

Aus dem Bereich
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
Fachrichtung Anatomie und Zellbiologie
Medizinische Fakultät
Universität des Saarlandes, Homburg / Saar

**Inflammation und Apoptose nach traumatischer Hirnschädigung in juvenilen
Ratten: Modulation durch humane Zellen aus Nabelschnurblut**

Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2013

vorgelegt von:
Alina Karolina Geers, geb. Gehrke
geboren am: 24.06.1981 in Bromberg (Polen)

Dekan: Herr Prof. Dr. Michael D. Menger
Referent: Frau Prof. Dr. Carola Meier
Koreferent:

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	11
1.1 Zusammenfassung deutsch.....	11
1.2 Zusammenfassung englisch	13
2. Einleitung	15
2.1 Das Schädelhirntrauma	15
2.1.1 Inzidenz des Schädelhirntraumas und langfristige Folgen	15
2.1.2 Komplikationen und Folgen eines Schädelhirntraumas bei Kindern	17
2.2 Pathophysiologie des Schädelhirntraumas.....	18
2.2.1 Primäre und sekundäre Schädigung.....	18
2.2.2 Beeinflussung der Blut-Hirn-Schranke	20
2.2.3 Inflammation im Gehirn	22
2.2.4 Nekrose und Apoptose.....	25
2.2.5 Amyloid Precursor Protein	27
2.3 Das Schädelhirntrauma im Tiermodell.....	28
2.3.1 Traumamodelle in der adulten Ratte	28
2.3.2 Weight Drop - Modell nach Marmarou	29
2.3.3 Trauma- Modell der juvenilen Ratte	30
2.4. Therapeutische Ansätze durch humane Nabelschnurblut-Zellen	31
2.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	34
3. Material und Methoden	36
3.1 Materialien	36
3.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	36
3.1.2 Verbrauchsmaterialien / Lösungen / Chemikalien.....	37
3.1.3 Verwendete Antikörper.....	38
3.2 Methoden.....	39
3.2.1 Auswahl der Tiere	39
3.2.2 Operation	40
3.2.3 Aufbereitung der Zellen aus humanem Nabelschnurblut	44
3.2.3.1 Probandenmaterial und Entnahme der Nabelschnurblut-Zellen	44
3.2.3.2 Isolierung und Aufarbeitung der Nabelschnurblut-Zellen.....	44
3.2.4 Präparation	45
3.2.5 Histologische Aufarbeitung und Untersuchung	45

3.2.5.1	Anfertigung von Kryoschnitten.....	45
3.2.5.2	Hämatoxylin-Erythrosin (HE-) - Färbung	45
3.2.5.3	Klüver-Barrera (KB) - Färbung (Markscheidenfärbung).....	47
3.2.5.4	Immunfluoreszenz	48
3.2.5.5	Amyloid Precursor Protein.....	49
3.2.5.6	Evans Blue- Färbung.....	49
3.2.6	Immunsupprimierte Tiere	50
3.2.7	Auswertung.....	50
4.	Ergebnisse	52
4.1.	Makroskopische und lichtmikroskopische Beurteilung.....	52
4.2	Cleaved-Caspase 3- Färbung.....	52
4.3	CD68- Färbung	58
4.4	Hippokampus mit Gyrus dentatus in der CC3- / CD68- Färbung.....	63
4.5	GFAP- und Cx43- Färbung.....	66
4.6	APP- Färbung.....	73
4.7	Evans Blue- Färbung.....	73
4.8	Modulation durch humane Zellen aus Nabelschnurblut.....	75
4.8.1	Modulation der Zahl CC3- immunpositiver Zellen durch humane Zellen aus Nabelschnurblut.....	76
4.8.2	Modulation der Zahl CD68- immunpositiver Zellen durch humane Zellen aus Nabelschnurblut.....	78
4.8.3	Modulation astrozytärer Proteine (GFAP und Cx43) durch humane Zellen aus Nabelschnurblut.....	81
4.9	Nachweis humaner Zellen aus Nabelschnurblut im Gehirn	84
5.	Diskussion.....	87
5.1	Diskussion der Methoden	87
5.1.1	Wahl der Tierart	87
5.1.2	Schädelhirntrauma- Modell	88
5.1.3	Histologische und immunhistochemische Methoden.....	91
5.2	Diskussion der Ergebnisse	92
5.2.1	Histologische und immunhistochemische Untersuchungen	92
5.2.2	Diffuse axonale Schädigung	96
5.2.3	Störung der Blut-Hirn-Schranke nach Trauma	97
5.2.4	Transplantation von Zellen aus Nabelschnurblut	98
5.3	Schlussbetrachtungen	103

6. Literaturverzeichnis	104
7. Danksagung	117

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Begriff
Abb.	Abbildung
APP	Amyloid Precursor Protein
ATP	Adenosintriphosphat
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BSA	Bovines Serumalbumin
bzgl.	Bezüglich
bzw.	beziehungsweise
ca.	Cirka
CC3	Cleaved-Caspase 3
CCI	Controlled Cortical-Impact
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPD	Citrate-Phosphate-Dextrose
Cx43	Connexin43
dest.	Destillata
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EB	Evans Blue
et al.	et alii
etc.	et cetera
EtOH	Ethanol
evtl.	Eventuell
g	Gramm
GCS	Glasgow Coma Scale
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
ggf.	gegebenenfalls
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HNA	Human Nuclear Antigen
hNSB	Humanes Nabelschnurblut
HLA	Human Leukocyte Antigen
hucb	Humane Nabelschnurblut-Zellen

Abkürzung	Begriff
i.c.	Intracisternal
IL	Interleukin
inkl.	Inklusive
i.p.	intraperitoneal
i.v.	Intravenös
KB	Klüver-Barrera
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
LFB	Luxol Fast Blue
m	Meter
mg	Milligramm
MHC	Major Histocompatibility
Min	Minute
mind.	Mindestens
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MPS	mononukleäres- phagozytäres System
MRT	Magnetresonanztomographie (Kernspintomographie)
NeuN	Neuron Specific Nuclear Protein
nm	Nanometer
NSB	Nabelschnurblut
OP	Operation
OT	Objektträger
PBS	Phosphor Buffered Saline
PFA	Paraformaldehyd
pH	Potential Hydrogenii
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic Acid)
rpm	Revolutions Per Minute
SHT	Schädelhirntrauma
sog.	so genannte
Std.	Stunde
TNF	Tumor Necrosis Factor
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem

Abkürzung	Begriff
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
ZNS	Zentralnervensystem

Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: Darstellung der Positionierung der Ratte, der Plexiglasröhre sowie Übersicht über die geschädigte Region	41
Abbildung 2: Platzierung der Ratte auf dem Schaumstoffbett.....	41
Abbildung 3: Übersicht der Modellanordnung.....	42
Abbildung 4: KB- Übersichtsfärbung sowie Darstellung der Immunfluoreszenz CC3- positiver Zellen bei Bregma +2,7mm im Trauma-, Kontroll- und Shamtier	53
Abbildung 5: KB- Übersichtsfärbung sowie Darstellung der Immunfluoreszenz CC3- positiver Zellen bei Bregma -1,8mm im Trauma-, Kontroll- und Shamtier.....	54
Abbildung 6: KB- Übersichtsfärbung sowie Darstellung der Immunfluoreszenz CC3- positiver Zellen in der Thalamusregion (Bregma -1,6mm) im Trauma-, Kontroll- und Shamtier.	55
Abbildung 7: Absolute Anzahl CC3- positiver Zellen im vorderen Gehirnabschnitt (Bregma +2,7mm) mit Gegenüberstellung der cranialen und caudalen Hirnoberfläche für die drei Gruppen	56
Abbildung 8: Absolute Anzahl CC3- positiver Zellen im hinteren Gehirnabschnitt (Bregma -1,8mm) mit Gegenüberstellung der cranialen und caudalen Hirnoberfläche	57
Abbildung 9: Absolute Anzahl an CC3- positiven Zellen im Thalamus (Bregma -1,6mm) mit Gegenüberstellung der rechten und linken Thalamushälfte	58
Abbildung 10: KB- Übersichtsfärbung sowie Darstellung der Immunfluoreszenz CD68- positiver Zellen bei Bregma +2,7mm im Trauma-, Kontroll-, Shamtier.....	59
Abbildung 11: Anzahl CD68- positiver Zellen an der Gehirnoberfläche im Bereich Bregma +2,7mm mit Aufteilung der drei Gruppen	60
Abbildung 12: KB- Übersichtsfärbung sowie Darstellung der Immunfluoreszenz CD68- positiver Zellen bei Bregma -1,8mm im Trauma-, Kontroll-, Shamtier.....	60

Abbildung 13: Anzahl CD68- positiver Zellen an der Gehirnoberfläche im Bereich Bregma -1,8mm mit Aufteilung der drei verschiedenen Gruppen	61
Abbildung 14: KB- Übersichtsfärbung sowie Darstellung der Immunfluoreszenz CD68- positiver Zellen in der Thalamusregion (Bregma -1,6mm) im Trauma-, Kontroll- und Shamtier	62
Abbildung 15: Anzahl CD68- positiver Zellen im Thalamus im direkten Vergleich zwischen den drei verschiedenen Gruppen.....	63
Abbildung 16: Anzahl CC3- positiver Zellen im Hippokampus, aufgeteilt in den vorderen und hinteren Hippokampusbereich im direkten Vergleich der drei Gruppen	64
Abbildung 17: Anzahl apoptotischer Zellen im Vergleich der rechten und linken Hippokampusseite zwischen der Traumagruppe sowie Kontroll- und Shamgruppe	64
Abbildung 18: Anzahl CD68- positiver Zellen in den verschiedenen drei Gruppen – aufgeteilt nach Hippokampushälften.....	65
Abbildung 19: Darstellung der Immunfluoreszenz CC3- / CD68- positiver Zellen in der Hippokampusregion im Trauma-, Kontroll- und Shamtier	66
Abbildung 20: Darstellung der Cx43- / GFAP- positiven Immunfluoreszenz an der cranialen und caudalen Gehirnoberfläche im Trauma-, Kontroll-, Shamtier.....	67
Abbildung 21: Prozentualer Anteil der Fläche der GFAP- Fluoreszenz pro Bildfläche, bestimmt für die craniale und caudale Hirnoberfläche	68
Abbildung 22: Prozentualer Anteil der Fläche der GFAP- Fluoreszenz pro Bildfläche, bestimmt für den Thalamus	69
Abbildung 23: Prozentualer Anteil der Fläche der GFAP- Fluoreszenz pro Bildfläche, bestimmt für den Hippokampusbereich.....	69
Abbildung 24: Prozentualer Anteil der Cx43- Fluoreszenz pro Bildfläche, bestimmt für die Gehirnoberfläche	70

Abbildung 25: Prozentualer Anteil der Fläche der Cx43- Fluoreszenz pro Bildfläche, bestimmt für den Thalamus	70
Abbildung 26: Prozentualer Anteil der Fläche der Cx43- Fluoreszenz pro Bildfläche, bestimmt für den Hippokampusbereich.....	71
Abbildung 27: Darstellung der Cx43- / GFAP- positiven Immunfluoreszenz in der Hippokampusregion (Bregma -2mm) im Trauma-, Kontroll- und Shamtier.....	72
Abbildung 28: Darstellung der Cx43- / GFAP- positiven Immunfluoreszenz in der Thalamusregion (Bregma -1,6mm) im Trauma-, Kontroll- und Shamtier	72
Abbildung 29: Darstellung der APP- Immunfluoreszenz im Traumatier	73
Abbildung 30: Darstellung der Evans Blue- Immunfluoreszenz im Trauma-, Kontrolltier	74
Abbildung 31: Eindringtiefe und Gewebediffusion von Evans Blue aus den Hirngefäßen in µm – Vergleich der beiden Traumagruppen mit der Kontrolle	75
Abbildung 32: Absolute Anzahl CC3- positiver Zellen im vorderen Gehirnabschnitt (Bregma +2,7mm) an der Gehirnoberfläche für Trauma ohne Zellen, Trauma mit Zellen und Kontrolle	77
Abbildung 33: Absolute Anzahl an CC3- positiven Zellen im Thalamus von Traumatieren ohne Zellen, Traumatieren mit Zelltransplantation und Kontrollen	77
Abbildung 34: Anzahl apoptotischer Zellen pro Sichtfeld im Hippokampusbereich der beiden Traumagruppen und der Kontrolle	78
Abbildung 35: Anzahl phagozytärer Zellen pro Sichtfeld an der Hirnoberfläche beider Traumagruppen sowie der Kontrollgruppe (Bregma +2,7mm)	79
Abbildung 36: Anzahl CD68- immunpositiver Zellen im Thalamusbereich (Bregma -1,6mm) beider Traumagruppen sowie der Kontrolle	80

Abbildung 37: Anzahl CD68– immunpositiver Entzündungszellen im Hippokampusbereich beider Traumagruppen sowie der Kontrolle	80
Abbildung 38: Prozentualer Anteil der Fläche der GFAP- Fluoreszenz pro Bildfläche, bestimmt für die craniale und caudale Hirnoberfläche beider Traumagruppen und Kontrolle	81
Abbildung 39: Prozentualer Anteil der Fläche der GFAP- Fluoreszenz pro Bildfläche, bestimmt für den Thalamus beider Traumagruppen und Kontrolle	82
Abbildung 40: Prozentualer Anteil der Fläche der Cx43- Fluoreszenz pro Bildfläche, bestimmt für die craniale und caudale Hirnoberfläche beider Traumagruppen und Kontrolle	83
Abbildung 41: Prozentualer Anteil der Fläche der Cx43- Fluoreszenz pro Bildfläche, bestimmt für den Thalamus beider Traumagruppen und Kontrolle	83
Abbildung 42: Prozentualer Anteil der Fläche der Cx43- Fluoreszenz pro Bildfläche, bestimmt für den Hippokampusbereich beider Traumagruppen und Kontrolle.....	84
Abbildung 43: Darstellung der Immunfluoreszenz HLA- positiver Zellen sowie Nachweis GFAP- positiver Astrozyten im Bereich der hypoxisch- ischämischen Läsion	85
Abbildung 44: Darstellung der fehlenden HLA- Immunfluoreszenz sowie Nachweis GFAP- positiver Astrozyten im Traumatier an der Gehirnoberfläche, im Hippokampusbereich mit Gyrus dentatus...	85

1. Zusammenfassung

1.1 Zusammenfassung deutsch

Inflammation und Apoptose nach traumatischer Hirnschädigung in juvenilen Ratten: Modulation durch humane Zellen aus Nabelschnurblut

Problem: Das Schädelhirntrauma ist in den industrialisierten Ländern einer der häufigsten Gründe für den Tod von Kindern und jungen Erwachsenen. In Deutschland erleiden ca. 250.000 Menschen jährlich ein Schädelhirntrauma, das auch als Hauptursache für bleibende und dauerhafte neurologische Schädigungen betrachtet wird. Vor allem bei Kindern sind die Auswirkungen fatal, da sie anders als Erwachsene auf ein Schädelhirntrauma reagieren. Hier ist vor allem ein diffuser axonaler Schaden mit anatomischen Veränderungen im Kortex, Hippokampus und Thalamus nachweisbar. Neben der irreversiblen primären Schädigung von Neuronen, Axonen und Gefäßen mit nachfolgendem Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke kommt es zu sekundären Schädigungen mit vermehrter Inflammation und Apoptose von Zellen. Diese sekundäre Phase bietet die einzige Möglichkeit einer therapeutischen Intervention. Aus diesem Grund ist unser Ziel die Etablierung eines Trauma-Tiermodells für juvenile Ratten sowie die Darstellung Trauma-induzierter Änderungen im Gehirn gewesen. Humane Zellen aus Nabelschnurblut sollten auf ihr therapeutisches Potential in diesem Modell untersucht werden.

Methode: Mittels des „Weight-drop“-Modells wurde bei männlichen Sprague-Dawley-Ratten in einem Alter von circa drei Wochen ein traumatischer Hirnschaden durch ein 75/80g Gewicht auf den Schädel erzeugt. Inflammation, Apoptose und ein diffuses axonales Trauma wurden immunhistochemisch durch Detektion von Cleaved-Caspase 3 (CC3), CD68 und des Amyloid Precursor Proteins nachgewiesen. Weitere wichtige Marker sind das astrozytäre Protein GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) und Connexin43. Eine Störung der Blut-Hirn-Schranke konnte durch Extravasation des Farbstoffs Evans Blue gezeigt werden. Einem Teil der Traumatiere wurden 24 Stunden nach dem Trauma Zellen aus humanem Nabelschnurblut intraperitoneal bzw. intracisternal appliziert. Der Nachweis der humanen Zellen erfolgte mittels der HNA- oder HLA- Färbung. Eine

mögliche Modulation der Inflammation und Apoptose wurde mittels Cleaved-Caspase 3- und CD68- Immunhistochemie untersucht.

Ergebnis: Mittels der oben genannten Verfahren konnte nach dem Trauma eine erhöhte Zahl an apoptotischen Zellen an der vorderen Hirnoberfläche (Bregma +2mm), im Thalamus und Hippokampus identifiziert werden. Zusätzlich konnte qualitativ der Nachweis einer Traumainduktion durch Darstellung der axonalen Akkumulation von Amyloid Precursor Protein erfolgen. Die Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke wurde mittels der Diffusionsmessung von Evans Blue durch kortikale Gefäße für bis 24 Stunden nach dem Trauma belegt. Nach Gabe von Zellen aus Nabelschnurblut konnten in fast allen Bereichen eine deutlich rückläufige Inflammations- und Apoptoserate gefunden werden. Die applizierten Zellen konnten jedoch - auch nach Ausschluss verschiedener Parameter, wie ein vorzeitiger Verschluss der Blut-Hirn-Schranke oder die Eliminierung durch das Immunsystem - in keinem Nachweisverfahren (HNA- / HLA- Färbung) im Gehirn detektiert werden.

Diskussion: In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das veränderte Traumamodell für juvenile Ratten in Anlehnung an Adelson zu einem relevanten traumatischen Hirnschaden führt. Dieser konnte über eine deutlich erhöhte Inflammations- und Apoptoserate nachgewiesen werden. Somit wurde ein valides Modell zur Traumainduktion bei juvenilen Ratten etabliert. Die zusätzliche Applikation von Zellen aus humanen Nabelschnurblut führte nachweislich zu einer signifikanten Reduktion der Inflammations- und Apoptoserate in verschiedenen Bereichen des Gehirns. Trotz fehlenden Nachweises der applizierten Zellen aus Nabelschnurblut im Gehirn liegt eine Modulation der genannten Parameter vor, die möglicherweise über parakrine Effekte der Zellen oder über eine Wirkweise über sekundäre Mechanismen erklärt werden kann.

1.2 Zusammenfassung englisch

Inflammation and apoptosis after traumatic brain injury in juvenile rats: modulation via human umbilical cord blood cells

Background and introduction:

Traumatic brain injury is still one of the most frequent reasons for the death of children and young adults in industrial countries. In Germany, there are about 250,000 people per year, who sustain a traumatic brain injury, which is regarded as the main cause of consistent and durable neurological impairment. Because of the different reaction of children to traumatic brain injury, the subsequent effects on children are fatal. First of all, there is a diffuse axonal injury detectable with anatomical alteration in cortex, hippocampus and thalamus. Beside this primary damage of neurons, axons and blood vessels and the following breakdown of the blood-brain-barrier, it comes to secondary damages with increased inflammation and apoptosis of cells. This secondary damage offers the only possibility for therapeutic intervention. For this reason, our aim was to establish an animal model of trauma for juvenile rats as well as to explore and analyse the effects on inflammation and apoptosis. With regard to the therapeutic intervention, there is an encouraging approach in the therapy with human umbilical cord blood cells.

Methods: Three weeks old male Sprague-dawley rats were used for inducing a traumatic brain injury by the "weight-drop-model". Inflammation and apoptosis were measured via immunohistochemical detection of Cleaved-Caspase 3, CD68, glial fibrillary acidic protein and Connexin43. Further important markers were amyloid precursor protein and the extravasation of evans blue- dye. Human umbilical cord blood cells were transplanted to one group 24 hours after traumatic brain injury. Here, we analysed the same parameters via immunohistochemical staining. The detection of human cells occurred by human nuclear- staining via HNA and HLA.

Results: Using these methods, we could detect an increased number of apoptotic cells after traumatic brain injury on the brain surface, in the thalamus and the hippocampus. Additionally, we provided the qualitative proof of the accumulation of amyloid precursor protein in disrupted axons. The breakdown and leakage of

the blood brain barrier was documented by measurement of the evans blue diffusion through blood vessels for more than 24 hours after traumatic brain injury. The application of human umbilical cord blood cells led in nearly all of the brain regions to significant reduction of apoptosis and inflammation. Nevertheless, we were not able to detect human umbilical cord blood cells in the brain.

Conclusion: In this work, we were able to show that the modified trauma animal model for juvenile rats according to the model of Adelson induces a relevant traumatic brain injury with increased apoptosis and inflammation. The application of human umbilical cord blood cells led to a significant reduction of these parameters in different parts of the brain. The missing detection of umbilical cord blood cells might argue for the secondary effect of these cells by secreting factors.

2. Einleitung

2.1 Das Schädelhirntrauma

2.1.1 Inzidenz des Schädelhirntraumas und langfristige Folgen

Ein Schädelhirntrauma (SHT) bezeichnet eine geschlossene oder offene Schädelverletzung mit Beteiligung des Gehirns und entsteht durch äußere Gewalteinwirkung auf den Kopf. Ursache sind heutzutage vor allem Stürze, aber auch Unfälle, beispielsweise im Straßenverkehr, im Beruf oder beim Sport, oder äußere Gewalt können ein SHT auslösen (Bushnik et al., 2003). Durch die äußere Gewalteinwirkung auf den Kopf / Schädel wird die funktionelle Integrität gestört. Dies führt mit unterschiedlicher Ausprägung zur Zerstörung von Knochen und Bindegewebe, wie den Hirnhäuten, die das Gehirn allseitig umhüllen und vor mechanischer Einwirkung schützen (Schiebler et al., 2002). Weiterhin treten Verletzungen des Gehirns selbst auf.

Man unterteilt das akute SHT in drei Schweregrade mit jeweils unterschiedlich häufigem Auftreten: Ein leichtes SHT macht mit 91% die Mehrheit aller Schädelhirntraumata aus, ein mittleres SHT 4% und ein schweres SHT 5% (Rickels et al., 2011). Die Einteilung in diese drei Schweregrade erfolgt nach der „Glasgow Coma Scale“ (GCS) durch Prüfung der Vitalzeichen, basierend auf der klinischen Untersuchung der betroffenen Person. Parameter sind das Öffnen der Augen sowie die verbale und motorische Reaktion (Frommelt und Lösslein, 2010). Die erhobenen Punkte der GCS korrelieren mit dem späteren klinischen Verlauf und dem Outcome (Jennett, 2002).

In Deutschland erleiden jährlich ca. 250.000 – 280.000 Menschen ein SHT. Die Inzidenz wird mit 332 - 360 pro 100.000 Einwohner pro Jahr angegeben (Rickels, 2009). In Europa wird die Inzidenz auf 235 pro 100.000 geschätzt, mit einer Sterblichkeitsrate von ca. 11% (Bellander et al., 2010). Laut dem statistischen Bundesamt verstarben im Jahr 2007 ca. 10% (entspricht 22.894 Menschen) der

Personen mit äußerlichen Verletzungen an den Folgen. Zu dieser Personengruppe zählen auch Patienten mit SHT.

Das SHT ist einer der häufigsten Gründe für den Tod von Kindern und jungen Erwachsenen in industrialisierten Ländern (Langlois et al., 2006). Das SHT wird auch als Hauptursache für bleibende und dauerhafte neurologische Schädigungen und Beeinträchtigungen betrachtet, wie z.B. eine Epilepsie nach Bildung einer Dura- Hirnnarbe (Lowenstein et al., 1992). Zudem benötigen viele Patienten aufwendige Rehabilitationsmaßnahmen und sind durch schwerste motorische Beeinträchtigungen langfristig und ggf. lebenslang pflegebedürftig und behindert (Elf et al., 2002). Diese langfristigen Beeinträchtigungen und Defizite machen einen Großteil der Kosten aus (Rickels et al., 2010). Mögliche dauerhafte und langfristige Folgen und resultierende neurologische Funktionsstörungen nach einer derartigen Hirnschädigung bestehen aus motorischen Behinderungen und kognitiven Defiziten (Adelson et al., 1996), sowie Defiziten im Aufmerksamkeitsverhalten (Whyte et al., 1996), die z.T. länger als sechs Monate persistieren und Kopfschmerz, Konzentrationsstörungen, Schwindel und Gedächtniseinschränkungen einschließen (Hofman et al., 2001; Graham et al., 2000). Des Weiteren erstrecken sich die beim Menschen beobachteten Verhaltensänderungen auf retrograde und anterograde Amnesie, Verwirrung, Desorientiertheit, Schwierigkeiten beim Lernen und Erinnern von neuen Informationen, Veränderung der Informationsverarbeitung, Inflexibilität bei Lösungsstrategien und Sprachschwierigkeiten (McDowell et al., 1997). Weitere beschriebene Störungen, die nach einem SHT auftreten können, sind depressive Episoden, Angststörungen und Persönlichkeitsstörungen. Insgesamt wird nach einem SHT, unabhängig von der Schwere, eine erhöhte Inzidenz und Lebenszeitprävalenz für neurologische und psychiatrische Krankheiten, wie Demenzen und Morbus Parkinson beobachtet (van Reekum et al., 2000). Zudem wird ein Zusammenhang zwischen einem SHT und der Alzheimer- Krankheit diskutiert (Kumar und Loane, 2012). Man rechnet mit ca. 2,8 Milliarden Euro Gesamtkosten pro Jahr zur Qualitätsversorgung der Schädelhirnverletzten in Deutschland sowie für die nachfolgenden indirekten Kosten (Rickels et al., 2006). Bereits Adams wies bei Patienten mit einem SHT nach, dass Beschleunigungsvorgänge im Gehirn zur Dehnung und Zerreißung von Axonen führen (Adams et al., 1977). Das am stärksten und häufigsten geschädigte Gebiet nach einem SHT ist der Frontotemporalbereich, aber auch alle anderen

Hirngebiete können betroffen sein. Das SHT führt in den betroffenen Arealen zu einem diffusen und multifokalen axonalen Schaden, der von Gennarelli erstmals mit dem Begriff „Diffuse Axonal Injury“ beschrieben wurde (Gennarelli et al., 1998). Vor allem Kinder reagieren verstärkt mit solch einer diffusen zerebralen Schwellung, während sich bei Erwachsenen häufiger nur ein fokales Trauma zeigt (Mazzola und Adelson, 2002). Diese diffuse Schwellung bei Kindern ist jedoch mit einer erhöhten Mortalität und Invalidität assoziiert (Adelson et al., 1998). Hinzu kommt, dass sich in den letzten 30 Jahren die Mortalität und Langzeitmorbidity bei Kindern nicht signifikant verbessert haben (Cox et al., 2011).

Untersuchungen an Ratten über einen Zeitraum von einem Jahr nach einem SHT wiesen Atrophien in bestimmten Regionen wie dem Kortex, Hippokampus, Thalamus und Septum nach (Smith et al., 1997). Dies spricht für einen chronisch progressiven degenerativen Prozess nach einem SHT. Zudem korreliert die Gehirnatrophie nach einem SHT unmittelbar mit der Schwere des SHT (Veenith et al., 2009). Aber selbst nach einem milden SHT, bei dem primär keine morphologischen und anatomischen Veränderungen zu erkennen sind, können Patienten unter lang anhaltenden kognitiven und emotionalen Schwierigkeiten leiden, inklusive Konzentrationsstörungen, Amnesie und Depressionen (Zohar et al., 2003).

2.1.2 Komplikationen und Folgen eines Schädelhirntraumas bei Kindern

Ca. 40% der Patienten mit einem SHT gehören in die Altersgruppe der unter 20-Jährigen (ca. 90.000 pro Jahr in Deutschland). Das SHT ist - nach den Erkrankungen, die unmittelbar aus der Schwangerschaft und Perinatalperiode resultieren - die Haupttodesursache für Kinder und junge Erwachsene unter 15 Jahren (Statistisches Bundesamt, 2009).

Nach einem milden SHT konnten vor allem bei Kindern motorische Defizite im Balanceverhalten und eine verzögerte Antwortgeschwindigkeit nachgewiesen werden (Gagnon et al, 1998). Bei Jugendlichen dagegen waren vor allem Langzeitveränderungen im Verhalten ausgeprägt, welche sich auch auf das Sozialverhalten auswirkten (Andrews et al, 1998; Cattelani et al, 1998). Daneben konnte gezeigt werden, dass ein schweres SHT auch nach Jahren ein deutlicher Prädiktor für persistierende (kognitive und motorische) Defizite bei Kindern (6 - 12

Jahre) ist und bei diesen Kindern keinerlei Verbesserungen im Verlauf gezeigt werden konnten, weder im Verhalten noch in neurophysiologischen Funktionen (Fay et al., 2009). Ewing-Cobbs bestätigte in einer prospektiven Studie, dass ein in frühen Lebensjahren erlittenes SHT signifikante und persistierende Konsequenzen auf die weitere intellektuelle Entwicklung hat. Entsprechend sind Kinder nach einem erlittenen SHT in Abhängigkeit von der Schwere des SHT lebenslang beeinträchtigt und dies betrifft nachweislich v.a. alltägliche Fertigkeiten (Ewing-Cobbs et al., 2006). Dieses hohe Risiko für persistierende Defizite nach einem schweren SHT in frühen Kindesjahren wurde in einer aktuelleren Studie nochmals bestätigt (Anderson et al., 2012).

Das Alter des Patienten zum Zeitpunkt des SHT ist ein Faktor, der als weiterer wichtiger Prädiktor für die Erholung der Funktionen nach einem SHT erhalten bleibt (Prins und Hovda, 2003). Generell gilt: je jünger die Kinder zum Zeitpunkt des Unfalls, desto gravierender die Langzeitfolgen. Noch nicht vollständig entwickelte Gehirne reagieren am empfindlichsten auf eine Schädigung (Anderson et al., 2005). Zudem zeigt sich im jungen Alter die höchste Schwere einer Neurodegeneration. Die Mortalität fällt mit zunehmendem Alter bis 14 Jahre ab und steigt danach deutlich wieder bis zum Erwachsenenalter an. Weiterhin bleibt das Langzeit-Outcome bei Kindern nach einem SHT arm, trotz der erzielten signifikanten Vorteile in der Therapie in den letzten Jahren.

2.2 Pathophysiologie des Schädelhirntraumas

2.2.1 Primäre und sekundäre Schädigung

In der Pathophysiologie des SHT ist die Unterscheidung zwischen einem primären und sekundären traumatischen Hirnschaden wichtig. Beim primären Hirnschaden kommt es als primäre Folge des Traumas, der mechanischen Belastung (Fraktur, Zug- und Scherbelastungen im Hirngewebe) und der Gewalteinwirkung zu einer direkten Gewebeerstörung und -verletzung. Diese äußert sich durch unmittelbare mechanische Zerstörung von Neuronen und Axonen. Die Ruptur von Gefäßen führt zu Einblutungen in das Hirngewebe und resultiert im nekrotischen Gewebeuntergang (Rickels et al., 2003). Während dieser Primärschaden meist fokal begrenzt und weitestgehend irreversibel ist, stellt sich der sekundäre

Hirnschaden als Kaskade infolge dieser Primärläsion dar. Die Kaskadenreaktion führt unter anderem zu einer Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke (BHS) und der Gefäßwände (Chen et al., 1996) mit nachfolgendem vasogenen Hirnödem, einer Hirnschwellung (Foda und Marmarou, 1994) und einem Anstieg des intrakraniellen Drucks, dem eine Kompression der Blutgefäße und dadurch eine Minderdurchblutung des Gehirns folgt (Donkin et al., 2010). Dadurch kann die primäre unabwendbare Verletzung sekundär verstärkt und verschlimmert werden.

Das Ödem selbst wird in zwei hauptsächliche Kategorien eingeteilt: das zytotoxische (zelluläre) Ödem und das vasogene Ödem. Das zytotoxische Ödem ist durch ein Ansteigen von Gewebsflüssigkeit im intrazellulären Kompartiment als Folge eines osmotischen Gradienten charakterisiert, was zur Zellschwellung und somit zu einer Änderung der zellulären metabolischen Konzentration und biochemischen Funktion führt. Das vasogene Ödem ist definiert als eine Extravasation von Proteinen aus den Blutgefäßen in das extrazelluläre Gewebe und Retention von Wasser im Extrazellulärraum und Parenchym aufgrund eines osmotischen Gradienten, der durch den Zusammenbruch der BHS verursacht wird (Donkin et al., 2010). Nach einem SHT zeigt sich innerhalb weniger Stunden ein vasogenes Ödem, gefolgt von einem zytotoxischen Ödem, welches sich langsam über die folgenden Tage entwickelt und bis zu zwei Wochen persistieren kann. Diese Ergebnisse beruhen auf Studien, in denen die Wasserdiffusion gemessen wurde und gezeigt werden konnte, dass die BHS für größere Plasmaproteine für lediglich vier bis sechs Stunden nach einem SHT geöffnet war. Gleichzeitig wurde postuliert, dass der Verschluss der BHS anschließend graduell erfolgt und sie für kleinere Substanzen für bis zu sieben Tage permeabel ist (Donkin et al., 2010).

Als Folge der Primärschädigung werden lokal und systemisch Signalkaskaden ausgelöst. Aus Tierversuchen ist bekannt, dass zu dieser Kaskadenreaktion neben morphologischen und funktionalen Veränderungen die Freisetzung pathogener Mediatorssubstanzen, wie z.B. exzitatorischer Aminosäuren (Glutamat, Aspartat, Glycin und Taurin (Koizumi et al., 1997)), freier Radikale (Awasthi et al., 1997), Stickstoffmonoxid, Arachidonsäure und pro- inflammatorischer Chemokine (Holmin et al., 1997) gehört. Diese sind an der Ausbildung des posttraumatischen Sekundärschadens beteiligt und können zu verzögerten Folgeschäden führen (Böcker et al., 2004).

Die als sekundäre Schädigungen eines SHT bezeichneten Störungen erstrecken sich somit über ein weites Spektrum, einschließlich Ödembildung (Foda und Marmarou, 1994), Neurodegeneration mit Inflammation und apoptotischem neuronalen Zelltod (Kumar und Loane, 2012). Arterielle Hypotonie und Gehirnhypoxie können erst Stunden oder Tage nach dem SHT auftreten und den Sekundärschaden, vor allem die Zerstörung der BHS- Funktion, verstärken (Rickels et al., 2003; Adelson et al 1996).

Insgesamt bieten diese sekundären Reaktionen den einzigen Angriffspunkt für therapeutische Intervention.

2.2.2 Beeinflussung der Blut-Hirn-Schranke

Die BHS stellt die physiologische Grenze zwischen Blut und Hirngewebe dar und verhindert normalerweise das Eindringen der meisten wasserlöslichen Moleküle, die größer als 500 Dalton sind. Histologisch ist die BHS aus folgenden Schichten aufgebaut: a) Kapillarendothelzellen, die über tight junction (Zonula occludens) miteinander verbunden sind (Blyth et al., 2009), b) die Basalmembran und c) Perizyten mit angegliederten verbundenen Fortsätzen der Astrozyten, die mehr als 90% der Basalmembran der Kapillaren bedecken (Bickel et al., 2001; Ramsauer et al., 2002).

Astrozyten gehören als Makroglia zur Neuroglia, die neben der Bildung und Regulation der BHS auch den neuronalen Stoffwechsel beeinflussen, die Axonscheide der Neurone bilden und bei Regenerationsvorgängen mithelfen und zur Stützfunktion im ZNS beitragen (Liebich, 2003; Gertz, 2003). Astrozyten sind somit in der Lage, die Zusammensetzung des extrazellulären Milieus zu kontrollieren und das Elektrolytgleichgewicht im ZNS aufrecht zu halten. Ferner sind sie zur Proliferation befähigt und decken Parenchymschäden des Gehirns durch Narbenbildung ab (Schiebler et al., 2002). Nach einer Schädigung umgeben aktivierte Astrozyten das verletzte Gewebe, bilden einen hemmenden extrazellulären Wall und tragen zur Narbenbildung bei (Kumar und Loane, 2012). Faserastrozyten zeichnen sich morphologisch durch lange, schmale Fortsätze aus; ihr Zytoplasma enthält spezielle Intermediärfilamente, aufgebaut aus dem „Glial Fibrillary Acidic Protein“ (GFAP). Dieses saure Gliafaserprotein ist Mitglied der Zytoskelett- Proteine und wird genutzt, um Astrozyten im ZNS darzustellen

und zu identifizieren. Dieses Protein definiert die Form und die Beweglichkeit der Astrozyten (Bongcam-Rudloff et al, 1991). Eng et al. gelang erstmals die Isolation dieses Proteins aus Multiple-Sklerose-Plaques (Eng et al., 1971; Jung et al., 2007). Nach Zellschädigung oder Zelltod, wie nach einem Trauma, einer Entzündung, bei neurodegenerativen Erkrankungen u.a., steigt die GFAP-Expression rapide in reaktiven Astrozyten an und markiert somit früh und sensitiv eine zerebrale Schädigung (Eng et al., 2000). Zusätzlich wird GFAP aus zerstörten Astrozyten selbst freigesetzt (Schiff et al., 2012).

Untereinander bilden Astrozyten ein funktionelles Netzwerk über Gap Junction. Diese werden in Astrozyten vornehmlich aus Connexin43 (Cx43) gebildet (Stout et al., 2002; Contreras et al., 2001). Connexine stellen eine Familie von integralen Transmembranproteinen dar und ermöglichen den direkten Austausch von Ionen, niedermolekularen Metaboliten, Neurotransmittern und Second-Messengern zwischen benachbarten Zellen. In einer hexameren Anordnung um eine Pore bilden sie ein Connexon, welches mit einem weiteren Connexon einer angrenzenden Membran einen Gap Junction-Kanal bildet (Même et al., 2006; Rouach et al., 2000). Astrozyten sind so untereinander durch Cx43 Gap Junction gekoppelt (Rouach et al., 2002b). Gehirnmakrophagen können die Cx43-Expression in Astrozyten herunterregulieren (Koulakoff et al., 2003). Neuere Untersuchungen zeigen zwei verschiedene Mechanismen auf: Nach Schädigung kommt es einerseits durch Zelltod zu einer Reduktion der Cx43-Expression (Rouach et al., 2002b), andererseits zeigen Studien aber auch eine vermehrte Expression von Cx43 nach Läsion (Retamal et al., 2007). Diese komplexen Veränderungen, wie der Verlust oder Anstieg von Cx43, wurden nach Trauma oder perinatalem hypoxisch-ischämischen Hirnschaden beobachtet und sind mit einer reaktiven Gliose, besonders der Proliferation und Migration der Astrozyten assoziiert (Rouach et al., 2002a; Wasielewski et al., 2012).

Normalerweise können Ionen, polare Substanzen und an Proteine gebundene Moleküle die BHS nicht passieren, wodurch die chemische Zusammensetzung der Interzellularflüssigkeit des Gehirns weitgehend konstant gehalten werden kann. Nach einem SHT ist die BHS zerstört und offen, so dass auch Moleküle, die größer als 500 Dalton sind, aus der peripheren Zirkulation in das Gehirn gelangen. Die BHS- Dysfunktion ist in der klinischen Anwendung bereits drei Stunden nach einem SHT im Kernspin (MRT) nachweisbar (Hofmeijer et al., 2004). In der Immunfluoreszenz bietet die Färbemethode mit dem Diazo- Farbstoff Evans Blue

(EB) eine gute Nachweismöglichkeit der BHS- Integrität. Dieses ist leicht löslich und bindet fest an Albumin (Saria und Lundberg, 1983). Unter normalen, gesunden Verhältnissen kann es die BHS nicht passieren und ins Hirngewebe übertreten, da das Kapillarendothel mit seinen Tight Junction eine Barrierschicht bildet. Wird die BHS durch Traumata, Entzündungen oder Tumoren geschädigt, so kann die BHS undicht werden, wodurch auch EB-Albumin durch die BHS hindurch dringen kann (Blyth et al., 2009). Somit dient EB als quantitativer Indikator für eine Schädigung der BHS (Cortez et al., 1989).

Bei Adelson zeigte sich eine gestörte BHS- Funktion nach einem SHT bei jungen Ratten bereits nach einer Stunde und diese hielt bis 24 Stunden an (Adelson et al., 1998). Zum Teil konnte eine Öffnung der BHS für über 72 Stunden nach dem Trauma nachgewiesen werden (Tanno et al., 1992). Eine zusätzliche Hypoxie verzögerte sogar die Regenerierung der BHS. Kinder scheinen für eine Hypoxie oder Hypotension anfälliger zu sein als Erwachsene (Mazzola und Adelson, 2002). Neuere Untersuchungen an Tiermodellen haben gezeigt, dass die Verletzung oder Zerstörung der BHS bei beginnenden Veränderungen von neuronalen Netzwerken, die unmittelbar zu neuronaler Dysfunktion und Degeneration führen, involviert ist und den Primärschaden verschlimmern kann. Der Zusammenbruch der BHS nach Trauma konnte in mehreren bildgebenden Verfahren bestätigt werden und kann somit auch als klinischer Biomarker für ein SHT benutzt werden (Shlosberg et al., 2010).

2.2.3 Inflammation im Gehirn

Das SHT mit der folgenden Sekundärschädigung des Gehirns führt zur Aktivierung einer Kaskadenreaktion mit lokaler und systemischer Entzündungsreaktion. Diese Inflammation entspricht dem allgemeinen Prinzip einer lokalisierten protektiven Antwort des Gewebes auf potentiell schädigende Signale, die durch Irritation, Verletzung oder Infektion ausgelöst werden mit dem Ziel der Beseitigung pathogener Stimuli einerseits, sowie der Einleitung eines Heilungsprozesses und Reparatur dieser reizbedingten Gewebsschädigung andererseits (Aktas et al., 2007). Sie bietet einen bedeutenden Angriffspunkt für eine mögliche therapeutische Intervention.

Inflammation konnte bislang nicht nur in neuroinflammatorischen Erkrankungen des Gehirns wie Multiple Sklerose oder Meningitis nachgewiesen werden, sondern auch bei nicht- inflammatorischen Erkrankungen, die durch eine Degeneration der Neurone charakterisiert sind, wie z.B. Trauma, Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson oder hypoxischer Ischämie (Aktas et al., 2007).

In diesem Zusammenhang werden Mikrogliazellen (Gehirnmakrophagen), Makrophagen und Mastzellen aktiviert, die sich in der Nähe von Hirnblutgefäßen aufhalten und zur Gruppe des mononukleären- phagozytären Systems (MPS) gehören. Weiterhin kommt es zur Expression von zytotoxischen, pro-inflammatorischen Mediatoren sowie der Infiltration durch Immunzellen (Jin et al., 2009). Zu diesen pro-inflammatorischen Zytokinen gehören Interleukin (IL) -1, IL-6 sowie TNF-alpha. Diese werden in der akuten Phase einer Hirnschädigung exprimiert und sezerniert und verstärken die Inflammationsreaktion. Die Balance zwischen posttraumatischer pro- und anti-inflammatorischer Antwort wird zugunsten der Inflammation verschoben. In der Folge führt die inflammatorische Reaktion zu einer progressiven Zerstörung von Neuronen (Silverstein et al., 1997) und zur Apoptose. Als Konsequenz verstärkt die inflammatorische Reaktion den neuronalen Zelltod und resultiert letztendlich in einer Expansion des Infarktolumens (Schwartz et al., 2008).

Mikrogliazellen sind Abkömmlinge der Blutmonozyten, weisen eine erhöhte Phagozytoseaktivität auf und produzieren eine Vielzahl an Zytokinen. Damit gehören sie in die Gruppe der Abwehrzellen (Gertz, 2003; Schiebler et al., 2002). Innerhalb weniger Minuten nach einer Hirnläsion werden Mikrogliazellen aktiviert, migrieren zu der verletzten Stelle und produzieren eine Vielzahl an pro-inflammatorischen Mediatoren (Jin et al., 2010). Die inflammatorische Antwort der Mikroglia wird durch Interaktion mit anderen Zellen des Gehirns moduliert, indem sie einerseits für bestimmte Stoffe wie Adenosintriphosphat (ATP), Glutamat und Zytokine, die von zerstörten Neuronen frei gesetzt werden, Rezeptoren exprimieren aber auch andererseits selbst Chemokine und pro- und anti-inflammatorische Zytokine sezernieren (Kumar und Loane, 2012). So können Astrozyten Faktoren frei setzen, die eine mikrogliale Aktivierung beeinflussen. Hierbei zeigte sich auch, dass Astrozyten mit Mikroglia kooperieren, um eine exzessive inflammatorische Antwort zu verhindern (Min et al., 2006). Obwohl Inflammation ein unabdingbarer Verteidigungsmechanismus gegen pathogene

Mechanismen ist, so wird durch die Mediatorfreisetzung oft das umliegende Gewebe zerstört oder der Gewebedefekt verschlimmert. Deshalb sollte die Ausbreitung der Inflammation kontrolliert werden um den anti- pathogenen Effekt zu maximieren und um die Zerstörung des Gewebes zu minimieren (Min et al., 2006). Zusätzlich wird in neueren Studien postuliert, dass Mikrogliazellen inkl. ihrer Mediatoren eine zweifache Rolle in den frühen und späten Stadien einer Hirnschädigung spielen. Sie führen bei Überaktivierung durch Freisetzen von IL-1 β , TNF-alpha und weiteren oxidativen Metaboliten zur Gewebszerstörung mit neurotoxischen Effekten (Kumar und Loane, 2012), jedoch fördern sie nachfolgend in der späten Phase die Regeneration (Jin et al., 2010). Aktivierte Mikrogliazellen können unter anderem zu einer verstärkten Zerstörung der BHS führen, so dass eine Inhibition der Mikroglia das Gehirn schützen könnte. Im Gegensatz hierzu wird Mikroglia ebenfalls eine protektive Rolle zugesprochen, indem sie freigesetzte Toxine eliminieren, infiltrierende Neutrophile phagozytieren und durch die Freisetzung neurotropher und Wachstums- Faktoren untergegangenes Gewebe reparieren können (Jin et al., 2010). Neuere Ergebnisse begründen diese widersprüchlichen Aufgaben von Mikroglia mit dem Vorhandensein und der Aktivierung verschiedener Phänotypen. In Abhängigkeit der Stimuli aus der Umgebung können einerseits pro- inflammatorische Zytokine von Mikroglia produziert werden, die wichtig für die Phagozytoseaktivität sind und zu einem Gewebsuntergang führen, andererseits begünstigen andere Phänotypen die Angiogenese und den Wiederaufbau von untergegangenen Gewebe. Von den lokalen Signalen ist es abhängig, in welchen Phänotyp sich diese Mikrogliazellen nach einer Hirnverletzung differenzieren (Kumar und Loane, 2012).

ED1 ist ein spezifischer monoklonaler Antikörper, der das CD68- Antigen, ein lysosomales Membranprotein dieser Mikrogliazellen, detektiert. Es stellt somit einen Marker für Zellen des mononukleären Phagozytensystems, wie Gewebe-Makrophagen und Monozyten dar (Damoiseaux et al., 1994; Dijkstra et al., 1985). Die Expression dieses Antigens CD68 steigt mit der Phagozytoseaktivität im Rahmen von Entzündungsreaktionen oder Phagozytosevorgängen an (Damoiseaux et al., 1994; Kumar und Loane, 2012). Die Menge des exprimierten CD68 in einer Zelle korreliert mit der phagozytischen Aktivität.

2.2.4 Nekrose und Apoptose

Das Auftreten von Nekrose und Apoptose wird initiiert durch Ischämie, Hypoxie und freie Radikale, wie dies nach einem SHT der Fall ist. Häufig werden Mischformen des Zelluntergangs ausgelöst mit Aktivierung des regulierten Apoptoseprogramms und mit Elementen der unregulierten Nekrose (Holtz, 2009; Raghupathi, 2004). Zwischen beiden Formen finden sich häufig unterschiedliche Zeitverläufe. Die Nekrose ist ein unmittelbarer und früher Prozess mit Nachweis neurodegenerativer Veränderungen bereits nach Minuten bis Stunden (Padosch et al., 2001; Hicks et al., 1996). Die Apoptose als aktiver, Energie- abhängiger Prozess tritt häufig erst mit einer gewissen Verzögerung von einem Tag bis zwei Wochen nach einem SHT auf (Padosch et al., 2001). Sowohl während der akuten Phase wie auch beim verzögerten Zelltod kann Apoptose jedoch nachgewiesen werden (Conti et al., 1998). Nach einem milden Trauma zeigen sich bereits nach 12 Stunden apoptotische Zellen, die erst nach 24 Stunden ein Maximum erreichen und dann in unterschiedlichen Bereichen des Gehirns nachgewiesen werden können. Hierzu gehören unter anderem der ipsilaterale Kortex, Gyrus dentatus und Hippokampus (Raghupathi et al., 2002; Hicks et al., 1993). Ein mittleres SHT dagegen resultiert in einer akuten (24 Stunden) und einer verspäteten (eine Woche) Zunahme apoptotischer Zellen im Kortex und nach zwei Wochen im Thalamus. Zudem zeigte sich auch Apoptose in der weißen Substanz. Dies spricht dafür, dass auch Gliazellen anfällig für Trauma- induzierte Veränderungen sind und der Apoptose unterliegen (Raghupathi et al., 2002).

Ob eine geschädigte Zelle apoptotisch oder nekrotisch zugrunde geht, ist neben der Stärke und Dauer der Schädigung auch vom intrazellulären ATP- Gehalt abhängig (Padosch et al., 2001). Vereinfacht dargestellt kann gesagt werden, dass bei genügend ATP die Zelle apoptotisch degeneriert. Bei Fehlen von ATP unterzieht sie sich der Nekrose (Miles und Knuckey, 1998). Diese Aufteilung wird jedoch nicht mehr derart dogmatisch gesehen, denn das Vorhandensein von morphologischen Befunden bzgl. Nekrose und Apoptose in derselben Zelle, hat zu der Ansicht geführt, dass es ein Kontinuum zwischen Apoptose und Nekrose gibt (Raghupathi, 2004). Somit ist auch möglich, dass eine initial apoptotische Zelle bei fehlendem ATP nekrotisch untergeht. Nicht selten finden sich daher auch kombinierte Formen eines Zelluntergangs (Padosch et al., 2001).

Nekrose ist häufig die schwere Folge einer lokal gestörten Stoffwechselstörung und beschreibt einen Gewebeuntergang. Sie ist charakterisiert durch den Zusammenbruch der nukleären Membran mit früher Ruptur der Zellmembran, einer initialen Zellschwellung und Aktivierung einer ausgeprägten inflammatorischen Antwort. Die Nervenzelle selbst nimmt nicht aktiv an diesem Prozess teil, in welchem der Abbau intrazellulärer Proteine durch lysosomale Enzyme und Freisetzen von lysosomalen Inhalten in das Zytoplasma und den Extrazellulärraum in einer unspezifischen und unkontrollierten Art und Weise geschieht (Miles und Knuckey, 1998).

Apoptose allgemein bezeichnet den programmierten Zelltod und meint vor allem ein genetisch determiniertes, aktives Sterbeprogramm einer Zelle. Sie stellt den kontrollierten Vorgang der Entfernung und Eliminierung von Zellen ohne ausgeprägte Entzündungsreaktion dar und ist ein wichtiger Faktor bei der sekundären Hirnschädigung nach einem SHT (Veenith et al., 2009). Durch proinflammatorische Stimuli, wie Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Glucocorticoide, Zytokine wie Tumor Necrosis Factor (TNF) oder Interleukine, freie Radikale, aber auch durch Entzug von Wachstumsfaktoren oder Zellschädigung wird dieser Energie- abhängige Prozess ausgelöst (Miles und Knuckey, 1998). Der Vorgang verläuft in mehreren Kaskaden und ist morphologisch charakterisiert als ein Vorgang, um die Zellmembranintegrität trotz Zelltod zu schützen (Padosch et al., 2001). Der Endpunkt all dieser Schritte und was die Apoptose ausmacht, ist die Fragmentation zellulärer DNA, der Abbau nukleärer Strukturen mit Kern- und Zellschrumpfung, Kondensation des Zytoplasmas und letztendlich die Bildung von Apoptotic Bodies, so genannter membranumschlossener Fragmente, die von Makrophagen aufgenommen werden (Veenith et al., 2009). Da bei dieser Art von Zelluntergang die Zellmembran intakt bleibt, wird deutlich weniger entzündliche Begleitreaktion hervorgerufen als bei der Nekrose (Longhi et al., 2001). Hieraus ergibt sich die Meinung, dass Apoptose nach einem SHT eine protektive Antwort des Gehirns ist, um verletztes Gewebe ohne große Beeinflussung des umgebenden Parenchyms zu entfernen (Veenith et al., 2009).

Die Apoptose wird in einen Caspase- abhängigen und einen Caspase- unabhängigen Mechanismus unterteilt. Über den Caspase- unabhängigen post-traumatischen neuronalen Zelltod ist nur wenig bekannt, während der Caspase- abhängige Weg der Apoptose in der Aktivierung einer Effektorkaskade mündet (Eldadah und Faden, 2000). Caspasen sind Zystein-Aspartat-spezifische-

Proteasen und bilden eine Kaskade proteolytischer Enzyme. Eine wichtige Funktion der Caspasen besteht in der Spaltung spezifischer zellulärer Schlüsselproteine und Inaktivierung von DNA- Reparaturenzymen. Alle Caspasen befinden sich in der Zelle als inaktive Proenzyme und benötigen eine proteolytische (Auto-)Spaltung für ihre Aktivierung (Springer et al., 2001). Diese erfolgt durch einen extrinsischen oder intrinsischen Weg (Stefanis, 2005). Der extrinsische Pfad wird durch Bindung eines extrazellulären Botenstoffes an verschiedene Rezeptoren der Zellen begonnen. Über eine Veränderung dieses Rezeptors mit Bildung eines Membranproteinkomplexes kommt es zur Aktivierung von Effektorcaspasen. Caspase 8 aktiviert Caspase 1, welche wiederum Caspase 3 als den finalen Todeseffektor aktiviert (Longhi et al., 2001). Beim häufiger genutzten intrinsischen Weg wird initial Cytochrom C aus den Mitochondrien in das Zytoplasma freigesetzt, was zu einer abschließenden Formation von Apoptosomen (Apoptotic Bodies) führt, die wiederum zu einer Aktivierung von Caspase 9 und nachfolgend zur Aktivierung weiterer Effektorcaspasen, u.a. auch Caspase 3, 6, 7 führen (Springer, 2002). Die wichtigste unter den Effektorcaspasen, die die Elimination der Zelle bewirken, ist Caspase 3 (Stefanis, 2005). Sie kommt sowohl in humanen wie auch Ratten- und Mauszellen vor. Dieses Enzym ist unter vielen anderen Nachweismethoden ein wichtiger Marker für apoptotische Zellen.

2.2.5 Amyloid Precursor Protein

Ein weiterer nach einem Trauma auftretender Marker ist die Akkumulation des β -Amyloid Precursor Proteins (APP), die bis zu sechs Monaten nach einem SHT nachweisbar ist (Veenith et al., 2009). Das axonal transportierte Protein APP ist der sensitivste Marker für eine axonale Schädigung (Finnie und Blumbergs, 2002) und kann bereits 30 Minuten nach traumatischer Schädigung nachgewiesen werden (Uryu et al., 2007; Hortobagyi et al., 2007). APP kumuliert in den geschädigten Axonen (Stone et al., 2000). Bei einem mittleren bis schweren SHT wurde eine erhöhte Inzidenz von Demenzen mit Atrophie des Hippokampus gefunden, die wiederum für eine kognitive Verschlechterung prädisponiert (Veenith et al., 2009). Ein diskutierter Zusammenhang zwischen einem SHT und der Alzheimer-Krankheit wird durch den Nachweis von Amyloid- Plaques, einem

wichtigen Kennzeichen für die Alzheimer- Krankheit, nach einem SHT unterstützt. Pro- inflammatorische Zytokine, die von Mikroglia sezerniert werden, resultieren nach einem SHT in einer vermehrten Akkumulation von APP (Kumar und Loane, 2012).

2.3 Das Schädelhirntrauma im Tiermodell

2.3.1 Traumamodelle in der adulten Ratte

In der Klinik sind Studien an SHT- Patienten sehr schwierig und eher ungeeignet, da – abgesehen von ethischen Belangen – die Ausprägungen und Ursachen des humanen SHT unterschiedlich sind und viele einfließende Variablen z.B. Alter, Geschlecht, Vorerkrankungen, Zeit bis zum Therapiebeginn und Behandlungsstrategien, die Vergleichbarkeit mit einer adäquaten Kontrollgruppe die Standardisierung und Analyse erschweren. Daher sind Tiermodelle notwendig, in denen ein SHT standardisiert reproduziert werden kann und verschiedene Therapieansätze unter standardisierten Bedingungen erprobt und untereinander verglichen werden können. Die Korrelation des Tiermodells mit den erhobenen Daten beim Menschen macht es möglich, in relativ kurzen Zeiträumen verschiedene therapeutische Maßnahmen am Modell zu testen. Vor allem am Modell der Ratte ist dies möglich, da diese in kurzen Zeitabständen einen größeren Lebensabschnitt verfolgt als der Mensch (Whishaw et al., 1992).

Die Auswirkungen eines humanen SHTs können aufgrund ihrer Komplexität allerdings nicht in einem einzigen Tiermodell erfasst und simuliert werden (Finnie und Blumbergs, 2002). In den letzten Jahren und Jahrzehnten wurden so verschiedene Tiermodelle entwickelt, von denen die meisten selektive Aspekte eines humanen SHT imitieren und berücksichtigen (Finnie und Blumbergs, 2002; Gennarelli 1994). Die diversen Tiermodelle zur Induktion eines SHT dienen dem Verständnis sowie der gezielten Reproduktion neurologischer Syndrome und der Erforschung biochemischer und physiologischer Aspekte zur Pathologie des SHT im komplexen System.

Die derzeit bedeutendsten und in der Forschung angewendeten Modelle sind das „Weight Drop“ Modell“ (Feeney et al., 1981), das „Controlled Cortical Impact

Injury“ (CCI) Modell (Dixon et al., 1991; Lighthall, 1988), sowie die „Fluid Percussion“ und „Impact Acceleration“ Modelle.

Das Trauma im CCI- Modell der Ratte wird nach Kraniotomie und Freilegung der Dura mittels eines druckluftbetriebenen, computergesteuerten Stempels erzeugt. Durch die Geschwindigkeit und Eindringtiefe dieses Stempels kann eine Variation der Traumastärke und eine standardisierte Reproduzierbarkeit erzeugt werden. Bei diesem Modell wird ein fokaler Schaden gesetzt (Prins und Hovda, 2003). Insgesamt konnten sowohl motorische als auch kognitive Defizite nachgewiesen werden, wie auch eine erhöhte BHS- Permeabilität mit akuter Inflammation und Apoptose im Kortex und Hippokampus (Adelson et al., 1998).

Beim „Fluid Percussion“ Modell (Versuchsaufbau nach Dixon et al., 1987) kann die Schwere der Verletzung von mild bis schwer mittels einer höheren applizierten Flüssigkeitsmenge sowie dem Druck, mit dem diese Flüssigkeit in ein Führungsröhrchen gepresst wird, erreicht werden. Bei Erreichen eines schweren SHT können sogar subarachnoidale Blutungen, Kontusionen und ein diffuser axonaler Schaden generiert werden (Dixon et al., 1987). Dieses Modell resultierte jedoch in einem geringeren diffusen als eher einem lokalen Schaden (Povlishock und Christman, 1995). Bei diesem Versuchsaufbau wurden altersabhängige Unterschiede im Verhalten und Metabolismus der Ratte dokumentiert. Während juvenile Ratten weniger neuronale Schädigung und weniger BHS- Permeabilität zeigten als adulte Tiere, so wiesen sie eine erhöhte Mikroglia- und Makrophageninfiltration und eine erhöhte Ca^{2+} - Akkumulation mit Verlust thalamischer und hippokampaler Zellen auf, die nachfolgend zur Unterdrückung motorischer Funktionen, kognitiven Defiziten, Verhaltensauffälligkeiten und je nach Schwere bis zum Tod führen können (Leker et al., 2002; Prins und Hovda, 2003).

2.3.2 Weight Drop - Modell nach Marmarou

Im modifizierten „Weight Drop“ Modell nach Marmarou (Marmarou et al, 1994; Foda und Marmarou, 1994) können die beim schweren SHT auftretenden diffusen Schädigungen im Tiermodell reproduzierbar simuliert werden. In diesem Versuchsaufbau wird auf den fixierten Kopf der Ratte ein Messinggewicht, welches variiert werden kann, aus einer beliebig einstellbaren Höhe im freien Fall auf den ungeöffneten Schädel fallen gelassen. Der Vorteil dieses simplen Modells

ist die Reproduzierbarkeit und Nachweisbarkeit verschiedener bedeutsamer Gesichtspunkte des SHT aus dem Bereich der Humanmedizin. Neben dem diffusen Schaden tritt unter anderem eine fokale Kontusion mit Verlust von Neuronen, vor allem im Kortex, Hippokampus und Thalamus auf (Tang et al., 1997a; Smith et al., 1997). Weiterhin kommt es zu intrakraniellen Blutungen und Ödemen. Nach dem Versuch wurden Verhaltensänderungen sowie motorische und kognitive Beeinträchtigungen gesehen (Shapira et al., 1988; Tang et al., 1997b). Nachteile sind die fehlende Kontrolle der Fallgeschwindigkeit und somit des erzielten SHT- Ausmaßes.

In diesem Modell zeigten sich neurologische Defizite, Gewichtsverlust, Hypotonie, ein histologisch nachweisbares diffuses Ödem, motorische Defizite und eine erhöhte Mortalitätsrate (Adelson et al., 1996). Allerdings konnten bei moderatem SHT keine kognitiven Defizite nachgewiesen werden. Erst bei einem besonders schweren SHT (Fallgewicht 150g / 1m) wurden verzögert kognitive Defizite erkennbar. Dieses Modell nach Marmarou ist das derzeit bekannteste Tiermodell zur Induktion einer diffusen traumatischen Schädigung bei adulten Ratten (Marmarou et al., 1994; Foda und Marmarou, 1994).

2.3.3 Trauma- Modell der juvenilen Ratte

Adelson modifizierte das „Weight Drop“- Modell nach Marmarou für die Anwendung an juvenilen, 17 Tage alten, Ratten. Das hierbei induzierte Trauma erfolgt ebenfalls über den Aufprall eines Gewichts auf den Schädelknochen (Adelson et al., 1996). Ziel war, die Pathomechanismen des SHT bei Kindern zu simulieren und ein Modell der diffusen zerebralen Schädigung zu etablieren, wie sie bei Kindern nach einem SHT vornehmlich entsteht. Nach neurologischer Untersuchung (Kornealreflex, Öffnen der Augen, Fluchtreflex und abnorme Bewegungen) wurden verschiedene Marker für das Trauma in der Studie von Adelson ausfindig gemacht. Zu diesen gehörten eine verzögerte Wiederherstellung der Reflexe, zunächst eine Hypertension mit nachfolgender Hypotension, ein posttraumatischer Gewichtsverlust sowie ein Absinken der Kerntemperatur. Histopathologisch zeigten sich beim schweren (100g) und mittleren (75g) Trauma diffuse neuropathologische Veränderungen mit dem Nachweis von Nekrose und Apoptose in den thalamischen Kernen, eine

Zerstörung der CA3- Architektur im Hippokampus, Gefäßrupturen und ein diffuses zerebrales Ödem, welches mit zur diffusen zerebralen Schwellung beiträgt, die als wichtiges Charakteristikum eines schweren SHT angesehen wird. Es wurden keine offensichtlichen zerebralen Kontusionen wie Risse oder Hämatome gefunden (Adelson et al., 1996). Zusätzlich zeigte sich eine Proportionalität zwischen der neurologischen Dysfunktion und der Schwere des Traumas.

Nach Romijn et al. (1991) entspricht das Gehirn einer Ratte am Postnataltag (P) 12 / 13 dem eines reifen (um den Geburtstermin auf die Welt gekommenen) Neugeborenen. Parameter bei dieser Berechnung sind der prozentuale Anteil der ausgebildeten Synapsen, festgelegt über die Expression der Glutamat-Decarboxylase und Cholinacetyltransferase sowie der elektrischen Aktivität. In der Modifikation nach Adelson wurden 21 Tage alte Ratten verwendet, was dem humanen Entwicklungsstand im Kleinkindalter entspricht.

2.4. Therapeutische Ansätze durch humane Nabelschnurblut-Zellen

Klinische Therapien beim SHT umfassen einige pharmakologische Ansätze. Viele dieser pharmakologischen Therapien, die in Tiermodellen viel versprechende Ergebnisse zeigten, versagten jedoch im klinischen Einsatz, wie z.B. Steroide, Wachstumshormone oder Antikonvulsiva (wie Valproinsäure, Magnesium). Unter anderem resultieren diese Medikamente in der Freisetzung freier Radikale. Zwar werden Steroide mit einem guten Effekt beim Hirnödeme eingesetzt mit dem Ergebnis einer Reduzierung freier Radikale und dem Nachweis eines protektiven Effekts auf das Gehirn in Tiermodellen, aber verschiedene klinische Studien zeigten keinen klaren Benefit bzgl. des Outcomes (Narayan et al., 2002; Veenith et al., 2009). In der CRASH-Studie (Edwards et al., 2005) zeigte sich bei Patienten nach einem SHT eine erhöhte Mortalität nach Behandlung mit Steroiden (Bellander et al., 2010), was ihren Einsatz obsolet machte. Viele weitere pharmakologische Studien konnten ebenfalls keine Verbesserung zeigen (Narayan et al., 2002; Langham et al., 2003; Alderson und Roberts, 2005). Die Zahl angewandter Therapieformen ist limitiert. Neue experimentelle Ansätze schließen Neurotrophine, NMDA-Antagonisten, Bradykinin-Antagonisten, Minocyclin, Inhibitoren des Zell-Zyklus wie Flavopiridol, Statine, Progesteron, Calciumkanal-Blocker wie Nimodipin mit neuroprotektiver Funktion sowie

verbessertem histologischen und funktionellem Outcome im Tiermodell ein, die allerdings noch keinen Zugang zur regulären klinischen Anwendung gefunden haben (Veenith et al., 2009; Kumar und Loane, 2012). Da zurzeit im klinischen Alltag fast ausschließlich Symptom- bezogene Behandlungsansätze möglich sind, die zudem meist nur einzelne Aspekte und Faktoren der Sekundärmechanismen eines SHT beeinflussen, ist nicht davon auszugehen, dass diese in einer signifikanten Verbesserung des Outcomes resultieren (Kumar und Loane, 2012). Die Möglichkeit eines kausalen, multipotenten Therapieansatzes könnte jedoch in der Transplantation von Zellen liegen. Eine Möglichkeit zur Zelltherapie bieten adulte Stammzellen, die in vielen Organen des Körpers vorkommen, wie im Knochenmark, Gehirn, Blut, Nabelschnur, Haut und Muskulatur. Diese adulten Stammzellen dienen als Reparatursystem des Körpers und werden lebenslang für die Regeneration untergegangener differenzierter Gewebezellen benutzt, d.h. ihre Aufgabe ist die Bildung unterschiedlicher Arten von Ersatzzellen. Während man früher der Ansicht war, dass das Differenzierungspotential adulter Stammzellen im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen auf Organ- oder Gewebe- limitierte Stammzellen begrenzt ist, so ist man mittlerweile der Auffassung, dass auch adulte Stammzellen sich mithilfe von Wachstumsfaktoren im Labor ebenfalls in differenzierte und spezialisierte Zellen anderer Organsysteme entwickeln können (Alison et al., 2002). Diese Verformbarkeit adulter Zellen kann in der regenerativen Medizin von Nutzen sein. Diskutiert werden jedoch auch indirekte, parakrine Wirkmechanismen, die von der Differenzierung der Zellen unabhängig sind (Taguchi et al., 2004; Neuhoff et al., 2007; Newman et al., 2006).

In dieser Arbeit liegt der Fokus auf der Applikation von Zellen aus humanem Nabelschnurblut. Die umbilikalen Zellen sollen auf ihren therapeutischen Nutzen nach SHT im Tiermodell untersucht werden. Der Nachweis transplanteder humaner Zellen kann über den immunhistochemischen Nachweis humanspezifischer Antigene erfolgen. Das Human-Leukocyte-Antigen (HLA), auch MHC oder Haupthistokompatibilitätskomplex genannt, befindet sich auf verschiedenen Zellen des Menschen, wie aktivierten T-Zellen, Makrophagen, Monozyten, Antigen- präsentierenden Zellen wie den Langerhans-Zellen der Haut, sowie einigen endothelialen und epithelialen Geweben, wie auch auf myeloiden und erythroiden Vorläuferzellen (Navarrete, 2000). Spezifische Antikörper reagieren mit der alpha-Gruppe der DR-Antigene dieser HLA-II-Antigene. Das HLA-DR Antigen stellt somit einen wichtigen Marker für humane Zellen, in unserem

Versuchsvorhaben vor allem für humane Nabelschnurblutzellen, dar. Ein weiterer Antikörper richtet sich gegen das „Human Nuclear Antigen“ (HNA) und detektiert die Kerne humaner Zellen. Beide Antikörper wurden bereits für die Darstellung transplanteder humaner Zellen im Wirt eingesetzt (HLA-DR: Meier et al., 2006; HNA: Chen et al., 2001).

Bislang wurden Zellen aus humanem Nabelschnurblut (hNSB) vorwiegend in der Behandlung hämatopoetischer Erkrankungen klinisch eingesetzt (Goldstein et al., 2007), aber auch in der Behandlung von Stoffwechselerkrankungen wie Morbus Krabbe wurden Zellen aus hNSB inzwischen mit positivem Effekt, wie der kontinuierlichen Entwicklung in alltäglichen Fertigkeiten mit altersentsprechender kognitiver Funktion, transplantiert (McGraw et al., 2005; Escolar et al., 2005). Weitere Anwendungsmöglichkeiten der Zelltransplantation bieten kardiovaskuläre Erkrankungen, neurodegenerative Krankheiten (Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson), Krebs und Diabetes (Alison et al., 2002). Tierexperimentelle Untersuchungen weisen darauf hin, dass Erkrankungen des gesamten neurologischen Symptomenkreises als mögliche Anwendungsbereiche in Frage kommen. Therapeutische Effekte von Zellen aus humanem Nabelschnurblut wurden bei Transplantation nach Schlaganfall (Chen et al., 2001; Jiang et al., 2010), perinatalem hypoxisch-ischämischen Hirnschaden (Meier et al., 2006; Wasielewski et al., 2012), Amyotropher Lateralsklerose (Garbuzova-Davis et al., 2003) etc. beobachtet. Es konnte nachgewiesen werden, dass Nabelschnurblutzellen die BHS passieren, in hypoxisch-ischämische Hirnareale migrieren und ein neurologisches Defizit verbessern (Chen et al., 2001; Nan et al., 2005). Hierbei ist eine Reduktion der inflammatorischen Antwort mit Inhibition von Apoptose und einer Reduktion der Infarktgröße nachweisbar, die zu einer Regeneration der motorischen Fähigkeiten führt (Jiang et al., 2010; Bliss et al., 2007). Auch die gliale Reaktion (Wasielewski et al., 2012) und Angiogenese (Rosenkranz et al., 2012a) werden beeinflusst.

Ebenso wurden nach traumatischem Hirnschaden Zellen aus Nabelschnurblut in tierexperimentellen Studien adulten Ratten appliziert (Lu et al., 2002). Die Transplantation ging einher mit der Reduktion motorischer und neurologischer Defizite nach Trauma sowie der Expression neuronaler und astrozytärer Marker (NeuN und GFAP) bei den transplantierten Zellen. Ähnliche Ergebnisse wurden nach Transplantation mesenchymaler Stammzellen nach Trauma nachgewiesen

und gingen mit einer Verbesserung des funktionellen Outcomes einher (Bakhtiar et al., 2010). Weiterhin wird der positive therapeutische Effekt von Zellen nach Rückenmarksschädigung berichtet. Die transplantierten Zellen aus hNSB führten zu einer Verbesserung in verschiedenen motorischen Tests und konnten sogar in den geschädigten Arealen aufgefunden werden (Saporta et al., 2003; Hu et al., 2010). Kim et al. beobachteten ebenfalls eine verbesserte neurologische Funktion nach Trauma und Transplantation mesenchymaler Stammzellen mit verminderter Apoptose (Cleaved-Caspase 3- Nachweis). Diese Untersuchungen wurden an adulten Ratten durchgeführt (Kim et al., 2010); therapeutische Effekte in juvenilen Ratten wurden bislang nicht untersucht.

Insgesamt sind trotz der beobachteten Effekte durch Zelltransplantation die genauen Wirkmechanismen unbekannt. Bislang konnten insgesamt nur wenige Zellen im Gehirn nach Transplantation gefunden werden, die neuronale Marker exprimieren. Aus diesem Grund geht man vielmehr davon aus, dass diese Zellen trophische Faktoren sezernieren, die endogene Mechanismen der Regeneration anregen und vorwiegend über parakrine Wirkung ihre Funktion erhalten (Bliss et al., 2007; Rosenkranz und Meier, 2011). Nachweislich können Zellen aus hNSB neurotrophe Faktoren sezernieren und somit die Immunfunktion und Inflammationsreaktion modulieren (Neuhoff et al., 2007; Newman et al., 2006, Rosenkranz und Meier, 2011). Auch ein systemischer immunmodulatorischer Effekt wird diskutiert (Rosenkranz et al., 2012b). Der deutliche Vorteil humaner Zellen aus Nabelschnurblut gegenüber anderen Stammzellen liegt in ihrer immunologischen Unreife, ihrer großen Plastizität und dass sie in ausreichender Menge zur Verfügung stehen (Ali und Bahbahani, 2010).

2.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Nach klinischer Studien- und Datenlage ist nachgewiesen, dass Kinder anders als Erwachsene mit einer diffusen axonalen Schwellung auf ein SHT reagieren (Prins und Hovda, 2003). Daher ergibt sich die Notwendigkeit geeignete Tiermodelle zu etablieren, die viele dieser relevanten Komplikationen im Kindesalter imitieren können.

Das primäre Ziel dieser Arbeit ist, ein Traumamodell in Modifikation nach Adelson in juvenilen Ratten zu etablieren. Hierbei soll zunächst der Nachweis erbracht

werden, dass dieses modifizierte Tiermodell der diffusen axonalen Schädigung einen belegbaren und relevanten traumatischen Hirnschaden hinterlässt. Als Parameter der Sekundärschädigungen dienen Inflammation, Apoptose, die Durchlässigkeit der BHS und die axonale Kumulation von APP.

Das zweite Ziel ist die Analyse einer therapeutischen Intervention mittels Zellen aus hNSB. Ziel der Analyse waren die gleichen, oben genannten Parameter der Inflammation und Apoptose. Falls positive Effekte durch die Zellen aus hNSB in Bezug auf Inflammation und Apoptose nachweisbar sind, so ist ebenfalls ein Nachweis der Zellen im geschädigten Areal wichtig.

Eine erfolgreiche und effektive Therapie durch die Kombination anti-inflammatorischer wie auch neuroprotektiver Effekte durch die Transplantation von Zellen könnte zu einem länger anhaltenden therapeutischen Fenster im klinischen Einsatz führen (Rosenkranz und Meier, 2011). Somit könnten die Ergebnisse und Erkenntnisse aus solchen Tiermodellen Grundlagen bzgl. der Entwicklung einer effizienten Humantherapie beisteuern, die nicht nur symptomatisch agiert sondern auch Aspekte der Neurogenese und Neuroprotektion durch Behandlung mit Nabelschnurblut-Zellen in Anspruch nimmt und mit einbezieht.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

- Anästhesie-Setup: Narkosegerät mit Fluovac System,
Beatmungsmaschine für Kleintiere,
Vorrichtung zum Absaugen der Narkosegase,
Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland
- Capnograph, Harvard Apparatus Ltd, Kent, UK
- Deckgläser, 34x60mm, Menzel-Gläser, D - Braunschweig
- Feuchte Kammer, Eigenbau
- Guillotine
- Homeothermic Blanket System (Wärmekissen), Harvard Apparatus Ltd,
Kent, UK
- Käfige, PC 3108, Ebeco, D - Castrop-Rauxel
- Kryostat, CM 3050 S, Leica Microsystems, D - Nußloch
- Mikroskop Zeiss Axiovert 200M / AxioCam HRm, Carl Zeiss AG, D –
Oberkochen
- Objektträger SuperFrost® Plus, Menzel-Gläser, Menzel GmbH, D –
Braunschweig
- PapPen, Wachsstift für Immunhistochemie, Dako GmbH, D - Hamburg
- Pipetten (Eppendorf Research Pipetten: 0,1 - 2,5µl; 2 – 20µl; 20 – 200µl; 100 –
1000µl), Eppendorf AG, D - Hamburg
- Pipettenspitzen, bevelled filter Tips 1 – 100µl, yellow bevelled Tipps 1 – 200µl,
blue graduated pipette tips 101 – 1000µl, extended length natural tips 0,1 –
10µl, Starlab GmbH, D - Ahrensburg
- Präparierbesteck (Scheren und Pinzetten)
- Reagiergefäße, Sarstedt, D - Nümbrecht

- Skalpell (Standard scalpel handel), Fine Science Tools GmbH, D - Heidelberg
- Wärmeschrank, WTB Binder GmbH, D - Tuttlingen
- Tischzentrifuge, Biofuge fresco, Heraeus, D - Osterode

3.1.2 Verbrauchsmaterialien / Lösungen / Chemikalien

- Antifade, Prolong Antifade Kit, Molecular Probes, NL - Leiden
- Bepanthen A + N Salbe, hauseigene Apotheke
- Blockierungslösung: 10% NGS (normal goat serum) / 0,1% Triton X100 in PBS
- Cicatrex Salbe, Pfizer, CH - Zürich
- Cresylviolet acetate, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D - Steinheim
- Einfriermedium, Tissue Freezing Medium, Jung Leica Microsystems, Nussloch
- Entellan, Merck KGaA, D - Darmstadt
- Erythrosin B 115936, Merck KGaA, D - Darmstadt
- Essigsäure Merk / Essigsäureanhydrid, Acros Organics, Geel, Belgien
- Ethanol, Baker B.V., NL - Deventer
- Evans Blue – Lösung, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D - Steinheim
- Ficoll-Lösung, Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
- Handschuhe, Meditrade, D - Kiefersfelden
- Hoechst- Färbung 33342, Sigma Chemical, St. Louis, MO
- Immersionsöl, Carl Zeiss AG, D – Oberkochen
- Isopentan, VWR International, F – Fontenay sous Bois
- Liquemin Am. 25 000 I.E. 5 ml, hauseigene Apotheke
- Lithiumcarbonat, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D - Steinheim
- Luxol Fast Blue, Waldeck GmbH, D - Münster
- Mayers Hämalaunlösung, Merck KGaA, D - Darmstadt
- Paraformaldehyd, Riedel – de Haen, Sigma Aldrich Laborchemikalien GmbH, D - Seelze
- PBS (phosphate buffered saline) L182-5, PBS Dulbecco, Biochrom AG, D - Berlin
- PBS-A (bovine serum albumin); Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D - Steinheim
- Reaktionsröhrchen, TPP 91050, Omnilab AG, CH - Mettmenstetten
- Rotihistol, Carl Roth GmbH, D - Karlsruhe

- Serologische Pipetten, 5ml/10ml, TPP 94010/94005, Omnilab AG, CH - Mettmenstetten
- Skalpellklingen
- Steriles chirurgisches Nahtmaterial
- Tissue Freezing Medium, Jung, Leica Microsystems Nussloch GmbH, D - Nußloch
- Triton X 100, Acros Organics, Geel, Belgien
- Trypanblau, Sigma Aldrich, D - Taufkirchen

3.1.3 Verwendete Antikörper

APP, Zymed Laboratories Inc., San Francisco, USA

Kaninchen- anti β - Amyloid Precursor Protein- Antikörper, polyclonal

Verdünnung 1:200

Cleaved-Caspase 3 (CC3), Cell Signalling Technology, Danvers, USA;

Kaninchen- anti CC3- Antikörper (ASP 175), polyclonal

Verdünnung 1:100

Connexin43, Zymed Laboratories Inc., San Francisco, USA

Maus- anti-Connexin43- Antikörper, monoclonal

Verdünnung 1:100

CD68 (Klon ED 1), MorphoSys AbD GmbH, D - Düsseldorf

Maus- anti-CD68- Antikörper, monoclonal

Verdünnung 1:80

GFAP, Millipore GmbH (Chemicon), D – Schwalbach

Maus- anti-Glial Fibrillary Acidic Protein- Antikörper, monoclonal

Verdünnung 1:1000

HLA-DR, Dako Cytomation Deutschland GmbH, D – Hamburg

Maus- anti-Human HLA-DR- Antikörper, monoclonal

Verdünnung 1:25

HNA, Millipore GmbH (Chemicon), D – Schwalbach
Maus- anti-Human HNA- Antikörper, monoclonal
Verdünnung 1:50

3.2 Methoden

3.2.1 Auswahl der Tiere

Die Traumainduktion wurde an männlichen, juvenilen Sprague Dawley Ratten (Centre d'Élevage R. Janvier, LE Genest-ST-ISLE, France) durchgeführt. Die Tiere wurden in vier Versuchsgruppen eingeteilt: Trauma mit Zellen (Traumainduktion mit nachfolgender Applikation humaner Zellen aus NSB); Trauma ohne Zellen (Traumainduktion ohne nachfolgende Applikation humaner Zellen aus NSB); Sham (Shamoperierte Tiere) und Kontrollen (je n=3).

Drei zusätzliche Tiere wurden direkt nach der Traumainduktion getötet und für andere Markierungen wie APP- (n=1) und Evans Blue- Färbung (Trauma n=2; Kontrolle n=1) benutzt. Zusätzlich wurden Untersuchungen an drei immunsupprimierten Tieren durchgeführt.

Bei weiteren 59 Tieren wurde während des Operationsablaufs eine Hypoxie ausgelöst, Haarrisse des Knochens festgestellt bzw. war eine Reanimation notwendig. Diese Tiere wurden nicht in die immunhistochemische Untersuchungen einbezogen und nicht in die Auswertung aufgenommen. Im Vorversuch wurden zur Einstellung der Normwerte und zum Ausschluss von Manipulationen im Hauptversuch invasive Eingriffe vorgenommen, wie die Katheterisierung der Femoralarterie.

Für die Versuchsreihe wurden lediglich männliche Ratten ausgewählt, um allgemeine Schwankungen, wie vor allem während des weiblichen Zyklus, herauszufiltern. Einen Tag vor der Operation wurden die Tiere im Alter von 21 bis 23 Tagen von ihrer Mutter getrennt und in Typ IV-Standard- Einzelkäfigen (54 x 33 x 18,5cm) mit Einstreu gesetzt. Die Haltung erfolgte während der gesamten Versuchsdauer bei einer Temperatur von $22 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 Stunden in der Zentralen Versuchstierhaltung der Medizinischen

Einrichtungen der Ruhr-Universität-Bochum. Wasser und Trockenfutter waren für die Tiere jederzeit frei zugänglich. Die Versuche wurden durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV-Recklinghausen) genehmigt und entsprechen den Richtlinien des Deutschen Tierschutzgesetzes vom 09.12.2010.

3.2.2 Operation

Der Versuchsablauf wurde in Anlehnung an das Traumamodell nach Marmarou für adulte Ratten durchgeführt (Foda und Marmarou, 1994; Marmarou et al., 1994). Zur Anwendung kam eine Adaptation des Modells für juvenile Ratten nach Adelson (Adelson et al., 1996).

Der Operationsablauf gliederte sich in folgende Abschnitte: Anästhesie, Traumainduktion und Nachbeobachtung. Im postoperativen Abschnitt erfolgte nach einer siebentägigen Verhaltenstestung die immunhistochemische Aufbereitung und mikroskopische Analyse der Gehirne.

Am Tag der Operation waren die Tiere 22 - 24 Tage alt und wogen im Durchschnitt $63,5 \pm 1,5$ g. Alle Ratten erhielten zur Einleitung eine Ketamin- (65mg/kg KG) / Domitor- (0,46mg/kg KG) Narkose. Zeitgleich wurde dem Tier eines der folgenden Analgetika i.v. verabreicht: Temgesic (0,085mg/kg KG) / Phenylbutazon (1ml/kg KG) / Metamizol (1ml/kg) oder Metacam (0,4ml/kg). Unter dieser Narkose wurde das Tier intubiert. Das Tier wurde direkt an eine geeignete Beatmungspumpe für Kleintiere angeschlossen. Der endexpiratorische CO₂-Wert wurde konstant auf 3,5 – 4,5% gehalten, um eine ausreichende Ventilation zu gewährleisten. Die Atemfrequenz wurde auf 120 – 140/min und das Atemzugvolumen auf 350 – 450µl eingestellt. Hierüber wurde auch der endexpiratorische CO₂- Wert reguliert. Die weitergehende Narkose und Beatmung wurde mit 70% Lachgas, 30% Sauerstoff und 3,5% Isofluran aufrechterhalten. In Vorversuchen wurde unter der Vollnarkose die Femoralarterie frei präpariert und ein Katheter zur Messung des Blutdrucks, der Blutgase und der Blutglukosekonzentration gelegt. Dieser invasive Eingriff diente zur Messung und Einstellung der Normwerte und verlängerte die Operationsdauer auf drei Stunden. Während des operativen Hauptversuches wurden keine invasiven Blutdruck- und Blutgaswerte erhoben, um eventuelle Nervenschädigungen und die lange Operationsdauer zu vermeiden.

Sobald die Normwerte (im Hauptversuch durch Überwachung des endexpiratorischen CO₂) erreicht waren, wurde die Kopfhaut desinfiziert und rasiert, mit einem Schnitt durchtrennt und das Periost sowie weitere Rückstände und Hautreste entfernt. Mittels eines Dentalklebers wurde eine runde Stahlplatte von 10mm Durchmesser und 3mm Dicke auf den trockenen Schädelknochen zwischen die Sutura coronalis und Sutura lambdoidea platziert und geklebt. Kurzzeitig wurde die bewusstlose Ratte vom Beatmungsgerät entfernt und auf dem Bauch liegend auf ein Schaumstoffbett gelegt und mit zwei Gurten befestigt (siehe Abb. 1 und 2).

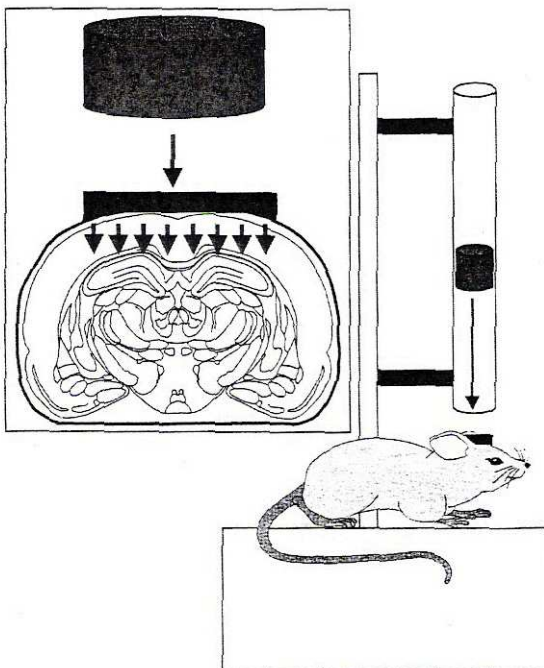


Abbildung 1: Darstellung der Positionierung der Ratte, der Plexiglasröhre sowie Übersicht über die geschädigte Region (Prins und Hovda, 2003)

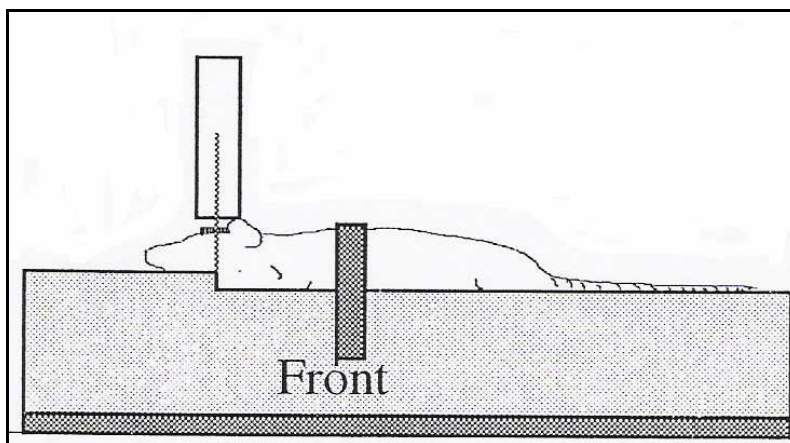


Abbildung 2: Platzierung der Ratte auf dem Schaumstoffbett (aus MCV Neurosurgery Impact Acceleration Model Instructions)

Der Kopf bzw. die Metallplatte wurde direkt unter die Öffnung einer 2m langen, vertikal aufgebauten Plexiglasröhre platziert. In dieser Röhre befand sich anfänglich ein 75g Messinggewicht, das im Verlauf der Versuche auf 80g erhöht wurde. Dieses wurde innerhalb dieser Vorrichtung aus der Höhe von einem Meter im freien Fall auf die Metallplatte fallen gelassen (siehe Abb. 3).

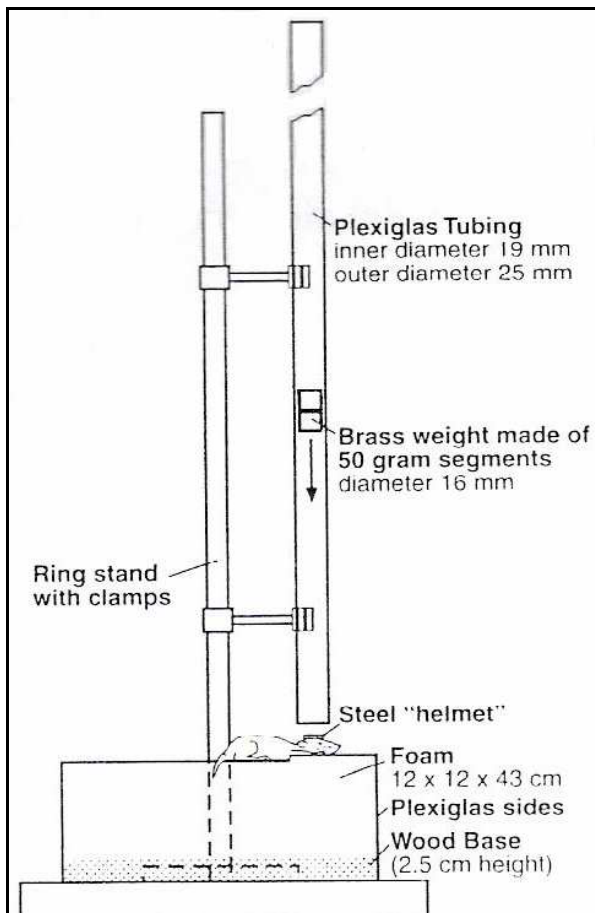


Abbildung 3: Übersicht der Modellanordnung (Adelson et al., 1996)

Direkt nach einmaligem Auftreffen des Gewichts wurde die Ratte samt Schaumstoffbett zur Seite bewegt, um ein weiteres Trauma durch mehrfaches Auftreffen des Gewichts auf die Schädelplatte zu verhindern. Unmittelbar nach dem Trauma und noch während der Narkose wurde die Ratte wieder an das Beatmungsgerät angeschlossen. Vor und bis ca. 30 Minuten nach der Läsionserzeugung wurden Blutgase, Blutdruck und Körpertemperatur kontrolliert. Um eine Auskühlung zu verhindern, wurde die Körpertemperatur rektal gemessen und bei $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ mit einem Wärmekissen mittels Rückkopplung aufrecht erhalten. Anschließend wurden die Metallplatte und die Kleberreste mit 70% Ethanol in Aqua dest. (v/v) entfernt. Der Schädelknochen wurde auf mögliche

makroskopische Risse hin kontrolliert und die Kopfhaut danach wieder zugenäht (0,3 Ethicon Monocryl). Tiere, die Risse im Schädelknochen aufwiesen, wurden nicht für weitere Untersuchungen verwendet. Alle Arbeiten wurden unter weitestgehenden sterilen Bedingungen durchgeführt.

Fünfundvierzig Minuten nach der OP wurde der Ratte der Antagonist Antisedan (1,7mg/kg KG bzw. 0,34 – 0,5ml/kg) injiziert, um die sedative Domitorwirkung aufzuheben, die Ratte zurück in ihren Käfig gelegt und beobachtet.

Die Kontrollgruppe erhielt keine Operation. Die scheinoperierten Tiere, Sham-Gruppe, erhielten die gleiche Behandlung bzw. Durchführung der Operation wie die Traumagruppe. Die Induktion des Traumas erfolgte hierbei jedoch nicht. D.h. die Tiere erhielten ebenfalls eine Isofluran-Narkose, die Kopfhaut wurde eröffnet, aber sie wurden keinem Trauma mittels des Gewichts unterzogen. Die gesamte Versuchsdauer betrug ohne Vorkommnisse ca. 30 Minuten.

Die operierten Tiere wurden über einen Zeitraum von einer Woche nach OP täglich kontrolliert. Die analgetische Behandlung der Tiere erfolgte über einen Zeitraum von drei Tagen (30 Minuten vor der Operation und bis 72 Stunden danach) durch Buprenorphin (Temgesic® 0,05mg/kg KG) alle 12 Stunden.

Zwei bzw. 24 Stunden nach dem Trauma erfolgte die Injektion mononukleärer Zellen aus hNSB intraperitoneal bzw. intracisternal in einer Konzentration von 1×10^7 Zellen in 250µl (i.p.) bzw. 10µl 0,9% NaCl in Aqua dest. (w/v) (i.c.) bzw. von 5×10^5 – 1×10^7 Kryozellen in 10µl 0,9% NaCl in Aqua dest. (w/v) (i.c.). Während die i.p.-Injektion ohne Betäubung erfolgte, wurde die Ratte bei der i.c.- Injektion ein erneutes Mal mit Ketamin und Domitor unter der gleichen Konzentration wie bei der Haupt- Operation narkotisiert und der Kopf der bewusstlosen Ratte ventroflektiert, so dass die Cisterna cerebellomedullaris gut zu erreichen war. An toten Tieren wurde vorher die Injektionstiefe sowie die Ausrichtung in die Cisterna cerebellomedullaris standardisiert.

Die operative Durchführung der Versuche und die Injektion der humanen Zellen wurden von Frau Dr. rer. nat. A. Roth-Härer unter meiner Assistenz durchgeführt.

3.2.3 Aufbereitung der Zellen aus humanem Nabelschnurblut

3.2.3.1 Probandenmaterial und Entnahme der Nabelschnurblut-Zellen

Das Nabelschnurblut wurde von der Geburtsklinik des Elisabeth-Krankenhauses bzw. des Knappschaftskrankenhauses in Bochum bereitgestellt. Dazu wurden die Mütter über die Freiwilligkeit der Teilnahme informiert und gaben vor der Entnahme des Nabelschnurblutes ihr schriftliches Einverständnis.

Das Nabelschnurblut wurde unmittelbar nach der Abnabelung mittels eines Abnahmesystems (Maco Pharma) entnommen, der im Primärbeutel (150ml Blutbeutel) 21ml CPD (Citrate-Phosphate-Dextrose)- Antikoagulans- Lösung (Citratpuffer) enthält, um eine Koagulation des Blutes zu verhindern.

3.2.3.2 Isolierung und Aufarbeitung der Nabelschnurblut-Zellen

Die Isolierung der mononukleären Zellen aus hNSB erfolgte mittels der Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Lösung. Das Nabelschnurblut wurde zunächst steril aus dem Blutbeutel entnommen, das Volumen bestimmt und das Blut in einem Verhältnis von 1:3 mit PBS verdünnt.

Anschließend wurden je 20ml Ficoll-Lösung, Dichte von 1,077g/ml, pipettiert. Über diese Ficoll-Lösung wurden nun 30ml des verdünnten Blutes vorsichtig geschichtet. Anschließend wurden die Röhrchen für 60 Minuten bei 1500rpm (400g) und bei Raumtemperatur (20 - 30°C) ohne Bremsse zentrifugiert, so dass die verschiedenen Zelltypen aufgrund ihrer Dichte separiert werden. Dabei entstehen vier Phasen: die weißlich erscheinende Interphase enthält Monozyten und Lymphozyten. Um die Ausbeute vitaler mononukleärer Zellen aus dem Nabelschnurblut zu bestimmen, wurde eine Vitalitätsbestimmung mit einer Trypanblaufärbung durchgeführt.

Im Anschluss an die Vitalitätsbestimmung wurden 10ml der Zellsuspension für 10 Minuten bei 1500rpm (400g) zentrifugiert, das Pellet in 0,9% NaCl in Aqua dest. (w/v) resuspendiert und die Zellen je nach Weiterverarbeitung entweder in Kultur genommen, kryokonserviert oder direkt den traumatisierten Tieren i.p. bzw. i.c. gespritzt.

Die Aufarbeitung der Zellen wurde von Frau Dr. rer. nat. S. Kumbruch durchgeführt.

3.2.4 Präparation

Zwei Wochen nach Trauma- Induktion wurden die Tiere nach einer CO₂/O₂-Narkose dekapitiert. Zuerst wurde das Gehirn frei präpariert, um eine Manipulation durch weitere Ischämie zu verhindern. Anschließend wurden Herz, Lunge, Leber, Niere, Milz, und ein Teil des abdominellen Fettgewebes entnommen.

Sämtliche Organe wurden mittels Einfriermedium, Tissue Freezing Medium, auf zuvor zugeschnittenem Kork platziert und in -70°C kaltem 8%igen Cyclohexan in Isopentan (v/v) eingefroren. Bis zur weiteren Verarbeitung erfolgte die Lagerung der Organe bei -20°C.

3.2.5 Histologische Aufarbeitung und Untersuchung

3.2.5.1 Anfertigung von Kryoschnitten

Zunächst wurde das tief gefrorene Präparat (Gehirn) mit Tissue Tec bedeckt. Nach Einspannen und Ausrichten des Objekthalters wurde das Gewebe mit einer Schnittdicke von 30µm bei einer Temperatur von -20°C manuell von rostral angeschnitten. Sobald die Schnittebene Bregma +2,7mm erreichte, wurde die Schnittdicke auf 12µm umgestellt und nachfolgend jeder zweite Schnitt bis zum Ende des Objekts auf die Objektträger aufgenommen. Anschließend wurden die Objektträger mit den fertigen Schnitten auf einer Wärmeplatte bei 40°C für 30 Minuten getrocknet und hinterher bei Raumtemperatur im Trockenen für weitere Untersuchungen gelagert.

3.2.5.2 Hämatoxylin-Erythrosin (HE-) - Färbung

Prinzip

Die HE-Sukzedan-Doppelfärbung findet in der Routine-Diagnostik ihre Anwendung und ist die meist genutzte Färbemethode für histologisches Material. Sie stellt eine

Übersichtsfärbung mit indirekter Kernfärbung und direkter Plasmafärbung dar. Im ersten Schritt werden die Zellkerne progressiv mit einer Lösung aus Hämatoxylin, einem natürlichen Pflanzenfarbstoff, gefärbt. Bei niedrigem pH ist es ein positiv geladener Farbstoff, der basophile Strukturen wie die DNA oder Nukleinsäuren der Zellkerne, die RNA des rauen endoplasmatischen Retikulums oder Kalk, blauviolett färbt (Welsch, 2003). Der zweite Schritt ist die regressive Gegenfärbung mit einem Xanthen-Farbstoff (Eosin G oder B oder Erythrosin B). Dabei werden azidophile Strukturen wie das Zytoplasma, Kollagen, Keratin und Erythrozyten rot gefärbt (Roche Lexikon, 1998; Merck, 2011a)

Färbevorgang

Von jedem Tier wurden jeweils 10 Objektträger mit den Gefrierschnitten des Rattengehirns in einem Abstand 480µm bis 600µm zum Färben mit HE benutzt. Die Schnitte wurden in 70% Ethanol (EtOH) in Aqua dest. (v/v) über Nacht fixiert. Am folgenden Tag erfolgte das Wässern im Aqua dest. zur Rehydratation der Schnitte. Die anschließende Färbung mit Hämatoxylin nach Mayer erfolgte für ein bis fünf Minuten, je nach Färbegrad bis zum gewünschten Färbeergebnis. Das Spülen im Leitungswasser führte zu einer Erhöhung des pH-Wertes ($\text{pH} > 3$) und somit zum Erreichen der eigentlichen tiefblauen Farbe der Kerne, sog. „Bläuen“ des Präparates, wobei auch gleichzeitig eine Stabilität und Fixierung der eingegangenen Verbindungen erreicht wurde. Nach erneutem Wässern in Aqua dest., wodurch das Bläuen gestoppt wurde, erfolgte das Eintauchen der Schnitte in 250ml frisch angesetztem und filtriertem Erythrosin (0,3g Erythrosin und 750µl 100% Eisessig in 100ml Aqua dest.). Der Zusatz von Eisessig intensivierte die Eosinfärbung und führte zur kräftigen Rotfärbung von Zytoplasma, Bindegewebe und Kollagenfasern (Merck, 2011a). Dem wiederholten Waschen der Gefrierschnitte in Aqua dest. folgte die Differenzierung und schonende Entwässerung der Schnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe. Anschließend wurden die Schnitte für jeweils zehn Minuten zur Fixierung, Aufhellung und Kontrastierung in Rotihistol gegeben und abschließend mit Eukitt auf den Objektträgern eingedeckt. Die Schnitte wurden bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Untersuchung der HE-gefärbten Präparate diente der Orientierung der geschädigten Areale, sowie der Lokalisation und evtl. Ausdehnung der Läsion im Gehirn und dem direkten Vergleich zu dem immunhistochemisch nachweisbaren Schaden im Gehirn.

3.2.5.3 Klüver-Barrera (KB) - Färbung (Markscheidenfärbung)

Prinzip

Die KB-Färbung ist ebenfalls eine sukzedane Doppelfärbung mit regressiver direkter Markscheiden- und Nissl- Färbung.

Der Farbstoff Luxol Fast Blue zeigt eine hohe Affinität zu den Markscheiden und Myelin der Neurone und färbt somit die weiße Substanz blau. Kresylviolett, ein basischer Teerfarbstoff, dient zum Darstellen von Nissl-Substanz in histologischen Schnitten. Er gehört zu den Oxazin- / Farbstoffen und wird besonders zur Färbung von Neuronen verwendet, da hierdurch die in der grauen Substanz befindlichen neuronalen Zellkörper und Kerngebiete sichtbar werden. Die gesamte graue Substanz erscheint hellviolett. Kresylviolett lagert sich an die sauren Gruppen der Nukleinsäuren und färbt Nissl-Schollen, Kernmembranen und Nukleolen intensiv violett an. Zellfortsätze und der Hintergrund bleiben ungefärbt (Merck, 2011b; Alvarez-Buylla et al., 1990).

Von jedem Rattengehirn wurden zehn Objektträger mit jeweils vier bzw. drei Schnitten mit einer Dicke von 12µm nach der KB-Färbemethode gefärbt.

Färbevorgang

Die Färbung erfolgte nach dem unten aufgeführten Protokoll:

Die Gefrierschnitte wurden über Nacht in 70%igen EtOH fixiert. In 96%igem EtOH in Aqua dest. (v/v) wurden die Schnitte am nächsten Tag entwässert und in einer 0,2%igen Luxol Fast Blue (LFB)- Lösung (0,2g LFB in 100ml 96%igen EtOH sowie 0,5ml Eisessig) bei 56 - 60°C über Nacht inkubiert. Zur Rehydratation wurden die Schnitte in eine absteigende Ethanolreihe für jeweils zwei Minuten gegeben. Nach Abspülen in Aqua dest. inkubierten die Schnitte für fünf Minuten in 0,05%igem Lithiumcarbonat in Aqua dest. (w/v) bis keine Farbwolken mehr abgingen. Nach dem Spülen in 70%igem EtOH in Aqua dest. (v/v) und anschließend in Aqua dest. erfolgte die Gegenfärbung mit 0,1%igem Cresylviolett in Aqua dest. (w/v) für 15 Minuten. Nach Abspülen mit Aqua dest., dem Auswaschen der Farbe in 96% EtOH in Aqua dest. (v/v) folgte die Differenzierung für ein bis zwei Minuten in einer Ethanol-Essigsäure-Lösung (250ml 96%igen Ethanol gemischt mit 150µl 10%iger Essigsäure). Diese wurde mit 96% EtOH in Aqua dest. (v/v) gestoppt und die Schnitte weiter mit 100%igem Ethanol entwässert. Der anschließenden Fixierung der Farbe in Rotihistol folgte das Eindecken der Objektträger mit Entellan (Euklid).

3.2.5.4 Immunfluoreszenz

Die Kryoschnitte wurden in eiskaltem EtOH (100%) für 10 Minuten bei -20°C fixiert. Anschließend wurden die Schnitte drei Mal für 10 Minuten in PBS gewaschen. Nach dem Waschen wurde das PBS abgesaugt und die Schnitte mit 200µl Blockierungsreagenz (10% Normal Goat Serum (NGS; v/v), 0,1% TritonX100 (v/v) in PBS) benetzt. Damit wurden unspezifische Bindungen bzw. Kreuzreaktionen auf der Zelloberfläche blockiert. Das Blockierungsreagenz wurde für zwei Stunden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer auf den Schnitten belassen. Nach der Blockade wurden die Primärantikörper-Lösungen (Erstantikörper verdünnt in Blockierungslösung) in folgender Aufteilung und Verdünnung auf die Präparate aufgetragen und über Nacht in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert: Anti-HNA 1:50, Anti-HLA-DR 1:25, Anti-CD68 1:80, Anti-CC3 1:100, Anti-GFAP 1:1000, Anti-Cx43 1:100. Als Negativkontrolle diente die Blockierungslösung ohne Erstantikörper.

Am folgenden Tag wurden die Schnitte wieder drei Mal 10 Minuten mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 200µl einer zweiten Blockierungslösung (PBS-A; 0,02% BSA in PBS; v/v) für 30 Minuten auf die Objektträger aufgetragen. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte für zwei Stunden abgedunkelt in der feuchten Kammer. Die Ziege anti Maus bzw. Ziege anti Kaninchen Alexa Fluor 488 bzw. 565 gekoppelte Sekundärantikörper wurden 1:3000 in PBS-A verdünnt. Nach dieser Zeit wurden die Schnitte erneut drei Mal für 10 Minuten in PBS gewaschen. Eine Gegenfärbung der Zellkerne wurde mit Hoechst 33342 in einer Verdünnung von 1:5000 in PBS durchgeführt. Jeweils 200µl wurden auf die Objektträger aufgetragen, nach einer Minute Inkubation sofort abgesaugt und mit PBS benetzt und noch einmal mit PBS gewaschen. Schließlich wurden die Schnitte mit Molecular Probes Antifade Eindeck Medium eingedeckt und bei 4°C aufbewahrt. Die Hoechstfärbung erfolgte nur bei den Trauma- und Kontrolltieren, jedoch nicht bei der Shamgruppe.

Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung erfolgte an einem Zeiss Axiovert 200M Mikroskop.

3.2.5.5 Amyloid Precursor Protein

Die APP- Färbung erfolgte im Prinzip wie bereits unter Punkt 3.2.5.4 Immunfluoreszenz beschrieben. Das Gehirn (n=1) wurde für die APP- Färbung jedoch in der sagittalen Ebene geschnitten, um den Verlauf der Axone besser darzustellen.

Die Fixierung erfolgte in 4% Paraformaldehyd (PFA) in PBS (v/v) für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Der Antikörper wurde 1:200 in Blockingreagenz (10% NGS, 2% TritonX100 in PBS) verdünnt. Für diese Färbung sowie die Einarbeitung in die Immunfluoreszenz und Mikroskopie habe ich J. Moers zu danken.

3.2.5.6 Evans Blue Färbung

Die Induktion des Traumas erfolgte wie unter Punkt 3.2.2 beschrieben. Zwei Tieren wurden nach dem Trauma 2ml pro kg Körpergewicht einer EB- Lösung (2% Evans Blue, 0.9% NaCl in Aqua dest. (w/v)) intraperitoneal gespritzt. Parallel zum Traumatier (T24Std.) wurde einem Kontrolltier EB injiziert und dieses nach der EB-Gabe als Kontrolle unter gleichen Bedingungen mitgeführt.

Zur besseren Beurteilbarkeit des Schließungszeitpunkts der BHS wurde einem Traumatier 24 Stunden nach Trauma (T24Std.) die EB- Lösung injiziert, einem zweiten Traumatier wurde die EB- Lösung 48 Stunden nach Trauma (T48Std.) verabreicht. Zwei Stunden nach Injektion von EB wurde allen drei Tieren (T24Std., T48Std., Kontrolle) 50µl Marcumar i.p. und 200µl Liquemin i.c. gespritzt. 60 Minuten später wurden die Tiere mit einer Vorspülung mit 200µl 4% PFA in Aqua dest. (v/v) perfundiert und mit weiteren 200µl 4% PFA in Aqua dest. fixiert. Die Gehirne wurden rasch nach der Fixierung entnommen und über Nacht in 4% PFA in Aqua dest. immersionsfixiert. Diese Methode wurde von Frau Dr. rer. nat. A. Roth-Härer durchgeführt.

Nach der Entnahme der Gehirne und Einfrieren bei -80°C wurden zur qualitativen und quantitativen Bestimmung des EB im perivaskulären Gehirngewebe mit dem Kryostat 12µm dicke Schnitte des Gehirns angefertigt. Anschließend wurde mittels der Fluoreszenzmikroskopie bei einer Wellenlänge von 500 - 560nm das aus den Gefäßen ins Gehirngewebe ausgetretene extravasale EB detektiert und der Radius bestimmt (Axiovision LE).

3.2.6 Immunsupprimierte Tiere

Insgesamt drei Traumatieren wurden 24 Stunden nach Traumainduktion 1×10^7 kryokonservierte und aufbereitete Zellen in 250 μ l 0,9% NaCl in Aqua dest. (w/v) intraperitoneal injiziert. Die Tiere erhielten über 10 Tage jeweils 1x10mg/kg KG das Cyclosporin A in 0,9% NaCl in Aqua dest. (w/v) intraperitoneal. Bis zur Tötung wurden die Tiere aufgrund der Immunsuppression in isolierten Futterkäfigen gehalten.

Nach insgesamt 15 Tagen wurden die Tiere unter CO₂/O₂-Narkose dekapitiert. Anschließend folgte die Entnahme von Gehirn, Leber, Milz, Niere, Herz, Lunge und Fett. Diese Organe wurden kryokonserviert und anschließend für die Detektion der Nabelschnurblutzellen aufgearbeitet.

3.2.7 Auswertung

Die Auswertung der Immunhistochemien sowie der EB- Fluoreszenz erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M von Zeiss und der Axiovision LE Software.

Bei der CC3-/ CD68- Färbung wurde die absolute Anzahl an CC3- und CD68-positiven Zellen pro Sichtfeld (320x420 μ m²) ausgezählt. Insgesamt wurden pro Tier zwei bis drei Schnitte derselben Region ausgewertet. Bei einer Tierzahl von drei Tieren pro Gruppe ergaben sich pro untersuchte Region sechs bis neun Werte. Für diese Werte wurde der Mittelwert der einzelnen Gruppen berechnet und nach Berechnung der Standardabweichung und des Standardfehlers unter den einzelnen Gruppen verglichen.

Die Auswertung der GFAP- und Cx43- Immunhistochemie erfolgte nach Bearbeitung der Bilder im Bildbearbeitungsprogramm (Axiovision LE) über ImageJ. Auch hier wurde zunächst bei jedem Tier die entsprechende Region des Gehirns aufgesucht und dann das Sichtfeld fotografiert. Das Bild wurde im AxioVision-Programm derart bearbeitet, dass die Hintergrundfluoreszenz minimiert wurde. Anschließend wurden die Bilder als JPEG in das ImageJ-Programm überführt und dort der prozentuale Anteil der GFAP- und Cx43- Immunfluoreszenz an der Bildfläche durch das Programm berechnet. Diese Prozentwerte wurden ebenfalls in eine Excel- Tabelle überführt und dort die Mittelwerte, Standard-

abweichung und der Standardfehler berechnet und unter den einzelnen Gruppen verglichen.

Für die EB- Auswertung wurden pro Tier drei charakteristische Sichtfelder pro Schnitt fotografiert. Insgesamt wurden fünf Schnitte, je zwei aus einer vorderen bzw. hinteren Bregma- Region bzw. ein Schnitt in Thalamusnähe untersucht. Anschließend folgte im AxioVision-Programm die Messung des Diffusionsdurchmessers von EB. Diese Werte wurden nach Übertragung in eine Excel-Tabelle und Berechnung der Mittelwerte, Standardabweichung und des Standardfehlers untereinander verglichen.

Die Auswertung der APP- Immunreaktion erfolgte lediglich qualitativ. Hierbei wurde der positive Nachweis von APP- Immunreaktion beim Traumatier erbracht.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels des Students t-Test. Bei einem Wert von $p < 0,05$ wurde eine statistische Signifikanz angenommen. Werte von $p < 0,05$ wurden als * angegeben, während $p < 0,001$ als hoch signifikant mit *** wiedergegeben wurde.

4. Ergebnisse

4.1. Makroskopische und lichtmikroskopische Beurteilung

Die Gehirne wurden zunächst makroskopisch auf Risse und mögliche Läsionen beurteilt. Bei dieser Begutachtung zeigten sich in keiner der drei Gruppen makroskopische Auffälligkeiten. Auch bei der Traumagruppe zeigten sich an der Hirnoberfläche keine Risse. Nach Aufarbeitung und Färbung mittels histologischer HE- und KB- Färbungen wurden die Gehirnschnitte der drei Gruppen unter dem Lichtmikroskop begutachtet. Hierbei fielen keine lichtmikroskopisch erkennbaren Läsionen auf. Da weder makroskopisch noch histologisch ein Schaden erkennbar war, wurden immunhistochemische Methoden zur Charakterisierung des Schadens eingesetzt.

4.2 Cleaved-Caspase 3- Färbung

Cleaved-Caspase 3 (CC3) ist ein Marker für Apoptose. Im direkten Vergleich zwischen den drei Gruppen sollte untersucht werden, ob das induzierte Trauma mit Apoptose im Gehirn einhergeht.

Aus jeder der Gruppen (Kontrolle, Sham, Trauma ohne Zellen) wurden jeweils drei Gehirne immunhistochemisch untersucht und ausgewertet. Beim Vergleich des immunhistochemischen CC3- Signals zwischen Gehirnen der Kontrolle, Sham und Trauma wurde ersichtlich, dass im Gehirn des Traumatieres erhöhte CC3-Immunreaktivität und somit auch mehr apoptotische Zellen pro Blickfeld zu finden waren.

Hierzu zeigt Abbildung 4 zur besseren Übersicht und Verdeutlichung die CC3-gefärbten und mikroskopierten Areale. Für jede Gruppe wurden mittels der HE- und KB- Färbung die gleichen Areale bzw. Gehirnabschnitte aufgesucht, diese in den entsprechenden Präparaten der Immunhistochemie wieder aufgefunden und anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop in einer gleich bleibenden Vergrößerung miteinander verglichen. Für den Vergleich wurden in unserer

Versuchsreihe vier Areale analysiert, der Bereich der cranialen bzw. caudalen Hirnoberfläche, die Thalamusregion sowie der Hippokampus (siehe Kapitel 4.4).

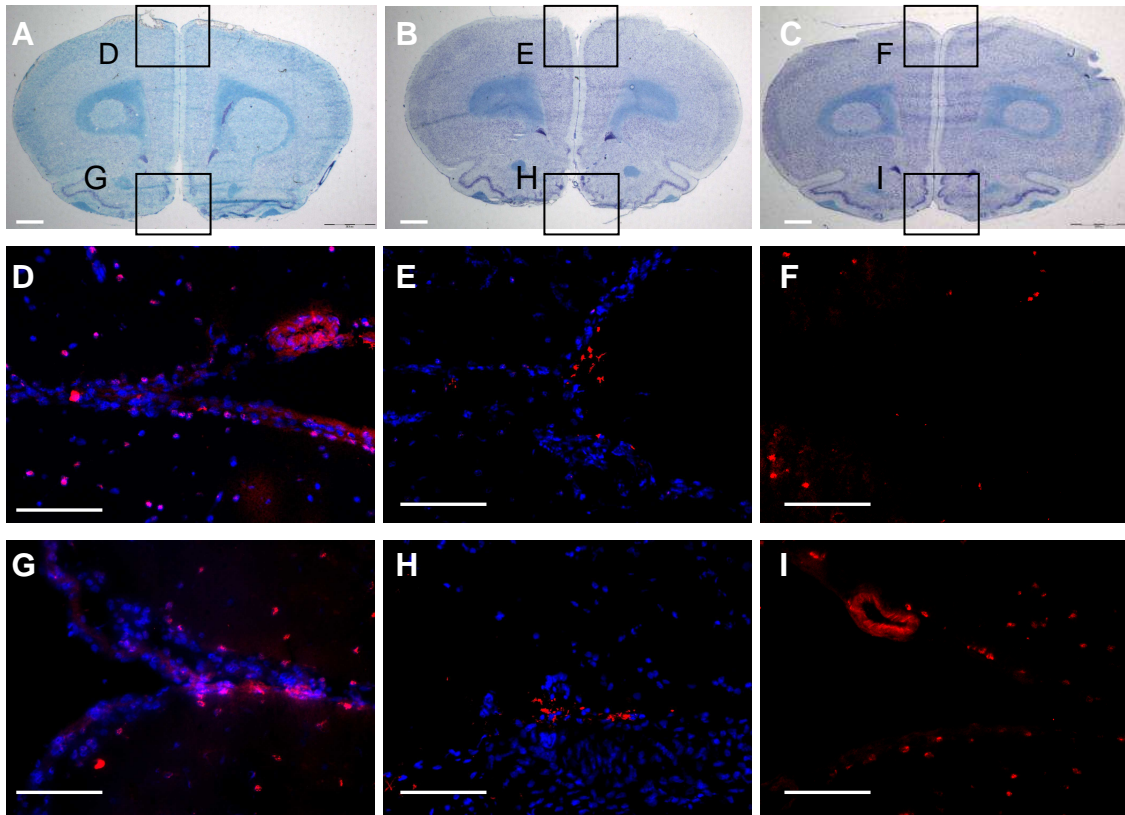


Abbildung 4: KB-Übersichtsfärbung (A)-(C) sowie Darstellung der Immunfluoreszenz CC3- positiver Zellen (rot) (D-I) bei Bregma +2,7mm im Trauma- (A, D, G), Kontroll- (B,E,H) und Shamtier (C, F, I).

Zellkerne sind über Hoechst 33342 blau gefärbt. Die Positionen der Ausschnitte der Immunfluoreszenz- Fotos sind im histologischen Präparat kenntlich gemacht, die Fotos sind jedoch um 90° gedreht. In D-F ist die craniale Hirnoberfläche rechts im Bild, in G-I die caudale Hirnoberfläche links im Bild. Die Skalierungsbalken entsprechen 100µm.

In der obersten Reihe der Abbildung 4 erkennt man die Übersichtsbilder der KB-Färbung, anhand derer die bestimmten Regionen in den immunhistochemischen Färbungen aufgesucht und ausgewertet wurden. In den unteren Reihen sind die entsprechenden Areale in der Immunfluoreszenz inklusive der Hoechst-Kernfärbung (außer beim Shamtier) wiedergegeben.

In Abbildung 5 ist analog zu Abbildung 4 die gleiche Übersicht und Anordnung gewählt, jedoch für die okzipitalen Gehirnabschnitte (Bregma -1,8mm).

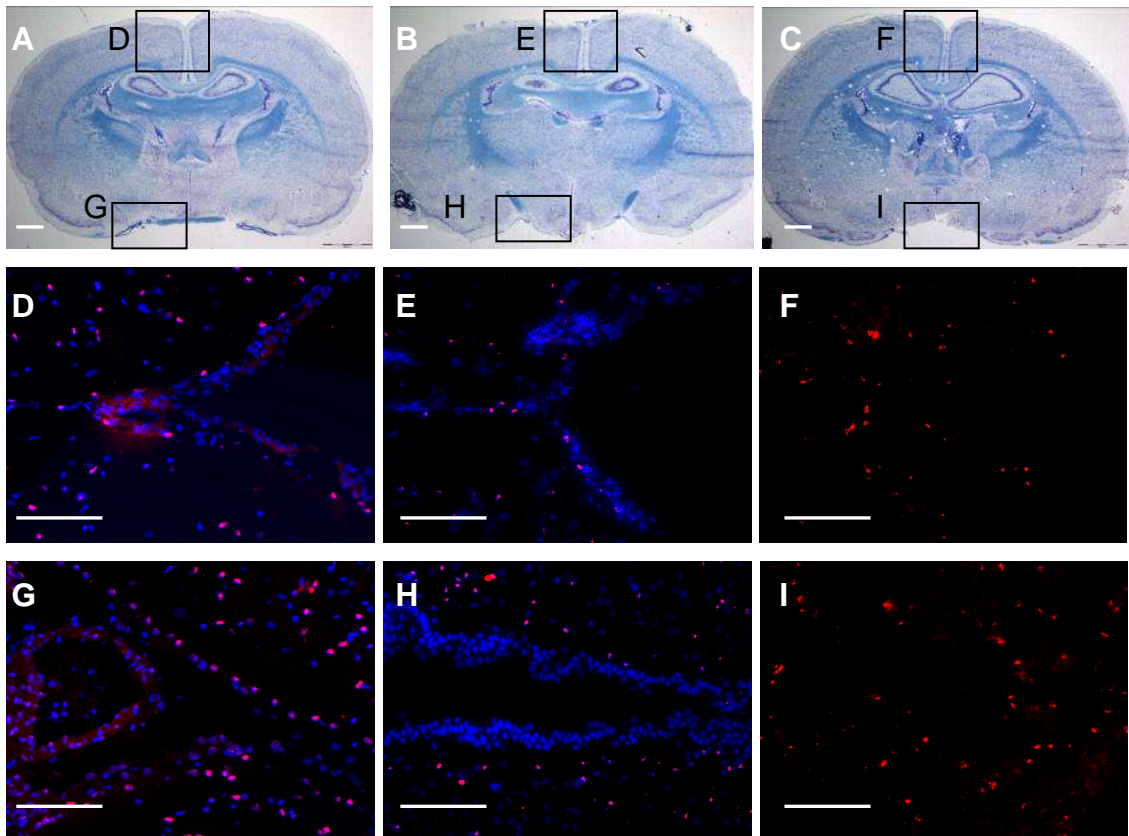


Abbildung 5: KB- Übersichtsfärbung (A)-(C) sowie Darstellung der Immunfluoreszenz CC3- positiver Zellen (rot) (D-I) bei Bregma -1,8mm im Trauma- (A, D, G), Kontroll- (B,E,H) und Shamtier (C, F, I).

Zellkerne sind über Hoechst 33342 blau gefärbt. Die Positionen der Ausschnitte der Immunfluoreszenz- Fotos sind im histologischen Präparat kenntlich gemacht, die Fotos sind jedoch um 90° gedreht. In D-F ist die craniale Hirnoberfläche rechts im Bild, in G-I die caudale Hirnoberfläche links im Bild. Die Skalierungsbalken entsprechen 100µm.

In den Abbildungen 4 und 5 wurde die immunhistochemische Markierung apoptotischer Zellen an der Gehirnoberfläche der craniale und caudalen Regionen zwischen den drei verschiedenen Gruppen gegenübergestellt (Bregma +2,5mm und Bregma -1,8mm). Die Abbildung 6 gibt einen Überblick über die untersuchte Thalamusregion wieder.

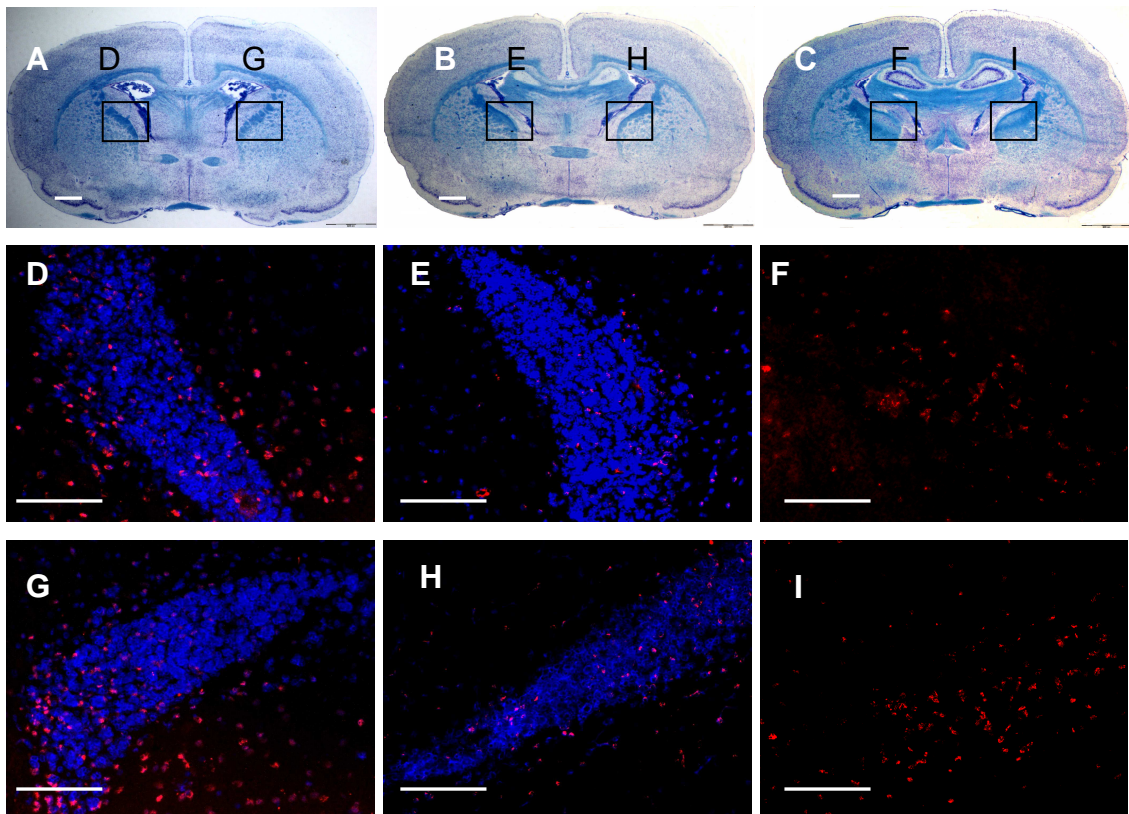


Abbildung 6: KB- Übersichtsfärbung (A)-(C) sowie Darstellung der Immunfluoreszenz CC3- positiver Zellen (rot) (D-I) in der Thalamusregion (Bregma -1,6mm) im Trauma- (A, D, G), Kontroll-(B,E,H) und Shamtier (C, F, I).

Zellkerne sind über Hoechst 33342 blau gefärbt. Die Positionen der Ausschnitte der Immunfluoreszenz- Fotos sind im histologischen Präparat kenntlich gemacht. Die Skalierungsbalken entsprechen 100µm.

Die Anzahl CC3- immunpositiver Zellen wurde in allen Regionen quantifiziert. Durch das Auszählen der Zellen pro Sichtfeld (320µm x 420µm) bei einer Vergrößerung von 1x20 wurde offenbar, dass es zwischen der Sham- und der Kontrollgruppe an der caudalen Gehirnoberfläche keinen signifikanten Unterschied gab; cranial zeigte sich eine geringe Signifikanz (Abb. 7). Somit wurde deutlich, dass allgemeine Versuchsparameter wie die Narkose keinen Einfluss auf die Anzahl apoptotischer Zellen hatten.

Weiterhin fällt in Abbildung 7 auf, dass zwischen den beiden Vergleichsgruppen und der Traumagruppe ohne Zelltransplantation ein hoch signifikanter Unterschied bestand. Das Gehirn nach dem Trauma enthielt in den ausgewerteten Abschnitten mehr CC3- positive, also apoptotische, Zellen pro Sichtfeldfläche als die Kontroll- oder Shamgruppe. Diese Deutlichkeit fand sich lediglich in den vorderen Abschnitten des Rattengehirns, im Bereich Bregma +2,5mm. Weiter okzipital hob sich dieser Unterschied auf, so dass pro Fläche im Traumatier lediglich

geringfügig mehr apoptotische Zellen als in der Kontrolle zu finden waren (Abb. 8). Hierbei zeigte sich eine Signifikanz für die craniale Hirnoberfläche, jedoch nicht mehr caudal. An der gesamten Hirnoberfläche ist keine deutliche Differenz zwischen cranialen und caudalen Abschnitten zu erkennen gewesen. Bezüglich der Verteilung der apoptotischen Zellen ist eine Betonung der frontalen Hirnareale zu erkennen.

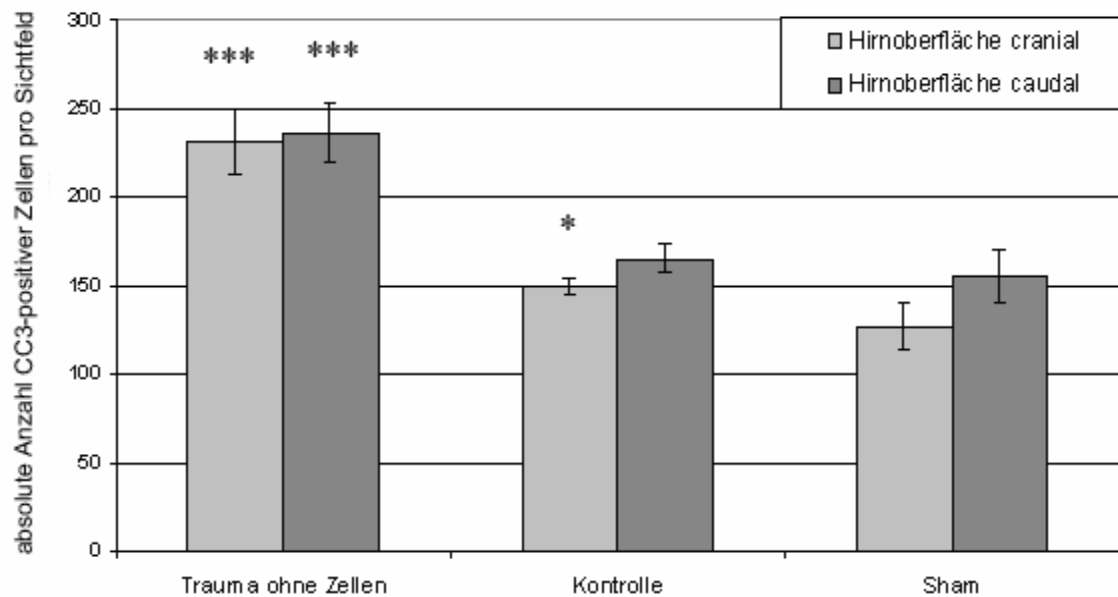


Abbildung 7: Absolute Anzahl CC3- positiver Zellen im vorderen Gehirnabschnitt (Bregma +2,7mm) mit Gegenüberstellung der cranialen und caudalen Hirnoberfläche für die drei Gruppen; *** $p < 0,001$ versus Kontrolle und Sham; * $p < 0,05$ versus Sham

Insgesamt ist in beiden Abbildungen (Abb. 7 und 8) erkennbar, dass bei der Traumagruppe signifikant mehr apoptotische Zellen zu finden waren als in den Vergleichsgruppen, unabhängig von der cranialen oder caudalen Gehirnoberfläche. Ebenso wird deutlich, dass sich die Zahl CC3- positiver Zellen in den okzipitalen Abschnitten wieder reduzierte. Beurteilend kann zur Gehirnoberfläche gesagt werden, dass beim Traumatier im vorderen Gehirnabschnitt signifikant mehr Apoptose nachweisbar war, während zwischen Kontrolle und Sham keine bzw. einmalig eine Signifikanz vorlag.

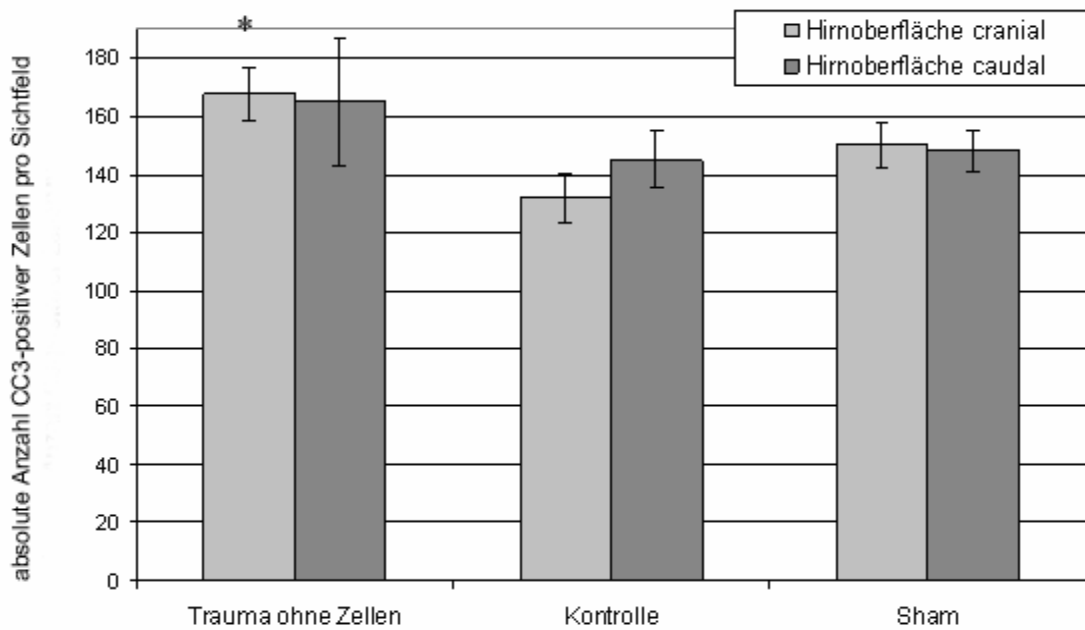


Abbildung 8: Absolute Anzahl CC3- positiver Zellen im hinteren Gehirnabschnitt (Bregma -1,8mm) mit Gegenüberstellung der cranialen und caudalen Hirnoberfläche; * $p < 0,05$ versus Kontrolle und Sham

In der Untersuchung wurde auch die Region des Thalamus analysiert, in der vermehrt apoptotische Zellen gefunden wurden. In beiden Thalamushälften wurde für alle drei Gruppen die Zahl CC3- positiver Zellen bestimmt. Im Folgenden zeigt Abbildung 9 die Zahl CC3- positiver Zellen im Thalamus in Gegenüberstellung der Traumatiere zu den Kontroll- und Shamtieren. Auch hier war ein Unterschied zu erkennen, der im Vergleich zur Auswertung an der Hirnoberfläche noch deutlicher ausfiel. Die Zellzahl des rechten und linken Thalamus wurde bei jedem Tier über vier Schnitte hinweg gemittelt und als solcher Mittelwert in das Diagramm eingetragen. Dies wurde für je drei Tiere pro Gruppe wiederholt. Während die Zellzahl zwischen Sham und Kontrolle kaum schwankte und nur wenig bis keine signifikanten Unterschiede aufwies, war die Apoptoserate beim Traumatier fast doppelt so hoch und zeigte eine hoch signifikante Zunahme der Anzahl CC3- positiver Zellen.

Weiterhin ist zu erkennen, dass die Zahl apoptotischer Zellen im Thalamus bei jeder Gruppe zwischen beiden Hemisphären annähernd gleichmäßig verteilt war. Somit bestand keinerlei Seitendifferenz, was für eine seitengleiche Durchführung des Traumas spricht.

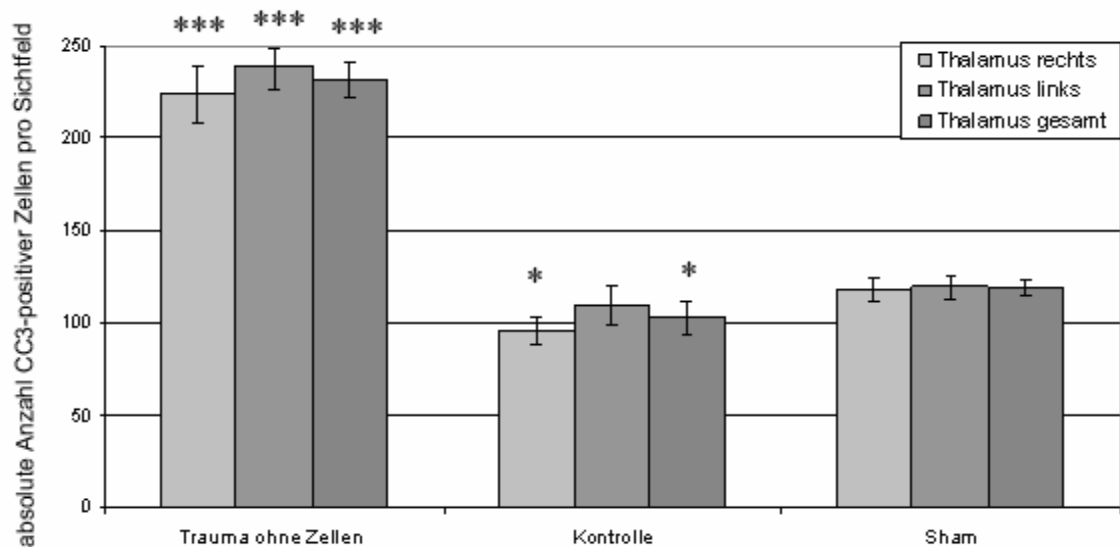


Abbildung 9: Absolute Anzahl an CC3- positiven Zellen im Thalamus (Bregma $-1,6\text{mm}$) mit Gegenüberstellung der rechten und linken Thalamushälfte sowie der Gesamtzahl; *** $p < 0,001$ versus Kontrolle und Sham, * $p < 0,05$ versus Sham

Insgesamt zeigte sich für die CC3- Färbung kein deutlicher Unterschied zwischen der Sham- und Kontrollgruppe. Des Weiteren konnten signifikante Veränderungen nach Traumainduktion nachgewiesen werden. In der Traumagruppe waren in allen Bereichen gegenüber beiden Vergleichsgruppen deutlich vermehrt apoptotische Zellen nachweisbar. Somit ist der Marker Cleaved-Caspase 3 als Nachweis für ein Trauma geeignet. Die Traumagruppe wies eine signifikant erhöhte Zahl an CC3-immunpositiven Zellen auf.

4.3 CD68– Färbung

Die Aktivierung des Mikroglia- / Makrophagensystems wurde über die Zahl CD68-positiver Zellen analysiert. Zunächst wurde die Zellzahl an der Gehirnoberfläche im vorderen (Bregma $+2,7\text{mm}$) und hinteren Bereich (Bregma $-1,8\text{mm}$) unter den drei Gruppen verglichen.

In der folgenden Abbildung 10 werden einige Übersichtsbilder der Areale analog zu der CC3- Abbildung dargestellt, zunächst einmal für die Gehirnoberfläche für Bregma $+2,7\text{mm}$.

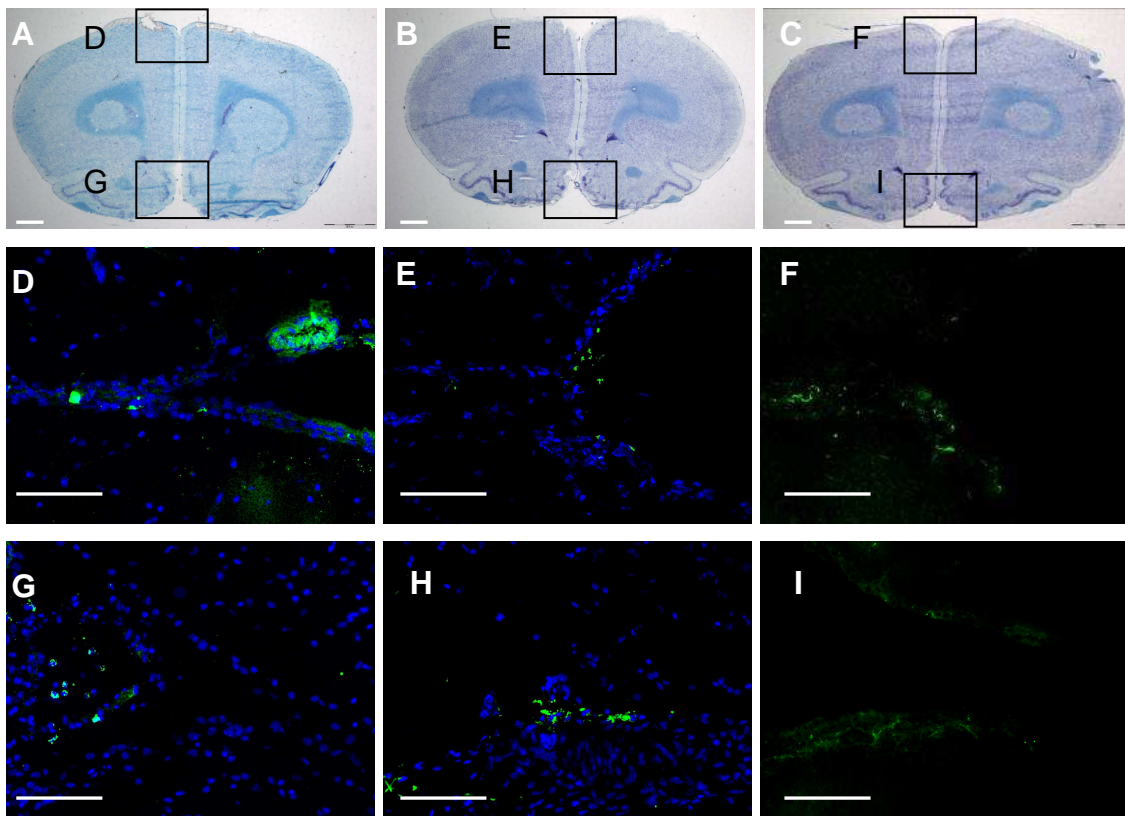


Abbildung 10: KB- Übersichtsfärbung (A)-(C) sowie Darstellung der Immunfluoreszenz CD68- positiver Zellen (grün) (D-I) bei Bregma +2,7mm im Trauma- (A, D, G), Kontroll- (B, E, H), Shamtier (C, F, I)

Zellkerne sind über Hoechst 33342 blau gefärbt. Die Positionen der Ausschnitte der Immunfluoreszenz- Fotos sind im histologischen Präparat kenntlich gemacht, die Fotos sind jedoch um 90° gedreht. In D-F ist die craniale Hirnoberfläche rechts im Bild, in G-I die caudale Hirnoberfläche links im Bild. Die Skalierungsbalken entsprechen 100µm.

In der Abbildung 11 ist erkennbar, dass bei allen Gruppen insgesamt weniger CD68- positive Zellen an der Gehirnoberfläche zu finden sind als es bei der CC3- Färbung der Fall war. Zwischen den beiden Vergleichsgruppen, Kontrolle und Sham, bestand kein signifikanter Unterschied. Weiterhin zeigte sich ein deutlicher Anstieg der absoluten Anzahl an CD68- positiven Zellen bei der Traumagruppe. In dieser Gruppe fand sich eine 6-fach höhere Zahl CD68- positiver, phagozytärer Zellen pro Sichtfeld als bei den beiden Vergleichsgruppen. Die Werte waren an der cranialen wie auch caudalen Gehirnoberfläche für alle Gruppen annähernd gleich.

Abbildung 12 gibt einige Übersichtsbilder für die hinteren Gehirnabschnitte wieder. Hier wurden Beispielbilder für die Hirnoberfläche bei Bregma -1,8mm eingesetzt.

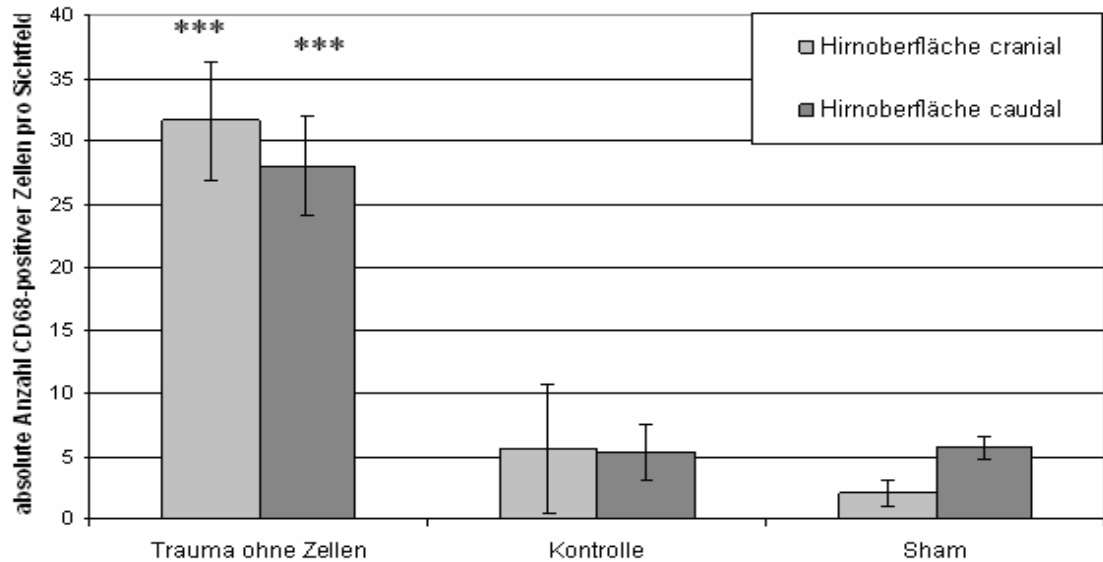


Abbildung 11: Anzahl CD68- positiver Zellen an der Gehirnoberfläche im Bereich Bregma +2,7mm mit Aufteilung der drei Gruppen; ***p<0,001 versus Kontrolle und Sham

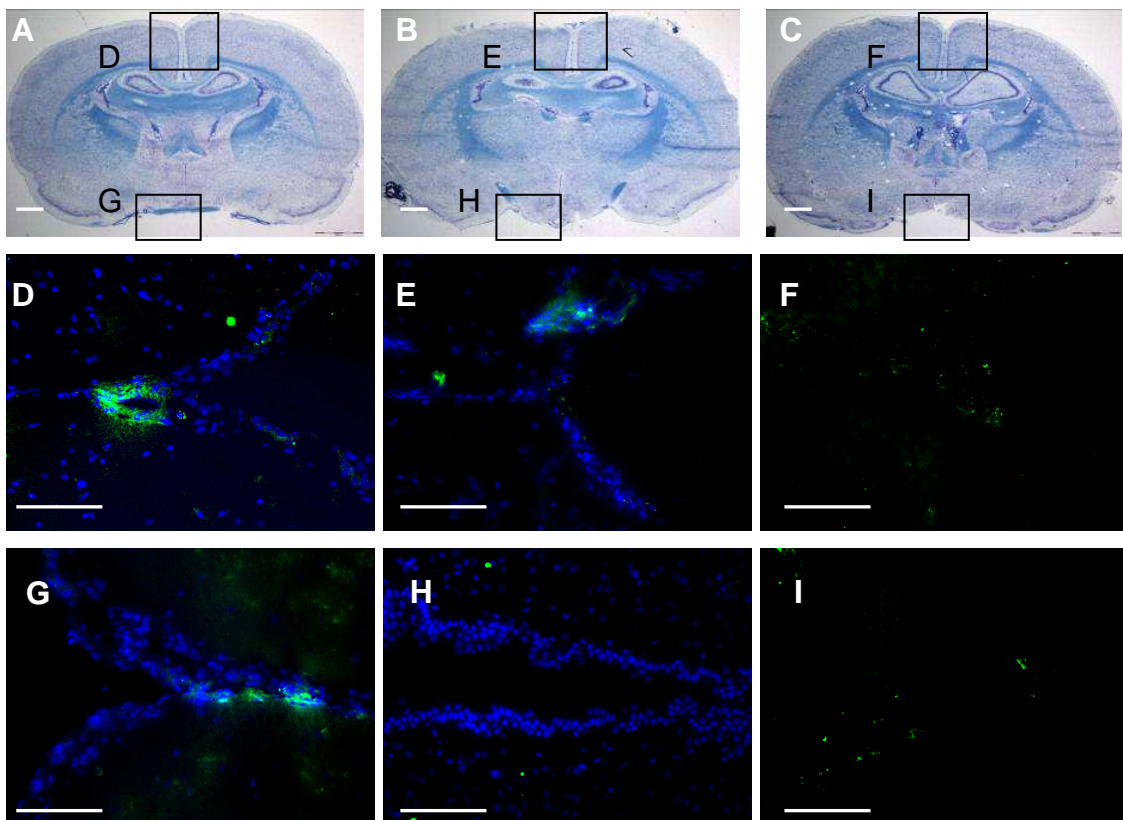


Abbildung 12: KB- Übersichtsfärbung (A)-(C) sowie Darstellung der Immunfluoreszenz CD68- positiver Zellen (grün) (D-I) bei Bregma -1,8mm im Trauma- (A, D, G), Kontroll- (B, E, H), Shamtier (C, F, I)

Zellkerne sind über Hoechst 33342 blau gefärbt. Die Positionen der Ausschnitte der Immunfluoreszenz- Fotos sind im histologischen Präparat kenntlich gemacht, die Fotos sind jedoch um 90° gedreht. In D-F ist die craniale Hirnoberfläche rechts im Bild, in G-I die caudale Hirnoberfläche links im Bild. Die Skalierungsbalken entsprechen 100µm.

Analog zur CC3- Färbung fiel im hinteren Gehirnabschnitt (Bregma -1,8mm) auf, dass in allen Gruppen die gesamte Zahl CD68- positiver Zellen pro Sichtfeld an der Gehirnoberfläche geringer ausfiel als im vorderen Bregmabereich. Abbildung 13 gibt diese absolute Zellzahl für die hinteren Gehirnabschnitte wieder. Auch hier zeigten sich vor allem an der cranialen Hirnoberfläche hoch signifikante Unterschiede mit teilweise 5-fach vermehrter Zellzahl zwischen der Traumagruppe und den beiden Vergleichsgruppen, zwischen denen keinerlei signifikanter Unterschied vorlag. Diese Unterschiede fielen jedoch insgesamt nicht so deutlich aus wie im vorderen Bregmabereich.

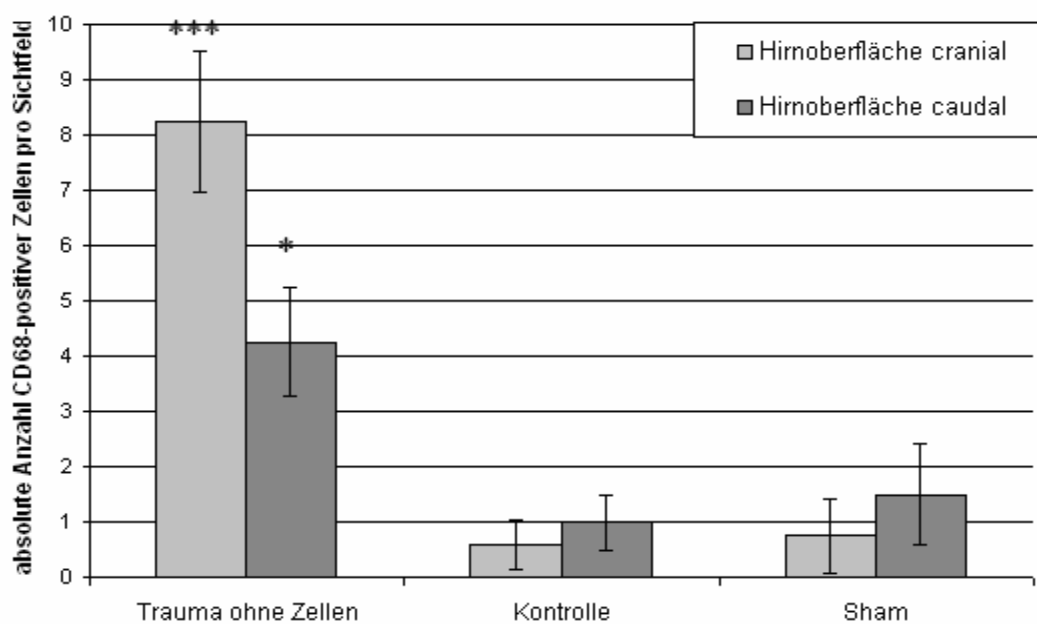


Abbildung 13: Anzahl CD68- positiver Zellen an der Gehirnoberfläche im Bereich Bregma -1,8mm mit Aufteilung der drei verschiedenen Gruppen; *** $p < 0,001$ versus Kontrolle und Sham, * $p < 0,05$ versus Kontrolle und Sham

In der Abbildung 14 sind für die Thalamusregion neben der KB- Übersichtsfärbung einige Beispielbilder in der CD68- Färbung für die jeweiligen Gruppen dargestellt.

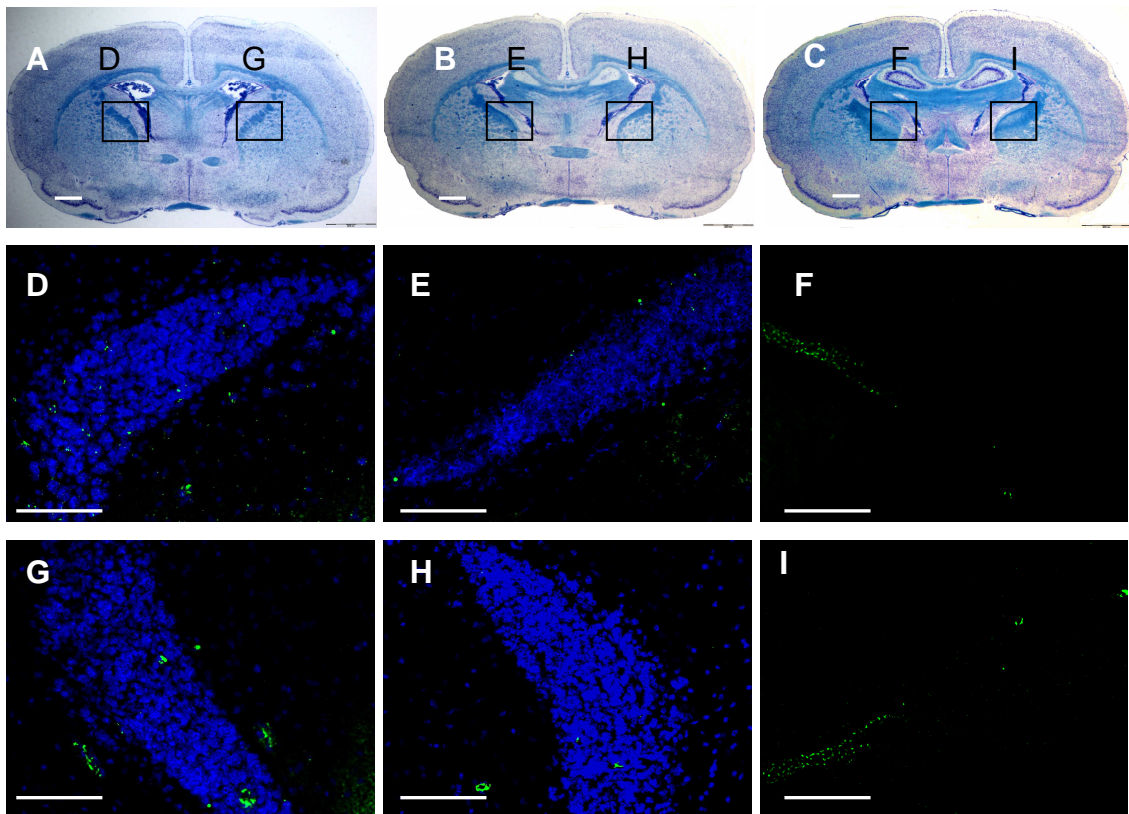


Abbildung 14: KB- Übersichtsfärbung (A)-(C) sowie Darstellung der Immunfluoreszenz CD68- positiver Zellen (grün) (D - I) in der Thalamusregion (Bregma -1,6mm) im Trauma- (A, D, G), Kontroll-(B, E, H) und Shamtier (C, F, I).

Zellkerne sind über Hoechst 33342 blau gefärbt. Die Positionen der Ausschnitte der Immunfluoreszenz- Fotos sind im histologischen Präparat kenntlich gemacht. Die Skalierungsbalken entsprechen 100µm.

Bei der Auszählung der Zellen im Thalamus fiel auf, dass beim Trauma mehr CD68- positive Zellen zu finden waren als bei der Kontrolle (Abbildung 15). Dies wurde durch die hohe Signifikanz zwischen beiden Gruppen belegt. Beim direkten Vergleich zwischen Trauma- und Shamtieren zeigte sich jedoch kein (signifikanter) Unterschied. Somit konnte unter Berücksichtigung der Shamgruppe in der Thalamusregion nicht von einem vermehrten Nachweis phagozytärer Zellen gesprochen werden. Die Auswertung der CD68- Protein- Expression im Thalamus zeigte somit zum ersten Mal einen deutlichen Unterschied zwischen beiden Vergleichsgruppen (Kontrolle und Sham).

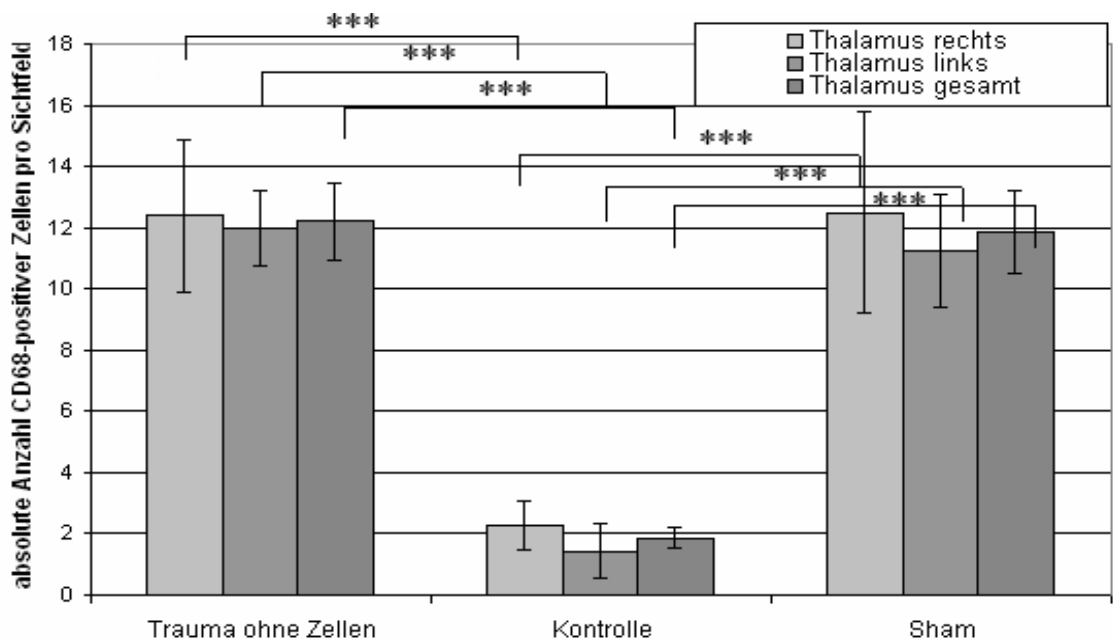


Abbildung 15: Anzahl CD68- positiver Zellen im Thalamus im direkten Vergleich zwischen den drei verschiedenen Gruppen; ***p<0,05

Insgesamt lässt sich für die CD68- Auswertung sagen, dass bis auf die Thalamusregion kein Unterschied zwischen Sham und Kontrolle nachweislich war. Durch Traumainduktion zeigte sich in der Gegenüberstellung zu beiden Vergleichsgruppen ein deutlicher Anstieg der Zahl aktivierter Mikrogliazellen. Somit war auch dieser Marker für den Nachweis des Traumas mit vermehrter Inflammation geeignet.

4.4 Hippokampus mit Gyrus dentatus in der CC3- / CD68- Färbung

Analog zu den oben genannten Arealen der cranialen und caudalen Gehirnoberfläche sowie der rechten und linken Thalamushälfte, wurde der Hippokampus separat untersucht und die Zahl CC3- und CD68- positiver Zellen bestimmt. Anhand von Abbildung 16 ist zu sehen, dass es zwischen den beiden Vergleichsgruppen keine Signifikanzen bzgl. der Anzahl CC3- immunpositiver Zellen gab. In der Traumagruppe hingegen waren im vorderen Hippokampusbereich (Bregma -1,8mm) signifikant mehr apoptotische Zellen pro Sichtfeld zu finden als in den Vergleichsgruppen. Wie bereits bei der Auswertung der CC3- Anzahl an der Hirnoberfläche festgestellt wurde, war der Anstieg der Zellzahl in den vorderen Hirnbereichen ausgeprägter.

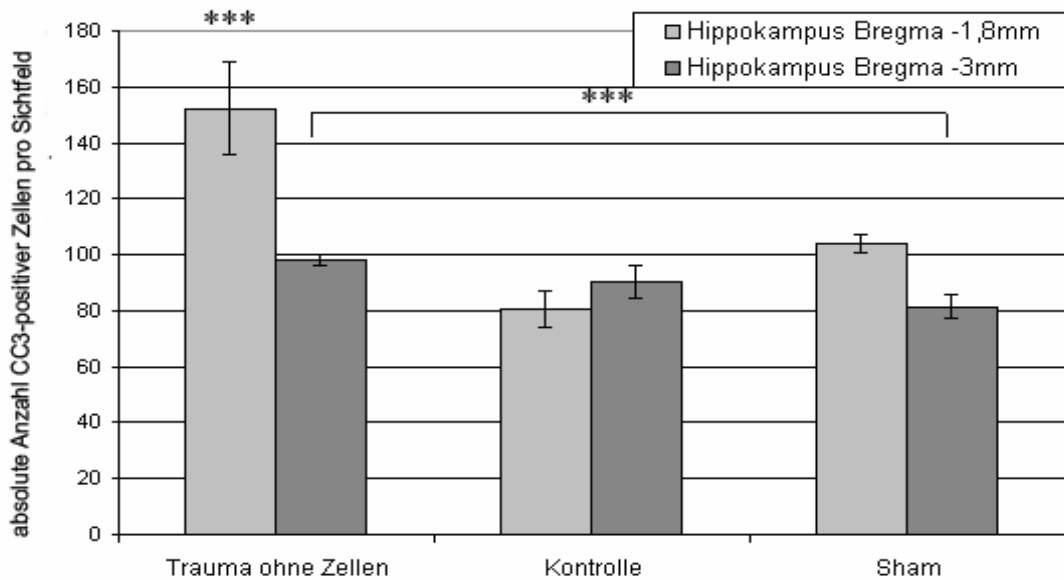


Abbildung 16: Anzahl CC3- positiver Zellen im Hippokampus, aufgeteilt in den vorderen und hinteren Hippokampusbereich im direkten Vergleich der drei Gruppen; *** $p < 0,001$ versus Kontrolle und Sham bzw. nur Sham (Linie)

Analysierte man die Seitenunterschiede zwischen den Hemisphären, so trat zwischen der rechten und linken Hemisphäre bei keiner der drei Gruppen ein signifikanter Unterschied in der Apoptoserate auf (Abb. 17). Dies spricht für die Gleichmäßigkeit des erzeugten Traumas. Auch hier fiel die signifikante Erhöhung der Anzahl CC3- positiver Zellen in der Traumagruppe auf, während in den beiden Vergleichsgruppen keine Differenz und Signifikanz belegbar war.

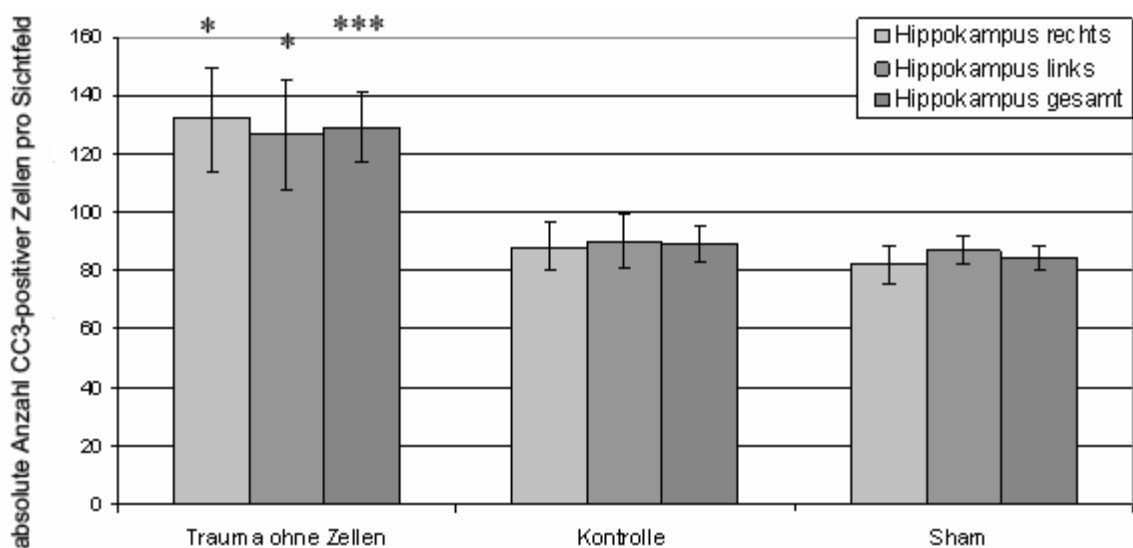


Abbildung 17: Anzahl apoptotischer Zellen im Vergleich der rechten und linken Hippokampusseite zwischen der Traumagruppe sowie Kontroll- und Shamgruppe; * $p < 0,05$ versus Kontrolle und / oder Sham; *** $p < 0,001$ versus Sham

Die Analyse des Hippokampus wurde auch für die CD68- Immunreaktivität durchgeführt und die Anzahl CD68- positiver Zellen pro Sichtfeld ausgewertet. Auch bei dieser Auszählung fällt in Abbildung 18 auf, dass zwischen den beiden Vergleichsgruppen ähnlich wie bei der Auswertung CD68- positiver Zellen im Thalamus ein deutlicher Unterschied zwischen Kontrolle und Sham vorlag, der ebenfalls signifikant war. In der Gegenüberstellung der Traumagruppe zu beiden Vergleichsgruppen war eine signifikante Erhöhung der Anzahl CD68- positiver Zellen nach Trauma belegbar. Insgesamt war jedoch die Zahl CD68- positiver Zellen in allen drei Gruppen sehr gering.

Abbildung 19 zeigt exemplarisch die immunhistochemischen Bilder mit Übersichten der Trauma-, Kontroll- und Shamgruppen sowohl für die CC3- als auch CD68- Färbung.

Zusammenfassend lässt sich zu diesen beiden Proteinen sagen, dass die CC3- und CD68- Immunhistochemie eine gute Nachweismöglichkeit für ein Trauma bieten und diese Proteine als Traumamarker im Modell angesehen werden können. Mittels Detektion dieser Proteine konnte ein relevantes Trauma in unserem Versuch nachgewiesen werden.

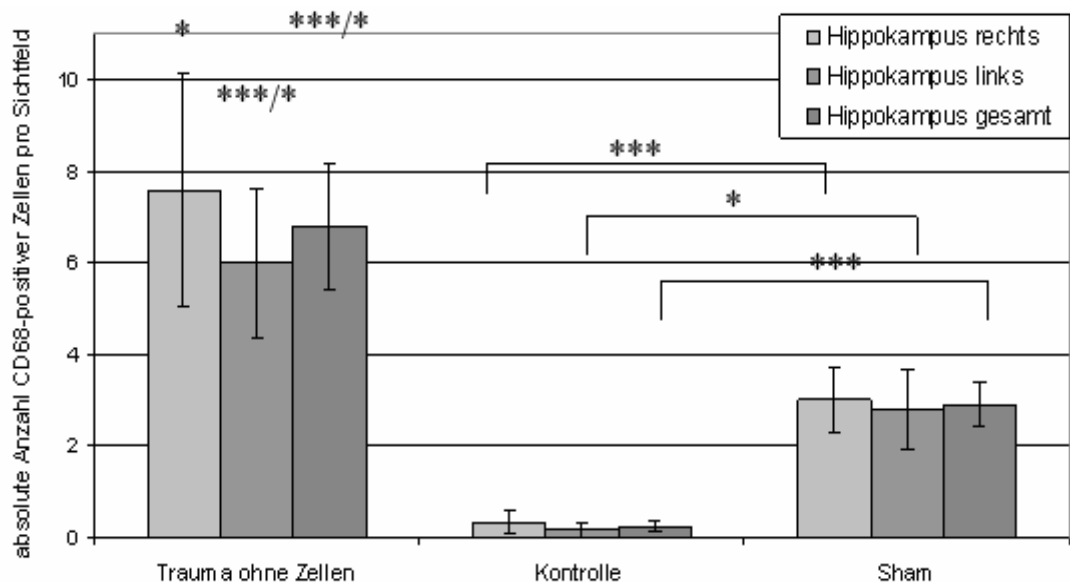


Abbildung 18: Anzahl CD68- positiver Zellen in den verschiedenen drei Gruppen – im Hippokampus der rechten und linken Hemisphäre sowie als Gesamtwert; *p<0,05 versus Kontrolle bzw. Sham; ***p<0,001 versus Kontrolle bzw. Sham

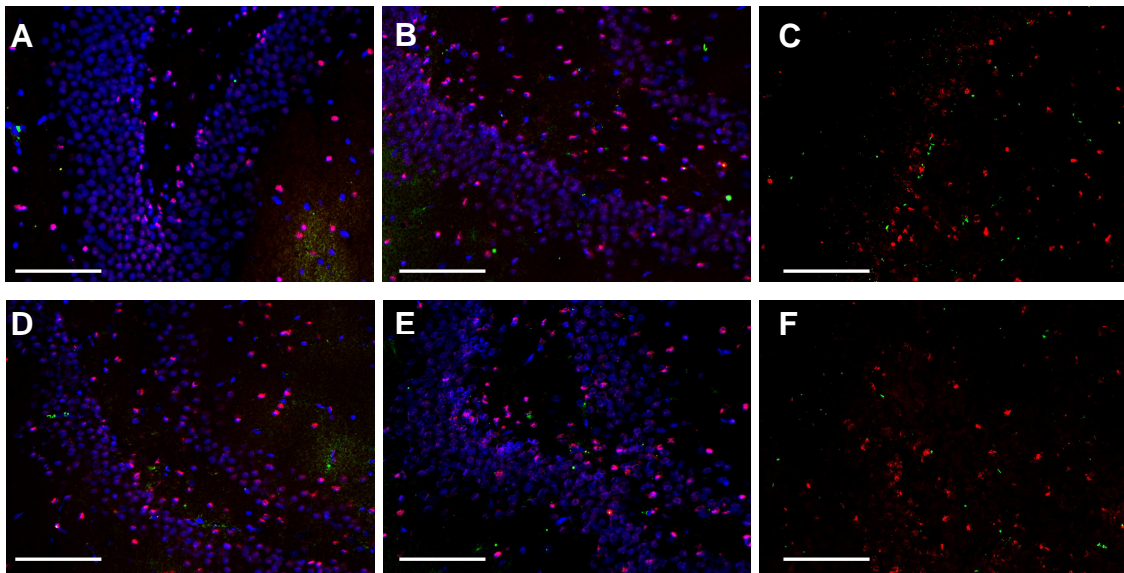


Abbildung 19: Darstellung der Immunfluoreszenz CC3- (rot) / CD68- positiver (grün) Zellen (A-F) in der Hippokampusregion im Trauma- (A, D), Kontroll- (B, E) und Shamtier (C, F). A, B, C linke Hemisphäre; D, E, F rechte Hemisphäre
Zellkerne (A, B, D, E) sind über Hoechst 33342 blau gefärbt. Die Skalierungsbalken in A-F entsprechen 100µm.

4.5 GFAP- und Cx43- Färbung

Das GFAP bildet den Hauptanteil an Intermediärfilamenten in Astrozyten und ermöglichte somit als zellspezifischer Marker die Differenzierung bzw. Erkennung von Astrozyten gegenüber anderen Zellen. Vor allem nach einer Schädigung des Gehirns wie beispielsweise einem Trauma, Hypoxie etc. wird GFAP vermehrt von Astrozyten gebildet. Deshalb wurde dieser Antikörper zum Nachweis der glialen Aktivierung durch das in diesem Versuch ausgelöste milde diffuse Trauma benutzt. Cx43 ist ein Gap Junction- Protein der Astrozyten. Da nach einer Schädigung die „Kommunikation“ unter den Zellen ansteigt, ist ein Expressionsanstieg von Cx43 ebenfalls als Marker für ein Trauma denkbar.

Folgende Regionen wurden zur GFAP und Cx43- Beurteilung zwischen Trauma-, Kontroll- und Shamtieren untersucht: die Gehirnoberfläche cranial und caudal (Bregma -2,6mm und Bregma -1,9mm), die Thalamus- (Bregma -1,7mm) sowie die Hippokampusregion. Hierbei erfolgte keine Unterscheidung zwischen der vorderen oder hinteren Gehirnhälfte.

Die Auswertung erfolgte nach Bildaufnahme in 20-facher Vergrößerung unter dem Zeiss Mikroskop. Mittels des AxioVision LE- Programms von Zeiss wurde die

Hintergrundfluoreszenz in den Bildern minimiert. Nach Überführen der Bilder in ImageJ, einem Auswertungsprogramm, wurden die Flächen des Signals des detektierten GFAP und Cx43 prozentual zu der Gesamtfläche des Bildes gemessen und ausgewertet. Somit erhielt man eine objektivierte prozentuale Angabe zur Fläche der GFAP- und Cx43- Fluoreszenz im Verhältnis zur Gesamtbildfläche. Diese Bearbeitung wurde für jeweils drei Tiere pro Gruppe in den verschiedenen Regionen durchgeführt. Die Auswertung für GFAP und Cx43 erfolgte separat, zunächst einmal für GFAP. Hierzu zeigt Abbildung 20 eine Übersichtsdarstellung der GFAP- und Cx43- Färbung an der Gehirnoberfläche für die drei Gruppen.

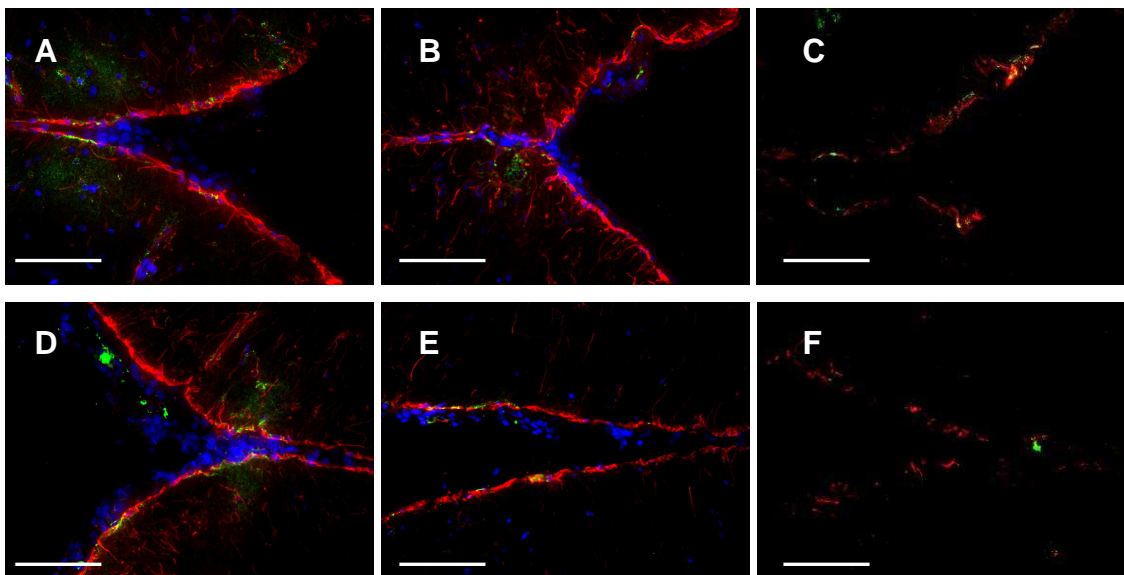


Abbildung 20: Darstellung der Cx43- (grün) / GFAP- (rot) Immunfluoreszenz (A-F) an der cranialen (A-C) und caudalen (D-F) Gehirnoberfläche im Trauma- (A, D), Kontroll- (B, E), Shamtier (C, F)

Die Positionen der Ausschnitte der Immunfluoreszenz-Fotos sind um 90° gedreht. In A-C ist die craniale Hirnoberfläche rechts im Bild, in D-F die caudale Hirnoberfläche links im Bild. Zellkerne in A, B, D, E sind über Hoechst 33342 blau gefärbt. Die Skalierungsbalken in A-F entsprechen 100µm.

Die Auswertung der GFAP- Immunreaktivität (Abb. 21) zeigt einen deutlichen Unterschied zwischen der Trauma- und den Vergleichsgruppen. Bei der Trauma-Gruppe wurde prozentual mehr als doppelt soviel Fläche für das GFAP- Signal detektiert wie in den beiden Vergleichsgruppen. Dieser Unterschied war für die gesamte Hirnoberfläche hoch signifikant. Zwischen der Kontroll- und der Sham-Gruppe waren minimale Unterschiede zu verzeichnen.

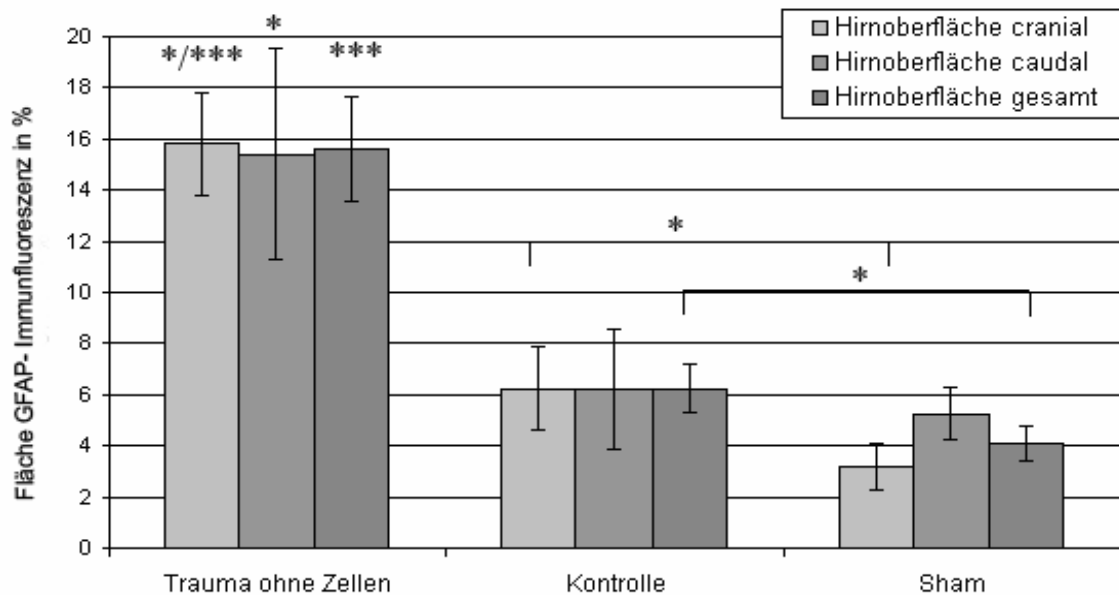


Abbildung 21: Prozentualer Anteil der Fläche der GFAP- Immunfluoreszenz pro Bildfläche, bestimmt für die craniale und caudale Hirnoberfläche; * $p < 0,05$ versus Kontrolle und Sham bzw. versus Sham; *** $p < 0,001$ versus Kontrolle und / oder Sham

In den weiteren Auswertungen (Abb. 22 und 23) ist ebenfalls zu erkennen, dass auch in der Thalamus- und Hippokampusregion bei den Traumatieren das GFAP-Signal deutlich mehr Fläche einnahm als bei den Vergleichsgruppen. In der Thalamusregion bestand allerdings auch für diesen Parameter ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Vergleichsgruppen. Die Shamgruppe zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe eine verminderte GFAP- Produktion. In der Hippokampusregion waren die GFAP- Werte für beide Vergleichsgruppen wieder annähernd gleich. Im Seitenvergleich ergab sich kein Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen. Da das Trauma in allen Arealen mit einem signifikanten Anstieg der GFAP- Immunreaktivität einherging, lässt sich auch GFAP als potentieller Marker für das hier durchgeführte Trauma diskutieren (Abb. 22 und 23).

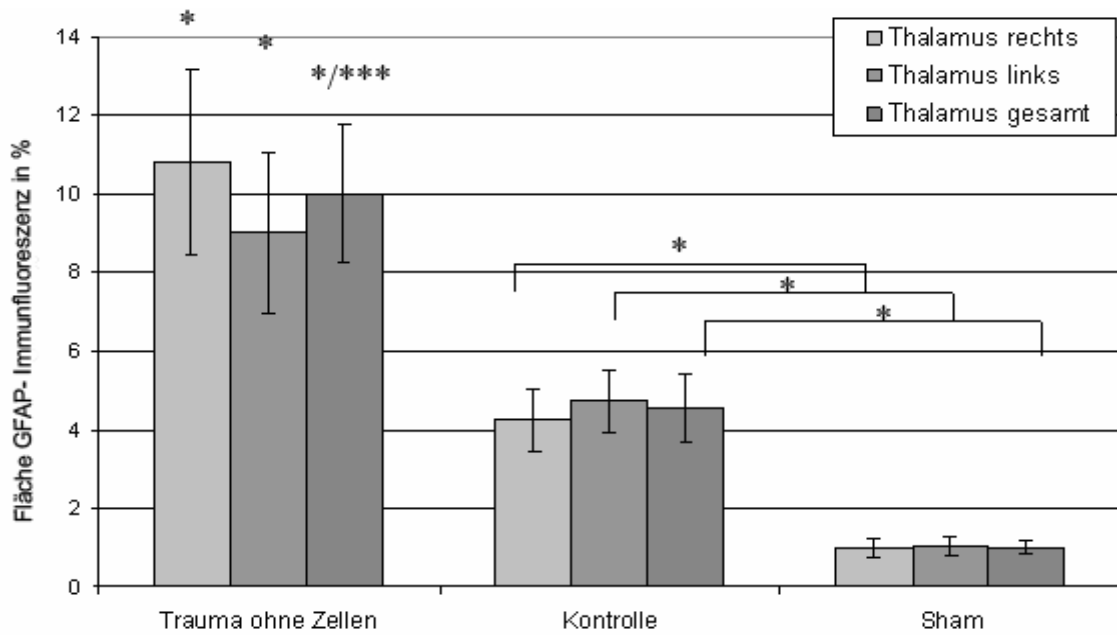


Abbildung 22: Prozentualer Anteil der Fläche der GFAP- Immunfluoreszenz pro Bildfläche, bestimmt für den Thalamus; * $p < 0,05$ versus Kontrolle und Sham bzw. versus Sham; **** $p < 0,001$ versus Sham

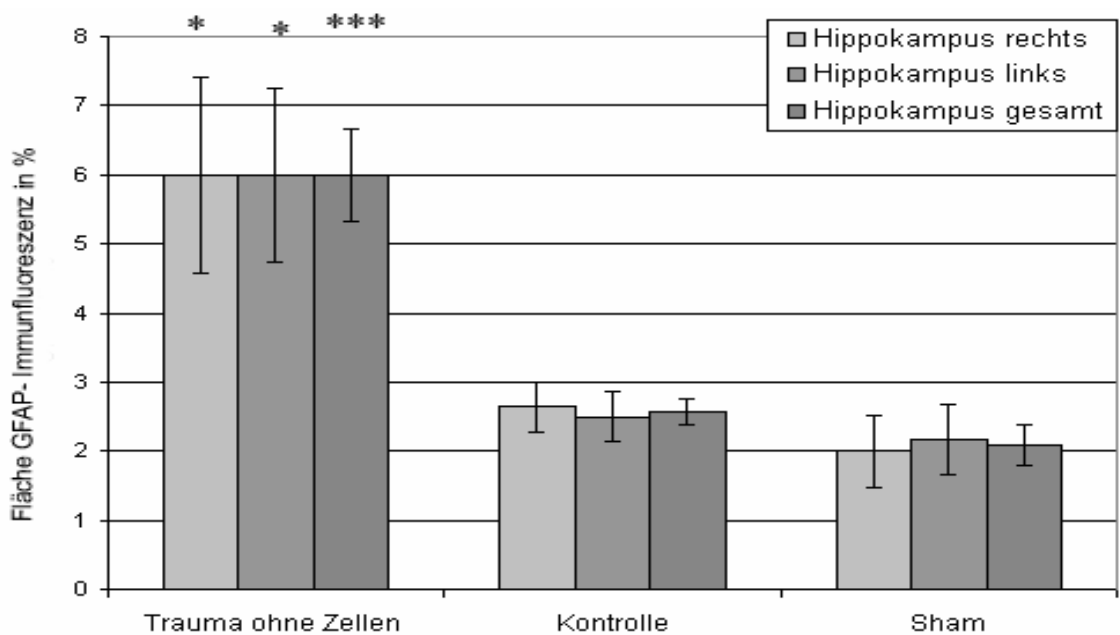


Abbildung 23: Prozentualer Anteil der Fläche der GFAP- Immunfluoreszenz pro Bildfläche, bestimmt für den Hippokampusbereich; * $p < 0,05$ versus Kontrolle und Sham; **** $p < 0,001$ versus Kontrolle und Sham

In analoger Weise erfolgte die Auswertung für Cx43. Zwischen den Vergleichsgruppen Sham und Kontrolle waren keine signifikanten Unterschiede nachweisbar. Nach Traumainduktion war eine vermehrte Cx43- Immunreaktivität an der

Hirnoberfläche nachweisbar. Hierbei zeigten sich teilweise hoch signifikante Unterschiede, die sowohl die craniale als auch die caudale Hirnoberfläche betrafen.

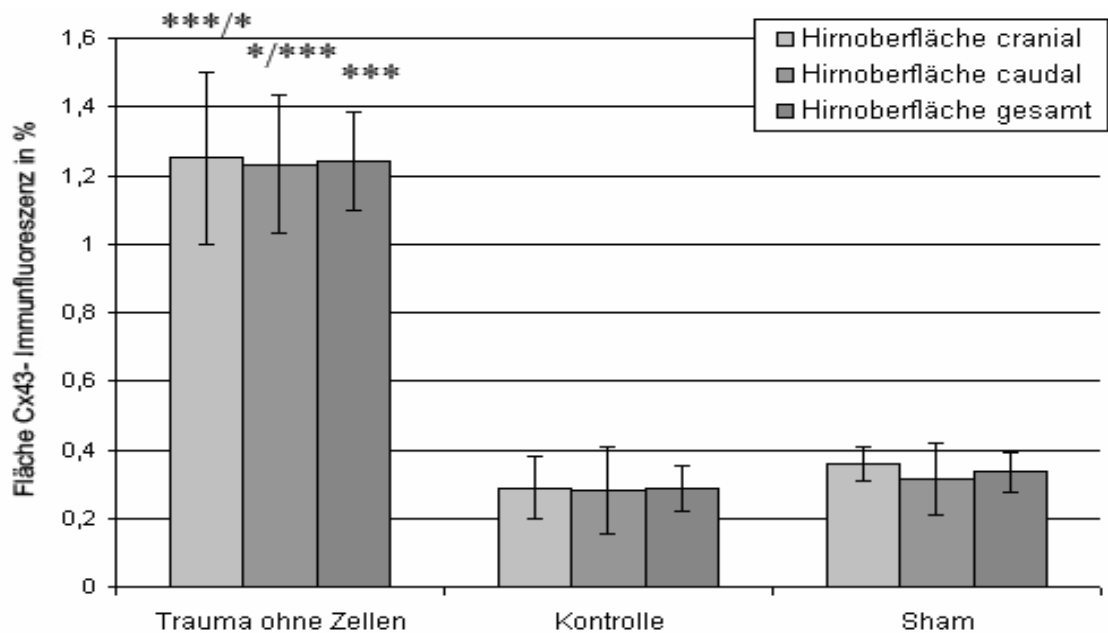


Abbildung 24: Prozentualer Anteil der Cx43- Immunfluoreszenz pro Bildfläche, bestimmt für die Gehirnoberfläche * $p < 0,05$ versus Kontrolle bzw. Sham; *** $p < 0,001$ versus Kontrolle und / oder Sham

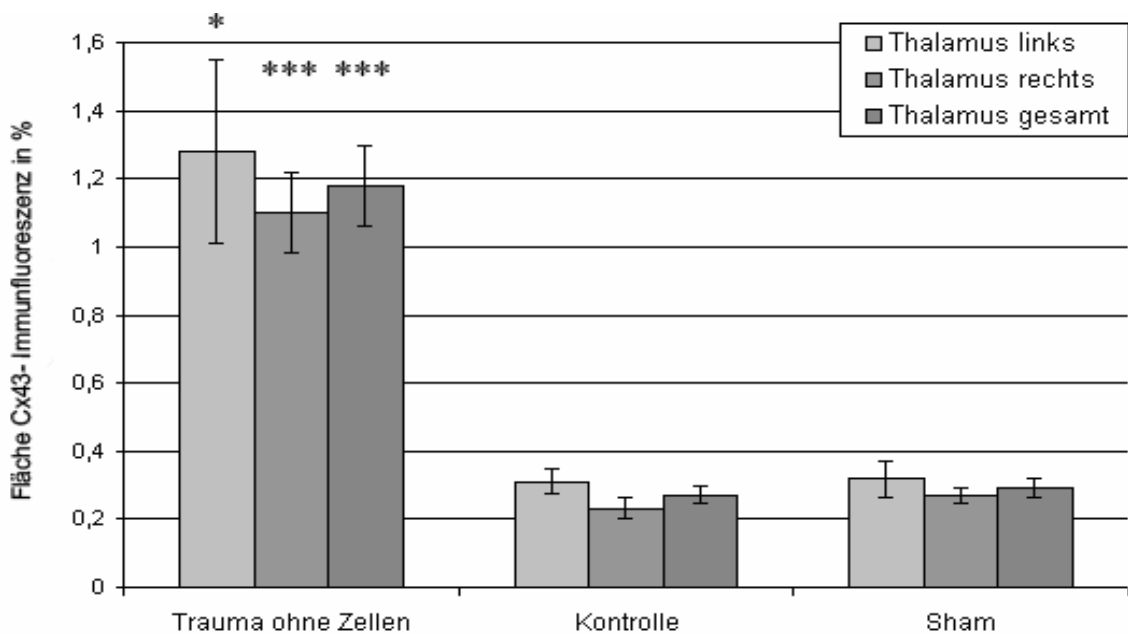


Abbildung 25: Prozentualer Anteil der Fläche der Cx43- Immunfluoreszenz pro Bildfläche, bestimmt für den Thalamus; * $p < 0,05$ versus Kontrolle und Sham; *** $p < 0,001$ versus Kontrolle und Sham

Im Bereich des Thalamus wiesen Kontrolle und Sham ähnliche Werte ohne Signifikanzunterschiede auf (Abb. 25). Nach Traumainduktion kam es jedoch zu einem hoch signifikanten Anstieg der Cx43- Immunreaktivität.

Auch in der Hippokampusregion zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle und Sham (Abb. 26). Nach Trauma stieg auch hier die Cx43- Immunreaktivität signifikant an.

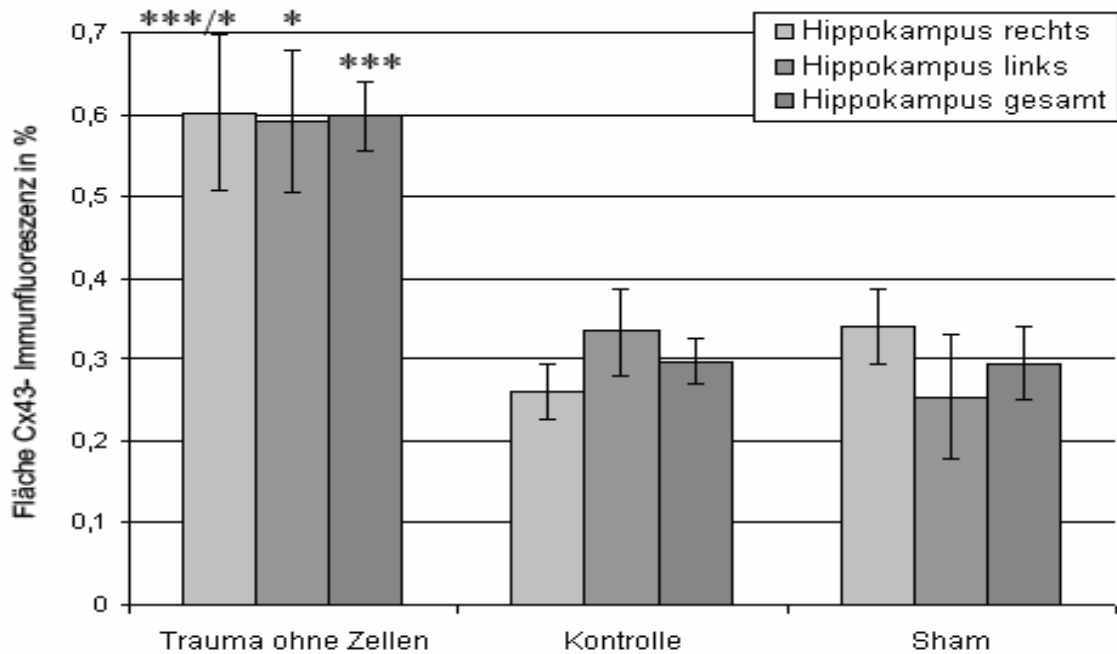


Abbildung 26: Prozentualer Anteil der Fläche der Cx43- Immunfluoreszenz pro Bildfläche, bestimmt für den Hippokampusbereich; * $p < 0,05$ versus Kontrolle und / oder Sham; *** $p < 0,001$ versus Kontrolle und Sham

Die Abbildungen 27 und 28 zeigen einige Beispielbilder für die Hippokampus- bzw. Thalamusregion in der GFAP- Cx43- Färbung. Diese beiden Färbungen wurden in einem Bild zusammengefasst.

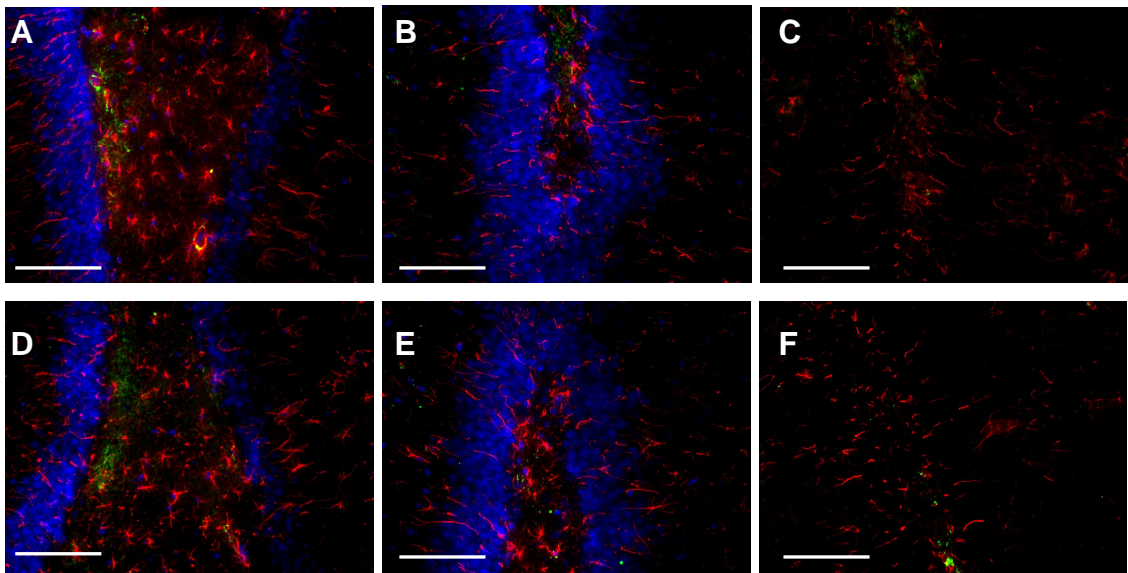


Abbildung 27: Darstellung der Cx43- (grün) / GFAP- (rot) Immunfluoreszenz (A-F) in der Hippokampusregion (Bregma -2mm) im Trauma- (A, D), Kontroll- (B, E) und Shamtier (C, F). A, B, C linke Hemisphäre; D, E, F rechte Hemisphäre
Zellkerne (A, B, D, E) sind über Hoechst 33342 blau gefärbt. Die Skalierungsbalken in A-F entsprechen 100µm.

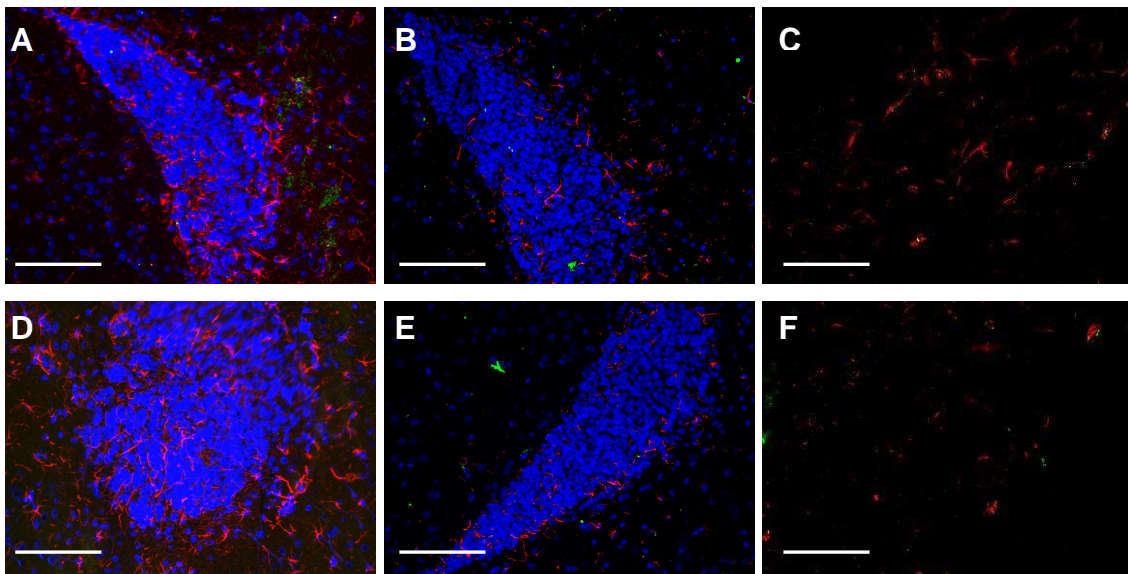


Abbildung 28: Darstellung der Cx43- (grün) / GFAP- (rot) Immunfluoreszenz (A-F) in der Thalamusregion (Bregma -1,6mm) im Trauma- (A, D), Kontroll- (B, E) und Shamtier (C, F). A, B, C linker Thalamus; D, E, F rechter Thalamus
Zellkerne (A, B, D, E) sind über Hoechst 33342 blau gefärbt. Die Skalierungsbalken in A-F entsprechen 100µm.

Zusammenfassend ist in Bezug auf die GFAP- und Cx43- Immunfluoreszenz-Auswertung erkennbar, dass zwischen Kontrolle und Sham in allen drei Regionen kein Unterschied zu erkennen war. Das herbeigeführte Trauma zeigte einen

deutlichen Effekt. Dieser war in beiden Färbungen und in allen untersuchten Bereichen nachweisbar. Im Vergleich zur Kontrollgruppe stieg nach Trauma signifikant sowohl die GFAP- als auch die Cx43- Immunreaktion an. Die fehlende Seitendifferenz in allen Gruppen und Färbungen spricht für die Gleichmäßigkeit des Traumas.

4.6 APP- Färbung

Beim APP handelt es sich um ein Protein, das in den Axonen der Nervenzellen anterograd transportiert wird. Nach einer Schädigung, z.B. einem Trauma, kumuliert das APP in den Axonen und führt zu einer Schwellung, die sich mittels APP- spezifischer Antikörper nachweisen lässt.

Wie in den immunhistochemischen Bildern (Abb. 29) zu erkennen ist, ließ sich das APP nach Traumainduktion nachweisen. Die APP- Kumulation, besonders in höherer Vergrößerung (Abb. 29 B) erkennbar, war ausschließlich in Traumatieren sichtbar. In Kontrolltieren, hier nicht gezeigt, fehlt die Kumulation des APP.

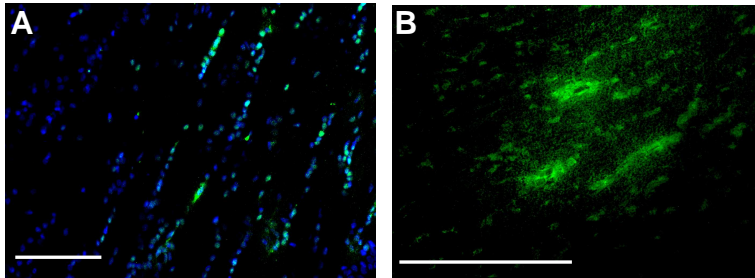


Abbildung 29: Darstellung der APP- Immunfluoreszenz (grün) (A, B) im Traumatier Zellkerne (A) sind über Hoechst 33342 blau gefärbt. Die Skalierungsbalken in A und B entsprechen 100µm.

4.7 Evans Blue- Färbung

Um die (Protein-)Durchlässigkeit der BHS für große Moleküle nach Trauma zu bestimmen, wurde den Tieren der Farbstoff EB injiziert. Bei Tieren der Traumagruppe wurde die Injektion 24 bzw. 48 Stunden nach Trauma intraperitoneal durchgeführt. Das Kontrolltier erhielt ebenfalls im gleichen Alter eine intraperitoneale EB- Injektion. Nach weiterer Aufarbeitung der Gehirne

erfolgte die Messung des fluoreszierenden EB- Farbstoffs unter dem Zeiss Mikroskop in verschiedenen Regionen des Gehirns.

Da EB eine geeignete und sichere Möglichkeit bietet, quantitativ die Schädigung der BHS mit hoher Sensitivität nachzuweisen (Saria und Lundberg, 1983) wurde diese Eigenschaft benutzt und in verschiedenen Gehirnregionen der Eintritt von EB über das Endothel ins Gewebe als Zeichen der Proteinleckage gemessen.

Anhand der Beispielbilder (Abb. 30) wird bereits ein optischer Unterschied zwischen beiden Traumatieren und der Kontrolle erkennbar.

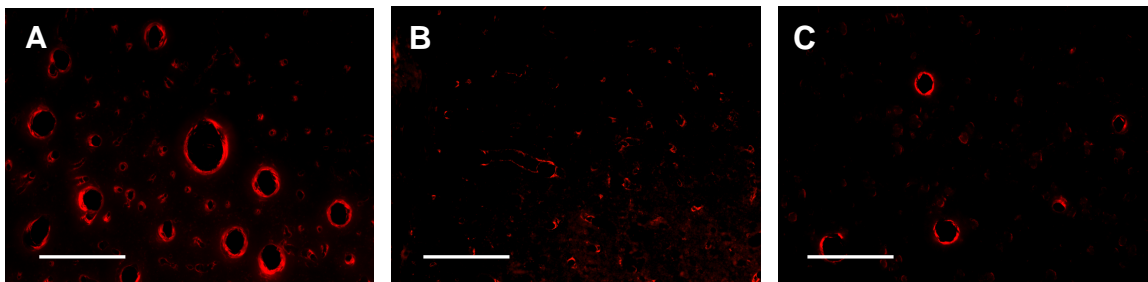


Abbildung. 30: Darstellung der EB- Immunfluoreszenz (rot) (A-C) im Trauma- (A, C), Kontrolltier (B) in verschiedenen Gehirnregionen

Die Skalierungsbalken in A-C entsprechen 100 μ m.

(A) Traumatier mit Evans Blue Gabe 24 Stunden nach Trauma

(B) Kontrolltier mit Evans Blue Perfusion

(C) Traumatier mit Evans Blue Gabe 48 Stunden nach Trauma

Im Vergleich zwischen dem Traumatier mit der 24 Std.- Applikation (T24Std.) und dem Kontrolltier ließ sich bereits optisch eine unterschiedliche EB- Verteilung erkennen. So waren beim Traumatier im gesamten Gehirn deutlich mehr Gefäße erkennbar, bei denen das bei einer Anregungswellenlänge von 560nm rot fluoreszierende EB tiefer ins Gewebe vorgedrungen war als bei der Kontrolle. Bei den Gefäßen waren rot fluoreszierende Ringe um die Gefäßwände sichtbar, die bei den Kontrollen nicht in dieser Ausprägung zu beobachten waren. Diese wurden unabhängig von der Gefäßgröße beobachtet. Wird EB 48 Stunden nach Trauma injiziert (T48Std.), so drang der Farbstoff weniger weit in das Gewebe ein (Abb. 30C) als nach 24 Stunden.

Bei dieser Auswertung wurde bei allen Tieren jeweils die größte Eindringtiefe von EB pro Gefäßanschnitt berücksichtigt und über das gesamte Gehirn gemittelt. Somit erhielt man einen durchschnittlichen Wert der Infiltration von EB ins Gehirngewebe. Während bei der Kontrolle der Mittelwert des Eindringradius bei

4,22µm lag, war er nach einem Trauma (T24Std.) mit einem Wert von 9,53µm mehr als doppelt so groß (Abb. 31) und somit signifikant verschieden. Jedoch war diese vermehrte Diffusion beim Traumatier mit Injektion nach 48 Stunden (T48Std.) nicht mehr festzustellen. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle. Es liegt nahe zu folgern, dass 48 Stunden nach einem Trauma die BHS größtenteils wieder geschlossen war und nicht mehr für größere Moleküle durchlässig.

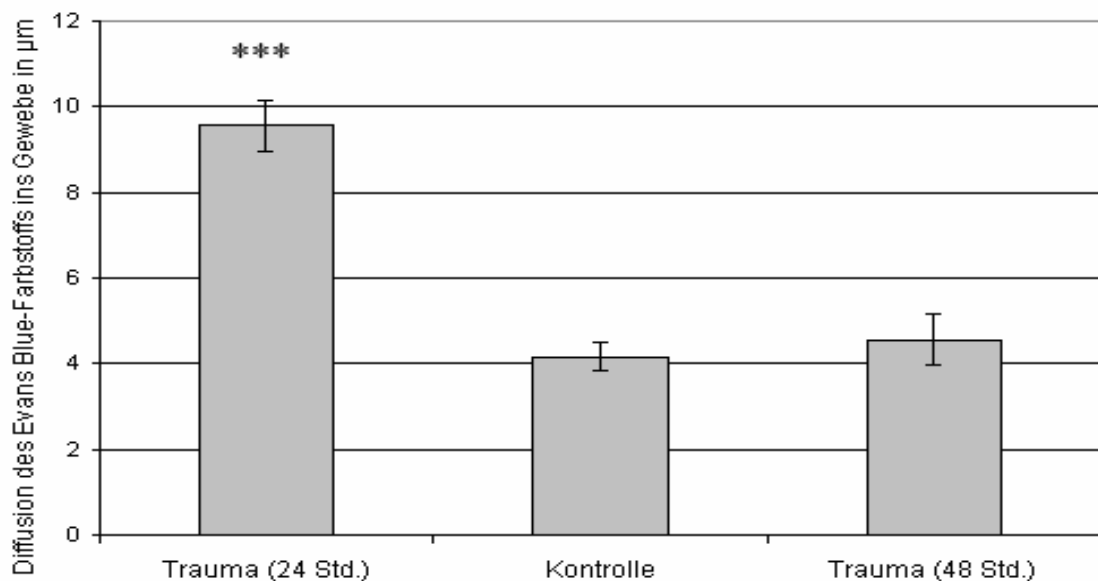


Abbildung 31: Eindringtiefe und Gewebediffusion von Evans Blue aus den Hirngefäßen in µm – Vergleich der beiden Traumatiere mit der Kontrolle; ***p<0,001 versus Kontrolle und Trauma (T48Std.)

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse des ersten Teils, dass die Induktion des diffusen Traumas über die Parameter Apoptose (CC3), Aktivierung von Mikroglia / Makrophagen (CD68), Aktivierung der Astrozyten (GFAP und Cx43), Kumulation des APP sowie die Diffusion von EB klar nachweisbar war. Die seitengleiche Ausprägung aller Parameter weist zudem auf die homogene Induktion des Traumas in beiden Hemisphären hin.

4.8 Modulation durch humane Zellen aus Nabelschnurblut

Nachdem nachgewiesen wurde, dass das durchgeführte Trauma tatsächlich einen diffusen Hirnschaden bei der juvenilen Ratte auslöst und Markerproteine

identifiziert wurden, sollte der Einfluss von humanen Nabelschnurblutzellen auf die gleichen Parameter untersucht werden. Da bereits gezeigt werden konnte, dass bei den meisten Parametern und Regionen kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- und der Shamgruppe bestand, wurde unter diesem Punkt jeweils nur die Kontrolle als Vergleichsgruppe aufgeführt. Die Auswertung erfolgte für die gleichen Regionen wie zuvor, d.h. jeweils für die Hirnoberfläche (vorne / hinten), den Thalamus und die Hippokampusregion.

4.8.1 Modulation der Zahl CC3- immunpositiver Zellen durch humane Zellen aus Nabelschnurblut

Zunächst wurde die CC3- Immunreaktivität in der Traumagruppe mit Zellen ausgewertet und mit den Ergebnissen der Traumagruppe ohne Zellen und der Kontrollgruppe verglichen. Die Abbildung 32 zeigt die Zahl CC3- positiver Zellen in den verschiedenen Gruppen für die Gehirnoberfläche. Im vorderen Gehirnabschnitt (Bregma +2,5mm) (Abb. 33) zeigte sich nach Trauma eine klare Zunahme der Zahl CC3- positiver Zellen (siehe auch Kapitel 4.2). Nach Transplantation umbilikaler Zellen wurden signifikant weniger CC3- positive Zellen detektiert; dieser Effekt war für den Gesamtwert signifikant.

In den hinteren Gehirnabschnitten konnte bereits im ersten Teil (siehe Kapitel 4.2) kein signifikanter Unterschied zwischen der Traumagruppe und den Kontrollen nachgewiesen werden. Auch die Werte der Traumagruppe mit Zellen entsprachen den Werten der Traumagruppe ohne Zellgabe und der Kontrolle. Signifikante Unterschiede lagen nicht vor (Daten nicht gezeigt).

In der Thalamusregion (Abb. 33) zeigte sich ein Anstieg der Apoptose nach Trauma. Nach Transplantation umbilikaler Zellen war die Zahl CC3- positiver Zellen signifikant reduziert und erreichte fast das Niveau der Kontrolltiere.

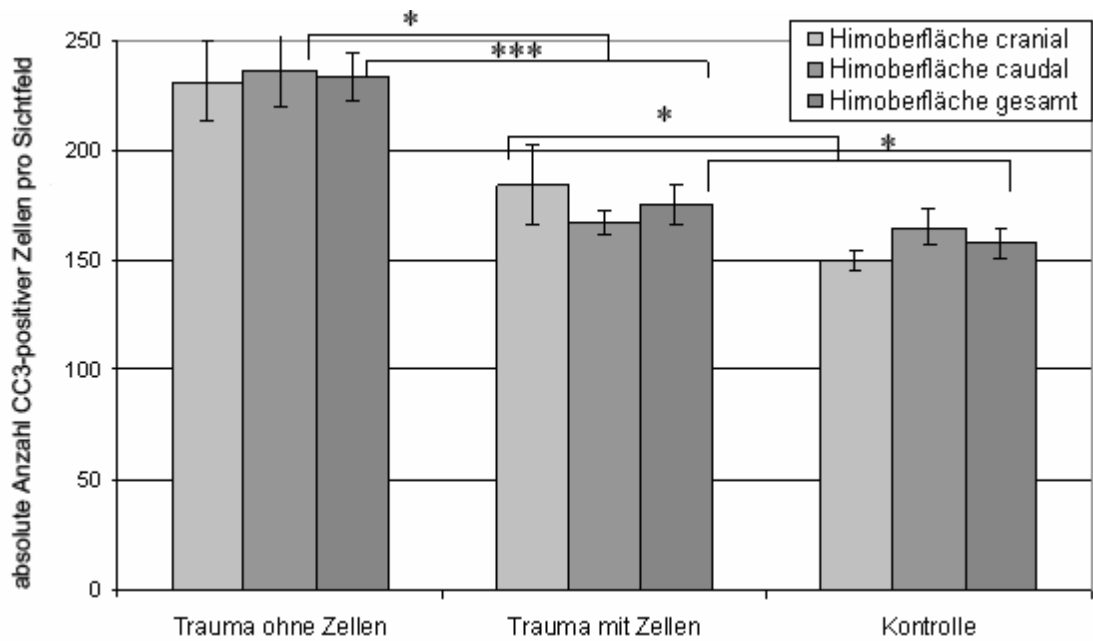


Abbildung 32: Absolute Anzahl CC3- positiver Zellen im vorderen Gehirnabschnitt (Bregma +2,7mm) an der Gehirnoberfläche für Trauma ohne Zellen, Trauma mit Zellen und Kontrolle; *p<0,05 versus Trauma mit Zellen bzw. Kontrolle; ***p<0,001 versus Trauma mit Zellen

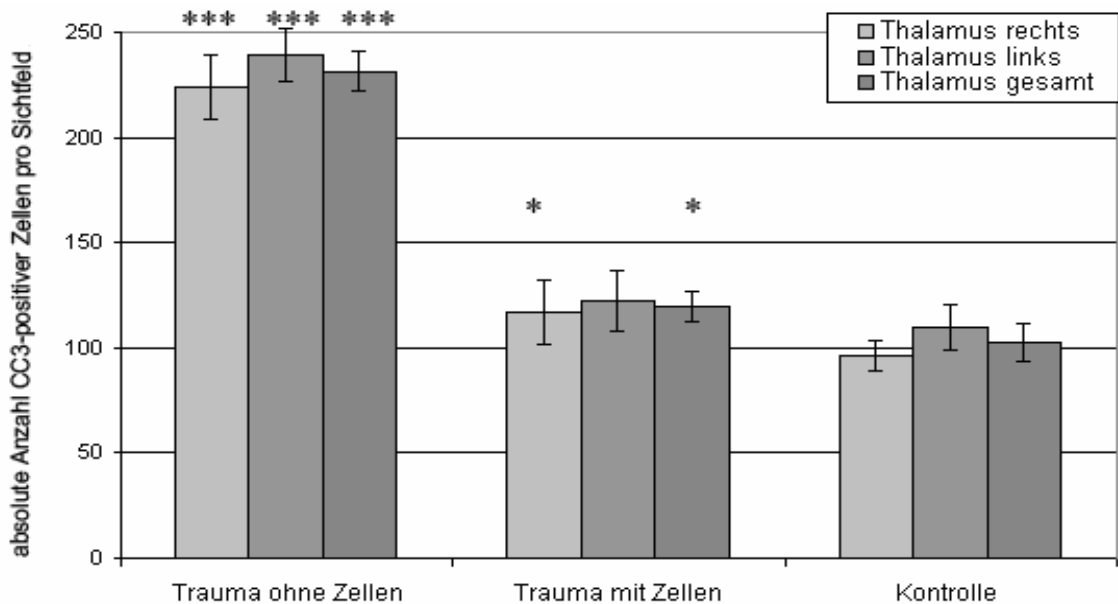


Abbildung 33: Absolute Anzahl CC3- positiver Zellen im Thalamus von Traumatieren ohne Zellen, Traumatieren mit Zelltransplantation und Kontrollen; *p<0,05 versus Kontrolle; ***p<0,001 versus Trauma mit Zellen

Auch im Hippokampusbereich (Abb. 34) war nach Zelltransplantation ein signifikanter Rückgang der Zahl CC3- positiver Zellen nachweisbar. Der Wert unterschied sich nicht mehr von der Kontrollgruppe.

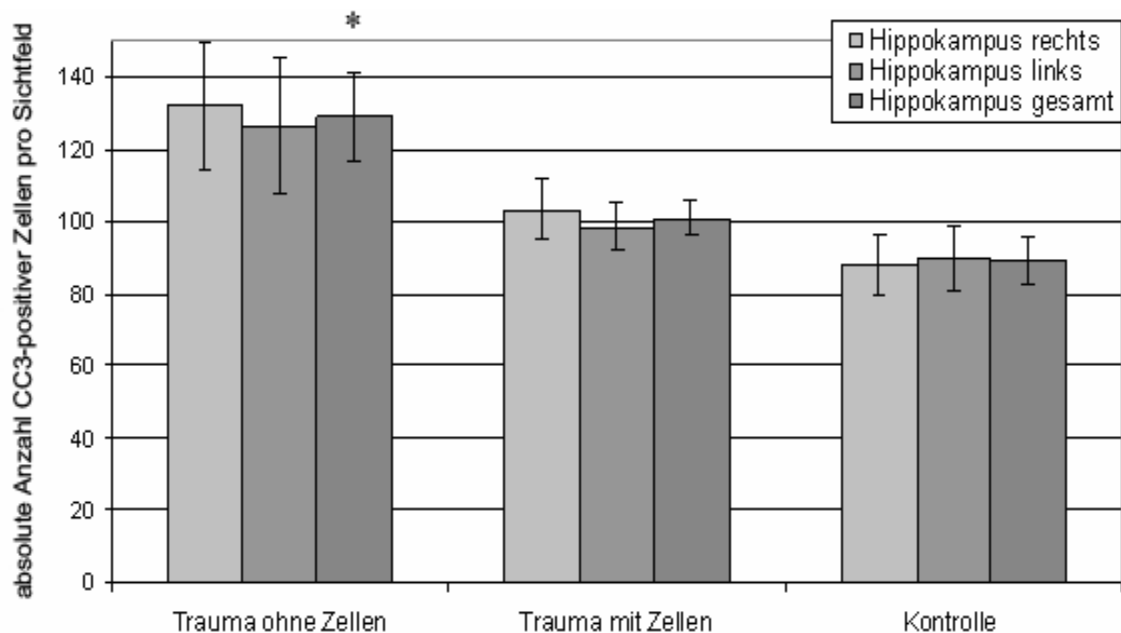


Abbildung 34: Anzahl apoptotischer Zellen pro Sichtfeld im Hippokampusbereich der beiden Traumagruppen und der Kontrolle; * $p < 0,05$ versus Trauma mit Zellen

4.8.2 Modulation der Zahl CD68- immunpositiver Zellen durch humane Zellen aus Nabelschnurblut

In analoger Weise erfolgte die Auswertung der CD68- Färbung, hier ebenfalls zunächst für die Hirnoberfläche. Auch die Zahl CD68- immunpositiver Zellen sank nach Transplantation umbilikaler Zellen signifikant und erreichte das Niveau der Kontrollgruppe. Im vorderen Bereich zeigte sich eine hohe Signifikanz zwischen beiden Traumagruppen, während zwischen Trauma mit Zellen und Kontrolle kein signifikanter Unterschied bestand. Auch im hinteren Hirnbereich zeigte sich zumindest an der cranialen Hirnoberfläche eine Reduktion der CD68- Zellen nach Zelltransplantation. Insgesamt waren hier jedoch in ähnlicher Weise zur CC3- Auswertung im hinteren Bereich in allen drei Gruppen weniger CD68- positive Zellen erkennbar (Daten nicht gezeigt).

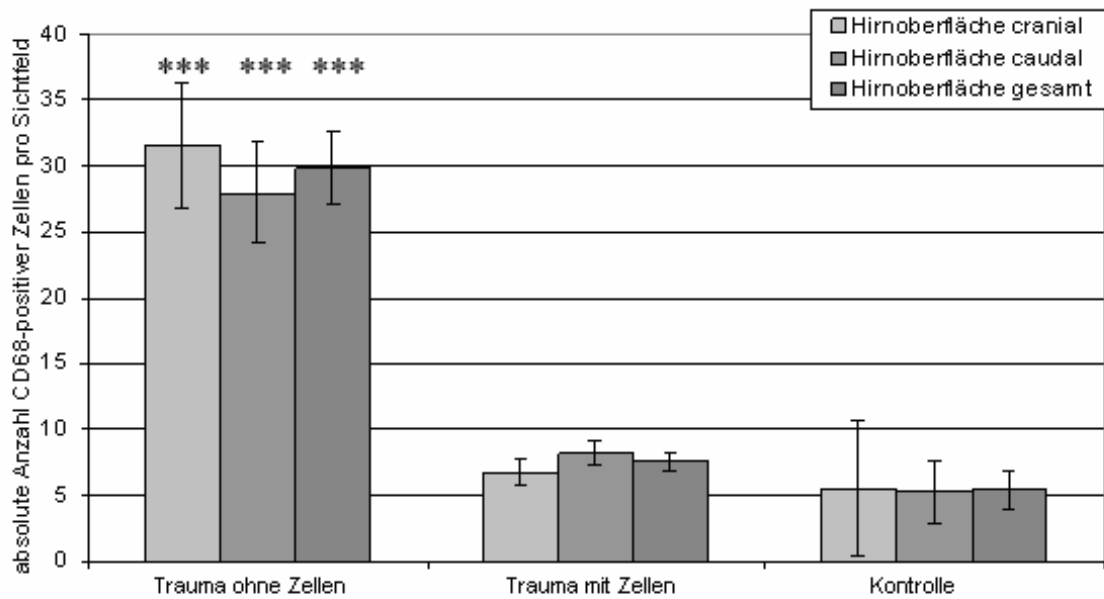


Abbildung 35: Anzahl phagozytärer Zellen pro Sichtfeld an der Hirnoberfläche in den beiden Traumagruppen sowie der Kontrollgruppe (Bregma +2,7mm); *** $p < 0,001$ versus Trauma mit Zellen

Im Thalamus- und Hippokampusbereich wurde zuvor gezeigt (siehe Kapitel 4.3), dass ein Trauma zu einer Zunahme der Zahl phagozytärer, CD68- positiver Zellen führt. Auch hier führte die Zelltransplantation zu einer signifikanten Reduktion der Zahl CD68- immunpositiver Zellen. Diese Effekte waren sowohl für die Hippokampus- als auch für die Thalamusregion nachweisbar (Abb. 36 und 37). In beiden Bereichen näherte sich die Zahl CD68- immunpositiver Zellen der Traumagruppe mit Transplantation den Werten der Kontrollgruppe an, waren jedoch noch signifikant verschieden.

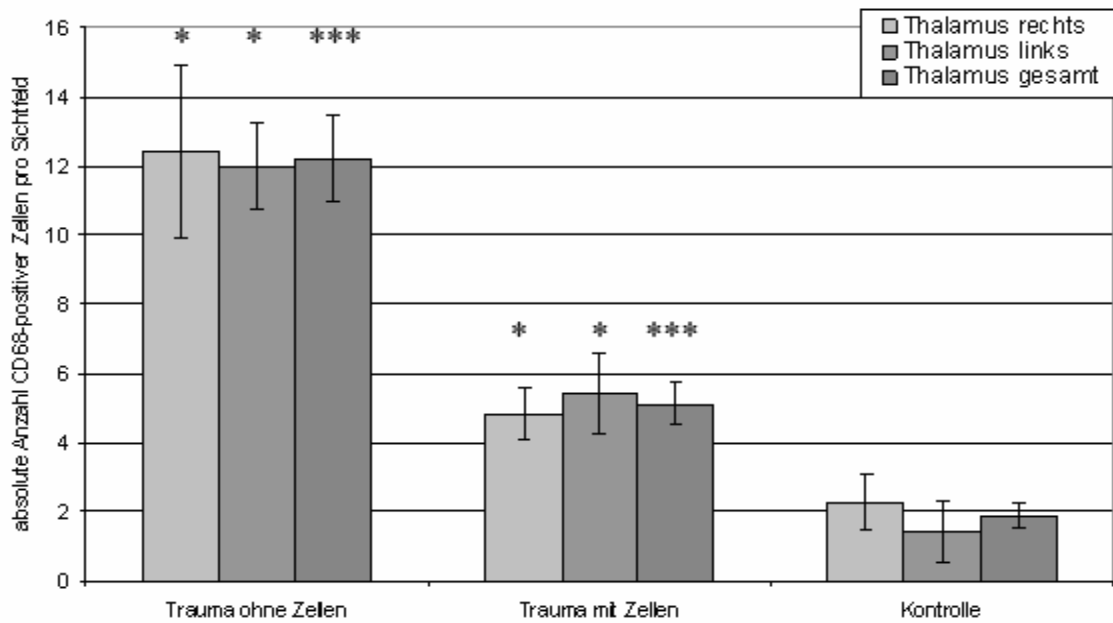


Abbildung 36: Anzahl CD68- immunpositiver Zellen im Thalamus (Bregma -1,6mm) in den beiden Traumagruppen sowie der Kontrolle; * $p < 0,05$ versus Trauma mit Zellen bzw. versus Kontrolle; *** $p < 0,001$ versus Trauma mit Zellen bzw. versus Kontrolle

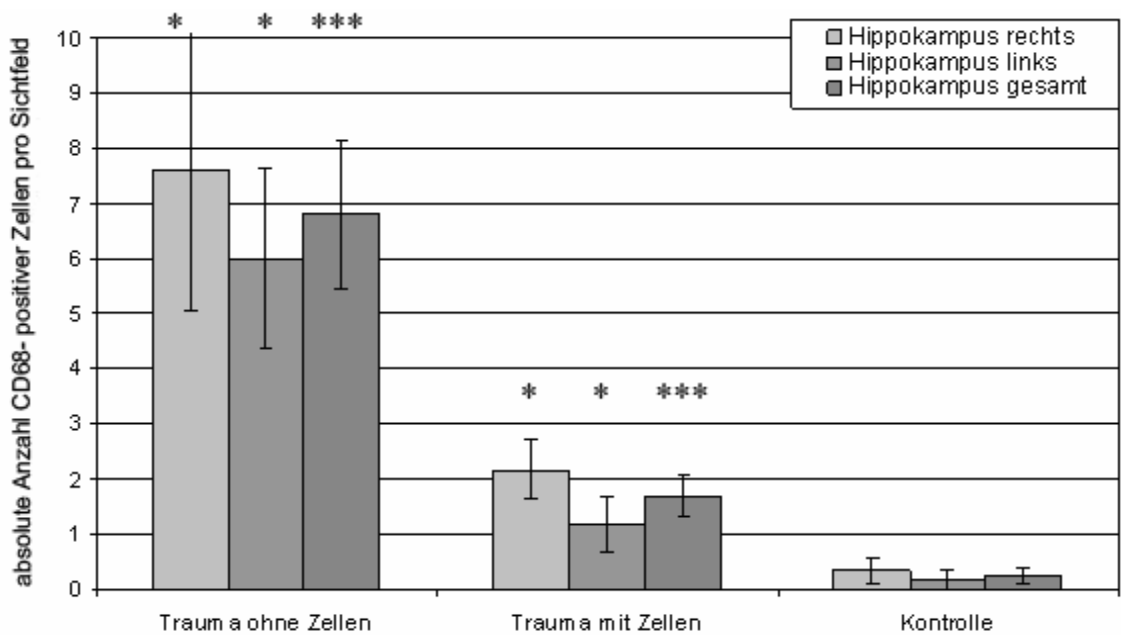


Abbildung 37: Anzahl CD68- immunpositiver Zellen im Hippokampusbereich beider Traumagruppen sowie der Kontrolle; * $p < 0,05$ versus Trauma mit Zellen bzw. versus Kontrolle; *** $p < 0,001$ versus Trauma mit Zellen bzw. versus Kontrolle

Zusammenfassend lässt sich für die Anzahl CC3- und CD68- immunpositiver Zellen sagen, dass – mit Ausnahme der hinteren Hirnoberfläche – in allen untersuchten Bereichen und Regionen ein Effekt der Transplantation nachweisbar

war. Insgesamt ließ sich nach Transplantation eine verminderte Expression von CC3 und CD68 nachweisen. Durch die umbilikalen Zellen wurden die Inflammation und Apoptose abgemildert, in großen Teilen sogar bis auf das Niveau der Vergleichsgruppe.

4.8.3 Modulation astrozytärer Proteine (GFAP und Cx43) durch humane Zellen aus Nabelschnurblut

In gleicher Weise erfolgte die Auswertung der GFAP- und Cx43- Färbung zwischen der Traumagruppe ohne Zelltransplantation, der Traumagruppe mit Zelltransplantation sowie der Kontrollgruppe. Die Abbildung 38 zeigt die Ergebnisse der Gruppen für die Gehirnoberfläche. Nach Trauma-induktion war ein vermehrter Nachweis von GFAP zu verzeichnen. Nach Transplantation von Zellen aus hNSB ist eine minimale rückläufige Tendenz der GFAP- Immunreaktivität zu erkennen, jedoch nicht so ausgeprägt und nicht signifikant wie bei den vorherigen Parametern.

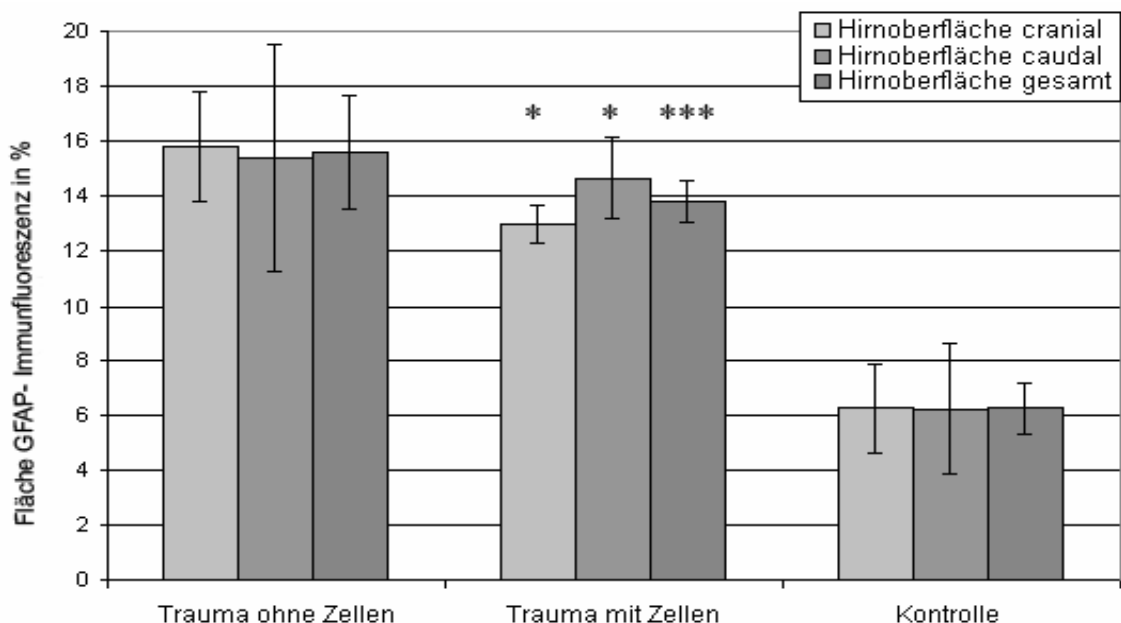


Abbildung 38: Prozentualer Anteil der Fläche der GFAP- Fluoreszenz pro Bildfläche, bestimmt für die craniale und caudale Hirnoberfläche; * $p < 0,05$ versus Kontrolle; *** $p < 0,001$ versus Kontrolle

Auch im Thalamus war eine geringe Abnahme der GFAP- Immunreaktivität nach Zelltransplantation zu verzeichnen (Abb. 39). Der GFAP- Wert sank hier nicht auf

das Niveau der Kontrollgruppe, unterschied sich jedoch zur Gruppe der Traumatiere ohne Zelltransplantation. Es zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Traumagruppen.

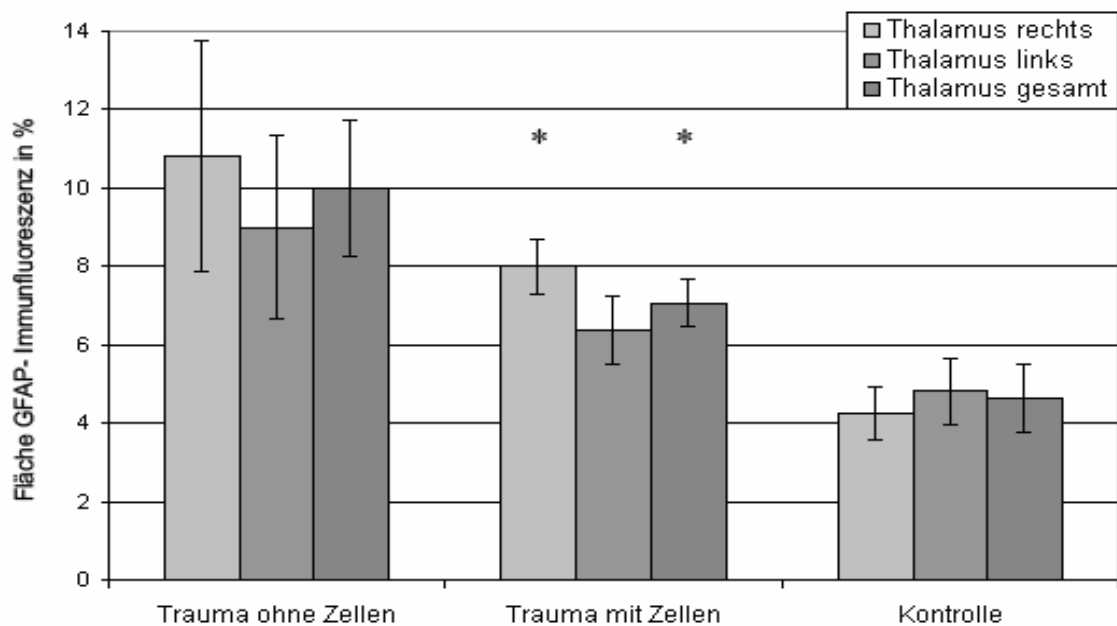


Abbildung 39: Prozentualer Anteil der Fläche der GFAP- Fluoreszenz pro Bildfläche, bestimmt für den Thalamus; * $p < 0,05$ versus Kontrolle

Im Hippokampusbereich war ebenfalls kein deutlicher Effekt der Nabelschnurblutzellen erkennbar. Zusammenfassend ließ sich insgesamt kein klarer Effekt durch die Nabelschnurblutzellen auf die GFAP- Expression nachweisen. Die Werte zeigten keine Signifikanz gegenüber der Traumagruppe ohne Zelltransplantation. Lediglich ein leichter Rückgang der GFAP- Immunreaktivität in der Traumagruppe mit Zelltransplantation war nachzuweisen, jedoch fiel dieser vor allem im Hippokampusbereich nicht deutlich und signifikant aus (Daten nicht gezeigt).

Weiterführend wurde die Cx43- Immunreaktivität untersucht. Interessanterweise war hier anders als bei der GFAP- Auswertung nach Gabe von Nabelschnurblutzellen ein deutlicher und teils hoch signifikanter Rückgang an Cx43- Immunreaktivität zu verzeichnen. Hierbei zeigte sich sowohl an der Hirnoberfläche als auch im Thalamusbereich eine klare Modulation nach Transplantation. Nach Zellgabe sank hier die Cx43- Immunreaktivität fast bis auf das Niveau der Kontrollgruppe und zeigte in einigen Regionen keinen signifikanten

Unterschied zur Kontrolle. Abbildungen 40 und 41 geben die entsprechenden Mittelwerte mit Standardfehler wieder.

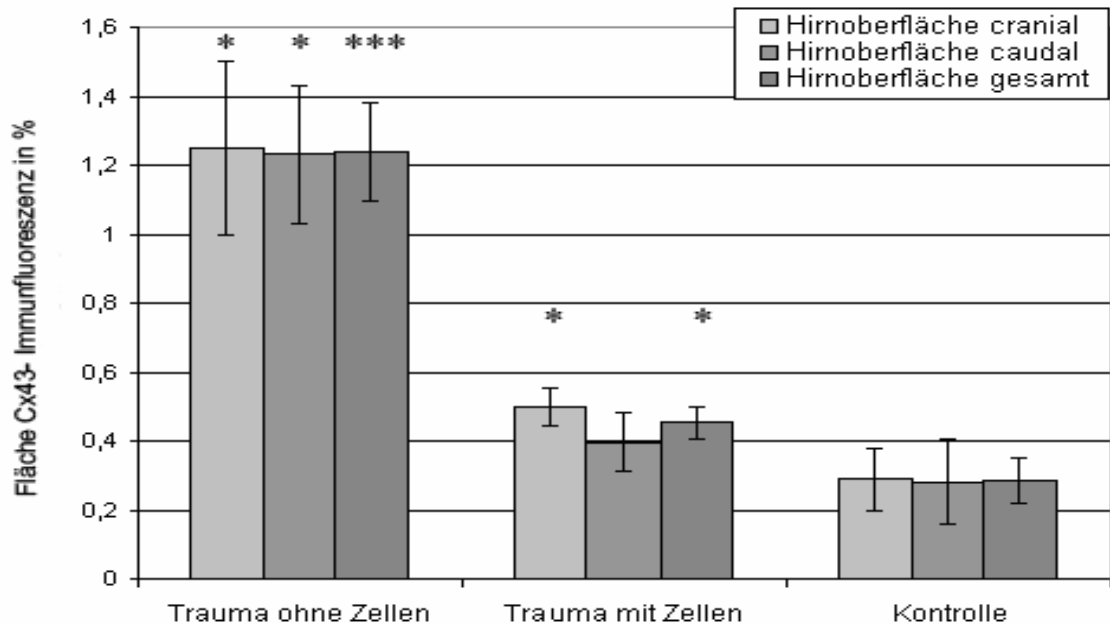


Abbildung 40: Prozentualer Anteil der Fläche der Cx43- Fluoreszenz pro Bildfläche, bestimmt für die craniale und caudale Hirnoberfläche; *p<0,05 versus Trauma mit Zellen bzw. versus Kontrolle; ***p<0,001 versus Trauma mit Zellen

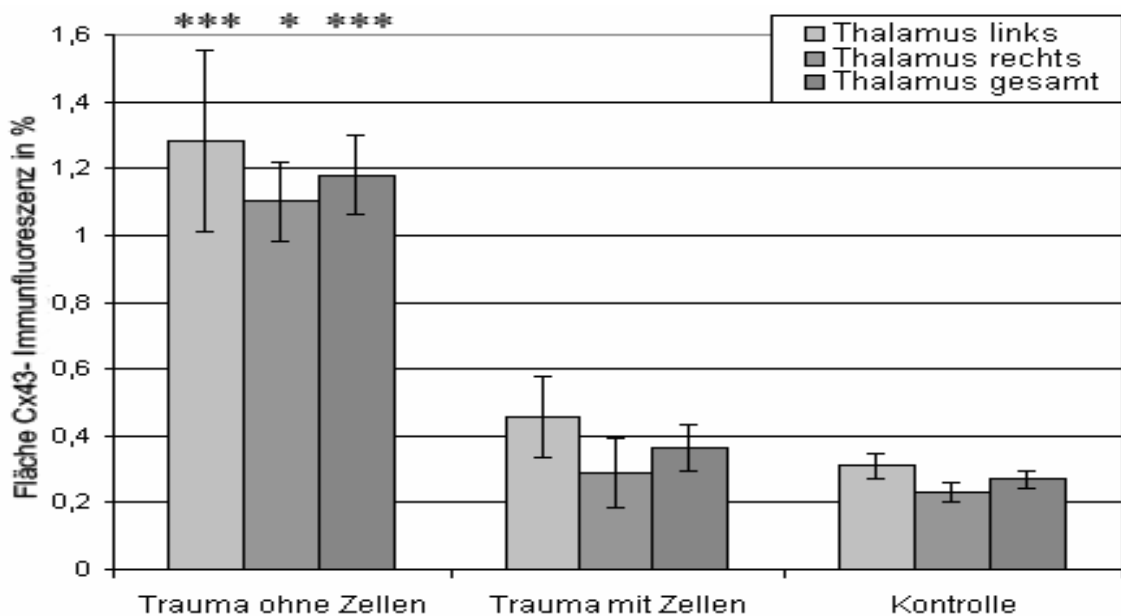


Abbildung 41: Prozentualer Anteil der Fläche der Cx43- Fluoreszenz pro Bildfläche, bestimmt für den Thalamus; *p<0,05 versus Trauma mit Zellen; ***p<0,001 versus Trauma mit Zellen

Im Bereich des Hippokampus zeigte sich dieser Rückgang der Immunreaktivität allerdings nicht (Abb. 42). Hierbei fiel auf, dass kein signifikanter Unterschied zwischen der Traumagruppe und der Traumagruppe mit Nabelschnurblutzellen bestand. Eine geringe Reduktion der Cx43- Immunreaktivität war nach Transplantation vorhanden, jedoch nicht so ausgeprägt wie in den beiden Regionen zuvor.

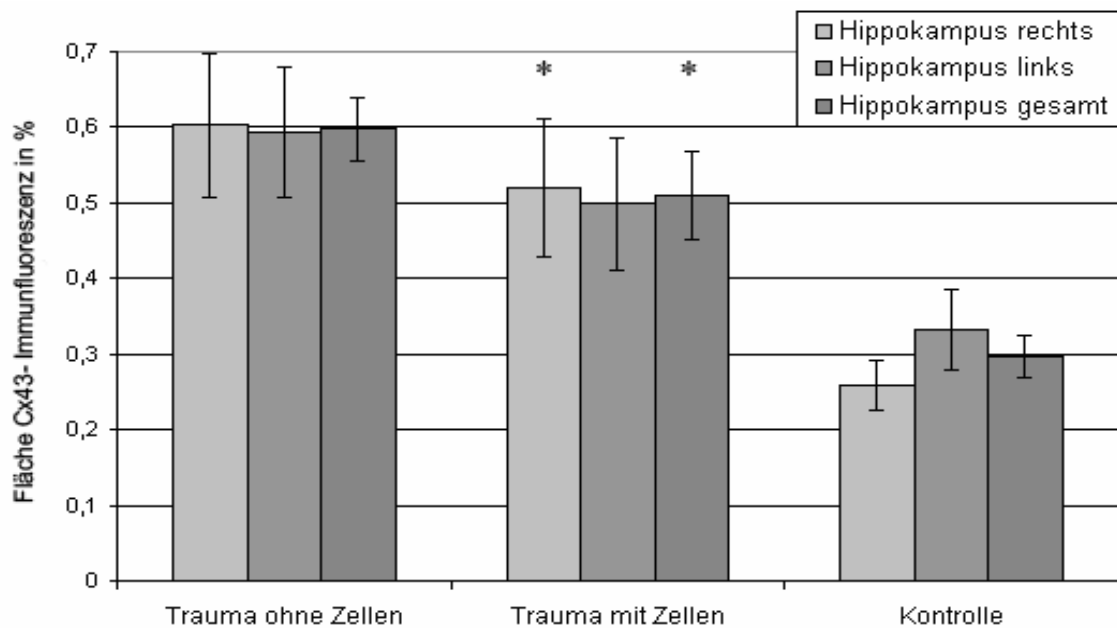


Abbildung 42: Prozentualer Anteil der Fläche der Cx43- Fluoreszenz pro Bildfläche, bestimmt für den Hippokampusbereich; * $p < 0,05$ versus Kontrolle

Insgesamt zeigte die GFAP- und Cx43- Auswertung, dass die Transplantation von Nabelschnurblutzellen in manchen Arealen mit einer Modulation der Expression einherging. Bei GFAP fiel sie jedoch nicht so offensichtlich aus wie bei Cx43. Hierbei war an der Gehirnoberfläche und im Thalamus eine klare Reduktion des Cx43 nachweisbar. Diese Signifikanz galt jedoch nicht für den Hippokampus.

4.9 Nachweis humaner Zellen aus Nabelschnurblut im Gehirn

Den Versuchstieren wurden einen Tag nach Traumainduktion (T24Std.) humane Nabelschnurblutzellen injiziert. Dies geschah bei einem Teil der Traumagruppe intraperitoneal (n=3) und bei einer weiteren Traumagruppe intracisternal (n=2). Diese humanen Nabelschnurblutzellen können anhand der HLA-DR-Immunhisto-

chemie nachgewiesen werden. Der verwendete HLA-Antikörper diente bereits dem Nachweis umbilikaler Zellen nach Hypoxie-Ischämie (Abb. 43) und zeigte grün fluoreszierende Zellen im hypoxisch-ischämischen Areal. Allerdings konnten nach Trauma keine HLA-DR- immunpositiven Zellen detektiert werden (Abb. 44). Deshalb wurde der Versuch unternommen, die Nabelschnurblutzellen zu einem früheren Zeitpunkt (zwei Stunden nach Trauma) den Tieren zu applizieren. Damit sollte ausgeschlossen werden, dass die Transplantation erst nach erneutem Verschluss der BHS erfolgte und somit die Zellen das geschädigte Gehirnareal nicht mehr erreichen konnten. Auch bei diesen Tieren mit Applikation der Zellen zwei Stunden nach Traumainduktion wurden keine HLA- positiven Zellen detektiert. In Abbildung 44 werden beispielhaft drei der untersuchten Areale in der HLA-GFAP- Immunfluoreszenz gezeigt. Auch der Nachweis für die HNA- Immunreaktivität verlief erfolglos.

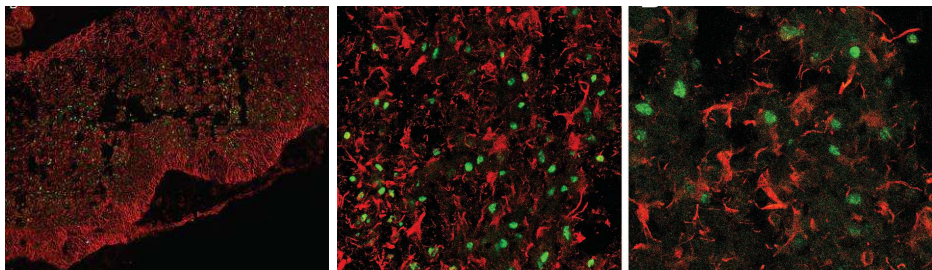


Abbildung 43: Darstellung der Immunfluoreszenz HLA- positiver Zellen (grün) sowie Nachweis GFAP- positiver Astrozyten (rot) im Bereich der hypoxisch-ischämischen Läsion (Meier et al., 2006)

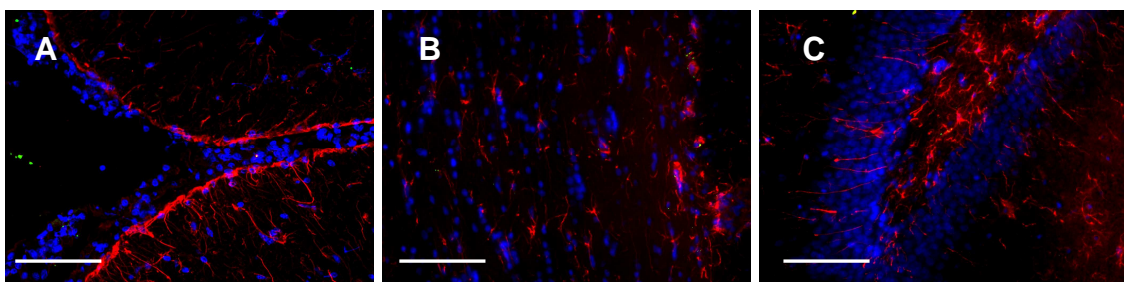


Abbildung 44: Darstellung der fehlenden HLA- (grün) Immunfluoreszenz sowie Nachweis GFAP- positiver Astrozyten (rot) im Traumatier an der Gehirnoberfläche (A), im Hippokampusbereich (B) mit Gyrus dentatus (C)
Zellkerne sind über Hoechst 33342 blau gefärbt. Die Skalierungsbalken in A-C entsprechen 100µm.

Aufgrund des fehlenden Nachweises der humanen Zellen wurden insgesamt drei weitere Tiere mit Cyclosporin A, einem Immunsuppressivum, behandelt und isoliert gehalten. Auch in immunsupprimierten Tieren konnten nach immunhistochemischer Färbung und Auswertung der Gehirne keine HNA- oder HLA- immunpositiven Zellen nachgewiesen werden.

5. Diskussion

In dieser Arbeit wurde ein Tiermodell zur Induktion eines milden diffusen Hirntraumas bei juvenilen Ratten nach Adelson modifiziert etabliert. Das Trauma wurde anhand von verschiedenen Markern nachgewiesen. Histologische Standardfärbungen wie Kresylviolett und Hämatoxylin-Eosin und immunhistochemische Nachweismethoden inkl. der Färbungen von CC3 (Apoptose-spezifisches Protein) und CD68 (ED1; Markierung aktivierter Mikroglia / Makrophagen) sowie GFAP und Cx43 (Astrozytenproteine) wurden eingesetzt. Die Ergebnisse der Traumagruppe wurden zunächst mit denen der Kontroll- und Shamgruppe verglichen.

Nach Feststellung der Parameter, die sich nach Trauma im Gehirn änderten, wurde in einem zweiten Schritt der Effekt transplanteder Zellen aus Nabelschnurblut auf diese genannten Parameter untersucht.

5.1 Diskussion der Methoden

5.1.1 Wahl der Tierart

Generell bieten Nagetiere für die experimentelle Untersuchung komplexer Hirnschädigungen wichtige Modelle. Sowohl Anatomie als auch Physiologie sind unter verschiedenen Spezies der Säuger vergleichbar. In vergleichenden Analysen in Bezug auf motorische Fähigkeiten konnten viele Homologien zwischen beiden Spezies (Mensch und Ratte) nachgewiesen werden (Cenci et al., 2002).

Bereits Dixon beschrieb 1987 verschiedene Vorteile in der Verwendung von Nagern gegenüber Primaten (Dixon et al., 1987). Gegenüber dem Einsatz größerer Tiere werden nur geringe Kosten durch Anschaffung, Aufzucht und Unterhaltung verursacht. Zusätzlich besteht eine hohe Resistenz gegenüber Infektionen. Zudem ist ein ökonomischer und effizienter Einsatz von Pharmaka (Analgetika, Anästhetika) aufgrund des niedrigeren Körpergewichts möglich.

Durch die genaue genetische Herkunft durch Züchtung der Tiere sind exakte Daten genauso wie das Alter und Gewicht bekannt und untereinander vergleichbar und standardisierbar (Dixon et al., 1987). Weiterhin sind durch den jahrelangen Einsatz standardisierte Daten und Normwerte für eine Vielzahl von physiologischen und verhaltensorientierten Variablen entstanden.

Als Nachteile von Nagetieren können angefügt werden, dass die kleineren Strukturen der Nagetiere die Untersuchungen komplizieren und ebenfalls nur eine unzureichende Erfassung von komplexen neurologischen Ausfällen im Vergleich zum Menschen möglich ist.

Insgesamt wurde das Modell der Ratte für die Analyse des SHT als besonders geeignet angesehen, da das Modell der diffusen axonalen Schädigung an der Ratte etabliert ist (Tiermodell nach Marmarou, Adelson et al., 1996). Ein weiterer Vorteil des Einsatzes der Ratte ist, dass der Einsatz von Antikörpern bereits in der Ratte erprobt und ebenfalls etabliert ist. Auch die Transplantation von Zellen aus Nabelschnurblut wurde bereits erfolgreich in der Ratte durchgeführt (Meier et al., 2006).

5.1.2 Schädelhirntrauma- Modell

Da die Ursachen und komplexen Auswirkungen des humanen SHT sehr unterschiedlich sind, sind kontrollierte und reproduzierbare Tiermodelle zur Untersuchung des SHT wichtig. Unter standardisierten Bedingungen ist es möglich, Fragestellungen zur Pathologie und Therapie des SHT zu untersuchen. In Untersuchungen hat sich gezeigt, dass für das Verständnis des humanen SHT verschiedene experimentelle Tiermodelle essentiell sind (Povlishock und Christman, 1995). Hierzu muss eine ganzheitliche Nachahmung der Ursache und Pathologie gewährleistet sein. Teilaspekte sollen jedoch isoliert betrachtet werden können. Da in einem Tiermodell aufgrund der verschiedenen Schwerpunkte der Modellansätze jeweils nur ein Teilaspekt des komplexen humanen SHT untersucht werden kann (Gennarelli, 1994; Finnie und Blumbergs, 2002), wird erst das Zusammenfügen verschiedener Ergebnisse aus diversen Modellen ein besseres langfristiges Verständnis des SHT inklusive der Entwicklung und Etablierung neuer Therapieansätze ermöglichen.

Ein entscheidender Parameter bei der Untersuchung des SHT ist das Alter, in dem das SHT erfolgt. Die auftretenden Beeinträchtigungen nach einem Trauma sind bei Kindern ausgeprägter und langfristiger (Catroppa et al., 2008; Prins und Hovda, 2003; Cattelani et al., 1998; Gagnon et al. 1998). Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass Kinder auf ein SHT verstärkt mit einer diffusen zerebralen Schwellung reagieren als Erwachsene (Mazzola und Adelson, 2002). Diese diffuse Schwellung ist auch mit einer erhöhten Mortalität und Invalidität assoziiert (Adelson et al., 1998). Daher ist essentiell, auch in den tierexperimentellen Modellen das Alter der Traumainduktion zu berücksichtigen und Modelle zu etablieren, in denen eine diffuse neuronale Schädigung im Vordergrund der Pathologie steht. Im Fokus dieser Untersuchung stand daher das an Adelson adaptierte Traumamodell an juvenilen Ratten (Adelson et al., 1996). Zur Simulation der neurologischen Schäden nach SHT eignet sich besonders das „Weight-drop“ Modell von Marmarou, denn damit können mehrere wichtige Aspekte der Humanmedizin nachgestellt werden. Neben dem diffusen Schaden nach einem schweren SHT treten auch eine fokale Kontusion an der Aufprallstelle und ein selektiver Verlust von Neuronen im Kortex und Hippokampus, sowie im Thalamus und im Gehirnstamm auf (Tang et al., 1997b; Smith et al., 1997). Diese Regionen des Gehirns waren in der vorliegenden Untersuchung ebenfalls von großer Bedeutung. Zudem korreliert die Gehirnatrophie nach einem SHT unmittelbar mit der Schwere des SHT (Veenith et al., 2009). Dies führt dann unweigerlich zu den genannten Spätfolgen. Ferner werden in diesem Modell Verhaltensänderungen wie reduzierte Spontanaktivität und beeinträchtigte motorische und kognitive Funktionen beobachtet (Shapira et al., 1988, Tang et al., 1997a). Generalisiert sind Störungen im Metabolismus, eine akute und chronische intrakranielle Hypertension, diffuse subarachnoidale Blutungen und Ödeme nachzuweisen (Adelson et al., 1996). Die auftretenden Sekundärschäden sind ebenfalls von besonderer Bedeutung für den weiteren Rehabilitationsverlauf. Eine wichtige Rolle spielen hierbei inflammatorische und neurodegenerative Prozesse, ebenso wie der verzögerte Zelltod (McIntosh et al., 1998), bei dem die Apoptose in den verschiedenen Strukturen und Regionen des Gehirns mit zeitlicher Verzögerung auftritt und z.T. auch nach Monaten und Jahren nachweisbar ist. Aus diesen genannten Gründen waren andere Tiermodelle für unsere Fragestellung ungeeignet, da diese meist nur fokale Schäden erzeugen („Fluid percussion“ oder „Weight drop“ Modell nach Feeney (Feeney et al., 1981)).

Die diffuse axonale Schädigung, wie sie über das „Weight drop“ Modell nach Marmarou erzielt wird, ist insbesondere charakteristisch für die Auswirkungen des SHT bei Kindern. Um die Pathologie des SHT im juvenilen Gehirn jedoch umfassend beurteilen zu können, wurde das Trauma in der Adaptation des Modells nach Adelson (Adelson et al., 1996) in juvenilen Ratten durchgeführt.

In diesem modifizierten Modell konnte gezeigt werden, dass in juvenilen Ratten ein reproduzierbarer diffuser axonaler Schaden verursacht wird. Durch strikte Einhaltung des Protokolls und Normierung aller Parameter (Plexiglasröhre, Schaumstoffplatte, Narkoseprotokoll, genaue Überwachung des einmaligen Aufpralls, gleiche Positionierung der Metallplatte auf den Schädel) wurde die Erhebung von standardisierten Daten mit geringer Streuung gewährleistet.

Dennoch enthielt die Versuchsdurchführung auch Schwachpunkte, deren Kontrolle bei der Durchführung nicht sicher objektivierbar war. Die fehlende Geschwindigkeitskontrolle des herabfallenden Gewichts und damit der Aufprall waren nicht einstellbar. Ebenso war durch die nicht vorhandene Steuerbarkeit der Tiefe der Duraimpression das Ausmaß des SHT in diesem Modell schlecht steuerbar und bot somit Variationsmöglichkeiten, die eine Objektivierbarkeit der Daten erschweren könnten.

In unserer Versuchsreihe wurde die Erhebung standardisierter Daten mit geringer Streuung durch die Durchführung des Modells von nur einem erfahrenen Operateur gewährleistet. Weiterhin wurden für eine größtmögliche Reproduzierbarkeit der Versuche die Schaumstoffplatte und die Plexiglasröhre fixiert, um so eine präzise Lagerung zu gewährleisten. Parameter wie Temperatur, Blutgase, Herzfrequenz, der mittlere arterielle Blutdruck wurden überwacht und dokumentiert. Dennoch kam es auch unter Beachtung aller Parameter zu unerwünschten Ereignissen, die sich gehäuft in der Shamgruppe gezeigt haben. Hierbei handelte es sich um notwendige Reanimationen und postoperative Hypoxien. Diese Tiere wurden histologisch nicht untersucht und nicht in der Auswertung berücksichtigt. Durch diesen Ausfall von Tieren lassen sich z.T. auch die kleinen Gruppen erklären. Da nur tatsächlich sorgfältig operierte Tiere ohne Zwischenfälle für die Auswertung benutzt wurden, fielen durch die oben beschriebenen Umstände gewisse Tiere für die immunhistochemische Untersuchung aus. Auch Tiere, die einen Riss der Schädelkalotte aufwiesen, wurden aus dem Versuch herausgenommen.

Aus diesen aufgeführten Gründen konnte von einem sorgfältigen und qualitativ hochwertigen Operationsablauf ausgegangen werden. Das gewählte Modell war sehr gut zur Imitation des SHT bei Kindern geeignet und ermöglichte die umfassende Analyse von Pathologie und Therapie.

5.1.3 Histologische und immunhistochemische Methoden

Mittels zweier histologischer Färbungen, der HE- und der KB- Färbung, wurde die Morphologie im Rattengehirn an Kryoschnitten dargestellt.

Für die Evaluierung des Schadens nach SHT sind jedoch weitere Parameter unerlässlich. Über die immunhistochemische Detektion von Markerproteinen für Apoptose und Inflammation sowie zellulären Markerproteinen können Änderungen dieser Prozesse und Zellen dargestellt werden.

Caspase 3 ist ein Enzym, das spezifisch beim apoptotischen Zelluntergang gespalten wird und damit als CC3 der Markierung apoptotischer Zellen nach einem Trauma dienen kann. Caspase 3- abhängige Apoptose ist in Neuronen, aber auch in Astrozyten und Oligodendrozyten nachweisbar (Beer et al., 2000).

Die Aktivierung von Mikrogliazellen und Makrophagen im Gehirn stellte einen weiteren wichtigen Marker für eine Hirnverletzung dar. Die Expression von CD68, detektiert durch den monoklonalen Antikörper ED1, steigt im Rahmen von Entzündungsreaktionen an. Über die Kombination beider Immunfluoreszenzen ließ sich eine SHT-assoziierte Schädigung im Gehirn darstellen.

Astrogliale Proteine sind das Zytoskelett- Protein GFAP und das Gap Junction- Protein Cx43. Nach einer zerebralen Schädigung wie beispielsweise einem Trauma werden vermehrt Connexine (Cx43) und GFAP in den reaktiven Astrozyten exprimiert (Frantseva et al., 2002; Lin et al., 2003; Eng et al., 2000). Der Anstieg der Expression beider Proteine war im geschädigten Areal deutlich nachweisbar.

Das APP ist ein integrales Glykomembranprotein, welches in Vesikeln antegrad entlang des Axons zum distalen Ende einer Nervenzelle transportiert wird. Nach axonaler Schädigung kumuliert es im Axon und kann dann vermehrt nachgewiesen werden (Stone et al., 2000). Die vermehrte Immunreaktion für APP konnte im Traumatier nachgewiesen werden.

Ein SHT geht zumeist mit der Störung der BHS einher. Über die Applikation des EB- Farbstoffes können Läsionen der BHS nach Schädigung wie Trauma, Hypoxie oder Ischämie nachgewiesen werden. Nach einem SHT ist die BHS auch für Plasmaproteine durchlässig (Donkin et al., 2010). Bei Adelson et al. (1998) zeigte sich bei jungen Ratten eine gestörte BHS- Schrankenfunktion nach einem SHT bereits nach einer Stunde und hielt bis zu 24 Stunden an. Bei Tanno et al. (1992) konnte in Kombination mit zusätzlicher Hypoxie eine Öffnung der BHS für 72 Stunden nachgewiesen werden. In unseren Versuchen konnte ein Übertritt des Farbstoffes EB nach 24 Stunden von den Gefäßen ins umliegende Hirnparenchym detektiert werden, nach 48 Stunden war dieser Effekt kaum noch nachweisbar. Dies könnte jedoch auch an der geringen Tierzahl (n=1) liegen und müsste ggf. mit einer vermehrten Tierzahl wiederholt und überprüft werden, um eine individuelle Varianz auszuschließen.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

Nach Durchführung des SHT Modells nach Adelson in der juvenilen Ratte wurden die Gehirne 14 Tage später auf pathologische Veränderungen hin untersucht.

5.2.1 Histologische und immunhistochemische Untersuchungen

Die histologischen Schnitte der HE- und KB- Färbung zeigten bei der Traumagruppe keinen relevanten mikroskopischen Schaden. Da mit dem Modell nach Adelson ein mildes und diffuses Trauma erzeugt wurde, war eine deutliche histologische Läsion nicht zu erwarten. Daher wurden weitere Proteine, die potentiell eine diffuse Schädigung im Gehirn detektieren können, immunhistochemisch untersucht. CC3, CD68, GFAP und Cx43 sind Proteine, die unter pathologischen Bedingungen vermehrt detektiert werden können und entsprechend Apoptose (CC3) und die Aktivierung von Mikro- und Makrogliazellen (CD68, GFAP, Cx43) sichtbar machen. Die untersuchten Regionen schlossen den Kortex, Hippokampus und Thalamus ein, da diese Areale auch im humanen SHT besonders stark betroffen sind.

Zunächst einmal zeigten unsere Ergebnisse, dass mit der verwendeten Methode nach Adelson ein Trauma des Gehirns stattgefunden hat und eine Läsion

nachweisbar war. Bezüglich der CC3- Immunfluoreszenz, indikativ für Apoptose, ließ sich ein signifikanter Unterschied zwischen Trauma- und Kontroll- bzw. Shamgruppe zeigen. Es zeigten sich jedoch auch lokale Unterschiede. Während in den vorderen Gehirnabschnitten eine deutliche Signifikanz vorlag, war diese in weiter hinten liegenden Hirnbereichen zunehmend aufgehoben. Im vorderen Bereich bei Bregma +2,7mm wurden mehr apoptotische Zellen in der Trauma-Gruppe ohne Zelltransplantation detektiert als in den Vergleichsgruppen. Dieser Unterschied war sowohl für die craniale als auch caudale Gehirnoberfläche hoch signifikant. Zwischen der Sham- und der Kontrollgruppe lag kein signifikanter Unterschied vor. Auffällig war zudem, dass sowohl an der cranialen wie auch caudalen Gehirnoberfläche eine annähernd gleich erhöhte Anzahl an untersuchten Parametern gefunden wurde, obwohl das Trauma lediglich von cranial erfolgte. Dies lässt sich mit dem Coup-Contre-Coup- Mechanismus erklären, dem Entstehen von Hirnschädigungen nach Gewalteinwirkung sowohl auf der Aufprallseite als auch auf der gegenüberliegenden Seite mit dem vermehrten Nachweis von Apoptose beidseits.

Im Thalamus zeigte sich durch das Trauma ebenfalls ein deutlicher Anstieg apoptotischer Zellen im Gegensatz zu den Vergleichsgruppen. Ebenso wie im Thalamus wurde im vorderen Bereich des Hippokampus vermehrte Apoptose nach Traumainduktion nachgewiesen. Dieser Effekt war auch hier signifikant.

Bei Raghupathi et al. (2002) zeigte sich nach einem milden unilateralen Trauma ein Maximum an apoptotischen Zellen nach 24 Stunden vor allem im ipsilateralen Kortex. Nur wenige Zellen fanden sich im Corpus callosum, im Hippokampus oder auf der kontralateralen Seite. Bei Hicks dagegen zeigte sich ein selektiver Verlust von Neuronen im Hilus des Gyrus dentatus und im Bereich des CA3 des Hippokampus (Hicks et al., 1993). Im Thalamus zeigte sich erst 72 Stunden nach dem SHT ein Anstieg nekrotischer Zellen nach einem milden SHT. Nach einem mittelschweren SHT konnten sowohl nach 24 Stunden wie auch nach einer Woche apoptotische Zellen im Kortex und erst nach zwei Wochen im Thalamus gefunden werden (Raghupathi et al., 2002; Hicks et al., 1993). Eine vergleichbare räumlich-zeitliche Abfolge der Apoptose wurde auch von Conti et al. (1998) beobachtet. Alle Auswertungen zeigen eine unterschiedliche regionale Aufteilung apoptotischer Zellen mit zeitlicher Streuung. Diese Befunde werden von unseren Ergebnissen

unterstützt, indem gezeigt werden konnte, dass bis zwei Wochen nach Trauma apoptotische Zellen beim Traumatier nachzuweisen waren und die Apoptose in verschiedenen Hirnregionen differentiell reguliert war.

Die CC3- Färbung bietet eine gute Nachweismöglichkeit zur Detektion apoptotischer Zellen. Die Ergebnisse sind vergleichbar mit Studien, die auf der Detektion durch TUNEL Assay und DNA- Fragmentierung basieren (Conti et al., 1998). Für die ordnungsgemäße Gleichmäßigkeit des durchgeführten Traumas spricht, dass es in keiner Gruppe einen Unterschied in der Apoptoserate im Hemisphärenvergleich gab.

Ein wichtiger Marker für die Inflammation ist CD68 (Antigen des verwendeten Antikörpers ED1), der phagozytäre Zellen kennzeichnet und somit einen Mikroglia- und Makrophagenmarker darstellt. Die Traumagruppe fiel durch eine signifikante Zunahme an CD68- positiven Zellen im Vergleich zur Kontroll- und Shamgruppe auf. Auch hier zeigten sich regionale Unterschiede, vor allem im Thalamus. Diese Schwankung kann an den kleinen Gruppen liegen, die mit in die Auswertung einbezogen wurden und so eine individuelle Varianz aufweisen. Durch das Trauma könnten vermehrt Mediatoren freigesetzt werden, die chemotaktisch auf phagozytäre Zellen wirken. Mikroglia selbst sind Schlüsselemente während des progressiven Gewebsuntergangs, indem sie innerhalb weniger Minuten nach Schädigung aktiviert werden und selbst auch zytotoxische Moleküle freisetzen (freie Radikale und inflammatorische Zytokine) (Jin et al., 2010). Diese sind in der lokalen inflammatorischen Antwort und Phagozytose involviert (Min et al., 2006) und führen zu einer Exazerbation des Gewebsuntergangs. In der post-traumatischen Phase jedoch führt die phagozytäre Aktivierung zu einer reparativen Kaskade mit Einleitung von Wundheilung und Geweberegeneration (McIntosh et al., 1998). Mikroglia arbeiten in einer Zeit- abhängigen Art und Weise (Jin et al., 2010). Aktivierte Mikroglia führen zur vermehrten Expression von Cx43 in Astrozyten. Nach einem Trauma ist eine gegensätzliche Regulation des Cx43 zu beobachten, zum Teil ist eine reduzierte astrozytäre Interaktion zu Neuronen zu beobachten, andererseits aber eine vermehrte „Kommunikation“ zu Mikrogliazellen (Rouach et al., 2002a). Mikroglia und Astrozyten beeinflussen sich gegenseitig nach Schädigung.

Neben der Aktivierung von Mikrogliazellen ist bekannt, dass nach Hirnläsion auch eine astrozytäre Aktivierung stattfindet. Im Fall von ischämischen wie auch traumatischen Verletzungen resultiert daraus langfristig die astrogliale Narbe

(Raghupathi und Huh, 2007; Rouach et al., 2002a; Koulakoff et al., 2003). In unseren Untersuchungen wurden GFAP und Cx43 analysiert. Für beide Proteine ist bekannt, dass sie nach einer Schädigung wie einer Hirnläsion vermehrt exprimiert sind (Frantseva et al., 2002; Vos et al., 2010; Rouach et al., 2002a; Retamal et al., 2007; Lee et al., 2005; Eng et al., 2000). Einigen neueren Studien zufolge korreliert ein hoher GFAP- Wert mit einer erhöhten Schwere des SHT, einem schlechteren Outcome sowie einer erhöhten Mortalität (Schiff et al., 2012). Des Weiteren wurde in Studien belegt, dass Cx43 unter anderem den Zelltod nach einer Schädigung vermittelt, indem Stressfaktoren von Zelle zu Zelle weitergegeben werden, was in einer Expansion der Schädigung resultiert. Eine Inhibition führt zum reduzierten Zelltod und somit zur Neuroprotektion (Frantseva et al., 2002). Insgesamt wird die Rolle des Cx43 bei Läsionen des Nervensystems allerdings kontrovers erörtert. In anderen Studien wird diskutiert, dass der Anstieg von Cx43 im menschlichen Gehirn zu einer neuronalen Protektion führen soll (Nakase et al., 2006). Neben einem Anstieg kann es auch zu einer Abnahme von Cx43 kommen. Proinflammatorische Agenzien führen mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer Öffnung der Connexine (Retamal et al., 2007).

Die Quantifizierung der GFAP-Immunreaktion zeigte einen deutlichen Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen. In der Traumagruppe wurde doppelt bis dreifach so viel GFAP gebildet wie in der Kontroll- bzw. Shamgruppe. Dies zeigt sich in allen untersuchten Regionen, wie der Gehirnoberfläche, dem Hippokampus und der Thalamusregion. Vor allem in der Hippokampusregion ist der Unterschied besonders deutlich geworden. Insgesamt wurde in unserer Studie ein relativ geringer Anstieg der GFAP- Expression detektiert, der sich jedoch mit der Milde des induzierten Traumas erklären lässt. Metting et al. (2012) fanden heraus, dass die GFAP- Expression nach einem milden Trauma beim Menschen im Gegensatz zu einem schweren SHT nicht zwingend ansteigt und in diesem Fall der prädiktive Wert von GFAP als alleiniger und verlässlicher Biomarker limitiert ist. Des Weiteren korreliert nicht immer die Intensität der Immunfluoreszenz mit dem GFAP- Gehalt (Eng et al., 2000). Hinzu kommt der zeitliche Faktor der Immunfluoreszenz- Untersuchung zwei Wochen nach Traumainduktion. Beim Menschen können GFAP- Peaks im Serum bereits nach ein bis zwei Tagen gemessen werden (Schiff et al., 2012).

In der Cx43-Auswertung zeigte sich ähnlich vergleichend zum GFAP, dass nach einem Trauma signifikant vermehrt Cx43 gebildet und exprimiert wurde. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die Detektion der verwendeten immunhistochemischen Markerproteine geeignet ist, ein diffuses Trauma nachzuweisen. Dieses wurde in vier untersuchten Hirnarealen nachgewiesen. Zudem zeigten die Ergebnisse, dass die Induktion eines milden SHT in juvenilen Ratten nach der Methode von Adelson reproduzierbar und gleichmäßig gelang.

5.2.2 Diffuse axonale Schädigung

Der Nachweis der diffusen axonalen Schädigung mittels APP beruht auf dem gestörten axonalen Transport von Proteinen durch das Trauma. APP wurde erstmals 1994 als Marker für eine axonale Schädigung beschrieben (Sherriff et al., 1994), und in den folgenden Jahren im Hinblick auf räumlich- zeitliche Expression sowie Funktion untersucht (Pierce et al., 1996; Bramlett et al., 1997; Murakami et al., 1998). Nach einer Schädigung mit der Zerstörung von Axonen kommt es zum Stopp des anterograden Transports von APP im Axon, der in der Anhäufung von APP im proximalen Axonbereich resultiert. Dies kann immunhistochemisch nachgewiesen werden. Wie an unseren Bildern zu sehen ist, konnte in vielen Axonen eine APP- Kumulation nachgewiesen werden. Da die APP-Immunhistochemie lediglich an einem Tier durchgeführt wurde, haben die Ergebnisse exemplarischen Charakter und weisen auf den potentiellen Wert dieser Färbung hin. Auch durch das Fehlen des Kontrolltieres in dieser Färbung kann das Ergebnis lediglich als Hinweis gewertet werden. Interessant ist jedoch, dass prinzipiell die Detektion von APP ein wichtiger Weg in der Charakterisierung des Traumas ist, wie durch neuere Studien unterstützt wird. Einerseits konnte gezeigt werden, dass die Akkumulation von APP räumlich distinkt von Axonen mit Neurofilament- Kompaktierung ist (DiLeonardi et al., 2009), und andererseits wurde APP nach traumatischer Hirnläsion in aktuellen Studien ein neuroprotektiver Effekt zugeschrieben (Corrigan et al., 2011).

5.2.3 Störung der Blut-Hirn-Schranke nach Trauma

Der Nachweis einer gestörten BHS- Funktion wurde durch Messung des Farbstoffes EB vom Blut in das Hirnparenchym geführt. EB bindet im Serum an Albumin und kann aufgrund der resultierenden Größe die intakte BHS nicht durchqueren (Saria und Lundberg, 1983). Nach einem SHT mit Öffnung der BHS ist dies jedoch möglich. Wie auch unsere Ergebnisse zeigen, konnte im verwendeten Tiermodell nach Adelson eine Öffnung der BHS nachgewiesen werden. Selbst 24 Stunden nach Traumainduktion zeigte sich eine vermehrte Diffusion von EB ins umliegende Gehirngewebe. Nach 48 Stunden hingegen war die EB- Gewebediffusion auf das Niveau der Kontrolle abgesunken. Die Extravasation von EB nach dem diffusen SHT weist die pathologische endotheliale Permeabilität von Plasmaproteinen in der Größenordnung von Albumin und somit die Störung der BHS- Integrität nach. Zusätzlich wird durch diese Extravasation das Entstehen eines vasogenen Hirnödems nach „Weight drop“ bestätigt, welches vornehmlich in der Literatur primär nach einem Trauma beschrieben wird (Donkin und Vink, 2010). Das Hirnödem nach einer BHS- Schädigung ist mit einer hohen Mortalität und Morbidität verbunden (Donkin und Vink, 2010). Neuere Studien belegen, dass ein Zusammenbruch der BHS nach einem SHT die post-traumatische Epilepsie bei Patienten bedingt (Tomkins et al., 2011).

Insgesamt erwiesen sich die angewandten Färbungen als sehr gute Nachweismöglichkeit, um verschiedene histologische Aspekte der Läsion nachweisen und darstellen zu können. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ein Trauma trotz des geringen Induktionsgewichts stattgefunden hat. Der Nachweis der BHS- Permeabilität wurde hierbei eindeutig durch Messung von EB- Diffusion nach einem induzierten Trauma durch kortikale Blutgefäße erbracht. Der Nachweis der Apoptose wurde mittels geeigneter Markerproteine, wie CC3 durchgeführt, Inflammation wurde durch Nachweis aktivierter Mikroglia (CD68, ED1) immunhistochemisch erbracht und quantifiziert. Diese Parameter zeigten einen deutlichen Anstieg der Werte in der Traumagruppe. Nachweislich stiegen Apoptose und Inflammation im geschädigten Areal (inkl. vorderer Kortex, Thalamus und Hippokampus).

In der Shamgruppe wurden für die Parameter CC3, CD68, GFAP und Cx43 durch den direkten Vergleich mit der Kontrollgruppe gezeigt, dass kein zerebraler

Schaden durch die Scheinoperation mit Eröffnung der Dura mater erfolgte und kaum ein Unterschied zu der Kontrollgruppe bestand. Lediglich im Thalamus zeigte sich einmalig auch bei der Shamgruppe eine vermehrte Apoptose und Mikrogliaaktivität als in der Kontrolle. Durch die geringe Gruppengröße kann entsprechend eine individuelle Varianz zu derartigen Ausreißern führen.

Das Modell mit den entsprechenden Kontrollen ist geeignet, ein mildes SHT mit diffusem neuronalen Schaden auszulösen. Durch die verwendeten Methoden konnte die resultierende Schädigung im Hinblick auf Apoptose, Inflammation, BHS- Durchlässigkeit und APP- Akkumulation nachgewiesen werden. Diese Parameter können in der Folge herangezogen werden, um mögliche Effekte der Transplantation von humanem Nabelschnurblut zu analysieren.

5.2.4 Transplantation von Zellen aus Nabelschnurblut

Die Transplantation humaner Zellen aus Nabelschnurblut ist mit hohen Erwartungen an das therapeutische Potential verbunden. Nicht nur im Einsatz bei chronischen Erkrankungen, sondern auch zur Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen (nach einem Myokardinfarkt), bei Krebs, Diabetes, Schlaganfall und auch nach einem SHT erhofft man sich den Therapieeinsatz (Alison et al., 2002).

Humanes Nabelschnurblut ist schnell und einfach verfügbar und reich an pluripotenten Stammzellen mit der Möglichkeit der Differenzierung in verschiedene Zellarten (Lu et al., 2002). Im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen löst ihr Einsatz keine ethischen Probleme und Diskussionen aus. Ihre Handhabung ist ebenso sicher und effektiv. Weiterhin bieten sie gegenüber Knochenmarkstammzellen einige Vorteile, wie eine schnellere Verfügbarkeit und eine bessere Verträglichkeit, indem sie aufgrund ihrer immunologischen Unreife deutlich weniger Graft-versus-Host-disease (Transplantatabstoßung) auslösen (Bojanic und Golubic Cepulic, 2006; Ali und Bahbahani, 2010). Sie bieten die Möglichkeit zur autologen wie auch allogenen Transplantation (Armson, 2005). Im Gegensatz zu Knochenmarkszellen liegt ein Nachteil in ihrer geringen gewinnbaren Gesamtzellzahl aus dem Nabelschnurblut und dem langsameren Heranwachsen dieser Zellen (Armson, 2005). Durch den Einsatz von Doppeltransplantationen lässt sich dies aber kompensieren (Kurtzberg, 2009). Die Nabelschnurblut-Transplantation hat sich zu einem etablierten Feld mit enormem Potential

entwickelt (Kurtzberg, 2009) und ihr therapeutisches Potential wird in vielen klinischen Studien untersucht.

In der Therapie des SHT ist das Ziel, den Sekundärschaden, der im Gegensatz zur Primärläsion reversibel ist, einzudämmen. Hier liegt der viel versprechende Einsatz von Zellen aus Nabelschnurblut. Das ultimative Ziel dieser Zelltherapie ist die Entdeckung und Überbringung lebensfähiger Zellen in geschädigte Hirnareale mit der Hoffnung, dass diese transplantierten Zellen direkt oder indirekt die geschädigten neuronalen Verbindungen wieder herstellen und die Regeneration fördern (Borlongan et al., 2004). Dieser Effekt konnte bereits nach Ischämie gezeigt werden. Ischämisches Gehirngewebe exprimiert chemotaktische Proteine und Adhäsionsmoleküle (Chen et al., 2001; Rosenkranz et al., 2012a), die Zellen aus Nabelschnurblut zur Läsion migrieren lassen. Kandidaten chemotaktischer Faktoren sind Chemokine wie MCP-1, MIP-1alpha, Interleukin-6. Für SDF-1 konnte nach Hypoxie eine verstärkte Expression in Astrozyten des Läsionsareals sowie ein Einfluss auf die Migration der Zellen aus Nabelschnurblut nachgewiesen werden (Rosenkranz und Meier, 2011). Intravenös oder intraperitoneal transplantierte Zellen konnten im geschädigten Gehirnareal nachgewiesen werden (Chen et al., 2001; Meier et al., 2006; Rosenkranz und Meier, 2011). Dieses initiale Einwandern von zirkulierenden Zellen in spezifische Organe wird als „Homing“ bezeichnet (Kyriakou et al., 2008).

Nach dem induzierten SHT in juvenilen Ratten wurde untersucht, ob intraperitoneal transplantierte mononukleäre Zellen aus humanem Nabelschnurblut nach vorheriger Aufarbeitung und Vitalitätsbestimmung ($95\pm 0,2\%$) im läsionierten Gehirn detektiert werden können. Wie auch in anderen Studien verwendet, nutzten wir den immunhistochemischen Nachweis von human-spezifischen Molekülen, wie HNA und HLA-DR, in den transplantierten Zellen. In keinem der aufgearbeiteten Gehirne konnten zwei Wochen nach Transplantation HNA- oder HLA- positive Zellen nachgewiesen werden.

In der Folge wurden verschiedene Parameter, die als mögliche Ursache für die Erfolglosigkeit des Zell- „Homing“ angesehen werden könnten, berücksichtigt und im experimentellen Design verändert. Mögliche Parameter sind a) der Zeitpunkt der Transplantation, b) die Durchlässigkeit der BHS, c) die Notwendigkeit von Immunsuppressiva.

Bei intraperitonealer Applikation von Zellen aus Nabelschnurblut ist die Öffnung der BHS zum Zeitpunkt der Transplantation Voraussetzung für den Eintritt der Zellen ins Gehirn. Für unser Modell konnte durch den Nachweis der EB-Extravasation ins Hirnparenchym nachgewiesen werden, dass die BHS zum Zeitpunkt der Transplantation (24 Stunden nach Trauma) geöffnet ist. Selbst die als Kontrolle durchgeführte Transplantation der Zellen aus Nabelschnurblut zu einem früheren Zeitpunkt (2 Stunden nach Trauma) führte nicht zum Nachweis der humanen Zellen im Gehirn. In Umgehung der BHS wurden einigen Tieren Zellen aus Nabelschnurblut intracisternal appliziert (Cisterna cerebellomedullaris). Auch bei diesen Tieren war ein Nachweis der Zellen nicht möglich, so dass möglicherweise von mangelnder Verfügbarkeit chemotaktischer Faktoren ausgegangen werden muss. Dem könnte ursächlich die erfolgte Applikation von Analgetika zugrunde liegen. Möglich ist jedoch auch, dass die Expression chemotaktischer Faktoren nach einem diffusen Trauma nicht zur Induktion des Zell- „Homings“ ausreicht.

Für Analgetika, insbesondere der Opioid- Gruppe ist bekannt, dass eine Suppression der Zytokinsekretion an der Läsion die Folge sein kann. Somit könnten sich diese Analgetika negativ auf chemotaktische Vorgänge, wie das „Homing“ der Zellen aus Nabelschnurblut auswirken. Alternativ wurden daher eine Reihe pharmakologisch unterschiedlich wirksamer Analgetika benutzt (mit dem Fokus auf deren Effekte bzgl. einer Suppression der Inflammation und Zytokinfreisetzung). Keines der verwendeten Analgetika resultierte in einem erfolgreichen „Homing“ der Nabelschnurblutzellen.

Eine weitere Option war, dass transplantierte humane Zellen vom Empfängerimmunsystem als fremd erkannt und eliminiert werden können. Aus diesem Grund wurden zwei zusätzlichen Ratten Immunsuppressiva (Cyclosporin A) simultan zur Transplantation der humanen mononukleären Zellen appliziert. Auch bei diesen beiden Tieren, die aufwändig getrennt, gepflegt und überwacht wurden, konnten keine positiven Zellen im Gehirn nachgewiesen werden. Die Detektionsmethoden sind mit den verwendeten zwei Antikörpern sicher nicht erschöpft, so dass in weiterführenden Versuchen andere Antigene detektiert werden sollten bzw. Zellen appliziert werden sollten, die bereits vor Transplantation markiert wurden.

Trotz des fehlenden Nachweises der humanen Zellen im Gehirn zeigten sich in der Gruppe der Traumatiere mit nachfolgender Zelltransplantation signifikante Veränderungen bei den Parametern Apoptose und Inflammation.

Die Anzahl CC3- immunpositiver Zellen war nach Applikation humaner Zellen aus Nabelschnurblut deutlich erniedrigt. An der cranialen Hirnoberfläche war dieser Unterschied nicht signifikant, im caudalen Bereich und im Thalamus zeigte sich eine signifikante Reduktion der Apoptose. Auch im vorderen Hippokampusbereich konnte eine Senkung der Zahl apoptotischer Zellen nach Transplantation umbilikaler Zellen nachgewiesen werden.

Die Transplantation der Zellen aus Nabelschnurblut ging insgesamt mit einem deutlichen anti- apoptotischen Effekt einher. Ähnliche Effekte wurden bereits *in vitro* (Reich et al., 2008; Hau et al., 2008) und *in vivo* (Rosenkranz et al., 2012a) nach Hypoxie beschrieben. Die transplantierten Zellen resultierten zwei Wochen nach dem Trauma auch in einem anti- inflammatorischen Effekt, wie er in der Literatur beschrieben wird (Walker et al., 2009). Zudem zeigte sich bei den Traumatieren mit Zellen, dass es nach Zelltransplantation zu einem geringeren Anstieg bzw. teils zu einer Reduktion der Expression von GFAP- Protein kommt. Dies könnte für eine protektive Wirkung der transplantierten Zellen sprechen, da in klinischen Studien der Nachweis erbracht werden konnte, dass eine erhöhte GFAP- Konzentration im Serum als starker Prädiktor für Zelltod und nachteiliges Outcome gewertet wird und gilt (Vos et al., 2010; Schiff et al., 2012). Erhöhte GFAP- Werte korrelieren gut mit dem Ausmaß der Verletzung bereits sechs Stunden nach Trauma. Für GFAP wird deshalb in neueren Studien diskutiert, in wie weit er als potentieller klinischer Biomarker im Serum für die Diagnose, Prognose und einer Vorhersage für Mortalität nach einem SHT herangezogen werden kann (Schiff et al., 2012).

An der Hirnoberfläche und dem Thalamus korrelierte die Transplantation von Nabelschnurblutzellen zudem mit einer Reduktion der Cx43- Proteinexpression. Dies weist auf eine verminderte Aktivierung der Astrozyten und somit der verminderten Ausbildung einer Glianarbe hin und damit möglicherweise auf einen protektiven Effekt der Zellen. Durch Inhibition des Cx43 werden aktive schädliche Moleküle zwischen den Astrozyten nicht ausgetauscht, apoptotische Signale untereinander unterbunden und somit das gesunde und intakte Gehirngewebe vom Läsionsareal isoliert.

Da die Zellen aus Nabelschnurblut nach Transplantation nicht nachgewiesen werden konnten, aber ein eindeutiger Beleg für ihre modulatorische Wirkung vorlag, waren möglicherweise indirekte Mechanismen für die beobachteten Effekte verantwortlich. Eine Hypothese ist, dass die transplantierten Zellen Chemo- und Zytokine freisetzen, die die bereits beschriebenen und weitere Effekte auslösen. Borlongan et al. (2004) postulierten, dass eine funktionelle Verbesserung durch transplantierte Zellen nach Ischämie nicht durch den Eintritt der transplantierten Zellen in das Gehirn verursacht wird, sondern durch Mediatoren und neuroprotektive Moleküle, die von diesen transplantierten Zellen sezerniert werden. Diese Moleküle könnten die BHS penetrieren, die geschädigten Hirnareale erreichen und dadurch zu einer verbesserten Funktionalität bzw. zur Herstellung eines regenerativen Milieus führen. Auch ein systemischer immunmodulatorischer Effekt, wie von Rosenkranz et al. (2012b) beschrieben, kann unterstützend wirken. Unsere Daten weisen ebenfalls auf die Bedeutung der indirekten Mechanismen nach Transplantation umbilikaler Zellen hin. Dieser Befund unterstützt die Hypothese, dass die Sekretion trophischer Moleküle ein entscheidender Parameter nach Zelltransplantation ist und dazu beiträgt, endogene Prozesse der funktionellen Wiederherstellung im Gehirn zu fördern. Möglicherweise können transplantierte Zellen ohne Passage der BHS die Effekte auf die geschädigten Areale aus der Peripherie ausüben und somit für die verbesserten Funktionen verantwortlich gemacht werden (Borlongan et al., 2004; Rosenkranz und Meier, 2011; Walker et al., 2009; Lu et al., 2002).

Eine neurale Differenzierung der transplantierten Zellen, die ursprünglich als Voraussetzung für regeneratives Potential postuliert und angesehen wurde (Saporta et al., 2003; Sanchez-Ramos et al., 2001; Buzańska et al., 2002; Zigova et al., 2002), scheint jedenfalls nicht oder nur in geringem Maße für den therapeutischen Effekt verantwortlich zu sein.

Parameter der Zelltransplantation wie Dosis und Konzentration der transplantierten Zellen, zeitliche Folge von Läsion und Transplantation sowie die Frage nach einer notwendigen Immunsuppression (Bliss et al., 2007) müssen vor einer klinischen Anwendung erforscht und standardisiert werden. Zudem sind Langzeit-Studien notwendig, um den Nachweis zu führen, dass die beobachteten Änderungen der Expression von Dauer sind. Die Untersuchung möglicher funktioneller Verbesserungen der Tiere stehen ebenfalls noch aus. Viel

versprechende präklinische Daten haben dazu geführt, dass verschiedene klinische Studien initiiert wurden, um die Zelltherapie bei neurologischen Krankheiten zu untersuchen (Walker et al., 2009), wie eine Phase I- Studie bei 5-14jährigen Kindern nach einem SHT. Hierbei wurden Kindern autologe mononukleäre Knochenmarkszellen intravenös nach einem schweren SHT verabreicht. Diese Verabreichung erwies sich nach sechs Monaten Beobachtung als sicher und resultierte auch in einem verbesserten funktionalen Outcome. Durch zahlreiche Ausschlusskriterien fehlte letztendlich die Signifikanz. Die nachgewiesene Sicherheit in der Verabreichung von Zellen und die viel versprechenden klinischen Studien rechtfertigen und garantieren jedoch die weitere zukünftige Durchführung kontrollierter Phase II- Studien (Cox et al., 2011) und stimmen optimistisch.

5.3 Schlussbetrachtungen

In diesem an Jungtiere angepassten „Weight drop“- Modell gelang die Induktion einer standardisierten und reproduzierbaren milden und diffusen Läsion nach SHT, wie sie im Kindesalter am häufigsten vorkommt.

Weiterhin konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die angewandten histologischen und immunhistochemischen Methoden sich als sehr gute Nachweismöglichkeit erwiesen, um verschiedene Aspekte, wie Apoptose, Inflammation, Integrität der BHS, nach einem SHT darstellen zu können. Mittels dieser Methoden konnte der Nachweis eines stattgefundenen Traumas geführt werden. In der Shamgruppe konnte gezeigt werden, dass für die meisten Parameter und Areale kein signifikanter Unterschied zu der Kontrollgruppe besteht. Das bedeutet, dass die Präparation ebenso wie die Narkose keinen relevanten Einfluss auf die Schädigung des Gehirns aufwies.

Trotz des fehlenden Nachweises der humanen Zellen im Gehirn zeigten sich im Tierversuch eine deutliche Reduktion von Apoptose und Inflammation nach Gabe von hUCB. Damit kann von einer indirekten Mediation anti- apoptotischer und anti- inflammatorischer Effekte umbilikaler Zellen ausgegangen werden.

Diese Ergebnisse wurden derart erstmalig für juvenile Ratten nachgewiesen.

6. Literaturverzeichnis

1. Adams JH, Mitchell DE, Graham DI, Doyle D (1977) Diffuse brain damage of immediate impact type: its relationship to "primary brain stem damage" in head injury. *Brain* 100:489-502
2. Adelson PD, Robichaud P, Hamilton RL, Kochanek PM (1996) A model of diffuse traumatic brain injury in the immature rat. *J Neurosurg* 85:877-887
3. Adelson PD, Whalen MJ, Kochanek PM, Robichaud P, Carlos TM (1998) Blood brain barrier permeability and acute inflammation in two models of traumatic brain injury in the immature rat: A preliminary report. *Acta Neurochir* 71:104-106
4. Alderson P, Roberts I (2005) Corticosteroids for acute traumatic brain injury. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 3:1-27
5. Alvarez-Buylla A, Ling CY, Kirn JR (1990) Cresyl violet: a red fluorescent Nissl stain. *Journal of Neuroscience Methods* 33:129-133
6. Aktas O, Ullrich O, Infante-Duarte C, Nitsch R, Zipp F (2007) Neuronal damage in brain inflammation. *Arch Neurology* 64:185-189
7. Ali H, Bahbahani H (2010) Umbilical cord blood stem cells – potential therapeutic tool for neural injuries and disorders. *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 70:316-324
8. Alison MR, Poulsom R, Forbes S, Wright NA (2002) An introduction to stem cells. *Journal of Pathology* 197:419-423
9. Anderson V, Catroppa C, Morse S, Haritou F, Rosenfeld J (2005) Functional plasticity or vulnerability after early brain injury? *Pediatrics* 116:1374-1382
10. Anderson V, Gofrey C, Rosenfeld JV, Catroppa C (2012) Predictors of cognitive function and recovery 10 years after traumatic brain injury in young children. *Pediatrics* 129:e254-e261
11. Andrews TK, Rose FD, Johnson DA (1998) Social and behavioural effects of traumatic brain injury in children. *Brain Injury* 12:133-138
12. Armson BA (2005) Umbilical cord blood banking: Implications for perinatal care providers. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada* 27:263-274
13. Awasthi D, Church DF, Torbati D, Carey ME, Pryor WA (1997) Oxidative stress following traumatic brain injury in rats. *Surg. Neurol.* 47:575-581

14. Bakhtiary M, Marzban M, Mehdizadeh M, Joghataei MT, Khoei S, Pirhajati-Mahabadi V, Laribi B, Tondar M, Moshforoush A (2010) Comparison of transplantation of bone marrow stromal cells (BMSC) and stem cell mobilization by granulocyte colony stimulation factor after traumatic brain injury in rat. *Iran Biomed J* 14:142-149
15. Beer R, Franz G, Srinivasan A, Hayes RL, Pike BR, Newcomb JK, Zhao X, Schmutzhard E, Poewe W, Kampf A (2000) Temporal profile and cell subtype distribution of activated caspase-3 following experimental traumatic brain injury. *Journal of Neurochemistry* 75:1264-1273
16. Bellander B-M, Olafsson IH, Ghatan PH, Skejo HPB, Hansso L-O, Wanecek M, Svensson MA (2010) Secondary insults following traumatic brain injury enhance complement activation in the human brain and release of the tissue damage marker S100B. *Acta Neurochirur* 1:90-100
17. Bickel U, Yoshikawa T, Pardridge WM (2001) Delivery of peptides and proteins through the blood-brain barrier. *Advanced Drug Delivery Reviews* 46:247-279
18. Bliss T, Guzman R, Daadi M, Steinberg GK (2007) Cell transplantation therapy for stroke. *Stroke* 38:817-826
19. Blyth BJ, Farhavar A, Gee C, Hawthorn B, He H, Nayak A, Stöcklein V, Bazarian JJ (2009) Validation of serum markers for blood-brain barrier disruption in traumatic brain injury. *Journal of Neurotrauma* 26:1497-1507
20. Böcker W, Denk H, Heitz PU (2004) *Repetitorium Pathologie*. Elsevier, Urban & Fischer Verlag, München
21. Bongcam-Rudoloff E, Nister M, Betsholtz C, Wang J-L, Stenman G, Huebner K, Croce CM, Westermarck B (1991) Human glial fibrillary acidic protein: complementary DNA cloning, chromosome localization and messenger RNA expression in human glioma cell lines of various phenotypes. *Cancer Research* 51:1553-1560
22. Bojanic I, Golubic Cepulic B (2006) Umbilical cord blood as source of stem cells. *Acta medica Croatica* 60:215-225
23. Borlongan CV, Hadman M, Sanberg CD, Sanberg PR (2004) Central nervous system entry of peripherally injected umbilical cord blood cells is not required for neuroprotection in stroke. *Stroke* 35:2385-2389
24. Bramlett HM, Kraydieh S, Green EJ, Dietrich WD (1997) Temporal and regional patterns of axonal damage following traumatic brain injury: a beta-amyloid precursor protein immunocytochemical study in rats. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 56:1132-1141
25. Bushnik T, Hanks RA, Kreutzer J, Rosenthal M (2003) Etiology of traumatic brain injury: Characterization of differential outcomes up to 1 year post injury. *Arch Phys Med Rehabil* 84:255-262

26. Buzańska L, Machaj EK, Zabłocka B, Pojda Z, Domańska-Janik K (2002) Human cord blood-derived cells attain neuronal and glial features in vitro. *Journal of Cell Science* 115:2132-2138
27. Cattelani R, Lombardi F, Brianti R, Mazzucchi A (1998) Traumatic brain injury in childhood: intellectual, behavioural and social outcome into adulthood. *Brain Injury* 12:283-296
28. Catroppa C, Anderson VA, Morse SA, Haritou F, Rosenfeld JV (2008) Outcome and predictors of functional recovery 5 years following pediatric traumatic brain injury (TBI). *Journal of Pediatric Psychology* 33:707-718
29. Cenci MA, Whishaw IQ, Schallert T (2002) Animal models of neurological deficits: how relevant is the rat? *Nature Reviews Neuroscience* 3:574-579
30. Chen Y, Constantini S, Trebovler V, Weinstock M, Shohami E (1996) An experimental model of closed head injury in mice: pathophysiology, histopathology, and cognitive deficits. *Journal of Neurotrauma* 13:557-568
31. Chen J, Sanberg PR, Li Y, Wang L, Lu M, Willing AE, Sanchez-Ramos J, Chopp M (2001) Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioural deficits after stroke in rats. *Stroke* 32:2682-2688
32. Conti AC, Raghupathi R, Trojanowski JQ, McIntosh TK (1998) Experimental brain injury induces regionally distinct apoptosis during the acute and delayed post-traumatic period. *The Journal of Neuroscience* 18:5663- 5672
33. Contreras JE, Sánchez HA, Eugenin EA, Speidel D, Theis M, Willecke K, Bukauskas FF, Bennett MVL, Sáez JC (2001) Metabolic inhibition induces opening of unopposed connexin 43 gap junction hemichannels and reduces gap junctional communication in cortical astrocytes in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:495-500
34. Corrigan F, Pham CL, Vink R, Blumbergs PC, Masters CL, van den Heuvel C, Cappai R (2011) The neuroprotective domains of the amyloid precursor protein, in traumatic brain injury, are located in the two growth factor domains. *Brain Res.* 1378:137-143
35. Cortez SC, McIntosh TK, Noble LJ (1989) Experimental fluid percussion brain injury: vascular disruption and neuronal and glial alterations. *Brain Research* 482:271-282
36. Cox CS, Baumgartner JE, Harting MT, Worth LL, Walker PA, Shah SK, Ewing-Cobbs L, Hasan KM, Day M-C, Lee D, Jimenez F, Gee A (2011) Autologous bone marrow mononuclear cell therapy for severe traumatic brain injury in children. *Neurosurgery* 68:588-600
37. Damoiseaux JGMC, Döpp EA, Calame W, Chao D, MacPherson GG, Dijkstra CD (1994) Rat macrophage lysosomal membrane antigen recognized by monoclonal antibody ED1. *Immunology* 83:140-147

38. Dijkstra CD, Döpp EA, Joling P, Kraal G (1985) The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. *Immunology* 54:589-599
39. DiLeonardi AM, Huh JW, Raghupathi R (2009) Impaired axonal transport and neurofilament compaction occur in separate populations of injured axons following diffuse brain injury in the immature rat. *Brain Res.* 1263:174-182
40. Dixon CE, Lyeth BG, Povlishock JT, Findling RL, Hamm RJ, Marmarou A, Young HF, Hayes RL (1987) A fluid percussion model of experimental brain injury in the rat. *J. Neurosurg* 67:110-119
41. Dixon CE, Clifton GL, Lighthall JW, Yaghami AA, Hayes RL (1991) A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat. *Journal of Neuroscience Methods* 39: 253-262
42. Donkin JJ, Vink R (2010) Mechanisms of cerebral edema in traumatic brain injury: therapeutic developments. *Curr. Opin. Neurol.* 23:293-299
43. Edwards P, Arango M, Balica L, Cottingham R, El-Sayed H, Farrell B, Fernandes J, Gogichaisvili T, Golden N, Hartzenberg B, Husain M, Ulloa MI, Jerbi Z, Khamis H, Komolafe E, Laloe V, Lomas G, Ludwig S, Mazairac G, Munoz Sanchez L, Nasi L, Ollidashi F, Plunkett P, Roberts I, Sandercock P, Shakur H, Soler C, Stocker R, Svoboda P, Trenkler S, Venkataramana NK, Wasserberg J, Yates D, Yutthakasemsunt S (2005) Final results of MRC CRASH, a randomised placebo-controlled trial of intravenous corticosteroid in adults with head injury-outcomes at 6 months. *Lancet* 365:1957-1959
44. Elf K, Nilsson P, Enblad P (2002) Outcome after traumatic brain injury improved by an organized secondary insult program and standardized neurointensive care. *Crit Care Med* 30:2129-2134
45. Eldadah BA, Faden AI (2000) Caspase pathways, neuronal apoptosis and CNS injury. *Journal of Neurotrauma* 17:811-829
46. Eng LF, Vanderhaeghen JJ, Bignami A, Gerstl B (1971) An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Research* 28:351-354
47. Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL (2000) Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one-years (1969-2000). *Neurochemical Research* 25:1439-1451
48. Ewing-Cobbs L, Prasad MR, Kramer L, Cox Jr, CS, Baumgartner J, Fletcher S, Mendez D, Barnes M, Zhang X, Swank P (2006) Late intellectual and academic outcomes following traumatic brain injury sustained during early childhood. *J Neurosurg* 105:287-296
49. Escolar ML, Poe MD, Provenzale JM, Richards KC, Allison J, Wood S, Wenger DA, Pietryga D, Wall D, Champagne M, Morse R, Krivit W, Kurtzberg J (2005) Transplantation of umbilical-cord blood in babies with infantile Krabbe's disease. *The new England Journal of Medicine* 352:2069-2081

50. Fay TB, Yeates KO, Wade SL, Drotar D, Stancin T, Taylor HG (2009) Predicting longitudinal patterns of functional deficits in children with traumatic brain injury. *Neuropsychology* 23:271-282
51. Feeney DM, Boyeson MG, Linn RT, Murray HM, Dail WG (1981) Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat. *Brain Research* 211:67-77
52. Finnie JW, Blumbergs PC (2002) Traumatic brain injury. *Vet Pathol* 39:679-689
53. Foda MA, Marmarou A (1994) A new model of diffuse brain injury in rats, Part II: Morphological characterization. *J Neurosurg* 80:301-313
54. Frantseva MV, Kokarovtseva L, Naus CG, Carlen PL, MacFabe D, Velazquez JLP (2002) Specific gap junctions enhance the neuronal vulnerability to brain traumatic injury. *The Journal of Neuroscience* 22:644-653
55. Frommelt P, Lösslein H (2010) *Neurorehabilitation – Ein Praxisbuch für interdisziplinäre Teams*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg
56. Gagnon I, Forget R, Sullivan SJ, Friedman D (1998) Motor performance following a mild traumatic brain injury in children: an exploratory study. *Brain Injury* 12:843-853
57. Garbuzova-Davis S, Willing AE, Zigova T, Saporta S, Justen EB, Lane JC, Hudson JE, Chen N, Davis CD, Sanberg PR (2003) Intravenous administration of human umbilical cord blood cells in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: distribution, migration and differentiation. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research* 12:255-270
58. Gennarelli TA (1994) Animate models of human head injury. *Journal of Neurotrauma* 11:357-368
59. Gennarelli TA, Thibault LE, Graham DI (1998) Diffuse axonal injury: an important form of traumatic brain damage. *Neuroscientist* 4:202-215
60. Gertz SD (2003) *Basiswissen Neuroanatomie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York
61. Goldstein G, Toren A, Nagler A (2007) Transplantation and other uses of human umbilical cord blood and stem cells. *Current Pharmaceutical Design* 13:1363-1373
62. Graham SH, Chen J, Clark RS (2000) Bcl-2 family gene products in cerebral ischemia and traumatic brain injury. *Journal of Neurotrauma* 17:831-841
63. Hau S, Reich DM, Scholtz M, Naumann W, Emmrich F, Kamprad M, Boltze J (2008) Evidence for neuroprotective properties of human umbilical cord blood cells after neuronal hypoxia in vitro. *BMC Neuroscience* 9:30
64. Hicks PR, Smith DH, Lowenstein DH, Saint Marie R, McIntosh TK (1993) Mild experimental brain injury in the rat induces cognitive deficits associated with regional neuronal loss in the hippocampus. *Journal of Neurotrauma* 10:405-414

65. Hicks RR, Soares HD, Smith DH, McIntosh TK (1996) Temporal and spatial characterization of neuronal injury following lateral fluid-percussion brain injury in the rat. *Acta Neuropathol* 91:236-246
66. Hofmeijer J, Veldhuis WB, Schepers J, Nicolay K, Kappelle LJ, Bär PR, van der Worp HB (2004) The time course of ischemic damage and cerebral perfusion in a rat model of space-occupying cerebral infarction. *Brain Research* 1013:74-82
67. Hofman PAM, Stapert SZ, van Kroonenburgh MJPG, Jolles J, de Kruijk J, Wilmink JT (2001) MR Imaging, single-photon emission CT and neurocognitive performance after mild traumatic brain injury. *American Journal of Neuroradiology* 22:441-449
68. Holmin S, Schalling M, Hojeberg B, Nordqvist AC, Skeftruna AK, Mathiesen T (1997) delayed cytokine expression in rat brain following experimental contusion. *J. Neurosurg.* 86:493-504
69. Holtz H (2009) Apoptose - was ist das? Bedeutung bei koronarer Herzkrankheit und Infarkt. *Herz* 24:196-210
70. Hortobagyi T, Wise S, Hunt N, Cary N, Djurovic V, Fegan-Earl A, Shorrock K, Rouse D, Al-Sarraj S (2007) Traumatic axonal damage in the brain can be detected using beta-APP immunohistochemistry within 35 min after head injury to human adults. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 33:226–237
71. Hu SL, Luo HS, Li JT, Xia YZ, Li L, Zhang LJ, Meng H, Cui GY, Chen Z, Wu N, Lin JK, Zhu G, Feng H (2010) Functional recovery acute traumatic spinal cord injury after transplantation of human umbilical cord mesenchymale stem cells. *Crit Care Med* 38: 2181-2189
72. Jennett B (2002) The Glasgow coma scale: History and current practice. *Trauma* 4:91-103
73. Jiang L, Womble T, Saporta S, Chen N, Sanberg CD, Sanberg PR, Willing AE (2010) Human umbilical cord blood cells - decrease microglial survival in vitro. *Stem Cells and Development* 19:221-228
74. Jin Y, Silverman AJ, Vannucci SJ (2009) Mast cells are early responders after hypoxia-ischemia in immature rat brain. *Stroke* 40:3107-3112
75. Jin R, Yang G, Li G (2010) Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. *Journal of Leukocyte Biology* 87:779-789
76. Jung CS, Foerch C, Schänzer A, Heck A, Plate KH, Seifert V, Steinmetz H, Raabe A, Sitzer M (2007) Serum GFAP is a diagnostic marker for glioblastoma multiforme. *Brain* 130:3336-3641
77. Kim HJ, Lee JH, Kim SH (2010) Therapeutic effects of human mesenchymale stem cells on traumatic brain injury in rats: secretion of neurotrophic factors and inhibition of apoptosis. *Journal of Neurotrauma* 27:131-138

78. Koizumi H, Fujisawa H, Ito H, Maekawa T, Di X, Bullock R (1997) Effects of mild hypothermia on cerebral blood flow-independent changes in cortical extracellular levels of amino acids following contusion trauma in the rat. *Brain Research* 747:304-312
79. Koulakoff A, Meme W, Calvo C-F, Ezan P, Rouach N, Giaume C (2003) Neurons and brain macrophages regulate connexin expression in cultured astrocytes. *cell communication adhesion* 10:407-411
80. Kumar A, Loane DJ (2012) Neuroinflammation after traumatic brain injury: Opportunities for therapeutic intervention. *Brain Behav Immun* 26:1191-1201
81. Kurtzberg J (2009) Update on umbilical cord blood transplantation. *Curr Opin Pediatr* 21:22-29
82. Kyriakou C, Rabin N, Pizzey A, Nathwani A, Yong K (2008) Factors that influence short-term homing of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a xenogeneic animal model. *Haematologica* 93:1457-1465
83. Langham J, Goldfrad C, Teasdale G, Shaw D, Rowan K (2003) Calcium channel blockers for acute traumatic brain injury. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 4:1-23
84. Langlois JA, Rutland-Brown W, Wald MM (2006) The epidemiology and impact of traumatic brain injury: A brief overview. *J Head Trauma Rehabil* 21:375–378
85. Lee IH, Lindqvist E, Kiehn O, Widenfalk J, Olson L (2005) Glial and neuronal connexin expression patterns in the rat spinal cord during development and following injury. *The Journal of Comparative Neurology* 489:1-10
86. Leker RR, Shohami E, Constantini S (2002) Experimental models of head trauma. *Acta Neurochir* 83:49-54
87. Liebich H-G (2003) Funktionelle Histologie der Haussäugetiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis. Schattauer Verlag, Stuttgart New York
88. Lighthall JW (1988) Controlled cortical impact: A new experimental brain injury model. *Journal of Neurotrauma* 5:1-15
89. Lin JH-C, Yang J, Liu S, Takano T, Wang X, Gao Q, Willecke K, Nedergaard M (2003) Connexin mediates gap junction-independent resistance to cellular injury. *The Journal of Neuroscience* 23:430-441
90. Lowenstein DH, Thomas MJ, Smith DH, McIntosh TK (1992) Selective vulnerability of dentate hilar neurons following traumatic brain injury: A potential mechanistic link between head trauma and disorders of the hippocampus. *The Journal of Neuroscience* 12:4846-4853
91. Longhi L, Saatman KE, Raghupathi R, Laurer HL, Lenzlinger PM, Riess P, Naugebauer E, Trojanowski JQ, Lee VM-Y, Grady MS, Graham DI, McIntosh TK (2001) A review and rationale for the use of genetically engineered animals in the

- study of traumatic brain injury. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 21:1241-1258
92. Lu D, Sanberg PR, Mahmood A, Li Y, Wang L, Sanchez-Ramos J, Chopp M (2002) Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces neurological deficit in the rat after traumatic brain injury. *Cell Transplantation* 11:275-281
 93. Marmarou A, Foda MA, van der Brink W, Campbell J, Kita H, Demetriadou K (1994) A new model of diffuse brain injury in rats, Part I: Pathophysiology and biomechanics. *J Neurosurg* 80:291-300
 94. Mazzola CA, Adelson PD (2002) Critical care management of head trauma in children. *Critical Care Medicine* 30:393-401
 95. McDowell S, Whyte J, D'Esposito M (1997) Working memory impairments in traumatic brain injury: evidence from a dual-task paradigm. *Neuropsychologia* 35:1341-1353
 96. McGraw P, Liang L, Escolar M, Mukundan S, Kurtzberg J, Provenzale J M (2005) Krabbe disease treated with hematopoietic stem cell transplantation: serial assessment of anisotropy measurements-initial experience. *Radiology* 236:221-230
 97. McIntosh TK, Saatman KE, Raghupathi R, Graham DI, Smith DH, Lee V-M, Trojanowski JQ (1998) The Dorothy Russell memorial lecture - The molecular and cellular sequelae of experimental traumatic brain injury: pathogenetic mechanisms. *Neuropathology Applied Neurobiology* 24:251-267
 98. Meier C, Middelains J, Wasielewski B, Neuhoff S, Roth-Haerer A, Gantert M, Dinse HR, Dermietzel R, Jensen A (2006) Spastic paresis after perinatal brain damage in rats is reduced by human cord blood mononuclear cells. *Pediatric Research* 59:244-249
 99. Mème W, Calvo C-F, Froger N, Ezan P, Amigou E, Koulakoff A, Giaume C (2006) Proinflammatory cytokines released from microglia inhibit gap junctions in astrocytes: potentiation by β -amyloid. *The FASEB Journal* 20:494-496
 100. Merck (2011a) Mikroskopie: Mayers Hämalaunlösung
 101. Merck (2011b) Mikroskopie: Kresylviolett (Acetat) Certistain
 102. Metting Z, Wilczak N, Rodiger LA, Schaaf JM, van der Naalt J (2012) GFAP and S100B in the acute phase of mild traumatic brain injury. *Neurology* 78(18):1428-1433
 103. Miles AN, Knuckey NW (1998) Apoptotic neuronal death following cerebral ischaemia. *Journal of Clinical Neuroscience* 5:125-145
 104. Min K-J, Yang M-S, Kim S-U, Joe, EH (2006) Astrocytes induce hemeoxygenase-1 expression in microglia: a feasible mechanism for preventing excessive brain inflammation. *The Journal of Neuroscience* 26:1880-1887

105. Murakami N, Yamaki T, Iwamoto Y, Sakakibara T, Kobori N, Fushiki S, Ueda S (1998) Experimental brain injury induces expression of amyloid precursor protein, which may be related to neuronal loss in the hippocampus. *Journal of Neurotrauma* 15:993-1003
106. Nakase T, Yoshida Y, Nagata K (2006) Enhanced connexin 43 immunoreactivity in penumbral areas in the human brain following ischemia. *Glia* 54:369-375
107. Nan Z, Grande A, Sanberg CD, Sanberg PR, Low WC (2005) Infusion of human umbilical cord blood ameliorates neurologic deficits in rats with hemorrhagic brain injury. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1049:84-96
108. Narayan RK, Michel ME, Ansell B, Baethmann A, Biegon A, Bracken MB, Bullock MR, Choi SC, Clifton GL, Contant CF, Coplin WM, Dietrich WD, Ghajar J, Grady SM, Grossman RG, Hall ED, Heetderks W, Hovda DA, Jallo J, Katz RL, Knoller N, Kochanek PM, Maas AI, Majde J, Marion DW, Marmarou A, Marshall LF, McIntosh TK, Miller E, Mohberg N, Muizelaar JP, Pitts LH, Quinn P, Riesenfeld G, Robertson CS, Strauss KI, Teasdale G, Temkin N, Tuma R, Wade C, Walker MD, Weinrich M, Whyte J, Wilberger J, Young AB, Yurkewicz L (2002) Clinical trials in head injury. *Journal of Neurotrauma* 19:503-557
109. Navarrete CV (2000) The HLA system in blood transfusion. *Bailliere`s Best Practise & Research Clinical Haematology* 13:511-532
110. Neuhoff S, Moers J, Rieks M, Grunwald T, Jensen A, Dermietzel R, Meier C (2007) Proliferation, differentiation, and cytokine secretion of human umbilical cord blood-derived mononuclear cells in vitro. *Experimental Hematology* 35:1119-1131
111. Newman MB, Willing AE, Manresa JJ, Sanberg CD, Sanberg PR (2006) Cytokines produced by cultured human umbilical cord blood (hucb) cells: implications for brain repair. *Experimental Neurology* 199:201-208
112. Padosch SA, Vogel P, Bottiger BW (2001) Neuronale Apoptose nach zerebraler Ischämie, Grundlagen, Pathophysiologie und Interventionsmöglichkeiten. *Anaesthesist* 50:905-920
113. Pierce JES, Trojanowski JQ, Graham DI, Smith DH, McIntosh TK (1996) Immunohistochemical characterization of alterations in the distribution of amyloid precursor proteins and β -amyloid peptide after experimental brain injury in the rat. *The Journal of Neuroscience* 16:1083-1090
114. Povlishock JT, Christman CW (1995) The pathobiology of traumatically induced axonal injury in animals and humans: a review of current thoughts. *Journal of Neurotrauma* 12:555-564
115. Prins ML, Hovda DA (2003) Developing experimental models to address traumatic brain injury in children. *Journal of Neurotrauma* 20:123-137
116. Raghupathi R, Conti AC, Graham DI, Krajewski S, Reed JC, Grady MS, Trojanowski JQ, McIntosh, TK (2002) Mild traumatic brain injury induces apoptotic cell death in

- the cortex that is preceded by decreases in cellular Bcl-2 immunoreactivity. *Neuroscience* 110:605-616
117. Raghupathi R (2004) Symposium: traumatic brain injury - cell death mechanisms following traumatic brain injury. *Brain Pathol* 14:215-222
 118. Raghupathi R, Huh JW (2007) Diffuse brain injury in the immature rat: evidence for an age-at-injury effect on cognitive function and histopathologic damage. *Journal of Neurotrauma* 24:1596-1608
 119. Ramsauer M, Krause D, Dermietzel R (2002) Angiogenesis of the blood-brain barrier in vitro and the function of cerebral pericytes. *The FASEB Journal* 16:1274-6
 120. Retamal MA, Froger N, Palacios-Prado N, Ezan P, Saez PJ, Saez JC, Giaume C (2007) Cx43 hemichannels and gap junction channels in astrocytes are regulated oppositely by proinflammatory cytokines released from activated microglia. *The Journal of Neuroscience* 27:13781-13792
 121. Reich DM, Hau S, Stahl T, Scholz M, Naumann W, Emmerich F, Boltze J, Kamprad M (2008) Neuronal hypoxia in vitro: investigation of therapeutic principles of hucb-MNC and CD133⁺ stem cells. *BMC Neuroscience* 9:91
 122. Rickels, E (2003) Das Schädel-Hirn-Trauma, Epidemiologie, Therapie und Prognose; Traumatic brain injury — epidemiology, therapy and prognosis. *Intensivmedizin und Notfallmedizin* 40:658-671
 123. Rickels E, von Wild K, Wenzlaff P, Bock WJ (2006) Schädel-Hirn-Verletzung, Epidemiologie und Versorgung. Ergebnisse einer prospektiven Studie. Zuckschwerdt- Verlag, München Wien New York
 124. Rickels E (2009) Diagnostik und Therapie von Schädel-Hirn-Traumen. *Chirurg* 80:153-163
 125. Rickels E, von Wild K, Wenzlaff P (2010) Head injury in Germany: a population-based prospective study on epidemiology, causes, treatment and outcome of all degrees of head-injury severity in two distinct areas. *Brain Injury* 24:1491-1504
 126. Rickels E, von Wild K, Wenzlaff P (2011) Versorgung Schädel-Hirn-Verletzter in Deutschland, *Unfallchirurg* 114:417-23
 127. Roche H-L (1998) Roche Lexikon Medizin. Urban & Fischer Verlag, München Stuttgart Jena Lübeck Ulm
 128. Romijn HJ, Hofman MA, Gramsbergen A (1991) At what age is the developing cerebral cortex of the rat comparable to that of the full-term newborn human baby? *Early Human Development* 26:61-67
 129. Rosenkranz K, Meier C (2011) Umbilical cord blood cell transplantation after brain ischemia – from recovery of function to cellular mechanisms. *Annals of Anatomy* 4:371-379

130. Rosenkranz K, Kumbruch S, Tenbusch M, Markus K, Marschner K, Dermietzel R, Meier C (2012a) Transplantation of human umbilical cord blood cells mediated beneficial effects on apoptosis, angiogenesis and neuronal survival after hypoxic-ischemic brain injury in rats. *Cell Tissue Res* 348:429-438
131. Rosenkranz K, Tenbusch M, May C, Markus K, Meier, C (2012b) Changes in Interleukin-1 alpha serum levels after transplantation of umbilical cord blood cells in a model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Annals of Anatomy* (doi:pii: S0940-9602(12)00142-2. 10.1016/j.aanat.2012.09.003)
132. Rouach N, Glowinski J, Giaume C (2000) Activity-dependent neuronal control of gap-junctional communication in astrocytes. *The Journal of Cell Biology* 149:1513-1526
133. Rouach N, Avignone E, Meme W, Koulakoff A, Venance L, Blomstrand F, Giaume C (2002a) Gap junctions and connexin expression in the normal and pathological central nervous system. *Biology of the Cell* 94:457-475
134. Rouach N, Calvo C-F, Glowinski J, Giaume, C (2002b) Brain macrophages inhibit gap junctional communication and downregulate connexin 43 expression in cultured astrocytes. *European Journal of Neuroscience* 15:403-407
135. Sanchez-Ramos JR, Song S, Kamath SG, Zigova T, Willing A, Cardozo-Pelaez F, Stedeford T, Chopp M, Sanberg PR (2001) Expression of neural markers in human umbilical cord blood. *Experimental Neurology* 171:109-115
136. Saporta S, Kim JJ, Willing AE, Fu ES, Davis CD, Sanberg PR (2003) Human umbilical cord blood stem cells infusion in spinal cord injury: engraftment and beneficial influence on behaviour. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research* 12:271-278
137. Saria A, Lundberg JM (1983) Evans blue fluorescence: quantitative and morphological evaluation of vascular permeability in animal tissues. *Journal of Neuroscience Methods* 8:41-49
138. Schiebler TH, Schmidt W (2002) *Anatomie*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York
139. Schiff L, Hadker N, Weiser S, Rausch C (2012) A literature review of the feasibility of glial fibrillary acidic protein as a biomarker for stroke and traumatic brain injury. *Mol Diagn Ther* 16(2):79-92
140. Schwarting S, Litwak S, Hao W, Bähr M, Weise J, Neumann H (2008) Hematopoietic stem cells reduce postischemic inflammation and ameliorate ischemic brain injury. *Stroke* 39: 2867-2875
141. Shapira Y, Shohami E, Sidi A, Soffer D, Freeman S, Cotev S (1988) Experimental closed head injury in rats: mechanical, pathophysiological and neurologic properties. *Critical Care Medicine* 16:258-265

142. Sherriff FE, Bridges LR, Sivaloganathan S (1994) Early detection of axonal injury after human head trauma using immunocytochemistry for beta-amyloid precursor protein. *Acta Neuropathol* 87:55-62
143. Shlosberg D, Benifla M, Kaufer D, Friedman A (2010) Blood-brain barrier breakdown as a therapeutic target in traumatic brain injury. *Nature Reviews* 6:393-403
144. Silverstein FS, Barks JD, Hagen P, Liu XH, Ivacko J, Szaflarski J (1997) Cytokines and perinatal brain injury. *Neurochem Int* 30:375-383
145. Smith DH, Chen SH, Pierce JE, Wolf JA, Trojanowski JQ, Graham DI, McIntosh TK (1997) Progressive atrophy and neuron death for one year following brain trauma in the rat. *Journal of Neurotrauma* 14:715-727
146. Springer JE (2002) Apoptotic cell death following traumatic injury to the central nervous system. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 35:94-105
147. Springer JE, Nottingham SA, McEwen ML, Azbill RD, Jin Y (2001) Caspase-3 apoptotic signaling following injury to the central nervous system. *Clin Chem Lab Med* 39:299-307
148. Statistisches Bundesamt (2009) Gesundheit: Diagnosedaten der Patienten und Patientinnen in Krankenhäusern (einschl. Sterbe- und Stundenfälle 2007). Fachserie 12 Reihe 6.2.1
149. Stefanis L (2005) Caspase-dependent and -independent neuronal death: two distinct pathways to neuronal injury. *The Neuroscientist* 11:50-62
150. Stone JR, Singleton RH, Povlishock JT (2000) Antibodies to the C-terminus of the beta-amyloid precursor protein (APP): a site specific marker for the detection of traumatic brain injury. *Brain Research* 871:288-302
151. Stout CE, Costantin JL, Naus CCG, Charles AC (2002) Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *The Journal of Biological Chemistry* 277:10482-10488
152. Taguchi A, Soma T, Tanaka H, Kanda T, Nishimura H, Yoshikawa H, Tsukamoto Y, Iso H, Fujimori Y, Stern DM, Naritomi H, Matsuyama T (2004) Administration of CD34+ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model. *The Journal of Clinical Investigation* 114:330-338
153. Tang Y-P, Noda Y, Hasegawa T, Nabeshima T (1997a) A concussive-like brain injury model in mice (II): selective neuronal loss in the cortex and hippocampus. *Journal of Neurotrauma* 14:863-873
154. Tang Y-P, Noda Y, Nabeshima T (1997b) Involvement of activation of dopaminergic neuronal system in learning and memory deficits associated with experimental mild traumatic brain injury. *European Journal of Neuroscience* 9:1720-1727

155. Tanno H, Nockels RP, Pitts LH, Noble LJ (1992) Breakdown of the blood-brain barrier after fluid percussion brain injury in the rat: Part 2: effect of hypoxia on permeability to plasma proteins. *Journal of Neurotrauma* 9:335-347
156. Tomkins O, Feintuch A, Benifla M, Cohen A, Friedman A, Shelef I (2011) Blood-brain barrier breakdown following traumatic brain injury: a possible role in posttraumatic epilepsy. *Cardiovascular Psychiatry and Neurology* 1-11
157. Uryu K, Chen X-H, Martinez D, Browne KD, Johnson VE, Graham DI, Lee VM-Y, Trojanowski JQ, Smith DH (2007) Multiple proteins implicated in neurodegenerative diseases accumulate in axons after brain trauma in humans. *Experimental Neurology* 208:185-192
158. Van Reekum R, Cohan T, Wong J (2000) Can traumatic brain injury cause psychiatric disorders? *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 12:316-327
159. Veenith T, Goon SSH, Burnstein RM (2009). Molecular mechanisms of traumatic brain injury: the missing link in management. *World Journal of Emergency Surgery* 4
160. Vos PE, Jacobs B, Andriessen TMJC, Lamers KJB, Borm GF, Beems T, Edwards M, Rosmalen CF, Vissers JLM (2010) GFAP and S100B are biomarkers of traumatic brain injury - An observational cohort study. *Neurology* 75:1786-1793
161. Walker PA, Shah SK, Harting MT, Cox Jr CS (2009) Progenitor cell therapies for traumatic brain injury: barriers and opportunities in translation. *Disease Models & Mechanisms* 2:23-38
162. Wasielewski B, Jensen A, Roth-Härer A, Dermietzel R, Meier C (2012) Neuroglial activation and Cx43 expression are reduced upon transplantation of human umbilical cord blood cells after perinatal hypoxic-ischemic injury. *Brain Research* 1487:39-53
163. Welsch U (2003) *Lehrbuch Histologie*. Urban & Fischer Verlag, München Jena
164. Whishaw IQ, Pellis SM, Gorny BP (1992) Skilled reaching in rats and humans: evidence for parallel development or homology. *Behavioural Brain Research* 47:59-70
165. Whyte J, Polansky M, Cavallucci C, Fleming M, Lhulier J, Coslett HB (1996) Inattentive behaviour after traumatic brain injury. *Journal of the International Neuropsychological Society* 2:274-81
166. Zigova T, Song S, Willing AE, Hudson JE, Newan MB, Saporta S, Sanchez-Ramos J, Sanberg PR (2002) Human umbilical cord blood cells express neural antigens after transplantation into the developing rat brain. *Cell Transplant* 11:265-274
167. Zohar O, Schreiber S, Getslev V, Schwartz JP, Mullins PG, Pick CG (2003) Closed-head minimal traumatic brain injury produces long-term cognitive deficits in mice. *Neuroscience* 118:949-955

7. Danksagung

Ganz herzlich möchte ich Frau Prof. Dr. rer. physiol. Carola Meier für die Ermöglichung dieser Arbeit, die gemeinsame Ausarbeitung des Themas sowie die stets vorhandene Geduld, Beratung und die langjährige, intensive Unterstützung und Betreuung danken.

Mein besonderer Dank gilt der Forschungsgruppe und allen Mitarbeitern des ZKF (Zentrum für klinische Forschung) in Bochum für die Ermöglichung der Rahmenbedingungen sowie die gute und kollegiale Unterstützung, Einarbeitung und Zusammenarbeit. Vielen Dank für die wertvollen Tipps, die hohe Motivation und permanenten Rückhalt. Sie standen mir immer tatkräftig zur Seite. Insbesondere Frau Dr. rer. nat. Astrid Roth-Härer möchte ich für die Ausführung und Durchführung des operativen Teils der Versuche und fachliche Anleitung und Hilfe im Umgang mit den Tieren und Versuchen danken. Mit ihr habe ich eine überaus nette und kompetente Betreuung erfahren.

Ebenso bedanke ich mich bei Janet Moers sowie bei Dr. rer. nat. Sandra Kumbruch für die große Hilfsbereitschaft und Beratung, vor allem bei der histologischen und immunhistochemischen Aufbereitung und bei allen histopathologischen Fragen. Sandra Kumbruch möchte ich besonders für die Aufbereitung und Konservierung der Nabelschnurblutzellen danken.

Abschließend möchte ich mich bei all meinen Freunden bedanken, die mir ebenfalls immer zur Seite standen und mich mit wertvollen Ratschlägen und Unterstützungen fortwährend in allen Lagen begleitet haben, hier besonders meine Mitstreiterin und Freundin Sina Mertens zu erwähnen.

Ausdrücklich gilt mein großer und herzlichster Dank meinem Ehemann, der mit seinem andauernden Beistand, Strenge und täglicher Bestärkung in allen Bereichen, mir Kraft für die Fertigstellung und Gestaltung dieser Arbeit gegeben hat. Ich danke meiner Familie, samt Eltern für Ihren allgegenwärtigen Rückhalt und Ratschlag auf meinem bisherigen Lebensweg sowie meiner Schwester und meinem Schwager für Ihre ständige Begleitung.