

**Rolle des endothelialen kontraktilen Apparates
bei der Entstehung eines Hirnödems nach
Schädelhirntrauma und Subarachnoidalblutung**

Dissertation
zur Erlangen des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

Im Promotionsfach Pharmazie
am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Clara Luh
geboren in Wiesbaden

Mainz 2011

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Meinem Vater gewidmet
in Gedanken bist du immer bei uns

Für meine Mutter und meine Familie:
In Liebe und Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

A. EINLEITUNG	7
B. HINTERGRUND	9
1. PATHOPHYSIOLOGIE	9
2. HIRNÖDEM	11
2.1. <i>Das vasogene Hirnödem</i>	12
2.2. <i>Das zytotoxische Hirnödem</i>	13
2.3. <i>Mediatoren des Hirnödems</i>	14
2.4. <i>Resolution des Hirnödems</i>	15
2.5. <i>Therapeutische Ansätze</i>	15
3. BLUTHIRNSCHRANKE	17
3.1. <i>Aufbau und Funktion der BHS</i>	17
3.2. <i>Permeabilität der BHS</i>	19
3.3. <i>Permeabilität der BHS nach zerebralem Insult</i>	22
4. ZEREBRALE INSULTE	28
4.1. <i>Schlaganfall</i>	28
4.2. <i>Schädelhirntrauma</i>	30
5. ZIEL DER ARBEIT	31
C. MATERIAL UND METHODEN	32
1. MATERIAL	32
1.1. <i>Geräte, Verbrauchsmaterialien und Software</i>	32
1.2. <i>Puffer, Lösungen, Kits, Chemikalien und Arzneistoffe</i>	35
1.3. <i>Primer, Antikörper und Enzyme</i>	39
1.4. <i>Versuchstiere</i>	41
2. METHODEN	42
2.1. <i>Tierexperimente</i>	42
2.2. <i>Versuchsgruppen – Studiendesign</i>	52
2.3. <i>Histologische Färbungen und Morphometrie</i>	55
2.4. <i>Molekularbiologische Methoden</i>	59
2.5. <i>Proteinbiochemische Untersuchungen</i>	66
2.6. <i>Statistische Datenauswertung</i>	69
D. ERGEBNISSE	70
1. EINFLUSS VON ANÄSTHETIKA AUF DAS AUSMAß EINES HIRNÖDEMS	70
2. ROLLE DER MLCK BEI DER ENTSTEHUNG DES HIRNÖDEMS NACH SHT	71

2.1. <i>Physiologische Parameter und Mortalität nach SHT</i>	71
2.2. <i>Differentielle Genregulation der MLCK und MLC nach SHT</i>	71
2.3. <i>Effekt der MLCK Inhibition</i>	72
3. ROLLE DER Fcγ REZEPTOREN FÜR DAS POSTTRAUMATISCHE HIRNÖDEM	78
3.1. <i>CRP Plasmaspiegel und Genregulation der FcγR nach CCI</i>	78
3.2. <i>FcγR^{-/-} Mäusen</i>	79
3.3. <i>Rolle der Fcγ Rezeptoren</i>	80
4. ROLLE DER MLCK BEI DER ENTSTEHUNG DES HIRNÖDEMS NACH SAB	85
4.1. <i>Physiologische Parameter</i>	85
4.2. <i>Effekt der MLCK Inhibition</i>	87
E. DISKUSSION	93
1. EINFLUSS VON ANÄSTHETIKA AUF DAS AUSMAß EINES HIRNÖDEMS	93
1.1. <i>Modell des tierexperimentellen Schädelhirntraumas</i>	93
1.2. <i>Entstehung des Hirnödems nach experimentellem Schädelhirntrauma</i>	96
1.3. <i>Narkose</i>	97
1.4. <i>Einfluss verschiedener Narkoseformen auf das Hirnödem</i>	98
2. DIE ROLLE DER MLCK BEI DER ENTSTEHUNG DES HIRNÖDEMS NACH SHT	99
2.1. <i>Rolle der endothelialen MLCK nach zerebralen Insulten</i>	99
2.2. <i>Pharmakologische Inhibition der MLCK und Entstehung des Hirnödems</i>	100
2.3. <i>Rolle der FcγR für das posttraumatische Hirnödem</i>	101
2.4. <i>Pathophysiologie der SAB und des SHT: Gleiches und Unterschiede</i>	103
3. DIE ROLLE DER MLCK BEI DER ENTSTEHUNG DES HIRNÖDEMS NACH SAB	104
3.1. <i>Modelle der tierexperimentellen SAB</i>	104
3.2. <i>Entstehung des Hirnödems nach experimenteller SAB</i>	105
3.3. <i>Pharmakologische Inhibition der MLCK</i>	106
F. ZUSAMMENFASSUNG	108
G. LITERATURVERZEICHNIS	111
H. ANHANG	124
1. ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	124
2. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	127
I. DANKSAGUNG	131
J. LEBENS LAUF	132

A. Einleitung

Nach zerebralen Insulten, wie Schädelhirntrauma (SHT), Subarachnoidalblutung (SAB) oder ischämischen Schlaganfall, führen sekundäre Mechanismen innerhalb der ersten Stunden bis Tage zu einer Vergrößerung des initialen Hirnschadens. Mit zunehmender Evidenz zeigt sich, dass die Entstehung eines zerebralen Hirnödems einer der Hauptfaktoren für die Vergrößerung des Hirnschadens und für die hohe Mortalität und Morbidität nach SHT ist. Bei mehr als der Hälfte aller Todesfälle nach schwerem SHT gilt das zerebrale Hirnödem als Ursache (Schreiter 1973). Als Folge der Hirnschädigung kommt es zu einer periläsionellen Schwellung, welches durch raumfordernde Wirkung auf umgebendes gesundes Hirngewebe zu einer zusätzlichen, sekundären Schädigung führt. Es resultiert zunächst eine lokale Beeinträchtigung der Hirnperfusion und Substratversorgung. Bei weiterer Zunahme kommt es durch die knöcherne Limitation des Schädelvolumens zu einer globalen Hirndrucksteigerung mit Funktionsstörung des Zentralnervensystems bis hin zur Einklemmungs-Symptomatik, welche den Patienten vital durch Hirnnervenlähmung und Atemstillstand bedroht (Chesnut *et al.* 1993).

Diese Hirnschwellung ist Folge (a) einer Verschiebung von Wasser von extra- nach intrazellulär, welches als „zytotoxisches Hirnödem“ bezeichnet wird, bzw. (b) Austritt von Flüssigkeit aus den Hirngefäßen in das Hirngewebe, welches mit dem Begriff „vasogenes Hirnödem“ verbunden ist (Staub *et al.* 1993). Das Ausmaß der Hirnschwellung korreliert mit einer Verschlechterung der Prognose (Eisenberg *et al.* 1990) und stellt einen entscheidenden Faktor für die neurologische Entwicklung der Patienten dar (Chesnut *et al.* 1993). Ein Durchbrechen des Circulus vitiosus aus Hirnschwellung, Hirndruckerhöhung und zerebraler Perfusionsminderung könnte eine Schadensbegrenzung ermöglichen und steht im Zentrum intensivmedizinischer Bemühungen. Ziel ist es die Entstehung des Hirnödems frühzeitig durch pharmakologische Maßnahme zu verhindern oder das Ausmaß zu reduzieren. Derzeit existieren jedoch dafür keine effektiven therapeutischen Ansätze. Um pharmakologische Ansätze für die Verhinderung bzw. Reduktion des Hirnödems zu identifizieren sind Untersuchungen der grundlegenden pathophysiologischen Mechanismen der Entstehung des Hirnödems notwendig. Da das Versagen der Bluthirnschranke (BHS) eine wesentliche Rolle bei der Entstehung des vasogenen Hirnödems spielt, könnte hier ein Therapieansatz liegen. Unter physiologischen Bedingungen wird die BHS als dichte Barriere aus Endothelzellen, Basalmembran, Astrozyten und Perizyten geformt. Unter pathologischen Bedingungen wie zerebrale Ischämie und Trauma bewirken verschiedene Mediatoren eine erhöhte Durchlässigkeit der BHS für Wasser und Makromolekülen. Ein möglicher zugrunde liegender Mechanismus der BHS Störung ist die Zunahme der Durchlässigkeit durch Verringerung der Dichtigkeit auf Ebene der Endothelzellen. Endothelzellen kleiden die Blutgefäße von luminal aus und sind mit Tight junctions (TJ) fest verbunden, wel-

che die Zwischenräume zwischen den Endothelzellen dicht verschließen. Die TJ Proteine sind über zonula occludens (ZO) Proteine mit Aktin Filamenten des zellulären Stützapparates der Endothelzellen verbunden. In der geplanten Studie soll die Hypothese überprüft werden, ob die erhöhte zerebrovaskuläre Permeabilität durch eine verstärkte Kontraktion des endothelialen Stützapparates hervorgerufen wird. Die Kontraktilität der Myosin Ketten wird vor allem durch die Myosin-leichte-Kette-Kinase (MLCK) reguliert. Eine erhöhte Aktivität der MLCK könnte über Phosphorylierung der endothelialen Myosin-leichte-Ketten (pMLC) eine Kontraktion der Endothelzellen bewirken und somit die Permeabilität der BHS erhöhen.

B. Hintergrund

1. Pathophysiologie

Bei neurologischen Erkrankungen, wie Schädelhirntrauma (SHT) und Subarachnoidalblutung (SAB) kommt es zur Entstehung eines Hirnödems. Bei zerebralen Insulten unterscheidet man zwischen dem primären Schaden und dem sekundären Schaden (Abb. 1). Als primärer Hirnschaden des SHTs werden die unmittelbaren und direkten Traumafolgen, wie lokale Kontusionen, Gefäßverletzungen und Laceration, bezeichnet. Bei der SAB führt meistens eine Aneurysmaruptur zu einer intrakraniellen Blutung. Beide Insulte lösen ähnliche pathophysiologische Mechanismen aus, welche innerhalb von Minuten bis hin zu Tagen eine Vergrößerung des initialen Schadens bedingen.

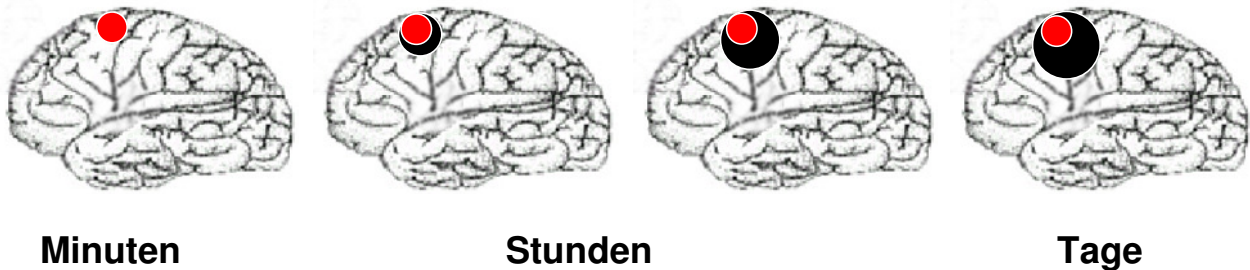


Abb. 1: Schematische Darstellung des primären Schadens (roter Punkt), welcher in das umgebende gesunde Gewebe wächst (sekundärer Schaden = schwarz). Modifiziert nach (Dirnagl *et al.* 1999).

Als Folge der primären Hirnschädigung kann es zur Entwicklung eines Hirnödems kommen, welches durch raumfordernde Wirkung auf das gesunde Hirngewebe zu einer Verstärkung sekundärer Schädigungen führt. Durch die Zunahme des intrakraniellen Volumens kommt es zu einem Anstieg des intrakraniellen Drucks (ICP) und einer Abnahme des zerebralen Blutflusses (CBF). Aufgrund des durch Schädelknochen limitierten Raums, kann eine Zunahme des Gewebevolument ohne Druckveränderung nach der Monroe-Kelli-Hypothese (Abb. 2) nur auf Kosten anderen intrakranieller Kompartimente erfolgen. Die Volumenzunahme geschieht Initial unter Verdrängung des Liquors. Ist diese Reserve ausgeschöpft und der Liquorraum kollabiert, steigt der Hirndruck steil an und die Kompression der Gefäße (insbesondere der Hirnsinus) führt zu einem Perfusionsdefizit.

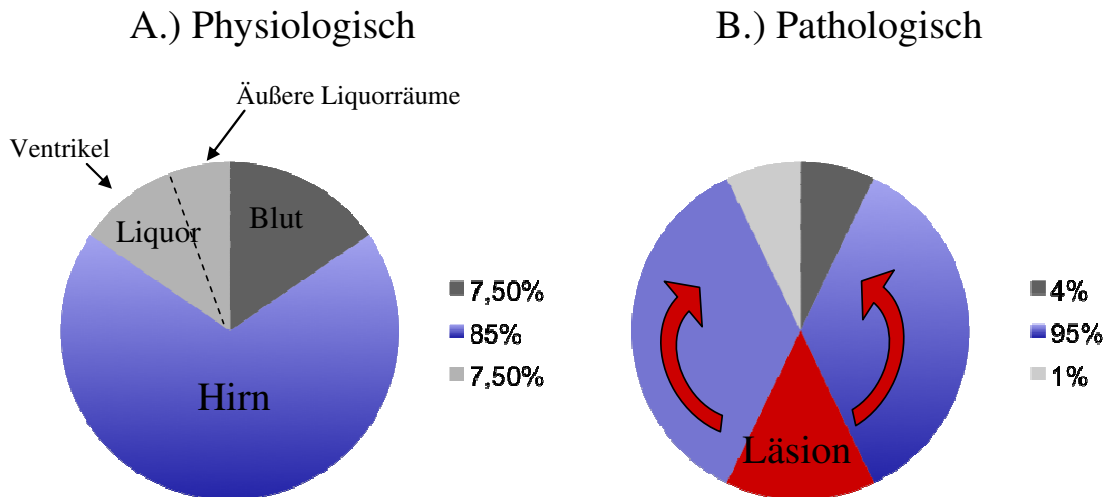


Abb. 2: Schematische Darstellung der Monroe-Kelli-Hypothese. A: Das intrakranielle Volumen setzt sich physiologisch aus den drei Komponenten Gehirn, Liquor und Blut zusammen. B: Vergrößerung des Hirnvolumens durch ein raumforderndes Ödem kann nur auf Kosten der anderen Kompartimente erfolgen. Modifiziert nach (Rickels 2009).

Als Folge der Verminderung des CBF kann sich bei Unterschreitung einer kritischen Perfusionsschwelle von 10–15 ml/100 g/min (normale zerebrale Perfusion ~ 58 ml/100 g/min) (Hossmann & Schuier 1980) eine zerebrale Ischämie entwickeln. Durch diese zerebrale Ischämie werden weitere Mechanismen getriggert, die wiederum das Hirnödem verstärken können und somit zur Entstehung eines Circulus vitiosus führen (Abb. 3). Der Circulus vitiosus aus Raumforderung, intrakraniellm Druckanstieg und Hirnschämie muss therapeutisch durchbrochen werden, da er unbehandelt zu Herniation und final zum zerebralen Perfusionsstillstand führen kann. Die Kaskade, aus diesen miteinander vernetzten Faktoren zu verhindern, stellt einen möglichen therapeutischen Ansatz dar.

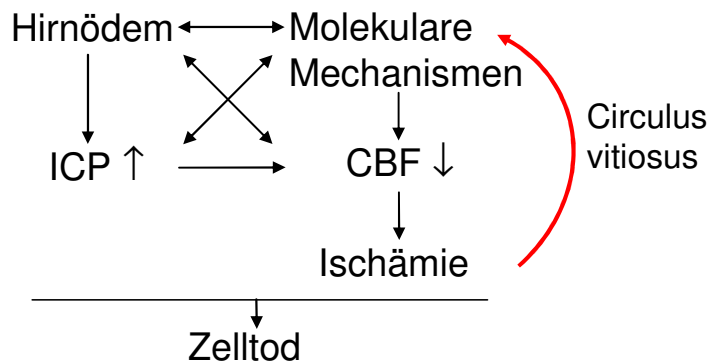


Abb. 3: Schematische Darstellung der pathophysiologischen Mechanismen, die zur Schadensexpansion durch Hirnschwellung führen.

2. Hirnödem

Das Hirnödem ist definiert als absolute Zunahme des zerebralen Wassergehaltes, was zu einer Zunahme des Gewebevolumens führt. Unter physiologischen Bedingungen besteht das intrakranielle Volumen eines erwachsenen Menschen aus verschiedenen Kompartimenten: Liquor cerebrospinalis (CSF, ~75–100 ml), Blut (~75–100 ml), intrazelluläre (1100–1300 ml) und interstitielle (~100–150 ml) Gewebeflüssigkeit. Das Wasser bewegt sich zwischen den verschiedenen Kompartimenten entlang eines osmotischen Gradienten und aufgrund hydrostatischer Druckunterschiede.

Man unterscheidet zwei Haupttypen, das **vasogene** und das **zytotoxische** Hirnödem (Klatzo 1987):

- a) Das vasogene Hirnödem ist extrazellulär lokalisiert und wird durch eine Störung der Blut-Hirn-Schranke induziert.
- b) Das zytotoxische Hirnödem ist intrazellulär lokalisiert und entsteht durch ein Versagen energieabhängiger zelluläre Plasmamembranpumpen.

Neben diesen zwei Hauptformen wurden für bestimmte Situationen weitere Formen des Hirnödems beschrieben:

- c) Das interstitielle Hirnödem entsteht durch einen vermehrten Einstrom von Liquor cerebrospinalis in das Interstitium.
- d) Durch Liquorabflussstörungen kommt es zur Ausbildung eines Hydrozephalus internus und einen Anstieg des intraventrikulären Drucks. Als Folge kommt es zu einer Volumenzunahme der periventrikulären weißen Substanz (Fishman 1975).
- e) Bei einer weiteren Form des osmotischen Ödems kommt es trotz intakter BHS durch einen osmotischen Gradienten zur Flüssigkeitsverschiebung vom Plasma in Richtung extrazellulärer Flüssigkeit. Die Osmolalität des Plasmas sinkt dabei unter die des Gehirns, so dass Wasser in das Interstitium des Gehirns verschoben wird (Nag *et al.* 2009).

Bei fast allen zerebralen Insulten besteht das Hirnödem aus einer Kombination der verschiedenen Typen. Je nachdem welche Hirnschädigung ursächlich ist, kann ein Subtyp dominieren. Bei einer zerebralen Ischämie kommt es zunächst zur zellulären Schwellung und somit zum zytotoxischen Hirnödem. Die zerebralen Endothelzellen werden ggf. zerstört und es kommt zu einem Zusammenbruch der Bluthirnschranke, welches verzögert in einem vasogenen Hirnödem resultiert. Auch nach traumatischer Hirnverletzung treten beide Haupttypen, das vasogene und zytotoxische Hirnödem auf.

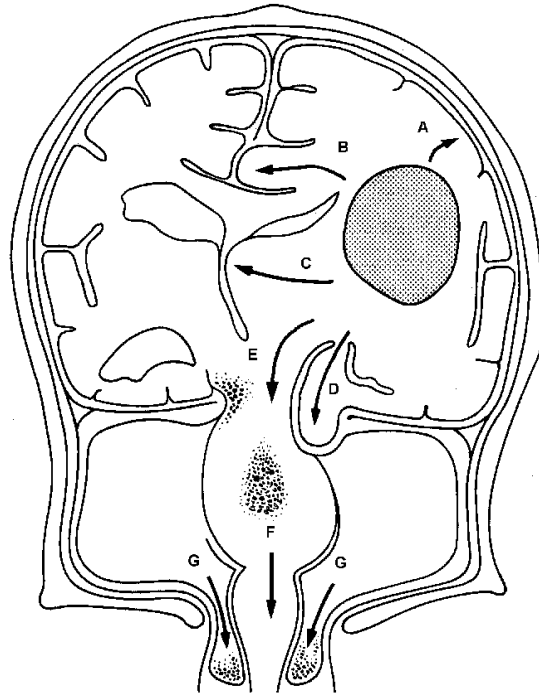


Abb. 4: Auswirkung der intrakraniellen Drucksteigerung, hier am Beispiel einer akuten Raumforderung in einer Großhirnhemisphäre.

(A) Verbreiterung der Hirnwindungen mit verstrichenen Windungstälern; (B) Herniation des Gyrus cinguli unter der Falx cerebri hindurch zur kontralateralen Seite; (C) Auspressung und Verziehung der Ventrikel mit Verlagerung der Mittellinie (III. Ventrikel) zur Gegenseite; (D) Herniation des Uncus (mediobasaler Temporallappenanteil) an der Kante des Tentoriums nach unten, Richtung hintere Schädelgrube, mit Kompression des Mittelhirns sowie – in (E) Drucknekrosen an der gegenüberliegenden Seite des Mittelhirns; (F) Verschiebeblutungen im unteren Hirnstamm; (G) Herniation der Kleinhirntonsillen durch das Foramen magnum (Kleinhirndruckkonus) mit Gewebenekrosen.

(Quelle: <http://www.uniklinik-saarland.de/neuropathologie/index.html>)

2.1. Das vasogene Hirnödem

Beim vasogenen Hirnödem führt zunächst die Verletzung der zerebralen Gefäße durch Kontusion bzw. durch zerebrale Ischämie zu einem Versagen der BHS. Das Versagen der BHS führt zu einer erhöhten vaskulären Permeabilität, welches mit einer Aufweitung der interendothelialen Zell-Zell-Kontakt Molekülen, den Tight junctions (TJ), vergesellschaftet ist. Folge ist eine erhöhte Durchlässigkeit für Wasser und Makromoleküle in das Hirnparenchym (Klatzo 1987). Es gelangt proteinreiche Flüssigkeit mit Plasmabestandteile in das zerebrale Parenchym, das unter physiologischen Bedingungen die BHS nicht penetriert hätte (Abb. 5). Neben der durch die Raumforderung hervorgerufen Hirnschädigung werden weiteren BHS-Schäden durch Freisetzung von Mediatoren aus Neuronen und Gliazellen induziert.

Verschiedene Mediatorsysteme, sog. „vaso-active agents“, verstärken ein Öffnen der BHS und somit das vasogene Hirnödem. Als Mediatoren, die für ein Öffnen der BHS verantwortlich gemacht werden, sind in der Tabelle 1, B.2.3. genannt (zur Übersicht siehe (Wahl *et al.* 1988, Schilling & Wahl 1999, Abbott 2000b)). Neuere Mediatoren, die nicht zu den „vaso-active agents“ gehören, wie Aquaporine, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (Lenzlinger *et al.* 2004) und Matrix-Metallo-Proteinasen (MMP) (Mori *et al.* 2002), führen ebenfalls zu einem Zusammenbruch der BHS und tragen wesentlich zur Entstehung des Hirnödems bei.

2.2. Das zytotoxische Hirnödem

Klatzo definierte das zytotoxische Hirnödem als Schwellung des Intrazellulärraums (Abb. 5) mit gleichzeitiger Abnahme des extrazellulären Volumens bei intakter endothelialer Zellstruktur der BHS (Klatzo 1987). Für die Entstehung des zellulären Ödems werden drei Mechanismen verantwortlich gemacht (Baethmann *et al.* 1988):

1. Erhöhte Permeabilität der Zellmembran für Natrium mit konsekutivem Na^+ -Einstrom
2. Dysfunktion der in der glialen, neuronalen und endothelialen Membran lokalisierten Na^+/K^+ -ATPase
3. Aufhebung des Membranpotentials gefolgt von einem Funktionsverlust der aktiven Ionen-Pumpen

Es kommt zu einem gestörten Gleichgewicht der intra-/extrazellulären Natrium-Konzentration. Die intrazelluläre Na^+ -Ionen-Konzentration erhöht sich und verursacht durch den erhöhten intrazellulären osmotischen Druck eine vermehrte Wasserretention und damit die Zellschwellung (Baethmann & Kempfski 1997). Die erhöhte Na^+ -Permeabilität wird überwiegend exzitatorische Aminosäuren, wie Glutamat zugeschrieben (Staub *et al.* 1994). Die Bluthirnschranke ist beim reinen zytotoxischen Hirnödem primär intakt (Klatzo 1987). Auch durch einen verstärkten Einbau von Aquaporinen = Wasserkanälen kann es zum Zellschwellen kommen (Manley *et al.* 2000).

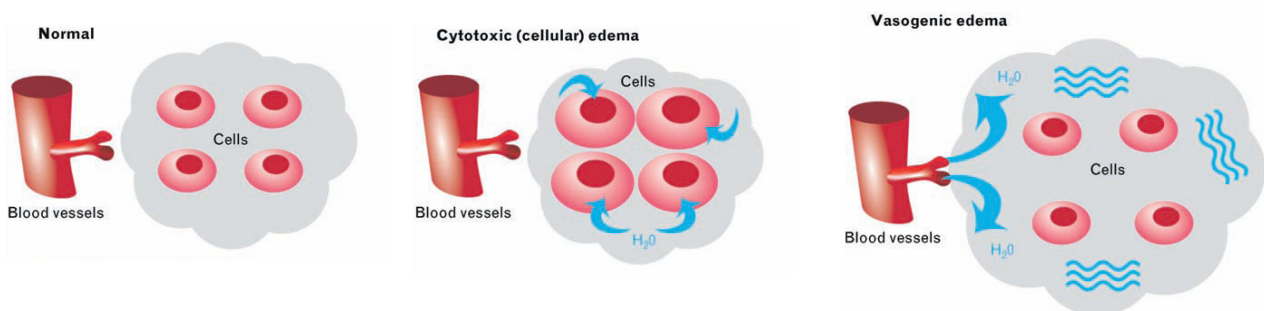


Abb. 5: Schematische Darstellung des zytotoxischen und vasogenen Hirnödems (Donkin & Vink 2010).

2.3. Mediatoren des Hirnödems

Die bekannten vasoaktiven Mediatoren sind in Tabelle 1 gelistet und gehören zu Genen der Inflammationskaskade, welche die endotheliale Permeabilität erhöhen. Die Permeabilität des Perineuriums bleibt dabei relativ unbeeinflusst (Abbott 2000b). Zu den neuen Mediatoren gehören Aquaporine (AQP), VEGF (Lenzlinger et al. 2004) und MMPs (Mori et al. 2002). Eine verstärkte Expression einiger MMPs (Mori et al. 2002) und VEGF (Lenzlinger et al. 2004) führt zu einer Störung der BHS und zur Entwicklung eines vasogenen Hirnödems. AQP sind Membranproteine, die die sogenannten Wasserkanäle im Gehirn bilden und den transmembranösen Wasserfluss und somit die extrazelluläre Homöostase regulieren. Bis heute sind 13 verschiedene Subtypen identifiziert worden. Im Gehirn wurden AQP1, AQP4 und AQP9 nachgewiesen (Antonetti *et al.* 1999). Durch eine veränderte Expression der AQP, wird die Entstehung des Hirnödems beeinflusst (Tran *et al.* 2010). Vor allem AQP4 scheint unter pathologischen Bedingungen eine entscheidende Rolle bei der Ödementwicklung zu spielen. Wobei sich der Anteil in der Pathogenese des vasogenen Hirnödems vom zytotoxischen Hirnödem unterscheidet. Beim vasogenen Hirnödem scheint eine Hochregulation von AQP4 die Beseitigung des Hirnödems zu begünstigen (Papadopoulos *et al.* 2004), während AQP4 Inhibitoren das Gehirn vor dem zytotoxischen Hirnödem zu schützen (Manley *et al.* 2000).

Tabelle 1: "vaso-active agents", die die Bluthirnschranken Permeabilität erhöhen

Angiotensinogen (Kakinuma *et al.* 1998)

Arachidonsäure

Bradykinin (Plesnila *et al.* 2001)

Glutamat (Kempski *et al.* 1990),

Interleukine IL-1a, IL-1b, IL-2 (Watts *et al.* 1989, de Vries *et al.* 1996, Abbott 2000b)

Leukotriene (Black & Hoff 1985)

Phospholipase A2 (Bazan *et al.* 1995)

Sauerstoff-Radikale (ROS) (Morita-Fujimura *et al.* 2000)

Serotonin und Histamin (Wahl *et al.* 1988)

Stickstoffmonoxid (NO) (Oury *et al.* 1993)

2.4. Resolution des Hirnödems

Bei der Resolution des vasogenen Hirnödems, kommt es zur Flüssigkeitsbewegung in das Interstitium durch „bulk flow“, welches einen Prozess bezeichnet bei dem Proteine ohne ein bestimmtes Signal und durch Diffusionsprozesse von einem Zellkompartiment in eine anderes wandern. Drei verschiedene Mechanismen werden für die Wasserbewegung verantwortlich gemacht:

1. Die Migration des extrazellulären Wassers in das CSF durch „bulk flow“ in Anwesenheit eines Druckgradienten (Reulen *et al.* 1977);
2. Aufnahme von Proteinen aus der Ödem-Flüssigkeit durch Gliazellen (Fotheringham *et al.* 2000, Wolman *et al.* 1981);
3. Digestion der Serum Proteine durch Astrozyten im extrazellulären Raum (Klatzo *et al.* 1980) und der Transport der extravasierten Proteine via transendothelialer Passage zurück ins Blut (Vorbrodts *et al.* 1985).

Neuere Daten deuten darauf, dass auch AQP4, welche an den Astrozyten Endfüßen expremiert werden, eine wichtige Funktion bei der Clearance des interstitiellen Wasser hat. Bei verschiedenen Tiermodellen mit primär vasogenem Hirnödem, wie kortikale Kälteverletzung, Tumor Implantation und zerebrale Abszess Modelle, war bei AQP4 defizienten Mäusen das Hirnödem und der ICP Anstieg signifikant größer im Vergleich zu Wildtyp Mäusen. Dies deutet darauf hin, dass die Elimination von Wasser in AQP4 defizienten Mäusen gestört ist (Papadopoulos *et al.* 2004, Verkman *et al.* 2006).

2.5. Therapeutische Ansätze

Zurzeit existieren nur wenige therapeutische Ansätze um frühzeitig in die Pathomechanismen des Hirnödems einzugreifen. Die heutige Therapie des Hirnödems ist fast ausschließlich symptomatisch und ist im Wesentlichen seit Jahrzehnten unverändert. Die Therapie besteht v.a. aus Senkung eines erhöhten intrakraniellen Druckes. Zu den effektiven Behandlungsmethoden zählen die Oberkörperhochlagerung (30°), eine moderate Hyperventilation durch maschinelle Beatmung (Hypokapnie führt zu zerebraler Vasokonstriktion) und osmotisch wirkende Arzneimittel, wie z.B. Mannitol. Mannitol verursacht einen osmotischen Gradienten, wodurch das Wasser vom Hirngewebe in den intravaskulären Raum gelangt. Zusätzlich erhöht Mannitol die zerebrale Perfusion (Barry & Berman 1961) und reduziert den ICP durch Reduzierung des vaskulären Volumens durch Vasokonstriktion (Deli *et al.* 1995). Durch eine wiederholte Gabe von Mannitol, kann es allerdings zu einer Störung der BHS kommen. Ähnlich wie beim vasogenen Hirnödem gelangt Mannitol in das Hirnparenchym

und kann so das zerebrale Hirnödem verstärken. Mannitol sollte daher nur für eine kurzzeitige akute Behandlung des erhöhten ICPs verwendet werden. Die adjuvante Gabe eines Schleifendiuretikums wie Furosemid kann den osmotischen Effekt verstärken. Corticosteroide werden eingesetzt, um das vasogene Hirnödem durch Verringerung der endothelialen Permeabilität zu reduzieren. Sie finden hauptsächlich ihren Einsatz bei peritumoralen Hirnödemen, da eine Wirkung nach Trauma und Ischämie nicht bewiesen ist. Eine weitere Limitation sind die systemischen Nebenwirkungen. Bei anderen Modalitäten, wie Analgosedierung, tiefer Barbiturat-Narkose oder Hypothermie wird durch Reduzierung des zerebralen Blutvolumens ein Anstieg des initial erniedrigten zerebralen Blutflusses erreicht (Haberl & Villringer 1990). Zur medikamentösen Therapie kommen zusätzlich operativen Maßnahmen wie ventrikulären Drainage, Dekompressionstrepanation oder Hämatom Ausräumung in Betracht (zur Übersicht: Medical Management of Cerebral Edema, (Raslan & Bhardwaj 2007))

In zahlreichen experimentellen Untersuchungen führte eine Inhibition eines oder mehrerer Mediatoren zu einer drastischen Verringerung des vasogenen Hirnödems. Bisher wurden vor allem anticholinerge, cholinomimetische, antihistaminerge und antiinflammatorische Therapieansätze untersucht (Schilling & Wahl 1999). In Rahmen klinisch kontrollierter Patientenstudien wurden u.a. Lipid-Peroxydation-Inhibitoren, Glutamat-Antagonisten, Calcium-Kanal-Blockern, NMDA-Rezeptor Antagonisten, synthetischen Cannabinoiden, Cycloporin A, Bradykinin-Rezeptor Antagonisten, sowie monoaminerge Substanzen untersucht (zur Übersicht (Beauchamp *et al.* 2008)). Leider konnte in der Mehrzahl der Fälle der experimentell erzielte Erfolg in den klinischen Studien nicht wiederholt werden. Die erfolgversprechendsten Ergebnisse konnten mit Progesteron erzielt werden. In experimentellen Studien reduziert Progesteron das zerebrale Hirnödem, erhöht die Neuronendichte und verbesserte die neurologische Funktion durch eine Inhibition des sekundären Schadens. Bei Patienten verringert Progesteron die Mortalität und verbessert das Outcome (Junpeng *et al.* 2011). Ansonsten hat sich die Behandlung in der letzten Dekade nicht wesentlich verändert. Die Folgen und die Länge des Krankenhausaufenthaltes konnte nicht verbessert werden und die Kosten sind weiterhin sehr hoch (Frontera *et al.* 2010). Dass die Translation von den vielversprechenden therapeutischen Strategien experimenteller Studien in die Klinik fehlgeschlagen ist, hängt u.a. damit zusammen, dass das menschliche SHT im Vergleich zu den standardisierten experimentellen Trauma Modellen ein sehr inhomogenes Krankheitsbild darstellt. Ein Hauptproblem liegt darin, dass das Target bzw. der Arzneistoff keine adäquate Wirkungskonzentration erreicht und dass der optimale Zeitpunkt verfehlt wird. Die Behandlung des zerebralen Hirnödems sollte im Idealfall keine Nebenwirkungen haben und bei möglichst allen Typen des Hirnödems wirksam sein. Solch ein Arzneistoff existiert zurzeit nicht. Die Stabilisierung der BHS könnte ein möglicher Angriffspunkt einer therapeutischen Behandlung des zerebralen Ödems sein.

3. Bluthirnschranke

Das Gehirn wird von einem großen Kapillar-Netzwerk durchzogen, welche eine direkte Grenzfläche zwischen Blutkreislauf und Hirngewebe bildet. Die BHS ist eine semipermeable Passagebarriere zwischen Blut und Hirngewebe, die eine unkontrollierte Diffusion im Blut gelöster Stoffe in das Gehirn verhindert und somit die Homöostase des Gehirnes aufrecht erhält. Die BHS ist ein dynamisch regulierter Zellverband aus Endothelzellen (EC), den Perizyten und den Astrozyten. Durch die Verknüpfung der Endothelzellen über TJ sind Hirnkapillaren gegenüber dem peripheren mikrovaskulären System 50-100 mal weniger permeabel (Abbott 2002). Sie weisen einen sehr hohen transendotheliale elektrische Widerstand (TEER) auf, welcher in vivo über $1500-2000 \Omega \cdot \text{cm}^2$ beträgt (Butt *et al.* 1990). Die Unterbindung des parazellulären Diffusionsweges hydrophiler Substanzen ist ein zentraler Aspekt der Barrierefunktion der BHS. Die strukturelle Grundlage für die nahezu vollständig unterdrückte parazelluläre Permeabilität liegt in den dichten Zell-Zell-Kontakten der TJs. Kleine lipophile Substanzen wie O_2 und CO_2 diffundieren entlang eines Konzentrationsgradienten frei durch die Plasmamembran (Grieb *et al.* 1985). Essentielle Nährstoffe wie Glukose und Aminosäuren gelangen über Transportersysteme in das Gehirn, während größere Moleküle, wie Insulin, über Rezeptor vermittelt Endozytose aufgenommen werden (Pardridge *et al.* 1985).

3.1. Aufbau und Funktion der BHS

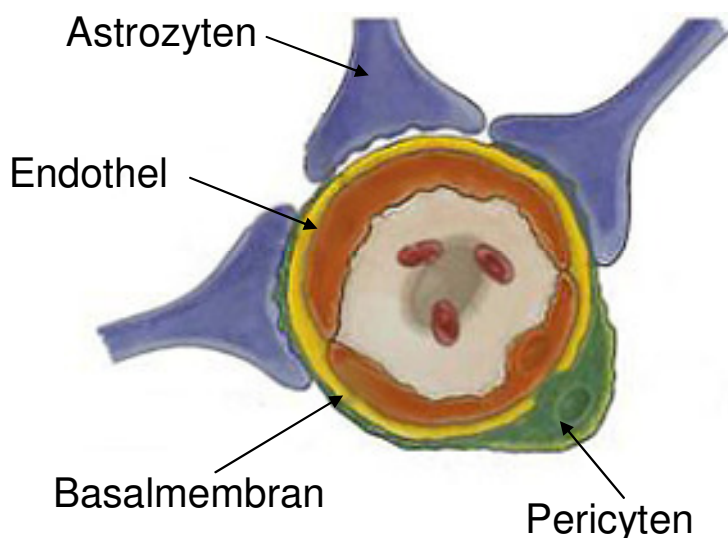


Abb. 6: Schematische Darstellung der BHS. Modifiziert nach (Zlokovic 2008)

Die BHS ist durch mehrere Schichten aufgebaut (Abb. 6). Die innere Schicht bilden die **Endothelzellen**, die die zerebralen Blutgefäße auskleiden. Die zerebralen Endothelzellen unterscheiden sich von den peripher-vaskulären durch das Fehlen von Fenestrations und eine minimale Pinozytose

Aktivität. Darüber hinaus sind sie über Zell-Zell-Kontakt Moleküle, den sogenannten **Tight Junctions** (TJ) miteinander verknüpft und bilden so eine Barriere, die den parazellulären Stofftransport hydrophiler Substanzen verhindert (Abb.7). Tight junctions verknüpfen Endothelzellen an der apikalen Seite der lateralen Plasmamembran. Zu den Interzellularspalten verschließenden TJ Proteine gehören die peripher lokalisierten zonula occludens (ZO)-Proteine (ZO-1, ZO-2 und ZO-3) und die Transmembranproteine: Occludin, Claudine und Junctional Adhesion Molecules (JAM) (Huber *et al.* 2001). Die Stabilität der TJ umfasst ein komplexes Netzwerk aller Proteine. Die wichtigste Funktion von Claudine ist die Formation und Aufrechterhaltung der TJ. Occludin korreliert mit der „tightness“ der TJ, da eine höhere Expression von Occludin den parazellulären Fluss verringert. JAM ist wichtig für Leukozyten Adhäsion und Migration. Über die ZO Proteine sind die TJ mit Cytoskelett verbunden (Brown & Davis 2002) (Abb. 7).

Die Endothelzellen sind von einer **Basalmembran** umgeben, die eine wichtige Stützfunktion ausübt. Ein weiteres Strukturmerkmal der BHS sind die **Perizyten**, die eng an der Basalmembran anliegen (Frank *et al.* 1987). Die Funktion der Perizyten ist komplex und noch nicht vollständig aufgeklärt. Generell geht man davon aus, dass eine Interaktion mit dem Endothel essentiell für die Formation, Reifung und Aufrechterhaltung der BHS ist (Hellstrom *et al.* 2001), sowie Transportprozesse und Phagozytose ist (Krause *et al.* 1993). Perizyten unterstützen die Proliferation und Differenzierung der Endothelzellen (Ramsauer *et al.* 2002). Das Fehlen von Perizyten führt zu einer endothelialen Hyperplasie, einer Erhöhung des Durchmessers der Kapillaren und einer Änderung der TJ Proteinanordnung (Hellstrom *et al.* 2001). Zudem regulieren Perizyten den Blutfluss in den zerebralen Kapillaren, was einen Einfluss auf die zerebrovaskuläre Autoregulation hat (Peppiatt *et al.* 2006). Nahezu vollständig wird die Basalmembran von einer Schicht aus Astrozytenendfüßchen umgeben. **Astrozyten** und zerebrale Kapillarendothelzellen stehen über Botenstoffe in Kontakt, deren Signale über Ca^{2+} -Signaltransduktionswege Einfluss auf die Zell-Regulation nehmen (zur Übersicht siehe (Abbott 2002)). Zudem werden durch Astrozyten-Endothelzell-Interaktionen der Hirnwassergehalt und der Elektrolyt-Haushalt unter normalen und pathologischen Bedingungen reguliert. Astrozytenendfüßchen enthalten Aquaporin-4 Wasserkanäle, die mit einer raschen Wasseraufnahme während Ischämie und dem zytotoxischen Hirnödem assoziiert sind (Kleffner *et al.* 2008).

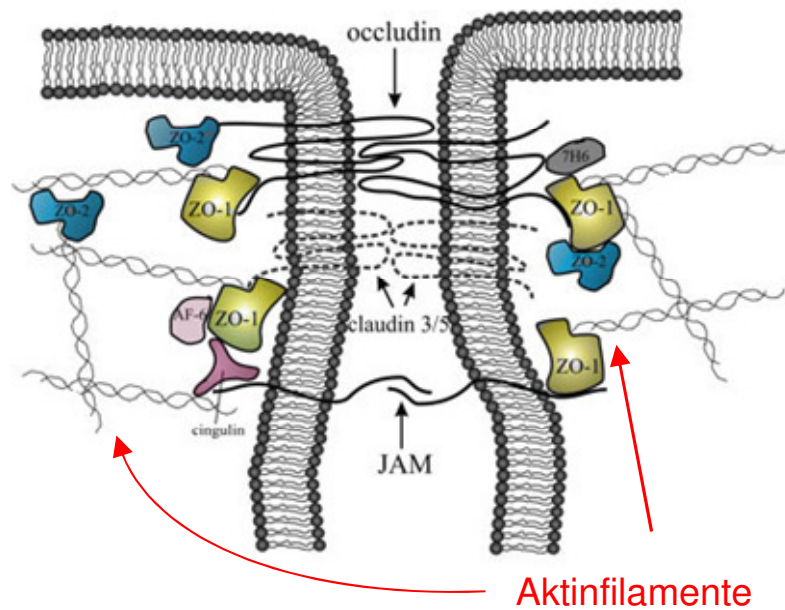


Abb. 7: Schematische Darstellung der Grenzschicht zweier Endothelzellen (Hawkins and Davis, 2005).

3.2. Permeabilität der BHS

Unter pathologischen Bedingungen kommt es häufig zur Öffnung der BHS, die durch erhöhte Permeabilität der Endothelzellen gekennzeichnet ist. Die molekularbiologischen Veränderungen, die zur Öffnung der BHS führen, sind weitgehend unbekannt und sind Forschungsgegenstand dieser Arbeit. Ein Öffnen der BHS kann zum einen auf den Verlust der Tight junctions zurückgeführt werden und zum anderen auf die Aktivierung des kontraktiven Apparates der Endothelzellen.

3.2.1. Regulation der endothelialen Permeabilität und Rolle der TJ

Die intrazellulären Signaltransduktionswege, die an der Funktion, der Expression, der subzelluläre Lokalisation, aber auch Protein-Protein Interaktionen der TJs beteiligt sind und somit auch an der Permeabilität der BHS, sind komplex. TJ werden von vielen verschiedenen Faktoren, wie Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Medikamenten, aber auch Hormonen beeinflusst. Zum Beispiel verstärken Glukokortikoide (Antonetti *et al.* 2002) oder ungesättigten Fettsäuren (Jiang *et al.* 1998) die TJ Dichtigkeit durch ein Steigerung der Expression von Occludin. Histamin, Zytokine, VEGF (zur Übersicht siehe (Harhaj & Antonetti 2004)) oder tumor necrosis factor alpha (TNF α) (Wachtel *et al.* 2001) erhöhen die Permeabilität der TJ durch eine Verringerung der Expression von Occludin und ZO-1. Auch durch bestimmte Phosphorylierungsschritte der TJ Proteine kommt es zur Änderung der TJ-Strukturen, die wiederum deren Dichtigkeit beeinflussen.

Die TJ Permeabilität wird direkt durch die Modifikation der TJ Proteine, durch Expressionsände-

rungen oder Phosphorylierungen, oder indirekt über Veränderungen des Zytoskeletts beeinflusst. Aktin Filamente sind direkt mit TJ Proteinen verbunden. Eine Zerstörung von Aktin mit cytochalasin D (Madara *et al.* 1986) oder durch einen hypoxischen Insult (Crawford *et al.* 1996), aber auch eine strukturelle Änderung von Aktin (Crawford *et al.* 1996) erhöht die Permeabilität und ändert die Anordnung der TJs. Die Änderung der zytoplasmatischen Stressfasern von Aktin durch TNF α führen zu einer Auflockerung des endothelialen Spaltes (Deli *et al.* 1995). Auch eine Umorganisation des Zytoskeletts durch das Ablösen von ZO-1 an den Zellgrenzen durch eine Tyrosin-Phosphorylierungen geht mit einer Permeabilitäts-erhöhung einher (Antonetti *et al.* 1999).

3.2.2. Regulation der endothelialen Permeabilität und Rolle des Zytoskeletts

Ein wichtiger Mechanismus, der die endothelialen Permeabilität reguliert, wird dem Zytoskelett zugeschrieben. Die intrazellulären TJ Proteine sind mit Aktin Filamenten des Zytoskeletts über ZO 1/2 Proteine verbunden (Huber *et al.* 2001). Dadurch übt das endotheliale Zytoskelett einen starken Einfluss auf die Zell-Zell Verbindung und somit auf die parazelluläre Permeabilität aus.

Das Zytoskelett hat eine wichtige Funktion für fast alle Zellen, da es für die Motilität, Endo- oder Exozytosis, bei der Zellteilung und der Aufrechterhaltung der Zellform beteiligt ist. Bei Endothelzellen stellt das Zytoskelett die Integrität des Monolayers sicher und reguliert die Kontraktion. Quer durch die Endothelzellen verlaufende Aktin-Filamente können mit Myosin interagieren, was zu einer Kontraktion der Zelle führt. Das Myosin Molekül, vom Typ II Myosin ist der molekulare Motor der Kontraktion in der glatten Muskulatur und in Nicht-Muskelzellen. Myosin II ist aufgebaut aus zwei miteinander verdrillten Eiweißmonomeren, die zum Ende hin zu zwei Köpfchen verdichtet sind. Myosin II besteht aus einem Paar schwerer Ketten, einem Paar essentieller leichter Ketten (essentielle MLC) und einem Paar regulatorischer leichter Ketten (regulatorische MLC, Abb. 8). Jede 200 kDa schwere Kette besteht aus einem globulären Kopf, welches eine ATP und Aktin Verbindungstelle besitzt, die für den Kontraktionsvorgang wichtig ist und aus einer Domäne, die helikal geformt ist. Die 17 kDa essentielle MLC und die 20 kDa regulatorische MLC haben ähnliche Strukturen und liegen im Übergangsbereich des Myosin Kopfes.

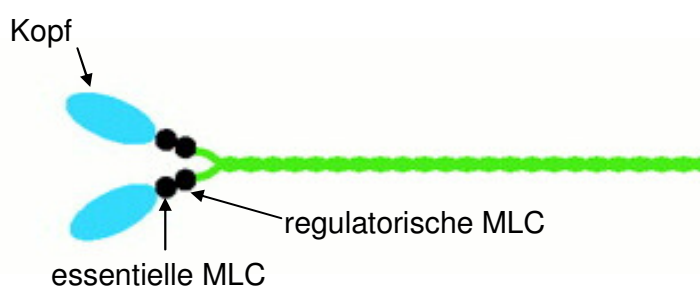


Abb. 8: Myosin II Molekül.
Krendel, M. *et al.* 2005

Wichtige Regulatoren der Kontraktion sind die MLCK und ihre Gegenspielerin, die Myosin-leichte-Kette-Phosphatase (MLCP). Diese beiden Enzyme phosphorylieren bzw. dephosphorylieren die regulatorische Myosin-leichte-Ketten (MLC). Stärkere Phosphorylierungen der MLC gehen mit vermehrten Aktomyosin-Interaktionen einher, was wiederum zur Kontraktion des Aktomyosin-Netzwerkes in der Zelle und damit zum Öffnen des parazellulären Spaltes führt (Dudek & Garcia 2001). MLCK hat nur ein bekanntes Zielprotein, die MLC, daher wird die MLCK auch als dedicated kinase bezeichnet (Kamm & Stull 2001). Als Mediator der Kontraktion verschiedener Zelltypen, auch von vaskulären EC ist die MLCK zwar gut charakterisiert, ihre Bedeutung für die BHS ist derzeit aber noch unklar und Forschungsschwerpunkt der Doktorarbeit.

In Muskelzellen sind drei MLCK Isoformen bekannt: die glattmuskuläre (smMLCK), die skelettale (skMLCK) und die kardiale (cMLCK) MLCK. In Nichtmuskelzellen sind vier MLCK Isoformen bekannt (MLCK1-4). In skelettalen und kardialen Muskelzellen lösen die skMLCK und die cMLCK zwar keine Muskelkontraktion aus, da die Aktomyosin Kontraktion Ca^{2+} -Troponin getriggert ist, dennoch unterstützt die skMLCK und cMLCK vermittelte Phosphorylierung der MLC die Kontraktion (Sweeney *et al.* 1993). In Nichtmuskelzellen und in der glatten Muskulatur ist die MLCK dagegen essentiell für die Kontraktion.

In vaskulären Endothelzellen wird am häufigsten die MLCK1 Isoform zusammen mit der MLCK2 exprimiert. Die MLCK1 (auch MLCK210 genannt) ist die schwerste Isoform mit einer Molekülmasse von 210 kDa, MLCK1 enthält eine zusätzliche p60Src-vermittelte Tyrosin Phosphorylierungsdomäne (siehe Abb. 9 (Birukov *et al.* 2001)).

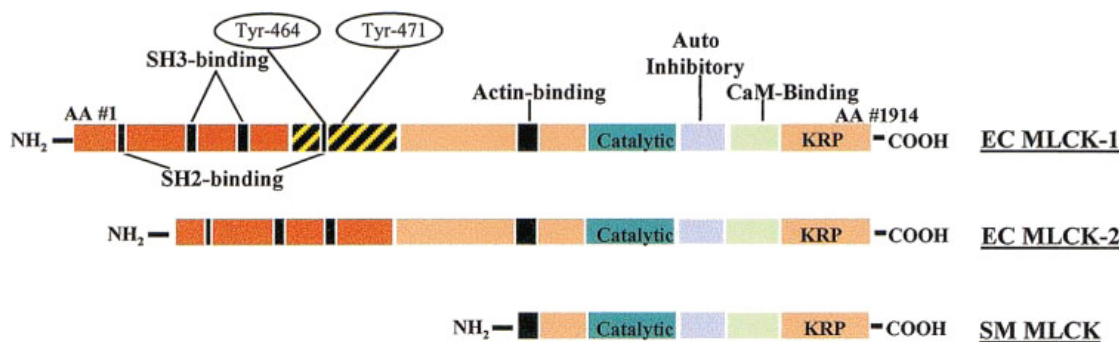


Abb. 9: Endotheliale MLCK Isoformen

In vaskulären EC wird die Aktin-Myosin Interaktion durch den Phosphorylationsgrad der MLC reguliert (siehe Abb. 10). Die Aktivierung der MLCK ist dabei der zentrale Schritt in der Aktomyosin-basierten Kontraktion. Die MLCK wird durch Ca^{2+} / Calmodulin aktiviert. Eine Phosphorylierung an Tyr-464 und Tyr-471 durch Proteinkinasen, wie z. B. Protein Kinase A (Conti & Adelstein

1981), Protein Kinase C (Nishikawa *et al.* 1985), CaM Kinase II (Hashimoto & Soderling 1990), beeinflusst die Bindungsaffinität zu Calmodulin (Atkinson *et al.* 1976). Die MLCK phosphoryliert Myosin an Ser-19 und Thr-18 der Myosin leichte Kette (MLC), wodurch der Myosinkopf für die Interaktion mit Aktin aktiviert wird. Der Gegenspieler der MLCK ist die MLCP, die die MLC dephosphoryliert und somit eine Relaxion des Zytoskeletts hervorruft. RhoA, ein Mitglied der Rho Familie small GTPases, spielt eine wichtige Rolle in der Regulation von MLCP. G-Proteins gekoppelte RhoA aktiviert die Rho-Kinase, die wiederum die MLCP phosphoryliert und infolgedessen inhibiert, wodurch der Phosphorylierungsgrad der MLC erhöht wird (Essler *et al.* 1998, Totsukawa *et al.* 2000).

Die endotheliale parazelluläre Permeabilität wird durch den MLCK-abhängigen Signaltransduktionsweg reguliert, aber auch über einen MLCK unabhängigen Mechanismus.

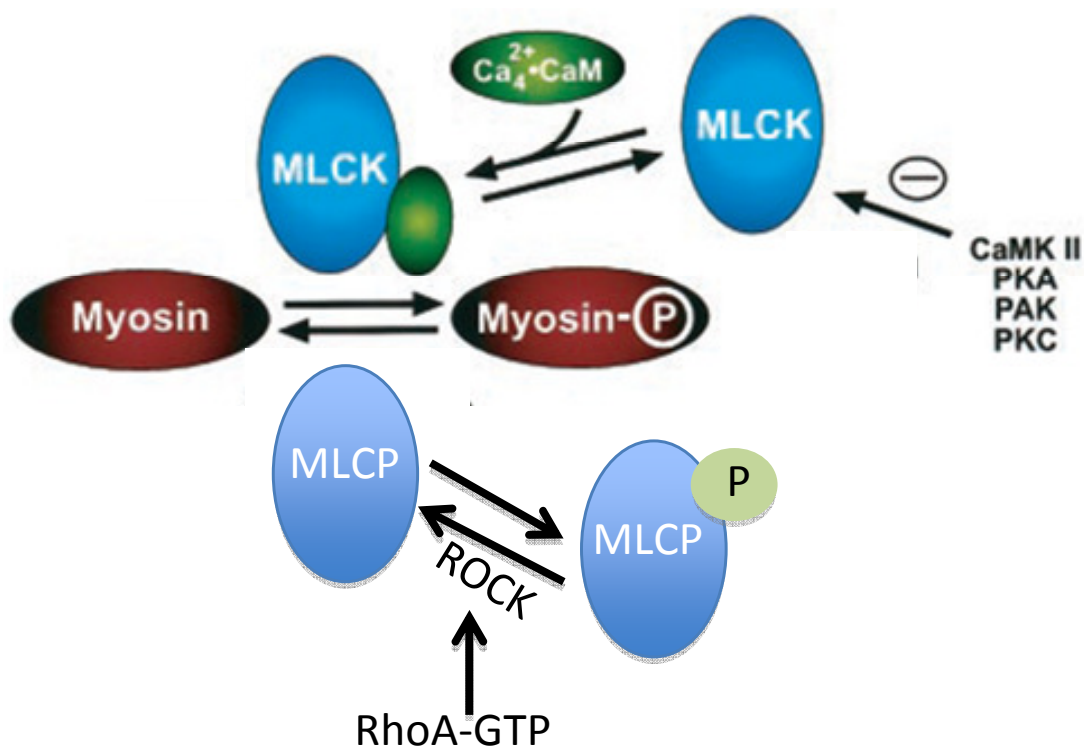


Abb. 10: Schematische Darstellung der Regulation und Modulation der Myosin Phosphorylierung. Modifiziert nach (Kamm & Stull 2001).

3.3. Permeabilität der BHS nach zerebralem Insult

In-vitro konnte gezeigt werden, dass die Integrität der BHS abhängig vom Phosphorylierungsgrad der MLC ist. Durch einen ischämischen Insult kommt es zu einer gesteigerten Permeabilität der BHS, was durch einen Abfall des transendothelialen Widerstandes (TEER) charakterisiert ist. Die gesteigerte Permeabilität ist auf eine verstärkte Aktivierung der MLCK zurückzuführen, was zu ei-

ner verstärkten Phosphorylierung der regulatorischen MLC führt (Kuhlmann et al. 2007). Auch Ethanol führt zu einer Aktivierung der MLCK in zerebralen Endothelzellen, woraus eine verstärkte Phosphorylierung der MLC, aber auch von Occludin und Claudin-5 resultiert. Durch die Phosphorylierung ändert sich die TJ und Zytoskelett-Anordnung. Beide Phosphorylierungen führen zu in einer Störung der BHS Integrität (Haorah et al. 2005).

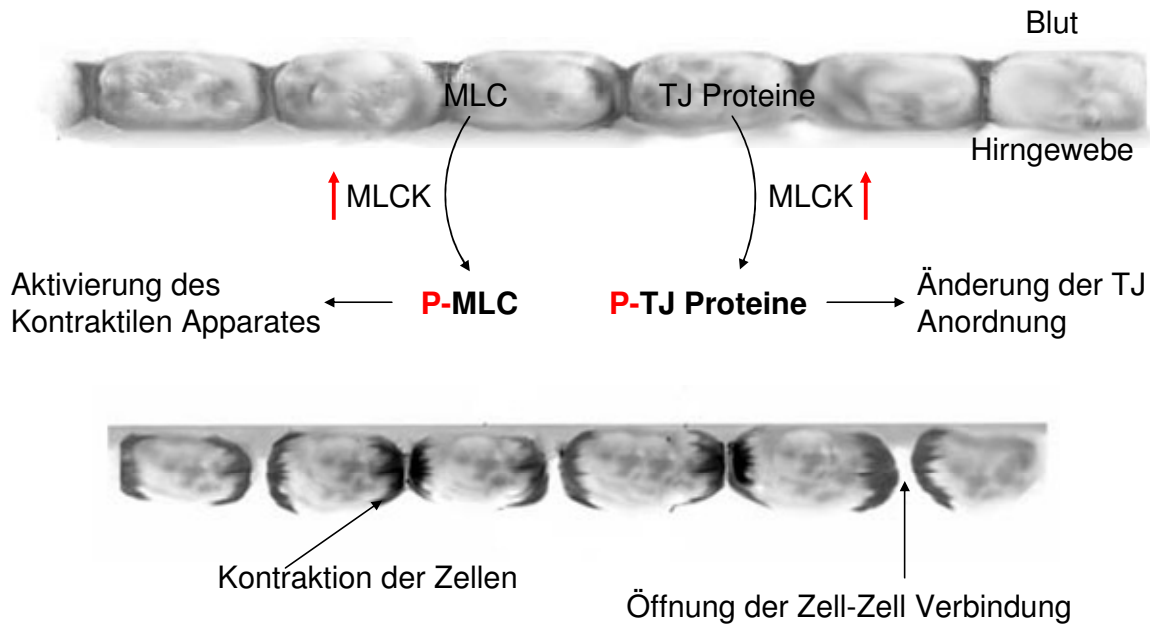


Abb. 11: Schematische Darstellung der BHS Störung durch Aktivierung der MLCK. Modifiziert nach (Haorah et al. 2005) und (Kuhlmann et al. 2007). Die Aktivierung des kontraktilen Apparates und die Änderung der TJ Anordnung führt zum Zusammenbruch der BHS.

3.3.1. Einfluss von C-reaktives Protein auf die BHS

C-reaktives Protein ist ein Akut-Phase-Protein des Menschen, das in der Leber gebildet wird. Die Serumkonzentration von CRP bei gesunden Patienten ist unter 1 µg/ml (Volanakis 2001). Durch eine Infektion, Inflammation oder Gewebsverletzung kommt es, während der akuten Phase, zu einem sehr schnellen Anstieg der Serumkonzentration, der ein Maximum nach 24 - 48 Stunden erreicht und mit einem bis zu 1000-fachen Anstieg einhergehen kann (Volanakis 2001). Klinisch wird CRP als Marker für eine akute Infektion, aber auch für chronische Erkrankungen, wie rheumatische Arthritis herangezogen. Erhöhte Plasma Level nach einer akuten zerebralen oder kardiovaskulären Ischämie sind assoziiert mit einem schlechten Verlauf der Krankheit (Di Napoli et al. 2001, Ridker et al. 2002) und korrelieren mit der Entstehung eines Hirnödems nach einem Schlaganfall (Modrego et al. 2008). In einem in-vitro BHS Model konnte gezeigt werden, dass C-reaktives Protein (CRP) über die Bindung an Fcγ-Rezeptoren den kontraktilen Apparat aktiviert und zu einem Öffnen der BHS führt (Kuhlmann et al. 2009).

3.3.1.1. Funktion von CRP

CRP ist ein zyklisches Pentamer, das aus fünf nicht kovalent gebundenen identisch großen Protomeren aufgebaut ist. Das CRP Pentamer weist die gleiche räumliche Orientierung auf und besitzt eine „Erkennungsseite“ bzw. B-Bindungsseite mit einer Phosphocholin (PC)-Bindungsdomänen und eine „Effektorseite“ bzw. A-Bindungsseite bestehend aus der C1q- und der Fc γ R-Bindungsdomäne (Marnell *et al.* 2005). Durch die Bindung an PC, C1q bzw. Fc γ R, besitzt CRP die Fähigkeit, Pathogene und beschädigte Zellstrukturen des Wirtsorganismus zu erkennen und diese durch Aktivierung des Komplementsystems und phagozytierender Zellen zu eliminieren (Gershov *et al.* 2000).

In-vitro und in-vivo Studien konnten zeigen, dass CRP anti- und pro-inflammatorische Eigenschaften besitzt. CRP induziert in Monozyten und Makrophagen die Sekretion von Interleukin-1 und TNF (Ballou & Lozanski 1992). CRP führt auch zu einer down-Regulation von Neutrophilen und deren chemotaktischen Antworten, was insgesamt zu einer abgeschwächten Aktivität der Neutrophilen während der akuten Inflammation führt (Zhong *et al.* 1998).

3.3.1.2. Fc Rezeptoren

Die Fc Rezeptoren, die an den Fc-Teil (fragment crystallizable) der Immunglobuline binden spielen zusammen mit den Rezeptoren für die Komponenten des Komplementsystems eine zentrale Rolle in der Vermittlung zwischen humoraler und zellulärer Immunabwehr. Fc Rezeptoren werden auf allen Zellen des Immunsystems exprimiert und unterstützen die hochspezifischen Interaktionen zwischen Antikörpern und ihren Antigenen mit zellulären Effektormechanismen (Brown & Davis 2002). Alle Klassen der Immunglobulin (Ig) Antikörper binden an den entsprechenden Fc Rezeptoren, deren Einteilung sich aus ihrer Spezifität für den Fc-Teil ergibt. Die meisten Fc γ R liegen als hetero-oligomere Komplexe aus der liganden-bindende α -Kette und aus signaltransduzierenden γ -, β -oder ζ -Ketten. Für IgG wurden die Fc γ Rezeptoren, für IgE die Fc ϵ Rezeptoren, für IgA die Fc α Rezeptoren, für IgD die Fc δ Rezeptoren und für IgM die Fc μ Rezeptoren beschrieben (Ravetch & Kinet 1991). Die Ig Bindung an den Rezeptor löst unterschiedliche Reaktionen aus. Bei Fc γ -Rezeptoren führt die IgG Bindung u.a. zur Phagozytose opsonierter Partikel, wie Bakterien oder Viren, Endozytose, antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) (durch NK-Zellen), Zytokinproduktion und Freisetzung, Antigenpräsentation, Antikörperproduktion und die Beseitigung von Immunkomplexen (Review: (Ravetch & Kinet 1991)). Bei Fc ϵ Rezeptor IgE Bindung kommt es zur Freisetzung von Histamin und Serotonin sowie anderer inflammatorischer Faktoren, was den Fc ϵ RI zu einem wichtigen Mediator von allergischen Reaktionen macht (Turner & Kinet 1999).

Das humane IgG überwiegt mit einem Anteils von ca. 75 % der gesamten Immunglobuline und hat dadurch eine zentrale Stellung im spezifischen Immunsystem. Dies äußert sich auch in der großen

Verbreitung und heterogenen Funktionalität der Rezeptoren für IgG.

3.3.1.3. Fcγ Rezeptoren

Die Fcγ-Rezeptoren binden die Fc-Domäne von Immunglobulin G (IgG). Zusätzlich zeigen Daten, dass auch die angeborene immun Opsonine, wie CRP und Serum Amyloid P an die Fcγ-Rezeptoren binden und eine Verbindung zwischen angeborener und erworbener Immunität schaffen.

Es gibt drei verschiedene Strukturtypen des Fcγ-Rezeptors, die mit IgG interagieren. FcγR beinhalten strukturell und biochemisch differente Moleküle und unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Zellverteilung sowie ihrer Affinität und Spezifität für IgG-Subklassen. FcγRI (CD64) bindet mit hoher Affinität an IgG, wohingegen FcγRII (CD32) und FcγRIII (CD16) mit niedriger Affinität an IgG binden. Die drei Klassen der Fcγ-Rezeptoren kommen sowohl in Menschen, wie auch in Mäusen vor, jedoch in unterschiedlichen Zellen und mit unterschiedlicher Bindung an IgG Subklassen (siehe Tabelle 2; Review: (Fridman 1991) und (Gessner *et al.* 1998)).

Tabelle 2: Humane und murine FcγR nach (Fridman 1991) und (Gessner *et al.* 1998).

	Human			Murin		
	FcγR Klasse			FcγR Klasse		
	I	II	III	I	II	III
Zellen	Makrophagen	Monozyten Neutrophile Eosinophile Thrombozyten B Lymphozyten	Makrophagen Neutrophile Eosinophile NK Zellen T Lymphozyten	Makrophagen	Makrophagen B Lymphozyten T Lymphozyten	NK Zellen
Affinität zu IgG	10^8 M^{-1}	$10^5 - 10^6 \text{ M}^{-1}$	$10^5 - 10^6 \text{ M}^{-1}$	10^8 M^{-1}	$10^5 - 10^6 \text{ M}^{-1}$	$10^5 - 10^6 \text{ M}^{-1}$
Spezifität für IgG	IgG1, G3	IgG1, G3>G2, G4	IgG1, G3>G2, G4	IgG2a	IgG1, G2b, G2a	IgG1, G2b, G2a
Funktion	Endozytose, Antigen Präsentation, ADCC Phagozytose	Ila: Endozytose, Antigen Präsentation, Phagozytose, ADCC, Mediator Freisetzung Iib: Endozytose, negative Regulation	Illa: Endozytose, Antigen Präsentation, ADCC, Apoptose, Phagozytose, Mediator Freisetzung IIIb: ADCC	ADCC, Phagozytose	Iib1: Apoptose, negative Regulation Iib2: Endozytose, Phagozytose, Antigen Präsentation	ADCC, Antigen Präsentation, Phagozytose, Degranulation, Mediator Freisetzung

FcγR werden auch eingeteilt nach ihren Eigenschaften, das Immunsystem über „immunoreceptor tyrosine-based activation or inhibition motifs, ITAM oder ITIM“ zu aktivieren (FcγRI, FcγRIIA/C, FcγRIII) oder zu inhibieren (FcγRIIB) (Cambier 1995). Diese signalisierenden „motifs“ liegen auf

der Liganden-bindenden α -Kette für Fc γ RII oder auf den homodimeren γ -Ketten für die Fc γ RI und Fc γ RIII, aber auch Fc ϵ RI (siehe Abb. 12 und 13).

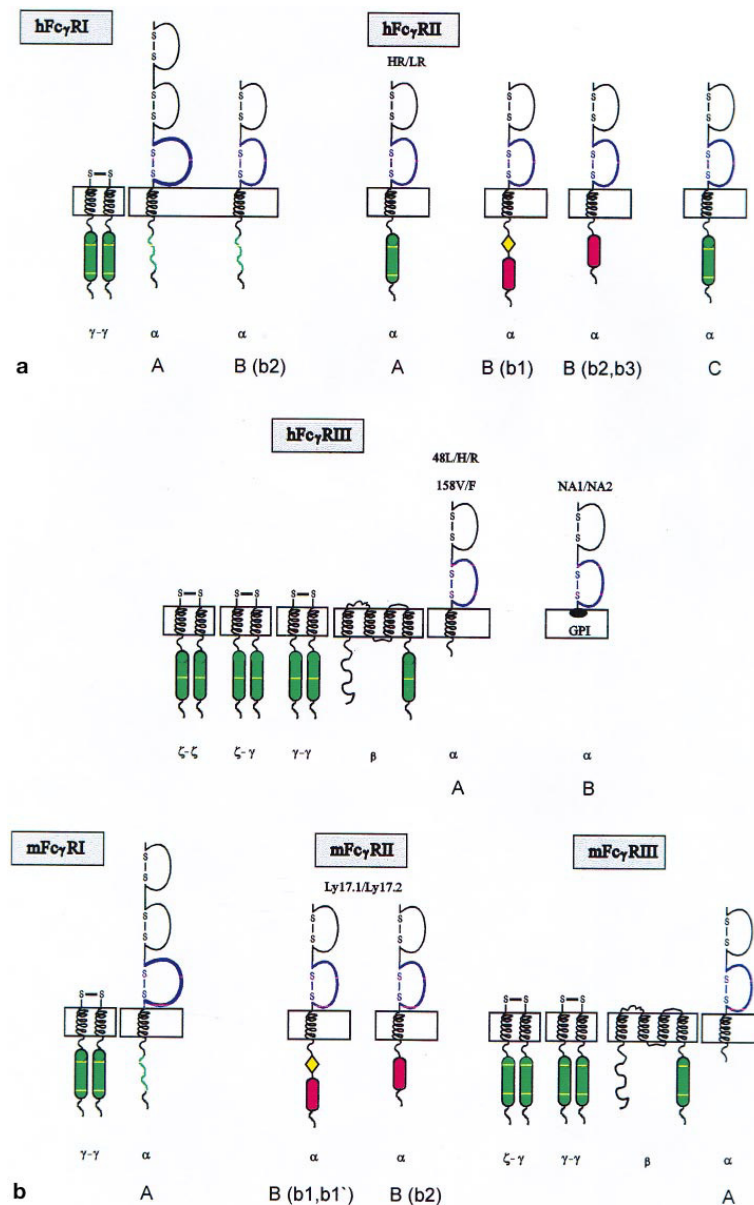


Abb. 12: Schematische Präsentation des humanen (a) und des murinen (b) IgG Fc γ Rezeptors. Alle Fc γ Rezeptoren haben zwei oder drei homologe extrazelluläre Ig Erkennungsdomänen. Die IgG Membran-proximale Ligandenbindungsdomäne ist blau dargestellt. Aktivierende ITAM Sequenzen sind in grün und inhibierende ITIM Sequenzen sind rot gekennzeichnet. Gelb markiert ist die Region, die verantwortlich für die Inhibition der Endozytose ist (Gessner et al. 1998).

3.2.1.1. Humaner Fc γ RI (CD64)

Der Fc γ RI ist ein multimerer Rezeptorkomplex aus ligandenbindender α -Kette und ITAM enthaltende FcR γ -Kette. Die γ -Kette ist ein Homodimer, das auch mit dem hochaffinen Rezeptor für IgE, dem Fc ϵ RI (Paolini *et al.* 1991) und mit Fc γ RIIIa assoziiert ist (Ra *et al.* 1989, Gessner et al. 1998).

Durch Bindung der FcR γ -Kette kommt es zur Aktivierung des Immunsystems, was die Antigen-Präsentation, ADCC, Phagozytose, reaktive Sauerstoffspezies- und Zytokin-Produktion induzieren kann. Die Expression der Fc γ RI wird durch Interferon- γ (IFN- γ) (Uciechowski *et al.* 1998), IL 10 und der Granulozyten-Kolonie stimulierende Faktor induziert, während IL 4 eine negative Regulation bewirkt (Hulett & Hogarth 1994).

3.2.1.2. Humaner Fc γ RII (CD32)

Zu der Fc γ RII Klasse gehören zwei Subtypen, die aktivierenden Rezeptoren Fc γ RIIa, der nicht in der Maus vorkommt und Fc γ RIIc und der inhibierende Rezeptor Fc γ RIIb. Die unterschiedlichen Funktionen der Fc γ RII resultieren aus den auf dem Liganden-bindenden α -Kette liegenden Signal „motifs“ ITIM für Fc γ RIIb und ITAM für Fc γ RIIa. Fc γ RIIb ITIM und Fc γ RIIa ITAM sind essentiell für das Gleichgewicht zwischen aktivierende und inhibierende Effekte. Die ITAM Sequenzen entsprechen denen, der γ -Ketten und T- und B-Zellen Antigenrezeptoren. Der Fc γ RIIb, der am häufigsten exprimiert wird, enthält inhibierende ITIM Sequenzen und ist damit in der Lage die ITAM-medierte Effekte zu inhibieren. In Mäusen entspricht der Fc γ RII, der in vier Isoformen vorkommt, dem humanen Fc γ RIIb (Gessner *et al.* 1998).

3.2.1.3. Humaner Fc γ RIII (CD16)

Vom Fc γ RIII sind zwei Isoformen bekannt, Fc γ RIIIa und Fc γ RIIIb. Während der Fc γ RIIIb auf der Zelloberfläche als monomeres Protein exprimiert wird, besteht Fc γ RIIIa Rezeptor aus einem multimeren Rezeptorkomplex aus γ und ζ Ketten, was zu den unterschiedlichen Funktionen der beiden Isoformen führt. Auf NK-Zellen verursacht der Fc γ RIIIa die Produktion ADCC und die Antikörper abhängige Immunantwort. Die Expression von Fc γ RIIIa wird durch Interferon- γ auf Mesangiumzellen getriggert, was zu Sekretion von IL-6 führt. Die Vernetzung von Fc γ RIIIb auf Neutrophilen führt zu einer zellulären Aktivierung. Die Interaktion von Fc γ RIIIb mit anderen Zelloberflächen-Proteinen scheint die synergistische Antworten zu triggern. So ist die Interaktion von Fc γ RIIIa und Fc γ RIIIb wichtig für eine effiziente Phagozytose, ADCC und Degranulation. Fc γ RIIIa wird dabei als essentiell für die Induktion effizienter Effektorfunktionen angesehen, wohingegen der Überschuss an Fc γ RIIIb eine wirksame Interaktion mit IgG-Komplexen garantiert (Takai *et al.* 2003, Gessner *et al.* 1998).

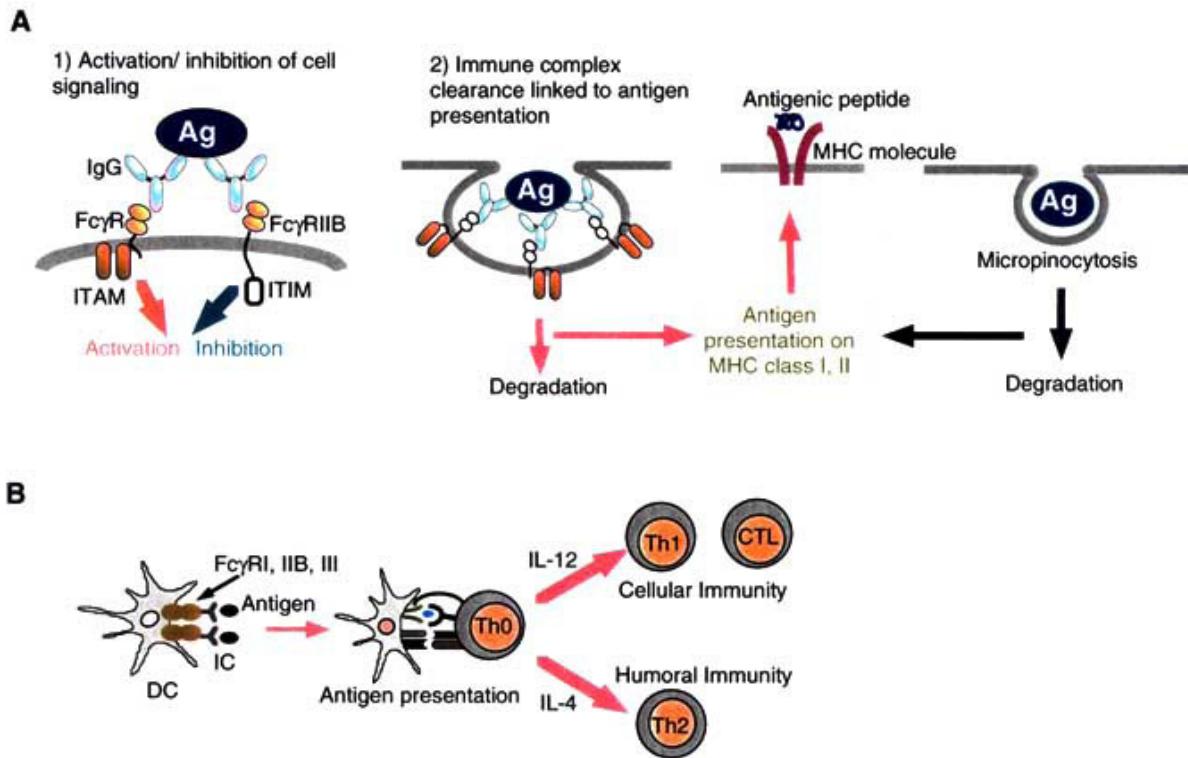


Abb. 13: Die zwei wichtigsten Rollen der Fc γ R: Positive/negative Regulation und Antigen-Präsentation. (A) Positive und negative Regulation des zellulären Signalweges und Clearance des Immunkomplexes (IC) durch MHC Klassen I und II. Fc γ R spielen eine zentrale Rolle bei der Immunantwort. Die Aktivierungskaskade durch Fc γ R resultiert in einer zellulären Aktivierung, was zur Phagozytose, ADCC, ROS, Produktion und Freisetzung von Zytokinen und proinflammatorischer Mediatoren führt. Im Gegensatz dazu, inhibiert der ITIM enthaltende Fc γ RIIB die ITAM induzierte Kaskade.

(B) Die verstärkte Antigenpräsentation führt zur zellulären und humoralen Immunantwort (Frank et al. 1987).

4. Zerebrale Insulte

4.1. Schlaganfall

Unter Schlaganfall versteht man ein plötzlich einsetzendes neurologisches Defizit aufgrund einer zentralnervöse Ischämie oder Hämorrhagie. Man unterscheidet zwischen drei verschiedenen Arten eines Schlaganfalles: Subarachnoidalblutung, intrazerebrale Blutung oder dem ischämischen Schlaganfall, der für ca. 80 % aller Schlaganfälle verantwortlich ist. Der Schlaganfall ist, nach kardiovaskulären und Krebserkrankungen, die dritthäufigste Todesursache der Industrieländer mit einer globalen Mortalitätsrate von 4,7 Millionen Menschen im Jahr (Bramlett & Dietrich 2004).

4.1.1. Ischämischer Schlaganfall

Beim ischämischen Schlaganfall kommt es durch einen lokalen Gefäßverschluss zu einem Verlust

der Sauerstoff- und Glukoseversorgung mit der Folge des Zusammenbruchs des Funktions- und schließlich Erhaltungsstoffwechsels im betroffenen Hirnareal (Bamford *et al.* 1991). Durch die zerebrale Ischämie und der damit verbundenen Reduktion des CBF kommt es innerhalb weniger Minuten zum Absterben der Neurone im Infarktkern. Das Gebiet um den Kern herum, auch als ischämische Penumbra bezeichnet, besteht aus funktionell geschädigten, strukturell aber noch intakten Zellen, die über Kollateralgefäße mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt werden. Das Absterben der Neuronen nach der zerebralen Ischämie resultiert aus einer Interaktion komplexer, pathophysiologischer Prozesse, wie Exzitotoxizität, Peri-infarkt Depolarisation, Inflammation und Apoptose (Dirnagl *et al.* 1999). Auch durch die Entstehung eines Hirnödems kommt es zum sekundären Schadenswachstum (Rosenberg 1999). Zunächst kommt durch die zerebrale Ischämie zu einem Verlust von Membranpumpen. Dies führt zum Zellschwellen und der Entstehung des zytotoxischen Hirnödems, wodurch wiederum freie Radikale und Proteasen gebildet werden, die Zellmembranen zerstören und das vasogene Hirnödem verstärken. Das zytotoxische und vasogene Hirnödem erreicht ein Maximum nach 24 bis 72 Stunden nach dem ischämischen Insult (Rosenberg 1999).

4.1.2. Subarachnoidalblutung

Als Subarachnoidalblutung (SAB) bezeichnet man eine Blutung aus einer Gefäßaussackung (Aneurysma) der hirnversorgenden Arterie. Subarachnoidalblutungen sind zwar für nur 6-10 % aller Schlaganfälle verantwortlich, diese nehmen in der Folge jedoch einen besonders schweren Verlauf, so dass aus Subarachnoidalblutungen 22-25 % aller zerebrovaskulären Todesfälle resultieren. Bei initial komatösen Patienten kommt es nur bei 11 % der Patienten zu einer vollständigen Erholung. Ca. 70 % der komatösen Patienten versterben innerhalb von 6 Monaten an den Folgen der Blutung (Hop *et al.* 1997, Sudlow & Warlow 1997, Wolfe *et al.* 2000).

Einer der wichtigsten Ursache für die hohe Mortalität und Morbidität nach SAB ist neben der Blutung und dem zerebralen Vasospasmus die Entwicklung eines Hirnödems und eine sich daraus entwickelnde zerebrale Ischämie (Zetterling *et al.* 2010). Bei der SAB kommen beide Hauptformen des Hirnödems vor, das zytotoxische und das vasogene Hirnödem (Orakcioglu *et al.* 2005). Nach experimenteller SAB konnte gezeigt werden, dass das zytotoxische Hirnödem schon innerhalb der ersten zwei Minuten auftritt (Busch *et al.* 1998). Das zytotoxische Hirnödem deutet auf die zerebrale Ischämie hin, die sich nach einer SAB entwickelt. Durch die Ischämie kommt es zum Funktionsverlust der Membranpumpen und somit zur Zellschwellung (Rosenberg 1999). Das vasogene Hirnödem, tritt als ein direktes Resultat des BHS Zusammenbruchs auf.

4.2. Schädelhirntrauma

Als Schädelhirntrauma werden Verletzungen des Schädels mit Hirnbeteiligung bezeichnet. Die häufigsten Ursachen sind Verkehrsunfälle, gefolgt von Arbeits-, Haus- und Sportunfällen. Das Schädelhirntrauma (SHT) ist die häufigste Ursache für Morbidität und Mortalität junger Erwachsener unter dem 45. Lebensjahr (Baethmann *et al.* 2002). Die Inzidenz des Schädelhirntraumas liegt in Deutschland bei 332 pro 100 000 Einwohner pro Jahr (Gesundheitsbericht für Deutschland 2006). Die Mortalität ist noch immer hoch und liegt bei ca. 20 %. Laut „World Health Organisation“ (WHO) starben allein 1998 5,8 Millionen Menschen im Alter von 20 – 40 Jahren an den Folgen eines schweren Schädelhirntraumas. Das SHT ist assoziiert mit einer Minderung des Bewusstseins, weshalb eine intensivmedizinische Versorgung der Patienten oft lebensnotwendig ist. 20% der Erwachsenen bleiben nach einem schweren SHT behindert, 1-14 % verbleiben im sog. apallischen Syndrom (z.B. vegetativer Zustand). In Amerika erleiden jährlich 1,5 Millionen junge Erwachsene ein SHT. Davon werden 230 000 hospitalisiert und überleben, 50 000 sterben und 80 – 90 000 leiden unter Langzeitschäden (National Center for Injury Prevention and Control, 2001). 6 Millionen Menschen leiden bis zum jetzigen Zeitpunkt in den USA an den Folgen einer traumatischen Hirnverletzung (NIH, 1999; Thurmann und Guerrero 1999).

Obwohl viele verschiedene Faktoren eine wichtige Rolle für die hohe Mortalität und Morbidität nach SHT spielen, nimmt die Entstehung eines Hirnödems einen besonderen Stellenwert ein. Bei allen Patienten mit schwerem SHT kommt es zu einer Schwellung des Zerebrums mit Erhöhung des intrakraniellen Drucks. Das Ausmaß der Schwellung korreliert mit einer Verschlechterung der Prognose (Eisenberg *et al.* 1990). Schon innerhalb der ersten Stunden nach SHT kommt es zur Entwicklung des vasogenen Hirnödems. Das zytotoxische Hirnödem entwickelt sich langsamer, über die folgenden Tage und verharrt bis zu zwei Wochen (Barzo *et al.* 1997). Da das vasogene Hirnödem innerhalb der ersten Stunden vorherrschend ist, wird zum einem durch MRI (Magnetik Resonance Image) Studien (Barzo *et al.* 1996) und zum anderen durch BHS Permeabilitäts Messungen belegt, in denen gezeigt wird, dass die Blut-Hirn-Schranke initial für wenige Stunden für große Plasma Proteine passierbar ist. Kleinere Moleküle können jedoch noch bis zu 7 Tagen nach SHT die BHS überwinden (Habgood *et al.* 2007). Die BHS öffnet sich am dritten Tag ein zweites Mal für große Moleküle (Baskaya *et al.* 1997). Das Hirnödem erreicht ein Maximum nach 24 Stunden und bleibt für bis zu 5 Tagen bestehen (Marmarou 2003).

Die Entstehung des Hirnödems kann in eine kurze vasogene Phase eingeteilt werden, die von einer gemischten zytotoxischen / vasogenen Phase abgelöst wird. In der gemischten Phase ist die zytotoxische Komponente die dominante, in der die Zellen ihre Funktion verlieren und sterben. Obwohl das zelluläre Hirnödem dominant zu sein scheint, gehen wir davon aus, dass die Behandlung des

vasogenen Ödems effektiver sein könnte, da ein Anstieg des Hirnwassergehalts, die Gewebevolumenzunahme und der damit verbundene Anstieg des ICP dem vasogenen Hirnödem zugeschrieben wird. Da der ICP Anstieg eine der zentralen Probleme nach SHT darstellt, ist das Verständnis der BHS Störung und die damit verbundene Entstehung des vasogenen Hirnödems essentiell für die Entwicklung einer effektiven Intervention. Die Stabilisierung der BHS könnte ein mögliches Ziel zur therapeutischen Behandlung des zerebralen Ödems sein.

5. Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Aktivierung der Myosin-leichten-Kette-Kinase (MLCK) einen zentralen Mechanismus darstellt, welcher nach zerebraler Läsion eine Öffnung der BHS bewirkt. Diese Hypothese wurde zu einem in dem Traumamodell des Controlled cortical impacts (CCI) und zum anderen nach Subarachnoidalblutung im Maus Fadenmodell untersucht. Es wurden folgende Fragestellungen bzw. Experimente durchgeführt:

- A.) Optimierung des Narkose Regimes im CCI Modell.
- B.) Einfluss des kontraktiven Apparates zerebraler Endothelzellen auf die Stabilität der BHS nach SHT und konsekutive vasogene Ödembildung. Hierzu wurde die MLCK spezifisch mit ML-7 inhibiert und die Endpunkte neurologische Funktion, Hirnödem, BHS-Störung und histologischer Schaden quantifiziert.
- C.) Einfluss des hirnödeminduzierenden Mediators C-reaktives Protein (CRP) auf die Aktivierung der MLCK nach SHT. Hierzu wurde in $Fc\gamma R^{-/-}$ ($Fc\gamma R$ Knockout durch Deletion der γ - Kette) defizienten Mäusen und entsprechenden Wildtyp Tieren die neurologische Funktion, das Hirnödem, der histologische Schaden und die zerebrale Inflammation untersucht.
- D.) Einfluss dieses Mechanismus bei der Entstehung des vasogenen Hirnödems nach SAB. Nach Inhibition der MLCK wurde das Hirnödem, die BHS-Störung und der histologische Schaden bestimmt.

C. Material und Methoden

1. Material

1.1. Geräte, Verbrauchsmaterialien und Software

Geräte	Hersteller
Analysenwaage	Sartorius AG, Göttingen
Blutdruckmessgerät RTBP 2000	Kent Scientific, Torrington, USA
Blutgasanalysegerät ABL800 FLEX	Radiometer Medical ApS, Brønshøj, Denmark.
Einbettautomat	Shandon, Frankfurt a.M.
Elektrophorese Kammern für Aggarosegele	Easycast, Owl Scientific; Portsmouth NH, USA
Gefrierschrank: - 80 °C	Heraeus Sepatech; Osterode
Gefrierschrank: - 20 °C	Comfort, Liebherr; Ochsenhausen
Gewebe-Homogenisator, MM300 mill mixer	Retsch, Haan
Handbohrer	Proxxon; Niersbach
ICP Express Systems, Parenchymsonde	Codman, Johnson & Johnson MEDICAL GmbH, Norderstedt
Inkubator IC8000	Draeger. Lübeck
Kodak EDAS 120 Image System	Eastman Kodak Sàrl, Genève, Switzerland
Kleintierrespirator	Kent Scientific, Großbritannien
Kyrostat Microm HM 560 Cryo-Star	Thermo Fisher Scientific, Walldorf
Laserdopplergerät PF 4001	Perimed, Schweden
LightCycler System LightCycler 1.2 und 480	Roche Molecular Biochemicals; Mannheim
Magnetrührer MR 3001	Heidolph; Schwabach
Mikropipetten	Reference, Research, Eppendorf, Hamburg
Mikroskope Wild M420, Wilozyt BX 300	Leica; Solms Fa. Will, Wetzlar
Zeiss	Carl Zeiss AG, Göttingen
Mikrotom	Reichert-Jung Biocut
NanoVue System	GE Healthcare
pH-Meter	WTW; Weilheim
Pipetten	Eppendorf, Hamburg Gilson, Abimed, Langenfeld ThermoFisher Scientific, Schwerte

Pipettierhilfe, Pipetus-akku	Hirschmann Laborgeräte; Eberstadt
Qubit™ Fluorometer	Molecular Probes™, Invitrogen, Karlsruhe
Schüttler Rotamax 120	Heidolph Instruments, Schwabach
stereotaktischen Rahmen	Kopf Instruments, Tujunga, USA
Taumler Polymax 1040	Heidolph; Schwabach
Thermocycler	Eppendorf, Hamburg
Temperaturhomöostasegerät (Heizplatte)	Hugo Sachs, March-Hugstetten
Temperatursonde TCAT-2DF	Havard, New Jersey, USA
Tischzentrifugen Centrifuge 5415C,	Eppendorf ; Hamburg
Mini-Centrifuge C-1200	Labnet, Woodbridge NJ, USA
Traumamaschiene SHTM-3	L.Kopacz; Mainz
Ultraschallgerät Sonifier W450	Branson, Fürth
Vapor 2000	Dräger Medical, Lübeck
Vortex: Reax control	Heidolph, Hamburg
Heizofen für HWG	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Hettich Universal 16 R	Hettich, Tuttlingen

Verbrauchsmaterial

2 % (w/v) Agarosegel
 ALU-Folie, (Laborfolie)
 Deckgläser 24x50mm
 Dreiweghahn BD Connecta
 Faltenfilter
 Einweghandschuhe Safe Ex
 Einwegpipetten
 Eppendorf Gefäße
 Falconröhrchen (15 und 50 ml)
 Faltenfilter Sorte 595 1/2 Ø 240mm
 Kanülen, Sterican 26 und 28 G
 Kosmetiktuch AS67 21x21 2lg
 LightCycler Kapillaren
 Mikropipettenspitzen
 Nahtmaterial Mersilene 4-0

Hersteller

Invitrogen
 VWR
 Diagonal GmbH
 Becton Dickinson, Helsingborg, Schweden
 Whatman GmbH, Dassel
 SafeMed, Zimmerwald
 Falcon, Becton Dickinson; Heidelberg
 StarLab
 Sarstedt, Nümbrecht
 VWR
 Braun, Melsungen
 Fa. Hegro
 Roche, Mannheim
 TipOne, Starlab, Ahrensburg
 Ethicon, Belgien

Nahtmaterial, Prolene 3-0	Ethicon, Belgien
4 – 12 % NuPAGE Bis-Tris Gele	Invitrogen
Objektträger (Superfrost plus)	Fischer Scientific
PCR Reaktionsgefäße (Softtubes 0,5 ml)	Biozym Scientific, Oldendorf
Pinsel für HM 560	Microm
Pipetten (5, 10 und 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (1000 µl; 200 µl; 100 µl; 20 µl; 10 µl)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Probengefäß Kalium EDTA/1,3ml	Sarstedt, Nümbrecht
Rasierklinge	Plano GmbH
Rastereinsätze 10x10 H:30mm	VWR
Schnittstreckerplättchen aus Glas, 39,5 mm	Microm
Skalpelle Fig 11, Cutfix	Aesculap
S-Monovette Kalium EDTA/1,2ml rot	Sarstedt, Nümbrecht
Sugi Saugtupfer steril	Kettenbach
Träger mit Watte, kleiner Kopf	BZ-Medizin-Technik
Vlieskompressen 10x10cm 6fach	Kael Beese GmbH

Software

Bildbearbeitungsprogramm: Optimate 6.51
 DasyLab 5.0
 FlexPro 6.0
 Geldokumentationssystem: KODAK-
 EDAS 120
 Kamera Software: 1 D Image Analysis Soft-
 ware
 Referenzverwaltung: *EndNote X4*
 Statistik Sigma Plot 11
 Tabellenkalkulation (Excel MS Office 2003)
 Textverarbeitung (Word MS Office 2003)

Hersteller

Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA
 measX
 Weisang
 Eastman Kodak; Rochester NY, USA
 Kodak Digital Science; USA
 Carlsbad, USA
 Sigma, SPSS
 Microsoft, Redmond, USA
 Microsoft, Redmond, USA

1.2. Puffer, Lösungen, Kits, Chemikalien und Arzneistoffe

Puffer und Lösungen

RLT-Buffer

1000 ml Paraformaldehyd 4%

Qiagen, Hilden

500 ml Aqua dest. auf 70 °C erhitzen und 40 g Paraformaldehyd zugeben. Unter Rühren 1 ml 10 molare NaOH dazugeben und anschließend über einen Faltenfilter und Trichter die angesetzte Lösung filtrieren. Über den gleichen Filter zum Schluss 500 ml 0,2 molaren Phosphatpuffer laufen lassen.

PBST

9,55 g PBS (Dulbecco Tockensubstanz)

+ 3 ml Triton X 100 (Sigma-Aldrich)

auf 1 Liter Aqua dest auffüllen. (Einstellen von pH = 7,4 mit NaOH und HCl)

Kresylviolett Färbelösung

5 g Kresylviolett in 100 ml Ethanol (100%) geben und 30 min bei 50 °C mischen. Dann auf 500 ml mit Aqua dest. auffüllen und Lösung filtern

Protein-Lysispuffer

62.5 mmol/L Tris

1 mmol/L EDTA

2 % (w/v) sodium dodecyl sulphate (SDS)

10 % (w/v) Saccharose mit 1 % (v/v) protease inhibitor mix (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) und 1 % (v/v) phosphatase inhibitor mix (Sigma-Aldrich)

SDS-Page Ladebuffer

10 % (w/v) SDS

20 % (v/v) Glycerol

125 mmol/L Tris

1 mmol/L EDTA

0.002 % (w/v) Bromphenol Blau

10 % (v/v) β -Mercaptoethanol

Transferpuffer	150 mM Glycin 20 mM Tris HCl, pH 8,3 10 % Methanol
6X DNA Ladepuffer	30 ml Glycerol 70 ml Aqua dest. 1 Spatelspitze Bromphenol Blau mischen, Aliquots bei 4°C lagern
5X TBE (Tris-Borat-EDTA) Puffer	108 g Tris 55 g Borsäure in 900 ml Aqua dest. auflösen 40 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) dazugeben mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen
Mastermix (cDNA Herstellung)	1 µl Quantiscript RTranskriptase 4 µl Quantiscript RT-Puffer 1 µl RT - Primermix

Kits

ABC-Komplex (Avidin-Biotin-Peroxidase,
Vectastain ABC Kit Standard PK-6100;)
DAB: Liquid DAB + Substrate Chromogen
System;
LightCycler 480 SYBR Green I Master Kit
LightCycler 480 Probes Master FastStart Taq
DNA Polymerase
LightCycler®FastStart DNA Master SYBR
Green I Kit
Maus CRP, Elisa Kit
QIAquick PCR Purification Kit
Qiamp DNA-Mini Kit
QuantiTect Reverse Transcription Kit
Quanti-iT™ RNA Assay Kit

Hersteller

AXXORA, Vector Laboratories, Peterborough,
United Kingdom
DAKO
Roche, Mannheim
Roche, Mannheim
Roche, Mannheim
Hölzel, Köln
Qiagen, Hilden
Qiagen, Hilden
Qiagen, Hilden
Invitrogen, Karlsruhe

RNeasy Lipid Tissue Mini Kit

Qiagen, Hilden

Chemikalien

Agarose

Aqua Spüllösung, steril

Aqua B. Braun Ecotainer [ddH₂O]

Bromphenolblau

BSA = Bovines Serumalbumin (98 %)

Chloroform

Dimethylsulfoxid (DMSO)

Dinatrium-Hydrogenphosphat-Heptahydrat
(Na₂HPO₄ x 7 H₂O)

50 bp DNA Melekulargewichtsmarker

Einbettmedium-Gehirn, Tissue Freezing Me-
dium

Einbettmedium-Gehirn, Neg-50

Eosin-Dinatriumlösung 0,5 %

Ethanol abs. > 99,8 %

Ethylendiamin-tetraacetische Säure (EDTA)

Evans Blue

Formamid

Formalin

Freka-Derm Spray farblos

Histoacryl, Gewebekleber

Isopropanol

Isotonische Kochsalzlösung

Knochenzement Poly-F Plus Bondex

Kresylviolett Acetat

Mayers Häkalaunlösung

Methanol HPLC grade

ML-7, 5-iodonaphthalene-1-
sulphonylhomopiperazine,

NaH₂PO₄ x H₂O

Na₂HPO₄ x 7H₂O

Hersteller

Sigma-Aldrich, München

Braun, Melsungen

Braun, Melsungen

Roth, Kalsruhe

Sigma-Aldrich, München

Sigma-Aldrich, München

Sigma-Aldrich, München

Roth, Karlsruhe

Roche Diagnostics, Mannheim

Jung

Microm

Merck, Darmstadt

Roth, Karlsruhe

Sigma-Aldrich, München

Sigma-Aldrich

Sigma-Aldrich

Sigma-Aldrich

Dr. Schumacher GmbH

Braun Aesculap, Melsungen

Roth, Karlsruhe

Braun, Melsungen

Dentsply DeTrey

Merck, Darmstadt

Merck, Darmstadt

Fisher Scientific, Leicestershire, UK

Sigma-Adrich, Taufkirchen

Merck, Darmstadt

Merck, Darmstadt

Naloxon	Inresa, Freiburg
NaOH 10 M	Sigma-Aldrich
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PBS, Dulbecco Tockensubstanz	Biochrom, Berlin
Protein Marker Prestained PeqGold	Peglab
RNAS Zap	Appleva Deutschland
Roti – Histol	Roth, Karlsruhe
Roti – Histokitt	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Sigma-Adrich
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Stickstoff, flüssig	
SYBR green	Roche
Trichloressigsäure	Sigma-Adrich
Triton X-100	Sigma Aldrich, Steinheim
Tris HCl	Sigma Aldrich, Steinheim
Tri-Natriumcitrat x 2 H ₂ O	VWR
Tween	Biorad Hercules, CA, USA
30% ig H ₂ O ₂ (Wasserstoffperoxid)	VWR

Arzneistoffe

Atipamezol
Fentanyl
Flumazenil
Freka-Derm farblos (Hautantiseptikum)
Heparin-Natrium 25.000
Isofluran
Midazolam
Medetomidin
Naloxon
Panthenol-Augensalbe
Sevofluran

Hersteller

Pfizer, Karlsruhe
CuraMed, Karlsruhe
Hoffmann-La-Roche, Grenzach-Wyhlen
Fresenius, Bad Homburg
Ratiopharm, Ulm
Baxter, Unterschleißheim
Ratiopharm, Ulm
Pfizer, Karlsruhe
Inresa, Freiburg
Jenapharm, Jena
Abbott, Wiesbaden

1.3. Primer, Antikörper und Enzyme

Tabelle 3: Spezifische Primer und Probes und deren Annealing Temperatur für die real-time PCR

PCR (Produkt Größe, Annealing Temp.)	Oligonukleotid Sequenz (5'-3')	GenBank Nr.
Cyclophilin A (PPIA) (146 bp, 55°C, A10, E15)	Forw: 5'-GCGTCTSCCTTCGAGCTGTT-3' Rev: 5'-RAAGTCACCACCCTGGCA-3' Cy5: Red-TTGGCTATAAGGGTTCCTCCTTTCACAG-Phos FL: 5'-GCTCTGAGCACTGGRGAGAAAGGA-FL	NM_008907 (Thal <i>et al.</i> 2008b)
MLC (181 bp, 58°C, A10, E15)	Forw: 5'-GCATCAGGTCAGATTTAAACCG-3' Rev: 5'-CCTTGTC AATGAAGCCATCC-3'	NM_023402
MLCK (176 bp, 58°C, A10, E15)	Forw: 5'-TAGCCCTCAGCAGGTTGACT-3' Rev: 5'-TGACATTCAAGACCTCAGCG-3'	NM_139300
TNF α (212 bp, 62°C, A10, E10)	Forw: 5'-TCTCATCAGTTCTATGGCCC-3' Rev: 5'-GGGAGTAGACAAGGTACAAC-3'	NM_013693 (Ferber <i>et al.</i> 2004)
IL1 β (348 bp, 55°C, A10, E15)	Forw: 5'-gTgCTgTCggACCCATATgAg-3' Rev: 5'-CAggAAgACAggCTTgTgCTC-3' Cy5: Red-CAgCTggAgAgTgTggATCCCAAgC-Phos FL: 5'-TAATgAAAgACggCACACCCACCC-FL	NM_008361
IL6 (141 bp, 58°C, A10, E10)	Forw: 5'-GAGGATACCACTCCCAACAGACC-3' Rev: 5'-AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA-3'	NM_031168 (Giulietti <i>et al.</i> 2001)
COX-2 (ptgs2) (183 bp, 55°C)	Forw: 5'-TCTTTgCCCgCACTTC-3' Rev: 5'-CCTCTCCACCRATgACCTgA-3' Red: R610-ggTCCTCgCTTMTgATCTgTCTTgAA-Phos FL: 5'-CCAgTCCTCgggTgAACCC-FL	NM_011198
iNOS (NOS2) (312 bp, 58°C)	Forw: 5'-TGTGTCAGCCCTCAGAGTAC-3' Rev: 5'-CACTgACACTYCgCACA-3' Red: R610-gCTCCTCCCAggACCACACCC-Phos	NM_010927 (Thal <i>et al.</i> 2008b)
Fc γ Rezeptor I (Fcgr1) (55°C)	Forw: 5'-CCAgAAggAAAATgTCACTTTAT-3' Rev: 5'-TCTTCCCgTgCCTgAgC-3' Red: LC640-gAAAACCAACCTgAgTCACAgCggC-Phos FL: 5'-TCAgATTcggAggTCgCCATTC -FL	NM_010186.5
Fc γ Rezeptor II (Fcgr2b) (55°C)	Forw: 5'-gTTCTCTgggTACTATCTgCCAA-3' Rev: 5'-CATgTCAgTgTCACCgTgTCTTC-3' Red: LC640-ACTgTggACAgCCgTgCTAAATCTTgC-Phos FL: 5'-gTTCTCACggACTTTgTgCCATATgC -FL	NM_001077189 NM_010187
Fc γ Rezeptor III (Fcgr3) (55°C)	Forw: 5'-ATggTgACACTgATgTgCg-3' Rev: 5'-AgTgATggTgACAggCTTg-3' Red: LC640-gAgCCAggTCCAATCCAgCTACACgT-Phos FL: 5'-TggTTCCACAACCTggAgTTCCATCC -FL	NM_010188

FCg KO, Exon1/2 (137 bp, 55°C)	Forw: 5'-CCAGGATGATCTCAGCCG-3' Rev: 5'-ACAGTAGAGTAGGGTAAG-3	(Jiang et al. 1998)
FCg KO, Neo/exon5 (197 bp, 55°C)	Forw: 5'-CTTCCTCGTGCTITACGGTATC-3' Rev: 5'-CTTCAGAGTCTCATATGT-3	Jiang et al. 1998

Antikörper	Verwendete Verdünnung	Hersteller
<i>Primärantikörper</i>		
MLC polyclonaler Antikörper		Cell Signaling
Anti-phospho-MLC	1:1000	Sigma-Aldrich
Anti-MLCK (clone K36)		Sigma-Aldrich
Anti-actin	1:1000	Sigma-Aldrich
Anti-Iba-1	1:1500	WAKO; 019-19741
<i>Sekundärantikörper</i>		
Anti Maus, HRP-konjugiert	1:20 000	Jackson Laboratory, West Grove, USA
Anti Ziege, HRP-konjugiert	1:20 000	Jackson Laboratory, West Grove, USA
Anti Kaninchen, HRP-konjugiert	1:20 000	Jackson Laboratory, West Grove, USA
Anti-Kaninchen IgG biotinyliert (H+L)	1:50	AXXORA, Vector Laboratories Peterborough, United Kingdom
Enzyme	Hersteller	
Protease Inhibitor Mix I	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	
Phosphatase Inhibitor Mix	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	
Protein und Phosphatase Inhibitor-Cocktail	Roche Diagnostics, Mannheim	

1.4. Versuchstiere

Alle Tiere wurden nach institutionellen Richtlinien der Johannes Gutenberg-Universität Mainz in Einzelkäfigen mit freiem Zugang zu Wasser und Futter (Ssnif, Soest, DE) gehalten. Die Tierstallung war voll klimatisiert bei einer Raumtemperatur von etwa 20 °C und einer relative Luftfeuchtigkeit um 65 %. Über eine Zeitschaltuhr wurde ein Zwölf-Stundenrhythmus über eine künstliche Beleuchtung eingehalten. Die Ethik Kommission des Landesuntersuchsamtes Rheinland-Pfalz gab die Zustimmung zu allen tierexperimentellen Studien.

Verwendete Versuchstiere:

- 1) C57Bl/6N Mäuse (männlich, Gewicht: 20-25 g, Charles River)
- 2) C57Bl/6J Mäuse (männlich, Gewicht: 25-35 g, Jackson Laboratory, Bar Harbor ME, USA)
Die Zucht der Mäuse erfolgte in der Zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE).
- 3) $Fc\gamma R^{-/}$ C57Bl/6J Mäuse (männlich und weiblich, Gewicht: 25-35 g, Charles River und Eigenzucht in der ZVTE) aus homozygoter Eigenzucht.

2. Methoden

2.1. Tierexperimente

2.1.1. Narkose

Für den Vorversuch wurden drei verschiedene Narkosemittel verwendet, zwei inhalative und ein intraperitoneales Anästhetikum. Die einminütige Einleitung mit den volatilen Narkosemitteln erfolgte mit 4 % Isofluran oder 6 % Sevofluran. Nach Einleitung wurde die Isofluran bzw. Sevofluran Dosis auf 1,5 % bzw. 3,5 % in einem Gasgemisch von 40 % O₂ und 60 % N₂ angepasst und mittels einer Gesichtsmaske aufrechterhalten. Bei dem intraperitonealen Regime wurden den Tieren eine Mischung aus Midazolam (5 mg/kg), Fentanyl (0,05 mg/kg) und Medetomidin (0,5 mg/kg) injiziert. Ein Gas-Gemisch aus 40 % O₂ und 60 % N₂ wurde den spontan atmenden Tieren zugeführt. Nach Beendigung des Versuches wurde die Narkose mit einer intraperitonealen Injektion von Atipamezol (2,5 mg/kg), Naloxon (1,2 mg/kg) und Flumazenil (0,5 mg/kg) antagonisiert. Für die Hauptversuche wurde nur die intraperitoneale Anästhesie verwendet. Für die länger andauernden Versuche zur Auslösung der SAB wurden die Tiere mit einem druckgesteuerten Kleintierrespirator mit einem Gas-Gemisch aus 40 % O₂ und 60 % N₂ beatmet.

2.1.2. Medikamentöse Aufbereitung

Kurz vor dem Gebrauch wurde ML-7 (5-iodonaphthalene-1-sulphonyl-homopiperazine; Abb. 14) in 0,9 %iger Kochsalzlösung gelöst. Den Mäusen wurde 1 mg / kg Körpergewicht 1 Stunde vor und 6 Stunden (bzw. + 20 Stunden) nach der Operation die Lösung intraperitoneal (i.p.) injiziert. Als Vehikel Kontrolle wurde 0,9 % Kochsalzlösung verwendet.

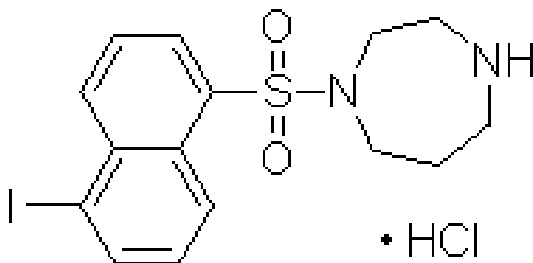


Abb. 14: Chemische Struktur von ML-7 (www.sigmaaldrich.com).

2.1.3. Induktion des Schädelhirntraumas

Die Induktion des Traumas erfolgte mit dem Controlled Cortical Impact (CCI) Modell. Hierfür wurde das Tier im stereotaktischen Rahmen in Bauchlage positioniert. Es erfolgte eine 1,5 cm lange

mediale Inzision der Kopfhaut zur Freilegung des Schädelknochens von der vorderen (Bregma) bis hinteren (Lambda) Koronarnaht. Nach vorsichtiger Entfernung des Periostes, wurde mit Hilfe eines Mikrobohrers eine Kraniotomie über der rechten Hemisphäre zwischen Bregma, Lambda und Arcus zygomaticus, unter Intakthalten der Dura durchgeführt. Zur Kühlung wurde mit 0,9 % NaCl Lösung gespült. Anschließend wurde der Kortex der Tiere mit einem kontrollierten pneumatisch angetriebenen Bolzen mit einem Durchmesser von 3 mm kontusioniert. Die Geschwindigkeit beim Aufschlag des Bolzens auf die Dura betrug 8 m/s, die Eindringtiefe 1 mm bzw. 1,5 mm und die Verweildauer 150 ms. Nach der Kontusion wurde die Kraniotomie mit dem initial entfernten Schädelknochen verschlossen und mit einem Gewebekleber fixiert. Zum Schluss wurde die Hautnaht verschlossen und die Narkose beendet. Die Tiere erholten sich bis zu sechs Stunden in ihren Käfigen in einem Inkubator bei einer Temperatur von 33 °C und bei einer Luftfeuchtigkeit von 35 %.

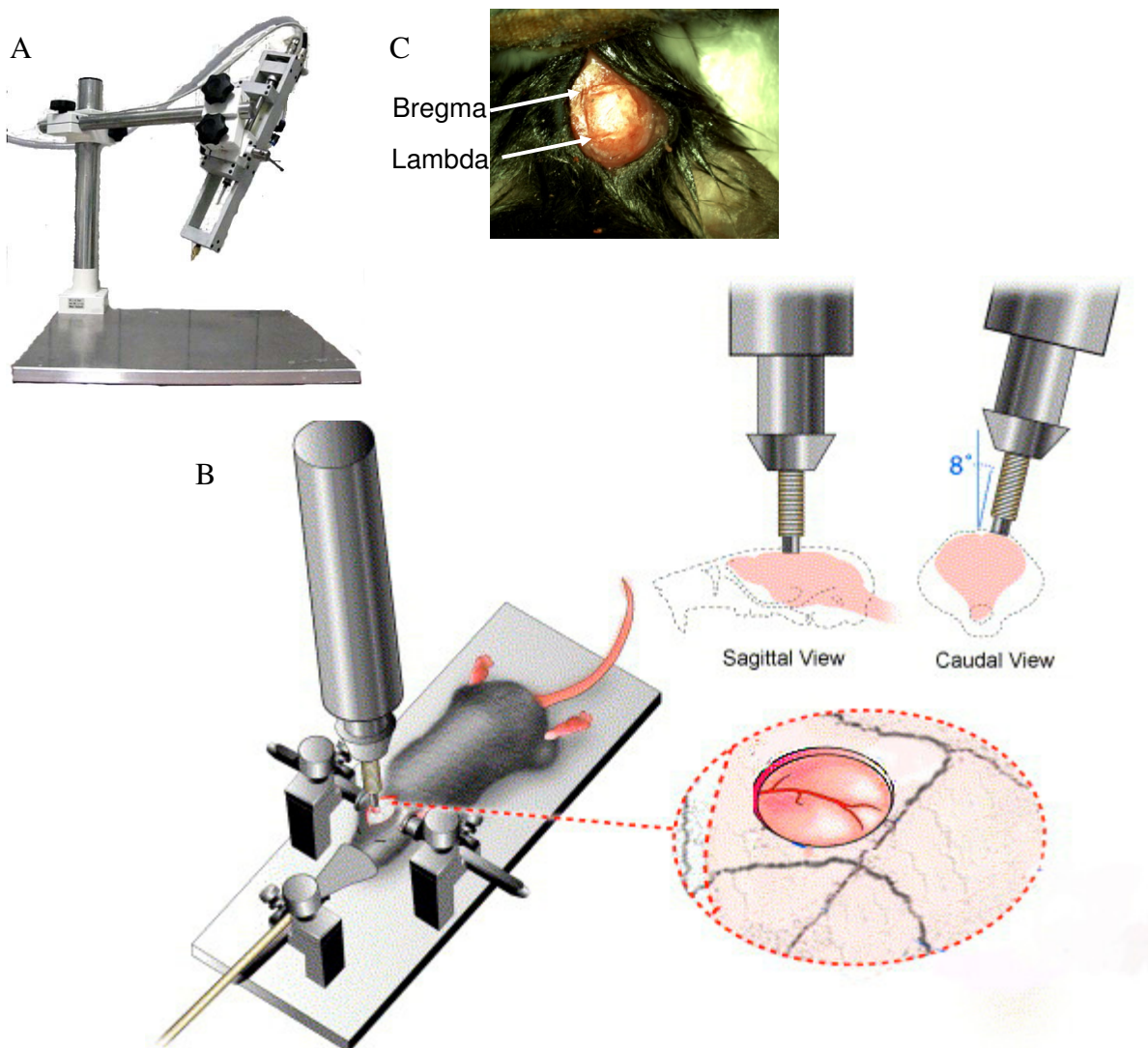


Abb. 15: (A) Traumamaschine: Controlled Cortical Impact (CCI). (B) Schematische Darstellung des CCI Modells. Abb. modifiziert nach Graphik unbekannter Herkunft. (C) Kraniotomiegebiet befindet in der rechten Hemisphäre zwischen Bregma und Lambda.

2.1.4. Induktion der Subarachnoidalblutung

Die SAB wurde induziert durch eine endoluminale Perforation des Circulus Willisii nach einem modifizierten Modell (Feiler *et al.* 2010) des Fadenmodells von Bederson (Bederson *et al.* 1995). Die Maus wurde hierfür in Rückenlage positioniert und der Hals lateral der Medianlinie geöffnet, um die Carotisbifurkation freizulegen. Die freigelegte A. carotis externa wurde mittels Fadenligatur verschlossen. Die Carotis communis und Carotis interna wurden temporär geclippt, so dass die Durchtrennung und Eröffnung der Carotis externa ermöglicht wurde. Nach dem Öffnen der Carotis externa wurde ein monophiler Faden (Prolene 5-0) eingeführt und mit einer Fadenligatur das Gefäß abgedichtet. Die temporären Clips auf der A. carotis communis und interna wurde entfernt, so dass der Faden unter Laserdoppler-Kontrolle von der Carotis externa in die Carotis interna vorgeschoben werden konnte. Die richtige Position des Fadens in der Nähe der Bifurkation der Carotis interna wurde mit einem ipsilateralen leichten Abfall des LCBF am Abgang der A. cerebri media mittels LDF (Laserdopplerfluxmetrie) festgestellt. Der Faden wurde dann bis Perforation des Gefäßes vorgeschoben. Ein sofortiger Laserdoppler-Abfall mit gleichzeitigem ICP-Anstieg belegt die Induktion der SAB. Nach Narkoseausleitung wurden die Tiere für 6 Std. in einem Intensivinkubator bei 33 °C Raumtemperatur und 35 % Luftfeuchtigkeit gehalten.

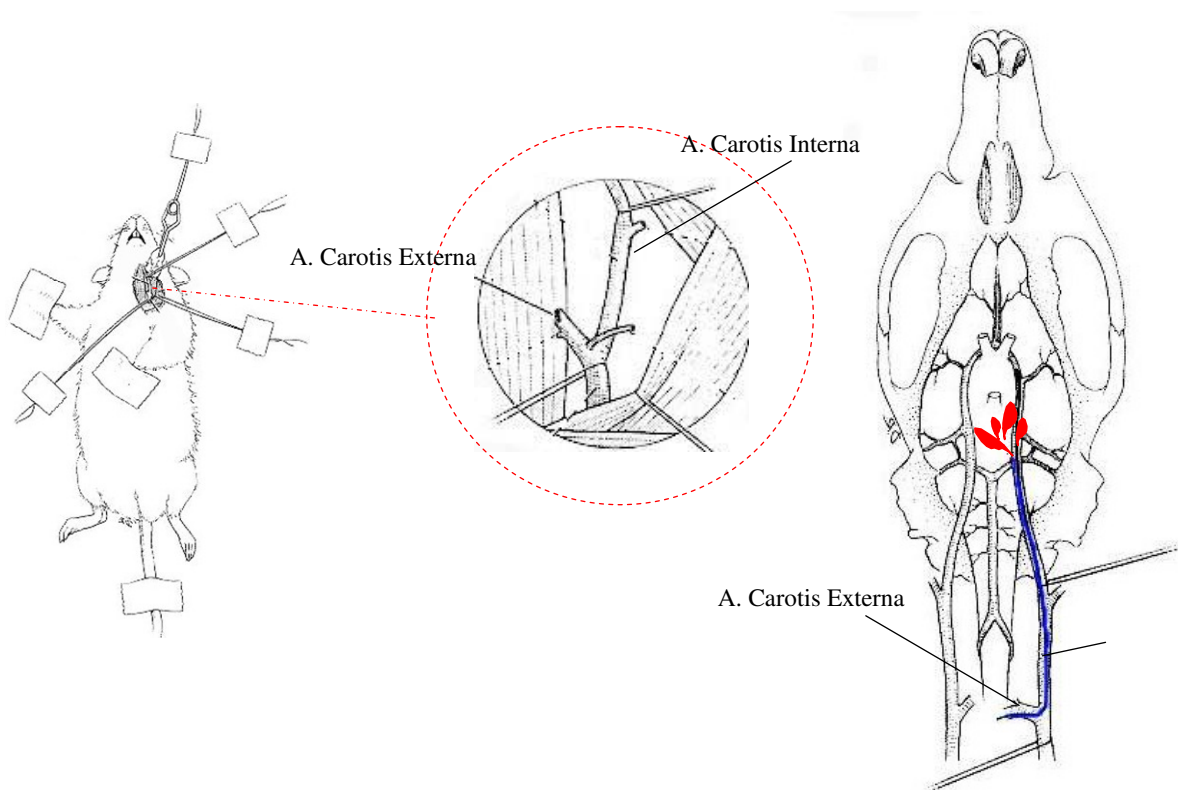


Abb. 16: Schematische Darstellung der Subarachnoidal-Blutung: endoluminale Perforation des Circulus Willisii mit Überwachung des CBF und ICP. Abb. modifiziert nach Graphik unbekannter Herkunft.

2.1.5. Intrakranielle Druckmessung

Für die intrakranielle Druckmessung wurde das Tier in Bauchlage positioniert. Nach Freilegung des Schädelknochens wurde ipsilateral eine ca. 1,5 mm großes Bohrloch in der Mitte zwischen Bregma und Lambda, rechts parasagittal gefräst. Über dieses Loch wurde eine Parenchymsonde mit Hilfe eines Mikromanipulators in die Hemisphäre eingebracht. Für die Operation wurde die Sonde mit Knochenzement auf der Schädelkalotte befestigt. Die Messung erfolgte mittels Codman ICP Express Systems Die Auswertung erfolgte offline mit dem Programm FlexPro 6.0.

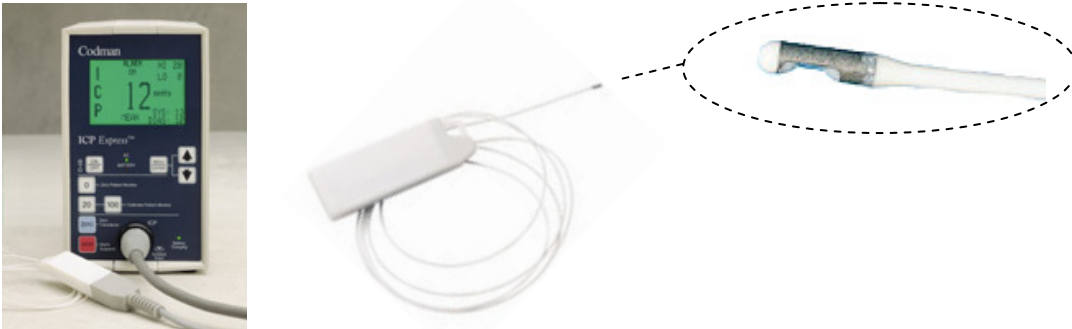


Abb. 17: Codman ICP microsensor

2.1.6. Messung des lokalen zerebralen Blutflusses mittels Laserdopplerfluxmetrie

Zur ipsilateralen kontinuierlichen Erfassung der zerebralen Durchblutung wurde eine Laserdoppler-sonde auf den Schädelknochen aufgesetzt. Die Maus wurde hierfür in Bauchlage positioniert. Über dem Versorgungsgebiet der A. cerebri media wurde der Temporalis Muskel mobilisiert und die Sonde auf den Schädelknochen aufgesetzt. Die Sonde war an einem 2-Kanal Laserdopplergerät PF4001 angeschlossen. Die Erfassung der Daten erfolgte mit 1 Hz, beginnend 15 Minuten vor Induktion bis 15 Minuten nach Induktion der SAB.

2.1.7. Schematische Darstellung

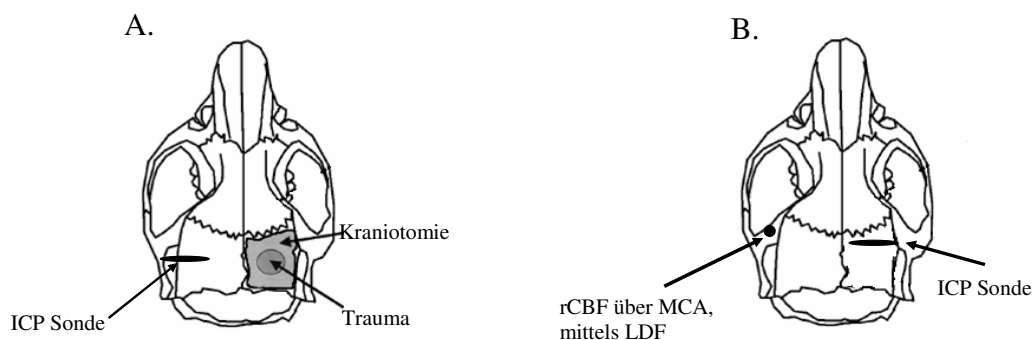


Abb. 18: (A) Darstellung des Kraniotomiegebietes, der ICP Messposition und der Traumaposition bei CCI, (B). Darstellung der ICP Messposition und CBF Messposition bei SAB.

2.1.8. Blutdruckmonitoring

Der systolische Blutdruck wurde mit einem nicht invasiven NIBP System (non invasive blood pressure system) am Schwanz der Mäuse gemessen (Thal & Plesnila 2007). Hierfür wurde das Manschetten Druck Signal bei einer Frequenz von 100 Hz aufgezeichnet (A/D converter: PCI 9112, Ad-link Technology, Taiwan; PC Software: DasyLab 5.0) und offline analysiert (Flexpro 6.0).

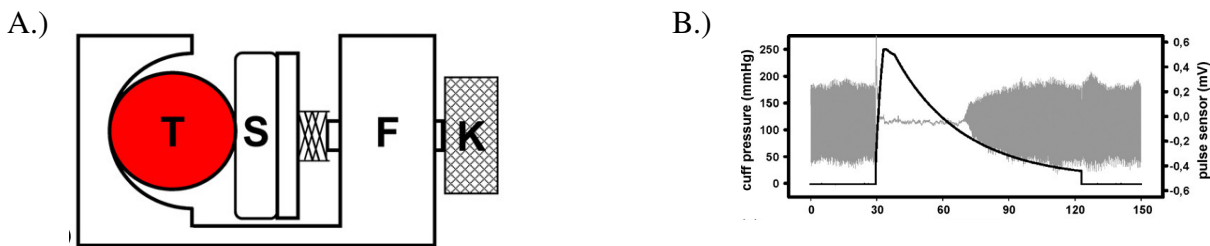


Abb. 19: (A) Schematische Zeichnung der Blutdruckmeßgerätes (T = Mäuseschwanz, S = Sensor, F = Gerüst der Apparatur, K = Drehknopf zum adjustieren des Kontaktes). (B) Repräsentative Aufnahme einer Blutdruckmessung (schwarz = Manschettendruck, grau = Pulssensor Signal) (Thal & Plesnila 2007).

2.1.9. Datenerfassung

Die Datenerfassung erfolgte mit einem PC (Betriebssystem: Microsoft Windows 2000 Pro) der Datenerfassungssoftware DasyLab 5.0.

Während der Narkose der Tiere gewonnenen Daten (intrakranieller Druck, Blutdruck, zerebraler Blutfluss) wurden mit einer zeitlichen Auflösung von 10 Hz aufgezeichnet. Zur Datenreduktion wurden 10 aufeinanderfolgende Werte zu einem Wert gemittelt. Für die weitere Verarbeitung wurden die Daten im DasyLab-Datenformat gespeichert. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm FlexPro 5.0 (Weisang, Deutschland).

Der Zeitpunkt der SAB wurde anhand des ICP und CBF Kurvenverlauf definiert. Hierzu wurde der Zeitpunkt des Laser-Doppler-Abfalls und gleichzeitigen ICP-Anstiegs angegeben. Danach wurden für jeden Datentyp ein Analysemakro gestartet. Bei den Laserdoppler-Daten wurde ein Basiswert aus dem Mittelwert der Daten 15 min bis 5 min vor Blutungsbeginn bestimmt. Die Daten nach SAB wurden in Prozent des Basiswertes umgerechnet. Danach wurden die Daten in SigmaPlot 11.0 (SPSS Science, Deutschland) gespeichert und graphisch aufgearbeitet.

2.1.10. Rektale Temperaturkontrolle

Zur Kontrolle der Körpertemperatur während der Operation wurde eine Sonde rektal eingeführt und mit einem Temperaturhomöostasegerät verbunden, das eine Heizplatte am Boden des stereotaktischen Rahmens steuerte. Als Richtwert diente eine Körpertemperatur von 37 °C. Die gleiche rektale

Sonde wurde verwendet, um die Körpertemperaturen zu bestimmten Zeiten während der Observationszeit zu messen.

2.1.11. Blutgasanalyse

Am Ende der Observationszeit wurde arterielles Blut aus der Arteria carotis communis in einer Heparin beschichteten Kapillare abgenommen und Blutgas-, Elektrolyt- und Blutglukosekonzentrationen, der Hämatokrit und der pH-Wert mit dem Blutgasanalysegerät bestimmt. Zur Kontrolle der Narkoseführung wurde kurz nach der Operation Blutgase entnommen.

2.1.12. Neurologische Untersuchungen

Zur Erfassung neurologischer Ausfälle mussten die Tiere verschiedene Leistungstests und neurologische Untersuchungen durchlaufen. Um Störungen der Motorik und des Verhaltens festzustellen wurde für SAB und CCI verschiedene Neuroscores durchgeführt.

2.1.12.1. Neuroscore – 31 Punkte Score (SAB)

Der Neuroscore wurde modifiziert anlehnend an einen etablierten Neuroscore für Ratten mit SAB (Thal *et al.* 2008a) und an den „neurological scale“ nach Bederson. Der Neuroscore untersucht generelles Verhalten, die Funktionen der Hirnnerven, Koordination und motorische Funktionen von Mäusen. Die neurologische Funktion wurde für alle Tiere zunächst vor der Operation und dann am Tag 1, 2, 3, 5 und 7 nach SAB getestet. Die Kriterien für den Neuroscore sind in der folgenden Tabelle gelistet. Für das Versagen in einem Test erhält die Maus je einen Punkt. Gesunde Mäuse waren erfolgreich in allen Tests und erhielten 0 Punkte [0 (gesund) - 31 (schweres Defizit)].

1. Allgemeines Verhalten		
Aufmerksamkeit	Normales Suchverhalten	= 0 Punkte
	Wach, aber passive	= 1 Punkt
	Keine Spontanbewegung (komatös)	= 2 Punkt
2. Hirnnervenstatus		
Bewegung der Barthaare	Vorhanden	= 0 Punkte
	Nicht vorhanden	= 1 Punkt
Gehör	Vorhanden	= 0 Punkte
	Ohr Bewegungen	= 1 Punkt
	Nicht vorhanden	= 2 Punkte
3. Motorik		
Vorderbeine: Linksbewegung	Normal	= 0 Punkte
	Versteift	= 1 Punkt
	Gelähmt	= 2 Punkte
Vorderbeine: Rechtsbewegung	Normal	= 0 Punkte
	Versteift	= 1 Punkt
	Gelähmt	= 2 Punkte
Hinterbeine: Linksbewegung	Normal	= 0 Punkte
	Versteift	= 1 Punkt
	Gelähmt	= 2 Punkte
Hinterbeine: Rechtsbewegung	Normal	= 0 Punkte
	Versteift	= 1 Punkt
	Gelähmt	= 2 Punkte
4. Koordination		
Balkengang 3 cm		= 0-4 Punkte
Balkengang 1,5 cm		= 0-4 Punkte
Balkengang 1 cm		= 0-4 Punkte
Kriterien: 0 Punkte: normal Bewegung/ kein Ausfall 1 Punkt: falsche Platzierung des Fußes / unstabile Bewegungen 2 Punkte: bleibt sitzen / bleibt auf dem Balken stehen 3 Punkte: fällt nach einigen Schritten vom Balken 4 Punkte: fällt direkt vom Balken ohne weiter Bewegung		
Bodengreiftest: Beide Vorderpfoten berühren den Boden, wenn die Maus am Schwanz hochgehoben wird	Möglich	= 0 Punkte
	Nicht möglich	= 1 Punkt
5. Neuroscore (Bederson)		
	Keine Verschlechterung	= 0 Punkte
	Krümmung der Vorderpfoten	= 1 Punkt
	Reduzierter Widerstand von links	= 2 Punkte
	Zirkelt beim ziehen am Schwanz	= 3 Punkte
	Spontanes zirkeln	= 4 Punkte
	Keine spontane Bewegung	= 5 Punkte
Totale Punktzahl		0-31 Punkte

2.1.12.2 Neurological Severity Score – 25 Punkte Score (CCI)

Motorische Fähigkeiten, Balance, Reflexe und Aufmerksamkeit der Mäuse wurde zunächst vor der Operation und dann 24 Stunden nach Schädelhirntrauma mit einem neurological severity score (NSS) nach Chen (Chen *et al.* 1997) bewertet. Der Score umfasst insgesamt 25 verschiedene Tests. Einen Punkt erhielten die Mäuse, wenn sie in einem Test durchfallen oder wenn ihnen ein bestimmter Reflex fehlte. Je höher der NSS, desto schwerer war der Schaden der Mäuse.

1. Verlassen eines Ringes (30 cm Durchmesser)	
innerhalb von 30 Sekunden	= 1 Punkt
innerhalb von 60 Sekunden	= 2 Punkte
mehr als 60 Sekunden	= 3 Punkte
2. Verlust des Aufrichtreflex	
für 10 Sekunden	= 1 Punkt
für 20 Sekunden	= 2 Punkte
mehr 30 Sekunden	= 3 Punkte
3. Allgemeines Verhalten	
Krümmung der Hinterpfoten beim Hochheben der Maus am Schwanz	= 1 Punkt
Unfähigkeit geradeaus zu laufen, wenn man die Maus auf den Boden setzt	= 1 Punkt
Reduzierter Widerstand, wenn man versucht die Richtung der Maus zu ändern	= 1 Punkt
4. Reflexe	
Verlust des Blinzelreflexes	= 1 Punkt
Verlust des Hörreflexes	= 1 Punkt
Verlust des Schreckreflexes	= 1 Punkt
5. Klinischer Grad	
Verlust des Suchverhaltens	= 1 Punkt
Maus ist erschöpft, müde	= 1 Punkt
6. Extremitäten Reflexe	
Verlust des Bodengreifreflex: Linke Vorderpfote	= 1 Punkt
Verlust des Bodengreifreflex: Rechte Vorderpfote	= 1 Punkt
Verlust des Bodengreifreflex: Linke Hinterpfote	= 1 Punkt
Verlust des Bodengreifreflex: Rechte Hinterpfote	= 1 Punkt
4. Koordination und Motorik	
Unfähigkeit über einen 3 cm breiten Balken zu laufen	= 1 Punkt
Unfähigkeit über einen 2 cm breiten Balken zu laufen	= 1 Punkt
Unfähigkeit über einen 1 cm breiten Balken zu laufen	= 1 Punkt
4. Balance	
Unfähigkeit auf einem Stock mit 0,5 cm Durchmesser zu balancieren	= 1 Punkt
Unfähigkeit auf einem 0,5 cm Balken zu balancieren	
für 20 Sekunden	= 1 Punkt
für 40 Sekunden	= 2 Punkte
für mehr als 60 Sekunden zu balancieren	= 3 Punkte
Totale Punktzahl	0-25 Punkte

2.1.12.3 Neurological Severity Score – 10 Punkte Score

Der Neurological Severity Score (NSS) wurde eine Stunde vor und 24 Stunden nach Trauma bzw. Scheinoperation bewertet. Der verwendete NSS nach Tsenter (Tsenter *et al.* 2008) und Beni-Adani (Beni-Adani *et al.* 2001) ist eine Modifikation des ursprünglichen 25 Punkte Score (s.o.). Die Anzahl der Tests wurde von den unter 2.1.11.2 beschriebenen 25 auf 10 reduziert. Die verschiedenen Tests evaluieren motorische Fähigkeiten, Balance und die Aufmerksamkeit der Mäuse. Gesunde Mäuse bestehen alle Tests erfolgreich und erhalten 0 Punkte. Das Durchfallen eines Testes wird mit je einem Punkt bewertet, so dass die Tiere mit einem maximalen Defizit 10 Punkte erhielten.

Der Test ist wie folgt aufgebaut:

Neurological Severity Score – 10 Punkte Score	
Mono- oder Hemiparese	= 1 Punkt
Unfähigkeit über einen 3 cm breiten Balken zu laufen	= 1 Punkt
Unfähigkeit über einen 2 cm breiten Balken zu laufen	= 1 Punkt
Unfähigkeit über einen 1 cm breiten Balken zu laufen	= 1 Punkt
Unfähigkeit auf einem 0,5 cm Balken zu balancieren	= 1 Punkt
Unfähigkeit auf einem Stock mit 0,5 cm Durchmesser zu balancieren	= 1 Punkt
Scheitern beim Verlassen eines Ringes (Durchmesser 30 cm) innerhalb von 2 min	= 1 Punkt
Unfähigkeit geradeaus zu laufen, wenn man die Maus auf den Boden setzt	= 1 Punkt
Verlust des Suchverhaltens	= 1 Punkt
Verlust des Schreckreflexes	= 1 Punkt
Totale Punktzahl	0-10 Punkte

2.1.12.4. Gewicht

Als allgemeiner Parameter für das Befinden der Tiere wurde täglich das Körpergewicht gemessen.

2.1.13. Messung des Hirnwassergehaltes

Das Hirnödem bzw. das Lungenödem wurde mit der wet/dry Methode quantifiziert. Nach der Observationszeit wurden den Mäusen vorsichtig das Gehirn und die Lunge entnommen. Entweder wurden die kompletten Hemisphären oder die Hemisphären einer 3 mm dicken, koronaren Gehirnscheibe entlang der interhemisphärischen Linie geteilt (siehe Abb. 20). Beide Hemisphären und die Lunge wurde feucht gewogen, um das Feuchtgewicht zu bestimmen (wet weight; ww). Danach wurden die Hemisphären und die Lunge für 24 Stunden bei 104 °C getrocknet, um das Trockengewicht zu bestimmen (dry weight; dw). Der Hirnwassergehalt bzw. der Lungenwassergehalt wurde nach folgender Formel kalkuliert:

Hirn-/Lungenwassergehalt (%) = $(ww - dw) / ww \times 100$.

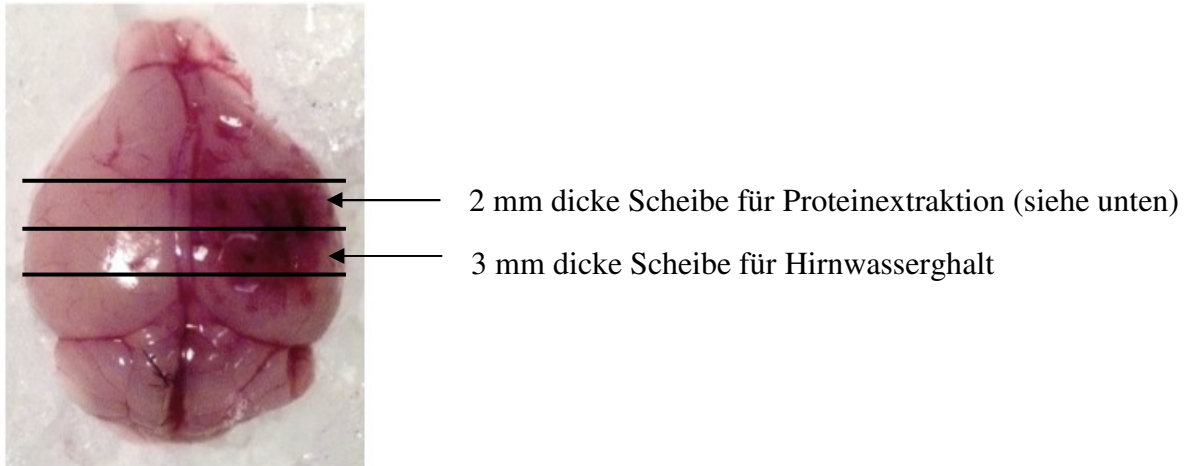


Abb. 20: Schnittschema für die Proteinextraktion und für die Bestimmung des HWG.

2.1.14. Extravasation von Evans Blue

Evans Blue ist ein Farbstoff, der an Albumin bindet, welches unter physiologischen Bedingungen die BHS nicht passiert. Kommt es zu einem Öffnen der BHS, tritt Evans Blue gefärbtes Albumin in das Hirnparenchym aus und kann nach Perfusion und Organentnahme als Maß für die BHS Permeabilität quantifiziert werden

2.1.14.1 Tierexperimenteller Versuch

Drei Stunden nach der Operation (Scheinoperation bzw. zerebraler Insult) wurde den Mäusen 1 ml einer 0,4 % Evans Blue Lösung intraperitoneal injiziert. Nach 24 Stunden wurden die Tiere unter Narkose mit PBS-Lösung (2x 20 ml) transkardial über den linken Ventrikel perfundiert. Anschließend wurden vorsichtig die Gehirne entnommen. Die Hemisphären wurden getrennt gewogen und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

2.1.14.2 Bestimmung der Evans Blue Menge im Gewebe

Zur Bestimmung der Evans Blue Menge wurde die Hemisphäre in 1 ml 50 % TCA homogenisiert (MM300 mill mixer: 20 Hertz, 2 min). Das Homogenat wurde bei 10000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und vierfach (1:3) mit 100 % Ethanol verdünnt. Die optische Dichte wurde mit einem Fluoreszenz Plate Reader bei Exzitation: 620 nm; Emission: 680 nm gemessen. Die Extravasation von Evans Blue wird angegeben in OD pro g Hirngewebe.

2.2. Versuchsgruppen – Studiendesign

2.2.1. Einfluss von Anästhetika auf das Ausmaß eines Hirnödems nach SHT

Im Vorversuch wurde der Einfluss des Anästhesie Verfahrens bei der Entstehung des Hirnödems getestet. Hierfür wurden die Tiere in sechs Gruppen randomisiert: (1) sham + iso; (2) sham + sevo; (3) sham + comb; (4) CCI + iso; (5) CCI + sevo; (6) CCI + comb.

2.2.2 Die Rolle der MLCK bei der Entstehung des Hirnödems nach SHT

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass an der Entstehung des hypoxie-induzierten Hirnödems die Aktivierung des endothelialen kontraktiven Apparates eine entscheidende Rolle für das Versagen der BHS spielt. Ziel der vorliegenden Studie war, die Rolle des kontraktiven Apparates beim SHT bedingten Versagen der BHS zu untersuchen.

Allen Mäusen wurde, wenn nicht anderes erwähnt 1 Stunde vor und 6 Stunden nach der Operation der spezifischen Myosin-leichte-Kette-Kinase Inhibitor ML-7 (1 mg/kg) oder die Vehikel Lösung (0,9% NaCl) intraperitoneal injiziert.

A. Differentielle Genregulation der MLCK und MLC nach experimentellem SHT

Die mRNA der MLCK und MLC wurde aus dem kontusionierten Gewebe von C57Bl6N Mäusen bestimmt, die 6, 12 oder 24 Stunden überlebten. Die Gruppen wurden mit nativen – nicht operierten Tieren – verglichen (n = 5 pro Gruppe).

B. Effekt der MLCK Inhibition auf den Hirnwassergehalt und die neurologische Funktion nach experimentellen Schädelhirntrauma.

Der Hirnwassergehalt und die neurologische Funktion wurden 24 Stunden nach CCI bzw. nach Scheinoperation (sham) bestimmt. Die Tiere wurden hierfür in sechs Gruppen randomisiert: (1) Sham + Vehikel; (2) CCI + Vehikel; (3) Sham + ML-7; (4) CCI + ML-7 (n = 8 pro Gruppe). In einer weiteren Studie wurde 15 Minuten nach Trauma der Hirnwassergehalt bestimmt in Mäusen, die in vier Gruppen randomisiert wurden: (1) Sham + Vehikel; (2) CCI + Vehikel; (3) Sham + ML-7; (4) CCI + ML-7 (n = 6 pro Gruppe).

C. Effekt der MLCK Inhibition auf die BHS Permeabilität und den intrakraniellen Druck nach CCI.

Die Evans Blue Extravasation wurde 24 Stunden der Operation in Tieren gemessen, die wie folgt randomisiert wurden: (1) CCI + Vehikel; (2) CCI + ML-7 (n = 5 pro Gruppe) und (3) Sham + Vehikel; (4) Sham + ML-7 (n = 6 pro Gruppe). Der intrakranielle Druck wurde 24 Stunden nach Trauma bzw. Scheinoperation gemessen.

D. Effekt der MLCK Inhibition auf die MLC Phosphorylierung nach CCI.

pMLC Protein Menge wurde mit Westernblot Analysen 15 Minuten nach CCI in Tieren be-

stimmt, die in folgende Gruppen randomisiert wurden: (1) Sham + Vehikel, (2) Sham + ML-7, (3) CCI + Vehikel oder (4) CCI + ML-7 (n = 5 pro Gruppe). In einem separaten Experiment wurde die pMLC Protein Menge 24 Stunden nach CCI in Mäusen bestimmt, die wie folgt randomisiert wurden: (1) Sham + Vehikel, (2) Sham + ML-7, und (3) CCI + Vehikel, (4) CCI + ML-7 (n = 8 je Gruppe). Der pMLC Level wurde mit pMLC Mengen von nativen – nicht operierten – Tieren verglichen (n = 5).

E. Effekt der MLCK Inhibition auf das Kontusionsvolumen und die neurologische Funktion.

Das Kontusionsvolumen wurde 15 Minuten und 24 Stunden nach CCI bestimmt, um das sekundäre Wachstum des Schadens in Tieren zu quantifizieren, die in folgende Gruppen randomisiert wurden: (1) CCI + Vehikel; (2) CCI + Hochdosis ML-7; (3) CCI + Niedrigdosis ML-7 + 24 Stunden Überleben und (4) CCI + 15 Minuten Überleben (n = 8 pro Gruppe).

Für die Hochdosis wurden den Mäusen 1 mg/kg ML-7 und für die Niedrigdosis 0,5 mg/kg ML-7 1 Stunde vor und 6 Stunden nach CCI intraperitoneal injiziert.

F. Effekt der MLCK Inhibition auf das Kontusionsvolumen, die neurologische Funktion und Genexpression bei einem größeren initialen Trauma mit einer Eindringtiefe von 1,5 mm.

Die Tiere wurden randomisiert in: (1) CCI + Vehikel; (2) CCI + ML-7 + 24 Stunden Überleben und (4) CCI + 15 Minuten Überleben (n = 8 pro Gruppe)

2.2.3. Rolle von FcγR^{-/-} für das posttraumatische Hirnödem

In einem in-vitro BHS Model konnte gezeigt werden, dass C-reaktives Protein (CRP) über die Bindung an Fcγ-Rezeptoren zu einer Aktivierung des kontraktiven Apparates zu einer Öffnung der BHS führt. Ziel der Studie war den Einfluss von Fcγ-Rezeptoren auf die Entstehung eines Hirnödems nach experimentellen SHT zu untersuchen.

A. CRP Plasmaspiegel und differentielle Genregulation der Fcγ-Rezeptoren nach experimentellem SHT

In der Studie wurde bei Wildtyp (WT) Mäusen 6, 12 und 24 Stunden nach SHT und in nativen Tieren der CRP Plasmaspiegel mittels ELISA bestimmt (n = 5 pro Gruppe). Die mRNA der Fcγ-Rezeptoren 1, 2b und 3 wurden aus dem kontusionierten Gewebe von Mäusen bestimmt, die 6, 12 oder 24 Stunden überlebten. Die Gruppen wurden mit nativ – nicht operierten Tieren – verglichen (n = 5 pro Gruppe).

B. Rolle der FcγR auf den Hirnwassergehalt nach CCI

Um den hemisphärischer Hirnwassergehalt 24 Stunden nach CCI zu bestimmen wurden die Tiere in vier Gruppen randomisiert: (1) WT + Scheinoperation; (2) WT + CCI; (3) FcγR^{-/-} + Scheinoperation; (4) FcγR^{-/-} + CCI (n = 4 je Gruppe).

C. Rolle der FcγR auf den histologischen Schaden, funktionelle Erholung und zerebrale Inflammation nach CCI

Die Mäuse wurden randomisiert in: (1) WT + CCI; (2) WT + nativ; (3) FcγR^{-/-} + CCI; (4) FcγR^{-/-} + nativ (CCI: n = 7 je Gruppe; nativ: n = 4 je Gruppe).

2.2.4. Die Rolle der MLCK bei der Entstehung des Hirnödems nach SAB

Ziel der vorliegenden Studie war, die Rolle des kontraktiven Apparates beim SAB-bedingten Versagen der BHS überprüft.

Allen Mäusen wurde 1 Stunde vor und 6 Stunden nach der Operation der spezifischen Myosinleichte-Kette-Kinase Inhibitor ML-7 (1 mg/kg) oder die Vehikel Lösung (0,9% NaCl) intraperitoneal injiziert.

A. Effekt der MLCK Inhibition auf Hirnwassergehalt, intrakraniellen Druck und neurologische Funktion nach experimenteller Subarachnoidalblutung.

Der HWG, der ICP und die neurologische Funktion wurden 24 Stunden nach SAB bzw. in nativen Tieren bestimmt. Die Tiere wurden hierfür in vier Gruppen randomisiert: (1) nativ + Vehikel; (2) SAB + Vehikel; (3) nativ + ML-7; (4) SAB + ML-7 (n = 7 pro Gruppe).

B. Effekt der MLCK Inhibition auf die BHS Permeabilität nach SAB

Die Evans Blue Extravasation wurde 24 Stunden der Operation in Tieren gemessen, die wie folgt randomisiert wurden: (1) SAB + Vehikel; oder (2) SAB + ML-7 (n = 7 pro Gruppe) und (3) nativ + Vehikel (4) nativ + ML-7 (n = 5 pro Gruppe). Der intrakranielle Druck wurde 24 Stunden nach Trauma bzw. Scheinoperation gemessen.

C. Effekt der MLCK Inhibition auf histologischen Schaden und die neurologische Funktion 7 Tage nach SAB.

Der histologische Schaden wurden am siebten Tag nach SAB durch Bestimmung der Neurosenzahl im Hippokampus in Tieren bestimmt, die in folgende Gruppen randomisiert wurden: (1) SAB + Vehikel; (2) SAB + ML-7; (3) nativ + Vehikel und (4) nativ + ML-7 (n = 11 pro Gruppe).

2.3. Histologische Färbungen und Morphometrie

2.3.1. Aufbereitung der Hirnschnitte

2.3.1.1 Gefriergetrocknete Hirnschnitte

Nach Ende der Observationszeit wurden die Tiere narkotisiert und anschließend dekapitiert. Das Gehirn wurde vorsichtig herausgenommen, auf pulverisiertem Trockeneis eingefroren und bei –20°C aufbewahrt. Die Gehirne wurden in koronarer Schnittführung mit einem Kyrostat geschnitten. 10 µm dicke Schnitte wurden alle 750 µm gesammelt und auf Superfrost plus Objektträger platziert. Der erste Schnitt wurde nach dem Mouse Brain Library Atlas (www.mbl.org) definiert als Bregma +3,14 mm.

2.3.1.2 PFA fixierte Hirnschnitte

7 Tage nach SAB wurden die Tiere narkotisiert und das Herz frei präpariert. Über den linken Ventrikel wurden die Tiere mit einer 2 %igen Paraformaldehyd-Lösung (pH=7,4) transkardial perfundiert. Danach wurde das Gehirn entnommen und für 24 Stunden in einer 2 %igen und bis zur Weiterverarbeitung in 0,5 %igen Paraformaldehyd-Lösung aufbewahrt. Die Einbettung der Gehirne in Paraffin erfolgte mit einem Einbettautomaten nach Standardprotokoll. Das Großhirn wurden mit einem Mikrotom in 4 µm dicke Scheiben geschnitten und jeweils 4 Scheiben in Abständen von 40 µm in der Hirnregion Bregma –1,28 mm nach dem Mouse Brain Library Atlas (www.mbl.org) für die Analyse verwendet.

2.3.2 NISSL Färbung

Die Nissl-Färbung dient zur Darstellung von Nervengewebe mit Hilfe des Farbstoffes Kresylviolett. Kresylviolett bindet sich an basophile Verbindungen wie RNA und DNA und färbt daher die Nissl-Schollen (endoplasmatisches Retikulum) der Neuronen blau-violett an.

Die in Paraffin gefestigten Schnitte wurden zur Entparaffinisierung über 2x 10 min in Rotihistol gelegt. Danach wurde eine absteigenden Alkoholreihe durchgeführt (2 min 100 % Ethanol, 2 min 96 % Ethanol, 2 min 70 % Ethanol) und die Schnitte dann für 10 min in eine Standard Nissl-Farb Mischung gelegt. Darauf wurden die Schnitte kurz mit Aqua destillata gespült und mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (kurz 70 % Ethanol + Hac, kurz 96 % Ethanol, kurz 100 % Ethanol, 2 min Isopropanol rein), gefolgt von einer 2x 4 minütigen Lagerung in Rotihistol.

Die gefriergetrockneten Schnitte wurden zunächst 2 Minuten mit 70 % Ethanol gewaschen und danach für 10 Minuten in eine Nissl-Farb Mischung gelegt. Darauf wurden die Schnitte kurz mit Aqua destillata gespült und mittels aufsteigender Alkoholreihe entwässert (kurz 70 % Ethanol und kurz

100% Ethanol), gefolgt von einer 7-minütigen Lagerung in Rotihistol. Zuletzt erfolgte die Eideckung der Schnitte mit Eukitt.

2.3.3. Hämatoxilin-Eosin Färbung

Hämatoxilin–Eosin-Färbung (HE-Färbung) ist eine Übersichtsfärbung, um Zellschädigungen sichtbar zu machen. Die HE-Färbung ist eine Doppelfärbung, bei der zum einem durch das Hämalaun (oxidierte Form des Hämatoxilin) saure (=basophilen) Strukturen wie Desoxyribonucleinsäure in Zellkernen und Zytoplasmaanteile, die reich an endoplasmatischem Reticulum sind, blau angefärbt werden. Zum anderen werden über eine Gegenfärbung mit Eosin alle basischen (=eosinophilen) Bestandteile wie das Zytoplasma kräftig rot färbt.

Zunächst werden die Schnitte über einer absteigenden Alkoholreihe (10 Minuten in 100 % Ethanol, 1 Minute in 96 % Ethanol, 1 Minute in 70 % Ethanol) rehydriert. Danach werden die Schnitte zweimal kurz in destilliertem Wasser gewaschen und anschließend 1 Minute lang in Mayers Hämalaunlösung gefärbt. Nach der Färbung werden die Schnitte 10 Minuten unter kaltem, fließendem Leitungswasser und zweimal in destilliertem Wasser gewaschen, wodurch Hämatoxylin in seine blaue Form überführt wird. Für die Gegenfärbung mit Eosin werden die Schnitte für 1,15 Minuten mit einer wässrigen Eosin-Lösung gefärbt. Im Anschluss erfolgt die Dehydratation mittels aufsteigender Alkoholreihe (5 Minuten in 70 % Ethanol, 2,5 Minuten in 80 % Ethanol, 1 Minute in 96 % Ethanol, 1 Minute in 100 % Ethanol). Für eine Fixierung lagert man die Schnitte 7 Minuten in Rotihistol. Zum Schluss erfolgt das Einbetten mit Roti - Histokitt.

2.3.4 Iba-1 Färbung

Die Mikroglia stellt im ZNS die immunologische Haupteffektorzelle dar (Graeber & Streit 1990). Bereits 24 Stunden nach einem zerebralen Insult kommt es zu einer Aktivierung der Mikroglia (Sandhir *et al.* 2008). Ein Mikroglia-spezifisches Protein ist Iba-1 (Ionized Calcium Binding Adaptor Molecule 1), das früh nach einer Läsion hochreguliert wird und einen Marker für aktivierte Mikroglia darstellt.

Zur Darstellung der aktivierten Mikroglia wurden Kryo-Schnitte zunächst für 1 Stunde in 4 % PFA fixiert. Anschließend folgte eine 30 minütige Inkubation bei Raumtemperatur mit einer serumhaltigen Lösung (BSA, 1:20 in PBST) um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Darauf folgte die Inkubation mit dem Erstantikörper (1:1500 in Serumlösung) über Nacht bei 4 °C.

Nach der 1 stündigen Behandlung mit dem biotinylierten anti-rabbit Zweitantikörper (1:50) folgte 30 Minuten lang die Inkubation mit einem Avidin-Biotin-Komplex (ABC-Elite-Kit). Der Antigen - Antikörper-Komplex wurde daraufhin durch die Zugabe von DAB Substrat (Diaminobenzidin-

Derivat) angefärbt. Zwischen den einzelnen Schritten wurde mit PBST gewaschen. Mit einer wässriger Hämalaun-Lösung wurde gegengefärbt. Abschließend wurden die Schnitte mit Roti-Histokit eingebettet.

2.3.5. Bestimmung der Neuronenzahl

Zur Bestimmung der Neuronenzahl wurde die Hippocampusregionen CA1-3 7 Tage nach SAB untersucht. Die Auswahl der Hirnregionen wurde mit Hilfe des Mouse Brain Library Atlas (www.mbl.org) definiert im Bereich Bregma $-1,28$ mm. Für die Auszählung der Neuronen wurde bei einer 20-fachen mikroskopischen Vergrößerung ein definiertes Feld innerhalb der Region des Hippocampus gelegt. Für die CA1 und CA2 Region wurde ein $0,1 \times 0,3$ mm und für die CA3 Region ein $0,1 \times 0,25$ mm Feld bestimmt. Die Auszählung der Neurone erfolgte verblindet.

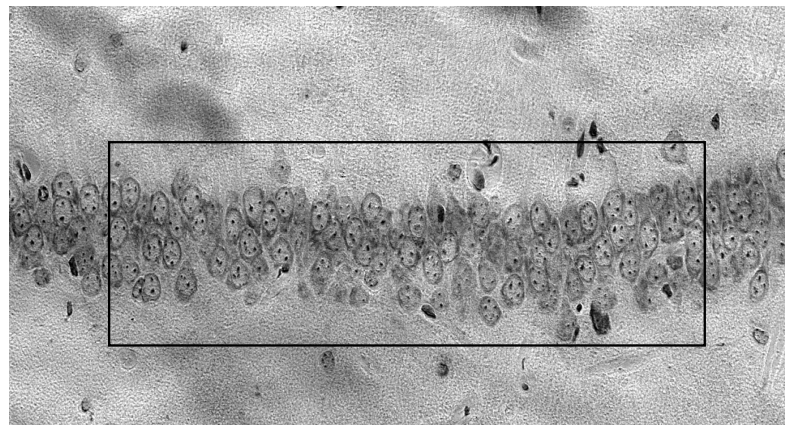


Abb. 21: Nissl gefärbter Beispielschnitt. Feld in dem der Auszählung der Neuronen erfolgt.

2.3.6. Bestimmung der Iba-1 positiven Zellen

Für die Auswertung wurden die Iba-1 positiven Zellen in kortikalen Kontusionsareal (ROI: $0,2 \times 0,3$ mm) bei Bregma $-1,28$ mm nach dem Mäuse Gehirnatlas (www.mbl.org) wurde bei einer 20-fachen mikroskopischen Vergrößerung gezählt. Die Auszählung erfolgte verblindet.

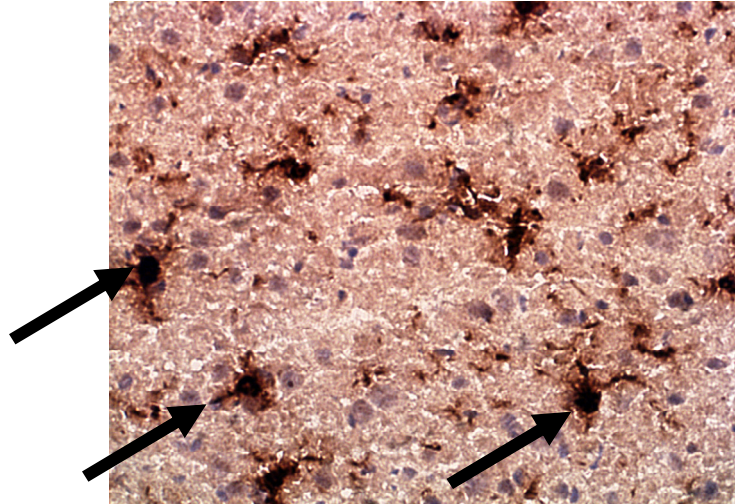


Abb. 22: Iba-1 gefärbter Beispielschnitt bei einer 40x Vergrößerung.
Die Pfeile zeigen auf die Iba-1 positiven Zellen.

2.3.7. Bestimmung des Kontusionsareals und des Kontusionsvolumens

Beide Hemisphären und das kontusionierte Hirngewebe der Nissl-gefärbten Schnitten wurden bei traumatisierten Tieren digitalisiert (Optimas 6.51, Optimas Corporation, Bothell, WA). Das Areal mit der deutlich verminderten Anfärbung wurde als das Areal der Kontusion bestimmt. Das Kontusionsvolumen wurde verblindet ausgewertet durch multiplizieren des Kontusionsareals der einzelnen Hirnarealsebene mit dem Abstand zwischen den Arealen (750 µm).

$$A_1 + 0,75 \times (A_2 + A_3 + \dots + A_n) + A_{n+1}$$



Abb. 23: Nissl gefärbter Beispielschnitt. Rot umrandete Fläche entspricht dem geschädigten Areal.

2.4. Molekularbiologische Methoden

2.4.1. Isolation von genomischer DNA

Für die Genotypisierung von genmodifizierten Mäusen bzw. dem entsprechenden WT Mäusen wurde die genomische DNA aus Blut mit dem Qiamp DNA-Minikit isoliert. Zunächst werden die Zellen mit Proteinase K enzymatisch lysiert. Die freigewordene DNA wird während eines Zentrifugationsschrittes an eine Silikagelmembran einer Spinnsäule gebunden. Die gebundene DNA wird in der Folge von kontaminierenden Stoffen gereinigt und mit einem kleinen Volumen Extraktionspuffer eluiert (Das Verfahren basiert auf einer Standard-Anleitung der Firma Qiagen.)

2.4.2. Verwendetes Hirngewebe

Das verwendete Hirngewebe wurde bei der Anfertigung der Hirnschnitte mit dem Kyrostat gesammelt (siehe unten). Hierfür wurde der obere Quadrant des Hirngewebes zwischen den allen 750 µm auf Objektträgern gefassten Schnitten eingesammelt. Zum anderen wurde bei behandelten Tieren das Gehirn vorsichtig entnommen und in eine 6 °C kalte Gehirnmatrix platziert. Eine 3 mm dicke Scheibe wurde in koronarer Richtung ausgeschnitten und in vier Quadranten aufgeteilt. Die rechte obere, traumatisierte Region wurde eingesammelt, in flüssigen Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert. Zur Vorbeugung des Abbaus der einzelsträngigen Ribonukleinsäuren (RNA) durch ubiquitär vorkommenden RNasen, wurden alle verwendeten Operationsbestecke und Materialien mit RNAS Zap behandelt. RNAS Zap inaktiviert die besonders auf menschlicher Hautoberfläche in großen Mengen vorhandene RNasen. Zur weiteren Vorbeugung wurde versucht, das Gewebe unmittelbar nach Entnahme schockzufrieren, um die Freisetzung von RNasen aus untergehenden Zellorganellen zu verhindern. Bei allen Arbeiten mit RNA wurden Einweghandschuhe getragen, auch beim Beschriften von Etiketten und Tubes.

2.4.3. RNA Isolation aus Hirngewebe

Für die Isolierung von Gesamt-RNA wurde das RNeasy Lipid Tissue Mini Kit verwendet, das die Gewinnung von RNA über ein Silika-Säulenprinzip erlaubt. Die RNA Isolierung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Hierfür wurde das Hirngewebe zunächst mit β-Mercaptoethanol- und Guanidiniumisothiocyant-haltigem RLT-Buffer (Qiazol Reagenz) zur sofortigen Denaturierung von RNasen lysiert und anschließend mit einem MM300 mill mixer homogenisiert (2 min, 20 Hertz). Das Lysat wurde mit Chloroform versetzt und zentrifugiert, so dass drei Phasen entstehen. Die wässrige Phase enthält RNA, die mit 70 %igem Ethanol versetzt wurde. Die Lösung wurde auf eine Silika-Säule geben mit Silicagel-Membran, an die RNA bindet. Anschließen wurde die gebundene

RNA nach mehreren Waschschritten mit 30µl RNase-freiem Wasser eluiert. Eine zusätzliche Behandlung der isolierten Gesamt-RNA mit DNase bei 37 °C für 15 min verringert die Gefahr von DNA-Kontaminationen.

Die RNA Konzentration wurde mit Quanti-iT™ RNA Assay Kit mit Hilfe des Qubit™ Fluorimeter bestimmt. Die Lösung des Quanti-iT™ RNA Assay Kits enthält einen Fluoreszenzfarbstoff, der sich spezifisch an die RNA bindet. Die Intensität des Fluoreszenzsignals ist in einem bestimmten Konzentrationsbereich linear zur RNA Konzentration und wurde bei Exzitation von 630 nm und Emission von 680 nm gemessen.

Die isolierte RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.4.4. Synthese von cDNA

Um die mRNA Expression verschiedener Markergene zu untersuchen, wurde zunächst mittels Reverse Transkription die RNA spezifisch in cDNA umgeschrieben, da RNA in einer PCR durch die DNA-Polymerase nicht amplifiziert werden kann. Die cDNA ist ein zur RNA-Matrize komplementärer DNA-Strang. Für die Transkription wurde das QuantiTect Reverse Transkription Kit verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Hierfür wurde 1 µg extrahierte RNA auf ein Volumen von 14 µl mit RNase freies H₂O gefüllt und für 8 Minuten bei 42 °C inkubiert, um sekundär Strukturen abzubauen. Nach der Zugabe von 6 µl Mastermix wird für 30 min bei 42 °C inkubiert. Hierbei lagern sich Primer an die einzelsträngige mRNA an, so dass die reverse Transkriptase eine rückläufige Kopie zur cDNA synthetisieren kann. Zum Schluss wird für 3 min bei 95 °C die reverse Transkriptase inaktiviert.

2.4.5. PCR Analysen

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode, mit der sich Desoxyribonukleinsäuren (DNA) exponentiell amplifizieren lassen. Man verwendet dabei DNA-Polymerasen, die einzelsträngige DNA im festgelegten Abschnitt zum Doppelstrang aufpolymerisieren. Damit die DNA-Polymerasen den festgelegten Abschnitt replizieren können, muss ein doppelsträngiger Bereich als Startpunkt zur Verfügung stehen. Der Startpunkt der DNA-Synthese wird durch Oligonukleotide (ca. 20 Nukleotide), den sogenannte Primer festgelegt. Für jedes Gen, dessen Expression untersucht werden soll, muss ein Primerpaar eingesetzt werden, das einen möglichst spezifischen Abschnitt des gesuchten Gens erkennt. Die PCR-Bedingungen müssen dabei an das jeweilige Primerpaar und die Länge des vervielfältigten Fragments angepasst werden. Für die Replikation der DNA wird diese zunächst denaturiert, so dass sich die Primer an den DNA-Einzelstrang anlagern können (Annealing). Die DNA-Polymerase erstellt, ausgehend vom 3'-OH-Ende des Primers, durch Primer-

Verlängerung eine Kopie der DNA-Sequenz. Die Bausteine zur DNA-Synthese sind Desoxyribonukleosid-Triphosphate (dNTPs), welche dem Reaktionsmedium im Überschuss beigelegt werden. Durch mehrmaliges Wiederholen dieses Zyklus wird eine Vervielfältigung des definierten DNA-Bereiches zwischen den Primern erreicht.

2.4.5.1 Quantitative real-time PCR (qPCR)

Mit Hilfe der quantitativen real-time PCR kann die mRNA Menge des zu untersuchenden Markergens quantitativ bestimmt werden. Diese Methode erlaubt die direkte Detektion der PCR-Produkte über ein Fluoreszenzfarbstoffe oder Fluoreszenzfarbstoff-markierte Sonden. Diese binden in bestimmten Schritten des PCR-Zyklus an die Ziel-DNA. Das Signal der durch eine Lichtquelle angeregten Fluoreszenzfarbstoffe korreliert dabei quantitativ mit der Menge an PCR-Produkt und kann über eine Software in Echtzeit (real-time) dargestellt werden. Trägt man die Intensität des Fluoreszenzfarbstoffes graphisch gegen die PCR Zykluszahl auf, erhält man einen typischen Kurvenverlauf, den man in drei Bereiche einteilen kann. In die Anfangsphase, anschließend die Phase des exponentiellen Wachstums, die so genannte Log-Phase, und die Plateauphase. In der Log-Phase findet zum ersten Mal ein quantifizierbarer Anstieg des Fluoreszenzsignals statt. In der Plateauphase nimmt die Fluoreszenz nicht weiter zu. Die Log-Phase wird herangezogen, um die Produktmenge, mittels Crossingpoints (Cp) zu bestimmen. Der CP-Wert ist die Zykluszahl, bei der das Fluoreszenzsignal der Probe signifikant aus dem Hintergrundrauschen heraustritt d.h. einen bestimmten Schwellenwert überschreitet. Dieser Punkt wird durch die Lightcycler Software berechnet.

Der Logarithmus des Cp ist indirekt proportional zur cDNA Konzentration, d.h. je mehr Produkt, desto früher wird der Cp gemessen. Jede Probe hat einen bestimmten Cp, abhängig von der Menge der enthaltenen cDNA. Um jedem Cp eine bestimmte cDNA Konzentration zuzuordnen zu können, muss zuerst eine Standardkurve erstellt werden.

2.4.5.2 PCR Standard Generierung für die quantitative real-time PCR (qPCR)

Über einen externen Standard lässt sich Ziel-mRNA absolut quantifizieren. Der Standard kann generell jede cDNA-Probe sein, die die Sequenz des Ziel-Gens enthält und deren Konzentration bekannt ist. Über eine Verdünnungsreihe dieser Probe, die in der PCR mitgeführt wird, lässt sich eine Standardkurve konstruieren und so absolute Werte für die Ausgangskonzentrationen unbekannter Proben ermitteln. Dazu werden für die Verdünnungen mit bekannter Kopienzahl der Cp ermittelt. Aus den ermittelten Cps kann man dann die Regressionsgerade darstellen, bei der die logarithmische Konzentration (x-Achse) gegen die Zykluszahl (y-Achse) aufgetragen wird. Mit Hilfe der Regressionsgerade kann nun jedem Cp eine bestimmte cDNA Menge zugeordnet werden. Jedem Lauf wird als Standard ein Kallibrator beigelegt, um die Standardkurve an die jeweiligen Läufe anzupassen.

sen. Die Lightcycler Software berechnet nun die absolute Kopienzahl der untersuchten Proben. Die Herstellung der externen Standards für alle Ziel-mRNAs wurde mittels herkömmlicher PCR mit dem Thermocycler durchgeführt. Die PCR Zyklen waren wie folgt:

- 1 Zyklus: Erhitzen für 10 min bei 95 °C (Aktivieren der Polymerase; Vordenaturierung der DNA)
- 35 Zyklen: 45 s bei 94 °C (Denaturieren der DNA in Einzelstränge)
- 45 s bei Annealing Temperatur 55 – 65 °C (Anlagerung der Primer)
- 60 s bei 72 °C (Elongation, Auffüllen der Einzelstränge durch die Polymerase)

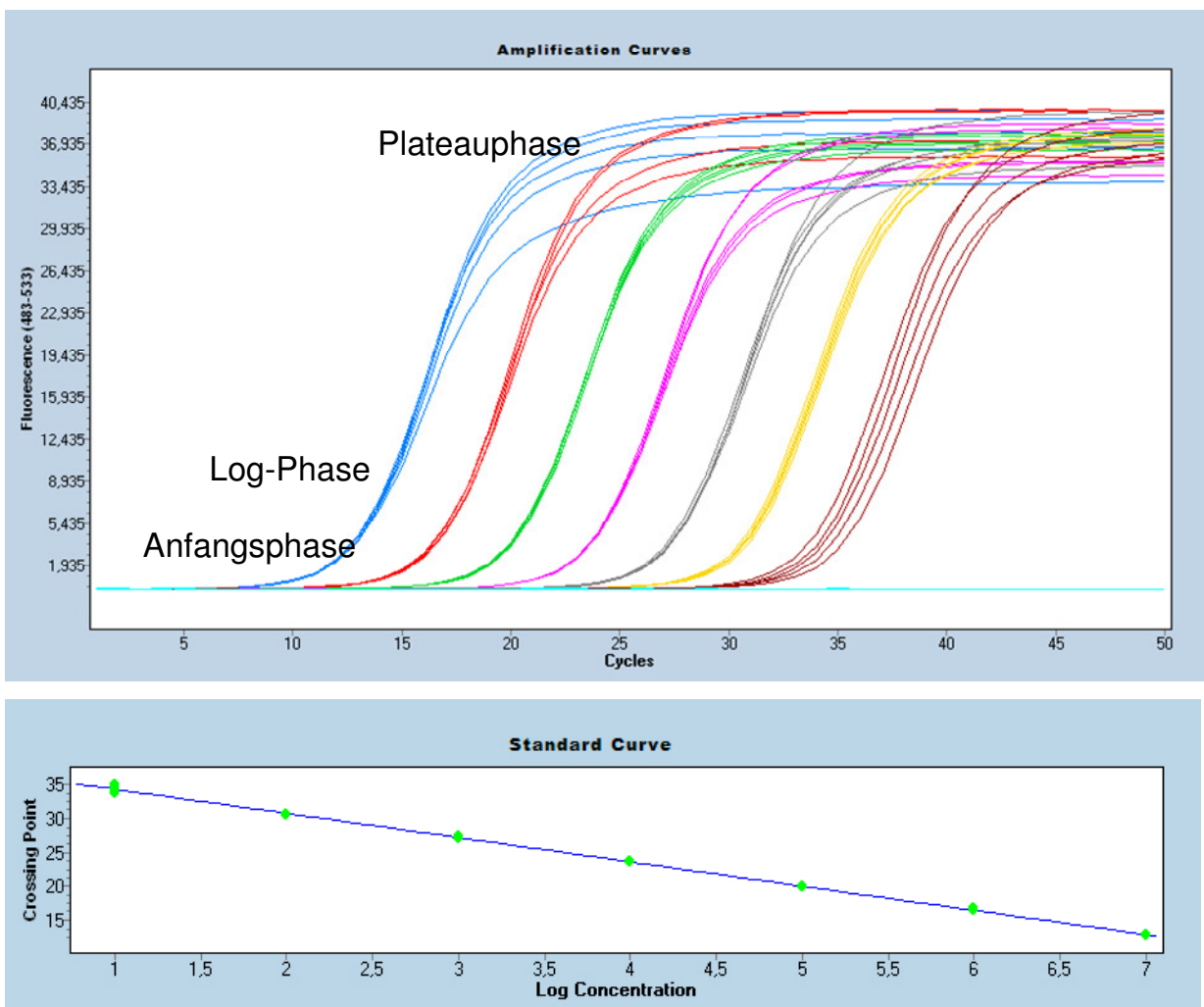


Abb .24: Standardkurvenlauf am Beispiel von Myl. Die Zykluszahl wird gegen die Intensität des Fluoreszenzsignals aufgetragen. Unteres Bild zeigt die dazugehörige Regressionsgerade.

Die verwendeten Primer sind unter C.1.3. Tabelle 3 gelistet. Um die Spezifität der PCR Reaktion zu bestimmen, wurden die PCR Produkte in einem 2 % (w/v) Agarosegel entlang eines 50 Bö DNA Molekulargewichtsmarkers aufgetrennt. Die Gele wurden mit SYBR Green gefärbt und visualisiert mit einem Kodak EDAS 120 Image System. Die PCR Produkte wurden aufgereinigt mit dem QIAquick PCR Purification Kit nach Anleitung des Herstellers. Die DNA Konzentration wurde mit dem NanoVue system bestimmt. Die Anzahl der Kopien wurde bestimmt und eine 10-fache Verdünnung im Bereich von 1×10^7 bis 1×10^1 Kopien gemessen.

2.4.5.3. Quantitative polymerase chain reaction (real-time PCR)

Alle cDNA Proben wurde amplifiziert mit dem real-time Lightcycler 480 PCR System. Für die Amplifikation wurde, bei einem Einsatz von 1 μ l cDNA, der Roche Lightcycler[®] 480 Probes Master (Cyclophlin A, IL1 β), Roche Lightcycler[®] 480 SYBR Green I Master (TNF α , IL6) oder der Thermo Scientific Absolute Blue SYBR Green (Myl, Mylk) verwendet. Aus der Doppelbestimmung der einzelnen Proben wurde der Mittelwert gebildet. Die real-time Zyklen waren folgende:

- 1 Zyklus: Erhitzen für 10 min bei 95 °C (Aktivieren der Polymerase; Vordenaturierung der DNA)
- 50 Zyklen: 10 s bei 94 °C (Denaturieren der DNA in Einzelstränge)
10 s bei Annealing Temperatur 55 – 65 °C (Anlagerung der Primer)
15 s bei 72 °C (Elongation, Auffüllen der Einzelstränge durch die Polymerase)

Die verwendeten Primer und die Annealing Temperaturen sind in der Tabelle 3 gelistet. Eine Standardkurve wurde mit PCR DNA für jedes PCR Produkt (10^1 - 10^7) generiert. Die absolute Anzahl der Kopien der zu untersuchenden Zielgene wurde normalisiert gegen die absolute Anzahl der Kopien von Cyclophilin A (PPIA) als Kontrollgen (Thal et al. 2008b).

2.4.5.4. Schmelzkurvenanalysen

Nach jedem Lauf der real-time PCR wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um die Spezifität des Produktes zu kontrollieren. Je nach Länge und Guanodin-Cytosin-Gehalt hat jedes PCR Produkt einen spezifischen Schmelzpunkt. Durch Aufheizen auf 95 ° C schmilzt die dsDNA und das Fluoreszenzsignal wird schwächer, da der gebundene Farbstoff freigesetzt wird. Entsteht neben dem spezifischen Schmelzpunkt weitere Peaks, liegen zusätzlich unspezifische Sequenzen vor, wie z.B. Primer-Dimere.

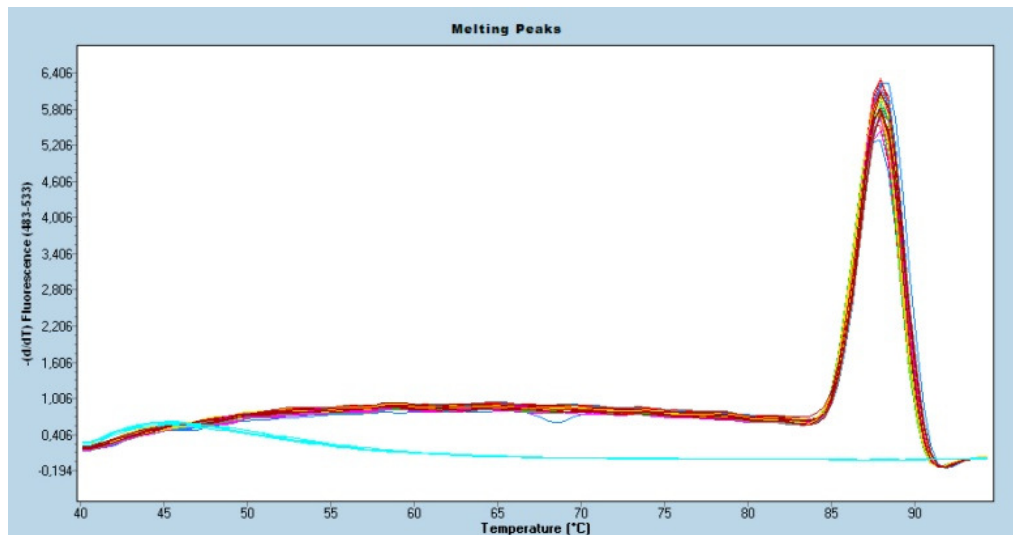


Abb. 25: Beispiel einer Schmelzkurve.

2.4.6. PCR zur Genotypisierung von Mäusen

Obwohl die Zucht der FC γ KO in homozygot transgene Mäuse erfolgte, wurden vor Versuchsbeginn die Mäuse genotypisiert. Die aus Blut isolierte genomische DNA wurde mit Hilfe einer PCR Reaktion auf die Anwesenheit des Transgens untersucht. Zu jeder Probe, die die gleiche Menge DNA enthielt, wurde zum Master Mix (enthält FastStartTaqDNA Polymerase, dNTPMix (mit dUTPan Stelle von dTTP), bestimmte Primer eingesetzt. Mit dem Reaktionsgemisch wurde eine konventionelle PCR (Thermocycler) durchgeführt.

Parameter:	3 min, 94 °C, initiale Denaturierung	
	94 °C, 30 s; Denaturierung	} 39
	64 °C, 30 s; Annealing	
	72 °C, 60 s; Extension	
	3 min, 72 °C; Finale Extension	
	4 °C	

2.4.7. DNA Gelelektrophorese

Um die Qualität der PCR Reaktion zu bestimmen, wurden die PCR Produkte in einem 2 % (w/v) Agarosegel nach ihrer Größe elektrophoretisch aufgetrennt. Mit Hilfe eines parallel aufgetragenen 50 bp DNA Molekulargewichtsmarkers lässt sich die Basenlänge der DNA Fragmente ermitteln. Die DNA Proben wurden mit 6x DNA Ladepuffer versetzt und aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 130 V für 25 – 30 Minuten mit 0,5 molaren TBE (Tris-Borat-EDTA, ph-Wert 7,5) als

Laufpuffer. Um die DNA Fragmente zu visualisieren, wurde das Gel für 30 – 40 Minuten in einem SYBR Green Färbebad geschwenkt und mit dem Kodak EDAS 120 Image System sichtbar gemacht.

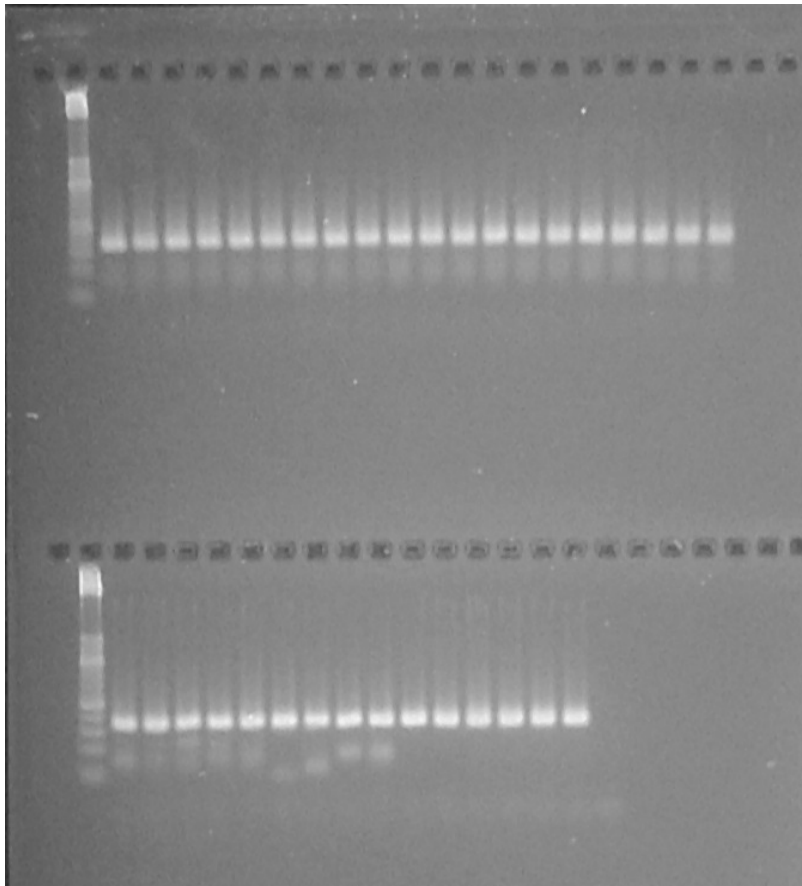


Abb. 26: Beispiel einer Gelelektrophorese des Standards Myl.

2.4.8. Reinigung der DNA Fragmente

Die PCR Produkte wurden mit dem QIAquick PCR Purification Kit mit Hilfe eines Silika-Säulenprinzip nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt. Bei dem Silika-Säulenprinzip bindet die DNA in Anwesenheit von hoher Konzentration chaotroper Salze an die Silikamembran der Säule, Verunreinigungen passieren die Säule und werden gewaschen. Die DNA wird zum Schluss mit Wasser eluiert.

2.5. Proteinbiochemische Untersuchungen

2.5.1. Gewebeaufbereitung

2.5.1.1 Proteingewinnung aus Hirngewebe

Zur Gewinnung der Proteine aus dem Hirngewebe wurde das Gehirn vorsichtig entnommen und in eine 6 °C kalte Gehirnmatrix platziert. Eine 3 mm bzw. 2 mm dicke Scheibe wurde in koronarer Richtung ausgeschnitten und in vier Quadranten aufgeteilt. Die rechte obere, traumatisierte Region wurde eingesammelt, in flüssigen Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.5.1.2 Proteingewinnung aus dem Blut

Am Ende der Observationszeit wurden die Tiere narkotisiert. Über eine transkardiale Punktion wurde Blut entnommen und in EDTA Röhrchen zentrifugiert. Der Überstand wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren.

2.5.2. Gewinnung des Proteinextraktes

Nach Zugabe von 200 µl Lysepuffer zu den Hirngewebeproben wurden diese sonifiziert und bei 99 °C für 5 Minuten gekocht. Zum Schluss wurden die Proben zentrifugiert (14 000 rpm, 4 °C, 15 min) und der Überstand bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

2.5.3. Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Quantifizierung der Proteinkonzentration wurde die colorimetrische BCA-Methode verwendet (Pierce, Rockford, IL, USA) (Huber et al. 2001). Zunächst wurde für die Bestimmung der Eichgerade mit BSA der Standard Proteinlösung eine Konzentrationsreihe in Konzentrationen von 0 µg/ml bis 20 µg/ml hergestellt. 5 µl Proteinlysate wurde mit 45 µl Wasser verdünnt. Zu den verdünnten Proben und zu den Standards der Eichgerade wurden je 1000 µl Testlösung (50 Teile BCA Reagenz A, ein Teil BCA Reagenz B) pipettiert und die Ansätze für 15 min bei 60 °C inkubiert. Die Konzentration der Proteine wurde im Abgleich zur Eichgeraden bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch bestimmt.

2.5.4. Western Blots

Die Western Blot Methode ermöglicht den Nachweis bestimmter Proteine eines Proteinextraktes aus dem zu untersuchenden Gewebe. Im ersten Schritt werden die Proteine in einem elektrischen

Feld mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach ihrem Molekulargewicht getrennt. Im nächsten Schritt werden die aufgetrennten Proteine auf eine „Blotting-Membran“ transferiert. Dabei wird auf das Gel eine Membran gelegt und die Proteine durch das Anlegen einer Spannung auf diese Membran geblottet. Das Trennmuster der verschiedenen Proteinmoleküle bleibt erhalten. Der Nachweis einzelner Proteine erfolgt auf der Membran mit Hilfe einer immunologischen Reaktion, wobei die Proteine mit den für sie spezifischen Antikörpern inkubiert werden (Towbin *et al.* 1979).

2.5.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Für die Elektrophorese wurden die Proben mit dem Ladepuffer auf gleiche Mengen (15 µg) angepasst und 3 min bei 99 °C gekocht, um eine vollständige Denaturierung der Proteine zu gewährleisten. Nach Abkühlung der Proben wurden diese und der Marker in die Geltaschen der 4 – 12 % NuPAGE Bis-Tris Gel aufgetragen. Die Proben konnten bei 100 V in Laufpuffer einlaufen. Bei Erreichen des Trenngels wurde auf 150 V erhöht. Nach Austritt der Bromphenolblau Front nach ca. 40-50 min wurde der Lauf gestoppt.

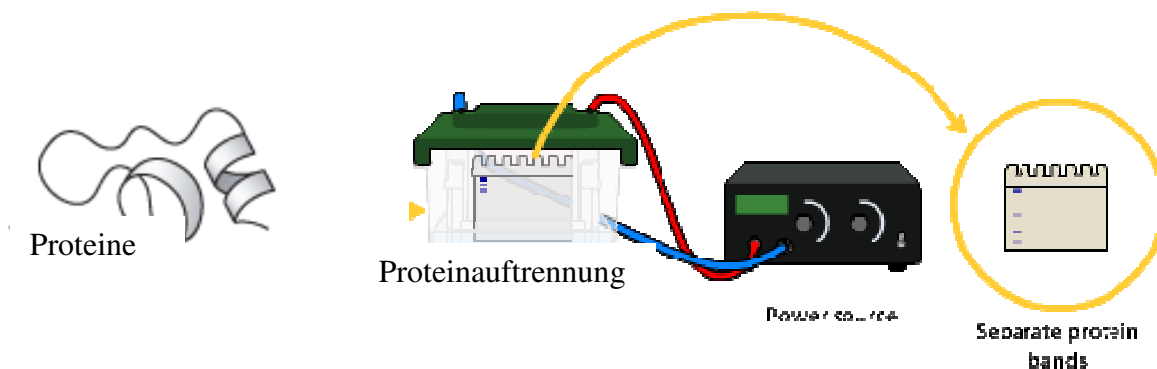


Abb. 27: SDS-Page Aufbau. Modifiziert nach:

http://www.peptide2.com/peptide/Western_blot_wikipedia_the_free.htm

2.5.4.2 Protein Blotting

Nach Auftrennung der Proteine durch SDS-Page wurden diese auf eine Nitrozellulose Membran mit Hilfe der Wet-Blotapparatur (Biorad) übertragen. Hierfür wurden pro Gel eine Membran, zwei Filter und zwei Pads in Transferpuffer getränkt. Im nächsten Schritt wurde das Gel auf die Membran gelegt und zwischen Pads und Filterpapier in die Sandwichplatten unter Vermeidung von Luftblasen geklemmt. Die Membran muss dabei auf die der Kathode zugewendeten Seite liegen ([+]Anode-Pad-Filter-Membrane-Gel-Filter-Pad-Kathode[-]). Die Sandwichplatten wurden in die mit Transferpuffer gefüllte Transferkammer eingeschoben. Für den Transfer der Proteine auf die

Membran wurde eine Spannung von 47 V für 1,5 Stunden angelegt.

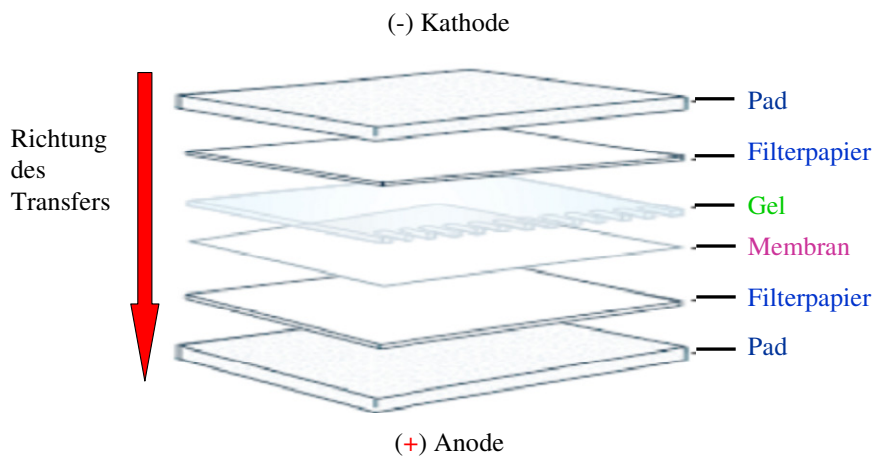


Abb. 28: Schematischer Aufbau eines Protein Plots. Modifiziert nach Millipore

2.5.4.3 Immunoblot

Zur Detektion der Proteine wurde die Membran zunächst 2 Stunden bei Raumtemperatur (21 °C) mit 5 % Milch behandelt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen (Blockierungspuffer: 5 % Milch in 0,05 % PBS/Tween). Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper in 5 % Milch in 0,05 % PBS/Tween bei 4 °C über Nacht. Danach wurde die Membran 3-mal für 10 min in 0,05 % PBS/Tween gewaschen und für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit dem Peroxidasegekoppelten Zweitantikörper inkubiert. Zum Schluss wurde nochmals 3-mal für 10 min in 0,05 % PBS/Tween gewaschen.

2.5.4.4 Detektion

Um die Proteine letztlich zu visualisieren wurde das ECL Super Signal Kit verwendet. Durch den Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper, der gegen den ersten Antikörper gerichtet ist, kommt es zu einer enzymkatalysierte Farbreaktion, die mit Fuji LAS-3000 intelligent Dark Box (Fujifilm, Düsseldorf, Germany) visualisiert wurde.

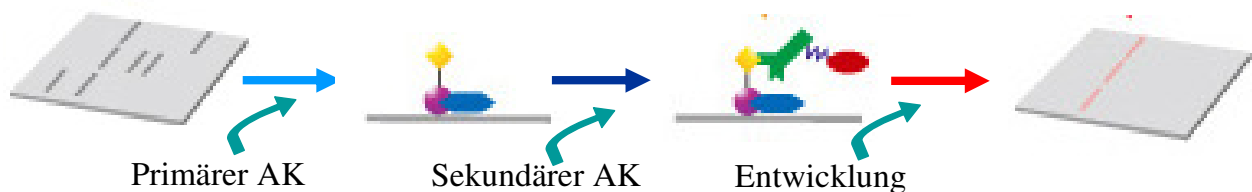


Abb. 29: Schematische Darstellung der Visualisierung des gesuchten Proteins. Modifiziert nach automation-drive.com/western-blot

2.5.5. CRP ELISA

Zur Bestimmung des CRP Proteingehalts aus dem Serum von traumatisierten Tieren wurden ELISAs (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) nach Herstellerangaben verwendet. In den Assay befindet sich ein auf Mikrotiterplatten immobilisierter monoklonaler Antikörper. Im Medium vorhandenes Antigen kann an diesen binden. Nach einem Waschschrift wird das nun gebundene Antigen durch einen polyklonalen, HRPO-gekoppelten Antikörper erkannt. Nach einem weiteren Waschschrift und Zugabe des Enzymsubstrats kann die Farbentwicklung mit Hilfe eines ELISA-Photometers gemessen werden. Die gemessenen Werte korrelieren dabei mit der Antigen Menge, die im ersten Schritt gebunden wurde. Die Untersuchung des Proteingehaltes im Serum erfolgte zum Zeitpunkt 6, 12 und 24 Stunden nach Operation und bei nativen Tieren.

2.6. Statistische Datenauswertung

Die statistische Datenauswertung wurde mit dem Programm SigmaPlot 11.0 (SPSS Science, Deutschland) durchgeführt. Zur Beurteilung der Daten wurden Varianzanalysen für unverbundene Stichproben durchgeführt. Die Nullhypothese, d.h. kein statistisch nachweisbarer Unterschied der untersuchten Daten, wurde mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von unter 5 % abgelehnt. In allen Experimenten wurde ein paarweiser Vergleich mit dem Wilcoxon Mann Whitney Rank Sum Test durchgeführt und die p-Werte nach Bonferroni gegen multiples Testen korrigiert (Bonferroni Korrektur). Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

D. Ergebnisse

1. Einfluss von Anästhetika auf das Ausmaß eines Hirnödems

Um die pathophysiologischen Mechanismen der Entstehung eines Hirnödems nach Schädelhirntrauma zu untersuchen, wurde das tierexperimentelle Modell des Controlled Cortical Impacts (CCI) verwendet. In diesem Modell kommt es posttraumatisch zu einem signifikanten Anstieg des Hirnwassergehaltes (HWG), sowie Schwellung der kontusionierten Hemisphäre.

Um optimale Versuchsbedingungen zu gewährleisten, wurde zunächst untersucht, ob das Anästhesieverfahren während der Induktion des Schädelhirntraumas einen Einfluss auf das Ausmaß des Hirnödems hat. Hierfür wurde 24 Stunden nach der Operation unter Sevofluran, Isofluran oder einer i.p. Narkose (Medetomidin, Fentanyl, Midazolam) der HWG bestimmt.

Der Hirnwassergehalt der rechten Hemisphäre steigt in allen Gruppen (CCI sevo: $79,51 \pm 0,54$ %; CCI iso: $79,92 \pm 0,5$ %; CCI comb: $80,35 \pm 0,24$ %; Abb. 30 A) signifikant im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren an (Sham sevo: $78,61 \pm 0,59$ %; Sham iso: $78,22 \pm 0,66$ %; Sham comb: $78,81 \pm 0,21$ %; Abb. 30 A). Je nach Anästhesieverfahren steigt der HWG unterschiedlich stark an. Vergleicht man den Anstieg des HWG von scheinoperierten mit traumatisierten Tieren eines Anästhesieverfahrens, so zeigt sich, dass unter Isofluran der HWG am stärksten ansteigt (Abb.30 B). Der HWG Anstieg ist unter Isofluran (iso: $+1,77 \pm 0,5$ %) und i.p. Narkose (comb: $+1,44 \pm 0,35$ %) signifikant höher im Vergleich zu Sevofluran (sevo: $0,77 \pm 0,27$ %).

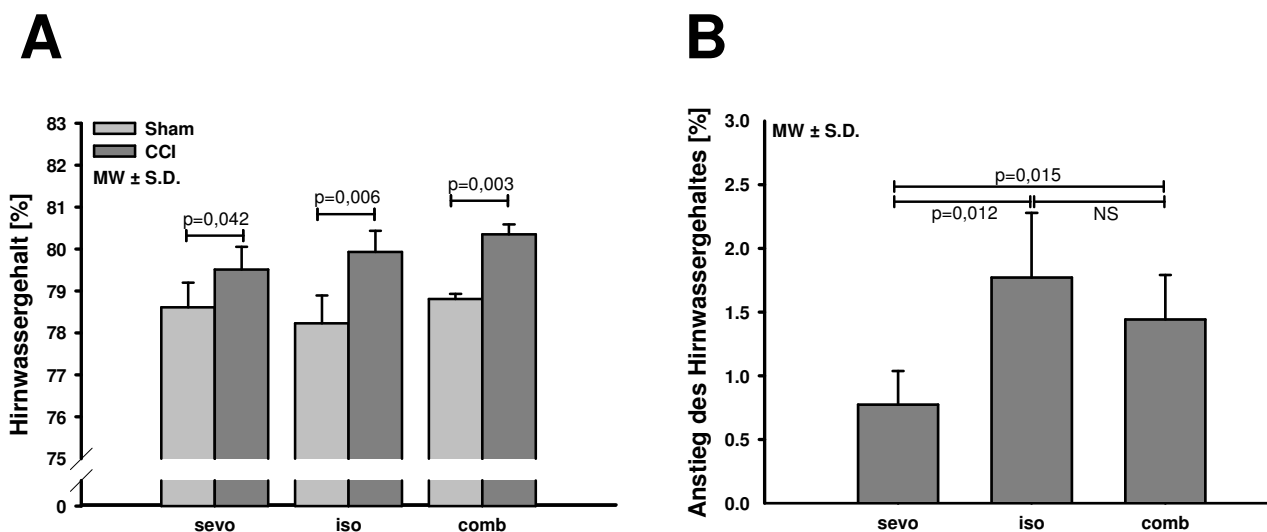


Abb. 30: (A) HWG 24 Stunden nach CCI oder Scheinoperation. (B) Anstieg des HWG im Vergleich zu scheinoperierten Tieren (n = 7 pro Gruppe, NS = nicht signifikant, p-Werte wurden korrigiert nach Bonferroni)

2. Rolle der MLCK bei der Entstehung des Hirnödems nach SHT

In der vorliegenden Studie wurde die Hypothese überprüft, ob die Inhibition der MLCK mit ML-7 eine Stabilisierung der BHS bewirkt und die Entstehung eines Hirnödems nach SHT verhindert. Weiterhin wurde der Effekt auf den histopathologischen und neurologischen Schaden untersucht.

2.1. Physiologische Parameter und Mortalität nach SHT

Um sicherzustellen, dass alle Mäuse den gleichen Versuchsbedingungen unterzogen wurden, wurden die physiologischen Parameter überwacht. 15 Minuten nach CCI waren pH, paCO₂, paO₂ im Normbereich. Die Körpertemperatur und der systolische Blutdruck während der Induktion des Traumas unterschieden sich nicht zwischen den Gruppen und blieben über den beobachteten Zeitraum konstant (Tabelle 4).

ML-7 hat in der verwendeten Dosierung keinen Einfluss auf pH, arterieller Blut Glukose Spiegel, Hämatokrit, Plasma Elektrolyt-Spiegel, systolische Blutdruck und die Körpertemperatur (siehe Tabelle 5 und Tabelle 6 unter Ergebnisse 4.1.). Alle Tiere überlebten den Beobachtungszeitraum.

Tabelle 4. Systolischer Blutdruck und Körpertemperatur während OP

	Sham Veh	Sham ML-7	CCI Veh	CCI ML-7
Syst. BP [mmHg] vor CCI	116 ± 13	109 ± 17	95 ± 13	109 ± 10
Syst. BP [mmHg] nach CCI	103 ± 13	104 ± 12	91 ± 11	101 ± 8
Rekt. Temp. [°C] vor CCI	36,9 ± 0,7	36,4 ± 1,1	37,0 ± 0,4	36,5 ± 0,7
Rekt. Temp. [°C] nach CCI	37,2 ± 0,6	37,2 ± 0,3	37,3 ± 0,2	37,3 ± 0,3
Rekt. Temp. [°C] 6h nach CCI	37,0 ± 0,9	35,7 ± 2,1	37,3 ± 1,0	37,9 ± 1,5

Syst. BP = nicht invasiv gemessener systolischer Blutdruck; Rekt. Temp = rektale Körpertemperatur

2.2. Differentielle Genregulation der MLCK und MLC nach SHT

Der Einfluss des SHT auf MLCK und MLC Expression wurde mit Hilfe einer real-time PCR im kontusionierten Gewebe zu den Zeitpunkten 6, 12 oder 24 Stunden nach CCI untersucht und mit nativen Tieren verglichen. Die MLCK Expression steigt nach experimentellen SHT innerhalb von 12 Stunden signifikant an (12h: 181 ± 63 % nativ; 24h: 137 ± 22 % nativ, Abb. 31 A), während die mRNA Expression von MLC die ersten 12 Stunden nach Trauma unverändert blieb und nach 24 Stunden um 26 % verringert war (24h: 74 ± 14 % native, Abb. 31 B).

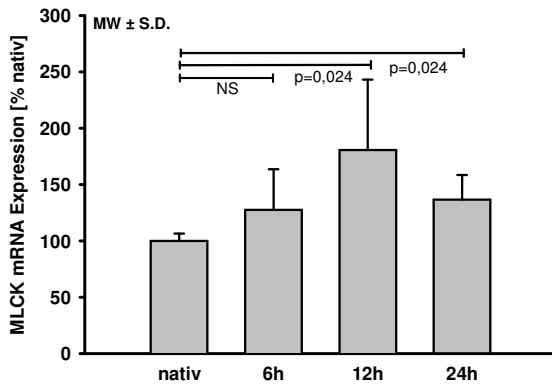
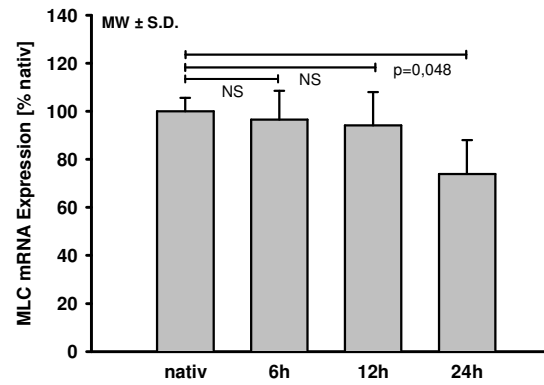
A**B**

Abb. 31: mRNA Expression von MLCK (A) und MLC (B) wurde in nativen Tieren und 6, 12 und 24 Stunden nach CCI bestimmt (n = 6 pro Gruppe, NS = nicht signifikant, p-Werte wurden korrigiert nach Bonferroni)

2.3. Effekt der MLCK Inhibition

Um den Einfluss des kontraktiven Apparates beim SHT zu untersuchen wurden verschiedene Endpunkte untersucht und die MLCK mit dem spezifischen Inhibitor ML-7 gehemmt.

2.3.1 Effekt der MLCK Inhibition auf den HWG und die neurologische Funktion

Das SHT bewirkt eine gesteigerte Expression von MLCK. Im folgendem wurde deshalb untersucht, ob die erhöhte Expression von MLCK über eine verstärkte Phosphorylierung von MLC zur der Öffnung der BHS beiträgt. Um diese Frage zu beantworten wurde die Aktivität von MLCK mit Hilfe des spezifischen Inhibitors ML-7 gehemmt und der HWG 15 Minuten und 24 Stunden nach CCI bzw. nach Scheinoperation (sham) bestimmt.

Der HWG der rechten, ipsilateralen Hemisphäre unterscheidet sich nicht zwischen der Vehikel und der ML-7 Gruppe in scheinoperierten Mäusen, sowohl nach 15 Minuten (sham + Vehikel: $77,9 \pm 0,4$ %; sham + ML-7: $77,7 \pm 0,9$ %; Abb. 32 A), wie auch nach 24 Stunden (sham + Vehikel: $78,4 \pm 0,6$ %; sham + ML-7: $78,8 \pm 0,8$ %; Abb. 32 B). Bereits 15 Minuten nach dem Trauma kommt es zu einem signifikanten Anstieg des HWG in Vehikel behandelten Tieren ($79,2 \pm 0,9$ %; $p = 0,02$ vs. sham + Vehikel, Abb.32 A), der innerhalb der nächsten 24 Stunden weiter ansteigt (CCI + Vehikel: $81,9 \pm 1,2$ %; $p < 0,002$ vs. sham + Vehikel; Abb. 32 B). 15 Minuten nach Schädelhirntrauma unterscheidet sich der Hirnwassergehalt nicht zwischen der ML-7 (CCI + ML-7: $79,4 \pm 0,6$ %) und Vehikel Gruppe (Abb.32 A). Nach 24 Stunden ist der Anstieg des Hirnwassergehaltes in Anwesenheit von ML-7 signifikant geringer im Vergleich zur Vehikel Gruppe ($79,9 \pm 1,2$ %; $p = 0,044$ vs. CCI + Vehikel, Abb.32 B).

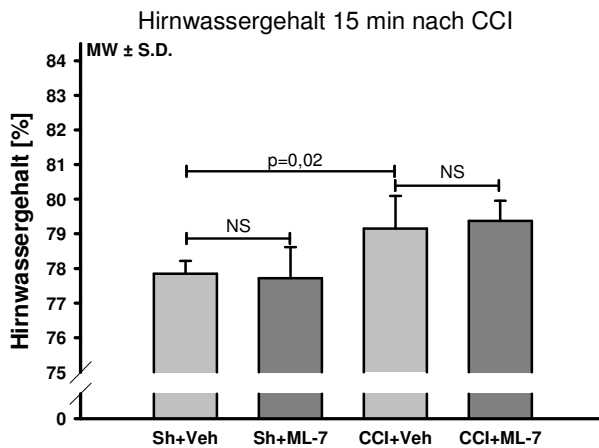
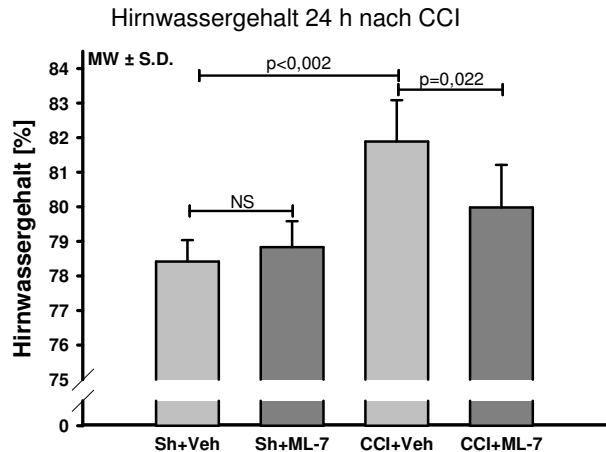
A**B**

Abb. 32: Der HWG 15 Minuten (A) und 24 Stunden (B) nach CCI bzw. Scheinoperation unterscheidet sich nicht zw. scheinoperierten Tieren in der Vehikel und ML-7 Gruppe. Nach Trauma kommt es zu einem Anstieg des HWG. Die Inhibition der MLCK mit ML-7 führt 24 Stunden nach Trauma zu einem signifikant geringern HWG im Vergleich zu nicht behandelten Tieren.

Die neurologische Funktion wurde vor der Operation und 24 Stunden nach dem Trauma bzw. der Scheinoperation mit einem 10 Punkte Test bewertet. Alle traumatisierten Mäuse zeigten eine Verschlechterung ihrer neurologischen Funktion im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren (sham + Vehikel: $0,9 \pm 0,9$ Punkte, sham + ML-7: $1,3 \pm 1$ Punkte, Abb.33) ohne Unterschied zwischen der ML-7 und der Vehikel Gruppe (CCI + Vehikel: $3,5 \pm 0,8$ Punkte; CCI + ML-7: $3,6 \pm 0,6$ Punkte, Abb.33).

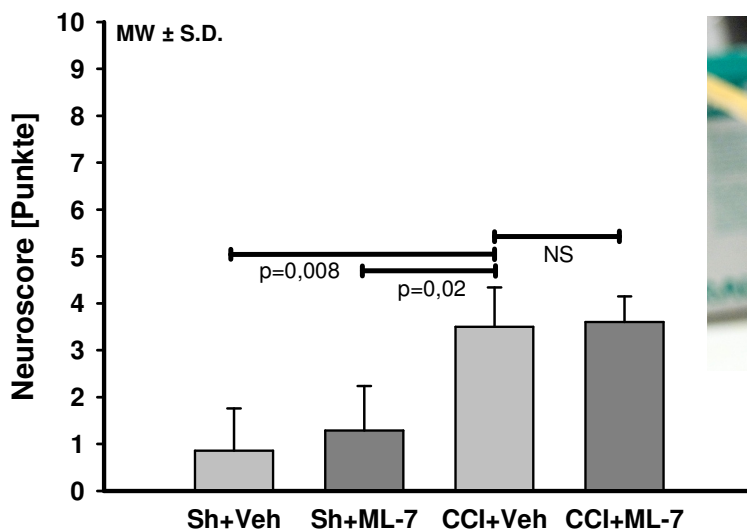


Abb. 33: Die neurologische Funktion wurde mit einem 10 Punkte Neuroscore vor der Operation und 24 Stunden nach Trauma bewertet (NS = nicht signifikant, p-Werte wurden korrigiert nach Bonferroni). Rechtes Bild zeigt eine Maus nach SHT, die beim Balkengang einen Fehltritt macht.

2.3.2 Effekt der MLCK Inhibition auf BHS Integrität und ICP

Um zu evaluieren, ob die Reduktion des HWG auf einer Stabilisierung der BHS beruht, wurde die BHS Permeabilität mit einem Evans Blue Assay quantifiziert. In scheinoperierten Tieren unterscheidet sich die Menge an Evans Blue Extravasation nicht zwischen der ML-7 und Vehikel behandelten Gruppe (sham + Vehikel: $0,26 \pm 0,02$ OD / g; sham + ML-7: $0,26 \pm 0,02$ OD / g, Abb. 34 A). 24 Stunden nach dem SHT ist die Evans Blue Menge signifikant erhöht als Zeichen einer Öffnung der BHS. Eine Inhibition der MLCK mit ML-7 bewirkte eine signifikante Reduktion an intrazerebralem Evans Blue im Vergleich zu den Vehikel behandelten Tieren (CCI + Vehikel: $0,42 \pm 0,04$ OD / g; CCI + ML-7: $0,35 \pm 0,05$ OD / g, $p = 0,048$; Abb. 34 A).

Ein Anstieg des Hirnwassergehaltes kann zu einem erhöhten intrakraniellen Druck führen. Deswegen wurde im Folgenden untersucht, ob ein durch Inhibition der MLCK verringertes Hirnödem zu einer Veränderung des posttraumatischen ICPs führt. In der ML-7 Gruppe hatten die Mäuse 24 Stunden nach CCI einen signifikanten geringen ICP im Vergleich zur Vehikel Gruppe (CCI + ML-7: $8,8 \pm 0,2$ mmHg; CCI + Vehikel: $14,2 \pm 1,2$ mmHg, $p = 0,036$; Abb. 34 C). In scheinoperierten Mäusen unterscheiden sich die ICP Werte nicht zwischen der ML-7 und der Vehikel Gruppe. (sham + Vehikel: $5,7 \pm 1,8$ mmHg; sham + ML-7: $6,2 \pm 1,3$ mmHg, Abb. 34 C).

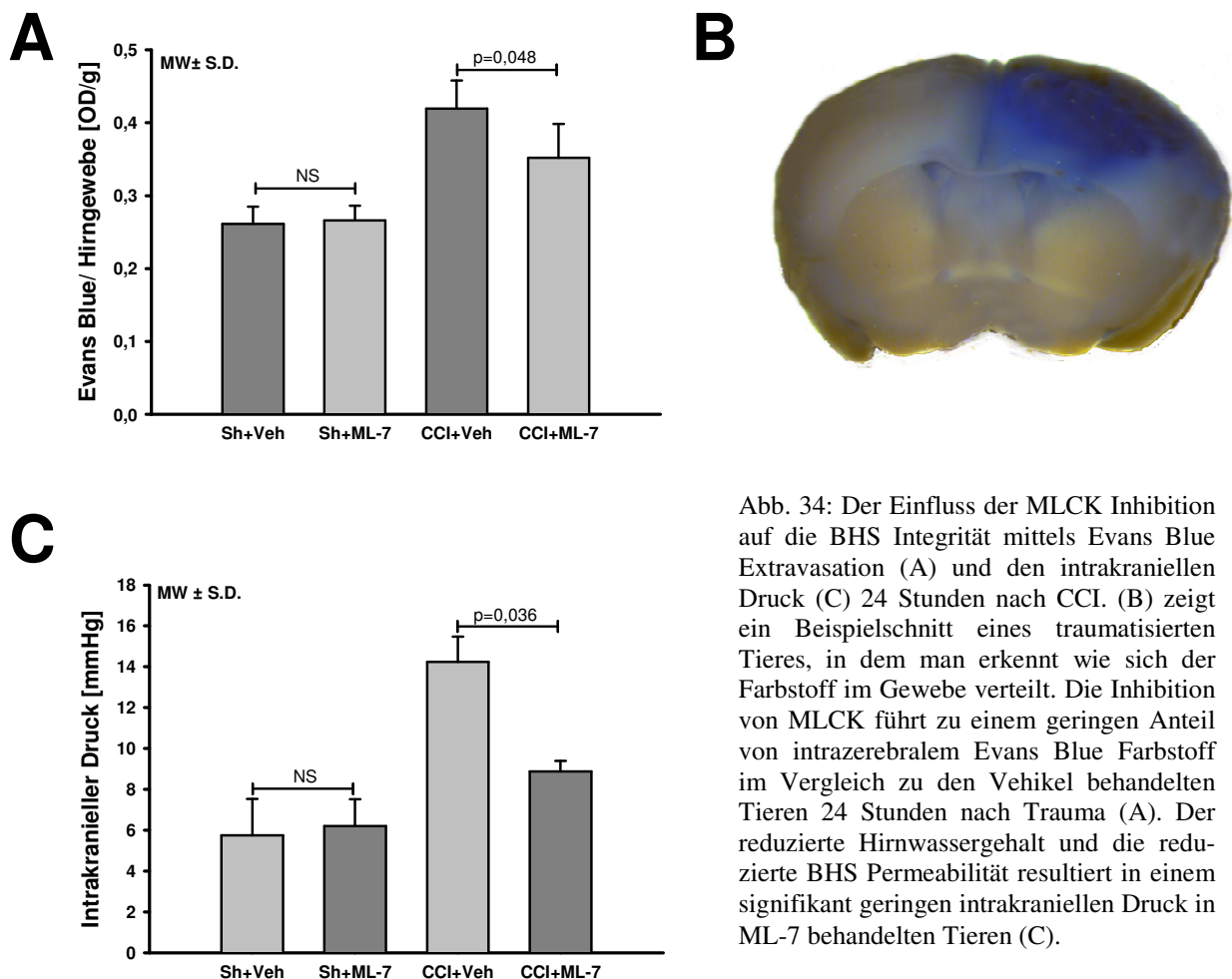


Abb. 34: Der Einfluss der MLCK Inhibition auf die BHS Integrität mittels Evans Blue Extravasation (A) und den intrakraniellen Druck (C) 24 Stunden nach CCI. (B) zeigt ein Beispielschnitt eines traumatisierten Tieres, in dem man erkennt wie sich der Farbstoff im Gewebe verteilt. Die Inhibition von MLCK führt zu einem geringen Anteil von intrazerebralem Evans Blue Farbstoff im Vergleich zu den Vehikel behandelten Tieren 24 Stunden nach Trauma (A). Der reduzierte Hirnwassergehalt und die reduzierte BHS Permeabilität resultiert in einem signifikant geringen intrakraniellen Druck in ML-7 behandelten Tieren (C).

2.3.3 Effekt der MLCK Inhibition auf die MLC Phosphorylierung

Der Einfluss von einem Schädelhirntrauma auf die Phosphorylierung von MLC (pMLC) wurde mittels Western Blot Analysen in traumatisierten und scheinoperierten Tieren mit 15 Minuten oder 24 Stunden Überleben bestimmt. 15 Minuten nach der Operation unterscheiden sich die pMLC Protein Mengen nicht zwischen der ML-7 und Vehikel Gruppe in traumatisierten und scheinoperierten Tieren (sham + Vehikel: $116,41 \pm 63,6 \%$; sham + ML-7: $94,08 \pm 19,3 \%$; CCI + Vehikel: $169,48 \pm 58,8 \%$; CCI + ML-7: $161,59 \pm 42,8 \%$; Abb. 35A). 24 Stunden nach CCI steigen die pMLC Protein Mengen signifikant im Vergleich zu scheinoperierten Tieren an (sham + Vehikel: $160,17 \pm 21,5 \%$; sham + ML-7: $127,83 \pm 61,7 \%$; CCI + Vehikel: $246,01 \pm 55,2 \%$, Abb. 35 B). Der Anstieg war in Anwesenheit von ML-7 signifikant geringer (CCI + ML-7: $139,20 \pm 50,6 \%$; $p=0,034$ vs. CCI + Vehikel; Abb. 35 B).

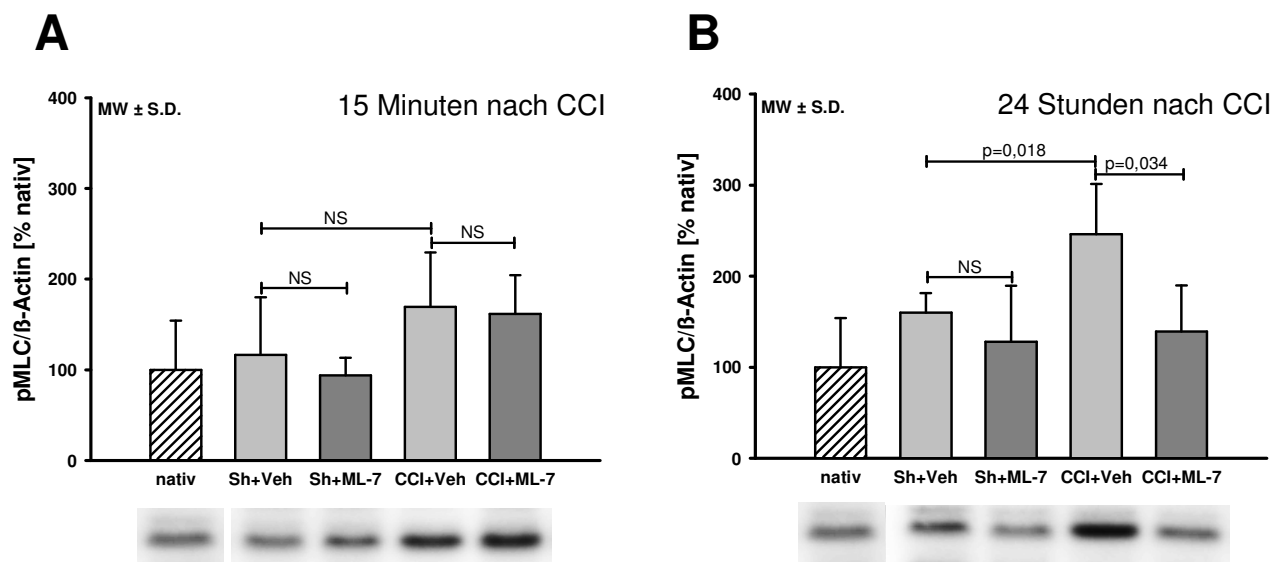


Abb. 35: Der Einfluss der MLCK Inhibition auf die auf den pMLC Protein Level nach 15 Minuten (A) und nach 24 Stunden (B). Die pMLC Werte wurden normalisiert gegen β-Aktin. Die Inhibition von MLCK führt zu einer Reduktion der pMLC Levels 24 Stunden nach Trauma (n = 8 pro Gruppe)

2.3.4 Effekt der MLCK Inhibition auf die Histologie und neurologische Funktion

Durch die Inhibition des kontraktiven Apparates konnte die BHS effektiv stabilisiert, der ICP gesenkt und das Hirnödem reduziert werden. Daraufhin wurde im nächsten Schritt untersucht, welchen Einfluss dieser Ansatz auf den histologischen Schaden und die neurologische Funktion hat. Da die neurologische Funktion mit dem 10 Punkte-NSS keinen Unterschied zwischen der ML-7 und der Vehikel Gruppe zeigte, wurde in dieser Studie die neurologische Funktion mit einem modifizierten 25 Punkte-Score untersucht. Zusätzlich wurde in dieser Studie eine Niedrigdosis ML-7 Gruppe (0,5 mg/kg) hinzugefügt, um die Dosierung zu optimieren.

Der primäre Schaden wurde 15 Minuten nach Trauma quantifiziert ($16,1 \pm 2,0 \text{ mm}^3$; Abb. 36 A). Der primäre Schaden wächst innerhalb der nächsten Stunden in das gesunde Gewebe hinein und steigt auf ein Kontusionsvolumen von $22,3 \pm 3,7 \text{ mm}^3$ in der Vehikel Gruppe. ML-7 hat keinen Einfluss auf das Kontusionsvolumen, sowohl mit der 1 mg/kg ($22,4 \pm 3,4 \text{ mm}^3$, Abb. 36 A), als auch mit der $0,5 \text{ mg/kg}$ Dosierung ($21,2 \pm 7 \text{ mm}^3$, $n = 8$).

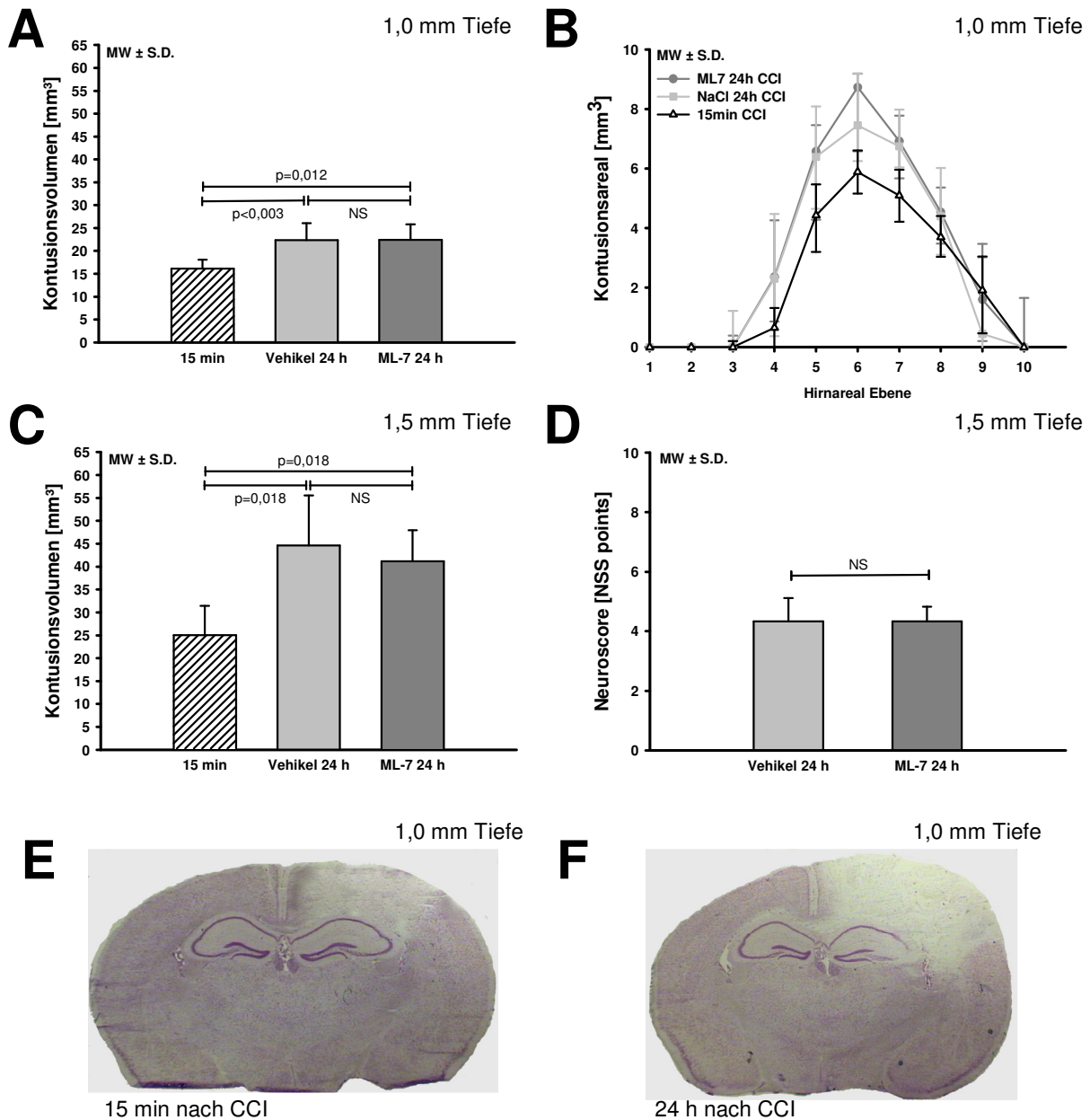


Abb. 36: Der Einfluss der MLCK Inhibition wurde mit einer Eintringtiefe von 1,0 mm (A, B) und von 1,5 mm (C, D) getestet. Der histologische Schaden wurde in Nissl gefärbten Cryo-Schnitten (A, C) gemessen und durch Multiplikation der einzelnen Areale (B) mit dem Abstand von $750 \mu\text{m}$ das Kontusionsvolumen bestimmt. Das Kontusionsvolumen unterschied sich nicht zwischen der Vehikel und ML-7 Gruppe für beide Eintringtiefe. (D) Die neurologische Funktion zeigt keinen Unterschied zwischen den Vehikel und ML-7 behandelten Tieren mit einem 10-Punkte-Score. (E, F) Nissl gefärbte Beispielschnitte, die das Kontusionsareal bei einer Eintringtiefe von 1,0 mm zeigen 15 Minuten (E) und 24 Stunden (F) nach Trauma bei Bregma $-1,64 \text{ mm}$. Das kontusionierte Areal zeichnet sich als helle Zone ab und wächst innerhalb der nächsten 24 Stunden in das gesunde Gewebe hinein (15 min = technische Kontrolle; Vehikel bzw. ML-7 24 h = 24 Stunden Überleben; $n = 8$ pro Gruppe; NS = nicht signifikant, p-Werte wurden nach Bonferroni korrigiert).

Durch das Trauma verschlechtert sich die neurologische Funktion bei allen Tieren ohne Unterschied zwischen der ML-7 und der Vehikel Gruppe (CCI + Vehikel: $10,1 \pm 4,1$ Punkte; CCI + Niedrigdosis ML-7: $8,5 \pm 5,7$ Punkte; CCI + Hochdosis ML-7: $9,1 \pm 4,5$ Punkte; $n = 8$).

Um die Daten zu bestätigen und die Möglichkeit auszuschließen, dass das Trauma zu klein war und das Hirnödem bzw. Hirnschwellung noch nicht raumfordernd genug war, wurde die Studie wiederholt (ohne Niedrigdosis) und das Initialtrauma vergrößert indem die Tiefe des Stempels der Traumamaschine von 1 mm auf 1,5 mm erhöht wurde.

Bei einem größeren Initialtrauma lag der primäre Schaden bei $25,1 \pm 6,4 \text{ mm}^3$ (Abb. 36 C). Nach 24 Stunden wuchs der primär Schaden auf ein Kontusionsvolumen auf über 40 mm^3 ohne Unterschied zwischen Vehikel und ML-7 Gruppe (Vehikel: $44,6 \pm 11,0 \text{ mm}^3$; ML-7: $41,1 \pm 6,8 \text{ mm}^3$; Abb. 36 C). Die neurologische Funktion, wurde mit dem 10 Punkte NSS bewertet unterscheidet sich auch bei einem größeren Trauma nicht zwischen den Gruppen (Vehikel: $4,3 \pm 0,78$ Punkte; ML-7: $4,3 \pm 0,49$ Punkte; Abb. 36 D).

2.3.5. Effekt der MLCK Inhibition auf die zerebrale Inflammation

Verschiedene inflammatorische Prozesse, die durch ein Schädelhirntrauma getriggert werden, beeinflussen die sekundäre Schadensexpansion. Unter anderem vergrößern pro-inflammatorische Zytokine, wie Interleukin 1 β , das zerebrale Hirnödem. Um zu untersuchen, ob MLCK ihrerseits die Inflammation beeinflusst, haben wir die mRNA Expression von inflammatorischen Markergenen bestimmt. Die Expression der inflammatorischen Markergene TNF α , IL1 β , and IL6 unterschied sich nicht zwischen der Vehikel und der ML-7 Gruppe 24 Stunden nach Trauma (Abb. 37; 1,5 mm Eindringtiefe).

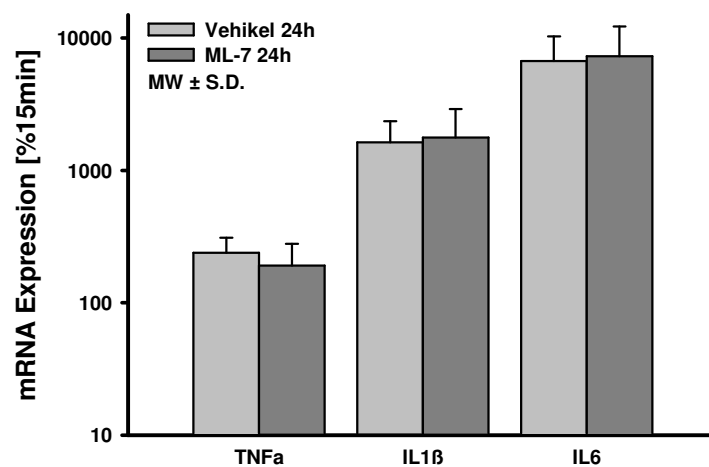


Abb. 37: Marker für die zerebrale Inflammation (TNF α , IL1 β , IL6) wurden mittels real-time PCR im geschädigten Gewebe gemessen und unterschieden sich nicht zwischen ML-7 und Vehikel Tieren 24 Stunden nach Trauma.

3. Rolle der Fcγ Rezeptoren für das posttraumatische Hirnödem

Die Inhibition des kontraktiven Apparates führt nach SHT zu einer Stabilisierung der BHS und zu einer Verringerung des Hirnödems. In einem in-vitro BHS Model konnte gezeigt werden, dass CRP über die Bindung an Fcγ-Rezeptoren den kontraktiven Apparat aktiviert und somit zu einem Öffnen der BHS führt. In der vorliegenden Studie wurde der CRP Plasmaspiegel und der Einfluss von Fcγ-Rezeptoren auf die Entstehung eines Hirnödems, die neurologische Funktion, die zerebrale Inflammation und des histologischen Schadens nach experimentellen SHT untersucht.

3.1. CRP Plasmaspiegel und Genregulation der FcγR nach CCI

Um die Fragestellung zu beantworten, welchen Einfluss CRP nach SHT hat, wurde zunächst der Plasmaspiegel von CRP zu den Zeitpunkten 6, 12 und 24 Stunden nach Trauma bestimmt. Der CRP Plasmaspiegel steigt nach experimentellem SHT an und erreicht ein Maximum nach 12 Stunden ($163 \pm 35 \%$; nach 24 h $150 \pm 27 \%$, $p=0,045$ vs. nativ; Abb. 38 A).

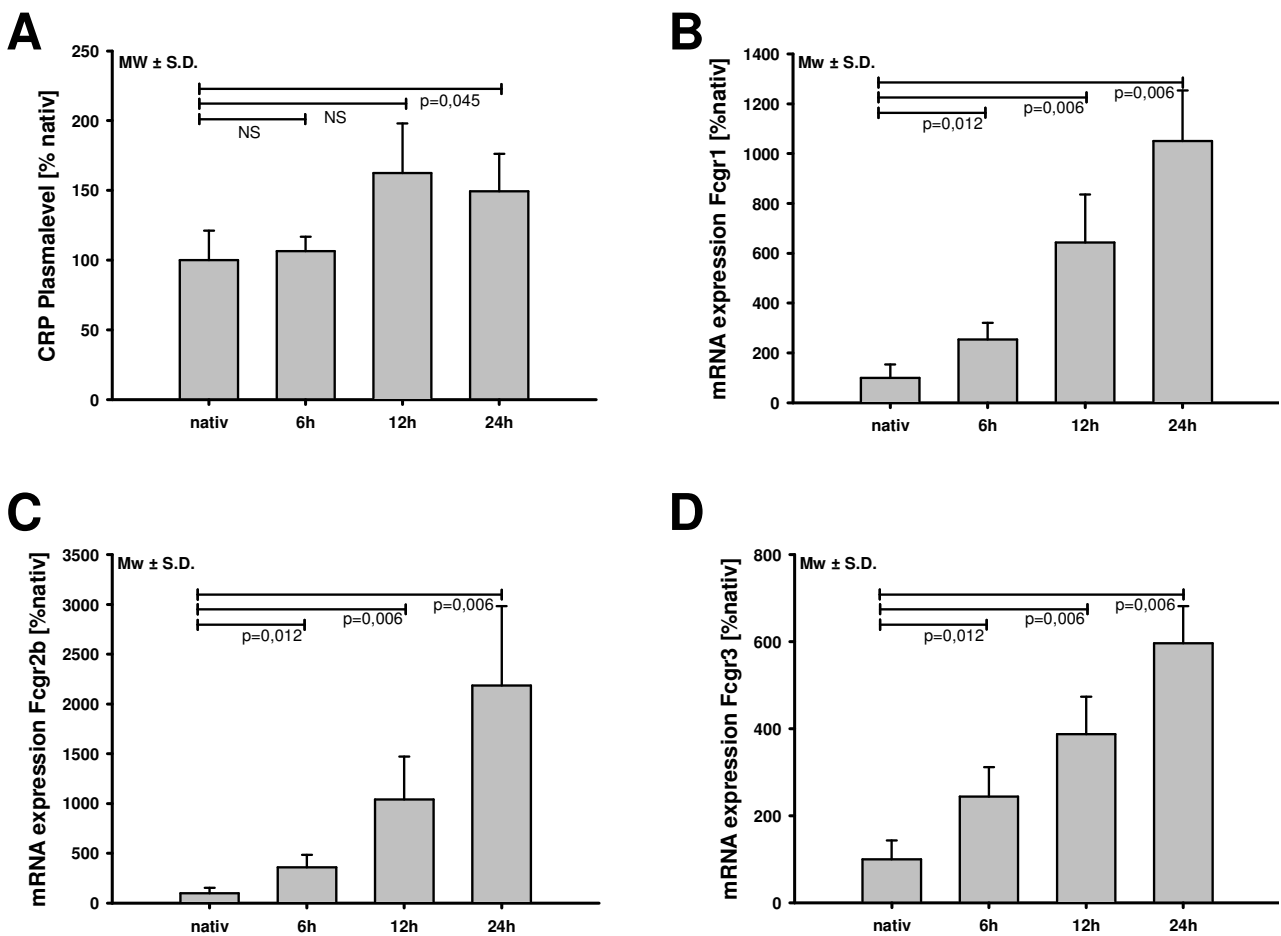


Abb.38: (A) CRP Plasma Level wurde mittels ELISA gemessen und gegen gesunde Tiere normalisiert. (B, C, D) Die mRNA Expression der CRP Rezeptoren (FcγRI, FcγRIIb, FcγRIII) wurden mittels real-time PCR im geschädigten Gewebe gemessen. Bei allen drei Rezeptoren kommt es bereits nach 6 Stunden zu einem signifikanten Anstieg. (n = 5 pro Gruppe; NS = nicht signifikant, p-Werte wurden nach Bonferroni korrigiert).

CRP bindet an drei unterschiedliche Fc γ Rezeptoren (Fc γ R). Mit einer hohen Affinität an den Fc γ RI (bzw. CD64) und mit niedriger Affinität an die Rezeptoren Fc γ RIIb (bzw. CD32) und Fc γ RIII (bzw. CD16). Da wir wissen wollten, ob die Fc γ R durch das SHT beeinflusst werden, haben wir die mRNA Expression dieser drei Fc γ R im kontusionierten Gewebe zu den Zeitpunkten 6, 12 oder 24 Stunden nach CCI gemessen und mit nativ Tieren – nicht operierten Tieren – verglichen.

Die mRNA Expression aller drei Fc γ R steigt nach experimentellen SHT bereits nach 6 Stunden signifikant an (Fc γ RI: 6h: 254 ± 67 % nativ, 12h: 643 ± 193 % nativ; 24h: 1051 ± 203 % nativ; Abb. 38 B; Fc γ RIIb 6h: 361 ± 124 % native; 12h: 1042 ± 431 % native; 24h: 2184 ± 799 % native; Abb. 38 C; Fc γ RIII: 6h: 244 ± 67 % nativ, 12h: 388 ± 86 % nativ; 24h: 597 ± 85 % nativ; Abb. 38 D). Am stärksten ausgeprägt war der Anstieg der mRNA Expression von Fc γ RIIb.

3.2. Fc γ R^{-/-} Mäusen

3.2.1 Genotypisierung der Fc γ R^{-/-} Mäusen

Bevor die Fc γ R KO Mäuse in den Versuch gingen, wurde diese genotypisiert. Die γ Subunit des Immunglobulin Fc Rezeptor ist ein essentielle Komponente für die Fc γ R. Die Zerstörung dieser Subunit führt dazu, dass die Rezeptoren ihre Funktion verlieren. Fc γ R transgene Mäuse exprimieren zusätzlich ein 197 bp großes Fragment, das in die γ Subunit eingesetzt wurde. Das 137 bp große Fragment ist spezifisch für WT und KO Mäuse.

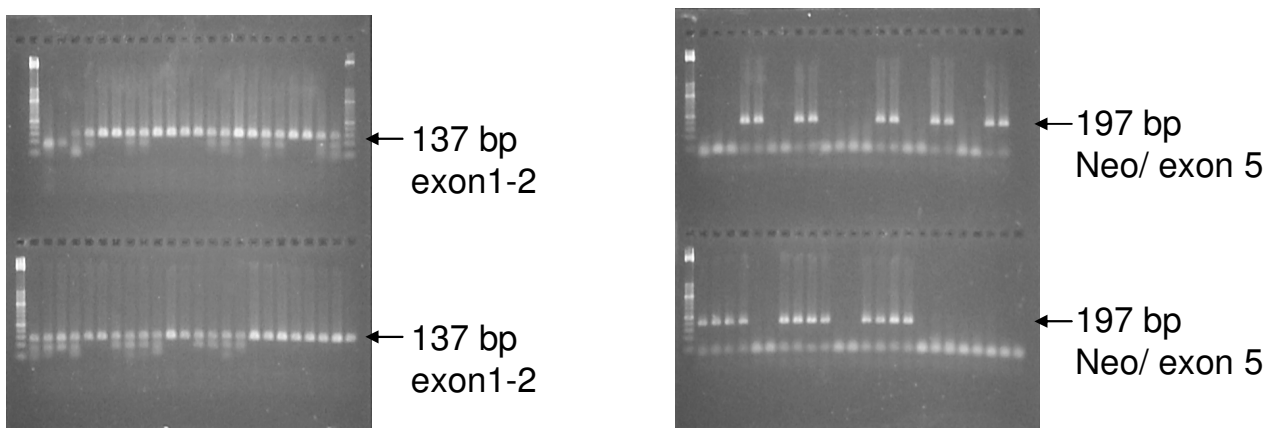


Abb. 39: Amplifizierte PCR Produkte wurden in einem Agarose Gel aufgetrennt. Das 197 bp Fragment charakterisiert die genmodifizierten Mäuse.

3.2.2. CRP Plasma Level in FcγR^{-/-} Mäusen nach CCI

Der CRP Plasma Spiegel steigt post CCI nur bei den WT Mäusen ($12,0 \pm 3,1 \mu\text{g/ml}$), nicht aber bei den FcγR^{-/-} defizienten Mäusen ($7,3 \pm 1,4 \mu\text{g/ml}$) im Vergleich zu nativen Tieren (WT + nativ: $5,7 \pm 0,8 \mu\text{g/ml}$; FcγR^{-/-} + nativ: $5,1 \pm 1,4 \mu\text{g/ml}$) an (Abb. 40).

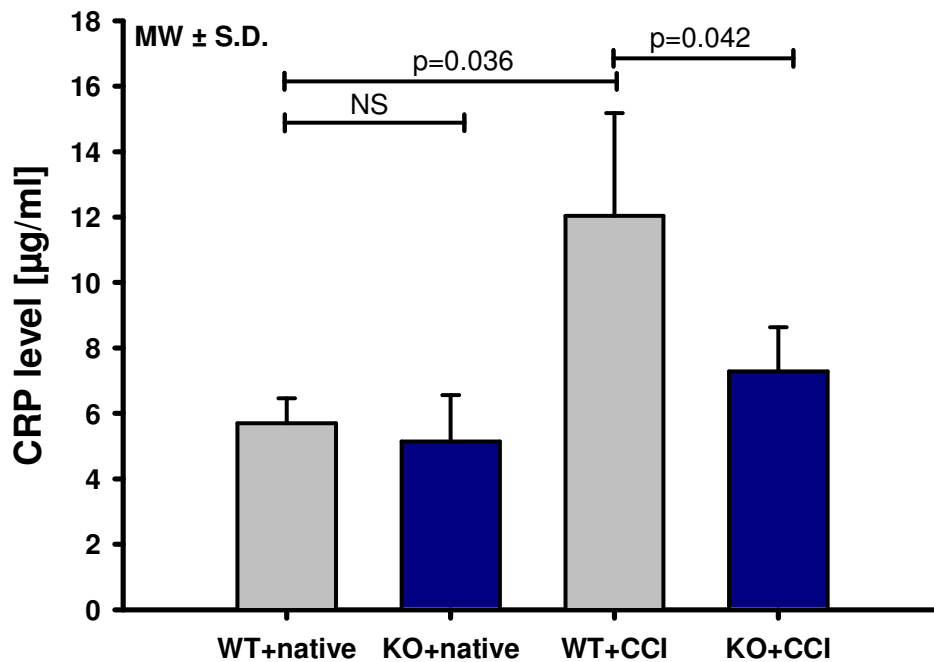


Abb. 40: CRP Plasma Level

3.3. Rolle der Fcγ Rezeptoren

Um zu überprüfen, welche Rolle die FcγR bei der Schadensexpansion nach SHT haben, wurden verschiedene Endpunkte in WT Mäusen mit FcγR KO Mäuse verglichen.

3.3.1 Rolle der Fcγ Rezeptoren auf den Hirnwassergehalt

Um die Hypothese zu überprüfen, dass CRP über die FcγR die BHS öffnet, haben wir in der nächsten Studie bei FcγR^{-/-} defizienten Mäusen und den entsprechenden Wildtypieren den HWG nach Trauma bestimmt. Der HWG steigt 24 Stunden nach SHT ohne Unterschied zwischen den WT ($81,16 \pm 0,6 \%$) und FcγR^{-/-} ($81,02 \pm 0,6 \%$) Mäusen (WT + Scheinoperation $78,89 \pm 0,8 \%$; FcγR^{-/-} + Scheinoperation $78,80 \pm 0,5 \%$) an. (siehe Abb. 41)

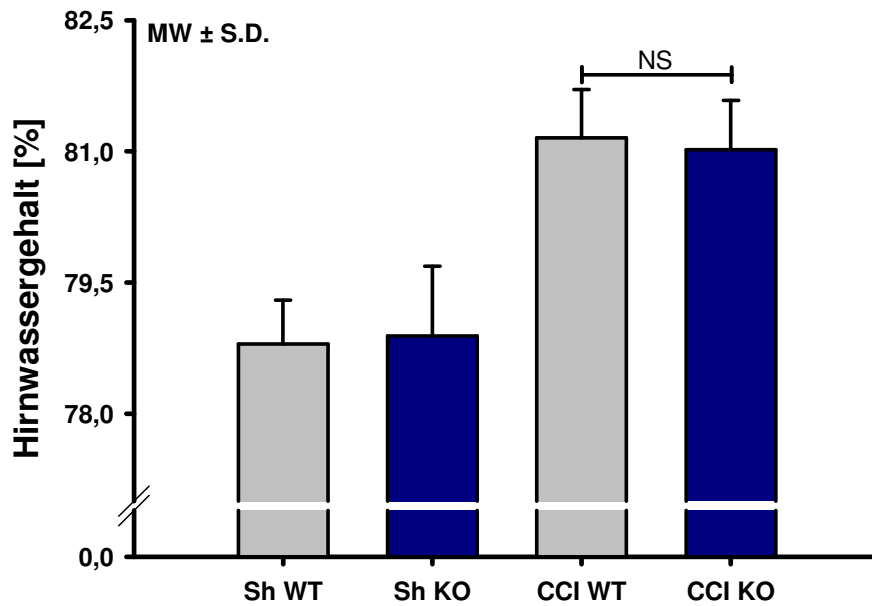


Abb. 41: Der Hirnwassergehalt wurde durch Messung der Feucht- und Trockengewichts bestimmt. Der HWG steigt 24 Stunden nach SHT signifikant an ohne Unterschied zwischen den WT und $Fc\gamma R^{-/-}$ Mäusen ($n = 5$ pro Gruppe; NS = nicht signifikant)

3.3.2 Rolle der $Fc\gamma$ Rezeptoren auf die neurologisch Funktion und die Histologie

Die neurologische Funktion wurde vor und 24 Stunden nach der OP mit einem 10 Punkte Neuroscore bewertet (0 Punkte = kein Defizit, 10 Punkte = max. Defizit). Die neurologische Funktion zwischen den WT ($3,8 \pm 1,1$ Punkte) und $Fc\gamma R^{-/-}$ ($4,3 \pm 1,3$ Punkte) Mäusen unterschied sich nicht (Abb. 42). 24 Stunden nach CCI war der histologische Schaden in $Fc\gamma R^{-/-}$ KO Mäusen ($31,31 \pm 4,87 \text{ mm}^3$) signifikant kleiner im Vergleich zu WT Mäusen ($41,11 \pm 6,84$; Abb. 43 A).

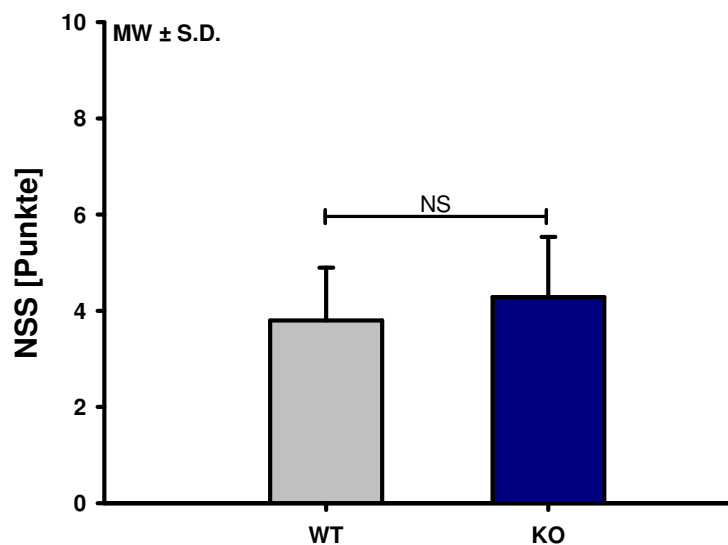


Abb. 42: Der NSS von WT und $Fc\gamma R^{-/-}$ Mäusen

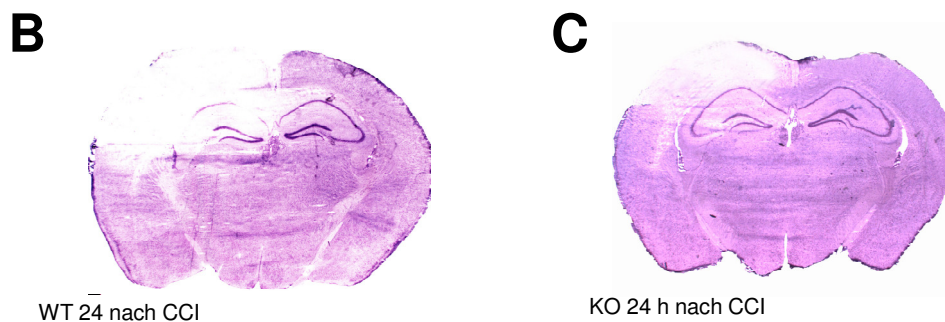
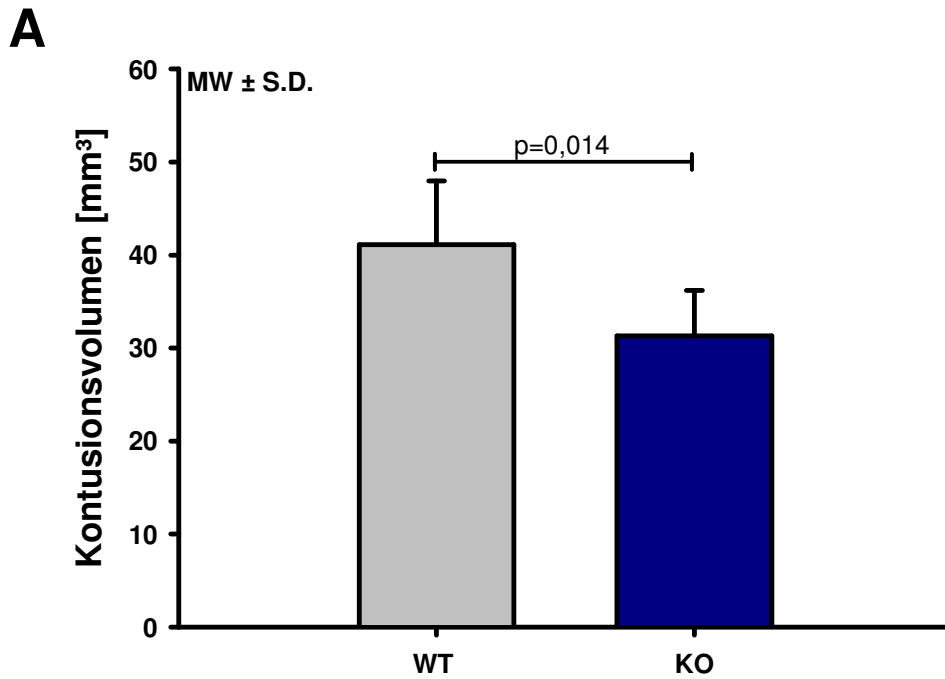
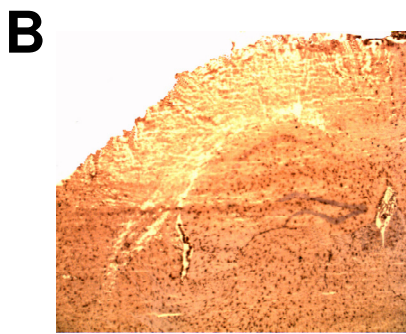
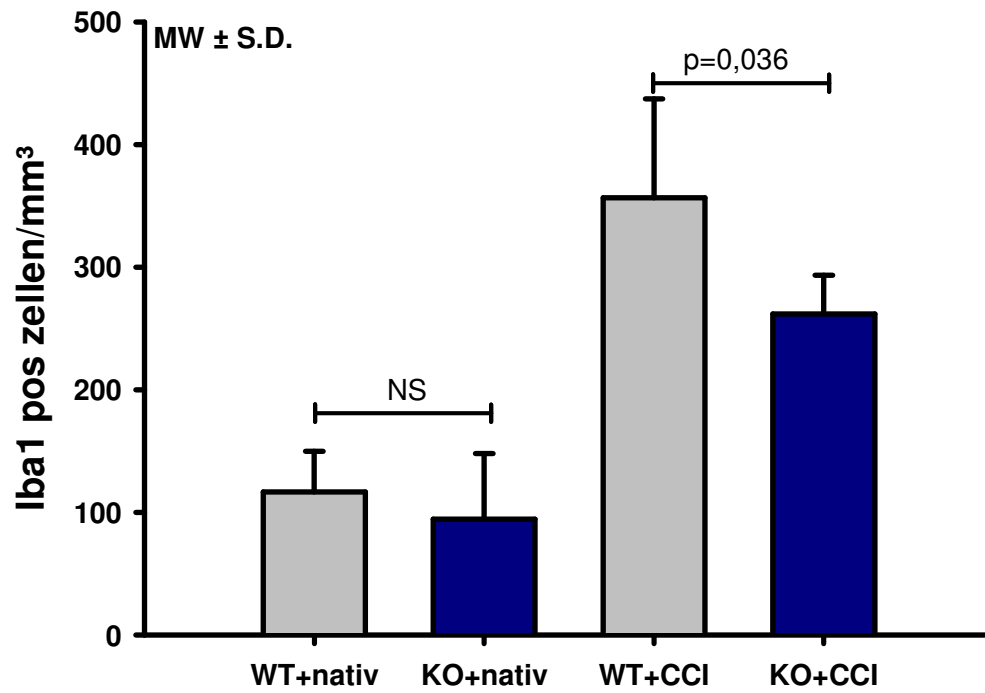


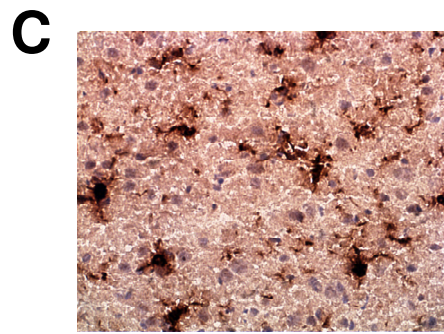
Abb. 43: Um den histologischen Schaden zu bestimmen, wurde in Nissl gefärbten Cryo-Schnitten das Kontusionsvolumen (A) gemessen und durch Multiplikation der einzelnen Areale mit dem Abstand von 500 μm bestimmt. Das Kontusionsvolumen der KO Mäuse ist signifikant kleiner als bei WT Mäusen ($n = 7$ pro Gruppe). (B, C) Nissl gefärbte Beispielschnitte, die das Kontusionsareal als helle Zone 24 Stunden nach Trauma bei Bregma -1,64 mm von einer WT (B) und einer KO (C) Maus zeigen.

3.3.3 Rolle der Fc γ Rezeptoren auf die zerebrale Inflammation

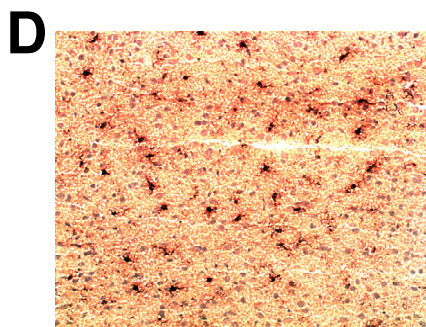
Als Marker für eine zerebrale Inflammation wurde die Aktivierung der Mikroglia mit Hilfe der Iba-1 Färbung untersucht. Die Anzahl der Iba-1 positiven Zellen unterschied sich nicht zwischen gesunden Fc γ R^{-/-} KO und WT Mäusen (KO: $94,4 \pm 53,6$; WT: $116,7 \pm 33,3$ Iba-1 pos. Zellen / mm³, Abb. 44 A). 24 Stunden nach CCI Anzahl steigt die Zahl Iba-1 positiver Zellen an. In Fc γ R^{-/-} defizienten Mäusen ist der Anstieg aber signifikant geringer (KO: $261,9 \pm 31,5$; WT: $356,7 \pm 80,5$ Iba-1 pos. Zellen / mm³, Abb. 44 A).



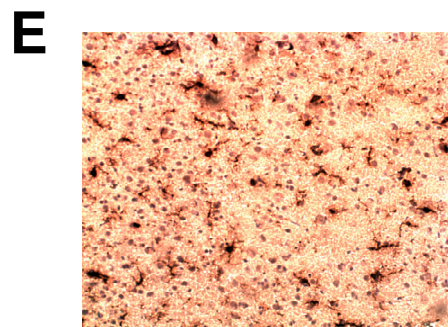
2,5 fache Vergrößerung



40 fache Vergrößerung



20 fache Vergrößerung/ WT



20 fache Vergrößerung/ KO

Abb. 44: Anzahl der Iba-1 positiven Mikroglia 24 h nach CCI. (die Daten sind angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung). (A). Photographische Darstellung der Iba-1 Immunhistochemischen Färbung (B-E) im perikontusionalen Gewebe 24 h nach CCI bei einer 2,5x und 40x fachen Vergrößerung. Dots representieren die Iba-1 immunreaktiven Zellen. Repräsentatives Beispiel einer WT (D) und KO (E) Maus bei 20x Vergrößerung.

Der Einfluss von CRP Rezeptoren auf die zerebrale Inflammation wurde zusätzlich auf RNA Ebene durch Quantifikation inflammatorischer Markergene bestimmt. Die mRNA Expression der inflammatorischen Markergene TNF α , IL1 β , und IL6 war bei den WT Tieren höher als bei den KO Tieren. Jedoch war der Anstieg nur bei TNF α signifikant (TNF α : WT: 3121,1 \pm 616,9; KO: 2082,3 \pm 724,6; IL1 β : WT: 2717,8 \pm 2179,5; KO: 1948,1 \pm 689,2; IL6: WT: 5524,6 \pm 2692,35; KO: 329,0 \pm 1266,1; Abb. 45). Die mRNA Expression ist prozentual zu nativ angegeben.

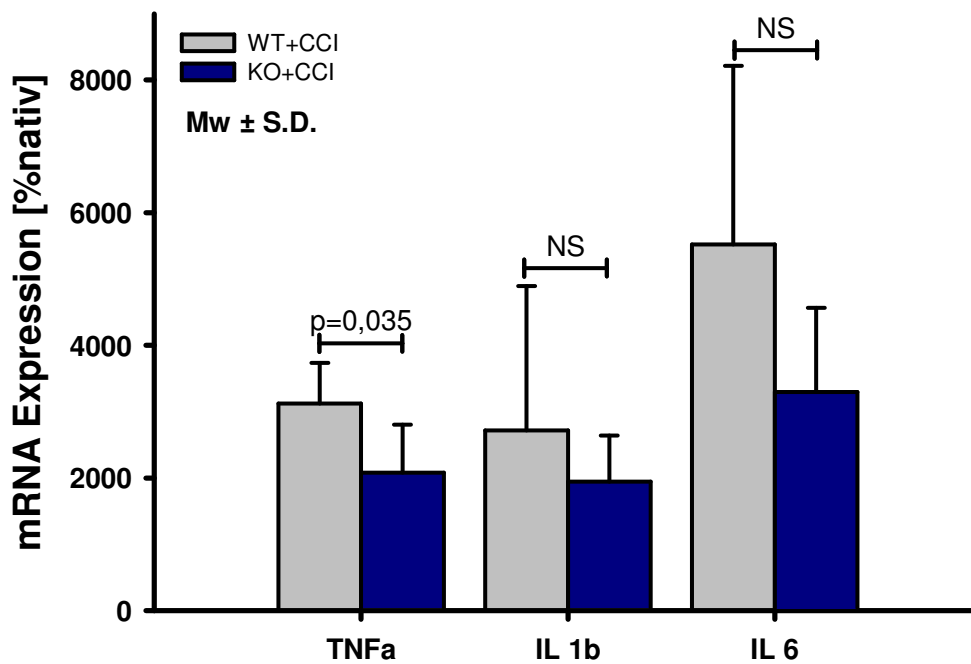


Abb. 45: mRNA Expression der Zytokine TNF α , IL1 β , and IL6 prozentual versus nativ.

4. Rolle der MLCK bei der Entstehung des Hirnödems nach SAB

Es konnte gezeigt werden, dass der endotheliale Stützapparat eine entscheidende Rolle bei der Entstehung eines Hirnödems nach SHT spielt. In der vorliegenden Studie wurde überprüft, welchen Einfluss die MLCK Inhibition auf das Hirnödem nach SAB hat. Weiterhin wurde der Effekt auf den histopathologischen und neurologischen Schaden untersucht.

4.1. Physiologische Parameter

24 Stunden nach SAB lagen die physiologischen Parameter (pH, arterieller Blut Glucose Level, Hämoglobin, Hämatokrit und Elektrolyte, Tabelle 5) im Normbereich und unterschieden sich nicht zwischen den behandelten Gruppen. Die Körpertemperatur und der systolische Blutdruck während des Auslösens der SAB unterschieden sich nicht innerhalb der Gruppen (Tabelle 5) und waren über den 7 Tage Beobachtungszeitraum stabil (Tabelle 6).

ML-7 hat keinen Einfluss auf physiologischen Parameter pH, arteriellen Blut Glucose Spiegel, Hämoglobin, Hämatokrit, Elektrolyte, systolische Blutdruck und Körpertemperatur bei nicht operierten Tieren (Tabelle 5).

Tabelle 5. Physiologische Parameter

	Vehikel	ML-7	Vehikel nativ	ML-7 nativ
pH Wert	7,3 ± 0,1	7,4 ± 0,1	7,3 ± 0,1	7,3 ± 0,1
Hb [mg/dl]	13,2 ± 1,0	13,0 ± 0,8	12,7 ± 0,8	12,8 ± 0,6
HCT [%]	40,0 ± 3,1	40,0 ± 2,4	39,1 ± 2,4	39,4 ± 1,8
Na ⁺ [mmol/l]	133 ± 13	140 ± 11,0	131 ± 12	132 ± 18
Blutglukose Level [mg/dl]	404 ± 127	392 ± 35	273 ± 53,0	290 ± 18,2
Syst. BP [mmHg] vor SAB	139 ± 26	133 ± 29		
Syst. BP [mmHg] nach SAB	134 ± 29	128 ± 27		
Rekt. Temp. [°C] bei SAB	36,6 ± 0,8	37,0 ± 0,8		

Syst. BP = nicht invasiv gemessener systolischer Blutdruck; Rekt. Temp = rektale Körpertemperatur

Tabelle 6. Systolischer Blutdruck über 7 Tage

	Vehikel	ML-7	Vehikel nativ	ML-7 nativ
Syst. BP [mmHg] vor SAB	144 ± 23	151 ± 24	140 ± 13	158 ± 18
Syst. BP [mmHg] 6h nach SAB	146 ± 23	135 ± 24	128 ± 20	150 ± 13
Syst. BP [mmHg] 24h nach SAB	147 ± 36	134 ± 31	146 ± 16	148 ± 18
Syst. BP [mmHg] 48h nach SAB	157 ± 23	155 ± 38	154 ± 23	138 ± 16
Syst. BP [mmHg] 3d nach SAB	155 ± 23	146 ± 14	152 ± 16	146 ± 34
Syst. BP [mmHg] 5d nach SAB	140 ± 28	147 ± 28	141 ± 18	164 ± 22
Syst. BP [mmHg] 7d nach SAB	158 ± 10	146 ± 27	148 ± 13	152 ± 10

Syst. BP = Nicht-invasiv gemessener systolischer Blutdruck

4.1.1. Lokaler zerebraler Blutfluss

Nach Induktion der SAB fiel in allen Gruppen der ipsilaterale lokale CBF auf ~10-20 % des Ausgangsniveaus. Danach kam es innerhalb der nächsten 15 min zu einer Erholung der Hirndurchblutung auf Werte um ~90 %. Die CBF Werte während der Operation unterschieden sich nicht zwischen der ML-7 und der Vehikel Gruppe (Abb. 46).

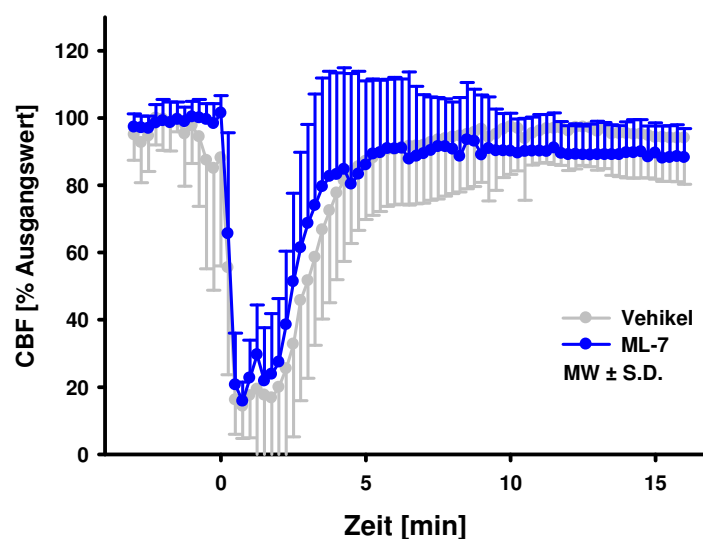


Abb. 46: Intraoperativer Zeitverlauf des zerebralen Blutflusses

4.1.2. Intrakranieller Druck

Der ICP stieg nach Induktion der SAB sofort in allen Gruppen auf Werte um ~85 mmHg an, erholte sich aber innerhalb von 15 min auf ~25 mmHg (Abb. 47 A). Der ICP unterschied sich während der Operation nicht zwischen der ML-7 - und der Vehikel Gruppe. In der ML-7 Gruppe hatten die Mäuse 24 Stunden nach SAB einen signifikant geringeren ICP im Vergleich zur Vehikel Gruppe (SAB + Vehikel: $12,0 \pm 3,6$; SAB + ML-7: $5,7 \pm 2,3$, Abb. 47 B).

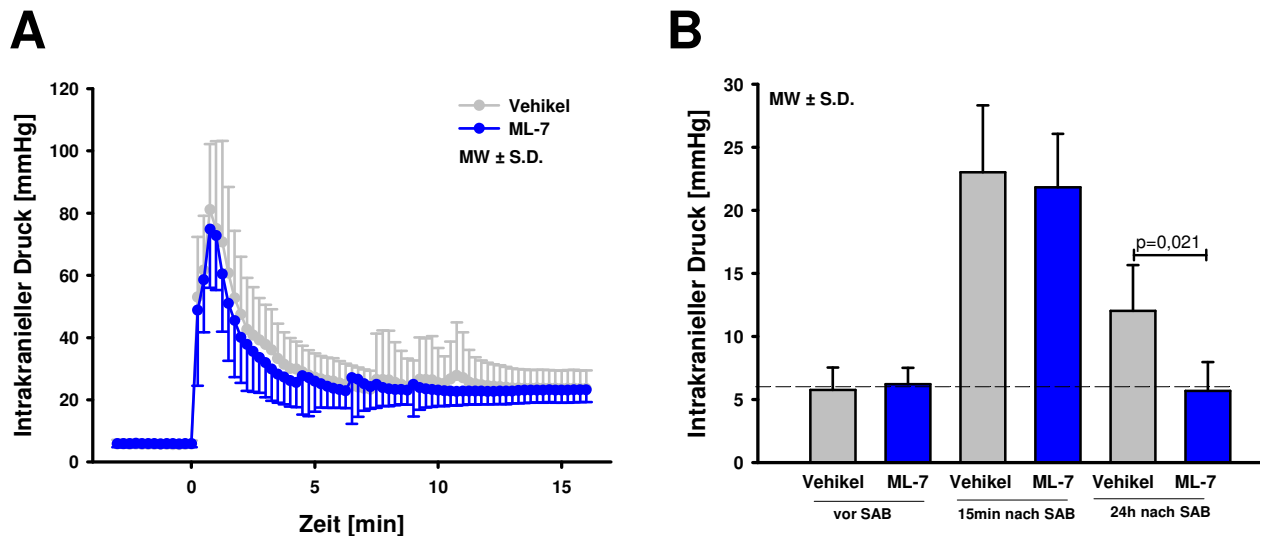


Abb. 47: Intraoperativer Zeitverlauf des ICP (A) und direkter Vergleich der ML-7 und Vehikel Gruppe zu den Zeitpunkten vor SAB, 15 Minuten und 24 Stunden nach SAB (B).

4.2. Effekt der MLCK Inhibition

Um den Einfluss des kontraktiven Apparates bei einer SAB zu untersuchen wurden verschiedene Endpunkte untersucht und die MLCK mit dem spezifischen Inhibitor ML-7 gehemmt.

4.2.1. Effekt der MLCK Inhibition auf den HWG, LWG und die neurologische Funktion

Um den Einfluss der Phosphorylierung der MLC bei der Entstehung eines Hirnödems bzw. Lungenödems nach SAB zu untersuchen, wurde die MLCK selektiv mit ML-7 inhibiert. Der Hirnwasser- bzw. Lungenwasser wurde 24 Stunden nach SAB oder in nativen Tieren bestimmt. Die neurologische Funktion wurde vor SAB und 24 Stunden nach SAB mit einem 31-Punkte Score bewertet.

4.2.1.1. Gesamter HWG

Eine Subarachnoidal-Blutung führt zu einem Anstieg des bihemisphärischen Hirnwassergehaltes gegenüber nativen Tieren (nativ + Vehikel: $78,86 \pm 0,27$ %; nativ + ML-7: $79,02 \pm 0,27$ %; Abb. 48 A) innerhalb von 24 Stunden nach Insult (SAB + Vehikel: $80,91 \pm 0,52$ %; Abb. 48 A). Die Inhibition der MLCK reduzierte signifikant den Hirnwassergehalt (SAB + ML-7: $80,12 \pm 0,65$ %; Abb. 48 A).

4.2.1.2. Hemisphärischer HWG

Der Hirnwassergehalt der einzelnen Hemisphären unterscheidet sich nicht bei nativen Tieren zwischen Vehikel oder ML-7 (ipsilateral: nativ + Vehikel: $78,82 \pm 0,34$ %; nativ + ML-7: $79,17 \pm 0,21$ %; Abb. 48 B; kontralateral: nativ + Vehikel: $79,04 \pm 0,18$ %; nativ + ML-7: $78,84 \pm 1,12$ %; Abb. 48 C). Durch das Auslösen einer SAB kommt es zu einem Anstieg des Hirnwassergehaltes der ipsilateralen und kontralateralen Hemisphäre. (ipsilateral: SAB + Vehikel: $80,95 \pm 0,63$ %, $p = 0,021$ vs. nativ + Vehikel, Abb. 48 B; kontralateral: SAB + Vehikel: $80,85 \pm 0,64$ %, $p = 0,021$ vs. nativ + Vehikel, Abb. 48 C). In Anwesenheit von ML-7 wurde der Anstieg des Hirnwassergehaltes der ipsilateralen Hemisphäre signifikant reduziert (SAB + ML-7: $79,86 \pm 0,56$ %, $p = 0,024$ vs. SAB + Vehikel; Abb. 48 B). Der Hirnwassergehalt der kontralateralen, rechten Hemisphäre unterscheidet sich nicht zwischen den Behandlungsgruppen (SAB + Vehikel: $80,85 \pm 0,64$ %; SAB + ML-7: $80,53 \pm 0,86$ %, Abb. 48 C).

4.2.1.3. LWG

24 Stunden nach SAB kam es zu einem Anstieg des Lungenwassergehalts, jedoch ohne Unterschied der behandelten Gruppen (nativ + Vehikel: $79,04 \pm 0,18$ %; nativ + ML-7: $78,84 \pm 1,12$ %; SAB + ML-7: $80,64 \pm 1,17$ %, SAB + Vehikel: $80,64 \pm 1,49$ %, nativ: $n = 5$ pro Gruppe, SAB: $n = 9$).

4.2.1.4. Neurologische Funktion

Die neurologische Funktion wurde am Tag vor der Operation und 24 Stunden nach SAB evaluiert (0 Punkt = gesunde Tiere und 31 Punkte = maximales Defizit). Bei allen Tieren verschlechtert sich die neurologische Funktion durch die SAB. Mit ML-7 behandelte Tiere waren 24 nach SAB neurologisch signifikant besser (SAB + Vehikel: $6,6 \pm 4,4$ Pkt; SAB + ML-7: $2,5 \pm 1,7$ Pkt, Abb. 48 D).

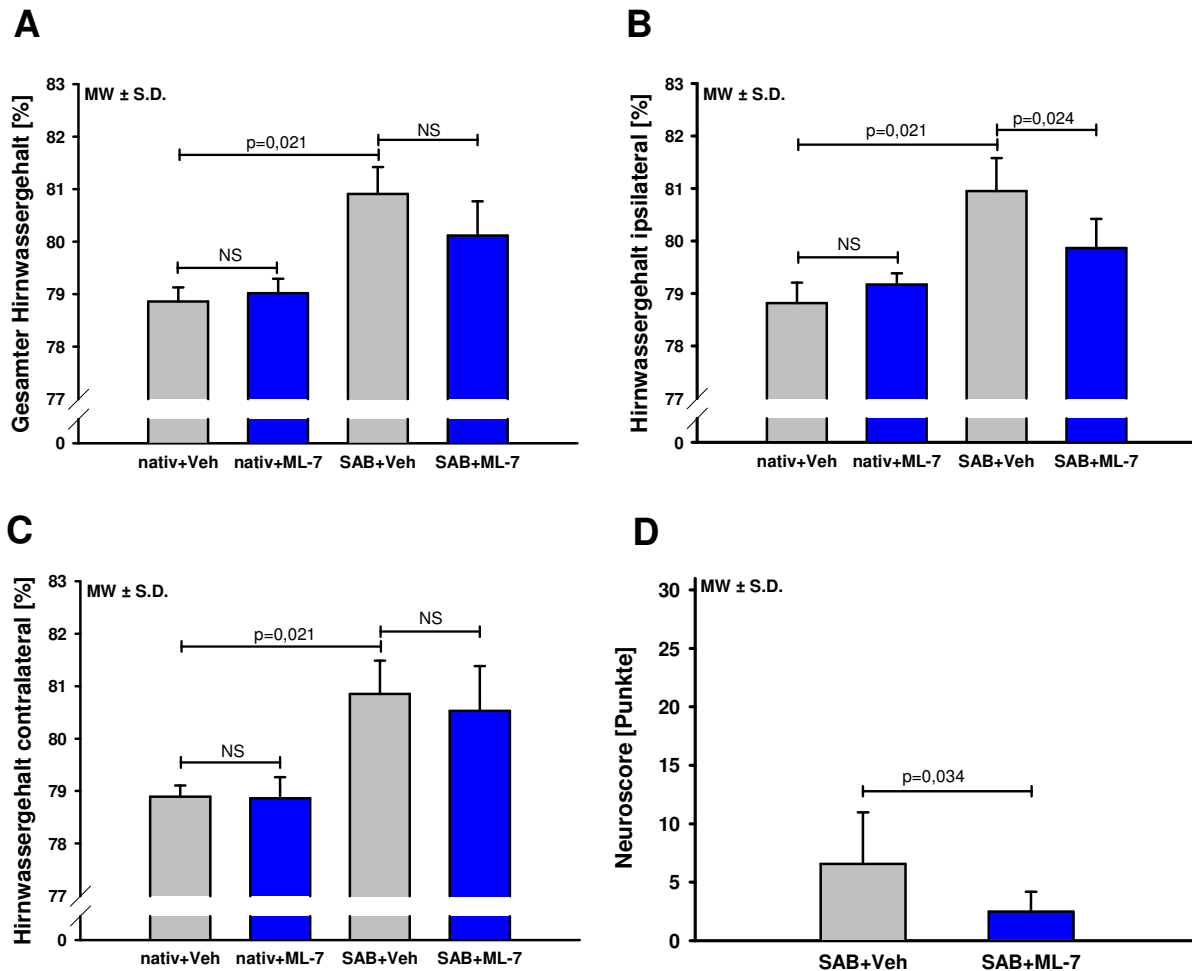


Abb. 48: Der Hirnwassergehalt (A, B, C) wurde mittels wet-dry ratio bei nativen Tieren und 24 Stunden nach SAB bestimmt. Der Hirnwassergehalt unterscheidet sich nicht in nativen Tieren zwischen der Vehikel und ML-7 Gruppe. Nach SAB kommt es zu einem Anstieg des HWG. Die Inhibition der MLCK mit ML-7 führt 24 Stunden nach SAB zu einem signifikant geringeren Anstieg des Hirnwassergehaltes der ipsilateralen Hemisphäre im Vergleich zu nicht behandelten Tieren. Die neurologische Funktion (D) wurde mit einem 31 Punkte Score bewertet. Die Tiere mit ML-7 waren neurologisch besser. (nativ: n = 5 pro Gruppe, SAB: n = 9 / Gruppe; NS = nicht signifikant, p-Werte wurden korrigiert nach Bonferroni).

4.2.2. Effekt der MLCK Inhibition auf die BHS Integrität

Um zu untersuchen, ob durch die Inhibition der MLCK die BHS stabilisiert wird und dadurch das Hirnödem reduziert wird, wurde die BHS Permeabilität mit einem Evans Blue Assay quantifiziert. In nativen Tieren unterscheidet sich die Evans Blue Extravasation der linken Hemisphäre nicht zwischen der ML-7 und der Vehikel Gruppe (nativ + Vehikel: $0,53 \pm 0,15$ OD / g; nativ + ML-7: $0,54 \pm 0,10$ OD / g). 24 Stunden nach einer SAB resultiert eine Inhibition der MLCK mit ML-7 in einer signifikant niedrigeren Menge an intrazerebralen Evans Blue im Vergleich zu den Vehikel behandelten Tieren (SAB + Vehikel: $0,67 \pm 0,15$ OD / g; CCI + ML-7: $0,48 \pm 0,13$ OD / g, $p = 0,048$;

Abb. 49).

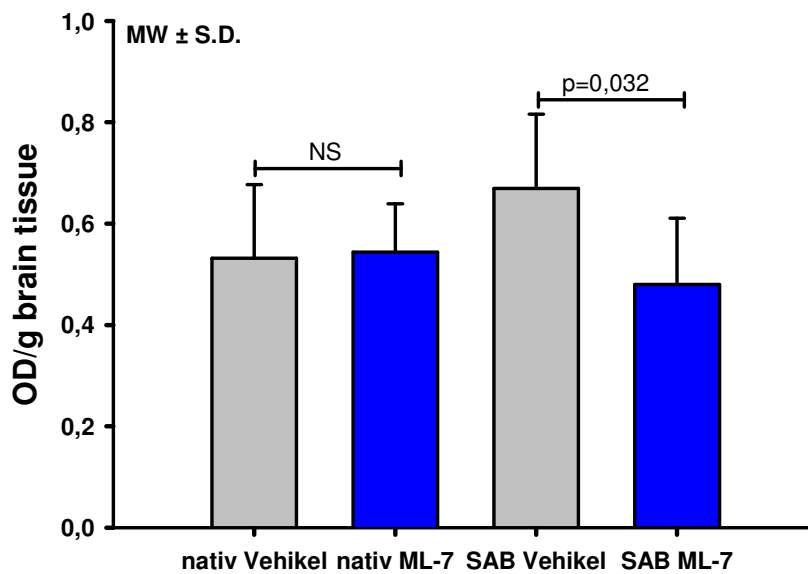


Abb. 49: Der Einfluss der MLCK Inhibition auf die BHS Integrität mittels Evans Blue Extravasation 24 Stunden nach SAB. Die Inhibition von MLCK führt zu einer geringeren Konzentration von intrazerebralem Evans Blue im Vergleich zu Vehikel behandelten Tieren. Dieses deutet auf eine Stabilisierung der BHS durch ML-7 hin.

4.2.3. Effekt der MLCK Inhibition auf die neurologische Funktion und Mortalität

Die neurologische Funktion wurde am Tag vor der Operation und am Tag 1, 2, 3, 5 und 7 nach SAB evaluiert (0 Punkt = gesunde Tiere und 31 Punkte = maximales Defizit). Bei allen Tieren verschlechtert sich die neurologische Funktion durch die SAB. Die Tiere erholten sich aber innerhalb von 72 Stunden. Durch die Gabe von ML-7 waren die Tiere 24 und 48 Stunden nach der SAB signifikant neurologisch besser (Abb. 50 A).

Das Körpergewicht der Mäuse ist ein allgemeiner Parameter für das Wohlbefinden der Tiere. Es wurde täglich gemessen und mit den Daten vor der Operation verglichen. Unabhängig von der Behandlungsgruppe verlieren die Tiere um die 13 % des ursprünglichen Körpergewichtes innerhalb der ersten 24 Stunden nach SAB, welches bis zum dritten Tag erniedrigt bleibt. Im Durchschnitt verlieren die Mäuse um die 19 % ihres Körpergewichtes am dritten Tag (Abb. 50 B). Sieben Tage nach SAB sind die Körpergewichtsmaße vergleichbar mit denen vor der Operation. Es gibt keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

In der Vehikel Gruppe verstarben im Beobachtungszeitraum von 7 Tagen 27 % (3 von 11 Mäusen) der Mäuse, was einer klinisch relevanten Mortalität entspricht. Durch die Gabe von ML-7 verringert sich die Mortalität auf 9 % (1 von 11 Mäusen).

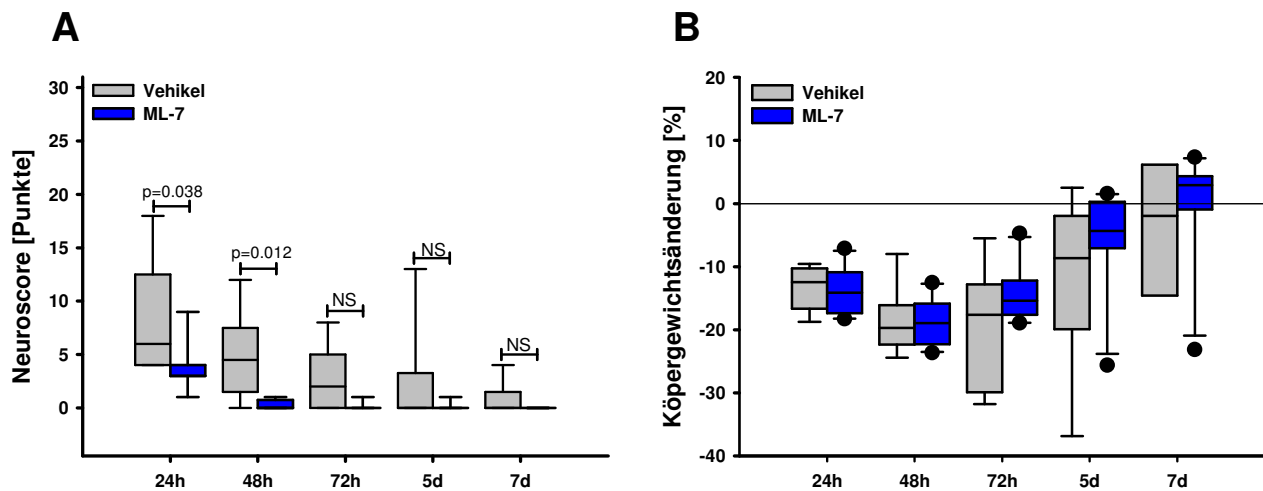


Abb. 50: Die neurologische Funktion, die mit einem 31-Punkte-Score (A) und durch das Messen der Körpergewichtsänderung (B) vor SAB und am Tag 1, 2, 3, 5 und 7 nach SAB bewertet.

4.2.4. Effekt der MLCK Inhibition auf die Histologie

Um eine mögliche Auswirkungen der Reduktion des Hirnödems nach SAB auf den morphologischen Hirnschaden zu untersuchen, wurde die Neuronendichte und Morphologie 7 Tage nach SAB untersucht. In Nissl-gefärbte Hirnschnitten wurde die CA1-3 Region des Hippocampus mikroskopisch ausgewertet.

Sieben Tage nach SAB konnte bei der mikroskopischen Auswertung der Nissl-gefärbten Schnitte jedoch keine Änderung der Neuronendichte von CA1–3 im Vergleich zu nativen Tieren nachgewiesen werden. Abb. 51 zeigt repräsentative Schnittbilder der untersuchten Region. (B, D) ist ein Schnittbild des Hippokampus einer Vehikel behandelten Maus nach SAB, die als einzige einen Neuronenschaden aufweist.

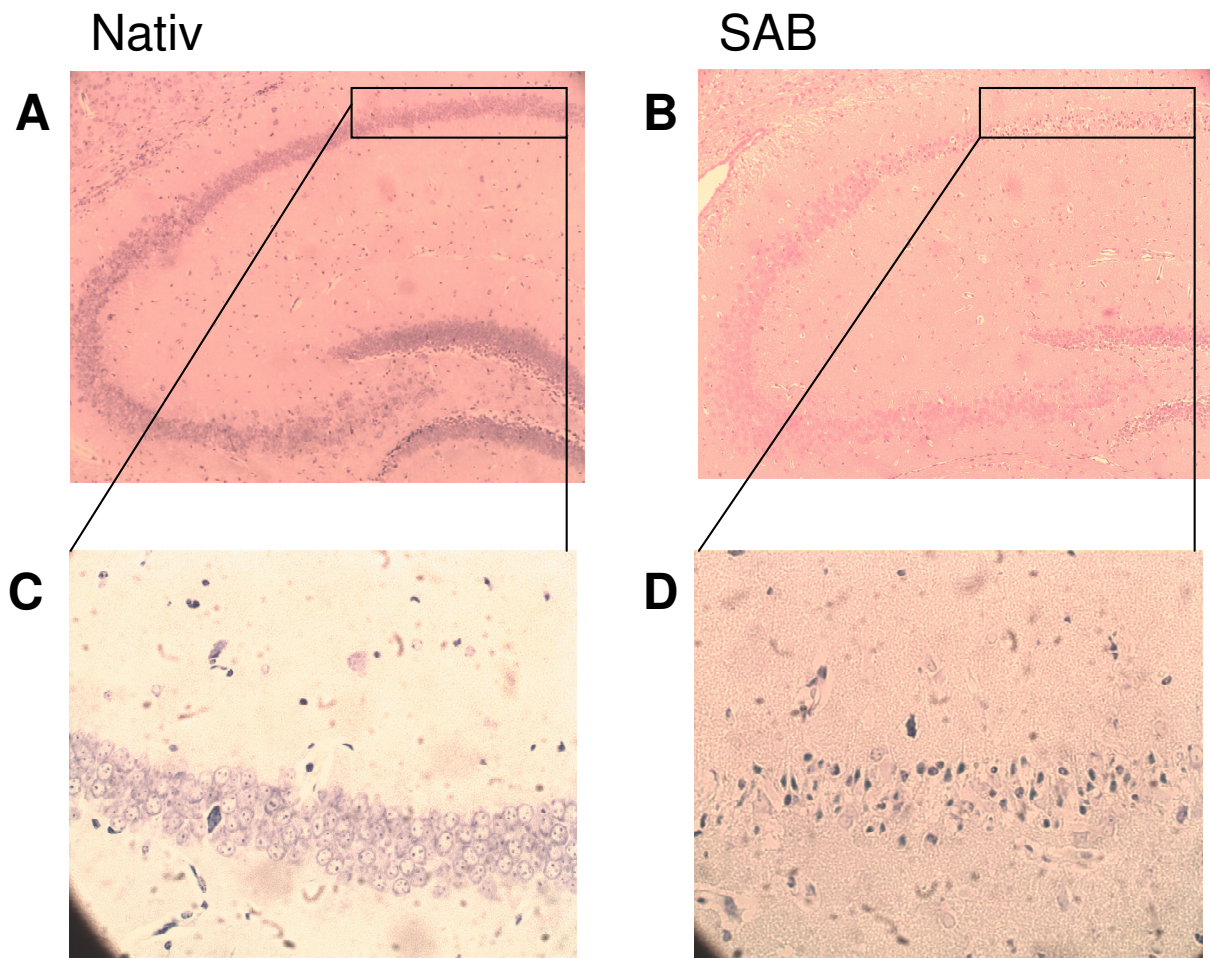


Abb. 51: Repräsentative NISSL gefärbte Beispielschnitte des Hippokampus (A, B) bei einer 10 fachen Vergrößerung und der CA1 Region (C, D) bei einer 40 fachen Vergrößerung von nativen Tieren (A, C) und nach SAB (B, D).

E. Diskussion

In der vorliegenden Studie wurde untersucht, ob die Aktivierung des kontraktiven Apparates ein zentraler Mechanismus bei der Entstehung des Hirnödems nach experimentellen SHT darstellt. Um den Stellenwert dieses Mechanismus bei der Entstehung des vasogenen Hirnödems zu untersuchen, wurde der HWG, die BHS Integrität, der ICP, die neurologische Funktion und der histologische Schaden nach spezifischer MLCK Inhibition bestimmt. Es wurde untersucht, ob die MLCK hochreguliert wird und ob die Inhibition durch den spezifischen Inhibitor ML-7 eine Reduktion der pMLC bewirkt. Des Weiteren wurde untersucht, welche Rolle die Aktivierung der MLCK nach experimenteller SAB hat. Dafür wurde der HWG, die BHS Integrität, der ICP, die neurologische Funktion und der histologische Schaden nach SAB untersucht. In einem weiteren Teilprojekt dieser Arbeit wurde überprüft, ob CRP, welches in-vitro die BHS öffnet, durch Aktivierung der MLCK eine verstärkte Phosphorylierung der MLC induziert und somit dieser Mechanismus für das darauf entstehende Hirnödem verantwortlich sein könnte. Im Folgenden werden die Ergebnisse näher diskutiert.

1. Einfluss von Anästhetika auf das Ausmaß eines Hirnödems

In der Vorstudie konnte gezeigt werden, dass bereits die Hintergrundanästhesie die Entstehung des Hirnödems beeinflussen kann. Die Hauptergebnisse der Studie sind:

- 1) 24 Stunden nach Schädelhirntrauma kommt es zu einem signifikanten Anstieg des Hirnwassergehaltes.
- 2.) Mit Isofluran als Hintergrundanästhesie ist der Hirnödemanstieg am größten.

1.1. Modell des tierexperimentellen Schädelhirntraumas

Das SHT ist die häufigste Todesursache und die häufigste Ursache einer Morbidität weltweit und betrifft mehr als 10 Millionen Menschen jährlich (Crawford et al. 1996). Zum besseren Verständnis des Schädelhirntraumas und zur Erforschung von pathophysiologischen Mechanismen, die an der Entstehung des zerebralen Sekundärschadens beteiligt sind, wurden verschiedene tierexperimentelle Traumamodelle entwickelt. Um eine fokale Hirnverletzung zu simulieren, werden hauptsächlich vier verschiedene Modelle verwendet:

1. Modell der kortikalen Kälteläsion
2. Fluid Percussion-Modell
3. Weight Drop-Modell
4. Controlled Cortical Impact Modell

Das SHT ist ein komplexes Krankheitsbild, das bei tierexperimentellen Untersuchungen zu berücksichtigen ist. Wichtige Teilaspekte des SHT sind die fokale Kontusion, das Hirnödem, die intrakranielle Blutung, Ischämie und der mechanische Nervenfaserschaden (diffuser Axonschaden). Bei Patienten liegen diese Teilaspekte kombiniert in jeweils unterschiedlicher Ausprägung vor. Zum Verständnis des SHT anhand tierexperimenteller Untersuchungen ist es wichtig, zum einen eine möglichst vollständige Nachahmung des komplexen Krankheitsbildes zu gewährleisten und zum anderen, einzelne Teilaspekte getrennt voneinander zu untersuchen. Die Teilaspekte sind therapeutisch unterschiedlich zugänglich und können tierexperimentell in verschiedenen Modellen imitiert werden. Es ist kein Modell verfügbar, das alle Aspekte des SHT vollständig imitiert.

1.1.1. Modell der kortikalen Kälteläsion

Das Modell der kortikalen Kälteläsion ist das älteste Modell einer experimentellen Hirnläsion (Klatzo *et al.* 1958). Hierbei wird auf die Hirnoberfläche ein Kältestempel gesetzt, wobei eine kortikale Kältenekrose entsteht. Das Endothel wird dabei geschädigt, was zu einer gestörten Blut-Hirn-Schranke führt und somit zur Entstehung eines vasogenen Hirnödems. Die Methode ist einfach in der Durchführung und gut reproduzierbar, ist allerdings aufgrund der fehlenden mechanischen Einwirkung auf das menschliche SHT schlecht übertragbar.

1.1.2. Fluid Percussion-Modell

Beim Fluid Percussion-Modell fällt ein Pendel mit definiertem Gewicht aus einer definierten Höhe auf ein mit Flüssigkeit gefüllten Zylinder (Lindgren & Rinder 1965, McIntosh *et al.* 1987, Dixon *et al.* 1987). Es entsteht ein Flüssigkeitsimpuls, der bei geschlossenem oder offenem Schädel auf die Kortexoberfläche übertragen wird. Der Impuls bewirkt einen intrakraniellen Druckanstieg und eine Deformation des Hirngewebes. Neben kleineren subarachnoidalen und intraparenchymalen Einblutungen entstehen vorwiegend axonale und vaskuläre Schäden im Hirnstamm, die zu

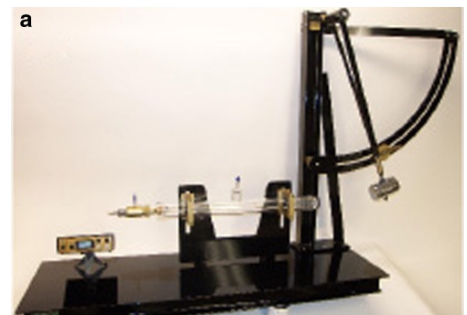


Abb. 52: Fluid Percussion-Modell (Potts *et al.* 2009)

einer erhöhten Mortalität der Tiere führt. Einer der wichtigsten Teilaspekte, die ein tierexperimentelles SHT Modell erfüllen sollte die fokale Kontusion, ist in diesem Modell nur sehr gering ausgeprägt, so dass man eine therapeutische Intervention nur schlecht testen kann.

1.1.3. Weight Drop-Modell

Um eine Schädelfraktur zu vermeiden fällt beim Weight Drop-Modell ein Pendel mit definierter Geschwindigkeit auf den geschlossenen Schädel, der mit einer Metallplatte bedeckt ist (Marmarou *et al.* 1994, Foda & Marmarou 1994). Der Kopf der Tiere ist dabei auf einem Schaumstoffkissen gelagert, dadurch erzeugt man mit diesem Modell vor allem Akzelerations- und Dezelerationsbewegungen des Gehirns innerhalb des knöchernen Schädels, das einer stumpfen, diffusen Hirnschädigung entspricht.

1.1.4. Controlled Cortical Impact Modell

Eines der meist genutzten Modelle ist das Controlled cortical impact (CCI, (Dixon *et al.* 1991) (Lighthall 1988)), bei dem ein Stempel mit einer bestimmten Geschwindigkeit, Tiefe und Verweildauer das Gehirn penetriert. Das CCI mit einem pneumatisch gesteuerten Stempel wurde erstmals 1995 von Smith auf Mäuse adaptiert (Smith *et al.* 1995). Das CCI imitiert die Folgen einer mechanischen Schädigung des Zerebrums. Diese zerebrale Läsion löst eine pathophysiologische Kaskade, analog zum menschlichen Gehirn aus, die eine Expansion des geschädigten Gewebes in das umgebende, gesunde Parenchym verursacht. Das im CCI Modell entstehende Kontusionsareal lässt sich histologisch anhand neuronaler Zellschädigungen und Zelluntergänge vom übrigen Gewebe gut abgrenzen. Die Entstehung eines Hirnödems kann man durch einen Anstieg des Wassergehalts, sowie der posttraumatischen hemisphärischen Schwellung nachweisen. Auch eine Blut-Hirn-Schrankenstörung konnte durch Extravasation von Evans Blue im CCI Modell gezeigt werden. Das Modell hat eine sehr gute Reproduzierbarkeit des geschädigten Gewebes und des Hirnwassergehaltes (Kochanek *et al.* 1995).

Ziel der vorliegenden Arbeit waren Untersuchungen verschiedener Pathomechanismen der Entstehung des zerebralen Hirnödems und des histologischen Schadens. Das CCI Modell wurde in dieser Arbeit verwendet, da es den Anforderungen, die wir an das tierexperimentellen SHT Modell stellen, entsprach:

1. Das Modell erzeugt eine fokale Rindenkontusion und ein zerebrales Hirnödem, deren Ausmaß sich sicher quantifizieren lässt. Dadurch lässt sich der Einfluss einer pharmakologischen Intervention auf den Schadenswachstum nachweisen.

2. Das Modell ist reproduzierbar und schafft für alle Versuchstiere gleiche Ausgangsbedingungen.
3. Das Modell deckt viele Einzelkomponenten des SHT ab.

1.2. Entstehung des Hirnödems nach experimentellem Schädelhirntrauma

Durch den primären Insult werden verschiedene pathophysiologische Kaskaden komplexer Prozesse in den Gang gesetzt, wie die Freisetzung von exzitatorischer Aminosäuren (Faden *et al.* 1989), freie Radikalbildung (Ikeda & Long 1990), Lipid Peroxidation (Siesjo 1981) und zerebrale Inflammation (Abbott 2000a). Diese sekundären Mechanismen führen zu einer verstärkten vaskulären Permeabilität und zu Entstehung des Hirnödems mit zytotoxischer und vasogener Komponente. Das Hirnödem wird als eines der zentralen pathophysiologischen Mechanismen angesehen, die zur sekundären Schadensexpansion führt, indem es den intrakraniellen Druck erhöht und die zerebrale Durchblutung vermindert. Die zeitliche Dynamik der Entstehung eines Hirnödems nach CCI zeigte, dass es bereits nach zwei Stunden zu einem Anstieg des Hirnwassergehaltes kommt, der ein Maximum 24 Stunden nach Insult erreicht (Baskaya *et al.* 1997, Soares *et al.* 1992). Nach 5 Tagen geht der Hirnwassergehalt wieder auf Ausgangswerte zurück (Bareyre *et al.* 1997). Der Anstieg des Hirnwassergehaltes findet primär auf der ipsilateralen traumatisierten Hemisphäre statt. Der Hirnwassergehalt auf der kontralateralen Seite scheint nur leicht verändert zu sein (Bareyre *et al.* 1997, Soares *et al.* 1992). Mit zunehmender Traumastärke kann es aber auch zu einem Anstieg des Hirnwassergehaltes auf der kontralateralen Hemisphäre kommen (Okiyama *et al.* 1992, Petty *et al.* 1996).

Die Entstehung des vasogenen Hirnödems resultiert aus einer gesteigerten Permeabilität der BHS. Es konnte gezeigt werden, dass für 4 - 6 Stunden und nochmals 3 Tage nach Trauma zu einem biphasischen Öffnen der BHS kommt. Der Zusammenbruch der BHS unmittelbar nach Trauma wird den direkten Folgen, wie Verletzung der zerebralen Gefäße durch die Kontusion, zugeschrieben. Das Versagen der BHS führt zu einer erhöhten vaskulären Permeabilität. Folge ist eine erhöhte Durchlässigkeit für Wasser und Makromolekülen in das Hirnparenchym (Klatzo 1987). Somit gelangt eine proteinreiche Flüssigkeit mit Plasmabestandteilen in das zerebrale Parenchym, das unter physiologischen Bedingungen nicht durch die BHS penetriert wäre. So kommt es neben der Hirnschädigung, die durch die Raumforderung hervorgerufen wird, zu weiteren Schäden.

1.3. Narkose

In der Studie wurden zwei volatile und eine intraperitoneale Anästhetika verglichen. Isofluran und Sevofluran ersetzen mittlerweile Halothan im Labor und wurden deswegen als Beispiel für die volatile Anästhetika gewählt. Die intraperitoneale Injektion ist ein etabliertes Narkoseprotokoll für Kleintiere in der tiermedizinischen Praxis und wurde als eine Alternative für volatile Anästhetika eingeführt.

1.3.1. Volatile Anästhetika

Isofluran und Sevofluran haben beide die Eigenschaft einer schnellen An- und Abflutungs geschwindigkeit und damit eine leichtere Steuerbarkeit der Narkosetiefe. Allerdings zeigen beide Anästhetika neuroprotektive Eigenschaften (Werner *et al.* 1995, Engelhard *et al.* 1999). Für den protektiven Effekt wird unter anderem eine Hochregulation der eNOS mit einer damit verbundener erhöhten zerebralen Perfusion, eine gesteigerte Aktivität von ATP-regulierenden Kalium Kanälen in Mitochondrien, eine Reduktion von exzitotoxischem und metabolischem Stress und schließlich ein verminderten apoptotischen Zelltod verantwortlich gemacht.

1.3.2. Die intraperitoneale Injektion

Die intraperitoneale Injektion ist ein etabliertes Narkoseprotokoll für Kleintiere in der tiermedizinischen Praxis. Die i.p. Injektion weist den Vorteil auf, dass es im Gegensatz zu inhalativen Anästhetika praktisch nie zu einer Bronchosekretion und Vagotonie kommt. Ein weiterer Vorteil ist, dass die i.p. Narkose den physiologischen ICP (Zweckberger *et al.* 2003) und den zerebralen Blutfluss (Zornow *et al.* 1992) im geringeren Maße beeinflusst als volatile Anästhetika. Das Konzept der i.p. Narkose ist, dass verschiedene Anästhetika in sinnvoller Weise so kombiniert werden, dass erwünschte Wechselwirkungen maximal ausgenutzt werden und damit potenzierend die therapeutische Breite der Narkose vergrößert wird. Durch die Kombination lassen sich die Einzeldosierung und somit unerwünschte Nebenwirkungen reduzieren.

Die i.p. Kombination besteht aus drei Komponenten, Medetomidin, Fentanyl und Midazolam. Medetomidin, einem spezifischer α_2 -Adrenozeptoragonist, wirkt sedativ, analgetisch und muskelrelaxierend. Die zentrale Dämpfung wird durch eine verminderte Freisetzung von Noradrenalin im ZNS hervorgerufen. Um eine ausreichende schmerzlindernde Wirkung für die Operation zu erzielen wurde Fentanyl als stark wirksamer μ -Opioid-Rezeptor Agonist hinzugefügt. Als dritte Komponente diente Midazolam, ein Benzodiazepin mit anxiolytischen, leicht relaxierender und krampfhemmender Wirkung. Midazolam verstärkt die hemmende Wirkung GABAerger Neuronen.

Durch die Kombination erhält man eine für chirurgische Eingriffe ausreichend tiefe Narkose. Allerdings erzeugt diese einen langen Nachschlaf, der zur Hypothermie führen und somit eine Kreislaufdepression entstehen kann. Die spezifische Antagonisation des Anästhesieregimens verhindert solche Komplikationen und ermöglicht eine schnelle Erholung der Tiere. Die Tiere kehren schnell zu ihrem normalen Bewegungsabläufen und Ess- und Trinkverhalten zurück, welches das Risiko einer Hypothermie und Flüssigkeitsverlust reduziert (Madara et al. 1986). Die Antagonisierung von Medetomidin erfolgt mit den spezifischen α_2 -Blocker Atipamezol (Virtanen *et al.* 1989). Die Wirkung des Benzodiazepins Midazolam wurde mit dem Rezeptor Antagonist Flumazenil und die Wirkung von Fentanyl mit dem μ -Opioid-Rezeptor Antagonist Naloxon inhibiert.

1.4. Einfluss verschiedener Narkoseformen auf das Hirnödem

In dieser Studie wurde die Entstehung des Hirnödems quantifiziert, indem der Hirnwassergehalt der Hemisphären gemessen wurde. In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass in allen Gruppen der Hirnwassergehalt 24 Stunden nach CCI ansteigt. In Abhängigkeit vom gewählten Hintergrundanästhetikum steigt der Hirnwassergehalt unterschiedlich an. In dieser Studie war der Anstieg des Hirnwassergehaltes am größten mit Isofluran als Hintergrundanästhesie und mit Sevofluran am geringsten. Neben dem von Anästhetika in der Literatur beschriebenen neuroprotektiven Effekten (Werner et al. 1995, Engelhard et al. 1999), haben Anästhetika auch einen Einfluss auf der zerebralen Wassergehalt nach bestimmten Hirnverletzungen (Stover *et al.* 2004), aber auch in gesunden Tieren (Schettini & Furniss 1979). Von denen in dieser Studie verwendeten Anästhetika ist Isofluran am besten untersucht. Tierstudien zeigten, dass Isofluran die BHS (Tetrault *et al.* 2008) öffnet und das Isofluran den Plasma Glutamat Spiegel und den Hirnwassergehalt von traumatisierten Katzen erhöht (Stover et al. 2004). In einer anderen Studie weist Isofluran ein höheres Hirnödem im Vergleich zu Pentobarbital auf (Ritz *et al.* 2006). Bereits eine sehr kurze Einwirkung von Isofluran erhöht im pyriformen Kortex im gesunden Tier den Wassergehalt (Mills *et al.* 1997).

In der vorliegenden Studie wurde kein Unterschied des Hirnwassergehaltes in scheinoperierten Tieren gezeigt. Der Hirnödem vergrößernde Effekt von den Anästhetika, vor allem von Isofluran, hängt von der Konzentration, dem Zeitpunkt und der Länge der Applikation ab, aber auch von der Traumastärke. Eine 4-stündige Isofluran Einwirkung auf traumatisierte Ratten führte zu einem bihemisphärischen Anstieg des Hirnwassergehaltes (Stover et al. 2004). In experimentellen Untersuchungen über die Narkoseführung für Operationen, konnte nur ein ipsilateraler Anstieg des Hirnwassergehaltes verzeichnet werden (Soares et al. 1992, Bareyre et al. 1997)

Auch in anderen Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass volatile Anästhetika die Entstehung eines Ödems beeinflussen. Eine kürzlich veröffentlichte Studie zeigte, dass die Entstehung eines Lun-

genödems in einem Lungenschädigungsmodell unter Isofluran erhöht war, aber nicht unter Sevofluran Narkose (Kandatsu *et al.* 2005). Auch nach Sepsis führt Isofluran zu einer verstärkten Leukozyten Aktivierung, was die Entstehung des Lungenödems verstärken kann (Soehnlein *et al.* 2010). Behandelt man Mäuse für 30 Minuten nach einer 90 minütigen Ischämie mit Sevofluran ist der Hirnwassergehalt reduziert im Vergleich zur Kontrollgruppe (Wang *et al.* 2010). Die aktuellen Daten der Literatur deuten daraufhin, dass unabhängig vom Modell, Isofluran das Ödem, sowohl Lungenödem, wie auch Hirnödem, vergrößert.

In dieser Arbeit resultiert das Hintergrundanästhetikum Isofluran im größten Hirnwassergehaltanstieg gefolgt von dem i.p. Anästhesie. Für die folgenden Studien haben wir uns für das i.p. Schema entschieden, da dieses in einem hohen Hirnwassergehalt resultiert und keine neuroprotektiven Eigenschaften hat.

2. Die Rolle der MLCK bei der Entstehung des Hirnödems nach SHT

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss des kontraktilen Apparates auf die BHS Störung nach SHT untersucht. Die Hauptergebnisse sind:

- 1.) Die Myosin-leichte-Kette-Kinase (MLCK) wird durch das induzierte Schädelhirntrauma hochreguliert.
- 2.) Eine pharmakologische MLCK Inhibition stabilisiert die BHS, senkt den ICP und das Hirnödem nach experimentellen SHT.
- 3.) Die MLCK Inhibition führte nicht zu einer Verbesserung des Hirnschadens, der neurologischen Funktion oder der zerebralen Inflammation 24 Stunden nach SHT.

2.1. Rolle der endothelialen MLCK nach zerebralen Insulten

Die Endothelzellen bilden zusammen mit den Perizyten und den Astrozyten einen dynamisch regulierten Zellverband - die Bluthirnschranke, die den parazellulären Transport von Ionen, Molekülen und Leukozyten in und aus dem Gehirn kontrolliert (Hawkins & Davis 2005). Die Endothelzellen die über TJ fest verbunden sind, sichern die strukturelle Integrität der BHS. Die intrazellulären TJ Proteine sind mit Aktin Filamenten verbunden, so dass die Integrität der BHS vom Phosphorylierungsgrad der MLC durch MLCK abhängig sein könnte. In vaskulären Endothelzellen kommt es durch eine Phosphorylierung der regulatorischen MLC durch die MLCK zur Aktin-Myosin Interaktion und somit zu einer strukturellen Änderung des Zytoskeletts. Die regulatorische MLC wurde in endothelialen Zellen von zerebralen Kapillaren (Ishmael *et al.* 2008) und in zerebralen Gefäßen von Wistar Ratten (Kuhlmann *et al.* 2007) nachgewiesen. Dies unterstützt die Hypothese, dass auch im zerebralen Gefäßsystem die MLC der Regulator der Aktomyosin basierten Kontraktion ist.

Nach einer traumatischen Hirnverletzung kommt es zu einer signifikanten Hochregulation der MLCK mRNA Expression mit einem Peak 12 Stunden nach der Verletzung. Dementsprechend steigt der Protein Gehalt von pMLC. Die Daten stimmen mit kürzlich veröffentlichten in-vitro Studien überein, die eine Beteiligung des endothelialen kontraktiven Apparats am BHS Versagen zeigen konnten. Eine Aktivierung der MLCK führte sowohl nach einem hypoxischen Insult (Kuhlmann et al. 2007), als durch Alkohol induzierten oxidativen Stress (Haorah et al. 2005, Haorah *et al.* 2007), zu einer verstärkten MLC Phosphorylierung und einer erhöhten endothelialen Permeabilität. Die Inhibition der MLCK mit ML-7 reduziert signifikant den Hirnwassergehalt nach einer venösen Ischämie in einem zwei-Venen-Okklusions Modell in Ratten (Kuhlmann et al. 2007). Auch eine Inhibition der pMLC durch ML-7 führt nach experimentellen SHT zu einer Reduktion des Hirnödems.

2.2. Pharmakologische Inhibition der MLCK und Entstehung des Hirnödems

Die Rolle der MLC bei der Entstehung des Hirnödems nach zerebraler Ischämie wurde gezeigt durch die Inhibition der MLCK mit einem small molecule Inhibitor – ML-7 (Kuhlmann et al. 2007). ML-7, ein Sulfonamid, ist ein gut charakterisierter, nicht peptidischer Inhibitor der MLCK. ML-7 bindet kompetitiv an der Adenosin Triphosphat (ATP) Bindungsstelle des aktiven Zentrums der MLCK (Saitoh *et al.* 1987) mit einem K_i Wert von 300 nM und einer niedrigen Affinität für andere Kinasen ($K_i > 20 \mu\text{M}$). Nach einer Injektion von 1 mg / kg peakt ML-7 bei 150 ng / ml im Plasma mit einer Halbwertszeit von 30 Minuten. 2 – 4 Stunden nach der Injektion ist ML-7 nicht mehr zu detektieren (Eutamene *et al.* 2005). Es gibt keine Informationen darüber, ob ML-7 BHS permeabel ist, ML-7 hat allerdings ein gutes Penetrationsvermögen in das Zellinnere (Bain *et al.* 2003). Neuere experimentelle Studien verwenden ML-7 zweimal täglich mit einer Konzentration von 1 – 2 mg / kg Körpergewicht intraperitoneal z.B. bei inflammatorischen Krankheiten (Ferrier *et al.* 2003, Moriez *et al.* 2005) ohne kardiopulmonalen Nebeneffekten.

Um das frühe Öffnen der BHS mit einem Maximum 4 – 6 Stunden nach SHT zu verhindern (Baskaya et al. 1997) und um ein optimales Therapiefenster in der frühen Phase nach Trauma zu gewährleisten, wurde ML-7 in einer Konzentration von 1 mg / kg Körpergewicht 1 Stunde vor und 6 Stunden nach Trauma gegeben. Mit den Westernblot Daten konnte gezeigt werden, dass ML-7 den pMLC Spiegel für 24 Stunden nach SHT wirkungsvoll reduziert. Zur gleichen Zeit entsteht das zerebrale Hirnödem mit einem Peak nach 24 Stunden und einer Aufhebung innerhalb der nächsten vier Tage nach der Verletzung. Um den Effekt der Inhibition der MLCK auf die BHS Integrität zu untersuchen, wurde das Hirnödem 24 Stunden nach CCI gewählt.

Der Anstieg des Hirnödems kann in ein Circulus vitiosus münden mit erhöhtem ICP und verschlechterter perikontusionaler Perfusion. Nach zerebraler Ischämie wurde die Entstehung des Hirnödems nach pharmakologischen Inhibition der MLCK reduziert (Kuhlmann et al. 2007). Die

Ergebnisse der vorliegenden Studie stimmen mit den Ischämie Daten überein und zeigen zum ersten Mal eine MLCK abhängige Entstehung des Hirnödems nach experimentellen SHT. Das SHT induziert eine Phosphorylierung der MLC und ein BHS Versagen, das durch den MLCK Inhibitor ML-7 verhindert werden konnte. Zusätzlich reduziert ML-7 den posttraumatischen ICP Anstieg. Dem Anstieg des ICP wird eine wichtige Rolle bei der Vergrößerung des sekundären Schadens zugeschrieben. Eine Behandlung eines erhöhten ICPs durch eine frühe dekompressive Kraniotomie reduziert signifikant das Hirnödem und den sekundären Hirnschaden nach CCI (Zweckberger *et al.* 2006). In der vorliegenden Studie führt die selektive MLCK Inhibition zu einer effektiven Reduktion des posttraumatischen ICP. Deswegen haben wir erwartet, dass die Reduktion des Hirnödems mit konsekutiver Reduzierung des ICP, auch zu einer reduzierten Expansion des Kontusionsvolumens führt. Jedoch führte die Vorbehandlung mit ML-7 nicht zu einer Reduktion des Kontusionsvolumens. Um auszuschließen, dass das Trauma bei einer Eindringtiefe von 1,0 mm zu klein war, wurde der Versuch wiederholt und die Eindringtiefe von 1,0 auf 1,5 mm erhöht. Unabhängig von der Traumagröße führt die Stabilisierung der BHS durch die selektive MLCK Inhibition zu einer Reduzierung des Hirnödems, sie beeinflusst aber nicht die sekundäre Schadensexpansion oder die neurologische Funktion.

Die Ergebnisse deuten daraufhin, dass die Öffnung der BHS nicht ausschließlich verantwortlich für den sekundären Hirnschaden ist und das vasogene Hirnödem wahrscheinlich als Folge früher pathophysiologischer Mechanismen auftritt. Vorhergehende Prozesse wie die post-traumatische zerebrale Inflammation, die die Entstehung des zerebralen Hirnödems triggert, könnte eine gesteigerte MLC Phosphorylierung auslösen. Die zerebrale Inflammation erhöht die BHS Permeabilität und die Entstehung des Hirnödems (Abbott 2000a). Eine Reduktion der post-traumatischen zerebralen Inflammation durch z.B. eine Bradykinin B₂ Rezeptor Inhibition (Abbott 2002), Erythropoietin (Chen *et al.* 2007) oder Fenofibrate (Besson *et al.* 2005) führen zu einer Reduktion des Hirnödems und des Hirnschadens. Die Reduktion des Hirnödems allein führt nicht zu einer Reduktion des Hirnschadens. Deswegen muss die Verringerung des Hirnödems auf der Ebene des Endothels kombiniert werden mit einer pharmakologischen Intervention, die z.B. die lokale Inflammation oder den neuronalen Zelltod reduziert, um eine Schadensverbesserung nach SHT zu gewährleisten.

2.3. Rolle der FcγR für das posttraumatische Hirnödem

In der vorliegenden Dissertation konnte gezeigt werden, dass die Inhibition des kontraktiven Apparates nach SHT zu einer Stabilisierung der BHS führt und zu einer Verringerung des Hirnödems. In einem in-vitro BHS Model konnte gezeigt werden, dass C-reaktives Protein (CRP) über die Bindung an Fcγ-Rezeptoren (FcγR) den kontraktiven Apparat aktiviert und somit zu einem Öffnen der BHS führt (Kuhlmann *et al.* 2009). Obwohl der CRP Plasmaspiegel nach experimentellen SHT an-

steigt, kommt es nicht zu einer Verringerung des Hirnwassergehaltes in $Fc\gamma R^{-/-}$ Mäusen. Die Entstehung des vasogenen Hirnödems wird im murinen CCI Model somit nicht über den $FC\gamma$ -Rezeptor vermittelt. Die in-vitro gezeigte $FC\gamma$ vermittelte Öffnung der BHS konnte in-vivo in dieser Studie nicht reproduziert werden. Jedoch deuten die Ergebnisse daraufhin, dass das Ausschalten des CRP Rezeptors die zerebrale Inflammation reduziert, was wahrscheinlich der Mechanismus für die Reduktion des sekundären histologischen Schaden in den $Fc\gamma R^{-/-}$ 24 Stunden nach experimentellen SHT ist.

2.3.1. Fc Rezeptoren γ -Ketten KO Maus und die Rolle bei SHT

Da die FcR γ -Kette mit mehreren Rezeptoren funktionell eng assoziiert ist kommt es durch die Deletion der γ -Kette zu vielfältigen Effekten der aktivierenden $Fc\gamma R$. In Mäusen mit defizienter γ -Kette ($Fc\gamma R^{-/-}$ Mäusen) können IgG opsonierte Partikel nicht mehr phagozytieren werden, die in NK-Zellen vermittelte ADCC, die Effektorfunktionen der Makrophagen, und die IgE vermittelte Effektorfunktion von Mastzellen sind beeinträchtigt. Beeinflusst werden maßgeblich die $Fc\gamma RI$, $Fc\gamma RIII$ und $Fc\epsilon RI$ vermittelten Reaktionen. Auf aktivierten Makrophagen hat sich gezeigt, dass IgG opsonierte Partikel nicht mehr phagozytieren werden, trotz einer noch vorhandenen Bindungskapazität für IgG1 und IgG2b. Dieser Befund reflektiert die regulatorische Funktion des $Fc\gamma RII$, der auf diesen Zellen noch aktiv ist und seine Liganden binden kann, diese jedoch nicht phagozytiert (Jiang et al. 1998).

An Hand der $Fc\gamma R^{-/-}$ Mäusen wurde gezeigt, dass die $Fc\gamma R$ auch eine wichtige Rolle bei neuronalen Zelluntergang nach zerebraler Ischämie und in Parkinson Krankheiten spielen. $Fc\gamma R$ defiziente Mäuse zeigen nach zerebraler Ischämie ein verringertes Infarkt volumen, reduzierte Aktivierung von Mikroglia und iNOS und eine verringerte Makrophagen Migration gegenüber Wildtyp Mäusen (Wachtel et al. 2001). Die Injektion von IgG von Parkinson erkrankten Patienten in die Substantia nigra verursacht die Aktivierung von Mikroglia und den Untergang dopaminerger Neuronen, nicht allerdings in $Fc\gamma R^{-/-}$ Mäusen (Harhaj & Antonetti 2004) In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte gezeigt werden, dass in einem Modell des neuronalen Zelluntertodes durch Kaninsäure Injektion in $Fc\gamma R^{-/-}$ Mäusen vs. Wildtyp Mäusen, die $Fc\gamma R$ durch Mikroglia Aktivierung, oxidativen Stress und durch triggern einer proteolytischen Kaskade zum exzitotoxischen Zelluntergang beitragen (Hellstrom et al. 2001). Die Daten dieser Studien stimmen mit unserer Studie überein und zeigen eine wichtige Rolle der $Fc\gamma R$ beim Zelluntergang nach zerebralen Insulten. In unserer Studie konnten wir zeigen, dass das Kontusionsvolumen und die zerebrale Inflammation in $Fc\gamma R^{-/-}$ Mäusen geringer ist.

Die zerebrale Inflammation nach SHT geht einher mit Leukozyten Infiltration und Mikroglia Aktivierung (Krause et al. 1993, Ramsauer et al. 2002). In Abhängigkeit vom Ausmaß und Zeit der im-

immunologischen Aktivierung kann diese schädlich oder protektiv sein, je nachdem ob pro- oder anti-inflammatorische Zytokine beteiligt sind (Peppiatt et al. 2006, Kleffner et al. 2008). Die Mikroglia stellt im ZNS die immunologische Haupteffektorzelle dar (Graeber & Streit 1990). Bereits 24 Stunden nach einem SHT kommt es zu einer Aktivierung der Mikroglia (Sandhir et al. 2008). Die aktivierte Mikroglia deutet auf einen sekundären Schadenswachstum, da diese zur Sekretion von proinflammatorischen Zytokine, wie TNF und IL-1, freie Radikale und neurotoxische Faktoren wie Glutamat führt (Kleffner et al. 2008, Antonetti et al. 2002). Aus diesem Grund kann eine Inhibition der Mikroglia Aktivierung protektiv wirken. Die vorliegenden Daten zeigen, dass die Mikroglia Aktivierung in den Fc γ R^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den WT Mäusen reduziert ist. Zusätzlich zur reduzierten Mikroglia Aktivierung ist die zerebrale Inflammation, die durch Bestimmung der mRNA Expression proinflammatorischer Zytokine bestimmt wurden in den Fc γ R^{-/-} Tieren reduziert. Unsere Daten deuten darauf hin, dass die Fc γ R eine wesentliche Rolle beim neuronalen Zelluntergang durch die Aktivierung der Mikroglia und proinflammatorischer Zytokine haben. Unsere Hypothese, dass CRP über die Fc γ R die BHS nach SHT öffnet, konnten wir allerdings mit dieser Studie nicht belegen. Unsere Hypothese beruht auf in-vitro Daten, die zeigen, dass CRP über die Bindung an die Fc γ R die MLCK aktiviert, was zu einer Aktivierung des kontraktiven Apparates und letztlich zum Zusammenbruch der BHS führt. Obwohl der CRP Plasmaspiegel nach experimentellen SHT signifikant ansteigt, führt das Ausschalten des CRP Rezeptors in Fc γ R^{-/-} Tieren nicht zu einer Verringerung des Hirnwassergehaltes im Vergleich zu den WT Mäusen. Der Anstieg des CRP Plasmaspiegel lag bei 50 %, was nur sehr gering ist im Vergleich zu dem humanen Anstieg des CRP nach SHT. Die Daten deuten darauf hin, dass CRP im murinen CCI Model eine untergeordnete Rolle spielt. Mit den Daten kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass CRP über einen Fc γ unabhängigen Mechanismus eine Öffnung der BHS vermittelt.

2.4. Pathophysiologie der SAB und des SHT: Gleiches und Unterschiede

Nach SHT und SAB führen ähnliche pathophysiologische Prozesse zu einer Vergrößerung des initialen Schadens (Dirnagl et al. 1999). Beide zerebralen Insulte haben ähnliche Folgen in der frühen akuten Phase, bis zu einem Jahr, aber auch bis zu mehreren Jahre nach dem Insult zeigen sie Ähnlichkeiten im klinischen Outcome und im Krankheitsverlauf (Hellawell & Pentland 2001). Mechanismen die am Zelluntergang beteiligt sind, sind unter anderem Exzitotoxizität, oxidativer Stress, freie Radikalbildung, Apoptose und Inflammation. Allerdings rühren beide zerebralen Insulte von unterschiedlichen primären Verletzungen her, so dass die zelluläre Vulnerabilität unterschiedlich ist. Durch die mechanische Primärschädigung beim SHT kommt es zu einer direkten Schädigung der Membranen und neuronaler Zellen, der weißen Hirnsubstanz und anderen vaskulären Hirngefäßen. Bei der SAB entwickelt sich nach der Blutung, welche meistens durch ein Aneurysma der

hirnversorgenden Gefäße hervorgerufen wird, durch den ICP Anstieg und CBF Abfall eine globale Ischämie. Zusätzlich bilden sich subarachnoidale Blutgerinnsel und eine akute Hypertonie. Dies führt zu einer Vielzahl von sekundären Effekten, wie zum verzögerten Vasospasmus, zur Plättchenaggregation, zur sogenannten kortikalen Streudepolarisation und zum verzögerten Zelluntergang durch apoptotische oder inflammatorische Prozesse.

3. Die Rolle der MLCK bei der Entstehung des Hirnödems nach SAB

Nach SHT geht ein erhöhter pMLC Level mit einer gestörten BHS einher. In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss des kontraktilen Apparates auf die BHS Störung nach SAB untersucht. Die Inhibition der MLCK mindert die Folgen einer SAB, sie führt zu einer Senkung des Hirnödems und des intrakraniellen Drucks und Verbesserung der neurologischen Erholung nach experimenteller SAB in Mäusen.

3.1. Modelle der tierexperimentellen SAB

Es gibt mehrere verschiedene Modelle, die bei der Maus angewendet werden, um eine experimentelle SAB auszulösen:

- 1.) „Perforation model“ (endovaskuläres Fadenmodell): Peforation einer Arterie (A. basilaris oder der A. carotis interna (Bederson et al. 1995)) mit Blutung in die unmittelbare Umgebung; (Review: (Jeon *et al.* 2009))
- 2.) „Pressure infusion model“: Injektion von autologem Blut in den Subarachnoidalraum mittels druckgesteuerter Injektion von Blut in den perichiasmalen Subarachnoidalraum (Fukuda *et al.* 1995, Kwak *et al.* 1979)
- 3.) „Blood injection model“: Injektion von autologem Blut als einmalige Injektion mit beliebigem Druck und definiertem Blutvolumen in die Cisterna magna (Goldstein 1993, Grabowski *et al.* 1993, Kwak et al. 1979), oder Cisterna chiasmatica (Hall & Travis 1988), oder als Doppel-Injektions-Modell mit einer zweiten autologen Blutinjektion in die Cisterna magna (Grote & Hassler 1988) nach 48 Stunden. (Review: (Jeon et al. 2009))
- 4.) Chirurgische Darstellung eines extrakraniellen Gefäßes und dessen Exposition mit autologem Blut

Das am häufigsten genutzten Modell ist das „perforation model“ und das „blood injection model“ (Jeon et al. 2009). Um die Pathophysiologie der SAB zu untersuchen, sollten Tiermodelle folgende Kriterien (Schwartz *et al.* 2000) erfüllen:

- 1.) Das Modell sollte reproduzierbare und konstante Blutvolumina in den Subarachnoidalraum

- 2.) und ein einheitlichen Grad der Blutung hervorrufen.
- 3.) Die pathophysiologische Mechanismen und
- 4.) die Blutungsdynamik und Hämatomverteilung sollten denen einer SAB aus einem zerebralen Aneurysma entsprechen.
- 5.) Es sollte leicht in der Handhabung sein
- 6.) und geringe Kosten aufweisen.

Für unsere Studie wählten wir das endovaskuläre Fadenmodell mit einer Perforation A. carotis interna, wodurch der Circulus Wilisii perforiert wird. Dieses Modell bildet die Pathophysiologie einer menschlichen SAB adäquat ab. Die endoluminale Perforation des Circulus Wilisii führt zum zerebralen Vasospasmus, neurologischen Ausfällen (McGirt *et al.* 2002b, Parra *et al.* 2002, Kamii *et al.* 1999, McGirt *et al.* 2002a), der Entstehung eines zerebralen Hirnödems (Thal *et al.* 2009, Feiler *et al.* 2010), neuronaler Schaden des Hippokampus (Feiler *et al.* 2010) und einer klinisch relevanten Mortalität von 30 % (Feiler *et al.* 2010, Altay *et al.* 2009). Allerdings beinhaltet das Fadenperforationsmodell auch den Nachteil, dass die Blutung nicht kontrolliert werden kann, wie es für ein ideales SAB Model (s.o.) nötig wäre. Da der direkte ICP Anstieg beim Auslösen der SAB in diesem Modell einheitlich ist und nur gering schwankt, deutet dies allerdings daraufhin, dass die Menge des extravasierten Blutes gleich ist (Feiler *et al.* 2010, Schwartz *et al.* 2000).

3.2. Entstehung des Hirnödems nach experimenteller SAB

Nach SAB, kommt es wegen einer frühen Vasokonstriktion der Gefäße zu einer Reduktion der zerebralen Perfusion (Bederson *et al.* 1998) und wegen der Volumenzunahme durch das extravasierte Blut zu Erhöhung des ICP, was schließlich in einer globalen zerebralen Ischämie resultiert. Durch die sich entwickelnde zerebrale Ischämie kommt es zu einer Ausschüttung von Glutamat. Dies führt zu einem Öffnen von Natrium und Calcium Kanälen auf die Zellmembranen. Durch den Verlust der Membran lokalisierten ATPase Pumpen kommt es zu einem vermehrten intrazellulären Natriumeinstrom, einer vermehrten intrazellulären Wasserretention und somit zum Zellschwellen. Die sehr früh nach SAB beginnende zerebrale Inflammation führt zur Aktivierung von Mikrogliazellen, der Rekrutierung von Neutrophilen und zu einer gesteigerten Produktion von Zytokinen. Auch die Produktion von Sauerstoff Radikalen endet im Zelluntergang. Das ischämische Hirnödem ist zunächst innerhalb der ersten 24 Stunden zytotoxische. Die globale Verschlechterung der zerebralen Perfusion resultiert aber auch in einem Öffnen der BHS (Doczi *et al.* 1986) mit konsekutiver Erhöhung des Hirnwassergehaltes (Johshita *et al.* 1990). Ein zentraler zugrunde liegender Mechanismus der zum Öffnen der BHS führt könnte die Aktivierung der MLCK sein. Nach einer zerebralen Schädigung konnte gezeigt werden, dass es zu einer Aktivierung der MLCK durch oxidativen Stress (Haorah *et*

al. 2005), Hypoxie (Kuhlmann et al. 2007) und in unserer Studie durch CCI (Luh *et al.* 2010) kommt. Nach CCI führte die Inhibition der MLCK zu einer Reduktion des Hirnödems, worauf wir in einem weiteren Schadensmodell die Rolle der MLCK bei der Entstehung des Hirnödems untersuchen wollten.

3.3. Pharmakologische Inhibition der MLCK

Anlehnend an die SHT Studie wurde das gleiche Therapiefenster auch bei der SAB Studie gewählt. Nach experimenteller SAB durch eine endoluminale Perforation kommt es nach 6 Stunden zum Öffnen der BHS mit einem Peak nach 48 Stunden (Scholler *et al.* 2007), der Hirnwassergehalt steigt signifikant an und resultiert in einer signifikanten Erhöhung des ICP 24 Stunden nach SAB (Feiler et al. 2010, Thal et al. 2009), so dass auch nach SAB mit dem Dosierschema von ML-7 in die frühe Pathophysiologie angewendet wurde.

Unsere Hypothese wird auch mit den Ergebnissen der SAB unterstützt. Auch hier konnten wir erstmalig eine Beteiligung des kontraktiles Apparates am SAB induzierten BHS Versagen zeigen. ML-7 verhindert auch nach SAB die Öffnung der BHS, reduziert den ICP und das zerebrale Hirn-ödem.

Die Entstehung eines Hirnödems nach SAB scheint dagegen für direkte neurologische Folgen verantwortlich zu sein. Nach experimenteller SAB kommt es zu einer Entstehung eines Hirnödems und zu einer Verschlechterung der neurologischen Funktion. In Anwesenheit von ML-7, einem pharmakologischen MLCK Inhibitor, wird die BHS effektiv stabilisiert, das zerebrale Hirn-ödem und der ICP reduziert, die neurologische Funktion verbessert und die Mortalität gesenkt. Ein kritischer Faktor für die kognitive Verschlechterung und die hohe Mortalität nach SAB ist die Entstehung eines globalen zerebralen Hirnödems. Viele experimentelle Studien, aber auch Patientenstudien zeigen, dass die CBF Reduktion (Davis *et al.* 1992, Grubb *et al.* 1977), die ICP Erhöhung und das Hirn-ödem (Thal et al. 2009, Claassen *et al.* 2002) mit der neurologischen Funktion und der Mortalität korreliert. Um eine mögliche Auswirkungen der Reduktion des Hirnödems nach SAB auf den morphologischen Hirnschaden zu untersuchen, wurde die Neuronendichte der Regionen CA1-3 7 Tage nach SAB untersucht. Diese Bereich ist besonders vulnerabel für eine zerebrale Ischämie bzw. Minderdurchblutung (Memezawa *et al.* 1992) und eignet sich damit für die histologische Auswertung nach experimenteller SAB. 7 Tage nach der experimentellen SAB kommt es nicht zu einer Abnahme der Neuronendichte im Vergleich zu Neuronendichte der nativen Tiere. Dies bedeutet nicht, dass in unserem Model kein neuronaler Schaden durch die SAB ausgelöst wurde. Auch in anderen experimentellen SAB Studien war der Neuronenuntergang schlecht zu bestimmen (Thal et al. 2009). Dies liegt unter anderem daran, dass es nach SAB zu einem verzögerten Zelluntergang kommt. Man weiß nur sehr wenig über den Zeitverlauf der neuronalen Vulnerabilität nach SAB.

Nach experimentellem ischämischem Schlaganfall kann der Neuronenuntergang bis zu Monaten dauern (Dirnagl et al. 1999).

In der vorliegenden Studie wurde gezeigt, dass die MLCK eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Zytoskeletts spielt, welche die endotheliale Barriereintegrität beeinflusst. Auch Studien in der Lunge (Morel *et al.* 1990), dem Darm (Conlin *et al.* 2009) und der Haut (Huang *et al.* 2003) deuten darauf hin, dass die Phosphorylierung der MLC durch die MLCK ein zentraler Schritt im Zusammenbruch der endothelialen Barriere mit Erhöhung vaskulären Permeabilität ist.

F. Zusammenfassung

Zerebrale Erkrankungen, wie Schädelhirntrauma (SHT) und Subarachnoidalblutung (SAB) sind mit einer hohen Morbidität und Mortalität vergesellschaftet und stellen eine ernsthafte medizinische und ökonomische Herausforderung dar. Grundlage für die Entwicklung neuer effektiver Therapieansätze ist das Verständnis der pathophysiologischen Mechanismen dieser Krankheiten. Das Entstehen eines vasogenen Hirnödems ist eine schwere Komplikation nach SHT und SAB und beruht u.a. auf einem Öffnen der Bluthirnschranke (BHS). Ein möglicher zu Grunde liegender Mechanismus könnte die Aktivierung der Myosin-leichte-Kette-Kinase (MLCK) sein, was man therapeutisch unterbinden könnte.

In der vorliegenden Studie wurde in zwei unterschiedlichen experimentellen, zerebralen Schadensmodellen der Einfluss des kontraktilen Apparates auf die BHS Störung untersucht. In dem Schadensmodell des SHT sind die Hauptergebnisse: 1.) die Myosin-leichte-Kette-Kinase (MLCK) wird durch das induzierte Schädelhirntrauma hochreguliert. 2.) eine pharmakologische MLCK Inhibition stabilisiert die BHS, senkt den ICP und das Hirnödem nach experimentellen SHT. 3.) die MLCK Inhibition führte nicht zu einer Verbesserung des Hirnschadens, der neurologischen Funktion oder der zerebralen Inflammation 24 Stunden nach SHT, obwohl angenommen wird, dass die Entstehung eines Hirnödems den sekundären Hirnschaden vergrößert. In einer weiteren Studie wurde untersucht, durch welchen Signalweg dieser zugrunde liegende Mechanismus aktiviert wird. In einem in-vitro BHS Model konnte gezeigt werden, dass C-reaktives Protein (CRP) über die Bindung an Fc γ -Rezeptoren den kontraktilen Apparat aktiviert und somit zu einem Öffnen der BHS führt. Obwohl der CRP Plasmaspiegel nach experimentellen SHT ansteigt, kommt es nicht zu einer Verringerung des Hirnwassergehaltes in Fc γ R^{-/-} Mäusen. Die Entstehung des vasogenen Hirnödems wird im murinen CCI Model somit nicht über den Fc γ -Rezeptor vermittelt. Die in-vitro gezeigte Fc γ vermittelte Öffnung der BHS konnte in-vivo in dieser Studie nicht reproduziert werden. Mit der vorliegenden Studie kann nicht ausgeschlossen werden, dass CRP über einen Fc γ unabhängigen Mechanismus eine Öffnung der BHS vermittelt. Jedoch deuten die Daten daraufhin, das CRP im murinen CCI Model eine untergeordnete Rolle spielt. Die Fc γ R^{-/-} Mäuse zeigten allerdings ein deutlich reduziertes Kontusionsvolumen und eine reduzierte Mikroglia Aktivierung, was darauf hindeutet, dass Fc γ R eine wesentliche Rolle bei der zerebralen Inflammation spielen.

In dem Schadensmodell der experimentellen SAB konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der MLCK die Folgen einer SAB mindert. Sie führt zu einer Senkung des Hirnödems, des intrakraniellen Drucks und Verbesserung der neurologischen Erholung nach experimenteller SAB. Die Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass die MLCK einer der Endpunkteffektor für verschiedene Mechanismen ist, welche die endotheliale Permeabilität sowohl nach SHT als auch nach SAB erhöhen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in beiden zerebralen experimentellen Insulten die MLCK eine wichtige Rolle beim BHS Versagen spielt. Die Daten tragen dazu bei, den zugrundeliegenden Mechanismus der BHS Öffnung, der durch eine Aktivierung der MLCK hervorgerufen werden könnte, besser zu verstehen. Dies könnte zu Entwicklung neuer Medikamente für eine Therapie des zerebralen Hirnödems führen.

Summary

Cerebral lesions like traumatic brain injury (TBI) or subarachnoid hemorrhage (SAH) are associated with high morbidity and mortality bearing a serious medical and economic burden for the society. The development of vasogenic brain edema is a severe complication of TBI and SAH and is caused by opening of the blood brain barrier (BBB). A possible underlying mechanism is the activation of the myosin light chain kinase (MLCK), which may be a promising target for a therapeutic intervention.

In the present study two distinct experimental lesion models were examined to determine the role of the endothelial contractile apparatus for the maintenance of the BBB integrity. The study demonstrates that following TBI: 1.) MLCK is upregulated; 2.) pharmacological inhibition of MLCK stabilizes the BBB, reduces ICP and brain edema formation; 3.) MLCK inhibition does not reduce histological brain damage, neurocognitive deficits or post-traumatic cerebral inflammation, although brain edema formation is accused to be a key factor for secondary brain damage after experimental TBI.

In a next step, the role of C-reactive protein (CRP) was investigated as possible pathway of MLCK mediated BBB breakage. In in-vitro BBB studies CRP binds to Fc γ -receptors (Fc γ R) and opens the BBB by activation of the contractile apparatus. Despite increase of CRP plasma levels following experimental TBI, brain edema is not reduced in Fc γ R $^{-/-}$ mice. The development of vasogenic brain edema is therefore not mediated by Fc γ -receptors in the murine CCI model. The present study does not support previous in-vitro data showing a link between Fc γ R and BBB breakage, but it cannot be ruled out that CRP might induce BBB opening independently of Fc γ -receptors. On the other hand, the data indicate the CRP plays only a minor role for edema formation in the pathology of murine TBI. Fc γ R $^{-/-}$ mice demonstrate reduced lesion volume and microglia activation. This indicates that Fc γ R plays an important role in post-traumatic cerebral inflammation.

After experimental SAH inhibition of the MLCK reduced the consequences of SAH by reducing

brain edema formation, intracranial pressure and improving neurological function. The results support the hypothesis of MLCK as possible underlying effector of multiple mechanisms, which lead to increase of endothelial permeability following TBI and SAH.

In summary, MLCK plays an important role for the disruption of the BBB following both experimental lesions. The presented data indicate that activation of the MLCK may be the underlying mechanisms for the opening of the BBB. These new insights may aid to develop new drugs for the treatment of cerebral brain edema.

G. Literaturverzeichnis

- Abbott, N. J. (2000a) Inflammatory mediators and modulation of blood-brain barrier permeability. *Cell Mol. Neurobiol.*, **20**, 131-147.
- Abbott, N. J. (2000b) Inflammatory mediators and modulation of blood-brain barrier permeability. *Cell Mol Neurobiol*, **20**, 131-147.
- Abbott, N. J. (2002) Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J Anat*, **200**, 629-638.
- Altay, T., Smithason, S., Volokh, N., Rasmussen, P. A., Ransohoff, R. M. and Provencio, J. J. (2009) A novel method for subarachnoid hemorrhage to induce vasospasm in mice. *J Neurosci Methods*, **183**, 136-140.
- Antonetti, D. A., Barber, A. J., Hollinger, L. A., Wolpert, E. B. and Gardner, T. W. (1999) Vascular endothelial growth factor induces rapid phosphorylation of tight junction proteins occludin and zonula occluden 1. A potential mechanism for vascular permeability in diabetic retinopathy and tumors. *J Biol Chem*, **274**, 23463-23467.
- Antonetti, D. A., Wolpert, E. B., DeMaio, L., Harhaj, N. S. and Scaduto, R. C., Jr. (2002) Hydrocortisone decreases retinal endothelial cell water and solute flux coincident with increased content and decreased phosphorylation of occludin. *J Neurochem*, **80**, 667-677.
- Atkinson, J., Campbell, F. W. and Francis, M. R. (1976) The magic number 4 +/- 0: a new look at visual numerosity judgements. *Perception*, **5**, 327-334.
- Baethmann, A. and Kempfski, O. S. (1997) [Pathophysiology of brain edema]. *Zentralbl. Neurochir.*, **58**, 20-29.
- Baethmann, A., Maier-Hauff, K., Kempfski, O., Unterberg, A., Wahl, M. and Schurer, L. (1988) Mediators of brain edema and secondary brain damage. *Crit Care Med*, **16**, 972-978.
- Baethmann, A., Wirth, A. and Schlesinger-Raab, A. (2002) Prospective system analysis of the pre- and early hospital care in severe head injury in Bavaria at a population-based level. *Eur. Surg. Res.*, **34**, 42-46.
- Bain, J., McLaughlan, H., Elliott, M. and Cohen, P. (2003) The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *Biochem J*, **371**, 199-204.
- Ballou, S. P. and Lozanski, G. (1992) Induction of inflammatory cytokine release from cultured human monocytes by C-reactive protein. *Cytokine*, **4**, 361-368.
- Bamford, J., Sandercock, P., Dennis, M., Burn, J. and Warlow, C. (1991) Classification and natural history of clinically identifiable subtypes of cerebral infarction. *Lancet*, **337**, 1521-1526.
- Bareyre, F., Wahl, F., McIntosh, T. K. and Stutzmann, J. M. (1997) Time course of cerebral edema after traumatic brain injury in rats: effects of riluzole and mannitol. *J Neurotrauma*, **14**, 839-849.
- Barry, K. G. and Berman, A. R. (1961) Mannitol infusion. III. The acute effect of the intravenous infusion of mannitol on blood and plasma volumes. *N Engl J Med*, **264**, 1085-1088.
- Barzo, P., Marmarou, A., Fatouros, P., Corwin, F. and Dunbar, J. (1996) Magnetic resonance imaging-monitored acute blood-brain barrier changes in experimental traumatic brain injury. *J*

Neurosurg, **85**, 1113-1121.

Barzo, P., Marmarou, A., Fatouros, P., Hayasaki, K. and Corwin, F. (1997) Contribution of vasogenic and cellular edema to traumatic brain swelling measured by diffusion-weighted imaging. *J Neurosurg*, **87**, 900-907.

Baskaya, M. K., Rao, A. M., Dogan, A., Donaldson, D. and Dempsey, R. J. (1997) The biphasic opening of the blood-brain barrier in the cortex and hippocampus after traumatic brain injury in rats. *Neurosci.Lett.*, **226**, 33-36.

Bazan, N. G., Rodriguez de Turco, E. B. and Allan, G. (1995) Mediators of injury in neurotrauma: intracellular signal transduction and gene expression. *J Neurotrauma*, **12**, 791-814.

Beauchamp, K., Mutlak, H., Smith, W. R., Shohami, E. and Stahel, P. F. (2008) Pharmacology of traumatic brain injury: where is the "golden bullet"? *Mol Med*, **14**, 731-740.

Bederson, J. B., Germano, I. M. and Guarino, L. (1995) Cortical blood flow and cerebral perfusion pressure in a new noncraniotomy model of subarachnoid hemorrhage in the rat. *Stroke*, **26**, 1086-1091.

Bederson, J. B., Levy, A. L., Ding, W. H., Kahn, R., DiPerna, C. A., Jenkins, A. L., III and Vallabhajosyula, P. (1998) Acute vasoconstriction after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*, **42**, 352-360.

Beni-Adani, L., Gozes, I., Cohen, Y., Assaf, Y., Steingart, R. A., Brenneman, D. E., Eizenberg, O., Trembolver, V. and Shohami, E. (2001) A peptide derived from activity-dependent neuroprotective protein (ADNP) ameliorates injury response in closed head injury in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, **296**, 57-63.

Besson, V. C., Chen, X. R., Plotkine, M. and Marchand-Verrecchia, C. (2005) Fenofibrate, a peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist, exerts neuroprotective effects in traumatic brain injury. *Neurosci.Lett.*, **388**, 7-12.

Birukov, K. G., Csontos, C., Marzilli, L., Dudek, S., Ma, S. F., Bresnick, A. R., Verin, A. D., Cotter, R. J. and Garcia, J. G. (2001) Differential regulation of alternatively spliced endothelial cell myosin light chain kinase isoforms by p60(Src). *J Biol Chem*, **276**, 8567-8573.

Black, K. L. and Hoff, J. T. (1985) Leukotrienes increase blood-brain barrier permeability following intraparenchymal injections in rats. *Ann Neurol*, **18**, 349-351.

Bramlett, H. M. and Dietrich, W. D. (2004) Pathophysiology of cerebral ischemia and brain trauma: similarities and differences. *J Cereb Blood Flow Metab*, **24**, 133-150.

Brown, R. C. and Davis, T. P. (2002) Calcium modulation of adherens and tight junction function: a potential mechanism for blood-brain barrier disruption after stroke. *Stroke*, **33**, 1706-1711.

Busch, E., Beaulieu, C., de Crespigny, A. and Moseley, M. E. (1998) Diffusion MR imaging during acute subarachnoid hemorrhage in rats. *Stroke*, **29**, 2155-2161.

Butt, A. M., Jones, H. C. and Abbott, N. J. (1990) Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study. *J Physiol*, **429**, 47-62.

Cambier, J. C. (1995) Antigen and Fc receptor signaling. The awesome power of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM). *J Immunol*, **155**, 3281-3285.

- Chen, X. R., Besson, V. C., Palmier, B., Garcia, Y., Plotkine, M. and Marchand-Leroux, C. (2007) Neurological recovery-promoting, anti-inflammatory, and anti-oxidative effects afforded by fenofibrate, a PPAR alpha agonist, in traumatic brain injury. *J.Neurotrauma*, **24**, 1119-1131.
- Chen, Y., Lomnitski, L., Michaelson, D. M. and Shohami, E. (1997) Motor and cognitive deficits in apolipoprotein E-deficient mice after closed head injury. *Neuroscience*, **80**, 1255-1262.
- Chesnut, R. M., Marshall, L. F., Klauber, M. R., Blunt, B. A., Baldwin, N., Eisenberg, H. M., Jane, J. A., Marmarou, A. and Foulkes, M. A. (1993) The role of secondary brain injury in determining outcome from severe head injury. *J Trauma*, **34**, 216-222.
- Claassen, J., Carhuapoma, J. R., Kreiter, K. T., Du, E. Y., Connolly, E. S. and Mayer, S. A. (2002) Global cerebral edema after subarachnoid hemorrhage: frequency, predictors, and impact on outcome. *Stroke*, **33**, 1225-1232.
- Conlin, V. S., Wu, X., Nguyen, C., Dai, C., Vallance, B. A., Buchan, A. M., Boyer, L. and Jacobson, K. (2009) Vasoactive intestinal peptide ameliorates intestinal barrier disruption associated with *Citrobacter rodentium*-induced colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **297**, G735-750.
- Conti, M. A. and Adelstein, R. S. (1981) The relationship between calmodulin binding and phosphorylation of smooth muscle myosin kinase by the catalytic subunit of 3':5' cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, **256**, 3178-3181.
- Crawford, L. E., Milliken, E. E., Irani, K. et al. (1996) Superoxide-mediated actin response in post-hypoxic endothelial cells. *J Biol Chem*, **271**, 26863-26867.
- Davis, S. M., Andrews, J. T., Lichtenstein, M., Rossiter, S. C., Kaye, A. H. and Hopper, J. (1992) Correlations between cerebral arterial velocities, blood flow, and delayed ischemia after subarachnoid hemorrhage. *Stroke*, **23**, 492-497.
- de Vries, H. E., Blom-Roosemalen, M. C., van Oosten, M., de Boer, A. G., van Berkel, T. J., Breimer, D. D. and Kuiper, J. (1996) The influence of cytokines on the integrity of the blood-brain barrier in vitro. *J Neuroimmunol*, **64**, 37-43.
- Deli, M. A., Descamps, L., Dehouck, M. P., Cecchelli, R., Joo, F., Abraham, C. S. and Torpier, G. (1995) Exposure of tumor necrosis factor-alpha to luminal membrane of bovine brain capillary endothelial cells cocultured with astrocytes induces a delayed increase of permeability and cytoplasmic stress fiber formation of actin. *J Neurosci Res*, **41**, 717-726.
- Di Napoli, M., Papa, F. and Bocola, V. (2001) Prognostic influence of increased C-reactive protein and fibrinogen levels in ischemic stroke. *Stroke*, **32**, 133-138.
- Dirnagl, U., Iadecola, C. and Moskowitz, M. A. (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.*, **22**, 391-397.
- Dixon, C. E., Clifton, G. L., Lighthall, J. W., Yaghmai, A. A. and Hayes, R. L. (1991) A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat. *J.Neurosci.Methods*, **39**, 253-262.
- Dixon, C. E., Lyeth, B. G., Povlishock, J. T., Findling, R. L., Hamm, R. J., Marmarou, A., Young, H. F. and Hayes, R. L. (1987) A fluid percussion model of experimental brain injury in the rat. *J.Neurosurg.*, **67**, 110-119.
- Doczi, T., Joo, F., Adam, G., Bozoky, B. and Szerdahelyi, P. (1986) Blood-brain barrier damage

- during the acute stage of subarachnoid hemorrhage, as exemplified by a new animal model. *Neurosurgery*, **18**, 733-739.
- Donkin, J. J. and Vink, R. (2010) Mechanisms of cerebral edema in traumatic brain injury: therapeutic developments. *Curr Opin Neurol*, **23**, 293-299.
- Dudek, S. M. and Garcia, J. G. (2001) Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability. *J Appl Physiol*, **91**, 1487-1500.
- Eisenberg, H. M., Gary, H. E., Jr., Aldrich, E. F. et al. (1990) Initial CT findings in 753 patients with severe head injury. A report from the NIH Traumatic Coma Data Bank. *J.Neurosurg.*, **73**, 688-698.
- Engelhard, K., Werner, C., Reeker, W., Lu, H., Mollenberg, O., Mielke, L. and Kochs, E. (1999) Desflurane and isoflurane improve neurological outcome after incomplete cerebral ischaemia in rats. *Br.J.Anaesth.*, **83**, 415-421.
- Essler, M., Amano, M., Kruse, H. J., Kaibuchi, K., Weber, P. C. and Aepfelbacher, M. (1998) Thrombin inactivates myosin light chain phosphatase via Rho and its target Rho kinase in human endothelial cells. *J Biol Chem*, **273**, 21867-21874.
- Eutamene, H., Theodorou, V., Schmidlin, F., Tondereau, V., Garcia-Villar, R., Salvador-Cartier, C., Chovet, M., Bertrand, C. and Bueno, L. (2005) LPS-induced lung inflammation is linked to increased epithelial permeability: role of MLCK. *Eur.Respir.J.*, **25**, 789-796.
- Faden, A. I., Demediuk, P., Panter, S. S. and Vink, R. (1989) The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury. *Science*, **244**, 798-800.
- Feiler, S., Friedrich, B., Scholler, K., Thal, S. C. and Plesnila, N. (2010) Standardized induction of subarachnoid hemorrhage in mice by intracranial pressure monitoring. *J Neurosci Methods*, **190**, 164-170.
- Ferger, B., Leng, A., Mura, A., Hengerer, B. and Feldon, J. (2004) Genetic ablation of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and pharmacological inhibition of TNF-synthesis attenuates MPTP toxicity in mouse striatum. *J Neurochem.*, **89**, 822-833.
- Ferrier, L., Mazelin, L., Cenac, N. et al. (2003) Stress-induced disruption of colonic epithelial barrier: role of interferon-gamma and myosin light chain kinase in mice. *Gastroenterology*, **125**, 795-804.
- Fishman, R. A. (1975) Brain edema. *N Engl J Med*, **293**, 706-711.
- Foda, M. A. and Marmarou, A. (1994) A new model of diffuse brain injury in rats. Part II: Morphological characterization. *J.Neurosurg.*, **80**, 301-313.
- Fotheringham, A. P., Davies, C. A. and Davies, I. (2000) Oedema and glial cell involvement in the aged mouse brain after permanent focal ischaemia. *Neuropathol Appl Neurobiol*, **26**, 412-423.
- Frank, R. N., Dutta, S. and Mancini, M. A. (1987) Pericyte coverage is greater in the retinal than in the cerebral capillaries of the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **28**, 1086-1091.
- Fridman, W. H. (1991) Fc receptors and immunoglobulin binding factors. *FASEB J*, **5**, 2684-2690.
- Frontera, J. A., de Los Reyes, K., Gordon, E., Gowda, A., Grilo, C., Egorova, N., Patel, A. and

- Bederson, J. B. (2010) Trend in Outcome and Financial Impact of Subdural Hemorrhage. *Neurocrit Care*.
- Fukuda, O., Endo, S., Kuwayama, N., Harada, J. and Takaku, A. (1995) The characteristics of laser-Doppler flowmetry for the measurement of regional cerebral blood flow. *Neurosurgery*, **36**, 358-364.
- Gershov, D., Kim, S., Brot, N. and Elkon, K. B. (2000) C-Reactive protein binds to apoptotic cells, protects the cells from assembly of the terminal complement components, and sustains an antiinflammatory innate immune response: implications for systemic autoimmunity. *J Exp Med*, **192**, 1353-1364.
- Gessner, J. E., Heiken, H., Tamm, A. and Schmidt, R. E. (1998) The IgG Fc receptor family. *Ann Hematol*, **76**, 231-248.
- Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R. and Mathieu, C. (2001) An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*, **25**, 386-401.
- Goldstein, L. B. (1993) Rapid reliable measurement of lesion parameters for studies of motor recovery after sensorimotor cortex injury in the rat. *J.Neurosci.Methods*, **48**, 35-42.
- Grabowski, M., Brundin, P. and Johansson, B. B. (1993) Paw-reaching, sensorimotor, and rotational behavior after brain infarction in rats. *Stroke*, **24**, 889-895.
- Graeber, M. B. and Streit, W. J. (1990) Microglia: immune network in the CNS. *Brain Pathol*, **1**, 2-5.
- Grieb, P., Forster, R. E., Strome, D., Goodwin, C. W. and Pape, P. C. (1985) O₂ exchange between blood and brain tissues studied with 18O₂ indicator-dilution technique. *J Appl Physiol*, **58**, 1929-1941.
- Grote, E. and Hassler, W. (1988) The critical first minutes after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*, **22**, 654-661.
- Grubb, R. L., Jr., Raichle, M. E., Eichling, J. O. and Gado, M. H. (1977) Effects of subarachnoid hemorrhage on cerebral blood volume, blood flow, and oxygen utilization in humans. *J.Neurosurg.*, **46**, 446-453.
- Haberl, R. L. and Villringer, A. (1990) [Hypertensive-hypervolemic therapy in cerebral vasospasm]. *Nervenarzt*, **61**, 749-751.
- Habgood, M. D., Bye, N., Dziegielewska, K. M., Ek, C. J., Lane, M. A., Potter, A., Morganti-Kossmann, C. and Saunders, N. R. (2007) Changes in blood-brain barrier permeability to large and small molecules following traumatic brain injury in mice. *Eur J Neurosci*, **25**, 231-238.
- Hall, E. D. and Travis, M. A. (1988) Attenuation of progressive brain hypoperfusion following experimental SAH by large intravenous doses of methylprednisolon. *Experimental Neurology*, **99**, 594-606.
- Haorah, J., Heilman, D., Knipe, B., Chrastil, J., Leibhart, J., Ghorpade, A., Miller, D. W. and Persidsky, Y. (2005) Ethanol-induced activation of myosin light chain kinase leads to dysfunction of tight junctions and blood-brain barrier compromise. *Alcohol Clin.Exp.Res.*, **29**, 999-1009.

- Haorah, J., Knipe, B., Gorantla, S., Zheng, J. and Persidsky, Y. (2007) Alcohol-induced blood-brain barrier dysfunction is mediated via inositol 1,4,5-triphosphate receptor (IP3R)-gated intracellular calcium release. *J.Neurochem.*, **100**, 324-336.
- Harhaj, N. S. and Antonetti, D. A. (2004) Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology. *Int J Biochem Cell Biol*, **36**, 1206-1237.
- Hashimoto, Y. and Soderling, T. R. (1990) Phosphorylation of smooth muscle myosin light chain kinase by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II: comparative study of the phosphorylation sites. *Arch Biochem Biophys*, **278**, 41-45.
- Hawkins, B. T. and Davis, T. P. (2005) The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol.Rev.*, **57**, 173-185.
- Hellawell, D. J. and Pentland, B. (2001) Relatives' reports of long term problems following traumatic brain injury or subarachnoid haemorrhage. *Disabil Rehabil*, **23**, 300-305.
- Hellstrom, M., Gerhardt, H., Kalen, M., Li, X., Eriksson, U., Wolburg, H. and Betsholtz, C. (2001) Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J Cell Biol*, **153**, 543-553.
- Hop, J. W., Rinkel, G. J., Algra, A. and van Gijn, J. (1997) Case-fatality rates and functional outcome after subarachnoid hemorrhage: a systematic review. *Stroke*, **28**, 660-664.
- Hossmann, K. A. and Schuier, F. J. (1980) Experimental brain infarcts in cats. I. Pathophysiological observations. *Stroke*, **11**, 583-592.
- Huang, Q., Xu, W., Ustinova, E., Wu, M., Childs, E., Hunter, F. and Yuan, S. (2003) Myosin light chain kinase-dependent microvascular hyperpermeability in thermal injury. *Shock*, **20**, 363-368.
- Huber, J. D., Egleton, R. D. and Davis, T. P. (2001) Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier. *Trends Neurosci*, **24**, 719-725.
- Hulett, M. D. and Hogarth, P. M. (1994) Molecular basis of Fc receptor function. *Adv Immunol*, **57**, 1-127.
- Ikeda, Y. and Long, D. M. (1990) The molecular basis of brain injury and brain edema: the role of oxygen free radicals. *Neurosurgery*, **27**, 1-11.
- Ishmael, J. E., Lohr, C. V., Fischer, K. and Kioussi, C. (2008) Localization of myosin II regulatory light chain in the cerebral vasculature. *Acta Histochem*, **110**, 172-177.
- Jeon, H., Ai, J., Sabri, M., Tariq, A., Shang, X., Chen, G. and Macdonald, R. L. (2009) Neurological and neurobehavioral assessment of experimental subarachnoid hemorrhage. *BMC Neurosci*, **10**, 103.
- Jiang, W. G., Bryce, R. P., Horrobin, D. F. and Mansel, R. E. (1998) Regulation of tight junction permeability and occludin expression by polyunsaturated fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun*, **244**, 414-420.
- Johshita, H., Kassell, N. F., Sasaki, T. and Ogawa, H. (1990) Impaired capillary perfusion and brain edema following experimental subarachnoid hemorrhage: a morphometric study. *J.Neurosurg.*, **73**, 410-417.

- Junpeng, M., Huang, S. and Qin, S. (2011) Progesterone for acute traumatic brain injury. *Cochrane Database Syst Rev*, **1**, CD008409.
- Kakinuma, Y., Hama, H., Sugiyama, F., Yagami, K., Goto, K., Murakami, K. and Fukamizu, A. (1998) Impaired blood-brain barrier function in angiotensinogen-deficient mice. *Nat.Med.*, **4**, 1078-1080.
- Kamii, H., Kato, I., Kinouchi, H., Chan, P. H., Epstein, C. J., Akabane, A., Okamoto, H. and Yoshimoto, T. (1999) Amelioration of vasospasm after subarachnoid hemorrhage in transgenic mice overexpressing CuZn-superoxide dismutase. *Stroke*, **30**, 867-871.
- Kamm, K. E. and Stull, J. T. (2001) Dedicated myosin light chain kinases with diverse cellular functions. *J Biol Chem*, **276**, 4527-4530.
- Kandatsu, N., Nan, Y. S., Feng, G. G. et al. (2005) Opposing effects of isoflurane and sevoflurane on neurogenic pulmonary edema development in an animal model. *Anesthesiology*, **102**, 1182-1189.
- Kempfski, O., von Andrian, U., Schurer, L. and Baethmann, A. (1990) Intravenous glutamate enhances edema formation after a freezing lesion. *Adv Neurol*, **52**, 219-223.
- Klatzo, I. (1987) Pathophysiological aspects of brain edema. *Acta Neuropathol*, **72**, 236-239.
- Klatzo, I., Chui, E., Fujiwara, K. and Spatz, M. (1980) Resolution of vasogenic brain edema. *Adv Neurol*, **28**, 359-373.
- Klatzo, I., Piraux, A. and Laskowski, E. J. (1958) The relationship between edema, blood-brain-barrier and tissue elements in a local brain injury. *J Neuropathol Exp Neurol*, **17**, 548-564.
- Kleffner, I., Bungeroth, M., Schiffbauer, H., Schabitz, W. R., Ringelstein, E. B. and Kühlenbaumer, G. (2008) The role of aquaporin-4 polymorphisms in the development of brain edema after middle cerebral artery occlusion. *Stroke*, **39**, 1333-1335.
- Kochanek, P. M., Marion, D. W., Zhang, W. et al. (1995) Severe controlled cortical impact in rats: assessment of cerebral edema, blood flow, and contusion volume. *J Neurotrauma*, **12**, 1015-1025.
- Krause, D., Kunz, J. and Dermietzel, R. (1993) Cerebral pericytes--a second line of defense in controlling blood-brain barrier peptide metabolism. *Adv Exp Med Biol*, **331**, 149-152.
- Kuhlmann, C. R., Librizzi, L., Closhen, D., Pflanzner, T., Lessmann, V., Pietrzik, C. U., de Curtis, M. and Luhmann, H. J. (2009) Mechanisms of C-reactive protein-induced blood-brain barrier disruption. *Stroke*, **40**, 1458-1466.
- Kuhlmann, C. R., Tamaki, R., Gamberdinger, M., Lessmann, V., Behl, C., Kempfski, O. S. and Luhmann, H. J. (2007) Inhibition of the myosin light chain kinase prevents hypoxia-induced blood-brain barrier disruption. *J.Neurochem.*, **102**, 501-507.
- Kwak, R., Niizuma, H., Ohi, T. and Suzuki, J. (1979) Angiographic study of cerebral vasospasm following rupture of intracranial aneurysms: Part I. Time of the appearance. *Surg.Neurol.*, **11**, 257-262.
- Lenzlinger, P. M., Saatman, K. E., Hoover, R. C., Cheney, J. A., Bareyre, F. M., Raghupathi, R., Arnold, L. D. and McIntosh, T. K. (2004) Inhibition of vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) signaling by BSF476921 attenuates regional cerebral edema following traumatic brain injury in rats. *Restor.Neurol.Neurosci.*, **22**, 73-79.

- Lighthall, J. W. (1988) Controlled cortical impact: a new experimental brain injury model. *J Neurotrauma*, **5**, 1-15.
- Lindgren, S. and Rinder, L. (1965) Experimental studies in head injury. I. Some factors influencing results of model experiments. *Biophysik*, **2**, 320-329.
- Luh, C., Kuhlmann, C. R., Ackermann, B., Timaru-Kast, R., Luhmann, H. J., Behl, C., Werner, C., Engelhard, K. and Thal, S. C. (2010) Inhibition of myosin light chain kinase reduces brain edema formation after traumatic brain injury. *J. Neurochem.*, **112**, 1015-1025.
- Madara, J. L., Barenberg, D. and Carlson, S. (1986) Effects of cytochalasin D on occluding junctions of intestinal absorptive cells: further evidence that the cytoskeleton may influence paracellular permeability and junctional charge selectivity. *J Cell Biol*, **102**, 2125-2136.
- Manley, G. T., Fujimura, M., Ma, T., Noshita, N., Filiz, F., Bollen, A. W., Chan, P. and Verkman, A. S. (2000) Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. *Nat Med*, **6**, 159-163.
- Marmarou, A. (2003) Pathophysiology of traumatic brain edema: current concepts. *Acta Neurochir Suppl*, **86**, 7-10.
- Marmarou, A., Foda, M. A., van den Brink, W., Campbell, J., Kita, H. and Demetriadou, K. (1994) A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics. *J Neurosurg*, **80**, 291-300.
- Marnell, L., Mold, C. and Du Clos, T. W. (2005) C-reactive protein: ligands, receptors and role in inflammation. *Clin Immunol*, **117**, 104-111.
- McGirt, M. J., Lynch, J. R., Parra, A., Sheng, H., Pearlstein, R. D., Laskowitz, D. T., Pelligrino, D. A. and Warner, D. S. (2002a) Simvastatin increases endothelial nitric oxide synthase and ameliorates cerebral vasospasm resulting from subarachnoid hemorrhage. *Stroke*, **33**, 2950-2956.
- McGirt, M. J., Parra, A., Sheng, H., Higuchi, Y., Oury, T. D., Laskowitz, D. T., Pearlstein, R. D. and Warner, D. S. (2002b) Attenuation of cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in mice overexpressing extracellular superoxide dismutase. *Stroke*, **33**, 2317-2323.
- McIntosh, T. K., Noble, L., Andrews, B. and Faden, A. I. (1987) Traumatic brain injury in the rat: characterization of a midline fluid-percussion model. *Cent Nerv Syst Trauma*, **4**, 119-134.
- Memezawa, H., Smith, M. L. and Siesj , B. K. (1992) Penumbra tissues salvaged by reperfusion following middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*, **23**, 552-559.
- Mills, C. D., Robertson, C. S., Contant, C. F. and Henley, C. M. (1997) Effects of anesthesia on polyamine metabolism and water content in the rat brain. *J Neurotrauma*, **14**, 943-949.
- Modrego, P. J., Boned, B., Berlanga, J. J. and Serrano, M. (2008) Plasmatic B-type natriuretic peptide and C-reactive protein in hyperacute stroke as markers of CT-evidence of brain edema. *Int J Med Sci*, **5**, 18-23.
- Morel, N. M., Petruzzo, P. P., Hechtman, H. B. and Shepro, D. (1990) Inflammatory agonists that increase microvascular permeability in vivo stimulate cultured pulmonary microvessel endothelial cell contraction. *Inflammation*, **14**, 571-583.
- Mori, T., Wang, X., Aoki, T. and Lo, E. H. (2002) Downregulation of matrix metalloproteinase-9

- and attenuation of edema via inhibition of ERK mitogen activated protein kinase in traumatic brain injury. *J.Neurotrauma*, **19**, 1411-1419.
- Moriez, R., Salvador-Cartier, C., Theodorou, V., Fioramonti, J., Eutamene, H. and Bueno, L. (2005) Myosin light chain kinase is involved in lipopolysaccharide-induced disruption of colonic epithelial barrier and bacterial translocation in rats. *Am J Pathol*, **167**, 1071-1079.
- Morita-Fujimura, Y., Fujimura, M., Gasche, Y., Copin, J. C. and Chan, P. H. (2000) Overexpression of copper and zinc superoxide dismutase in transgenic mice prevents the induction and activation of matrix metalloproteinases after cold injury-induced brain trauma. *J.Cereb.Blood Flow Metab*, **20**, 130-138.
- Nag, S., Manias, J. L. and Stewart, D. J. (2009) Pathology and new players in the pathogenesis of brain edema. *Acta Neuropathol*, **118**, 197-217.
- Nishikawa, M., Shirakawa, S. and Adelstein, R. S. (1985) Phosphorylation of smooth muscle myosin light chain kinase by protein kinase C. Comparative study of the phosphorylated sites. *J Biol Chem*, **260**, 8978-8983.
- Okiyama, K., Smith, D. H., Thomas, M. J. and McIntosh, T. K. (1992) Evaluation of a novel calcium channel blocker, (S)-emopamil, on regional cerebral edema and neurobehavioral function after experimental brain injury. *J Neurosurg*, **77**, 607-615.
- Orakcioglu, B., Fiebach, J. B., Steiner, T. et al. (2005) Evolution of early perihemorrhagic changes- ischemia vs. edema: an MRI study in rats. *Exp Neurol*, **193**, 369-376.
- Oury, T. D., Piantadosi, C. A. and Crapo, J. D. (1993) Cold-induced brain edema in mice. Involvement of extracellular superoxide dismutase and nitric oxide. *J Biol Chem*, **268**, 15394-15398.
- Paolini, R., Jouvin, M. H. and Kinet, J. P. (1991) Phosphorylation and dephosphorylation of the high-affinity receptor for immunoglobulin E immediately after receptor engagement and disengagement. *Nature*, **353**, 855-858.
- Papadopoulos, M. C., Manley, G. T., Krishna, S. and Verkman, A. S. (2004) Aquaporin-4 facilitates reabsorption of excess fluid in vasogenic brain edema. *FASEB J*, **18**, 1291-1293.
- Pardridge, W. M., Eisenberg, J. and Yang, J. (1985) Human blood-brain barrier insulin receptor. *J Neurochem*, **44**, 1771-1778.
- Parra, A., McGirt, M. J., Sheng, H., Laskowitz, D. T., Pearlstein, R. D. and Warner, D. S. (2002) Mouse model of subarachnoid hemorrhage associated cerebral vasospasm: methodological analysis. *Neurol.Res.*, **24**, 510-516.
- Peppiatt, C. M., Howarth, C., Mobbs, P. and Attwell, D. (2006) Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature*, **443**, 700-704.
- Petty, M. A., Poulet, P., Haas, A., Namer, I. J. and Wagner, J. (1996) Reduction of traumatic brain injury-induced cerebral oedema by a free radical scavenger. *Eur J Pharmacol*, **307**, 149-155.
- Plesnila, N., Schulz, J., Stoffel, M., Eriskat, J., Pruneau, D. and Baethmann, A. (2001) Role of bradykinin B2 receptors in the formation of vasogenic brain edema in rats. *J.Neurotrauma*, **18**, 1049-1058.

- Potts, M. B., Adwanikar, H. and Noble-Haeusslein, L. J. (2009) Models of traumatic cerebellar injury. *Cerebellum*, **8**, 211-221.
- Ra, C., Jouvin, M. H., Blank, U. and Kinet, J. P. (1989) A macrophage Fc gamma receptor and the mast cell receptor for IgE share an identical subunit. *Nature*, **341**, 752-754.
- Ramsauer, M., Krause, D. and Dermietzel, R. (2002) Angiogenesis of the blood-brain barrier in vitro and the function of cerebral pericytes. *FASEB J*, **16**, 1274-1276.
- Raslan, A. and Bhardwaj, A. (2007) Medical management of cerebral edema. *Neurosurg Focus*, **22**, E12.
- Ravetch, J. V. and Kinet, J. P. (1991) Fc receptors. *Annu Rev Immunol*, **9**, 457-492.
- Reulen, H. J., Graham, R., Spatz, M. and Klatzo, I. (1977) Role of pressure gradients and bulk flow in dynamics of vasogenic brain edema. *J Neurosurg*, **46**, 24-35.
- Rickels, E. (2009) [Monitoring intracranial pressure. Indication, limits, practice]. *Anaesthetist*, **58**, 398-404.
- Ridker, P. M., Rifai, N., Rose, L., Buring, J. E. and Cook, N. R. (2002) Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med*, **347**, 1557-1565.
- Ritz, M. F., Schmidt, P. and Mendelowitsch, A. (2006) Effects of isoflurane on glutamate and taurine releases, brain swelling and injury during transient ischemia and reperfusion. *Int J Neurosci*, **116**, 191-202.
- Rosenberg, G. A. (1999) Ischemic brain edema. *Prog Cardiovasc Dis*, **42**, 209-216.
- Saitoh, M., Ishikawa, T., Matsushima, S., Naka, M. and Hidaka, H. (1987) Selective inhibition of catalytic activity of smooth muscle myosin light chain kinase. *J.Biol.Chem.*, **262**, 7796-7801.
- Sandhir, R., Onyszchuk, G. and Berman, N. E. (2008) Exacerbated glial response in the aged mouse hippocampus following controlled cortical impact injury. *Exp Neurol*, **213**, 372-380.
- Schettini, A. and Furniss, W. W. (1979) Brain water and electrolyte distribution during the inhalation of halothane. *Br.J.Anaesth.*, **51**, 1117-1124.
- Schilling, L. and Wahl, M. (1999) Mediators of cerebral edema. *Adv Exp Med Biol*, **474**, 123-141.
- Scholler, K., Trinkl, A., Klotowski, M., Thal, S. C., Plesnila, N., Trabold, R., Hamann, G. F., Schmid-Elsaesser, R. and Zausinger, S. (2007) Characterization of microvascular basal lamina damage and blood-brain barrier dysfunction following subarachnoid hemorrhage in rats. *Brain Res.*, **1142**, 237-246.
- Schreiter, F. (1973) [Late results in the surgical treatment of recurring incontinence in women]. *Helv Chir Acta*, **40**, 523-524.
- Schwartz, A. Y., Masago, A., Sehba, F. A. and Bederson, J. B. (2000) Experimental models of subarachnoid hemorrhage in the rat: a refinement of the endovascular filament model. *J.Neurosci.Methods*, **96**, 161-167.
- Siesjo, B. K. (1981) Cell damage in the brain: a speculative synthesis. *J Cereb Blood Flow Metab*, **1**, 155-185.

Smith, D. H., Soares, H. D., Pierce, J. S., Perlman, K. G., Saatman, K. E., Meaney, D. F., Dixon, C. E. and McIntosh, T. K. (1995) A model of parasagittal controlled cortical impact in the mouse: cognitive and histopathologic effects. *J.Neurotrauma*, **12**, 169-178.

Soares, H. D., Thomas, M., Cloherty, K. and McIntosh, T. K. (1992) Development of prolonged focal cerebral edema and regional cation changes following experimental brain injury in the rat. *J.Neurochem.*, **58**, 1845-1852.

Soehnlein, O., Eriksson, S., Hjelmqvist, H., Andersson, A., Morgelin, M., Lindbom, L., Rundgren, M. and Frithiof, R. (2010) Anesthesia aggravates lung damage and precipitates hypotension in endotoxemic sheep. *Shock*, **34**, 412-419.

Staub, F., Mackert, B., Kempfski, O., Haberstock, J., Peters, J. and Baethmann, A. (1994) [Swelling and damage to nerves and glial cells by acidosis]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*, **29**, 203-209.

Staub, F., Peters, J., Kempfski, O., Schneider, G. H., Schurer, L. and Baethmann, A. (1993) Swelling of glial cells in lactic acidosis and by glutamate: significance of Cl(-)-transport. *Brain Res*, **610**, 69-74.

Stover, J. F., Sakowitz, O. W., Kroppenstedt, S. N., Thomale, U. W., Kempfski, O. S., Flugge, G. and Unterberg, A. W. (2004) Differential effects of prolonged isoflurane anesthesia on plasma, extracellular, and CSF glutamate, neuronal activity, 125I-Mk801 NMDA receptor binding, and brain edema in traumatic brain-injured rats. *Acta Neurochir.(Wien.)*, **146**, 819-830.

Sudlow, C. L. and Warlow, C. P. (1997) Comparable studies of the incidence of stroke and its pathological types: results from an international collaboration. International Stroke Incidence Collaboration. *Stroke*, **28**, 491-499.

Sweeney, H. L., Bowman, B. F. and Stull, J. T. (1993) Myosin light chain phosphorylation in vertebrate striated muscle: regulation and function. *Am J Physiol*, **264**, C1085-1095.

Takai, T., Nakamura, A. and Akiyama, K. (2003) Fc receptors as potential targets for the treatment of allergy, autoimmune disease and cancer. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*, **3**, 187-197.

Tetrault, S., Chever, O., Sik, A. and Amzica, F. (2008) Opening of the blood-brain barrier during isoflurane anaesthesia. *Eur J Neurosci*, **28**, 1330-1341.

Thal, S. C., Messmer, K., Schmid-Elsaesser, R. and Zausinger, S. (2008a) Neurological impairment in rats after subarachnoid hemorrhage-A comparison of functional tests. *J.Neurol.Sci.*, **268**, 150-159.

Thal, S. C. and Plesnila, N. (2007) Non-invasive intraoperative monitoring of blood pressure and arterial pCO(2) during surgical anesthesia in mice. *J.Neurosci.Methods*, **159**, 261-267.

Thal, S. C., Sporer, S., Klopotoski, M., Thal, S. E., Woitzik, J., Schmid-Elsaesser, R., Plesnila, N. and Zausinger, S. (2009) Brain edema formation and neurological impairment after subarachnoid hemorrhage in rats. Laboratory investigation. *J.Neurosurg.*, **111**, 988-994.

Thal, S. C., Wyschkon, S., Pieter, D., Engelhard, K. and Werner, C. (2008b) Selection of endogenous control genes for normalization of gene expression analysis after experimental brain trauma in mice. *J.Neurotrauma*, **25**, 785-794.

Totsukawa, G., Yamakita, Y., Yamashiro, S., Hartshorne, D. J., Sasaki, Y. and Matsumura, F.

- (2000) Distinct roles of ROCK (Rho-kinase) and MLCK in spatial regulation of MLC phosphorylation for assembly of stress fibers and focal adhesions in 3T3 fibroblasts. *J Cell Biol*, **150**, 797-806.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 4350-4354.
- Tran, N. D., Kim, S., Vincent, H. K., Rodriguez, A., Hinton, D. R., Bullock, M. R. and Young, H. F. (2010) Aquaporin-1-mediated cerebral edema following traumatic brain injury: effects of acidosis and corticosteroid administration. *J Neurosurg*, **112**, 1095-1104.
- Tsenter, J., Beni-Adani, L., Assaf, Y., Alexandrovich, A. G., Trembovler, V. and Shohami, E. (2008) Dynamic changes in the recovery after traumatic brain injury in mice: effect of injury severity on T2-weighted MRI abnormalities, and motor and cognitive functions. *J. Neurotrauma*, **25**, 324-333.
- Turner, H. and Kinet, J. P. (1999) Signalling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilonRI. *Nature*, **402**, B24-30.
- Uciechowski, P., Schwarz, M., Gessner, J. E., Schmidt, R. E., Resch, K. and Radeke, H. H. (1998) IFN-gamma induces the high-affinity Fc receptor I for IgG (CD64) on human glomerular mesangial cells. *Eur J Immunol*, **28**, 2928-2935.
- Verkman, A. S., Binder, D. K., Bloch, O., Auguste, K. and Papadopoulos, M. C. (2006) Three distinct roles of aquaporin-4 in brain function revealed by knockout mice. *Biochim Biophys Acta*, **1758**, 1085-1093.
- Virtanen, R., Savola, J. M. and Saano, V. (1989) Highly selective and specific antagonism of central and peripheral alpha 2-adrenoceptors by atipamezole. *Arch.Int.Pharmacodyn.Ther.*, **297**, 190-204.
- Volanakis, J. E. (2001) Human C-reactive protein: expression, structure, and function. *Mol Immunol*, **38**, 189-197.
- Vorbrodt, A. W., Lossinsky, A. S., Wisniewski, H. M., Suzuki, R., Yamaguchi, T., Masaoka, H. and Klatzo, I. (1985) Ultrastructural observations on the transvascular route of protein removal in vasogenic brain edema. *Acta Neuropathol*, **66**, 265-273.
- Wachtel, M., Bolliger, M. F., Ishihara, H., Frei, K., Bluethmann, H. and Gloor, S. M. (2001) Down-regulation of occludin expression in astrocytes by tumour necrosis factor (TNF) is mediated via TNF type-1 receptor and nuclear factor-kappaB activation. *J Neurochem*, **78**, 155-162.
- Wahl, M., Unterberg, A., Baethmann, A. and Schilling, L. (1988) Mediators of blood-brain barrier dysfunction and formation of vasogenic brain edema. *J Cereb Blood Flow Metab*, **8**, 621-634.
- Wang, J. K., Yu, L. N., Zhang, F. J., Yang, M. J., Yu, J., Yan, M. and Chen, G. (2010) Postconditioning with sevoflurane protects against focal cerebral ischemia and reperfusion injury via PI3K/Akt pathway. *Brain Res*, **1357**, 142-151.
- Watanabe, H., Takahashi, R., Zhang, X. X. et al. (1998) An essential role of myosin light-chain kinase in the regulation of agonist- and fluid flow-stimulated Ca²⁺ influx in endothelial cells. *FASEB J*, **12**, 341-348.

- Watts, R. G., Wright, J. L., Atkinson, L. L. and Merchant, R. E. (1989) Histopathological and blood-brain barrier changes in rats induced by an intracerebral injection of human recombinant interleukin 2. *Neurosurgery*, **25**, 202-208.
- Werner, C., Mollenberg, O., Kochs, E. and Schulte, J. a. E. (1995) Sevoflurane improves neurological outcome after incomplete cerebral ischaemia in rats. *Br.J.Anaesth.*, **75**, 756-760.
- Wolfe, C. D., Giroud, M., Kolominsky-Rabas, P., Dundas, R., Lemesle, M., Heuschmann, P. and Rudd, A. (2000) Variations in stroke incidence and survival in 3 areas of Europe. European Registries of Stroke (EROS) Collaboration. *Stroke*, **31**, 2074-2079.
- Wolman, M., Klatzo, I., Chui, E., Wilmes, F., Nishimoto, K., Fujiwara, K. and Spatz, M. (1981) Evaluation of the dye-protein tracers in pathophysiology of the blood-brain barrier. *Acta Neuropathol*, **54**, 55-61.
- Zetterling, M., Hallberg, L. and Ronne-Engstrom, E. (2010) Early global brain oedema in relation to clinical admission parameters and outcome in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Acta Neurochir (Wien)*, **152**, 1527-1533; discussion 1533.
- Zhong, W., Zen, Q., Tebo, J., Schlottmann, K., Coggeshall, M. and Mortensen, R. F. (1998) Effect of human C-reactive protein on chemokine and chemotactic factor-induced neutrophil chemotaxis and signaling. *J Immunol*, **161**, 2533-2540.
- Zlokovic, B. V. (2008) The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron*, **57**, 178-201.
- Zornow, M. H., Scheller, M. S., Sheehan, P. B., Strnat, M. A. and Matsumoto, M. (1992) Intracranial pressure effects of dexmedetomidine in rabbits. *Anesth.Analg.*, **75**, 232-237.
- Zweckberger, K., Eros, C., Zimmermann, R., Kim, S. W., Engel, D. and Plesnila, N. (2006) Effect of early and delayed decompressive craniectomy on secondary brain damage after controlled cortical impact in mice. *J.Neurotrauma*, **23**, 1083-1093.
- Zweckberger, K., Stoffel, M., Baethmann, A. and Plesnila, N. (2003) Effect of decompression craniotomy on increase of contusion volume and functional outcome after controlled cortical impact in mice. *J.Neurotrauma*, **20**, 1307-1314.

H. Anhang

1. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1:	Schematische Darstellung des primären und sekundären Schadens	9
Abb. 2:	Schematische Darstellung der Monroe-Kelli-Hypothese	10
Abb. 3:	Schematische Darstellung der Schadensexpansion	10
Abb. 4:	Auswirkung der intrakraniellen Drucksteigerung	12
Abb. 5:	Schematische Darstellung des zytotoxischen und vasogenen Hirnödems	13
Abb. 6:	Schematische Darstellung der BHS	17
Abb. 7:	Schematische Darstellung der Grenzschicht zweier Endothelzellen	19
Abb. 8:	Myosin II Molekül	20
Abb. 9:	Endotheliale MLCK Isoformen	21
Abb. 10:	Schematische Darstellung der Regulation der Myosin Phosphorylierung	22
Abb. 11:	Schematische Darstellung der BHS Störung durch Aktivierung der MLCK	23
Abb. 12:	IgG Fc γ Rezeptors	26
Abb. 13:	Positive/negative Regulation und Antigen- Präsentation der Fc γ R	28
Abb. 14:	Chemische Struktur von ML-7	42
Abb. 15:	Controlled Cortical Impact Modell	43
Abb. 16:	SAB Modell	44
Abb. 17:	Codman ICP Microsensor	45
Abb. 18:	Darstellung der Kraniotomie, ICP und CBF Messposition und Traumaposition	45
Abb. 19:	Blutdruckmeßgeräte und Repräsentative Aufnahme einer Blutdruckmessung	46
Abb. 20:	Schnittschema für die Proteinextraktion und für die Bestimmung des HWG	51
Abb. 21:	Nissl gefärbter Beispielschnitt für Neuronendichtebestimmung	57
Abb. 22:	Iba-1 gefärbter Beispielschnitt	58
Abb. 23:	Nissl gefärbter Beispielschnitt für Schadensbestimmung	58
Abb. 24:	Standardkurvenlauf am Beispiel von Myl	62
Abb. 25:	Beispiel einer Schmelzkurve	64

Abb. 26:	Beispiel einer Gelelektrophorese des Standards Myl	65
Abb. 27:	SDS-Page Aufbau	67
Abb. 28:	Schematischer Aufbau eines Protein Plots	68
Abb. 29:	Schematische Darstellung der Visualisierung des gesuchten Proteins	68
Abb. 30:	Einfluss verschiedener Anästhetika auf HWG	70
Abb. 31:	mRNA Expression von MLCK und MLC nach SHT	72
Abb. 32:	Der Einfluss der MLCK Inhibition auf den HWG nach SHT	73
Abb. 33:	Der Einfluss der MLCK Inhibition auf die neurologische Funktion nach SHT	73
Abb. 34:	Der Einfluss der MLCK Inhibition auf die BHS und ICP nach SHT	74
Abb. 35:	Der Einfluss der MLCK Inhibition auf den pMLC Protein Level nach SHT	75
Abb. 36:	Der Einfluss der MLCK Inhibition auf histologischen Schaden nach SHT	76
Abb. 37:	Der Einfluss der MLCK Inhibition auf die zerebrale Inflammation nach SHT	77
Abb. 38:	CRP Plasma Level und mRNA Expression der CRP Rezeptoren nach SHT	78
Abb. 39:	Genotypisierung der FcγR ^{-/-} Mäusen	79
Abb. 40:	CRP Plasma Level in WT und FcγR ^{-/-} Mäusen nach SHT	80
Abb. 41:	Der Hirnwassergehalt von WT und FcγR ^{-/-} Mäusen nach SHT	81
Abb. 42:	NSS von WT und FcγR ^{-/-} Mäusen nach SHT	81
Abb. 43:	Histologischen Schaden von WT und FcγR ^{-/-} Mäusen nach SHT	82
Abb. 44:	Zerebrale Inflammation von WT und FcγR ^{-/-} Mäusen nach SHT	83
Abb. 45:	mRNA Expression von inflammatorischer Gene von WT und FcγR ^{-/-} Mäusen	84
Abb. 46:	Intraoperativer Zeitverlauf des CBF bei SAB	86
Abb. 47:	Intraoperativer Zeitverlauf des ICP und 24 h nach SAB	87
Abb. 48:	Einfluss der MLCK Inhibition auf den Hirnwassergehalt nach SAB	89
Abb. 49:	Einfluss der MLCK Inhibition auf die BHS Integrität nach SAB	90
Abb. 50:	Der Einfluss der MLCK Inhibition auf die neurologische Funktion nach SAB	91
Abb. 51:	Der Einfluss der MLCK Inhibition auf die Histologie nach SAB	92
Abb. 52:	Fluid Percussion-Modell	94

Tabelle 1:	“vaso-active agents“, die die Bluthirnschranken Permeabilität erhöhen	14
Tabelle 2:	Humane und murine FcγR	25
Tabelle 3:	Spezifische Primer für die real-time PCR	39
Tabelle 4:	Systolischer Blutdruck und Körpertemperatur während OP bei CCI	71
Tabelle 5:	Physiologische Parameter während SAB	85
Tabelle 6:	Systolischer Blutdruck über 7 Tage nach SAB	86

2. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
α	alpha
β	beta
γ	gamma
β 2M	Beta-2-Mikroglobulin
$^{\circ}$ C	Grad Celsius
μ	mikro
A	
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
ADCC	antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität
AQP	Aquaporine
B	
BHS	Bluthirnschranke
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
C	
ca.	circa
Ca^{2+}	Calcium 2+ Ionen
CBF	cerebral blood flow (engl., zerebraler Blutfluss)
CCI	controlled cortical impact
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cMLCK	kardiale Myosin-leichte-Kette-Kinase
CO_2	Kohlenstoffdioxid
comb	intraperitoneale 3-fach Kombination
Cp	Crossingpoint
CRP	C-reaktive Protein
CSF	Liquor cerebrospinalis
Cy5	Fluoreszenzfarbstoff im Bereich ~650/670nm
D	
D	Tage
DAB	Diaminobenzidin-Derivat
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dw	dry weight
E	
EC	endothelial cells (engl., Endothelzellen)
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetische Säure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
eNOS	endotheliale NO-Synthase
et al.	et alia
F	
Fc	engl. fragment crystallizable
Fc γ R	Fc γ Rezeptor

FcγR ^{-/-}	Fcγ Rezeptor Knockout durch Deletion der γ- Kette
FL	Fluorescein
Forw	forward Primer
G	
g	Gramm
GABA	γ-Aminobuttersäure
H	
h	Stunde
Hb	Hämoglobin
HCl	Salzsäure
Hct	Hämatokrit
HE	Hämatoxilin–Eosin
HWG	Hirnwassergehalt
I	
Iba-1	Ionized Calcium Binding Adaptor Molecule 1
IC	Immunkomplex
ICP	intracranial pressure (engl.)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
i.p.	intraperitoneal
iso	Isofluran
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motifs (engl.)
ITIM	immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs (engl.)
J	
JAM	Junctional Adhesion Molecules (engl.)
K	
Ki	Equilibrium Dissoziation Konstante
kg	Kilogramm
KO	Knock out (engl.)
L	
LC	Light Cyler (Typ 480 und 1.2)
LDF	Laserdopplerfluxmetrie
LWG	Lungenwassergehalt
M	
min	Minute
ML-7	5-iodonaphthalene-1-sulphonyl-homopiperazine
MLC	Myosin-leichte-Ketten
MLCK	Myosin-leichte-Kette-Kinase
MLCP	Myosin-leichte-Kette-Phosphatase
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm ³	Kubikmillimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule

mmol	Millimol
MMP	Matrix-Metallo-Proteinasen
MRI	Magnetik Resonance Image (engl.)
mRNS	Messenger Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
N	
N	Anzahl
Na ⁺	Natrium+ Ionen
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalz
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
NIBP	non invasive blood pressure (engl.)
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
NS	nicht signifikant
NSS	neurological severity score (engl.)
O	
O ₂	Sauerstoff
OD	optische Dichte
P	
PC	Phosphocholin
PCR	polymerase chain reaction (engl.)
PFA	Paraformaldehyd
pH	potentia Hydrogenii
Pkt.	Punkte
pMLC	phosphorylierte MLC
PPIA	Cyclophilin A
R	
R640	Fluoreszenzfarbstoff mit Emission im Bereich 640nm
R705	Fluoreszenzfarbstoff mit Emission im Bereich 705nm
Rekt. Temp.	Rektale Körpertemperatur
Rev	reverse Primer
RNA	ribonucleic acids (engl.)
RO	rechts oben
ROS	Sauerstoff-Radikale
rpm	rounds per minute
RT	reverse Transkriptase
S	
SAB	Subarachnoidalblutung
S.D.	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
sevo	Sevofluran
SHT	Schädelhirntrauma
smMLCK	glattmuskuläre Myosin-leichte-Kette-Kinase
skMLCK	skelettale Myosin-leichte-Kette-Kinase
Syst. BP	systolischer Blutdruck

T	
TBE	Tris-Borat- Ethylendiamin-tetraacetische Säure
TEER	engl. Trans endothelial electrical resistance (transendotheliale elektrische Widerstand)
TJ	Tight Junctions (engl.)
Tyr	Tyrosin
TNF α	tumor necrosis factor alpha
U	
u.a.	unter anderem
V	
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vs.	versus
v/v	
W	
WHO	World Health Organisation
WT	Wildtyp
w/v	
ww	wet weight (engl.)
Z	
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZO	zonula occludens
ZVTE	Zentralen Versuchstiereinrichtung

I. Danksagung

J. Lebenslauf