definierten Zeitpunkten, nämlich direkt nach Anlage der ICP-Sonde, sowie zu den Zeitpunkten 12 h, 24 h, 48 h und 72 h nach Trauma (**siehe Abbildung 9**).

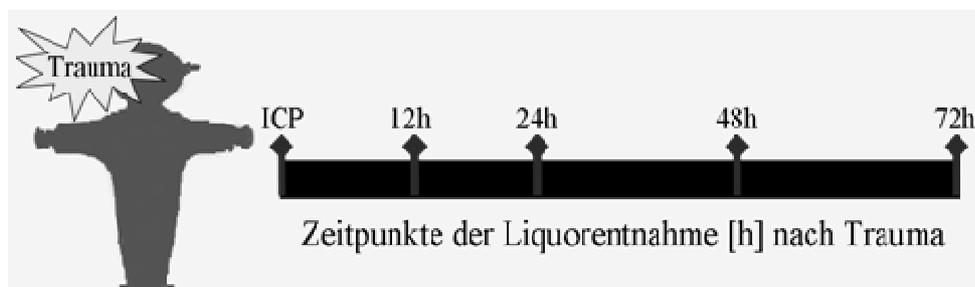


Abbildung 9: Zeitachse der sequenziellen Liquor- und Blutabnahmen: Den Patienten wurden initial bei Aufnahme im Schockraum, sowie nach 12h, 24h, 48h und 72h standardisiert nach Trauma Liquor- und Blutproben entnommen.

Die entnommenen Liquorproben wurden anschließend sofort gekühlt und in das Labor gebracht, wo sie direkt weiterverarbeitet wurden. Zusätzlich wurden 500 µl der Probe zur routinemäßigen Zelldifferenzierung und Messung der Anzahl der vorhandenen Zellen, sowie zur Analyse des Albuminwertes an das Labor übergeben.

3.4.2. Gewinnung und Analyse von Blutproben

Zu den gleichen Zeitpunkten, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben (**siehe Abbildung 9**), wurden den Patienten jeweils ein EDTA-, sowie ein Serum-Röhrchen mit peripherem Blut abgenommen. Diese Blutproben dienten der Bestimmung des Differentialblutbildes (Diff.-BB) und wurden zur Messung der Albuminkonzentration verwendet. Die abgenommenen Proben wurden ebenfalls zur weiteren Diagnostik an unser Routinelabor weitergegeben.

3.5. Messverfahren und Methodik

Bei der von uns durchgeführten Studie haben wir zur Bestimmung der Parameter im Liquor drei verschiedene Messmethoden verwendet. Für die Analyse der humanen Subzellpopulationen bedienten wir uns der Methodik der Durchflusszytometrie, („*fluorescence activated cell sorting*“) (FACS). Eine Quantifizierung der PMN-Elastase erfolgte mittels der ELISA-Technik („*enzyme linked immunosorbent assay*“). Zur Analyse des Proteins S100-B wurde jeweils eine Liquorprobe in das Routinelabor weitergegeben, die mit Hilfe der Elektro-Immunoassay Methode (ECLIA) das Protein gemessen haben. Die angewandten Methoden werden im Weiteren näher erläutert.

3.5.1. Durchflusszytometrische Analyse

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um eine etablierte Methode zur Analyse von Zellen. Hierbei werden mit Hilfe von fluoreszenzgefärbten Antikörpern bestimmte Oberflächenproteine, sowie intrazelluläre Strukturen analysiert. Das dazu nötige Gerät wird auch als „*fluorescence activated cell sorter*“ (FACS) bezeichnet. Die benötigten Abläufe lassen sich in drei Abschnitte (**siehe Abbildung 10**) unterteilen und sollen im Folgenden näher erläutert werden.

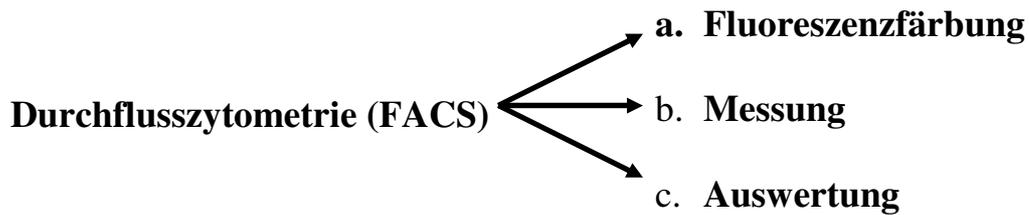


Abbildung 10: Die drei Abschnitte der FACS Analyse

a. Fluoreszenzfärbung

Direkt nach Abnahme des Liquors wurde dieser in unserem Labor bei 1200 Umdrehungen in der Minute (RPM) bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der klare Überstand vorsichtig abpipettiert, in ein neues Falcon gefüllt und schließlich für eine später geplante Zell- und Zytokinbestimmung bei -80°C eingefroren. Das Sediment wurde direkt weiterverarbeitet. Zur Wiedererkennung der Proben wurden diese mit der jeweiligen Patientenummer sowie dem Datum und der Uhrzeit der Abnahme versehen. Als nächstes wurde der verbliebene Bodensatz, das Zellpellet, mit einer Suspension bestehend aus 200µl FC Puffer (0,01 M Phosphate Buffered Saline (PBS), PH 7,2, 1% Bovines Serum Albumin, 5% FCS, 0,02% NaN₃) resuspendiert. Im nächsten Schritt wurden jeweils 20 µl der resuspendierten Lösung in ein spezielles FACS-Röhrchen gefüllt, welches anhand eines definierten Färbeprotokolls beschriftet wurde (**siehe Tabelle 8**).

Monozyten	Granulozyten	Leerkontrolle
CD-14+, HLA-DR	CD-15+	Keine Antikörper

Tabelle 8: Färbeprotokoll: Oberflächenfärbung mittels fluoreszierender Antikörper

Zu den Proben mit der resuspendierten Lösung wurden jeweils 3µl der speziellen fluoreszenzmarkierten Antikörper (Caltag Laboratories GmbH, Hamburg, Deutschland) hinzugegeben. Um eine Bindung der Antikörper an die von den Zellen exprimierten und an der Oberfläche vorhandenen Antigene zu gewährleisten, wurden die Proben für die Dauer von 20 Minuten in der sog. Inkubationsphase in einem abgedunkelten Raum auf Eis gelagert. Um die in der Suspension verbliebenen Erythrozyten zu lysieren, wurden die Lösungen im Anschluss an die Inkubationsphase mit jeweils 500µl FACS „lysing solution“ (Caltag Laboratories GmbH, Hamburg, Germany) resuspendiert und nochmals 10 Minuten in einem abgedunkelten Raum inkubiert. Danach folgten zwei Waschvorgänge, bei denen die Zellsuspension erneut mit 500µl PBS (0,5/FCS, Pettenkofer Apotheke, München, Deutschland) resuspendiert und im Anschluss mit 1200 RPM bei 4°C über 10 Minuten zentrifugiert wurde. Nach Abschluss dieses Arbeitsschrittes waren die Proben vorbereitet und es konnte im nächsten Schritt mit der durchflusszytometrischen Messung begonnen werden.

b. Messung

Für die durchflusszytometrische Methode verwendeten wir einen *EPICS-XL MCL* Durchflusszytometer (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland). Das verwendete Gerät ist mit einem 20mW 488nm Argon-Ionen-Laser und 4 Kanälen ausgestattet. Zur Bestimmung von Fluoreszenzsignalen der jeweiligen markierten Antikörper, ausgehend von FITC war ein Filter von 530nm Wellenlänge, für PE 585nm und für PC5 >650nm vorgeschaltet. Zur Analyse zählt das Gerät standardisiert 5000 Zellen.

Der Durchflusszytometer selbst ist aus drei Einheiten aufgebaut:

- **Flüssigkeitssystem**
- **Optisches Detektionssystem**
- **Signalumwandlung und – verarbeitung**

Zuerst wird die Probe von einer Trägerflüssigkeit erfasst und beschleunigt. Dabei werden die in der Flüssigkeit vorhandenen Zellen hintereinander aufgereiht („*hydrodynamische Fokussierung*“) und schließlich von einem Argonlaser getroffen. Das auf die Zellen treffende Licht wird abhängig von verschiedenen physikalischen Parametern (z.B. Querschnittsfläche, Refraktionsindex und Granulationsgrad) unterschiedlich stark abgelenkt. Der dabei axial auf die Zelle treffende Laserstrahl, der sog. „*Forward Angle Light Scatter*“ (FALS) korreliert mit der Größe, der orthogonal auf die Zelle treffende Strahl, der sog. „*Side Angle Light Scatter*“ (SSC) mit der Granularität und der Form der Zellen (**siehe Abbildung 11**).

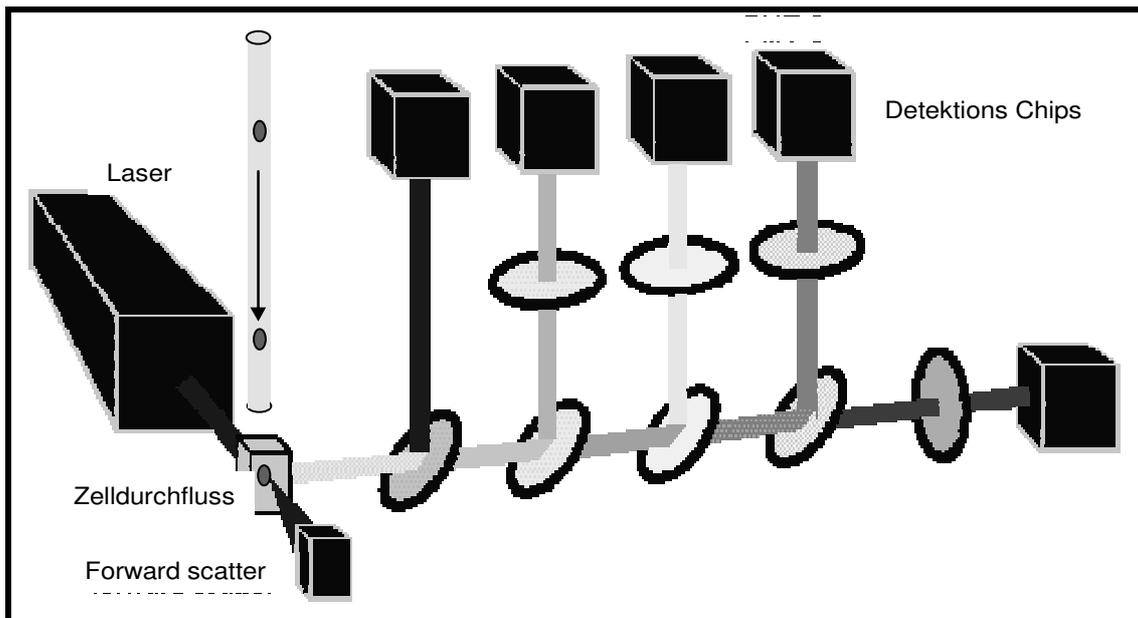


Abbildung 11: Prinzip der Funktion der durchflusszytometrischen Analyse: Zuerst wird ein Multispektrallicht auf die Zielsuspension emittiert. Die Fluoreszenzträger in der Zielsuspension emittieren auf Anregung verschiedene charakteristische Spektralwellen, die durch halbdurchlässige Spiegel hindurchtreten. Ein hochauflösender Detektor zählt das für jeden Fluoreszenzfarbstoff spezifische Signal. Als Lichtquelle wird im Durchflusszytometer (FACS) ein luftgekühlter Argonlaser mit einer Wellenlänge von 488 nm eingesetzt.

Diese optischen Signale wurden nachfolgend durch Photomultiplier, besonders empfindliche Photodetektoren, in elektrische Signale umgewandelt und mit der vorhandenen Software ausgewertet. Die Datenaquisition erfolgte an der „EPICS System Station“ mit der Expo 32 Software (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland). Vor jeder Messung wurden die System- und Filtereinstellungen überprüft und die Stabilität der Lichtspektren mit Fluoreszenz-Beads (FlowCheck, Beckman-Coulter) validiert. Zunächst wurde eine Oberflächencharakterisierung mittels *Scatter*-Analyse gemäß den dreidimensionalen Eigenschaften der Zellen vorgenommen. So wurden zunächst entsprechend Größe und Zelldichte die peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) als „*region of interest*“ markiert. Aus diesen wurden dann u.a. die CD-14+ Monozyten über den PC-5-Detektionskanal sortiert.

Dies bedeutet, dass eine sichere Unterscheidung zwischen CD-15+ Granulozyten und CD-14+-Monozyten möglich ist.

c. Auswertung

Für die der Messung folgenden Analyse wurde ein Programm der Firma Beckman-Coulter (*WinMDI 2.8 Software* (<http://facs.scripps.edu/software.html>)) verwendet. Beispielhaft ist in der folgenden Abbildung die Unterscheidung von Granulozyten und Monozyten durch die scatter-Analyse und die Isolation der CD-14+Monozyten über den PC-5-Detektionskanal dargestellt (siehe **Abbildung 12**).

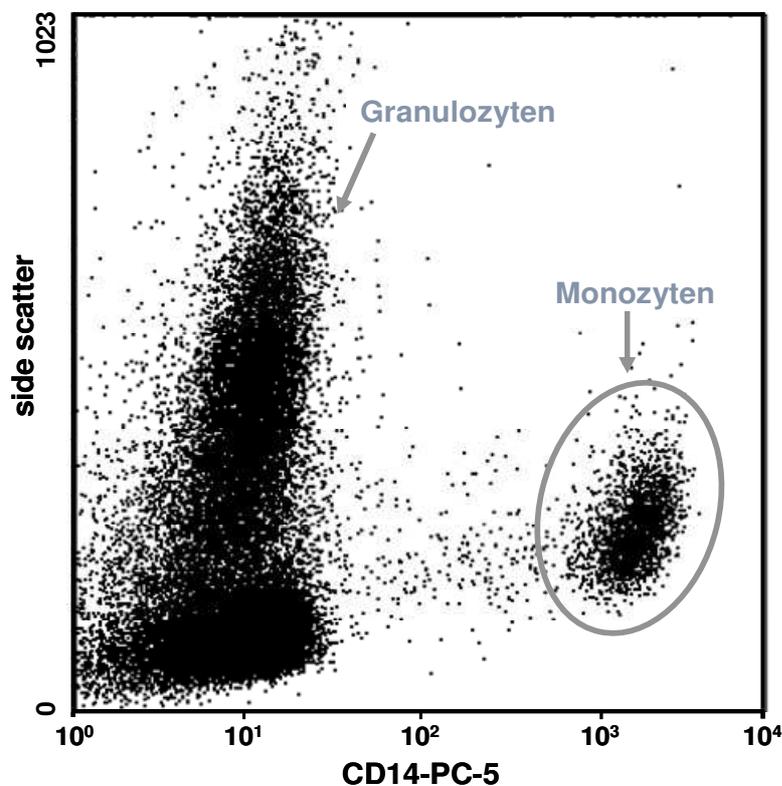


Abbildung 12: Unterscheidung Granulozyten-Monozyten mittels FACS-Analyse: Auf der y-Achse der „side scatter“, auf der x-Achse das Oberflächenepitop CD-14 im PC-5-Konjugat. Eine sichere Unterscheidung zwischen CD-14+ Monozyten und CD-15+ Granulozyten ist somit möglich.

In der vorliegenden Studie wurden aus der „region of interest“ sowohl die CD-14+ Monozyten, wie auch die CD-15+ Granulozyten herausgefiltert.

3.5.2. Analyse der Konzentration von PMN-Elastase im Liquor mittels ELISA

Zur Bestimmung der Konzentration der PMN-Elastase wurde der zu den jeweiligen Abnahmezeitpunkten bei – 80 °C eingefrorene Überstand in Raumtemperatur aufgetaut und mit Hilfe der etablierten „*ELISA-Technologie*“ entsprechend den Angaben des Herstellers (Milenia Biotech, Bad Nauheim, Deutschland) analysiert. Die Analyse erfolgte mit einer speziellen Technik, dem sog. „*sandwich ELISA*“. Die dabei verwendete Mikrotiterplatte („Festphase“) ist mit polyklonalen Antikörpern („Hühnereigelb“), die gegen humane PMN-Elastase gerichtet sind, beschichtet. Die zu vermessenden Patientenproben, sowie die Standard- und Kontrollösungen wurden in einer speziellen Verdünnungsreihe in die Vertiefungen („wells“) der Platte pipettiert (**siehe Abbildung 13**).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B	S	P	P	P	P	P	P	P	P	VK	ZK	S
C	S	P	P	P	P	P	P	P	P	VK	ZK	S
D	S	P	P	P	P	P	P	P	P	VK	ZK	S
E	S	P	P	P	P	P	P	P	P	VK	ZK	S
F	S	P	P	P	P	P	P	P	P	VK	ZK	S
G	S	P	P	P	P	P	P	P	P	VK	ZK	S
H	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Abbildung 13: Beispiel einer Anordnung der vorbereiteten Vertiefungen einer Mikrotiterplatte zur Doppelbestimmung der Proben (aus „Milenia Biotec, PMN-Elastase Kit, Testdurchführung“)

In der folgenden Inkubationszeit von 60 Minuten bindet die in den Proben vorhandene Elastase an die Antikörper. Nicht gebundene Anteile werden in einem darauf folgenden Waschschrift entfernt. Im Anschluss wird ein zweiter polyklonaler Antikörper, der mit Meerrettichperoxidase markiert und gegen $\alpha 1$ -PI gerichtet ist, zugegeben. In einer weiteren Inkubationszeit von 60 Minuten wird der an den ersten Antikörper gebundene PMN-Elastase/ $\alpha 1$ -PI-Komplex von dem zweiten, enzymatische wirksamen, Antikörper erkannt und daraus ein „*Sandwich-Komplex*“ gebildet. Der restliche Überschuss wird wiederum ausgewaschen. Durch darauffolgende Zugabe von chromogenem Substrat und Salzsäure wird

ein spezieller Farbumschlag erreicht, deren Intensität mit der vorhandenen Konzentration an PMN-Elastase direkt proportional ist. Dieser wird bei einer bestimmten Wellenlänge von 450 nm gemessen. Die folgende Tabelle zeigt ein Auswertungsbeispiel mit typischen Messwerten einer PMN-Elastase Analyse (**siehe Tabelle 9**):

	Replikat (OD)	Mittelwert (OD)	Bindung (%)	PMN-Elastase (ng/ml)
Standards				
A	0,080 ----- 0,073	0,077	-	0
B	0,163 ----- 0,153	0,158	5	15,6
C	0,259 ----- 0,268	0,264	8	31,3
D	0,479 ----- 0,469	0,474	15	62,5
E	0,887 ----- 0,910	0,889	28	125
F	1,490 ----- 1,530	1,510	47	250
G	2,429 ----- 2,441	2,435	76	500
H (Bmax)	3,144 ----- 3,251	3,198	100.0	1000
Unbekannte Proben				
X 001	0,406 ----- 0,473	0,440	14	57
X 002	1,882 ----- 1,988	1,915	60	342

Tabelle 9: Beispiel von typischen Messwerten des Milenia PMN-Elastase Testes (aus „Milenia Biotec, PMN-Elastase Kit, Auswertungsbeispiel)

3.5.3. Analyse der Konzentration von S100-B im Liquor

Zur Analyse der S100-B Konzentration im Liquor wurden ebenfalls die beschriebenen Liquor-Überstände der jeweiligen Abnahmezeitpunkte verwendet. Zum Ausschluss iatrogenen S100-B Erhöhungen wurden Patienten mit vorbestehenden neurologischen Erkrankungen oder operativen Interventionen innerhalb der frühen posttraumatischen Phase, also innerhalb der ersten 72 Stunden nach Trauma, ausgeschlossen. Zur Analyse wurden jeweils 3ml des

Liquors und 5ml des Serums eingesetzt. Die Serumproben wurden anschließend, um sie von Zellabfällen zu befreien, zentrifugiert und der entstandene Überstand weiterverarbeitet. Da es sich bei den vorhandenen Liquorproben um bereits zentrifugierte Überstände handelte, konnte dieser Schritt der Probenaufbereitung ausgelassen werden. Für die Bestimmung der Konzentration wurde der frei erhältliche *Elektrochemiluminescence-Immunoassay-Methode-KIT* (ECLIA; Elecsys S-100[®] assay, Roche[®] Diagnostics; Mannheim, Germany) verwendet (141). Um einen Standard-Wert für die Proben zu definieren, wurde künstliches humanes S100-B benutzt. Das Testprinzip beruht hierbei wiederum auf einem "sandwich"-Verfahren. Zuerst wurden ein biotinilierter und ein an Ruthenium-Komplex gebundener S100 spezifischer Antikörper zu den Proben gegeben und inkubiert. Hiermit wurde eine Bindung der Antikörper mit dem Protein hergestellt („*sandwich-Komplex*“). Nach Hinzufügen von mit Streptavidin umhüllten Mikropartikeln und folgender Bindung an den Komplex wurde die entstandene Lösung in eine Messzelle gegeben und die ungebundenen Überstände durch eine spezielle Waschung entfernt. Nachdem eine an der Messzelle vorhandene Elektrode mit Spannung versorgt wurde, bildeten sich chemoluminiszente Emissionen, die durch einen Photomultiplier gemessen werden konnten. Die folgende Abbildung soll den Vorgang besser verdeutlichen (**siehe Abbildung 14**):

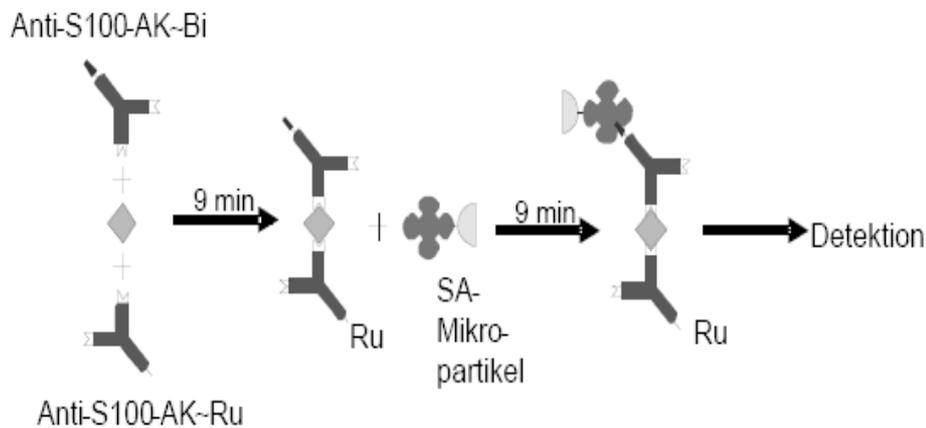


Abbildung 14: Reaktionsprinzip des Elecsys® S100 Testverfahrens: Anti-S100 AK-Bi: biotinilierter monoklonaler S100 spezifischer Antikörper; Anti S100 AK-Ru: S100 spezifischer Antikörper an Ruthenium-Komplex gekoppelt

3.5.4. Bestimmung der Blut-Hirnschranken (BBB) Funktion

Ca. 80% der im ZNS vorhandenen Proteine stammen aus einem Ultrafiltrat des Plasmas. Hierbei handelt es sich um Proteine mit geringem Molekulargewicht, insbesondere Albumin, Präalbumin und Transferrin. Nachdem Albumin im ZNS weder synthetisiert noch verstoffwechselt wird, stellt es, wie bereits 1987 von *Reiber und Felgenhauer* beschrieben, einen geeigneten Indikator für eine erhöhte Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke und somit einer Funktionsstörung, wie es u.a. bei traumatischen Ereignissen vorkommt, dar (142). Zur Bestimmung und Abschätzung des Ausmaßes einer Beeinträchtigung der BBB verwendet man dazu den Liquor-/Serum-Albuminindex, wozu zu jedem der bereits erwähnten Abnahmezeitpunkte der jeweilige Albuminwert des Liquors, wie auch des Serums (Q_{alb}) bestimmt wurde (siehe **Abbildung 15**).

$$\text{Liquor-/Serum-Albuminindex} = \frac{\text{Albumin}_{\text{Liquor}} \text{ (mg/l)}}{\text{Albumin}_{\text{Ser}} \text{ (g/l)}}$$

Abbildung 15: Liquor-/Serum-Albuminindex

Bei der Testung handelt es sich um einen sog. *Trübungstest*. Humanalbumin bildet in Verbindung mit einem spezifischen Antiserum einen Niederschlag, der turbidimetrisch bei 340 nm gemessen werden kann. Die Messung des Albumins wurde durch ein standardisiertes Verfahren, dem „turbidimetric assay“ (Cobas Integra[®] Albumin; Roche[®] Diagnostics; Mannheim, Germany) durchgeführt. Zur Einschätzung des Ausmaßes der Schädigung werden genaue Werte definiert. Bei einem Q_{alb} Wert unter 0,007 gilt die Funktion der BBB per definitionem als normal, Werte zwischen 0,007 und 0,01 stellen eine nur leichte Störung, Werte zwischen 0,01 und 0,02 eine moderate Störung und Werte über 0,02 eine starke Störung der BBB-Funktion dar.

3.6. Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurde das Programm Sigma Stat[®] 3.0 (SPSS[®] Inc., Chicago, USA) eingesetzt. Die pro Abnahmezeitpunkt ermittelten Subpopulationen der humanen Immunzellen sowie das Ergebnis der gemessenen Konzentrationen an PMN-Elastase und S100-B wurden gemittelt und schließlich als Mittelwerte±Standardfehler des Mittelwertes (MW±SEM) angegeben. Um die Ergebnisse der Patienten mit der Kontrollgruppe und dem initialen Wert nach Aufnahme in die Klinik zu vergleichen, wurden die gewonnenen Daten mittels *Analysis of Variance on ranks (ANOVA)* für nicht verbundene Stichproben nach *Kruskall-Wallis* analysiert. Für die Analyse signifikanter Unterschiede im zeitlichen Verlauf wurde ebenfalls ANOVA mit anschließendem *Student-Neumann-Keuls test* bestimmt. Zur Bestimmung spezifischer Unterschiede wurde noch der *Dunn's test* als post-hoc Verfahren mit einem Signifikanzniveau von $p \leq 0.05$ eingesetzt. Zur grafischen Darstellung wurde Sigma Plot[®] angewandt. (SPSS[®] Inc., Chicago, USA)

4. Ergebnisse

4.1. Patienten und Kontrollkollektiv

Bei der Analyse von S100-B wurden insgesamt 15 Patienten mit einem Durchschnittsalter von 46 ± 8 Jahren eingeschlossen. Die gewonnenen Ergebnisse wurden zuerst als Gesamtergebnis im Liquor ausgewertet. Anschließend erfolgte eine Aufteilung in zwei Gruppen gemäß der Funktion der Blut-Hirn-Schranke (BBB). In die Gruppe I wurden Patienten mit einer intakten BBB, in die Gruppe II Patienten mit einer gestörten BBB eingeteilt.

Für die Analyse der CD-14+ Monozyten, der CD-15+ Granulozyten, sowie der PMN-Elastase wurden die gleichen 15 Patienten eingeschlossen. Auch hier wurde eine Aufteilung in zwei Gruppen (Gruppe I: BBB intakt; Gruppe II: BBB gestört), gemäß der Analyse von S100-B

vorgenommen. Demographische und klinische Daten (z.B. Geschlecht, Alter, Verletzung, usw.) und eine Historie systemischer Erkrankungen aller Patienten wurden mit Hilfe einer standardisierten Tabelle aufgezeichnet (**siehe Tabelle 10**). Zusätzlich wurden SHT spezifische klinische Daten, wie ICP, das Blutungsmuster, die Flüssigkeitsbilanz und therapeutische Interventionen (z.B. sekundäre osteoklastische Trepanation, Mannitol-Infusionen, Hypothermie und Hypoventilation) gesammelt (**siehe Tabelle 10**).

Alle Patienten wurden während des gesamten Messzeitraums auf einer Intensiv-Station versorgt, wo sie u.a. hinsichtlich des ICP-Verlaufs kontinuierlich beobachtet wurden. Die Behandlung erfolgte streng nach den Richtlinien der *Brain Trauma Foundation* (143). Als Kontrolle wurden 10 gesunde Probanden (5 Frauen, 5 Männer) mit einem durchschnittlichen Alter von 40 ± 11 Jahren rekrutiert.

Gruppe	Pat.	Alter	Geschlecht	ICP (mmHg)	Albumin Quotient (Qα)	Initiales Verletzungsmuster	Interventionen
BBB intakt	I	32	w	10,8±2,2	0,002	SAB, SDH	ICP-Sonde
	II	82	m	6,4±2,3	0,007	Felsenbeinlängs#, SAB, Kontusionsblutung, SDH	ICP-Sonde
	III	43	m	917,8±1,8	0,008	EDB, SAB, Rindenkontusionsherde	Osteoklastische Trepanation, Hämatomentfernung der EDB
	IV	23	m	11,8±2,4	0,007	SAB, Kontusionsblutung, Impressions#, intrakranielle Fremdkörper	Osteoklastische Trepanation
	V	20	m	15,8±1,5	0,003	ICB, Mittelgesichts#	ICP-Sonde, Frakturversorgung
	VI	48	m	9,2 ± 0,5	0,002	Kleinhirn ICB, SHD	Occipitale Kraniotomie
	VII	54	m	14,2±1,9	0,001	SAB	ICP-Sonde
	VIII	50	w	44,2±15,7	0,006	Impressions#, Parenchymblutung, SAB	Osteoklastische Trepanation
	IX	34	m	11,2±1,7	0,002	SAB, Kalotten#, Felsenbeinlängs#, Rhinobasis#	ICP-Sonde
BBB gestört	X	50	m	21,4±1,2	0,010	Schädelbasis#, Os occipitale#, Orbita#, Felsenbein#	ICP-Sonde
	XI	27	w	21,6±2,9	0,013	SDB, SAB, Kalotten#, Mastoid#, Kontusionsblutung	Osteoklastische Trepanation
	XII	41	w	17,6±2,2	0,018	SAB, SDH, Schädelbasis#	ICP-Sonde
	XIII	62	m	9,4±0,2	0,048	SDB, EDB, SAB, Schädel#, Parenchymläsion	Osteoklastische Trepanation
	XIV	67	m	16,8±1,5	0,014	Schädelbasis#, Os occipitale#, Felsenbein#, EDB, ICB, SAB	Osteoklastische Trepanation SDH-Entfernung
	XV	69	w	14,2±0,9	0,020	ICB, SAB	Osteoklastische Trepanation

Tabelle 10: Standardisierte Tabelle mit demographischen und SHT spezifischen klinischen Daten, Verletzungen und therapeutischen Interventionen; Gruppen unterteilt nach BBB-Funktion (Gruppe I: BBB intakt; Gruppe II: BBB gestört)

4.2. Analyse von S100-B

4.2.1. Ergebnisse von S100-B im Liquor (CSF)

In der folgenden Tabelle (**siehe Tabelle 11**) sehen Sie die gemessenen Werte von S100-B im Liquor zu den jeweiligen Abnahmezeitpunkten in pg/ml und den Wert der Kontrollgruppe.

Zeit nach Trauma [h]	Kontrolle	A	12h	24h	48h	72h
S100-B	0,25±0,04	49,3±12,3 (*#)	21,9±7,7 (*)	9,8±3,8	20,8±9,8 (*)	13,5±5,3 (*)

Tabelle 11: Gemessene Anteile von S100-B der Patienten und der Kontrolle zu den jeweiligen Abnahmezeitpunkten im Liquor in pg/ml; (n=15 Patienten; 10 Kontrollen; Werte als MW±SEM)

In der Kontroll-Gruppe konnten wir einen Wert von 0,2±0,04 pg/ml messen. Geht man davon aus, dass sich im Liquor aus den Ventrikeln und Liquor, der durch eine Lumbalpunktion gewonnen wurde gemäß einer Studie von *Reiber et al.* eine Abnahme von 3,5:1 ergibt, kann man für das Ventrikelsystem von einem Wert von 0,8±0,1 pg/ml bei gesunden Probanden ausgehen (144).

Bei der Messung von S100-B im Liquor ergab sich bereits bei Aufnahme der Patienten in unsere Klinik, bzw. direkt nach Anlage der ICP-Sonde im Schockraum ein signifikanter Anstieg im Vergleich zu unserer Kontrollgruppe. Dieser signifikante Unterschied gegenüber der Kontrolle konnte 12h, 48h und 72h nach Trauma beobachtet werden. Nach 24h konnte man ein Abfallen des gemessenen Proteins erkennen. Die genannten Werte sind in der Abbildung 16 graphisch dargestellt (**siehe Abbildung 16**):

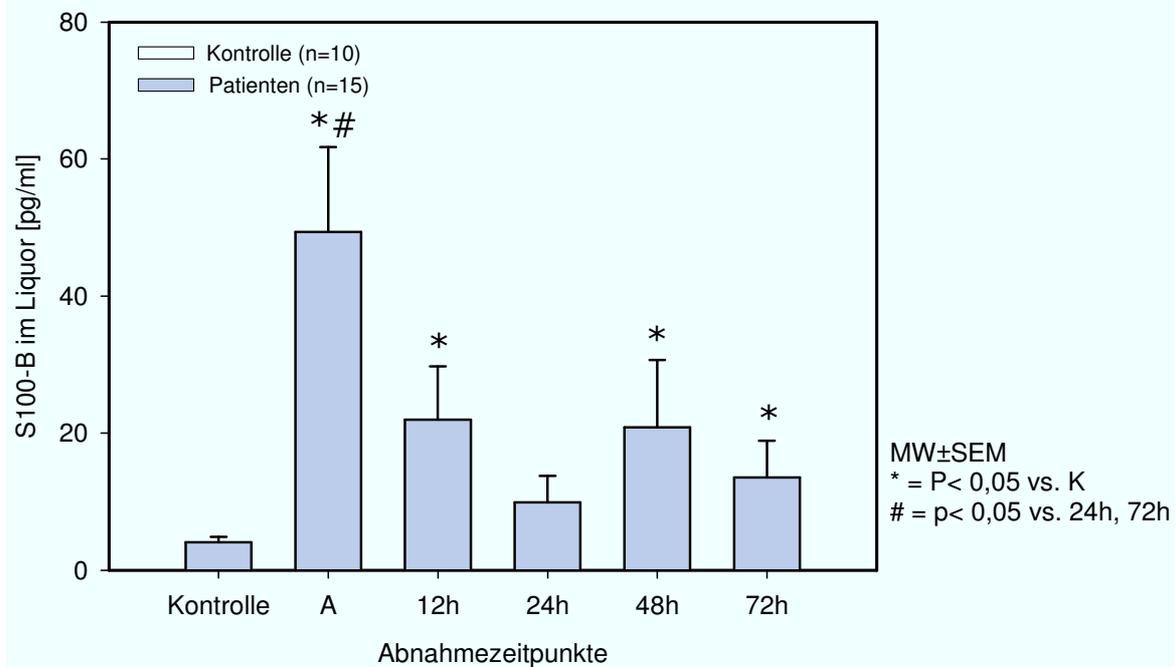


Abbildung 16: Auf der y Achse aufgetragen die gemessenen Werte von S100-B im Liquor, der Negativ-Kontrolle, sowie der Patienten in den ersten 72h nach Trauma in pg/ml; Werte als MW±SEM; p < 0,05

4.2.2. Dynamik von S100-B im Liquor in Abhängigkeit der Blut-Hirn-Schranke (BBB)

Um den Einfluss der BBB-Funktion auf die Dynamik von S100-B zu bestimmen, wurden die Patienten je nach Funktion der BBB in 2 Gruppen unterteilt. Die Patienten der *Gruppe I* weisen dabei gemäß dem Liquor-/Serum-Albuminindex (Q_{alb}) eine intakte, die Patienten der *Gruppe II* eine gestörte BBB Funktion auf (**siehe Tabelle 12**):

Zeit nach Trauma [h]	Kontrolle	A	12h	24h	48h	72h
S100-B BBB intakt	0,25±0,04	21,44±4,0 (*#)	4,94±2,0 (*)	2,81±1,3	6,41±3,45 (*)	8,67±2,8
S100-B BBB gestört	0,25±0,04	77,27±13,3 (*#~)	39,04±9,0 (*)	16,95±5,9	35,24±17,3 (*)	18,35±10,4

Tabelle 12: Zeile a: S100-B im Liquor in pg/ml bei intakter BBB-Funktion: (n=9 Patienten, Werte als MW±SEM); Zeile b: S100-B im Liquor in pg/ml bei gestörter BBB-Funktion: (n=6 Patienten, Werte als MW±SEM)

In *Gruppe I* (BBB intakt) sieht man bereits initial einen massiven Anstieg des Proteins mit einem signifikanten Unterschied gegenüber der Kontrolle und den restlichen Werten aller Abnahmezeitpunkte. Im Verlauf stellt sich nach 12h und 24h ein Abfallen der Werte ein. 48h und 72h post Trauma sieht man einen erneuten Anstieg der gemessenen Werte. Der 12h und 48h Wert weist dabei signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrolle auf. Betrachtet man die *Gruppe II* (BBB gestört), sieht man eine ähnliche Dynamik im Vergleich zu der Gruppe I. Der Wert bei der initialen Abnahme ist gegenüber der Kontrolle, wie gegenüber den Werten der restlichen Abnahmezeitpunkte, signifikant erhöht. Die Ergebnisse nach 12h und 48h weisen, gemäß der Gruppe I, einen signifikanten Anstieg gegenüber der Kontrolle auf. Bei dem Vergleich der beiden Gruppen zeigt sich ein signifikanter Unterschied des Aufnahmewertes von Gruppe II gegenüber aller Werte des gesamten Messzeitraumes von Gruppe I (**siehe Abbildung 17**).

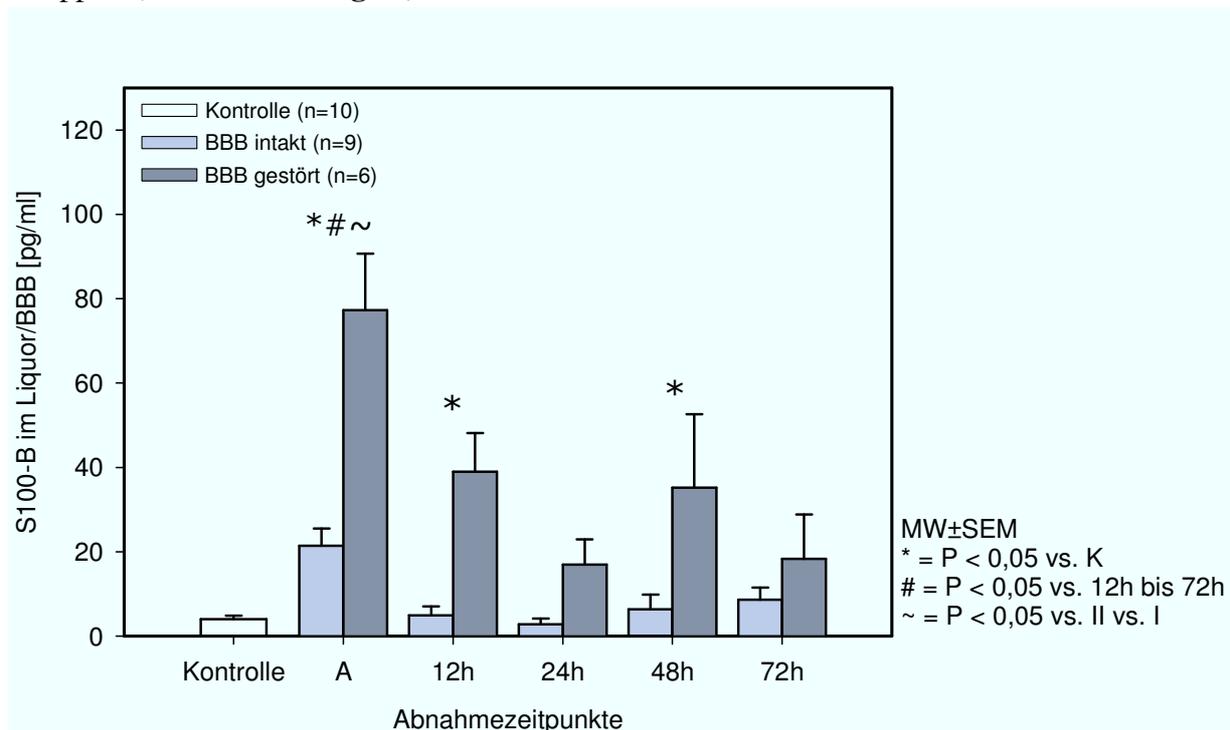


Abbildung 17: Auf der y Achse aufgetragen die gemessenen Werte von S100-B im Liquor, der Negativ-Kontrolle, sowie der Patienten aufgeteilt in zwei Gruppen gemäß der Funktion der BBB (Gruppe I: BBB intakt; Gruppe II: BBB gestört) in den ersten 72h nach Trauma in pg/ml; Werte als MW±SEM; p< 0,05

4.3. Durchflusszytometrische Analyse

4.3.1. Häufigkeit und Dynamik der CD-14+Monozyten (MØ)

In der folgenden Tabelle (siehe Tabelle 13) sind in der ersten Zeile die Ergebnisse der gemessenen Monozytenhäufigkeiten zu den jeweiligen Abnahmezeitpunkten und den gemessenen Werten der Kontrollgruppe dargestellt:

Zeit nach Trauma [h]	Kontrolle	A	12h	24h	48h	72h
CD-14 + Monozyten	2,6±0,6	2,32±0,6	4,10 ±1,0	4,61±1,4	5,26±1,0	6,48±0,8 (*#)
CD-14+/HlaDR +Monozyten	0,34±0,09	1,91±0,5 (*)	2,67±0,7 (*)	2,77±1,0 (*)	2,84±0,7 (*)	3,62±0,6 (*#)

Tabelle 13: Zeile a: Prozentuale Monozytenzahlen und durchschnittliche CD-14-Oberflächen-Rezeptorexpression: (n=15 Patienten, Werte als MW±SEM); Zeile b: Ergebnisse aus Zeile a mit zusätzlichen HlaDR+ Merkmalen als prozentuale Häufigkeiten: (n=15 Patienten, Werte als MW±SEM)

Betrachtet man diese Ergebnisse der CD-14+MØ, bemerkt man, dass sich ein kontinuierlicher Anstieg der Monozyten gegenüber ihrem Aufnahmewert und dem Wert der Kontrollgruppe im Verlauf des gesamten Messzeitraumes von 72h erkennen lässt. Trotzdem lässt sich erst bei dem Ergebnis nach 72h ein signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrolle, wie auch gegenüber dem Aufnahmewert messen (siehe Abbildung 18).

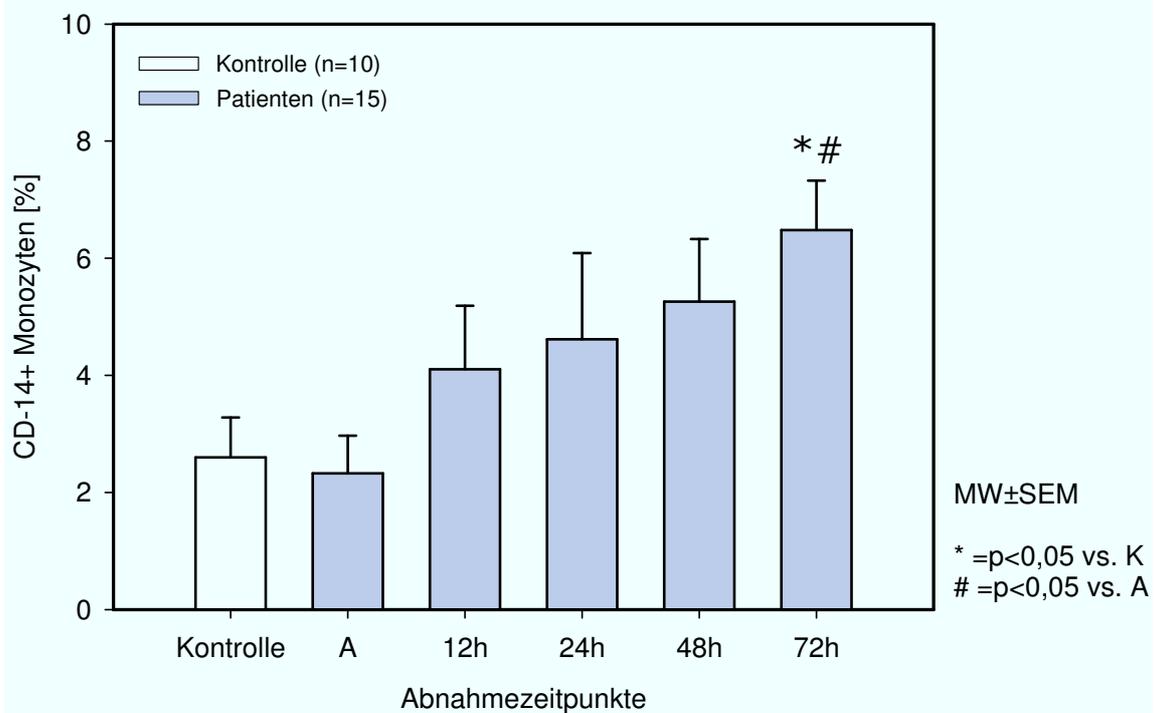


Abbildung 18: CD-14+Monozyten (MØ): Auf der Y-Achse aufgetragen die CD-14 positiven MØ in [%] der Gesamt-Zellzahl. Auf der X-Achse die Probanden (weiß, n=10), gefolgt von der Patientengruppe zu den Abnahmezeitpunkten (n=15). Werte als MW±SEM

Um die gemessenen Monozyten noch genauer zu spezifizieren haben wir neben der Bestimmung der absoluten Monozytenhäufigkeiten noch den prozentualen Anteil an Monozyten, die sich in einem *aktivierten Zustand* befinden, analysiert. Dazu wurden die HLA-DR + Monozyten (Humane Leukozytenantigene) bestimmt. HLA-DR ist ein Molekül des MHC II Komplexes (Major Histocompatibility Complex), das u.a. auf Monozyten vorhanden ist (145). Aufgrund eines extremen genetischen Polymorphismus gibt es eine sehr große Anzahl an unterschiedlichen HLA Phänotypen. Eine niedrige HLA-DR Expression korreliert dabei mit einer geringen Immunkompetenz und u.a. mit einer erhöhten Anfälligkeit für Krankheiten (145-147). Die hierbei gewonnenen Ergebnisse sind in der **Tabelle 13** dargestellt (**siehe oben**). Auch hier lässt sich ein kontinuierlicher Anstieg im gesamten Messverlauf von 72h erkennen. Bereits bei Aufnahme stellt sich ein signifikant erhöhter Wert gegenüber der Kontrollgruppe dar. Dies kann man über den gesamten Messzeitraum verfolgen. Das Ergebnis 72h nach Trauma erbrachte einen signifikant höheren Wert gegenüber dem Aufnahmewert (**siehe Abbildung 19**).

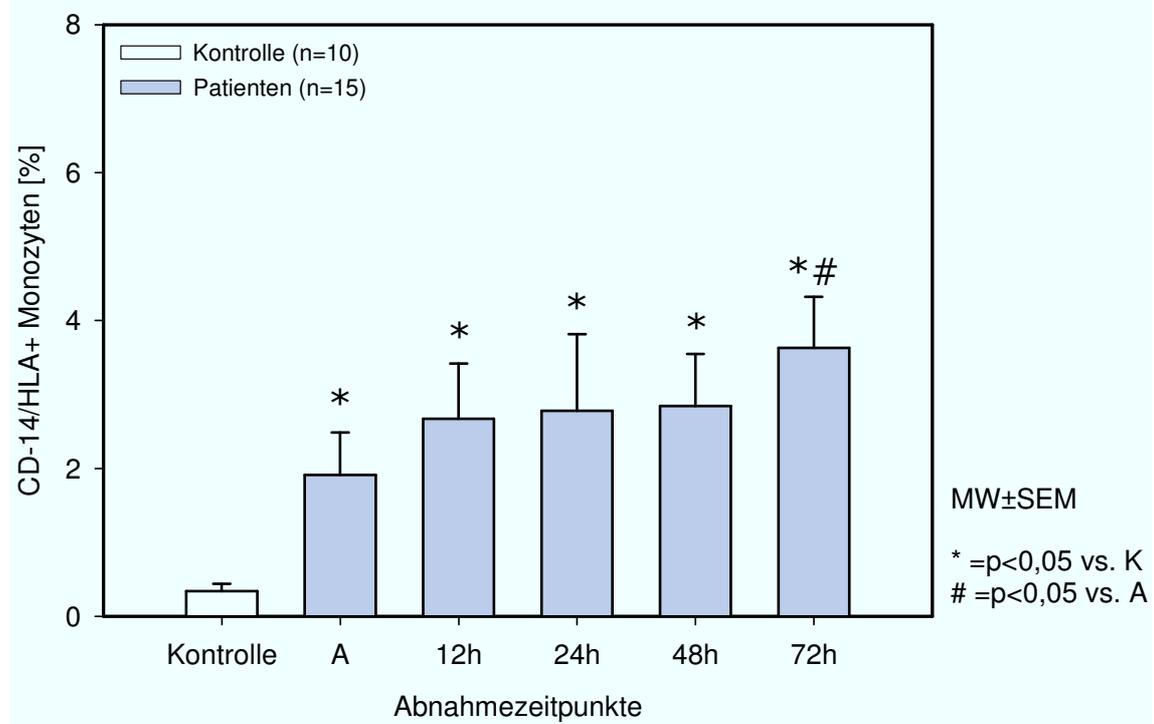


Abbildung 19: CD-14+/HlaDr-Monozyten (MØ): Auf der Y-Achse aufgetragen die CD-14/HlaDr positiven MØ in [%] der Gesamt-Zellzahl. Auf der X-Achse die Probanden (weiß, n=10), gefolgt von der Patientengruppe zu den Abnahmezeitpunkten (n=15). Werte als MW±SEM

4.3.2. Dynamik der CD-14+ Monozyten in Abhängigkeit der BBB-Funktion

Um den Einfluss zwischen der Dynamik der Monozyten und der Funktion der BBB festzustellen haben wir die Patienten bzgl. der BBB-Funktion, vergleichbar der Messung von S100-B, in zwei Gruppen (Gruppe I: BBB intakt; Gruppe II: BBB gestört) unterteilt (**siehe Tabelle 14**):

Zeit nach Trauma [h]	Kontrolle	A	12h	24h	48h	72h
CD-14 + Monozyten BBB intakt	2,60±0,6	2,61±0,9	4,00±1,5	4,34±1,4	6,40±1,5 (*~)	6,91±1,0 (*#)
CD-14 + Monozyten BBB gestört	2,6±0,6	1,89±0,9	4,25±1,6	5,02±3,2	3,53±01,1 (*#)	5,83±1,4 (*#)

Tabelle 14: Zeile a: Prozentuale Monozytenzahlen und durchschnittliche CD-14-Oberflächen-Rezeptorexpression bei intakter BBB-Funktion: (n=9 Patienten, Werte als MW±SEM); Zeile b: Prozentuale Monozytenzahlen und durchschnittliche CD-14-Oberflächen-Rezeptorexpression bei gestörter BBB-Funktion: (n=6 Patienten, Werte als MW±SEM)

In der *Gruppe I* (BBB intakt) konnte man einen kontinuierlichen Anstieg der Werte im Verlauf d gesamten Messzeitraumes erkennen. Dabei weist der Wert nach 48h einen signifikant erhöhten Wert gegenüber der Kontrollgruppe, nach 72h gegenüber der Kontrolle sowie dem Aufnahmewert auf. In *Gruppe II* kommt es nach Aufnahme und 12h nach Trauma zu einer Zunahme der Zellen. Nach 24h kommt es zu einem deutlichen Abfall. Im weiteren Verlauf steigen die Werte wieder an, bis sie nach 72h den höchsten Wert des Messzeitraumes erreichen. Die Ergebnisse nach 48h und 72h weisen signifikant erhöhte Werte gegenüber der Kontrolle sowie dem Aufnahmewert auf. Der Vergleich der Ergebnisse der zwei Gruppen erbrachte für *Gruppe I* (BBB intakt) nach 48h signifikant höhere Werte gegenüber dem Aufnahmewert der *Gruppe II* (BBB gestört) (**siehe Abbildung 20**).

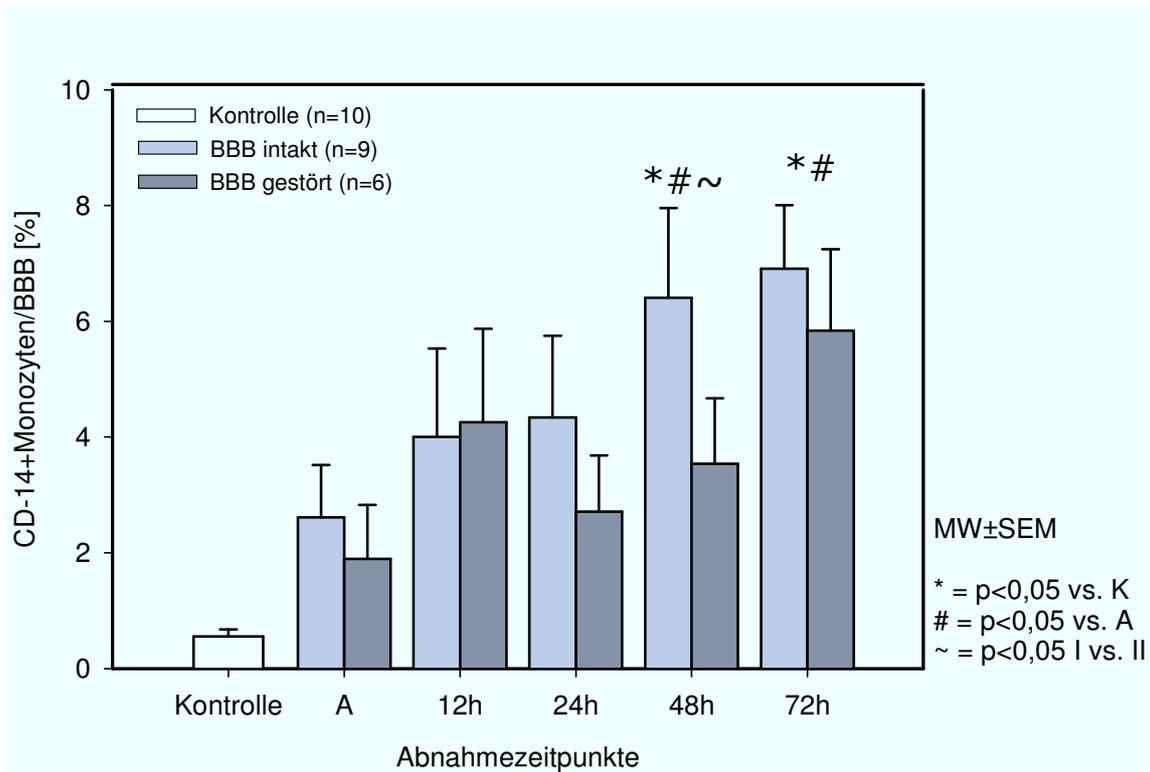


Abbildung 20: CD-14+/BBB abh. (MØ): Auf der Y-Achse aufgetragen die CD-14 positiven MØ in [%] der Gesamt-Zellzahl. Auf der X-Achse die Probanden (weiß, n=10), gefolgt von den Patientengruppen; eingeteilt in 2 Gruppen je nach BBB Funktion zu den Abnahmezeitpunkten (n=15) (Gruppe I: BBB intakt; Gruppe II: BBB gestört), Werte als MW±SEM

4.3.3. Häufigkeit und Dynamik der CD-15+ Granulozyten (Gα)

Entsprechend den durchflusszytometrischen Ergebnissen der CD-14+ Monozyten wurden die CD-15+ Granulozyten gemäß ihrer Häufigkeit und Dynamik in den ersten 72h nach Trauma analysiert (siehe Tabelle 15).

Zeit nach Trauma [h]	Kontrolle	A	12h	24h	48h	72h
CD-15 + Granulozyten	0,98±0.2	9,15±1,6	24.65±1.6 (*#)	25.9±3.1 (*#)	34.3±5.0 (*#)	25.5±3.5 (*#)

Tabelle 15: Prozentuale Granulozytenzahlen und durchschnittliche CD15-Oberflächen-Rezeptorexpression: (n=15 Patienten, Werte als MW±SEM)

Betrachtet man die Ergebnisse (**siehe Tabelle 15**), lässt sich bis 48h nach Trauma ein kontinuierlicher Anstieg erkennen. Nach 72h bemerkt man einen leichten Rückgang des prozentualen Zellanteils. Dieser Anstieg ist ab der ersten Abnahme direkt nach Anlage der ICP-Sonde gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht. Ab 12h post Trauma sind die gemessenen Werte gegenüber der Kontrolle wie auch gegenüber dem Aufnahmezeitpunkt signifikant erhöht. Dieser signifikante Unterschied konnte trotz des leichten Abfalls nach 72h über den gesamten Messzeitraum verfolgt werden (**siehe Abbildung 21**).

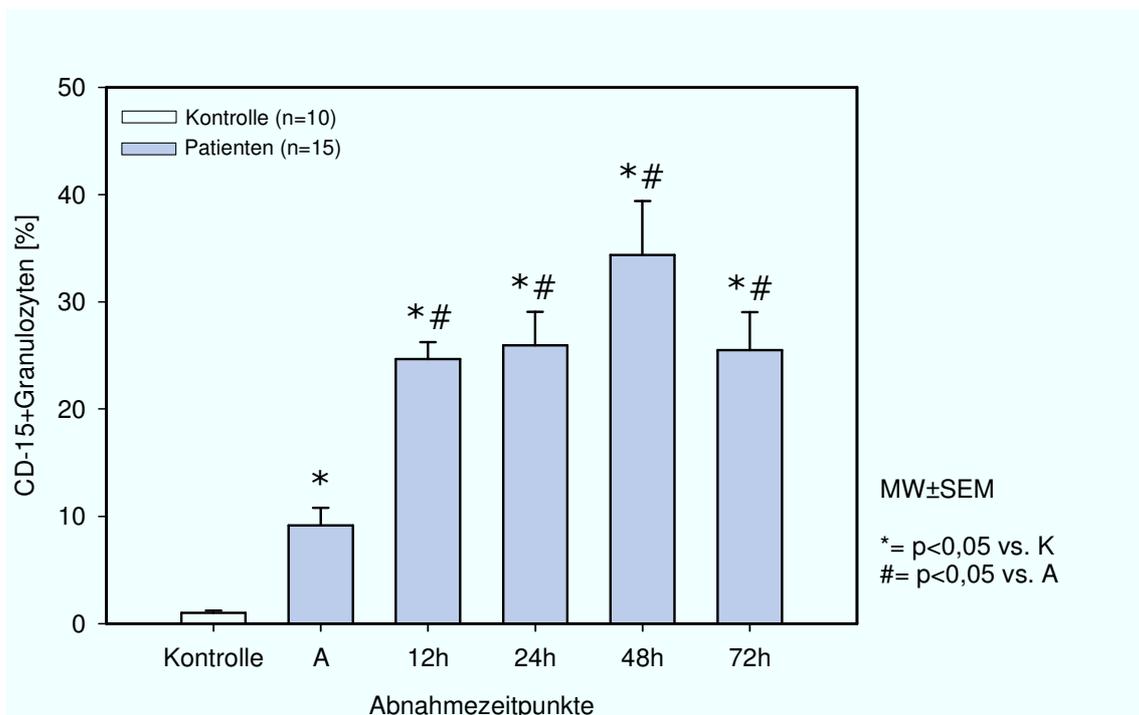


Abbildung 21: CD-15+Granulozyten (Ga): Auf der Y-Achse aufgetragen die CD-15 positiven Ga in [%] der Gesamt-Zellzahl. Auf der X-Achse die Probanden (weiß, n=10), gefolgt von der Patientengruppe zu den Abnahmezeitpunkten (n=15). Werte als MW±SEM

4.3.4 Dynamik der CD-15+Granulozyten in Abhängigkeit der BBB-Funktion

Um den Einfluss der BBB-Funktion auf die Dynamik der Granulozyten zu untersuchen, haben wir die Patienten, gemäß den Monozyten, je nach Funktion der BBB wiederum in zwei Gruppen (Gruppe I: BBB intakt; Gruppe II: BBB gestört) eingeteilt (Siehe Tabelle 16).

Zeit nach Trauma [h]	Kontrolle	A	12h	24h	48h	72h
CD-15 + Granulozyten BBB intakt	0,98±0,2	8,61±1,3 (*)	26,96±2,6 (*)	25,42±4,6 (*#)	33,38±7,0 (*#)	22,27±4,6 (*#)
CD-15 + Granulozyten BBB gestört	0,98±0,2	14,92±1,0 (*)	24,48±1,3 (*)	28,37±2,9 (*)	35,80±7,6 (*#~)	30,33±5,3 (*)

Tabelle 16: Zeile a: Prozentuale Granulozytenzahlen und durchschnittliche CD-15-Oberflächen-Rezeptorexpression bei intakter BBB-Funktion: (n=9 Patienten, Werte als MW±SEM); Zeile b: Prozentuale Granulozytenzahlen und durchschnittliche CD-15-Oberflächen-Rezeptorexpression bei gestörter BBB-Funktion: (n=6 Patienten, Werte als MW±SEM)

Man sieht bei den Ergebnissen der *Gruppe I* (BBB intakt), vergleichbar mit den Ergebnissen ohne Unterteilung nach BBB-Funktion (siehe **Abbildung 21**), dass bereits initial ein signifikanter Anstieg gegenüber der Kontrolle erkennbar ist. Entgegen den Messungen ohne Unterteilung nach BBB-Funktion bemerkt man bereits nach 24h ein leichtes Abfallen der gemessenen Werte. Trotzdem kann man einen signifikanten Unterschied gegenüber der Kontrolle über den gesamten Messzeitraum verfolgen. Ab der 24h Messung sieht man zudem einen signifikanten Anstieg gegenüber dem Aufnahmewert, was sich vergleichbar zu der Kontrolle über den restlichen Messzeitraum von 72h verfolgen lässt. Bei den Ergebnissen der *Gruppe II* (BBB gestört) sieht man entsprechend der Messung ohne Unterteilung nach BBB einen kontinuierlichen Anstieg der Zellen bis 48h nach Trauma. Nach 72h lässt sich auch hier

ein leichtes Abfallen erkennen. Bereits bei Aufnahme ist dieser Anstieg gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht. Gegenüber dem Aufnahmezeitpunkt weist nur der 48h Wert einen signifikanten Unterschied auf. Vergleicht man die zwei Gruppen untereinander, sieht man bei der 48h Messung einen signifikanten Unterschied zwischen *Gruppe II* und dem Aufnahmezeitpunkt von *Gruppe I* (siehe **Abbildung 22**).

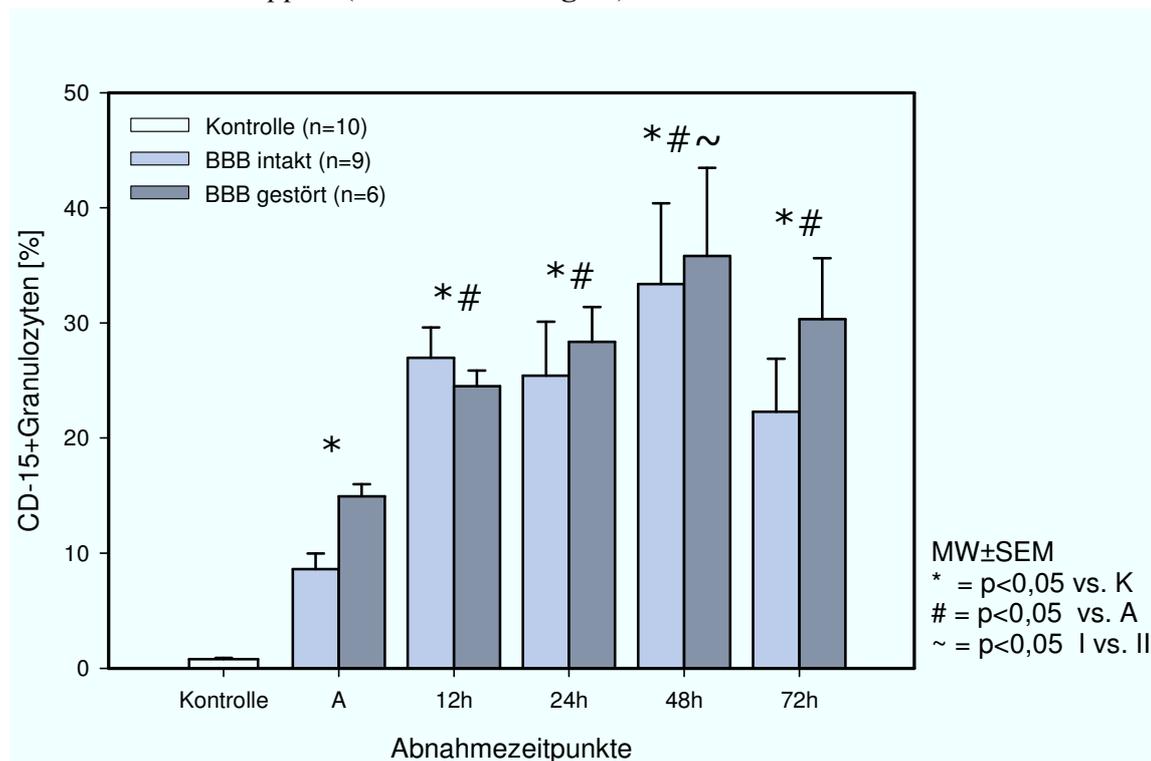


Abbildung 22: CD-15+Granulozyten (Ga): Auf der Y-Achse aufgetragen die CD-15 positiven Ga in [%] der Gesamt-Zellzahl. Auf der X-Achse die Probanden (weiß, n=10), gefolgt von den Patientengruppen; eingeteilt in 2 Gruppen je nach BBB Funktion zu den Abnahmezeitpunkten (n=15). Werte als MW±SEM

4.4. Polymorph-Nukleäre-Elastase (PMN-Elastase)

4.4.1. Dynamik der PMN-Elastase im Liquor

Die folgende Tabelle zeigt die gewonnenen Ergebnisse der Messung der PMN-Elastase im Liquor (siehe Tabelle 17):

Zeit nach Trauma [h]	Kontrolle	A	12h	24h	48h	72h
PMN-Elastase	3,68±0,3	4,97±1,9	7,33±2,3	9,33±1,7	27,12±10,6 (*#)	57,1±21,5 (*#)

Tabelle 17: PMN-Elastase im Liquor im Verlauf von 72 Stunden post SHT in ng/ml (Kontrolle: n =10; Patienten: n=15; Werte als MW±SEM)

Wie bereits in den Kapiteln der Einleitung erläutert ist in den Granula der CD-15+ Granulozyten PMN-Elastase vorhanden. Interessanterweise lässt sich bei der Analyse der PMN-Elastase im Vergleich zu den Granulozyten ein Unterschied hinsichtlich der Dynamik in den ersten 72h nach Trauma feststellen. So lässt sich entgegen dem bereits initial vorhandenen signifikanten Anstieg der Granulozyten eine gewisse Verzögerung bis zu einem ersten deutlichen Ansteigen der PMN-Elastase erkennen. Erst 48h nach SHT erkennt man einen signifikanten Anstieg gegenüber den Werten der Kontrollgruppe sowie gegenüber dem Aufnahmewert. Entgegen der Analyse der Granulozyten mit einem leichten Abfall nach 72h kann man bei der PMN-Elastase ein kontinuierliches Ansteigen über 72h sehen. Der 72h-Wert ist gegenüber der Kontrolle wie auch gegenüber der Aufnahme signifikant erhöht (siehe **Abbildung 23**).

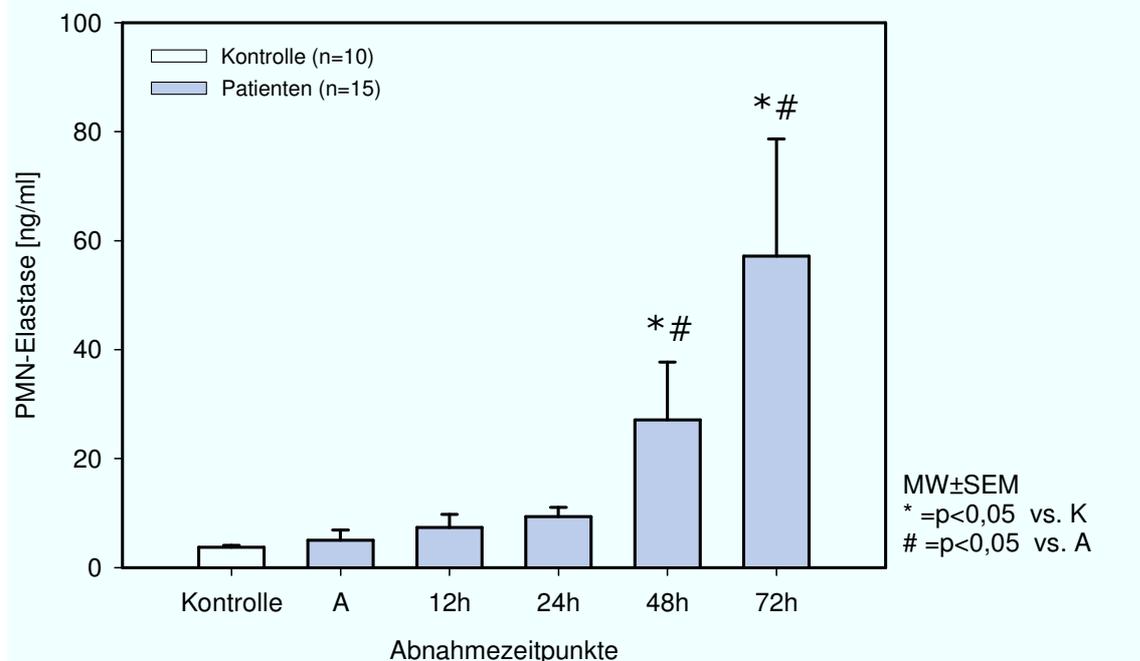


Abbildung 23: PMN-Elastase: Auf der y-Achse sind die Werte für PMN-Elastase in ng/ml im Liquor aufgetragen; auf der X-Achse die jeweiligen Abnahmezeitpunkte (Werte als MW±SEM)

4.4.2. Dynamik der PMN-Elastase im Liquor in Abhängigkeit der BBB-Funktion

Gemäß den vorangegangenen Messungen wurden die Ergebnisse der PMN-Elastase ebenso je nach Funktion der BBB in zwei Gruppen (Gruppe I: BBB intakt; Gruppe II: BBB gestört) eingeteilt (siehe Tabelle 18):

Zeit nach Trauma [h]	Kontrolle	A	12h	24h	48h	72h
PMN-Elastase; BBB intakt	3,68±0,3	2,93±1,9	3,87±2,5	8,20±2,1	14,56±3,8 (*#)	58,56±32,6 (*#)
PMN-Elastase BBB gestört	3,68±0,3	8,8±4,2	11,72±4,3	9,80±3,5	45,26±26,6 (*~)	50,00±27,1 (*~)

Tabelle 18: Zeile a: PMN-Elastase in ng/ml bei intakter BBB-Funktion: (n=9 Patienten, Werte als MW±SEM); Zeile b: PMN-Elastase in ng/ml bei gestörter BBB-Funktion: (n=6 Patienten, Werte als MW±SEM)

Betrachtet man die Ergebnisse, bemerkt man in *Gruppe I* (BBB intakt) entsprechend der Messung ohne Unterteilung in BBB-Funktion einen ebenso verzögerten, aber kontinuierlichen Anstieg im Verlauf der Abnahmezeitpunkte. 48h post Trauma zeigt sich ein signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrolle sowie gegenüber der Aufnahme. Diesen signifikanten

Unterschied kann man auch 72h nach Trauma noch erkennen. In *Gruppe II* (BBB gestört) sieht man nach einem Ansteigen in den ersten 12h ein Abfallen nach 24h. Die Messungen nach 48h, sowie nach 72h weisen wiederum ein kontinuierliches Ansteigen auf. Entgegen den Ergebnissen in Gruppe I zeigt sich nach 48h und 72h ein signifikanter Unterschied nur gegenüber der Kontrollgruppe. Vergleicht man die zwei Gruppen miteinander, zeigt sich ein signifikanter Unterschied nach 48h in Gruppe II gegenüber dem Wert bei Aufnahme und nach 12h von Gruppe I. 72h post Trauma ist dieser signifikante Unterschied noch gegenüber der Aufnahme von Gruppe I vorhanden (**siehe Abbildung 24**).

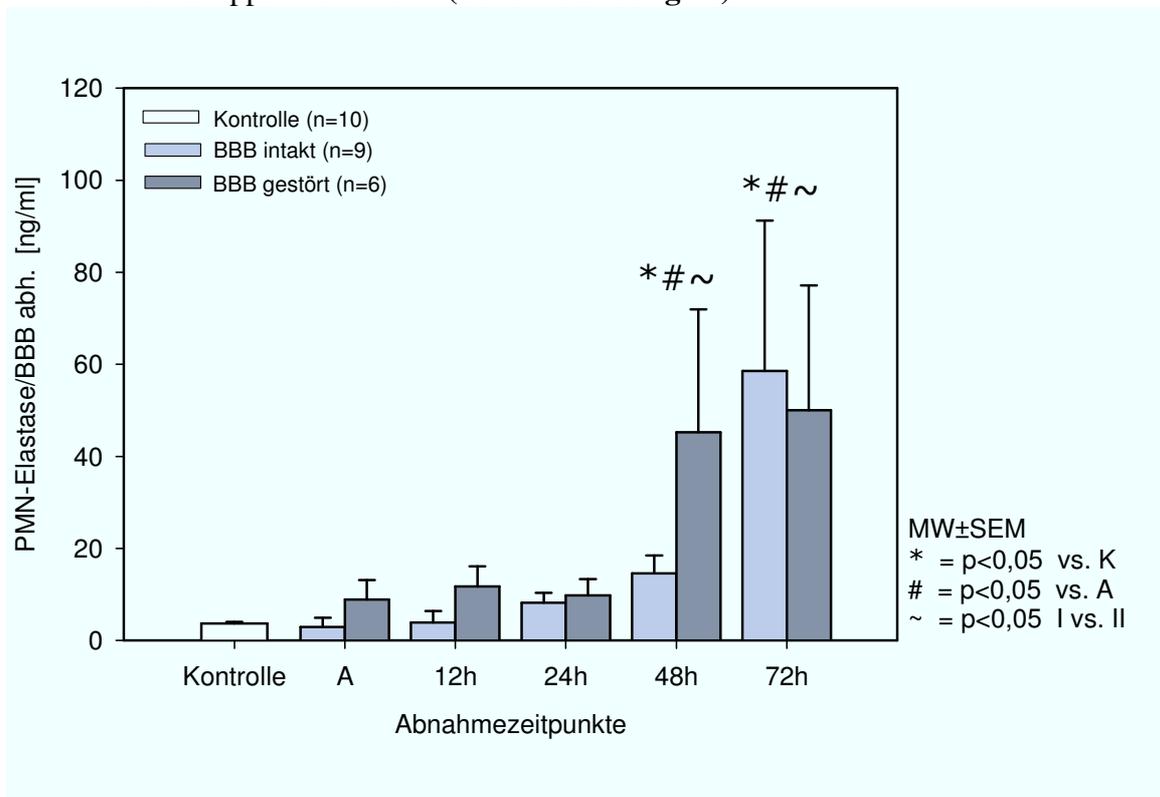


Abbildung 24: PMN-Elastase: Auf der Y-Achse aufgetragen die PMN-Elastase im Liquor in ng/ml; Auf der x-Achse die Probanden (weiß, n=10), gefolgt von den Patientengruppen; eingeteilt in 2 Gruppen je nach BBB Funktion zu den Abnahmezeitpunkten (n=15). Werte als MW±SEM

5. Diskussion

Die vorliegende Studie präsentiert erstmalig das initiale Verteilungsmuster *immunkompetenter Zellen* und zweier wichtiger biochemischer Marker, *S100-B* und *PMN-Elastase*, im Liquor von Patienten nach isoliertem Schädel-Hirn-Trauma in der frühen posttraumatischen Phase. Das Protein S100-B, als ein bereits bekannter Marker, der zur Abschätzung des initialen Schadensausmaßes nach SHT herangezogen werden kann, war bereits direkt nach Abnahme im Schockraum, wie auch über den gesamten Messzeitraum, bis auf den 24 Stunden-Wert, signifikant erhöht (100, 148). Bei der anschließenden Unterteilung in zwei Gruppen je nach Funktion der BBB konnte man in der Gruppe mit gestörter BBB bereits direkt nach Aufnahme einen signifikanten Unterschied gegenüber der Gruppe mit intakter BBB sehen. Als immunkompetente Zellen wurden CD-14+ Monozyten und CD-15+ Granulozyten in den ersten 72h nach Trauma bzgl. ihrer Dynamik im Liquor durchflusszytometrisch gemessen. Wie wir zeigen konnten, lässt sich bei den analysierten Monozyten ein kontinuierlicher Anstieg in den ersten 72h nach Trauma gegenüber dem Aufnahmewert erkennen. Die Granulozyten verhielten sich mit ihrer Dynamik in den ersten 48h nach Trauma ähnlich. Nach 72h konnten wir jedoch ein leichtes Abfallen erkennen. Für die aus den Granula der CD-15+ Granulozyten stammende PMN-Elastase konnte ebenfalls ein kontinuierlicher Anstieg im Zeitraum der ersten 72h nach Trauma gesehen werden. Ein weiterer Schwerpunkt der Studie lag neben der Untersuchung der Dynamik der Zellen und des Proteins S100-B in der Analyse des Einflusses der Blut-Hirn-Schranke (BBB) auf die gefundenen Ergebnisse. Dazu wurde von uns die Funktion der BBB der einzelnen Patienten bei jedem Abnahmezeitpunkt untersucht und die Ergebnisse der Zellmessungen in Abhängigkeit einer intakten oder eingeschränkten BBB-Funktion verglichen. Natürlich müssen die vorliegenden Ergebnisse bei einer experimentellen Studie dieser Art sehr kritisch betrachtet werden, was im Folgenden diskutiert werden soll.

5.1. Patienten und Kontrollkollektiv

Die in die Studie eingeschlossenen Patienten erlitten alle ein isoliertes Schädelhirntrauma und wurden spätestens 45 Minuten nach Trauma in unseren Schockraum eingeliefert. Von den 15 in die Studie aufgenommenen Patienten handelte es sich um 10 Männer und 5 Frauen. Die Verteilung der epidemiologischen Daten, hier v.a. die Geschlechtsverteilung von 2/3 Männern zu 1/3 Frauen entspricht dabei in etwa den deutschen Traumaregistern (149, 150). Das durchschnittliche Alter der Patienten lag bei 46,8 Jahren, was im Vergleich zu den o.g. Studien etwas höher lag. Das Durchschnittsalter in vorher zitierten epidemiologischen Studien lag bei 31,6 bzw. 39 Jahren. Sicherlich ist dabei u.a. das von uns gewählte Studiendesign mitverantwortlich, da alle Patienten unter 18 Jahren aus der Studie ausgeschlossen wurden. Bezüglich des Verletzungsmechanismus- und -musters beschreiben u.a. *Ruchholtz et al.*, dass bei ca. 50% aller schweren SHTs zusätzliche Verletzungen anderer Körperregionen (Polytrauma) vorliegen (151, 152). Für unsere Studie haben wir das Design so gewählt, dass ausschließlich Patienten mit isoliertem, schwerem SHT berücksichtigt wurden und somit einen initialen oder frühzeitig nach Trauma (noch vor Sedierung der Patienten) erreichten GCS von ≤ 8 Punkten aufweisen mussten. Bei der Einteilung der Verletzungsschwere wurde der etablierte *Glasgow-Coma-Scale* (GCS), der 1970 von *Teasdale und Jennett* entworfen und 1974 veröffentlicht wurde, verwendet. Die Klassifikation der SHTs in leichtes, mittelschweres und schweres SHT wird dabei anhand der Bewusstseinslage der Patienten direkt nach Trauma vorgenommen. Dazu werden drei klinische Parameter – *Augenöffnen (max. 4)*, *verbale Reaktion (max. 5)*, *motorische Reaktion (max. 6)* – herangezogen und mit insgesamt 3 – 15 Punkten versehen, wobei 15 Punkte volles Bewusstsein und 3 Punkte mit Koma oder Tod definiert sind (12). Diesbezüglich hat u.a. die Gruppe um *Lannoo et al.* beschrieben, dass der GCS-Wert mit der initialen Mortalität, der Morbidität sowie dem Langzeitverlauf nach SHT korreliert (153, 154). Die Dokumentation der präklinischen- und klinischen Daten erfolgte

gemäß den Richtlinien der *Europäischen Konsensuskonferenz zur Aufnahme von Daten polytraumatisierter Patienten* (155).

5.2. Probengewinnung

Das Studiendesign mit einer sehr frühzeitigen Gewinnung der Proben wurde bereits in zahlreichen Arbeiten, die sich mit dem Thema des sekundären Hirnschadens beschäftigt haben, verwendet. Einige Arbeitsgruppen konnten klar aufzeigen, wie wichtig das frühzeitige Erkennen der sekundären Auswirkungen ist und konnten die Wichtigkeit der raschen Prävention eines sekundären Hirnschadens als maßgeblichen Parameter für das negative Outcome der Patienten herausarbeiten. Die Arbeitsgruppe um *Miller et al.* zeigte, dass sich bei 90% aller Patienten, die an einem SHT verstorben sind, ein sekundärer Hirnschaden histopathologisch nachweisen lässt (156). Selbst bei leichten SHTs, ohne eindeutigen morphologischen Hinweis einer intrazerebralen Läsion, spielt der sekundäre Hirnschaden als unabhängige prognostische Variable für die Letalität eine große Rolle (157). U.a. die Gruppe um *Hayakata et al.* hat die auch von uns gewählten Abnahmezeitpunkte in ihrer Studie verwendet und die Ansicht eines wichtigen Zusammenhangs zwischen den Ergebnissen und den Abnahmezeitpunkten vertreten (100, 159). Aus der Grundlage dieser Arbeiten haben wir die Zeitpunkte unserer Probengewinnung festgelegt. Wir wählten als ersten Abnahmezeitpunkt die Anlage der ICP-Sonde im Schockraum, was nach unserem Studienprotokoll spätestens 45 min nach Trauma vorgenommen werden musste. Die weiteren Proben wurden 12h, 24h, 48h und 72h nach Trauma gewonnen (**siehe Abbildung 9**). Alle Proben sind im direkten Anschluss an die Abnahme weiterverarbeitet worden. Alle Patienten, bei denen z.B. eine deutliche Zeitverzögerung bis zur Anlage der ICP-Sonde vorlag, wurden aus der Studie ausgeschlossen.

Der Studienzeitraum unseres Protokolls reicht sicherlich nicht aus, um die kompletten Vorgänge auf zellulärer Ebene, die an der Entstehung des sekundären Hirnschadens beteiligt sind, abzubilden. Die gewonnenen Daten spielen aber sicherlich eine wichtige Rolle für das grundlegende Verständnis der pathophysiologischen Zusammenhänge. Auch wenn die Komplexität der Entstehung des sekundären Hirnschadens nicht vollständig analysiert werden kann, erfordert die Durchführung einer klinischen Studie an Patienten die primäre Verpflichtung, diesen keinen zusätzlichen Schaden zuzufügen (158). Die Proben wurden ausschließlich durch klinisch bereits gelegte Zugänge, die zu diagnostischen und therapeutischen Zwecken notwendig waren, gewonnen. Die Abnahme der Liquorproben stellt keine weitere Belastung für den Patienten dar, da durch die meist deutlich erhöhten intrakraniellen Druckwerte routinemäßig ein Liquorabfluss, in unserem Fall durch das Legen einer ICP-Sonde, zur Senkung des ICP angeordnet wurde.

Die vorliegende Arbeit stellt trotz einiger schwieriger Aspekte bei der Durchführung die erstmalige Untersuchung der frühen, posttraumatischen Phase nach SHT dar, was u.a. für die frühe Probengewinnung innerhalb der ersten 45 min nach Trauma eine große logistische Herausforderung bedeutete.

Einen weiteren kritischen Punkt bei der vorliegenden Studie nimmt die Möglichkeit einer Beeinflussung der Ergebnisse durch eine systemische Inflammation oder eine generalisierte neurologische Erkrankung ein, wodurch die Ergebnisse verfälscht werden können. Einerseits haben wir, um den Einfluss des systemischen Kreislaufs zu beurteilen und zu berücksichtigen, die Funktion der Blut-Hirn-Schranke anhand des Reiber-Quotienten gemessen, andererseits wurde mit Hilfe der Abnahme einer Serum-Probe incl. Differential Blutbild eine mögliche systemische Entzündung nahezu ausgeschlossen. Dadurch konnten auch diese Fehlerquellen weitgehend vernachlässigt werden.

5.3. S100-B

Das Protein, das 1965 von *Moor et al.* in bovinem Nervengewebe gefunden wurde, ist ein saures, Kalzium bindendes Polypeptid von ca. 10 kDa, das v.a. in den Zellen der Astroglia und den Schwannschen Zellen vorkommt (89). Die Arbeitsgruppen um *Kogel et. al.* und *Hayakata et al.* konnten dem Protein bereits 2004 einen Anstieg im Serum und Liquor bei Patienten nach SHT nachweisen, was einen Zusammenhang mit der Schwere des SHT vermuten lässt (100, 148).

In der vorliegenden Studie konnten wir belegen, dass sich bei Patienten mit einem sSHT ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem von uns analysierten Anstieg des Proteins S100-B und der Verletzungsschwere erkennen lässt. Zusätzlich haben wir die Korrelation der S100-B Level mit der Funktion der BBB untersucht. Bereits bei der ersten Abnahme des Liquors direkt nach Anlage der ICP-Sonde konnte man bei allen Patienten einen signifikanten Anstieg ($49,3 \pm 12,3$ pg/ml) gegenüber der Kontrolle mit einem Abfallen im Zeitraum der ersten 72h nach Trauma erkennen, wobei stets eine Signifikanz gegenüber der Kontrolle bestehen blieb ($13,5 \pm 5,3$ pg/ml). Nachdem wir in unserer Studie keine Datenerhebung 6h nach Trauma vorgenommen haben, konnten wir im Gegensatz zu der Studie von *Hayakata et al.*, der einen Anstieg in den ersten 6h nach Trauma beschrieb, dies nicht bestätigen (100). Außerdem zeigte sich bei unseren Werten der Kontrollgruppe mit $0,25 \pm 0,04$ pg/ml im Vergleich zu den Werten von *Hayakata et al.* ($3,3 \pm 1,3$ pg/ml) ein dtl. Unterschied. Neben der Arbeitsgruppe um *Hayakata et al.* haben auch *Ucar et al.* einen signifikanten Anstieg von S100-B bei Patienten mit schlechtem Outcome beschrieben (100, 159). Diese Korrelation wurde in unserer Studie noch nicht analysiert und ist aktuell Gegenstand weiterer Arbeiten. Trotz verschiedener Quellen, aus denen das Protein stammen kann (91, 97), untermauern die von uns gewonnen Ergebnisse die Tatsache, welche auch von mehreren Autoren unterstützt wird, dass das Protein S100-B nach SHT hauptsächlich aus dem ZNS ausgeschüttet wird (111, 113, 160,

161). Der genaue Mechanismus der Ausschüttung des Proteins ist jedoch noch nicht vollständig geklärt und muss sicherlich noch genauer untersucht werden, um eine weitere mögliche Fehlerquelle bei der Analyse von S100-B nach SHT auszuschalten. Vermutet wird eine Freisetzung aus durch das SHT geschädigten neuronalen Zellen. 2001 wurde von *Reiber et al.* beschrieben, dass sich ein Anstieg des Proteins in Abhängigkeit von Q_{alb} , einem Indikator der BBB Funktion, beobachten lässt (144). Dieser Zusammenhang wurde 2008 auch von einer Arbeitsgruppe um *Kirchhoff et al.* herausgearbeitet (180). In dieser Studie konnte neben einer Korrelation zwischen dem Ansteigen von S100-B und der Höhe des ICP, eine ICP abhängige Korrelation zwischen S100-B und Q_{alb} bei Patienten mit schwerem SHT aufgezeigt werden. Auch in unserer Studie konnten wir eine Korrelation zwischen dem Ansteigen des Proteins und Q_{alb} nachweisen. So konnten wir in der Gruppe mit gestörter BBB einen signifikanten Anstieg gegenüber der Gruppe mit intakter BBB registrieren. Somit kann man überlegen, die Dynamik von S100-B als Parameter der BBB-Funktion einzusetzen, was auch durch *Marchi et al.* postuliert wurde (162). Nachdem der Untergang von Nervenzellen bei Vorhandensein eines sekundären Hirnschadens auch noch nach dem eigentlichen Trauma weiter voranschreiten kann, kann man einen, wie auch in unserer Studie vorhandenen Anstieg der S100-B Werte im Verlauf von 72h nach SHT erklären. So konnten auch *Grasso et al.* in einer experimentellen Studie an Patienten mit Subarachnoidalblutungen herausarbeiten, dass die S100-B Konzentration mit dem Ausmaß der geschädigten Neuronen korreliert (163). Verfolgt man die Dynamik von S100-B weiter, erkennt man, dass sich bei einem Ende des Zellunterganges auch die S100-B Konzentrationen verringert, wodurch sich auch Aussagen bzgl. des Verlaufes machen lassen (164). In unserer Arbeit konnten wir diesen stetigen Abfall des Proteins ebenfalls erkennen. Wie bereits erwähnt, gibt es auch extrakranielle Quellen des Proteins (91, 97). Es ist also prinzipiell möglich, dass nicht nur neuronales S100-B für einen Anstieg nach SHT ursächlich sein kann. So zeigt sich u.a. nach kardiochirurgischen Eingriffen ein Anstieg von S100-B im Serum, wonach ein Zusammenhang zwischen einem

Thoraxtrauma und einem erhöhten S100-B Wert ebenfalls möglich erscheint (165, 166). Analysen zeigten allerdings, dass in den Thoraxorganen nur ein geringer Anteil an S100-B vorhanden ist. Da in unserer Studie ausschließlich Patienten mit isoliertem SHT eingeschlossen wurden und die erreichten S100-B Werte um ein Vielfaches höher sind, als es nach Thoraxtraumen möglich wäre, kann man bei unseren Patienten von einem spezifischen Anstieg von neuronalem S100-B ausgehen. Trotzdem muss man sicherlich ein genaues Augenmerk darauf legen, ob es sich bei den in die Studie aufgenommenen Patienten definitiv um isolierte SHT-Patienten handelt, um nicht zu falsch positiven Ergebnissen zu gelangen. Außerdem ist es sicherlich eine sinnvolle Überlegung neben S100-B weitere Biomarker, wie es *Bloomfield et al.* in einer Publikation aus 2007 darstellen, zu verwenden, um durch mögliche Begleitverletzungen entstandene extrakranielle Quellen, als Ursache für den Anstieg des Proteins auszuschließen (182). Es ist auch immer wieder zu beobachten, dass sich trotz eines scheinbar geringen SHT-Schadens, ohne ein erkennbares morphologisches Korrelat im cCT, ein S100-B Anstieg erkennen lässt (167). Neben den bereits erläuterten extrakraniellen Quellen ist in diesem Zusammenhang die Art des Traumas von entscheidender Bedeutung. Hierbei spielen v.a. Verkehrsunfälle und Stürze eine erhebliche Rolle. Die dabei oft bestehenden „Dezelerationstraumen“ sind besonders zu erwähnen. Erfährt das Gehirn ein solches Trauma, kommt es durch die hohen, auf das Gehirn wirkenden Scherkräfte zu diffusen axonalen Schädigungen (168). Untersucht man diesen Zusammenhang etwas genauer, kann es auch ohne ein eigentlich morphologisch sicher identifizierbares SHT zu einem S100-B Anstieg kommen, was nicht an einer mangelnden Spezifität des Markers, sondern an einer mangelnden Sensitivität der herangezogenen Untersuchungen liegen kann. Umgekehrt gibt es Regionen im Gehirn, die bei einer vergleichsweise geringen Schädigung schwere neurologische Defizite nach sich ziehen, aber aufgrund ihres vergleichsweise kleinen Volumens eine nur geringe Ausschüttung des Proteins bewirken. Eine andere, sehr wichtige Überlegung bei der Verwendung von S100-B in der Diagnostik nach SHT, ergibt sich aus der

Tatsache, dass auch extrakranielle Verletzungen intrakranielle Schäden hervorrufen können. Die Arbeitsgruppe um *Pelinka et al* konnte u.a. einen Zusammenhang zwischen hämorrhagischem Schock und der Ausbildung eines SHT erarbeiten. Auch wenn sich vereinzelt S100-B Anstiege in Schocksituationen, auch ohne eigentliches SHT erkennen lassen, kann nicht von einem grundsätzlichen Zusammenhang ausgegangen werden. Neben den von uns diskutierten Anwendungen bei Patienten mit schwerem SHT ist ein weiterer interessanter Aspekt die Analyse des Proteins nach leichten SHTs. Dies wurde auch schon in diversen Arbeitsgruppen, u.a. durch die Gruppe um *Biberthaler et al.*, eingehend untersucht. Man hat herausgefunden, dass sich bei Patienten mit leichten Anzeichen eines SHT, wie z.B. Erbrechen, Schwindel und einer Amnesie, also ohne einen eindeutigen radiologischen Nachweis einer cerebralen Schädigung, unterschiedlich hohe Werte im Vergleich zu gesunden Probanden erkennen ließen. Man kann somit evtl. den Schluss ziehen, dass es sich dabei v.a. um Patienten mit einem potentiell erhöhten Risiko für intrakranielle Komplikationen handeln könnte. Folglich eignet sich das Protein in diesen Fällen sicherlich als Risiko-Screening und kann zur Entscheidungsfindung für weitere, auch finanziell aufwendige, diagnostische Untersuchungen verwendet werden (112, 169-171). Nachdem sich die Veränderungen des Proteins in einem kleineren Rahmen abspielen, sollten allerdings die *cut-offs* verändert werden. Es werden u.a. Schwellenwerte von 0,18 µg/l und 0,21 µg/l angegeben (172, 173). Fasst man die obigen Ausführungen zusammen, kann man sagen, dass es sich bei dem Protein S100-B um einen guten Parameter zu diagnostischen Zwecken bei Patienten mit SHT handelt. Man sollte jedoch die Anwendung kritisch betrachten, da neben einer möglichen Verfälschung der Ergebnisse durch Quellen aus extrakraniellen Verletzungen, auch die noch zu lange Dauer der Analyse für die die akute Diagnostik gewisse Probleme darstellt. *Biberthaler et al.* stellten dabei in einer Studie 2004 Analysezeiten von 40 min vor (98). Trotzdem ist eine Weiterentwicklung im Sinne einer noch schnelleren und für den Notfall praktikableren Analyse anzustreben. Man kann deswegen sicherlich davon ausgehen, dass

sich bei einer positiven Weiterentwicklung, die Messung von S100-B zu diagnostischen Zwecken und als Einfluss nehmende Größe bei therapeutischen Entscheidungen als sinnvoller Parameter anbietet.

5.4. Durschflusszytometrische Analyse

5.4.1. CD-14+ Monozyten

Die dem unspezifischen Immunsystem abstammenden Monozyten besitzen auf ihrer Oberfläche u.a. das myeloide Markerantigen CD-14. Das Protein wird auf der Zelloberfläche exprimiert und dort verankert. Nachdem die Zellen ursprünglich in einem inaktiven Zustand vorliegen, werden sie durch die Aktivierung einer Signalkaskade, durch die Induktion bestimmter Zytokine, z.B. TNF oder Interleukine oder über LPS, einem Hauptbestandteil der Außenmembran gramnegativer Bakterien, aktiviert. *Guha et al.* konnten sowohl auf biochemischer als auch auf genetischer Ebene die Rolle von CD-14+ Markerantigenen bezüglich der LPS-Aktivierung von Monozyten und Makrophagen nachweisen (174, 175). Im Liquor von Patienten mit schwerem SHT ließen sich pro- und antiinflammatorische Mediatoren, wie z.B. TNF oder Interleukine, nachweisen und auch die daraus folgenden Reaktionskaskaden (176, 177). Die Literatur zeigt aber auch, dass es zu dem beschriebenen sekundären Hirnschaden bei Patienten mit SHT auch ohne die Entwicklung eines MODS oder eines Anstieges des lokalen Zytokinspiegels im Liquor kommen kann (136). Untersuchungen an Patienten mit chronisch entzündlichen Erkrankungen des ZNS erbrachten Hinweise auf eine funktionelle Beteiligung körpereigener Abwehrzellen, wie Monozyten, an der Ausbildung einer sekundären Hirnschädigung. Diese Zellen könnten eine zentrale Rolle bei der Aktivierung lokaler inflammatorischer Prozesse darstellen (137-140, 178). Aus diesem Grund haben wir in unserer Studie die Dynamik dieser immunkompetenten Zellen in den ersten 72h nach Trauma, in der Zeit der Ausbildung des sekundären Hirnschadens, im Liquor

von Patienten mit isoliertem SHT analysiert. Wir konnten aufzeigen, dass die CD-14+ Monozyten im Liquor über den gesamten Messzeitraum von 72h kontinuierlich angestiegen sind, mit einer Signifikanz gegenüber der Kontrolle und gegenüber der Aufnahme direkt nach Trauma. Wie bereits erläutert ist es in diesem Zusammenhang sicherlich von großer Bedeutung, dass man nur isolierte SHT-Patienten mit in die Studie aufgenommen hat um keine Verfälschung der Ergebnisse durch eine mögliche Einschwemmung der Zellen über den systemischen Kreislauf zu haben. Um zu unterscheiden, ob es sich bei den gemessenen Monozyten um Zellen in einem „aktiven Zustand“ handelt, sie also aktiv an der Entwicklung der posttraumatischen Inflammation beteiligt sind und in der Lage sind eine Verbindung zum spezifischen Immunsystem herzustellen, indem sie phagozytierte Erreger präsentieren, haben wir die Zellen genauer spezifiziert. Dazu haben wir die Monozyten bzgl. des auf ihrer Oberfläche vorhandenen HLA-DR Proteins unterteilt. Bei den HLA-DR positiven (aktiven) Monozyten lässt sich ebenso ein kontinuierlicher Anstieg über den gesamten Messzeitraum erkennen, wobei bereits initial ein signifikanter Anstieg gegenüber der Kontrolle und nach 72h gegenüber dem Aufnahmewert vorhanden ist. In diesem Zusammenhang muss noch ein möglicher Zusammenhang zwischen der Funktion der BBB und der Dynamik der Zellen überlegt werden. In früheren Arbeiten an Patienten mit SHT konnte eine Unabhängigkeit zwischen einem möglichen Zytokinanstieg und der Funktion der BBB aufgezeigt werden (136). Ziel dabei war es, wichtige Unterschiede der intrazerebralen Dynamik der Zellen durch eine mögliche systemische Beeinflussung herauszuarbeiten. Auch hier ergab sich ein kontinuierlicher Anstieg der Monozyten in beiden Gruppen (Gruppe I: BBB intakt; Gruppe II: BBB gestört). Interessanterweise konnten wir bei dem Vergleich beider Gruppen einen Unterschied nach 48h erkennen. Die Patienten mit intakter BBB wiesen signifikant höhere Werte als die Patienten mit gestörter BBB auf. Es lässt sich also vermuten, dass es nach einem SHT unabhängig von den Vorgängen im systemischen Kreislauf zu einer deutlichen Induktion der intrathekalen Inflammationsreaktion kommt. Sicherlich ist die Patientenzahl mit neun

Patienten in der Gruppe mit intakter BBB und sechs Patienten mit gestörter BBB zu gering, um definitive Aussagen zu treffen, aber eine Tendenz, dass sich der reaktive Monozytenanstieg unabhängig von der Funktion der BBB ergibt, lässt sich vermuten. Weiterhin muss bei der Analyse der Zellen, trotz einer Unterscheidung in zwei Gruppen je nach Funktion der BBB, ein möglicher Einfluss des Serums auf die gewonnenen Ergebnisse im Liquor diskutiert werden.

5.4.2. CD-15+ Granulozyten

Wie bereits eingangs erwähnt, setzt sich das Immunsystem aus dem spezifischen und dem unspezifischen Anteil zusammen. Neben den o.g. Monozyten gehören die CD-15+ Granulozyten mit ihrer phagozytierenden Fähigkeit ebenso dem unspezifischen Immunsystem an. Durch eine Aktivierung mittels proinflammatorischer Antigene sind sie in der Lage durch die Bildung reaktiver Sauerstoffmetabolite fremde Mikroorganismen abzutöten. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass sie an der posttraumatischen Inflammation, vergleichbar zu den CD-14+ Monozyten, beteiligt sind (122). Nachdem sich der sekundäre Hirnschaden auch ohne die Mithilfe von Zytokinen entwickeln kann, gilt es auch den Granulozyten eine besondere Bedeutung bei der Entstehung des sekundären Hirnschadens zukommen zu lassen. Betrachtet man die Ergebnisse der Granulozyten (**siehe Tabelle 15**), lässt sich ein kontinuierlicher Anstieg bis 48h nach Trauma erkennen, der bereits ab 12h nach Trauma gegenüber der Kontrollgruppe und den Aufnahmewerten signifikant erhöht ist. Trotz eines leichten Abfallens nach 72h bleibt die Signifikanz bestehen. Vergleichbar zu den Messungen der Monozyten haben wir auch hier den Einfluss der BBB für die Dynamik der Granulozyten mit untersucht. In beiden Gruppen (Gruppe I: intakte BBB; Gruppe II: gestörte BBB) konnten wir unabhängig der BBB-Funktion vergleichbar zu der Messung ohne Unterscheidung bzgl. der BBB Funktion einen kontinuierlichen Anstieg bis 48h mit einem signifikanten Unterschied gegenüber der Kontrolle erkennen. Entgegen der Ergebnisse der Monozyten

konnten wir jedoch bei dem Vergleich beider Gruppen einen signifikant höheren Wert nach 48h in der Gruppe mit gestörter BBB gegenüber der Gruppe mit intakter BBB erkennen. Dies lässt wiederum vermuten, dass sich die Entwicklung und die Dynamik der Zellen bei der Entstehung der Inflammation unabhängig von der BBB-Funktion verhalten und folglich auch das Vorhandensein intrathekaler Quellen für Granulozyten, ähnlich den Monozyten, als Möglichkeit herangezogen werden muss. Trotzdem ist auch die hier herangezogene Zahl von Patienten sicherlich zu gering, um eine definitive Aussage treffen zu können.

5.5. PMN-Elastase

Die PMN-Elastase stellt als Bestandteil der Granula in CD-15+ Granulozyten durch ihr Potential als Serinprotease einen wichtigen Faktor bei der Abwehr von Mikroorganismen nach Trauma dar. Trotz einer ursprünglich inaktiven Form werden die Proteasen bei einer massiven Ausschüttung, wie dies bei einer posttraumatischen Reaktion geschehen kann, aktiviert und unterstützen durch Freisetzung eines entscheidenden Fragmentes die Bindung bestimmter Liganden an einem an der posttraumatischen Inflammation wesentlich beteiligten proinflammatorischen Zytokins (127). Betrachtet man diese Funktionen genauer lässt sich deutlich erkennen, dass die genaue Analyse der Dynamik der PMN-Elastase in der frühen Phase nach Trauma eine wichtige Bedeutung bei der Entwicklung möglicher Strategien zur Prävention des sekundären Hirnschadens zukommt. Außerdem kann man durch die Bestimmung des *PMN-Elastase/Inhibitor-Komplexes* eine Aktivitätsbestimmung der Granulozyten vornehmen und in deren Folge eine genaue Einschätzung der Granulozytenbeteiligung in der jeweiligen Phase der Entstehung und Ausbildung des sekundären Hirnschadens erheben (128). Dies könnte wiederum einen wichtigen Teilschritt zur Prävention des Sekundärschadens nach SHT darstellen und zur therapeutischen Unterstützung für ein besseres Outcome nach Trauma beitragen. Betrachtet man das Ergebnis der Analyse der PMN-Elastase nach SHT genauer (**siehe Tabelle 17**), lässt sich

interessanterweise feststellen, dass sich trotz des Vorkommens der Elastase in den Granulozyten die Dynamik im Vergleich zu den CD-15+ Zellen in dem gleichen Untersuchungszeitraum unterscheidet. Entgegen dem Ergebnis der Granulozyten (**siehe Tabelle 15**) reagiert die PMN-Elastase deutlich verzögert. Erst nach 48h konnte man einen signifikanten Anstieg gegenüber der Kontrolle wie gegenüber dem Aufnahmewert erkennen. Auch gegen Ende unseres Messzeitraumes lässt sich ein Unterschied der zwei Parameter erkennen. Sieht man bei den Granulozyten nach 48h ein leichtes Abfallen, steigen die Ergebnisse der Elastase weiterhin an. Auch hier wurden die Patienten bzgl. der BBB-Funktion unterteilt. Man konnte in beiden Gruppen, bis auf den 24h Wert der Gruppe mit gestörter BBB, einen kontinuierlichen Anstieg im Verlauf von 72h messen. Bei der Unterscheidung der beiden Gruppen untereinander zeigte sich ein signifikanter Unterschied nach 48h der Patienten von Gruppe II gegenüber den Patienten der Gruppe I bei Aufnahme und nach 12h. In einer Arbeitsgruppe um *Hensler et al.* wurde herausgearbeitet, dass keine wesentliche Erhöhung der Plasmawerte der PMN-Elastase bei Patienten mit isoliertem SHT im Vergleich zu nicht traumatisierten Kontrollen zu erkennen war (181). Der in dieser Studie vorliegende Anstieg der Elastase im Liquor bei Patienten mit intakter BBB unterstützt unsere These, dass es neben den Granulozyten, als mögliche Quelle der Elastase, auch andere wichtige intrathekale Quellen geben kann. Nachdem die BBB in dieser Patientengruppe intakt war, könnte man daraus möglicherweise ableiten, dass keine Elastase in das Plasma übertritt, was für einen fehlenden Anstieg der Zellen im Plasma bei isolierten SHT-Patienten, wie es die Arbeitsgruppe um *Hensler et al.* postuliert hat, sprechen könnte. Dennoch sollten in weiteren Studien neben den Liquorwerten vergleichbare Plasmawerte erhoben werden, um genauere Analysen bzgl. der Dynamik der PMN-Elastase vornehmen zu können.

Diese viel versprechenden Ergebnisse eines wichtigen Parameters bei der Entstehung des sekundären Hirnschadens in der posttraumatischen Frühphase geben somit Anlass zu weiteren Untersuchungen und Analysen bisher unbekannter, aber für das genaue Verständnis des

Sekundärschadens sehr bedeutender, intrathekaler Quellen, wozu sicherlich auch das Patientenkollektiv erhöht werden muss.

6. Zusammenfassung

Das Schädel-Hirn-Trauma (SHT) stellt mit einer Letalitätsrate zwischen 37% und 60% trotz des in den letzten Jahren deutlich verbesserten Traumamanagements mit neuen Erkenntnissen in der Grundlagenforschung und neuen Erfolg versprechenden Therapiestrategien ein unverändert großes Problem für das Überleben der v.a. jungen Bevölkerung dar. In diesem Zusammenhang spielt neben dem initialen, direkt durch das Trauma bedingten und strukturell nicht beeinflussbarem Schaden, dem sog. *primären Hirnschaden*, die sekundäre Hirnschädigung (*sekundärer Hirnschaden*), die durch Inflammation, Ödembildung und daraus folgend einer Störung der Mikrozirkulation mit zerebralen Zelltod gekennzeichnet ist, eine entscheidende Rolle (2, 6, 7, 179). Die überschießende intrakranielle Entzündungsreaktion ist dabei als der zentrale pathophysiologische Prozess für die Entstehung des sekundären Hirnschadens anzusehen (40, 59). Frühere Studien an Patienten mit chronisch entzündlichen Erkrankungen des ZNS konnten eine funktionelle Beteiligung von Monozyten/Makrophagen und T-Lymphozyten an der Entstehung der Inflammationsreaktion belegen (137-140). Entgegen der allgemein angenommenen Vermutung, dass es sich bei dem ZNS um ein immunprivilegiertes System handelt, weiß man nun, dass das Gehirn selbst über wichtige inflammatorische Mediatoren verfügt und eine Entzündungsreaktion unabhängig vom systemischen Kreislauf induzieren kann. Die Blut-Hirn-Schranke (BBB) als physiologische Barriere zwischen systemischem und intrathekalem Kreislauf spielt hierbei sicherlich eine wichtige Rolle. In Studien an Schädel-Hirn-traumatisierten Patienten konnte die Beteiligung von Monozyten und Granulozyten als wichtige Vertreter von immunkompetenten Zellen nachgewiesen werden. Mit der als Serinprotease fungierenden PMN-Elastase kennt man zudem einen wichtigen Faktor bei der Zerstörung der neuronalen Zellen in der

posttraumatischen Phase. Neben den Erkenntnissen der immunkompetenten Zellen konnte man mit dem Protein S100-B einen biochemischen Marker etablieren, mit dem sich das Ausmaß der zerebralen Schädigung nach SHT abschätzen lässt. Umfangreiche Studien der letzten Zeit konnten jedoch die Frage nach der Dynamik der zellulären Subpopulationen des humanen Immunsystems, der PMN-Elastase und des Proteins S100-B im Liquor in der frühen, entscheidenden Phase nach Trauma nur unzureichend beantworten. Zur genauen Darstellung der Dynamik der erwähnten Parameter wurden in dieser Studie 15 Patienten mit isoliertem SHT III° (GCS \leq 8 Punkten) eingeschlossen und gemäß eines seriellen Protokolls eine Liquor-, sowie eine Serumprobe zu den Zeitpunkten „Aufnahme in den Schockraum“, bzw. Anlage der ICP-Sonde, 12h, 24h, 48h und 72h nach Trauma abgenommen und im direkten Anschluss bzgl. ihrer Dynamik in den ersten 72h nach Trauma analysiert. Die gewonnenen Ergebnisse wurden zudem auf eine mögliche Korrelation mit der Funktion der Blut-Hirn-Schranke, die mit Hilfe des Liquor-/Serum-Albuminindex bestimmt wurde, untersucht.

Aus den daraus formulierten Einzelzielen der vorliegenden Studie ergaben sich folgende Ergebnisse:

I. Bei der Analyse von S100-B konnte man bereits bei der ersten Abnahme im Schockraum mit $49,3 \pm 12,3$ pg/ml einen signifikanten Anstieg gegenüber der Kontrollgruppe ($0,25 \pm 0,04$ pg/ml) und gegenüber den Ergebnissen nach 24h ($9,8 \pm 3,8$ pg/ml) und 72h ($13,5 \pm 5,3$ pg/ml) erkennen. Trotz eines Abfallens im weiteren Messzeitraum blieb ein signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrollgruppe bestehen. Nach einer Unterteilung in zwei Gruppen (Gruppe I: BBB intakt; Gruppe II: BBB gestört) sah man in beiden Gruppen eine ähnliche Dynamik mit einem initialen signifikanten Anstieg gegenüber der Kontrolle. In

Gruppe II lies sich zudem bei Aufnahme ($77,27 \pm 13,3$ pg/ml) ein signifikanter Unterschied gegenüber allen Abnahmezeitpunkten von Gruppe I erkennen.

II. Die CD-14+ Monozyten zeigten einen kontinuierlichen Anstieg über den gesamten Messzeitraum mit einem signifikanten Unterschied nach 72h ($6,48 \pm 0,8$ %) gegenüber der Kontrollgruppe ($2,6 \pm 0,6$ %), wie auch gegenüber den Ergebnissen der initialen Abnahme ($2,32 \pm 0,6$ %). Bei der Bestimmung der „aktiven“, HLA-DR+ Monozyten konnte man mit $1,91 \pm 0,5$ % initial einen signifikanten Anstieg im Vergleich zu der Kontrolle ($0,34 \pm 0,09$ %) und nach 72h ($3,62 \pm 0,6$ %) gegenüber dem Aufnahmewert ($1,91 \pm 0,5$ %) erkennen. Die Unterteilung in zwei Gruppen gemäß der Messung von S100-B erbrachte für beide Gruppen nach 48h und 72h einen signifikanten Unterschied gegenüber der Kontrolle, nach 72h gegenüber der Aufnahme (Gruppe II bereits nach 48h). Vergleicht man die beiden Gruppen untereinander, sah man in Gruppe I nach 48h ($6,40 \pm 1,5$ %) signifikant erhöhte Werte gegenüber der Aufnahmemessung von Gruppe II ($1,89 \pm 0,9$ %).

Betrachtet man die Ergebnisse der CD-15+ Granulozyten, lies sich mit $9,15 \pm 1,6$ % bereits initial ein signifikanter Anstieg gegenüber der Kontrollgruppe ($0,98 \pm 0,2$ %) und nach 12h ($24,65 \pm 1,6$ %) gegenüber den Ergebnissen der initialen Abnahme erkennen. Bei der Unterteilung in zwei Gruppen, je nach Funktion der BBB, sah man auch hier in beiden Gruppen bereits initial einen signifikanten Anstieg gegenüber der Kontrolle, der im Verlauf der gesamten Studie bestehen blieb. In Gruppe I konnte man zudem nach 24h, 48h und 72h, in Gruppe II nach 48h, einen signifikanten Unterschied gegenüber der Aufnahmemessung erkennen. Vergleicht man die beiden Gruppen miteinander, bemerkt man einen signifikanten

Unterschied zwischen der 48h-Abnahme von Gruppe II ($35,80 \pm 7,6 \%$) und dem Aufnahmewert von Gruppe I ($8,61 \pm 1,3 \%$).

III. Die PMN-Elastase wies einen kontinuierlichen Anstieg im gesamten Messzeitraum auf. Die Ergebnisse nach 48h ($27,12 \pm 10,6 \text{ ng/ml}$) und 72h ($57,1 \pm 21,5 \text{ ng/ml}$) zeigten zudem signifikant höhere Werte gegenüber der Kontrolle ($3,68 \pm 0,3 \text{ ng/ml}$) sowie gegenüber der Aufnahmemessung ($4,97 \pm 1,9 \text{ ng/ml}$). Bei der Unterteilung in zwei Gruppen gemäß der anderen Messungen wiesen die Patienten der Gruppe I eine vergleichbare Dynamik mit einem signifikanten Unterschied nach 48h und 72h gegenüber der Kontrolle und der initialen Abnahme auf. In Gruppe II war dies lediglich gegenüber der Kontrolle nachzuweisen. Beim Vergleich der beiden Gruppen miteinander waren in Gruppe II nach 48h ($45,26 \pm 26,6 \text{ ng/ml}$) signifikant erhöhte Werte gegenüber dem Aufnahmewert ($2,93 \pm 1,9 \text{ ng/ml}$) von Gruppe I vorhanden.

Mit der vorliegenden Arbeit konnten wir erstmals die Dynamik von S100-B im Liquor von schwer Schädel-Hirn-traumatisierten Patienten in den ersten 72h nach Trauma analysieren. Bei den Ergebnissen des Proteins kann man, wie in der Literatur bereits beschrieben, durch den initial deutlich erhöhten Anstieg einen Zusammenhang mit der Schwere des Traumas erkennen, woraus sich vermuten lässt, dass S100-B als Marker für die Abschätzung des Schadens nach SHT herangezogen werden kann. Zusätzlich kann S100-B durch seinen signifikant erhöhten Anstieg in der Gruppe mit einer Störung der BBB als ein Marker für die Funktion der BBB gesehen werden.

Weiterhin konnten wir in der vorliegenden Studie erstmals die quantitative Analyse zellulärer Sub-Populationen im Liquor von Patienten nach schwerem SHT im direkten posttraumatischen Beobachtungszeitraum demonstrieren. Der dabei gemessene Anstieg der

CD-14+-Monozyten wie auch CD-15+-Granulozyten, der unabhängig von der BBB-Funktion zu sehen war, könnte hinweisend auf die direkte und vom systemischen Kreislauf unabhängige Beteiligung des intrathekalen zellulären Immunsystems an der Ausbildung des sekundären Hirnschadens dieser Patienten sein.

Bei der Analyse der Dynamik der PMN-Elastase im Liquor konnte man einen von den Granulozyten, als bekannte Quelle der PMN-Elastase, unabhängigen Anstieg erkennen. Unterteilt man alle Patienten in zwei Gruppen (Gruppe I: BBB intakt; Gruppe II: BBB gestört) sieht man bei allen untersuchten Parametern im Verlauf signifikant höhere Werte der Patienten mit gestörter BBB gegenüber den Patienten mit intakter BBB. Eine Ausnahme bilden lediglich die Ergebnisse der CD-14+- Monozyten, bei denen die Patienten mit intakter BBB signifikant erhöhte Werte gegenüber der Gruppe mit gestörter BBB aufweisen.

Weitere Studien sollen belegen, inwieweit der Anstieg der immunkompetenten Zellen mit der Ausbildung eines sekundären Hirnschadens auf dem Boden immunologischer Funktionsstörungen korreliert und welchen genauen Einfluss die Funktion der BBB in diesem Zusammenhang einnimmt. Zusätzlich sollen die genaue Pathophysiologie und die Signaltransduktion zur Synthese von PMN-Elastase untersucht und weitere intrathekale Quellen erkundet werden.

7. Literatur

1. J.Ghajar, Traumatic brain injury, *Lancet* 356:923 (2000).
2. L.F.Marshall, Head injury: recent past, present, and future, *Neurosurgery* 47:546 (2000).
3. F.Masson, M.Thicoipe, P.Aye, T.Mokni, P.Senjean, V.Schmitt, P.H.Dessalles, M.Cazaugade, and P.Labadens, Epidemiology of severe brain injuries: a prospective population-based study, *J.Trauma* 51:481 (2001).
4. G.D.Murray, G.M.Teasdale, R.Braakman, F.Cohadon, M.Dearden, F.Iannotti, A.Karimi, F.Lapierre, A.Maas, J.Ohman, L.Persson, F.Servadei, N.Stocchetti, T.Trojanowski, and A.Unterberg, The European Brain Injury Consortium survey of head injuries, *Acta Neurochir.(Wien.)* 141:223 (1999).
5. N.Stocchetti, K.I.Penny, M.Dearden, R.Braakman, F.Cohadon, F.Iannotti, F.Lapierre, A.Karimi, A.Maas, Jr., G.D.Murray, J.Ohman, L.Persson, F.Servadei, G.M.Teasdale, T.Trojanowski, and A.Unterberg, Intensive care management of head-injured patients in Europe: a survey from the European brain injury consortium, *Intensive Care Med.* 27:400 (2001).
6. R.Prat and V.Calatayud-Maldonado, Prognostic factors in posttraumatic severe diffuse brain injury, *Acta Neurochir.(Wien.)* 140:1257 (1998).
7. D.Thurman and J.Guerrero, Trends in hospitalization associated with traumatic brain injury, *JAMA* 282:954 (1999).
8. D.M.Sosin, J.E.Sniezek, and R.J.Waxweiler, Trends in death associated with traumatic brain injury, 1979 through 1992. Success and failure, *JAMA* 273:1778 (1995).
9. D.D.Trunkey, Trauma. Accidental and intentional injuries account for more years of life lost in the U.S. than cancer and heart disease. Among the prescribed remedies are improved preventive efforts, speedier surgery and further research, *Sci.Am.* 249:28 (1983).
10. C.Crawford, Social problems after severe head injury, *N.Z.Med.J.* 96:972 (1983).
11. J.Piek, Medical complications in severe head injury, *New Horiz.* 3:534 (1995).
12. G.Teasdale and B.Jennett, Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale, *Lancet* 2:81 (1974).
13. M.Bhandari, G.H.Guyatt, V.Khera, A.V.Kulkarni, S.Sprague, and E.H.Schemitsch, Operative management of lower extremity fractures in patients with head injuries, *Clin.Orthop.Relat Res.* 187 (2003).
14. S.R.Finifer and J.Cohen, Severe traumatic brain injury, *Resuscitation* 48:77 (2001).
15. B.Jennett, G.Teasdale, S.Galbraith, R.Braakman, C.Avezaat, J.Minderhoud, J.Heiden, T.Kurze, G.Murray, and L.Parker, Prognosis in patients with severe head injury, *Acta Neurochir.Suppl (Wien.)* 28:149 (1979).

16. M.Schaan, H.Jaksche, and B.Boszczyk, Predictors of outcome in head injury: proposal of a new scaling system, *J.Trauma* 52:667 (2002).
17. L.F.Marshall, S.B.Marshall, M.R.Klauber, C.M.Van Berkum, H.Eisenberg, J.A.Jane, T.G.Luerssen, A.Marmarou, and M.A.Foulkes, The diagnosis of head injury requires a classification based on computed axial tomography, *J.Neurotrauma* 9 Suppl 1:S287 (1992).
18. H.M.Eisenberg, H.E.Gary, Jr., E.F.Aldrich, C.Saydjari, B.Turner, M.A.Foulkes, J.A.Jane, A.Marmarou, L.F.Marshall, and H.F.Young, Initial CT findings in 753 patients with severe head injury. A report from the NIH Traumatic Coma Data Bank, *J.Neurosurg.* 73:688 (1990).
19. S.Lubillo, J.Bolanos, J.A.Cardena, F.Robaina, P.Ponce, J.Morera, and J.L.Manzano, Diffuse axonal injury with or without an evacuated intracranial hematoma in head injured patients. Are they different lesions?, *Acta Neurochir.Suppl* 76:415 (2000).
20. M.A.Poca, J.Sahuquillo, M.Baguena, S.Pedraza, R.M.Gracia, and E.Rubio, Incidence of intracranial hypertension after severe head injury: a prospective study using the Traumatic Coma Data Bank classification, *Acta Neurochir.Suppl* 71:27 (1998).
21. E.Fainardi, A.Chierigato, V.Antonelli, L.Fagioli, and F.Servadei, Time course of CT evolution in traumatic subarachnoid haemorrhage: a study of 141 patients, *Acta Neurochir.(Wien.)* 146:257 (2004).
22. H.Bayir, R.S.Clark, and P.M.Kochanek, Promising strategies to minimize secondary brain injury after head trauma, *Crit Care Med.* 31:S112 (2003).
23. H.L.Rosomoff, P.M.Kochanek, R.Clark, S.T.DeKosky, U.Ebmeyer, A.N.Grenvik, D.W.Marion, W.Obrist, A.M.Palmer, P.Safer, and R.J.White, Resuscitation from severe brain trauma, *Crit Care Med.* 24:S48 (1996).
24. S.K.Ray, C.E.Dixon, and N.L.Banik, Molecular mechanisms in the pathogenesis of traumatic brain injury, *Histol.Histopathol.* 17:1137 (2002).
25. P.F.Stahel, W.Ertel, and C.E.Heyde, [Traumatic brain injury: impact on timing and modality of fracture care], *Orthopade* 34:852 (2005).
26. W.C.Wiederholt, L.J.Melton, III, J.F.Annegers, J.D.Grabow, E.R.Laws, Jr., and D.M.Istrup, Short-term outcomes of skull fracture: a population-based study of survival and neurologic complications, *Neurology* 39:96 (1989).
27. O.I.Schmidt, I.Leinhase, E.Hasenboehler, S.J.Morgan, and P.F.Stahel, [The relevance of the inflammatory response in the injured brain.], *Orthopade* 36:248 (2007).
28. T.A.Gennarelli and D.I.Graham, Neuropathology of the Head Injuries, *Semin.Clin.Neuropsychiatry* 3:160 (1998).
29. Y.Xiong, Q.Gu, P.L.Peterson, J.P.Muizelaar, and C.P.Lee, Mitochondrial dysfunction and calcium perturbation induced by traumatic brain injury, *J.Neurotrauma* 14:23 (1997).

30. T.P.Obrenovitch and J.Urenjak, Is high extracellular glutamate the key to excitotoxicity in traumatic brain injury?, *J.Neurotrauma* 14:677 (1997).
31. P.Vespa, M.Prins, E.Ronne-Engstrom, M.Caron, E.Shalmon, D.A.Hovda, N.A.Martin, and D.P.Becker, Increase in extracellular glutamate caused by reduced cerebral perfusion pressure and seizures after human traumatic brain injury: a microdialysis study, *J.Neurosurg.* 89:971 (1998).
32. A.Thomas, H.G.Berlinghof, K.H.Bock, and L.Lampl, [Outcome factors in severe skull-brain trauma. A retrospective analysis of 228 (161) patients], *Anesthesiol.Intensivmed.Notfallmed.Schmerzther.* 35:91 (2000).
33. K.A.Hossmann, Ischemia-mediated neuronal injury, *Resuscitation* 26:225 (1993).
34. G.Nagashima, Cumulative effect of repetitive ischemia: pathophysiological findings, *Bull.Tokyo Med.Dent.Univ* 41:23 (1994).
35. S.L.Wald, S.R.Shackford, and J.Fenwick, The effect of secondary insults on mortality and long-term disability after severe head injury in a rural region without a trauma system, *J.Trauma* 34:377 (1993).
36. J.D.Miller and D.P.Becker, Secondary insults to the injured brain, *J.R.Coll.Surg.Edinb.* 27:292 (1982).
37. R.Raghupathi, D.I.Graham, and T.K.McIntosh, Apoptosis after traumatic brain injury, *J.Neurotrauma* 17:927 (2000).
38. M.Gaetz, The neurophysiology of brain injury, *Clin.Neurophysiol.* 115:4 (2004).
39. A.I.Maas, M.Dearden, F.Servadei, N.Stocchetti, and A.Unterberg, Current recommendations for neurotrauma, *Curr.Opin.Crit Care* 6:281 (2000).
40. O.I.Schmidt, C.E.Heyde, W.Ertel, and P.F.Stahel, Closed head injury--an inflammatory disease?, *Brain Res.Brain Res.Rev.* 48:388 (2005).
41. A.W.Unterberg, J.Stover, B.Kress, and K.L.Kiening, Edema and brain trauma, *Neuroscience* 129:1021 (2004).
42. D.I.Graham, I.Ford, J.H.Adams, D.Doyle, G.M.Teasdale, A.E.Lawrence, and D.R.McLellan, Ischaemic brain damage is still common in fatal non-missile head injury, *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry* 52:346 (1989).
43. R.M.Chesnut, Secondary brain insults after head injury: clinical perspectives, *New Horiz.* 3:366 (1995).
44. M.J.Rosner and S.Daughton, Cerebral perfusion pressure management in head injury, *J.Trauma* 30:933 (1990).
45. D.G.Changaris, C.P.McGraw, J.D.Richardson, H.D.Garretson, E.J.Arpin, and C.B.Shields, Correlation of cerebral perfusion pressure and Glasgow Coma Scale to outcome, *J.Trauma* 27:1007 (1987).

46. J.P.Coles, T.D.Fryer, P.Smielewski, D.A.Chatfield, L.A.Steiner, A.J.Johnston, S.P.Downey, G.B.Williams, F.Aigbirhio, P.J.Hutchinson, K.Rice, T.A.Carpenter, J.C.Clark, J.D.Pickard, and D.K.Menon, Incidence and mechanisms of cerebral ischemia in early clinical head injury, *J.Cereb.Blood Flow Metab* 24:202 (2004).
47. J.N.Glenn, M.E.Miner, and L.F.Peltier, The treatment of fractures of the femur in patients with head injuries. 1973, *Clin.Orthop.Relat Res.*142 (2004).
48. M.R.Grotz, P.V.Giannoudis, H.C.Pape, M.K.Allami, H.Dinopoulos, and C.Krettek, Traumatic brain injury and stabilisation of long bone fractures: an update, *Injury* 35:1077 (2004).
49. E.W.Lang, J.Lagopoulos, J.Griffith, K.Yip, A.Yam, Y.Mudaliar, H.M.Mehdorn, and N.W.Dorsch, Cerebral vasomotor reactivity testing in head injury: the link between pressure and flow, *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry* 74:1053 (2003).
50. U.Lehmann, E.Rickels, and C.Krettek, [Multiple trauma with craniocerebral trauma. Early definitive surgical management of long bone fractures?], *Unfallchirurg* 104:196 (2001).
51. L.A.Steiner, J.P.Coles, M.Czosnyka, P.S.Minhas, T.D.Fryer, F.I.Aigbirhio, J.C.Clark, P.Smielewski, D.A.Chatfield, T.Donovan, J.D.Pickard, and D.K.Menon, Cerebrovascular pressure reactivity is related to global cerebral oxygen metabolism after head injury, *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry* 74:765 (2003).
52. L.A.Steiner, J.P.Coles, A.J.Johnston, D.A.Chatfield, P.Smielewski, T.D.Fryer, F.I.Aigbirhio, J.C.Clark, J.D.Pickard, D.K.Menon, and M.Czosnyka, Assessment of cerebrovascular autoregulation in head-injured patients: a validation study, *Stroke* 34:2404 (2003).
53. R.C.Bone, Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome: what we do and do not know about cytokine regulation, *Crit Care Med.* 24:163 (1996).
54. R.M.Chesnut, S.B.Marshall, J.Piek, B.A.Blunt, M.R.Klauber, and L.F.Marshall, Early and late systemic hypotension as a frequent and fundamental source of cerebral ischemia following severe brain injury in the Traumatic Coma Data Bank, *Acta Neurochir.Suppl (Wien.)* 59:121 (1993).
55. D.W.Marion, J.Darby, and H.Yonas, Acute regional cerebral blood flow changes caused by severe head injuries, *J.Neurosurg.* 74:407 (1991).
56. G.J.Bouma, J.P.Muizelaar, K.Bandoh, and A.Marmarou, Blood pressure and intracranial pressure-volume dynamics in severe head injury: relationship with cerebral blood flow, *J.Neurosurg.* 77:15 (1992).
57. D.S.DeWitt, T.G.Smith, D.J.Deyo, K.R.Miller, T.Uchida, and D.S.Prough, L-arginine and superoxide dismutase prevent or reverse cerebral hypoperfusion after fluid-percussion traumatic brain injury, *J.Neurotrauma* 14:223 (1997).
58. W.M.Armstead, Role of endothelin-1 in age-dependent cerebrovascular hypotensive responses after brain injury, *Am.J.Physiol* 277:H1884 (1999).

59. E.Neugebauer, T.Hensler, S.Rose, B.Maier, M.Holanda, M.Raum, D.Rixen, and I.Marzi, [Severe craniocerebral trauma in multiple trauma. An assessment of the interaction of local and systemic mediator responses], *Unfallchirurg* 103:122 (2000).
60. M.G.Davies and P.O.Hagen, Systemic inflammatory response syndrome, *Br.J.Surg.* 84:920 (1997).
61. X.Guirao and S.F.Lowry, Biologic control of injury and inflammation: much more than too little or too late, *World J.Surg.* 20:437 (1996).
62. S.M.Allan and N.J.Rothwell, Cytokines and acute neurodegeneration, *Nat.Rev.Neurosci.* 2:734 (2001).
63. M.Hauwel, E.Furon, C.Canova, M.Griffiths, J.Neal, and P.Gasque, Innate (inherent) control of brain infection, brain inflammation and brain repair: the role of microglia, astrocytes, "protective" glial stem cells and stromal endymal cells, *Brain Res.Brain Res.Rev.* 48:220 (2005).
64. S.M.Lucas, N.J.Rothwell, and R.M.Gibson, The role of inflammation in CNS injury and disease, *Br.J.Pharmacol.* 147 Suppl 1:S232 (2006).
65. J.van Beek, K.Elward, and P.Gasque, Activation of complement in the central nervous system: roles in neurodegeneration and neuroprotection, *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 992:56 (2003).
66. P.Gasque, Y.D.Dean, E.P.McGreal, J.VanBeek, and B.P.Morgan, Complement components of the innate immune system in health and disease in the CNS, *Immunopharmacology* 49:171 (2000).
67. S.J.Hopkins and N.J.Rothwell, Cytokines and the nervous system. I: Expression and recognition, *Trends Neurosci.* 18:83 (1995).
68. S.Nataf, P.F.Stahel, N.Davoust, and S.R.Barnum, Complement anaphylatoxin receptors on neurons: new tricks for old receptors?, *Trends Neurosci.* 22:397 (1999).
69. V.C.Asensio and I.L.Campbell, Chemokines in the CNS: plurifunctional mediators in diverse states, *Trends Neurosci.* 22:504 (1999).
70. D.L.Haviland, R.L.McCoy, W.T.Whitehead, H.Akama, E.P.Molmenti, A.Brown, J.C.Haviland, W.C.Parks, D.H.Perlmutter, and R.A.Wetsel, Cellular expression of the C5a anaphylatoxin receptor (C5aR): demonstration of C5aR on nonmyeloid cells of the liver and lung, *J.Immunol.* 154:1861 (1995).
71. T.Kossmann, V.H.Hans, H.G.Imhof, R.Stocker, P.Grob, O.Trentz, and C.Morganti-Kossmann, Intrathecal and serum interleukin-6 and the acute-phase response in patients with severe traumatic brain injuries, *Shock* 4:311 (1995).
72. J.D.Sedgwick, D.S.Riminton, J.G.Cyster, and H.Korner, Tumor necrosis factor: a master-regulator of leukocyte movement, *Immunol.Today* 21:110 (2000).

73. U.Felderhoff-Mueser, O.I.Schmidt, A.Oberholzer, C.Buhrer, and P.F.Stahel, IL-18: a key player in neuroinflammation and neurodegeneration?, *Trends Neurosci.* 28:487 (2005).
74. R.Beer, G.Franz, M.Schopf, M.Reindl, B.Zelger, E.Schmutzhard, W.Poewe, and A.Kampfl, Expression of Fas and Fas ligand after experimental traumatic brain injury in the rat, *J.Cereb.Blood Flow Metab* 20:669 (2000).
75. P.M.Lenzlinger, A.Marx, O.Trentz, T.Kossmann, and M.C.Morganti-Kossmann, Prolonged intrathecal release of soluble Fas following severe traumatic brain injury in humans, *J.Neuroimmunol.* 122:167 (2002).
76. F.C.Barone, G.Z.Feuerstein, and R.P.Spera, Calcium channel blockers in cerebral ischaemia, *Expert.Opin.Investig.Drugs* 6:501 (1997).
77. P.M.Lenzlinger, M.C.Morganti-Kossmann, H.L.Laurer, and T.K.McIntosh, The duality of the inflammatory response to traumatic brain injury, *Mol.Neurobiol.* 24:169 (2001).
78. E.Shohami, I.Ginis, and J.M.Hallenbeck, Dual role of tumor necrosis factor alpha in brain injury, *Cytokine Growth Factor Rev.* 10:119 (1999).
79. L.L.Rubin and J.M.Staddon, The cell biology of the blood-brain barrier, *Annu.Rev.Neurosci.* 22:11 (1999).
80. W.M.Pardridge, Blood-brain barrier biology and methodology, *J.Neurovirol.* 5:556 (1999).
81. U.Kniesel and H.Wolburg, Tight junctions of the blood-brain barrier, *Cell Mol.Neurobiol.* 20:57 (2000).
82. S.M.Gloor, M.Wachtel, M.F.Bolliger, H.Ishihara, R.Landmann, and K.Frei, Molecular and cellular permeability control at the blood-brain barrier, *Brain Res.Brain Res.Rev.* 36:258 (2001).
83. N.J.Abbott, Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability, *J.Anat.* 200:629 (2002).
84. G.Rascher and H.Wolburg, The tight junctions of the leptomeningeal blood-cerebrospinal fluid barrier during development, *J.Hirnforsch.* 38:525 (1997).
85. S.Nabeshima, T.S.Reese, D.M.Landis, and M.W.Brightman, Junctions in the meninges and marginal glia, *J.Comp Neurol.* 164:127 (1975).
86. F.Vandenabeele, J.Creemers, and I.Lambrichts, Ultrastructure of the human spinal arachnoid mater and dura mater, *J.Anat.* 189 (Pt 2):417 (1996).
87. Y.Tsuchihashi, T.Kitamura, and S.Fujita, Immunofluorescence studies of the monocytes in the injured rat brain, *Acta Neuropathol.(Berl)* 53:213 (1981).
88. D.Giulian, J.Chen, J.E.Ingeman, J.K.George, and M.Nojonen, The role of mononuclear phagocytes in wound healing after traumatic injury to adult mammalian brain, *J.Neurosci.* 9:4416 (1989).

89. D.B.Zimmer, E.H.Cornwall, A.Landar, and W.Song, The S100 protein family: history, function, and expression, *Brain Res.Bull.* 37:417 (1995).
90. R.Bianchi, M.Garbuglia, M.Verzini, I.Giambanco, V.V.Ivanenkov, R.V.Dimlich, G.A.Jamieson, Jr., and R.Donato, S-100 (alpha and beta) binding peptide (TRTK-12) blocks S-100/GFAP interaction: identification of a putative S-100 target epitope within the head domain of GFAP, *Biochim.Biophys.Acta* 1313:258 (1996).
91. D.B.Zimmer and L.J.Van Eldik, Tissue distribution of rat S100 alpha and S100 beta and S100-binding proteins, *Am.J.Physiol* 252:C285 (1987).
92. C.W.Heizmann and J.A.Cox, New perspectives on S100 proteins: a multi-functional Ca(2+)-, Zn(2+)- and Cu(2+)-binding protein family, *Biometals* 11:383 (1998).
93. O.Ben Abdesselam, J.Vally, C.Adem, M.J.Foglietti, and J.L.Beaudeux, Reference values for serum S-100B protein depend on the race of individuals, *Clin.Chem.* 49:836 (2003).
94. L.V.Portela, J.C.Brenol, R.Walz, M.Bianchin, A.B.Tort, U.P.Canabarro, S.Beheregaray, J.A.Marasca, R.M.Xavier, E.C.Neto, C.A.Goncalves, and D.O.Souza, Serum S100B levels in patients with lupus erythematosus: preliminary observation, *Clin.Diagn.Lab Immunol.* 9:164 (2002).
95. M.Wiesmann, U.Missler, D.Gottmann, and S.Gehring, Plasma S-100b protein concentration in healthy adults is age- and sex-independent, *Clin.Chem.* 44:1056 (1998).
96. D.Gazzolo, F.Michetti, M.Bruschettini, N.Marchese, M.Lituanica, S.Mangraviti, E.Pedrazzi, and P.Bruschettini, Pediatric concentrations of S100B protein in blood: age- and sex-related changes, *Clin.Chem.* 49:967 (2003).
97. H.Haimoto, S.Hosoda, and K.Kato, Differential distribution of immunoreactive S100-alpha and S100-beta proteins in normal nonnervous human tissues, *Lab Invest* 57:489 (1987).
98. P.Biberthaler, T.Mussack, K.G.Kanz, U.Linsenmaier, K.J.Pfeifer, W.Mutschler, and M.Jochum, [Identification of high-risk patients after minor craniocerebral trauma. Measurement of nerve tissue protein S 100], *Unfallchirurg* 107:197 (2004).
99. P.Biberthaler, U.Linsenmeier, K.J.Pfeifer, M.Kroetz, T.Mussack, K.G.Kanz, E.F.Hoecherl, F.Jonas, I.Marzi, P.Leucht, M.Jochum, and W.Mutschler, Serum S-100B concentration provides additional information for the indication of computed tomography in patients after minor head injury: a prospective multicenter study, *Shock* 25:446 (2006).
100. T.Hayakata, T.Shiozaki, O.Tasaki, H.Ikegawa, Y.Inoue, F.Toshiyuki, H.Hosotubo, F.Kieko, T.Yamashita, H.Tanaka, T.Shimazu, and H.Sugimoto, Changes in CSF S100B and cytokine concentrations in early-phase severe traumatic brain injury, *Shock* 22:102 (2004).

101. M.Oertel, D.F.Kelly, D.McArthur, W.J.Boscardin, T.C.Glenn, J.H.Lee, T.Gravori, D.Obukhov, D.Q.McBride, and N.A.Martin, Progressive hemorrhage after head trauma: predictors and consequences of the evolving injury, *J.Neurosurg.* 96:109 (2002).
102. R.D.Lobato, P.A.Gomez, R.Alday, J.J.Rivas, J.Dominguez, A.Cabrera, F.S.Turanzas, A.Benitez, and B.Rivero, Sequential computerized tomography changes and related final outcome in severe head injury patients, *Acta Neurochir.(Wien.)* 139:385 (1997).
103. M.Herrmann, N.Curio, S.Jost, C.Grubich, A.D.Ebert, M.L.Fork, and H.Synowitz, Release of biochemical markers of damage to neuronal and glial brain tissue is associated with short and long term neuropsychological outcome after traumatic brain injury, *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry* 70:95 (2001).
104. J.W.Huang, Z.Ming, P.Shrestha, M.Mori, E.Ilg, B.W.Schafer, and C.W.Heizmann, Immunohistochemical evaluation of the Ca(2+)-binding S-100 proteins S-100A1, S-100A2, S-100A4, S-100A6 and S-100B in salivary gland tumors, *J.Oral Pathol.Med.* 25:547 (1996).
105. E.G.McKeating, P.J.Andrews, and L.Mascia, Relationship of neuron specific enolase and protein S-100 concentrations in systemic and jugular venous serum to injury severity and outcome after traumatic brain injury, *Acta Neurochir.Suppl* 71:117 (1998).
106. A.Raabe, D.K.Menon, S.Gupta, M.Czosnyka, and J.D.Pickard, Jugular venous and arterial concentrations of serum S-100B protein in patients with severe head injury: a pilot study, *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry* 65:930 (1998).
107. R.D.Rothoerl, C.Woertgen, M.Holzschuh, C.Metz, and A.Brawanski, Rapid evaluation of S-100 serum levels. Case report and comparison to previous results, *Brain Inj.* 13:387 (1999).
108. M.Wiesmann, U.Missler, H.Hagenstrom, and D.Gottmann, S-100 protein plasma levels after aneurysmal subarachnoid haemorrhage, *Acta Neurochir.(Wien.)* 139:1155 (1997).
109. P.Biberthaler, T.Mussack, E.Wiedemann, T.Gilg, M.Soyka, G.Koller, K.J.Pfeifer, U.Linsenmaier, W.Mutschler, C.Gippner-Steppert, and M.Jochum, Elevated serum levels of S-100B reflect the extent of brain injury in alcohol intoxicated patients after mild head trauma, *Shock* 16:97 (2001).
110. L.E.Pelinka, E.Toegel, W.Mauritz, and H.Redl, Serum S 100 B: a marker of brain damage in traumatic brain injury with and without multiple trauma, *Shock* 19:195 (2003).
111. T.Mussack, P.Biberthaler, C.Gippner-Steppert, K.G.Kanz, E.Wiedemann, W.Mutschler, and M.Jochum, Early cellular brain damage and systemic inflammatory response after cardiopulmonary resuscitation or isolated severe head trauma: a comparative pilot study on common pathomechanisms, *Resuscitation* 49:193 (2001).

112. P.Biberthaler, T.Mussack, E.Wiedemann, K.G.Kanz, M.Koelsch, C.Gippner-Steppert, and M.Jochum, Evaluation of S-100b as a specific marker for neuronal damage due to minor head trauma, *World J.Surg.* 25:93 (2001).
113. A.Raabe, C.Grolms, M.Keller, J.Dohnert, O.Sorge, and V.Seifert, Correlation of computed tomography findings and serum brain damage markers following severe head injury, *Acta Neurochir.(Wien.)* 140:787 (1998).
114. A.Raabe, C.Grolms, and V.Seifert, Serum markers of brain damage and outcome prediction in patients after severe head injury, *Br.J.Neurosurg.* 13:56 (1999).
115. C.Woertgen, R.D.Rothoerl, C.Metz, and A.Brawanski, Comparison of clinical, radiologic, and serum marker as prognostic factors after severe head injury, *J.Trauma* 47:1126 (1999).
116. R.E.Anderson, L.O.Hansson, O.Nilsson, R.Dijlani-Merzoug, and G.Settergren, High serum S100B levels for trauma patients without head injuries, *Neurosurgery* 48:1255 (2001).
117. R.S.Ghirnikar, Y.L.Lee, and L.F.Eng, Inflammation in traumatic brain injury: role of cytokines and chemokines, *Neurochem.Res.* 23:329 (1998).
118. M.Rancan, N.Bye, V.I.Otto, O.Trentz, T.Kossmann, S.Frentzel, and M.C.Morganti-Kossmann, The chemokine fractalkine in patients with severe traumatic brain injury and a mouse model of closed head injury, *J.Cereb.Blood Flow Metab* 24:1110 (2004).
119. S.R.Barnum, Complement in central nervous system inflammation, *Immunol.Res.* 26:7 (2002).
120. R.M.Ransohoff and M.Tani, Do chemokines mediate leukocyte recruitment in post-traumatic CNS inflammation?, *Trends Neurosci.* 21:154 (1998).
121. S.Rose and I.Marzi, Mediators in polytrauma--pathophysiological significance and clinical relevance, *Langenbecks Arch.Surg.* 383:199 (1998).
122. K.V.Biagas, M.W.Uhl, J.K.Schiding, E.M.Nemoto, and P.M.Kochanek, Assessment of posttraumatic polymorphonuclear leukocyte accumulation in rat brain using tissue myeloperoxidase assay and vinblastine treatment, *J.Neurotrauma* 9:363 (1992).
123. R.J.Schoettle, P.M.Kochanek, M.J.Magargee, M.W.Uhl, and E.M.Nemoto, Early polymorphonuclear leukocyte accumulation correlates with the development of posttraumatic cerebral edema in rats, *J.Neurotrauma* 7:207 (1990).
124. P.F.Stahel, M.C.Morganti-Kossmann, and T.Kossmann, The role of the complement system in traumatic brain injury, *Brain Res.Brain Res.Rev.* 27:243 (1998).
125. M.Wahl, L.Schilling, A.Unterberg, and A.Baethmann, Mediators of vascular and parenchymal mechanisms in secondary brain damage, *Acta Neurochir.Suppl (Wien.)* 57:64 (1993).

126. A.Aderem and D.M.Underhill, Mechanisms of phagocytosis in macrophages, *Annu.Rev.Immunol.* 17:593 (1999).
127. F.Porteu, M.Brockhaus, D.Wallach, H.Engelmann, and C.F.Nathan, Human neutrophil elastase releases a ligand-binding fragment from the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor. Comparison with the proteolytic activity responsible for shedding of TNF receptors from stimulated neutrophils, *J.Biol.Chem.* 266:18846 (1991).
128. M.Jochum, C.Gippner-Steppert, W.Machleidt, and H.Fritz, The role of phagocyte proteinases and proteinase inhibitors in multiple organ failure, *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 150:S123 (1994).
129. E.Shohami, R.Gallily, R.Mechoulam, R.Bass, and T.Ben Hur, Cytokine production in the brain following closed head injury: dexanabinol (HU-211) is a novel TNF-alpha inhibitor and an effective neuroprotectant, *J.Neuroimmunol.* 72:169 (1997).
130. D.W.Marion, L.E.Penrod, S.F.Kelsey, W.D.Obrist, P.M.Kochanek, A.M.Palmer, S.R.Wisniewski, and S.T.DeKosky, Treatment of traumatic brain injury with moderate hypothermia, *N.Engl.J.Med.* 336:540 (1997).
131. M.Aibiki, S.Maekawa, S.Ogura, Y.Kinoshita, N.Kawai, and S.Yokono, Effect of moderate hypothermia on systemic and internal jugular plasma IL-6 levels after traumatic brain injury in humans, *J.Neurotrauma* 16:225 (1999).
132. V.M.Holers and J.M.Thurman, The alternative pathway of complement in disease: opportunities for therapeutic targeting, *Mol.Immunol.* 41:147 (2004).
133. I.Roberts, D.Yates, P.Sandercock, B.Farrell, J.Wasserberg, G.Lomas, R.Cottingham, P.Svoboda, N.Brayley, G.Mazairac, V.Laloe, A.Munoz-Sanchez, M.Arango, B.Hartzenberg, H.Khamis, S.Yutthakasemsunt, E.Komolafe, F.Olldashi, Y.Yadav, F.Murillo-Cabezas, H.Shakur, and P.Edwards, Effect of intravenous corticosteroids on death within 14 days in 10008 adults with clinically significant head injury (MRC CRASH trial): randomised placebo-controlled trial, *Lancet* 364:1321 (2004).
134. M.R.Bullock, B.G.Lyeth, and J.P.Muizelaar, Current status of neuroprotection trials for traumatic brain injury: lessons from animal models and clinical studies, *Neurosurgery* 45:207 (1999).
135. R.K.Narayan, M.E.Michel, B.Ansell, A.Baethmann, A.Biegon, M.B.Bracken, M.R.Bullock, S.C.Choi, G.L.Clifton, C.F.Contant, W.M.Coplin, W.D.Dietrich, J.Ghajar, S.M.Grady, R.G.Grossman, E.D.Hall, W.Heetderks, D.A.Hovda, J.Jallo, R.L.Katz, N.Knoller, P.M.Kochanek, A.I.Maas, J.Majde, D.W.Marion, A.Marmarou, L.F.Marshall, T.K.McIntosh, E.Miller, N.Mohberg, J.P.Muizelaar, L.H.Pitts, P.Quinn, G.Riesefeld, C.S.Robertson, K.I.Strauss, G.Teasdale, N.Temkin, R.Tuma, C.Wade, M.D.Walker, M.Weinrich, J.Whyte, J.Wilberger, A.B.Young, and L.Yurkewicz, Clinical trials in head injury, *J.Neurotrauma* 19:503 (2002).

136. B.Maier, K.Schwerdtfeger, A.Mautes, M.Holanda, M.Muller, W.I.Steudel, and I.Marzi, Differential release of interleukines 6, 8, and 10 in cerebrospinal fluid and plasma after traumatic brain injury, *Shock* 15:421 (2001).
137. E.Mix, T.Olsson, J.Correale, S.Baig, V.Kostulas, O.Olsson, and H.Link, B cells expressing CD5 are increased in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis, *Clin.Exp.Immunol.* 79:21 (1990).
138. N.Shahani, A.Nalini, M.Gourie-Devi, and T.R.Raju, Reactive astrogliosis in neonatal rat spinal cord after exposure to cerebrospinal fluid from patients with amyotrophic lateral sclerosis, *Exp.Neurol.* 149:295 (1998).
139. J.J.Scarano, White blood cells and cerebrospinal fluid, *Pediatrics* 97:929 (1996).
140. D.Subira, S.Castanon, E.Aceituno, J.Hernandez, C.Jimenez-Garofano, A.Jimenez, A.M.Jimenez, A.Roman, and A.Orfao, Flow cytometric analysis of cerebrospinal fluid samples and its usefulness in routine clinical practice, *Am.J.Clin.Pathol.* 117:952 (2002).
141. T.Mussack, C.Kirchhoff, S.Buhmann, P.Biberthaler, R.Ladurner, C.Gippner-Steppert, W.Mutschler, and M.Jochum, Significance of Elecsys S100 immunoassay for real-time assessment of traumatic brain damage in multiple trauma patients, *Clin.Chem.Lab Med.* 44:1140 (2006).
142. H.Reiber and K.Felgenhauer, Protein transfer at the blood cerebrospinal fluid barrier and the quantitation of the humoral immune response within the central nervous system, *Clin.Chim.Acta* 163:319 (1987).
143. The Brain Trauma Foundation. The American Association of Neurological Surgeons. The Joint Section on Neurotrauma and Critical Care. Recommendations for intracranial pressure monitoring technology, *J.Neurotrauma* 17:497 (2000).
144. H.Reiber, Dynamics of brain-derived proteins in cerebrospinal fluid, *Clin.Chim.Acta* 310:173 (2001).
145. J.A.Todd, H.Acha-Orbea, J.I.Bell, N.Chao, Z.Fronek, C.O.Jacob, M.McDermott, A.A.Sinha, L.Timmerman, L.Steinman, and ., A molecular basis for MHC class II--associated autoimmunity, *Science* 240:1003 (1988).
146. T.S.Jardetzky, J.H.Brown, J.C.Gorga, L.J.Stern, R.G.Urban, Y.I.Chi, C.Stauffacher, J.L.Strominger, and D.C.Wiley, Three-dimensional structure of a human class II histocompatibility molecule complexed with superantigen, *Nature* 368:711 (1994).
147. P.K.Gregersen, T.Moriuchi, R.W.Karr, F.Obata, J.Moriuchi, J.Maccari, D.Goldberg, R.J.Winchester, and J.Silver, Polymorphism of HLA-DR beta chains in DR4, -7, and -9 haplotypes: implications for the mechanisms of allelic variation, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 83:9149 (1986).
148. D.Kogel, M.Peters, H.G.Konig, S.M.Hashemi, N.T.Bui, V.Arolt, M.Rothermundt, and J.H.Prehn, S100B potently activates p65/c-Rel transcriptional complexes in hippocampal neurons: Clinical implications for the role of S100B in excitotoxic brain injury, *Neuroscience* 127:913 (2004).

149. G.Regel, P.Lobenhoffer, M.Grotz, H.C.Pape, U.Lehmann, and H.Tscherne, Treatment results of patients with multiple trauma: an analysis of 3406 cases treated between 1972 and 1991 at a German Level I Trauma Center, *J.Trauma* 38:70 (1995).
150. D.Rixen, M.Raum, B.Bouillon, L.E.Schlosser, and E.Neugebauer, [Predicting the outcome in severe injuries: an analysis of 2069 patients from the trauma register of the German Society of Traumatology (DGU)], *Unfallchirurg* 104:230 (2001).
151. E.Hartwig, B.Dirks, P.Oldenkott, E.Pfenninger, M.Helm, and L.Kinzl, [Management of the patient with craniocerebral injuries at the accident site and clinic admission], *Unfallchirurg* 96:564 (1993).
152. S.Ruchholtz, D.Nast-Kolb, C.Waydhas, and L.Schweiberer, [The injury pattern in polytrauma. Value of information regarding accident process in clinical acute management], *Unfallchirurg* 99:633 (1996).
153. J.Y.Jiang, G.Y.Gao, W.P.Li, M.K.Yu, and C.Zhu, Early indicators of prognosis in 846 cases of severe traumatic brain injury, *J.Neurotrauma* 19:869 (2002).
154. E.Lannoo, F.Van Rietvelde, F.Colardyn, M.Lemmerling, T.Vandekerckhove, C.Jannes, and G.De Soete, Early predictors of mortality and morbidity after severe closed head injury, *J.Neurotrauma* 17:403 (2000).
155. S.Ruchholtz, D.Nast-Kolb, C.Waydhas, and R.Lefering, [The trauma register of the 'Polytrauma' Committee of the German Society of Trauma Surgery as the basis for quality management in the management of severely injured patients], *Langenbecks Arch.Chir Suppl Kongressbd.* 114:1265 (1997).
156. J.D.Miller, Head injury, *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry* 56:440 (1993).
157. S.C.Stein and C.M.Spettell, Delayed and progressive brain injury in children and adolescents with head trauma, *Pediatr.Neurosurg.* 23:299 (1995).
158. J.A.Lederer, M.L.Rodrick, and J.A.Mannick, The effects of injury on the adaptive immune response, *Shock* 11:153 (1999).
159. T.Ucar, A.Baykal, M.Akyuz, L.Dosemeci, and B.Toptas, Comparison of serum and cerebrospinal fluid protein S-100b levels after severe head injury and their prognostic importance, *J.Trauma* 57:95 (2004).
160. M.Herrmann, N.Curio, S.Jost, M.T.Wunderlich, H.Synowitz, and C.W.Wallesch, Protein S-100B and neuron specific enolase as early neurobiochemical markers of the severity of traumatic brain injury, *Restor.Neurol.Neurosci.* 14:109 (1999).
161. R.D.Rothoerl, C.Woertgen, M.Holzschuh, C.Metz, and A.Brawanski, S-100 serum levels after minor and major head injury, *J.Trauma* 45:765 (1998).
162. N.Marchi, P.Rasmussen, M.Kapural, V.Fazio, K.Kight, M.R.Mayberg, A.Kanner, B.Ayumar, B.Albensi, M.Cavaglia, and D.Janigro, Peripheral markers of brain damage and blood-brain barrier dysfunction, *Restor.Neurol.Neurosci.* 21:109 (2003).

163. G.Grasso, M.Passalacqua, A.Sfacteria, A.Conti, A.Morabito, G.Mazzullo, V.G.De, M.Buemi, B.Macri, and F.Tomasello, Does administration of recombinant human erythropoietin attenuate the increase of S-100 protein observed in cerebrospinal fluid after experimental subarachnoid hemorrhage?, *J.Neurosurg.* 96:565 (2002).
164. A.Raabe, O.Kopetsch, A.Woszczyk, J.Lang, R.Gerlach, M.Zimmermann, and V.Seifert, S-100B protein as a serum marker of secondary neurological complications in neurocritical care patients, *Neurol.Res.* 26:440 (2004).
165. R.E.Anderson, L.O.Hansson, O.Nilsson, J.Liska, G.Settergren, and J.Vaage, Increase in serum S100A1-B and S100BB during cardiac surgery arises from extracerebral sources, *Ann.Thorac.Surg.* 71:1512 (2001).
166. S.Blomquist, P.Johnsson, C.Luhrs, G.Malmkvist, J.O.Solem, C.Alling, and E.Stahl, The appearance of S-100 protein in serum during and immediately after cardiopulmonary bypass surgery: a possible marker for cerebral injury, *J.Cardiothorac.Vasc.Anesth.* 11:699 (1997).
167. T.Struffert and W.Reith, [Brain and head injury. Part 1: Clinical classification, imaging modalities, extra-axial injuries, and contusions], *Radiologe* 43:861 (2003).
168. D.Demann and G.Leisman, Biomechanics of head injury, *Int.J.Neurosci.* 54:101 (1990).
169. J.R.de Kruijk, P.Leffers, P.P.Menheere, S.Meerhoff, and A.Twijnstra, S-100B and neuron-specific enolase in serum of mild traumatic brain injury patients. A comparison with health controls, *Acta Neurol.Scand.* 103:175 (2001).
170. T.Ingebrigtsen and B.Romner, Serial S-100 protein serum measurements related to early magnetic resonance imaging after minor head injury. Case report, *J.Neurosurg.* 85:945 (1996).
171. T.Ingebrigtsen, B.Romner, S.Marup-Jensen, M.Dons, C.Lundqvist, J.Bellner, C.Alling, and S.E.Borgesén, The clinical value of serum S-100 protein measurements in minor head injury: a Scandinavian multicentre study, *Brain Inj.* 14:1047 (2000).
172. P.Biberthaler, T.Mussack, E.Wiedemann, K.G.Kanz, W.Mutschler, U.Linsenmaier, K.J.Pfeifer, C.Gippner-Steppert, and M.Jochum, Rapid identification of high-risk patients after minor head trauma (MHT) by assessment of S-100B: ascertainment of a cut-off level, *Eur.J.Med.Res.* 7:164 (2002).
173. T.Mussack, P.Biberthaler, K.G.Kanz, U.Heckl, R.Gruber, U.Linsenmaier, W.Mutschler, and M.Jochum, Immediate S-100B and neuron-specific enolase plasma measurements for rapid evaluation of primary brain damage in alcohol-intoxicated, minor head-injured patients, *Shock* 18:395 (2002).
174. M.Guha and N.Mackman, LPS induction of gene expression in human monocytes, *Cell Signal.* 13:85 (2001).
175. S.D.Wright, P.S.Tobias, R.J.Ulevitch, and R.A.Ramos, Lipopolysaccharide (LPS) binding protein opsonizes LPS-bearing particles for recognition by a novel receptor on macrophages, *J.Exp.Med.* 170:1231 (1989).

176. A.L.Siren, R.McCarron, L.Wang, P.Garcia-Pinto, C.Ruetzler, D.Martin, and J.M.Hallenbeck, Proinflammatory cytokine expression contributes to brain injury provoked by chronic monocyte activation, *Mol.Med.* 7:219 (2001).
177. M.J.Bell, P.M.Kochanek, L.A.Doughty, J.A.Carcillo, P.D.Adelson, R.S.Clark, S.R.Wisniewski, M.J.Whalen, and S.T.DeKosky, Interleukin-6 and interleukin-10 in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury in children, *J.Neurotrauma* 14:451 (1997).
178. A.Travlos, H.A.Anton, and P.C.Wing, Cerebrospinal fluid cell count following spinal cord injury, *Arch.Phys.Med.Rehabil.* 75:293 (1994).
179. M.C.Morganti-Kossmann, M.Rancan, P.F.Stahel, and T.Kossmann, Inflammatory response in acute traumatic brain injury: a double-edged sword, *Curr.Opin.Crit Care* 8:101 (2002).
180. C. Kirchhoff, S. Buhmann, V. Braunstein, B. A. Leidel, T. Vogel, U. Kreimeier, W. Mutschler, P. Biberthaler, Cerebrospinal S100-B: A potential marker for progressive intracranial hemorrhage in patients with severe traumatic brain injury, *Eur J Med Res* 13: 1-6 (2008)
181. T. Hensler; S. Sauerland; B. Bouillon; M. Raum, D. Rixen; H.J. Helling, J. Andermahr; E.A. Neugebauer, Association between injury pattern of patients with multiple injuries and circulating levels of soluble tumor necrosis factor receptors, interleukin-6 and interleukin-10, and polymorphonuclear neutrophil elastase, *J Trauma* 52:962-70 (2002)
182. SM Bloomfield, J McKinney, L, Smith, J. Brisman, Reliability of S100B in predicting severity of central nervous system injury, *Neurocrit Care* 6(2): 121-38 (2007)

8. Glossar

Ag	Antigen
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
Ak	Antikörper
ANOVA	Analysis of Variance
ATP	Adenosin Tri Phosphat
BBB	Blut-Hirn-Schranke
BCFB	Blood cerebrospinale fluid barriere
cCT	Kraniale Computertomographie
CD	Cluster of differentiation
CDC	Center of disease control
CPP	Zerebraler Perfusionsdruck
CSF	Cerebro spinal fluid

DAI	Diffuse axonal injury
Diff.-BB	Differential Blut Bild
ECLIA	Electrochemiluminescence Immunoassay
EDH	Epidurales Hämatom
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELAM	Endothelial leukocyte adhesion molecules
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetales Kälber Serum
FCS	Forward Angle Light Scatter
FITC	Fluorisothiocyanat
g	Gramm
GCS	Glasgow coma scale
GOS	Glasgow outcome scale
Gα	Granulozyten
h	Stunde
H ⁺	Wasserstoffion
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HIV	Human immunodeficiency virus
HLA	Human leucocyte antigen
ICAM	Intercellular adhesion molecule
ICB	Intrazerebrale Blutung
ICP	Intrakranieller Druck
IL	Interleukin
kDa	Kilo dalton
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
m	Milli
MAP	Arterieller Mitteldruck
M-CSF	Makrophagenkolonie stimulierender Faktor
MHC	Major histocompatibility complex
Min	Minute
mmHG	Millimeter einer Quecksilbersäule
MØ	Monozyt

MPS	Mononukleären Phagozytensystems
MPS	Mononukleäres Phagozyten System
MW	Mittelwert
n	nano (x 10 ⁻⁹)
O ₂	Sauerstoff
p sys	Systolischer Druch
PBMC	Mononukleärer Leukozyt aus dem peripheren Blut
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC-5	Phycoerythrin-Cyanin-5
Pdia	Diastolischer Druck
PE	Phycoerthrein
PIH	Progressive intracranial hemorrhage
PMN	Poly Morpho Nuclear
Q _{alb}	Albumin Quotient
ROI	Reactive oxygen intermediates
RPM	Umdrehungen in der Minute
SAB	Subarachnoidale Blutung
SDH	Subdurales Hämatom
SEM	Standard error of the mean (Standardfehler)
SHT	Schädel-Hirn-Trauma
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
SSC	Side Angle Light Scatter
sSHT	Schweres Schädel-Hirn-Trauma
TNF	Tumor Nekrose Faktor
VEGF	Vascular endothelial growth factor
W	Watt
ZNS	Zentrales Nerven System
α1-PI	α1-Proteinase Inhibitor
□	Mikro (x 10 ⁻⁶)
-	Minus
#	Fraktur
°	Grad-Celsius

9. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Christoph Egginger

Ausbildung:

1997 Abitur am Maristengymnasium, Fürstenzell

1999-2002: Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg

2002-2006 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München

2005-2006 Praktisches Jahr an Lehrkrankenhäusern der Ludwig-Maximilians- Universität, München

2006 Auslandsaufenthalt an der Emory University, School of Medicine, Atlanta, GA, U.S.A.

26.05.2006 Approbation

10. Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn Priv. Doz. Dr. med. P. Biberthaler möchte ich für die Überlassung des Themas sowie für seine ständige Unterstützung sehr herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. med. Wolf Mutschler, dem Direktor der Chirurgischen Klinik und Poliklinik-Innenstadt des Klinikums der Ludwig-Maximilians-Universität München danke ich für die Unterstützung der Arbeitsgruppe „Polytrauma“.

Ganz besonderer Dank gilt an dieser Stelle meinem Betreuer Herrn Dr. med. Chlodwig Kirchhoff, der mich über die gesamte Dauer der Studie hinweg unterstützte und motivierte, und mir von Beginn der wissenschaftlichen Arbeit an zu jeder Zeit zur Seite stand. Unter seiner Anleitung erlernte ich das wissenschaftliche Arbeiten von der Versuchsplanung bis hin zur kritischen Interpretation der Daten und der Verfassung von Vorträgen. Aus dieser Zusammenarbeit entwickelte sich zudem eine sehr gute Freundschaft.

Großer Dank gilt auch meinem Ko-Doktoranden Herrn Tom Müller für seine Mithilfe bei den durchgeführten Untersuchungen.

Nicht zuletzt möchte ich meinen geliebten Eltern und meiner Familie für ihr Verständnis und ihre unerschöpfliche Geduld auf meinem bisherigen Lebensweg danken.