

AUS DEM LEHRSTUHL
DER KLINIK UND POLIKLINIK FÜR NEUROCHIRURGIE
DIREKTOR: PROF. DR. MED. ALEXANDER BRAWANSKI
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**DIE *IN VIVO*-EFFEKTE VON “*PIGMENT EPITHELIUM-DERIVED FACTOR*”
(PEDF) AUF DIE NEUROGENESE IM RATTENGEHIRN NACH
EXPERIMENTELLEM HIRNTRAUMA**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Elisabeth Maria Bründl

2009

AUS DEM LEHRSTUHL
DER KLINIK UND POLIKLINIK FÜR NEUROCHIRURGIE
DIREKTOR: PROF. DR. MED. ALEXANDER BRAWANSKI
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**DIE *IN VIVO*-EFFEKTE VON “*PIGMENT EPITHELIUM-DERIVED FACTOR*”
(PEDF) AUF DIE NEUROGENESE IM RATTENGEHIRN NACH
EXPERIMENTELLEM HIRNTRAUMA**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Elisabeth Maria Bründl

2009

Dekan:

Prof. Dr. Bernhard Weber

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Alexander Brawanski

2. Berichterstatter:

PD Dr. Carsten Englert

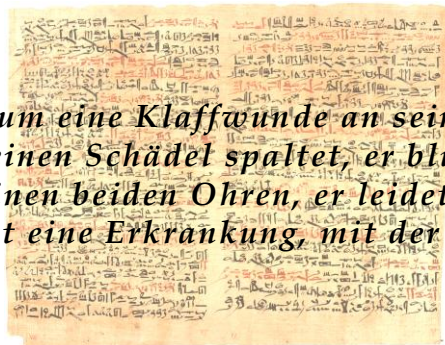
Tag der mündlichen Prüfung:

08.02.2010

MEINEN ELTERN
ANNEMARIE UND KONRAD BRÜNDL

IN LIEBE UND DANKBARKEIT

„[...] Es handelt sich um eine Klaffwunde an seinem Kopf, die bis zum Knochen reicht und seinen Schädel spaltet, er blutet aus seinen beiden Nasenlöchern und seinen beiden Ohren, er leidet an einer Versteifung seines Nackens, es ist eine Erkrankung, mit der ich kämpfen werde.“



Zitat aus dem Papyrus Edwin Smith (Fall 4)⁵⁷

Zusammenfassung

Fragestellung: Das Schädelhirntrauma (SHT) ist weltweit eine Hauptursache für Morbidität und Mortalität. In Deutschland wird bei 34,5 % aller Patienten mit schwerem SHT eine ungünstige Prognose, d.h. Tod oder ein Status vegetativus, beobachtet. Das Gehirn ist in der Lage, sich durch die Proliferation und Differenzierung endogener Progenitoren selbst zu regenerieren, sofern das molekulare Mikromilieu geeignete Voraussetzungen bietet. Der *Pigment Epithelium-derived Factor* (PEDF) ist ein potenter antiangiogener und Tumor-differenzierender Faktor, der zugleich neuroprotektive und neuronal differenzierende Eigenschaften aufweist. Bisher wurden die neurotrophen Effekte von PEDF vornehmlich an *in vitro*-Experimenten nachgewiesen. Die vorliegende Studie hat zum Ziel, die Bioeffekte von PEDF auf die neuronalen Stammzellen der subventrikulären Zone (SVZ) und der subgranulären Zone (SGZ) des Gyrus dentatus (DG) des Hippocampus (HC) an Tieren zu untersuchen, die einem experimentellen SHT unterzogen worden sind. Weiter ist von Interesse, ob PEDF Einfluss auf die Größe und Zellproliferation des Läsionsareals nimmt.

Material und Methodik: Als Versuchstiere dienten 35 männliche Fischer-Ratten mit einem Körpergewicht (KG) von 240-270 g. 30 Ratten wurden einer kontrollierten kortikalen Kontusion (CCII) unterzogen, weitere 5 Tiere (iCON) wurden ohne Trauma oder spezielle Behandlung als Kontrollgruppe eingesetzt. Die Behandlungs-Kontrollgruppe (Ix; n = 9) wurde kontusioniert, erfuhr jedoch keine zusätzliche Behandlung. Den übrigen Tieren wurde während einer Versuchsphase von 8 Tagen über eine miniosmotische Pumpe intraventrikulär PEDF infundiert, entweder in der Konzentration (Konz.) von 5 µg/ml (PEDF 5; n = 7) oder von 10 µg/ml (PEDF 10; n = 8). Den Kontrolltieren (aCSF; n = 6) wurde artifizieller zerebrospinaler Liquor als Vehikel infundiert. Zur Analyse der DNA-Synthese wurde allen Versuchstieren vom Versuchsbeginn am Tag 1 an (CCII; Pumpenimplantation) täglich 5'-Bromo-2'-Deoxyuridin (BrdU) (50 mg/kg KG) injiziert. Nach 8 Tagen wurde die Versuchsreihe durch transkardiale Perfusion beendet, und die Gehirne wurden zur histologischen Untersuchung aufbereitet. Die Ausdehnung des Läsionsareals wurde mit einer Kresylviolett (CV)-Färbung dargestellt und anschließend durch die immunhistochemische Anfärbung mit den Markern BrdU und ED1 untersucht. Die Analyse der Stammzell-Proliferation erfolgte immunhistochemisch mit BrdU und Doublecortin (DCX); ED1 diente der Darstellung inflammatorischer Reaktionen, BrdU detektierte stattgehabte DNA-Synthese und DCX frühe neuronale Vorläuferzellen.

Ergebnisse: Die Ausdehnung des Kontusionsareals war in allen Behandlungsgruppen nahezu identisch. PEDF-behandelte Tiere wiesen keine Zeichen der Toxizität auf. Auch das Ausmaß der inflammatorischen Reaktion zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen. Allerdings wurden nach Behandlung mit PEDF dosisabhängig vermehrt BrdU-gelabelte Zellen in der SVZ nachgewiesen. Der Nachweis der Signifikanz und der Beweis, ob es sich bei den BrdU-positiven proliferierenden Zellen möglicherweise um sich aktiv teilende *Glial Fibrillary Acidic Protein* (GFAP)-positive Typ B-Stammzellen handeln könnte, bleibt weiterführend durch eine Doppelfärbung GFAP/BrdU zu erbringen.

Schlussfolgerung: Es fanden sich keinerlei Anzeichen für eine toxische Schädigung der PEDF-behandelten Tiere, was für eine gute Verträglichkeit der Methodik *per se* und somit für die potentielle Option einer klinischen Anwendbarkeit spricht. Wenngleich die Ausdehnung des Läsionsareals nach CCII nicht positiv beeinflusst wurde, lassen die vorliegenden Daten vermuten, dass die Infusion von PEDF eine proliferationsfördernde Wirkung auf die neuronalen Stammzellen der SVZ hat. Dies könnte letztlich eine gesteigerte Neurogenese nach SHT induzieren.

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| I. | EINFÜHRUNG..... | 6 |
| I.1 | Schädel-Hirn-Trauma (SHT)..... | 6 |
| I.1.1 | Definition und Klassifikation | 7 |
| I.1.2 | Epidemiologische Relevanz | 9 |
| I.1.3 | Pathogenese und morphologische Einteilung..... | 10 |
| I.1.3.1 | Fokaler vs. diffuser Hirnschaden | 11 |
| I.1.3.2 | Primärer und sekundärer Hirnschaden..... | 11 |
| | Metabolische Dysregulation..... | 14 |
| | Exzitotoxizität und oxidativer Stress..... | 15 |
| | Inflammation..... | 16 |
| | Nekrose und Apoptose..... | 16 |
| I.1.3.3 | Regenerationsmechanismen: Neurogenese im adulten Zentralnervensystem (ZNS) | 17 |
| | Neuroplastizität..... | 17 |
| | Adulte Neurogenese – Historie/Chronologie einer wissenschaftlichen Entwicklung..... | 20 |
| | Adulte Neurogenese – Definition und Lokalisation..... | 21 |
| | Adulte Neurogenese – Regulation..... | 23 |
| | Adulte Neurogenese – Funktionelle Bedeutung..... | 24 |
| I.2 | Schädel-Hirn-Trauma im experimentellen Tiermodell..... | 24 |
| I.3 | Pigment Epithelium-Derived Factor (PEDF) | 25 |
| I.3.1 | Charakterisierung und Lokalisation von PEDF | 25 |
| | Gen- und Proteinstruktur..... | 25 |
| | Lokalisation und Proteinexpression..... | 26 |
| I.3.2 | Bioeffekte von PEDF | 27 |
| I.3.2.1 | Allgemeine Funktionen | 27 |
| I.3.2.2 | Funktionen im Gehirn: Neurotrophie und Neuroprotektion | 29 |
| | Neurotrophie..... | 29 |
| | Neuroprotektion..... | 30 |
| I.3.2.3 | Auswirkungen von PEDF auf die Inflammation – eine Kontroverse | 30 |
| I.3.3 | Therapeutisches Potential..... | 32 |
| II. | FRAGESTELLUNGEN UND ZIELE DER STUDIE..... | 34 |
| III. | MATERIAL UND METHODIK..... | 36 |
| III.1 | In vivo-Untersuchung: tierexperimenteller Versuchsaufbau..... | 36 |
| III.1.1 | Versuchstiere und allgemeine Haltungsbedingungen..... | 36 |
| III.1.2 | Equipment und Instrumente..... | 37 |
| III.1.2.1 | Chirurgisches Instrumentarium und Nahtmaterial | 37 |
| III.1.2.2 | Injektion von 5'-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU)..... | 37 |
| III.1.3 | Tiermodelle | 38 |
| III.1.3.1 | Kontrollierte kortikale Kontusion..... | 38 |
| III.1.3.1.1 | Operative unilaterale Trepanation in Vollnarkose..... | 39 |
| III.1.3.1.2 | CCII-Apparatur und Traumatisierung in Vollnarkose..... | 41 |
| III.1.3.2 | Implantation der osmotischen Minipumpe incl. zerebralem Infusions-Kit von ALZET® .. | 44 |
| III.1.3.2.1 | Technische Deskription des Infusionssystems | 44 |
| III.1.3.2.2 | Pumpenbefüllung | 49 |
| III.1.3.2.3 | Operative unilaterale Implantation des Infusionssystems | 52 |
| III.1.4 | Versuchsablauf und Einteilung der Behandlungsgruppen..... | 55 |
| III.1.4.1 | Versuchsablauf | 55 |
| III.1.4.2 | Versuchsgruppen | 56 |
| III.2 | Ex vivo-Untersuchung: histologische Verfahren..... | 57 |
| III.2.1 | Aufbereitung der Gehirne..... | 57 |
| III.2.1.1 | Transkardiale Perfusion, Explantation des Infusionssystems und Gehirnentnahme..... | 57 |

| | | |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| III.2.1.2 | Anfertigen von Gewebsschnitten am Schlittenmikrotom | 58 |
| III.2.2 | Immun-/histochemische Reagentien und ihre Zusammensetzung..... | 60 |
| III.2.2.1 | Puffer-Lösungen | 60 |
| III.2.2.2 | Fixativ-Lösungen..... | 61 |
| III.2.2.3 | Aufbewahrungs-Lösungen..... | 61 |
| III.2.2.4 | Immunhistochemische Reagentien | 62 |
| III.2.2.4.1 | Antikörper | 62 |
| III.2.2.4.2 | Lösungen und Kits..... | 62 |
| III.2.2.5 | Sonstige Reagentien..... | 63 |
| III.2.3 | Histologische Färbemethoden | 64 |
| III.2.3.1 | Histochemie: Kresylviolett (CV)-Färbung | 64 |
| III.2.3.2 | Immunhistochemische Färbetechniken..... | 65 |
| III.2.3.2.1 | Grundlagen der Immunhistochemie | 65 |
| III.2.3.2.2 | 5'-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU)-Färbung..... | 68 |
| III.2.3.2.3 | Doublecortin (DCX)-Färbung | 71 |
| III.2.3.2.4 | ED1 (Makrophagen)-Färbung | 72 |
| III.2.4 | Stereologie-Software-gestützte Datenerhebung | 72 |
| III.2.4.1 | Software | 72 |
| III.2.4.2 | Methodik der Datenerfassung..... | 73 |
| III.3 | Statistische Analyse und Dokumentation der experimentell erhobenen Daten | 76 |
| IV. | ERGEBNISSE | 78 |
| IV.1 | Untersuchungsgut: Gewicht der Tiere und Tierversuch | 78 |
| IV.2 | Statistik | 79 |
| IV.2.1 | Messungen im Kontusionsareal..... | 80 |
| IV.2.1.1 | Extension | 80 |
| IV.2.1.1.1 | Streuung der BrdU-positiven Zellen um die fokale Läsion..... | 80 |
| IV.2.1.1.2 | Streuung der ED1-positiven Zellen um die fokale Läsion | 81 |
| IV.2.1.2 | Zellproliferation..... | 82 |
| IV.2.1.2.1 | BrdU-positive Zellen/Fläche | 82 |
| IV.2.1.2.2 | ED1-positive Zellen/Fläche..... | 85 |
| IV.2.2 | Messungen in den neurogenen Zonen | 87 |
| IV.2.2.1 | Zellproliferation in der SVZ | 88 |
| IV.2.2.1.1 | BrdU-positive Zellen/Fläche | 88 |
| IV.2.2.1.2 | DCX-positive Zellen/Fläche | 90 |
| IV.2.2.2 | Zellproliferation in der SGZ des hippocampalen DG | 93 |
| IV.2.2.2.1 | BrdU-positive Zellen/Fläche | 93 |
| IV.2.2.2.2 | DCX-positive Zellen/Fläche | 96 |
| V. | DISKUSSION | 99 |
| V.1 | Motivation und Ziel der Studie..... | 101 |
| V.2 | Untersuchungsgut und Tierversuch..... | 102 |
| V.3 | Intraventrikuläre Verteilung („Drug Delivery“) von PEDF durch die Alzet®-Pumpe..103 | |
| V.3.1 | Vorteile von Drug Delivery Systemen | 103 |
| V.3.2 | Drug Delivery beim SHT: Pharmakodynamik von PEDF | 104 |
| V.4 | Detektion der Effekte von PEDF | 106 |
| V.4.1 | Auswirkungen von PEDF auf die DNA-Synthese | 106 |
| V.4.1.1 | Detektion neuronaler Zellteilung | 106 |
| V.4.1.2 | PEDF als Induktor von Zellproliferation | 107 |
| V.4.1.3 | PEDF als antiproliferativer Faktor..... | 109 |
| V.4.2 | Einfluss von PEDF auf die posttraumatische zelluläre Immunreaktion | 111 |
| V.4.2.1 | Detektion von Zellen der Mononukleären-Makrophagen-Linie | 111 |
| V.4.2.2 | Auswirkungen von PEDF auf Mikroglia | 111 |
| V.4.3 | Reaktion der DCX-positiven Progenitorzellen auf die PEDF-Applikation | 115 |
| V.5 | Schlussfolgerung | 117 |

| | | |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <i>VI.</i> | <i>ABSCHLUSSBETRACHTUNG: BEDEUTUNG DER PEDF- UND TRAUMA-FORSCHUNG FÜR DIE NEUROWISSENSCHAFTEN</i> | <i>119</i> |
| <i>VII.</i> | <i>LITERATURVERZEICHNIS</i> | <i>120</i> |
| <i>VIII.</i> | <i>ANLAGEN</i> | <i>143</i> |
| | Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen..... | 143 |
| | Danksagung | 147 |
| | Curriculum Vitae | 149 |

I. EINFÜHRUNG

I.1 SCHÄDEL-HIRN-TRAUMA (SHT)

Das menschliche Gehirn ist in vielerlei Hinsicht ein Organ unvergleichlicher Komplexität, struktureller Organisation, aber auch Vulnerabilität. Die neuroanatomische und neurophysiologische Feinabstimmung des Nervensystems ist unabdingbare Grundvoraussetzungen für die ebenso facettenreichen wie komplizierten Hirnleistungen und – funktionen⁴³². Nach Schädigung sind die Kompensationsmöglichkeiten durch zelluläre Regeneration im zentralen Nervensystem (ZNS) stark limitiert. Entsprechend verheerende Auswirkung zeigen „Störungen“ dieser anatomischen Einheit, wie sie das SHT in einer umfassenderen Dimension als jede andere zerebrale Pathologie zeigt.

Kaum ein anderes Gebiet der Neurowissenschaften greift in der Forschung auf eine so alte und medizinisch erkenntnisreiche Historie zurück wie die Neurotraumatologie. Bereits an prähistorischen Funden wurden Verletzungen des Schädels festgestellt, und schon seit vorchristlicher Zeit aus Ägypten sind ausführliche Berichte und Empfehlungen zur Behandlung¹³⁹ überliefert. Als eine Quelle von außerordentlicher Bedeutung erweist sich das altägyptische Papyrus Edwin Smith, auch als „Wundenbuch“ bezeichnet. Dieses medizinische Dokument, eines der ältesten und viel interpretierten Schriftstücke über medizinische Heilverfahren, wurde 1862 in Theben entdeckt und geht vermutlich auf das Ende der zwölften Dynastie in Ägypten zurück. Gegliedert in 48 chirurgische Fallbeispiele werden u.a. Krankheitsentitäten des Viszero- (Fälle 10 – 27) und Neurokraniums (Fälle 1 - 8) bis hin zu Schädelhirnverletzungen mit offenliegendem Hirn präzise geschildert, diagnostisch eingeordnet und deduktiv einer Therapie und Prognose zugeführt. Das empirische Vorgehen zeugt von der Modernität und Wissenschaftlichkeit des Textes im heutigen Sinne⁵⁷.

Trotz der gegenwärtig intensiv beforschten und in ihren Grundzügen mäßig bis gut verstandenen neuro- und histopathologischen Prozesse bei Status post SHT und trotz des in Deutschland mittlerweile hohen Versorgungsstandards durch die Rettungs-, Notfall-, Intensiv- und auch Rehabilitationsmedizin sind noch keine Therapieoptionen wie z.B. potente neuroprotektive Medikamente gefunden, welche das klinische *Outcome* schädelhirntraumatisierter Patienten nachweislich entscheidend verbessern könnten²⁰². Daher sind insbesondere in der Neurochirurgie die Hoffnungen groß, durch die Entwicklung neuroregenerativer Therapiemethoden Areale des menschlichen Gehirns nach Schädigungen durch Traumata oder neurodegenerative Erkrankungen wiederherzustellen und so neuronale Dysfunktionen zu kompensieren. Auf diesem

weiten Feld bisher nur palliativ behandelbarer klinischer Symptome steht – neben neurodegenerativen (z.B. M. Alzheimer und M. Parkinson), zerebrovaskulären (z.B. Schlaganfall und Ischämie), psychiatrischen (z.B. Depression und Schizophrenie) und entwicklungsbedingten Erkrankungen des Gehirns^{7,62} - in der Gegenwart gerade das SHT mehr denn je im Fokus intensiver neurowissenschaftlicher Forschung¹⁶¹.

I.1.1 DEFINITION UND KLASSIFIKATION

Das SHT bezeichnet im Unterschied zu reinen Schädelfrakturen oder Kopfplatzwunden jede durch äußere Gewalteinwirkung entstandene Hirnfunktionsstörung mit oder ohne morphologisch fassbarem Korrelat. In Abhängigkeit vom Schweregrad kann das SHT mit einer strukturellen Verletzung des Gehirns und seiner Hüllen einschließlich des Schädels und der Kopfschwarte assoziiert sein. Differenziert wird zwischen dem geschlossenen und dem offenen SHT, wobei bei letzterem eine Zerreißung der Liquor-umhüllenden Dura mater vorliegt. Das offene SHT kann weiterhin unterteilt werden in eine direkte und eine indirekt offene Form. Bei dem direkt offenen SHT handelt es sich um eine durchgehende Verletzung von Kopfschwarte, Schädelknochen und Dura, d.h. es liegt eine direkte Kommunikation des intra- mit dem extrakraniellen Raum vor. Kommunizieren hingegen der intra- und extrakranielle Raum ausschließlich über die Eröffnung von Nebenhöhlen (z.B. bei frontobasaler Fraktur), so spricht man von einem indirekt offenen SHT³⁷⁰.

Die Art und Dauer der neurologischen Störung bestimmen die Schwere eines SHT^{140,430}. Nach der erlittenen Schwere der Gehirnschädigung wurden in der Zeit nach dem Zweiten Weltkrieg - und werden zum Teil noch heute – klinisch drei Grade unterschieden, die eine ihnen eigene Langzeitprognose erkennen lassen und klinisch klassifiziert werden können. Grad I bezeichnet ein SHT, das sich innerhalb von vier Tagen vollständig zurückbildet, ohne vegetative Störungen zu hinterlassen. SHTs vom Grad II bilden sich innerhalb von drei Wochen zurück, und ab Grad III persistieren die Störungen über die 3. Woche hinaus⁴³⁰.

Glasgow-Komaskala. Die Klassifikation von SHTs erfolgt entsprechend der Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie¹⁰² nach der sog. *Glasgow-Komaskala* (*Glasgow Coma Scale* (GCS)). Die GCS hat sich international zur Feststellung der Schwere eines SHTs durchgesetzt und ist der gebräuchlichste und bekannteste Traumaindex. Teasdale und Jennett haben 1974 gemäß dieser Punkteskala erstmals eine klinische Abschätzung der Hirnfunktionsstörungen zum Untersuchungszeitpunkt gegeben. Es handelt sich um eine halbquantitative Skala, aus deren Verlauf Veränderungen des Wachbewusstseins rasch erfasst werden können. Zunächst beinhaltete die Skala eine Differenzierung in 3 bis 14 Punkte und wurde 1976 auf die aktuell gültigen 15 Punkte erweitert⁴¹⁸.

In die Bewertung gehen die drei Grundfunktionen des Wachbewusstseins (Augenöffnen, sprachliche und motorische Reaktion) ein. Der jeweilige klinische Parameter wird am traumatisierten Patienten untersucht und entsprechend bepunktet (s. Tab. 1), um das SHT graduell in eine leichte (13-15 Punkte), mittelschwere (9-12 Punkte) oder schwere Form (3-8 Punkte) einteilen zu können. Die maximal erreichbare Punktzahl bei vollem Bewusstsein beträgt 15 Punkte, während Tod oder tiefes Koma mit dem Minimalwert von 3 Punkten bewertet werden.

Zur Beurteilung der Verletzungsschwere (nach kardiopulmonaler Stabilisierung, um das Ergebnis nicht durch Hypoxie oder Hypotonie zu verfälschen,) wird der schlechteste binnen 48 Stunden nach dem Trauma erreichte Koma-Score verwertet. Bei pflegebedürftigen, desorientierten Menschen ist die GCS nur eingeschränkt aussagekräftig. Ebenso beschränkt einsetzbar ist die GCS bei Kindern mit einem Alter < 36 Monate aufgrund der fehlenden verbalen Kommunikationsfähigkeit. Deshalb wurde für jüngere Kinder die *Pediatric Glasgow Coma Scale* entwickelt.

Insgesamt erwies sich die Klassifizierung nach der GCS – auch in unterschiedlichen Untersuchungen – als zuverlässig reproduzierbar und von prognostischem Wert und hat sich als SHT-Klassifikationsmodell der Gegenwart bewährt.

| Punkte | Augenöffnung (A) | Verbale Kommunikation (V) | Motorische Reaktion (M) |
|----------|------------------|-----------------------------------|--------------------------------------------------|
| 6 Punkte | - | - | auf Aufforderung |
| 5 Punkte | - | konversationsfähig, orientiert | gezielte Schmerzabwehr |
| 4 Punkte | spontan | konversationsfähig, desorientiert | ungezielte Schmerzabwehr |
| 3 Punkte | auf Aufforderung | unzusammenhängende Worte | auf Schmerzreiz, Beugeabwehr (abnormale Beugung) |
| 2 Punkte | auf Schmerzreiz | unverständliche Laute | auf Schmerzreiz, Strecksynergismen |
| 1 Punkt | keine Reaktion | keine verbale Reaktion | keine Reaktion auf Schmerzreiz |

Tab. 1: Glasgow-Komaskala (nach Jennett und Teasdale, 1974⁴¹⁸); Schweregrad: Leicht: 14-15 Punkte; Mittel: 9-13 Punkte; Schwer: 3-8 Punkte; Maximalscore (A + V + M): 15 Punkte.

Comotio, Contusio und Compressio cerebri. Vom 17. Jahrhundert bis zur Einführung der GCS erfolgte die SHT-Klassifikation nach einer dreistufigen Schweregradeinteilung, die sich an der Dauer der Bewusstlosigkeit, der Rückbildung der Symptome und den Spätfolgen orientiert. Diese graduelle Einteilung ist inzwischen veraltet, da sehr schematisch, und sei ob der Terminologie in älterer Literatur nur ergänzend erwähnt: das SHT 1. Grades (Comotio cerebri, Gehirnerschütterung) ist als eine leichte, gedeckte Hirnverletzung ohne Bewusstlosigkeit bzw. mit Bewusstlosigkeit bis zu einer Stunde definiert. Als klinisches Korrelat finden sich in der Regel

lediglich eine retrograde Amnesie und Nausea. Das SHT 2. Grades (Contusio cerebri, Gehirnprellung) geht mit einer Bewusstlosigkeit bis 24 Stunden, das SHT 3. Grades (Compressio cerebri, Gehirnuquetschung) infolge einer Einklemmung des Gehirns mit einer Bewusstlosigkeit länger als 24 Stunden einher. Während die Spätfolgen der Contusio von der Lokalisation der Hirnschädigung determiniert werden, kennzeichnen den Z. n. Compressio quantitativ variable Bewusstseinsstörungen bis hin zum lange andauernden Koma.

Die fulminanteste Form einer quantitativen Bewusstseinsstörung stellt das Koma dar. Eine Definition des Terminus Koma wurde 1976 als „Brüsseler Komagrad“ vorgeschlagen, die besonders in der Notversorgung auch ohne Punkteskala praktikabel ist^{59,138}. Andere gebräuchliche Skalen zur Erfassung der Verletzungsschwere sind in Tab. 2 ergänzend namentlich angeführt. Keine der etablierten Skalen erfasst allerdings die Komplexität von intrakraniellen Läsionen (wie Lokalisation und Zahl der Kontusionen und Art der intrakraniellen Blutungen u.a.).

| | |
|---------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Abbreviated Injury Scale (AIS) | Erfassung der anatomischen Verletzungen nach SHT klinisch und mittels zerebraler Bildgebung (meist cCT) |
| Revised Trauma Score (RTS) | Quantifizierung der Traumaschwere unter Berücksichtigung der GCS, des systolischen Blutdrucks und der Atemfrequenz |
| Injury Severity Score (ISS) | Prognoseabschätzung durch Einteilung der Verletzungsschwere von sechs Körperarealen (Kopf-Hals, Thorax, Abdomen-Beckenorgane, Arme, Becken-Beine, Wirbelsäule) in jeweils 6 Grade |
| Trauma Injury Severity Score (TRISS) | Bestimmung der Letalitätswahrscheinlichkeit in % |

Tab. 2: Weitere Skalen zur Erfassung des SHT-Schweregrads.

I.1.2 EPIDEMIOLOGISCHE RELEVANZ

In Deutschland gehen Schätzungen von einer Inzidenz von 200 bis 300 Patienten mit intrakraniellen Verletzungen aller Schweregrade auf 100.000 Einwohner jährlich aus. Dies entspricht einer Fallzahl von etwa 230.000 stationären Aufnahmen pro Jahr. Weitere Hochrechnungen belegen für die Inzidenz des schweren SHT (GCS < 9) 16/100.000 Fälle in Deutschland³⁶, was pro Jahr 12.700 Fällen entspricht. Davon versterben 7.700 Patienten und 1.300 überleben mit lebenslanger, schwerer Behinderung³⁶. Internationale⁸⁴ und nationale Studien (Stat. Bundesamt Wiesbaden) mit altersbezogenen Daten zeigen einen Inzidenzgipfel für die Altersklasse 15 bis 25 Jahre von etwa 700 SHTs pro 100.000 Einwohner und Jahr. Zwei weitere Gipfel finden sich bei Kleinkindern (0 bis 1 Jahr) und bei älteren Menschen (> 75 Jahre). Betrachtet man die Geschlechterverteilung, sind Männer etwa zwei- bis dreimal häufiger von SHTs betroffen als Frauen^{84,196,278}. Der Schweregrad der SHTs reicht von leichten Gehirnerschütterungen bis hin zu schwersten Schädelhirnverletzungen, wobei in 15-20 % der Fälle (34.500 bis 46.000) die Diagnose eines schweren SHT (GCS < 9) gestellt wird⁵. Die häufigsten Ursachen für SHTs sind Verkehrsunfälle (≥ 50 %) und, gehäuft bei älteren Menschen, Stürze (ca. 30 %). In mindestens 50 % der Fälle ist das SHT mit einem Polytrauma

vergesellschaftet, wodurch sich die Wahrscheinlichkeit daran zu versterben verdreifacht¹⁴⁷. Das SHT ist in den industrialisierten Ländern weltweit bis zu einem Lebensalter von 45 Jahren die häufigste Ursache für Tod oder schwere Behinderung^{4,177,286}. Internationale Analysen ergeben beim SHT Mortalitätsraten von 14 bis 30 pro 100.000 Einwohner und Jahr³⁸⁹. Eine Datenerhebung des Statistischen Bundesamtes von 1996 ergab die höchste Mortalität in der Altersgruppe der über 75jährigen (24 pro 100.000 Einwohner), wo sie das Dreifache der Mortalität im jungen Erwachsenenalter betrug. Bei Kindern und Jugendlichen wiederum liegt die Mortalität zwei- bis dreimal so hoch wie bei Erwachsenen⁴⁰³.

Das SHT, seine Prävention und Therapie sind nicht nur in der Medizin und damit speziell in der Neurochirurgie von zentraler Bedeutung, sondern haben auch aus gesundheitsökonomischen und sozialintegrativen Aspekten erhebliche Konsequenzen. Zusätzlich zu den aus der Hirnverletzung resultierenden Belastungen für Patienten und Angehörige hat das Gesundheitssystem große sozialmedizinische Kosten zu tragen, die derzeit nicht abschätzbar sind. Bei dem Gros der Verunfallten handelt es sich primär um junge, vor dem Insult gesunde und aktive Menschen, die aus erwerbsfähigen Altersklassen stammen und deren Lebensperspektive sich plötzlich ändern kann. Einer amerikanischen Studie zufolge erholen sich nur ca. 7 % zufriedenstellend²⁷⁶. In den USA rechnet man jährlich mit 70.000 bis 90.000 Patienten, die nach einem SHT eine lebenslange Funktionsstörung behalten²¹⁶. Allein in den Vereinigten Staaten von Amerika werden jährlich näherungsweise 20 Milliarden US \$ für Therapie und Nachsorge ausgegeben²³⁶. Eine grobe Schätzung der „lebenslangen Kosten“ aller US-amerikanischen SHT-Patienten des Jahres 1985 ergab immerhin eine Summe von 37,8 Milliarden \$²⁸⁰. Das schwere SHT stellt damit eine ernste Herausforderung für das Gesundheitssystem im Speziellen und die Gesellschaft insgesamt dar, v.a. wenn man von einer weltweiten Zunahme traumabedingter Todesfälle von 5,1 auf 8,4 Millionen/Jahr bis zum Jahr 2020 ausgeht²⁹⁹.

I.1.3 PATHOGENESE UND MORPHOLOGISCHE EINTEILUNG

Eine Vielzahl experimenteller und klinischer Analysen der Biomechanik intrakranieller Verletzungen sowie der posttraumatischen Gewebeschäden haben ein Grundverständnis für die Pathomechanismen des SHT geschaffen, wie beispielsweise den Einfluss auf Veränderungen im zerebralen Blutfluss (CBF) (Hypo- und Hyperperfusion), Beeinträchtigung der zerebrovaskulären Autoregulation, zerebrale metabolische Dysfunktion, Ödembildung und inadäquate zerebrale Oxygenierung. Darüber hinaus können exzitotoxischer Zellschaden und inflammatorische Prozesse zu Apoptose und nekrotischem Zelltod führen⁴⁴⁵. Dem zugrunde liegt eine komplizierte, noch nicht vollkommen verstandene Kaskade von Interaktionen, die im Moment

des Traumas initiiert wird und auf struktureller, funktioneller, zellulärer und molekularer Ebene abläuft.

I.1.3.1 Fokaler vs. diffuser Hirnschaden

Entsprechend der Art der Gewalteinwirkung auf den Kopf ist das SHT biomechanisch und neuropathologisch in zwei Grundmechanismen zu differenzieren. Bereits Genarelli (1982) unterschied – basierend auf den Arbeiten von Becker (1977) – diffuse von fokalen Hirnschädigungen. Der fokale Hirnschaden wie z.B. eine Kontusion, Risswunde oder/und intrakranielle Blutung ist auf eine Kontaktverletzung zurückzuführen und ist u. U. einer operativen Intervention zugänglich. Der diffuse Hirnschaden hingegen resultiert aus Verletzungen durch Akzelerations-/Dezelerationstraumata, manifestiert sich – ohne operativ behandelbare Raumforderung - generalisiert am Gehirn in Form von diffusem axonalen Schaden (DAI) oder Hirnschwellung und kann bei genügender Schwere zur sofortigen Bewusstlosigkeit des Patienten führen^{33,275,286,305}. Neben dem tiefen initialen Koma ist das Verletzungsmuster des DAI durch Zeichen der Mittelhirnbeteiligung (Beuge- und Strecksynergismen), sowie computertomographisch durch punktförmige Blutungen (im Corpus callosum, Basalganglien und Hirnstamm, häufig verbunden mit subependymalen, ventrikelnahen oder intraventrikulären Blutungen) charakterisiert. Die Daten der *Traumatic Coma Data Bank* (TCDB) belegen den diffusen Hirnschaden als die häufigere Entität. 56 % der Patienten mit schwerem geschlossenem SHT hatten eine diffuse Schädigung, und 42 % wiesen eine fokale Massenläsion auf. Allerdings ist die Mortalitätsrate bei fokaler Läsion mit 39 % grundsätzlich höher als bei einer diffusen Verletzung (24 %).

I.1.3.2 Primärer und sekundärer Hirnschaden

Zwei hinsichtlich ihrer Pathomechanismen und ihrer zeitlichen Abfolge vollkommen unterschiedliche Komponenten bedingen die zuvor beschriebene hohe Mortalität und schlechte klinische Prognose des schweren SHT. Initial, d. h. zum Unfallzeitpunkt, manifestiert sich die direkte mechanische Schädel-Hirn-Verletzung in Form des sog. Primärschadens. Konsekutiv (Stunden bis Wochen nach dem Trauma) setzt sich eine multidimensionale Kaskade pathologischer Prozesse in Gang, die als sog. Sekundärschaden nicht-mechanischen Ursprungs klinisch verzögert in Erscheinung tritt. Letzterer führt als Folge der akuten Verletzung zu weiterem Verlust von Hirngewebe bzw. Nervenzellen. Diese Zwei-Phasen-Differenzierung ist nicht allein wissenschaftlich, sondern gerade klinisch hinsichtlich des therapeutischen Fensters von großer Bedeutung. Während sich die traumatische Primärläsion irreversibel und therapierefraktär zeigt, und ihr ausschließlich präventiv begegnet werden kann, ist die sekundäre

Hirnschädigung therapeutischen Interventionen zugänglich und damit wichtiger Gegenstand der Forschung nach (potentiellen) Therapieoptionen.

Primärschaden. Der zerebrale Primärschaden entsteht im Augenblick des Traumas als unmittelbare Folge der Gewalteinwirkung. Die primären Komplikationen sind abhängig von der Art, Richtung und Lokalisation der einwirkenden Gewalt. Beispiele hierfür sind die fokale Kontusionsnekrose (bei 60 – 100 % aller SHT-Opfer)¹³, der diffuse Axonschaden durch Dehnung und Zerreißung von Nervenfasern in der weißen Substanz^{12,337} oder die Verletzung von Hirngefäßen als spätere Ursache einer Blutung^{34,35}.

Sekundärschaden. Ausgehend von der Primärläsion nach einem (fokalen) traumatischen Insult manifestiert sich der sekundäre Hirnschaden typischerweise in einer Vergrößerung der Parenchymnekrose^{127,232}.

Extrakranielle Ursachen sind vornehmlich die Hypoxämie aufgrund einer respiratorischen Insuffizienz (z.B. infolge von Aspiration), und die arterielle Hypotension (z.B. im Rahmen eines hämorrhagischen Schocks)^{291,77,332}. Beide können im geschädigten und daher vulnerablen Hirnparenchym eine zerebrale Ischämie induzieren und durch den neuronalen und astrozytären Adenosintriphosphat (ATP)-Verlust die Entstehung eines zytotoxischen Hirnödems begünstigen (Versagen der Natrium-Kalium (Na^+/K^+)-ATPase mit konsekutiver intrazellulärer Natrium- und Wasserakkumulation).

Bedeutende intrakranielle Ursachen des zerebralen Sekundärschadens bilden Raumforderungen, z.B. epi- und subdurale sowie intrazerebrale Blutungen¹¹⁷, oder die Genese bzw. Aggravation der posttraumatischen Hirnschwellung mit Ausbildung eines Hirnödems (zytotoxisches und/oder vasogenes Ödem)²⁷⁴ durch Freisetzung von Mediatorsubstanzen (exzitatorische Aminosäuren (Glutamat)^{129,325}, freie Radikale^{179,250,286}, Stickoxid²⁹⁷, Arachidonsäure⁴³³, proinflammatorische Substanzen (Zytokine)¹⁹², Calcium¹³⁰) aus dem geschädigten Hirnparenchym bzw. den zerebralen Gefäßen³⁵. Beide Mechanismen können zum Anstieg des intrakraniellen Drucks (ICP)* mit Abnahme des zerebralen Perfusionsdrucks (CPP) führen (s. Abb. 1) – eine direkte Folge ist die Ischämie und Herniation des geschwollenen Gehirns in den Tentoriumschlitz oder das Foramen occipitale magnum^{336,339}. Nach heutigem Kenntnisstand wird vornehmlich die zerebrale Mangelperfusion für den sekundären Hirnschaden

*Der ICP wird durch die drei Kompartimente im knöchernen Cranium bestimmt: Gehirn (88 %), Liquor (9 %) und Blut (3 – 5 %). Die Monroe-Kellie-Doktrin, formuliert von Burrows 1848, besagt, dass jede Volumenzunahme in einem dieser Kompartimente nur durch die Abnahme einer oder der beiden anderen Komponenten kompensiert werden kann. Im Gegensatz zu allen anderen menschlichen Organen ist der intrakranielle Reserveraum durch den knöchernen Schädel begrenzt, so dass auf eine Raumforderung schnell zunehmender Tendenz ein (ab einer gewissen Toleranzschwelle) exponentieller Hirndruckanstieg innerhalb der Schädelkalotte folgt.

nach Trauma verantwortlich gemacht. Neuropathologische Untersuchungen an Patienten, die durch ein schweres SHT gestorben sind, ergaben bei 88 bis 92 % sekundär ischämische bzw. hypoxische Veränderungen des Hirnparenchyms^{165,166}.

Weitere sekundäre Schädigungsfolgen sind Liquorausstrom nach Zerreißen der Dura mit Ausbildung einer Liquorfistel (meist im Bereich der Schädelbasis)²⁷⁰ und nachfolgender Enzephalitis durch eine Sekundärinfektion von Liquor⁵¹ und Hirnparenchym. Auch eine Verletzung der hirnversorgenden Gefäße (Thrombosen, Aneurysmata und Sinus cavernosus-Fisteln)^{231,393} sowie seltener Epilepsien¹⁷⁶ prägen das klinische Bild nach Sekundärinsult. Daneben spielen auch traumainduzierte neurochemische Veränderungen und Veränderungen in der Neurotransmission (z.B. pathologische Freisetzung und Aufnahme von Neurotransmittern oder Veränderungen in der prä- und postsynaptischen Rezeptorbindung) eine bedeutende Rolle für die Entstehung des Sekundärschadens^{284,286}. Trotz mangelnder Kenntnis der zugrunde liegenden Mechanismen weiß man, dass die neurochemischen Veränderungen im Gehirn u.a. zu einer Störung der Ionenhomöostase (Verschiebung des intra-/extrazellulären Na⁺/K⁺-Gleichgewichtes, Gewebeazidose) mit zytotoxischer Zellschwellung und Verminderung des CBF durch direkte Gefäßmodulation führen³⁹⁷.

Der – hier nur in seinen elementaren Pathomechanismen charakterisierte – zerebrale Sekundärschaden führt den Organismus in einen Circulus vitiosus, der sich, einmal initiiert, selbst unterhält und letztlich zum progredienten Zelltod führen kann.

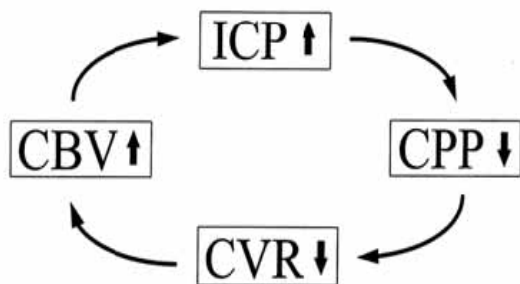


Abb. 1: Bedingt durch die Ausbreitung einer Blutung oder die Entwicklung eines Hirnödems steigt der ICP. Dadurch sinkt der zerebrale Perfusionsdruck (CPP). Es kommt zur Vasodilatation mit Reduktion des zerebrovaskulären Widerstands (CVR). Dadurch nimmt das zerebrale Blutvolumen (CBV) zu, und der ICP steigt erneut an.

Nachfolgend sollen diese den zerebralen Sekundärinsult bedingenden Haupteinflussfaktoren in den pathophysiologischen Gesamtzusammenhang des zerebralen Traumaereignisses gestellt werden. Die Pathomechanismen laufen posttraumatisch in zwei Phasen ab:

Die erste Phase nach SHT ist von der unmittelbaren Gewebsschädigung und der in der Folge auftretenden Dysregulation des CBF und des zerebralen Metabolismus, respektive des zerebralen Sauerstoff (O₂-) und Glucose-Verbrauchs, geprägt. Ähnlich Ischämie-induzierten Prozessen setzt die anaerobe Glykolyse ein, wodurch es zu einer Akkumulation von Laktat kommt. Zudem steigt die vaskuläre Permeabilität, und konsekutiv bildet sich ein Hirnödem aus. Da der zelluläre

Energiebedarf durch den anaeroben Stoffwechsel nicht gedeckt werden kann, erschöpfen sich die ATP-Speicher, und die Energie-abhängigen transmembranösen Ionenpumpen fallen aus⁴⁴⁵.

Metabolische Dysregulation. Das Ausmaß des metabolischen Versagens nach SHT korreliert mit der Schwere des Primärinsults und präsentiert sich daher hinsichtlich seines zeitlichen Auftretens und der räumlichen Ausdehnung sehr heterogen^{80,90,104,151}. Häufig sind sowohl die Metabolisierungsrate als auch der zerebrale Energiestatus (gemessen an den Gewebs-Konzentrationen von Phosphokreatin und ATP bzw. indirekt an der Laktat-Pyruvat-Ratio) infolge eines SHT gestört. Der Primärschaden führt zu einer mitochondrialen Dysfunktion mit einer Reduktion des Zyklus der Atmungskette und der ATP-Produktion, einer verminderten Verfügbarkeit des nikotinischen Coenzym-Pools und einer intramitochondrialen Calcium-Überladung^{417,438}. Charakteristischerweise kann beim SHT auch ein Hypermetabolismus von Glucose auftreten, der durch einen transienten aber massiven transmembranösen Ionenfluss getriggert wird^{49,76}. Es resultiert eine Neuroexzitation, der nicht durch einen adäquaten CBF-Anstieg gegenreguliert werden kann. Auf diese Weise fördert die Entkopplung von CBF und Metabolismus die Ausbildung ischämischer Sekundärinsulte. Schwere posttraumatische Metabolismusstörungen sind mit einer schlechten klinischen Prognose assoziiert⁴⁵⁰.

Zerebrale Hypoxie. Die unterschiedlichen vaskulären und hämodynamischen Prozesse nach SHT verursachen ein Ungleichgewicht zwischen der zerebralen O₂-Zufuhr und seinem Verbrauch. Allen Abläufen ist allerdings der Endpunkt, die Hypoxie des Hirngewebes, gemeinsam. Posttraumatische O₂-Druckmessungen im Hirngewebe haben 15 bis 10 mmHg PtO₂ als kritischen Schwellenwert ermittelt, unter dem es zur Infarzierung von neuronalem Gewebe kommt^{211,361}. Auftreten, Dauer und Ausmaß der Gewebshypoxie korrelieren mit der Prognose.

Hirnödem. Die posttraumatische Ausbildung von Hirnödemen ist wesentlich an der Reduktion der Gewebsperfusion und folglich der Aggravation des sekundären Hirnschadens beteiligt. Die aktuelle Hirnödem-Klassifikation orientiert sich an dem strukturellen Schaden bzw. der (durch die Primär- und Sekundärschädigung verursachten) Imbalance von Wasser und Osmose. Differenziert wird zwischen dem vasogenen und dem zytotoxischen Hirnödem. Das vasogene Ödem entsteht infolge des Zusammenbruchs der Bluthirnschranke (BBB). Die Endothelzellschicht der Hirngefäße ist eine essentielle Struktur der BBB und kann durch mechanische und autodigestive Einflüsse oder funktionell destruiert werden. Auf die Zerstörung der zerebrovaskulären Endothelzellwand folgt ein unkontrollierter Ionen- und Proteintransfer aus den intravaskulären in die extrazellulären (interstitiellen) Hirnkompartimente, der eine Anreicherung von Wasser nach sich zieht. Aus anatomischer Sicht vergrößert diese Pathologie das Volumen des Extrazellulärraums^{101,434}. Ungeachtet der Integrität des Gefäßendothels entsteht das zytotoxische Hirnödem durch eine intrazelluläre Wasseranreicherung in Neuronen,

Astrozyten und Mikroglia. Auslöser ist hier zum einen die gesteigerte Membranpermeabilität für Ionen, des Weiteren der Defekt von Ionenpumpen aufgrund der Energieerschöpfung und zum anderen die zelluläre Resorption von osmotisch aktiven gelösten Substanzen^{397,434}. Obgleich das zytotoxische Ödem bei SHT-Patienten häufiger zu sein scheint als das vasogene, gehen beide Entitäten mit einem ICP-Anstieg und ischämischem Sekundärinsult einher^{272,274}.

Das zweite Stadium der nach SHT initiierten pathophysiologischen Kaskade ist durch eine letzte Membran-Depolarisation charakterisiert, die mit einer exzessiven Freisetzung exzitatorischer Transmittersubstanzen wie z.B. Glutamat und Aspartat einhergeht. Ferner folgt auf die Aktivierung spannungsabhängiger Calcium- und Natrium-Kanäle ein Calcium- und Natrium-Einstrom, der intrazellulär katabole, autodigestive Prozesse in Gang setzt: Calcium aktiviert Lipid-Peroxidasen, Proteasen und Phospholipasen, welche wiederum die intrazelluläre Konzentration an freien Fettsäuren und freien Radikalen erhöhen. Zusätzlich führt die Aktivierung von Kaspasen (*ICE-like proteins/CysteinyI-aspartase-specific-protease*), Translokasen und Endonukleasen zu fortschreitenden strukturellen Veränderungen der biologischen Membranen und der nukleosomalen DNA (DNA-Fragmentierung und Inhibition von DNA-Reparaturmechanismen). In der Zusammenschau dieser Prozesse kommt es zum Membranabbau von vaskulären wie zellulären Strukturen und letzten Endes zum nekrotischen oder programmierten (d.h. apoptotischen) Zelltod⁴⁴⁵.

Exzitotoxizität und oxidativer Stress. An der Primär- wie Sekundärschädigung nach Trauma ist die exzessive Freigabe exzitatorischer Aminosäure(AS)-Neurotransmitter, insbesondere von Glutamat, beteiligt^{64,357}. Das Übermaß an extrazellulärem Glutamat erregt Neuronen und Astrozyten und resultiert in einer Überstimulation von ionotropen und metabotropen Glutamatrezeptoren mit konsekutivem Kalzium-, Natrium- und Kaliumfluss^{135,461}. All diese Vorgänge triggern katabole Prozesse einschließlich des Zusammenbruchs der BBB und münden in einen Circulus vitiosus ein: die Zellen versuchen durch eine Ankurbelung der Na^+/K^+ -ATPase-Aktivität die Ionengradienten zu kompensieren und steigern dadurch wiederum den metabolischen Bedarf. Fluss und Metabolismus werden so auf zellulärer Ebene entkoppelt^{101,307}.

Durch die Bildung reaktiver O_2 -Spezies (freie O_2 -Radikale und verwandte Entitäten wie Superoxide, Hydrogenperoxid, Stickstoffmonoxid und Stickstoffperoxid) entsteht infolge des SHT oxidativer Stress. Ursache für die Radikalbildung sind die Exzitotoxizität und die Erschöpfung des endogenen Antioxidantien-Systems (z.B. Superoxiddismutase, Gluthationperoxidase und Katalase). Dies induziert die Peroxidation zellulärer und vaskulärer Strukturen, Proteinoxidation, DNA-Spaltung und die Inhibition der mitochondrialen Elektronentransportkette^{42,79,375}. Inflammatorische Prozesse und Apoptoseprogramme folgen⁷⁹.

Inflammation. Eine gewisse Ähnlichkeit zu den ischämischen Reperfusionsschäden weisen die *post hoc* auftretenden, komplexen immunologischen und inflammatorischen Reaktionen des Hirngewebes auf. Primär- wie auch Sekundärinsulte aktivieren binnen Stunden die Freisetzung zellulärer Mediatoren wie proinflammatorischer Zytokine (z.B. Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), Interleukin (IL)-1- β und IL-6), Prostaglandine, freier Radikale und Komplementfaktoren. Diese Prozesse induzieren Chemokine und Adhäsionsmoleküle, die wiederum synergistisch Immun- und Gliazellen aktivieren^{263,335}. Zusammen mit Makrophagen und T-Zelllymphozyten infiltrieren sie das verletzte Gewebe⁴⁶⁶ und räumen das geschädigte und das an die Kontusion angrenzende Gewebe ab. Innerhalb von Stunden bis Tagen und Wochen synthetisieren Astrozyten durch die Produktion von Mikrofilamenten und Neutropinen letztlich Narbengewebe¹²⁸. Durch die freigesetzten neurotoxischen Mediatoren sowie indirekt durch die Ausschüttung von Stickstoffmonoxid und Zytokinen schreitet der Gewebeschaden fort. Zusätzlich wird durch die Freisetzung von Vasokonstriktoren (Prostaglandine und Leukotriene), BBB-Störung, Ödemformation und durch die Obliteration mikrovaskulärer Strukturen die Gewebepfusion weiter reduziert, und der sekundäre Hirnschaden aggraviert.

Nekrose und Apoptose. Nach SHT können zwei unterschiedliche Formen des Zelltods auftreten: Nekrose und Apoptose, der programmierte Zelltod. Die Nekrose tritt als Reaktion auf schweren mechanischen oder ischämisch-hypoxischen Gewebeschaden auf, wobei es zu einer exzessiven Freisetzung exzitatorischer AS-Transmitter und zu metabolischem Versagen kommt. Anschließend induzieren Phospholipasen, Proteasen und Lipidperoxidasen die Autolyse biologischer Membranen. Der anfallende Zelldetritus wird als „Antigen“ (Ag) erkannt und durch inflammatorische Prozesse abgeräumt, so dass Narbengewebe zurückbleibt. Im Gegensatz dazu präsentieren sich die Neuronen, die der Apoptose ausgesetzt sind, während der posttraumatischen Phase morphologisch intakt. Der programmierte apoptotische Zelltod tritt Stunden oder Tage nach dem Primärinsult auf, erfordert grundsätzlich Energiezufuhr und basiert auf einer Imbalance natürlich auftretender pro- und anti-apoptotischer Proteine. Als wichtigste Mediatoren wurden Kaspasen und spezielle Proteasen aus der Familie der *Interleukin-converting-Enzyme* identifiziert^{78,125}, die aktiv - über die Lyse nukleärer Membranen, Chromatinkondensation und DNA-Fragmentation - eine diskret progrediente Membrandestruktion initiieren. Die kleinen Partikel aus kondensiertem intrazellulärem Material (sog. „*apoptotic bodies*“) werden von der schrumpfenden Zelle durch exzitotoxische Mechanismen abgebaut. Die klinische Bedeutung der Apoptose liegt in dem verspäteten Auftreten von Zellschäden, was potentiell eine Option für (anti-apoptotische) Interventionen darstellen könnte^{302,435}.

I.1.3.3 Regenerationsmechanismen: Neurogenese im adulten Zentralnervensystem (ZNS)

Die Regenerationskapazität des ZNS ist im Unterschied zu vielen anderen Geweben des menschlichen Organismus^{61,185,381} stark limitiert. Das Gehirn von Säugetieren ist in seiner zellulären Architektur, den neuronalen Netzwerken sowie seiner funktionalen Lokalisation und Integration ein derart komplexes biologisches System, dass Schädigungen jeglicher Modalität nicht in suffizientem Maße durch autogene Reparaturmechanismen kompensiert werden können. Am häufigsten infausten Krankheitsverlauf von SHT-Patienten wird offensichtlich, dass die postmitotischen Regenerationsprozesse des schwer traumatisierten Gehirns trotz einer gewissen morphologischen und strukturellen Dynamik keine vollständige Reorganisation und Genesung erlauben (s.u.).

Neuroplastizität. Mit Beginn der modernen Neurowissenschaft im späten 19. Jahrhundert haben Pioniere wie William James²⁰¹, Ramón y Cajal³⁴⁹ oder Donald Hebb¹⁸⁴ in der Verhaltensforschung und in histologischen Studien richtungweisende Erkenntnisse über die „regenerative Formbarkeit“ des Gehirns gewonnen^{206,327,363,371,447}. Der italienische Psychiater Ernesto Lugaro hat für diese Konzepte 1906 den Terminus der neuronalen Plastizität geprägt⁵⁰. Der vitale Prozess der zerebralen Plastizität beschreibt das dynamische Potential des Gehirns, sich während der Ontogenese, bei Lernprozessen (durch Übung und Erfahrung), d. h. unter physiologischen Bedingungen, oder zur Funktionserholung in Folge von Schädigungen lebenslanglich selbst zu reorganisieren und durch eine Veränderung der anatomo-funktionalen, interneuronalen Beziehungen zu adaptieren. Die Einführung der funktionellen Neurobildgebung und der Fortschritt in neurophysiologischen Verfahren haben in der letzten Dekade das Studium der diesem Phänomen *in vivo* zugrunde liegenden pathophysiologischen Vorgänge ermöglicht^{118,207,353}. Das plastische Potential des ZNS basiert zum einen auf der Fähigkeit von Neuronen, anhand von zellulären synaptischen Umformungsprozessen die Signalkonduktion zu beeinflussen und somit Information zu speichern. Dies impliziert sowohl die Umformung bereits vorhandener synaptischer Verbindungen^{148,391}, als auch die Ausbildung neuer struktureller Verbindungen durch axonales Aussprossen nach Läsionen (strukturelle Plastizität)⁹². Neben dieser mikroskopischen Zustandsänderung existiert auch eine sog. funktionelle Neuroplastizität auf kortikaler Funktionsebene. Diese meint die Verlagerung von Funktionen umschriebener geschädigter Hirnareale in angrenzende intakte Hirnregionen³⁵⁴. In eingeschränktem Maße sind die benachbarten Areale zur Funktionsübernahme befähigt. Eine zelluläre Plastizität im Sinne des direkten Ersatzes untergegangener Zellen ist im ZNS hingegen nur in geringem Maße ausgeprägt, denn Neurone des adulten Gehirns sind terminal differenzierte postmitotische Zellen. Der Zustand der terminalen Differenzierung impliziert den Ausstieg aus dem Zellzyklus³⁶⁶. Der genaue Mechanismus, der die Neurone im postmitotischen Stadium hält,

ist allerdings nicht geklärt³⁴². Komplexe *in vivo*- und *in vitro*-Untersuchungen von Patienten mit schwerem SHT und Autopsie nach Exitus letalis belegten hohe Apoptoseraten in den perikontusionellen Arealen²⁹³. Der Nachweis einer posttraumatischen, zerebralen zellulären Plastizität wurde bisher auch in Obduktionen nicht erbracht.

Neuronale Stammzellen. Ontogenetisch geht jede Zelle eines Organismus aus einer Stammzelle hervor. Nämliche sind in allen bisher untersuchten Geweben², wenngleich in geringer Zahl, detektierbar. Eine Stammzelle bezeichnet eine undifferenzierte Zelle, die durch Zellteilung entweder zwei neue Stammzellen hervorbringen kann (symmetrische Teilung) oder aber eine neue Stammzelle und eine Vorläuferzelle (Progenitor-/Präkursorzelle), welche Ausgangspunkt für die Ausdifferenzierung in eine oder mehrere Zelltypen ist (asymmetrische Teilung). Definitionsgemäß zeichnet sie sich neben ihren besonderen Fähigkeiten zu Proliferation und Selbsterneuerung auch durch ihr Differenzierungspotential in funktionelle Zellen des jeweiligen Organs aus^{180,443}. Das einzigartige Charakteristikum dieser Zellen gründet sich auf ihrer Befähigung, sich in fast alle Zelltypen entwickeln zu

können. Diese sog. Potenz einer Stammzelle wird nach ihrer Vielfalt an Differenzierungsmöglichkeiten, respektive an Zelltypen, bemessen, die aus ihr durch asymmetrische Teilung direkt oder über Zwischenstufen entstehen können. Sie erlaubt eine Klassifikation der Stammzellen:

die Zygote kann sich als einzige Stammzelle in sämtliche Zelltypen differenzieren und dabei (wenngleich in ihrer Selbsterneuerung limitiert) einen vollständigen, neuen Organismus, einschließlich des zentralen und peripheren Nervensystems, ausbilden. Diese Eigenschaft beschreibt der Begriff der Toti-/Omnipotenz. Während der nächsten Furchungsteilung der Zygote entstehen aus dieser im nächsten Schritt pluripotente embryonale Stammzellen der Blastozyste, die zwar verschiedene Differenzierungswege einschlagen und somit multiple Zell- und Organtypen aller drei Keimblätter (Ento-, Meso-, Ektoderm) hervorbringen können, jedoch nicht mehr den Gesamtorganismus. In der weiteren Entwicklung entstehen aus den embryonalen Stammzellen gewebsspezifische, sog. multipotente Stammzellen, die nicht nur im Embryo

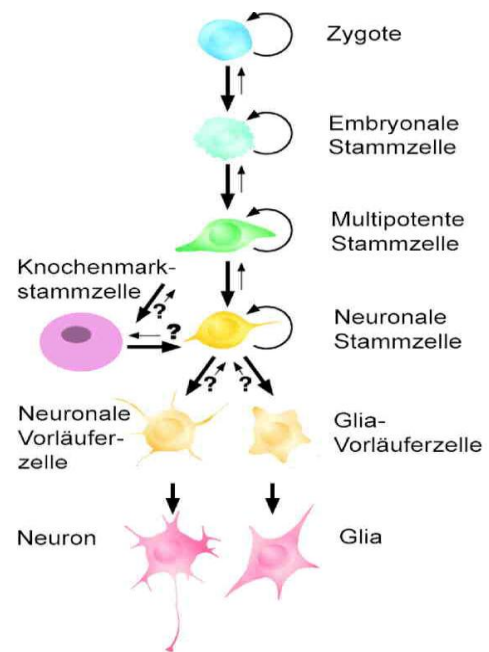


Abb. 2: Differenzierungswege neuronaler Stammzellen. Das Schema verdeutlicht die Eigenschaften neuronaler Stammzellen wie Proliferation, Selbsterneuerung und Fähigkeit zur Differenzierung in Gehirnzellen (modifiziert nach¹⁴¹).

sondern auch als adulte Stammzellen über die gesamte Lebensspanne im Körper persistieren. Diese Multipotenz impliziert die Fähigkeit, zumindest alle Zelltypen des jeweiligen Keimblatts und somit des betreffenden Organs ausbilden zu können. Aus der multipotenten Stammzelle entstehen unipotente Progenitorzellen des jeweiligen Gewebes, die nur noch eine limitierte Kapazität zur Selbsterneuerung besitzen, deren weiterer Verlauf jedoch derart determiniert ist, dass sie viele Eigenschaften der differenzierten Zielzelle aufweisen, ohne voll funktionsfähig zu sein. Erst die daraus entstandene, terminal differenzierte Zelle kann alle Funktionen der spezifischen Gewebeanforderungen erfüllen^{141,142,344} (s. Abb. 2).

Im Hinblick auf das ZNS entstehen aus den embryonalen Stammzellen des Neuroektoderms im werdenden Gehirn und Rückenmark neuronale Progenitorzellen, die eine der drei Zelllinien des Hirngewebes, nämlich Neuronen und gliale Zellen (Astrozyten und Oligodendrozyten), hervorbringen können²⁸⁷.

Die Detektion und Charakterisierung neuronaler Stammzellen gestaltet sich diffizil, da es bisher - im Gegensatz zu anderen Stammzelltypen^{392,406} - an der Identifikation eines spezifischen Zellmarkers mangelt. Einige Proteine, darunter Nestin²⁴⁸, Musashi-1²²⁸, Mcm2²⁷⁷ und GFAP¹¹¹, scheinen hierfür zwar potentiell in Frage zu kommen, allerdings erfasst keiner dieser „Marker“ alle neuronalen Stammzellen. Vielmehr werden diese nur von Subfraktionen der Zellen zu einem bestimmten Differenzierungszeitpunkt exprimiert.

Die Frage nach der morphologischen Herkunft neuronaler Stammzellen wird kontrovers diskutiert: Wissenschaftler sind sich uneins, ob es sich um eine Population multipotenter, subependymaler Zellen handelt, die den glialen Marker GFAP, ein Protein, das vornehmlich in Astrozyten exprimiert wird, besitzen^{111,199}, oder ob Ependymzellen in der Wand der Ventrikel Stammzeleigenschaften aufweisen²⁰⁹ (Klassifikation, s.u.).

Weiter auf der Suche nach Grundlagen für die neuronale Stammzelldefinition erwies sich auch der Herkunftsort der Zellen als kein valides Kriterium, da es gelungen ist, aus Stammzellen von Knochenmark²⁹⁰, Nabelschnurblut³⁶⁹ und anderen Organen³¹⁷ Zellen mit neuronalem Phänotyp zu kultivieren. Noch ist allerdings unklar, welche Signalkaskaden in der Zelle aktiviert oder supprimiert sein müssen, damit neuronale Stammzellen einerseits ihre Stammzeleigenschaften wahren können bzw. andererseits zu Gehirnzellen differenzieren.

Aus dem ZNS isolierte Zellen lassen sich *in vitro* unter definierten Kulturbedingungen und unter Zusatz bestimmter Wachstumsfaktoren (wie z.B. *Epidermal Growth Factor* (EGF) oder *Fibroblast Growth Factor* (FGF)-2) lange Zeit in Kultur expandieren und zu Proliferation, Selbsterneuerung und Differenzierung anregen, ohne diese Eigenschaften zu verlieren^{298,319,320,355,407}. In dieser streng definierten Umgebung ist es möglich, eine große Anzahl von Zellen zu gewinnen und sie experimentellen Zuständen zu exponieren. Die Isolation von Stamm- und Vorläuferzellen gelang

bei Nagetieren u.a. für Zellen aus dem fötalen und adulten ZNS, einschließlich des Neocortex und HC, sowie aus dem Rückenmark^{93,281,321,377} und auch aus verschiedenen Hirnregionen am humanen Nervengewebe des ZNS^{30,210,240}. Auch *in vivo* ist es möglich, neuronale Stammzellen (mit Hilfe von Proliferationsmarkern wie BrdU) und ihr Differenzierungspotential (durch den Nachweis von für die Stammzellnachkommen typische Markerproteine) zu untersuchen (s.u.). Auf diese Weise wurden im Säugetier-Gehirn zwei germinativ hochaktive Gehirnareale identifiziert, in denen über das gesamte Lebensalter hinweg neue Nervenzellen generiert werden^{18,20,66,238} (Lokalisation, s.u.). Nach aktuellem Forschungsstand ist im Säugerhirn ubiquitär von der Existenz neuronaler Stammzellen auszugehen; diese ruhenden Stammzellen bringen jedoch unter physiologischen Bedingungen keine neuronalen Zelltypen hervor, sondern differenzieren sich nur auf den Stimulus akuter Läsionen bzw. unter bestimmten Kulturbedingungen *in vitro* zu Neuronen aus^{30,31,209,301}. Die in diesen nicht-neurogenen Zonen wie beispielsweise dem Rückenmark (dessen neugebildete Zellen glialen Ursprungs sind¹⁹³) angesiedelten Nervenzellen sind Produkt embryofetaler oder früh postnataler Neurogenese^{233,345-347}.

Wenngleich die physiologische Bedeutung der neuronalen Stammzellen für Prozesse wie Altern, Lernen und Kognition bislang nicht vollständig geklärt sind, nähren diese Resultate die Hoffnung auf einen therapeutischen Einsatz neuronaler Stammzellen am Nervensystem^{227,251}. Die Ressourcen adult gebildeter zentralnervöser Zellen, Stamm- und Vorläuferzellen des ZNS, verbunden mit dem weitreichenden Potential dieser Zellen sowie der Tatsache, dass sie ihre Stammzell-Eigenschaften fast über die gesamte Lebensspanne eines Menschen wahren können, sind gegenwärtig Gegenstand intensiver, weil vielversprechender Forschung, schwebt doch die Zukunftsvision im Raum, diese endogenen – oder exogen applizierten – Kapazitäten eines Tages zur vielseitigen Therapie neurochirurgischer, neurologischer und psychiatrischer Krankheitsentitäten wie z.B. beim SHT aufbieten zu können^{17,67,144,153,209,210,242,244,383,396,419,444}.

Adulte Neurogenese – Historie/Chronologie einer wissenschaftlichen Entwicklung. Der spanische Neuroanatom Santiago Ramón y Cajal konstatierte Anfang des letzten Jahrhunderts in seinem Dogma, dass im adulten ZNS weder axonales Wachstum noch Zellersatz durch Proliferation von Neuronen möglich seien³⁵⁰. Er belegte mit histologischen Untersuchungen an Säugetiergehirnen, dass sich die strukturellen Veränderungen des ZNS nach der Geburt ausschließlich auf den Verlust von Nervenzellen beschränkten, und prägte mit der Hypothese, „alles könne sterben, nichts regenerieren“ die wissenschaftlichen Annahmen seiner Zeit^{48,350}. Entgegen großem Widerstand ob des gemeinhin akzeptierten Paradigmas von weitgehender Stabilität der zellulären Elemente des Nervensystems zeigte Joseph Altman 1960 mit der neu etablierten Methode der [3H]-Thymidin-Autoradiographie, einem Marker für proliferierende Zellen, dass sich teilende

Zellen im erwachsenen ZNS bei verschiedenen Spezies in weiter Verbreitung vorkommen¹⁹⁻²². Neben einer Vielzahl von anatomischen Strukturen wurde die Genese neuer Neuronen im Bulbus olfactorius (OB), in der SVZ, dem HC und dem zerebralen Kortex der adulten Ratte und Katze konstatiert²⁰. [3H]-Thymidin wird von Zellen aufgenommen, die sich in der S-Phase auf die Mitose vorbereiten, so dass Lokalisation und Zeitpunkt „neugeborener“ Zellen bestimmt werden können. Bei der Darstellung sich teilender Zellen konnte erstmals zwischen „alten“, d. h. in der Embryogenese entstandenen, und „neuen“, im adulten Organismus gebildeten Neuronen differenziert werden. Mit dieser Methode war allerdings weder die Zahl der neu gebildeten Zellen hinreichend genau bestimmbar, noch war eindeutig zu beweisen, ob es sich bei den neu entstandenen Zellen wirklich um Neurone oder um Gliazellen handelte. Die Theorie von adulter zellulärer Plastizität wurde von Kaplan und Hinds, die mit Einführung der Elektronenmikroskopie die ultrastrukturellen Charakteristika von Neuronen nachwiesen^{186,187,213}, und Nottebohm, der bei erwachsenen Kanarienvögeln beispielsweise eine Korrelation zwischen Neurogenese im dorsomedialen Striatum und dem Erlernen neuer Lieder der Singvögel feststellte^{38,39,154}, wissenschaftlich weitergeführt. Damit war beobachtet, dass exogene Faktoren für die Regulation der Neurogenese biologisch und funktionell von Bedeutung sind.

Seit den 90er Jahren⁶⁶ erlebt die Erforschung der adulten Neurogenese eine Renaissance. Meilensteine in der Neurowissenschaft bildeten die Etablierung der *in vitro*-Kultivierung von Stammzellen aus dem adulten Gehirn^{143,355} sowie die Einführung des synthetisierten Thymidinanalogs BrdU als nicht-radioaktivem, immunhistochemisch detektierbarem Zellzyklusmarker^{87,97,388}. Zudem verbesserte die konfokale Mikroskopie die Phänotypisierung der Zellen durch Verwendung multipler Marker und die qualitative Auswertung der Neurogenese *in vivo* entscheidend^{225,238}. Bis heute ist das BrdU-Verfahren zur Markierung und Visualisierung sich teilender Zellen – nicht unbestrittener Weise^{124,344,442} – die am weitesten verbreitete und zuverlässige Methode zur Darstellung und Erforschung der Neubildung neuronaler Zellen¹¹⁵. Durch die Beweiskraft dieser Untersuchungsverfahren ist die Existenz kontinuierlicher Neurogenese im Gehirn von erwachsenen Säugetieren mittlerweile etabliert und allgemein akzeptiert.

Adulte Neurogenese – Definition und Lokalisation. Die adulte Neurogenese ist durch die Abfolge bestimmter Entwicklungsschritte charakterisiert, die von der Teilung einer neuronalen Stamm- oder Progenitorzelle hin zu einem reifen, funktionell integrierten Neuron führen. Im Gegensatz zur früheren Lehrmeinung³⁵¹ wurde in den letzten Dekaden nachgewiesen, dass in bestimmten Regionen des erwachsenen Säuger-Gehirns^{20,163,234} und in der Folge auch in dem des Menschen¹²⁶ zeitlebens neue Zellen generiert werden, die sich zu Nervenzellen, Astroglia und Oligoglialzellen entwickeln können. Adulte neuronale Stammzellen konnten aus mehreren Regionen des

erwachsenen Säugerhirns isoliert werden. Die adulte zentralnervöse Zellneubildung weist regionale Unterschiede sowohl quantitativer als auch qualitativer Art auf. Unter physiologischen Bedingungen werden Neuronen nur in bestimmten Gebieten des ZNS gebildet. Nach gegenwärtigem Kenntnisstand ist insbesondere zwei Arealen des adulten Gehirns, den sog. neurogenen Zonen, die kontinuierliche spontane Neurogenese bis ins hohe Erwachsenenalter eigen^{141,222,224,313,317}: dies ist zum einen das System SVZ, Rostraler Migratorischer Strom (Rostraler Migrationstrakt, RMS) und OB^{20,21,25,213,259}, zum anderen der DG des HC^{20,21,66,213,437} (s. Abb. 3 und Abb. 4). Die differenzierten neuronalen Stammzellen scheinen sich in OB und HC in funktionelle Neuronenkreise zu integrieren und elektrisch aktiv zu sein^{437,446}.

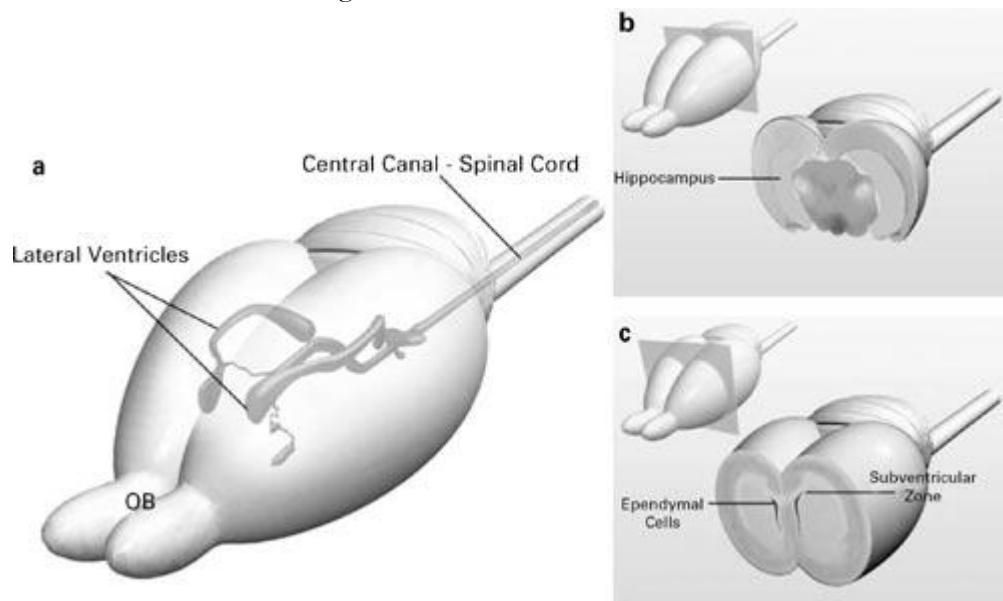


Abb. 3: Neurogene Zonen des adulten Säugetier-ZNS. Neuronale Stammzellen sind in zwei unterschiedlichen Arealen des adulten ZNS identifiziert worden: in der SVZ des lateralen Ventrikels und der SGZ des DG im HC. In (a) ist das Ventrikelsystem mit seinem Übergang in den Zentralkanal des Rückenmarks dargestellt. Koronarschnitte zeigen die Lokalisation (b) des HC und (c) der ependymalen Zellschicht mit der anliegenden SVZ des lateralen Ventrikels (aus⁸¹).



Abb. 4: Neurogene Zonen und neurale Stammzellen des adulten Gehirns. Neuronale Stammzellen befinden sich im HC (rot) und in der lateralen Ventrikelwand (blau). Sie erneuern sich selbst (symmetrische Teilungen) und bilden in asymmetrischen Teilungen die Vorläufer von reifen Gliazellen und Neuronen (modifizierte 3D-Abbildung aus¹⁸⁸).

Adulte Neurogenese – Regulation. Bis heute wurde eine Vielzahl an Faktoren identifiziert, die *in vivo* zu einer Steigerung oder Abnahme der adulten Neurogenese führen²²⁰. Dabei sind weder alle Mechanismen erfasst, noch die Regulationsprozesse auf molekularer wie zellbiologischer Ebene hinreichend verstanden. Der Vollständigkeit wegen seien im Folgenden die bisher bekannten Einflussfaktoren orientierend angeführt. Die bisher beschriebenen Regulatoren adulter Neurogenese lassen sich drei Gruppen zuordnen:

- zum einen greifen einzelne chemische Komponenten, insbesondere Wachstumsfaktoren, Neurotransmitter und bestimmte Pharmaka/Hormone, regulatorisch ein. (Beispielsweise wurde für Glucocorticoide ein inhibitorischer, jedoch für Östrogene ein proliferativer Effekt auf die Neurogenese konstatiert^{158,160,413}.)
- Weiter sind systemische Parameter wie Alter^{224,238,372}, Stress¹⁶², genetische Prädispositionen, Ernährung^{226,238,245} sowie physische Aktivität und exogene Faktoren der unmittelbaren Umgebung („*enriched environment*“^{225,364,436}) Bedeutung tragend und
- schließlich wirken sich auch pathophysiologische Vorgänge bei Gehirnschädigung wie z.B. selektive kortikale Läsionen²⁶⁷, Ischämie/Schlaganfall^{257,408} oder epileptische Anfälle³²⁴ nachhaltig auf die Neubildung von Nervenzellen in den neurogenen Regionen des Gehirns aus (Zunahme der Neurogeneserate).

Auf eine detaillierte Darstellung wird in diesem Rahmen verzichtet. Im Zusammenhang mit der Methodik der vorliegenden Arbeit sei stellvertretend nur hervorgehoben, dass die intraventrikuläre Infusion verschiedener Wachstumsfaktoren (z.B. EGF, FGF-2, *Brain-derived Neurotrophic Factor* (BDNF) oder *Insulin-like Growth Factor* (IGF)-1) nachweislich signifikante Effekte auf das neuronale Proliferations- und Differenzierungsverhalten zeigte^{9,88,239,467}.

Die Erkenntnis einer ständigen neuronalen Zellneubildung im adulten Gehirn wirft die Frage nach dem Schicksal dieser Zellen auf. Tatsache ist, dass die Zielstrukturen beider neurogenen Zonen ein lebenslanges Wachstum aufzeigen. Obgleich bisher keine exakte Quantifizierung der realen täglichen Produktion an neuen Zellen in diesen Regionen durchgeführt wurde, deutet eine Reihe von Untersuchungsergebnissen darauf hin, dass die Zahl der Zellneubildungen die Zellzunahme deutlich übersteigt^{40,41,214}. Diese Differenz legt nahe, dass der täglichen Proliferation ein Eliminierungsprozess gegenüberstehen muss, um einer vermeintlichen Überproduktion entgegenzuwirken. Es ist belegt, dass ein nicht unerheblicher Teil der Tochterzellen proliferierender Vorläuferzellen binnen kurzer Zeit wieder abstirbt^{53,221,225}, sowohl im DG⁹⁵ als auch im Bereich des OB überleben nur etwa 50 % der neugebildeten Nervenzellen^{331,448}. Durch Selektionsvorgänge werden die wirklich benötigten Zellen aus den potentiell angelegten Nervenzellen rekrutiert. Man vermutet als Parallele zur Embryonalentwicklung ein sensibles Gleichgewicht zwischen Neurogenese und Apoptose¹⁵⁹, bei dem auch der Interaktion

verschiedenster neurotropher Faktoren (wie *Nerve Growth Factor* (NGF), BDNF, Neurotrophin (NT)-3 und *Ciliary Neurotrophic Factor* (CNTF)) Bedeutung zukommen könnte³¹⁵. Somit ist der Nachweis proliferierender Stamm- oder Vorläuferzellen kein valides Maß zur Beschreibung der adulten Neurogenese.

Adulte Neurogenese – Funktionelle Bedeutung. Die Erforschung der physiologischen Funktionen adulter zellulärer Neurogenese rückt insbesondere im Zusammenhang mit der plastischen Regenerationskapazität des ZNS in den Fokus allgemeinen Interesses^{73,164,219,306}. Dennoch bleibt die Funktion dieses Phänomens bis heute ein Gebiet der Spekulation. Wie erwähnt, wurde der Nachweis der Integration und Funktionalität der in den neurogenen Zonen neu gebildeten Neuronen bereits erbracht⁴³⁷. Die Möglichkeit eines Kausalzusammenhangs zwischen hochspezialisierten Strukturen im Gehirn einer Spezies und Neurogenese stellt eine bedeutende, noch zu überprüfende Hypothese dar. So könnte beispielsweise die Nervenreubildung im HC mit seiner zentralen Rolle als Steuerorgan für Kognition korrelieren³⁸⁰. Auf der Annahme dieser funktionellen Relevanz basieren die Fragestellungen der vorliegenden Arbeit.

I.2 SCHÄDEL–HIRN–TRAUMA IM EXPERIMENTELLEN TIERMODELL

Um die äußerst komplexen und vielfach noch unzureichend verstandenen neurophysiologischen und neurobiochemischen Pathomechanismen sowie Einflussfaktoren und Folgen des posttraumatischen Geschehens präziser abschätzen zu können, sind in der experimentellen Neurotraumatologie reproduzierbare Tiermodelle zur Analyse pathophysiologischer Einzelkomponenten wie der Kontusion erarbeitet worden^{63,98,99,106,109,178,230,252,253,273,285,292,314,365,385,412}.

Allen Modellen, darunter beispielsweise das *Controlled cortical impact injury* (CCII)-Modell, das *Inertial acceleration*-Modell, das *Weight drop*-Modell oder das *Fluid percussion*-Modell, gemeinsam ist das Ziel, die Vielschichtigkeit der Krankheitsentität SHT objektiv zu erfassen, indem selektiv bestimmte Teilaspekte der klinischen Situation herausgegriffen und tierexperimentell imitiert werden. In der Realität am Patienten sind all diese Facetten in jeweils unterschiedlicher Ausprägung kombiniert. Während in klinischen Studien am Menschen viele Variablen (z.B. Alter, Ursache, Grunderkrankungen, Zeitlatenz bis zum Therapiebeginn, Therapieoptionen, Kontrollgruppen, Randomisierung, Blindung) die Standardisierung erschweren und so den Datenvergleich fast unmöglich gestalten, sind die Tiermodelle zuverlässig reproduzierbar und hinsichtlich des Schadens gleichartig. Die Resultate erlauben, weil objektivierbar, eine Aussage über die Ursache, deren interagierende Mechanismen und die Auswirkung eines Krankheitsbildes, das im Bezug auf die Individualität der Umstände bei Entstehung und hinsichtlich seiner Folgen

nach Überleben unterschiedlicher nicht sein könnte. Damit eröffnet sich für die Testung potentiell neuroprotektiver Substanzen und die Evaluation individueller Therapieregimes eine neue Perspektive.

In Kap. III.1.3 wird das dieser Arbeit zugrunde liegende CCII-Modell erläutert und in den Kontext zu den Fragestellungen gesetzt.

I.3 PIGMENT EPITHELIUM-DERIVED FACTOR (PEDF)

PEDF ist 1989 erstmals in konditioniertem Kulturmedium von fetalen Pigmentepithelzellen der humanen Retina (RPE-Zellen) identifiziert worden⁴²⁵. Seither sind seine molekulare Struktur, die von ihm aktivierten biologischen Signalwege und Wirkmechanismen und die multiplen Funktionen von PEDF Gegenstand intensiver Investigation, verbunden mit der großen Hoffnung auf sein künftiges Potential als therapeutisches Agens gegen ein weites Krankheitsspektrum. Die nachfolgend dargestellten Forschungserkenntnisse belegen die Bedeutung von PEDF als multifunktionalem Protein mit relevantem klinischen Potential, was mögliche Therapieoptionen für tumorassoziierte Erkrankungen, aber auch chronisch neurodegenerative und – im Rahmen der vorliegenden Arbeit - insbesondere akut neurotraumatologische Krankheitsentitäten anbelangt.

I.3.1 CHARAKTERISIERUNG UND LOKALISATION VON PEDF

Gen- und Proteinstruktur. Das humane PEDF-Gen kodiert für ein monomeres Glykoprotein aus 418 AS mit einem Molekulargewicht von 46,3 kDa bis 50 kDa³⁹⁴. Der Faktor weist eine Struktur- und Sequenzhomologie zur Gruppe der Serin-Protease-Inhibitoren (SERPIN)-Supergen-Familie auf, deren Mitglieder sich untereinander strukturell sehr ähneln und wichtige, individuell sehr unterschiedliche Funktionen während zahlreicher zellulärer Prozesse ausüben^{71,394,452}. Anders als die SERPINE verfügt PEDF allerdings über keine inhibitorische Aktivität gegenüber Proteasen (s.u.)^{43,46}. Diese Tatsache basiert mutmaßlich auf Unterschieden in der Sequenz eines für die SERPIN-Familie charakteristischen, exponierten zentralen Molekülbestandteils (sog. *Reactive Centre Loop* (RCL))^{382,394}. Das humane PEDF-Gen ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17p13.3 lokalisiert^{155,427,428}. Es umfasst ca. 16 kb an DNA und enthält 8 Exons⁴²⁷. Die Kristallstruktur von PEDF weist eine asymmetrische Ladungsverteilung auf, die durch Interaktion mit extrazellulären Matrixmolekülen von physiologischer Bedeutung sein könnte³⁸². Als weitere, funktionell bisher nicht geklärte Besonderheiten fallen am PEDF-Gen eine 5'-Terminalregion aus einem dichten Cluster an ALU-Repeats⁴²⁷ auf sowie in der PEDF-

Promotorregion mehrere regulatorische Schlüsselemente wie beispielsweise ein Retinolsäure-Rezeptormotiv⁴²⁶. Wie zuvor erwähnt unterscheidet sich PEDF trotz seiner Zugehörigkeit zu den SERPINEN in seinem Wirkmechanismus grundsätzlich von den übrigen Mitgliedern der Supergenfamilie. Seine beiden Haupteffekte, Neuroprotektion und Antiangiogenese, werden nicht über die Serinproteasen-Inhibition vermittelt. Daher obliegt der Erforschung der funktionell tragenden, neurotrophen Proteindomänen bzw. Bindungsstellen des PEDF-Moleküls entscheidende Bedeutung.

Lokalisation und Proteinexpression. Erstmalig wurde PEDF in der Interphotorezeptor-Matrix der Augen verschiedener Spezies lokalisiert^{44,47,215,309,316,451}. Das Protein ist in allen Kompartimenten des Auges nachweisbar und wurde aus historischen Gründen zunächst vornehmlich in der Retina untersucht, u.a. von^{68,69,72,200,308,310}. Heute weiß man, dass der Faktor einerseits in einigen Geweben nicht-neuronalen Ursprungs und in biologischen Flüssigkeiten (wie im Corpus vitreum, Serum und zerebrospinalen Liquor (CSF)^{55,241}) exprimiert wird, aber auch in signifikanten Spiegeln nahezu ubiquitär im ZNS detektierbar ist^{55,427,429}. Allerdings hat es sich ob der raschen Sekretion von PEDF als schwierig erwiesen, das Protein unter bestimmten Bedingungen zu lokalisieren²³⁵. Der Nachweis von PEDF-mRNA wurde für fast alle adulten humanen Organe einschließlich Auge, Leber, Niere, Herz, Lunge, (Skelett-)muskulatur, Dünndarm, Kolon, Appendix, Magen, Pankreas, Plazenta, Ovarien, Testis, Knochenmark sowie unterschiedliche Gehirnregionen geführt⁴²⁷. Weiterhin unklar ist, ob die Zellen dieser Organe tatsächlich PEDF produzieren oder das Protein nur binden, und welche Zellen genau PEDF produzieren bzw. auf das Protein ansprechen. Abb. 5 veranschaulicht anhand einer *Northern Blot* Analyse mit einer radioaktiv markierten PEDF-DNA-Probe die großflächige Verteilung von PEDF-mRNA im erwachsenen humanen Gehirn^{55,427,429}. Analysen am Rückenmark von Mensch, Affe und Ratte belegten das Vorkommen des Proteins in den Motoneuronen des Vorderhorns und einigen Nervenzellen im Hinterhorn. Auch die den Spinalkanal auskleidenden Ependymzellen waren PEDF-positiv und lassen daher den CSF als bedeutende Quelle für den Faktor vermuten^{54,55}.

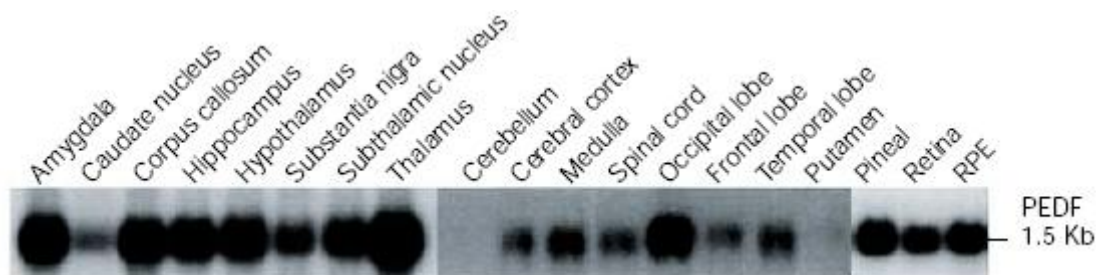


Abb. 5: Zerebrales Verteilungsmuster von PEDF-mRNA im adulten humanen Gehirn, detektiert anhand einer Northern Blot Analyse mit radioaktiv markierter PEDF-DNA (modifiziert nach⁴²⁷).

I.3.2 BIOEFFEKTE VON PEDF

I.3.2.1 Allgemeine Funktionen

Da der Interessensfokus dieser Arbeit speziell auf die neuromodulatorischen Bioeffekte von PEDF gerichtet ist, soll das facettenreiche und nicht minder bedeutende extra-zerebrale Wirkspektrum dieses Faktors an dieser Stelle nur ergänzend Erwähnung finden.

In proliferierenden Zellen steht die PEDF-Expression in enger Verbindung mit dem Zellzyklus. Zellen, die in die G0-Phase eintreten (und junge Zellen mit hoher Teilungsaktivität), exprimieren in besonderem Maße PEDF^{333,334,429}. Durch diesen parakrinen Effekt wird die Zahl an Zellen, die in die S-Phase eintreten, reduziert, und es resultiert „netto“ eine zelluläre Reduktion der Zellzyklus-Passage¹⁹⁰. Über diesen Primärmechanismus scheint PEDF in vielen unterschiedlichen Zelltypen, darunter auch mehrere Tumorzellen^{89,425}, indirekt Differenzierungsvorgänge zu induzieren und somit die Zellteilung und Proliferation zu inhibieren. Daneben konnte in der Tumorforschung an Glio- und Neuroblastomen gezeigt werden, dass PEDF auch direkten Einfluss auf die Zelldifferenzierung (und Antiangiogenese) nimmt^{89,174}. Neuroblastome beispielsweise sind eine heterogene Tumorentität, die sich neben primitiven malignen Neuroblasten auch aus differenzierten Schwann-Zellen und Ganglionzellen zusammensetzen. Letztere produzieren PEDF, das zum einen die Tumorzelldifferenzierung induziert und zum anderen das Wachstum, Überleben und die Proliferation der Schwann-Zellen fördert. Über auto- und parakrine *feedback*-Mechanismen wird dadurch wiederum die PEDF-Synthese gesteigert, und es ist ein Tumorregress zu beobachten (s. Abb. 6). Nämliche Resultate bestätigten sich auch unter intratumoraler Injektion von exogenem/rekombinantem PEDF (rPEDF) *in vitro* und *in vivo*⁸⁹. Umgekehrt geht ein Verlust der PEDF-Genexpression bei Gliomen mit einem Tumorprogress einher^{89,174}.

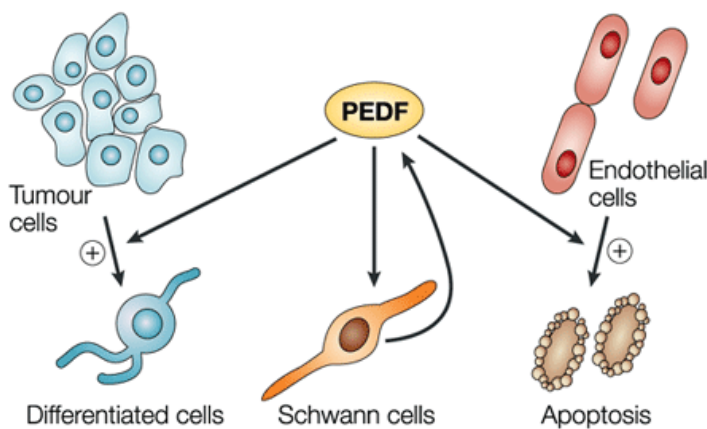


Abb. 6: Multiple Effekte von PEDF auf Neuroblastome. PEDF fördert die Tumorzelldifferenzierung, stimuliert die Schwannzellen zur PEDF-Sekretion und inhibiert zugleich die Tumorraskularisation durch die Blockade endothelialer Zellen (aus⁸⁹).

PEDF wirkt desweiteren als potenter antiangiogener Faktor, der das Wachstum neuer Blutgefäße unter normalen und pathologischen Bedingungen kontrolliert^{94,119,294,395,422}. In seiner

antiangiogenen Funktion supprimiert PEDF die Vaskularisation verschiedener Organe und inhibiert dadurch das Tumorwachstum^{8,10,268,441}. Darüber hinaus vermutet man hinter PEDF auch einen Einfluss auf die Antipermeabilität²⁵⁶, die Wundheilung³³⁰ sowie die Organo- oder Morphogenese²³⁵.

Ein weiteres interessantes Faktum ist die Altersabhängigkeit der PEDF-Expression. *In vitro*-Untersuchungen an Fibroblasten und RPE-Zellen haben belegt, dass die PEDF-Synthese- und – Sekretionsrate mit der Kultivierungszeit abnimmt, d. h. der PEDF-Spiegel sinkt mit der Seneszenz/Zellalterung^{103,190,333,334,429}. Wenngleich der molekulare Kontrollmechanismus der PEDF-Expression ungeklärt ist, gibt es Hinweise für eine post-transkriptionelle Regulation der mRNA-Stabilität⁸³. Weitere Studien an Kälbern, die durch nukleären Transfer aus gealterten Spenderzellen geklont wurden, haben gezeigt, dass der Alters-induzierte PEDF-Rückgang reversibel ist²⁴³. Sollte sich dieser Alters-assoziierte Abfall von PEDF als bedeutender neuroprotektiver Faktor im gesamten Nervensystem bestätigen, wäre eine Korrelation mit der steigenden Inzidenz vieler neurodegenerativer Erkrankungen im Alter denkbar.

PEDF ist neben einer Vielzahl weiterer Faktoren (wie z.B. EGF und *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF) *in vitro*^{88,298,319,320,355,407}, und der *Transforming Growth Factor alpha* (TGF- α) zusammen mit EGF und bFGF auch *in vivo*²³⁹) von funktioneller Bedeutung für die Proliferation und Differenzierung neuronaler Stammzellen. Unter diesen Wachstumsfaktoren ist der *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) aufgrund seiner großenteils antagonistischen Interaktion mit PEDF ganz besonders hervorzuheben. Dieses dimere Polypeptid wurde als potenter Induktor von Angiogenese^{120,131,300,356} und Inflammation^{27,171,340,378} identifiziert, wirkt vasopermeabilitätssteigernd und hat daneben auch ähnlich wie PEDF neurotrophe und neuroprotektive Aufgaben^{58,157,169,362,401,405,409,460,463}. VEGF steht in verschiedenen Bereichen des Organismus in einem sensiblen physiologischen Gleichgewicht mit PEDF, wobei das Überwiegen von einem der beiden bei physiologischen Prozessen wie der Regeneration auftritt, aber auch pathophysiologisch beispielsweise bei der Tumorangio-geneseinduktion oder Ischämie. Für eine Vielzahl von Neoplasien, darunter z.B. Adenocarcinome des Pankreas¹⁸³, Prostata-Carcinome¹⁷², hepatozelluläre Carcinome²⁷⁹, maligne Melanome⁸ und Gliome^{173,174}, ist eine Überexpression von angiogenen Wachstumsfaktoren wie VEGF bei gleichzeitiger Sekretionssuppression von PEDF pathognomonisch. Im Zustand der Balance/*Steady state* steuert PEDF dem angiogenen Potential von VEGF entgegen³¹¹. Pathogene Einflüsse wie oxidativer Stress³¹¹ bewirken einen Abfall des PEDF-Spiegels. Das resultierende Ungleichgewicht der pro- und antiangiogenen Faktoren begünstigt eine pathogene Neovaskularisation¹⁰⁵. Zudem gehen verminderte PEDF-Spiegel nachweislich mit einem höheren Malignitätsgrad^{173,174} und einem erhöhten Risiko für Tumorprogress²⁷⁹, Metastasierung und Kurzzeitüberleben^{172,183} einher.

Nachfolgend wird dezidiert auf die neurotrophen und neuroprotektiven Effekte von PEDF eingegangen.

I.3.2.2 Funktionen im Gehirn: Neurotrophie und Neuroprotektion

Unser Nervensystem wird von etlichen neuroprotektiven Faktoren beeinflusst, die durch gegenseitige Wechselwirkungen den Schwellenwert anheben, ab dem chronische Erkrankungen oder Verletzungen irreversiblen neuronalen Schaden anrichten.

Neurotrophie. PEDF wirkt nicht nur in der Tumorigenese zelldifferenzierend, sondern fungiert auch in einigen neuronalen Zellen als potenter Aktivator von Differenzierungsvorgängen^{89,195,425}. Die ersten Forschungsergebnisse belegten den Einfluss von PEDF auf die Transformation sich teilender Retinoblastomzellen in differenzierte Neurone^{424,425}. Als man dann kultivierte zerebelläre Granulazellen mit BrdU markierte, konnte keine PEDF-induzierte neuronale Proliferation nachgewiesen werden⁴¹⁴, was PEDF im Unterschied zu anderen Wachstumsfaktoren nicht als mitogenes, sondern vielmehr als zellulär differenzierendes Agens kennzeichnet. In einem weiteren Experiment wurde der Faktor in einer Konzentration von nur 0,1 nM dem kultivierten Rückenmark von Küken zugesetzt, und auch hier bestätigten das verlängerte Zellüberleben und der Längenzuwachs der Neuriten¹⁹⁵ den stark neurotrophen Effekt von PEDF. Andererseits belegten zwar Untersuchungen an kultivierten zerebellären Granulazellen unter ähnlich niedrigen Konzentrationsverhältnissen die förderliche Wirkung auf das Zellüberleben, hier konnten jedoch keine Effekte auf die Neuritenaussprossung festgestellt werden²⁸. Ob diese Unterschiede nun auf die verschiedenen Entwicklungsstadien der jeweils untersuchten Neuronen zurückzuführen sind, oder ob die differierenden Resultate durch die unterschiedlichen Untersuchungsareale des ZNS bedingt sind, bleibt noch ungewiss.

Jüngste Studien haben PEDF als wesentliches Regulatorprotein der subventrikulären adulten Stammzellnische identifiziert^{341,348}. Neurogene Nischen zeichnen sich durch ein spezielles „Wachstumsmilieu“ aus, das die Stammzellen lebenslang in einem undifferenzierten, proliferationsfähigen Status der Multipotenz erhält^{24,212,303,416}. Eine herausragende Bedeutung scheint hier endothelialen Zellen zuzukommen. Dies lassen die Lokalisation der hippocampalen Progenitoren in der Nähe von Kapillarendigungen und die Lage subventrikulärer Stammzellen nahe der ependymalen Zellschicht des lateralen Ventrikels und der Blutgefäße vermuten^{70,110,112}. Das Gefäßsystem sezerniert nachweislich Faktoren, die die Proliferation und/oder das Überleben von Neuroblasten fördern^{205,249,261,379}. Von Endothelzellen freigesetzte Moleküle können zudem die Stammzellerneuerung induzieren³⁷⁶. *In vitro*-Untersuchungen an Assays mit Neurosphären zeigten, dass PEDF als Wachstumsfaktor endothelialen Ursprungs von endothelialen und epithelialen Zellen in der adulten SVZ exprimiert wird und die Selbsterneuerung neuronaler

Stammzellen fördert. Auch *in vivo* wurde der Nachweis erbracht, dass die Infusion von PEDF die Typ B-Stammzellen der intakten adulten SVZ zur Selbsterneuerung stimuliert und dadurch die Neurogeneserate steigert³⁴⁸. Man vermutet hinter diesem Effekt eine Interaktion von PEDF mit anderen Wachstumsfaktoren.

Neuroprotektion. In der Wissenschaft ist vielfach beschrieben, dass PEDF – auch in Anwesenheit unterschiedlicher neurotoxischer Stimuli - auf verschiedene Zellen des ZNS neuroprotektiv wirkt^{28,54,55,96,195,414,415}. In Kapitel I.1.3.2 wurde die Glutamat-vermittelte Exzitotoxizität als folgenschwerer Pathomechanismus des SHT und bedeutende Ursache für viele akut neurodegenerative Erkrankungen (wie Schlaganfall und Epilepsie) beschrieben, da sie mit neuronalem Zelltod assoziiert ist. Versuche an kultivierten Neuronen konstatieren für mikromolare Glutamat-Konzentrationen die Apoptoseinduktion³¹⁸. Autoren belegen für nanomolare Konzentrationen an PEDF eine Inhibition des Glutamat-induzierten apoptotischen Zelltods in Kulturen aus zerebellären Granulazellen^{28,414,415} und unreifen hippocampalen Neuronen der Ratte⁹⁶ sowie spinalen Motoneuronen von Affen und Mäusen^{54,55,195}. Der dahinter stehende Biomechanismus, beispielsweise ob PEDF die Sensitivität der Glutamatrezeptoren verändert, die intrazellulären Calcium-Bewegungen oder die mitochondriale Reaktion auf Glutamat beeinflusst, ist noch unbekannt.

Zusätzlich zu den vielfachen Experimenten an Zellkulturen gibt es auch erste Belege für die neuroprotektive Wirkung von PEDF *in vivo*. Untersuchungen an neonatalen Mäusen zeigten, dass nach Durchtrennung des N. ischiadicus ca. 50 % der Motoneuronen zugrunde gingen, und viele der überlebenden Zellen atrophierten. Wurde jedoch PEDF an der Stelle der Axotomie appliziert, konnte der motoneuronale Zelltod um 57 % reduziert werden, und die vorbeschriebene Zellatrophie ließ sich gänzlich inhibieren¹⁹⁵. Ähnliche Ergebnisse wurden bei Modellversuchen mit kultiviertem Rückenmark von Ratten beobachtet, das durch Zugabe von Glutamat chronisch toxisch geschädigt wurde. Nanomolare Konzentrationen von PEDF waren ausreichend, um die Degeneration der Motoneuronen effektiv zu senken⁵⁵. Erwähnenswert ist zudem, dass die neuroprotektive Potenz von PEDF der von Gabapentin, Riluzol und IGF-1 vergleichbar ist.

Zusammen betrachtet belegen die Studien an Zellkulturen und Tiermodellen die neuroprotektive Bedeutung von PEDF bei akuten wie auch chronischen Formen der Neurodegeneration.

I.3.2.3 Auswirkungen von PEDF auf die Inflammation – eine Kontroverse

Widersprüchlich zu den bisher entdeckten Bioeffekten von PEDF erscheinen jüngste *in vitro*-Erkenntnisse, nach denen das Protein im ZNS in proinflammatorische Prozesse involviert ist^{368,404}. Dies ist insbesondere bemerkenswert, da PEDF am Auge bekanntermaßen

antiinflammatorisch wirkt^{462,464,465}. Die Wirkmechanismen von PEDF sind noch nicht gänzlich verstanden⁴²². Möglicherweise bedingen Unterschiede im Mikromilieu oder im Phänotypus der Zielzelle die teils gegensätzlichen Wirkungsweisen des multifaktoriellen Proteins (s. Kap. V).

Da sich ein zentraler Teil dieser Arbeit mit der Detektion einer zellulären Subfraktion der Mononukleären-Makrophagen-Linie, der Mikroglia, befasst, folgt an dieser Stelle eine Einordnung derselben in den Prozess der Inflammation: zytologisch ist unser ZNS aus Neuronen und Gliazellen aufgebaut, wobei letztere die zahlenmäßig größte zentralnervöse Zellpopulation darstellen und mehr als die Hälfte seines Volumens einnehmen⁴³¹. Die Gliazellen lassen sich in Makroglia ektodermalen Ursprungs, hierzu zählen Oligodendrozyten und Astrozyten, und Mikroglia, die aus mesodermalen Makrophagen hervorgehen²⁵⁴, einteilen. Mikroglia, auch als Hortega-Zellen oder Mesoglia bezeichnet, gehören dem mononukleären Phagozytensystem (MPS) an und bilden als eingewanderte Makrophagen die residente, unspezifische Immunabwehr des ZNS³⁵⁹. Die besondere Bedeutung der Mikroglia als immunkompetente Zellen erschließt sich aus der Tatsache, dass das ZNS ansonsten ein relativ immunprivilegiertes Organ ist, dem es an Lymphgefäßen bzw. lymphatischem Gewebe und ausreichend freien Bindegewebszellen mangelt⁴³¹. Mikroglia ist ubiquitär im Gehirn lokalisierbar, wobei ihre Dichte abhängig von den unterschiedlichen Regionen stark differiert³⁵⁹. Im Gegensatz zu den anderen Zellen des Nervensystems ist sie nicht ortsständig und weist je nach Aktivierungszustand die größten Formvariationen aller Zellen im ZNS auf. Unter physiologischen Bedingungen liegt die Mikroglia zumeist in der ruhenden, ramifizierten Form (*Resting Ramified Type* (RRT)) vor. Pathophysiologische Zustände - wie SHT, Ischämie, Neurodegeneration, Infektionen oder Hirntumore^{182,262,283,399,390} - stimulieren die mikrogliale Proliferation am Ort der Entzündung und setzen einen Aktivierungsprozess in Gang. Dieser geht mit der raschen morphofunktionellen Umwandlung in einen aktivierten Phänotyp einher, d.h. der Modulation vom RRT in einen abgerundeten, phagozytierenden Typ (*Rounded Phagocytic Type* (RPT)), der auf seiner Zelloberfläche verstärkt entzündungsassoziierte Antigene (wie *Leukocyte Function Antigen* (LFA)-1, *Intercellular Adhesion Molecule* (ICAM)-1 und *Major Histocompatibility Complex* (MHC)-class II) exprimiert und mit einer Veränderung des immunologischen Status der Mikroglia assoziiert ist³⁵⁹.

Eine Wertung der mikroglialen Aktivierungsreaktion für den Organismus fällt nicht eindeutig aus^{123,399}. Einerseits ist dieser Immunabwehrreaktion die Protektion vor schädigenden Einflüssen auf das Hirngewebe eigen, indem die aktivierte Mikroglia befähigt ist, Mikroorganismen zu zerstören, zu phagozytieren und Zellschutt zu eliminieren. Darüber hinaus ist sie durch die Sezernierung von Wachstumsfaktoren an der Gewebereparation beteiligt²³⁷. Neben diesem Benefit wirkt die Mikroglia andererseits auch potentiell zytotoxisch³⁷, da sie, aktiviert durch den

Entzündungsreiz, unterschiedlichste proinflammatorische Substanzen, darunter v.a. Zytokine wie TNF- α oder IL-1 β , aber auch Arachidonsäuremetabolite und Prostanoiden sowie reaktive Sauerstoff- und Stickstoffmetabolite produziert^{37,247,400}. In der Literatur ist die schädigende Wirkung von Mikroglia nicht nur für infektiöse und entzündliche Erkrankungen des ZNS wie bakterielle und virale Meningitiden^{29,152,439} oder die HIV-Enzephalopathie^{146,288} belegt, sondern auch ihre Beteiligung an der Pathogenese und dem Verlauf neurodegenerativer Krankheitsentitäten wie M. Parkinson^{56,255}, M. Alzheimer und Autoimmunerkrankungen wie der Multiplen Sklerose³⁹⁸.

I.3.3 THERAPEUTISCHES POTENTIAL

Mit dem Einsatz von PEDF zur Therapie bisher schwer behandelbarer Erkrankungen verbinden sich seit einigen Jahren große Erwartungen. In der Zusammenschau der oben angeführten vielfältigen Effekte dieses Proteins wird seine herausragende Rolle deutlich: es liegt als stabil sezerniertes Protein vor, das nicht besonders empfindlich gegenüber den Proteasen im extrazellulären Milieu zu sein scheint, und zeigt eine Reagibilität auf Umwelteinflüsse wie z.B. Sauerstoffspannung und Krankheit bzw. Verletzung. In der Praxis sind mindestens drei Optionen denkbar, um den PEDF-Spiegel therapeutisch zu erhöhen:

- durch eine Steigerung der endogenen PEDF-Synthese mittels Gentransfer
- durch die exogene PEDF-Zufuhr und
- durch die exogene Applikation des Proteins oder kleinerer Peptid-Derivate.

Erstrebenswert wäre es, kleine PEDF-Peptide als therapeutische Agentien einzusetzen, die als „*slow release*“-Präparate verabreicht werden könnten und über eine protrahierte Zeitperiode protektive Effekte gewähren würden. Auch bei der Behandlung von akuten Verletzungen wie dem Schlaganfall oder dem SHT, die vorübergehend neuroprotektiver Versorgung bedürfen, wären Peptide das Agens der Wahl.

Im Unterschied zu den meisten anderen Wachstumsfaktoren zeichnet sich PEDF durch seine duale neuroprotektive und gleichzeitig antiangiogene Wirkkomponente aus, worauf sich wiederum sein Potential als Antitumor-Agens gründet. In der Behandlung neuraler Tumore sind verschiedene Therapiestrategien mit PEDF und anderen antiangiogenen Substanzen in klinischer Erprobung, die das Tumorstadium verlangsamen und die Differenzierung in langsamer wachsende Zelltypen induzieren können^{358,11,266,229,170}. Tierversuche haben gezeigt, dass die Verfügbarkeit des Proteins im Organismus direkt mit neuronalem Benefit korreliert. Während hohe PEDF-Pegel ein außerordentliches Maß an Neuroprotektion (gegen Ischämie, Exzitotoxizität, Axotomie und oxidierende Agentien) garantieren, äußert sich sein Mangel oder Fehlen, wie an *knock-out* Mäusen exploriert, in morphologischen Anomalien und Missbildungen

(von einer erhöhten retinalen Mikrovaskularisationsdichte, dem Verlust an Ganglienzellen und gesteigertem Stromagefäßwachstum bis hin zur Epithelzellhyperplasie in Organen wie der Prostata und dem Pankreas)^{116,173}. Desweiteren hat die Forschung mit der probatorischen PEDF-Gentherapie von ophthalmologischen Krankheitsbildern wie der Altersabhängigen Makuladegeneration (AMD) und der *Pattern*-Dystrophie der Retina eine vielversprechende Richtung eingeschlagen. Die intravitreale und subretinale Protein-Applikation mittels viraler Vektoren hat gezeigt, dass die präzise Abgabe des Faktors für seine Wirkungen, in diesem Falle die Reduktion von Neovaskularisationen, nicht essentiell ist^{295,343}. Alternativ zum viral vermittelten Gentransfer erwies sich am Auge auch die Transplantation von PEDF-transfizierten autologen Zellen als therapeutisch wirksam³⁷³. Es bleibt abzuwarten, ob ähnliche Gen- oder Zelltransfer-Studien mit PEDF am Gehirn künftig darauf hoffen lassen, degenerativen diffusen Schaden wie bei M. Alzheimer oder fokalsegmentalen Schaden wie bei M. Parkinson abwenden zu können. Daher sind insbesondere in der Neurochirurgie und Neurologie die Hoffnungen groß, durch die Applikation von PEDF neuronalen Verlust zu reduzieren und damit neue Therapieoptionen bei neurodegenerativen Erkrankungen und Schädigungen des ZNS zu etablieren.

Grundlage der vorliegenden Arbeit sind die – in Gegenwart verschiedenster neurotoxischer Stimuli erwiesenen - neuroprotektiven und neurotrophen Effekte von PEDF. Da sich die Forschungsergebnisse bis *dato* vornehmlich auf Erkenntnisse aus *in vitro*-Untersuchungen (an Retina und ZNS) stützen, steht hinter dieser Studie die Motivation, *in vivo* am Traumamodell zu eruieren, ob die intraventrikuläre Applikation von PEDF Effekte auf die Neurogenese oder inflammatorische Reaktionen im Rattengehirn hat. Vor dem Hintergrund der erfolgversprechenden Erkenntnisse über das Wirkungsspektrum von PEDF *in vitro*, befasst sich die Fragestellung hier im Speziellen mit den PEDF-vermittelten *in vivo*-Effekten auf die neuronalen Stammzellen in der SVZ und der SGZ des hippocampalen DG nach experimenteller kortikaler Traumatisierung. Neben dem Aspekt der Neurogenese interessiert auch der Einfluss von PEDF auf das Kontusionsareal und die panmakrophagozytäre Entzündungsreaktion nach SHT. Dies soll mit Hilfe des erprobten CCII-Verfahrens in der histologischen Analyse und statistischen Auswertung von immunhistochemischen Färbungen (BrdU, DCX, ED1) ermittelt werden.

II. FRAGESTELLUNGEN UND ZIELE DER STUDIE

Erklärtes Ziel dieser tierexperimentellen Studie ist es zu eruieren, inwieweit die *in vivo*-Applikation von PEDF nach fokaler, kontrollierter kortikaler Kontusion am Modell des CCII nach Dixon und Lighthall neuroprotektive bzw. neuroregenerative Wirkungen auf das Hirnparenchym, insbesondere auf das Kontusionsareal und die neurogenen Zonen, von Ratten zeigt. Ferner interessiert, inwieweit die posttraumatische, über acht Tage protrahierte Stimulation mit dem Wachstumsfaktor PEDF Auswirkungen auf die Induktion der mikroglial vermittelten inflammatorischen Reaktion im Hirnparenchym der Nager hat. Durch den Einsatz unterschiedlicher PEDF-Konzentrationen sollen die Ergebnisse nivelliert werden.

Als jeweilige Prüfgröße fungierte die Anzahl definierter Zellen pro Flächeneinheit, die zuerst durch immunhistochemische Spezialfärbungen markiert und nach Versuchsende histomorphologisch durch präzise bilaterale Auszählung quantifiziert wurden. Entsprechend wurden als Surrogatparameter drei immunhistochemisch visualisierbare Marker eingesetzt: (a) BrdU wird als Thymidinanalogon während der Synthesephase (S-Phase) des Zellzyklus in die DNA inkorporiert und dient dem Nachweis stattgehabter DNA-Synthese, (b) das Phosphoprotein DCX ist ein spezifischer Marker für unreife neuronale Vorläuferzellen und migrierende Neuroblasten und (c) der Antikörper (Ak) ED1 (Ectodysplasin A) erlaubt die Detektion panmakrophagozytärer Zellpopulationen wie z.B. immunkompetenter Zellen aus der mononukleären Makrophagen-Linie (phagozytotisch aktive Mikroglia). Bei der Auswertung sollten die Daten der Versuchstiere mit PEDF-Infusion in Relation zu den Daten der (nicht kontusionierten) Kontrolltiere ohne PEDF-Infusion gesetzt werden, um eine Aussage über die jeweiligen posttraumatischen Veränderungen treffen zu können. Der Fokus des wissenschaftlichen Interesses richtet sich auf die Frage, ob adjuvante PEDF-Substitution Einfluss auf das Ausmaß bzw. eine mögliche Regeneration des neuronalen Gewebes Schadens hat.

Basierend auf den bereits bekannten Forschungsergebnissen aus *in vitro*-Untersuchungen von PEDF-Aktivitäten und –Wirkmechanismen wurde für die vorliegende tierexperimentelle Studie folgende Arbeitshypothese formuliert:

„Nach kontrollierter kortikaler Kontusion induziert die *in vivo*-Applikation von PEDF bei adulten Ratten die Neurogenese, moduliert die inflammatorische Reaktion von Mikroglia und zeigt konsekutiv eine neuroregenerative und neuroprotektive Wirkung.“

Vor dem Hintergrund dieser biologischen Hypothese wurden drei spezifische Gehirnareale, (I) das Läsionsareal und (II) die neurogenen Zonen, bestehend aus der SVZ und der SGZ des DG des HC, beobachtet.

Das Läsionsareal wurde auf folgende Fragestellungen überprüft:

I.1: „Führt die posttraumatische, über acht Versuchstage protrahierte intraventrikuläre Infusion von PEDF *in vivo* zu einer Verkleinerung der Größe des Kontusionsareals adulter Ratten in der Umgebung der fokalen Läsion im Vergleich zur Kontrollgruppe?“

Die Quantifizierung erfolgt planimetrisch anhand der zirkumferenten Streuung von BrdU-positiven (d.h. posttraumatisch durch Regeneration neu entstandenen) Zellen einerseits und von ED1-positiven Zellen (als Zeichen immunologisch-inflammatorischer Prozesse) andererseits.

I.2: „Unterscheiden sich die kontinuierlich mit PEDF behandelten von den nicht behandelten Versuchsgruppen in der Zellproliferation (Zellzahl) der BrdU-markierten Zellen und/oder der ED1-markierten Zellen im Kontusionsareal adulter Ratten?“

Ferner wurde untersucht, welchen Einfluss die *in vivo*-Darreichung von PEDF in dem genannten Versuchszeitraum auf die Zellproliferation in den neurogenen Zonen der adulten Ratte nimmt.

II.1: „Hat die kontinuierliche posttraumatische intraventrikuläre *in vivo*-Infusion von PEDF in die Versuchstiere einen von der Kontrollgruppe unterschiedlichen Einfluss auf die Zellproliferation (Zellzahl) von BrdU-markierten Zellen und/oder DCX-markierten Zellen in der SVZ adulter Ratten?“

II.2: „Differieren die Ergebnisse von den Versuchstieren mit der posttraumatischen intraventrikulären Infusion von PEDF *in vivo* hinsichtlich der Zellproliferation (Zellzahl) von BrdU-markierten Zellen und/oder DCX-markierten Zellen im DG des HC adulter Ratten von den Untersuchungen an Kontrolltieren?“

Zur Untersuchung und Stellungnahme zu diesem Fragenkatalog wurden im Anschluss an die experimentelle Phase histochemische und immunhistologische Verfahren eingesetzt, um mögliche Einflüsse von PEDF auf die Neuroprotektion, Neurogenese und neuronale Inflammation näher zu charakterisieren und zu quantifizieren.

III. MATERIAL UND METHODIK

Das den Versuchen zugrunde liegende Tierprotokoll wurde gemäß § 8 des deutschen Tierschutzgesetzes von der Tierversuchskommission der Medizinischen Fakultät der Universität Regensburg und der Regierung der Oberpfalz (Sachgebiet 54, Veterinärwesen) genehmigt. Der tierexperimentelle Teil dieser Arbeit wurde in den Laborräumen und dem Tierlabor der Universitätsklinik, die histologischen Arbeitsschritte im Labor der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Regensburg in der Zeit zwischen März 2005 und Januar 2006 durchgeführt.

III.1 *IN VIVO*-UNTERSUCHUNG: TIEREXPERIMENTELLER VERSUCHSAUFBAU

III.1.1 VERSUCHSTIERE UND ALLGEMEINE HALTUNGSBEDINGUNGEN

Für die vorliegenden Experimente wurden adulte männliche Fischer-Ratten (Stamm: F-344, Fa. Charles River (WIGA) GmbH, Sulzfeld, Dtl.) verwendet. Sieben Tage vor der Operation wurden die Versuchstiere von der Fa. *Charles River* mit ca. 240 - 270 g KG geliefert. Zur interindividuellen Unterscheidung wurden die Tiere mit offiziellen „rat earmarks“ versehen. Dabei werden stellvertretend für



Abb. 7: Aufnahme der Versuchstierhaltung in einem Standardkäfig.

die jeweilige Tiernummer Markierungen (kleine Löcher bzw. Kerben) in den anterioren, medialen oder posterioren Randbereich der Rattenohren gestanzt, rechts für die Einer-Ziffer, links für die Zehner-Stelle.

Die Tierhaltungsbedingungen waren standardisiert. Bei dem Tierlabor handelte es sich um vollklimatisierte Räume mit Durchschnittstemperaturen von 21 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 45 - 75 % (Mittelwert 55 %) bei 15fachem Luftwechsel. Durch künstliches Licht mit einer automatisch gesteuerten Lichtphase von 7.00 bis 19.00 Uhr wurde ein strenger Tag-Nacht-Rhythmus von täglich 12 h eingehalten. Bei dem Licht-Zeit-Rhythmus wurden im Käfig 60 Lux und im Raum im Durchschnitt 300 Lux erzielt. Der Versuchsraum schloss sich räumlich an den Tierraum an.

In der ersten Woche akklimatisierten sich die Ratten, d.h. sie wurden nach dem Transport an die neue Umgebung mit ihrem Licht-Zeit-Rhythmus gewöhnt und erfuhren den Raum, seine Gerüche und Geräusche als angstfreie und natürliche Umwelt. Die Nager wurden im Tierlabor voneinander separiert in durchnummerierten Standard-Einzelkäfigen (Typ III hoch, 840 cm², Fa. Ehret, Emmendingen, Dtld.) aus Makrolon (Fa. Bayer® MaterialScience, Leverkusen, Dtld.) gehalten, die bei einer Höhe von 18 cm ein Aufrichten der Tiere ermöglichten (s. Abb. 7). Während des gesamten Experiments hatten die Ratten *ad libitum* Zugang zu Leitungswasser und energiereduziertem Pressfutter (Ratten-Alleinfutter V1535000, Fa. ssniff® Spezialdiäten GmbH, Soest, Dtld.). Als Einstreu verwendete man entstaubtes und entkeimtes Weichholzgranulat (Fa. Rettenmeier & Söhne, Rosenberg, Dtld.), als zusätzliches Nistmaterial wurde Zellstoff angeboten. Einmal pro Woche wurden die Käfige gereinigt, und drei Mal wöchentlich frisches Wasser angeboten, ansonsten wurden die Tiere außerhalb des Versuchsablaufs nicht gestört.

III.1.2 EQUIPMENT UND INSTRUMENTE

III.1.2.1 Chirurgisches Instrumentarium und Nahtmaterial

Das gesamte Operationsbesteck wurde von der Fa. FST (Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Dtld.) bezogen und umfasste 2 anatomische Pinzetten, 2 chirurgische Scheren (spitz-stumpf, gerade), 2 Gewebespreitzer und 4 Arterienklemmen (*Halsted-Mosquito Hemostats*) nach Pean 125 mm. Die dampfsterilisierten Instrumente wurden zur Zwischendesinfektion in ein 70 %iges Ethanolbad eingelegt. Des Weiteren wurden für die Operation ein Kleintierscherer, Tupfer, Wattestäbchen und Desinfektionsmittel (Betasisodona®-Lösung (Lsg.), Wirkstoff: Povidon-Iod, Mundipharma GmbH, Limburg/Lahn, Dtld.) eingesetzt.

Der Wundverschluss erfolgte nach Implantation der osmotischen Pumpen mit folgendem Nahtmaterial: PERMA-HAND® SEIDE, chirurgisches Nahtmaterial, schwarz geflochten, nicht resorbierbar, 4/0, 1,5 metrisch, 45 cm, Nadel: P-3, 13 mm, 3/8 C, Fa. ETHICON®; Vertrieb: Johnson-Johnson Intl., Brüssel, Belgien.

III.1.2.2 Injektion von 5'-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU)

In dem vorliegenden Experiment wurde zum Nachweis proliferierender Zellen (s. Kapitel III.2.3.2.2 und Kapitel V.1.4) BrdU (Fa. SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim, Dtld.) appliziert. Um kumulativ eine genügend hohe Anzahl an BrdU-markierten Zellen zu erhalten, wurde den Tieren über einen Zeitraum von acht aufeinander folgenden Tagen jeweils einmal täglich eine in 0,9 % Natriumchlorid (NaCl) im Verhältnis 1 : 10 verdünnte BrdU-Lsg. (50 mg BrdU/kg KG) intraperitoneal (i.p.) injiziert. Die Injektions-Lsg. hatte eine Konz. von 10 mg/ml. Zur Injektion wurden 1ml-Tuberkulinspritzen (BD Plastipak™, Becton Dickinson S.A., Madrid,

Spanien) mit 27 G $\frac{3}{4}$ -Kanülen (BD Microlance™ 3, 0,4 x 19 mm, Becton, Dickinson and Company, Drogheda, Irland) verwendet, über die den Ratten nach einem KG-adaptierten Injektionsschema (s. Tab. 3) individuelle Lösungsmengen i.p. injiziert wurden.

| Gewicht des Versuchstiers in [g] | Menge an BrdU in [mg] | Menge der Injektions-Lsg. in [ml] |
|-------------------------------------|--------------------------|--------------------------------------|
| 100 | 5 | 0,5 |
| 150 | 7,5 | 0,75 |
| 200 | 10 | 1 |
| 250 | 12,5 | 1,25 |
| 300 | 15 | 1,5 |

Tab. 3: Injektionsschema für die BrdU-Grundverdünnung (10 mg/ml) in 0,9 %iger physiologischer Kochsalz-Lsg. (1: 10) in Abhängigkeit vom KG des Versuchstiers (50 mg BrdU/kg KG); Umrechnung der Einheiten: 50 mg = 5000 μ l = 5 ml.

Unmittelbar vor jeder BrdU-Applikation wurde bei allen Ratten eine Gewichtskontrolle durchgeführt und jeweils dokumentiert. Ratten, die in Folge der Operation bzw. des Traumas an Gewicht verloren, durch geringe spontane motorische Aktivität auffielen oder durch vermehrten postoperativen Blutverlust körperlich geschwächt erschienen, wurden zur Rehydratisierung nach Bedarf zwischen 1 ml und 6 ml einer 0,9 %igen NaCl-Lsg. subkutan (s.c.) substituiert.

III.1.3 TIERMODELLE

III.1.3.1 Kontrollierte kortikale Kontusion

Das CCII-Modell induziert pneumatisch gesteuert eine mechanische Kontusion und ist gegenwärtig das weitentwickeltste Traumamodell. Es wurde initial als Modell des spinalen Traumas etabliert^{26,217}, dann als Modell des traumatischen Hirnschadens am Frettchen modifiziert²⁵² und schließlich auf die Ratte übertragen¹⁰⁶. Letztgenannte Modifikation liegt dem methodischen Untersuchungsteil dieser Arbeit zugrunde. Dieses Traumamodell beruht auf einer Kraniotomie mit Freilegung der intakten Dura mater. Durch einen druckluftbetriebenen und computergesteuerten Schlagbolzen, der in einer Führungshülse gehalten wird, kann zielgerichtet ein lokal begrenztes Trauma an der Kortexoberfläche gesetzt werden (s.u.). Dabei ist das Kontusionsareal schon makroskopisch als Schädigung der grauen Substanz deutlich abzugrenzen. In der Histologie ist das Kontusionsareal anhand neuronaler Zellschädigungen und Zelluntergänge vom gesunden Gewebe gut differenzierbar, so dass dessen Größenausdehnung durch morphometrische Methoden quantifizierbar wird. Das CCII erlaubt die Simulation vieler Phänomene des SHT am Patienten. Die präzise regulierbare Traumastärke korreliert mit Störungen im CBF, Blutungen, Hirnödemen²³², motorischen bzw. kognitiven Ausfällen und längeren Regenerationszeiten^{156,271}. Darüber hinaus sind Defizite des räumlichen Gedächtnisses¹⁸¹ und des nicht-deklarativen Gedächtnisses beschrieben¹⁰⁸. Der große Vorteil des CCII liegt in der

gezielten, kontrollierten und definierten Traumatisierung des Kortex mit einem folglich fokal begrenzten und somit gut quantifizierbaren Gewebeschaden. Die unter kontrollierter Variation der Parameter regulierbare Traumastärke (s. Tab. 5) und die Reproduzierbarkeit des Traumas^{75,136,252,421} sind dafür wesentlich. Damit ist die Grundvoraussetzung für die systematische Bewertung neuroprotektiver Therapiemethoden in vergleichenden Studien geschaffen^{271,421}.

III.1.3.1.1 Operative unilaterale Trepanation in Vollnarkose

Zur Vorbereitung auf das zerebrale Trauma wurden die Ratten nacheinander aus den Käfigen genommen und mit 0,35 - 0,4 ml einer ketaminhaltigen Anästhetika-Mischung narkotisiert (s. Tab. 4). Der Anästhesie-Cocktail wurde in Tuberkulinspritzen aufgezogen und i.p. injiziert. Die Narkose trat nach ca. 5 min ein. Vor Beginn der Operation wurde die Narkosetiefe durch Testung des Flexorreflexes der Hinterpfote überprüft, und bei Bedarf Narkosemittel i.p. nachinjiziert.

| Handelsname | Wirkstoff | Konz. in [mg/ml] | Menge in [ml] | Hersteller |
|-------------------------|---------------------|---------------------|------------------|---------------------------------------------------|
| Isotone NaCl-Lsg. 0,9 % | - | 9 | 20,0 | Fa. BRAUN Melsungen AG, Melsungen, Dtl. |
| Ketamin 10 % | Ketaminhydrochlorid | 100 | 7,5 | Fa. Bela-Pharm GmbH & Co. KG, Vechta, Dtl. |
| Xylazin 2 % | Xylazinhydrochlorid | 20 | 8,5 | Fa. CP-Pharma Handels-GmbH, Burgdorf, Dtl. |
| Vetranquil® 1 % | Acepromazinmaleat | 13,56 | 0,8 | Fa. CEVA TIERGESUNDHEIT GmbH, Düsseldorf, Dtl. |

Tab. 4: Zusammensetzung des Anästhesie-Cocktails.

Für die Operation wurden die Tiere am Kopf mit den Ohren und Schneidezähnen in einem stereotaktischen Rahmen für Kleintiere (MODEL 900 SMALL ANIMAL STEREOTAXIC INSTRUMENT, Fa. David Kopf® Instruments, Tujunga, Kalifornien) positioniert. Um während der Narkose einer Austrocknung der Cornea vorzubeugen, wurde den Ratten ein Tränenersatzmittel mit zugesetztem Filmbildner (Methocel® 2 %, Wirkstoff: Hypromellose, CIBA Vision Corp., Duluth, USA; Vertrieb: CIBA Vision GmbH, Grosswallstadt, Dtl.) in die Augen getropft. Die Augenoberfläche wird dadurch von einem dickflüssigen, lang haftenden Schutzfilm überzogen, der der Verdunstung von Feuchtigkeit entgegenwirkt. Mit Eintritt der Narkose wurde der Ratte zunächst das Kopfhaar vom Operationsareal am Schädel bis in den Nackenbereich (für die spätere Pumpen-Implantation) geschoren (Professionelle Akku-Haarschneidemaschine Typ 1556, Fa. Moser® AnimalLine, WAHL GmbH, Unterkirnach, Dtl.)

und die rasierte Kopfhaut im Operationsfeld gründlich mit Betaisodona®-Lsg. desinfiziert. Als Lichtquelle diente eine Kaltlichtlampe (KL 1500 electronic, Schott, Dtl.).

Dann wurde die Kopfhaut mit dem Skalpell ca. 1 cm dorsal der Augen in einem ungefähr 3 cm langen Sagittalschnitt entlang der Mittellinie inzidiert, und die umliegende Haut sowie das Subkutangewebe bis unter das Periost stumpf abpräpariert (s. Abb. 8). Der freiliegende Knochen wurde desinfiziert.

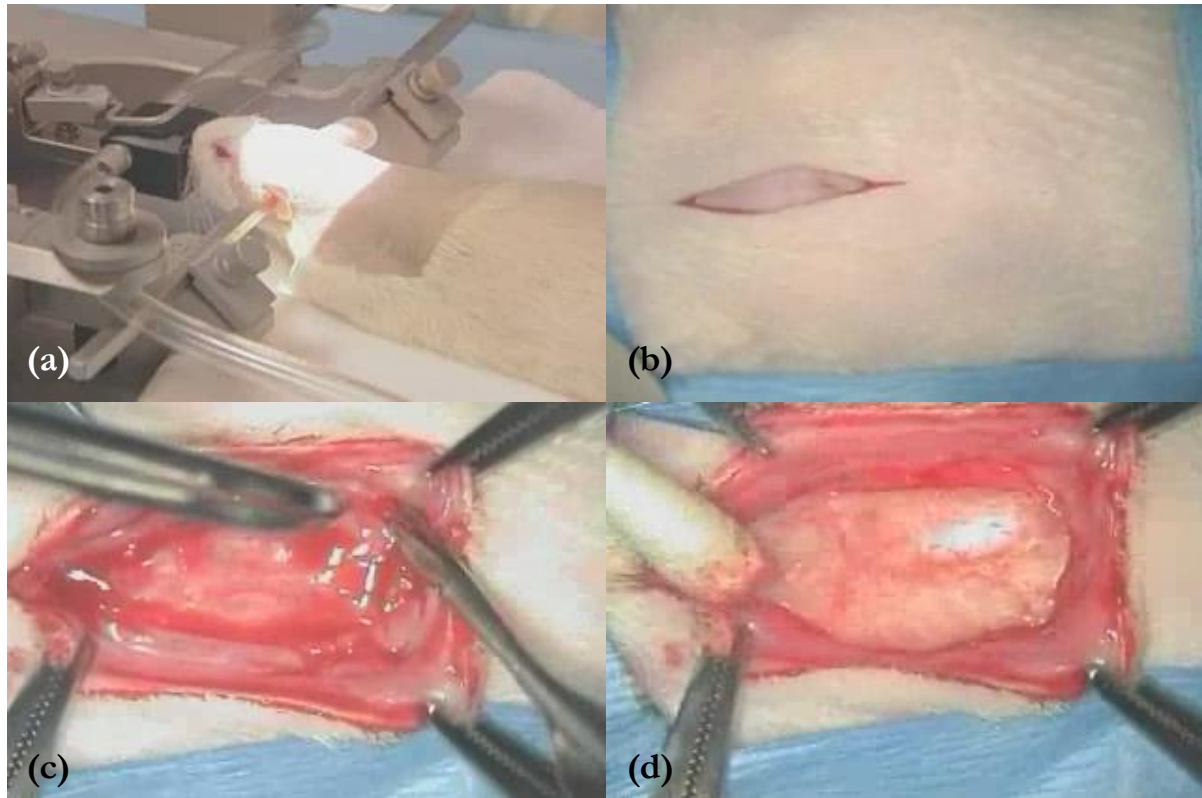


Abb. 8 (a-d): Aufsicht auf den Operations-Situs. Nach Rasur des Kopfhaars und Zugang über einen sagittalen Kopfbautschnitt wird das Subkutangewebe bis unter das Periost abpräpariert (aus⁶).

Im weiteren Operationsverlauf dienten zwei kranimetrische Messpunkte auf der Schädelkalotte der Ratte, Bregma und Lambda (s. Abb. 9), der Orientierung. Das rostral gelegene Bregma definiert sich als Kreuzungspunkt zweier Schädelnähte, nämlich der Sutura sagittalis mit der Sutura coronalis, und ist im stereotaktischen Koordinatensystem des Rattengehirns (vgl.³²⁸) als Nullpunkt festgesetzt. Der weiter dorsal gelegene Punkt Lambda bildet den Kontaktpunkt der Sutura lambdoidea mit der Sutura sagittalis.

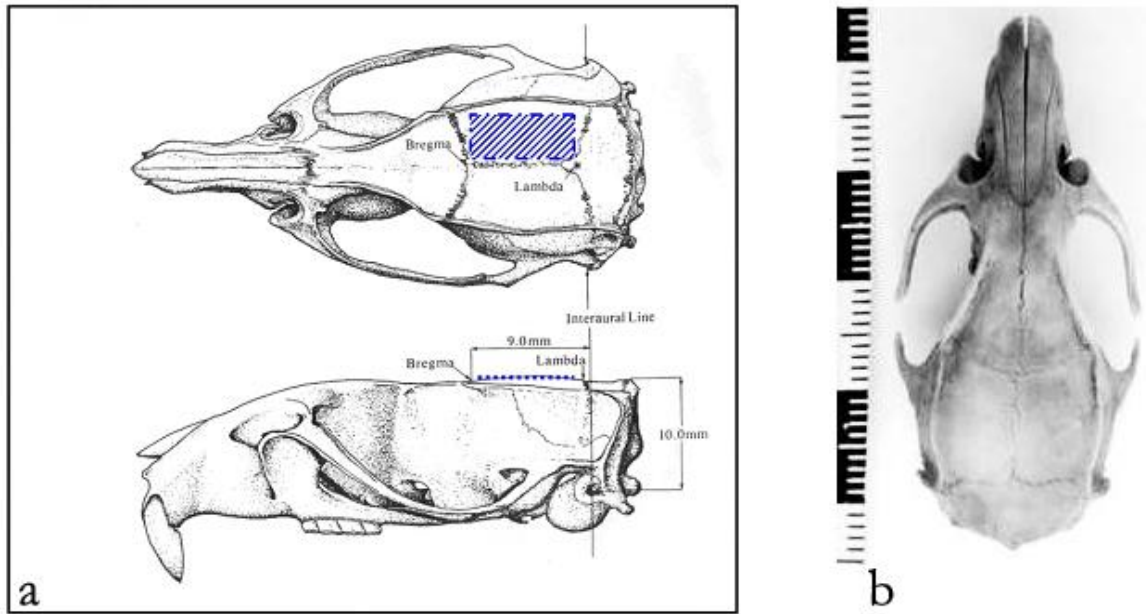


Abb. 9: (a) In der Anthropologie verwendete Messpunkte Bregma und Lambda. Darstellung des Trepanationsbereichs (blau) entlang der Suturæ coronalis, sagittalis und lambdoidea des Rattenschädels (modifiziert nach³²⁹). (b) Fotografie eines Rattenschädels (aus¹).

Nach Darstellung von Koronar-, Sagittal- und Lambdanaht mit den oben genannten anatomischen Landmarken wurde auf der rechten Hemisphäre, mittig zwischen Bregma und Lamda lokalisiert, eine 1,5 cm x 1 cm große Kraniektomie ca. 1 mm lateral von der Mittellinie vorgenommen. Mit Hilfe eines Mikrobohrers (Fa. FARO, Typ B680, Ornago, Italien) und eines geeigneten Bohraufsatzes (Fa. Meisinger USA, L.L.C., Colorado, USA; Vertrieb: Henry Schein® Dental Depot GmbH, Regensburg) wurde das umschriebene Areal in der Schädelkalotte mittels Trepanation eröffnet, das Knochenfenster abgehoben und der rechte frontoparietale Kortex freigelegt (s. Abb. 9). (Während der Kraniektomie wurde der Bohrer kontinuierlich mit physiologischer Kochsalz-Lsg. gekühlt.) Die Dura wurde intakt gelassen. Im Anschluss erfolgte die stereotaktische Fein-Ausrichtung der frontoparietal trepanierten Kortexoberfläche auf die Kontusionseinheit.

III.1.3.1.2 CCII-Apparatur und Traumatisierung in Vollnarkose

Zur Induktion einer experimentellen, traumatischen Kortexverletzung an Versuchstieren wurde die in Studien^{106,252} erprobte CCII-Apparatur (s. Abb. 10 und Abb. 11) eingesetzt. Dieses Traumamodell wurde vom *Biomedical Science Department* des *General Motors Research Laboratory* konzipiert, von dem *Medical Bioengineering Department* des *College of Virginia* weiterentwickelt und ist ein gängiges und anerkanntes tierexperimentelles Instrumentarium zur Erzeugung standardisierter und reproduzierbarer zerebraler Traumata.

Das Druck erzeugende Moment für die Kontusion bildete ein Computer-kontrollierter, pneumatisch angetriebener Luftdruckkolben (*PNEUMATIC IMPACTOR CONTROLLER*, Biomedical Engineering Facility, Virginia Commonwealth University, Virginia, USA). Der Kontusionsstoß wurde von einem Metallbolzen ausgelöst, der 3 mm im Durchmesser umfasste und eine leicht konvexe Oberfläche aufwies. Dabei wurde der Bolzen durch einen doppelwirkenden pneumatischen Rundzylinder mit einem Kolbendurchmesser von 19,75 mm und einer Hublänge von 5 cm beschleunigt. Der Kolbenstab war mit einer geringen Neigung gegen die Vertikale in einem stabilen Metallrahmen montiert. Die akzelerierende Schubkraft wurde über einen Druckluftanschluss (Druckluft, DIN EN 12021, GA 229, UN 1002, Luft verdichtet, Fa. Lindl, Höllriegelskreuth, Dtl.) aufgebaut und von einem Präzisions-Druckregler justiert. Über ein zweites, ebenfalls Druckluft-getriebenes Modul mit eigenem Druckregler erfolgte die Rückholbewegung des doppelwirkenden Zylinderkolbens. Für dieses Projekt wurde die erste Stoßwelle von 50 psi (*high pressure*) kombiniert mit einem gedämpfteren Rückstoß von 25 psi (*low pressure*). (Die in den USA gebräuchliche Druckeinheit psi bezeichnet „Pfund pro Quadratzoll“; für Überschlagsrechnungen gilt: 1 psi \approx 70 mbar.)

Der Kontusionsstoß war über einen arretierbaren Sicherheitsschalter auslösbar. Die Kontaktzeit, also die Zeit bis zum Einsetzen der Rückholbewegung, ließ sich über einen variablen Zeitverzögerungsschalter einstellen. Auf dem Tisch des Metallrahmens war eine stereotaktische Halterung montiert, die es durch Höhen-, Seiten- und Neigungsverstellung erlaubte, das in diesem Rahmen fixierte Tier präzise gegenüber dem Kontusionsbolzen auszurichten. Für die Einstellung des Kontusionsablaufs wurde der Bolzen zunächst in Kontakt mit der Dura gebracht, was durch ein tiefenverstellbares Schraubgewinde ermöglicht wurde. Hierbei wurde der Stereotaxieschlitten derart positioniert, dass die Schlagrichtung in radiärer Richtung zur konvexen Kortexoberfläche stand. Dadurch verlief der Bolzenstab unter einem Aufschlagwinkel von 41 ° im Zentrum der Kraniotomie parallel zur Gehirnoberfläche. Die Impressionstiefe konnte dann durch Verschrauben der Bolzenspitze eingestellt werden, wobei die Ganghöhe des Gewindes 1 mm/Umdrehung entsprach. Die Bolzenspitze wurde zur Sicherung der Impressionstiefe durch eine Mutter gekontert.

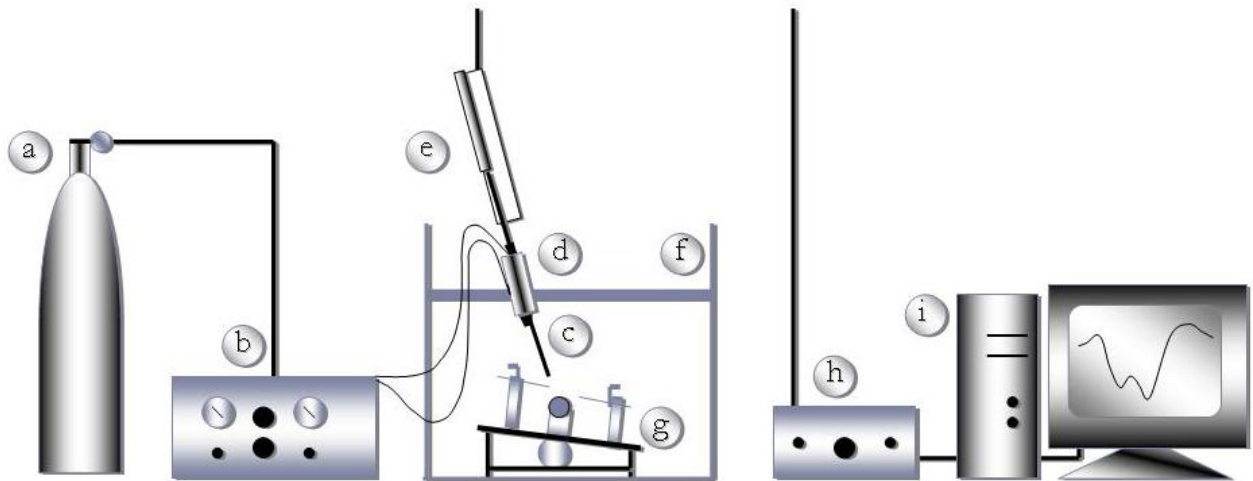


Abb. 10: Schemazeichnung der CCII-Apparatur mit (a) Druckluftflasche, (b) Nieder- und Hochdrucksteuerung, (c) Schlagbolzen, (d) Druckventil, (e) dem linearen variablen Differentialtransformer, (f) Halterungsrahmen, (g) Stereotaxieschlitten, (h) Frequenzgenerator und Phasenshifter und (i) LabView-Programm-Routine (modifiziert nach¹⁰⁶).

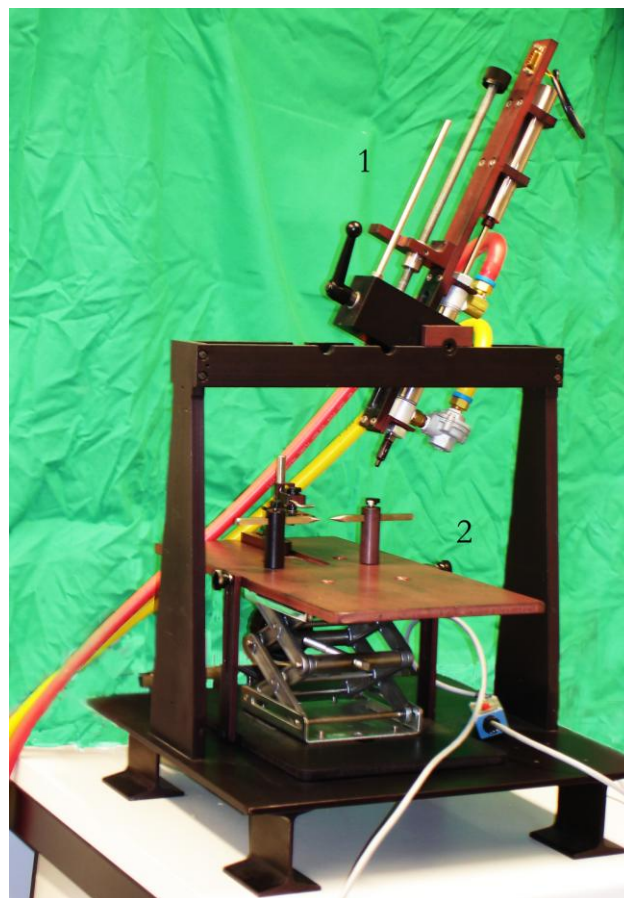


Abb. 11: Traumamodell des CCII. Abgebildet ist die Kontusionseinheit bestehend aus (1) dem am Stahlrahmen fixierten Kontusionsschlitten mit Bolzen und (2) dem höhenverstellbaren Tisch mit stereotaktischer Halterung, in welcher die Versuchstiere fixiert werden.

Für die Kontusionierung im aktuellen Experiment wurden die biomechanischen Parameter der CCII-Apparatur gemäß Tab. 5 gewählt.

| Parameter an der CCII-Apparatur | |
|-------------------------------------|---------|
| Maximale Impressionsgeschwindigkeit | 4,4 m/s |
| Impressionstiefe | 2 mm |
| Impressionsdauer | 320 ms |
| Kontusionsdruck | 50 psi |
| Rückholdruck | 25 psi |
| Kontusionskraft | 200 N |
| Rückholkraft | 20 N |

Tab. 5: Biomechanische Parameter zur Traumatisierung am CCII-Modell.

Nach Einstellung aller apparativen Parameter wurde die narkotisierte und im Stereotaxie-Rahmen unter der Kontusionseinheit fixierte Ratte sorgfältig mit der Trepanationsfläche gegenüber dem Kontusionsbolzen ausgerichtet. Mit Auslösen des Kontusionsstoßes drang der Bolzen mit einer Geschwindigkeit von 4,4 m/s in die Dura ein und verursachte dabei gezielt eine Deformation von 2 mm Gewebstiefe. Es wurde ausschließlich der rechtsseitige frontoparietale Kortex läsiert. Die Lokalisation und Ausdehnung der Läsion ließ sich makroskopisch beim Schneiden des Gehirns am Schlittenmikrotom sowie mikroskopisch beim Vergleich des traumatisierten Kortex mit der nicht läsierten, contralateralen Hirnhemisphäre überprüfen.

Die Kontrolltiere (keine kortikale Traumatisierung, keine Pumpen-Implantation) wurden ohne Anwendung des CCII der Anästhesie und nach Inzision der Kopfhaut der Kraniektomie mit anschließender Wundversorgung unterzogen.

Vor dem Wundverschluss wurde den traumatisierten Versuchsgruppen in einem zweiten Operationsschritt ein intrazerebroventrikuläres Pumpsystem implantiert.

III.1.3.2 Implantation der osmotischen Minipumpe incl. zerebralem Infusions-Kit von ALZET®

III.1.3.2.1 Technische Beschreibung des Infusionssystems

Die verwendete Miniaturpumpe wird für den Gebrauch in Tierlabors hergestellt und ausschließlich in Versuchstiere implantiert. Die osmotischen Pumpen der Fa. Alzet® bieten eine Vielfalt an Applikationsmöglichkeiten (für Ratten mit einem Minimalgewicht von 20 g) und wurden bereits für viele unterschiedliche Substanzen erprobt.

In diesem Projekt wurden ALZET® Minipumpen eingesetzt, um die Testsubstrate dauerhaft s.c. applizieren zu können. Das implantierte Modell infundiert osmotisch über einen Zeitraum von sieben Tagen kontinuierlich und in kontrollierter Dosis ein appliziertes Agens in das Gewebe,

ohne dabei der Konnektion eines externen Systems zu bedürfen oder das Versuchstier häufig manipulieren zu müssen (s. Abb. 12). Um bei der Implantation des Fremdmaterials das Milieu keimfrei zu halten, wurden die ALZET®-Pumpen im Produktionsprozess einer sterilisierenden Strahlendosis (^{60}Co) ausgesetzt.

ALZET PUMP VS. CONVENTIONAL DRUG ADMINISTRATION

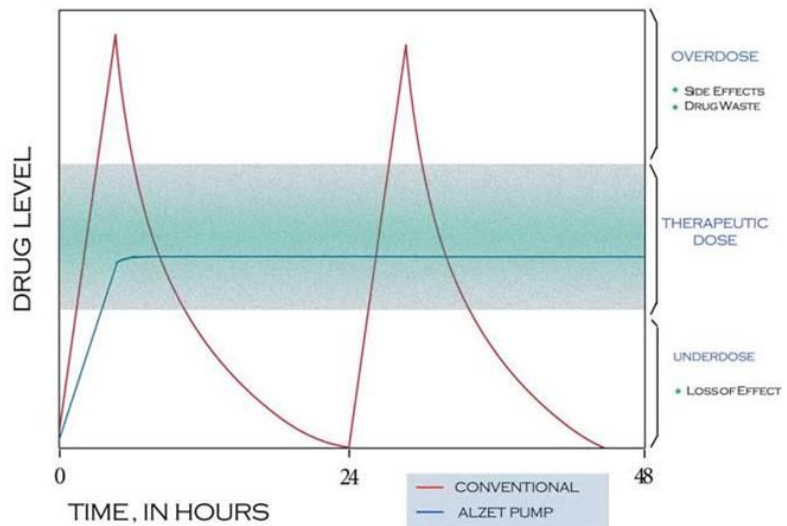


Abb. 12: Dosis-Wirkungs-Kurve bei Applikation einer Testsubstanz über eine osmotische Pumpe (aus⁶).

Osmotische Minipumpe von ALZET®. Die ALZET®-Pumpe (ALZET® Osmotic Pumps, MODEL 2001, DURECT™ Corporation, Cupertino, Kalifornien, USA; Vertrieb: Fa. Charles River (WIGA) GmbH, Sulzfeld, Dtl.) (s. Abb. 13) hat ihr Wirkungsoptimum bei einer Temperatur von 37 °C. Die osmotische Pumpe besitzt ein Reservoirvolumen von ca. 200 µl bei einer Pumprate von $1,0 \pm 0,15$ µl/h und einer Abgabeperiode von sieben Tagen. Die Pumpdauer errechnet sich dabei nach der Formel:

$$D = (V/Q) \cdot 0,95, \text{ wobei}$$

D die Dauer in Stunden bezeichnet, V das Fassungsvermögen des Pumpenreservoirs in µl beschreibt und Q die Pumprate in µl/h angibt.

Das Modell 2001 der Fa. Alzet erhält die konstante Abgaberate bis zum Absinken des Füllungsvolumens auf unter 5 % aufrecht. Danach fällt die Pumprate schnell auf Null ab. Diese Daten, mittleres Füllvolumen und mittlere Pumprate einschließlich der entsprechenden Standardabweichungen, wurden für jede Charge durch Herstellerangaben näher spezifiziert. Mit einer Länge von 3,0 cm, einem Durchmesser von 0,7 cm und einem Leergewicht von 1,1 g hat die Pumpe ein totales Fassungsvermögen von ca. 1,0 ml. (Gefüllt hat die Pumpe dementsprechend ein Gewicht von ca. 1,11 g.) Die ALZET® Minipumpe setzt sich aus drei unterschiedlichen Komponenten zusammen: aus dem Substratreservoir, der osmotischen Brücke und aus der semipermeablen Membran (s. Abb. 14).



Abb. 13: Osmotische Minipumpen der Fa. Alzet®, dargestellt in unterschiedlichen Größen (aus⁶).

Ein zusätzlicher Bestandteil ist der Flussmodulator, welcher aus einer 21 G Nadel mit einer Plastikcappe am Ende besteht. Diese Nadel wurde nach dem Füllen in die Pumpe gesteckt.

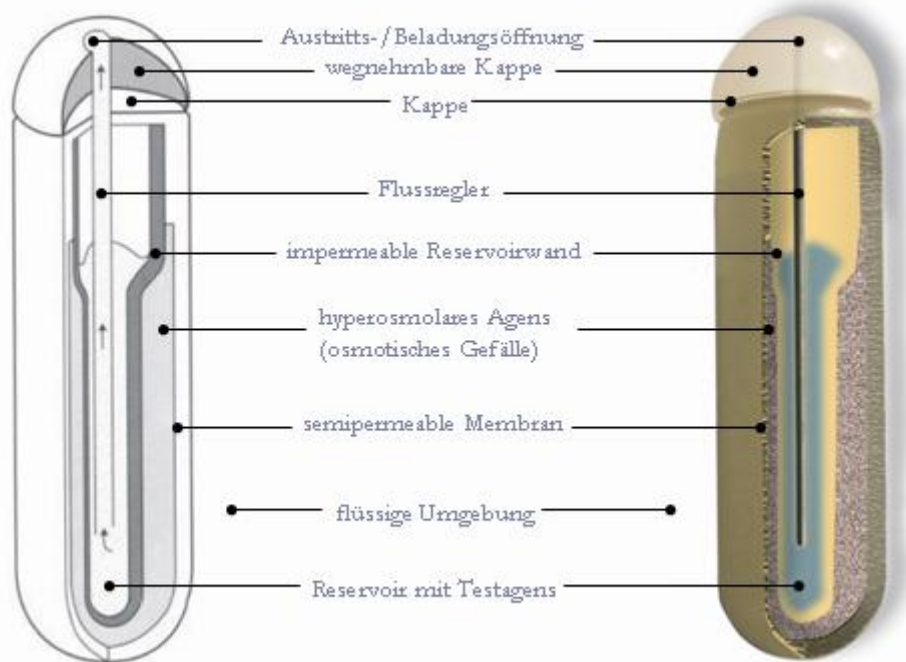


Abb. 14: Schematische Darstellung des Innenlebens einer ALZET® Minipumpe (modifiziert nach⁶).

Pumpengehäuse. Das Pumpengehäuse besteht aus einer äußeren semipermeablen Membran aus einem Zellulose-Ester-Gemisch und einer nichtpermeablen inneren Membran aus einem thermoplastischen Kohlenwasserstoff-Elastomer. Letztere umgibt das Substratreservoir, einen zylindrischen Hohlraum, der keinen Austausch mit der osmotischen Flüssigkeit des Nachbarräumens erlaubt. Als treibende Kraft für die Abgabe des eingefüllten Testwirkstoffes fungiert die osmotische Differenz zwischen der Reservoirkammer und der Umgebung. Das Substratreservoir enthält eine hohe Konz. an NaCl, welches einen für den Substrataustausch wirksamen osmotischen Gradienten aufrechterhält. Das hyperosmolare Milieu zwischen den beiden Membranen führt nach Implantation der Pumpe in den Körper der Ratte zu einem passiven Einstrom einer konstanten Flüssigkeitsmenge (Wasser) über die semipermeable äußere Membran. Durch den Flüssigkeitseinstrom wird ein konstanter Druck aufgebaut, der konsekutiv eine Kompression des Substratreservoirs bewirkt. Das Reservoir, bestehend aus elastischem Material (Kohlenwasserstoff-Elastomer), gibt den eingefüllten Wirkstoff sukzessive aus der Austrittsöffnung (über den Katheter) in das Gewebe ab.

Die Rate, mit der das Agens freigesetzt wird, ist direkt abhängig von der Wasserdurchlässigkeit der semipermeablen Membran und dem osmotischen Gradienten zwischen den beiden Räumen.

Während das Volumen, das pro Zeiteinheit freigegeben wird, konstant ist, lässt sich die Menge des Infusats steigern, indem man seine Anfangskonzentration erhöht.

Befüllungskanüle. Zur Pumpenbefüllung wurde eine feine, stumpfe Kanüle (27 G) von 2,2 cm Länge, einem Außendurchmesser von 0,04 cm und einem Innendurchmesser von 0,02 cm mitgeliefert.

Flussregler. Um Einfluss auf die Pumprate zu nehmen, wird ein Flussregler in der osmotischen Pumpe platziert. Diese Regelgröße ist 2,4 cm lang, hat 21 G, einen Außendurchmesser von 0,08 cm, einen Innendurchmesser von 0,05 cm und ein Gesamtgewicht von 0,2 g. Sie setzt sich aus drei Materialien zusammen. Die Verschlusskappe ist aus Polyethylen gefertigt, der Kanülenaufsatz besteht aus Styrol-Acrylnitril und das Röhrchen aus rostfreiem Stahl.

Zerebraler Infusions-Kit von ALZET®. Der ALZET® Brain Infusion Kit ist ein zerebrales Infusionssystem, das über eine operativ in den Schädel eingesetzte Kanüle einen direkten Zugang zum ZNS ermöglicht (s. Abb. 15).

Konnektiert mit der zuvor beschriebenen, osmotischen ALZET® Minipumpe können Testpräparate kontinuierlich

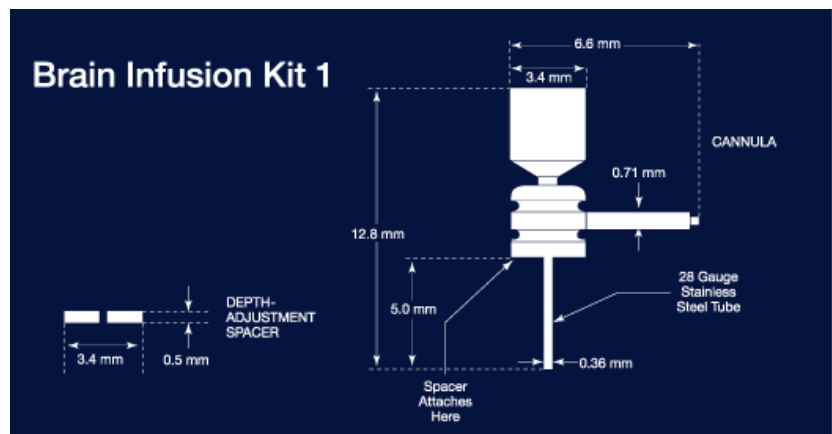


Abb. 15: Technische Skizze vom Aufbau des zerebralen Infusions-Kit (aus⁶).

lokal im ZNS appliziert werden. Die Applikationsform einer Substanz entscheidet neben ihren physikochemischen Charakteristika (z.B. Molekulargewicht und Konzentration) und/oder ihren Bindungseigenschaften sowie der Metabolisierung im Gehirn über das Ausmaß ihrer Distribution im Gewebe. Im Unterschied zur Punktion spezifischer fester Gewebsstrukturen im Gehirn, die in einer umschriebenen, lokoregionären Wirkung des Substrats in der jeweiligen zerebralen Struktur resultiert, werden durch eine intraventrikuläre Applikation infolge der Liquorzirkulation und Diffusion weite Gehirnareale der infundierten Substanz ausgesetzt³⁷⁴. In jedem Fall ist die Methode der zerebralen Infusion experimentell von Vorteil, wenn ein Substrat Effekte auf das ZNS hat, es aber die BBB nicht passieren kann. Mit Hilfe dieser Technik kann der Wirkstoff direkt im Gehirn appliziert werden, und seine lokalen Effekte im ZNS können unabhängig von den Wirkmechanismen in der Peripherie erforscht werden.

Zerebrale Infusionskanüle. Die zerebrale Infusionskanüle besteht aus einer Kanüle aus rostfreiem Stahl und einem Kanülenaufsatz aus Polycarbonat. Sie fasst ein Volumen von 0,323 µl. Die zugehörigen Maßangaben sind der Tab. 6 zu entnehmen.

Spacer. Zur Justierung und individuellen Modifikation der zerebralen Eindringtiefe der Infusionskanüle wurden Abstandshalter, sog. *Spacer* aus Polycarbonat, mitgeliefert. Ein *Spacer* misst 3,4 mm ($\pm 0,1$) im Durchmesser und ist 0,5 mm ($\pm 0,1$) dick. Mit Cyanacrylat können bis zu vier *Spacer* an der Basis der Infusionskanüle fixiert werden, so dass im Anschluss noch ein Wundverschluss möglich ist. In diesem Experiment wurde kein *Spacer* eingesetzt, da die gesamte Kanülenlänge (0,5 mm) intrazerebral zu liegen kommen sollte.

Katheter. Der Katheterschlauch besteht aus Polyvinylchlorid, ist (ungekürzt) ca. 15 cm lang und hat einen Innendurchmesser von 0,69 mm ($\pm 0,08$) sowie einen Außendurchmesser von 1,14 mm ($\pm 0,08$).

| Abmessungen der Infusionskanüle | Maße in [mm] ($\pm 0,1$) |
|------------------------------------------------------------|----------------------------|
| Gesamthöhe | 12,5 |
| Gesamtlänge | 6,8 |
| Länge der Kanüle | 5,0 |
| Durchmesser des Kanülenaufsatzes | 3,4 |
| Außendurchmesser des distalen/intrazerebralen Kanülen-Arms | 0,36 |
| Außendurchmesser des proximalen/externen Kanülen-Arms | 0,81 |

Tab. 6: Abmessungen der zerebralen Infusionskanüle, Angaben auf $\pm 0,1$ mm genau.

Konnektion von Pumpe und Katheter. Vor Befüllung des Infusionssystems wurde die osmotische Minipumpe mit dem Katheter und der Infusionskanüle verbunden (s. Abb. 16). Zuerst wurden die stereotaktischen Koordinaten der gewünschten Infusionsstelle festgelegt, und die dafür benötigte Kanülenlänge kalkuliert. Nach Angaben der Fa. DURECT müssen Kanülen zur Ventrikelpunktion 4 bis 5 mm unter der Schädeldecke positioniert werden. Diese Vorgabe gilt für Versuchstiere mit einem KG von näherungsweise 250 g und ist individuell zu überprüfen. Unter Abwägung der Tiergröße, Schädelknochendicke und der stereotaktischen Koordinaten des Punktionsortes wurde für die L-förmige Kanüle eine Penetrationstiefe von 5 mm (ohne Einsatz von *Spacern*) gewählt. Der Katheter mit einer Gesamtlänge von 15 cm diente als Verbindungsstück zwischen der Infusionskanüle und dem Flussregler der ALZET® Pumpe. Vor Konnektion wurde die Distanz gemessen, mit der die Kanüle später zur Pumpe positioniert würde. Der Katheterschlauch sollte laut Hersteller 25 % länger sein als der gemessene Abstand, um dem Tier Freiheitsgrade in der Bewegung von Kopf und Nacken zu lassen. Für eine intraventrikuläre Infusion empfiehlt die Fa. bei einem durchschnittlichen Tiergewicht von 250 g eine Katheter-Länge von ca. 10 cm, wobei die Kanüle ca. 3 mm posterior des Bregma positioniert werden sollte. Entsprechend dieser Überlegungen wurde der Katheterschlauch vor Implantation auf eine Länge von ca. 10 cm zugeschnitten und an einem Ende mit der Infusionskanüle konnektiert. Das andere Ende wurde probeweise mit dem Flussregler verbunden, um durch

leichtes Ziehen an dem fertig installierten Pumpsystem die Haftung zu überprüfen. Keines der Enden durfte leicht disloziert werden können. Anschließend wurde das mit dem Flussregler in Kontakt stehende Katheterende für die folgende Befüllung wieder diskonnektiert.

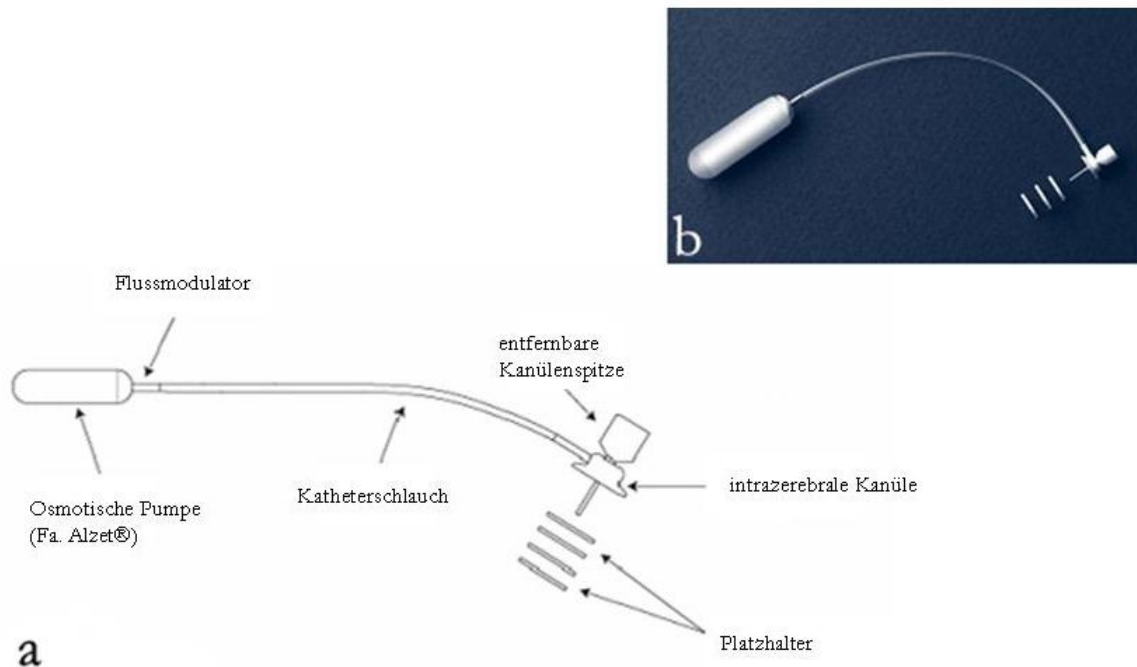


Abb. 16: (a) Schemazeichnung und (b) Foto einer osmotischen Pumpe nach Konnektion an das zerebrale Infusionssystem (Kit) (aus⁶).

III.1.3.2.2 Pumpenbefüllung

Erstellen der Grundverdünnung der Testsubstrate. Bei allen Arbeitsschritten wurde sorgfältigst auf eine sterile Technik bei der Handhabung, Füllung und Implantation des ALZET® Infusionssystems sowie der Bedienung der Geräte geachtet und es wurden OP-Handschuhe getragen, um den Materialkontakt mit Hautfett zu vermeiden. Dazu wurde in der Inkubationsphase mit den Pumpen unter der Zellkulturwerkbank (Sterilbank Biohazard Gelaire BSB 4, FLOW LABORATORIES GmbH, Meckenheim, Dtl.) gearbeitet.

Da das installierte Pumpsystem unmittelbar nach Implantation einsatzbereit sein sollte, musste das Material vor Operationsbeginn gemäß Herstellerangaben mindestens vier bis sechs Stunden, vorzugsweise über Nacht, mit befüllter Reservoirkammer in einer sterilen isotonen NaCl-Lsg. bei 37 °C inkubiert werden. Es bedurfte der angegebenen 4 - 6 h, damit die Pumpe ihre volle Pumpleistung erreichte, und die Infusion der gespeicherten Präparate in konstanter Rate erfolgte. Zudem wurde dadurch das Risiko minimiert, dass die Infusions-Lsg. in der Kanüle ausfällt, oder die Kanüle während des Infusionsvorganges durch Gewebe verlegt wird.

Daher wurden am Vortag der Operation die Grundverdünnungen der drei Testsubstanzen hergestellt:

PEDF. PEDF (BioProducts MD, LLC, Maryland, Inc., USA) wurde zunächst in Aqua destillata (dH₂O) (Aqua, B. Braun, Melsungen, Dtl.) (1 µg/µl) gelöst und dann in zwei unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. Entsprechend dem Reservoirvolumen von ca. 200 µl/Pumpe wurde das gelöste PEDF in künstlichem zerebrospinalen Liquor (*artificial cerebrospinal fluid* (aCSF)) auf Konzentrationen von 5 µg/ml sowie von 10 µg/ml verdünnt.

Künstlicher zerebrospinaler Liquor. Neben den PEDF-Wirkstoffen wurden Pumpen auch ausschließlich mit aCSF (laborinterne Herstellung, s. Tab. 7) als Transportmedium (Vehikel) befüllt. Diese im Experiment mit „aCSF“ bezeichnete 3. Versuchsgruppe diente der Kontrolle und dem Vergleich mit den beiden „PEDF-Gruppen“ (s. Versuchsablauf, Kapitel III.1.3).

| Wirkstoff | Menge | Hersteller |
|---------------------------------------------------------------|-----------|-----------------------------------|
| Natriumchlorid (NaCl) | 148,0 mM | Merck, Darmstadt, Dtl. |
| Kaliumchlorid (KCl) | 3,0 mM | Merck, Darmstadt, Dtl. |
| Calciumchlorid (CaCl ₂) | 1,4 mM | Merck, Darmstadt, Dtl. |
| Magnesiumchlorid (MgCl ₂) | 0,8 mM | Merck, Darmstadt, Dtl. |
| Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄) | 1,5 mM | Merck, Darmstadt, Dtl. |
| Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄) | 0,2 mM | Merck, Darmstadt, Dtl. |
| Rattenserumalbumin | 100 µg/ml | Sigma-Aldrich, Steinheim, Dtl. |
| Gentamycin | 50 µg/ml | PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Dtl. |

Tab. 7: Zusammensetzung des aCSF-Cocktails (pH = 7,4).

Die Menge der Förderleistung wurde dabei nach der mathematischen Gleichung

$$k_0 = Q \times C_d$$

kalkuliert. Die Menge der Pumprate k_0 , angegeben in µg/h, errechnet sich aus dem Produkt zwischen dem Fördervolumen Q in µl/h und der Konz. C_d des in dem Transportmittel gelösten Agens in µg/µl.

Vor Befüllung wurde unter sterilen Bedingungen das Leergewicht der Pumpe ermittelt. Anschließend wurden die vorbereiteten Substrate, die PEDF-Lösungen und aCSF, in 1 ml-Tuberkulinspritzen aufgezogen und (je nach Katheterlänge) in einer Menge von ca. 200 - 300 µl in die vorgesehenen Pumpen und Katheter eingebracht.

Befüllung der einzelnen Kompartimente.

Reservoirkammer der osmotischen Pumpe. Nach dem Füllen der Pumpe (s. Abb. 17) wurde das Gewicht erneut bestimmt, und anhand der Differenz zwischen dem Gewicht der befüllten Pumpe und ihrem Leergewicht kontrolliert, dass das Mindestfüllvolumen eingebracht worden war. Das Füllungsvolumen lag bei jedem Versuch über 90 % des Reservoirvolumens der Pumpe. Damit war sichergestellt, dass während des Füllungsvorganges keine Luftblasen in der Reservoirkammer der Pumpe eingeschlossen worden waren.

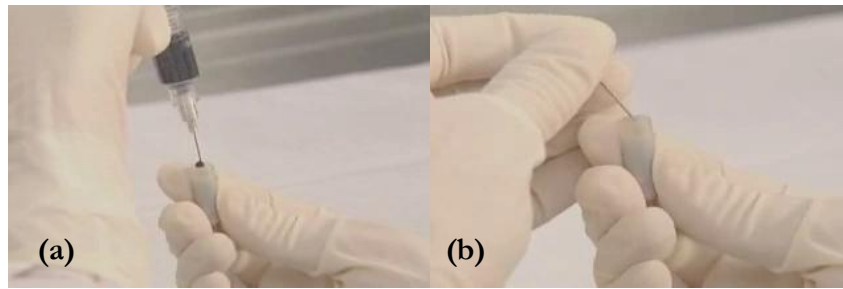


Abb. 17: (a) Demonstration der Befüllung des Substratreservoirs einer osmotischen Pumpe. Zu Anschauungszwecken ist die Injektions-Lsg. angefärbt. (b) Anschließend wird der Flussregler in die befüllte Pumpe eingesetzt (aus⁶).

Katheterschlauch. Vor dem eigentlichen Befüllen wurde die Katheterlänge unter Zugeständnis eines gewissen Spielraums festgelegt, der Katheterschlauch entsprechend zugeschnitten und an einem Ende mit der Infusionskanüle verbunden. An dem freien Ende des Katheterschlauches wurden mit der gleichen Technik und unter den gleichen Vorsichtsmaßnahmen wie zuvor über die mitgelieferte Füllungskanüle die jeweiligen Lösungen in den Katheter appliziert (s. Abb. 18). Dieser wurde im Anschluss an den Flussregler konnektiert.

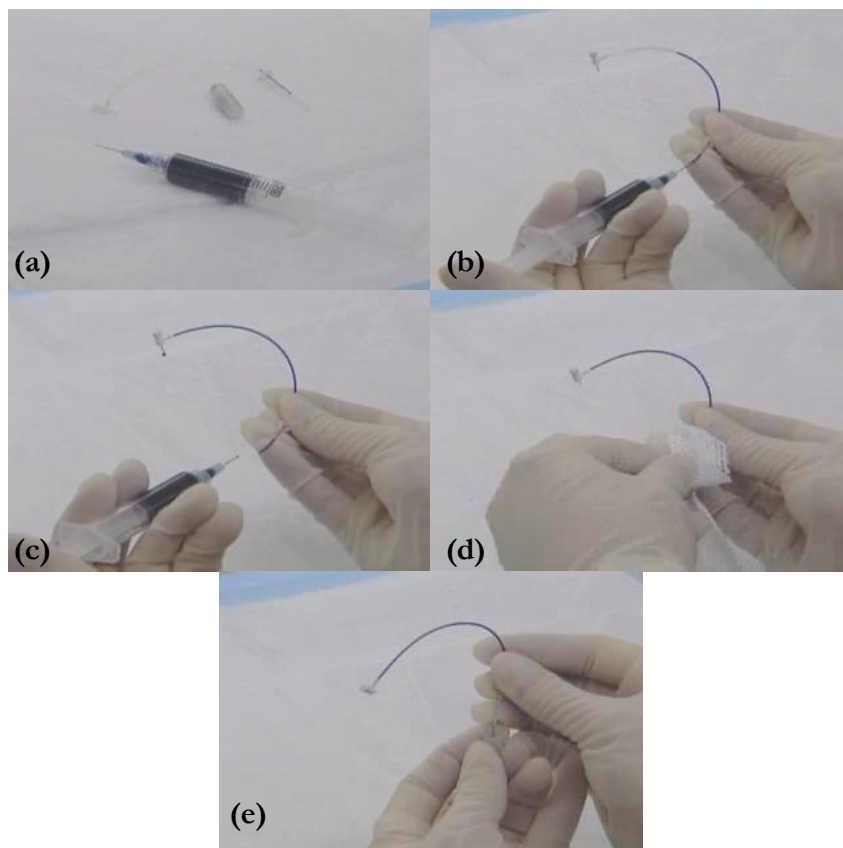


Abb. 18: (a-c) Darstellung der Befüllung des Katheterschlauches. Zu Demonstrationszwecken ist die Injektions-Lsg. angefärbt. In (d) wird die Katheter-Öffnung von der Benetzung mit überschüssigem Substrat gereinigt und dann (e) an den Flussregler in der Pumpe angeschlossen. Der Katheter ist am anderen Ende mit der Infusionskanüle verbunden (a-e) (aus⁶).

Über Nacht wurden die unterschiedlich befüllten Pumpsysteme im (mikrobiologischen) Brutschrank (Typ B6060, Heraeus instruments, Osterode, Dtld.) in das 37 °C warme isotonische

NaCl-Bad gestellt und bis zur Implantation dort einzeln und aufrecht in markierten Bechergläsern vorinkubiert. Dieses Vorgehen gewährleistete die sofortige maximale Pumprate im Tier.

III.1.3.2.3 Operative unilaterale Implantation des Infusionssystems

Subkutane Implantation der osmotischen Pumpe in eine medioskapuläre Hauttasche. Im Anschluss an das kortikale Trauma wurden die Versuchstiere für eine weitere stereotaktische Operation, die Implantation der ALZET® Pumpen, vorbereitet. Die subkutane Implantation der Pumpe erwies sich als optimale, weil für die Ratten nur einmalig mit „Stress“ verbundene Lösung für die dauerhafte Zufuhr der Testagentien.

Präoperativ wurde die bereits narkotisierte und rasierte Ratte neuerlich am Kopf mit den Ohren und Schneidezähnen in dem Stereotaxie-System fixiert und unter Sterilhaltung des Operationsfeldes in Bauchlage positioniert (s. Abb. 19). Die mediosagittale Inzision der Kopfhaut bis zum Periost/Schädelkalotte, die zuvor für die Trepanation angelegt worden war, wurde als operativer Zugang für die Implantation genutzt. Mit Hilfe einer Arterienklemme wurde die Haut der linken Schädelhälfte $\frac{1}{2}$ cm lateral der Medianebene, beginnend von nuchal, stumpf 5 cm nach kaudal vom subkutanen Bindegewebe abpräpariert. So entstand durch vorsichtiges Tunneln medioskapulär eine kleine Hauttasche, in welche die Pumpe subkutan eingebettet wurde (s. Abb. 20). Die subkutane Implantation bot sich als einfachste Technik und v.a. im Sinne der Versuchstiere als minimal invasiver Zugang an. Die Lokalisation am Rücken wurde gewählt, um auszuschließen, dass die Ratte das irritierte Hautareal mit der Schnauze oder den Extremitäten aufkratzen, sich verletzen und die Pumpe freilegen würde.

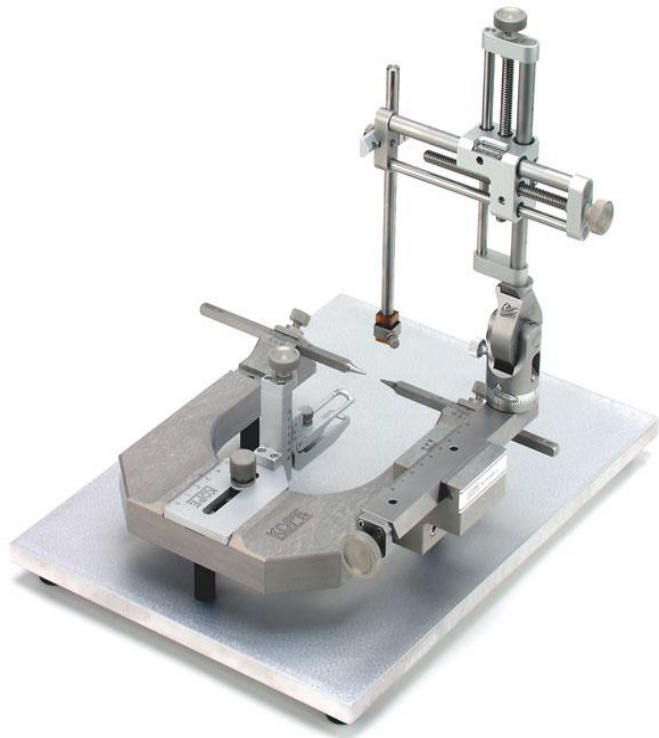


Abb. 19: Foto des eingesetzten Stereotaxie-Systems der Fa. David Kopf® (aus³).

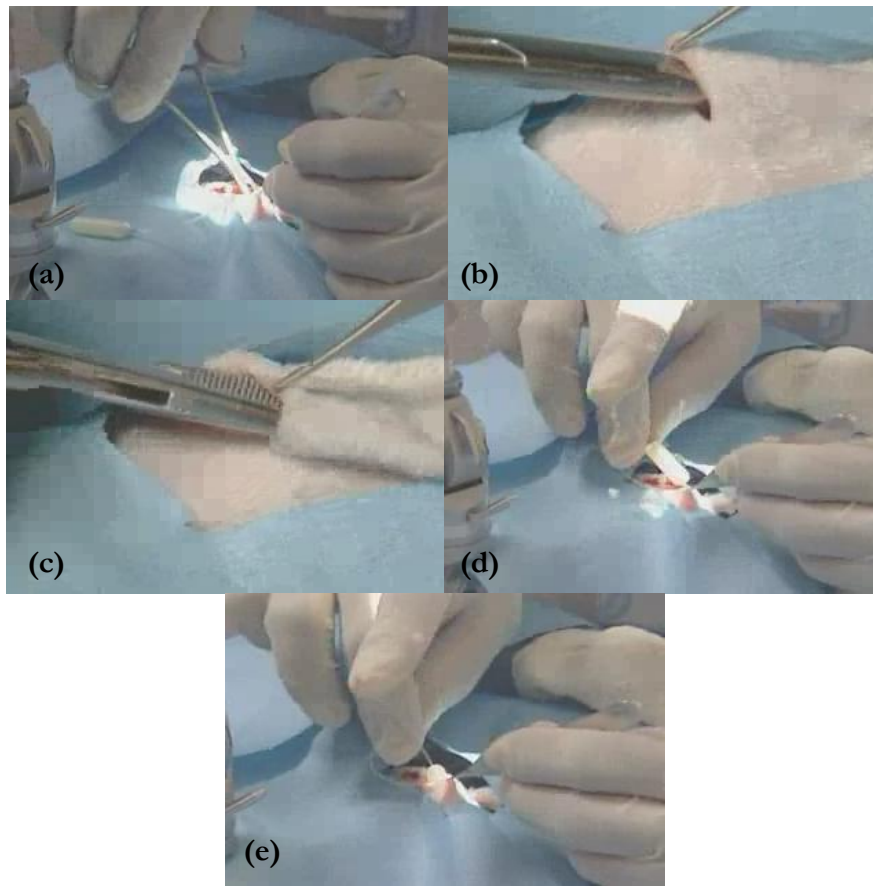


Abb. 20: (a-c) Dargestellt ist die medioskapuläre Anlage einer subkutanen Hauttasche durch vorsichtiges Tunneln. In (d-e) wird das Pumpengehäuse implantiert, wobei der Flussregler mit dem angeschlossenen Katheter nach rostral weist (aus⁶).

Intrazerebroventrikuläre Einlage der Infusionskanüle. Anschließend wurde die Implantation der Infusionskanüle vorbereitet. Unter Orientierung an den beiden kraniometrischen Referenzpunkten Bregma und Lambda wurden die zuvor bestimmten stereotaktischen Koordinaten (lateral: + 1,4; anterioposterior: - 0,8; dorsoventral: - 5) mit Hilfe des Stereotaxie-Systems aufgesucht. Eine Bleistift-Markierung legte den Schnittpunkt der Koordinaten als Punktionsort der Infusionskanüle fest. An dieser Marke wurde über ein feines Bohrloch, das gerade groß genug war, um eine Penetration der Infusionskanüle zu erlauben, vorsichtig trepaniert. Um die Kanüle intraventrikulär präzise zu positionieren, wurde der Kanülenaufsatz nicht manuell geführt, sondern in einem Implantationshalter an dem Schwenkarm des Stereotaxie-Rahmens fixiert. In dieser Haltevorrichtung wurde die Infusionskanüle durch die Schädelkalotte in den linken Seitenventrikel eingeführt, bis die Abstandbuchse nach der erwünschten Eindringtiefe von 5 mm auf der Schädeldecke aufsaß. Der externe Arm der Infusionskanüle kam dabei parallel zur Kalottenoberfläche zu liegen (s. Abb. 21).

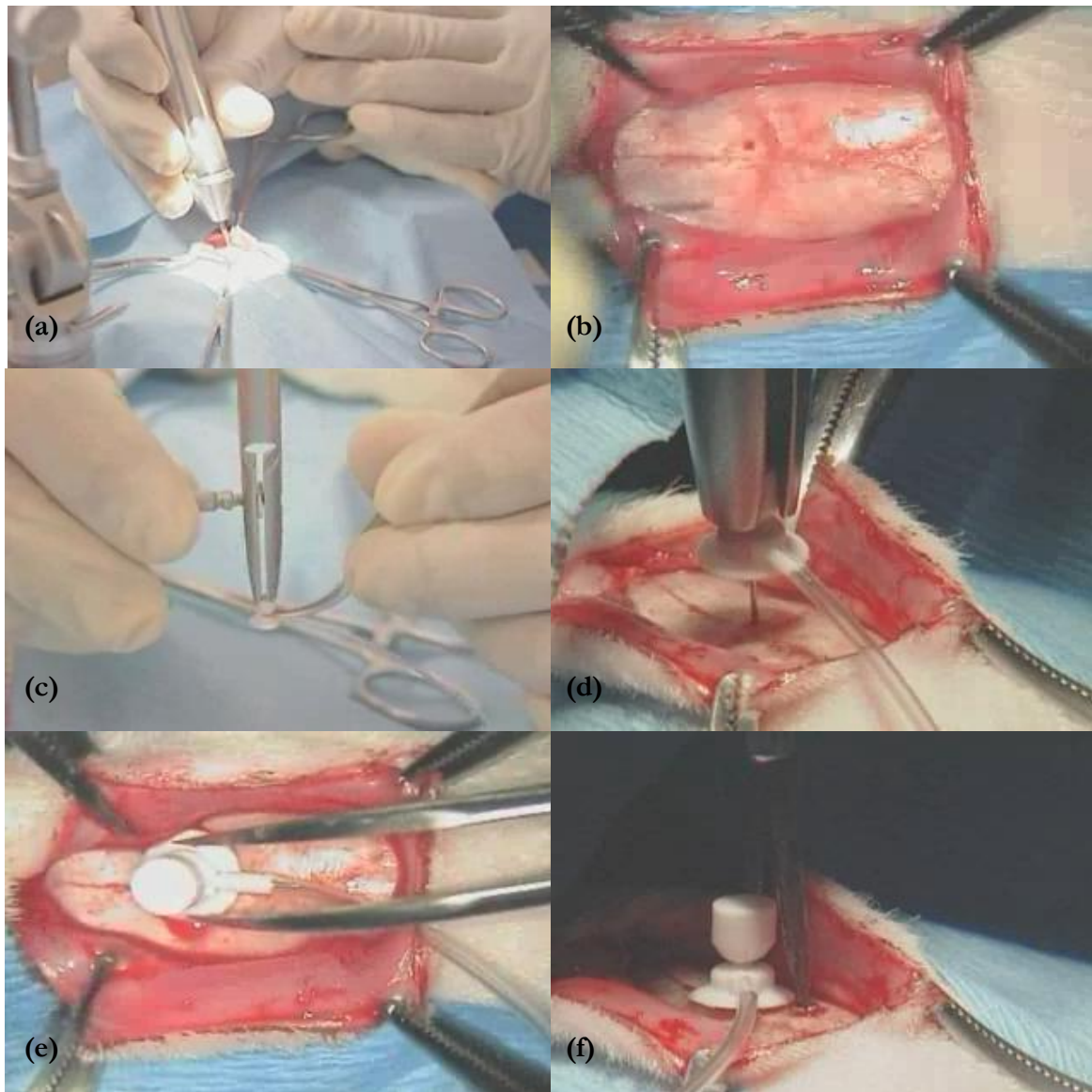


Abb. 21: (a-b) Darstellung des Situs während der koordinatengetreuen Anlage des Bohrlochs und (d-f) während bzw. nach Punktion des (hier) rechten Seitenventrikels mit der ALZET®-Infusionskanüle. (c) Die präzise Implantation der Kanüle erfolgt unter Führung an der Implantationshalterung des stereotaktischen Schwenkarms (aus⁶).

Nach dem Beschluss der gesamten Operation wurde die Kopfhaut mit einer Wundnaht adaptiert. Abschließend wurde die Kopfhaut im Operationsareal nochmals mit Bêtisodona® desinfiziert, und den Tieren zur Prophylaxe wiederum eine Augensalbe (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe, Wirkstoff: Dexpanthenol, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Whylen, Dtl.) appliziert.

Beide Operationen, das CCII und die Implantation des intraventrikulären Pumpsystems, nahmen pro Ratte ca. 30 min in Anspruch.

Nach Abgabe des Infusats wurden die Pumpen und der Infusions-Kit am 7. postoperativen Tag explantiert (s. Kapitel III.2.1.1). Nach Explanation konnte über das Residualvolumen der Pumpen die Abgabetätigkeit verifiziert werden. Anhand des ursprünglichen Füllvolumens und

des Restvolumens konnte eine durchschnittliche Pumprate berechnet werden, die mit den Angaben des Herstellers in jedem Fall übereinstimmte.

III.1.4 VERSUCHSABLAUF UND EINTEILUNG DER BEHANDLUNGSGRUPPEN

III.1.4.1 Versuchsablauf

Der Versuchsablauf orientiert sich an dem unten aufgeführten, an früheren Traumamodell-Studien erprobten Zeitschema (s. Abb. 22), in dem alle geplanten Aktionen und deren Rahmenbedingungen erfasst sind. Der Versuchsaufbau erforderte eine ruhige und zielgerichtete Behandlung der Tiere.

Alle Versuchstiere erhielten am Operationstag sowie an den sieben darauf folgenden Tagen Injektionen von BrdU. Abgesehen von den Kontrolltieren wurde an allen Ratten intraoperativ eine unilaterale kontrollierte Traumatisierung des zerebralen Kortex der rechten Hemisphäre vorgenommen, und anschließend durch einen Eingriff in der contralateralen Hemisphäre ein ventrikuläres Pumpsystem installiert. So konnte über eine siebentägige Periode kontinuierlich eine definierte Konz. verschiedener Testsubstanzen in das ZNS infundiert werden. Am Morgen des 8. Experimenttages wurde die Versuchsreihe nach der letzten BrdU-Gabe durch transkardiale Perfusion beendet. Im Anschluss erfolgte die histologische Untersuchung der Gehirne.

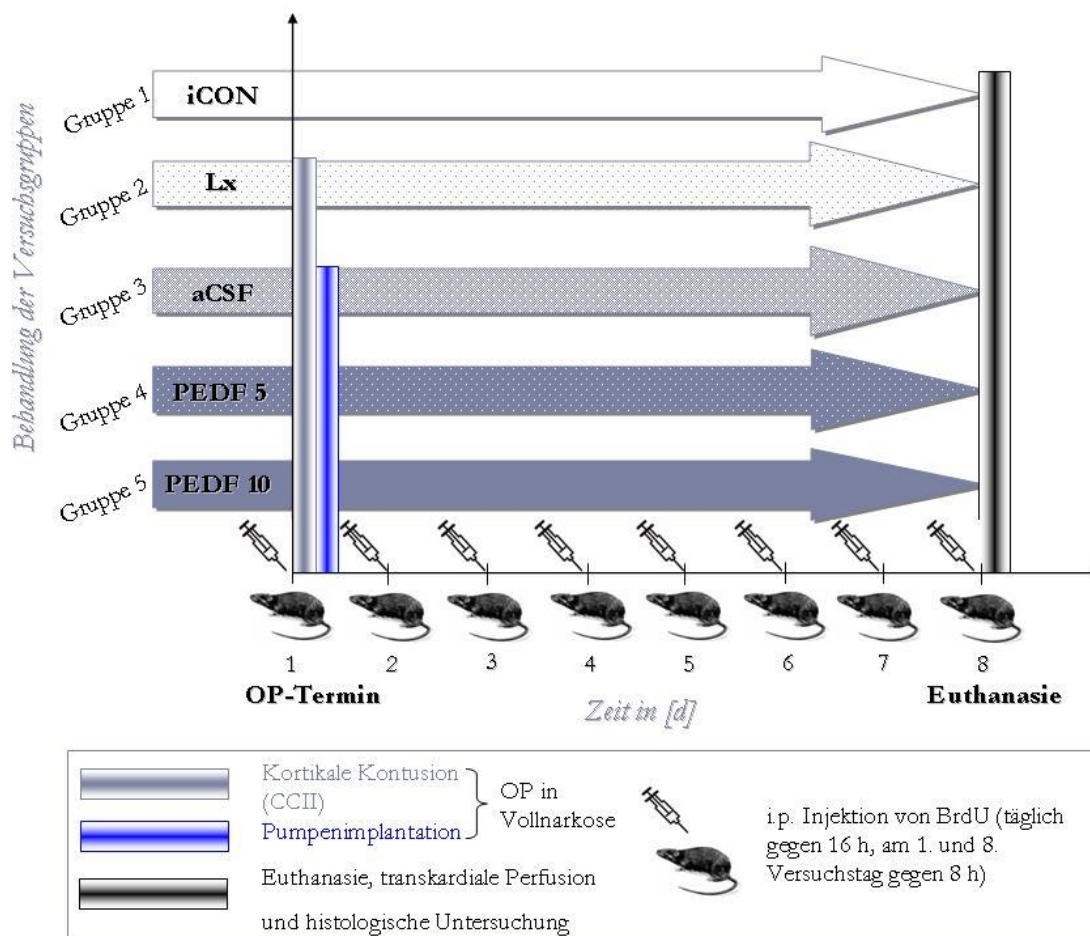


Abb. 22: Schematische Darstellung des gesamten Versuchsablaufs und des Zeitplans der einzelnen Versuchsschritte.

III.1.4.2 Versuchsgruppen

Das Projekt basiert auf fünf unterschiedlichen Versuchsgruppen. Aus anfänglich 40 Versuchstieren wurden fünf Gruppen à $5 \leq n \leq 9$ Tiere gebildet. Vor jeder Intervention wurden die Tiere aller Gruppen täglich gewogen (Waage: Sartorius AG, Göttingen, Dtl.), und der Verlauf des Körpergewichts während der achttägigen Beobachtungsphase notiert. Die Tiere wurden während der Versuche weiterhin einzeln in den Käfigen gehalten, und täglich ihr Gesundheitszustand beurteilt. Welche Behandlungsmethode die jeweilige Ratte erfuhr, wurde unmittelbar vor Operationsbeginn durch das Los entschieden. Die Gruppenzugehörigkeit war durch Nummerierung der Käfige und durch die zusätzliche Kennzeichnung der Ratten mit den offiziellen Ohrmarken bekannt.

Versuchsgruppe 1: Intakte Kontrolle (iCON). Unter den Versuchsgruppen fungiert die 1. Gruppe als Kontrollgruppe, bezeichnet als „**intact control (iCON)**“, der zusammen mit den Ratten aller anderen Gruppen vom Experimentbeginn am 1. Tag bis zum 8. und letzten Versuchstag jeweils einmal täglich zur selben Zeit (ca. 16.00 h) eine in 0,9 % NaCl verdünnte BrdU-Lsg. (50 mg/kg KG) i.p. injiziert wurde. In den ersten experimentellen Schritten unterschied sich die Behandlung der 1. Gruppe nicht von der der übrigen Gruppen. Die Kontrolltiere wurden zunächst narkotisiert und in der Stereotaxie-Halterung eingespannt. Nach der Rasur und Desinfektion des Operationsareals wurde wie bei den anderen Versuchsgruppen die Kopfhaut bis zum Periost mediosagittal inzidiert, die Schädelkalotte freipräpariert und anschließend das definierte Areal trepaniert. Im Unterschied zum weiteren Procedere bei den Gruppen 2 bis 5 wurde bei den Kontrolltieren kein CCII durchgeführt, sondern die Kopfhaut nach Entnahme des ca. 1,5 x 1 cm großen Knochenfensters mit einer Wundnaht adaptiert.

Versuchsgruppe 2: Läsion (Lx). Während Gruppe 2, titulierte als „**lesion (Lx)**“, ausschließlich läsiert wurde, hat man bei den übrigen drei Gruppen nach Durchführung der CCII stereotaktisch ein von einer intrakorporalen osmotischen Pumpe betriebenes Infusionssystem in die zum späteren Trauma contralaterale Hemisphäre implantiert, welche über einen Katheterschlauch mit einem zerebralen Infusionssystem in den linken Seitenventrikel führt. Die Reservoirkammer der Pumpe wurde mit 300 µl befüllt und gab über einen Zeitraum von sieben Tagen konstant $1 (\pm 0,15)$ µl/Stunde ab. So wurden je nach Versuchsgruppe unterschiedliche Agentien in das Liquorsystem der Ratten infundiert und gelangten durch die Liquorzirkulation auch in das auf der Seite der Läsion gelegene, ipsilaterale Ventrikelsystem.

Versuchsgruppe 3: Künstlicher zerebrospinaler Liquor (aCSF). In die Pumpen von Gruppe 3 wurden 300 µl künstlicher zerebrospinaler Liquor, daher „**aCSF**“ genannt, eingebracht. Während hier in Form von aCSF ausschließlich das Transportmedium (Vehikel) infundiert

wurde, erhielten die 4. und 5. Versuchsgruppe die in Wasser gelösten und mit aCSF verdünnten eigentlichen Testwirkstoffe.

Versuchsgruppen 4 bzw. 5: PEDF 5 µg/ml (PEDF 5) bzw. 10 µg/ml (PEDF 10). Den Tieren der letzten beiden Behandlungsgruppen applizierte man über die Alzet®-Pumpe PEDF unterschiedlicher Konzentrationen. Während Gruppe 4 die niedrigere Wirkstoffmenge von PEDF = 5 µg/ml (**„PEDF 5“**) erhielt, erhöhte man in Gruppe 5 auf PEDF = 10 µg/ml (**„PEDF 10“**).

Am 8. Tag nach Versuchsbeginn wurde das Experiment im Anschluss an die letzte BrdU-Gabe mit der transkardialen Perfusion der Tiere aller Gruppen abgeschlossen. Dabei wurde das zerebrale Infusionssystem samt der osmotischen Minipumpe unter Beachtung der Herstellerangaben (DURECT™ Corporation) aus der subkutanen Hauttasche bzw. dem linken Seitenventrikel der Ratte explantiert.

III.2 EX VIVO-UNTERSUCHUNG: HISTOLOGISCHE VERFAHREN

Durch die histologische Bewertung des Gehirngewebes nach der Induktion des fokalen Traumas konnten Schadensprozesse auf zellulärer Ebene erkannt werden. Primär verletzte Strukturen wurden von neuronalen Reaktionen des umliegenden Gewebes abgegrenzt.

III.2.1 AUFBEREITUNG DER GEHIRNE

Die chemische Zusammensetzung der zur Aufbereitung des Gewebes eingesetzten Fixativflüssigkeiten ist in Kapitel III.2.2 angeführt.

III.2.1.1 Transkardiale Perfusion, Explantation des Infusionssystems und Gehirnentnahme

Nach einer achttägigen Experimentphase erfolgte am Morgen des 8. Tages ca. zwei Stunden nach der letzten Applikation von BrdU die Perfusion der Tiere mit der nachfolgenden Entnahme der Gehirne.

Um das zerebrale Gewebe für die immunhistochemischen Färbungen aufzubereiten, wurden die Ratten zunächst gewogen und anschließend durch i.p. Gabe von 0,3 ml eines Anästhetikums (NARCOREN®, Wirkstoff: Pentobarbital-Na., Tierärztlicher Dienst, Dr. med. Spruss, Universität Regensburg) in eine tiefe, irreversible Narkose gelegt. Nachdem die Tiere auf Schmerzreize keine Reaktion mehr zeigten, wurde der Thorax der Nagetiere durch eine Thorakotomie eröffnet. Nun wurde die Herzspitze mit einer Klammer über den rechten und linken Ventrikel abgeklemmt und mit einer Schere mediosagittal eingeschnitten. Über diese Öffnung wurde eine abgerundete Perfusionsnadel in den linken Ventrikel eingebracht und unter

vorsichtigem, kurzzeitigem Öffnen der Klammer in der Aorta ascendens positioniert. Um die Perfusion auf die obere Körperhälfte zu beschränken, wurde die Aorta abdominalis abgeklemmt. Das rechte Atrium wurde im Bereich des Herzohrs mit der Schere eröffnet, damit die Perfluationsflüssigkeit abfließen konnte. Angeschlossen an eine Peristaltikpumpe (Ismatec® Midi-Vario, Typ ISM880, Fa. Ismatec SA, Labortechnik – Analytik, Glattbrugg-Zürich, Schweiz; Vertrieb: ISMATEC Laboratoriumstechnik GmbH, Wertheim-Mondfeld, Dtld.) wurden über das installierte Perfusionssystem zuerst ca. 84 ml isotoner Kochsalz-Lsg. (0,9 % NaCl-Lsg., 12 ml/min) für 7 min in den Kreislauf des Tieres gespült, und so das Gefäßsystem von für das Experiment hinderlichen Blutbestandteilen gereinigt. Dann wurden für weitere 14 min ca. 168 ml der frisch angesetzten paraformaldehydhaltigen Fixativflüssigkeit (4 %ige Paraformaldehyd (PFA)-Lsg., 12 ml/min) in das Kreislaufsystem der Ratte infundiert und schließlich das Gehirn mit dem oberen Halsmark freipräpariert (s. Abb. 23). Parallel dazu wurde das subkutan und intraventrikulär angelegte Pumpsystem unter Lösen der kraniellen Kutan- und Subkutannähte vorsichtig explantiert. Die Wunden waren in allen Fällen blande, Verwachsungen mit dem umliegenden Gewebe in Folge einer Irritation z.B. durch den Testwirkstoff wurden nicht beobachtet. Über Nacht gab man das Gewebe zur Nachfixation in die 4 %ige PFA-Lsg., bis es am nächsten Tag in 30 %ige Saccharose-Lsg. überführt und fortan bei 4 °C gelagert wurde.

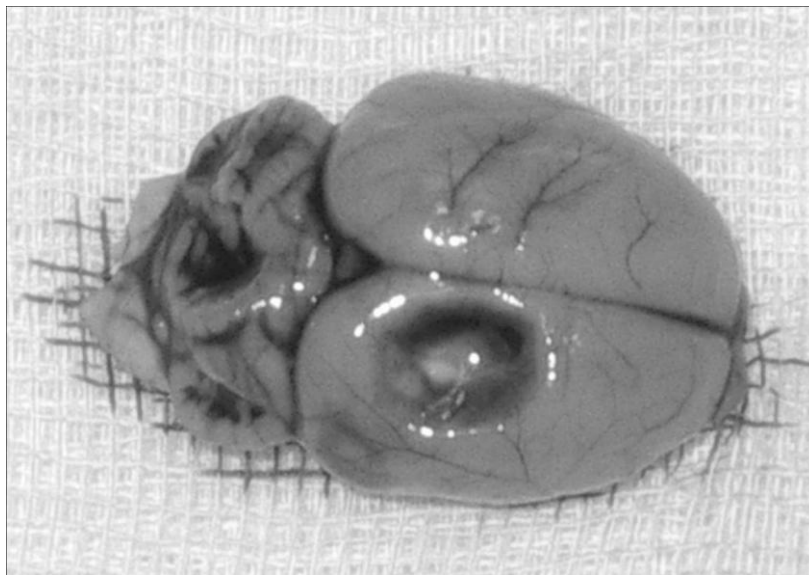


Abb. 23: Fotografische Aufsicht auf ein freipräpariertes Rattengehirn mit den beiden Großhirnhemisphären (rechts), dem Cerebellum und dem Übergang in die Medulla oblongata (links). Rechts frontoparietal ist makroskopisch das fokale Trauma zu erkennen.

III.2.1.2 Anfertigen von Gewebsschnitten am Schlittenmikrotom

Im Folgenden galt es, das Gewebe für die Anfertigung von histologischen Schnittpräparaten zu präparieren. Im Hinblick auf den späteren immunhistochemischen Nachweis von Antigenen in den Zellen und dem Gewebe war es bei der Gewebevorbehandlung von Bedeutung, die Antigenität und die Gewebsstrukturen bestmöglich zu erhalten.

Dazu wurden die fixierten Gehirne auf ein Schlittenmikrotom gefroren und Frontalschnitte angefertigt. Auf das Mikrotom (LEICA SM 2000R, LEICA, Wetzlar, Dtl.) wurde ein spezieller Kupfertisch (Eigenbau) aufgeschraubt, mit einer Wasserwaage ausgelotet und durch randständiges Auflegen von Trockeneis gekühlt. In einem weiteren Präparationsschritt wurde von jedem Gehirn der OB und die Medulla oblongata abgetrennt, indem zwei Rasierklingen an den anatomischen Strukturen parallel angesetzt wurden und gleichzeitig und mit mäßigem Druck vorsichtig in eine entsprechende Metallform (Mikromanipulator, Rodent Brain Matrix, Fa. ASI Instruments, Warren, USA) mit eingearbeiteten koronaren Rillen geführt wurden. Zur Fixation des Gehirns auf dem Aufsatz erfolgte eine plane Beschichtung mit Tissue-Tek® (Sakura, Zoeterwoude, Niederlande), worauf wenige Mikroliter Phosphatpuffer (PB) pipettiert wurden. Bevor diese Tropfen anfroren, wurde das vorbereitete Gehirn unter leichtem Druck senkrecht aufgesetzt und bis zur Härtung ca. eine Minute mit Trockeneis überschichtet. In gefrorenem Zustand konnten nun koronare Hirnschnitte von rostral des Chiasma opticum bis zum Beginn des Cerebellums angefertigt werden. Zur späteren Orientierung, ob bei einem Schnitt die ipsilaterale Seite, d. h. die Hemisphäre mit der kortikalen Läsion, oder die contralaterale Seite mit der implantierten Alzet-Pumpe vorliege, wurde jeweils im linken Kortex mit einer Rasierklinge eine oberflächliche Kerbe gesetzt. Vor Schnittbeginn wurde das Gehirn aus dem Einfriermedium freigelegt, und eine Nullebene für den ersten in die Auswertung eingehenden Gewebeschnitt definiert. Diese war anatomisch ungefähr zwischen den koronaren Schnittebenen „Plate 7“ mit Bregma = 3,70 mm und „Plate 8“ mit Bregma = 3,20 mm lokalisiert und konnte makroskopisch aufgesucht werden. Die angegebenen Koordinaten sind dem topographischen Atlas des Rattengehirns von Paxinos und Watson³²⁸ entnommen. Anterior der Nullebene gelegenes Gewebe wurde vom rostralen Gehirnde in großzügigen Schnitten abgehobelt, wobei das Messer bereits senkrecht zur Sagittalebene ausgerichtet wurde, um die Hemisphären symmetrisch abzubilden. Mit dem Schlittenmikrotom wurden 30 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt (s. Abb. 24), mit einem Aquarellpinsel vorsichtig von der angefeuchteten Schneide des Messers abgehoben und in 96-well-Platten (TPP,



Abb. 24: Darstellung des Schlittenmikrotoms mit Kupfertisch (1) und Metallklinge (2).

Zellkultur Testplatte 96F, Peske GmbH & Co. KG, Aindling-Arnhofen, Dtl.) mit Kryoprotektions (*Cryo-Protection-Solution* (CPS))-Lsg. überführt. In dieser wurden die Schnitte bei 4 °C gelagert. Während des Schneidens wurde makroskopisch verifiziert, ob die Kanüle korrekt intraventrikulär platziert worden war, und ob auch die Lokalisation und Ausdehnung des fokalen Traumas interzerebral vergleichbar waren.

Die Schnitte wurden für die nachfolgend beschriebenen Färbungen den 96-*well*-Platten entnommen. Dabei wurde für jede Färbung aus den Zellkulturplatten willkürlich eine vertikale Reihe mit Gewebeschnitten ausgewählt. Zur Vergleichbarkeit betrug der Abstand der Schnittebenen innerhalb einer Farbe- und somit Analysereihe jeweils 360 µm (12 *wells* x 30 µm Schnittdicke). Von der Nullebene ausgehend wurden aus einem Rattengehirn ca. 12 - 16 Schnitte hergestellt.

III.2.2 IMMUN-/HISTOCHEMISCHE REAGENTIEN UND IHRE ZUSAMMENSETZUNG

Im folgenden Abschnitt sind alle chemischen Reagentien, die zur Aufbereitung der Rattengehirne oder bei der immunhistochemischen Färbung der Gewebeschnitte eingesetzt wurden, in einer Übersicht tabellarisch zusammengestellt. Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Lösungen selbst hergestellt, und die Reagentien von der Fa. SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH (Steinheim, Dtl.) bezogen. Das in den Lösungen verwendete dH₂O wurde der laborinternen Millipor-Anlage entnommen.

III.2.2.1 Puffer-Lösungen

- Tris-Puffer (*Tris Buffered Saline* (TBS)) (1 l):

| | | |
|----------------------|-------------------------|----------------------------|
| dH ₂ O | 920 ml | Fa. Merck, Darmstadt, Dtl. |
| 1 M Tris-Cl (pH 7,4) | 50 ml (Endkonz. 50 mM) | |
| 5 M NaCl | 30 ml (Endkonz. 150 mM) | |

- 0,1 M Phosphatpuffer (PO₄³⁻; PB) (pH 7,4; 20 °C):

| | | |
|----------------------------------------------------------------------------|----------|----------------------------|
| 0,5 M Na ₂ HPO ₄ | 154,8 ml | Fa. Merck, Darmstadt, Dtl. |
| 0,5 M NaH ₂ PO ₄ (mit dH ₂ O) MW 137,9 | 45,2 ml | Fa. Merck, Darmstadt, Dtl. |

Die Lsg. wird mit Aqua bidest. (ddH₂O) auf 1000 ml aufgefüllt.

- 0,1 M Borat-Puffer:

| | |
|--------------------------------|------------|
| Borsäure | 3,09 g |
| Aqua dest. (dH ₂ O) | ca. 450 ml |

Das Gemisch wird mit 5 N NaOH auf pH 8,5 eingestellt und auf 500 ml aufgefüllt.

- Fish-Skin*-Gelatine-Puffer**

| | | |
|---------------------------------|----------|-------------------------|
| TBS | 497,5 ml | Fa. PAA, Pasching, Dtl. |
| Bovine-Serum-Albumin (BSA) | 5 g | |
| 45 % <i>Fish-Skin</i> -Gelatine | 2 ml | |
| Triton-X 100 | 0,5 ml | |

- 20 x SSC**

| | | |
|-------------------|------------|----------------------------|
| 3 M NaCl | 175,3 g | Fa. Merck, Darmstadt, Dtl. |
| 0,3 M NaCitrat | 88,2 g | Fa. Merck, Darmstadt, Dtl. |
| dH ₂ O | ca. 800 ml | |

Die Lsg. wird mit 10 N HCl auf pH 7 eingestellt und auf 1 l aufgefüllt.

- Chlorwasserstoff (Salzsäure, 2 N HCl)**

III.2.2.2 Fixativ-Lösungen

- 4 % Paraformaldehyd (PFA) in PB (pH 7,4; 4 °C; 1 l):**

| | |
|-------------|-------------------|
| PFA | 40 g |
| PB (pH 7,4) | ca. 800 ml + x ml |

Das in PB gelöste PFA wird unter dem Abzug für ca. 20 min auf 60 - 70 °C erhitzt. Die leicht trübe Lsg. löst sich bei ca. 70 °C problemlos. Die Lsg. wird nun mit PB auf exakt 1000 ml aufgefüllt und dann mit einem Faltenfilter filtriert. Anschließend lässt man das PFA auf Eis erkalten, misst den pH bei 20 °C und korrigiert ggf. mit HCl auf pH 7,4.

Zum Perfundieren verwendet man frisch angesetzte Lösungen (ca. 150 ml/Tier mit einem KG von ca. 200 g), die höchstens einen Tag alt sind und bei 4 °C aufbewahrt wurden.

III.2.2.3 Aufbewahrungs-Lösungen

- Kryoprotektions-Lsg. (CPS) (1 l):**

| | | |
|------------------------------------------------------------------|--------|--------------------|
| Glycerin (C ₃ H ₅ (OH ₃)) | 250 ml | Fa. INC, Ohio, USA |
| Ethylenglycol (C ₂ H ₄ (OH ₂)) | 250 ml | |
| 0,1 M PB | 500 ml | |

- 30 % Sucrose/Saccharose**

| | | |
|----------|--------|---------------------------|
| Sucrose | 150 g | Fa. Roth, Karlsruhe, Dtl. |
| 0,1 M PB | 350 ml | |

Die Lsg. wird auf 500 ml aufgefüllt und bei 4 °C gelagert.

III.2.2.4 Immunhistochemische Reagentien

III.2.2.4.1 Antikörper

Primär-Ak in Verdünnung:

- Maus anti BrdU (ms α BrdU): 1 : 250 in *Fish-Skin*-Gelatine-Puffer

Maus monoklonaler Ak (ms IgG, Klon: BMC 9318) gegen BrdU-Monophosphat, 50 μ g/500 μ l (Roche Molecular Biochemicals, Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, Indiana, USA)

- Ziege anti DCX (gt α DCX): 1 : 500 in Block-Lsg.

Affinitätspurifizierter Ziege polyklonaler Ak gegen DCX (C-18), 200 μ g/ml (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Dtl.)

- Maus anti ED1 (ms α ED1): 1 : 300 in Block-Lsg.

Maus anti Ratte ED1, purifiziertes IgG, 0,25 mg/0,25 ml (Serotec, Düsseldorf, Dtl.)

Primär-Ak der Negativkontrollen in Verdünnung:

- Maus IgG (ms IgG): 1 : 1000 in *Fish-Skin*-Gelatine-Puffer

- Ziege IgG (gt IgG): 1 : 1200 in Block-Lsg.

- Maus IgG (ms IgG): 1 : 120 in Block-Lsg.

Sekundär-Ak in Verdünnung:

- Esel anti Ziege-biotinyliert (dk α gt-bt): 1 : 500 in Block-Lsg.

Biotin-SP-konjugiertes affinitätspurifiziertes Esel anti Ziege IgG (H+L) 1 : 1 in Glycerol, 0,8 mg/ml (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Soham, Cambridgeshire, UK; Vertrieb: Fa. Dianova® Forschungsreagentien/Immundiagnostik, Hamburg, Dtl.)

- Esel anti Maus-biotinyliert (dk α ms-bt): 1 : 300 in Block-Lsg.

Esel anti Maus-biotinyliert (dk α ms-bt): 1 : 300 in *Fish-Skin*-Gelatine-Puffer (Biotin-SP-konjugiertes affinitätspurifiziertes Esel anti Maus IgG (H+L) 1 : 1 in Glycerol, 0,75 mg/ml (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Soham, Cambridgeshire, UK; Vertrieb: Fa. Dianova® Forschungsreagentien/Immundiagnostik, Hamburg, Dtl.)

III.2.2.4.2 Lösungen und Kits

- Block-Lsg.

| | | |
|------------------|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 3 % Esel-Serum | 300 μ l | Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Soham, Cambridgeshire, UK; Vertrieb: Fa. Dianova® Forschungsreagentien/Immundiagnostik, Hamburg, Dtl. |
| 0,1 % Triton 100 | 10 μ l | |
| TBS | 9690 μ l | |

- ABC-HRP-Kit/ABC-Komplex/Avidin-Biotin-Peroxidase (Vectastain® Elite ABC Kit, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, Kalifornien, USA)

| | |
|--------|-----------|
| TBS | 5 ml |
| Lsg. A | 2 Tropfen |
| Lsg. B | 2 Tropfen |

Die Lsg. wird ca. 30-60 min vor Gebrauch hergestellt und gemischt.

- DAB-Kit/3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid-Kit (DAB *substrate kit for peroxidase*, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, Kalifornien, USA)

| | |
|---------------------|-----------|
| dH ₂ O | 5 ml |
| Puffer | 2 Tropfen |
| Peroxid | 2 Tropfen |
| DAB-Grundverdünnung | 4 Tropfen |

Restliches DAB ist Sondermüll und wird nach Inaktivierung mit Na-Hydrochlorid in einem speziellen Abfallcontainer entsorgt.

III.2.2.5 Sonstige Reagentien

- 0,9 % NaCl

| | |
|--------------------|--------|
| ddH ₂ O | 800 ml |
| NaCl | 9 g |

Fa. Merck, Darmstadt, Dtld.

Die Lsg. wird mit ddH₂O auf 1000 ml aufgefüllt.

- Ethanol (C₂H₅OH), vergällt, 99 % (Chemikalien-Ausgabe, Universität Regensburg, Dtld.)

Für die Alkoholreihe wurden 30, 50, 70, 96 und 100 % Ethanol mit H₂O verdünnt angesetzt.

- Kresylviolett (CV)-Lsg.

| | |
|---------------------------------------|--------|
| 0,5 % CV | 1,25 g |
| ddH ₂ O | 15 ml |
| 1 M Natriumacetat | 15 ml |
| 1 M Essigsäure (CH ₃ COOH) | 85 ml |

Fa. Fluka, Buchs, Dtld.

Fa. Merck, Darmstadt, Dtld.

- Neo Clear® (Fa. Merck, Darmstadt, Dtld.)

- Neo Mount® Eindeckmedium (Fa. Merck, Darmstadt, Dtld.)

III.2.3 HISTOLOGISCHE FÄRBEMETHODEN

Bei jedem Tier wurde entsprechend einem Intervall von je 360 μm ein Schnitt immunhistochemisch gefärbt und analysiert. Die Konservierung und Aufbereitung der 30 μm dünnen Gewebsschnitte für die Analyse erfolgte bei allen in diesem Experiment angewandten Färbungen nach einer einheitlichen Technik:

der Objektträger (SuperFrost® Plus, Fa. Menzel-Gläser, Braunschweig, Dtl.) zur Aufnahme der Schnitte wurde zunächst mit Bleistift unter Vermerk der Versuchsgruppe, des Versuchstiers, der Färbetechnik und des Färbedatums beschriftet. Anschließend wurde dieser als schiefe Ebene in einer mit dH_2O gefüllten Petrischale so gelagert, dass der Wasserspiegel das Trägermedium zu ca. zwei Dritteln bedeckte. Je nach Färbung wurden die Gehirnschnitte wie zuvor beschrieben aus einer einheitlich gewählten vertikalen Reihe den Zellkulturplatten entnommen und durch vorsichtige Aufnahme mit Hilfe eines feinen Borstenhaarpinsels aus der CPS-Lsg. in die Petrischale überführt. Entsprechend des anatomischen Aufbaus des Rattengehirns wurden die freischwimmenden Gewebeschnitte mit dem Aquarellpinsel auf dem Objektträger angeordnet, wobei der das Medium überziehende Wasserfilm die Schnitte gleiten ließ und so eine Destruktion des Gewebes (z.B. durch Zerren) verhinderte. Zugleich förderte die wässrig benetzte Oberfläche die Adhäsion des einmal platzierten Schnittes auf dem Trägermedium. Die Schräglagerung des Objektträgers diente der Feinregulierung des Wasserspiegels, indem der Flüssigkeitsfilm bei jeder neuerlichen Aufnahme eines Gewebsschnittes mittels einer Einmalpipette (Costar® Transfer Pipettes, Corning Costar Corp., Cambridge, England) kontrolliert gesenkt werden konnte. Je nach Größe wurden pro Objektträger drei bis sechs Gehirnschnitte aufgezo- gen. Diese Arbeitstechnik mit frei schwimmenden Schnittpräparaten wird als „free floating“-Technik bezeichnet. Zur Glättung und Fixation des Gewebes auf dem Objektträger wurde dieser aus der Petrischale genommen und vorsichtig mit den halbfeuchten Pinselborsten getrocknet, ohne die Schnitte dabei zu quetschen. Die Schnitte ließ man über Nacht unter dem Laborabzug (WALDNER Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG, Wangen, Dtl.) lufttrocknen und deckte sie am nächsten Tag mit dem Eindeckmedium Neo Mount® unter Deckgläsern (24 x 60 mm, Fa. C. Roth, Karlsruhe, Dtl.) ein. So geschützt wurden die Schnitte in histologischen Präparatekästen bei Raumtemperatur aufbewahrt.

III.2.3.1 Histochemie: Kresylviolett (CV)-Färbung

Zur lichtmikroskopischen Darstellung von Neuronen im Nervengewebe eignet sich die CV-Färbung. Sie gibt Orientierung über den Anteil von markierten Nervenzellen an der Gesamtheit aller Zellen und lässt histologisch das Ausmaß der Gehirnläsion bestimmen. Neurone enthalten im Zytoplasma Nisslsubstanz, die dem rauen endoplasmatischen Reticulum entspricht. Dessen

Menge, Verteilung und Form variiert in den verschiedenen Neuronentypen und wird von dem verwendeten Farbstoff CV charakteristisch angefärbt. CV bindet basophile Strukturen wie Ribonukleinsäuren (RNA) und Desoxyribonukleinsäuren (DNA), so dass sich der Zellinhalt deutlich abzeichnet³⁶⁰. Wegen des Anteils an RNA ist die Nisslsubstanz sehr basophil und wird daher gut durch basische Anilinfarbstoffe angefärbt. Abhängig vom pH-Wert und dem Grad der Differenzierung färbt CV entweder ausschließlich Nisslsubstanz (Nissl-Färbung) oder Nisslsubstanz samt Kernen an und wird dann als Kernfärbung genutzt.

Für die Standardfärbung mit CV wurden die Gewebsschnitte der Spalte 6 der Zellkulturplatten entnommen und in der *free floating*-Technik auf Super Frost® Plus-Objektträger aufgezogen. Die Gehirnschnitte wurden über Nacht unter dem Dunstabzug luftgetrocknet und am nächsten Tag nach folgendem Standardprotokoll gefärbt: zunächst wurde die 0,5 %ige CV-Lsg. (s. o.) angesetzt. In der 0,5 %igen CV-Lsg. wurden die basophilen Gewebestrukturen für 15 bis 20 min angefärbt, und die Gehirnschnitte dann in warmem dH₂O gespült. Es schloss sich die Entwässerung des Gewebes in einer aufsteigenden Alkoholreihe an, die mit jeweils ca. drei Minuten Verweilzeit (in Abhängigkeit von der individuellen Differenzierung der Schnitte) von 30 %igem Alkohol, über 50 %igen zu 70 %igem Alkohol führte. Danach wurden die Schnitte jeweils zweimal nur kurz in 96 %igem Alkohol und zuletzt zweimal kurz in 100 %igem Alkohol geschwenkt. Im Anschluss wurden alle Objektträger zweimal je 15 min in Neo Clear® gestellt, mit Deckgläsern eingedeckt und schließlich zum Trocknen unter dem Dunstabzug gelagert.

III.2.3.2 Immunhistochemische Färbetechniken

Die Ag-Nachweise wurden immunhistochemisch erbracht. Das Prinzip der immunhistochemischen Färbung basiert auf einer hochspezifischen Ag-Ak-Reaktion mit einer sich anschließenden enzymgesteuerten Farbreaktion, welche letztlich die zu detektierenden Strukturen auf den Schnitten sichtbar und damit beurteilbar macht.

III.2.3.2.1 Grundlagen der Immunhistochemie

Immunhistochemische Färbemethoden dienen in der biologisch-medizinischen Forschung und der morphologischen Diagnostik dem Nachweis und der Identifikation antigener Komponenten in Zellen und Gewebsschnitten. Grundsätzlich wird seit der Erstbeschreibung dieser Methode durch Coons und Kaplan (1950)⁸⁵ noch immer wie folgt vorgegangen.

Indirekte immunoenzymatische Methode. Für dieses Experiment wurde die indirekte immunoenzymatische Methode gewählt. Ein spezifischer Primär-Ak (ohne Konjugat) bindet an die zu detektierenden Proteindomänen, in diesem Fall die Gewebsantigene BrdU, DCX und ED1, und wird seinerseits durch einen gegen die Ag-Strukturen des Erst-Ak gerichteten, mit

Biotin konjugierten Sekundär-Ak aus einer anderen Tierspezies nachgewiesen. Der sekundäre Ak richtet sich spezifisch gegen das Fc-Fragment von Immunglobulinen der Tierspezies, in welcher der primäre Ak hergestellt worden ist. Die eingesetzten Ak sind gegen speziesspezifische IgGs (hier Maus bzw. Ziege) gerichtet.

Um die gewebsgebundenen Ag-Ak-Reaktionen sichtbar zu machen, bedarf der Zweit-Ak der Konjugation mit einer Markersubstanz, hier dem Enzym Meerrettichperoxidase (*Horseradish Peroxidase* (HRP)). Weil die an den Sekundär-Ak konjugierte Peroxidase auch endogen im Gewebe, hauptsächlich in Granulozyten, Mastzellen und Erythrozyten, vereinzelt in Nervenzellen (und Dünndarmgewebe), vorkommen kann, müssen „falsch positive“ Reaktionen durch eine Blockade der endogenen Peroxidase verhindert werden. Zur Eliminierung der endogenen Enzymaktivität wird das Präparat vor der Immunfärbung mit einem Überschuss an Wasserstoffperoxid (H_2O_2) inkubiert.

Bei Nachweismethoden mit einem Markerenzym benötigt man einen gegen den Sekundär-Ak gerichteten Komplex, welcher das gewünschte Markerenzym trägt.

Avidin-Biotin-Komplex (ABC)-Methode. Dieses Verfahren wurde von Hsu et al. (1981)¹⁹⁷ entdeckt und als sog. „IBRAB“-Technik (*indirect bridged avidin-biotin technique*) bezeichnet. Es basiert auf der hohen Bindungsaffinität von Avidin, einem aus Hühnereiweiß gewonnenen Glykoprotein, zu dem Coenzym Biotin (Vitamin H). Avidin hat ein Molekulargewicht von 68 kDa und weist als Tetramer vier Bindungsstellen für Biotin auf. Bei der indirekten Avidin-Biotin-Methode wird als Sekundär-Ak ein Brücken-Ak eingesetzt, der mit Biotin markiert, d.h. biotinyliert, ist. Bei Biotin handelt es sich um ein wasserlösliches Vitamin, welches sich gut an den Brücken-Ak koppeln lässt und somit die Verbindung zu dem präformierten Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex herstellt. Bei diesem Enzymkomplex wird das Enzym Peroxidase über Biotin an das Avidin (bzw. Streptavidin) gebunden, wobei eine von vier möglichen Bindungsstellen des Avidin zur Kopplung des biotinmarkierten Sekundär-Ak frei bleibt. An die drei verbleibenden Bindungsstellen wird jeweils ein Molekül Biotin gebunden (s. Abb. 25).

Da mehrere ABC-Komplexe binden können, werden mehrere Marker-Enzymmoleküle am Ort des gewebsgebundenen Ag nachweisbar, wodurch die Sensitivität erhöht wird.

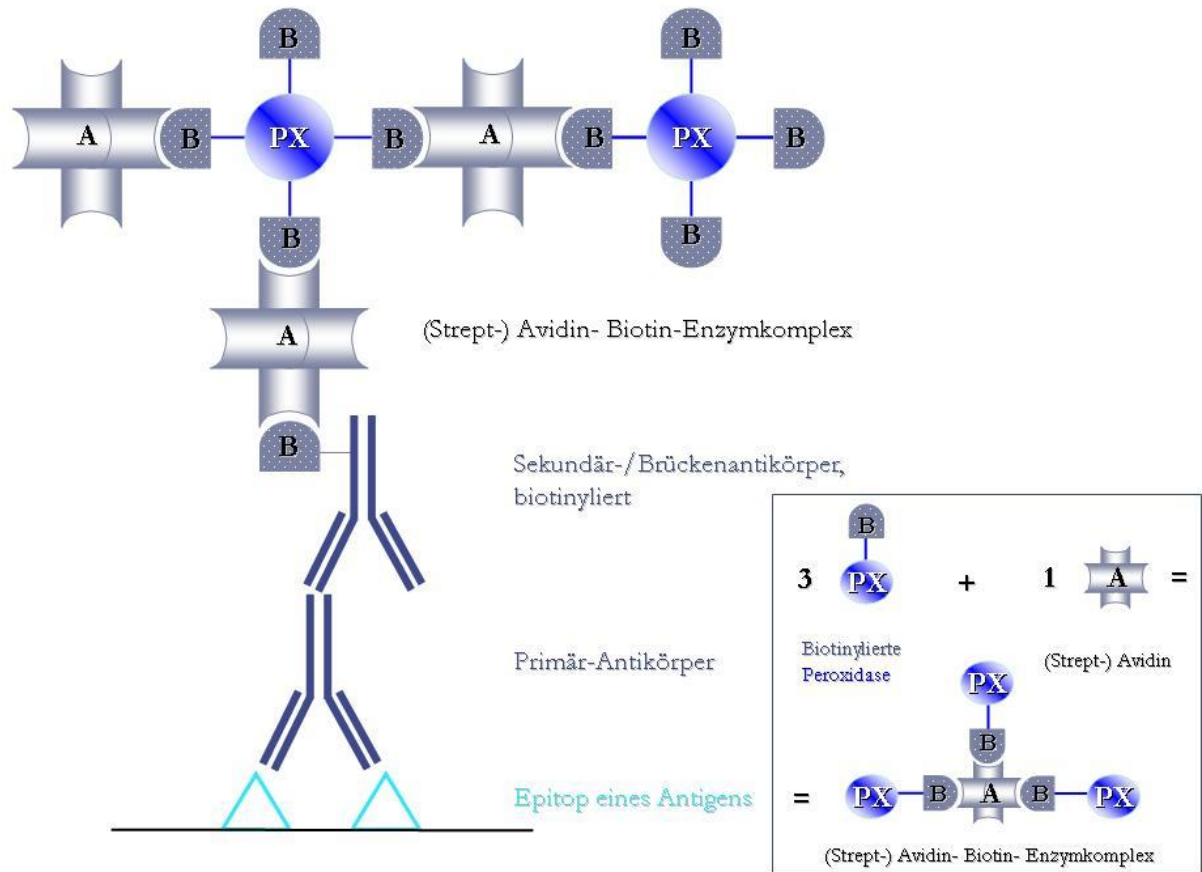


Abb. 25: Schema der indirekten immunoenzymatischen Methode. Der Enzym (Peroxidase)-konjugierte Sekundär-Ak markiert die Position des unkonjugierten primären Ak. Unter Ausnützung der Affinität von Avidin zu Biotin wird bei der ABC-Methode ein Avidin (A)-Biotin (B)-Peroxidase (PX)-Komplex an einen biotinylierten (B) Brücken-Ak gebunden. Die Peroxidase wird histochemisch nachgewiesen. Da mehrere Komplexe binden können, kann die Peroxidase-Konz. am Ort des Ag und damit die Sensitivität gesteigert werden.

Peroxidase-vermittelte 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Farbreaktion. Das komplexierte aktive Enzym HRP wird mit einem immunhistochemischen Farbstoff, einem sog. Chromogen, entwickelt, das in einer Enzym-Substrat-Reaktion den Ag-Ak-Komplex und damit die lokale Immunreaktion als farbiges „Endprodukt“ sichtbar macht. Das bei Peroxidase-Methoden am häufigsten eingesetzte Chromogen ist der immunhistochemische Farbstoff 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB). Das zunächst lösliche, leicht bräunliche DAB wird von der Peroxidase nach Katalyse mit H_2O_2 in sein unlösliches braunes Reaktionsprodukt überführt und stellt so hochselektiv die den Untersucher interessierenden Antigene dar. (Gegebenenfalls kann die Farbintensität von DAB durch spezielle Nachbehandlung mit Osmiumtetroxid, $NiCl_2$, $CoCl_2$ oder $CuSO_4$ verstärkt werden.) Die gute Strukturhaltung fixierter Gewebe, die Möglichkeit der Gegenfärbung zur Verbesserung der Strukturerkennung, und die Verwendbarkeit gewöhnlicher Lichtmikroskope sind wesentliche Vorteile der

enzymhistochemischen Methode. Das indirekte Verfahren zeichnet sich durch eine höhere Sensitivität gegenüber der direkten Methode aus.

Negativkontrolle. In der Immunhistochemie sind positive und negative Gewebekontrollen notwendig, um die Methodik und die eingesetzten Reagentien zu überprüfen und eine Qualitätssicherung zu gewährleisten. Hierbei sind negative Kontrollen von Bedeutung, um unspezifische Reaktionen eines Primär-Ak oder des Detektionssystems mit dem Gewebe aufzudecken. In diesem Projekt wurde parallel zu jeder Färbereihe ein Negativkontrollschnitt mitgeführt, der anatomisch so gewählt war, dass er einen angeschnittenen Seitenventrikel aufwies. Dieser Gehirnschnitt erfuhr zeitgleich dieselbe Behandlung wie das übrige Gewebe und durchlief die Färbeschritte in analoger Weise, unterschied sich allerdings in der Zusammensetzung des applizierten Primär-Ak-Cocktails. Abhängig von der jeweiligen immunhistochemischen Färbung wurde dem Gewebe nicht der Erst-Ak der Positivkontrollen zugesetzt, sondern das speziesspezifische, nicht an das jeweilige Marker-Ag bindende IgG:

- in der BrdU-Färbung ms IgG (statt ms α BrdU) in einem Verdünnungsverhältnis von 1 : 1000 in *Fish-Skin*-Gelatine-Puffer,
- in der DCX-Färbung gt IgG (statt gt α DCX) in einem Verdünnungsverhältnis von 1 : 1200 in Block-Lsg. und
- in der ED1-Färbung ms IgG (statt ms α ED1), 1 : 120 in Block-Lsg. verdünnt.

Die Negativkontroll-Ak gehen anders als die Positivkontrollen keine Bindung mit den BrdU-, DCX- bzw. ED1-Antigenen ein, was die ausbleibende charakteristische Farbreaktion (Farbumschlag ins Braune nach Entwicklung mit DAB) in den Negativkontrollschnitten bestätigt und eine unspezifische Anfärbung des Gewebes durch die übrigen Reagentien nachweislich ausschließt. Die Färbemethode samt der verwendeten Reagentien hat sich damit als wirksam und qualitativ geeignet erwiesen. Zur Erfolgskontrolle wurden unmittelbar nach jeder Färbereihe eine Positiv- und eine Negativkontrolle aufgezo- gen und am Lichtmikroskop (Leitz DM IL, Fa. Leica, Wetzlar, Dtl.) vergleichend überprüft.

Konservierung. Im Anschluss wurden alle BrdU-, DCX- und ED1-gefärbten Gehirnschnitte mit der *free floating*-Technik auf die Super Frost® Plus-Objektträger aufgezo- gen und - nach nächtlicher Trocknung - zur Konservierung mit Deckgläsern überzo- gen.

III.2.3.2.2 5'-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU)-Färbung

Eine klassische Nachweismethode für die Neubildung von Neuronen in der adulten Neurogenese von Nagetieren ist die Detektion von *in vitro*, aber auch *in vivo* (i.p.) appliziertem BrdU¹⁶⁸. BrdU ist ein synthetisches Thymidinanalogon, das dem Thymidinstoffwechsel (Thymidinkinase) unterliegt und während der DNA-Synthese-Phase (S-Phase) in der Interphase der Mitose kompetitiv

anstelle von Thymidin in die Zell-DNA inkorporiert wird. Es ist ein Derivat von Uridin, einem Nukleosid, welches statt dem Thymidin der DNA in der RNA vorkommt. BrdU (Desoxyribose + Uridinrest + Bromrest) und Thymidin (Desoxyribose + Thyminbasenrest) sind analoge Moleküle, die sich lediglich in ihrem Basenrest unterscheiden. Das Proliferationsverhalten kann indirekt über die Untersuchung der Inkorporation von BrdU überprüft werden. Alle Zellen, die sich während der BrdU-Expositionszeit in der S-Phase des Zellzyklus befinden, bauen das ihnen angebotene BrdU anstelle normalen Thymidins in die DNA ein, wo es wiederum durch Ak immunzytochemisch an Gewebsschnitten oder Zellkulturen nachgewiesen werden kann (s. Abb. 26). Zellkerne mit replizierender DNA färben sich dann schwarz-braun an. Diese Methode ermöglicht es, durch Bestimmung des Anteils der Zellen mit stattgefundenem Eintritt in die S-Phase Aussagen über die Verteilung der Zellen im Zellzyklus zu treffen.

Im Unterschied zur CV-Färbung wurden die immunhistochemisch angefärbten Gewebeschnitte erst im Anschluss an das Procedere der jeweiligen Färbetechnik auf Objektträger aufgezogen. Soweit nicht anders vermerkt wurden sämtliche Inkubationsschritte und Waschgänge bei Raumtemperatur auf dem Wippschüttler (Fa. E. Bühler, Hechingen, Dtl.) mit einer Wippbewegung von 22 U/min durchgeführt, um eine gleichmäßige Verteilung der Ak zu gewährleisten und dabei ein Verkleben der Schnitte zu verhindern. Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten eines immunhistochemischen Prozesses wurde mit Puffer-Lsg. „gewaschen“, d.h. nicht gebundene bzw. unspezifisch gebundene Ak wurden vom Schnitt abgespült, um eine nachfolgende spezifische Ak-Bindung zu gewährleisten. Zwischen den einzelnen aufeinanderfolgenden Waschgängen wurde das Spülmedium stets gewechselt und durch frisches ersetzt.

Zu Beginn der zweitägigen BrdU-Färbung wurden die Schnitte aus den Zellkulturplatten (96-well-Platten) in Kulturplatten überführt, die aus sechs Kunststoff-Einsätzen mit einem feinen Netz-Überzug am Boden bestanden, sog. *netwells*/6-*netwell-plates* (Corning Incorporated Costar®, Corning, New York, USA). Die *Netwells* mit 9 ml Fassungsvermögen je Vertiefung erleichterten

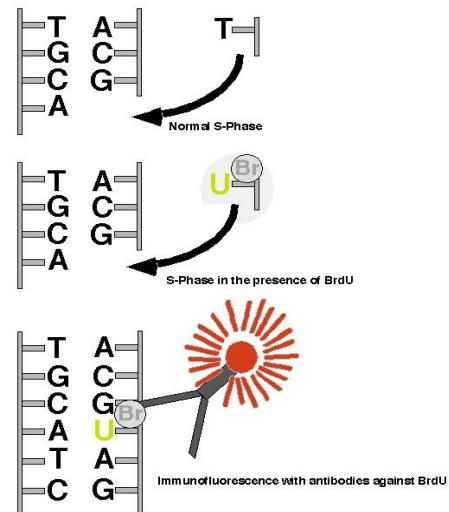


Abb. 26: Markierung von mitotischen Zellen mit BrdU. Die schematische Zeichnung zeigt im oberen Teil, wie in der normalen S-Phase der Mitose Thymidin (T), sich mit Adenin (A) paarend, in den neuen Strang der DNA eingebaut wird. Wird das Thymidinanalogue BrdU im Überfluß angeboten, kompetiert es mit Thymidin um den Einbau in die DNA und wird statt Thymidin in den neu synthetisierten Strang inkorporiert (mittleres Bild). Nicht eingebautes BrdU wird schnell vom Körper eliminiert. Zellen, die BrdU enthalten, können mit Antikörpern gegen BrdU sichtbar gemacht werden²¹⁸.

das häufige Überführen der frei schwimmenden Gehirnschnitte in die unterschiedlichen Lösungen. Am Morgen des 1. Färbetages wurde, beginnend mit dem rostral gelegenen Referenzschnitt jeder 12. Gehirnschnitt (Spalte 8 der Zellkulturplatten) aus CPS in TBS überführt und darin zweimal jeweils 10 min gewaschen. Im Folgenden wurde das Gewebe zum Blocken der endogenen Peroxidase in 0,6 %iges H_2O_2 , gelöst in TBS, eingebracht und 30 min auf den Schüttler gestellt. Das H_2O_2 wurde anschließend wieder zweimal je 10 min unter TBS-Wechsel gründlich aus dem Gewebe ausgewaschen. Dann wurden die Gehirnschnitte zur DNA-Strang-Separation 1 bis 2 h in einem Wasserbad bei 65 °C einer Lsg. aus 50 %igem Formamid in 2 x SCC ausgesetzt und weitere 5 min in 2 x SCC gespült. Anschließend behandelte man das Gewebe für 30 min in einer 2 N HCl-Lsg. bei 37 °C. Durch diesen Puffer mit hoher Ionenstärke wurde die DNA-Denaturierung und –Strangseparation fortgesetzt. Die stark saure Lsg. wurde daraufhin 10 min lang bei Raumtemperatur in 0,1 M Boratpuffer-Lsg. (pH 8,5) neutralisiert. Es folgten viermal je zehnminütige Waschschriffe in TBS. Durch diese Arbeitsschriffe wurde die DNA der Zellen denaturiert, und eine Bindung zwischen anti-BrdU-Ak und in die DNA integriertem BrdU ermöglicht. Nun war in die DNA inkorporiertes BrdU für den spezifischen Ak detektierbar. Um unspezifische Ak-Bindungen auszuschließen, wurde das Gewebe dann für 1 h in *Fish-Skin*-Gelatine-Puffer blockiert. Die sich anschließende Applikation der Ak-Cocktails erfolgte ebenfalls in Verdünnungen mit dieser Puffer-Lsg.. Vor der Ak-Inkubation mussten zum einen lipophile Membranen zerstört werden, um eine Bindung zwischen Ak und intrazellulär lokalisierten Antigenen zu ermöglichen, zum anderen wurden durch die Absättigung unspezifischer Ak-Bindungen Hintergrundsignale reduziert. Ein spezifischer Anti-BrdU-Ak aus der Maus, Maus-anti-BrdU (ms α BrdU), wurde in einem Verdünnungsverhältnis von 1 : 250 eingesetzt, und man ließ die Gehirnschnitte über Nacht bei 4 °C inkubieren.

Der 2. Färbetag begann mit neuerlichem Spülen der mit dem Primär-Ak vorbehandelten Gehirnschnitte für zweimal jeweils 10 min in TBS, sowie für 10 min in *Fish-Skin*-Gelatine-Puffer. Anschließend wurde das Gewebe für 2 h mit dem im Verhältnis 1 : 300 verdünnten Sekundär-Ak bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf wurde zuerst zweimal je 10 min in TBS gewaschen, dann 10 min in *Fish-Skin*-Gelatine-Puffer. Es folgte eine zweistündige Inkubation in dem ABC-Kit, um die Biotinidasefunktion in den Schnitten detektierbar zu machen. Dabei wurden die beiden Fertig-Lsg. A und B (s. o.) bei Raumtemperatur mit den Schnitten in Kontakt gebracht. Nach erneutem Spülen von dreimal je 10 min in TBS wurden die Schnitte für 2 bis 4 Minuten mit dem DAB-Kit entwickelt. Abschließend wurde das Gewebe dreimal jeweils 10 min in TBS gewaschen.

III.2.3.2.3 Doublecortin (DCX)-Färbung

Alternativ zur *in vivo*-BrdU-Markierung kann DCX zur Beurteilung der Modulation der adulten Neurogenese genutzt werden. DCX ist ein X-chromosomal kodiertes, Mikrotubulin-bindendes Phosphoprotein, das während der Embryonalentwicklung des ZNS und in Regionen adulter Neurogenese in Säugetieren spezifisch von proliferierenden Vorläuferzellen und Neuroblasten temporär exprimiert wird. Das Protein ist nur vorübergehend in diesem Zelltyp und weder in Stammzellen, noch in adulten Neuronen nachweisbar. Wenn Nervenzellen vermehrt absterben – beispielsweise ausgelöst durch Traumatisierung oder Ischämie – ist die Neurogenese-Rate des adulten Gehirns gesteigert^{162,386}. Die durch diesen Stimulus neu gebildeten Neuronen weichen dann zum Teil von ihren üblichen Pfaden wie etwa dem RMS ab und steuern stattdessen auf die Läsion zu. Die gerichtete Migration zu dem geschädigten Kortexareal ist gekoppelt mit der Expression von DCX^{258,260,264}. Postischämisch wurde eine Zunahme der Neurogenese über die vermehrte Expression von DCX in der SVZ, dem RMS und dem HC detektiert^{203,204}.

Die Gewebeschnitte aus Spalte 10 der Zellkulturplatten wurden mit Doublecortin angefärbt. Auch diese Färbetechnik nahm zwei aufeinander folgende Arbeitstage in Anspruch.

Der 1. Tag begann mit dem Überführen der Schnitte aus den 96-*well*-Platten in die vorher beschriebenen 6-*netwell*-Platten und zweimal jeweils 15-minütigem Spülen in TBS (0,1 M; pH 7,4). Die Gehirnschnitte wurden daraufhin in 48-*well*-Platten (Corning Incorporated Costar®, Corning, New York, USA) mit ca. 300 µl Block-Lsg./*well* überführt. Darin wurde das Gewebe 30 bis 60 min blockiert. Nun konnte der Primär-Ak Ziege-anti-DCX (gt α DCX) appliziert werden. Unter einer Verdünnung mit der Block-Lsg. im Verhältnis 1 : 500 und wiederum ca. 300 µl Lsg./*well* wurden die 48-*well*-Platten über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert.

Am 2. Tag wurde das Gewebe zunächst wieder in die 6-*well*-Platten überführt und dort dreimal je 15 min in TBS gewaschen. Danach gab man die Schnitte in die 48-*well*-Platten zurück und applizierte den Biotin markierten, gegen Ziegen-Ag gerichteten Sekundär-Ak Esel-anti-Ziege-biotinyliert (dk α gt-bt), der 1 : 500 in der Block-Lsg. verdünnt war. Das Gewebe wurde für 2 h mit dem verdünnten Sekundär-Ak (300 µl Lsg./*well*) auf dem Schüttler inkubiert. Nach Umfüllen in die 6-*well*-Platten schloss sich wieder ein Spülgang in TBS von dreimal je 15 min an. Dann wurde in 0,3 %iger H₂O₂-Lsg. für 30 min die endogene Peroxidase blockiert und schließlich wieder zweimal jeweils 15 min in TBS gewaschen. Der ABC-HRP-Kit wurde mit 300 µl Lsg./*well* in die 48-*well*-Platte pipettiert, die Schnitte dorthin überführt und auf dem Schüttler 1 bis 2 h inkubiert. Unter Verwendung der 6-*well*-Platten wurden die Schnitte dreimal je 15 min in TBS gespült und schließlich mit DAB entwickelt. In einem letzten Schritt wurde das Gehirngewebe dann nochmals zweimal kurz in TBS gewaschen, bevor die Schnitte wieder auf die Super Frost®

Plus-Objektträger aufgezogen und nach dem Trocknen mit Deckgläsern überzogen werden konnten.

III.2.3.2.4 ED1 (Makrophagen)-Färbung

Traumata wie die CCII wirken neben vielfältigen anderen Genesefaktoren als Induktoren auf die Proliferation immunkompetenter Zellen aus der mononukleären Makrophagen-Linie, die sog. Mikroglia, auch Hortega- oder Mesogliazellen genannt.

Die Gehirnschnitte in Spalte 4 der Kulturplatten wurden mit ED1 angefärbt. Das Färbeprotokoll für die ED1-Färbung folgt mit Ausnahme der verwendeten Ak identisch allen Arbeitsschritten des DCX-Färbeprotokolls. Als Primär-Ak wurde Maus-anti-ED1 ($\text{ms} \propto \text{ED1}$), als Sekundär-Ak Esel-anti-Maus-biotinyliert ($\text{dk} \propto \text{ms-bt}$) in einer Verdünnung von jeweils 1 : 300 mit der Block-Lsg. eingesetzt.

III.2.4 STEREOLOGIE-SOFTWARE-GESTÜTZTE DATENERHEBUNG

III.2.4.1 Software

Die Quantifizierung der Immunfärbungen und die Auswertung der Daten aus den einzelnen Versuchsgruppen erfolgte an einem standardisierten Auswertungssystem, bestehend aus der halbautomatischen Stereologie-Software *STEREOINVESTIGATOR* (MicroBrightField, Colchester, USA) und einer Farbvideokamera (3-CCD Farbkamera, MODELL HV-C20A, HITACHI DENSHI (EUROPA) GmbH, Radgau, Dtl.), die mit einem Mikroskop der Marke Olympus IX 70 (Fa. Olympus, Hamburg, Dtl.) verbunden war. Die Flächenmessungen wurden mit Objektiven unter vierfacher (Olympus UPlanFl 4x/0.13 PhL), die Auszählung der Zellen unter zehnfacher Vergrößerung (Olympus UPlanFl 10x/0.30 Ph1) durchgeführt.

Im Anschluss an die Datenerhebung wurden die Gehirnschnitte an einem Lichtmikroskop (Olympus® BX 51, Olympus, Hamburg, Dtl.) bei zehnfacher (Olympus®, UPlanFl 10x/0.30 Ph1) bzw. 40facher (Olympus®, UPlanFl 40x/0.75 Ph2) Vergrößerung mit Hilfe des angeschlossenen analySIS® 3.2-Systems (Soft Imaging System, Münster, Dtl.) und der verbundenen Farbvideokamera (ColorView 12, Fa. Olympus, Hamburg, Dtl.) fotografisch aufgenommen und digitalisiert. Das in den Abbildungen dieser Arbeit dargestellte histologische Bildmaterial wurde mit Adobe Photoshop CS (Adobe Systems Inc., San Jose, USA) auf das passende Format zugeschnitten und zur besseren Vergleichbarkeit der Zellen auf unterschiedlich belichtetem Hintergrund mit einem Helligkeits- und Kontrastabgleich nachbearbeitet.

III.2.4.2 Methodik der Datenerfassung

Festlegung, Vermessung und Auszählung der Gesichtsfelder. In die Analyse gingen beide Hemisphären der Gehirnschnitte ein, um mit der symmetrischen, aber intakten Gewebehälfte eine Vergleichsgröße für die neurogenen Zonen zu haben und die Ausdehnung neuroprotektiver, neurogener und inflammatorischer Reaktionen beobachten zu können. (Die Hemisphäre, auf der die fokale Kontusion lokalisiert war, wurde als ipsilaterale Schnitthälfte bezeichnet, die Seite, in der intraventrikulär die Infusionskanüle platziert worden war, lag contralateral. Eine entsprechende Orientierungshilfe bot die sagittale Inzision auf der contralateralen Hemisphäre, mit der die Gehirnhälften vor dem Schneiden markiert worden waren.)

Bei den immunhistochemischen Färbungen wurden sowohl Schnitte aus dem Bereich der SVZ als auch aus dem Bereich des HC sowie des Läsionsareals untersucht.

Bei anfänglich vierfacher Übersichtsvergrößerung wurden die Schnittpräparate unter das oben genannte, Stereologie-*Software* gesteuerte Lichtmikroskop gelegt. Zunächst wurden die zu untersuchenden Strukturen, das Läsionsareal, die laterale SVZ und die SGZ des hippocampalen DG, auf dem Bildschirm vermessen. Dazu wurden die Areale möglichst exakt mit dem *Cursor* umrandet. Das Programm *Stereoinvestigator* errechnete aus der geschlossenen Kontur ihre Fläche und den Umfang. Während diese Information für die Analyse der neurogenen Zonen ausreichte, wurde das Läsionsareal präziser vermessen, indem sowohl um die Penumbra des kontusionierten Gewebes als auch in nächster Nähe um den Randsaum des Traumas eine begrenzende Kontur gelegt wurde. Ausschlaggebend für das Setzen der Markierungspunkte war die Streuungsdichte der BrdU- bzw. ED1-markierten Zellen, die innerhalb der zentralen Kontur sehr dicht lagen, während sie in der Peripherie diffus verstreut zu lokalisieren waren. Die aufgrund von Zellschäden untergegangenen Gewebsabschnitte wurden ausgespart.

Nachdem die Strukturgrenzen der zu untersuchenden Areale erfasst waren, wurden die innerhalb und auf der Kontur nachweisbaren Zellkerne bei nun zehnfacher Vergrößerung durch Markierung mit dem *Cursor* ausgezählt. In den neurogenen Zonen wurden alle angefärbten Nuclei ausgewertet, was im Kontusionsareal aufgrund des Zellreichtums jedoch nicht zu realisieren war. Daher wurde die Kontur um das Zentrum bzw. die Peripherie des Traumas systematisch in jeweils vier Gesichtsfelder unterteilt, in welchen die Zellen repräsentativ für die gesamte Läsion ausgezählt werden sollten. Dadurch konnte man nach der Auswertung von einer möglichst großen Zahl an Einzelwerten ausgehen. Ein von Hand angefertigter quadratischer Zählrahmen in Form einer Hilfsschablone aus durchsichtiger Plastikfolie legte ein solches Gesichtsfeld fest. Jedes Gesichtsfeld umfasste bei einer Seitenlänge von je 4 cm eine 16 cm² große Fläche und wurde mit einem Tesafilm auf dem Bildschirm befestigt. Zur Standardisierung wurden die vier Ausschnitte in jedem Schnittpräparat so festgelegt, dass die Zellzahl in Nord, Süd, West und Ost

des Kontusionsareals erfasst wurde. Vor Beginn der Auszählung wurden folgende Regeln definiert: es durften nur diejenigen Nuclei berücksichtigt werden, welche die obere horizontale oder die rechte vertikale Kante (grün markierte Grenzlinie) des Quadrates von Innen oder von Außen berührten, während Zellkerne, die mit der linken vertikalen oder der unteren horizontalen Kante (rot markierte Grenzlinie) in Kontakt standen, nicht berücksichtigt werden durften.

Auf diese Weise wurden BrdU- bzw. ED1-positive Zellen im Kontusionsareal hochgerechnet, und die Zellproliferation von BrdU- bzw. DCX-positiven Zellen in den neurogenen Zonen direkt erfasst. Die CV-Färbung wurde nicht analysiert, sondern diente ausschließlich der orientierenden Darstellung des histologischen Ausmaßes der Gehirnläsion und dem Nachweis des Anteils von markierten Nervenzellen an der Gesamtheit aller Zellen in den jeweiligen Hirnregionen.

Morphologische und proliferationskinetische Auswertungskriterien. In die Auswertung gingen nur Präparate ein, in denen die SVZ bzw. der HC bilateral intakt waren. Es wurden nur Zellen berücksichtigt, die einen deutlich angefärbten Zellkern aufwiesen, d.h. in der Schnittebene in ihrem Zellleib getroffen waren. Bei einer Schnittdicke von 30 µm war es zur Erfassung überlagerter Zellen erforderlich, in jedem Gesichtsfeld auch entlang der Z-Achse durch die Schnittebenen zu fokussieren. Als BrdU-, DCX- bzw. ED1-positiv galten alle Zellen, deren Nuclei deutlich schwarz-braun angefärbt waren. Positive Zellen, deren Nuclei aufgrund schwacher Anfärbung schwer abgrenzbar waren oder die durch Überlappung in Zellkonglomeraten nur unscharf zu differenzieren waren, wurden nicht gezählt.

Pro Versuchsratte gingen von den Präparaten auf dem Objektträger selektiv drei qualitativ hochwertige Gehirnschnitte in die Auswertung ein. Unter Orientierung an der Anatomie des Rattengehirns, wurde ein rostral gelegener, neben einem medialen und einem weiter posterior gelegenen Schnitt ausgewählt, um auch in der Sagittalen repräsentative Informationen von dem Gehirngewebe zu erhalten. Bei der Vermessung des HC entsprach dies gemäß den Angaben im Stereotaxie-Atlas von Paxinos und Watson³²⁸ ungefähr den koronaren Schnittebenen „Plate 30-32“, „Plate 34-36“ und „Plate 38-40“ und in der SVZ den „Plates 12-14, 16-18 und 20-22“. Für das Kontusionsareal wurden schließlich Schnitte im Bereich von „Plate 14/15“, „Plate 22/23“ und „Plate 28/29“ gewählt.

Die Auszählungen erfolgten dabei für die SVZ und den HC getrennt, wobei zunächst zwischen ipsilateraler und contralateraler Zellzahl differenziert, und anschließend die Zellsumme aus beiden Hemisphären errechnet wurde.

Für die statistische Analyse wurden die Daten aus drei Tier-Operationen vom März und November 2005 sowie vom Januar 2006 zusammengefasst.

Extension des Läsionsareals. Die Gesamtfläche des Kontusionsareals konnte unmittelbar aus den Daten der BrdU- bzw. ED1-Färbung für jede Ratte abgelesen werden und wurde in [$\mu\text{m}^2 \times 10^6$], also [mm^2] angegeben.

Die Zellzahlen für die neuronale Proliferation bzw. die Mikroglia wurden auf die Gesamtfläche der jeweiligen Struktur hochgerechnet. Dazu wurden zunächst die Zellsummen pro Versuchstier errechnet.

Zellzahl/Fläche im Läsionsareal. Im Kontusionsareal unterschied man die Zellsumme im Zentrum von derjenigen in der Peripherie und der Vereinigungsmenge („total“) aus beiden. Damit wurden im Läsionsareal aus je vier Gesichtsfeldern insgesamt acht Messwerte pro Präparat und 24 Werte pro Tier ermittelt. Zur Ermittlung der Fläche wurde der verwendete Zählrahmen nach oben beschriebener Methode mit dem *Cursor* auf dem Bildschirm mehrmals vermessen, und das *Stereoinvestigator*-System errechnete im Mittel eine Fläche von $9025 \mu\text{m}^2$. Die Gesamtfläche der vier im Läsionsareal ausgezählten Gesichtsfelder ergab sich aus der Multiplikation mit 4. Damit wurde die Zellsumme (aus Nord, Süd, Ost und West) zunächst für die Gesamtfläche von $36100 \mu\text{m}^2$ pro Gehirnschnitt angegeben und anschließend auf eine Zellzahl pro $1000 \mu\text{m}^2$ normiert.

$$\text{durchschnittliche Zellzahl pro } 1000 \mu\text{m}^2 = \frac{\text{Gesamtsumme an Zellen pro Tier} \times 1000 \mu\text{m}^2}{36100 \mu\text{m}^2 \text{ pro Tier}}$$

Entsprechend sind die BrdU- und ED1-positiven Zellen in der Statistik pro $1000 \mu\text{m}^2$ angegeben.

Zellzahl/Fläche in SVZ und HC. In den neurogenen Zonen wurde differenziert zwischen der ipsilateralen, der contralateralen und der totalen Zellsumme. Damit wurden pro Tier aus drei Präparaten insgesamt jeweils sechs Messwerte erhoben. Für jedes einzelne Gehirn wurde unter Einbeziehung aller ausgewerteten Schnitte folgende Berechnung angestellt:

$$\text{durchschnittliche Zellzahl pro Zählfläche} = \frac{\text{Gesamtsumme an Zellen pro Tier}}{\text{Gesamtfläche pro Tier}}$$

Die Zahlenwerte wurden für die BrdU- und die DCX-Färbungen in [$\mu\text{m}^2 \times 10^3$] angegeben.

Nach dieser Methode wurden die Extension des Kontusionsareals und die Zellproliferation im Bereich der Läsion und in den neurogenen Zonen untersucht.

III.3 STATISTISCHE ANALYSE UND DOKUMENTATION DER EXPERIMENTELL ERHOBENEN DATEN

Im Anschluss an die Datenerhebung am *Stereoinvestigator*-System wurden die Zahlenwerte zunächst mit Hilfe von Microsoft Excel 2003 organisiert und dann statistisch und graphisch mit dem Statistikprogramm SPSS 12.0 für Windows analysiert.

Nicht-parametrische Testverfahren für unabhängige Stichproben. Da bei den untersuchten Rattenpopulationen von einer Streuung auszugehen ist, die nicht entsprechend der Gauß'schen Glockenkurve normalverteilt ist, wurden die statistischen Ergebnisse mit dem Kruskal-Wallis- bzw. dem sich anschließenden Mann-Whitney-U-Testverfahren ermittelt, beides nicht-parametrische Testmethoden für unabhängige Stichproben aus Nicht-gauß'schen Populationen. Die erfassten Zellzahlen und die Größe des Kontusionsareals der PEDF-Testgruppen wurden mit den einzelnen Kontrollgruppen verglichen. Unterschiede wurden ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5 % ($p < 0,05$) als signifikant betrachtet. Alle Daten ohne Signifikanzschwelle wurden auf einen „Trend“ hin, d.h. eine Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 10 % ($0,1 > p > 0,05$), untersucht.

Box-Whisker-Plot. Die Datenanalyse ergab nachfolgend aufgeführte Ergebnisse. Die dargestellten Werte sind Gesamtsummen der gemessenen Flächen bzw. Zellzahlen pro Fläche. Die Daten sind in Form von „Box-Whisker-Plots“ (oder kurz „Box Plots“) graphisch präsentiert, um die Häufigkeitsverteilungen zwischen den einzelnen Gruppen zu veranschaulichen. Dieser Diagrammtyp wird zur graphischen Beschreibung einer Reihe numerischer Daten verwendet, wobei verschiedene Maße der zentralen Tendenz, Streuung und Schiefe in einem Graphen zusammengefasst sind. Alle Werte der Fünf-Punkte-Zusammenfassung, also den Median, die Quartile und die Extrema (*Whiskers*), zeigt Abb. 27.

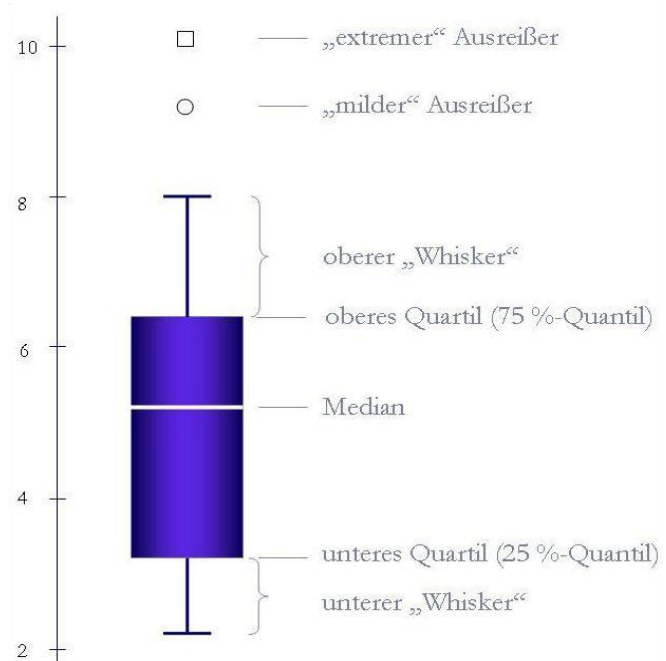


Abb. 27: Schematische Darstellung eines vertikalen Box Plots am Zahlenstrahl. Daten können anhand von Quantilen zusammenfassend dargestellt werden. Die Box wird begrenzt durch das 25 %- und das 75 %-Quantil, der Median in der Mitte eingezeichnet, und die Whiskers (Schnurrhaare) begrenzen beispielsweise das 10 %- und das 90 %-Quantil.

Der *Box Plot* beschreibt eine nach der Größe der Werte geordnete Reihe mit Hilfe von Quantilen. Quantile sind Verallgemeinerungen des Medians (als der Mitte aller Werte), die die Daten ebenfalls in zwei (allerdings nicht gleich große) Hälften teilen. Für die Bestimmung von Quantilen werden die Werte der Stichprobe zunächst vom kleinsten zum größten Wert sortiert. Anschließend wird für jede Beobachtung die kumulative (relative) Häufigkeit angegeben, d.h. der Anteil derjenigen Werte, die kleiner sind als (oder gleich wie) dieser beobachtete Wert. Je nach Fragestellung können unterschiedliche Quantile eingesetzt werden z.B. die Quartile. Das 25 %-Quantil, der Median und das 75 %-Quantil werden auch als Quartile bezeichnet, da sie die Stichprobe in 4 (zumindest annähernd) gleich große Bereiche unterteilen. Das 25 %-Quantil markiert einen Punkt, unterhalb dem (bei endlichen Stichproben mindestens) 25 % und darüber (höchstens) 75 % der Werte liegen. Bei diskreten Daten, d.h. endlich vielen Merkmalsausprägungen, werden die Quantile formal zumeist als der kleinste Wert der Stichprobe definiert, für den mindestens ein vorgegebener Anteil – z.B. 25 % - kleiner oder gleich diesem Wert ist.

Die Box im *Box-Whiskers-Plot* wird durch das obere und das untere Quartil, d.h. durch das 25 %- und 75 %-Quantil, begrenzt. Sie umfasst 50 % der Daten. An der Länge der Box ist der Interquartilsabstand (*interquartile range* (IQR)) abzulesen. Dies ist ein Maß der Streuung, welches durch die Differenz des oberen und unteren Quartils definiert ist. Als weiteres Quantil ist der Median in der Box eingezeichnet, welcher durch seine Lage innerhalb der Box einen Eindruck von der Schiefe der den Daten zugrunde liegenden Verteilung vermittelt. Der Median wird in den Kasten als (in diesem Fall weiße) Horizontale eingezeichnet und kennzeichnet denjenigen Bereich, über bzw. unter dem 50 % der Messwerte liegen. Von den Quartilen ausgehend werden vertikale Linien zu den „Schnurrhaaren“ („*Whiskers*“, ebenfalls wieder horizontale Linien) gezogen. Häufig stellen die *Whiskers* das 10 %- (bzw. 90 %-), das 5 %- (95 %-) oder das 2,5 %- (97,5 %-) Quantil dar. Abhängig von dem jeweiligen Referenzbereich liegen innerhalb der *Whiskergrenzen* somit 80 % (bzw. 90 % oder 95 %) aller beobachteten Werte. *Box-Whisker-Plots* sind insbesondere dann hilfreich, wenn mehrere Testgruppen hinsichtlich der Verteilung ihrer Daten verglichen werden sollen. Neben der zentralen Lage erhält man einen groben Überblick über die Symmetrie der Verteilungen.

IV. ERGEBNISSE

IV.1 UNTERSUCHUNGSGUT: GEWICHT DER TIERE UND TIERVERLUST

Vor Einleitung der Anästhesie am 1. Versuchstag und vor allen weiteren Eingriffen an den Tagen 2 bis 8 wurden die Versuchstiere gewogen. Die Ermittlung des Gewichts stellte ein grobes Maß dar, inwieweit die CCII und/oder die intraventrikuläre PEDF-Infusion generell Auswirkungen auf die Ratten zeigte/n. Bis zum Operationstermin erreichten die Ratten aller Gruppen ein Durchschnittsgewicht von $266,92 \pm 14,44$ g ($M \pm STD$) und nahmen bis zum Ende des Experiments auf ein Gewicht von durchschnittlich $254,35 \pm 18,54$ g ab. Dies bedeutete einen Gewichtsverlust von 12,57 g im Mittel. Vergleicht man den Gewichtsverlauf innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen anhand willkürlich gewählter, repräsentativer Stichtage, so betrug das durchschnittliche KG bei der Läsionsgruppe am 1. Versuchstag $270,70 \pm 10,78$ g und in der Testgruppe PEDF 10 $268,33 \pm 10,29$ g. Am Ende der Versuchsphase wog die Gruppe Lx im Mittel $253,67 \pm 18,82$ g, während PEDF 10 $249,08 \pm 13,71$ g auf die Waage brachte. Ein signifikanter Unterschied im Gewichtsverlauf der einzelnen Versuchsgruppen konnte allerdings zu keinem der Messzeitpunkte nachgewiesen werden (s. Tab. 8). Die Tiere aller Gruppen haben innerhalb der achttägigen Projektphase an Gewicht verloren.

| Behandlungsgruppen | 1. Versuchstag Gewicht in [g] | 4. Versuchstag Gewicht in [g] | 5. Versuchstag Gewicht in [g] | 8. Versuchstag Gewicht in [g] |
|--------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| iCON | $252,25 \pm 17,20$ | $266,80 \pm 23,18$ | $260,5 \pm 18,23$ | $276,26 \pm 18,70$ |
| Lx | $270,70 \pm 10,78$ | $253,76 \pm 9,86$ | $245,83 \pm 8,03$ | $253,67 \pm 18,82$ |
| aCSF | $269,17 \pm 15,77$ | $246,27 \pm 12,59$ | $236 \pm 4,32$ | $247,52 \pm 14,90$ |
| PEDF 5 | $265,57 \pm 15,81$ | $249,74 \pm 16,13$ | $242,75 \pm 5,49$ | $250,50 \pm 12,94$ |
| PEDF 10 | $268,33 \pm 10,29$ | $248,08 \pm 10,83$ | $243,67 \pm 9,46$ | $249,08 \pm 13,71$ |

Tab. 8: Statistische Dokumentation des KG der Ratten im Versuchsverlauf. Angegeben sind Mittelwerte (M) \pm Standardabweichung (STD). Die Überprüfung nach Kruskal und Wallis ergab an keinem der Versuchstage (1. Tag: $p = 0,196$, 4. Tag: $p = 0,422$, 5. Tag: $p = 0,153$, 8. Tag: $p = 0,202$) ein signifikantes Ergebnis.

Von den 40 Tieren, die ursprünglich für das Projekt zur Verfügung standen, gingen insgesamt 35 Ratten in die histologische Auswertung ein, während die fünf übrigen Tiere an Komplikationen bei der Operation oder an Nachblutungen infolge der kortikalen Traumatisierung verstorben waren (s. Tab. 9).

| Versuchsgruppe | Tier | Behandlungsgruppe | Vorzeitiger Todeseintritt |
|----------------|----------|-------------------|------------------------------------------|
| Gruppe 47 | Ratte 5 | Lx | 02.12.2005 |
| Gruppe 47 | Ratte 15 | PEDF 10 | 30.11.2005 (postop., starke Nachblutung) |
| Gruppe 47 | Ratte 16 | PEDF 10 | 02.12.2005 |
| Gruppe 47 | Ratte 20 | iCON | 30.11.2005 (postop.) |
| Gruppe 48 | Ratte 18 | PEDF 10 | 18.01.2006 (postop.) |

Tab. 9: Dokumentation der vom Experiment ausgeschlossenen, da vorzeitig verstorbenen Versuchstiere. (Start der Versuchsreihe von Gruppe 44 am 02.03.2005, von Gruppe 47 am 30.11.2005 und Gruppe 48 am 18.01.2006.)

Abhängig vom Schadensausmaß der oben bezeichneten 10 Rattengehirne in dem vermessenen Areal stand im Optimalfall folgende Anzahl von Tieren für die Analyse zur Verfügung (s. Tab. 10):

| Behandlungsgruppen | Tierzahl |
|--------------------|----------|
| iCON | n = 5 |
| Lx | n = 9 |
| aCSF | n = 6 |
| PEDF 5 | n = 7 |
| PEDF 10 | n = 8 |

Tab. 10: Maximalzahl n des der Analyse zugänglichen Untersuchungsguts (ohne Berücksichtigung von partiell geschädigtem Probenmaterial).

IV.2 STATISTIK

Adulte Fischer-Ratten wurden protrahiert über acht Versuchstage mit 50 mg BrdU/kg KG i.p. behandelt. Durch die immunhistochemischen Färbungen wurden die zu untersuchenden Zellen, neugebildete Zellen bzw. unreife Neurone sowie makrophagozytäre Zellpopulationen, markiert, und durch Auszählung die Größe und Zellproliferation pro Fläche im Läsionsareal und die Zellproliferation pro Fläche in den neurogenen Zonen untersucht. Die angefärbten Zellen stellten sich in der BrdU-, der DCX- und der ED1-Färbung dunkelbraun bis schwarz dar. Im Bereich der Läsion, der SVZ und der SGZ des HC wurden die signalpositiven Zellen beider Gehirnhemisphären auf der gesamten Dicke des Schnittes quantitativ erfasst. Auf die Datenerhebung folgte die proliferationskinetische und statistische Analyse. Die vorliegende Statistik zeigt die histologischen Befunde am 8. und letzten Versuchstag. Graphisch dargestellt sind die Gesamtsummen der gemessenen Flächen bzw. die Zellsummen pro Fläche. Die *Box-Whisker-Plots* ermöglichen einen Vergleich der Datenverteilung unter den fünf Versuchsgruppen. Sie werden durch die numerische Deskription von Mittelwert (M) und Standardabweichung (STD) ergänzt.

IV.2.1 MESSUNGEN IM KONTUSIONSAREAL

IV.2.1.1 Extension

Anhand der Streuung von BrdU- und ED1-positiven Zellen wurde die Gesamtfläche des Kontusionsareals in der Penumbra des Traumas quantifiziert. Die verwendete Flächeneinheit ist 1 mm². (Die Gruppe iCON ist in den Diagrammen zur Extension nicht vertreten, da nämliche Tiere keiner CCII unterzogen worden sind.)

IV.2.1.1.1 Streuung der BrdU-positiven Zellen um die fokale Läsion

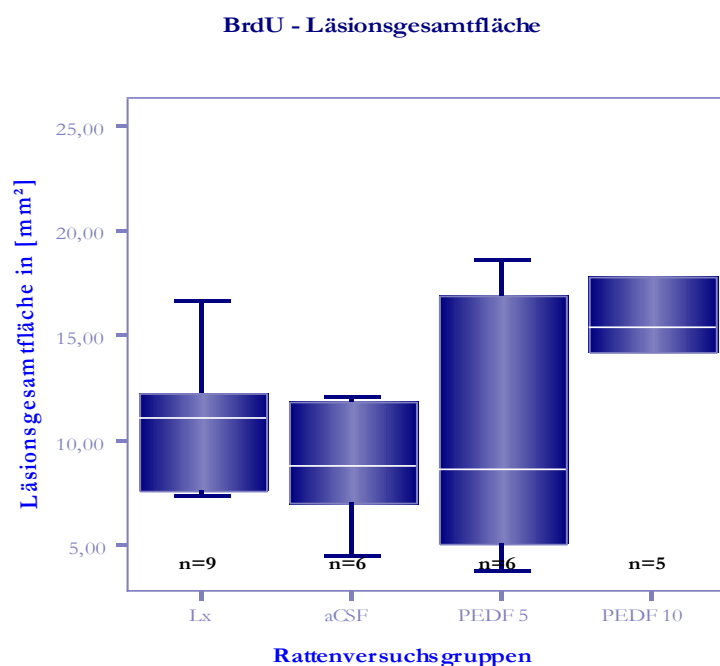


Abb. 28: Gesamtfläche des Kontusionsareals (in [mm²]) in den fünf Versuchsgruppen, gemessen in BrdU. Die Überprüfung der Messergebnisse für die Läsionsgesamtfläche in BrdU-Färbung in den Versuchsgruppen Lx, aCSF, PEDF 5 und PEDF 10 nach Kruskal und Wallis ergab mit $p = 0,293$ keine Signifikanz.

| Lx n = 9 | aCSF n = 6 | PEDF 5 n = 6 | PEDF 10 n = 5 |
|-------------|---------------|-----------------|------------------|
| 11,9 ± 5,6 | 8,8 ± 3,1 | 10,3 ± 6,3 | 15,6 ± 7,4 |

Tab. 11: Numerische Deskription ($M \pm STD$) der in Abb. 28 (Streuung der BrdU-positiven Zellen um die fokale Läsion) graphisch dargestellten Versuchsgruppen. „n“ gibt die gruppenspezifische Tieranzahl an.

Bezogen auf die Streuung BrdU-positiver Zellen ergab sich für die Größenausdehnung des Läsionsareals die in Abb. 28 dargestellte Häufigkeitsverteilung innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen. Mit dem Median als Referenzwert weist die Gruppe Lx eine deutlich kleinere Fläche auf als die Gruppe PEDF 10. Die Medianwerte für aCSF und PEDF 5 liegen darunter und ungefähr auf gleicher Höhe, wobei in PEDF 5 die Asymmetrie der Datenverteilung zugunsten des 75 %-Quartils auffällt.

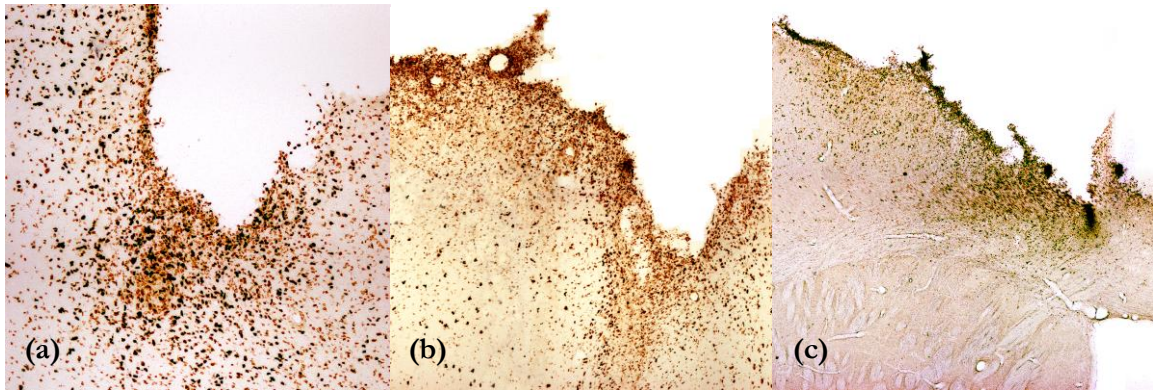


Abb. 29: Ausdehnung des Kontusionsareals nach posttraumatischer Neurogenese BrdU-positiver Zellen. Dargestellt sind repräsentative histologische Ausschnitte des Läsionsbereichs (a) von Tieren ausschließlich mit Lx und (b) von Tieren, denen aCSF (jeweils 10fache Vergrößerung) bzw. (c) PEDF [10 µg/ml] (Vergrößerung: $\times 4$) infundiert worden war.

IV.2.1.1.2 Streuung der ED1-positiven Zellen um die fokale Läsion

ED1 - Läsionsgesamtfläche

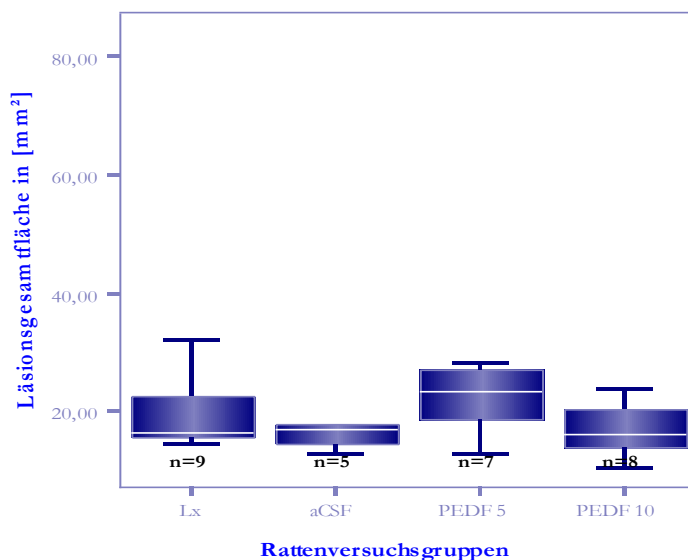


Abb. 30: Gesamtfläche des Kontusionsareals (in mm^2) in den fünf Versuchsgruppen, gemessen in ED1. Mit $p = 0,337$ zeigen die Messergebnisse für die Läsionsgesamtfläche in ED1-Färbung in den Versuchsgruppen Lx, aCSF, PEDF 5 und PEDF 10 nach Kruskal und Wallis keine Signifikanz.

| Lx n = 9 | aCSF n = 5 | PEDF 5 n = 7 | PEDF 10 n = 8 |
|-------------|---------------|-----------------|------------------|
| 19,8 ± 6,2 | 23,0 ± 16,6 | 30,3 ± 24,5 | 16,9 ± 4,5 |

Tab. 12: Numerische Deskription ($M \pm \text{STD}$) der in Abb. 30 (Streuung der ED1-positiven Zellen um die fokale Läsion) graphisch dargestellten Versuchsgruppen. „n“ gibt die gruppenspezifische Tieranzahl an.

Die Analyse des Läsionsareals, gemessen an der gruppenspezifischen Ausdehnung ED1-positiver makrophagozytärer Zelllinien, stellt sich graphisch (s. Abb. 30) wie folgt dar: der Median von Lx liegt ungefähr auf gleicher Höhe mit den Medianen der Gruppen aCSF und PEDF 10. Entgegen der Annahmen in der Hypothese beschreibt der Median in PEDF 5 eine vergleichsweise größere

Kontusionsfläche. Mit Ausnahme von Lx, wo das 75 %-Quartil mit seiner Größe deutlich dominiert, sind die Daten der übrigen Versuchsgruppen relativ symmetrisch verteilt.

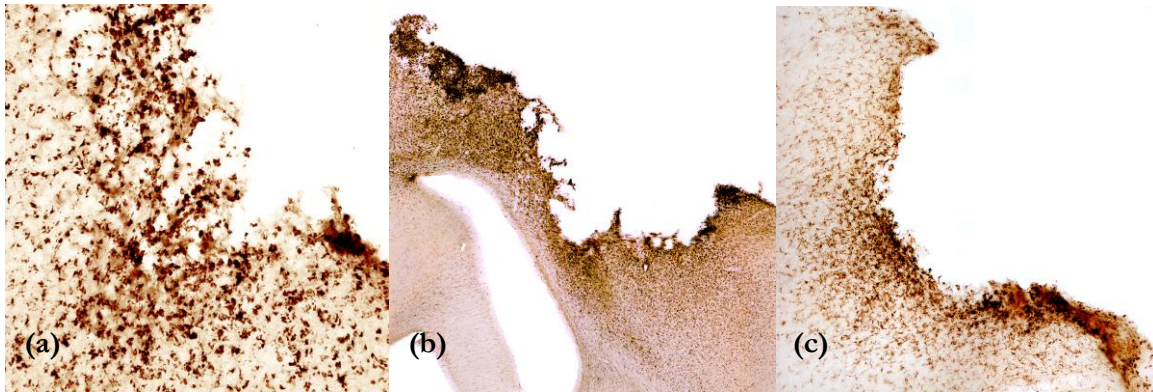


Abb. 31: Ausdehnung des Kontusionsareals nach posttraumatischer Proliferation ED1-positiver aktivierter Mikrogliazellen. Dargestellt sind repräsentative histologische Ausschnitte des Läsionsbereichs (a) von Tieren ausschließlich mit Lx (Vergrößerung: $\times 20$) und (b) von Tieren, denen aCSF (Vergrößerung: $\times 4$) bzw. (c) PEDF [10 $\mu\text{g/ml}$] (Vergrößerung: $\times 10$) infundiert worden war.

IV.2.1.2 Zellproliferation

Anschließend wurden in der BrdU- und ED1-Färbung die Zellen in der Zirkumferenz des Kontusionsareals ausgezählt. Dabei wurde zwischen peripherem und zentralem Läsionsareal differenziert, und im Anschluss aus beiden die Summe gebildet. Als Bezugsfläche wurden $10^3 \mu\text{m}^2$ gewählt.

IV.2.1.2.1 BrdU-positive Zellen/Fläche

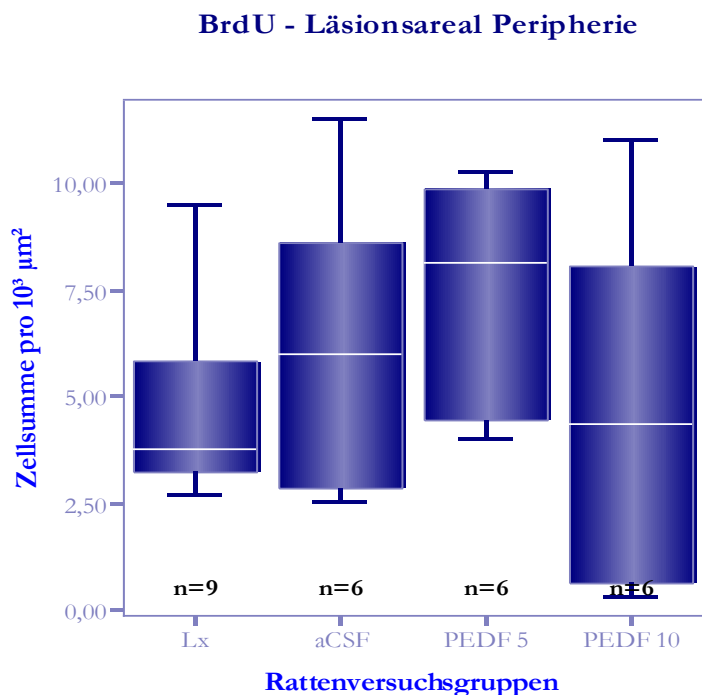


Abb. 32

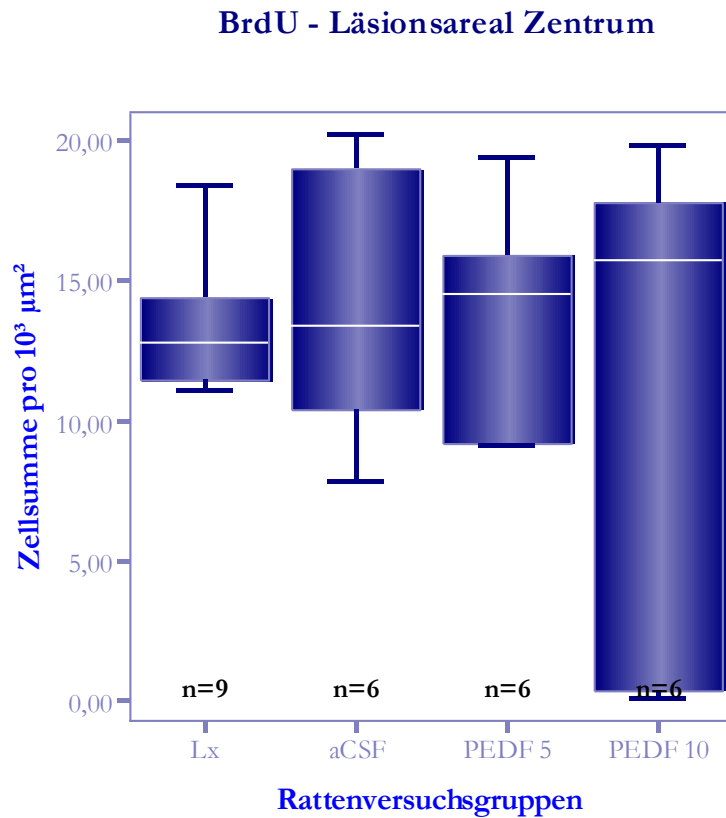


Abb. 33

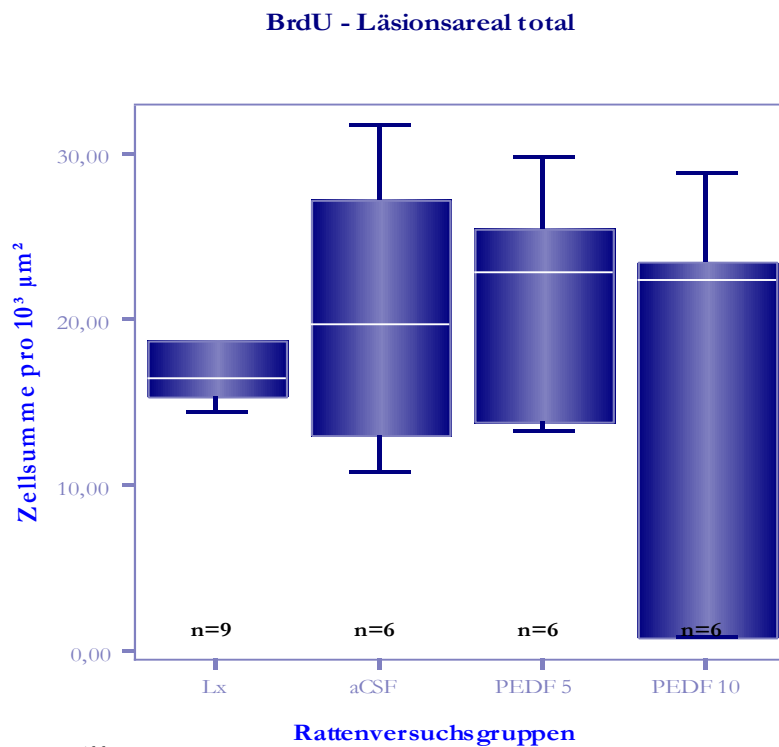


Abb. 34

Abb. 32 - Abb. 34: Anzahl BrdU-markierter Zellen (pro $10^3 \mu m^2$) im Kontusionsareal in den Versuchsgruppen Lx, aCSF, PEDF 5 und PEDF 10. Im Kruskal-Wallis-Testverfahren konnte für die Proliferation BrdU-positiver Zellen in keinem der Messungsteilbereiche, weder in der Läsionsperipherie (s. Abb. 32) ($p = 0,273$), noch im Läsionszentrum (s. Abb. 33) ($p = 0,995$) oder total (s. Abb. 34) ($p = 0,915$) Signifikanz

| Versuchsgruppen Läsionsareal | Lx n = 9 | aCSF n = 6 | PEDF 5 n = 6 | PEDF 10 n = 6 |
|-----------------------------------------------|---------------------------|-----------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| (1) | 4,8 ± 2,3 | 6,3 ± 3,7 | 7,5 ± 2,8 | 4,8 ± 4,2 |
| (2) | 13,7 ± 2,8 | 14,1 ± 4,8 | 13,8 ± 4,0 | 11,6 ± 9,0 |
| (3) | 18,5 ± 4,7 | 20,3 ± 8,3 | 21,3 ± 6,8 | 16,4 ± 12,4 |

Tab. 13: Numerische Deskription ($M \pm STD$) der in Abb. 32 - Abb. 34 (Zellproliferation der BrdU-positiven Zellen/Läsionsfläche in der Peripherie (1), im Zentrum (2) und total (3)) graphisch dargestellten Versuchsgruppen. „n“ gibt die gruppenspezifische Tieranzahl an.

Die Abb. 32 - Abb. 34 dokumentieren die Zellproliferation BrdU-positiver Zellen in den Kontusionsarealen der vier Versuchsgruppen, differenziert in das Zellvorkommen in der Peripherie und im Zentrum der Läsion. Aus deren Summe wurde die Zellproliferation im gesamten Läsionsareal („total“) errechnet und ebenfalls in einem Diagramm dargestellt. Zunächst fällt auf, dass das Zentrum der Läsion in allen Gruppen eine höhere Proliferationsrate an BrdU-positiven Neuronen aufweist als das periphere Läsionsareal.

In der Peripherie der BrdU-gefärbten Kontusionsareale (s. Abb. 32) wurde in Lx und PEDF 10 jeweils ein ähnlich niedriger Median gemessen, während die Medianwerte über aCSF hin zu PEDF 5 zunehmen. Die Daten von Lx sind hauptsächlich im oberen Quartil verteilt, in PEDF 5 hingegen liegt die Mehrzahl der erfassten Zellen im unteren Quartil. Der große *Box-Whisker-Plot* von PEDF 10 veranschaulicht die große Streuung (bezogen auf die Häufigkeitsverteilung) der erfassten Daten.

Im Läsionszentrum (s. Abb. 33) liegen die Medianwerte für Lx und aCSF auf ungefähr gleichem Niveau, wachsen jedoch in den Gruppen PEDF 5 und PEDF 10 auf etwas höhere, ebenfalls ähnliche Werte an. Erneut zeigt sich eine breite Streuung der Daten in PEDF 10 zugunsten des 75 %-Quartils.

Betrachtet man die Zellproliferation im gesamten Läsionsareal (s. Abb. 34), so findet sich in Lx der kleinste Median, in PEDF 5 und PEDF 10 imponieren höhere Werte. aCSF kommt dazwischen zu liegen. Ansonsten ist hier die Häufigkeitsverteilung der Daten sehr eng um den Median gruppiert, während der lange *Box-Whisker-Plot* in PEDF 10 eine große Streubreite in der Zellproliferation zeigt.

ED1 - Läsionsareal Peripherie

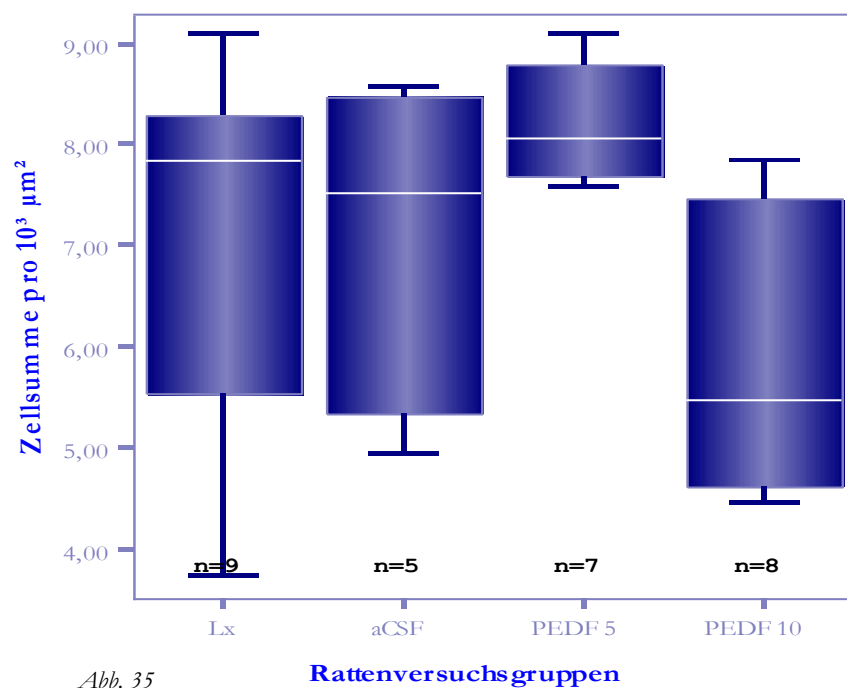


Abb. 35

ED1 - Läsionsareal Zentrum

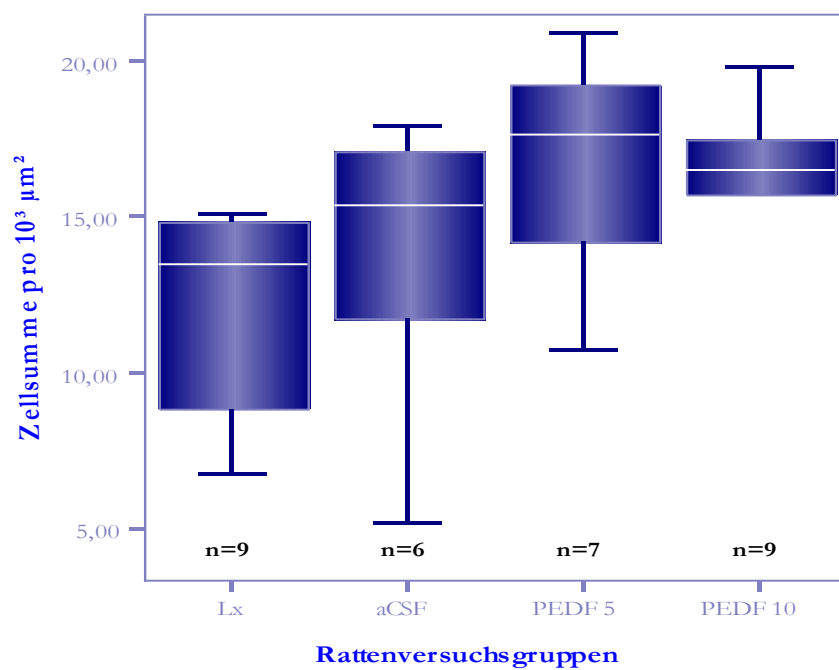


Abb. 36

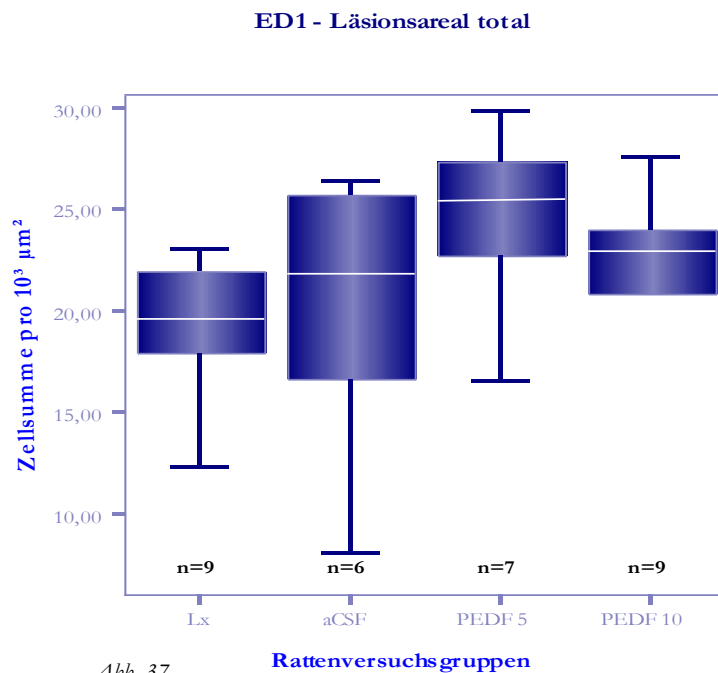


Abb. 37

Abb. 35 - Abb. 37: Anzahl ED1-markierter Zellen (pro $10^3 \mu\text{m}^2$) im Kontusionsareal in den Versuchsgruppen Lx, aCSF, PEDF 5 und PEDF 10. Dargestellt ist die Zellproliferation in der Läsionsperipherie (s. Abb. 35), im Läsionszentrum (s. Abb. 36) und total (s. Abb. 37).

Die statistische Analyse der Messergebnisse nach Kruskal und Wallis deutet mit $0,1 > p > 0,05$ in der Läsionsperipherie ($p = 0,075$) und dem Läsionszentrum ($p = 0,098$) einen Trend an. Aus den Messergebnissen für das gesamte Läsionsareal ließ sich mit $p = 0,147$ keine Signifikanz belegen.

| Versuchsgruppen Läsionsareal | Lx n = 9 | aCSF n = 5 in (1), n = 6 in (2) und (3) | PEDF 5 n = 7 | PEDF 10 n = 8 in (1), n = 9 in (2) und (3) |
|---------------------------------|-------------|-----------------------------------------------|-----------------|--------------------------------------------------|
| (1) | 12,3 ± 3,2 | 7,0 ± 1,7 | 8,0 ± 1,1 | 5,9 ± 1,4 |
| (2) | 12,3 ± 3,2 | 13,8 ± 4,8 | 16,6 ± 3,8 | 14,9 ± 5,1 |
| (3) | 19,4 ± 3,5 | 20,1 ± 7,0 | 24,6 ± 4,4 | 20,5 ± 6,3 |

Tab. 14: Numerische Deskription ($M \pm \text{STD}$) der in Abb. 35 - Abb. 37 (Zellproliferation der ED1-positiven Zellen/Läsionsfläche in der Peripherie (1), im Zentrum (2) und total (3)) graphisch dargestellten Versuchsgruppen. „n“ gibt die gruppenspezifische Tieranzahl an.

| Vergleich von zwei unabhängigen Stichproben | ED1 – Läsionsareal Peripherie | ED1 – Läsionsareal Zentrum |
|------------------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| Lx vs. aCSF | - ($p = 0,841$) | - ($p = 0,346$) |
| Lx vs. PEDF 5 | - ($p = 0,458$) | * ($p = 0,039$) |
| Lx vs. PEDF 10 | ~ ($p = 0,092$) | * ($p = 0,031$) |
| aCSF vs. PEDF 5 | - ($p = 0,167$) | - ($p = 0,253$) |
| aCSF vs. PEDF 10 | - ($p = 0,242$) | - ($p = 0,724$) |
| PEDF 5 vs. PEDF 10 | * ($p = 0,011$) | - ($p = 0,427$) |

Tab. 15: Paarweiser Vergleich der (unabhängigen) Versuchsgruppen Lx, aCSF, PEDF 5 und PEDF 10 hinsichtlich eines signifikanten Unterschiedes in der Proliferation ED1-positiver Zellen in der Peripherie und im Zentrum des Kontusionsareals (nach Mann und Whitney).

* signifikanter Unterschied ($p < 0,05$). ~ Trend ($0,1 > p > 0,05$).

Analog zu den BrdU-positiven Zellen wurden auch die ED1-markierten Zellen im Läsionsareal analysiert. Das Zellvorkommen wurde wiederum nach den drei oben beschriebenen Bezugsflächen differenziert: die Läsionsperipherie (s. Abb. 35), das Läsionszentrum (s. Abb. 36) und das gesamte Läsionsareal (s. Abb. 37). Während in der Peripherie PEDF 10 verhältnismäßig weniger ED1-positive Zellen aufweist als die übrigen Versuchsgruppen, imponieren im Zentrum und der Gesamtheit der Läsion in der Gruppe Lx die niedrigsten Zellzahlen. PEDF 5 und PEDF 10 weisen hier mehr Mikroglia auf als die übrigen Gruppen.

In der Läsionsperipherie liegt der Median von PEDF 10 unter dem Median von Lx und dem Median von aCSF. Die meiste Mikroglia findet sich in PEDF 5. Sowohl in Lx als auch in aCSF sind die Daten mehrheitlich im unteren Quartil verteilt. Die Daten sind sowohl in PEDF 10, als auch in aCSF und Lx breit gestreut. Es dominiert die Datenverteilung unterhalb des Medians.

Im Läsionszentrum weisen durchweg alle Versuchsgruppen mehr ED1-positive Zellen auf als in der Peripherie. Lx hat, gefolgt von aCSF, den niedrigsten Median. PEDF 5 zeigt das höchste Zellvorkommen, wobei sich in PEDF 10 ähnlich viele makrophagozytäre Zellen finden. In Lx, aCSF und PEDF 5 ist die Datenverteilung zugunsten des unteren Quartils verschoben. Dagegen scheinen die Daten in PEDF 10 innerhalb des 25- und 75 %-Quartils symmetrisch verteilt.

Bezogen auf das gesamte Kontusionsareal ähnelt die Relation der Zellverteilung derjenigen im Läsionszentrum. In Lx kommen die wenigsten Zellen vor. Die Medianwerte von aCSF bzw. PEDF 10 liegen etwas darüber, auf etwa gleicher Höhe. Die meisten Zellen weist PEDF 5 auf. Insgesamt imponiert eine relativ symmetrische Datenverteilung.

IV.2.2 MESSUNGEN IN DEN NEUROGENEN ZONEN

Die SVZ und die SGZ des DG des HC wurden auf PEDF-induzierte Unterschiede in der Zellproliferation BrdU- und DCX-positiver Zellen untersucht. Zunächst werden die neurogenen Zonen entsprechend der Hemisphären unterschieden und die erfassten Zellzahlen dann summiert. Die Zellzahlen beziehen sich auf eine Einheitsfläche von $10^3 \mu\text{m}^2$.

IV.2.2.1 Zellproliferation in der SVZ

IV.2.2.1.1 BrdU-positive Zellen/Fläche

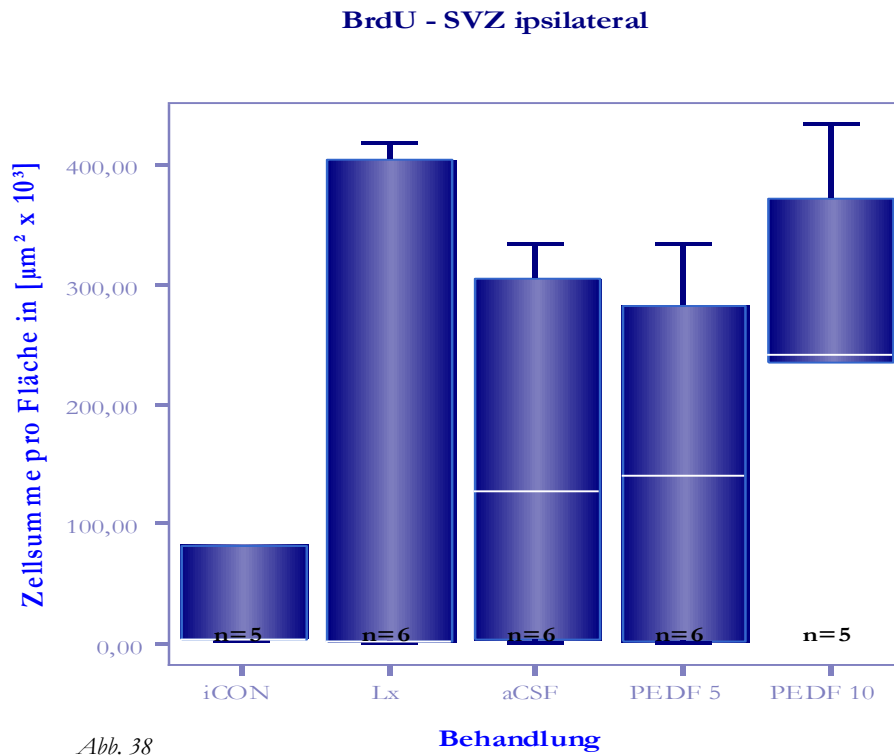


Abb. 38

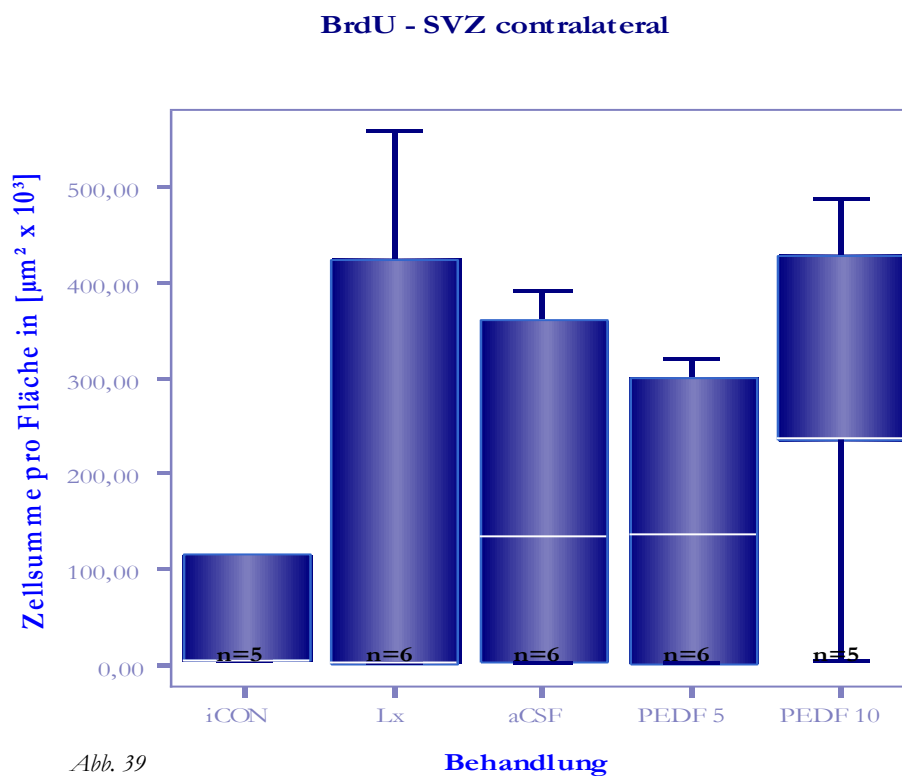


Abb. 39

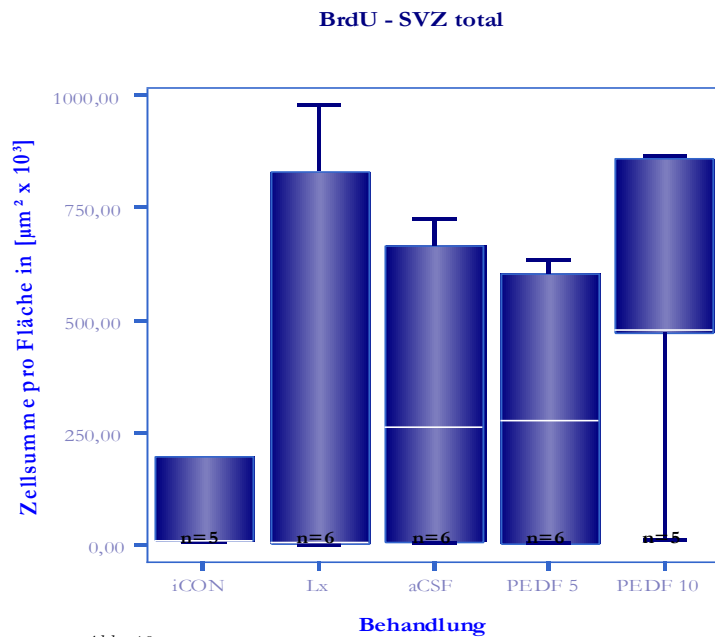


Abb. 40

Abb. 38 – Abb. 40: Anzahl BrdU-markierter Zellen pro Fläche (in $[\mu\text{m}^2 \times 10^3]$) in der SVZ in den Versuchsgruppen iCON, Lx, aCSF, PEDF 5 und PEDF 10. Dargestellt ist die Zellproliferation in der ipsilateralen (s. Abb. 38) und der contralateralen (s. Abb. 39) SVZ sowie total (s. Abb. 40).

Die Messergebnisse sind mit $p = 0,572$ in der ipsilateralen SVZ, mit $p = 0,669$ in der contralateralen und mit $p = 0,554$ in der gesamten SVZ (nach Kruskal und Wallis) nicht signifikant.

| Versuchsgruppen SVZ-Areal | iCON n = 5 | Lx n = 6 | aCSF n = 6 | PEDF 5 n = 6 | PEDF 10 n = 5 |
|------------------------------|---------------|---------------|---------------|-----------------|------------------|
| (1) | 100,6 ± 174,8 | 138,9 ± 211,7 | 150,5 ± 163,0 | 150,3 ± 163,4 | 258,7 ± 164,8 |
| (2) | 112,1 ± 185,1 | 165,6 ± 256,8 | 171,6 ± 189,0 | 150,4 ± 163,1 | 278,9 ± 190,7 |
| (3) | 212,7 ± 359,7 | 304,5 ± 467,2 | 322,1 ± 351,8 | 300,7 ± 325,8 | 537,5 ± 352,5 |

Tab. 16: Numerische Deskription ($M \pm \text{STD}$) der in Abb. 38 - Abb. 40 (Zellproliferation der BrdU-positiven Zellen/Fläche der SVZ ipsilateral (1), contralateral (2) und total (3)) graphisch dargestellten Versuchsgruppen. „n“ gibt die gruppenspezifische Tieranzahl an.

Die Diagramme (s. Abb. 38 - Abb. 40) zeigen den Einfluss der *in vivo*-Therapie mit und ohne PEDF auf die Proliferation BrdU-positiver Zellen in der SVZ der adulten Ratte. Die Datenverteilungen in der ipsi- und contralateralen SVZ ähneln einander, so dass sich die drei Diagramme auch hinsichtlich des Verteilungsverhältnisses der Daten innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen gleichen.

Unter der insgesamt hohen Streubreite der Daten fällt die Gruppe PEDF 10 besonders ins Auge: PEDF 10 weist unter allen Gruppen die höchste Proliferationsrate auf. Sowohl auf der ipsi- wie auch auf der contralateralen Seite sind die Medianwerte von iCON, Lx und PEDF 10 mit ihrer Lage am unteren Quartilsende asymmetrisch verteilt. In iCON ist kaum eine Proliferation neuronaler Vorläuferzellen festzustellen. Der Median von aCSF liegt ungefähr auf gleicher Höhe mit dem Median von PEDF 5. In aCSF und PEDF 5 sind die Daten symmetrischer verteilt als in iCON, Lx und PEDF 10.

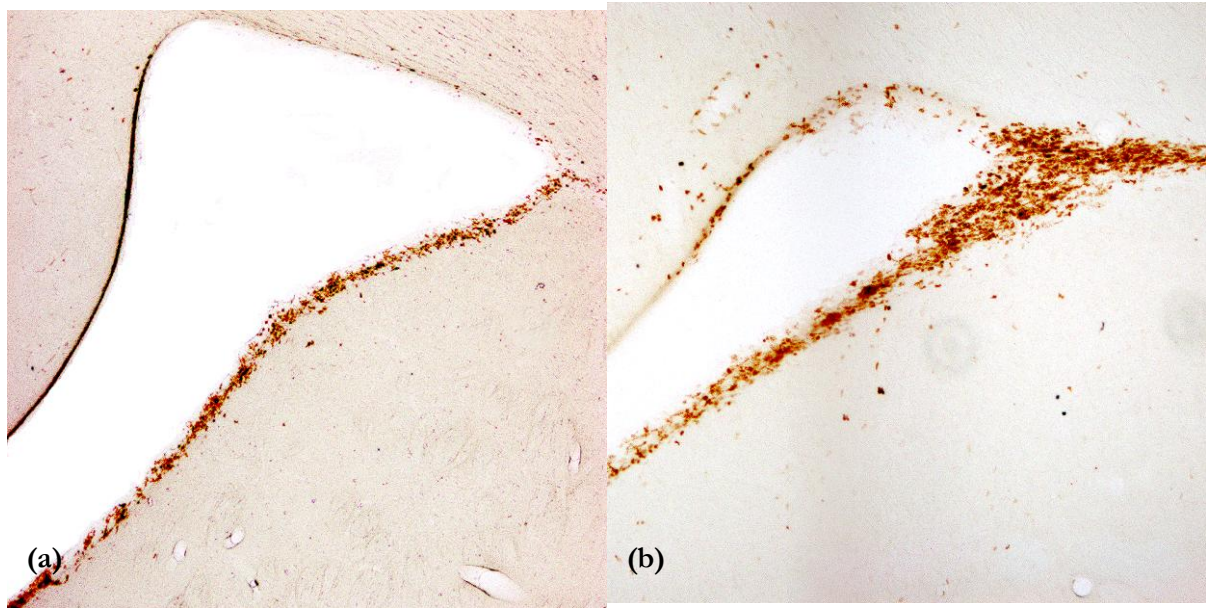


Abb. 41: Zellproliferation BrdU-positiver Zellen in der SVZ. Dargestellt sind repräsentative histologische Ausschnitte der lateralen SVZ (a) von Tieren ausschließlich mit Lx und (b) von Tieren, denen PEDF [$10 \mu\text{g/ml}$] infundiert worden war. Vergrößerung: $\times 10$.

IV.2.2.1.2 DCX-positive Zellen/Fläche

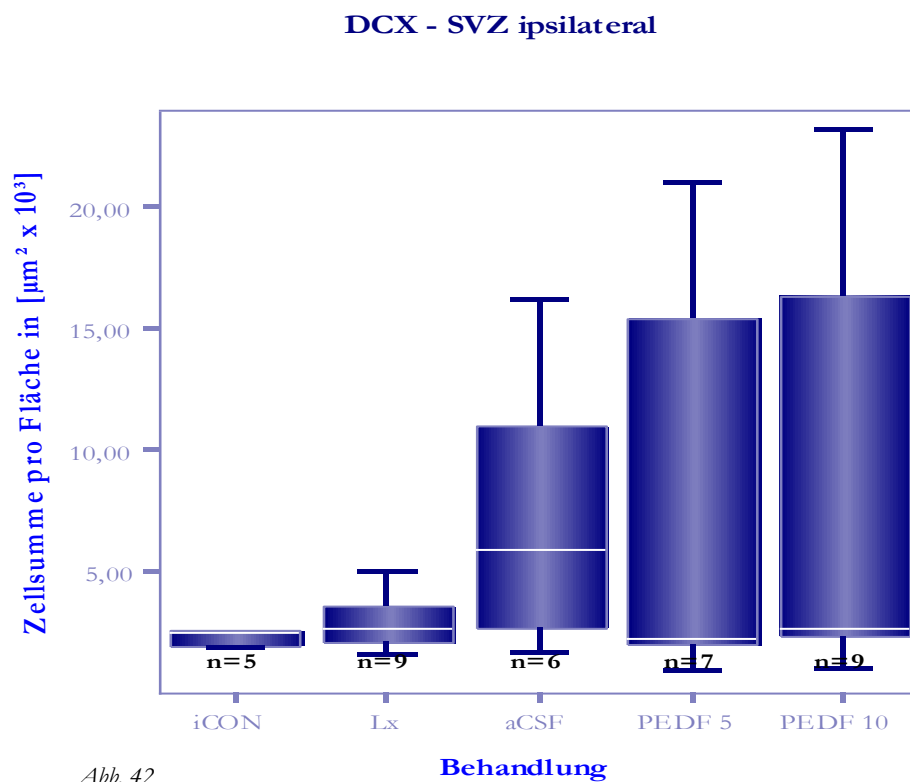


Abb. 42

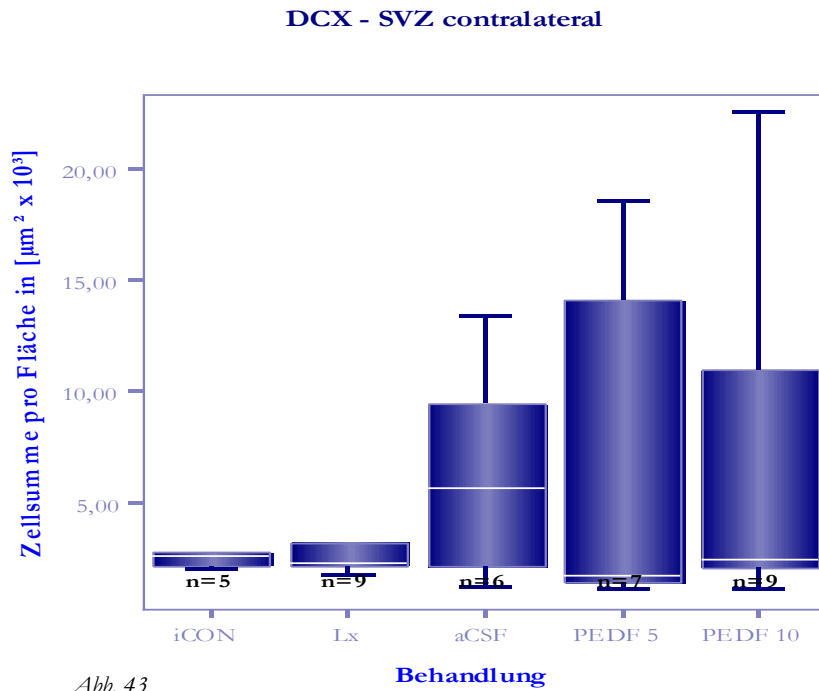


Abb. 43

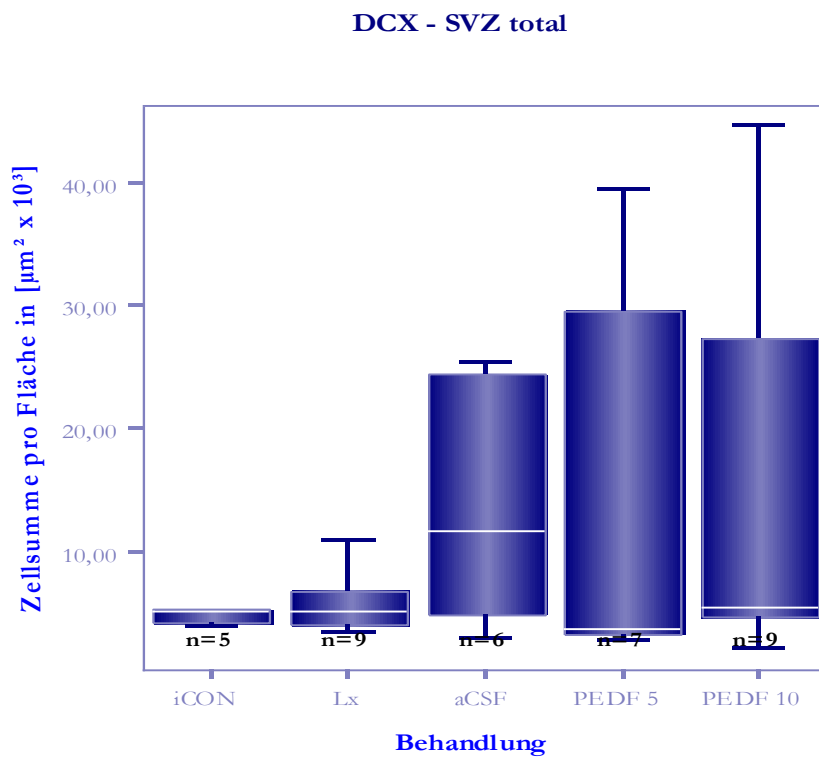


Abb. 44

Abb. 42 - Abb. 44: Anzahl DCX-markierter Zellen pro Fläche (in $[\mu\text{m}^2 \times 10^3]$) in der SVZ in den Versuchsgruppen iCON, Lx, aCSF, PEDF 5 und PEDF 10. Abgebildet sind die DCX-exprimierenden Zellen in der ipsilateralen (s. Abb. 42) und der contralateralen (s. Abb. 43) SVZ sowie total (s. Abb. 44).

Die statistische Analyse nach Kruskal und Wallis zeigt für kein Messungsareal Signifikanz: $p = 0,728$ in der ipsilateralen SVZ, $p = 0,971$ in der contralateralen und $p = 0,919$ in der gesamten SVZ.

| Versuchsgruppe SVZ-Areal | iCON n = 5 | Lx n = 9 | aCSF n = 6 | PEDF 5 n = 7 | PEDF 10 n = 9 |
|-----------------------------|---------------|-------------|---------------|-----------------|------------------|
| (1) | 4,8 ± 5,8 | 3,0 ± 1,2 | 7,2 ± 5,7 | 8,4 ± 8,6 | 8,5 ± 9,2 |
| (2) | 4,9 ± 5,7 | 3,3 ± 1,8 | 6,3 ± 5,1 | 7,5 ± 7,8 | 7,3 ± 8,3 |
| (3) | 9,8 ± 11,4 | 6,2 ± 2,9 | 13,5 ± 10,3 | 16,0 ± 16,2 | 15,8 ± 17,5 |

Tab. 17: Numerische Deskription ($M \pm STD$) der in Abb. 42 - Abb. 44 (DCX-positive Zellen/Fläche der SVZ ipsilateral (1), contralateral (2) und total (3)) graphisch dargestellten Versuchsgruppen. „n“ gibt die gruppenspezifische Tieranzahl an.

Die Messergebnisse der Expression DCX-positiver Zellen in der SVZ sind in den Diagrammen Abb. 42 - Abb. 44 zusammengefasst. Die Daten in iCON, Lx, PEDF 5 und PEDF 10 sind asymmetrisch verteilt, die Mediane liegen jeweils am Ende der Box. aCSF zeigt bei einer vergleichsweise symmetrischen Datenverteilung das höchste Zellvorkommen. PEDF 5 und 10 zeichnen sich einerseits durch den am unteren Quartil gelegenen Median und andererseits durch die größte Streuung unter den Versuchsgruppen aus.

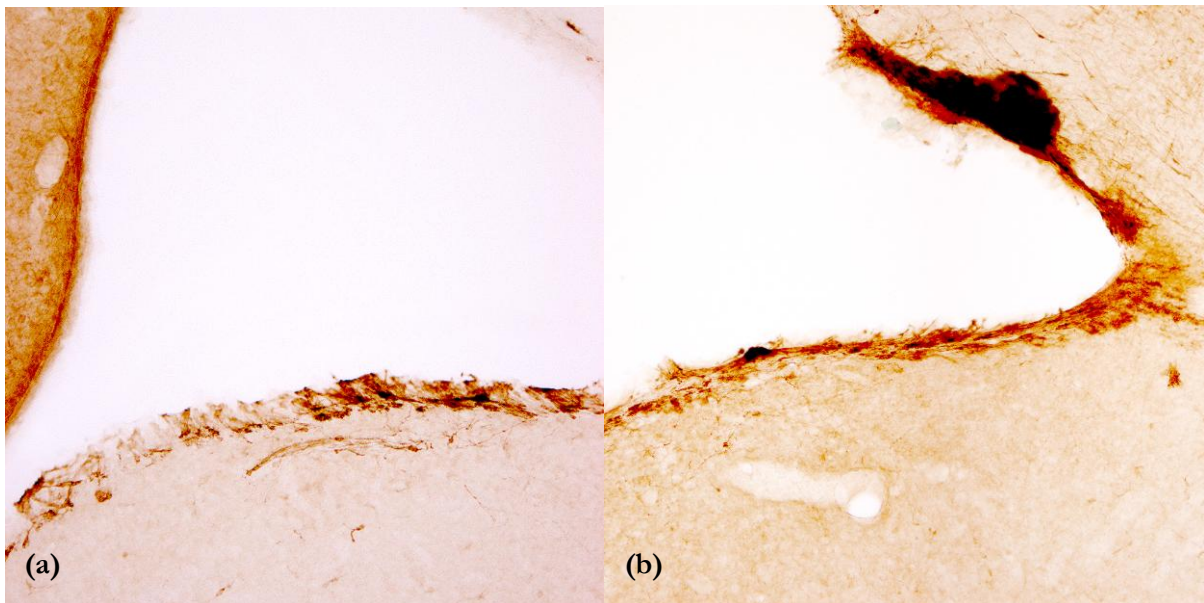
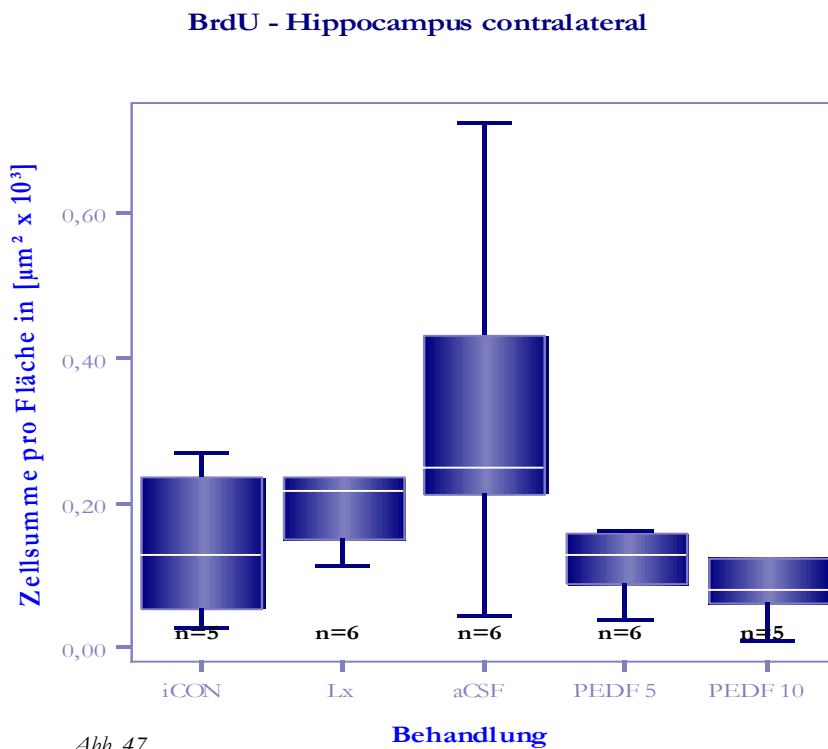
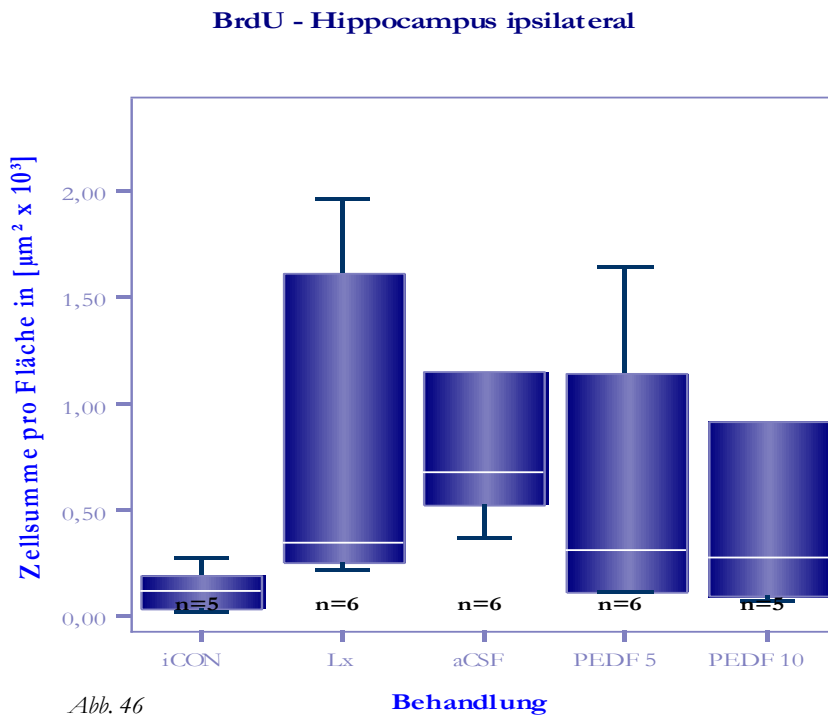


Abb. 45: DCX-positive Zellen in der SVZ. Dargestellt sind repräsentative histologische Ausschnitte der lateralen SVZ (a) von Tieren ausschließlich mit Lx und (b) von Tieren, denen PEDF [10 µg/ml] infundiert worden war. Vergrößerung: $\times 20$.

V.2.2.2 Zellproliferation in der SGZ des hippocampalen DG

IV.2.2.2.1 *BrdU-positive Zellen/Fläche*



BrdU - Hippocampus total

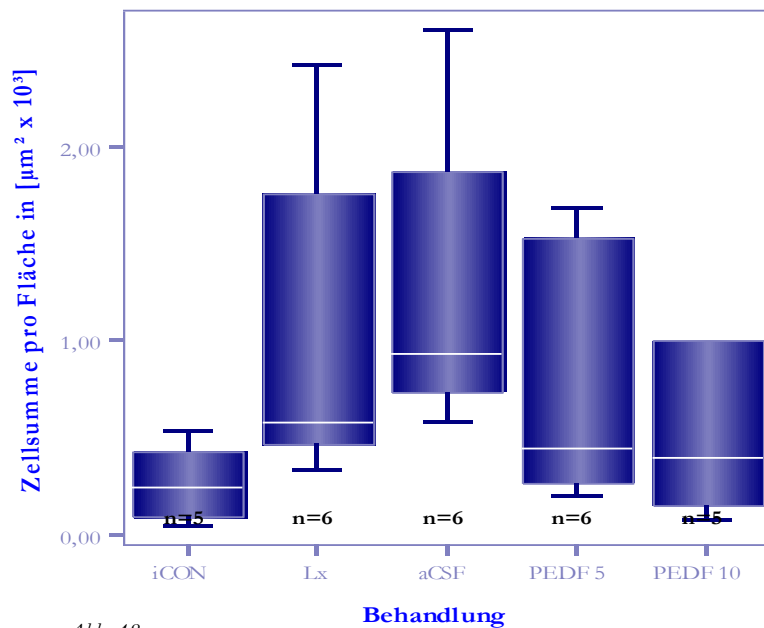


Abb. 48

Abb. 46 - Abb. 48: Anzahl BrdU-markierter Zellen pro Fläche (in $[\mu\text{m}^2 \times 10^3]$) in der SGZ des HC in den Versuchsgruppen iCON, Lx, aCSF, PEDF 5 und PEDF 10. Dargestellt ist die Zellproliferation im ipsilateralen (s. Abb. 46) und contralateralen (s. Abb. 47) HC sowie total (s. Abb. 48).

Die Überprüfung der Messergebnisse nach Kruskal und Wallis ergab für den ipsilateralen und den gesamten HC mit $p = 0,050$ bzw. $p = 0,066$ einen Trend ($0,1 > p > 0,05$). Für den contralateralen HC ($p = 0,148$) konnte keine Signifikanz nachgewiesen werden.

| Versuchsgruppen HC-Areal | iCON n = 5 in (1) und (3), n = 3 in (2) | Lx n = 6 | aCSF n = 6 | PEDF 5 n = 6 | PEDF 10 n = 5 |
|-----------------------------|-----------------------------------------------|---------------|---------------|-----------------|------------------|
| (1) | $0,1 \pm 0,1$ | $0,8 \pm 0,8$ | $1,0 \pm 0,7$ | $0,6 \pm 0,6$ | $0,7 \pm 0,9$ |
| (2) | $0,1 \pm 0,1$ | $0,2 \pm 0,1$ | $0,3 \pm 0,2$ | $0,1 \pm 0,1$ | $0,1 \pm 0,1$ |
| (3) | $0,3 \pm 0,2$ | $1,0 \pm 0,9$ | $1,3 \pm 0,8$ | $0,8 \pm 0,7$ | $0,8 \pm 1,0$ |

Tab. 18: Deskription ($M \pm \text{STD}$) der in Abb. 46 - Abb. 48 (Zellproliferation der BrdU-positiven Zellen/Fläche des HC ipsilateral (1), contralateral (2) und total (3)) graphisch dargestellten Versuchsgruppen. „n“ gibt die gruppenspezifische Tieranzahl an.

| Vergleich von zwei unabhängigen Stichproben | BrdU – HC ipsilateral | BrdU – HC total |
|------------------------------------------------|--------------------------|--------------------|
| iCON vs. Lx | * ($p = 0,018$) | * ($p = 0,045$) |
| iCON vs. aCSF | * ($p = 0,006$) | * ($p = 0,006$) |
| iCON vs. PEDF 5 | - ($p = 0,100$) | - ($p = 0,201$) |
| iCON vs. PEDF 10 | - ($p = 0,175$) | - ($p = 0,465$) |
| Lx vs. aCSF | - ($p = 0,262$) | - ($p = 0,200$) |
| Lx vs. PEDF 5 | - ($p = 0,522$) | - ($p = 0,262$) |
| Lx vs. PEDF 10 | - ($p = 0,584$) | - ($p = 0,465$) |
| aCSF vs. PEDF 5 | - ($p = 0,150$) | - ($p = 0,109$) |
| aCSF vs. PEDF 10 | - ($p = 0,273$) | - ($p = 0,201$) |
| PEDF 5 vs. PEDF 10 | - ($p = 0,584$) | - ($p = 0,584$) |

Tab. 19: Paarweiser Vergleich der (unabhängigen) Versuchsgruppen Lx, aCSF, PEDF 5 und PEDF 10 hinsichtlich eines signifikanten Unterschiedes in der Proliferation BrdU-positiver Zellen im ipsilateralen und gesamten HC (nach Mann und Whitney).

* signifikanter Unterschied ($p < 0,05$).

Neben der SVZ wurde auch die SGZ des hippocampalen DG untersucht. Die Proliferation BrdU-markierter neuronaler Präkursorzellen ist graphisch in den Diagrammen Abb. 46 - Abb. 48 dargestellt. Durchweg fällt die geringe Zellzahl auf.

Im ipsilateralen HC (s. Abb. 46) zeigt aCSF die höchste Proliferationsrate. Die Gruppen Lx, PEDF 5 und PEDF 10 weisen ein ähnliches Zellvorkommen auf. In den vier erstgenannten Gruppen sind die Daten asymmetrisch zugunsten des oberen Quartils verteilt, wobei Lx und PEDF 5 am breitesten streuen. In iCON ließen sich kaum BrdU-positive Zellen detektieren.

Contralateral (s. Abb. 47) verändern sich die Relationen innerhalb der Gruppen. Die HCs von PEDF 5 und 10 zeigen nur mehr ein geringes Zellvorkommen. aCSF weist wiederum die höchste Proliferationsrate mit der zugleich höchsten Streuung auf. Nach Höhe der Proliferation folgen Lx und iCON.

Die Resultate im gesamten HC (s. Abb. 48) ähneln hinsichtlich der Verteilung der Medianwerte den Ergebnissen im ipsilateralen Bereich. aCSF weist, gefolgt von Lx, das größte Zellvorkommen bei der zugleich größten Streubreite auf. Auch die Daten von PEDF 5 und 10 sind asymmetrisch zugunsten des oberen Quartils verteilt, wobei die Medianwerte auf nahezu identischer Höhe liegen. Die geringste Zellproliferation bei der geringsten Streubreite der symmetrisch verteilten Daten zeigt iCON.

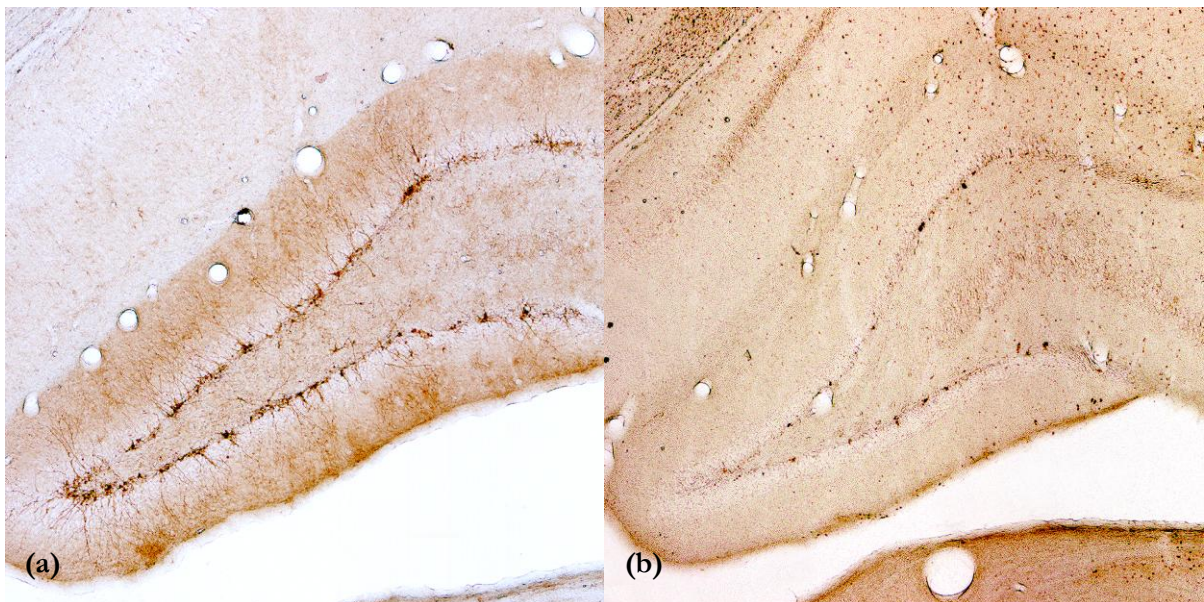


Abb. 49: Zellproliferation BrdU-positiver Zellen im HC. Dargestellt sind repräsentative histologische Ausschnitte der SGZ des hippocampalen DG (a) von Tieren ausschließlich mit Lx und (b) von Tieren, denen PEDF [10 µg/ml] infundiert worden war. Vergrößerung: $\times 10$.

DCX - Hippocampus ipsilateral

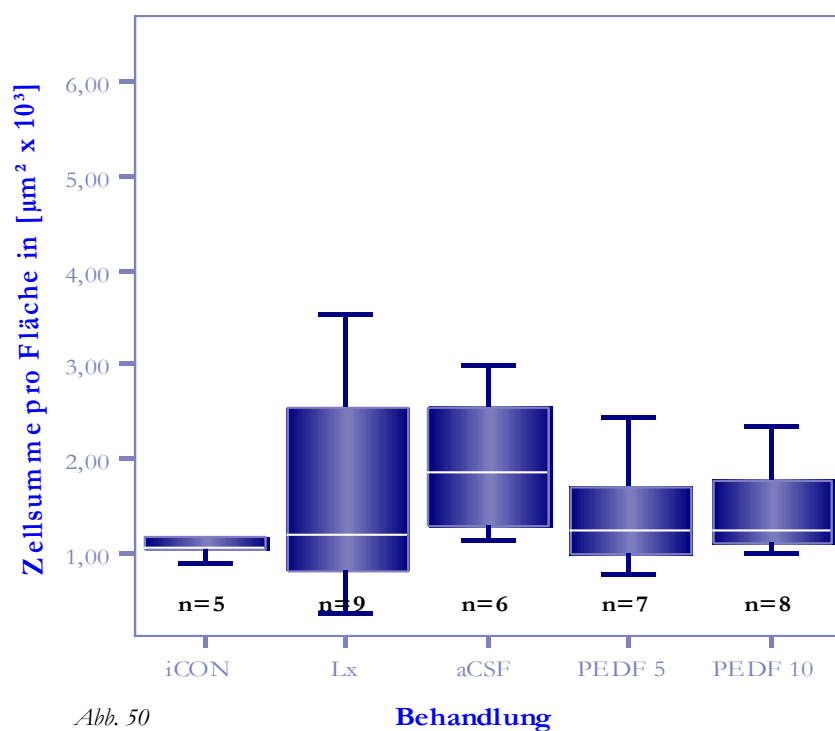


Abb. 50

DCX - Hippocampus contralateral

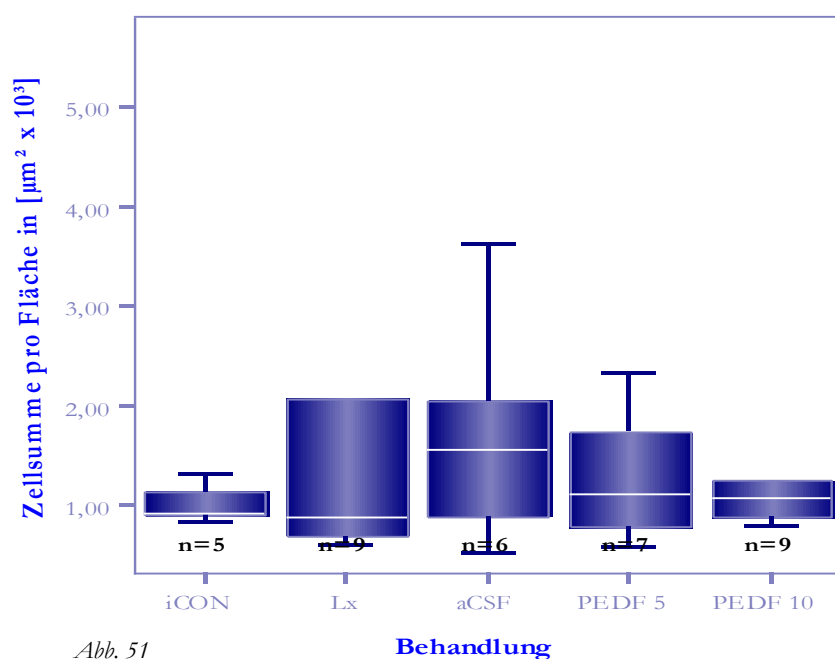


Abb. 51

DCX - Hippocampus total

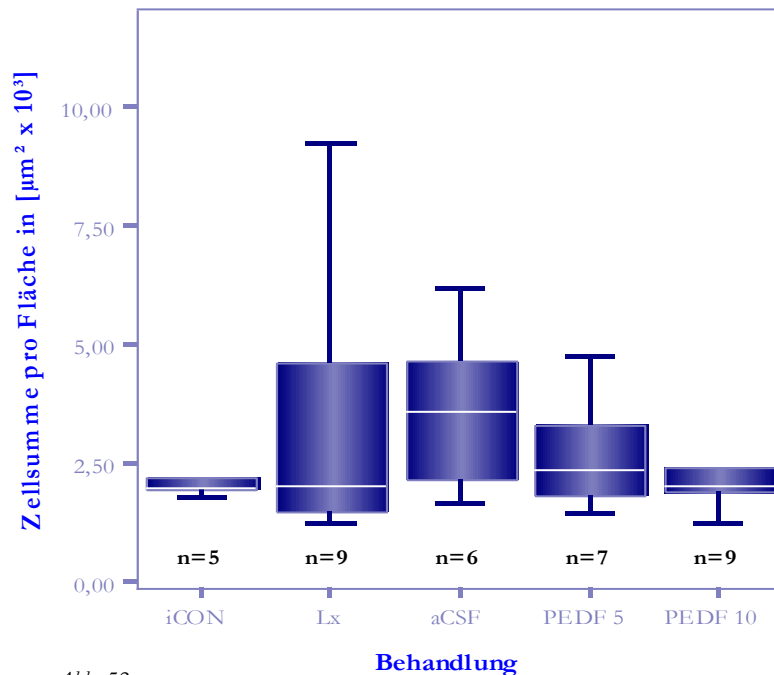


Abb. 52

Abb. 50 - Abb. 52: Anzahl DCX-markierter Zellen pro Fläche (in $[\mu\text{m}^2 \times 10^3]$) in der SGZ des HC in den Versuchsgruppen iCON, Lx, aCSF, PEDF 5 und PEDF 10. Abgebildet sind die DCX-exprimierenden Zellen im ipsilateralen (s. Abb. 50) und contralateralen (s. Abb. 51) HC sowie total (s. Abb. 52).

Die Messergebnisse sind mit $p = 0,379$ im ipsilateralen HC, mit $p = 0,928$ im contralateralen und $p = 0,689$ im gesamten HC nicht signifikant.

| Versuchsgruppen HC- Areal | iCON n = 5 | Lx n = 9 | aCSF n = 6 | PEDF 5 n = 7 | PEDF 10 n = 8 in (1), n = 9 in (2) und (3) |
|---------------------------------|---------------|---------------|---------------|-----------------|--------------------------------------------------|
| (1) | $1,2 \pm 0,3$ | $2,0 \pm 1,9$ | $1,9 \pm 0,7$ | $1,4 \pm 0,6$ | $1,4 \pm 0,5$ |
| (2) | $1,0 \pm 0,2$ | $2,0 \pm 2,0$ | $1,7 \pm 1,1$ | $1,3 \pm 0,7$ | $1,3 \pm 0,6$ |
| (3) | $2,2 \pm 0,5$ | $4,0 \pm 3,8$ | $3,7 \pm 1,7$ | $2,7 \pm 1,3$ | $2,4 \pm 1,4$ |

Tab. 20: Deskription ($M \pm \text{STD}$) der in Abb. 50 - Abb. 52 (DCX-positive Zellen/Fläche des HC ipsilateral (1), contralateral (2) und total (3)) graphisch dargestellten Versuchsgruppen. „n“ gibt die gruppenspezifische Tieranzahl an.

Schließlich wurde die SGZ des hippocampalen DG auf die Expression DCX-positiver Zellen untersucht (s. Abb. 50 - Abb. 52). Die Medianwerte der Versuchsgruppen aller drei Diagramme konstatieren auch für die DCX-Färbung sehr niedrige Expressionsraten.

Im ipsilateralen HC (s. Abb. 50) zeigt aCSF bei symmetrischer Datenverteilung die höchste Expressionsrate. Die Medianwerte von Lx, PEDF 5 und PEDF 10 liegen sehr dicht zusammen, wobei die Daten in allen drei *Box-Whisker-Plots* asymmetrisch zugunsten des oberen Quartils verteilt sind. Lx zeigt die breiteste Datenstreuung. Das geringste Zellvorkommen bei zugleich kleinster Streuung weist iCON auf.

Im Vergleich zu den hippocampalen Arealen ipsilateral wurden contralateral (s. Abb. 51) noch niedrigere Medianwerte gemessen. Auch contralateral hat aCSF das höchste Zellvorkommen bei

asymmetrischer Datenverteilung zugunsten des unteren Quartils und einer breiten Streuung. Die Mediane von PEDF 5 bzw. PEDF 10 liegen tiefer, wobei die Daten von PEDF 5 asymmetrisch zugunsten des oberen Quartils verteilt sind. In PEDF 10 geht contralateral ein Versuchstier mehr in die Analyse ein. Die geringste Expressionsrate zeigen iCON und Lx. In beiden Gruppen streuen die Daten vornehmlich im oberen Quartil.

Entsprechend ergibt sich das letzte Diagramm (s. Abb. 52) aus der Summe der beiden hippocampalen Areale. aCSF hat das höchste Zellvorkommen, gefolgt von PEDF 5 und PEDF 10. In iCON und Lx finden sich die wenigsten Zellen. Die größte Datenstreibbreite zeigt Lx.

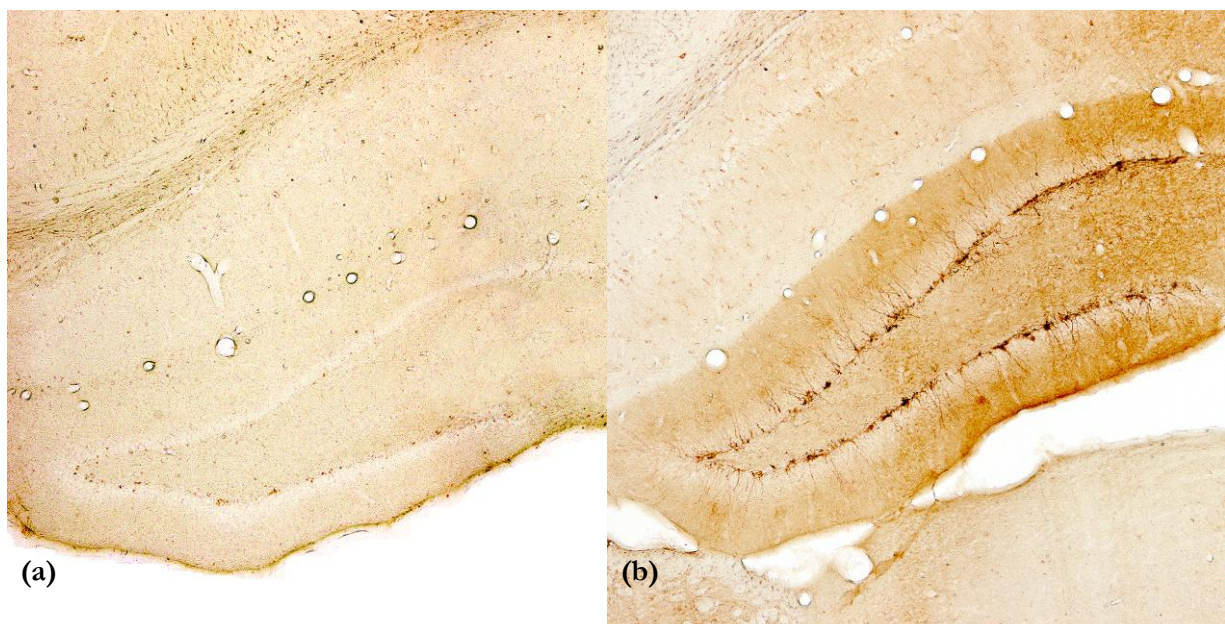


Abb. 53: DCX-exprimierende Zellen im DG der SGZ des HC. Dargestellt sind repräsentative histologische Ausschnitte des Läsionsbereichs (a) von Tieren ausschließlich mit Lx und (b) von Tieren, denen PEDF [10 µg/ml] infundiert worden war.

Vergrößerung: $\times 10$.

V. DISKUSSION

Die traumatische Hirnschädigung stellt eine Erkrankung von großer Tragweite dar und fordert Medizin wie Gesellschaft in besonderem Maße. In den nationalen und internationalen epidemiologischen Daten ist das SHT neben Schlaganfall oder Carcinomkrankungen als gleichermaßen häufige wie lebensbedrohliche und lebensverändernde Krankheitsentität präsent. Dies ist insbesondere bemerkenswert, da das SHT im Vergleich zu vorgenannten in der Tendenz eher eine Verletzung des jüngeren, im Allgemeinen bis *dato* gesunden Menschen ist, dessen Lebensumstände sich dadurch - sozial wie beruflich - akut und von Grund auf ändern. Das Ausmaß des Gehirnschadens sowie die weitgehend fehlenden Regenerationsmöglichkeiten des Hirngewebes bedingen bei posttraumatischem Überleben die enormen Einschränkungen der Lebensqualität bis hin zu langandauernden Behinderungen oder einem apallischen Syndrom^{338,387,403,449}.

In der Medizin existiert bislang keine klinisch etablierte und direkt wirksame Therapiemaßnahme zur gezielten kausalen Behandlung der Pathomechanismen, die von einem SHT initiiert werden. Den zahlreichen experimentellen und klinischen Studien weltweit gemeinsam ist die Motivation, die extrem hohe Morbidität und Mortalität dieses Krankheitsbildes zu senken.

Wegbereitend für die SHT-Forschung war im letzten Jahrhundert der Fall von Ramón y Cajals Dogma, nach dem das adulte Säugerhirn ein postmitotisches Organ sei³⁵⁰. In der vergangenen Dekade revolutionierte die Entdeckung neuronaler Stammzellen im adulten Säugetiergehirn, verbunden mit ihrer kontinuierlichen Genese und Persistenz bis ins hohe Erwachsenenalter, die Neurowissenschaften (s. Abb. 54)^{141,222,224,313,317}. Infolge der Identifikation der neurogenen Zonen^{20,21,25,66,213,259,437} eröffnete sich mit der Erforschung des zugrunde liegenden Mikromilieus als regulatorischer Instanz ein vollkommen neues wissenschaftliches Betätigungsfeld. Die sog. „Stammzellnische“ beschreibt ein phylogenetisch angelegtes und bisher nur in Grundzügen erforschtes Kommunikationssystem zwischen mesenchymalen Geweben (Endothel- oder Ependymzellen) und zirkulierenden Faktoren³²², deren dynamische Interaktion die Selbsterneuerung und Differenzierung von neuronalen Stammzellen und Vorläuferzellen und damit den Prozess der adulten Neurogenese steuert^{24,341,416}. PEDF ist einer dieser Faktoren.

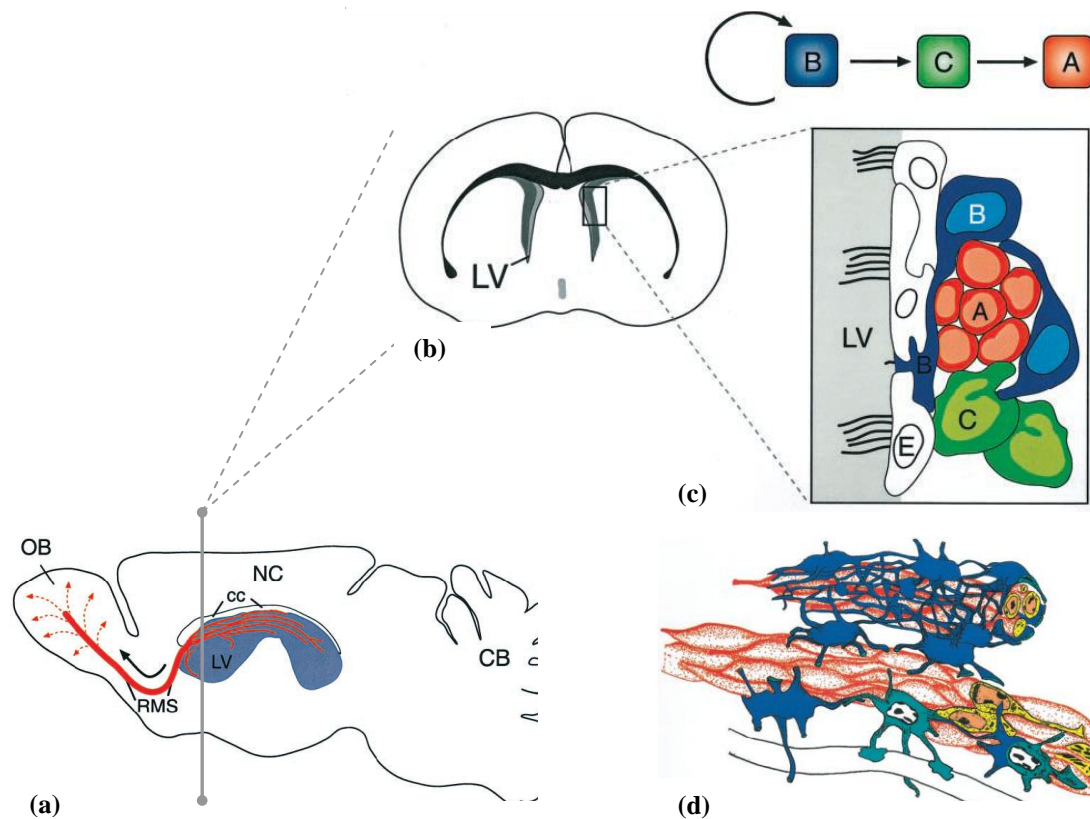


Abb. 54: (a) Das SVZ-OB-System. Dargestellt ist ein schematischer Sagittalschnitt durch das adulte Nagergehirn mit dem OB links und dem Cerebellum (CB) rechts. Die SVZ liegt entlang der lateralen Wand des Seitenventrikels (LV, blau). In der gesamten SVZ werden kontinuierlich neue Neuronen produziert, die sich dann als Typ A Zellen ((c) und (d)) kettenförmig aufreihen (rote Linien) und ((d)) ein komplexes Netzwerk aus untereinander verbundenen Pfaden in der SVZ ausbilden. Viele dieser Ketten in der anterioren SVZ schließen sich dem RMS an, der die jungen Neuronen in den Kern des OB leitet. Im OB dispergieren die Zellen radiär (gepunktete Linien) als individuelle Zellen und vollenden ihre Differenzierung in granuläre und periglomeruläre Interneurone. NC, Neocortex; cc, Corpus callosum.

(b) und (c) Zellarchitektur und Zelllinien in der SVZ. (b) zeigt einen Koronarschnitt aus dem anterioren Nagergehirn, in dem die Lokalisation der SVZ an der lateralen Wand des LV gekennzeichnet ist. Der zelluläre Aufbau der SVZ ist (c) zu entnehmen. Kettenformationen aus jungen Neuronen (Typ A Zellen, rot) werden von Typ B Zellen (blau) umhüllt, die astrozytäre Charakteristika aufweisen und tubuläre Scheiden formen. Neurosphären aus hoch proliferativen Typ C Zellen (grün) stehen mit den Typ A Zell-Ketten in Verbindung. Ependymale (E) Zellen bilden die Epithelzellschicht, welche die SVZ vom LV trennt. Die Typ B Zellen generieren die sich schnell teilenden Typ C Zellen (auch als Transitory Amplifying Neural Progenitors bezeichnet), die wiederum die Typ A Zellen hervorbringen.

(d) Migrationsketten. Junge Neuronen im Netzwerk der SVZ und des RMS migrieren aneinander entlang und bilden so lange Ketten. Die Ketten aus migrierenden Zellen (rot) sind von einer Gliazellscheide (blau) eingehüllt, die astrozytäre Charakteristika aufweist: dichte Bündel GFAP-haltiger Intermediärfilamente mit Kontakt zu Blutgefäßen ((d) unten). Bei den hier abgebildeten zwei Ketten sind auf der unteren nur einige Astrozyten eingezeichnet, um die dichte Organisation der Typ A Zellen zu Ketten aufzuzeigen. Die intrazellulären Charakteristika von einigen der Typ B Zellen (hellblau) und Typ A Zellen (gelb) sind entsprechend eingezeichnet. Auf der unteren Kette rechts ist eine Typ A Zelle in Mitose zu sehen (modifiziert nach²³).

V.1 MOTIVATION UND ZIEL DER STUDIE

Seit der Entdeckung von PEDF 1989⁴²⁵ und der fortan intensiven Beforschung seiner vielversprechenden neuromodulatorischen Effekte *in vitro* verbinden sich mit seinem Einsatz am traumatisierten Gehirn *in vivo* große therapeutische Hoffnungen^{133,348,422}. Bislang existieren in der Literatur ausschließlich Belege über die neuroprotektiven und neuroregenerativen Effekte von PEDF *in vitro*. In der vorliegenden Studie wurde erstmalig am standardisierten Tiermodell untersucht, ob die posttraumatische intraventrikuläre *in vivo*-Applikation von PEDF als neuroregenerative Therapiemethode bei experimentellem SHT an der Ratte geeignet ist. Die Prävention bzw. Eindämmung der spezifischen, verlaufbestimmenden Sekundärschäden extra- und intrakranieller Genese stellt nach wie vor eine Herausforderung dar, gilt sie doch nach neuestem Wissensstand über Neuroprotektion als einzige Option, die Morbidität und Mortalität dieser Krankheitsentität zu senken²⁰². Eine effektive neuroprotektive Therapie in der Frühphase der Behandlung ist zwar der unabwendbaren irreversiblen Primärläsion nicht zugänglich, wirkt aber zusätzlichem Substanzverlust entgegen. In Zusammenschau dieser Erkenntnisse wurde folgende Arbeitshypothese (s. Kap. II) postuliert:

„Nach kontrollierter kortikaler Kontusion induziert die *in vivo*-Applikation von PEDF bei adulten Ratten die Neurogenese, moduliert die inflammatorische Reaktion von Mikroglia und zeigt konsekutiv eine neuroregenerative und neuroprotektive Wirkung.“

Bei kortikaler Traumatisierung sind auch sekundäre Prozesse^{80,136} (s. Kap. I.1.3.2) am Untergang von Nervengewebe beteiligt und vergrößern nicht nur das primäre Läsionsareal, sondern schädigen auch umliegende Hirnregionen, die daraufhin einen Funktionsausfall mit klinischer Symptomatik erleiden. Aus diesem Grund wurden nicht nur die PEDF-vermittelten Auswirkungen auf das Kerngebiet des Aufschlags (Fragestellung I) untersucht, sondern auch die Effekte auf das Zellvorkommen in den neurogenen Zonen (Fragestellung II). Zwar ergab die Ergebnis-Auswertung (s. Kap. IV) nach dem Kruskal-Wallis-Testverfahren für alle Untersuchungsreihen keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen, mitunter jedoch deutliche Trends. In zukünftigen Studien gilt es zu eruieren, ob der Faktor PEDF *per se* möglicherweise nicht wie erwartet auf BrdU-, DCX- bzw. ED1-positive Zellen wirkt, oder ob gegebenenfalls mit dem gewählten Versuchsaufbau die PEDF-induzierten Effekte nicht detektierbar sind. Nachfolgend werden die Methodik, die histologischen Parameter und Ergebnisse kritisch betrachtet, interpretiert und in den Kontext bisher aus der Literatur bekannter Forschungserkenntnisse auf diesem speziellen Feld gestellt.

V.2 UNTERSUCHUNGSGUT UND TIERVERLUST

In den letzten Dekaden greifen die experimentellen Neurowissenschaften zur Simulation des SHT immer häufiger auf Tiermodelle an Kleintieren, besonders Nagetieren, zurück. Die meistverwendeten Modelle werden an Ratten durchgeführt. Als Untersuchungsgut vereinen Laborratten mehrere Vorteile^{107,109}:

- präzise Daten über Alter, Gewicht, Zustand und genetischen Hintergrund der Tiere
- einfache anästhetische und chirurgische Handhabung während der Versuchsdurchführung
- Wissen um Normwerte in einer Vielzahl von physiologischen und verhaltensorientierten Variablen
- Kompatibilität zu anerkannten neurochemischen, pharmakologischen und histologischen Techniken, über die eine große Erfahrung im Vergleich zu anderen Spezies besteht
- hohe Resistenz gegen Infektionen
- niedrige Beschaffungs- und Unterhaltskosten
- ökonomischer und effizienter Einsatz von Pharmaka und teuren Reagentien aufgrund des geringen Körpergewichts (KG).

Dagegen wiegen einige nachteilige Fakten eher gering, so z.B. die Unterschiede der neuroanatomischen Strukturen und Massenrelationen von Hirngewebe, Schädel und extrakraniellen Weichteilen im Vergleich zum Menschen¹⁰⁷.

Während des Versuchs verstarben fünf von den ursprünglich 40 Tieren nach der Traumainduktion (s. Tab. 10 in Kap. IV.1). Für das invasive Experiment an sich bedeutet dies zwar keine unerhebliche Ausfallsrate, aber dennoch erweist sich die Traumastärke nicht so schwer, als dass ein Weiterleben in der achttägigen Versuchsphase nicht gewährleistet würde. Die statistische Auswertung des während der Versuchsphase präzise und unverwechselbar dokumentierten Gewichtsverlaufs der Tiere ergab zu keinem Messzeitpunkt (s. Tab. 8 in Kap. IV.1) einen signifikanten Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen. Der allen Ratten gemeinsame Gewichtsverlust verdeutlicht, dass das experimentelle *Setting* eine generelle Belastung für den Organismus darstellt. Ungeklärt bleibt, inwieweit die EZ-Reduktion durch die physischen Folgen des Eingriffs (Trepanation und/oder CCII und/oder intraventrikuläre PEDF-Infusion) bedingt ist, und ob auch die psychische Belastungssituation eine Rolle spielt. Verglichen mit den Kontrolltieren schienen das Wachstum und die Gesamtentwicklung der nach Schema behandelten Tiere nicht grob beeinträchtigt zu sein. Zu bedenken ist ferner, dass aus organisatorischen Gründen die Gewebebegewinnung aus drei unterschiedlichen Versuchsgruppen zu unterschiedlichen Operations-Zeitpunkten (März und November 2005, Januar 2006) erfolgte,

was potentiell Fehlerquellen hinsichtlich gruppenspezifischer Besonderheiten (z.B. in Aufzucht, Umgebungsgewöhnung oder Behandlung) bergen kann. Da jedoch bei dem Alter, der Eingewöhnung und allen Folgeeingriffen an den Versuchstieren streng standardisierte Rahmenbedingungen eingehalten wurden, ist diese Wahrscheinlichkeit vernachlässigbar gering.

Auffallend ist die den Ergebnissen durchweg immanente große Datenstreuung. Es muss in Betracht gezogen werden, dass die unerwartet hohe biologische Variabilität, die in Zusammenhang mit dem bewusst gewählten, geringen Stichprobenumfang von 35 Versuchstieren steht, keine statistische Trennschärfe gewährleistet. Beispielfhaft sei an dieser Stelle auf die Auswertung der Fragestellung II.1 verwiesen. Die Analysen BrdU-positiver Zellen in der SVZ zeigten für alle Versuchsgruppen eine breite Datenstreuung, wie die weit vom Median entfernten und häufig asymmetrisch liegenden oberen und unteren Quartile der *Box-Whisker-Plots* veranschaulichen. Auffallend sind jedoch in beiden Hemisphären der SVZ dominant hohe DNA-Syntheseraten in den PEDF-behandelten Gruppen. Trotz fehlender Signifikanz im Vergleich zu den Kontrollgruppen, ähnelt dieses Resultat doch bereits gewonnenen Erkenntnissen am intakten Nagerhirn³⁴⁸. Zu konstatieren ist, dass unser Experiment als explorative Pilotstudie angelegt ist, die gewisse Tendenzen für PEDF-Effekte (s.u.) aufzeigt, dass jedoch aufgrund fehlender Signifikanz die postulierte Hypothese nicht bestätigt werden kann. Inwieweit hierfür die biologische Varianz eine tragende Rolle spielt, gilt es, in Folgestudien zu veri- bzw. falsifizieren.

V.3 INTRAVENTRIKULÄRE VERTEILUNG („*DRUG DELIVERY*“) VON PEDF DURCH DIE ALZET®-PUMPE

V.3.1 VORTEILE VON *DRUG DELIVERY*SYSTEMEN

Die Miniaturpumpe der Fa. Alzet® ist eine in Tierlabors etablierte, da präzise, vielseitig einsetzbare und nebenwirkungsarme Methode, um Ratten über einen protrahierten Zeitraum kontrolliert intraventrikulär eine Testsubstanz (PEDF bzw. aCSF (Vehikel)) zu applizieren, ohne dabei durch ein externes Konnektionssystem ein zusätzliches Infektionsrisiko eingehen zu müssen oder das Versuchstier mehrmaliger Manipulation auszusetzen. Der operative Eingriff ist auf die Implantation (und die Explantation des Systems nach Euthanasie) limitiert.

In den letzten zwei Jahrzehnten haben sich mit der Entwicklung implantierbarer *Drug Delivery* Systeme wie der osmotischen Minipumpe von Alzet® in der medizintechnischen Forschung völlig neue Möglichkeiten für die kontrollierte Medikamentenfreisetzung eröffnet. In Klinik und Wissenschaft gewinnt die gezielte lokale und zeitliche Verabreichung (potentieller) Therapeutika

zunehmend an Bedeutung^{137,282,420}. Das Pumpsystem ist in vielen Aspekten alternativen Ansätzen wie z.B. der Wirkstoff-Applikation über Haut oder Nasenschleimhaut oder konventionellen Methoden wie der oralen Aufnahme bzw. der i.v. Injektion überlegen. So muss bei systemischer Gabe von PEDF beispielsweise in Betracht gezogen werden, dass das Protein nicht befähigt sein könnte, die BBB zu kreuzen und damit seinen Wirkort zu erreichen. Im Unterschied zu systemischen Verteilungsverfahren tritt bei implantierbaren Systemen zudem der Verdünnungseffekt in den Hintergrund, d.h. mit geringeren Wirkstoff-Konzentrationen werden die gewünschten Effekte erzielt, ohne dabei mögliche dosisbedingte Nebenwirkungen, die häufig fernab des Wirkorts auftreten, hervorzurufen^{16,134,384}. Vielmehr ist eine zielgerichtete Kontrolle von Wirkungsort (Pharmakodynamik) und Pharmakokinetik des Wirkstoffs möglich. In diesem Experiment wird PEDF (bzw. aCSF) aus einem internen Reservoir präzise im linken Seitenventrikel, contralateral zur kontusionierten Hemisphäre, freigesetzt und unter kontinuierlicher, gleichmäßiger Einspeisung durch den Liquorfluss (gleich einem „*Wash out*“-Effekt) verteilt. Während orale oder i.v. Applikationsformen mit ungünstigen Konzentrationsverläufen, sog. *peak and trough*-Zyklen (initial viel zu hohe Wirkstoff-Konz., gefolgt von einem rapiden Abfall innerhalb kurzer Zeit unter den therapeutisch wirksamen Konzentrationsbereich), verbunden sind, erhält die Alzet® Pumpe während des achttägigen Versuchsintervalls einen konstanten Wirkspiegel aufrecht und vermindert eine potentiell toxische Akkumulation. Am Zielort entstehen lokal hohe PEDF-Konzentrationen, die sich über die Liquorzirkulation intrazerebral verteilen. Durch lokales *Drug Delivery* können somit Wirkstoffe effizient eingesetzt werden, die, systemisch verabreicht, toxisch wirken könnten. Essentiell sind die *Drug Delivery* Systeme für die Verabreichung der neuen Generation von biotechnologisch hergestellten Wirkstoffen. Proteine wie rPEDF haben ungeschützt im Körper nur eine kurze Lebensdauer. Eine enterale Applikation verbietet sich, da das Protein bei Passage des Gastrointestinaltrakts rasch proteolytisch zersetzt würde. Durch die parenterale Freisetzung aus dem Pumpreservoir kommt PEDF erst zum gewünschten Zeitpunkt am Wirkort mit der physiologischen Umgebung in Kontakt.

V.3.2 *DRUG DELIVERY* BEIM SHT: PHARMAKODYNAMIK VON PEDF

Kritisch zu hinterfragen ist in diesem Versuchsaufbau, inwieweit sich das intraventrikulär applizierte PEDF pharmakodynamisch verteilt, d.h. ob es auch seinen Bestimmungsort, das Kontusionsareal und die Germinalzentren, erreicht hat. Da der rechtshemisphärische Kortex durch das CCII umfassend geschädigt wurde, entschied man sich methodisch für die Platzierung der Infusionskanüle im linken Seitenventrikel. Andernfalls wäre das Hirnparenchym u.U. für die nachfolgende gewebliche Aufarbeitung und Analyse zu sehr destruiert worden. Fraglich bleibt

jedoch, ob die Pumprate und –verweildauer sowie die contralaterale Lokalisation der Kanüle ausreichen, damit PEDF über die Liquorzirkulation in einer effektiven Wirkkonzentration zum Traumaareal auf der Gegenseite gelangt. Denkbar wäre auch, dass die durch den Sekundärinsult bedingten pathophysiologischen Veränderungen im Gehirn⁴⁴⁵ wie z.B. die Ausbildung eines Hirnödems oder der Anstieg des ICP die Diffusion von PEDF erschweren oder gar inhibieren. Die These eines insuffizienten *Drug Delivery* könnte möglicherweise die Analyse der subventrikulären DNA-Synthese stützen: zwar bleibt das Ergebnis einen Signifikanznachweis schuldig, dennoch zeichnen sich in der SVZ in den PEDF-behandelten Gruppen bilateral tendenziell höhere BrdU-positive DNA-Syntheseraten ab als in den Vergleichsgruppen. Ginge man nun von posttraumatischen pathomorphologischen Veränderungen des Gehirnparenchyms aus, welche die Bioverfügbarkeit von PEDF negativ beeinflussen, könnte PEDF nur die SVZ erreicht haben, da sie in unmittelbarer Nachbarschaft zum lateralen Ventrikelependym lokalisiert ist und somit leichter erreichbar wäre, als die weiter distanzierten Strukturen des HC und der Läsion. So ließe sich ein Ausbleiben der PEDF-Effekte in der SGZ des hippocampalen DG und im Kontusionsareal erklären.

Technisch ließ sich in dem vorliegenden Experiment nicht be- bzw. widerlegen, ob PEDF durch das intraventrikuläre *Drug Delivery* tatsächlich seine Wirkung im Kontusionsareal entfalten kann, so dass unklar bleibt, ob die Ergebnisse auf den Einfluss von PEDF zurückzuführen sind, oder vielmehr der Versuchsaufbau eine mögliche Detektion traumaassoziierter PEDF-Effekte nicht zulässt. Dieser Kritikpunkt wirft auch die Frage auf, ob eine Ausdehnung der Versuchsphase beispielsweise auf ein 2-Monatsüberleben der Tiere ausschlaggebend wäre, um PEDF-vermittelte Effekte erfassen zu können. In Vergleichsstudien³⁴⁸ erfolgte die BrdU-Applikation bereits einen Monat vor PEDF-Infusion, um die Inkorporation des Proliferationsmarkers in Zellen mit langen Zellzyklen sicherzustellen. Möglicherweise wurde unsere Versuchsreihe abgebrochen, ehe PEDF – wie *in vitro* mehrfach nachgewiesen^{68,195,414,415,422} – neurotroph bzw. neuroregenerativ wirken konnte.

Aufgrund der Umsicht bei der Implantation (s. Kap. III.1.3.2) und der Bestimmung des Residualvolumens nach Pumpen-Explantation (zur Verifizierung der Abgabetätigkeit bzw. der Pumprate) ist ansonsten von einer planmäßigen Abgabe von PEDF (bzw. aCSF) im Ventrikel bei optimaler Pumpfunktion auszugehen.

V.4 DETEKTION DER EFFEKTE VON PEDF

Zu klären bleibt auch, ob die der Studie zugrunde liegenden Färbemethoden eine Detektion möglicher PEDF-Effekte zulassen.

V.4.1 AUSWIRKUNGEN VON PEDF AUF DIE DNA-SYNTHESE

V.4.1.1 Detektion neuronaler Zellteilung

Berechtigt ist die Frage, ob BrdU als histologischer Parameter zur Detektion von stattgehabter DNA-Synthese für die Fragestellung dieser Studie hinreichend geeignet ist.

Das synthetische Thymidinanalogon BrdU verteilt sich nach systemischer Applikation in allen Körperkompartimenten und wird zuverlässig in die DNA neu entstandener Zellen inkorporiert¹⁶⁸. Überschüssiges BrdU wird rasch aus dem Körper eliminiert und hat deshalb nur eine relativ kurze Verweildauer von ca. zwei Stunden, was den Rückschluss zulässt, dass BrdU-positive Zellen in dieser Zeitspanne DNA synthetisiert haben müssen^{113-115,410}. BrdU bleibt über die gesamte Lebenszeit in der Zelle nachweisbar und kann durch immunhistochemische Techniken visuell detektiert werden. Sobald allerdings auf eine derartige Zellmarkierung weitere Zellteilungen folgen, kann das BrdU-Signal infolge des exponentiellen Verdünnungseffekts nach drei Mitosen unter die histologische Nachweisgrenze fallen⁴⁴². Bis heute besteht die Kontroverse, ob mit BrdU ausschließlich und somit zuverlässig die Nachkommen sich teilender Stamm- und Vorläuferzellen markiert werden. Diskutiert wurde die Möglichkeit, dass auch DNA-Reparaturprozesse in postmitotischen Zellen eine BrdU-Inkorporation in die Zellkerne induzieren könnten³⁴⁴, die mit der prätraumatischen DNA-Synthese in keinerlei Verbindung stehen. Trotz weiterhin bestehender Uneinigkeit¹²⁴ ist BrdU von Experten in der Neurogenese-Forschung als valider Marker anerkannt.

Da mit BrdU allein allerdings nicht zwischen einzelnen Neuronentypen differenziert werden kann, und in der vorliegenden Arbeit somit nur unspezifisch eine neuronale Zellteilung konstatiert werden kann, ist in weiterführenden Arbeiten eine gleichzeitige Doppel- bzw. Dreifachmarkierung mit Antikörpern gegen zellspezifische Marker sinnig, um darüber hinaus eine Aussage über die Effekte von PEDF auf den Differenzierungsgrad neuronaler Zellen treffen zu können³⁸⁸. Hier eignet sich z.B. die Doppelfärbung mit BrdU und dem Neuronenmarker TUJ1, einem neuronalen Klasse III β -Tubulin, das hochspezifisch in frühen Entwicklungsstadien der neuronalen Zelllinie exprimiert wird und in Gliazellen nicht vorkommt²⁴⁶. Zum spezifischen Nachweis einer glialen Differenzierung, was hinsichtlich der vorliegenden Ergebnisse in der SVZ von großem Interesse ist (s.u.), bietet sich zusätzlich die Doppelfärbung von BrdU mit dem Protein GFAP an, das spezifisch in Astrozyten exprimiert wird²⁰⁸.

V.4.1.2 PEDF als Induktor von Zellproliferation

In den Gehirnschnitten aller traumatisierten Versuchsgruppen (Lx, aCSF, PEDF 5 und PEDF 10) waren in der Penumbra der Läsion vermehrt BrdU-positive, proliferierende Zellen zu beobachten. Ungewiss bleibt, welche Zellpopulation/-en hier im Kontusionsareal mit dem Proliferationsmarker BrdU detektiert wurden. Möglicherweise könnte es sich bei dem dichten, die Läsion umgebenden Randsaum posttraumatisch proliferierender Zellen um neuronale Vorläuferzellen handeln. Allerdings kommt es dadurch nicht, wie in der Hypothese vermutet, zu einem neuroregenerativen Effekt im Sinne einer PEDF-induzierten Verkleinerung des Kontusionsareals.

In der bisher publizierten Literatur wurde der Einfluss von PEDF auf die SGZ des hippocampalen DG noch nicht untersucht, weder am intakten Gehirn noch posttraumatisch. Bei der Analyse der Germinalzentren zeigte sich in den (ipsilateralen und gesamten) HCs unversehrter Kontrollratten (iCON) ein signifikant geringeres Vorkommen BrdU-markierter neuronaler Vorläuferzellen als bei Tieren mit Läsion ($p = 0,018$ ipsilateral bzw. $p = 0,045$ total) oder Tieren mit intraventrikulärer Infusion von aCSF ($p = 0,006$ ipsilateral bzw. $p = 0,006$ total). Dies weist darauf hin, dass eine Manipulation am Rattenkortex die hippocampale Neurogenese stimuliert. Insgesamt war die Proliferationsrate BrdU-positiver Zellen im HC allerdings sehr gering. Im Vergleich mit der SVZ fällt hier, wenngleich bei fehlender Signifikanz, tendenziell eine stärkere Proliferation BrdU-positiver Zellen auf, als dies im HC der Fall ist. Die Ergebnisse der SVZ werden in Zusammenschau mit der aktuellen Literatur wie folgt interpretiert:

nach dem gegenwärtigen Forschungsstand existieren weder *in vivo* noch *in vitro* Erkenntnisse über die konkreten Auswirkungen von PEDF auf das zerebrale Trauma. Der Nachweis einer proliferationsfördernden Wirkung von PEDF wurde jedoch aktuell erbracht³⁴⁸. Proliferationsstudien am intakten adulten Mäusegehirn zeigten für eine zelluläre Subfraktion der SVZ, dass endogenes PEDF zwar keine stimulierende Wirkung auf das neuronale Überleben hat, jedoch sehr wohl auf die Teilungsrate BrdU- bzw. GFAP-positiver Typ B-Zellen³⁴⁸. Nach einer einwöchigen Versuchsphase mit intraventrikulärer Infusion von PEDF (20 ng/ml bei einer Flussrate von 0,5 µl/h) wurde den Tieren zum Nachweis der subventrikulären Zellproliferation am letzten Tag sieben Mal im Intervall von zwei Stunden BrdU (50 mg/kg KG) injiziert. Verglichen mit den Kochsalz (Vehikel)-behandelten Kontrollgruppen ließ sich eine globale Zunahme BrdU-positiver Zellen feststellen³⁴⁸.

Auch in der vorliegenden Studie wurde die Proliferation BrdU-positiver Zellen speziell in der SVZ untersucht. Wenngleich statistisch in den PEDF-behandelten Tiergruppen kein signifikanter Unterschied zur Zellproliferation in den Kontrollgruppen (iCON, Lx, aCSF) nachgewiesen werden konnte, so deutet sich in Trends doch an, dass es in PEDF 10 und in geringerem Maße,

wohl da niedriger dosiert³⁴⁸, auch in PEDF 5 zu einem Anstieg der Zellzahl kommt. Allein mit dem Marker BrdU bleibt es allerdings spekulativ, auf welche zelluläre Subpopulation PEDF proliferationsfördernd wirkt. Richtungweisend sind auch hier die Erkenntnisse der Forschergruppe um Ramirez-Castillejo et al.³⁴⁸: um zu spezifizieren, ob PEDF mit seinen trophischen Effekten ausschließlich die neuronale Zelldifferenzierung stimuliert oder auch auf gliale Zellen induktiv wirkt, wurden ferner die Auswirkungen von PEDF auf die subventrikulären Typ B-Stammzellen untersucht. Diese Zellen zeichnen sich durch ihre Immunreaktivität für den Astrozytenmarker GFAP aus^{111,145,296}. Da für die Typ B-Zellen lange Zellzyklen charakteristisch sind²⁹⁶, wurde den Mäusen in einer weiteren Versuchsreihe bereits einen Monat vor Beginn der PEDF-Infusion sechs-malig (zwei Mal pro Tag an drei aufeinander folgenden Tagen) BrdU injiziert, mit dem Ergebnis, dass mehr BrdU- und GFAP-positive Zellen detektiert wurden als in der Kontrolle. Dies lässt den Schluss zu, dass endogenes PEDF *in vivo* zur spezifischen Aktivierung und Selbsterneuerung der subependymalen Typ B-Zellen in der SVZ führt. Weiterführend bestätigte sich der Umkehrschluss, dass die Blockade von endogenem PEDF die Teilungsrate reduziert. Dazu wurde selektiv der C-terminale Molekülbestandteil von PEDF appliziert, der – anders als das neurotroph wirkende N-Terminal – die PEDF-Effekte inhibiert (s. Abb. 55 und Abb. 56). Nachfolgend ließ sich – verglichen mit den PEDF-behandelten Tieren sowie der Kontrollgruppe - eine Abnahme der Dichte GFAP-positiver Zellen beobachten. Folglich stellt PEDF zwar einen Stimulus für die B-Zellproliferation dar, ist jedoch kein entscheidender Faktor für deren Überleben³⁴⁸.

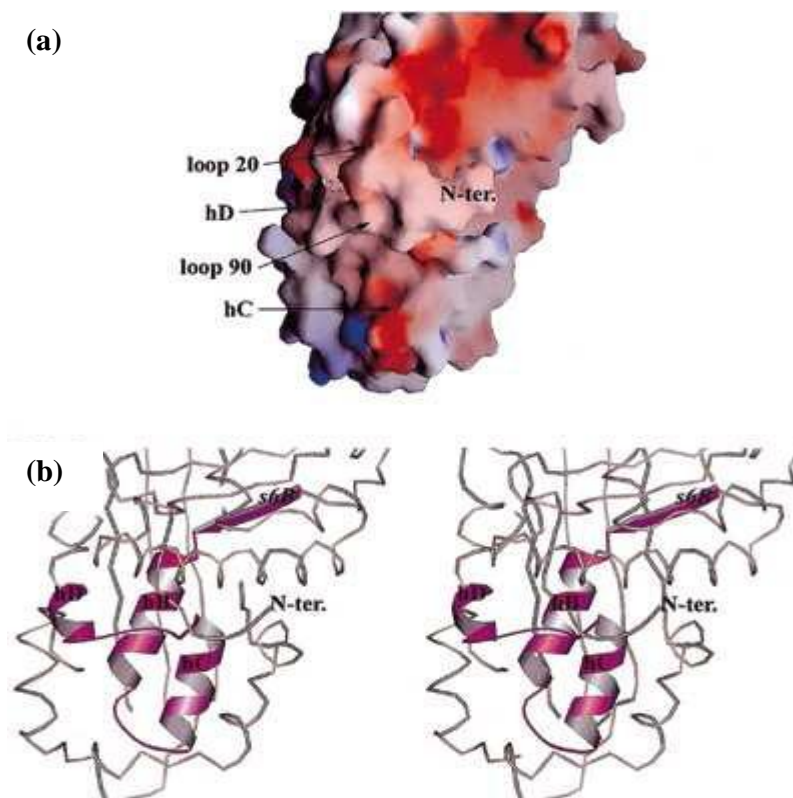


Abb. 55: Rezeptorbindungsstellen des PEDF-Moleküls. (a) zeigt die Ladungsverteilung im Bereich der Bindungsstelle mit den basischen (blau) und sauren (rot) Seitenketten. Den gekennzeichneten Helices hC und hD sowie loop 90 werden die neurotrophen Effekte von PEDF zugeordnet. (loop 20 weist auffallend viele negative Ladungen auf.) In (b) (Stereo-Ansicht) ist die Sekundärstruktur der Bindungsstellen (magenta) dargestellt (nach³⁸²).

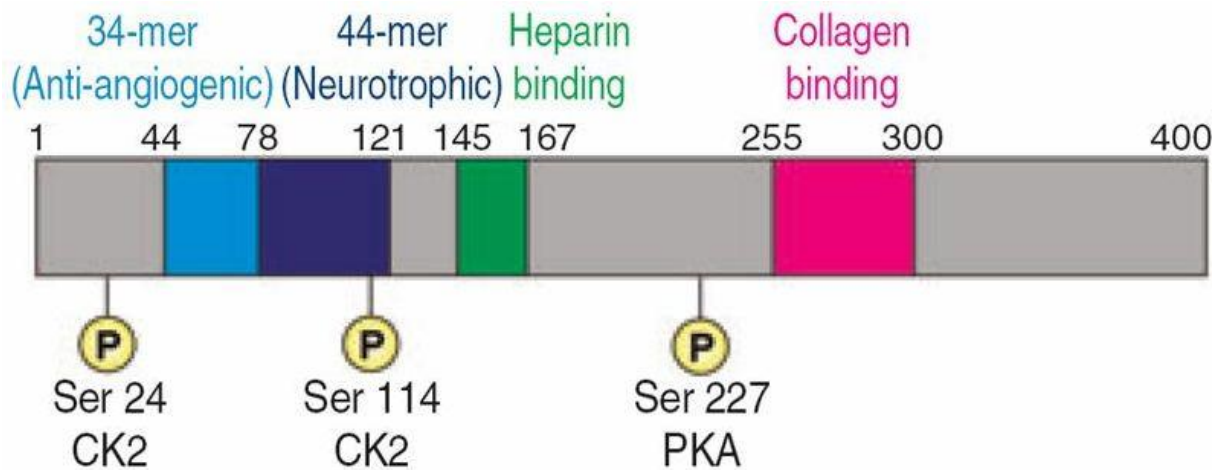


Abb. 56: Schematische Darstellung der bisher identifizierten funktionellen Domänen von PEDF. Abgebildet sind die bedeutenden Phosphorylierungsstellen und die Interaktionsstellen mit der extrazellulären Matrix. PKA, Proteinkinase A; CK2, Kaseinkinase 2; Ser, Serin (nach³⁴¹).

Interessant wäre, ob eine Ausweitung des vorliegenden Experiments auf die Analyse mit GFAP (Kokolisierung BrdU/GFAP) dieses vorbeschriebene Resultat bestätigen würde. In der Zusammenschau mit den in dieser Arbeit erbrachten Ergebnissen ist durchaus denkbar, dass die SVZ als neurogene Nische mit speziellem Wachstums milieu^{24,212,303,341,348,416} aus bisher ungeklärten Gründen besonders suszeptibel für PEDF ist. Zwar ist auch der HC nachweislich ein Ort adulter Neurogenese, weist jedoch gegebenenfalls eine geringere neurogene Potenz auf als die SVZ. Möglicherweise bedingen dies bisher nicht spezifizierte Unterschiede im Mikromilieu beider Germinalzentren. Dieser Interpretationsansatz würde das Ausbleiben der PEDF-Effekte in der SGZ des hippocampalen DG und im Kontusionsareal erklären.

V.4.1.3 PEDF als antiproliferativer Faktor

Neben dem zuvor angeführten proliferationsfördernden Aspekt sind - seit der Entdeckung von PEDF in einer Vielzahl humaner fetaler und adulter Gewebe⁴²⁷ - seine antiproliferativen Effekte auf die unterschiedlichsten Zelltypen dokumentiert: beispielsweise bestätigten Kokulturstudien an PEDF-behandelten Mikroglia- und Astrozytenpopulationen aus dem Gehirn neugeborener Ratten den antiproliferativen Effekt des Proteins auf Astrozyten⁴⁰⁴ (s.u.). Ferner inhibiert PEDF *in vitro* die Angiotensin (Ang) II-vermittelte T-Zell-Proliferation durch Suppression (1.) der autokrinen Interleukin-2-Produktion und (2.) der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, wodurch der Faktor in der Arteriosklerose-Protektion an Bedeutung gewinnt⁴⁵⁷. Gleichmaßen inhibitorische und damit antiarteriosklerotische Wirkung zeigt PEDF durch seine antioxidativen Eigenschaften auf die AngII-induzierte Proliferation glatter Muskel-⁴⁵⁸ und Endothelzellen von Blutgefäßen⁴⁵⁹. Weiter supprimiert PEDF in den kapillären Endothelzellen der Choroidea *in vitro* die VEGF-vermittelte Zellproliferation und -migration⁴⁴⁰.

Neben seiner Bedeutung in der Behandlung neovaskulärer Erkrankungen verspricht PEDF als kombiniert antiangiogener, antiproliferativer, differenzierungsfördernder und neuroprotektiver Faktor auch antitumorigenes Potential^{122,423}. Eine Studie an humanen Endometriumzellen bestätigte die Hypothese, dass der altersbedingte Abfall der PEDF-Spiegel ein Milieu schafft, das anfälliger für Tumorwachstum ist³²³. Die endometrialen Stromafibroblasten (ESF) bilden als dominierender Zelltyp des menschlichen Endometriums die Kontrollinstanz über die glandulären Epithelzellen, aus welchen die meisten Tumore entspringen. Mit der Seneszenz der ESF *in vitro* nimmt auch ihre Fähigkeit ab, das Wachstum und die Differenzierung der Epithelzellen adäquat zu regulieren. Dies korreliert mit einem Absinken des von den ESF sezernierten PEDF im Zellkulturmedium. Eine Supplementierung von PEDF zeigte zwar keine Wirkung auf die ESF-Proliferation, inhibierte jedoch in Abhängigkeit von Dosis und Zeit die Proliferation endometrialer Carcinomzellen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass mit dem altersbedingten Verlust der PEDF-Expression ein Gegenregulator für Tumorzellwachstum eliminiert wird, und daher im Alter die Carcinom-Inzidenz steigt³²³. Weiterführend postulieren die Wissenschaftler, dass die gentherapeutisch induzierte, intratumorale Überexpression von exogen supplementiertem PEDF zur Apoptose von Tumorzellen führt und zudem durch die Hemmung der Angiogenese das Tumorwachstum inhibiert^{8,172,395}.

In endothelialen Zellkulturen unterschiedlichen Phänotyps wurden jedoch auch gegensätzliche Effekte von PEDF festgestellt: bei gefäßproliferativen Netzhauterkrankungen wie der diabetischen Retinopathie wird der proangiogene Faktor VEGF in der Retina überexprimiert und tritt in Wechselwirkung mit PEDF, dessen antiangiogene Aktivität *in vivo* durch seine Hemmung der Ischämie-induzierten retinalen Neovaskularisation nachgewiesen wurde¹¹⁹. Einerseits kann PEDF dann das endotheliale Zellwachstum supprimieren, indem es die VEGF-induzierte Aktivierung der Mitogen-aktivierten Protein-Kinase (MAPK) blockiert, andererseits ist belegt, dass PEDF in Kultur mit VEGF synergistisch mit dem proangiogenen Faktor wirkt und durch eine Steigerung der MAPK-Aktivierung die Zellproliferation fördert¹⁹⁸.

In der Zusammenschau der Literatur sind somit für Zellen unterschiedlichen Phänotyps bzw. Ursprungs *in vitro* und *in vivo* sowohl pro- als auch antiproliferative Wirkungen von PEDF beschrieben. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich posttraumatisch in der SVZ tendenziell eine höhere DNA-Syntheserate als hippocampal bzw. perikontusionell. Interpretatorisch richtungweisend ist die von Ramirez-Castillejo et al. erstbeschriebene, PEDF-induzierte Typ-B-Stammzellproliferation in der SVZ³⁴⁸. Für endgültige Aussagen bleiben Analysen der PEDF-Suszeptibilität im Hinblick auf Wachstumsmilieus und zelluläre Phänotypen unerlässlich.

V.4.2 EINFLUSS VON PEDF AUF DIE POSTTRAUMATISCHE ZELLULÄRE IMMUNREAKTION

V.4.2.1 Detektion von Zellen der Mononukleären-Makrophagen-Linie

Zur Untersuchung der Invasion phagozytärer Zellen bzw. aktiver Makrophagen wurde der Ak ED-1 (Ectodysplasin A) verwendet. ED1 weist als Pan-Makrophagenmarker viele gemeinsame Eigenschaften mit dem humanen *Cluster of Differentiation* (CD) 68 auf. Die antigene Determinante, gegen die sich der ED1-Ak richtet, ist eine 90 bis 100 kDa schwere einzelne Kette des „CD68-like“-Glykoproteins der Ratte und wird insbesondere auf lysosomalen Membranen, aber auch auf der Zelloberfläche von Gewebsmakrophagen exprimiert. Das Ausmaß der Ag-Expression korreliert hierbei mit der phagozytotischen Aktivität der Mikrogliazellen⁹¹. Durch die ED1-Färbung wird aktivierte Mikroglia am Ort der Entzündung darstellbar. Dennoch können mit dem Pan-Makrophagenmarker möglicherweise mikrogliale Subgruppen nicht visualisiert werden. Aufgrund dieses histochemischen Dilemmas ist bei der nachfolgenden Interpretation der Ergebnisse zunächst grundsätzlich zu hinterfragen, inwieweit ED1 sensitiv und spezifisch genug ist, um die in der Hypothese postulierten immunmodulatorischen Effekte von PEDF nach Trauma zu detektieren. Methodisch wäre eine Ergänzung der Färbereihe durch einen Marker höherer Spezifität durchaus anzustreben. Ein präziserer Nachweis wäre beispielsweise mit dem histochemischen Marker Isolektin B₄ (IB₄), einem Zellmembranprotein aus der Familie der Lektine, möglich, der spezifisch an Monozyten bindet⁴⁰². Auch bei Lektin bleibt jedoch zu bedenken, dass es nicht mit 100 %iger Sensitivität Mikroglia zu binden und somit zu färben vermag. Da mikrogliale Vorläuferzellen MHC Klasse II-positiv sind und CD45 exprimieren⁷⁴, eignen sich als weitere spezifische immunhistochemische Mikroglia-Detektoren¹⁷⁵ auch der Pan-Leukozytenmarker CD45/*Leukocyte Common Antigen* (LCA)²⁶⁵ oder der MHC Klasse II-Antikörper OX6⁷⁴.

V.4.2.2 Auswirkungen von PEDF auf Mikroglia

Bis heute ist sich die Wissenschaft uneins, ob sich die Aktivierung von Mikroglia bzw. Makrophagen, verbunden mit den nachfolgend induzierten Veränderungen (s. Kap. I.3.2.3), generell zuträglich oder hinderlich auf eine Gewebsregeneration auswirkt^{121,123,149,304,466}. Eine Conclusio bezüglich der anti- oder proinflammatorischen Wirkung von PEDF ist in der aktuellen Literatur bislang nicht absehbar. Vor dem Hintergrund dieser Kontroverse stellte sich in dem vorliegenden Traumamodell die Frage nach dem Einfluss von PEDF auf das Immunsystem. Aktuelle *in vitro*-Studien zufolge wirkt der multipotente Faktor PEDF nicht nur auf neuronaler Ebene, sondern fungiert auch als Modulator einer überschießenden zellulären Immunreaktion im Nagergehirn^{368,404} (s.u.). Dies bot Anlass, in der vorliegenden Arbeit die posttraumatischen, PEDF-induzierten inflammatorischen Gewebsreaktionen *in vivo* zu untersuchen. Die statistische

Auswertung ergab weder hinsichtlich der Ausdehnung des Kontusionsareals noch der phagozytären Zellpräsenz in der Penumbra signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungs- und Kontrollgruppen. Dennoch lassen die in der ED1-Färbung beobachteten Trends ($p = 0,075$ in der Peripherie und $p = 0,098$ im Zentrum) einen neuro-immunmodulatorischen Einfluss von PEDF auf die posttraumatische Entzündungsreaktion vermuten. Richtungweisend ist im Läsionszentrum das tendenziell höhere ED1-positive Zellvorkommen in den Gruppen PEDF 5 und PEDF 10 im Vergleich zu Lx ($p = 0,039$ bzw. $p = 0,031$ nach Mann-Whitney-U) (s. Tab. 15 in Kap. IV.2.1.2.2). Demnach könnte PEDF induktiv auf die mikrogliale Zellproliferation nach SHT wirken. Ein gegensätzlicher Trend zeichnet sich in der Läsionsperipherie ab, wo in PEDF 10 tendenziell weniger ED1-positive Zellen zu beobachten waren als in Lx ($p = 0,092$ im Stichprobenvergleich nach Mann-Whitney-U). Möglicherweise liegt diesem konträren Ergebnis die oben bereits erwähnte Verteilungsproblematik von PEDF zugrunde, will heißen, dass PEDF zwar durch die Liquorzirkulation in das unmittelbare Zentrum der Kontusion gelangen und dort proliferativ auf Mikroglia wirken konnte, ohne jedoch die Penumbra der Läsion zu erreichen. Offen bleibt auch die Frage der Dosis-Wirkungs-Beziehung von PEDF. In der Läsionsperipherie wurden nämlich in PEDF 5 mehr ED1-positive Zellen detektiert als in PEDF 10 ($p = 0,011$ nach Mann-Whitney-U). Eine potentielle Toxizität ist für PEDF – trotz bekannter proinflammatorischer Effekte^{368,404} – bisher nicht belegt⁴²². Zudem scheint PEDF in der SVZ dosisabhängig proliferationsfördernd auf Neuronen zu wirken (PEDF 10 > PEDF 5, s. Abb. 38)³⁴⁸. Interpretatorisch ist denkbar, dass PEDF die zelluläre Immunreaktion in Abhängigkeit von dem umgebenden Mikromilieu sowohl pro- als auch antiinflammatorisch modulieren könnte. Zum gegenwärtigen Forschungsstand existieren – neben vielen offenen Fragen zur Signaltransduktion und den Wirkmechanismen⁴²³ – nur wenige Belege, wie PEDF seine multiplen Funktionen induziert. Es liegt jedoch die Vermutung nahe, dass er wie die meisten anderen Wachstumsfaktoren an einen oder multiple Rezeptoren der Zelloberfläche bindet und dort eine Kaskade intrazellulärer Prozesse triggert, die wiederum zu einer Regulation und Aktivierung am Zielgen führen^{14,32,54}. Neben einer spezifischen PEDF-Zellrezeptor-Interaktion scheinen allosterische Modifikationen²⁶⁹ (s. Abb. 56) und die Bindung an extrazelluläre Matrixkomponenten^{15,194,235,289,382} die biologische Aktivität des Moleküls zu regulieren. Nicht erforscht ist, ob es einen Pool an gebundenem PEDF gibt, zu dessen Freisetzung es bestimmter Stimuli wie z.B. Verletzung bedarf. Während die Effekte von PEDF auf Makrophagen und Mikroglia am nicht-läsionierten Gehirn mehrfach untersucht wurden (s.u.), liegt diesbezüglich bisher nur eine Studie am mit Kainsäure (KA) geschädigten Cerebellum der Ratte vor. Als Folge der rechtszerebellären Injektion von KA ließ sich im ipsilateralen Läsionsbereich eine Gleichzeitigkeit von PEDF-Expression und dem Auftreten von aktivierter

Isolektin B4-positiver Mikroglia beobachten³⁶⁷. Nach experimentellem SHT wurde die potentielle Wirkung von PEDF auf Mikroglia bislang nicht untersucht. Ausgehend von den Erkenntnissen dieser Arbeit könnte das posttraumatisch generierte Mikromilieu im Gehirn ursächlich sein für die proinflammatorische Wirkung von PEDF im Sinne der Induktion einer mikroglialen Immunreaktion.

Weitere Orientierung gibt der aktuelle Forschungsstand: jüngeren Erkenntnissen zu Folge übernimmt PEDF *in vitro* neuro-immunmodulatorische Funktionen in glialen Zellen des Nagergehirns. Zum einen sind proinflammatorische Effekte dokumentiert: die Forschergruppe um Sugita et al. (1997) belegte in Kulturstudien an Ratten-Mikroglia eine PEDF-induzierte Aktivierung des mikroglialen Metabolismus⁴⁰⁴. Die aus dem Gehirn neugeborener Ratten isolierten glialen Zellen wurden in Kultur für 48 h mit humanem rPEDF⁴⁵ behandelt. Da kultivierte Mikroglia zu langsam proliferiert, als dass rPEDF-vermittelte Effekte detektierbar wären, wurde als Proliferationsstimulans *Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor* (GM-CSF = 4 ng/ml) zugesetzt. Im Vergleich zu den mitgeführten unbehandelten Kontrollen, in denen sich die Mikroglia morphologisch homogen (stäbchen- oder spindelförmig mit Fortsätzen sowie vereinzelt mit Verzweigungen) präsentierte, veränderte sich die Mikroglia nach 24-stündiger rPEDF-Exposition in kleine, runde Zellen mit kurzen Fortsätzen und in 15 – 20 % in eine flache, amöboide Form. Steigende Konzentrationen von rPEDF stimulierten, einer Dosis-Wirkungs-Beziehung ($ED_{50} = 1,3 \text{ nM}$) folgend, direkt den mikroglialen Metabolismus (gemessen am Umsatz des Kulturmediums bzw. der Aktivität von saurer Phosphatase), ohne dabei auf die Mitose, d.h. die Proliferation von Mikroglia, Einfluss zu nehmen. Die Transformation in die morphologisch aktive Form ließ sich mit einem Anti-PEDF-Ak blocken⁴⁰⁴. Weiterführend wurden auch Astrozytenkulturen untersucht. Auf den astrozytären Metabolismus und die Astrozytenproliferation zeigte PEDF keinen direkten Effekt, allerdings ließ sich in rPEDF-behandelten Kokulturen aus Astrozyten und Mikroglia die Astrozytenproliferation inhibieren. Demzufolge liegt die Annahme nahe, dass rPEDF-stimulierte Mikroglia einen oder mehrere Faktoren freisetzt, der oder die eine Blockade der astroglialen Zellproliferation bedingen⁴⁰⁴. Aktuelle Arbeiten führen den Nachweis der PEDF-vermittelten Inflammation fort. In kultivierter Ratten-Mikroglia steigerte PEDF, wie auch an zerebellären Granulaneuronen *in vitro* beobachtet⁴⁵³, die Zytokin-Expression^{368,411}. Über die Aktivierung des *cAMP response element binding* (CREB)-Proteins oder Nekrosefaktor (NF)-kappaB induziert PEDF in mikroglialen Zellen proinflammatorische Gene wie IL-1 β , IL-6 und TNF- α ³⁶⁸ und die Chemokin-Produktion (*Macrophage Inflammatory Protein* (MIP)-1 α , MIP-2 und MIP-3 α), die zur Migration von Mikroglia- und Immunzellen führen. Daher ist nicht auszuschließen, dass der klinische Einsatz von PEDF

beispielsweise zur Therapie der retinalen Neovaskularisation, des SHT oder der Ischämie inflammatorische Reaktionen auslösen und dadurch potentiell schädigend wirken könnte.

Konträr zu den Beobachtungen von Sugita et al. (1997)⁴⁰⁴ wurden von Takanohashi et al. (2005) antiinflammatorische Wirkungen für PEDF belegt⁴¹¹. Trotz nachgewiesener Induktion von Entzündungsmediatoren zeigte sich nach einstündiger PEDF-Exposition parallel eine metabolische Deaktivierung von Ratten-Mikroglia. Der Nachweis wurde neben der morphologischen Umwandlung anhand der ausbleibenden Effekte auf die Expression von Aktivitätsmarkern wie OX-42 oder ED1 geführt⁴¹¹. Festzuhalten bleibt, dass in der Literatur sowohl Evidenz für die PEDF-vermittelte Pro- als auch Antiinflammation belegt ist. Entscheidend zu sein scheinen die jeweiligen zellulären Umstände bzw. der Status der untersuchten Zellen.

Neben dem Einfluss auf Mikroglia wirkt PEDF ebenso gegensätzlich auf verschiedene Makrophagen-Zelllinien. Eine antiinflammatorische Wirkung ist für retinale Pigmentepithelzellen, die PEDF produzieren, beschrieben. In diesen Zellen retinalen Ursprungs inhibiert PEDF *in vitro* und *in vivo* die Lipopolysaccharid-vermittelte Aktivierung von Makrophagen und fungiert dadurch als Suppressor inflammatorischer Prozesse. Auf diese Weise leistet PEDF eine Kontribution zur relativen Immunprivilegiertheit des retinalen Pigmentepithels⁴⁶⁴.

Auf Makrophagen der RAW-Zelllinie wirkt PEDF proinflammatorisch. Ähnlich den Ergebnissen von Sugita et al. (1997)⁴⁰⁴ aktiviert rPEDF in der RAW-Makrophagen-Zelllinie nachweislich den Metabolismus, inhibiert aber parallel dazu ihre Proliferation. Der Wirkungseintritt setzte zwölf Stunden nach rPEDF-Exposition ein und persistierte bei kontinuierlicher Supplementierung bis zu 72 h. rPEDF stimulierte die RAW-Zellen zu einer gesteigerten Sekretion löslicher Faktoren und erwies sich dadurch als indirekter Inhibitor der Gliom-Zellteilung. Dies belegt neuerlich den Einfluss von PEDF auf Neuronen und Immunsystemzellen⁸². Weiter induziert PEDF die Apoptose und Nekrose von Makrophagen. Im Rahmen der antiangiogenen PEDF-Funktionen wurde bereits die Induktion des apoptotischen Zelltodes von Endothelzellen konstatiert. PEDF führt auch die THP-1 Makrophagen der humanen monozytären Leukämie-Zelllinie und primäre humane *Monocyte-derived Macrophages* (MDMs) zur Apoptose. Über die Stimulation des Rezeptor-Signalwegs von *Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma* (PPARgamma) induziert PEDF die Apoptose und Nekrose von Makrophagen und moduliert über diesen Mechanismus inflammatorische Prozesse¹⁹¹.

Wie diskutiert bleibt in der vorliegenden Studie fraglich, ob sich unter den ED1-markierten phagozytären Zellen Mikroglia befindet, und ob sich deren Proliferation förderlich oder schädlich auf das Traumaareal auswirkt. Für eine endgültige Aussage bzgl. der Dosis-Wirkungs-Beziehung

von PEDF sollte daher der Stichprobenumfang ausgeweitet, und ergänzend einer der o.g. spezifischen Mikroglia-Marker zur Detektion aktivierter Mikroglia einschließlich ihrer zellulären Subfraktionen eingesetzt werden. Feststeht, dass dem Faktor PEDF eine bedeutende Rolle in der Regulation der glialen Funktion und Proliferation im ZNS zukommt^{368,404}. Basierend auf den Daten unserer Studie scheint PEDF nach experimentellem Hirntrauma die mikrogliale Proliferation im Läsionszentrum zu stimulieren.

V.4.3 REAKTION DER DCX-POSITIVEN PROGENITORZELLEN AUF DIE PEDF-APPLIKATION

Zwar ist die BrdU-Methode ein etabliertes immunhistochemisches Verfahren zum Nachweis der Neubildung neuronaler Zellen¹¹⁵, jedoch gibt der Marker allein keinen Aufschluss über den Differenzierungsgrad von Neuronen. Aus diesem Grund wurden die Effekte von PEDF auf die neurogenen Zonen zusätzlich mit dem spezifischen Neuronenmarker DCX untersucht. DCX ist ein Phosphoprotein, das sich an die Mikrotubuli unreifer Neurone bindet und diese durch Bündelung stabilisiert⁶⁰. Im Gegensatz zu BrdU ist DCX ein spezifischer Marker für unreife, frühe neuronale Entwicklungsstufen und erweist sich daher für den relativ kurzzeitigen, achttägigen Versuchsaufbau dieser Arbeit als prädestiniert. Es ist belegt, dass DCX zwei Wochen nach Zell-Neubildung sein transientes Expressionsmaximum erreicht, hingegen nach vier Wochen im migrierenden, post-mitotischen reifen Neuron nicht mehr detektierbar ist^{60,223,352}. Die DCX-Expression korreliert mit dem Auftreten von unreifen Neuronen¹⁰⁰, die sich in einem Migrationsstadium befinden^{86,150}, und ist somit ein spezifischer Marker für Neurogenese. Über diese Eigenschaft hinaus ist das Protein auch in migrierenden Neuroblasten der adulten SVZ, den sog. Typ A Zellen, detektierbar.

In der vorliegenden Studie ließ die spezifische Detektion neuronaler Vorstufen in den Germinalzentren keine signifikanten PEDF-Effekte erkennen. Interessant ist, dass unter Anfärbung mit BrdU eine um mehrere Zehnerpotenzen höhere DNA-Syntheserate in der SVZ beobachtet wurde, als DCX-positive neuronale Vorläuferzellen gezählt wurden. Da sich die BrdU-positiven Zellen in der SVZ mit DCX nicht darstellen lassen, erscheint DCX folglich ungeeignet, die vielfach publizierten neurotrophen und neuroprotektiven Effekte (s.u.) von PEDF zu visualisieren. In der Wissenschaft ist weder am Traumamodell noch *in sano* eine Wirkung von PEDF auf das Phosphoprotein DCX bzw. DCX-positive unreife neuronale Vorläuferzellen beschrieben. Allerdings hat die Forschergruppe um Ramírez-Castillejo (2006)³⁴⁸ in der intakten SVZ von Mäusen *in vivo* einen PEDF-induzierten Anstieg PSA-NCAM-positiver Neuroblasten festgestellt. Man folgerte daraus, dass die erhöhte Proliferationsrate von Neuroblasten (A-Zellen) und Progenitoren (C-Zellen) entweder auf den direkten Einfluss von

PEDF auf diese Populationen zurückzuführen sein könnte oder aber auf die zuvor nachgewiesene, PEDF-abhängige Aktivierung des B-Zell-Pools, aus dem sie abstammen. Weitere Proliferationsstudien an A- und C-Zellen belegten, dass sich der direkte Einfluss von PEDF auf die B-Zellreihe beschränkt. Die Erklärung für diesen spezifischen Selbsterneuerungs-Effekt von PEDF fand Ramírez-Castillejo auf molekularer Ebene. *Per definitionem* gründen die einzigartigen Fähigkeiten von Stammzellen auf deren Multipotenz. In der Tat konnte in Stammzellkulturen gezeigt werden, dass PEDF durch die Regulation von differenzierungsbestimmenden Genen die neuronalen Vorläuferzellen in einem Zustand der Undifferenziertheit erhält: PEDF induziert zum einen über *Notch*-Rezeptoren die vermehrte Expression der Transkriptionsunterdrücker *Hes1* und *Hes5*, zum anderen bewirkt er die Hochregulation von HMG-box Transkriptionsfaktoren aus der SoxB-Genfamilie. Beide Signalwege führen zu einer verminderten Ausbildung proneuronaler *basic helix-loop-helix* (bHLH)-Proteine^{52,65,132,167,189,312,326}, wodurch konsekutiv die Differenzierung von Stammzellen inhibiert wird. Zwar wurde von diesen Forschern keine Färbereihe mit DCX durchgeführt, eine in Kultur vorgenommene Färbung mit dem neuronalen Marker TUJ1 jedoch ergab unter PEDF-Exposition einen signifikanten Anstieg β -Tubulin (TUJ1)-positiver Neuronen während der Proliferationsphase. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der „Undifferenzierungs-Effekt“ von PEDF die Zellen nicht von der Ausdifferenzierung abhält, sondern vielmehr das neurogene Potential der Zellkultur steigert³⁴⁸.

Ferner bekannt ist der differenzierungsfördernde Effekt von PEDF auf humane Y-79 Retinoblastomzellen^{424,425}. Um das neurotrophe Potential des Proteins auch an Neuronen nicht-retinaler Herkunft zu bestimmen, wurde PEDF Kulturen zerebellärer Granulazellen zugesetzt, wo es zwar deren Überleben nach Exposition gegenüber neurotoxischen Stimuli förderte^{28,414,415,454,455}, jedoch keine Auswirkungen auf die BrdU-Inkorporation (Zellproliferation) oder auf den Neurofilament-Gehalt (Neuritenaussprossung) zeigte⁴¹⁴. Ferner stimuliert PEDF zerebelläre Granulaneuronen zur gesteigerten Expression von weiteren neurotrophen Faktoren (z.B. NGF, NT-3 und *Glial Cell-derived Neurotrophic Factor* (GDNF)) und Zytokinen. Deren Produktion steht jedoch nicht in Zusammenhang mit dem neuroprotektiven Effekt von PEDF auf die zerebellären Granulazellen⁴⁵³.

Nachfolgende *in vitro*-Untersuchungen am Rückenmark von Küken belegten für PEDF (0,1 nM) sowohl einen Einfluss auf das Zellüberleben als auch auf die Länge der Neuriten¹⁹⁵. Auch für kultivierte Neuronen aus dem HC⁹⁶, Rückenmark (Motoneuronen)^{55,195} und der Retina⁶⁸ wurden neurotrophe und neuroprotektive Eigenschaften von PEDF konstatiert. PEDF-Spiegelbestimmungen bei M. Alzheimer (im Liquor)⁴⁵⁶ und am mit KA geschädigten Ratten-Cerebellum (PEDF-Sezernierung von GFAP-positiven reaktiven Astrozyten)³⁶⁷ ergaben eine

Überexpression von PEDF, welche als Teil eines Kompensationsmechanismus gegen neuronale Degeneration zu werten ist.

Damit ist wiederholt *in vitro* und vereinzelt auch *in vivo* der Beleg erbracht, dass PEDF neuroprotektiv wirkt. Nach unseren Ergebnissen zeigt PEDF nach SHT keinen signifikanten Effekt auf neuronale Progenitoren. Ob das Protein auch das traumatisierte Gehirn vor den Schädigungen durch Primär- und Sekundärinsulte wie z.B. der Exposition gegenüber oxidativem Stress oder Glutamat zu schützen vermag, bleibt mit anderen neuronalen Markern wie z.B. TUJ1 zu klären.

V.5 SCHLUSSFOLGERUNG

Die Effekte von PEDF auf das traumatisierte Rattengehirn entbehren im Gegensatz zu dem erfolgversprechenden Einsatz des Proteins *in vitro* noch fundierter wissenschaftlicher Erkenntnisse. Daraus erklärt sich der explorative Charakter dieser Arbeit, die mit ersten Resultaten am lebenden Organismus ein Anstoß für die weitere Erforschung der vielversprechenden therapeutischen Optionen von PEDF sein soll. Aufgrund dieser Überlegungen wurde von vorneherein eine überschaubare Anzahl an Versuchstieren als Untersuchungsgut gewählt (s. Tab. 10 in Kap. IV.1). Folgestudien sind nötig, um die vorliegenden Untersuchungsergebnisse anhand von repräsentativen Fallzahlen zu verifizieren bzw. falsifizieren.

Abschließend lassen sich die Ergebnisse der Studie wie folgt zusammenfassen: der statistisch signifikante Nachweis für PEDF-induzierte Effekte auf die Ausdehnung des Kontusionsareals und seine Zellproliferation sowie auf die Zellproliferation in den neurogenen Zonen bleibt für die Surrogatparameter BrdU und ED1 bzw. BrdU und DCX zu führen. Angesichts der hohen biologischen Varianz der Daten ist keine statistische Trennschärfe gegeben. Betrachtet man die überschaubare Datenmenge im Kontext bisher bekannter Auswirkungen von PEDF, sind dennoch gewisse Tendenzen zu beobachten:

- die Ausdehnung des Läsionsareals imponiert in allen Behandlungsgruppen annähernd identisch. Es fanden sich keinerlei Anzeichen für eine toxische Schädigung der PEDF-behandelten Tiere, was für eine gute Verträglichkeit der Methodik *per se* und somit für die potentielle Option einer klinischen Anwendbarkeit spricht.

- PEDF scheint die posttraumatische mikrogliale Entzündungsreaktion zu modulieren, indem er proliferationsfördernd auf die ED1-positiven Zellen im Zentrum des Kontusionsareals wirkt.
- Im Bereich der Kontusion ist für alle Versuchsgruppen eine gesteigerte Proliferationsrate BrdU-positiver Zellen zu konstatieren, ohne dass diese PEDF-vermittelt nachweislich verstärkt stimuliert werden konnte.
- Auch im HC induziert PEDF weder die Zellproliferation noch die Genese früher neuronaler Vorläuferzellen. Wie diskutiert steht hier die Frage im Raum, ob PEDF durch die intraventrikuläre Applikation nicht nur die an die inneren Liquorräume unmittelbar angrenzende SVZ, sondern auch die weiter entfernten Bestimmungsorte, nämlich die SGZ des hippocampalen DG und das Kontusionsareal, erreicht hat. Nicht auszuschließen ist auch, dass die Konz. und/oder Aktivität von PEDF durch die Interaktion mit bisher unbekannten Komponenten der speziellen Mikroumgebung moduliert wird/werden³⁴⁸.
- In der SVZ scheinen sich die Erkenntnisse von Ramírez-Castillejo et al.³⁴⁸ zu bestätigen, nach denen PEDF abhängig von seiner Konz. die Selbsterneuerung von Stammzellen induziert. Ausgehend von der Annahme einer proliferationsfördernden Wirkung von PEDF auf den Typ-B-Stammzell-Pool, könnte PEDF eine zentrale Rolle als Induktor der Neurogenese nach SHT zukommen. In diesem Fall gewinnt PEDF über seinen bisher in der Literatur mehrfach postulierten, potentiellen Stellenwert in der Behandlung von neurologischen, neurodegenerativen und carcinomatösen Erkrankungen hinaus an Bedeutung. Möglicherweise eröffnet die PEDF-induzierte Förderung der endogenen Stammzell-Aktivität für die Zukunft Optionen, das *Outcome* nach Schädel-Hirn-Verletzungen entscheidend zu verbessern.

Um die in der Hypothese formulierte neuroregenerative und neuroprotektive Wirkung von PEDF nach experimentellem SHT zu verifizieren, ist in Folgestudien eine Untersuchung des funktionellen *Outcomes* anzustreben. Beispielsweise wäre eine Ausdehnung der Projektphase auf vier oder acht Wochen ein geeigneter Verlaufsparemeter, um durch ergänzende posttraumatische Verhaltenstestungen wie z.B. *water maze*, *open field* oder *beam balance* die neurofunktionelle Entwicklung der Versuchstiere zu beobachten. Interessant wäre, ob sich in langfristig angelegten *Follow up*-Untersuchungen eine morphometrische Besserung zeigt. Dann können auch definitive Aussagen über eine PEDF-vermittelte funktionelle Neuroregeneration getroffen werden.

VI. ABSCHLUSSBETRACHTUNG: BEDEUTUNG DER PEDF- UND TRAUMA-FORSCHUNG FÜR DIE NEUROWISSENSCHAFTEN

Aus der Erkenntnis, dass im adulten Gehirn bis ins hohe Lebensalter kontinuierlich neue Nervenzellen generiert werden, erwächst die Hoffnung, durch eine Steigerung der spontanen Neurogenese künftig therapeutisch in den Progress neurodegenerativer Erkrankungen eingreifen zu können und komplexen zentralnervösen Schädigungen wie dem SHT therapeutisch begegnen zu können. Über den Einfluss, das Zusammenspiel und die Funktionalität endogener Reparaturmechanismen bei Schädelhirnverletzungen ist noch wenig bekannt. Umso bedeutungsvoller erscheint der Aspekt des Gewebeersatzes durch exogene Progenitoren. Damit gewinnt die Erforschung PEDF-vermittelter Effekte nach experimenteller Hirnrindenkontusion über seinen ideell wissenschaftlichen Wert hinaus an klinischer Relevanz. Aufbauend auf den Erkenntnissen über die PEDF-induzierte Stammzellerneuerung in der SVZ³⁴⁸ sind die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit vielversprechend, dass der Wachstumsfaktor PEDF auch am traumatisierten Rattengehirn als Milieu-begünstigendes Therapeutikum wirken könnte. Inwieweit die in der SVZ beobachtete Wirkung von PEDF einen Ansatz für künftige Therapieoptionen des SHT darstellt, ist noch nicht abzusehen. Zuvor bleibt zu klären, über welche/n Rezeptor/en und welche Signalwege PEDF seine Effekte am Gehirn vermittelt, welchen molekularen Kontrollmechanismen die PEDF-Expression unterliegt und welcher Stimuli es zu seiner Freisetzung unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen bedarf. Auch die Frage nach der optimalen PEDF-Applikation bleibt noch offen.

Wenngleich sich die gegenwärtige Datenlage über den therapeutischen Einsatz von PEDF auf Erkenntnisse aus Kulturversuchen oder an Tiermodellen beschränkt, sprechen die Studienergebnisse potentiell für einen Benefit der PEDF-Supplementierung an Patienten mit verschiedenen neurologischen Erkrankungen. Bis zum gegenwärtigen Forschungsstand wurde PEDF in unterschiedlichen Formen appliziert, wobei in keiner Studie jegliche Zeichen von PEDF-assoziiierter Toxizität oder Inflammation nachweisbar waren⁴²². Auch die Ergebnisse unserer Studie belegen keinerlei Toxizität für die Applikation von PEDF am traumatisierten Rattengehirn. Auf der Basis seiner Wirkungskraft, sowie mehrerer effektiver Applikationsmethoden und fehlender Toxizität hat PEDF das Potential in naher Zukunft ein wertvolles Medikament zur Behandlung verschiedenster chronischer und akuter zerebraler Erkrankungen zu werden.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

1. Fotografie des Schädelknochens einer Ratte. Website des Niedersächsischen Instituts für historische Küstenforschung (NIhK), Wilhelmshaven (www.nihk.de), in, 2006
2. National Institutes of Health Stem cells: a primer, in, 2000
3. Small Animal Stereotaxic Instrument. Website von David Kopf Instruments (www.kopfstruments.com) - unter Small Animal Stereotaxics for Rat & Mouse, in
4. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden. Sterbefälle bei Schädel- Hirntrauma durch Schädelfraktur (ICD 800- 804) und intrakranielle Verletzungen (ICD 850-854), in **Fachserie Gesundheitswesen**, 1992-1995, Vol 4
5. Statistisches Bundesamt: Krankenhausstatistik. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Bundesministerium für Gesundheit und soziale Sicherung (www.gbe-bund.de), in, 1999
6. Website von ALZET Osmotic Pumps (www.alzet.com) - unter Products, in
7. Abe K: Therapeutic potential of neurotrophic factors and neural stem cells against ischemic brain injury. **J Cereb Blood Flow Metab** **20**:1393-1408, 2000
8. Abe R, Shimizu T, Yamagishi S, Shibaki A, Amano S, Inagaki Y, et al: Overexpression of pigment epithelium-derived factor decreases angiogenesis and inhibits the growth of human malignant melanoma cells in vivo. **Am J Pathol** **164**:1225-1232, 2004
9. Aberg MA, Aberg ND, Hedbacker H, Oscarsson J, Eriksson PS: Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus. **J Neurosci** **20**:2896-2903, 2000
10. Abramson LP, Stellmach V, Doll JA, Cornwell M, Arensman RM, Crawford SE: Wilms' tumor growth is suppressed by antiangiogenic pigment epithelium-derived factor in a xenograft model. **J Pediatr Surg** **38**:336-342; discussion 336-342, 2003
11. Adachi Y, Reynolds PN, Yamamoto M, Wang M, Takayama K, Matsubara S, et al: A midkine promoter-based conditionally replicative adenovirus for treatment of pediatric solid tumors and bone marrow tumor purging. **Cancer Res** **61**:7882-7888, 2001
12. Adams H, Mitchell DE, Graham DI, Doyle D: Diffuse brain damage of immediate impact type. Its relationship to 'primary brain-stem damage' in head injury. **Brain** **100**:489-502, 1977
13. Adams JH: Head injury, in Adams JH, Corsellis JAN, Duchen LW (eds): **Greenfield's Neuropathology**, ed 4. London: Edward Arnold, 1984, pp 85-124
14. Alberdi E, Aymerich MS, Becerra SP: Binding of pigment epithelium-derived factor (PEDF) to retinoblastoma cells and cerebellar granule neurons. Evidence for a PEDF receptor. **J Biol Chem** **274**:31605-31612, 1999
15. Alberdi E, Hyde CC, Becerra SP: Pigment epithelium-derived factor (PEDF) binds to glycosaminoglycans: analysis of the binding site. **Biochemistry** **37**:10643-10652, 1998
16. Ali J, Kulshreshtha S, Khar RK: Novel Drug Delivery Systems. **Eastern Pharmacist** **41**:33-36, 1998
17. Alison MR, Poulsom R, Forbes S, Wright NA: An introduction to stem cells. **J Pathol** **197**:419-423, 2002
18. Altman J: Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. **J Comp Neurol** **137**:433-457, 1969
19. Altman J: Proliferation and migration of undifferentiated precursor cells in the rat during postnatal gliogenesis. **Exp Neurol** **16**:263-278, 1966
20. Altman J, Das GD: Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. **J Comp Neurol** **124**:319-335, 1965
21. Altman J, Das GD: Post-natal origin of microneurons in the rat brain. **Nature** **207**:953-956, 1965

22. Altman J, Das GD: Postnatal neurogenesis in the guinea-pig. **Nature** **214**:1098-1101, 1967
23. Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM: Neurogenesis in adult subventricular zone. **J Neurosci** **22**:629-634, 2002
24. Alvarez-Buylla A, Lim DA: For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. **Neuron** **41**:683-686, 2004
25. Alvarez-Buylla A, Nottebohm F: Migration of young neurons in adult avian brain. **Nature** **335**:353-354, 1988
26. Anderson TE: A controlled pneumatic technique for experimental spinal cord contusion. **J Neurosci Methods** **6**:327-333, 1982
27. Angelo LS, Kurzrock R: Vascular endothelial growth factor and its relationship to inflammatory mediators. **Clin Cancer Res** **13**:2825-2830, 2007
28. Araki T, Taniwaki T, Becerra SP, Chader GJ, Schwartz JP: Pigment epithelium-derived factor (PEDF) differentially protects immature but not mature cerebellar granule cells against apoptotic cell death. **J Neurosci Res** **53**:7-15, 1998
29. Arditi M, Manogue KR, Caplan M, Yogev R: Cerebrospinal fluid cachectin/tumor necrosis factor-alpha and platelet-activating factor concentrations and severity of bacterial meningitis in children. **J Infect Dis** **162**:139-147, 1990
30. Arsenijevic Y, Villemure JG, Brunet JF, Bloch JJ, Deglon N, Kostic C, et al: Isolation of multipotent neural precursors residing in the cortex of the adult human brain. **Exp Neurol** **170**:48-62, 2001
31. Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O: Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. **Nat Med** **8**:963-970, 2002
32. Aymerich MS, Alberdi EM, Martinez A, Becerra SP: Evidence for pigment epithelium-derived factor receptors in the neural retina. **Invest Ophthalmol Vis Sci** **42**:3287-3293, 2001
33. Baethmann A, Eriskat J, Stoffel M, Chapuis D, Wirth A, Plesnila N: Special aspects of severe head injury: recent developments. **Curr Opin Anaesthesiol** **11**:193-200, 1998
34. Baethmann A, Kempfski O: Biochemical factors and mechanisms of secondary brain damage in cerebral ischemia and trauma. Neurochemical correlates of cerebral ischemia, in Bazan NG, Braquet P, Ginsberg MD (eds): **Advances in Neurochemistry** **7**: Plenum Press New York, 1992
35. Baethmann A, Maier-Hauff K, Kempfski O, Unterberg A, Wahl M, Schurer L: Mediators of brain edema and secondary brain damage. **Crit Care Med** **16**:972-978, 1988
36. Baethmann A, Wirth A, Chapuis D, Schlesinger-Raab A: A system analysis of the pre- and early hospital care in severe head injury in Bavaria (Abstract). **Restor Neurol Neurosci** **16**:173, 2000
37. Banati RB, Gehrmann J, Schubert P, Kreutzberg GW: Cytotoxicity of microglia. **Glia** **7**:111-118, 1993
38. Barnea A, Nottebohm F: Recruitment and replacement of hippocampal neurons in young and adult chickadees: an addition to the theory of hippocampal learning. **Proc Natl Acad Sci U S A** **93**:714-718, 1996
39. Barnea A, Nottebohm F: Seasonal recruitment of hippocampal neurons in adult free-ranging black-capped chickadees. **Proc Natl Acad Sci U S A** **91**:11217-11221, 1994
40. Bayer SA: Changes in the total number of dentate granule cells in juvenile and adult rats: a correlated volumetric and 3H-thymidine autoradiographic study. **Exp Brain Res** **46**:315-323, 1982
41. Bayer SA, Yackel JW, Puri PS: Neurons in the rat dentate gyrus granular layer substantially increase during juvenile and adult life. **Science** **216**:890-892, 1982
42. Bayir H, Kagan VE, Borisenko GG, Tyurina YY, Janesko KL, Vagni VA, et al: Enhanced oxidative stress in iNOS-deficient mice after traumatic brain injury: support for a neuroprotective role of iNOS. **J Cereb Blood Flow Metab** **25**:673-684, 2005

43. Becerra SP: Structure-function studies on PEDF. A noninhibitory serpin with neurotrophic activity. **Adv Exp Med Biol** **425**:223-237, 1997
44. Becerra SP, Fariss RN, Wu YQ, Montuenga LM, Wong P, Pfeffer BA: Pigment epithelium-derived factor in the monkey retinal pigment epithelium and interphotoreceptor matrix: apical secretion and distribution. **Exp Eye Res** **78**:223-234, 2004
45. Becerra SP, Palmer I, Kumar A, Steele F, Shiloach J, Notario V, et al: Overexpression of fetal human pigment epithelium-derived factor in Escherichia coli. A functionally active neurotrophic factor. **J Biol Chem** **268**:23148-23156, 1993
46. Becerra SP, Sagasti A, Spinella P, Notario V: Pigment epithelium-derived factor behaves like a noninhibitory serpin. Neurotrophic activity does not require the serpin reactive loop. **J Biol Chem** **270**:25992-25999, 1995
47. Behling KC, Surace EM, Bennett J: Pigment epithelium-derived factor expression in the developing mouse eye. **Mol Vis** **8**:449-454, 2002
48. Berciano J, Lafarga M, Berciano M: Santiago Ramon y Cajal. **Neurologia** **16**:118-121, 2001
49. Bergsneider M, Hovda DA, Shalmon E, Kelly DF, Vespa PM, Martin NA, et al: Cerebral hyperglycolysis following severe traumatic brain injury in humans: a positron emission tomography study. **J Neurosurg** **86**:241-251, 1997
50. Berlucchi G: The origin of the term plasticity in the neurosciences: Ernesto Lugaro and chemical synaptic transmission. **J Hist Neurosci** **11**:305-309, 2002
51. Bernal-Sprekelsen M, Alobid I, Mullol J, Trobat F, Tomas-Barberan M: Closure of cerebrospinal fluid leaks prevents ascending bacterial meningitis. **Rhinology** **43**:277-281, 2005
52. Bertrand N, Castro DS, Guillemot F: Proneural genes and the specification of neural cell types. **Nat Rev Neurosci** **3**:517-530, 2002
53. Biebl M, Cooper CM, Winkler J, Kuhn HG: Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. **Neurosci Lett** **291**:17-20, 2000
54. Bilak MM, Becerra SP, Vincent AM, Moss BH, Aymerich MS, Kuncel RW: Identification of the neuroprotective molecular region of pigment epithelium-derived factor and its binding sites on motor neurons. **J Neurosci** **22**:9378-9386, 2002
55. Bilak MM, Corse AM, Bilak SR, Lehar M, Tombran-Tink J, Kuncel RW: Pigment epithelium-derived factor (PEDF) protects motor neurons from chronic glutamate-mediated neurodegeneration. **J Neuropathol Exp Neurol** **58**:719-728, 1999
56. Boje KM, Arora PK: Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. **Brain Res** **587**:250-256, 1992
57. Brawanski A: Die Fälle 1-8 des Papyrus Edwin Smith ("Schädelhirntraumafälle"), in Altenmüller H (ed): **Studien zur Altägyptischen Kultur**. Hamburg: Helmut Buske, 2001, Vol 29, pp 7-39
58. Breen EC: VEGF in biological control. **J Cell Biochem** **102**:1358-1367, 2007
59. Brihaye J, Frowein RA, Lindgren S: Report on the meeting of the W.F.N.S. Neuro-Traumatology Committee, Brussels, 19.-23. September 1976. **Acta Neurochir (Wien)** **40**:181-186, 1978
60. Brown JP, Couillard-Despres S, Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Aigner L, Kuhn HG: Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. **J Comp Neurol** **467**:1-10, 2003
61. Bruder SP, Fink DJ, Caplan AI: Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. **J Cell Biochem** **56**:283-294, 1994
62. Brustle O, McKay RD: Neuronal progenitors as tools for cell replacement in the nervous system. **Curr Opin Neurobiol** **6**:688-695, 1996

63. Bullock R, Mendelow AD, Teasdale GM, Graham DI: Intracranial haemorrhage induced at arterial pressure in the rat. Part 1: Description of technique, ICP changes and neuropathological findings. **Neurol Res** 6:184-188, 1984
64. Bullock R, Zauner A, Woodward JJ, Myseros J, Choi SC, Ward JD, et al: Factors affecting excitatory amino acid release following severe human head injury. **J Neurosurg** 89:507-518, 1998
65. Bylund M, Andersson E, Novitsch BG, Muhr J: Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity. **Nat Neurosci** 6:1162-1168, 2003
66. Cameron HA, Woolley CS, McEwen BS, Gould E: Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. **Neuroscience** 56:337-344, 1993
67. Cao Q, Benton RL, Whittemore SR: Stem cell repair of central nervous system injury. **J Neurosci Res** 68:501-510, 2002
68. Cao W, Tombran-Tink J, Chen W, Mrazek D, Elias R, McGinnis JF: Pigment epithelium-derived factor protects cultured retinal neurons against hydrogen peroxide-induced cell death. **J Neurosci Res** 57:789-800, 1999
69. Cao W, Tombran-Tink J, Elias R, Sezate S, Mrazek D, McGinnis JF: In vivo protection of photoreceptors from light damage by pigment epithelium-derived factor. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 42:1646-1652, 2001
70. Capela A, Temple S: LeX/ssea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells, identifying them as nonependymal. **Neuron** 35:865-875, 2002
71. Carrell NA, Fitzgerald LA, Steiner B, Erickson HP, Phillips DR: Structure of human platelet membrane glycoproteins IIb and IIIa as determined by electron microscopy. **J Biol Chem** 260:1743-1749, 1985
72. Cayouette M, Smith SB, Becerra SP, Gravel C: Pigment epithelium-derived factor delays the death of photoreceptors in mouse models of inherited retinal degenerations. **Neurobiol Dis** 6:523-532, 1999
73. Cecchi GA, Petreanu LT, Alvarez-Buylla A, Magnasco MO: Unsupervised learning and adaptation in a model of adult neurogenesis. **J Comput Neurosci** 11:175-182, 2001
74. Chen L, Yang P, Kijlstra A: Distribution, markers, and functions of retinal microglia. **Ocul Immunol Inflamm** 10:27-39, 2002
75. Chen S, Pickard JD, Harris NG: Time course of cellular pathology after controlled cortical impact injury. **Exp Neurol** 182:87-102, 2003
76. Chen SF, Richards HK, Smielewski P, Johnstrom P, Salvador R, Pickard JD, et al: Relationship between flow-metabolism uncoupling and evolving axonal injury after experimental traumatic brain injury. **J Cereb Blood Flow Metab** 24:1025-1036, 2004
77. Chesnut RM, Marshall LF, Klauber MR, Blunt BA, Baldwin N, Eisenberg HM, et al: The role of secondary brain injury in determining outcome from severe head injury. **J Trauma** 34:216-222, 1993
78. Choi DW: Ischemia-induced neuronal apoptosis. **Curr Opin Neurobiol** 6:667-672, 1996
79. Chong ZZ, Li F, Maiese K: Oxidative stress in the brain: novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease. **Prog Neurobiol** 75:207-246, 2005
80. Clark RS, Carcillo JA, Kochanek PM, Obrist WD, Jackson EK, Mi Z, et al: Cerebrospinal fluid adenosine concentration and uncoupling of cerebral blood flow and oxidative metabolism after severe head injury in humans. **Neurosurgery** 41:1284-1292; discussion 1292-1283, 1997
81. Clarke DL: Neural stem cells. **Bone Marrow Transplant** 32 Suppl 1:S13-17, 2003
82. Cohen J, Sugita Y, Chader GJ, Schwartz JP: Recombinant forms of the neurotrophic factor pigment epithelium-derived factor activate cellular metabolism and inhibit proliferation of the RAW macrophage cell line. **Neuroimmunomodulation** 7:51-58, 2000

83. Coljee VW, Rotenberg MO, Tresini M, Francis MK, Cristofalo VJ, Sell C: Regulation of EPC-1/PEDF in normal human fibroblasts is posttranscriptional. **J Cell Biochem** **79**:442-452, 2000
84. Conference NC: Rehabilitation of persons with traumatic brain injury. NIH Consensus Development Panel on rehabilitation of persons with traumatic brain injury. 1999
85. Coons AH, Kaplan MH: Localization of antigen in tissue cells: II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. **JEM** **91**:1-13, 1950
86. Corbo JC, Deuel TA, Long JM, LaPorte P, Tsai E, Wynshaw-Boris A, et al: Doublecortin is required in mice for lamination of the hippocampus but not the neocortex. **J Neurosci** **22**:7548-7557, 2002
87. Corotto FS, Henegar JA, Maruniak JA: Neurogenesis persists in the subependymal layer of the adult mouse brain. **Neurosci Lett** **149**:111-114, 1993
88. Craig CG, Tropepe V, Morshead CM, Reynolds BA, Weiss S, van der Kooy D: In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain. **J Neurosci** **16**:2649-2658, 1996
89. Crawford SE, Stellmach V, Ranalli M, Huang X, Huang L, Volpert O, et al: Pigment epithelium-derived factor (PEDF) in neuroblastoma: a multifunctional mediator of Schwann cell antitumor activity. **J Cell Sci** **114**:4421-4428, 2001
90. Cunningham AS, Salvador R, Coles JP, Chatfield DA, Bradley PG, Johnston AJ, et al: Physiological thresholds for irreversible tissue damage in contusional regions following traumatic brain injury. **Brain** **128**:1931-1942, 2005
91. Damoiseaux JG, Dopp EA, Calame W, Chao D, MacPherson GG, Dijkstra CD: Rat macrophage lysosomal membrane antigen recognized by monoclonal antibody ED1. **Immunology** **83**:140-147, 1994
92. Darian-Smith C, Gilbert CD: Axonal sprouting accompanies functional reorganization in adult cat striate cortex. **Nature** **368**:737-740, 1994
93. Davis AA, Temple S: A self-renewing multipotential stem cell in embryonic rat cerebral cortex. **Nature** **372**:263-266, 1994
94. Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, Crawford SE, Xu H, Benedict W, et al: Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. **Science** **285**:245-248, 1999
95. Dayer AG, Ford AA, Cleaver KM, Yassae M, Cameron HA: Short-term and long-term survival of new neurons in the rat dentate gyrus. **J Comp Neurol** **460**:563-572, 2003
96. DeCoster MA, Schabelman E, Tombran-Tink J, Bazan NG: Neuroprotection by pigment epithelial-derived factor against glutamate toxicity in developing primary hippocampal neurons. **J Neurosci Res** **56**:604-610, 1999
97. del Rio JA, Soriano E: Immunocytochemical detection of 5'-bromodeoxyuridine incorporation in the central nervous system of the mouse. **Brain Res Dev Brain Res** **49**:311-317, 1989
98. Denny-Brown D: Cerebral concussion. **Physiol Rev** **25**:296, 1945
99. Denny-Brown D, Russel WR: Experimental cerebral concussion. **Brain** **64**:93, 1945
100. des Portes V, Pinard JM, Billuart P, Vinet MC, Koulakoff A, Carrie A, et al: A novel CNS gene required for neuronal migration and involved in X-linked subcortical laminar heterotopia and lissencephaly syndrome. **Cell** **92**:51-61, 1998
101. DeWitt DS, Prough DS: Traumatic cerebral vascular injury: the effects of concussive brain injury on the cerebral vasculature. **J Neurotrauma** **20**:795-825, 2003
102. Diener HC: Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie, in, ed 3. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 2005
103. DiPaolo BR, Pignolo RJ, Cristofalo VJ: Identification of proteins differentially expressed in quiescent and proliferatively senescent fibroblast cultures. **Exp Cell Res** **220**:178-185, 1995

104. Diringer MN, Yundt K, Videen TO, Adams RE, Zazulia AR, Deibert E, et al: No reduction in cerebral metabolism as a result of early moderate hyperventilation following severe traumatic brain injury. **J Neurosurg** **92**:7-13, 2000
105. Distler JH, Hirth A, Kurowska-Stolarska M, Gay RE, Gay S, Distler O: Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. **Q J Nucl Med** **47**:149-161, 2003
106. Dixon CE, Clifton GL, Lighthall JW, Yaghmai AA, Hayes RL: A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat. **J Neurosci Methods** **39**:253-262, 1991
107. Dixon CE, Hayes RL: Fluid percussion and cortical impact models of traumatic brain injury, in Narayan RK, Wilberger JE, Povlishock JT (eds): **Neurotrauma**. New York: McGraw Hill, 1997, pp 1337-1346
108. Dixon CE, Kochanek PM, Yan HQ, Schiding JK, Griffith RG, Baum E, et al: One-year study of spatial memory performance, brain morphology, and cholinergic markers after moderate controlled cortical impact in rats. **J Neurotrauma** **16**:109-122, 1999
109. Dixon CE, Lyeth BG, Povlishock JT, Findling RL, Hamm RJ, Marmarou A, et al: A fluid percussion model of experimental brain injury in the rat. **J Neurosurg** **67**:110-119, 1987
110. Doetsch F: A niche for adult neural stem cells. **Curr Opin Genet Dev** **13**:543-550, 2003
111. Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A: Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. **Cell** **97**:703-716, 1999
112. Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A: Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. **J Neurosci** **17**:5046-5061, 1997
113. Dolbeare F: Bromodeoxyuridine: a diagnostic tool in biology and medicine, Part I: Historical perspectives, histochemical methods and cell kinetics. **Histochem J** **27**:339-369, 1995
114. Dolbeare F: Bromodeoxyuridine: a diagnostic tool in biology and medicine, Part II: Oncology, chemotherapy and carcinogenesis. **Histochem J** **27**:923-964, 1995
115. Dolbeare F: Bromodeoxyuridine: a diagnostic tool in biology and medicine, Part III. Proliferation in normal, injured and diseased tissue, growth factors, differentiation, DNA replication sites and in situ hybridization. **Histochem J** **28**:531-575, 1996
116. Doll JA, Stellmach VM, Bouck NP, Bergh AR, Lee C, Abramson LP, et al: Pigment epithelium-derived factor regulates the vasculature and mass of the prostate and pancreas. **Nat Med** **9**:774-780, 2003
117. Donovan DJ, Moquin RR, Ecklund JM: Cranial burr holes and emergency craniotomy: review of indications and technique. **Mil Med** **171**:12-19, 2006
118. Duffau H: Brain plasticity: from pathophysiological mechanisms to therapeutic applications. **J Clin Neurosci** **13**:885-897, 2006
119. Duh EJ, Yang HS, Suzuma I, Miyagi M, Youngman E, Mori K, et al: Pigment epithelium-derived factor suppresses ischemia-induced retinal neovascularization and VEGF-induced migration and growth. **Invest Ophthalmol Vis Sci** **43**:821-829, 2002
120. Dvorak HF: Angiogenesis: update 2005. **J Thromb Haemost** **3**:1835-1842, 2005
121. Eddleston M, Mucke L: Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease. **Neuroscience** **54**:15-36, 1993
122. Ek ET, Dass CR, Choong PF: PEDF: a potential molecular therapeutic target with multiple anti-cancer activities. **Trends Mol Med** **12**:497-502, 2006
123. Ekdahl CT, Kokaia Z, Lindvall O: Brain inflammation and adult neurogenesis: the dual role of microglia. **Neuroscience** **158**:1021-1029, 2009
124. El-Khodori BF, Oo TF, Kholodilov N, Burke RE: Ectopic expression of cell cycle markers in models of induced programmed cell death in dopamine neurons of the rat substantia nigra pars compacta. **Exp Neurol** **179**:17-27, 2003
125. Eldadah BA, Faden AI: Caspase pathways, neuronal apoptosis, and CNS injury. **J Neurotrauma** **17**:811-829, 2000

126. Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, et al: Neurogenesis in the adult human hippocampus. **Nat Med** 4:1313-1317, 1998
127. Eriskat J, Schurer L, Kempinski O, Baethmann A: Growth kinetics of a primary brain tissue necrosis from a focal lesion. **Acta Neurochir Suppl (Wien)** 60:425-427, 1994
128. Fabricius M, Fuhr S, Bhatia R, Boutelle M, Hashemi P, Strong AJ, et al: Cortical spreading depression and peri-infarct depolarization in acutely injured human cerebral cortex. **Brain** 129:778-790, 2006
129. Faden AI, Demediuk P, Panter SS, Vink R: The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury. **Science** 244:798-800, 1989
130. Fern R, Ransom BR, Waxman SG: Voltage-gated calcium channels in CNS white matter: role in anoxic injury. **J Neurophysiol** 74:369-377, 1995
131. Ferrara N: Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. **Semin Oncol** 29:10-14, 2002
132. Ferri AL, Cavallaro M, Braida D, Di Cristofano A, Canta A, Vezzani A, et al: Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain. **Development** 131:3805-3819, 2004
133. Filleur S, Nelius T, de Riese W, Kennedy RC: Characterization of PEDF: a multi-functional serpin family protein. **J Cell Biochem** 106:769-775, 2009
134. Florence AT: New Drug Delivery Systems. **Chemistry & Industry** 24:1000-1004, 1993
135. Floyd CL, Gorin FA, Lyeth BG: Mechanical strain injury increases intracellular sodium and reverses Na⁺/Ca²⁺ exchange in cortical astrocytes. **Glia** 51:35-46, 2005
136. Forbes ML, Clark RS, Dixon CE, Graham SH, Marion DW, DeKosky ST, et al: Augmented neuronal death in CA3 hippocampus following hyperventilation early after controlled cortical impact. **J Neurosurg** 88:549-556, 1998
137. Freeman AI, Mayhew E: Targeted drug delivery. **Cancer** 58:573-583, 1986
138. Frowein RA: Classification of coma. **Acta Neurochir (Wien)** 34:5-10, 1976
139. Frowein RA, Firsching R: Classification of head injury, in Vinken PJ, Bruyn GW (eds): **Handbook of Clinical Neurology**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1990, Vol 13, pp 101-122
140. Frowein RA, Karimi A, Nittner K: Verletzungen des Kopfes, in Zenker R, Deucher F, Schink W (eds): **Chirurgie der Gegenwart**. München, Wien: Urban & Schwarzenberg, 1977, pp 1-80
141. Gage FH: Mammalian neural stem cells. **Science** 287:1433-1438, 2000
142. Gage FH: Neurogenesis in the adult brain. **J Neurosci** 22:612-613, 2002
143. Gage FH, Coates PW, Palmer TD, Kuhn HG, Fisher LJ, Suhonen JO, et al: Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. **Proc Natl Acad Sci U S A** 92:11879-11883, 1995
144. Galli R, Gritti A, Bonfanti L, Vescovi AL: Neural stem cells: an overview. **Circ Res** 92:598-608, 2003
145. Garcia AD, Doan NB, Imura T, Bush TG, Sofroniew MV: GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. **Nat Neurosci** 7:1233-1241, 2004
146. Genis P, Jett M, Bernton EW, Boyle T, Gelbard HA, Dzenko K, et al: Cytokines and arachidonic metabolites produced during human immunodeficiency virus (HIV)-infected macrophage-astroglia interactions: implications for the neuropathogenesis of HIV disease. **J Exp Med** 176:1703-1718, 1992
147. Gennarelli TA, Champion HR, Copes WS, Sacco WJ: Comparison of mortality, morbidity, and severity of 59,713 head injured patients with 114,447 patients with extracranial injuries. **J Trauma** 37:962-968, 1994
148. Gilbert CD, Wiesel TN: Receptive field dynamics in adult primary visual cortex. **Nature** 356:150-152, 1992
149. Giulian D: Reactive glia as rivals in regulating neuronal survival. **Glia** 7:102-110, 1993

150. Gleeson JG, Lin PT, Flanagan LA, Walsh CA: Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. **Neuron** **23**:257-271, 1999
151. Glenn TC, Kelly DF, Boscardin WJ, McArthur DL, Vespa P, Oertel M, et al: Energy dysfunction as a predictor of outcome after moderate or severe head injury: indices of oxygen, glucose, and lactate metabolism. **J Cereb Blood Flow Metab** **23**:1239-1250, 2003
152. Glimaker M, Kragstjerg P, Forsgren M, Olcen P: Tumor necrosis factor-alpha (TNF alpha) in cerebrospinal fluid from patients with meningitis of different etiologies: high levels of TNF alpha indicate bacterial meningitis. **J Infect Dis** **167**:882-889, 1993
153. Goldman SA: Adult neurogenesis: from canaries to the clinic. **J Neurobiol** **36**:267-286, 1998
154. Goldman SA, Nottebohm F: Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. **Proc Natl Acad Sci U S A** **80**:2390-2394, 1983
155. Goliath R, Shugart Y, Janssens P, Weissenbach J, Beighton P, Ramasar R, et al: Fine localization of the locus for autosomal dominant retinitis pigmentosa on chromosome 17p. **Am J Hum Genet** **57**:962-964, 1995
156. Goodman JC, Cherian L, Bryan RM, Jr., Robertson CS: Lateral cortical impact injury in rats: pathologic effects of varying cortical compression and impact velocity. **J Neurotrauma** **11**:587-597, 1994
157. Gora-Kupilas K, Josko J: The neuroprotective function of vascular endothelial growth factor (VEGF). **Folia Neuropathol** **43**:31-39, 2005
158. Gould E: The effects of adrenal steroids and excitatory input on neuronal birth and survival. **Ann N Y Acad Sci** **743**:73-92; discussion 92-73, 1994
159. Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ: Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. **Nat Neurosci** **2**:260-265, 1999
160. Gould E, Cameron HA, Daniels DC, Woolley CS, McEwen BS: Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus. **J Neurosci** **12**:3642-3650, 1992
161. Gould E, Gross CG: Neurogenesis in adult mammals: some progress and problems. **J Neurosci** **22**:619-623, 2002
162. Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LA, Fuchs E: Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. **J Neurosci** **17**:2492-2498, 1997
163. Gould E, Reeves AJ, Fallah M, Tanapat P, Gross CG, Fuchs E: Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. **Proc Natl Acad Sci U S A** **96**:5263-5267, 1999
164. Gould E, Tanapat P, Hastings NB, Shors TJ: Neurogenesis in adulthood: a possible role in learning. **Trends Cogn Sci** **3**:186-192, 1999
165. Graham DI, Adams JH, Doyle D: Ischaemic brain damage in fatal non-missile head injuries. **J Neurol Sci** **39**:213-234, 1978
166. Graham DI, Ford I, Adams JH, Doyle D, Teasdale GM, Lawrence AE, et al: Ischaemic brain damage is still common in fatal non-missile head injury. **J Neurol Neurosurg Psychiatry** **52**:346-350, 1989
167. Graham V, Khudyakov J, Ellis P, Pevny L: SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. **Neuron** **39**:749-765, 2003
168. Gratzner HG: Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. **Science** **218**:474-475, 1982
169. Greenberg DA, Jin K: From angiogenesis to neuropathology. **Nature** **438**:954-959, 2005
170. Griscelli F, Li H, Cheong C, Opolon P, Bannaceur-Griscelli A, Vassal G, et al: Combined effects of radiotherapy and angiostatin gene therapy in glioma tumor model. **Proc Natl Acad Sci U S A** **97**:6698-6703, 2000

171. Guadagni F, Ferroni P, Palmirotta R, Portarena I, Formica V, Roselli M: Review. TNF/VEGF cross-talk in chronic inflammation-related cancer initiation and progression: an early target in anticancer therapeutic strategy. **In Vivo** **21**:147-161, 2007
172. Guan M, Jiang H, Xu C, Xu R, Chen Z, Lu Y: Adenovirus-mediated PEDF expression inhibits prostate cancer cell growth and results in augmented expression of PAI-2. **Cancer Biol Ther** **6**:419-425, 2007
173. Guan M, Pang CP, Yam HF, Cheung KF, Liu WW, Lu Y: Inhibition of glioma invasion by overexpression of pigment epithelium-derived factor. **Cancer Gene Ther** **11**:325-332, 2004
174. Guan M, Yam HF, Su B, Chan KP, Pang CP, Liu WW, et al: Loss of pigment epithelium derived factor expression in glioma progression. **J Clin Pathol** **56**:277-282, 2003
175. Guillemin GJ, Brew BJ: Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification. **J Leukoc Biol** **75**:388-397, 2004
176. Gupta YK, Gupta M: Post traumatic epilepsy: a review of scientific evidence. **Indian J Physiol Pharmacol** **50**:7-16, 2006
177. Gurdjian ES: Acute head injuries. **Surg Gynecol Obstet** **146**:805-820, 1978
178. Gurdjian ES, Lissner HR, Webster JE, Latimer FR, Haddad BF: Studies on experimental concussion: relation of physiologic effect to time duration of intracranial pressure increase at impact. **Neurology** **4**:674-681, 1954
179. Hall ED, Braughler JM: Free radicals in CNS injury. **Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis** **71**:81-105, 1993
180. Hall PA, Watt FM: Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. **Development** **106**:619-633, 1989
181. Hamm RJ, Dixon CE, Gbadebo DM, Singha AK, Jenkins LW, Lyeth BG, et al: Cognitive deficits following traumatic brain injury produced by controlled cortical impact. **J Neurotrauma** **9**:11-20, 1992
182. Hanisch UK: Microglia as a source and target of cytokines. **Glia** **40**:140-155, 2002
183. Hase R, Miyamoto M, Uehara H, Kadoya M, Ebihara Y, Murakami Y, et al: Pigment epithelium-derived factor gene therapy inhibits human pancreatic cancer in mice. **Clin Cancer Res** **11**:8737-8744, 2005
184. Hebb DO: **The organization of Behavior**. New York: John Wiley Sons Inc., 1949
185. Herzlinger D: Renal stem cells and the lineage of the nephron. **Annu Rev Physiol** **56**:671-689, 1994
186. Hinds JW: Autoradiographic study of histogenesis in the mouse olfactory bulb. I. Time of origin of neurons and neuroglia. **J Comp Neurol** **134**:287-304, 1968
187. Hinds JW: Autoradiographic study of histogenesis in the mouse olfactory bulb. II. Cell proliferation and migration. **J Comp Neurol** **134**:305-322, 1968
188. Hirsch MC: interBRAIN. Topographische Anatomie des ZNS des Menschen. Sonderausgabe der 1. Auflage von 1998, in: Study Edition Macintosh/Windows Basisversion 1.2, 2004
189. Hitoshi S, Alexson T, Tropepe V, Donoviel D, Elia AJ, Nye JS, et al: Notch pathway molecules are essential for the maintenance, but not the generation, of mammalian neural stem cells. **Genes Dev** **16**:846-858, 2002
190. Hjelmeland LM, Cristofalo VJ, Funk W, Rakoczy E, Katz ML: Senescence of the retinal pigment epithelium. **Mol Vis** **5**:33, 1999
191. Ho TC, Yang YC, Chen SL, Kuo PC, Sytwu HK, Cheng HC, et al: Pigment epithelium-derived factor induces THP-1 macrophage apoptosis and necrosis by the induction of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma. **Mol Immunol** **45**:898-909, 2008
192. Holmin S, Mathiesen T: Intracerebral administration of interleukin-1beta and induction of inflammation, apoptosis, and vasogenic edema. **J Neurosurg** **92**:108-120, 2000

193. Horner PJ, Power AE, Kempermann G, Kuhn HG, Palmer TD, Winkler J, et al: Proliferation and differentiation of progenitor cells throughout the intact adult rat spinal cord. **J Neurosci** **20**:2218-2228, 2000
194. Hosomichi J, Yasui N, Koide T, Soma K, Morita I: Involvement of the collagen I-binding motif in the anti-angiogenic activity of pigment epithelium-derived factor. **Biochem Biophys Res Commun** **335**:756-761, 2005
195. Houenou LJ, D'Costa AP, Li L, Turgeon VL, Enyadike C, Alberdi E, et al: Pigment epithelium-derived factor promotes the survival and differentiation of developing spinal motor neurons. **J Comp Neurol** **412**:506-514, 1999
196. Howard R: The Major Trauma Outcome Study: Establishing national norms for trauma care. **J Trauma** **30**:1356-1365, 1990
197. Hsu SM, Raine L: Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. **J Histochem Cytochem** **29**:1349-1353, 1981
198. Hutchings H, Maitre-Boube M, Tombran-Tink J, Plouet J: Pigment epithelium-derived factor exerts opposite effects on endothelial cells of different phenotypes. **Biochem Biophys Res Commun** **294**:764-769, 2002
199. Imura T, Kornblum HI, Sofroniew MV: The predominant neural stem cell isolated from postnatal and adult forebrain but not early embryonic forebrain expresses GFAP. **J Neurosci** **23**:2824-2832, 2003
200. Jablonski MM, Tombran-Tink J, Mrazek DA, Iannaccone A: Pigment epithelium-derived factor supports normal development of photoreceptor neurons and opsin expression after retinal pigment epithelium removal. **J Neurosci** **20**:7149-7157, 2000
201. James W: **The Principles of Psychology**. New York: Holt, 1890
202. Jantzen JP, Piek J: Leitlinien zur Primärversorgung von Patienten mit Schädel-Hirn-Trauma. **Anästhesiol Intensivmed**:89-93, 1997
203. Jiang W, Gu W, Brannstrom T, Rosqvist R, Wester P: Cortical neurogenesis in adult rats after transient middle cerebral artery occlusion. **Stroke** **32**:1201-1207, 2001
204. Jin K, Minami M, Lan JQ, Mao XO, Batteur S, Simon RP, et al: Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. **Proc Natl Acad Sci U S A** **98**:4710-4715, 2001
205. Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Greenberg DA: Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A** **99**:11946-11950, 2002
206. Johansson BB: Functional and cellular effects of environmental enrichment after experimental brain infarcts. **Restor Neurol Neurosci** **22**:163-174, 2004
207. Johansson BB: Regeneration and plasticity in the brain and spinal cord. **J Cereb Blood Flow Metab** **27**:1417-1430, 2007
208. Johansson CB: Mechanism of stem cells in the central nervous system. **J Cell Physiol** **196**:409-418, 2003
209. Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisen J: Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. **Cell** **96**:25-34, 1999
210. Johansson CB, Svensson M, Wallstedt L, Janson AM, Frisen J: Neural stem cells in the adult human brain. **Exp Cell Res** **253**:733-736, 1999
211. Johnston AJ, Steiner LA, Coles JP, Chatfield DA, Fryer TD, Smielewski P, et al: Effect of cerebral perfusion pressure augmentation on regional oxygenation and metabolism after head injury. **Crit Care Med** **33**:189-195; discussion 255-187, 2005
212. Jordan JD, Ma DK, Ming GL, Song H: Cellular niches for endogenous neural stem cells in the adult brain. **CNS Neurol Disord Drug Targets** **6**:336-341, 2007
213. Kaplan MS, Hinds JW: Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. **Science** **197**:1092-1094, 1977
214. Kaplan MS, McNelly NA, Hinds JW: Population dynamics of adult-formed granule neurons of the rat olfactory bulb. **J Comp Neurol** **239**:117-125, 1985

215. Karakousis PC, John SK, Behling KC, Surace EM, Smith JE, Hendrickson A, et al: Localization of pigment epithelium derived factor (PEDF) in developing and adult human ocular tissues. **Mol Vis** 7:154-163, 2001
216. Katz D, Alexander MP: Traumatic Brain Injury, in Good DC, Couch Jr. JR (eds): **Handbook of Neurorehabilitation**. New York, Basel, Hong Kong: Dekker, 1994, pp 493-549
217. Kearney PA, Ridella SA, Viano DC, Anderson TE: Interaction of contact velocity and cord compression in determining the severity of spinal cord injury. **J Neurotrauma** 5:187-208, 1988
218. Kempermann G: Aktivitätsabhängige Regulation von Neurogenese im erwachsenen Hippocampus. Habilitationsschrift zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach Experimentelle Neurologie vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin, in, 2002, p 13
219. Kempermann G: Why new neurons? Possible functions for adult hippocampal neurogenesis. **J Neurosci** 22:635-638, 2002
220. Kempermann G, Gage FH: Genetic determinants of adult hippocampal neurogenesis correlate with acquisition, but not probe trial performance, in the water maze task. **Eur J Neurosci** 16:129-136, 2002
221. Kempermann G, Gage FH: Genetic influence on phenotypic differentiation in adult hippocampal neurogenesis. **Brain Res Dev Brain Res** 134:1-12, 2002
222. Kempermann G, Gage FH: New nerve cells for the adult brain. **Sci Am** 280:48-53, 1999
223. Kempermann G, Gast D, Kronenberg G, Yamaguchi M, Gage FH: Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. **Development** 130:391-399, 2003
224. Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH: Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. **J Neurosci** 18:3206-3212, 1998
225. Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH: Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice. **Proc Natl Acad Sci U S A** 94:10409-10414, 1997
226. Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH: More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. **Nature** 386:493-495, 1997
227. Kempermann G, Kuhn HG, Winkler J, Gage FH: [New nerve cells for the adult brain. Adult neurogenesis and stem cell concepts in neurologic research]. **Nervenarzt** 69:851-857, 1998
228. Keyoung HM, Roy NS, Benraiss A, Louissaint A, Jr., Suzuki A, Hashimoto M, et al: High-yield selection and extraction of two promoter-defined phenotypes of neural stem cells from the fetal human brain. **Nat Biotechnol** 19:843-850, 2001
229. Kirsch M, Schackert G, Black PM: Anti-angiogenic treatment strategies for malignant brain tumors. **J Neurooncol** 50:149-163, 2000
230. Klatzo I, Piraux A, Laskowski EJ: The relationship between edema, blood-brain-barrier and tissue elements in a local brain injury. **J Neuropathol Exp Neurol** 17:548-564, 1958
231. Kneyber MC, Rinkel GJ, Ramos LM, Tulleken CA, Braun KP: Early posttraumatic subarachnoid hemorrhage due to dissecting aneurysms in three children. **Neurology** 65:1663-1665, 2005
232. Kochanek PM, Marion DW, Zhang W, Schiding JK, White M, Palmer AM, et al: Severe controlled cortical impact in rats: assessment of cerebral edema, blood flow, and contusion volume. **J Neurotrauma** 12:1015-1025, 1995
233. Kornack DR, Rakic P: Cell proliferation without neurogenesis in adult primate neocortex. **Science** 294:2127-2130, 2001
234. Kornack DR, Rakic P: Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. **Proc Natl Acad Sci U S A** 96:5768-5773, 1999

235. Kozaki K, Miyaishi O, Koiwai O, Yasui Y, Kashiwai A, Nishikawa Y, et al: Isolation, purification, and characterization of a collagen-associated serpin, caspin, produced by murine colon adenocarcinoma cells. **J Biol Chem** **273**:15125-15130, 1998
236. Kraus JF, McArthur DL, Silberman TA: Epidemiology of mild brain injury. **Semin Neurol** **14**:1-7, 1994
237. Kreutzberg GW: Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. **Trends Neurosci** **19**:312-318, 1996
238. Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH: Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. **J Neurosci** **16**:2027-2033, 1996
239. Kuhn HG, Winkler J, Kempermann G, Thal LJ, Gage FH: Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. **J Neurosci** **17**:5820-5829, 1997
240. Kukekov VG, Laywell ED, Suslov O, Davies K, Scheffler B, Thomas LB, et al: Multipotent stem/progenitor cells with similar properties arise from two neurogenic regions of adult human brain. **Exp Neurol** **156**:333-344, 1999
241. Kuncel RW, Bilak MM, Bilak SR, Corse AM, Royal W, Becerra SP: Pigment epithelium-derived factor is elevated in CSF of patients with amyotrophic lateral sclerosis. **J Neurochem** **81**:178-184, 2002
242. Lakatos A, Franklin RJ: Transplant mediated repair of the central nervous system: an imminent solution? **Curr Opin Neurol** **15**:701-705, 2002
243. Lanza RP, Cibelli JB, Blackwell C, Cristofalo VJ, Francis MK, Baerlocher GM, et al: Extension of cell life-span and telomere length in animals cloned from senescent somatic cells. **Science** **288**:665-669, 2000
244. Le Belle JE, Svendsen CN: Stem cells for neurodegenerative disorders: where can we go from here? **BioDrugs** **16**:389-401, 2002
245. Lee J, Seroogy KB, Mattson MP: Dietary restriction enhances neurotrophin expression and neurogenesis in the hippocampus of adult mice. **J Neurochem** **80**:539-547, 2002
246. Lee MK, Tuttle JB, Rebhun LI, Cleveland DW, Frankfurter A: The expression and posttranslational modification of a neuron-specific beta-tubulin isotype during chick embryogenesis. **Cell Motil Cytoskeleton** **17**:118-132, 1990
247. Lee SC, Liu W, Dickson DW, Brosnan CF, Berman JW: Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. Differential induction by lipopolysaccharide and IL-1 beta. **J Immunol** **150**:2659-2667, 1993
248. Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD: CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. **Cell** **60**:585-595, 1990
249. Leventhal C, Rafii S, Rafii D, Shahar A, Goldman SA: Endothelial trophic support of neuronal production and recruitment from the adult mammalian subependyma. **Mol Cell Neurosci** **13**:450-464, 1999
250. Lewen A, Matz P, Chan PH: Free radical pathways in CNS injury. **J Neurotrauma** **17**:871-890, 2000
251. Lie DC, Song H, Colamarino SA, Ming GL, Gage FH: Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases. **Annu Rev Pharmacol Toxicol** **44**:399-421, 2004
252. Lighthall JW: Controlled cortical impact: a new experimental brain injury model. **J Neurotrauma** **5**:1-15, 1988
253. Lindgren S, Rinder L: Experimental studies in head injury. I. Some factors influencing results of model experiments. **Biophysik** **2**:320-329, 1965
254. Ling EA, Penney D, Leblond CP: Use of carbon labeling to demonstrate the role of blood monocytes as precursors of the 'ameboid cells' present in the corpus callosum of postnatal rats. **J Comp Neurol** **193**:631-657, 1980

- 255. Liu B, Hong JS: Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention. **J Pharmacol Exp Ther** **304**:1-7, 2003
- 256. Liu H, Ren JG, Cooper WL, Hawkins CE, Cowan MR, Tong PY: Identification of the antivasopermeability effect of pigment epithelium-derived factor and its active site. **Proc Natl Acad Sci U S A** **101**:6605-6610, 2004
- 257. Liu J, Solway K, Messing RO, Sharp FR: Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. **J Neurosci** **18**:7768-7778, 1998
- 258. Lois C, Alvarez-Buylla A: Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. **Science** **264**:1145-1148, 1994
- 259. Lois C, Alvarez-Buylla A: Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. **Proc Natl Acad Sci U S A** **90**:2074-2077, 1993
- 260. Lois C, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A: Chain migration of neuronal precursors. **Science** **271**:978-981, 1996
- 261. Louissaint A, Jr., Rao S, Leventhal C, Goldman SA: Coordinated interaction of neurogenesis and angiogenesis in the adult songbird brain. **Neuron** **34**:945-960, 2002
- 262. Luber-Narod J, Rogers J: Immune system associated antigens expressed by cells of the human central nervous system. **Neurosci Lett** **94**:17-22, 1988
- 263. Lucas SM, Rothwell NJ, Gibson RM: The role of inflammation in CNS injury and disease. **Br J Pharmacol** **147 Suppl 1**:S232-240, 2006
- 264. Luskin MB, Parnavelas JG, Barfield JA: Neurons, astrocytes, and oligodendrocytes of the rat cerebral cortex originate from separate progenitor cells: an ultrastructural analysis of clonally related cells. **J Neurosci** **13**:1730-1750, 1993
- 265. Lyck L, Dalmau I, Chemnitz J, Finsen B, Schroder HD: Immunohistochemical markers for quantitative studies of neurons and glia in human neocortex. **J Histochem Cytochem** **56**:201-221, 2008
- 266. Ma HI, Lin SZ, Chiang YH, Li J, Chen SL, Tsao YP, et al: Intratumoral gene therapy of malignant brain tumor in a rat model with angiostatin delivered by adeno-associated viral (AAV) vector. **Gene Ther** **9**:2-11, 2002
- 267. Magavi SS, Leavitt BR, Macklis JD: Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. **Nature** **405**:951-955, 2000
- 268. Mahtabifard A, Merritt RE, Yamada RE, Crystal RG, Korst RJ: In vivo gene transfer of pigment epithelium-derived factor inhibits tumor growth in syngeneic murine models of thoracic malignancies. **J Thorac Cardiovasc Surg** **126**:28-38, 2003
- 269. Maik-Rachline G, Shaltiel S, Seger R: Extracellular phosphorylation converts pigment epithelium-derived factor from a neurotrophic to an antiangiogenic factor. **Blood** **105**:670-678, 2005
- 270. Mangiola A, Anile C, Di Chirico A, Maria G: Cerebrospinal fluid rhinorrhea: pathophysiological aspects and treatment. **Neurol Res** **25**:708-712, 2003
- 271. Markgraf CG, Clifton GL, Aguirre M, Chaney SF, Knox-Du Bois C, Kennon K, et al: Injury severity and sensitivity to treatment after controlled cortical impact in rats. **J Neurotrauma** **18**:175-186, 2001
- 272. Marmarou A, Fatouros PP, Barzo P, Portella G, Yoshihara M, Tsuji O, et al: Contribution of edema and cerebral blood volume to traumatic brain swelling in head-injured patients. **J Neurosurg** **93**:183-193, 2000
- 273. Marmarou A, Foda MA, van den Brink W, Campbell J, Kita H, Demetriadou K: A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics. **J Neurosurg** **80**:291-300, 1994
- 274. Marmarou A, Signoretti S, Fatouros PP, Portella G, Aygok GA, Bullock MR: Predominance of cellular edema in traumatic brain swelling in patients with severe head injuries. **J Neurosurg** **104**:720-730, 2006

275. Marshall LF: Head injury: recent past, present, and future. **Neurosurgery** 47:546-561, 2000
276. Marshall LF, Gattille T, Klauber MR, Eisenberg HM, Jane JA, Luerssen TG, et al: The outcome of severe closed head injury. **J Neurosurg** 75:28-36, 1991
277. Maslov AY, Barone TA, Plunkett RJ, Pruitt SC: Neural stem cell detection, characterization, and age-related changes in the subventricular zone of mice. **J Neurosci** 24:1726-1733, 2004
278. Masson F, Thicoipe M, Mokni T, Aye P, Erny P, Dabadie P: Epidemiology of traumatic comas: a prospective population-based study. **Brain Inj** 17:279-293, 2003
279. Matsumoto K, Ishikawa H, Nishimura D, Hamasaki K, Nakao K, Eguchi K: Antiangiogenic property of pigment epithelium-derived factor in hepatocellular carcinoma. **Hepatology** 40:252-259, 2004
280. Max W, MacKenzie EJ, Rice DP: Head injuries: costs and consequences. **J Head Trauma Rehabil** 6:76-91, 1991
281. Mayer-Proschel M, Kalyani AJ, Mujtaba T, Rao MS: Isolation of lineage-restricted neuronal precursors from multipotent neuroepithelial stem cells. **Neuron** 19:773-785, 1997
282. Mayer LD: Future developments in the selectivity of anticancer agents: drug delivery and molecular target strategies. **Cancer Metastasis Rev** 17:211-218, 1998
283. McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG: Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. **Neurology** 38:1285-1291, 1988
284. McIntosh TK: Neurochemical sequelae of traumatic brain injury: therapeutic implications. **Cerebrovasc Brain Metab Rev** 6:109-162, 1994
285. McIntosh TK, Noble L, Andrews B, Faden AI: Traumatic brain injury in the rat: characterization of a midline fluid-percussion model. **Cent Nerv Syst Trauma** 4:119-134, 1987
286. McIntosh TK, Smith DH, Meaney DF, Kotapka MJ, Gennarelli TA, Graham DI: Neuropathological sequelae of traumatic brain injury: relationship to neurochemical and biomechanical mechanisms. **Lab Invest** 74:315-342, 1996
287. McKay R: Stem cells in the central nervous system. **Science** 276:66-71, 1997
288. Meeker RB, Azuma Y, Bragg DC, English RV, Tompkins M: Microglial proliferation in cortical neural cultures exposed to feline immunodeficiency virus. **J Neuroimmunol** 101:15-26, 1999
289. Meyer C, Notari L, Becerra SP: Mapping the type I collagen-binding site on pigment epithelium-derived factor. Implications for its antiangiogenic activity. **J Biol Chem** 277:45400-45407, 2002
290. Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR: Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. **Science** 290:1779-1782, 2000
291. Miller JD, Becker DP: Secondary insults to the injured brain. **J R Coll Surg Edinb** 27:292-298, 1982
292. Miller JD, Bullock R, Graham DI, Chen MH, Teasdale GM: Ischemic brain damage in a model of acute subdural hematoma. **Neurosurgery** 27:433-439, 1990
293. Minambres E, Ballesteros MA, Mayorga M, Marin MJ, Munoz P, Figols J, et al: Cerebral apoptosis in severe traumatic brain injury patients: an in vitro, in vivo, and postmortem study. **J Neurotrauma** 25:581-591, 2008
294. Mori K, Duh E, Gehlbach P, Ando A, Takahashi K, Pearlman J, et al: Pigment epithelium-derived factor inhibits retinal and choroidal neovascularization. **J Cell Physiol** 188:253-263, 2001

295. Mori K, Gehlbach P, Yamamoto S, Duh E, Zack DJ, Li Q, et al: AAV-mediated gene transfer of pigment epithelium-derived factor inhibits choroidal neovascularization. **Invest Ophthalmol Vis Sci** **43**:1994-2000, 2002
296. Morshead CM, Craig CG, van der Kooy D: In vivo clonal analyses reveal the properties of endogenous neural stem cell proliferation in the adult mammalian forebrain. **Development** **125**:2251-2261, 1998
297. Murakami K, Kawase M, Kondo T, Chan PH: Cellular accumulation of extravasated serum protein and DNA fragmentation following vasogenic edema. **J Neurotrauma** **15**:825-835, 1998
298. Murphy M, Drago J, Bartlett PF: Fibroblast growth factor stimulates the proliferation and differentiation of neural precursor cells in vitro. **J Neurosci Res** **25**:463-475, 1990
299. Murray CJ, Lopez AD: Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. **Lancet** **349**:1498-1504, 1997
300. Nakagawa K, Chen YX, Ishibashi H, Yonemitsu Y, Murata T, Hata Y, et al: Angiogenesis and its regulation: roles of vascular endothelial cell growth factor. **Semin Thromb Hemost** **26**:61-66, 2000
301. Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, Yamamoto S, Hatano O, Kawahara N, et al: Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. **Cell** **110**:429-441, 2002
302. Nathoo N, Narotam PK, Agrawal DK, Connolly CA, van Dellen JR, Barnett GH, et al: Influence of apoptosis on neurological outcome following traumatic cerebral contusion. **J Neurosurg** **101**:233-240, 2004
303. Ninkovic J, Gotz M: Signaling in adult neurogenesis: from stem cell niche to neuronal networks. **Curr Opin Neurobiol** **17**:338-344, 2007
304. Norenberg MD: Astrocyte responses to CNS injury. **J Neuropathol Exp Neurol** **53**:213-220, 1994
305. Nortje J, Menon DK: Traumatic brain injury: physiology, mechanisms, and outcome. **Curr Opin Neurol** **17**:711-718, 2004
306. Nottebohm F: Why are some neurons replaced in adult brain? **J Neurosci** **22**:624-628, 2002
307. Obrenovitch TP, Urenjak J: Is high extracellular glutamate the key to excitotoxicity in traumatic brain injury? **J Neurotrauma** **14**:677-698, 1997
308. Ogata N, Tombran-Tink J, Nishikawa M, Nishimura T, Mitsuma Y, Sakamoto T, et al: Pigment epithelium-derived factor in the vitreous is low in diabetic retinopathy and high in rhegmatogenous retinal detachment. **Am J Ophthalmol** **132**:378-382, 2001
309. Ogata N, Wada M, Otsuji T, Jo N, Tombran-Tink J, Matsumura M: Expression of pigment epithelium-derived factor in normal adult rat eye and experimental choroidal neovascularization. **Invest Ophthalmol Vis Sci** **43**:1168-1175, 2002
310. Ogata N, Wang L, Jo N, Tombran-Tink J, Takahashi K, Mrazek D, et al: Pigment epithelium derived factor as a neuroprotective agent against ischemic retinal injury. **Curr Eye Res** **22**:245-252, 2001
311. Ohno-Matsui K, Morita I, Tombran-Tink J, Mrazek D, Onodera M, Uetama T, et al: Novel mechanism for age-related macular degeneration: an equilibrium shift between the angiogenesis factors VEGF and PEDF. **J Cell Physiol** **189**:323-333, 2001
312. Ohtsuka T, Sakamoto M, Guillemot F, Kageyama R: Roles of the basic helix-loop-helix genes Hes1 and Hes5 in expansion of neural stem cells of the developing brain. **J Biol Chem** **276**:30467-30474, 2001
313. Okano H: Stem cell biology of the central nervous system. **J Neurosci Res** **69**:698-707, 2002
314. Ommaya AK, Hirsch AE, Flamm ES, Mahone RH: Cerebral concussion in the monkey: an experimental model. **Science** **153**:211-212, 1966

315. Oppenheim RW: Cell death during development of the nervous system. **Annu Rev Neurosci** **14**:453-501, 1991
316. Ortego J, Escribano J, Becerra SP, Coca-Prados M: Gene expression of the neurotrophic pigment epithelium-derived factor in the human ciliary epithelium. Synthesis and secretion into the aqueous humor. **Invest Ophthalmol Vis Sci** **37**:2759-2767, 1996
317. Ostenfeld T, Svendsen CN: Recent advances in stem cell neurobiology. **Adv Tech Stand Neurosurg** **28**:3-89, 2003
318. Otori Y, Wei JY, Barnstable CJ: Neurotoxic effects of low doses of glutamate on purified rat retinal ganglion cells. **Invest Ophthalmol Vis Sci** **39**:972-981, 1998
319. Palmer TD, Ray J, Gage FH: FGF-2-responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of the adult rodent brain. **Mol Cell Neurosci** **6**:474-486, 1995
320. Palmer TD, Schwartz PH, Taupin P, Kaspar B, Stein SA, Gage FH: Cell culture. Progenitor cells from human brain after death. **Nature** **411**:42-43, 2001
321. Palmer TD, Takahashi J, Gage FH: The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. **Mol Cell Neurosci** **8**:389-404, 1997
322. Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH: Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. **J Comp Neurol** **425**:479-494, 2000
323. Palmieri D, Watson JM, Rinehart CA: Age-related expression of PEDF/EPC-1 in human endometrial stromal fibroblasts: implications for interactive senescence. **Exp Cell Res** **247**:142-147, 1999
324. Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS, Lowenstein DH: Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. **J Neurosci** **17**:3727-3738, 1997
325. Park CH, Choi SH, Piao Y, Kim S, Lee YJ, Kim HS, et al: Glutamate and aspartate impair memory retention and damage hypothalamic neurons in adult mice. **Toxicol Lett** **115**:117-125, 2000
326. Parras CM, Galli R, Britz O, Soares S, Galichet C, Battiste J, et al: Mash1 specifies neurons and oligodendrocytes in the postnatal brain. **Embo J** **23**:4495-4505, 2004
327. Pascual-Leone A, Amedi A, Fregni F, Merabet LB: The plastic human brain cortex. **Annu Rev Neurosci** **28**:377-401, 2005
328. Paxinos G, Watson C: **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**, ed 4. New York: Academic Press, 1998
329. Pellegrino LJ, Pellegrino AS, Cushman AJ: **A Stereotaxic Atlas of the Rat Brain**, ed 2, 1979
330. Petersen SV, Valnickova Z, Enghild JJ: Pigment-epithelium-derived factor (PEDF) occurs at a physiologically relevant concentration in human blood: purification and characterization. **Biochem J** **374**:199-206, 2003
331. Petreanu L, Alvarez-Buylla A: Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. **J Neurosci** **22**:6106-6113, 2002
332. Piek J, Chesnut RM, Marshall LF, van Berkum-Clark M, Klauber MR, Blunt BA, et al: Extracranial complications of severe head injury. **J Neurosurg** **77**:901-907, 1992
333. Pignolo RJ, Cristofalo VJ, Rotenberg MO: Senescent WI-38 cells fail to express EPC-1, a gene induced in young cells upon entry into the G0 state. **J Biol Chem** **268**:8949-8957, 1993
334. Pignolo RJ, Francis MK, Rotenberg MO, Cristofalo VJ: Putative role for EPC-1/PEDF in the G0 growth arrest of human diploid fibroblasts. **J Cell Physiol** **195**:12-20, 2003
335. Potts MB, Koh SE, Whetstone WD, Walker BA, Yoneyama T, Claus CP, et al: Traumatic injury to the immature brain: inflammation, oxidative injury, and iron-mediated damage as potential therapeutic targets. **NeuroRx** **3**:143-153, 2006
336. Povlishock JT: Pathophysiology of neural injury: therapeutic opportunities and challenges. **Clin Neurosurg** **46**:113-126, 2000

337. Povlishock JT, Christman CW: The pathobiology of traumatically induced axonal injury in animals and humans: a review of current thoughts. **J Neurotrauma** 12:555-564, 1995
338. Povlishock JT, Hayes RL, Michel ME, McIntosh TK: Workshop on animal models of traumatic brain injury. **J Neurotrauma** 11:723-732, 1994
339. Povlishock JT, Jenkins LW: Are the pathobiological changes evoked by traumatic brain injury immediate and irreversible? **Brain Pathol** 5:415-426, 1995
340. Proescholdt MA, Heiss JD, Walbridge S, Muhlhauser J, Capogrossi MC, Oldfield EH, et al: Vascular endothelial growth factor (VEGF) modulates vascular permeability and inflammation in rat brain. **J Neuropathol Exp Neurol** 58:613-627, 1999
341. Pumiglia K, Temple S: PEDF: bridging neurovascular interactions in the stem cell niche. **Nat Neurosci** 9:299-300, 2006
342. Raina AK, Takeda A, Smith MA: Mitotic neurons: a dogma succumbs. **Exp Neurol** 159:248-249, 1999
343. Raisler BJ, Berns KI, Grant MB, Beliaev D, Hauswirth WW: Adeno-associated virus type-2 expression of pigmented epithelium-derived factor or Kringles 1-3 of angiostatin reduce retinal neovascularization. **Proc Natl Acad Sci U S A** 99:8909-8914, 2002
344. Rakic P: Adult neurogenesis in mammals: an identity crisis. **J Neurosci** 22:614-618, 2002
345. Rakic P: Limits of neurogenesis in primates. **Science** 227:1054-1056, 1985
346. Rakic P: Neurogenesis in adult primate neocortex: an evaluation of the evidence. **Nat Rev Neurosci** 3:65-71, 2002
347. Rakic P: Neurons in rhesus monkey visual cortex: systematic relation between time of origin and eventual disposition. **Science** 183:425-427, 1974
348. Ramirez-Castillejo C, Sanchez-Sanchez F, Andreu-Agullo C, Ferron SR, Aroca-Aguilar JD, Sanchez P, et al: Pigment epithelium-derived factor is a niche signal for neural stem cell renewal. **Nat Neurosci** 9:331-339, 2006
349. Ramon y Cajal S: **Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados**. Madrid: Moya, 1904
350. Ramón y Cajal S: **Degeneration and Regeneration of the Nervous System (Translated by R. M. Day from the 1913 Spanish edition)**. London: Oxford University Press, 1928, Vol 1
351. Ramón y Cajal S: **Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertébrés**. Paris: Maloine Oxford University Press, 1909
352. Rao MS, Shetty AK: Efficacy of doublecortin as a marker to analyse the absolute number and dendritic growth of newly generated neurons in the adult dentate gyrus. **Eur J Neurosci** 19:234-246, 2004
353. Raymont V, Grafman J: Cognitive neural plasticity during learning and recovery from brain damage. **Prog Brain Res** 157:199-206, 2006
354. Recanzone GH, Merzenich MM, Jenkins WM: Frequency discrimination training engaging a restricted skin surface results in an emergence of a cutaneous response zone in cortical area 3a. **J Neurophysiol** 67:1057-1070, 1992
355. Reynolds BA, Weiss S: Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. **Science** 255:1707-1710, 1992
356. Ribatti D: The crucial role of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in angiogenesis: a historical review. **Br J Haematol** 128:303-309, 2005
357. Robertson CL, Bell MJ, Kochanek PM, Adelson PD, Ruppel RA, Carcillo JA, et al: Increased adenosine in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury in infants and children: association with severity of injury and excitotoxicity. **Crit Care Med** 29:2287-2293, 2001
358. Rocchi P, Ferreri AM, Simone G, Bagnara GP, Paolucci G: Neuronal cell differentiation of human neuroblastoma cells by inducing agents in combination. **Anticancer Res** 11:1885-1889, 1991

359. Rock RB, Gekker G, Hu S, Sheng WS, Cheeran M, Lokensgard JR, et al: Role of microglia in central nervous system infections. **Clin Microbiol Rev** 17:942-964, table of contents, 2004
360. Romeis B: **Mikroskopische Technik**, ed 17. München, Wien, Baltimore: Urban und Schwarzenberg, 1989
361. Rose JC, Neill TA, Hemphill JC, 3rd: Continuous monitoring of the microcirculation in neurocritical care: an update on brain tissue oxygenation. **Curr Opin Crit Care** 12:97-102, 2006
362. Rosenstein JM, Krum JM: New roles for VEGF in nervous tissue--beyond blood vessels. **Exp Neurol** 187:246-253, 2004
363. Rosenzweig MR: Environmental complexity, cerebral change, and behavior. **Am Psychol** 21:321-332, 1966
364. Rosenzweig MR, Krech D, Bennett EL, Diamond MC: Effects of environmental complexity and training on brain chemistry and anatomy: a replication and extension. **J Comp Physiol Psychol** 55:429-437, 1962
365. Ross DT, Meaney DF, Sabol MK, Smith DH, Gennarelli TA: Distribution of forebrain diffuse axonal injury following inertial closed head injury in miniature swine. **Exp Neurol** 126:291-299, 1994
366. Ross ME: Cell division and the nervous system: regulating the cycle from neural differentiation to death. **Trends Neurosci** 19:62-68, 1996
367. Sanagi T, Yabe T, Yamada H: Changes in pigment epithelium-derived factor expression following kainic acid induced cerebellar lesion in rat. **Neurosci Lett** 424:66-71, 2007
368. Sanagi T, Yabe T, Yamada H: The regulation of pro-inflammatory gene expression induced by pigment epithelium-derived factor in rat cultured microglial cells. **Neurosci Lett** 380:105-110, 2005
369. Sanchez-Ramos JR: Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood. **J Neurosci Res** 69:880-893, 2002
370. Schirmer M: **Neurochirurgie**, ed 10. München: Elsevier GmbH, 2005
371. Seitz RJ, Butefisch CM, Kleiser R, Homberg V: Reorganisation of cerebral circuits in human ischemic brain disease. **Restor Neurol Neurosci** 22:207-229, 2004
372. Seki T, Arai Y: Age-related production of new granule cells in the adult dentate gyrus. **Neuroreport** 6:2479-2482, 1995
373. Semkova I, Kreppel F, Welsandt G, Luther T, Kozlowski J, Janicki H, et al: Autologous transplantation of genetically modified iris pigment epithelial cells: a promising concept for the treatment of age-related macular degeneration and other disorders of the eye. **Proc Natl Acad Sci U S A** 99:13090-13095, 2002
374. Sendelbeck SL, Urquhart J: Spatial distribution of dopamine, methotrexate and antipyrine during continuous intracerebral microperfusion. **Brain Res** 328:251-258, 1985
375. Shao C, Roberts KN, Markesbery WR, Scheff SW, Lovell MA: Oxidative stress in head trauma in aging. **Free Radic Biol Med** 41:77-85, 2006
376. Shen Q, Goderie SK, Jin L, Karanth N, Sun Y, Abramova N, et al: Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. **Science** 304:1338-1340, 2004
377. Shihabuddin LS, Ray J, Gage FH: FGF-2 is sufficient to isolate progenitors found in the adult mammalian spinal cord. **Exp Neurol** 148:577-586, 1997
378. Shijubo N, Uede T, Kon S, Nagata M, Abe S: Vascular endothelial growth factor and osteopontin in tumor biology. **Crit Rev Oncog** 11:135-146, 2000
379. Shingo T, Sorokan ST, Shimazaki T, Weiss S: Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells. **J Neurosci** 21:9733-9743, 2001
380. Shors TJ, Beylin AV, Wood GE, Gould E: The modulation of Pavlovian memory. **Behav Brain Res** 110:39-52, 2000

381. Sigal SH, Brill S, Fiorino AS, Reid LM: The liver as a stem cell and lineage system. **Am J Physiol** **263**:G139-148, 1992
382. Simonovic M, Gettins PG, Volz K: Crystal structure of human PEDF, a potent anti-angiogenic and neurite growth-promoting factor. **Proc Natl Acad Sci U S A** **98**:11131-11135, 2001
383. Sinden JD, Stroemer P, Grigoryan G, Patel S, French SJ, Hodges H: Functional repair with neural stem cells. **Novartis Found Symp** **231**:270-283; discussion 283-278, 302-276, 2000
384. Skelley JP, Amidon GL, Barr WH, Benet LZ, Carter JE, Robinson JR, et al: Report of the workshop on in vitro and in vivo testing and correlation for oral controlled/modified-release dosage forms. **J Pharm Sci** **79**:849-854, 1990
385. Smith ML, Auer RN, Siesjo BK: The density and distribution of ischemic brain injury in the rat following 2-10 min of forebrain ischemia. **Acta Neuropathol** **64**:319-332, 1984
386. Snyder EY, Yoon C, Flax JD, Macklis JD: Multipotent neural precursors can differentiate toward replacement of neurons undergoing targeted apoptotic degeneration in adult mouse neocortex. **Proc Natl Acad Sci U S A** **94**:11663-11668, 1997
387. Soblosky JS, Matthews MA, Davidson JF, Tabor SL, Carey ME: Traumatic brain injury of the forelimb and hindlimb sensorimotor areas in the rat: physiological, histological and behavioral correlates. **Behav Brain Res** **79**:79-92, 1996
388. Soriano E, Del Rio JA: Simultaneous immunocytochemical visualization of bromodeoxyuridine and neural tissue antigens. **J Histochem Cytochem** **39**:255-263, 1991
389. Sosin DM, Sniezek JE, Waxweiler RJ: Trends in death associated with traumatic brain injury, 1979 through 1992. Success and failure. **Jama** **273**:1778-1780, 1995
390. Spencer DC, Price RW: Human immunodeficiency virus and the central nervous system. **Annu Rev Microbiol** **46**:655-693, 1992
391. Spengler F, Godde B, Dinse HR: Age related changes in receptive fields and cortical maps. **Neuroreport** **6**:469-473, 1995
392. Srour EF, Brandt JE, Briddell RA, Leemhuis T, van Besien K, Hoffman R: Human CD34+ HLA-DR- bone marrow cells contain progenitor cells capable of self-renewal, multilineage differentiation, and long-term in vitro hematopoiesis. **Blood Cells** **17**:287-295, 1991
393. Stallmeyer MJ, Morales RE, Flanders AE: Imaging of traumatic neurovascular injury. **Radiol Clin North Am** **44**:13-39, vii, 2006
394. Steele FR, Chader GJ, Johnson LV, Tombran-Tink J: Pigment epithelium-derived factor: neurotrophic activity and identification as a member of the serine protease inhibitor gene family. **Proc Natl Acad Sci U S A** **90**:1526-1530, 1993
395. Stellmach V, Crawford SE, Zhou W, Bouck N: Prevention of ischemia-induced retinopathy by the natural ocular antiangiogenic agent pigment epithelium-derived factor. **Proc Natl Acad Sci U S A** **98**:2593-2597, 2001
396. Stewart R, Przyborski S: Non-neural adult stem cells: tools for brain repair? **Bioessays** **24**:708-713, 2002
397. Stiefel MF, Tomita Y, Marmarou A: Secondary ischemia impairing the restoration of ion homeostasis following traumatic brain injury. **J Neurosurg** **103**:707-714, 2005
398. Stoll G, Jander S: The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. **Prog Neurobiol** **58**:233-247, 1999
399. Stoll G, Jander S, Schroeter M: Detrimental and beneficial effects of injury-induced inflammation and cytokine expression in the nervous system. **Adv Exp Med Biol** **513**:87-113, 2002
400. Stoll G, Jander S, Schroeter M: Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. **Prog Neurobiol** **56**:149-171, 1998

401. Storkebaum E, Lambrechts D, Carmeliet P: VEGF: once regarded as a specific angiogenic factor, now implicated in neuroprotection. **Bioessays** 26:943-954, 2004
402. Streit WJ, Kreutzberg GW: Lectin binding by resting and reactive microglia. **J Neurocytol** 16:249-260, 1987
403. Striebel HW: **Die Anästhesie**. Stuttgart: Schattauer, 2003
404. Sugita Y, Becerra SP, Chader GJ, Schwartz JP: Pigment epithelium-derived factor (PEDF) has direct effects on the metabolism and proliferation of microglia and indirect effects on astrocytes. **J Neurosci Res** 49:710-718, 1997
405. Sun FY, Guo X: Molecular and cellular mechanisms of neuroprotection by vascular endothelial growth factor. **J Neurosci Res** 79:180-184, 2005
406. Sutherland HJ, Eaves CJ, Eaves AC, Dragowska W, Lansdorp PM: Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis in vitro. **Blood** 74:1563-1570, 1989
407. Svendsen CN, Fawcett JW, Bentlage C, Dunnett SB: Increased survival of rat EGF-generated CNS precursor cells using B27 supplemented medium. **Exp Brain Res** 102:407-414, 1995
408. Takagi Y, Nozaki K, Takahashi J, Yodoi J, Ishikawa M, Hashimoto N: Proliferation of neuronal precursor cells in the dentate gyrus is accelerated after transient forebrain ischemia in mice. **Brain Res** 831:283-287, 1999
409. Takahashi H, Shibuya M: The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. **Clin Sci (Lond)** 109:227-241, 2005
410. Takahashi T, Nowakowski RS, Caviness VS, Jr.: BUdR as an S-phase marker for quantitative studies of cytokinetic behaviour in the murine cerebral ventricular zone. **J Neurocytol** 21:185-197, 1992
411. Takanohashi A, Yabe T, Schwartz JP: Pigment epithelium-derived factor induces the production of chemokines by rat microglia. **Glia** 51:266-278, 2005
412. Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM: Focal cerebral ischaemia in the rat: 2. Regional cerebral blood flow determined by [¹⁴C]iodoantipyrine autoradiography following middle cerebral artery occlusion. **J Cereb Blood Flow Metab** 1:61-69, 1981
413. Tanapat P, Hastings NB, Reeves AJ, Gould E: Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. **J Neurosci** 19:5792-5801, 1999
414. Taniwaki T, Becerra SP, Chader GJ, Schwartz JP: Pigment epithelium-derived factor is a survival factor for cerebellar granule cells in culture. **J Neurochem** 64:2509-2517, 1995
415. Taniwaki T, Hirashima N, Becerra SP, Chader GJ, Etcheberrigaray R, Schwartz JP: Pigment epithelium-derived factor protects cultured cerebellar granule cells against glutamate-induced neurotoxicity. **J Neurochem** 68:26-32, 1997
416. Taupin P: Adult neural stem cells, neurogenic niches, and cellular therapy. **Stem Cell Rev** 2:213-219, 2006
417. Tavazzi B, Signoretti S, Lazzarino G, Amorini AM, Delfini R, Cimatti M, et al: Cerebral oxidative stress and depression of energy metabolism correlate with severity of diffuse brain injury in rats. **Neurosurgery** 56:582-589; discussion 582-589, 2005
418. Teasdale G, Jennett B: Assessment and prognosis of coma after head injury. **Acta Neurochir (Wien)** 34:45-55, 1976
419. Temple S: The development of neural stem cells. **Nature** 414:112-117, 2001
420. Theeuwes F, Yum SI, Haak R, Wong P: Systems for triggered, pulsed, and programmed drug delivery. **Ann N Y Acad Sci** 618:428-440, 1991
421. Thomale UWN: Evaluation des tierexperimentellen Modells einer traumatischen kortikalen Kontusion für Therapiestudien. **Med Diss Humboldt-Universität Berlin**, 2001

422. Tombran-Tink J, Barnstable CJ: PEDF: a multifaceted neurotrophic factor. **Nat Rev Neurosci** 4:628-636, 2003
423. Tombran-Tink J, Barnstable CJ: Therapeutic prospects for PEDF: more than a promising angiogenesis inhibitor. **Trends Mol Med** 9:244-250, 2003
424. Tombran-Tink J, Chader GG, Johnson LV: PEDF: a pigment epithelium-derived factor with potent neuronal differentiative activity. **Exp Eye Res** 53:411-414, 1991
425. Tombran-Tink J, Johnson LV: Neuronal differentiation of retinoblastoma cells induced by medium conditioned by human RPE cells. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 30:1700-1707, 1989
426. Tombran-Tink J, Lara N, Apricio SE, Potluri P, Gee S, Ma JX, et al: Retinoic acid and dexamethasone regulate the expression of PEDF in retinal and endothelial cells. **Exp Eye Res** 78:945-955, 2004
427. Tombran-Tink J, Mazuruk K, Rodriguez IR, Chung D, Linker T, Englander E, et al: Organization, evolutionary conservation, expression and unusual Alu density of the human gene for pigment epithelium-derived factor, a unique neurotrophic serpin. **Mol Vis** 2:11, 1996
428. Tombran-Tink J, Pawar H, Swaroop A, Rodriguez I, Chader GJ: Localization of the gene for pigment epithelium-derived factor (PEDF) to chromosome 17p13.1 and expression in cultured human retinoblastoma cells. **Genomics** 19:266-272, 1994
429. Tombran-Tink J, Shivaram SM, Chader GJ, Johnson LV, Bok D: Expression, secretion, and age-related downregulation of pigment epithelium-derived factor, a serpin with neurotrophic activity. **J Neurosci** 15:4992-5003, 1995
430. Tönnis W, Loew F: Einteilung der gedeckten Hirnschädigungen. **Aerztl Praxis (München)** 5:13-14, 1953
431. Trepel M: **Neuroanatomie Struktur und Funktion**, ed 2. München, Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm: Urban & Fischer Verlag, 1999
432. Trepel M: **Neuroanatomie Struktur und Funktion**, ed 2. München, Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm: Urban & Fischer Verlag, 1999
433. Unterberg A, Polk T, Ellis E, Marmarou A: Enhancement of infusion-induced brain edema by mediator compounds. **Adv Neurol** 52:355-358, 1990
434. Unterberg AW, Stover J, Kress B, Kiening KL: Edema and brain trauma. **Neuroscience** 129:1021-1029, 2004
435. Uzan M, Erman H, Tanriverdi T, Sanus GZ, Kafadar A, Uzun H: Evaluation of apoptosis in cerebrospinal fluid of patients with severe head injury. **Acta Neurochir (Wien)** 148:1157-1164; discussion, 2006
436. van Praag H, Kempermann G, Gage FH: Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. **Nat Neurosci** 2:266-270, 1999
437. van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH: Functional neurogenesis in the adult hippocampus. **Nature** 415:1030-1034, 2002
438. Verweij BH, Muizelaar JP, Vinas FC, Peterson PL, Xiong Y, Lee CP: Impaired cerebral mitochondrial function after traumatic brain injury in humans. **J Neurosurg** 93:815-820, 2000
439. Waage A, Halstensen A, Espevik T: Association between tumour necrosis factor in serum and fatal outcome in patients with meningococcal disease. **Lancet** 1:355-357, 1987
440. Wang FH, Sun XD, Zhang X, Xu X, Zhu Q, Huang JN, et al: Role of pigment epithelium-derived factor on proliferation and migration of choroidal capillary endothelium induced by vascular endothelial growth factor in vitro. **Chin Med J (Engl)** 120:1534-1538, 2007
441. Wang L, Schmitz V, Perez-Mediavilla A, Izal I, Prieto J, Qian C: Suppression of angiogenesis and tumor growth by adenoviral-mediated gene transfer of pigment epithelium-derived factor. **Mol Ther** 8:72-79, 2003

442. Ward JM, Henneman JR, Osipova G, Anisimov VN: Persistence of 5-bromo-2'-deoxyuridine in tissues of rats after exposure in early life. **Toxicology** **70**:345-352, 1991
443. Weissman IL: Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. **Cell** **100**:157-168, 2000
444. Weissman IL: Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. **Science** **287**:1442-1446, 2000
445. Werner C, Engelhard K: Pathophysiology of traumatic brain injury. **Br J Anaesth** **99**:4-9, 2007
446. Wernig M, Benninger F, Schmandt T, Rade M, Tucker KL, Bussow H, et al: Functional integration of embryonic stem cell-derived neurons in vivo. **J Neurosci** **24**:5258-5268, 2004
447. Will B, Galani R, Kelche C, Rosenzweig MR: Recovery from brain injury in animals: relative efficacy of environmental enrichment, physical exercise or formal training (1990-2002). **Prog Neurobiol** **72**:167-182, 2004
448. Winner B, Cooper-Kuhn CM, Aigner R, Winkler J, Kuhn HG: Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat olfactory bulb. **Eur J Neurosci** **16**:1681-1689, 2002
449. Wood RL, Rutterford NA: Long-term effect of head trauma on intellectual abilities: a 16-year outcome study. **J Neurol Neurosurg Psychiatry** **77**:1180-1184, 2006
450. Wu HM, Huang SC, Hattori N, Glenn TC, Vespa PM, Yu CL, et al: Selective metabolic reduction in gray matter acutely following human traumatic brain injury. **J Neurotrauma** **21**:149-161, 2004
451. Wu YQ, Notario V, Chader GJ, Becerra SP: Identification of pigment epithelium-derived factor in the interphotoreceptor matrix of bovine eyes. **Protein Expr Purif** **6**:447-456, 1995
452. Xu X, Zhang SS, Barnstable CJ, Tombran-Tink J: Molecular phylogeny of the antiangiogenic and neurotrophic serpin, pigment epithelium derived factor in vertebrates. **BMC Genomics** **7**:248, 2006
453. Yabe T, Herbert JT, Takanohashi A, Schwartz JP: Treatment of cerebellar granule cell neurons with the neurotrophic factor pigment epithelium-derived factor in vitro enhances expression of other neurotrophic factors as well as cytokines and chemokines. **J Neurosci Res** **77**:642-652, 2004
454. Yabe T, Kanemitsu K, Sanagi T, Schwartz JP, Yamada H: Pigment epithelium-derived factor induces pro-survival genes through cyclic AMP-responsive element binding protein and nuclear factor kappa B activation in rat cultured cerebellar granule cells: Implication for its neuroprotective effect. **Neuroscience** **133**:691-700, 2005
455. Yabe T, Wilson D, Schwartz JP: NFkappaB activation is required for the neuroprotective effects of pigment epithelium-derived factor (PEDF) on cerebellar granule neurons. **J Biol Chem** **276**:43313-43319, 2001
456. Yamagishi S, Inagaki Y, Takeuchi M, Sasaki N: Is pigment epithelium-derived factor level in cerebrospinal fluid a promising biomarker for early diagnosis of Alzheimer's disease? **Med Hypotheses** **63**:115-117, 2004
457. Yamagishi S, Kikuchi S, Nakamura K, Matsui T, Takeuchi M, Inoue H: Pigment epithelium-derived factor (PEDF) blocks angiotensin II-induced T cell proliferation by suppressing autocrine production of interleukin-2. **Med Chem** **2**:265-269, 2006
458. Yamagishi S, Matsui T, Nakamura K, Imaizumi T: Pigment epithelium-derived factor (PEDF) inhibits angiotensin II-induced smooth muscle cell proliferation through its anti-oxidative properties. **Protein Pept Lett** **14**:615-617, 2007
459. Yamagishi S, Nakamura K, Ueda S, Kato S, Imaizumi T: Pigment epithelium-derived factor (PEDF) blocks angiotensin II signaling in endothelial cells via suppression of NADPH oxidase: a novel anti-oxidative mechanism of PEDF. **Cell Tissue Res** **320**:437-445, 2005

460. Yasuhara T, Shingo T, Date I: The potential role of vascular endothelial growth factor in the central nervous system. **Rev Neurosci** **15**:293-307, 2004
461. Yi JH, Hazell AS: Excitotoxic mechanisms and the role of astrocytic glutamate transporters in traumatic brain injury. **Neurochem Int** **48**:394-403, 2006
462. Yoshida Y, Yamagishi S, Matsui T, Nakamura K, Imaizumi T, Yoshimura K, et al: Increased levels of pigment epithelium-derived factor in aqueous humor of patients with uveitis. **Br J Ophthalmol** **91**:149-150, 2007
463. Zachary I: Neuroprotective role of vascular endothelial growth factor: signalling mechanisms, biological function, and therapeutic potential. **Neurosignals** **14**:207-221, 2005
464. Zamiri P, Masli S, Streilein JW, Taylor AW: Pigment epithelial growth factor suppresses inflammation by modulating macrophage activation. **Invest Ophthalmol Vis Sci** **47**:3912-3918, 2006
465. Zhang SX, Wang JJ, Gao G, Shao C, Mott R, Ma JX: Pigment epithelium-derived factor (PEDF) is an endogenous antiinflammatory factor. **Faseb J** **20**:323-325, 2006
466. Zhang Z, Artelt M, Burnet M, Trautmann K, Schluesener HJ: Early infiltration of CD8+ macrophages/microglia to lesions of rat traumatic brain injury. **Neuroscience** **141**:637-644, 2006
467. Zigova T, Pencea V, Wiegand SJ, Luskin MB: Intraventricular administration of BDNF increases the number of newly generated neurons in the adult olfactory bulb. **Mol Cell Neurosci** **11**:234-245, 1998

VIII. ANLAGEN

VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

| | |
|---------------|----------------------------------------------|
| ABC | Avidin-Biotin-Komplex |
| Abb. | Abbildung |
| (a)CSF | (artifizieller) zerebrospinaler Liquor |
| Ag | Antigen |
| AIS | <i>Abbreviated Injury Scale</i> |
| Ak | Antikörper |
| AMD | Altersabhängige Makuladegeneration |
| AngII | Angiotensin II |
| AS | Aminosäure/-n |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BBB | Bluthirnschranke |
| BDNF | <i>Brain-derived Neurotrophic Factor</i> |
| bFGF | <i>basic Fibroblast Growth Factor</i> |
| bHLH-Proteine | <i>basic helix-loop-helix</i> -Proteine |
| BrdU | 5'-Bromo-2'-desoxyuridin |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| CB | Cerebellum |
| CBF | zerebraler Blutfluss |
| CBV | zerebrales Blutvolumen |
| CC | Corpus callosum |
| CCII | <i>Controlled cortical impact injury</i> |
| CD68 | <i>Cluster of Differentiation 68</i> |
| CK2 | Kaseinkinase 2 |
| CNTF | <i>Ciliary Neurotrophic Factor</i> |
| CPP | zerebraler Perfusionsdruck |
| CPS | Kryoprotektionslösung |
| CREB protein | <i>cAMP response element binding</i> Protein |
| CV | Kresylviolett |
| CVR | zerebrovaskulärer Widerstand |
| DAB | 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid |

| | |
|--------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| DAI | diffuser axonaler Schaden |
| DCX | <i>Doublecortin</i> |
| (d)dH ₂ O | Aqua (bi-)destillata |
| DG | Gyrus dentatus |
| DGNC | Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie |
| dk (α gt-bt/ α ms-bt) | Esel (anti Ziege-biotinyliert/anti Maus-biotinyliert) |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| ED1 | Ectodysplasin A |
| EGF | <i>Epidermal Growth Factor</i> |
| ESF | endometriale Stromafibroblasten |
| FGF-2 | <i>Fibroblast Growth Factor 2</i> |
| GCS | Glasgow-Komaskala |
| GDNF | <i>Glial Cell-derived Neurotrophic Factor</i> |
| GFAP | <i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i> |
| GM-CSF | <i>Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor</i> |
| gt (α DCX) | Ziege (anti DCX) |
| G0-Phase | Ruhephase im Zellzyklus |
| HCl | Chlorwasserstoff |
| H ₂ O ₂ | Wasserstoffperoxid |
| HRP | Meerrettichperoxidase |
| IBRAB | <i>indirect bridged avidin-biotin technique</i> |
| ICAM-1 | <i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i> |
| ICB | intrakranielle Blutung |
| iCON | intakte Kontrolle |
| ICP | intrakranieller Druck |
| IGF-1 | <i>Insuline-like Growth Factor 1</i> |
| IgG | Immunglobulin G |
| i.p. | intraperitoneal |
| IQR | Interquartilsabstand (bei <i>Box-Whisker-Plots</i>) |
| ISS | <i>Injury Severity Score</i> |
| KA | Kainsäure |
| KG | Körpergewicht |
| Konz. | Konzentration |
| LCA | <i>Leukocyte Common Antigen</i> |
| LFA-1 | <i>Leukocyte Function Antigen 1</i> |

| | |
|-----------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| Lsg. | Lösung |
| LV | lateraler Ventrikel |
| Lx | Läsion |
| M | Mittelwert |
| M. | Morbus |
| MAP | mittlerer arterieller Druck |
| MAPK | Mitogen-aktivierte Protein-Kinase |
| MDM | <i>Monocyte-derived Macrophage</i> |
| MHC | <i>Major Histocompatibility Complex</i> |
| MIP | <i>Macrophage Inflammatory Protein</i> |
| mmHg | Millimeter Quecksilbersäule |
| MPS | mononukleäres Phagozytensystem |
| (m)RNA | (<i>messenger</i>) Ribonukleinsäure |
| ms (α BrdU/ED1) | Maus (anti BrdU/ED1) |
| n | Stichprobenzahl |
| Na ⁺ /K ⁺ -ATPase | Natrium-Kalium-Adenosintriphosphatase |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NGF | <i>Nerve Growth Factor</i> |
| NPCs | Neuronale Progenitorzellen |
| NT-3 | Neurotrophin 3 |
| O ₂ | Sauerstoff |
| OB | Bulbus olfactorius |
| p(a)CO ₂ | (arterieller) Kohlendioxid-Partialdruck |
| PB | Phosphatpuffer |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PKA | Proteinkinase A |
| PPARgamma | <i>Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma</i> |
| PSA-NCAM | <i>Polysialylated Neural Cell Adhesion Molecule</i> |
| PtO ₂ | <i>tissue partial pressure of oxygen</i> |
| RCL | <i>Reactive Centre Loop</i> |
| RMS | Rostraler Migratorischer Strom/Rostraler Migrationstrakt |
| RPE | retinales Pigmentepithel |
| (r)PEDF (5/10) | (rekombinanter) <i>Pigment Epithelium Derived Factor</i> (5 µg/ml/10 µg/ml) |
| RPT | <i>Rounded Phagozytic Type</i> |
| RRT | <i>Resting Ramified Type</i> |

| | |
|------------------|-------------------------------------------|
| RTS | <i>Revised Trauma Score</i> |
| SAB | Subarachnoidalblutung |
| SaO ₂ | arterielle Sauerstoffsättigung |
| SBP | systemischer Blutdruck |
| s.c. | subkutan |
| SDB | Subduralblutung |
| SERPINE | Serin-Protease-Inhibitoren |
| SGZ | Subgranulärzone |
| SHT | Schädelhirntrauma |
| S-Phase | DNA-Synthese-Phase im Zellzyklus |
| STD | Standardabweichung |
| SVZ | Subventrikulärzone |
| Tab. | Tabelle |
| TBS | <i>Tris Buffered Saline</i> |
| TCDB | <i>Traumatic Coma Data Bank</i> |
| TGF- α | <i>Transforming Growth Factor alpha</i> |
| TNF | Tumor-Nekrose-Faktor |
| TRISS | <i>Trauma Injury Severity Score</i> |
| VEGF | <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> |
| ZNS | Zentrales Nervensystem |

DANKSAGUNG

Abschließend richte ich meinen herzlichen Dank an all diejenigen, die durch ihr Mitwirken maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ganz besonders, und daher an erster Stelle danke ich *Herrn Prof. Dr. Alexander Brawanski*, der die Durchführung der tierexperimentellen Dissertation in den Forschungslabors seiner Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie am Universitätsklinikum Regensburg ermöglicht hat, ihren Fortgang aufmerksam begleitet hat und mir als Mentor stets zur Seite stand. Dem *Forschungsleiter Herrn Dr. Martin Proescholdt* gilt mein tiefer Dank für seine Offenheit und Bereitschaft, diese Arbeit zu betreuen und korrekturzulesen. Ich habe von seinen umfassenden wissenschaftlichen Kenntnissen und Erfahrungen sowie seiner Art, wissenschaftlich zu arbeiten und schwierige Probleme zu lösen, viel lernen können. Seine sachliche, konstruktive und zugleich freundliche Kritik haben mich immer wieder beeindruckt und motiviert. Seine differenzierte und aufmerksame Anleitung hat nachhaltig sowohl diese Arbeit als auch meinen Werdegang geformt. *Frau Dr. rer. nat. Ana-Luisa Piña* danke ich für die Überlassung des Themas und die anfängliche Mitbetreuung.

Frau Eva-Maria Störr hat meine Arbeit während des gesamten Entstehungsprozesses als MTA und auch menschlich in umfassender Weise unterstützt. Sie brachte mir die Grundlagen wissenschaftlichen Arbeitens nahe und stand mir durch ihre kritische, fachliche Anleitung bei der Durchführung der Versuchsreihe und der Ausführung des operativen Teils dieser Studie mit Rat und Tat zur Seite. Ihre Kompetenz, ihre stete, schnelle, unkomplizierte Hilfsbereitschaft und die freundliche Zusammenarbeit schätze ich sehr. Sie verstand es, bei mir die Begeisterung und das Engagement für die wissenschaftliche Tätigkeit zu wecken. Außerordentlich wertvoll waren mir auch ihr permanenter Rückhalt in allen Fragen, die im Verlauf der Dissertations-Irrungen und –Wirrungen schwer lösbar schienen, und die unmittelbare und detaillierte Korrektur der versuchstheoretischen Inhalte dieser Arbeit. Sie war stets der zentrale und zuverlässigste Anlaufpunkt. Hierfür danke ich ihr von Herzen. Im Rahmen der praktischen Umsetzung bedanke ich mich ferner bei den Tierpflegern für ihre bereitwillige Kooperation und bei dem gesamten Laborteam der Neurochirurgie und Neurologie für die freundliche und angenehme Arbeitsatmosphäre, die mir das Vorankommen sehr erleichtert haben. Nicht zu vergessen gilt mein Dank den 40 Versuchstieren, die diese Studie und die Erkenntnisse für die Wissenschaft erst ermöglicht haben.

Frau Dr. Sylvia Bele hat sich mit großer Eigeninitiative vor der Ethikkommission für die tierexperimentelle Studie stark gemacht, so dass der Ethikantrag angenommen und die rechtliche

Grundlage für die Arbeit geschaffen wurde. Ich danke ihr vielfach für ihre tatkräftige Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Jörg Marienhagen danke ich für die kritische Beurteilung der statistischen Auswertung meiner Versuchsergebnisse. Als Dozent der Biometrie führte er mich mit bemerkenswertem Sachverstand durch die Tiefen der Statistik und scheute weder Zeit noch Mühen, meine vielen Fragen erschöpfend zu beantworten. Für seine selbstlose Hilfsbereitschaft bin ich ihm sehr verbunden.

Letzten Endes, aber an allererster Stelle danke ich meinen lieben Eltern, *Annemarie und Konrad Bründl*, die mir mit ihrem Verständnis, ihrer Geduld und der ständigen selbstlosen Unterstützung weit mehr als eine umfassende Ausbildung ermöglicht haben. Euch sei diese Arbeit gewidmet. Euch, meinem großen Bruder *PD Dr. Jürgen Bründl* sowie seiner Frau *Prof. Dr. Sabine Schneider* sage ich von Herzen:

Danke für Eure immerwährende Begleitung und Bestärkung in dem, was ich tue!

CURRICULUM VITAE

Elisabeth Maria Bründl

PERSÖNLICHE DATEN

| | |
|--------------------|----------------------|
| Geburtsdatum/-ort: | 07.01.1982 in Passau |
| Nationalität: | deutsch |
| Familienstand: | ledig |
| Konfession: | römisch-katholisch |

BILDUNGSWEGSCHULISCHE BILDUNG:

| | |
|-----------|-------------------------------|
| 1987-1991 | Grundschule Neukirchen/Inn |
| 1991-2001 | Maristengymnasium Fürstenzell |
| 05/2001 | Allgemeine Hochschulreife |

AKADEMISCHE BILDUNG:

| | |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 10/2001 – 02/2008 | Studium der Humanmedizin, Universität Regensburg |
| 03/2004 | Ärztliche Vorprüfung |
| 02/2007 – 02/2008 | Praktisches Jahr |
| | 1. PJ-Tertial: Innere Medizin, Universitätsklinikum Regensburg, Prof. Dr. G. Riegger und Prof. Dr. J. Schölmerich |
| | 2. PJ-Tertial: Chirurgie, Universitätsspital Zürich, Prof. Dr. O. Trentz |
| | 3. PJ-Tertial: Neurochirurgie, Universitätsklinikum Regensburg, Prof. Dr. A. Brawanski |
| 10-11/2008 | Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung |

BERUFLICHER WERDEGANG

| | |
|--------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| seit 12/2008 | Assistenzärztin in der Neurochirurgie, Universitätsklinikum Regensburg, Prof. Dr. A. Brawanski |
|--------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|

WISSENSCHAFTLICHE TÄTIGKEITENTUTORTÄTIGKEIT:

| | |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| WS 2003/2004 | Hilfswissenschaftlerin für den Präparierkurs am Institut für Makroskopische Anatomie, Vorklinikum Regensburg |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

DISSERTATION:

| | |
|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2004 – 2009 | „Die <i>in vivo</i> -Effekte von „Pigment Epithelium-Derived Factor“ (PEDF) auf die Neurogenese im Rattegehirn nach experimentellem Hirntrauma“. Neurochirurgische Universitätsklinik, Klinikum der Universität Regensburg, Direktor: Prof. Dr. A. Brawanski |
|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

PRÄSENTATIONEN:

| | |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 13.05.2006 | Pina A.-L., Bründl E.M., Brawanski A., Neurochirurgische Universitätsklinik, Klinikum der Universität Regensburg: <i>In vivo effects of Pigment Epithelium derived factor (PEDF) on injured brain</i> . Posterpräsentation auf dem Kongress der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie e.V. (DGNC), Essen, 11.-14.05.2006. |
| 03.06.2008 | Bründl E.M., Pina A.-L., Störr E.-M., Proescholdt M., Brawanski A., Neurochirurgische Universitätsklinik, Klinikum der Universität Regensburg: <i>Intraventricular infusion of PEDF causes proliferation of neural stem cells in the subventricular zone following experimental brain injury</i> . Posterpräsentation auf dem Kongress der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie e.V. (DGNC), Würzburg, 01. - 04.06.2008. |