

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR NEUROCHIRURGIE  
PROF. DR. MED. ALEXANDER BRAWANSKI  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Die Auswirkungen einer Minocyclin-Therapie auf die Größe des Läsionsvolumens  
sowie auf die Aktivierung MHC-II-positiver cerebraler Immunzellen nach  
experimentellem Schädel-Hirn-Trauma**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Christoph Michael Geier

2012



AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR NEUROCHIRURGIE  
PROF. DR. MED. ALEXANDER BRAWANSKI  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Die Auswirkungen einer Minocyclin-Therapie auf die Größe des Läsionsvolumens  
sowie auf die Aktivierung MHC-II-positiver cerebraler Immunzellen nach  
experimentellem Schädel-Hirn-Trauma**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Christoph Michael Geier

2012

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Alexander Brawanski
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Michael Nerlich
Tag der mündlichen Prüfung:	04.02.2013

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	3
1.1	Das Schädelhirntrauma.....	3
1.1.1	Epidemiologie.....	3
1.1.2	Einteilung.....	4
1.1.3	Pathophysiologie.....	5
1.2	Neuroprotektive Behandlung.....	13
1.3	Minocyclin.....	14
1.4	Zielsetzung .....	16
2	Material und Methoden.....	17
2.1	Tierversuche.....	17
2.1.1	Versuchstiere .....	17
2.1.2	Versuchsgruppen .....	17
2.2	Versuchsdurchführung.....	19
2.2.1	Anästhesie .....	19
2.2.2	Trauma.....	20
2.2.3	Posttraumatische Phase.....	22
2.3	Histologie .....	22
2.3.1	Geräte .....	22
2.3.2	Chemikalien und Reagenzien .....	22
2.3.3	Fixation und Gewebeentnahme .....	25
2.3.4	Histologische Gewebeaufbereitung .....	25
2.3.5	Anfertigung von Serienschnitten .....	26
2.3.6	Kresylviolett-Färbung .....	27
2.3.7	Immunhistochemische Methoden .....	27
2.4	Morphometrie .....	29
2.4.1	Messung der Nekrosefläche.....	29
2.4.2	Quantifizierung des Nekrosevolumens .....	31
2.5	Quantifizierung der Reaktion MHC-II-positiver Zellen.....	33

2.6 Statistik.....	34
3 Ergebnisse .....	35
3.1 Ergebnisse der Gruppe „Outcome“ .....	35
3.1.1 Makroskopischen Auswirkungen des Traumas .....	35
3.1.2 Mikroskopische Auswirkungen des Traumas.....	35
3.1.3 Darstellung des Läsionsvolumens.....	39
3.2 Ergebnisse der Gruppe „Zeitverlauf“ .....	43
3.2.1 Makroskopische Auswirkungen des Traumas.....	43
3.2.2 Quantifizierung der Mikrogliareaktion.....	43
4 Diskussion.....	48
4.1 Diskussion der Methoden.....	48
4.1.1 Versuchstiere .....	48
4.1.2 Auswahl des experimentellen Trauma-Modells.....	48
4.1.3 Histologie.....	55
4.2 Diskussion der Ergebnisse.....	58
4.2.1 Eigene Ergebnisse und Resultate anderer Autoren.....	58
4.2.2 Wirkmechanismus von Minocyclin.....	61
4.2.3 Klinische Anwendung - Ausblick .....	67
5 Zusammenfassung .....	69
6 Literaturverzeichnis .....	70
7 Anhang.....	90
7.1 Danksagung.....	90
7.2 Lebenslauf.....	91

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Schädelhirntrauma

### 1.1.1 Epidemiologie

Das Schädelhirntrauma stellt weltweit die häufigste Ursache für Tod oder schwere Behinderung junger Menschen bis zu einem Alter von 45 Jahren dar (Jennett, 1996, Baethmann et al., 2002). In Deutschland waren im Jahr 2007 nach Daten des statistischen Bundesamtes in Wiesbaden 62% der vollstationären Patienten und Patientinnen mit der Diagnose „Verletzung des Kopfes“ (ICD-10 S00-S09) nicht älter als 45 Jahre (Statistisches Bundesamt Wiesbaden, 2007).

Diagnose (ICD-10)	Vollstationäre Patienten und Patientinnen 2007		
	Gesamt (a)	≤ 45 Jahre (b)	Verhältnis (b/a)
Alle Diagnosen (A00-T98)	17 568 576	5 957 180	0,34
Äußere Ursachen (S00-T98)	1 709 480	665 931	0,39
Verletzungen des Kopfes (S00-09)	322 131	200 781	0,62
Intrakranielle Verletzungen (S06)	220 536	135 968	0,62
Fraktur des Schädels und der Gesichtsschädelknochen (S02)	43 398	26 884	0,62

**Tabelle 1: Diagnosen vollstationärer Patienten 2007 in Deutschland (Statistisches Bundesamt Wiesbaden, 2007)**

Europaweit geht man von einer Inzidenz von 235 / 100 000 aus (Tagliaferri et al., 2006). In Deutschland werden jährlich ca. 280 000 Patienten mit der Diagnose Schädel-Hirn-Trauma in Krankenhäuser aufgenommen. Hierbei handelt es sich jedoch zum Großteil um leichte oder mittelschwere Schädel-Hirn-Traumata, nur in 5% der Fälle liegt ein schweres Schädel-Hirn-Trauma, entsprechend einem neurologischen Defizit von weniger als 9 Punkten im Glasgow-Coma-Score 6-24h nach Trauma, vor (Baethmann et al., 2002).

Die Ätiologie differiert abhängig vom Alter der Patienten. Kinder und alte Menschen erleiden Schädel-Hirn-Traumata vor allem im Zuge von Stürzen, im jungen und mittleren

Erwachsenenalter stellen Verkehrsunfälle die häufigste Ursache dar (Gennarelli et al., 1994, Jennett, 1996, Baethmann et al., 2002).

### 1.1.2 Einteilung

Zur Einteilung von Schädel-Hirn-Traumata existiert eine Vielzahl von Scores und Klassifikationen, welche die Verletzung jeweils nach unterschiedlichen Gesichtspunkten einteilen. Dieser Mangel an einheitlichen Richtlinien führte in der Vergangenheit oft zu Missverständnissen bei der Informationsübermittlung zwischen medizinischem Personal. Da bei der klinischen Beurteilung eines Schädel-Hirn-Verletzten vor allem der Grad der Bewusstseinsstörung eine Rolle spielt, entwickelten zwei Neurochirurgen aus Glasgow, Graham Teasdale und Bryan Jennett, 1974 den „Glasgow Coma Score“ (Teasdale und Jennett, 1974). Ziel dieses Scores sollte ein in der Praxis leicht anwendbares System zur zuverlässigen, nicht invasiven und leicht reproduzierbaren Einschätzung des Bewusstseins sein. Zu diesem Zweck beschränkte man sich auf die Beurteilung von drei Bewertungskriterien, welchen jeweils entsprechend der Reaktion des Patienten ein bestimmter Punktwert zugeordnet wird: Augenöffnen, Motorik und Sprache (siehe Tabelle 2: Glasgow Coma Score (GCS)).

Punkte	Augenöffnung (A)	Motorische Reaktion (M)	Verbale Kommunikation (V)
6 Punkte	-	gezielt auf Aufforderung	-
5 Punkte	-	gezielte Abwehr auf Schmerz	konversationsfähig, orientiert
4 Punkte	Spontan	ungezielte Abwehr auf Schmerz	konversationsfähig, desorientiert
3 Punkte	auf Ansprache	Beugesynergismen (Dekortikationshaltung)	unzusammenhängende Worte
2 Punkte	auf Schmerzreiz	Strecksynergismen (Dezerebrationshaltung)	unverständliche Laute
1 Punkt	keine Reaktion	keine Reaktion	keine verbale Reaktion

**Tabelle 2: Glasgow Coma Score (GCS) nach Teasdale und Jennett (Teasdale und Jennett, 1976)**

Anhand dieser drei Punktwerte wird ein Summenscore gebildet, welcher minimal 3 Punkte (tief komatöser Patient) und maximal 15 Punkte (wacher, orientierter Patient) enthält. Die Einteilung der Schwere eines Schädel-Hirn-Traumas erfolgt entsprechend des erreichten Punktwerts:

- Leichtes SHT: GCS 13-15
- Mittelschweres SHT: GCS 9-12
- Schweres SHT: GCS 3-8

Eine weitere wichtige Einteilung kann anhand des Verletzungsmusters bezogen auf die Mitbeteiligung der harten Hirnhaut getroffen werden. Ist letztere unversehrt spricht man von einem geschlossenen Schädel-Hirn-Trauma, bei Eröffnung der Dura mater liegt ein offenes Schädel-Hirn-Trauma vor. Diese Unterscheidung spielt vor allem eine Rolle im Hinblick auf eine mögliche erhöhte Infektionsgefahr des Gehirn-Liquor-Raumes.

### **1.1.3 Pathophysiologie**

Das initiale Ereignis, welches im Rahmen eines Schädel-Hirn-Traumas zu neuronalem Schaden führt ist i.d.R. nur von sehr kurzer Dauer. Die darauf folgenden pathophysiologischen Abläufe dagegen sind äußerst komplex, entwickeln sich über einen längeren Zeitraum und führen oftmals zu einem Schädigungsmuster das eine größere Ausdehnung zeigt als das ursprünglich durch die initiale Verletzung verursachte. Dies führte dazu die unmittelbare, initiale Verletzung als primären Hirnschaden von einem sekundären Hirnschaden zu unterscheiden, welcher erst durch die posttraumatisch einsetzenden Abläufe verursacht wird. Diese Unterscheidung ist von großer klinischer Bedeutung, da nur der sekundäre Hirnschaden einer klinischen Therapie zugänglich ist (McIntosh et al., 1998).

#### **1.1.3.1 Primärer Hirnschaden**

Der primäre Parenchymschaden wird durch rein mechanische Faktoren verursacht und ist daher nur durch Präventionsmaßnahmen beeinflussbar. Bereits 1943 konnte Holbourn mit Hilfe eines Gehirnmodells aus Gelatine zwei Hauptkomponenten unterscheiden: Kontusionsschäden durch direkte Gewalteinwirkung und indirekte Verletzungen als Folge von

Rotationskräften, welche heute auch als diffuser axonaler Schaden bezeichnet werden (Holbourn, 1943). Eine dritte Hauptkomponente stellen Verletzungen von Hirngefäßen als Quelle späterer Blutungen dar (Baethmann und Kempinski, 1993).

Kontusionen können in Hirnarealen unmittelbar unter der Stelle der Hauptgewalteinwirkung sowie entlang einer linearen Kraftlinie auch an der gegenüberliegenden Kontaktstelle des Gehirns mit der Schädelwand auftreten. Lange Zeit wurden diese als Coup- und Contre-Coup-Herde bezeichnet (Ommaya et al., 1971). Durch genauere biomechanische Untersuchungen konnte jedoch festgestellt werden, dass Kontusionsschäden nicht nur auf der Gegenseite der Gewalteinwirkungen auftreten, sondern auch entfernt davon, bevorzugt an den Temporalpolen sowie frontobasal (Ommaya et al., 1971, Teasdale, 1976, Mendelow und Teasdale, 1983).

Zu einem diffusen axonalen Schaden kommt es vor allem durch die Einwirkung von Rotationskräften. Die dabei entstehenden Scherkräfte führen zu Zerreißen von Axonen im Grenzbereich zwischen grauer und weißer Substanz, in tiefer gelegenen Strukturen der weißen Substanz, v.a. des Corpus callosum, sowie der grauen Substanz im Bereich des Mesencephalons und des Hirnstammes (Adams et al., 1977, Mendelow und Teasdale, 1983, Greve und Zink, 2009).

#### **1.1.3.2 Sekundärer Hirnschaden**

Durch das primäre, mechanische Trauma werden pathophysiologische Prozesse getriggert, welche zu einer fortschreitenden, sekundären Schädigung von zunächst gesund erscheinendem Hirngewebe führen. Die Bedeutung des sekundären Hirnschadens für das outcome des Patienten ist immens, noch immer stellt er die häufigste Todesursache von Patienten mit schwerem Schädel-Hirn-Trauma während des Krankenhausaufenthalts dar (Marshall et al., 1991). Anders als der Primärschaden, welcher eine irreversible, mechanische Zerstörung von Gewebe darstellt und keiner Therapie zugänglich ist, laufen die pathophysiologischen Prozesse des Sekundärschadens innerhalb eines Zeitrahmens von Stunden bis Wochen ab und sind somit therapeutisch beeinflussbar.

## Cerebrale Ischämie

Das Gehirn stellt das Organ mit der höchsten Hypoxie-Empfindlichkeit im Körper dar (Klinke und Silbernagl, 2005). Insbesondere nach einem Schädel-Hirn-Trauma liegt eine erhöhte Ischämie-Gefahr vor, da die Schwelle zur Entwicklung irreversibler cerebraler Gewebsschäden bereits bei einem relativen cerebralen Blutfluss von  $15\text{ml } 100\text{g}^{-1} \text{ min}^{-1}$  liegt und das Gewebe somit sogar empfindlicher auf einen Sauerstoffmangel reagiert als im Falle eines nicht-traumatischen, primär ischämischen Insults, bei dem die Schwelle erst bei  $5 - 8,5\text{ml } 100\text{g}^{-1} \text{ min}^{-1}$  zu finden ist (Cunningham et al., 2005). Ab einem  $\text{O}_2$ -Partialdruck im Hirngewebe kleiner  $14\text{mmHg}$  ( $1,8\text{kPa}$ ) ist mit ischämischen Gewebsschäden zu rechnen (Johnston et al., 2005, Rose et al., 2006).

Zur Aufrechterhaltung einer ausreichenden Versorgung des Gehirns mit Blut und Nährstoffen existiert eine Reihe von Autoregulationsmechanismen. Den wichtigsten Mechanismus stellt hierbei die Autoregulation des cerebralen Perfusionsdrucks (CPP) dar, auch Bayliss-Effekt genannt, welcher den CPP in einem Bereich eines systemisch herrschenden arteriellen Mitteldruck (MAP) von  $50\text{-}150\text{mmHg}$  konstant hält (Klinke und Silbernagl, 2005). Die Regulation des CPP geschieht über eine Erhöhung bzw. Erniedrigung des cerebralen Gefäßwiderstands (CVR), wobei eine intakte Blut-Hirn-Schranke Voraussetzung ist (DeWitt und Prough, 2003, Greve und Zink, 2009). Der CPP ist sowohl vom MAP, als auch vom intracraniellen Druck (ICP) abhängig:

$$\text{CPP} = \text{MAP} - \text{ICP}$$

Entscheidend für eine ausreichende cerebrale Perfusion sind somit ein genügend hoher systemischer arterieller Mitteldruck, die Höhe des intracraniellen Drucks, sowie eine intakte Blut-Hirn-Schranke. Nach Schädel-Hirn-Traumen kommt es in ca. einem Drittel der Fälle zu starken hypotensiven Blutdruckentgleisungen (Chesnut et al., 1993).

Kritische Erhöhungen des ICP entstehen durch intracranielle Raumforderungen, wobei vor allem posttraumatische Blutungen, sowie reaktiv entstehende cerebrale Ödeme eine Rolle

spielen (Werner und Engelhard, 2007, Engelhard et al., 2008). Im Rahmen der CRASH-Studie zeigten 56% der Patienten nach einem Schädel-Hirn-Trauma mindestens eine intracranielle Blutung vom Typ Epidural-, Subdural-, Subarachnoidal- oder intraparenchymale Blutung (Edwards et al., 2005, Perel et al., 2010).

Ebenfalls eine häufige posttraumatische Komplikation stellen cerebrale Ödeme dar, wobei zwei verschiedenen Typen unterschieden werden: Das vasogene Ödem entsteht durch einen strukturellen Schaden des Gefäßendothels, ausgelöst durch mechanische Kräfte, autodigestive Prozesse oder einen funktionellen Zusammenbruch der Endothelzellschicht (Werner und Engelhard, 2007). Hierdurch kommt zu einem unkontrollierten Austausch von Wasser, Ionen und Proteinen zwischen Intra- und Extravasalraum und letztendlich zu einer Vergrößerung des extravasalen extrazellulären Raumes (DeWitt und Prough, 2003). Beim zytotoxischen Ödem kommt es hingegen zu einer intrazellulären Wasseransammlung in Neuronen, Astrozyten und Microglia, ausgelöst durch eine osmotische Dysregulation des zellulären Wasserhaushalts als Folgeprozess komplexer pathophysiologischer Prozesse (Marmarou et al., 2006), auf welche im Folgenden genauer eingegangen wird.

### **Exzitotoxizität**

Im Rahmen der posttraumatisch ablaufenden Prozesse lässt sich initial eine ausgedehnte Depolarisation von Neuronen, Gliazellen und cerebralen vaskulären Endothelzellen feststellen. Als Auslöser dieser Depolarisation wird eine exzessive Ausschüttung des exzitatorisch wirkenden Neurotransmitters Glutamat vermutet, wobei jedoch unklar ist, ob die hohen Glutamatkonzentrationen Ursache oder Folge der massiven Depolarisation sind (Greve und Zink, 2009). Eine mögliche Ursache für die exzessiv erhöhten Glutamatspiegel stellt die verminderte Aufnahmefähigkeit von Astrozyten für Glutamat dar (van Landeghem et al., 2006). Die Wirkung des Glutamats wird über vor allem über N-methyl-D-aspartat (NMDA) und  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole (AMPA) Rezeptoren vermittelt (McIntosh et al., 1998) und führt zum Influx von  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Na}^{+}$ -Ionen, zum Eflux von  $\text{K}^{+}$ -Ionen aus der Zelle (Floyd et al., 2005), sowie zur Produktion von Stickoxid-Radikalen (NO) (Arundine et al., 2004).

### **Metabolische Dysregulation**

Unter physiologischen Bedingungen wird der zelluläre Ionenhaushalt vorwiegend über die energieverbrauchende  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase reguliert, wodurch der intrazellulären Akkumulation osmotisch wirksamer Ionen entgegengewirkt wird (Klinke und Silbernagl, 2005). Durch die oben beschriebene glutamaterge Überstimulation exzitatorischer Rezeptoren auf Neuronen und Astrozyten wird eine derart starke Dysregulation des zellulären Ionenhaushaltes ausgelöst, dass die kompensatorische Aktivitätssteigerung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase zu einem massiven Anstieg des ATP-Bedarfs der Zelle führt, wodurch die vorhandenen Energiereserven der Zelle schnell verbraucht werden (Unterberg et al., 2004).

Die zelluläre ATP-Produktion wird durch die posttraumatisch herrschende ischämische Versorgungslage der Zelle mit Sauerstoff eingeschränkt (siehe oben). Ein hoher intrazellulärer Calciumspiegel führt zu einer mitochondrialen Schwellung und Dysfunktion, was eine Reduktion des Zyklus der Atmungskette und der Regeneration von Reduktionsäquivalenten ( $\text{NAD}^+$ ) zur Folge hat (Tavazzi et al., 2005). Das Zusammenspiel dieser Prozesse führt letztendlich zur Ausbildung eines Teufelskreises, welcher aus Ausdruck des kompletten Versagens der Regulation des zellulären Ionenhaushalts zum Einstrom von Wasser und osmotisch wirksamen Teilchen und somit der Ausbildung eines zytotoxischen Hirnödems führt (Unterberg et al., 2004).

### **Oxidativer Stress**

Dem zellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt kommt eine Schlüsselrolle zu, da über die intrazelluläre Konzentration dieser Ionen eine Vielzahl von metabolischen Prozessen gesteuert wird. So kommt es neben Störungen der Proteinphosphorylierung, der Synthese von Mikrotubuli und der Aktivierung von Proteasen zu einem Anstieg der intrazellulären Konzentration an freien Fettsäuren und Arachidonsäure. Letztere wird über das Enzym Cyclooxygenase (COX) verstoffwechselt, was zur Bildung freier reaktiver Sauerstoffradikale (ROS) führt. In Mitochondrien führt ein hoher Calcium-Spiegel zur Bildung von reaktiven Superoxid-Anionen (Chong et al., 2005, Greve und Zink, 2009). Hohe intrazelluläre Spiegel von ROS sensibilisieren die Zelle für weitere Schäden, die vor allem durch das zusätzliche Vorhandensein von

Stickstoffmonoxid-Radikalen (NO) entstehen. NO entsteht vorwiegend im Rahmen der glutamatergen Aktivierung von NMDA-Rezeptoren (siehe oben). In Verbindung mit den durch mitochondriale Dysfunktion entstandenen Superoxid-Anionen entstehen Peroxynitrite. Peroxynitrite können zu DNA-Fragmentationen und somit zum Auslösen des programmierten Zelltods führen (Arundine et al., 2004).

### **Cerebrale Inflammation**

Lange Zeit wurde das zentrale Nervensystem als ein immunprivilegierter Ort angesehen, an welchem unter physiologischen Gegebenheiten durch eine intakte Blut-Hirn-Schranke sichergestellt wird, dass für Bestandteile des Blutes, also auch für Zellen des Immunsystems, eine Impermeabilität besteht und das ZNS somit von systemischen Inflammationen abgeschottet ist (Lucas et al., 2006). Diese Impermeabilität besteht allerdings nach neueren Erkenntnissen auch im physiologischen Zustand nur selektiv und kann im Falle einer Inflammationsreaktion noch weiter herabgesetzt werden (Cederberg und Siesjö, 2010). Zwar erfolgt durch diese Selektivität bei cerebraler Inflammation die Invasion von Leukozyten aus dem Blutkreislauf im Vergleich zu anderen Organen verzögert, die Aktivierung lokaler, ortsansässiger Mikrogliazellen findet jedoch innerhalb kurzer Zeit statt und kann zur Ausschüttung großer Mengen proinflammatorischer Mediatoren führen. Auf Grund dieser Fähigkeit sehr schnell auf nahezu alle Arten akuter ZNS-Verletzungen zu reagieren, werden Mikrogliazellen deshalb von einigen Autoren passenderweise auch als „Sensor für pathologische Vorgänge“ bezeichnet (Kreutzberg, 1996).

<b>Zelltyp</b>	<b>Aktivierungszeit nach Trauma</b>
Microglia	≥ 3 h
Neutrophile Granulozyten	≥ 6 h
Perivaskuläre Zellen	≥ 10 h
Astrocyten	≥ 24 h
Monozyten	≥ 24 h

**Tabelle 3: Zeit bis zur Aktivierung verschiedener Zellarten nach SHT (Cederberg und Siesjö, 2010)**

Im Rahmen der primären Verletzung kommt es zur Freisetzung stark proinflammatorisch wirkender Triggerfaktoren. So führen unter anderem die Extravasation von Blutbestandteilen sowie die Freisetzung intrazellulärer Komponenten durch nekrotischen Zelltod zu einer Veränderung der extrazellulären Homöostase, welche von ortsansässigen Mikrogliazellen und Astrozyten registriert wird (Morganti-Kossmann et al., 2001, Juliet et al., 2008). Hierdurch werden die Mikrogliazellen, welche sich im physiologischen Zustand in einer Ruheform befinden, in den Aktivierten Zustand überführt, in welchem sie durch die Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren die Rekrutierung weiterer Immunzellen bewirken (siehe Abbildung 1).



**Abbildung 1: Morphologie von Mikrogliazellen. Von links nach rechts Transformation von der Ruheform in die aktivierte Form, welche im Endzustand phagozytischen Zellen ähnelt (Kreutzberg, 1996)**

Es konnte gezeigt werden, dass die regionalen Konzentrationen der Zytokine Interleukin (IL) 1 und 6, sowie  $\text{TNF-}\alpha$  nach einem experimentellen Schädel-Hirn-Trauma bei der Ratte während der akuten posttraumatischen Periode im ZNS signifikant ansteigen (Woodrooffe et al., 1991, Taupin et al., 1993, Morganti-Kossmann et al., 1997, McIntosh et al., 1998). Eine Schlüsselrolle spielt dabei IL-1 mit seinen zwei Unterformen IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$ . Als starkes endogenes Pyrogen stellt es den „Prototyp eines inflammatorischen Zytokins“ dar (Rothwell und Luheshi, 2000). In der hierarchischen Signalkaskade der Zytokine nimmt es eine Stellung nahe oder möglicherweise sogar an der Spitze ein (Basu et al., 2004, Folkersma et al., 2008). IL-1 $\beta$  wird als inaktives Precursor-Protein synthetisiert und erst durch Spaltung durch das Enzym

Caspase-1 (auch Interleukin converting enzyme (ICE) genannt) in seine biologisch aktive Form überführt (Arvin et al., 1996, Rothwell, 2003, Chiaretti et al., 2005). Als Hauptquelle der Ausschüttung von ICE werden Mikrogliazellen angesehen (Folkersma et al., 2008). Neben der Ausschüttung einer Reihe proinflammatorischer Zytokine und Chemokine durch Mikroglia und Astrozyten (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, M-CSF, G-CSF, GM-CSF (Aloisi et al., 1992)) induziert IL-1 die Expression der Zelladhäsionsmoleküle VCAM-1 und ICAM-1 und fördert somit die Adhäsion und Transmigration von Leukozyten (Dinarello, 1996). Reaktive Mikrogliazellen infiltrieren gemeinsam mit Makrophagen das zerstörte Gewebe, phagozytieren Zell-Debris und schütten weitere proinflammatorische, neurotoxische Mediatoren aus (Zhang et al., 2006). Hierdurch kommt es zur Verstärkung der oben Beschriebenen Kaskade aus metabolischer Dysregulation und oxidativem Stress und letztendlich zur Aktivierung neuronaler Zelltod-Kaskaden.

### **Aktivierung neuronaler Zelltod-Kaskaden**

Apoptose stellt eine Form des programmierten Zelltods und damit einen aktiven Prozess dar, welcher eine wichtige Rolle bei vielen physiologischen Prozessen wie Embryogenese, Synaptogenese, Immunreaktionen und Organogenese spielt. Auch im Rahmen des sekundären Untergangs neuronaler Zellen nach akuten neurologischen Insulten wie Schlaganfall, SHT und spinalem Trauma lassen sich apoptotische Vorgänge beobachten (Rink et al., 1995, Conti et al., 1998, Emery et al., 1998, Love et al., 1998, Clark et al., 2000a, Smith et al., 2000).

Im Gegensatz zur Zellnekrose, welche eine aus akuter und direkter zellulärer Verletzung resultierende Form des Zelltods darstellt, läuft die Apoptose erst Stunden oder Tage nach dem Primärinsult in organisierten Abläufen nach einem bestimmten Programm an zunächst gesund aussehenden Zellen ab. Zu den Merkmalen, welche diesen Prozess charakterisieren, zählen Verminderung des Zellvolumens, Kondensation und Margination des Chromatins, Fragmentation des Nucleus und Auflösung der Zelle in apoptotische Körperchen (Savitz und Rosenbaum, 1998).

Das molekulare Korrelat dieser morphologisch erfassbaren Zellveränderungen ist äußerst komplex und bis heute Gegenstand intensiver Grundlagenforschung, wie schon die hohe Anzahl von über 4500 Pubmed-Publikationen zu diesem Thema allein im Jahr 2010 zeigt. Als aktiver

Prozess erfordern apoptotische Vorgänge Energiezufuhr und basieren auf einer Imbalance natürlich auftretender pro- und antiapoptotischer Faktoren. Die bedeutendsten Mediatoren in diesem Prozess stellen die Caspasen dar, eine Gruppe von Cystein-Proteasen, welche in einem fest organisierten Prozess selektiv über 100 Substrate spalten und so letztendlich zu den oben genannten, morphologisch sichtbaren Veränderungen während des Zelluntergangs führen (Kaufmann und Hengartner, 2001). Darüber hinaus existieren weitere, Caspasen-unabhängige pro-apoptotische Signalwege. Nähere Details dieser biochemischen Kaskaden werden unter 4.2.2.1 in Zusammenhang mit der Wirkungsweise von Minocyclin besprochen. Die klinische Bedeutung apoptotischer Vorgänge liegt in ihrem Auftreten während der therapeutisch zugänglichen Phase nach dem initialen Trauma, sie stellen also eine mögliche Schnittstelle neuroprotektiver Behandlungsstrategien dar.

## 1.2 Neuroprotektive Behandlung

Entsprechend der großen Anzahl an posttraumatisch ablaufenden pathophysiologischen Abläufen stehen zahlreiche mögliche Angriffspunkte für eine neuroprotektive Therapie im Interesse der Forschung. Tabelle 4 gibt eine Übersicht über die derzeit wichtigsten Ansätze für eine neuroprotektiven Therapie:

Wirkstoffklasse	Wirkmechanismus	Derzeit in Erprobung befindliche Substanzen
<b>NMDA-Rezeptor-Antagonisten</b>	Unterdrückung der durch Glutamat ausgelösten Exzitotoxizität	Aptiganel, Eliprodil, Memantine, Nitromemantine, Traxoprodil, ACEA-1416, Arcaine, Ketamin
<b>AMPA-Rezeptor-Antagonisten</b>	Unterdrückung der durch Glutamat ausgelösten Exzitotoxizität	Zonampanel (YM872), BIIR-561-CL (Irampanel)
<b>Nekrose-Inhibitoren</b>	Inhibierung von Calpain	MDL28170, SJA6017, SNJ-1945
<b>Apoptose-Inhibitoren</b>	Inhibierung von Caspasen	M826, MX1013, IDN-6566, IDN-5370, Dexamethason

<b>Hormone</b>	Wahrscheinlich durch den Subtyp eines gehirnspezifischen Rezeptors	Östrogen, Progesteron
<b>Erythropoietin</b>	Antiapoptotische Wirkung, Ausschüttung stimulierbar durch Hypoxie	Rekombinantes menschliches Erythropoietin
<b>Calcium-Kanal-Blocker</b>	Verminderung der metabolischen Dysregulation	Nimodipine, SNX-111
<b>Immunophiline</b>	Verminderung der Aktivität von Calcineurin bzw. der mitochondrialen Membranpermeabilität	Cyclosporin A, DEBIO-025, UNIL025, NIM811, FK506
<b>Hypothermie</b>	Verminderung des gesamten cerebralen Metabolismus	33°C Körperkerntemperatur für mindestens 48h

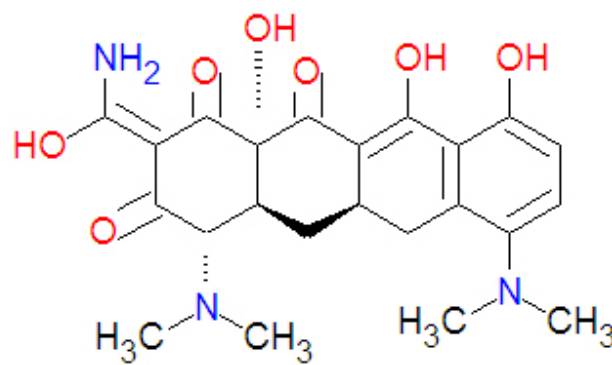
**Tabelle 4: Ansätze für eine neuroprotektive Therapie (Wang et al., 2006, Schouten, 2007, Jain, 2008)**

Viele dieser Ansätze zeigten im tierexperimentellen Versuch ermutigende Ergebnisse, welche jedoch anschließend in klinischen Versuchen nicht mehr erreicht wurden. Eine 2009 durchgeführte Review-Analyse von Phase II/III-Studien neuroprotektiver Therapien nach Schädel-Hirn-Trauma kam zu dem Schluss, dass beinahe alle dieser Studien ihr Ziel, eine signifikante Verbesserung des Outcome zu erreichen, verfehlten (Xiong et al., 2009). Eine Online-Abfrage der Datenbank des U.S. National Institutes of Health ergab eine aktuell laufende Anzahl von 9 Studien, welche sich mit der neuroprotektiven Anwendung von Pharmaka nach Schädel-Hirn-Trauma beschäftigen (<http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=neuroprotective&recr=Open&cond=%22traumatic+brain+injury%22>). Eine dieser Studien, welche im Februar 2010 gestartet ist, beschäftigt sich mit der posttraumatischen, neuroprotektiven Anwendung des Tetracyclin-Antibiotikums Minocyclin (<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01058395>).

### **1.3 Minocyclin**

Tetracyclin-Antibiotika wurden seit ihrer Entdeckung in den 1940ern mehrfach modifiziert, um die antibakterielle Aktivität zu steigern, die intestinale Absorption zu erhöhen, die Gewebspenetration zu verbessern und die Halbwertszeit zu verlängern. Minocyclin (7-dimethyl-amino-6-dioxy-6-dimethyl-tetracyclin), ein halbsynthetisches Tetracyclin-Derivat der

zweiten Generation, wurde erstmals 1966 in der Literatur erwähnt (Redin, 1966). Wie alle Tetracycline besitzt es ein auf vier Ringen basierendes chemisches Grundgerüst, welches durch zusätzliche Dimethylamino-Gruppen verbesserte lipophile Eigenschaften aufweist, wodurch die Penetration der Blut-Hirn-Schranke erleichtert und die Gewebsgängigkeit im ZNS erhöht wird. Die bakteriostatische Wirkung beruht auf einer Inhibierung der bakteriellen Proteinsynthese durch Bindung an die 30S-Untereinheit der Ribosomen (Jonas und Cunha, 1982).



**Abbildung 2: Die Chemische Struktur des Tetracyclin-Antibiotikums Minocyclin**

Neben seiner antimikrobiellen Aktivität zeigt Minocyclin auch anti-inflammatorische, sowie anti-apoptotische Eigenschaften. Eine derartige Wirkung von Tetracyclin-Antibiotika konnte erstmals 1994 bei experimenteller fokaler Ischämie am Kaninchengehirn gezeigt werden (Clark et al., 1994). Weitere positive Ergebnisse mit Minocyclin bei experimenteller globaler Ischämie am Rattengehirn (Yrjanheikki et al., 1998) führten zu einer wahren Flut an Studien, welche die Wirkungen von Minocyclin bei neurologischen Krankheitsbildern untersuchte. In experimentellen Anwendungen konnten positive Ergebnisse erzielt werden bei cerebraler Ischämie (Yrjanheikki et al., 1998, Yrjanheikki et al., 1999, Arvin et al., 2002, Wang et al., 2003a, Xu et al., 2004, Morimoto et al., 2005), Exzitotoxizität (Tikka et al., 2001, Tikka und Koistinaho, 2001b), M. Parkinson (Du et al., 2001, He et al., 2001, Wu et al., 2002, Thomas und Le, 2004), M. Huntington (Chen et al., 2000, Hersch et al., 2003, Thomas et al., 2003, Wang et al., 2003b), Encephalomyelitis disseminata (Brundula et al., 2002, Popovic et al., 2002, Yong et al., 2004),

Amyotropher Lateralsklerose (Zhu et al., 2002, Kriz et al., 2002, Bosch et al., 2002, Zhang et al., 2003) sowie bei M. Alzheimer (Ryu et al., 2004).

Der Effekt von Minocyclin nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma wurde erstmals 2001 untersucht und zeigte eine deutliche Verbesserung der neurologischen Funktion, eine Reduktion des Läsionsvolumens, sowie eine signifikante Verminderung der intracerebralen Konzentration von IL-1 $\beta$  (Mejia et al., 2001). Bis zum aktuellen Zeitpunkt haben weitere Studien stattgefunden, die zu ähnlichen Ergebnissen kamen (Bye et al., 2007, Homsí et al., 2009, Homsí et al., 2010b). Auf die genauen biochemischen Effekte sowie den dahinter stehenden Wirkmechanismus wird an späterer Stelle genauer eingegangen.

#### **1.4 Zielsetzung**

Ziel der vorliegenden Studie ist die Untersuchung der Auswirkungen einer Minocyclin-Therapie nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma an der Ratte auf

- Die Größe des Läsionsvolumen
- Der Aktivierung MHC-II-positiver cerebraler Immunzellen

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Tierversuche**

Die Versuche wurden in der Forschungsabteilung der Klinik für Neurochirurgie an der Universität Regensburg in der Zeit von März 2006 bis Dezember 2007 durchgeführt. Das Tierversuchsvorhaben wurde gemäß § 8 des Deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG i.d.F. vom 25.05.1998, BGBII S. 1105) von der Tierversuchskommission der Medizinischen Fakultät der Universität Regensburg und der Regierung der Oberpfalz (Sachgebiet 54, Veterinärwesen) genehmigt. Die Tierversuchsnummern lauten 54/2531.1-15/04 und 54/2531.1-26/05.

#### **2.1.1 Versuchstiere**

Für die Versuche wurden 41 männliche Wistar-Ratten (Charles River Laboratories, Sulzfeld) mit einem Körpergewicht von ca. 140g und einem Alter von 6 Wochen verwendet. Die Ratten waren einer Durchschnittstemperatur von 21°C bei einer Luftfeuchtigkeit von 45-75% (Mittelwert 55%) bei 15fachem Luftwechsel ausgesetzt und hatten freien Zugang zu Futter und Wasser. Ein Tag-Nacht-Rhythmus von jeweils 12 Stunden wurde durch künstliches Licht automatisch gesteuert. Die Tiere wurden im Tierstall des Forschungsgebäudes in Standard-Einzelkäfigen (Typ III hoch, 840 cm<sup>2</sup>, Fa. Ehret, Emmendingen, Dtld.) gehalten.

#### **2.1.2 Versuchsgruppen**

Vor Beginn der Versuche wurden die Tiere zwei Versuchsgruppen zugeteilt, welche ihrerseits wiederum in je eine Therapie- und Kontrollgruppe unterteilt wurden. Die Zuteilung der Tiere erfolgte randomisiert.

##### **2.1.2.1 Gruppe „Outcome“: Quantifizierung des Nekrosevolumens**

Zur Feststellung einer möglichen Veränderung der Kinetik des Nekrosewachstums unter Minocyclin-Therapie wurden 13 Ratten einem experimentellen Schädel-Hirn-Trauma unterzogen. Nach Setzen der Läsion (siehe 2.2.2) erhielten in der Therapiegruppe 5 Tiere 1h und

12h nach Trauma 90mg/kg Minocyclin i.p.. Anschließend erfolgten zweimal täglich (8:00 und 20:00 Uhr) Injektionen von 45mg/kg Minocyclin i.p. Die Tötung und transkardiale Perfusion der Tiere erfolgte 26 d nach Trauma (siehe Abbildung 3).

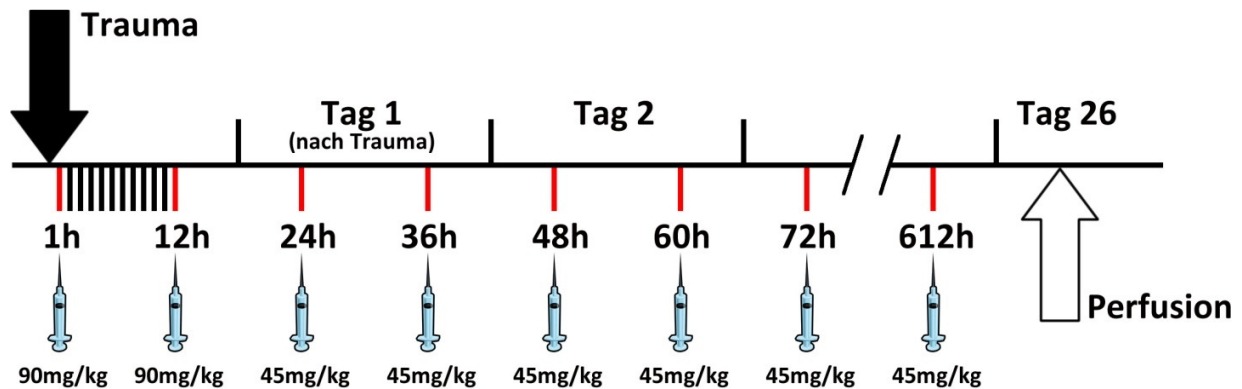


Abbildung 3: Versuchsablauf Gruppe „Outcome“

Von den restlichen 8 Tieren in der Kontrollgruppe erhielten

- n = 3 nur eine Sham-Kraniotomie, kein Trauma, keine Injektion von Minocyclin
- n = 4 nur das Trauma, keine Injektion von Minocyclin
- n = 1 nur eine Narkose

Die Tötung und transkardiale Perfusion erfolgte ebenfalls 26 d nach Trauma.

### 2.1.2.2 Gruppe „Zeitverlauf“: Quantifizierung der MHC-II-positiven Zellen

Um mögliche Auswirkungen einer Minocyclin-Therapie auf die Aktivierung MHC-II-positiven Zellen abhängig von der Therapiedauer festzustellen wurden 16 Ratten einem experimentellen Schädel-Hirn-Trauma unterzogen. Hiervon wurden 8 Tiere der Therapiegruppe zugeteilt und erhielten 1h und 12h nach Trauma 90mg/kg Minocyclin i.p. verabreicht, sowie anschließend zweimal täglich (8:00 und 20:00 Uhr) Injektionen von 45mg/kg Minocyclin i.p. Die Tötung und transkardiale Perfusion der Tiere erfolgte in 24h-Abständen, wobei zu den Zeitpunkten 24h, 48h, 72h, 96h nach Trauma jeweils zwei Tiere getötet wurden (siehe Abbildung 4).

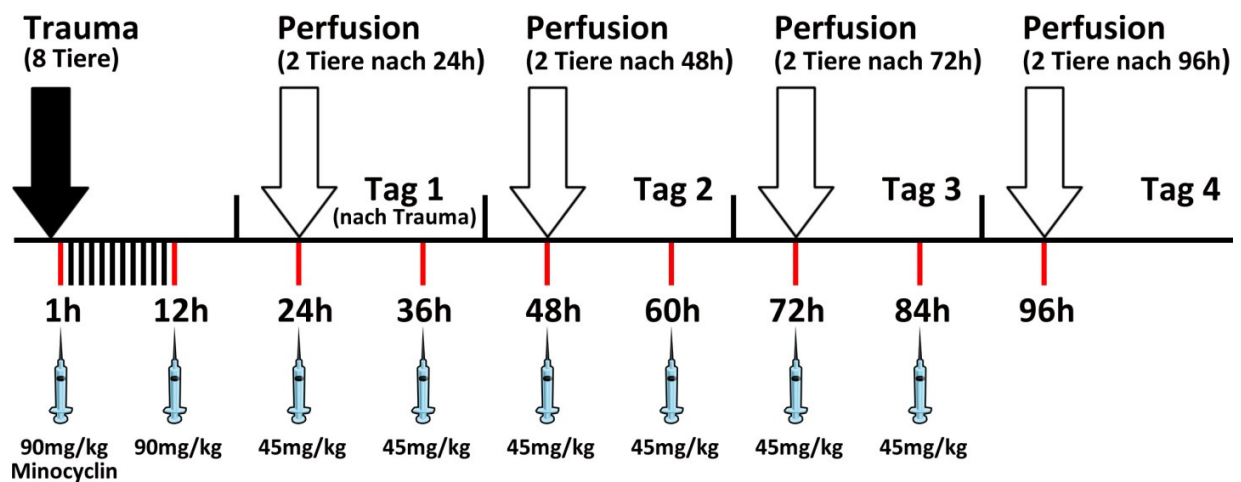


Abbildung 4: Versuchsablauf Gruppe „Zeitverlauf“

Der Kontrollgruppe wurden die restlichen 8 Tiere zugeteilt. Diese erhielten nach dem Trauma keine Injektionen. Die Tötung und Perfusion von jeweils 2 Tieren erfolgte wie bei der Therapiegruppe in 24h-Abständen zu den Zeitpunkten 24h, 48h, 72h, 96h nach Trauma.

## 2.2 Versuchsdurchführung

### 2.2.1 Anästhesie

Zur Narkose wurde ein in der Arbeitsgruppe bereits etabliertes Anästhesieverfahren verwendet. Die Tiere wurden durch intraperitoneale Injektion von 0,2ml / 100g eines Gemisches aus Ketamin, Xylazin, Acepromazin und Kochsalzlösung (Tabelle 5) narkotisiert. Die Narkosetiefe wurde regelmäßig durch Setzen eines Schmerzreizes am Hinterlauf überprüft und bei Bedarf nachgespritzt.

Handelsname	Wirkstoff	Konz. in [mg/ml]	Menge in [ml]	Hersteller
Isotone NaCl-Lösung 0,9 %	-	9	20,0	Fa. BRAUN Melsungen AG, Melsungen, Dtld.

Ketamin 10 %	Ketaminhydrochlorid	100	7,5	Fa. Bela-Pharm GmbH & Co. KG, Vechta, Dtld.
Xylazin 2 %	Xylazinhydrochlorid	20	8,5	Fa. CP-Pharma Handelsges. mbH, Burgdorf, Dtld.
Vetranquil® 1 %	Acepromazinmaleat	13,56	0,8	Fa. Ceva Tiergesundheit GmbH, Düsseldorf, Dtld.

**Tabelle 5: Zusammensetzung des Anästhesiegemisches**

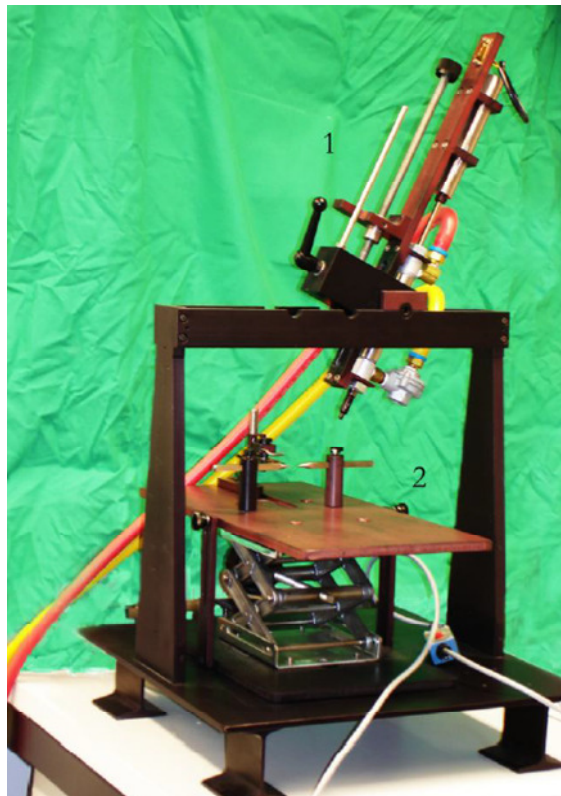
### 2.2.2 Trauma

Nach Wirkungseintritt der Narkose wurden die Tiere an der späteren Operationsstelle am Schädeldach rasiert und der Kopf anschließend in einer stereotaktischen Halterung (Model 900 small animal stereotaxic instrument, David Kopf Instruments, Tujunga, USA) fixiert. Nach gründlicher Desinfektion der Kopfhaut wurde mit dem Skalpell ein ca. 3cm langer Mittellinienschnitt vorgenommen und die Schädelkalotte freipräpariert. Für die anschließende Trepanation wurden das Bregma und der weiter dorsal gelegene Lambda-Punkt zur Orientierung dargestellt. Die ca. 0.5 x 0.5 cm große Bohrung erfolgte mittig zwischen Bregma und Lambda lokalisiert, ca. 1 mm lateral von der Mittellinie gelegen 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), wobei die Dura mater nicht verletzt wurde. Durch vorsichtige Entfernung des Knochendeckelchens wurde die Dura mater des rechten Motorkortex freigelegt.

Zur Induktion des Traumas wurde das Modell des Controlled Cortical Impact (CCI) verwendet, welches ein standardisiertes SHT-Modell darstellt mit dem sich verlässlich reproduzierbare Kontusionen erzielen lassen (Dixon et al., 1991). Die Läsion wird hierbei durch einen 3mm dicken, harten Einschlagstift verursacht, welcher durch einen pneumatischen Schlagkolben (Pneumatic Impact Controller, Biomedical Engineering Facility, Virginia Commonwealth University, Virginia, USA) mit einem definierten Kontusionsdruck in eine zuvor festgelegte Eindringtiefe getrieben wird und anschließend mit einem separat einstellbaren Rückholdruck wieder herausgezogen wird.

Vor dem Setzen des Traumas wurde der Einschlagstift bis zum Berühren der Dura einjustiert und senkrecht zur Kortexoberfläche ausgerichtet. Die Traumaparameter wurden wie folgt eingestellt:

Kontusionsdruck:	100 psi (entspricht ca. 7,0 bar)
Rückholdruck:	30 psi (entspricht ca. 2,1 bar)
Eindringtiefe:	2 mm
Einschlaggeschwindigkeit:	7 m/s



**Abbildung 5:** Kontusionseinheit zur Erzeugung des Traumas nach dem Prinzip des CCI-Modells. Das Trauma wird durch einen am Stahlrahmen fixierten Kontusionsschlitten mit Bolzen (1) erzeugt, die Versuchstiere werden auf einem höhenverstellbaren Tisch mit stereotaktischer Halterung fixiert (2).

### **2.2.3 Posttraumatische Phase**

Nach dem Wundverschluss wurden die Tiere in ihre Käfige verbracht und für ca. eine halbe Stunde bis zum vollständigen Erwachen aus der Narkose unter einer Wärmelampe gehalten. Die intraperitoneale Verabreichung von Minocyclin erfolgte je nach Gruppenzugehörigkeit in den zuvor festgelegten Dosierungen und Abständen (siehe 2.1.2).

## **2.3 Histologie**

### **2.3.1 Geräte**

Folgende Geräte wurden im Verlauf der Experimente eingesetzt:

Rotationsmikrotom (Leica RM 2155, Wetzlar, Deutschland)

Wasserbad (GFL Typ 1052, Burgwedel, Deutschland)

Inverses Mikroskop Leica LEITZ DM IL (Wetzlar, Deutschland)

Durchlichtmikroskop (Olympus BX 51, Olympus, Hamburg, Dtld.)

UV-Licht (Olympus U-RFL-T, Olympus, Hamburg, Dtld.)

Quecksilberdampflampe (Mercur HB0 1x HBO® 103W/2, OSRAM, München, Dtld.)

Kamera (ColorView 12, Olympus, Hamburg, Dtld.)

### **2.3.2 Chemikalien und Reagenzien**

Alle in diesem Kapitel beschriebenen und verwendeten chemischen Substanzen besaßen den Reinheitsgrad p.A. (zur Analyse). Das zum Ansetzen aller Lösungen benutzte Wasser erfüllte die Qualitätsnorm „bidestilliert“. Soweit nicht anders vermerkt wurden alle Lösungen selbst hergestellt und die Reagenzien von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland) bezogen.

### 2.3.2.1 Pufferlösungen:

0,1M PBS-Puffer, pH 7,4		
KCl	2,68 mM	Merck, Darmstadt, Deutschland
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,47 mM	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaCl	136,89 mM	VWR International, Leuven, Belgien
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	8,05 mM	Merck, Darmstadt, Deutschland
pH-Wert eingestellt auf 7,4		

10 mM Citrat-Puffer, pH 6,0		
Citric Acid anhydrous	10 mM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
pH-Wert eingestellt auf 6,0		

### 2.3.2.2 Eindeck-Chemikalien

Neo-Clear	Merck, Darmstadt, Deutschland
Neo-Mount	Merck, Darmstadt, Deutschland

### 2.3.2.3 Immunhistochemische Reagenzien

Primärer Antikörper OX-6	
Mouse anti rat MHC class II RT1B	AbD Serotec, MorphoSys AG, Martinsried/Planegg, Deutschland

Sekundärer Antikörper Donkey-Anti-Maus	
Biotin-SP-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch laboratories INC., Suffolk, UK

Blocklösung in 0,1M PBS-Puffer, pH 7,4		
Donkey-Serum	3 %	Jackson ImmunoResearch laboratories INC., Suffolk, UK
Triton X 100	0,1 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

Avidin-Fitc	
Fluorescein Streptavidin	Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA USA

Eindeckmedium DABCO/PVA (selbst hergestellt)		
Glycerol	12,0 g	Merck, Darmstadt, Deutschland
Polyvinylalkohol	4,8 g	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
H <sub>2</sub> O	12 ml	
0,2M Tris pH 8,0 – 8,5	24 ml	USB Corporation, Cleveland, OH USA
1,4-Diazabicyclo-[2.2.2]octane (DABCO)	2,5 % w/v	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

#### 2.3.2.4 Sonstige Reagenzien

Kresylviolett- (CV) Lösung		
0,5 % CV	1,25 g	Fa. Fluka, Buchs, Dtlid.
ddH <sub>2</sub> O	15 ml	
1 M Natriumacetat	15 ml	
1 M Essigsäure (CH <sub>3</sub> COOH)	85 ml	Fa. Merck, Darmstadt, Dtlid.

Ethanol (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH), vergällt, 99 % (Chemikalien-Ausgabe, Universität Regensburg, Dtld.)
Für die Alkoholreihe wurden 30, 50, 70, 96 und 100 % Ethanol mit H <sub>2</sub> O verdünnt angesetzt.

### 2.3.3 Fixation und Gewebeentnahme

Je nach Zugehörigkeit zu den einzelnen Versuchsgruppen wurden die Tiere 24h, 48h, 72h oder 96h (Zeitverlauf-Versuch) bzw. 26d (Outcome-Versuch) nach Trauma getötet. Hierzu wurde 0,3ml eines Narkotikums (Narcoren®, Wirkstoff: Pentobarbital-Na, Tierärztlicher Dienst, Dr. med. Spruss, Universität Regensburg) intraperitoneal injiziert. Nach Überprüfung der Narkosetiefe durch Setzen mehrerer Schmerzreize wurde der Thorax per Thorakotomie eröffnet, das perikardiale Fettgewebe entfernt und die Herzspitze mit einer Klemme über den rechten und linken Ventrikel abgeklemmt. Anschließend wurde die Wand des linken Ventrikels mit einer Mikroschere mediosagittal inzidiert, wobei darauf geachtet wurde, die Kammer nicht zu perforieren. Über diesen Zugang wurde eine Perfusionsnadel in den linken Ventrikel eingebracht und in die Aorta ascendens vorgeschoben. Ebenso wurde die Aorta abdominalis abgeklemmt, um die spätere Perfusion auf die obere Körperhälfte zu beschränken. Um ein Abfließen der Perfusionsflüssigkeit zu ermöglichen wurde das rechte Herzohr ebenfalls inzidiert. Die Perfusion wurde nun über eine Peristaltikpumpe (Ismatec® Midi-Vario, Typ ISM880, Fa. Ismatec SA, Labortechnik – Analytik, Glattbrugg-Zürich, Schweiz; Vertrieb: ISMATEC Laboratoriumstechnik GmbH, Wertheim-Mondfeld, Dtld.) gestartet wobei zunächst nur Kochsalzlösung (0,9%ige NaCl-Lösung, 12ml/min) verabreicht wurde um den Kreislauf zu spülen. Sobald die austretende Flüssigkeit überwiegend klar erschien, wurde auf paraformaldehydhaltige Fixativflüssigkeit (4%-Paraformaldehyd- (PFA) Lösung, 12 ml/min) umgestellt und der Kreislauf damit ca. 15min lang perfundiert. Nach Entfernen des Schädeldachs wurde das Gehirn freipräpariert, vorsichtig mobilisiert und entnommen. Zur weiteren Fixation wurde es über Nacht in 4%iger PFA-Lösung nachfixiert.

### 2.3.4 Histologische Gewebeaufbereitung

Nach Entnahme aus der PFA-Lösung wurde das Gewebe in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30%, 50% ,70%, 2x 96%, 2x 100%) entwässert und anschließend mittels

klinikumseigener Ausblockstation des Instituts für Pathologie (Shandon Histocentre 2, Thermo Fisher Scientific Germany Ltd. & Co. KG, Bonn, Dtld.) und Einbettautomat (Shandon Hypercenter XP, Thermo Fisher Scientific Germany Ltd. & Co. KG, Bonn, Dtld.) in Paraffin ausgeblockt.

### **2.3.5 Anfertigung von Serienschnitten**

Zur späteren Quantifizierung des Nekrosevolumens wurden aus den in Paraffin eingebetteten Gehirnen mit einem Rotationsmikrotom (Leica RM 2155, Wetzlar, Deutschland) Serienschnitte in coronarer Schnittführung angefertigt. Die Schnittdicke wurde für alle Schnitte auf 5µm eingestellt. Von rostral beginnend wurden jeweils zwei Schnitte auf einen Objektträger aufgebracht und diese anschließend ungefärbt mit einem inversen Durchlichtmikroskop auf den Beginn der Läsion untersucht. Konnten keine Anzeichen auf einen entsprechenden Gewebsdefekt gefunden werden, wurden die nächsten 100 Schnitte (entsprechend einem Gewebeabschnitt von 500µm) verworfen und anschließend wiederum jeweils zwei Schnitte mikroskopisch untersucht. Sobald sich der Beginn der Läsion zeigte, wurde das Vorgehen geändert, um den Bereich der Läsion für die anschließende Berechnung des Volumens präziser darzustellen. Die Anzahl der auf einen Objektträger aufgezogenen Schnitte wurde auf 20 (entsprechend 100µm) erhöht, die Anzahl der anschließend verworfenen Schnitte wurde auf 80 (entsprechend 400µm) verringert. Sobald mikroskopisch kein Anschneiden des Nekroseareals mehr festgestellt werden konnte, wurde das Schneiden beendet und das restliche Gewebe für eventuell später nötige Untersuchungen aufbewahrt.

Zur Gewinnung von Gewebsschnitten für die spätere Quantifizierung der Reaktion MHC-II-positiver Zellen wurden ebenfalls Serienschnitte der Dicke 5µm in coronarer Schnittführung angefertigt. Um ein möglichst repräsentatives Areal darzustellen wurden nur Schnitte aus der Mitte des Läsionsbereichs auf Objektträger aufgezogen, da sich dort die größte Ausdehnung der Läsionsfläche befand.

Die auf Objektträger (Superfrost plus Objektträger, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig) aufgezogenen Gewebsschnitte wurden über Nacht im Wärmeschrank bei 37°C getrocknet.

### **2.3.6 Kresylviolett-Färbung**

Mit Hilfe der Kresylviolett-Färbung, auch Nissl-Färbung genannt, können die in Nervenzellen vorkommenden Tigroidschollen (Nissl-Schollen) dargestellt werden, welche Stapel von rauhem endoplasmatischem Retikulum darstellen. Das Substrat der Färbung sind Ribonukleoproteine. Durch die Kresylviolett-Färbung stellen sich Tigroidschollen, Kernmembranen und Nukleolen intensiv blau oder violett dar, das Zytoplasma der Ganglienzellen- und Gliazellen färben sich blassblau, Zellfortsätze bleiben ungefärbt (Romeis, 1989).

Zur Herstellung der 0,5%igen Kresylviolett-Lösung wurden 1,25g Kresylviolett in 15ml bidestilliertem Wasser, 15ml Natriumacetat (1M) und 85ml Essigsäure gelöst. Die zuvor zur Bestimmung des Nekrosevolumens hergestellten Serienschritte wurden zunächst 2 x 15 Min. in Neo-Clear entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 70%; je 2 x 1-2 Min.) hydriert. Nach kurzer Spülung mit VE-Wasser wurden die Schnitte 15-20 Min. in 0,5%iger Kresylviolett-Lösung gefärbt, anschließend 2-5 Min. in warmen Leitungswasser erneut gespült und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30%, 50%, 70%, 2x 96%, 2x100%), je ca. 2 Min.) wieder dehydriert. Zuletzt erfolgte die Eindeckung, wobei als Eindeckmedium NeoMount verwendet wurde.

### **2.3.7 Immunhistochemische Methoden**

Mit Hilfe immunhistochemischer Methoden lassen sich zelluläre Antigene in situ mit primären Antikörpern markieren, welche anschließend ihrerseits wiederum durch geeignete, markierte, sekundäre Antikörper nachgewiesen werden.

#### **2.3.7.1 Primärer Antikörper OX6**

Als primäre Antikörper bezeichnet man jene Antikörper, die spezifisch an ein nachzuweisendes Antigen binden, jedoch nicht mit einer Markersubstanz konjugiert sind. In einer dem Nachweis eines Antigens dienenden Serie von Antikörperinkubationen werden sie als erste eingesetzt.

Der monoklonale Maus-Antikörper OX6 (Serotec, Oxford, UK) gehört zur Klasse IgG1. Er entstand durch Immunisierung mit Ratten-Thymozyten und erkennt ein Membran-Glycoprotein welches eine monoklonale Determinante des I-A-Antigens ist (McMaster und Williams, 1979b). Ursprünglich bezeichnete der Begriff I-A-Antigen (bei Ratten alternativ auch RT-1B-Antigen genannt (Howard, 1978)) lediglich die Codierung dieses Proteins auf dem Gen I-A, einem bei Ratten und Mäusen auf Chromosom 17 vorkommendem Gen, welches einen Teil des MHC-II-Komplexes codiert. Heute gilt als bewiesen, dass I-A-Antigene den Klasse-II-HLA-Antigenen des Menschen entsprechen und werden deshalb als generischer Begriff für das MHC-II-Antigen verwandt (McMaster und Williams, 1979a). .

Die Serienschnitte zur Quantifizierung der Reaktion OX6-positiver Zellen wurden zunächst 2 x 15 Min. in Neo-Clear entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 70%; je 2 x 1-2min) hydriert. Nach Spülung mit PBS-Puffer (3 x 10 min) wurden die Paraffinschnitte in der Mikrowelle 3 x 5 Minuten in Citrat-Puffer gekocht. Hierdurch wurden Epitope, die durch die Formalinfixierung möglicherweise verändert worden waren, demaskiert. Zur Suppression unspezifischer Bindungsstellen wurden die Schnitte 30 min in Blocklösung inkubiert, die anschließende Inkubation mit den in Blocklösung verdünnten Primär-Antikörpern erfolgte über Nacht in einer feuchten Kammer.

### **2.3.7.2 Sekundärer Antikörper**

Als sekundäre Antikörper bezeichnet man diejenigen Antikörper die dem Nachweis der am gesuchten Antigen gebundenen primären Antikörper dienen. Sekundäre Antikörper sind spezifisch gegen die Tierspezies des Primärantikörpers gerichtet und mit einer Markersubstanz konjugiert. Für unsere immunzytochemischen Experimente wurden als sekundäre Antikörper mit Biotin konjugierte Donkey-Anti-Maus-Antikörper eingesetzt.

Hierzu wurden die am Vortag mit dem Primärantikörper OX6 versetzten Schnitte zunächst 3 x 10 min in PBS-Puffer gewaschen und anschließend mit dem in Blocklösung verdünnten sekundären Antikörper für 2h in einer feuchten Kammer inkubiert.

### **2.3.7.3 Avidin-FITC-Komplex**

Um die Immunreaktion sichtbar zu machen wurde das Fluorochrom Fluoresceinisothiocyanat (FITC) verwendet, ein Derivat des Fluoreszeins welches Licht der Wellenlänge 495 nm absorbiert und anschließend Photonen im Wellenlängenbereich 528 nm emittiert, wodurch es grün leuchtet. Avidin ist ein aus Hühnereiweiß gewonnenes Glykoprotein welches eine hohe Affinität zu Biotin besitzt (Noll, 2000). Unter Ausnutzung der hohen Bindungsaffinität von Avidin zu Biotin wurden die biotinylierten sekundären Antikörper mit an Avidin gekoppeltem FITC markiert.

Die zuvor mit dem sekundären Antikörper inkubierten Serienschnitte wurden hierfür 3 x 10 min in PBS-Puffer gewaschen, anschließend wurde in Blocklösung verdünntes Avidin-FITC zugegeben. Es wurde darauf geachtet möglichst zügig zu arbeiten und so wenig Licht wie möglich auf die Schnitte fallen zu lassen um ein Verblässen des Farbstoffs im Tageslicht zu vermeiden. Die anschließende Inkubation erfolgte für 1,5h in einer dunklen feuchten Kammer. Zuletzt wurden die Schnitte erneut 3 x 10 min in PBS gewaschen, danach zur Konservierung mit wasserhaltigem, für Fluoreszenz geeignetem, Eindeckmedium benetzt und eingedeckelt.

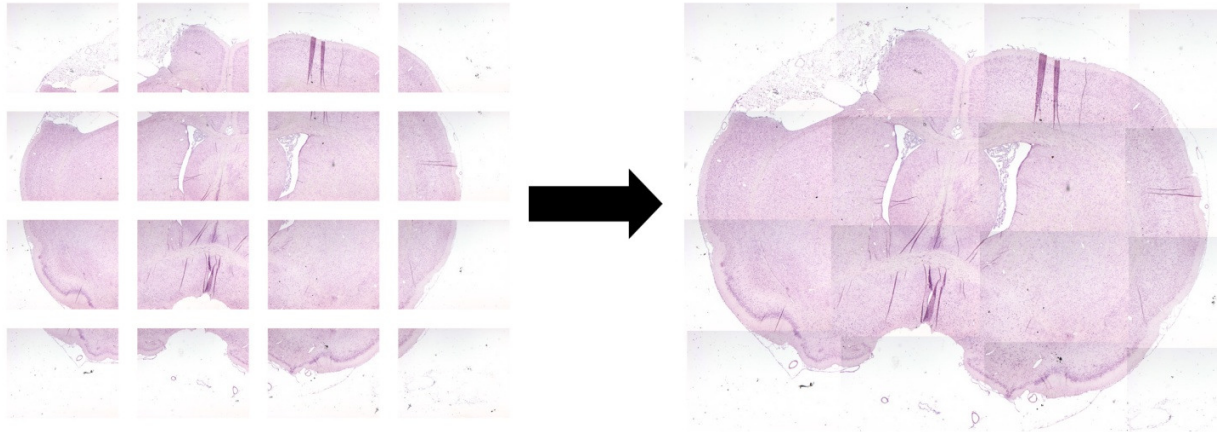
An jedem Versuchstag wurden durch Weglassen des primären Antikörpers Negativ-Kontrollen angefertigt um falsch-positive Markierungen, beispielsweise durch Autofluoreszenz, auszuschließen.

## **2.4 Morphometrie**

### **2.4.1 Messung der Nekrosefläche**

Zur Messung des Nekroseareals wurden die histologischen Schnitte an einem Durchlichtmikroskop (Olympus® BX 51, Olympus, Hamburg, Dtld.) bei 2-Facher Vergrößerung (Olympus PlanApo 2x/0.08) mit Hilfe einer hochauflösenden Farbvideokamera (ColorView 12, Fa. Olympus, Hamburg, Dtld.) und entsprechender Software zur Bildverarbeitung (analySIS® 3.2, Soft Imaging System, Münster, Dtld.) abfotografiert. Da pro Fotoaufnahme nur ein Teilbereich des Gehirnschnitts abgebildet werden konnte, wurde der Gesamtbereich durch mehrere sich

überlappende Einzelaufnahmen meanderförmig abfotografiert und diese anschließend softwaregesteuert zu einem Gesamtbild zusammengefügt (Abbildung 6).

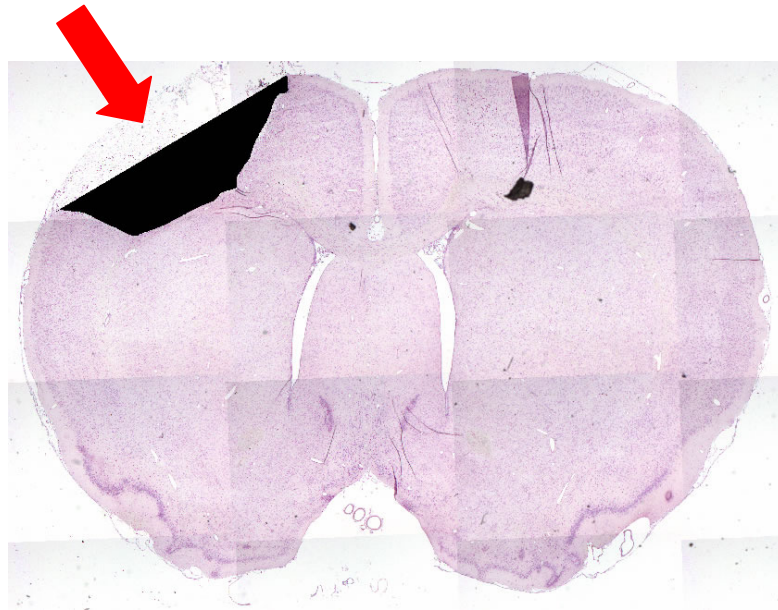


**Abbildung 6: Erstellung der Gesamtübersicht durch Zusammenfügen von Einzelbildern**

Anhand dieser Gesamtaufnahme wurde anschließend per Bildanalyse-Software (ImageJ, National Institutes of Health, USA) das nekrotische Areal mit der Maus umfahren und die entsprechende Fläche vom Programm errechnet. Vor jeder Auswertungsserie wurde die Morphometriesoftware mit einer dafür entwickelten Skala (Calibration Grid Slide 250µm and 25µm, MicroBrightField Inc., Williston, Vermont, USA) kalibriert. Die Nekrosegrenze zum anliegenden intakten Hirngewebe wurde durch mikroskopische Begutachtung des entsprechenden Schnitts in höherer Vergrößerung kontrolliert. Zur Differenzierung von vitalen gegenüber avitalen Zellen wurden folgende Kriterien verwendet (Stummer et al., 1994):

- Nucleus scharf abgrenzbar mit ellipsoider oder runder Form
- Klar erkennbarer Nucleolus
- Nucleus nur leicht dunkler als umgebendes Neuropil
- Neuronales Zytoplasma klar abgrenzbar von umgebendem Neuropil
- Weniger als ein Drittel des Neurons umgeben von konfluierenden Vakuolen („perizelluläres Halo-Zeichen“)

Um das fehlende Gewebe an der Grenze zur Kortexoberfläche auszugleichen und um gleichzeitig eine Verfälschung der Flächenmessung durch Gewebsdefekt oder –schwellung auszugleichen, wurde die Grenze mit Hilfe einer Tangente über die Kortexoberfläche interpoliert (siehe Abbildung 7).



**Abbildung 7: Interpolierung der Nekrosegrenze an der Kortexoberfläche mit Hilfe einer Tangente**

#### **2.4.2 Quantifizierung des Nekrosevolumens**

Zur Berechnung des Volumens eines Objektes durch vorherige Ermittlung dessen Flächenausdehnung in Serienschnitten stehen verschiedene mathematische Berechnungsmöglichkeiten zur Verfügung (Uylings et al., 1986, Rosen und Harry, 1990):

$t$  = Dicke des Serienschnitts

$x_i$  = Abstand orthogonal zur Ebene des  $i$ -ten Serienschnitts

$y_i$  = gemessene Nekrosefläche des  $i$ -ten Serienschnitts

### 1) Rechtecksregel:

Regelmäßige Abstände der Serienschritte:

$$V = d \sum_{i=1}^{n-1} (y_i)$$

unregelmäßige Abstände der Serienschritte

$$V = \sum_{i=1}^{n-1} (x_{i+1} - x_i)(y_i)$$

### 2) Basic volume estimator (Cavalieri-Prinzip):

$$V = d \left( \sum_{i=1}^{n-1} (y_i) \right) - (t)y_{MAX}$$

### 3) Trapezregel:

Regelmäßige Abstände der Serienschritte:

$$V = d \left[ \frac{1}{2} (y_1 + y_n) + y_2 + y_3 + \dots + y_{n-1} \right]$$

Unregelmäßige Abstände der Serienschritte:

$$V = \sum_{i=1}^{n-1} (x_{i+1} - x_i) \left[ \frac{(y_i + y_{i+1})}{2} \right]$$

### 4) Parabolregel

$$V = \frac{d}{3} [(y_1 + y_n) + 4(y_2 + y_4 + \dots + y_{n-1}) + 2(y_3 + y_5 + \dots + y_{n-2})]$$

Zur Entscheidung welches Näherungsverfahren die höchste Genauigkeit liefert sind folgende Kriterien ausschlaggebend (Rosen und Harry, 1990):

- Abstand der Serienschritte zueinander (Stets gleicher Abstand oder unterschiedlicher Abstand)
- Form (Regelmäßig oder unregelmäßig)
- Anzahl der gemessenen Flächen

Ein regelmäßiger Abstand der Schnitte konnte technisch bedingt nicht gewährleistet werden, da bei der Erstellung der Serienschritte auf Grund teilweiser Beschädigung der Schnitte durch Messerscharten nicht jeder Schnitt verwendet werden konnte. Ausgehend vom makroskopischen Aspekt der Läsion wurde zunächst von einer regelmäßigen Form ausgegangen, eine eindeutige Bestimmung der Form war erst nach Ausmessen der einzelnen Läsionsflächen und Rekonstruktion der Form des Läsionsvolumens möglich. Hierzu wurde mittels entsprechender Software (IMOD, University of Colorado, Boulder, USA) aus den zur Messung der Läsionsflächen erstellten zweidimensionalen Bildern durch tomographische Rekonstruktion ein 3D-Modell des Läsionsvolumens erstellt (siehe 3.1.3.).

Die Anzahl der zu vermessenden Schnitte pro Tier wurde deshalb zunächst auf  $n=10$  festgelegt, was der nötigen Anzahl zur Bestimmung eines im 95% Konfidenzintervall liegenden Ergebnisses bei regelmäßiger Form der Läsion und ungleichen Abständen der Einzelschnitte zueinander entspricht. Die Berechnung des Volumens erfolgte anhand der für diese Konstellation empfohlenen Trapezregel für unregelmäßige Abstände (Rosen und Harry, 1990).

## **2.5 Quantifizierung der Reaktion MHC-II-positiver Zellen**

Die Quantifizierung der Reaktion MHC-II-positiver Zellen erfolgte durch Auszählen der OX6-positiven Zellen in der traumatisierten Hemisphäre. Die histologischen Schnitte wurden hierzu an einem Durchlichtmikroskop (Olympus® BX 51, Olympus, Hamburg, Dtl.) (Olympus PlanApo 2x/0.08) mit einer Quecksilberdampflampe (Mercur HBO 1x HBO® 103W/2, OSRAM, München, Dtl.) in der Fluoreszenzmikroskopie beurteilt. Die OX6-positiven Zellen leuchteten

hierdurch beim Blick durchs Mikroskop gelb-grün auf und ließen sich so eindeutig identifizieren. Die Auszählung der Zellen erfolgte bei 40-facher Vergrößerung durch meanderartiges Durchschwenken der gesamten traumatisierten Hemisphäre.

## **2.6 Statistik**

Die statistische Auswertung wurde softwaregestützt durchgeführt (SigmaStat, Systat, San José, USA). Zur Feststellung statistisch signifikanter Unterschiede wurden gepaarte oder ungepaarte Student-t-Tests durchgeführt, wobei ein p-Wert von unter 0,05 als signifikant angesehen wurde. Die Grafiken wurden ebenfalls mit Hilfe entsprechender Software erstellt (SigmaPlot, Systat, San José, USA).

### **3 Ergebnisse**

Alle Tiere erreichten die Versuchskriterien. Das Gehirn eines Versuchstieres aus der Kontrollgruppe zur Gruppe „Zeitverlauf“ wurde bei der Herstellung der Serienschnitte beschädigt und konnte deshalb nicht mehr verwendet werden.

#### **3.1 Ergebnisse der Gruppe „Outcome“**

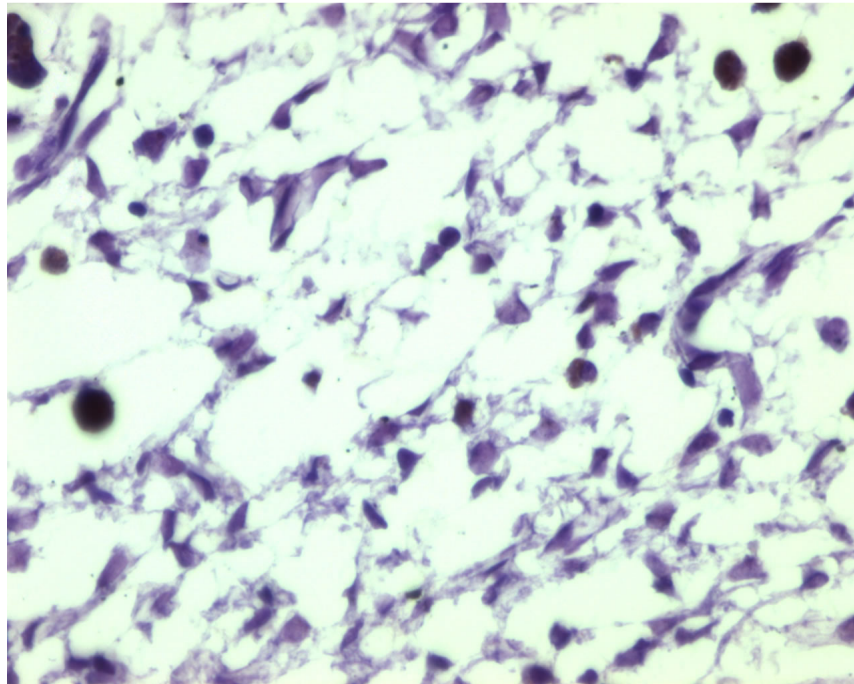
##### **3.1.1 Makroskopischen Auswirkungen des Traumas**

Bei dem in diesem Versuch angewendeten standardisierten Modell des Controlled Cortical Impact wurde zur Induktion des Traumas ein 3mm dicker, harter Einschlagstift verwendet, welcher mit einem Kontusionsdruck von 100psi 2mm tief in den Kortex getrieben wurde. Dies führte zu einer makroskopisch scharf abgegrenzten, hämorrhagischen, runden Nekrose mit einem Durchmesser von ca. 3mm. Das restliche Hirnparenchym erschien makroskopisch unauffällig. Ein makroskopischer Unterschied zwischen Tieren, welche Minocyclin erhalten hatten, und denjenigen ohne Behandlung, lies sich nicht erkennen.

##### **3.1.2 Mikroskopische Auswirkungen des Traumas**

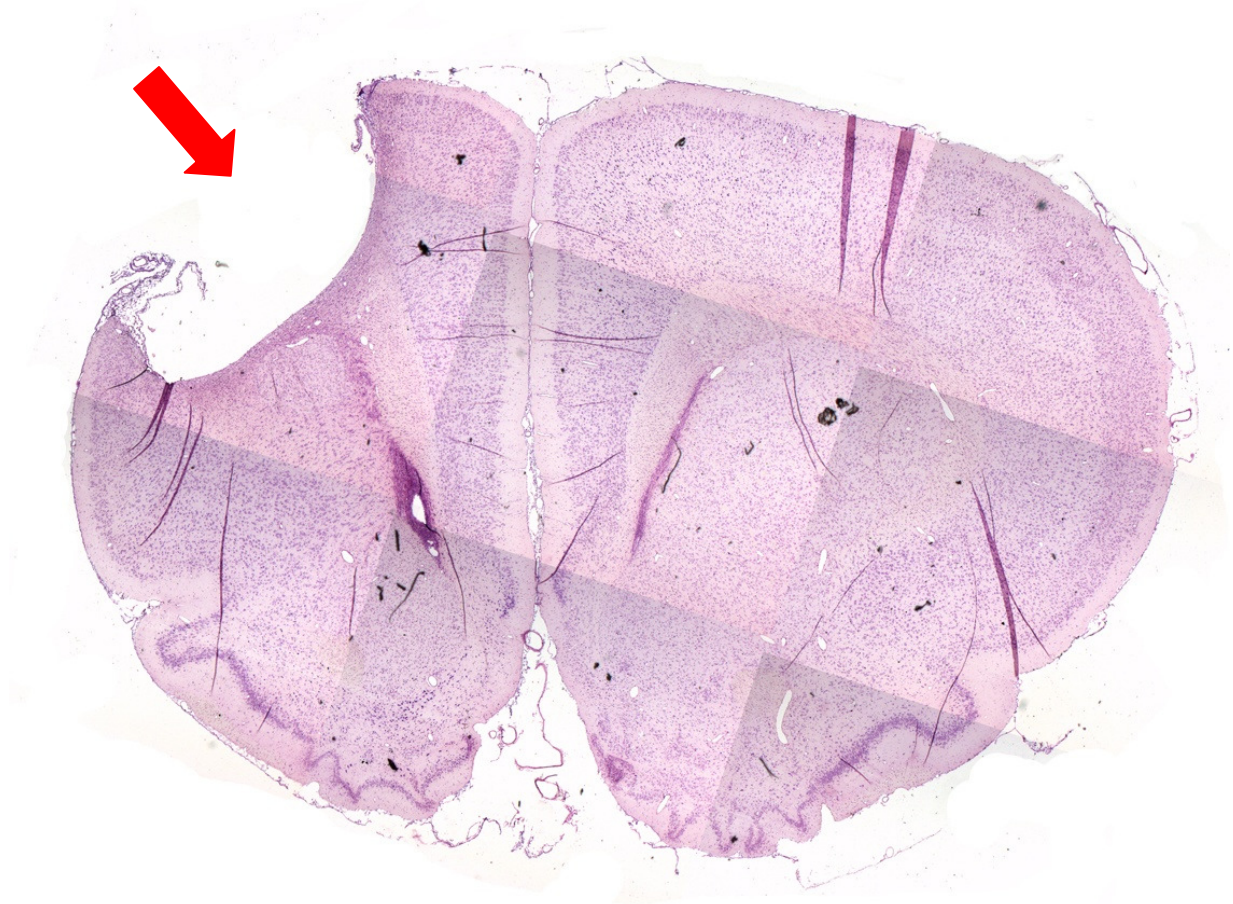
###### **3.1.2.1 Primärer Hirnschaden**

Im Bereich des primären Traumas lässt sich in allen Fällen eine deutlich abgegrenzte, stark hämorrhagische Gewebnekrose feststellen. Das Parenchym zeigt sich spongiös aufgelockert, die Zahl der Neurone ist stark reduziert. Fast alle Neuronen zeigen Kriterien des Zelluntergangs mit Chromatinverklumpungen und Kernpyknosen. Eine Differenzierung der Zellen ist größtenteils nicht möglich, da sich nur noch Zelldebris erkennen lässt.



**Abbildung 8: Im Bereich des primären Traumas zeigt sich ein ausgeprägter nekrotischer Gewebsuntergang**

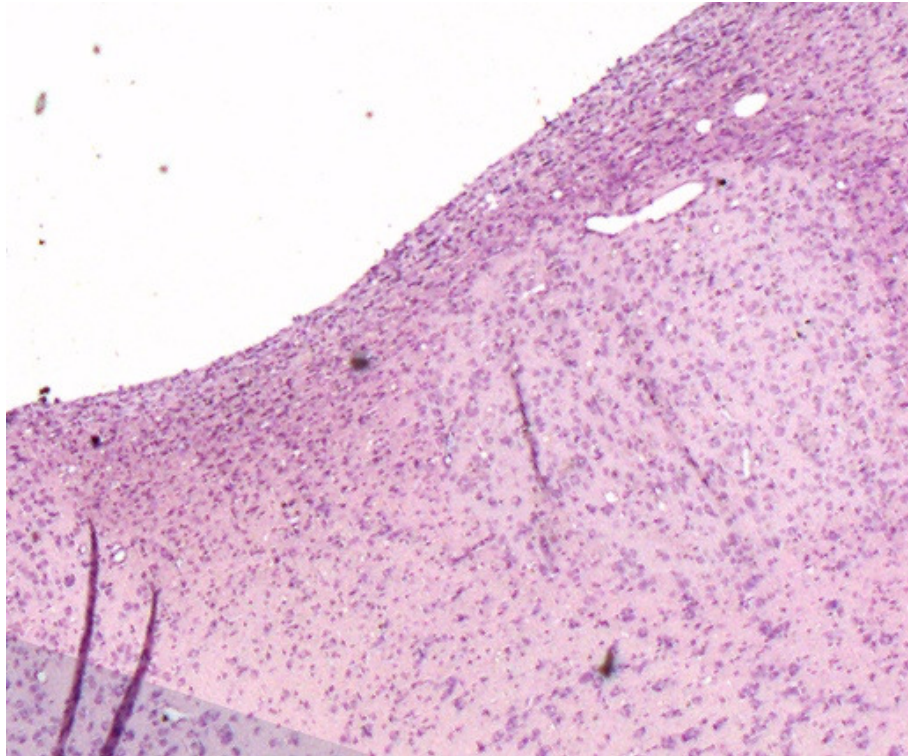
Durch die histologische Verarbeitung ist es in einigen Fällen zu Substanzdefekten gekommen, in vielen Fällen ist der nekrotische Bereich der Primärläsion komplett herausgelöst (siehe Abbildung 9). Im Bereich des primären Hirnschaden zeigt sich mikroskopisch kein Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen.



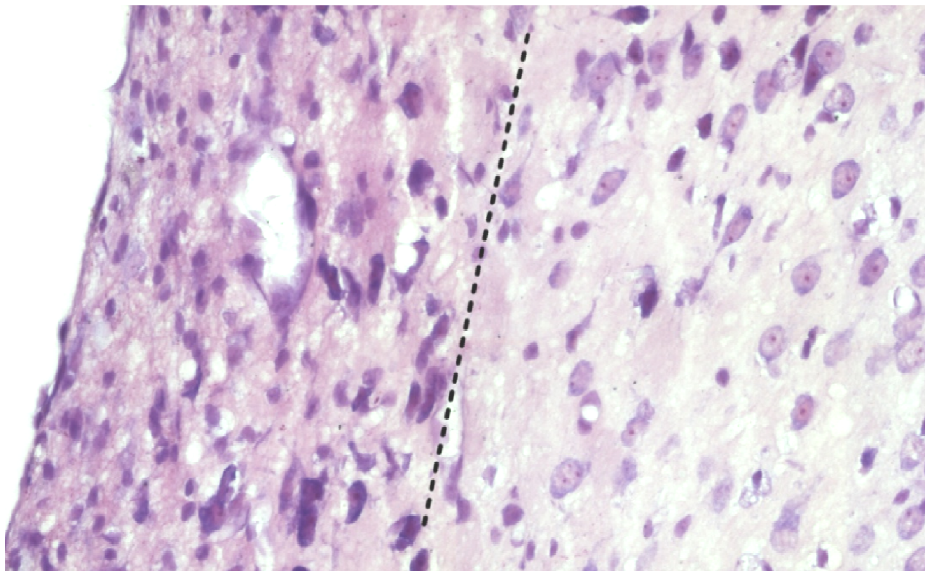
**Abbildung 9:** Das nekrotische Areal im Bereich der Primärläsion ist durch die histologische Verarbeitung herausgelöst. Im Randbereich der Nekrose lässt sich eine Zellverdichtung erkennen.

### **3.1.2.2 Sekundärer Hirnschaden**

Bereits in der Übersichtsaufnahme (Abbildung 10) lässt sich eine deutliche perikontusionale Verdichtung des Gewebes feststellen. Bei höherer Vergrößerung zeigt sich, dass diese v.a. durch eingewanderte Leukozyten und Gliazellen zustande kommt. Eine Abgrenzung zum darunter liegenden, gesunden Neuropil lässt sich feststellen, welche als Grenze für die Bestimmung des Läsionsvolumens markiert wird (Abbildung 11).



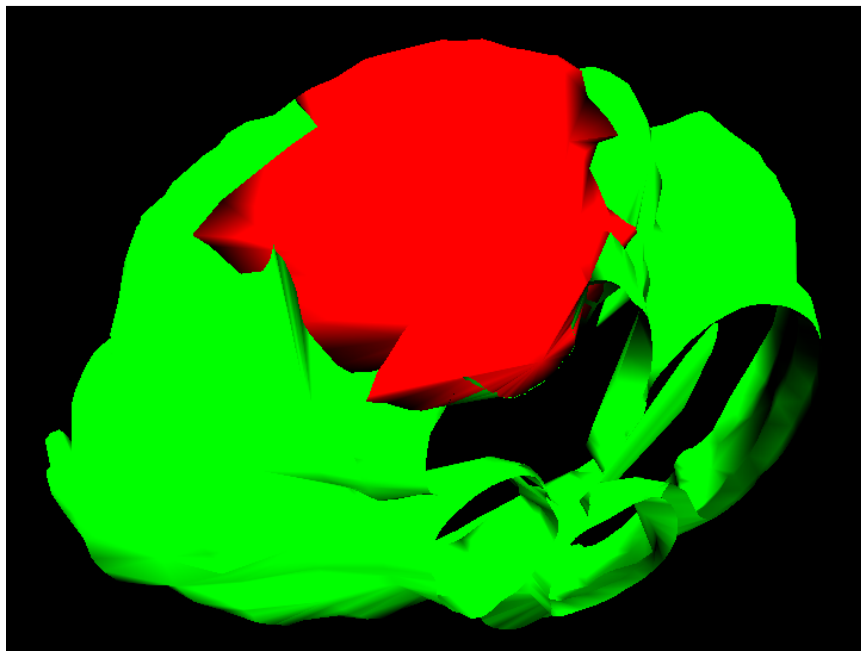
**Abbildung 10:** In der Übersichtsaufnahme lässt sich eine deutliche perikontusionale Verdichtung des Gewebes erkennen



**Abbildung 11:** In höherer Vergrößerung wird bei demselben Präparat die Grenze zwischen nekrotischem und gesundem Neuropil markiert

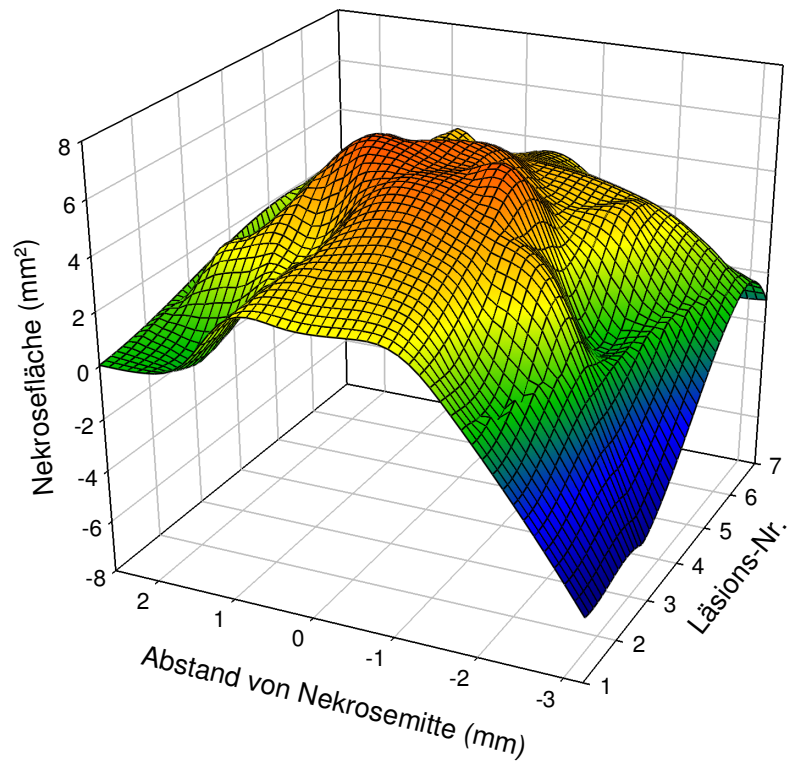
### 3.1.3 Darstellung des Läsionsvolumens

Zur Entscheidung ob es sich bei dem zu messenden Nekrosevolumen um eine regelmäßige oder unregelmäßige Form handelt wurden mit Hilfe eines Programms zur tomographischen Rekonstruktion von Schnittbildern (IMOD, Boulder Laboratory, Colorado, USA) dreidimensionale Modelle der traumatisierten Gehirnabschnitte erstellt. Die Nekrosevolumina zeigten hierbei eine vorwiegend regelmäßige, linsenförmige Form (Abbildung 12).



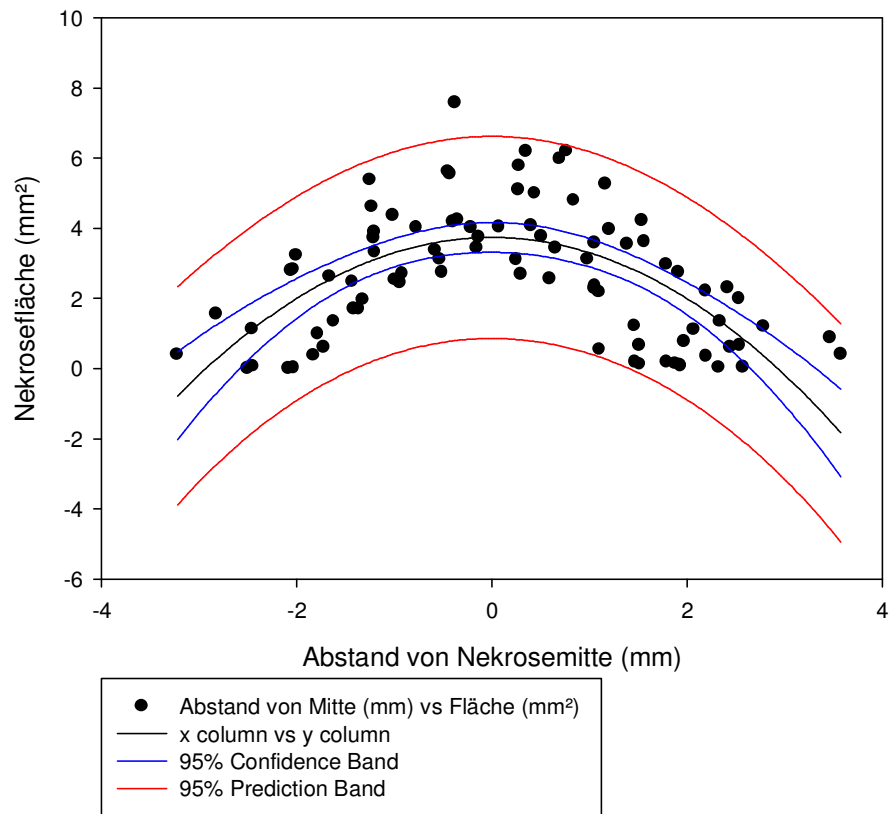
**Abbildung 12: Dreidimensionale Rekonstruktion der Läsion. Es zeigt sich eine vorwiegend regelmäßige, linsenförmige Form**

Abbildung 13 zeigt einen Mesh-Blot zur räumlichen Darstellung der Verteilung der Nekroseflächen. Auf der x-Achse sind hintereinander die einzelnen Läsionsschnitte aufgereiht. Dazu werden auf der z-Achse die jeweils gemessenen Nekroseflächen, auf der y-Achse der Abstand von der Nekrosemitte dargestellt. Es lässt sich eine regelmäßige, von der Nekrosemitte weg abnehmende Verteilung erkennen.



**Abbildung 13: Mesh Blot zur räumlichen Darstellung der Verteilung der Nekroseflächen.**

Abbildung 14 zeigt dieselben Daten kummulativ zweidimensional: Auf der Ordinate sämtliche gemessenen Nekroseflächen, auf der Abszisse den jeweiligen Abstand von der Nekrosemitte.



**Abbildung 14: Zweidimensionale Darstellung der Nekroseflächen in Relation zu ihrem Abstand zur Nekrosemitte.**

Auf Grund der Kriterien regelmäßige Form des Läsionsvolumens sowie unregelmäßiger Abstände der Gewebsschnitte wurde zur Berechnung des Läsionsvolumens die Trapezregel für unregelmäßige Abstände verwendet (siehe auch 2.4.2):

$$V = \sum_{i=1}^{n-1} (x_{i+1} - x_i) \left[ \frac{(y_i + y_{i+1})}{2} \right]$$

Der Vergleich der Gruppen ergibt einen deutlichen Unterschied, welcher jedoch statistisch als nicht-signifikant bezeichnet werden muss:

	<b>Kein Minocyclin</b>	<b>Minocyclin</b>
Mittelwert	11,599 $\mu\text{m}^3$	16,888 $\mu\text{m}^3$
Standardabweichung	5,428 $\mu\text{m}^3$	4,068 $\mu\text{m}^3$
T-Test	p=0,137	

Abbildung 15 zeigt die Läsionsvolumina zugehörig zur jeweiligen Versuchsgruppe in Form von Box-Whisker-Blots um die Streuungs- und Lagemaße der Daten zu veranschaulichen. Die roten Boxen repräsentieren den Bereich in dem 50% der mittleren Daten liegen, d.h. alle Werte zwischen dem 25%- und dem 75%-Perzentil. Die schwarzen horizontalen Striche innerhalb der Boxen stehen für den jeweiligen Median. Durch die Whisker werden außerhalb der Boxen liegende Werte dargestellt. Die horizontalen Abschlussstriche der Whisker kennzeichnen die größten und kleinsten Werte, welche nicht als extreme Werte klassifiziert sind. Der kleine rote Punkt über der Box der Minocyclin-Gruppe stellt einen solchen extremen Wert dar, d.h. der Abstand von dem 25%- oder 75%-Perzentil beträgt mehr als das Dreifache der Box.

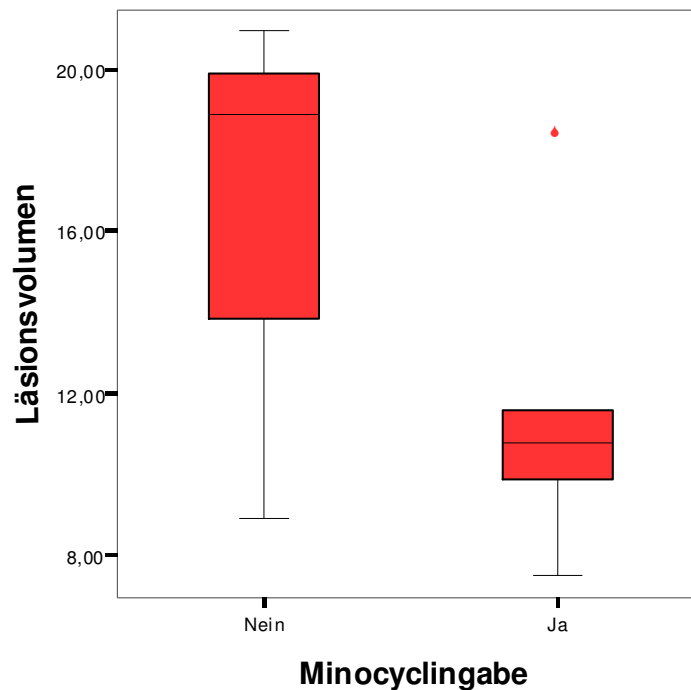


Abbildung 15: Box-Whisker-Plot der Läsionsvolumina jeweils mit bzw. ohne Minocyclingabe

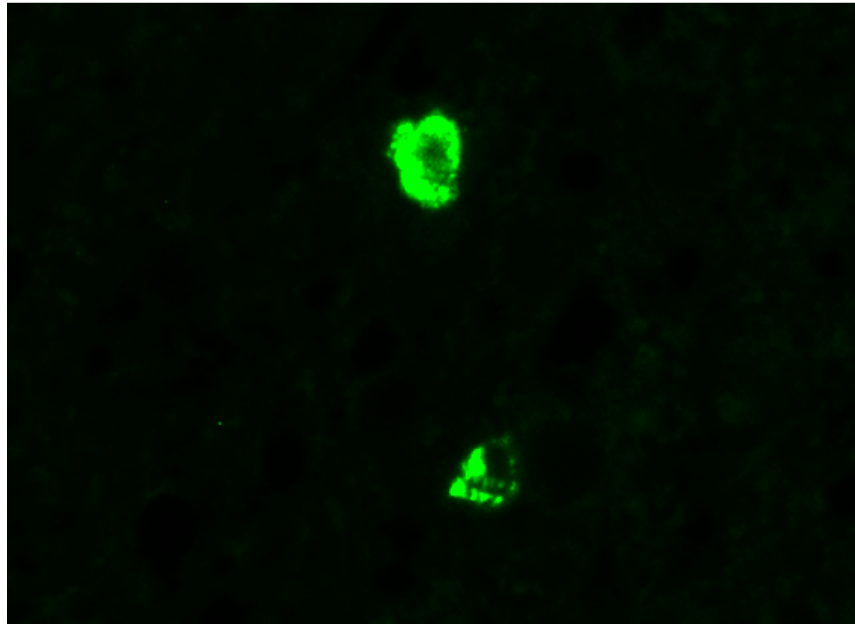
## 3.2 Ergebnisse der Gruppe „Zeitverlauf“

### 3.2.1 Makroskopische Auswirkungen des Traumas

Das Traumamodell der Gruppe „Zeitverlauf“ entspricht demselben Modell wie dem für die Gruppe „Outcome“ verwendeten. Bezüglich der makroskopischen Beobachtungen ergibt sich dementsprechend kein Unterschied zu den oben genannten Eigenschaften.

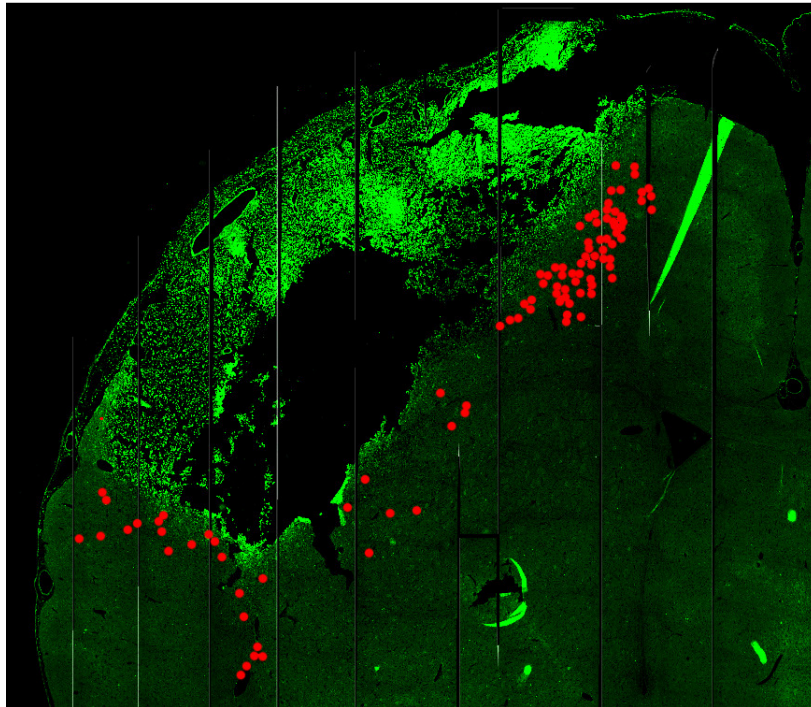
### 3.2.2 Quantifizierung der Mikrogliareaktion

In der Fluoreszenzmikroskopie ließen sich die OX-6-positiven Zellen durch ihre grüne Fluoreszenz eindeutig identifizieren. Bei allen Zellen ließ sich eine nukleäre Aussparung der Fluoreszenz beobachten (siehe Abbildung 16). Bei keiner der Negativkontrollen konnten entsprechende Zellen ausgemacht werden.

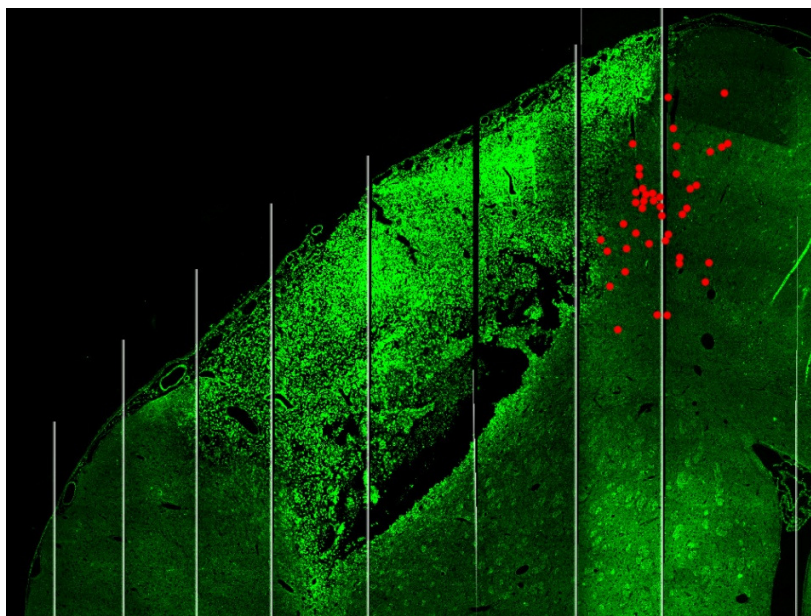


**Abbildung 16: In der Fluoreszenzmikroskopie lassen sich OX-6- positive Zellen durch ihre Fluoreszenz eindeutig identifizieren. Im Bereich des Nukleus lässt sich eine deutliche Aussparung der Fluoreszenz beobachten.**

Die Auszählung der Zellen erfolgt bei 40-facher Vergrößerung durch meanderartiges Durchschwenken der gesamten traumatisierten Hemisphäre. Auffällig ist hierbei ein deutlich sichtbarer Unterschied im örtlichen Verteilungsmuster zwischen beiden Behandlungsgruppen. Tiere ohne Behandlung mit Minocyclin zeigen eine gleichmäßige Verteilung der OX-6-positiven Zellen um das Läsionsareal herum. Wurde eine Behandlung mit Minocyclin durchgeführt, lässt sich eine Konzentrierung der Ansammlung OX-6-positiver Zellen auf einige wenige Bereiche beobachten, wohingegen die restlichen perikontusionalen Regionen weitgehend frei von entsprechenden Zellen sind (siehe Abbildungen 17 und 18).



**Abbildung 17:** Tiere der Gruppe ohne Minocyclin-Behandlung zeigen eine relativ gleichmäßige perikontusionale Anordnung OX-positiver Zellen um die gesamte Ausdehnung des Läsionsareals herum.



**Abbildung 18:** Wurde eine Behandlung mit Minocyclin durchgeführt lässt sich eine Konzentrierung OX-6-positiver Zellen auf wenige Bereiche beobachten.

Nach Auszählen der OX-6-positiven Zellen zu den verschiedenen Zeitpunkten ließ sich ein deutlicher Unterschied feststellen. Eine statistische Signifikanz ließ sich zu den Zeitpunkten 24h, 48h und 96h nach Trauma feststellen:

#### **OX-6-positive Zellen 24h nach Trauma**

	<b>Kein Minocyclin</b>	<b>Minocyclin</b>
Mittelwert (n)	9,000	0,000
Standardabweichung	1,414	0,000
T-Test	p= <0,001	

#### **OX-6-positive Zellen 48h nach Trauma**

	<b>Kein Minocyclin</b>	<b>Minocyclin</b>
Mittelwert (n)	52,000	2,250
Standardabweichung	39,412	1,500
T-Test	p=0,045	

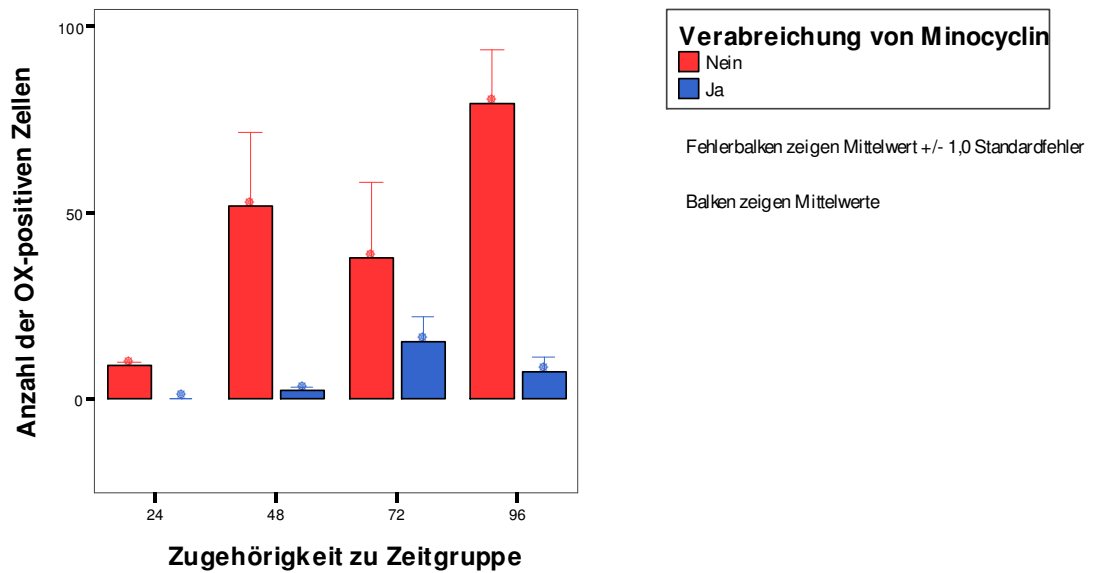
#### **OX-6-positive Zellen 72h nach Trauma**

	<b>Kein Minocyclin</b>	<b>Minocyclin</b>
Mittelwert (n)	37,750	15,250
Standardabweichung	40,713	14,009
T-Test	p=0,336	

#### **OX-6-positive Zellen 96h nach Trauma**

	<b>Kein Minocyclin</b>	<b>Minocyclin</b>
Mittelwert (n)	79,250	7,000
Standardabweichung	29,307	8,124
T-Test	p=0,003	

Abbildung 19 zeigt die Anzahl der OX-6-positiven Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Trauma. Die Roten Balken stehen hierbei für die Versuchsgruppe, welche Minocyclin erhalten hat, die blauen Balken für die Gruppe welche kein Minocyclin erhalten hat.



**Abbildung 19: Anzahl der OX6-positiven Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Trauma.**

## **4 Diskussion**

### **4.1 Diskussion der Methoden**

#### **4.1.1 Versuchstiere**

Zur Durchführung der Experimente wurden männliche Wistar-Ratten (Charles River Laboratories, Sulzfeld) mit einem Körpergewicht von ca. 140g und einem Alter von 6 Wochen verwendet. Die Entscheidung, Ratten als Versuchstiere zu verwenden, beruhte neben der langjährigen Erfahrung unserer Arbeitsgruppe mit diesen Tieren unter anderem auf der relativ einfachen, stabilen Narkoseführung, welche ohne die Anlage eines i.v.-Katheters und unter Spontanatmung möglich ist. Die Kopfgröße der Tiere erlaubt eine exakte Fixierung des Schädels in der stereotaktischen Halterung. Der parietale Anteil der Hirnhemisphären ist verhältnismäßig flach, wodurch die Trepanation der Kalotte relativ leicht durchführbar ist und die exakte Platzierung des Kontusionsstempels erleichtert wird. Die Größe der Gehirne ermöglicht bei koronarer Schnittführung die vollständige Aufbringung der Gewebsschnitte auf einen Objektträger. Darüber hinaus wurde der bei unseren Experimenten verwendete Antikörper OX6 an Ratten etabliert, so dass ein Vergleich unserer Ergebnisse mit bisher in der Literatur publizierten Daten durch Verwendung ebendieser Tiere erleichtert wird.

#### **4.1.2 Auswahl des experimentellen Trauma-Modells**

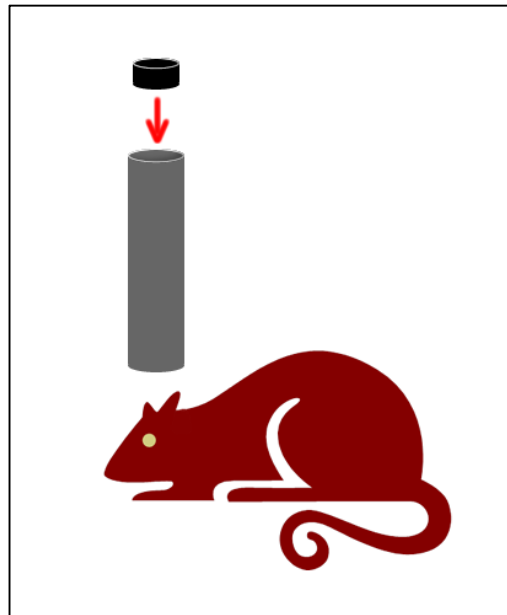
Mittlerweile existiert eine Vielzahl an experimentellen Modellen, welche alle zum Ziel haben die heterogenen und komplexen Aspekte eines Schädel-Hirn-Traumas beim Menschen nachzubilden. Die vollständige Replikation der bei einem Trauma ablaufenden Phänomene durch ein einziges Modell ist trotz aller Bemühungen jedoch bisher nicht gelungen. Dies liegt vor allem daran, dass Hirnverletzungen bei Menschen auf Grund der Verschiedenheit von Mechanismus, Ort und Schwere des Traumas niemals identisch sind. Experimentelle Traumata können daher nur einzelne Mechanismen, welche von besonderer klinischer Bedeutung sind, nachbilden (Morales et al., 2005). Für unsere Versuche wurde ein Traumamodell benötigt, welches folgende Kriterien erfüllt:

- Einfache und schnelle Anwendung um eine möglichst kurze Narkosezeit zur gewährleisten
- Hohe Replizierbarkeit der Versuchsbedingungen bei den einzelnen Versuchstieren
- Erzeugung eines fokalen Kontusionsherdes, um eine Messung des Nekrosevolumens zu ermöglichen

Im Folgenden wird auf die vier derzeit am häufigsten verwendeten in vivo Traumamodelle eingegangen:

#### **4.1.2.1 Weight-Drop-Modell**

Das Weight-Drop-Modell ist eines der einfachsten und am längsten verwendeten experimentellen Modelle zur Darstellung eines fokalen Hirnschadens (Feeney et al., 1981, Dail et al., 1981). Nach Fixierung des Kopfes in einer stereotaktischen Halterung erfolgt die cerebrale Traumatisierung durch ein an einer Schiene geleitetes, aus definierter Höhe herabfallendes Gewicht (siehe Abbildung 20). Die Fixierung des Kopfes ist nicht obligatorisch, wird jedoch im Großteil der Fälle durchgeführt, um eine bessere Replizierbarkeit zu erreichen (Morales et al., 2005).



**Abbildung 20: Weigh-Drop-Modell**

Die Induktion des Traumas kann sowohl bei geschlossener Schädeldecke, als auch nach Kraniotomie und Freilegung der Dura erfolgen. Eine einfache Modifizierung der Traumastärke ist durch Variierung des Gewichts und dessen Fallhöhe möglich.

Das Weight-Drop-Modell stellt ein Traumamodell dar, dessen Stärken vor allem in der unkomplizierten und schnellen Anwendung leichterer Schädel-Hirn-Traumata sowie den einfachen Möglichkeiten zur Variation des Traumas liegen. Die Induktion leichter Traumata führt weniger zu einer Ausbildung fokaler Läsionen, sondern eher zu einer diffusen Schädigung des Gehirns mit Verletzung auch tiefer gelegener Hirnstrukturen wie z.B. des Hippocampus (Tang et al., 1997). Je höher die Traumastärke gewählt wird, desto größer wird bei geschlossener Schädeldecke die Gefahr unkontrollierter Schädelfrakturen, was zu einer hohen Anzahl von auszuschließenden Versuchstieren bzw. einer starken Erhöhung der Variabilität der Messergebnisse führt (Laurer et al., 2000).

#### 4.1.2.2 Impact-Acceleration-Modell

Das Problem der unkontrollierten Schädelfrakturen beim Weight-Drop-Modell führte zur Entwicklung des Impact-Acceleration-Modells (Marmarou et al., 1994, Foda und Marmarou, 1994). Der Versuchsaufbau ähnelt dem des Weight-Drop-Modells, auch hier wird der Kopf des Versuchstieres unter eine Schiene verbracht, an welcher ein Gewicht aus definierter Höhe auf die Kalotte herabfällt. Der Unterschied besteht darin, dass zur Verteilung der auf den Schädel wirkenden Kräfte ein Stahlplättchen auf die freigelegte, intakte Kalotte aufgeklebt wird. Der Kopf wird nicht stereotaktisch fixiert, sondern liegt auf einer Schaumstoffunterlage, welche definierte, elastische Eigenschaften aufweist. (siehe Abbildung 21).

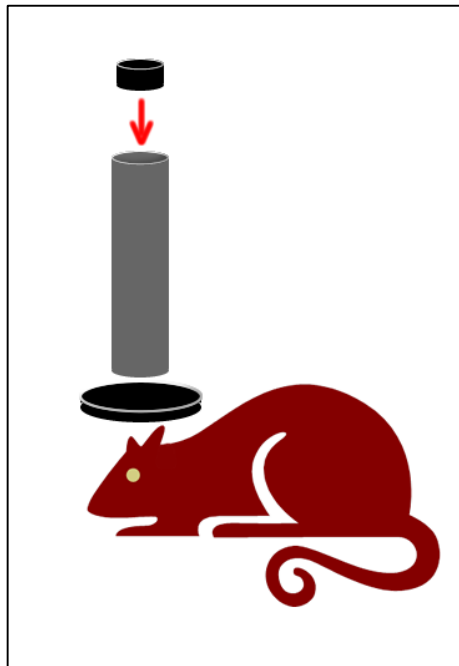


Abbildung 21: Impact-Acceleration-Modell

Durch das Impact-Acceleration-Modell werden Schäden verursacht, welche einerseits auf direkter stumpfer Gewalt durch das herabfallende Gewicht beruhen, andererseits durch Scherkräfte entstehen, welche im Rahmen der Akzelerations- / Dezelerationsbewegungen auf der Schaumstoffunterlage auftreten. Es werden somit pathophysiologische Veränderungen hervorgerufen, wie sie nach schweren, geschlossenen Schädel-Hirn-Traumen auftreten können.

Das Impact-Acceleration-Modell führt zu einem diffusen Schädigungsmuster des Gehirns, die Ausbildung fokaler Kontusionsherde wird weniger häufig beobachtet.

#### 4.1.2.3 Fluid-Percussion-Modell

Das am häufigsten zur Erzeugung cerebraler Traumata verwendete Modell ist das Fluid-Percussion-Modell (Laurer et al., 2000). Ursprünglich zur Anwendung bei Katzen entwickelt (Stalhammar et al., 1987, Hayes et al., 1987b) wurde es neben anderen Tierarten auch an Ratten erprobt (Dixon et al., 1987, McIntosh et al., 1987). Nach Trepanation und Freilegung der intakten Dura wird das Trepanationsloch wasserdicht mit einem flüssigkeitsgefüllten Zylinder verbunden, welcher auf der anderen Seite mit einem Stempel verschlossen ist. Ein aus definierter Höhe auf den Stempel herabschwingendes Gewicht führt zum Einspritzen der Flüssigkeit in das Trepanationsloch mit einem hohen Druckimpuls, wodurch es neben der Traumatisierung des unmittelbar unter der Dura liegenden Hirnparenchyms, auch zum Einschießen von Flüssigkeit in den epiduralen Raum kommt (siehe Abbildung 22).

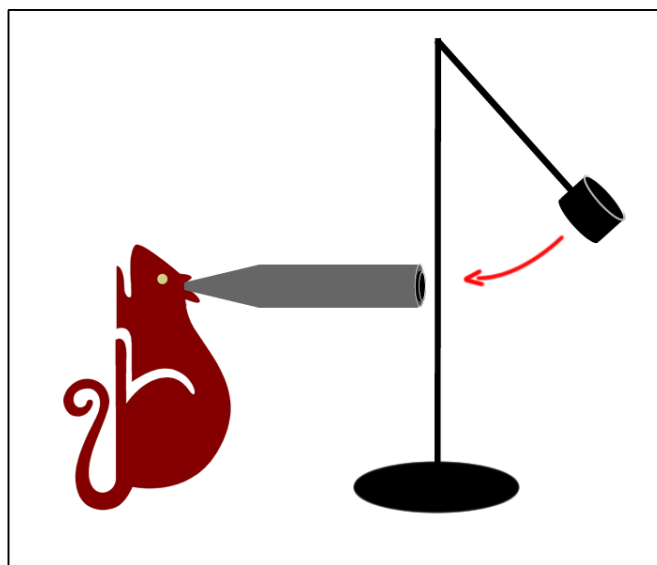
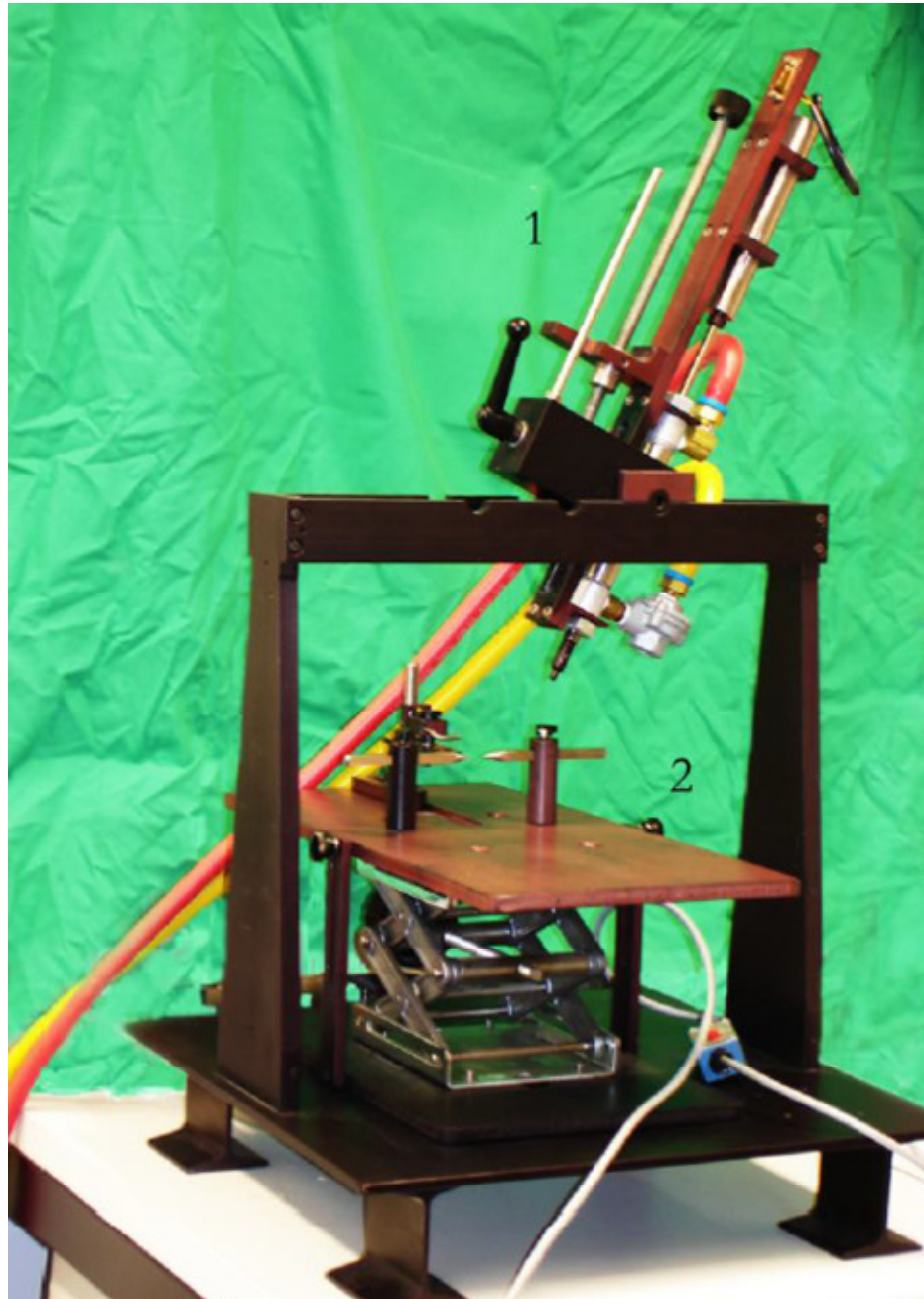


Abbildung 22: Fluid-Percussion-Modell

Durch dieses Modell werden sowohl fokale Kontusionsschäden, welche von petechialen Einblutungen sowie intraparenchymalen und subarachnoidalen Blutungen begleitet werden, als auch diffuse Gewebsschäden verursacht. Darüber hinaus kommt es zur Schädigung auch tiefer gelegener Hirnstrukturen, wie Thalamus, Hippocampus und bei höheren Traumastärken auch des Hirnstamms. Die mit letzterem Verletzungsmuster verbundene hohe akute Letalität stellt den größten Nachteil dieses Traumamodells dar (McIntosh et al., 1987, Dixon et al., 1987, Graham et al., 2000, Laurer et al., 2000).

#### **4.1.2.4 Controlled-Cortical-Impact-Modell**

Ebenfalls zur Erzeugung primär fokaler Kontusionsschäden dient das in unseren Versuchen verwendete Controlled-Cortical-Impact-Modell. Erstmals 1982 als Modell des spinalen Traumas vorgestellt (Anderson, 1982), wurde es zunächst an Frettchen angewandt (Lighthall, 1988), später erfolgten auch Versuche an Ratten (Dixon et al., 1991), Mäusen (Smith et al., 1995) und Schafen (Anderson et al., 2003). Das Trauma wird nach Trepanation bei intakter Dura durch einen harten, mit Druckluft beschleunigten Metallbolzen erzeugt. Eine ausführliche Beschreibung des Versuchsaufbaus findet sich im Abschnitt 2.2.2.



Ähnlich dem Fluid-Percussion-Modell entspricht das Verletzungsmuster einer Kontusionsverletzung mit fokaler Nekrose, begleitet von intraparenchymalen petechialen

Blutungen sowie epiduralen und subduralen Hämatomen. Weitere Schäden wurden in tiefer gelegenen, vulnerablen Strukturen wie dem Hippocampus, dem Gyrus dentatus und dem zum Trauma ipsilateralen Thalamus beobachtet. Insgesamt stehen jedoch corticale Schäden gegenüber axonalen Schäden im Vordergrund (Dixon et al., 1991, Smith et al., 1995).

Der Vorteil dieses Modells gegenüber dem Fluid-Percussion-Modell ist die hohe Kontrollierbarkeit der Traumaparameter. Über eine Computersteuerung können alle wichtigen biomechanischen Parameter wie Kontusionsdruck, Rückholdruck, Eindringtiefe und Einschlaggeschwindigkeit exakt eingestellt werden. Die Gefahr ungewollter, akut letaler Hirnstammverletzungen wird hierdurch minimiert (Morales et al., 2005). In Verbindung mit der leichten und schnellen Anwendbarkeit stellt das Controlled-Cortical-Impact-Modell somit einen für unsere Bedürfnisse sehr gut geeigneten Versuchsaufbau dar.

#### **4.1.3 Histologie**

##### **4.1.3.1 Morphometrie**

Die planimetrische Vermessung von intracerebralen Läsionen wurde bereits früh versucht. Musste man sich anfangs noch relativ ungenauer Methoden wie beispielsweise auf die Hirnoberfläche gelegten Millimeterpapiers (Hass und Taylor, 1953), oder der Vermessung von abfotografierten Mikrotomschnitten mittels Millimeterpapier (Wennerstrand et al., 1967) bedienen, ermöglichte der Einsatz von Computern und Digitalisierbrettern in der 80er Jahren eine enorme Steigerung der Messgenauigkeit (Curcio und Sloan, 1986, Haug, 1986). Für unsere Versuche wurde eine hochauflösende digitale Farbkamera (ColorView 12, Fa. Olympus, Hamburg, Dtld.) und entsprechende Software zur Bildverarbeitung (analySIS® 3.2, Soft Imaging System, Münster, Dtld. und ImageJ, National Institutes of Health, USA) verwendet. Um eine exakte Eichung der Software zu gewährleisten, wurde vor jeder Auswertungsserie die Morphometriesoftware mit einer dafür entwickelten Skala (Calibration Grid Slide 250µm and 25µm, MicroBrightField Inc., Williston, Vermont, USA) kalibriert. Alle Gewebeschnitte wurden von einem einzigen Untersucher verblindet ausgewertet.

In Zusammenhang mit der Bestimmung des Läsionsvolumens muss im Zuge der Fixierung, Dehydratation und Einbettung der Gehirne in Paraffin mit einer gewissen Gewebsschrumpfung gerechnet werden. Auch die Kompression des Gewebe, welche beim Herstellen der Gewebsschnitte durch das Mikrotom-Messer erzeugt wird, verändert die ursprünglichen Größenverhältnisse des untersuchten Präparats. Nach Untersuchungen von Mandarim-de-Lacerda können die Veränderungen durch Paraffininfiltration bis zu 25%, die durch Kompression bis zu 10% gegenüber der Größe von frische, unbehandelten Präparaten betragen (Mandarim-de-Lacerda, 2003). Entsprechend des bereits von Nissl geprägten Begriffs des „Äquivalentbildes“ kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die Anwendung derselben histologischen Aufbereitungsprozedur immer auch bei allen Präparaten zu Veränderungen im gleichen Ausmaß führt (Haug, 1986). Da es bei unseren Untersuchungen darüber hinaus vor allem um die Bestimmung der Relation des Läsionsvolumens beim Vergleich zweier Versuchsgruppen ging, kann der Einfluss der Gewebsschrumpfung auf die Ergebnisse vernachlässigt werden.

#### **4.1.3.2 Quantifizierung der Reaktion MHC-II-positiver Zellen**

Im Gegensatz zu vielen anderen Pathologien des ZNS bietet das experimentelle Schädel-Hirn-Trauma die Möglichkeit, den Verlauf der Kinetik pathophysiologischer Abläufe von Anfang an genau zu beobachten, da der Zeitpunkt des Beginns dieser Prozesse durch das Trauma exakt definiert ist. Die Untersuchung der zellulären Reaktion nach ZNS-Läsionen war daher bereits Gegenstand zahlreicher Studien, im Rahmen welcher das posttraumatische Verhalten der verschiedenen Zelllinien bestimmt wurde (Engel et al., 2000, Czigler et al., 2007). Auf Grund der Hypothese, dass die posttraumatische Applikation von Minocyclin möglicherweise einen neuroprotektiven Effekt durch die Inhibition neuroinflammatorischer Prozesse bewirkt, wurde in unseren Experimenten die Kinetik des Auftretens MHC-II-positiver Zellen im posttraumatischen Zeitverlauf untersucht. Die Markierung der Zellen erfolgte mit Hilfe des monoklonalen Maus-Antikörpers OX6, welcher an ein Membranglykoprotein des I-A-Antigens bindet (McMaster und Williams, 1979b). Heute gilt als bewiesen, dass I-A-Antigene den Klasse-

II-HLA-Antigenen des Menschen entsprechen und werden deshalb als generischer Begriff für das MHC-II-Antigen verwandt (McMaster und Williams, 1979a). Eine genaue Charakterisierung des OX6-Antikörpers erfolgte bereits unter 2.3.7.1.

MHC-II-positive Zellen kommen unter physiologischen Bedingungen nur in sehr geringer Zahl im ZNS vor (Williams et al., 1980). Untersuchungen an histologisch normal erscheinenden Gehirnbiospien zeigten das stärkste Vorkommen in den Meningen (meningeale Makrophagen) und der Neurohypophyse (Pituicyten). Die Zahl der in der weißen Substanz des Cortex gefundenen MHC-II-positiven Zellen war im Vergleich hierzu deutlich geringer, in der grauen Substanz kamen nur vereinzelte Zellen vor (Sasaki und Nakazato, 1992, Gehrman et al., 1993).

Unter pathologischen Zuständen, welche mit neuronalem Schaden oder Untergang von Neuronen einhergeht, lässt sich ein starker Anstieg MHC-II-positiver Zellen im ZNS beobachten. Ein solcher Anstieg ließ sich experimentell nachweisen nach cerebraler Ischämie (Morioka et al., 1992, Zhang et al., 1997), experimentell ausgelöster Neurodegeneration (Akiyama et al., 1988, Streit et al., 1989a, Morioka und Streit, 1991, Gehrman et al., 1991, Kaur und Ling, 1992), Applikation von Lipopolysaccharid oder Interferon-Gamma (Steiniger und van der Meide, 1988, Sethna und Lampson, 1991, De Groot et al., 1991, Xu et al., 1993), spinalem Trauma (Popovich et al., 1997) sowie nach cerebralem Trauma (Engel et al., 1996, Lu et al., 2001, Orihara et al., 2001).

Die Zuordnung der MHC-II-positiven Zellen zu einem bestimmten Zelltyp mit Hilfe immunocytochemischer und elektronenmikroskopischer Untersuchungen ergab, dass MHC-II-Antigene im ZNS im physiologischen Zustand v.a. von ortsansässigen, ruhenden Mikrogliazellen (Hayes et al., 1987a, Vass und Lassmann, 1990), sowie von perivaskulären Zellen (Graeber et al., 1992) exprimiert werden. Die unter pathologischen Zuständen beobachtete starke Zunahme der MHC-II-positiven Zellen lässt sich vorwiegend auf eine starke Hochregulation dieses Antigens auf aktivierten Mikrogliazellen zurückführen (Hayes et al., 1987a, Streit et al., 1989a, Streit et al., 1989b, Flaris et al., 1993, Gehrman et al., 1993, Bo et al., 1994, Kreutzberg, 1996, Ulvestad et al., 1994).

Auf Grund dieses in zahlreichen Experimenten festgestellten, starken posttraumatischen Anstiegs MHC-II-positiver Zellen, der Erkenntnis, dass diese vorwiegend dem Zelltyp der

Mikrogliazellen zuzuordnen sind, sowie der zentrale Rolle, die diese Zellen bei der Initiation und Unterhaltung neuroinflammatorischer Prozesse spielen, stellt die Quantifizierung MHC-II-positiver Zellen im Zeitverlauf eine geeignete Methode dar, um mögliche Auswirkungen von Minocyclin auf neuroinflammatorische Prozesse darzustellen.

## **4.2 Diskussion der Ergebnisse**

### **4.2.1 Eigene Ergebnisse und Resultate anderer Autoren**

#### **4.2.1.1 Reduktion des cerebralen Läsionsvolumens**

Die bisher zu der Frage einer möglichen Reduktion des Läsionsvolumens veröffentlichten Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen weisen uneinheitliche Resultate auf.

Nach experimentellem SHT an Mäusen konnten Mejia et al. eine signifikante Reduktion des Läsionsvolumens beobachten, wobei es keine Rolle spielte, ob Minocyclin bereits 12h vor oder erst 30min nach Trauma verabreicht wurde (Mejia et al., 2001). Bei den von Bye et al. durchgeführten Experimenten konnte 24h nach Trauma zunächst eine signifikante Volumenreduktion beobachtet werden, 4 Tage Post-Trauma verschwand dieser Unterschied zwischen den Versuchsgruppen jedoch wieder (Bye et al., 2007).

Ähnliche Ergebnisse ließen sich bei Modellen Ischämie-Induzierter cerebraler Läsionen erzielen. Innerhalb der ersten 3 Tage nach Trauma kam es zu einer Signifikanten Volumenreduktion (63% nach 3 Tagen Minocyclin-Therapie (Yrjanheikki et al., 1999) bzw. 56% nach 1 Tag Therapie (Xu et al., 2004)), Messungen nach 7 Tagen Therapie zeigten wiederum keinen Unterschied mehr (Fox et al., 2005).

Bei Beurteilung dieser Ergebnisse muss jedoch beachtet werden, dass sich die Versuche in denen kein Spät-Effekt einer Minocyclin-Therapie mehr nachgewiesen werden konnte bei den Versuchsbedingungen deutlich von den vorhergehenden Experimenten unterschieden. So waren die Läsionsvolumina im Trauma-Modell von Bye et al. deutlich geringer als in den Vor-Versuchen, was die Hypothese zulässt, dass ein protektiver Effekt von Minocyclin erst nach schwereren Traumata evident wird. Die Experimente von Fox et al. wurden an neonatalen

Mäusen durchgeführt. Hinweise, dass Minocyclin nach hypoxisch-ischämischen Läsionen einen altersabhängigen deletären Effekt auf infantile Mäusegehirne hat, wurden bereits beschrieben (Tsuji et al., 2004) und sind derzeit noch Gegenstand der wissenschaftlichen Diskussion (Buller et al., 2009).

Die bei unseren Experimenten durchgeführten Messungen stellen daher den Versuch dar, die Auswirkungen einer im Vergleich zu bisherigen Untersuchungen deutlich länger andauernden Minocyclin-Therapie bei erwachsenen Ratten zu bestimmen. Die morphometrischen Messungen 26 Tage nach Trauma zeigten hierbei eine deutliche Reduktion des Läsionsvolumens in der mit Minocyclin behandelten Versuchsgruppe. Eine statistische Signifikanz ergab sich jedoch auf Grund der geringen Anzahl an Versuchstieren nicht. Sinn der Untersuchungen war die Erforschung biologischer Effekte im Rahmen einer Pilotstudie. Diesbezüglich können unsere Ergebnisse als Grundlage für weitergehende Studien betrachtet werden.

#### **4.2.1.2 Inhibierung der Aktivierung von Mikroglia**

Die von uns beobachtete Reduktion der Aktivierung von Mikrogliazellen durch Applikation von Minocyclin stimmt mit bisher veröffentlichten Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen überein. Anders als bei unseren zuvor beschriebenen Ergebnissen bezüglich der Verminderung des cerebralen Läsionsvolumens lässt sich in diesem Fall zu drei Zeitpunkten (24h, 48h und 96h nach Trauma) eine statistische Signifikanz beobachten. Auch in diesem Fall wurde nur eine geringe Anzahl an Versuchstieren verwendet. Die trotzdem erreichte statistische Signifikanz betont die Deutlichkeit des biologischen Effekts. Somit ist auch in diesem Fall unser Ergebnis als Anreiz für weitere Grundlagenforschung zu sehen.

Im Tiermodell sowie unter Verwendung von Zellkulturen wurde eine Inhibition der Aktivierung von Mikrogliazellen durch Minocyclin bei verschiedenen neurologischen Krankheitsbildern, welche pathophysiologisch mit einer neuroinflammatorischen Aktivierung von Mikroglia einhergehen, nachgewiesen. In den meisten dieser Studien wurde zur Quantifizierung der Mikroglia-Reaktion der Antikörper OX-42 verwendet, welcher selektiv am

Komplement-Rezeptor Typ 3 bindet (Robinson et al., 1986). Eine quantitative Vergleichbarkeit der Zellreaktion gegenüber dem in unseren Experimenten verwendeten Antikörper OX-6 kann angenommen werden, da in Studien welche sowohl OX-6 als auch OX-42 Antikörper verwendeten, jeweils ähnlich hohe Zellzahlen bestimmt wurden (Kaur und Ling, 1992, Kaur et al., 1993, Schwab et al., 2000, Lu et al., 2001, Schwab et al., 2001, Jiang et al., 2009).

**Tabelle 6: Ergebnisse bisheriger Studien bezüglich der Inhibierung von Mikrogliazellen nach Minocyclin-Applikation**

Modell	Antikörper	Reduktion (Zeit nach Noxe)	Autor
<b>Cerebrales Trauma</b>			
Weight-Drop	F4/80	43% (4d)	(Bye et al., 2007)
Hemicerebellectomie	OX-42	67% (21d)	(Viscomi et al., 2008)
Weight-Drop	OX-42	59% (24h)	(Homsí et al., 2010a)
<b>Spinales Trauma</b>			
Dorsale Transsektion	OX-42, ED1	58% (7d)	(Stirling et al., 2004)
Weight-Drop	HAM-56	„substantially reduced“ (28d)	(Festoff et al., 2006)
Weight-Drop	OX-42	„significantly reduced“ (33d)	(Hains und Waxman, 2006)
Hemisektion	OX-42	32,8% (14d)	(Marchand et al., 2009)
Weight-Drop	OX-42	28% (28d)	(Tan et al., 2009)
<b>Cerebrale Ischämie</b>			
Okklusion Ae. carotides com.	Phosphotyrosin, Isolektin B4	100% (6d)	(Yrjanheikki et al., 1998)
Okklusion A. cerebri media	OX-42	„significantly reduced“ (3d)	(Yrjanheikki et al., 1999)
Okklusion Ae. carotides com.	OX-42	88% (17d)	(Fan et al., 2006)
Okklusion A. cerebri media sin.	Isolektin B4	„significantly reduced“ (30d)	(Tang et al., 2007)
Okklusion A. carotis com. dex.	Iba-1	100% (7d)	(Carty et al., 2008)
Okklusion A. carotis interna	OX-6, CD-68	28% (4d)	(Lechpammer et al., 2008)

<b>M. Parkinson</b>				
1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin	MAC-1, Isolektin B4	„significantly reduced“ (24h)		(Wu et al., 2002)
1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin	OX-42	„much less“ (7d)		(Yang et al., 2003)
Intranigrale LPS-Injektion	OX-6, OX-42	43% (7d)		(Tomas-Camardiel et al., 2004)
<b>M. Huntington</b>				
Quinolinsäure-Injektion	OX-42	60% (7d)		(Ryu et al., 2006)
<b>M. Alzheimer</b>				
Amyloid-precursor-protein-transgene Maus	MHC-II, OX-42, CD-45	„significant decrease“ (12m)		(Seabrook et al., 2006)
<b>Amyotrophe Lateralsklerose</b>				
Zellkultur, CSF von ALS-Patienten	OX-42	100% (24h)		(Tikka et al., 2002)
<b>Exzitotoxizität</b>				
Zellkultur, NMDA	OX-42	100% (24h)		(Tikka et al., 2001)
Zellkultur, Glutamat	OX-42	„significantly reduced“ (24h)		(Tikka und Koistinaho, 2001a)
Cerebrale Ibotenat-Injektion	Isolektin B4	„significant decrease“ (24h)		(Dommergues et al., 2003)

#### 4.2.2 Wirkmechanismus von Minocyclin

Über welchen Mechanismus Minocyclin seine Wirkung im ZNS entfaltet, ist nicht abschließend geklärt. Die bisher durchgeführten Untersuchungen konzentrierten sich vor allem auf die Erforschung der anti-apoptotischen und anti-inflammatorischen Wirkung. Im Folgenden wird der derzeitige Wissensstand dargestellt.

##### 4.2.2.1 Anti-apoptotische Wirkung

Eine Schlüsselrolle bei der Regulierung apoptotischer Vorgänge spielt eine Gruppe von Cystein-Proteasen, welche als Caspasen bezeichnet werden. Caspasen werden als inaktive Procaspasen synthetisiert, die durch Spaltung in ihre aktive Form überführt werden können.

Nach ihrer Funktion können sie unterteilt werden in Initiator-Caspasen (Caspasen 2, 8, 9) und Effektor-Caspasen (3, 6, 7), welche durch vorherige aktiviert werden. Die aktiven Effektor-Caspasen leiten durch Spaltung diverser Substrate die eigentlichen, zur Apoptose führenden Stoffwechselvorgänge ein (Nicholson und Thornberry, 1997, Kaufmann und Hengartner, 2001).

Nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma konnte ein eindeutiger Zusammenhang des Auftretens apoptotischer Zellen mit der Aktivierung oben genannter Caspasen beobachtet werden, wobei vor allem der Effektor-Caspase-3 eine Schlüsselrolle in der Aktivierungskaskade zukommt (Yakovlev et al., 1997, Beer et al., 2000, Clark et al., 2000b, Yakovlev und Faden, 2001, Sullivan et al., 2002). Die Aktivierung von Caspase-3 kann durch Aktivierung sogenannter „Todesrezeptoren“ (extrinsischer Signalweg), als auch über Permeabilitätsänderungen der mitochondrialen Membran (intrinsischer Signalweg) erfolgen.

Als „Todesrezeptoren“ des extrinsischen Signalwegs fungieren hierbei Fas/CD95- und TNF- $\alpha$ -Rezeptoren, welche nach Bindung mit ihren Liganden zu einer Spaltung der Initiator-Procaspase-8 und konsekutiver Aktivierung von Caspase-3 führen. Der intrinsische Signalweg führt durch noch nicht eindeutig identifizierte propapoptotische Faktoren über eine Permeabilitätsänderung der äußeren mitochondrialen Membran zu einer Ausschüttung von Cytochrom C und Smac/DIABLO aus dem intermembranösen Spalt ins Cytosol. Cytochrom C initiiert durch Komplexbildung mit Apaf-1 (apoptosis-inducing-factor-1) und Spaltung der Initiator-Procaspase-9 die Aktivierung von Caspase-3. Smac/DIABLO unterstützt diesen Prozess durch die Inhibierung von IAPs (inhibitor of apoptosis proteins) (Yakovlev und Faden, 2001).

Neben den Caspasen-abhängigen proapoptotischen Signalkaskaden wurden darüber hinaus durch Ausschüttung proapoptotischer Proteine aus dem intermembranösen mitochondrialen Spalt Caspasen-unabhängige Aktivierungswege beschrieben. Zu diesen Proteinen zählt u.a. das Flavoprotein AIF (apoptosis inducing factor), welches physiologischerweise im Mitochondrium im Rahmen der Zellatmung eine Rolle bei der oxidativen Phosphorylierung spielt (Vahsen et al., 2004). Durch Permeabilitätsänderung der äußeren mitochondrialen Membran gelangt AIF ins Cytosol und führt dort zu Chromatinkondensation sowie DNA-Fragmentation (van Loo et al., 2002). Im Gegensatz zu Caspasen-abhängigen Signalwegen kann AIF-induzierter Zelltod auch unter bioenergetisch

eingeschränkten Bedingungen, d.h. beispielsweise auch in zentralen Bereichen ischämischer Läsionen, beobachtet werden, in welchen Caspasen-abhängige Aktivierungswege mangels ausreichender ATP-Versorgung nicht funktionieren (Cregan et al., 2004, Alano et al., 2004, Moubarak et al., 2007).

Minocyclin entfaltet seine antiapoptotische Wirkung durch Beeinflussung sowohl Caspasen-abhängiger (Cytochrom C, Smac/Diablo) als auch Caspasen-unabhängiger (AIF) Signalwege. Eine Reduktion der Caspase-3-Aktivität durch Minocyclin-Applikation ließ sich bei der Behandlung von M. Huntington (Chen et al., 2000), bei diabetischer Retinopathie (Kradky et al., 2005), nach spinalem Trauma (Lee et al., 2003, Stirling et al., 2004, Festoff et al., 2006) sowie nach cerebralem Trauma (Mejia et al., 2001) feststellen. Der Angriffspunkt von Minocyclin scheint hierbei jedoch keine direkte Inhibition der Caspasen zu sein, was durch Verwendung einer zellfreien Lösung in vitro nachgewiesen wurde (Chen et al., 2000), sondern vielmehr eine Verhinderung der Caspasen-Aktivierung durch Blockierung der Signalkaskade an einem früheren Punkt. Hinweise, dass dieser Interaktionspunkt auf Ebene des Mitochondriums liegen könnte, zeigt die signifikant verminderte Ausschüttung von Cytochrom C und die damit verbundene geringere Rate mitochondrialer Schwellung und Depolarisation nach Stimulation einer Lösung isolierter Mitochondrien mit Calcium (Zhu et al., 2002). Grund für die Beeinflussung der Cytochrom-C-Ausschüttung könnte eine Verminderung der intramitochondrialen Calciumkonzentration und dadurch eine Stabilisierung der mitochondrialen Membran sein (Antonenko et al., 2010, Garcia-Martinez et al., 2010). Ein direkter Effekt Minocyclins auf Cytochrom C konnte durch exogene cytoplasmatische Zugabe von Cytochrom C ausgeschlossen werden (Wang et al., 2004). Eine verminderte Aktivität von AIF durch Minocyclin-Applikation wurde bei M. Huntington (Wang et al., 2003c), Kainat-induziertem cerebralem Zellschaden (Heo et al., 2006) sowie nach ischämischen Nervenläsionen (Keilhoff et al., 2008) beobachtet.

Einen weiteren Angriffspunkt stellt die Induktion von Bcl-2 dar, einem antiapoptotisch wirkenden Protein, welches die Wirkung proapoptotischer Proteine wie Bax, Bak und Bid antagonisiert. Nach Applikation von Minocyclin kommt es zu einer Akkumulation der mRNA sowie des Proteins in den Mitochondrien (Wang et al., 2004). Eine solche Anreicherung konnte nur in neuronalen, nicht jedoch in Gliazellen beobachtet werden (Matsukawa et al., 2009). Folge

dieser Anreicherung ist eine verminderte Ausschüttung von Cytochrom C und damit konsekutiv einhergehend wiederum eine Inhibierung der Aktivierung proapoptotischer Caspasen.

#### **4.2.2.2 Anti-inflammatorische Wirkung**

Die Pathophysiologie des sekundären cerebralen Traumas beinhaltet die Auslösung einer äußerst komplexen Immunantwort, bei der neben ortsansässigen glialen Zellen wie Astrozyten und Mikroglia auch aus dem Blutkreislauf eingewanderte Leukozyten eine Rolle spielen. Durch Ausschüttung von Cytokinen wird durch diese Zellen ein Inflamationsprozess getriggert, welcher neben positiven Reparaturmechanismen auch deletäre, neurotoxische Effekte hat und somit zum neuronalen Zelluntergang beiträgt (Morganti-Kossmann et al., 2001, Morganti-Kossmann et al., 2002, Viviani et al., 2004). Auf die pathophysiologischen Abläufe wurde bereits unter 1.1.3.2 näher eingegangen. Eine therapeutische Beeinflussung dieses Inflamationsprozesses erscheint deshalb äußerst vielversprechend und so ist es nicht überraschend, dass in der Vergangenheit bereits äußerst umfassend die Anwendung verschiedenster Medikamentengruppen zur Behandlung des sekundären Hirnschadens erprobt wurde. Hierbei fiel bei der Erprobung von Tetracyclin-Antibiotika auf, dass diese neben ihrer eigentlichen, antibiotischen Wirkung auch antiinflammatorische Effekte zeigten (Sapadin und Fleischmajer, 2006).

Ein morphologisch sichtbarer Effekt Minocyclins ist eine signifikante Inhibition der Aktivierung und Proliferation von Mikrogliazellen, welcher auch durch unsere Experimente bestätigt wurde (siehe auch Tabelle 6). Um möglicherweise damit verbundene antiinflammatorische Effekte beurteilen zu können, wurden in mehreren Studien die Veränderung der Konzentration verschiedener Cytokine gemessen, mit dem einheitlichen Ergebnis, dass es unter Minocyclin-Therapie zu einer signifikanten Reduktion der IL-1 $\beta$ -Konzentrationen kam (Yrjanheikki et al., 1998, Yrjanheikki et al., 1999, Mejia et al., 2001, Chen et al., 2000, Bye et al., 2007). Da IL-1 $\beta$  nach Schädel-Hirn-Traumata vorwiegend durch aktivierte Mikrogliazellen freigesetzt wird (Loddick und Rothwell, 2002, Folkersma et al., 2008) erscheint ein Zusammenhang zwischen diesen beiden Beobachtungen als wahrscheinlich. Ebenso ließ

sich tierexperimentell beweisen, dass eine medikamentöse Reduktion von IL-1 $\beta$  im Rahmen cerebraler Traumata oder ZNS-Erkrankungen eine neuroprotektive Wirkung hat (Viviani et al., 2004). In gemeinsamen Zellkulturen humaner fetaler Neuronen und Mikrogliazellen hemmte Minocyclin die Aktivierung und Proliferation von letzteren und wirkte auf diese Weise neuroprotektiv (Filipovic und Zecevic, 2008). Eine Veränderung weiterer Cytokine wurde bisher uneinheitlich beschrieben, so dass hierzu keine Eindeutige Aussage zu treffen ist (Lee et al., 2003, Ledebauer et al., 2005, Sriram et al., 2006, Bye et al., 2007).

Neben dem Effekt auf Cytokine wurden Auswirkungen auf weitere proinflammatorische Mediatoren untersucht, wobei eine Inhibierung der Produktion der proinflammatorischen Lipidmediatoren Phospholipase A2 und Cyclooxygenase 2 (COX-2) sowie konsekutiv damit einhergehend verminderte Gewebskonzentrationen von Prostaglandin E2 (PGE-2) beobachtet wurden (Pruzanski et al., 1992, Yrjanheikki et al., 1999, Kim et al., 2004). Die Sekretion von Tumornekrose-Faktor-alpha (TNF- $\alpha$ ), vorwiegend durch aktivierte Mikrogliazellen (Huang et al., 2010), wurde durch Minocyclin signifikant gesenkt (Lee et al., 2004, Huang et al., 2010), ebenso die Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) (Amin et al., 1997, Yrjanheikki et al., 1998, Chen et al., 2000, Du et al., 2001, Huang et al., 2010).

#### **4.2.2.3 Blockade der p38-mitogenaktivierten Proteinkinase**

Auch wenn sich einzelne Konzentrationsveränderungen bestimmter Mediatoren wie beispielsweise die Reduktion von IL-1 $\beta$  herauskristallisieren, so stellen diese dennoch nur einzelne Endpunktbeobachtungen dar. Ein zugrunde liegender spezifischer Wirkmechanismus ist daraus noch nicht ersichtlich. Die Vielzahl solcher inhibitorischer Auswirkungen auf proapoptotische und proinflammatorische Moleküle (Caspase-1, Caspase-3, Cytochrom c, IL-1 $\beta$ , COX-2, PGE-2, TNF- $\alpha$ , iNOS) lässt einen in der Wirkungskaskade höher liegenden Mechanismus vermuten. Eine hierfür möglicherweise passende Schnittstelle stellt die Signalkaskade der p38-mitogenaktivierten Proteinkinase (p38-MAPK) dar (Tikka und Koistinaho, 2001a, Stirling et al., 2005).

p38-MAPKs sind Serin-Threonin-Kinasen welche im Rahmen inflammatorischer Ereignisse die Übermittlung zellulärer Signale übernehmen und somit wichtige Funktionen wie Zellproliferation, -Migration oder -Differenzierung übernehmen (Haines et al., 2008). Im ZNS spielen sie eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von Mikrogliazellen sowie in Neuronen bei der Auslösung apoptotischer Vorgänge (Koistinaho und Koistinaho, 2002, Wada und Penninger, 2004, Zarubin und Han, 2005, Cui et al., 2008). So kommt es in vitro bei Mikrogliazellen nach transienter Hypoxie zu einer signifikanten Aktivierung von p38-MAPKs, welche mit einer vermehrten Expression von iNOS einhergeht. Die Applikation des p38-MAPK-Inhibitors lässt eine deutliche Verringerung der p38-Aktivierung als auch der iNOS-Produktion beobachten (Park et al., 2002). Dazu passend führte auch bei einem in-vivo-Modell transienter fokaler Ischämie die intraventrikuläre Applikation von SB203580 zu einer signifikanten Reduktion des Infarkt Volumens. Diese Beobachtung ging ebenfalls einher mit einer deutlichen Reduktion der Expression von iNOS, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und COX-2 (Piao et al., 2003). Nach spinalem Trauma wurde durch die intrathekale Gabe von SB203580 eine deutliche Besserung der Motorik der Hinterläufe beobachtet (Horiuchi et al., 2003).

Die Inhibierung von p38-MAPK zeigt Effekte, welche den neuroprotektiven Auswirkungen einer Minocyclin-Applikation stark ähneln. In gemischten Zellkulturen von spinalen Neuronen, Gliazellen und Mikroglia reduzierte die Applikation von Minocyclin sowohl die Glutamat-, als auch die NMDA-induzierte Exzitotoxizität, hemmte die Proliferation der Mikrogliazellen und verringerte den Anteil apoptotischer Neurone signifikant. Damit einhergehend wurde eine Inhibierung der p38-MAPK-Aktivität beobachtet (Tikka et al., 2001, Tikka und Koistinaho, 2001a). Nach spinalem Trauma wurde durch Minocyclin-Applikation in aktivierten Mikrogliazellen eine verminderte Aktivität von p38-MAPK als auch von CD11b (OX-42) verzeichnet (Stirling et al., 2005). Darüber hinaus reduzierte Minocyclin den Zelltod in einem in-vitro-Modell Hypoglykämie-induzierter p38-MAPK-Aktivierung in Motoneuronen um 50% (Guo und Bhat, 2007).

#### 4.2.3 Klinische Anwendung - Ausblick

Die Bedeutung der Therapie des sekundären Hirnschadens hat große klinische Bedeutung. Im Idealfall sollte die Prognose von Patienten mit Schädel-Hirn-Trauma nur noch vom Ausmaß des primären Traumas abhängen. Die posttraumatische Verabreichung von Minocyclin verminderte in unseren Versuchen die Entstehung des sekundären Zellschadens und stellt somit einen vielversprechenden Ansatz dar, diesem Ziel näher zu kommen. Ist eine aus pharmakologischer Sicht sichere klinische Anwendung auch beim Menschen möglich?

Als Breitspektrum-Antibiotikum der Klasse der Tetracycline ist Minocyclin zur Behandlung von Acne vulgaris, rheumatoider Arthritis sowie einiger sexuell übertragbarer Krankheiten zugelassen (Good und Hussey, 2003). Die therapeutische Breite ist sehr groß, die letale Dosis liegt im irrelevanten Bereich ( $DL_{50}$  oral :2380mg/kg; (Sigma-Aldrich, 2011)). Die Langzeitbehandlung am Menschen im Rahmen klinischer Studien und Tolerabilitätstests mit bis zu 200mg/d wurden gut vertragen (Goulden et al., 1996, HuntingtonStudyGroup, 2004, Thomas et al., 2004). Die Dosierung in unseren Experimenten wurde mit einer loading-dose von zweimal 90mg/kg in den ersten 12h nach Trauma, sowie anschließend einer täglichen Applikation von 45mg/kg in einem auch für den Menschen sicheren therapeutischen Bereich durchgeführt. In seltenen Fällen wurden beim Menschen Nebenwirkungen wie digestive und vestibuläre Störungen (Goulden et al., 1996), permanente Verfärbung der Zähne (Good und Hussey, 2003), late-onset Fieber (Grim et al., 2003), Autoimmunhepatitis (Teitelbaum et al., 1998), Lupus (Schlienger et al., 2000) und ein Hypersensitivitätssyndrom (Settgast et al., 2003) beobachtet. Als Wirkstoff, welcher bereits Jahrzehnte zu anderen therapeutischen Zwecken verwendet wird hat sich Minocyclin als ein für die klinische Anwendung sicheres Medikament erwiesen. Aus pharmakodynamischer Sicht ist die Anwendung von Minocyclin zu neuroprotektiven Zwecken im Rahmen klinischer Studien am Menschen also möglich und wurde auch bereits mehrfach durchgeführt. Vor allem im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen wie amyotropher Lateralsklerose und Morbus Huntington wurden in den letzten Jahren vermehrt klinische Studien durchgeführt, in denen jedoch kein signifikant besseres outcome der mit Minocyclin behandelten Patientengruppe festgestellt werden konnte (Bonelli et al., 2003, Thomas et al., 2004, Gordon et al., 2004, Gordon et al., 2007). Hauptkritikpunkt der meisten Studien, war eine

zu geringe Fallzahl der einzelnen Gruppen, was sich bei Erkrankungen wie M. Huntington leicht nachvollziehen lässt.

Zumindest dieses Problem stellt sich bei klinischen Studien zur Beurteilung der neuroprotektiven Eigenschaften von Minocyclin nach Schädel-Hirn-Trauma nicht und so wird es äußerst interessant sein, die Ergebnisse der ersten Studie die dieses Ziel verfolgt, zu erhalten. Seit Februar 2010 führt die Wayne State University eine Dosis-Eskalations-Studie mit Minocyclin an Patienten mit Schädel-Hirn-Trauma durch, das Studienende ist auf Januar 2014 festgelegt. Bisher wurden leider noch keine Daten aus dieser Untersuchung veröffentlicht (<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01058395>).

Abgesehen von den bisherigen vielversprechenden Ergebnissen im Rahmen tierexperimenteller und in-vitro-Studien sollte jedoch nicht vergessen werden, dass der genaue Wirkmechanismus eines möglichen neuroprotektiven Effekts von Minocyclin nach wie vor unklar ist. Ein besseres Verständnis der inflammatorischen Interaktion von immunkompetenten Zellen im ZNS ist unabdingbar, um gezielte pharmakologische Angriffspunkte zu identifizieren. Gerade im Hinblick auf die derzeit vermehrt beginnenden klinischen Studien zur Anwendung von Minocyclin zu diesen Zwecken am Menschen sind weitere Experimente zur Grundlagenforschung unmittelbar und dringlich notwendig.

## **5 Zusammenfassung**

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss einer Minocyclin-Therapie nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma an der Ratte auf die Größe des cerebralen Läsionsvolumens sowie die Aktivierung MHC-II-positiver cerebraler Immunzellen untersucht. Hierzu wurden neben histologischen Planimetrien zur Volumenrekonstruktion immunhistochemische Färbungen zur Quantifizierung der Mikrogliareaktion durchgeführt.

### **Quantifizierung des cerebralen Läsionsvolumens**

Eine posttraumatische Behandlung mit Minocyclin führte zu einer deutlichen Reduktion des Läsionsvolumens 26d nach Trauma. Vorangehende Arbeiten anderer Autoren zeigten ähnliche Ergebnisse, auch bei Anwendung im Rahmen cerebraler Ischämien und neurodegenerativer Erkrankungen. Da zur Applikation des Traumas ein Modell verwendet wurde, welches eine hohe Reproduzierbarkeit in der Quantität des Traumas aufweist, lässt sich der Unterschied des Läsionsvolumens auf eine Reduktion des sekundären Zellschadens zurückführen. Der hierfür verantwortliche Wirkmechanismus ist nach wie vor nicht völlig geklärt. Von einer Vielzahl an vorbeschriebenen, möglichen biochemischen Mechanismen erscheint vor allem eine antiinflammatorische Wirkung von Bedeutung zu sein, welche zu einer signifikanten Senkung der intrazellulären Konzentration von Interleukin-1 $\beta$  führt.

### **Quantifizierung der Mikrogliareaktion**

Zu allen gemessenen Zeitpunkten führte die Applikation von Minocyclin zu einer deutlichen posttraumatischen Unterdrückung der Mikrogliazellenaktivierung. Zu den Zeitpunkten 24h, 48h und 96h nach Trauma war diese statistisch signifikant. Die Tatsache berücksichtigend, dass IL-1 $\beta$  nach Schädel-Hirn-Traumata vorwiegend durch aktivierte Mikrogliazellen freigesetzt wird, stützen unsere Beobachtungen die These einer antiinflammatorischen Wirkung von Minocyclin im posttraumatischen Zeitverlauf. Da dies jedoch nur die Endstrecke einer äußerst komplexen Reaktion darstellt sind zur genauen Aufklärung des Wirkungsmechanismus weitere Untersuchungen nötig, insbesondere auch im Hinblick auf eine mögliche Anwendung im Rahmen klinischer Studien.

## 6 Literaturverzeichnis

- ADAMS, H., MITCHELL, D. E., GRAHAM, D. I. & DOYLE, D. 1977. Diffuse brain damage of immediate impact type. Its relationship to 'primary brain-stem damage' in head injury. *Brain*, 100, 489--502.
- AKIYAMA, H., ITAGAKI, S. & MCGEER, P. L. 1988. Major histocompatibility complex antigen expression on rat microglia following epidural kainic acid lesions. *J Neurosci Res*, 20, 147-57.
- ALANO, C. C., YING, W. & SWANSON, R. A. 2004. Poly(ADP-ribose) polymerase-1-mediated cell death in astrocytes requires NAD<sup>+</sup> depletion and mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem*, 279, 18895-902.
- ALOISI, F., CARÈ, A., BORSELLINO, G., GALLO, P., ROSA, S., BASSANI, A., CABIBBO, A., TESTA, U., LEVI, G. & PESCHLE, C. 1992. Production of hemolymphopoietic cytokines (IL-6, IL-8, colony-stimulating factors) by normal human astrocytes in response to IL-1 beta and tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol*, 149, 2358--2366.
- AMIN, A. R., PATEL, R. N., THAKKER, G. D., LOWENSTEIN, C. J., ATTUR, M. G. & ABRAMSON, S. B. 1997. Post-transcriptional regulation of inducible nitric oxide synthase mRNA in murine macrophages by doxycycline and chemically modified tetracyclines. *FEBS Lett*, 410, 259--264.
- ANDERSON, R. W., BROWN, C. J., BLUMBERGS, P. C., MCLEAN, A. J. & JONES, N. R. 2003. Impact mechanics and axonal injury in a sheep model. *J Neurotrauma*, 20, 961-74.
- ANDERSON, T. E. 1982. A controlled pneumatic technique for experimental spinal cord contusion. *J Neurosci Methods*, 6, 327-33.
- ANTONENKO, Y. N., ROKITSKAYA, T. I., COOPER, A. J. & KRASNIKOV, B. F. 2010. Minocycline chelates Ca<sup>2+</sup>, binds to membranes, and depolarizes mitochondria by formation of Ca<sup>2+</sup>-dependent ion channels. *J Bioenerg Biomembr*, 42, 151-63.
- ARUNDINE, M., AARTS, M., LAU, A. & TYMIANSKI, M. 2004. Vulnerability of central neurons to secondary insults after in vitro mechanical stretch. *J Neurosci*, 24, 8106-23.
- ARVIN, B., NEVILLE, L. F., BARONE, F. C. & FEUERSTEIN, G. Z. 1996. The role of inflammation and cytokines in brain injury. *Neurosci Biobehav Rev*, 20, 445-52.
- ARVIN, K. L., HAN, B. H., DU, Y., LIN, S. Z., PAUL, S. M. & HOLTZMAN, D. M. 2002. Minocycline markedly protects the neonatal brain against hypoxic-ischemic injury. *Ann Neurol*, 52, 54-61.

- BAETHMANN, A. & KEMPSKI, O. (eds.) 1993. *Biochemical factors and mechanisms of secondary brain damage in cerebral ischemia and trauma. Neurochemical Correlates of Cerebral Ischemia.*
- BAETHMANN, A., WIRTH, A., SCHLESINGER-RAAB, A., OF BMBF RESEARCH CONSORTIUM NEUROTRAUMATOLOGY, S. G. & REHABILITATION, N. 2002. Prospective system analysis of the pre- and early hospital care in severe head injury in Bavaria at a population-based level. *Eur Surg Res*, 34, 42--46.
- BASU, A., KRADY, J. K. & LEVISON, S. W. 2004. Interleukin-1: a master regulator of neuroinflammation. *J Neurosci Res*, 78, 151--156.
- BEER, R., FRANZ, G., SRINIVASAN, A., HAYES, R. L., PIKE, B. R., NEWCOMB, J. K., ZHAO, X., SCHMUTZHARD, E., POEWE, W. & KAMPFL, A. 2000. Temporal profile and cell subtype distribution of activated caspase-3 following experimental traumatic brain injury. *J Neurochem*, 75, 1264-73.
- BO, L., MORK, S., KONG, P. A., NYLAND, H., PARDO, C. A. & TRAPP, B. D. 1994. Detection of MHC class II-antigens on macrophages and microglia, but not on astrocytes and endothelia in active multiple sclerosis lesions. *J Neuroimmunol*, 51, 135-46.
- BONELLI, R. M., HEUBERGER, C. & REISECKER, F. 2003. Minocycline for Huntington's disease: an open label study. *Neurology*, 60, 883-4.
- BOSCH, L. V. D., TILKIN, P., LEMMENS, G. & ROBBERECHT, W. 2002. Minocycline delays disease onset and mortality in a transgenic model of ALS. *Neuroreport*, 13, 1067--1070.
- BRUNDULA, V., REWCASTLE, N. B., METZ, L. M., BERNARD, C. C. & YONG, V. W. 2002. Targeting leukocyte MMPs and transmigration: minocycline as a potential therapy for multiple sclerosis. *Brain*, 125, 1297--1308.
- BULLER, K. M., CARTY, M. L., REINEBRANT, H. E. & WIXEY, J. A. 2009. Minocycline: a neuroprotective agent for hypoxic-ischemic brain injury in the neonate? *J Neurosci Res*, 87, 599--608.
- BYE, N., HABGOOD, M. D., CALLAWAY, J. K., MALAKOOTI, N., POTTER, A., KOSSMANN, T. & MORGANTI-KOSSMANN, M. C. 2007. Transient neuroprotection by minocycline following traumatic brain injury is associated with attenuated microglial activation but no changes in cell apoptosis or neutrophil infiltration. *Exp Neurol*, 204, 220--233.
- CARTY, M. L., WIXEY, J. A., COLDITZ, P. B. & BULLER, K. M. 2008. Post-insult minocycline treatment attenuates hypoxia-ischemia-induced neuroinflammation and white matter injury in the neonatal rat: a comparison of two different dose regimens. *Int J Dev Neurosci*, 26, 477-85.

- CEDERBERG, D. & SIESJÖ, P. 2010. What has inflammation to do with traumatic brain injury? *Childs Nerv Syst*, 26, 221--226.
- CHEN, M., ONA, V. O., LI, M., FERRANTE, R. J., FINK, K. B., ZHU, S., BIAN, J., GUO, L., FARRELL, L. A., HERSCH, S. M., HOBBS, W., VONSATTEL, J. P., CHA, J. H. & FRIEDLANDER, R. M. 2000. Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. *Nat Med*, 6, 797--801.
- CHESNUT, R. M., MARSHALL, L. F., KLAUBER, M. R., BLUNT, B. A., BALDWIN, N., EISENBERG, H. M., JANE, J. A., MARMAROU, A. & FOULKES, M. A. 1993. The role of secondary brain injury in determining outcome from severe head injury. *J Trauma*, 34, 216--222.
- CHIARETTI, A., GENOVESE, O., ALOE, L., ANTONELLI, A., PIASTRA, M., POLIDORI, G. & DI ROCCO, C. 2005. Interleukin 1beta and interleukin 6 relationship with paediatric head trauma severity and outcome. *Childs Nerv Syst*, 21, 185-93; discussion 194.
- CHONG, Z. Z., LI, F. & MAIESE, K. 2005. Oxidative stress in the brain: novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease. *Prog Neurobiol*, 75, 207-46.
- CLARK, R. S., KOCHANKEK, P. M., ADELSON, P. D., BELL, M. J., CARCILLO, J. A., CHEN, M., WISNIEWSKI, S. R., JANESKO, K., WHALEN, M. J. & GRAHAM, S. H. 2000a. Increases in bcl-2 protein in cerebrospinal fluid and evidence for programmed cell death in infants and children after severe traumatic brain injury. *J Pediatr*, 137, 197-204.
- CLARK, R. S., KOCHANKEK, P. M., WATKINS, S. C., CHEN, M., DIXON, C. E., SEIDBERG, N. A., MELICK, J., LOEFFERT, J. E., NATHANIEL, P. D., JIN, K. L. & GRAHAM, S. H. 2000b. Caspase-3 mediated neuronal death after traumatic brain injury in rats. *J Neurochem*, 74, 740-53.
- CLARK, W. M., CALCAGNO, F. A., GABLER, W. L., SMITH, J. R. & COULL, B. M. 1994. Reduction of central nervous system reperfusion injury in rabbits using doxycycline treatment. *Stroke*, 25, 1411-5; discussion 1416.
- CONTI, A. C., RAGHUPATHI, R., TROJANOWSKI, J. Q. & MCINTOSH, T. K. 1998. Experimental brain injury induces regionally distinct apoptosis during the acute and delayed post-traumatic period. *J Neurosci*, 18, 5663-72.
- CREGAN, S. P., DAWSON, V. L. & SLACK, R. S. 2004. Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Oncogene*, 23, 2785--2796.
- CUI, Y., LIAO, X. X., LIU, W., GUO, R. X., WU, Z. Z., ZHAO, C. M., CHEN, P. X. & FENG, J. Q. 2008. A novel role of minocycline: attenuating morphine antinociceptive tolerance by inhibition of p38 MAPK in the activated spinal microglia. *Brain Behav Immun*, 22, 114-23.
- CUNNINGHAM, A. S., SALVADOR, R., COLES, J. P., CHATFIELD, D. A., BRADLEY, P. G., JOHNSTON, A. J., STEINER, L. A., FRYER, T. D., AIGBIRHIO, F. I., SMIELEWSKI, P., WILLIAMS, G. B.,

- CARPENTER, T. A., GILLARD, J. H., PICKARD, J. D. & MENON, D. K. 2005. Physiological thresholds for irreversible tissue damage in contusional regions following traumatic brain injury. *Brain*, 128, 1931--1942.
- CURCIO, C. A. & SLOAN, K. R., JR. 1986. Computer-assisted morphometry using video-mixed microscopic images and computer graphics. *Anat Rec*, 214, 329-37.
- CZIGNER, A., MIHALY, A., FARKAS, O., BUKI, A., KRISZTIN-PEVA, B., DOBO, E. & BARZO, P. 2007. Kinetics of the cellular immune response following closed head injury. *Acta Neurochir (Wien)*, 149, 281-9.
- DAIL, W. G., FEENEY, D. M., MURRAY, H. M., LINN, R. T. & BOYESON, M. G. 1981. Responses to cortical injury: II. Widespread depression of the activity of an enzyme in cortex remote from a focal injury. *Brain Res*, 211, 79-89.
- DE GROOT, C. J., SMINIA, T., DIJKSTRA, C. D., VAN DER PAL, R. H. & LOPES-CARDOZO, M. 1991. Interferon-gamma induced IA antigen expression on cultured neuroglial cells and brain macrophages from rat spinal cord and cerebrum. *Int J Neurosci*, 59, 53-65.
- DEWITT, D. S. & PROUGH, D. S. 2003. Traumatic cerebral vascular injury: the effects of concussive brain injury on the cerebral vasculature. *J Neurotrauma*, 20, 795--825.
- DINARELLO, C. A. 1996. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*, 87, 2095--2147.
- DIXON, C. E., CLIFTON, G. L., LIGHTHALL, J. W., YAGHMAI, A. A. & HAYES, R. L. 1991. A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat. *J Neurosci Methods*, 39, 253-62.
- DIXON, C. E., LYETH, B. G., POVLISHOCK, J. T., FINDLING, R. L., HAMM, R. J., MARMAROU, A., YOUNG, H. F. & HAYES, R. L. 1987. A fluid percussion model of experimental brain injury in the rat. *J Neurosurg*, 67, 110-9.
- DOMMERGUES, M. A., PLAISANT, F., VERNEY, C. & GRESSENS, P. 2003. Early microglial activation following neonatal excitotoxic brain damage in mice: a potential target for neuroprotection. *Neuroscience*, 121, 619-28.
- DU, Y., MA, Z., LIN, S., DODEL, R. C., GAO, F., BALES, K. R., TRIARHOU, L. C., CHERNET, E., PERRY, K. W., NELSON, D. L., LUECKE, S., PHEBUS, L. A., BYMASTER, F. P. & PAUL, S. M. 2001. Minocycline prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 14669--14674.
- EDWARDS, P., ARANGO, M., BALICA, L., COTTINGHAM, R., EL-SAYED, H., FARRELL, B., FERNANDES, J., GOGICHAISVILI, T., GOLDEN, N., HARTZENBERG, B., HUSAIN, M., ULLOA, M. I., JERBI, Z., KHAMIS, H., KOMOLAFE, E., LALOË, V., LOMAS, G., LUDWIG, S., MAZAIRAC, G., DE LOS ANGELES MUÑOZ SANCHEZ, M., NASI, L., OLLDASHI, F.,

- PLUNKETT, P., ROBERTS, I., SANDERCOCK, P., SHAKUR, H., SOLER, C., STOCKER, R., SVOBODA, P., TRENKLER, S., VENKATARAMANA, N. K., WASSERBERG, J., YATES, D., YUTTHAKASEMSUNT, S. & TRIAL COLLABORATORS, C. R. A. S. H. 2005. Final results of MRC CRASH, a randomised placebo-controlled trial of intravenous corticosteroid in adults with head injury-outcomes at 6 months. *Lancet*, 365, 1957--1959.
- EMERY, E., ALDANA, P., BUNGE, M. B., PUCKETT, W., SRINIVASAN, A., KEANE, R. W., BETHEA, J. & LEVI, A. D. 1998. Apoptosis after traumatic human spinal cord injury. *J Neurosurg*, 89, 911-20.
- ENGEL, S., SCHLUESENER, H., MITTELBRONN, M., SEID, K., ADJODAH, D., WEHNER, H. D. & MEYERMANN, R. 2000. Dynamics of microglial activation after human traumatic brain injury are revealed by delayed expression of macrophage-related proteins MRP8 and MRP14. *Acta Neuropathol*, 100, 313-22.
- ENGEL, S., WEHNER, H. D. & MEYERMANN, R. 1996. Expression of microglial markers in the human CNS after closed head injury. *Acta Neurochir Suppl*, 66, 89-95.
- ENGELHARD, K., MÜLLER-FORELL, W. & WERNER, C. 2008. [Therapy of head trauma]. *Anaesthesist*, 57, 1219--1231.
- FAN, L. W., LIN, S., PANG, Y., RHODES, P. G. & CAI, Z. 2006. Minocycline attenuates hypoxia-ischemia-induced neurological dysfunction and brain injury in the juvenile rat. *Eur J Neurosci*, 24, 341-50.
- FEENEY, D. M., BOYESON, M. G., LINN, R. T., MURRAY, H. M. & DAIL, W. G. 1981. Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat. *Brain Res*, 211, 67-77.
- FESTOFF, B. W., AMEENUDDIN, S., ARNOLD, P. M., WONG, A., SANTACRUZ, K. S. & CITRON, B. A. 2006. Minocycline neuroprotects, reduces microgliosis, and inhibits caspase protease expression early after spinal cord injury. *J Neurochem*, 97, 1314-26.
- FILIPOVIC, R. & ZECEVIC, N. 2008. Neuroprotective role of minocycline in co-cultures of human fetal neurons and microglia. *Exp Neurol*, 211, 41-51.
- FLARIS, N. A., DENSMORE, T. L., MOLLESTON, M. C. & HICKEY, W. F. 1993. Characterization of microglia and macrophages in the central nervous system of rats: definition of the differential expression of molecules using standard and novel monoclonal antibodies in normal CNS and in four models of parenchymal reaction. *Glia*, 7, 34-40.
- FLOYD, C. L., GORIN, F. A. & LYETH, B. G. 2005. Mechanical strain injury increases intracellular sodium and reverses Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange in cortical astrocytes. *Glia*, 51, 35--46.

- FODA, M. A. & MARMAROU, A. 1994. A new model of diffuse brain injury in rats. Part II: Morphological characterization. *J Neurosurg*, 80, 301-13.
- FOLKERSMA, H., BREVÉ, J. J. P., TILDERS, F. J. H., CHERIAN, L., ROBERTSON, C. S. & VANDERTOP, W. P. 2008. Cerebral microdialysis of interleukin (IL)-1 $\beta$  and IL-6: extraction efficiency and production in the acute phase after severe traumatic brain injury in rats. *Acta Neurochir (Wien)*, 150, 1277--84; discussion 1284.
- FOX, C., DINGMAN, A., DERUGIN, N., WENDLAND, M. F., MANABAT, C., JI, S., FERRIERO, D. M. & VEXLER, Z. S. 2005. Minocycline confers early but transient protection in the immature brain following focal cerebral ischemia-reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab*, 25, 1138-49.
- GARCIA-MARTINEZ, E. M., SANZ-BLASCO, S., KARACHITOS, A., BANDEZ, M. J., FERNANDEZ-GOMEZ, F. J., PEREZ-ALVAREZ, S., DE MERA, R. M., JORDAN, M. J., AGUIRRE, N., GALINDO, M. F., VILLALOBOS, C., NAVARRO, A., KMITA, H. & JORDAN, J. 2010. Mitochondria and calcium flux as targets of neuroprotection caused by minocycline in cerebellar granule cells. *Biochem Pharmacol*, 79, 239-50.
- GEHRMANN, J., BANATI, R. B. & KREUTZBERG, G. W. 1993. Microglia in the immune surveillance of the brain: human microglia constitutively express HLA-DR molecules. *J Neuroimmunol*, 48, 189-98.
- GEHRMANN, J., SCHOEN, S. W. & KREUTZBERG, G. W. 1991. Lesion of the rat entorhinal cortex leads to a rapid microglial reaction in the dentate gyrus. A light and electron microscopical study. *Acta Neuropathol*, 82, 442-55.
- GENNARELLI, T. A., CHAMPION, H. R., COPES, W. S. & SACCO, W. J. 1994. Comparison of mortality, morbidity, and severity of 59,713 head injured patients with 114,447 patients with extracranial injuries. *J Trauma*, 37, 962--968.
- GOOD, M. L. & HUSSEY, D. L. 2003. Minocycline: stain devil? *Br J Dermatol*, 149, 237-9.
- GORDON, P. H., MOORE, D. H., GELINAS, D. F., QUALLS, C., MEISTER, M. E., WERNER, J., MENDOZA, M., MASS, J., KUSHNER, G. & MILLER, R. G. 2004. Placebo-controlled phase I/II studies of minocycline in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*, 62, 1845-7.
- GORDON, P. H., MOORE, D. H., MILLER, R. G., FLORENCE, J. M., VERHEIJDE, J. L., DOORISH, C., HILTON, J. F., SPITALNY, G. M., MACARTHUR, R. B., MITSUMOTO, H., NEVILLE, H. E., BOYLAN, K., MOZAFFAR, T., BELSH, J. M., RAVITS, J., BEDLACK, R. S., GRAVES, M. C., MCCLUSKEY, L. F., BAROHN, R. J. & TANDAN, R. 2007. Efficacy of minocycline in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a phase III randomised trial. *Lancet Neurol*, 6, 1045-53.

- GOULDEN, V., GLASS, D. & CUNLIFFE, W. J. 1996. Safety of long-term high-dose minocycline in the treatment of acne. *Br J Dermatol*, 134, 693-5.
- GRAEBER, M. B., STREIT, W. J., BURINGER, D., SPARKS, D. L. & KREUTZBERG, G. W. 1992. Ultrastructural location of major histocompatibility complex (MHC) class II positive perivascular cells in histologically normal human brain. *J Neuropathol Exp Neurol*, 51, 303-11.
- GRAHAM, D. I., RAGHUPATHI, R., SAATMAN, K. E., MEANEY, D. & MCINTOSH, T. K. 2000. Tissue tears in the white matter after lateral fluid percussion brain injury in the rat: relevance to human brain injury. *Acta Neuropathol*, 99, 117-24.
- GREVE, M. W. & ZINK, B. J. 2009. Pathophysiology of traumatic brain injury. *Mt Sinai J Med*, 76, 97--104.
- GRIM, S. A., ROMANELLI, F., JENNINGS, P. R. & OFOTOKUN, I. 2003. Late-onset drug fever associated with minocycline: case report and review of the literature. *Pharmacotherapy*, 23, 1659-62.
- GUO, G. & BHAT, N. R. 2007. p38alpha MAP kinase mediates hypoxia-induced motor neuron cell death: a potential target of minocycline's neuroprotective action. *Neurochem Res*, 32, 2160-6.
- HAINES, J. D., FRAGOSO, G., HOSSAIN, S., MUSHYNSKI, W. E. & ALMAZAN, G. 2008. p38 Mitogen-activated protein kinase regulates myelination. *J Mol Neurosci*, 35, 23-33.
- HAINS, B. C. & WAXMAN, S. G. 2006. Activated microglia contribute to the maintenance of chronic pain after spinal cord injury. *J Neurosci*, 26, 4308-17.
- HASS, G. M. & TAYLOR, C. B. 1953. Quantitative studies of experimental productive and treatment of acute closed cerebral injury. *AMA Arch Neurol Psychiatry*, 69, 145-70.
- HAUG, H. 1986. History of neuromorphometry. *J Neurosci Methods*, 18, 1-17.
- HAYES, G. M., WOODROOFE, M. N. & CUZNER, M. L. 1987a. Microglia are the major cell type expressing MHC class II in human white matter. *J Neurol Sci*, 80, 25-37.
- HAYES, R. L., STALHAMMAR, D., POVLISHOCK, J. T., ALLEN, A. M., GALINAT, B. J., BECKER, D. P. & STONNINGTON, H. H. 1987b. A new model of concussive brain injury in the cat produced by extradural fluid volume loading: II. Physiological and neuropathological observations. *Brain Inj*, 1, 93-112.
- HE, Y., APPEL, S. & LE, W. 2001. Minocycline inhibits microglial activation and protects nigral cells after 6-hydroxydopamine injection into mouse striatum. *Brain Res*, 909, 187--193.

- HEO, K., CHO, Y. J., CHO, K. J., KIM, H. W., KIM, H. J., SHIN, H. Y., LEE, B. I. & KIM, G. W. 2006. Minocycline inhibits caspase-dependent and -independent cell death pathways and is neuroprotective against hippocampal damage after treatment with kainic acid in mice. *Neurosci Lett*, 398, 195-200.
- HERSCH, S., FINK, K., VONSATTEL, J. P. & FRIEDLANDER, R. M. 2003. Minocycline is protective in a mouse model of Huntington's disease. *Ann Neurol*, 54, 841; author reply 842--841; author reply 843.
- HOLBOURN, A. 1943. Mechanics of head injuries. *Lancet*, 2, 438-441.
- HOMSI, S., FEDERICO, F., CROCI, N., PALMIER, B., PLOTKINE, M., MARCHAND-LEROUX, C. & JAFARIAN-TEHRANI, M. 2009. Minocycline effects on cerebral edema: relations with inflammatory and oxidative stress markers following traumatic brain injury in mice. *Brain Res*, 1291, 122-32.
- HOMSI, S., PIAGGIO, T., CROCI, N., NOBLE, F., PLOTKINE, M., MARCHAND-LEROUX, C. & JAFARIAN-TEHRANI, M. 2010a. Blockade of acute microglial activation by minocycline promotes neuroprotection and reduces locomotor hyperactivity after closed head injury in mice: a twelve-week follow-up study. *J Neurotrauma*, 27, 911-21.
- HOMSI, S., PIAGGIO, T., CROCI, N., NOBLE, F., PLOTKINE, M., MARCHAND-LEROUX, C. & JAFARIAN-TEHRANI, M. 2010b. Blockade of acute microglial activation by minocycline promotes neuroprotection and reduces locomotor hyperactivity following closed head injury in mice: a twelve-week follow-up study. *J Neurotrauma*.
- HORIUCHI, H., OGATA, T., MORINO, T., CHUAI, M. & YAMAMOTO, H. 2003. Continuous intrathecal infusion of SB203580, a selective inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase, reduces the damage of hind-limb function after thoracic spinal cord injury in rat. *Neurosci Res*, 47, 209-17.
- HOWARD, J. C. 1978. Genetic complexity of the rat MHC: biochemical evidence. *Rat News Letter*, 4, 12.
- HUANG, W. C., QIAO, Y., XU, L., KACIMI, R., SUN, X., GIFFARD, R. G. & YENARI, M. A. 2010. Direct protection of cultured neurons from ischemia-like injury by minocycline. *Anat Cell Biol*, 43, 325-31.
- HUNTINGTONSTUDYGROUP 2004. Minocycline safety and tolerability in Huntington disease. *Neurology*, 63, 547-9.
- JAIN, K. K. 2008. Neuroprotection in traumatic brain injury. *Drug Discov Today*, 13, 1082-9.
- JENNETT, B. 1996. Epidemiology of head injury. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 60, 362--369.

- JIANG, W., DESJARDINS, P. & BUTTERWORTH, R. F. 2009. Cerebral inflammation contributes to encephalopathy and brain edema in acute liver failure: protective effect of minocycline. *J Neurochem*, 109, 485-93.
- JOHNSTON, A. J., STEINER, L. A., COLES, J. P., CHATFIELD, D. A., FRYER, T. D., SMIELEWSKI, P., HUTCHINSON, P. J., O'CONNELL, M. T., AL-RAWI, P. G., AIGBIRIHIO, F. I., CLARK, J. C., PICKARD, J. D., GUPTA, A. K. & MENON, D. K. 2005. Effect of cerebral perfusion pressure augmentation on regional oxygenation and metabolism after head injury. *Crit Care Med*, 33, 189--95; discussion 255-7.
- JONAS, M. & CUNHA, B. A. 1982. Minocycline. *Ther Drug Monit*, 4, 137--145.
- JULIET, P. A. R., MAO, X. & BIGIO, M. R. D. 2008. Proinflammatory cytokine production by cultured neonatal rat microglia after exposure to blood products. *Brain Res*, 1210, 230--239.
- KAUFMANN, S. H. & HENGARTNER, M. O. 2001. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol*, 11, 526--534.
- KAUR, C. & LING, E. A. 1992. Activation and re-expression of surface antigen in microglia following an epidural application of kainic acid in the rat brain. *J Anat*, 180 ( Pt 2), 333-42.
- KAUR, C., YONG, E. S. & LING, E. A. 1993. Studies of activated microglia and macrophages in lumbosacral spinal cord following an intraperitoneal injection of 6-aminonicotinamide into adult rats. *Histol Histopathol*, 8, 699-707.
- KEILHOFF, G., SCHILD, L. & FANSA, H. 2008. Minocycline protects Schwann cells from ischemia-like injury and promotes axonal outgrowth in bioartificial nerve grafts lacking Wallerian degeneration. *Exp Neurol*, 212, 189-200.
- KIM, S.-S., KONG, P.-J., KIM, B.-S., SHEEN, D.-H., NAM, S.-Y. & CHUN, W. 2004. Inhibitory action of minocycline on lipopolysaccharide-induced release of nitric oxide and prostaglandin E2 in BV2 microglial cells. *Arch Pharm Res*, 27, 314--318.
- KLINKE, R. & SILBERNAGL, S. 2005. *Lehrbuch der Physiologie*, Thieme.
- KOISTINAHO, M. & KOISTINAHO, J. 2002. Role of p38 and p44/42 mitogen-activated protein kinases in microglia. *Glia*, 40, 175--183.
- KRADY, J. K., BASU, A., ALLEN, C. M., XU, Y., LANOUE, K. F., GARDNER, T. W. & LEVISON, S. W. 2005. Minocycline reduces proinflammatory cytokine expression, microglial activation, and caspase-3 activation in a rodent model of diabetic retinopathy. *Diabetes*, 54, 1559-65.

- KREUTZBERG, G. W. 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*, 19, 312-8.
- KRIZ, J., NGUYEN, M. D. & JULIEN, J.-P. 2002. Minocycline slows disease progression in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis*, 10, 268--278.
- LAURER, H. L., LENZLINGER, P. M. & MCINTOSH, T. K. 2000. Models of Traumatic Brain Injury. *Eur J Trauma*, 3, 95-110.
- LECHPAMMER, M., MANNING, S. M., SAMONTE, F., NELLIGAN, J., SABO, E., TALOS, D. M., VOLPE, J. J. & JENSEN, F. E. 2008. Minocycline treatment following hypoxic/ischaemic injury attenuates white matter injury in a rodent model of periventricular leucomalacia. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 34, 379-93.
- LEDEBOER, A., SLOANE, E. M., MILLIGAN, E. D., FRANK, M. G., MAHONY, J. H., MAIER, S. F. & WATKINS, L. R. 2005. Minocycline attenuates mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in rat models of pain facilitation. *Pain*, 115, 71-83.
- LEE, S. M., YUNE, T. Y., KIM, S. J., KIM, Y. C., OH, Y. J., MARKELONIS, G. J. & OH, T. H. 2004. Minocycline inhibits apoptotic cell death via attenuation of TNF-alpha expression following iNOS/NO induction by lipopolysaccharide in neuron/glia co-cultures. *J Neurochem*, 91, 568--578.
- LEE, S. M., YUNE, T. Y., KIM, S. J., PARK, D. W., LEE, Y. K., KIM, Y. C., OH, Y. J., MARKELONIS, G. J. & OH, T. H. 2003. Minocycline reduces cell death and improves functional recovery after traumatic spinal cord injury in the rat. *J Neurotrauma*, 20, 1017--1027.
- LIGHTHALL, J. W. 1988. Controlled cortical impact: a new experimental brain injury model. *J Neurotrauma*, 5, 1-15.
- LODDICK, S. & ROTHWELL, N. 2002. Cytokines and neurodegeneration. In: ROTHWELL, N. & LODDICK, S. (eds.) *Immune and Inflammatory Responses in the Nervous System*. Oxford: Oxford University Press.
- LOVE, S., BARBER, R. & WILCOCK, G. K. 1998. Apoptosis and expression of DNA repair proteins in ischaemic brain injury in man. *Neuroreport*, 9, 955-9.
- LU, J., MOOCHHALA, S., KAUR, C. & LING, E. A. 2001. Cellular inflammatory response associated with breakdown of the blood-brain barrier after closed head injury in rats. *J Neurotrauma*, 18, 399-408.
- LUCAS, S.-M., ROTHWELL, N. J. & GIBSON, R. M. 2006. The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br J Pharmacol*, 147 Suppl 1, S232--S240.

- MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. 2003. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc*, 75, 469-86.
- MARCHAND, F., TSANTOULAS, C., SINGH, D., GRIST, J., CLARK, A. K., BRADBURY, E. J. & MCMAHON, S. B. 2009. Effects of Etanercept and Minocycline in a rat model of spinal cord injury. *Eur J Pain*, 13, 673-81.
- MARMAROU, A., FODA, M. A., VAN DEN BRINK, W., CAMPBELL, J., KITA, H. & DEMETRIADOU, K. 1994. A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics. *J Neurosurg*, 80, 291-300.
- MARMAROU, A., SIGNORETTI, S., FATOUROS, P. P., PORTELLA, G., AYGOK, G. A. & BULLOCK, M. R. 2006. Predominance of cellular edema in traumatic brain swelling in patients with severe head injuries. *J Neurosurg*, 104, 720--730.
- MARSHALL, L., GAUTILLE, T. & KLAUBER, M. 1991. The outcome of severe closed head injury. *J Neurosurg*, 75, 28-36.
- MATSUKAWA, N., YASUHARA, T., HARA, K., XU, L., MAKI, M., YU, G., KANEKO, Y., OJIKI, K., HESS, D. C. & BORLONGAN, C. V. 2009. Therapeutic targets and limits of minocycline neuroprotection in experimental ischemic stroke. *BMC Neurosci*, 10, 126.
- MCINTOSH, T. K., NOBLE, L., ANDREWS, B. & FADEN, A. I. 1987. Traumatic brain injury in the rat: characterization of a midline fluid-percussion model. *Cent Nerv Syst Trauma*, 4, 119-34.
- MCINTOSH, T. K., SAATMAN, K. E., RAGHUPATHI, R., GRAHAM, D. I., SMITH, D. H., LEE, V. M. & TROJANOWSKI, J. Q. 1998. The Dorothy Russell Memorial Lecture. The molecular and cellular sequelae of experimental traumatic brain injury: pathogenetic mechanisms. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 24, 251--267.
- MCMASTER, W. R. & WILLIAMS, A. F. 1979a. Identification of Ia glycoproteins in rat thymus and purification from rat spleen. *Eur J Immunol*, 9, 426-33.
- MCMASTER, W. R. & WILLIAMS, A. F. 1979b. Monoclonal antibodies to Ia antigens from rat thymus: cross reactions with mouse and human and use in purification of rat Ia glycoproteins. *Immunol Rev*, 47, 117-37.
- MEJIA, R. O. S., ONA, V. O., LI, M. & FRIEDLANDER, R. M. 2001. Minocycline reduces traumatic brain injury-mediated caspase-1 activation, tissue damage, and neurological dysfunction. *Neurosurgery*, 48, 1393--9; discussion 1399-401.
- MENDELOW, A. D. & TEASDALE, G. M. 1983. Pathophysiology of head injuries. *Br J Surg*, 70, 641-650.

- MORALES, D. M., MARKLUND, N., LEBOLD, D., THOMPSON, H. J., PITKANEN, A., MAXWELL, W. L., LONGHI, L., LAURER, H., MAEGELE, M., NEUGEBAUER, E., GRAHAM, D. I., STOCCHETTI, N. & MCINTOSH, T. K. 2005. Experimental models of traumatic brain injury: do we really need to build a better mousetrap? *Neuroscience*, 136, 971-89.
- MORGANTI-KOSSMANN, M., LENZLINGER, P., HANS, V., STAHEL, P., CSUKA, E., AMMANN, E., STOCKER, R., TRENTZ, O. & KOSSMANN, T. 1997. Production of cytokines following brain injury: beneficial and deleterious for the damaged tissue. *Mol Psychiatrie*, 2, 133-136.
- MORGANTI-KOSSMANN, M. C., RANCAN, M., OTTO, V. I., STAHEL, P. F. & KOSSMANN, T. 2001. Role of cerebral inflammation after traumatic brain injury: a revisited concept. *Shock*, 16, 165-177.
- MORGANTI-KOSSMANN, M. C., RANCAN, M., STAHEL, P. F. & KOSSMANN, T. 2002. Inflammatory response in acute traumatic brain injury: a double-edged sword. *Curr Opin Crit Care*, 8, 101-5.
- MORIMOTO, N., SHIMAZAWA, M., YAMASHIMA, T., NAGAI, H. & HARA, H. 2005. Minocycline inhibits oxidative stress and decreases in vitro and in vivo ischemic neuronal damage. *Brain Res*, 1044, 8-15.
- MORIOKA, T., KALEHUA, A. N. & STREIT, W. J. 1992. Progressive expression of immunomolecules on microglial cells in rat dorsal hippocampus following transient forebrain ischemia. *Acta Neuropathol*, 83, 149-57.
- MORIOKA, T. & STREIT, W. J. 1991. Expression of immunomolecules on microglial cells following neonatal sciatic nerve axotomy. *J Neuroimmunol*, 35, 21-30.
- MOUBARAK, R. S., YUSTE, V. J., ARTUS, C., BOUHARROUR, A., GREER, P. A., MENISSIER-DE MURCIA, J. & SUSIN, S. A. 2007. Sequential activation of poly(ADP-ribose) polymerase 1, calpains, and Bax is essential in apoptosis-inducing factor-mediated programmed necrosis. *Mol Cell Biol*, 27, 4844-62.
- NICHOLSON, D. W. & THORNBERRY, N. A. 1997. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci*, 22, 299-306.
- NOLL, S. 2000. Praxis der Immunhistochemie. MÃ¼nchen: Urban und Fischer.
- OMMAYA, A. K., GRUBB, R. L. & NAUMANN, R. A. 1971. Coup and contre-coup injury: observations on the mechanics of visible brain injuries in the rhesus monkey. *J Neurosurg*, 35, 503-516.
- ORIHARA, Y., IKEMATSU, K., TSUDA, R. & NAKASONO, I. 2001. Induction of nitric oxide synthase by traumatic brain injury. *Forensic Sci Int*, 123, 142-9.

- PARK, S. Y., LEE, H., HUR, J., KIM, S. Y., KIM, H., PARK, J. H., CHA, S., KANG, S. S., CHO, G. J., CHOI, W. S. & SUK, K. 2002. Hypoxia induces nitric oxide production in mouse microglia via p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Brain Res Mol Brain Res*, 107, 9-16.
- PEREL, P., ROBERTS, I., SHAKUR, H., THINKHAMROP, B., PHUENPATHOM, N. & YUTTHAKASEMSUNT, S. 2010. Haemostatic drugs for traumatic brain injury. *Cochrane Database Syst Rev*, 1, CD007877.
- PIAO, C. S., KIM, J. B., HAN, P. L. & LEE, J. K. 2003. Administration of the p38 MAPK inhibitor SB203580 affords brain protection with a wide therapeutic window against focal ischemic insult. *J Neurosci Res*, 73, 537-44.
- POPOVIC, N., SCHUBART, A., GOETZ, B. D., ZHANG, S.-C., LININGTON, C. & DUNCAN, I. D. 2002. Inhibition of autoimmune encephalomyelitis by a tetracycline. *Ann Neurol*, 51, 215--223.
- POPOVICH, P. G., WEI, P. & STOKES, B. T. 1997. Cellular inflammatory response after spinal cord injury in Sprague-Dawley and Lewis rats. *J Comp Neurol*, 377, 443-64.
- PRUZANSKI, W., GREENWALD, R. A., STREET, I. P., LALIBERTE, F., STEFANSKI, E. & VADAS, P. 1992. Inhibition of enzymatic activity of phospholipases A2 by minocycline and doxycycline. *Biochem Pharmacol*, 44, 1165--1170.
- REDIN, G. S. 1966. Antibacterial activity in mice of minocycline, a new tetracycline. *Antimicrob Agents Chemother (Bethesda)*, 6, 371-6.
- RINK, A., FUNG, K. M., TROJANOWSKI, J. Q., LEE, V. M., NEUGEBAUER, E. & MCINTOSH, T. K. 1995. Evidence of apoptotic cell death after experimental traumatic brain injury in the rat. *Am J Pathol*, 147, 1575-83.
- ROBINSON, A. P., WHITE, T. M. & MASON, D. W. 1986. Macrophage heterogeneity in the rat as delineated by two monoclonal antibodies MRC OX-41 and MRC OX-42, the latter recognizing complement receptor type 3. *Immunology*, 57, 239-47.
- ROMEIS, B. 1989. Mikroskopische Technik. MÃ¼nchen: Urban & Schwarzenberg.
- ROSE, J. C., NEILL, T. A. & HEMPHILL, J. C. 2006. Continuous monitoring of the microcirculation in neurocritical care: an update on brain tissue oxygenation. *Curr Opin Crit Care*, 12, 97--102.
- ROSEN, G. D. & HARRY, J. D. 1990. Brain volume estimation from serial section measurements: a comparison of methodologies. *J Neurosci Methods*, 35, 115-24.
- ROTHWELL, N. 2003. Interleukin-1 and neuronal injury: mechanisms, modification, and therapeutic potential. *Brain Behav Immun*, 17, 152-7.

- ROTHWELL, N. J. & LUHESHI, G. N. 2000. Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. *Trends Neurosci*, 23, 618--625.
- RYU, J. K., CHOI, H. B. & MCLARNON, J. G. 2006. Combined minocycline plus pyruvate treatment enhances effects of each agent to inhibit inflammation, oxidative damage, and neuronal loss in an excitotoxic animal model of Huntington's disease. *Neuroscience*, 141, 1835-48.
- RYU, J. K., FRANCIOSI, S., SATTAYAPRASERT, P., KIM, S. U. & MCLARNON, J. G. 2004. Minocycline inhibits neuronal death and glial activation induced by beta-amyloid peptide in rat hippocampus. *Glia*, 48, 85--90.
- SAPADIN, A. N. & FLEISCHMAJER, R. 2006. Tetracyclines: nonantibiotic properties and their clinical implications. *J Am Acad Dermatol*, 54, 258-65.
- SASAKI, A. & NAKAZATO, Y. 1992. The identity of cells expressing MHC class II antigens in normal and pathological human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 18, 13-26.
- SAVITZ, S. I. & ROSENBAUM, D. M. 1998. Apoptosis in neurological disease. *Neurosurgery*, 42, 555-72; discussion 573-4.
- SCHLIENGER, R. G., BIRCHER, A. J. & MEIER, C. R. 2000. Minocycline-induced lupus. A systematic review. *Dermatology*, 200, 223-31.
- SCHOUTEN, J. W. 2007. Neuroprotection in traumatic brain injury: a complex struggle against the biology of nature. *Curr Opin Crit Care*, 13, 134--142.
- SCHWAB, J. M., BRECHTEL, K., NGUYEN, T. D. & SCHLUESENER, H. J. 2000. Persistent accumulation of cyclooxygenase-1 (COX-1) expressing microglia/macrophages and upregulation by endothelium following spinal cord injury. *J Neuroimmunol*, 111, 122-30.
- SCHWAB, J. M., SEID, K. & SCHLUESENER, H. J. 2001. Traumatic brain injury induces prolonged accumulation of cyclooxygenase-1 expressing microglia/brain macrophages in rats. *J Neurotrauma*, 18, 881-90.
- SEABROOK, T. J., JIANG, L., MAIER, M. & LEMERE, C. A. 2006. Minocycline affects microglia activation, Abeta deposition, and behavior in APP-tg mice. *Glia*, 53, 776-82.
- SETHNA, M. P. & LAMPSON, L. A. 1991. Immune modulation within the brain: recruitment of inflammatory cells and increased major histocompatibility antigen expression following intracerebral injection of interferon-gamma. *J Neuroimmunol*, 34, 121-32.
- SETTGAST, A. M., GROTH, T. & GERTNER, E. 2003. Minocycline-induced central nervous system-pulmonary hypersensitivity syndrome. *Int J Dermatol*, 42, 316-7.
- SIGMA-ALDRICH 2011. Datenblatt Minocyclin.

- SMITH, D. H., SOARES, H. D., PIERCE, J. S., PERLMAN, K. G., SAATMAN, K. E., MEANEY, D. F., DIXON, C. E. & MCINTOSH, T. K. 1995. A model of parasagittal controlled cortical impact in the mouse: cognitive and histopathologic effects. *J Neurotrauma*, 12, 169-78.
- SMITH, F. M., RAGHUPATHI, R., MACKINNON, M. A., MCINTOSH, T. K., SAATMAN, K. E., MEANEY, D. F. & GRAHAM, D. I. 2000. TUNEL-positive staining of surface contusions after fatal head injury in man. *Acta Neuropathol*, 100, 537-45.
- SRIRAM, K., MILLER, D. B. & O'CALLAGHAN, J. P. 2006. Minocycline attenuates microglial activation but fails to mitigate striatal dopaminergic neurotoxicity: role of tumor necrosis factor-alpha. *J Neurochem*, 96, 706-18.
- STALHAMMAR, D., GALINAT, B. J., ALLEN, A. M., BECKER, D. P., STONNINGTON, H. H. & HAYES, R. L. 1987. A new model of concussive brain injury in the cat produced by extradural fluid volume loading: I. Biomechanical properties. *Brain Inj*, 1, 73-91.
- STATISTISCHES BUNDESAMT WIESBADEN 2007. Sterbefälle 2007 nach ausgewählten Todesursachen, Altersgruppen und Geschlecht.
- STEINIGER, B. & VAN DER MEIDE, P. H. 1988. Rat ependyma and microglia cells express class II MHC antigens after intravenous infusion of recombinant gamma interferon. *J Neuroimmunol*, 19, 111-8.
- STIRLING, D. P., KHODARAHMI, K., LIU, J., MCPHAIL, L. T., MCBRIDE, C. B., STEEVES, J. D., RAMER, M. S. & TETZLAFF, W. 2004. Minocycline treatment reduces delayed oligodendrocyte death, attenuates axonal dieback, and improves functional outcome after spinal cord injury. *J Neurosci*, 24, 2182--2190.
- STIRLING, D. P., KOOCHESFAHANI, K. M., STEEVES, J. D. & TETZLAFF, W. 2005. Minocycline as a neuroprotective agent. *Neuroscientist*, 11, 308-22.
- STREIT, W. J., GRAEBER, M. B. & KREUTZBERG, G. W. 1989a. Expression of Ia antigen on perivascular and microglial cells after sublethal and lethal motor neuron injury. *Exp Neurol*, 105, 115-26.
- STREIT, W. J., GRAEBER, M. B. & KREUTZBERG, G. W. 1989b. Peripheral nerve lesion produces increased levels of major histocompatibility complex antigens in the central nervous system. *J Neuroimmunol*, 21, 117-23.
- STUMMER, W., WEBER, K., TRANMER, B., BAETHMANN, A. & KEMPSKI, O. 1994. Reduced mortality and brain damage after locomotor activity in gerbil forebrain ischemia. *Stroke*, 25, 1862--1869.
- SULLIVAN, P. G., KELLER, J. N., BUSSEN, W. L. & SCHEFF, S. W. 2002. Cytochrome c release and caspase activation after traumatic brain injury. *Brain Res*, 949, 88-96.

- TAGLIAFERRI, F., COMPAGNONE, C., KORSIC, M., SERVADEI, F. & KRAUS, J. 2006. A systematic review of brain injury epidemiology in Europe. *Acta Neurochir (Wien)*, 148, 255--68; discussion 268.
- TAN, A. M., ZHAO, P., WAXMAN, S. G. & HAINS, B. C. 2009. Early microglial inhibition preemptively mitigates chronic pain development after experimental spinal cord injury. *J Rehabil Res Dev*, 46, 123-33.
- TANG, X. N., WANG, Q., KOIKE, M. A., CHENG, D., GORIS, M. L., BLANKENBERG, F. G. & YENARI, M. A. 2007. Monitoring the protective effects of minocycline treatment with radiolabeled annexin V in an experimental model of focal cerebral ischemia. *J Nucl Med*, 48, 1822-8.
- TANG, Y. P., NODA, Y., HASEGAWA, T. & NABESHIMA, T. 1997. A concussive-like brain injury model in mice (II): selective neuronal loss in the cortex and hippocampus. *J Neurotrauma*, 14, 863-73.
- TAUPIN, V., TOULMOND, S., SERRANO, A., BENAVIDES, J. & ZAVALA, F. 1993. Increase in IL-6, IL-1 and TNF levels in rat brain following traumatic lesion. Influence of pre- and post-traumatic treatment with Ro5 4864, a peripheral-type (p site) benzodiazepine ligand. *J Neuroimmunol*, 42, 177--185.
- TAVAZZI, B., SIGNORETTI, S., LAZZARINO, G., AMORINI, A. M., DELFINI, R., CIMATTI, M., MARMAROU, A. & VAGNOZZI, R. 2005. Cerebral oxidative stress and depression of energy metabolism correlate with severity of diffuse brain injury in rats. *Neurosurgery*, 56, 582-9; discussion 582-9.
- TEASDALE, G. 1976. Assessment of head injuries. *Br J Anaesth*, 48, 761--766.
- TEASDALE, G. & JENNETT, B. 1974. Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. *Lancet*, 2, 81--84.
- TEASDALE, G. & JENNETT, B. 1976. Assessment and prognosis of coma after head injury. *Acta Neurochir (Wien)*, 34, 45--55.
- TEITELBAUM, J. E., PEREZ-ATAYDE, A. R., COHEN, M., BOUSVAROS, A. & JONAS, M. M. 1998. Minocycline-related autoimmune hepatitis: case series and literature review. *Arch Pediatr Adolesc Med*, 152, 1132-6.
- THOMAS, M., ASHIZAWA, T. & JANKOVIC, J. 2004. Minocycline in Huntington's disease: a pilot study. *Mov Disord*, 19, 692-5.
- THOMAS, M. & LE, W. D. 2004. Minocycline: neuroprotective mechanisms in Parkinson's disease. *Curr Pharm Des*, 10, 679--686.

- THOMAS, M., LE, W. D. & JANKOVIC, J. 2003. Minocycline and other tetracycline derivatives: a neuroprotective strategy in Parkinson's disease and Huntington's disease. *Clin Neuropharmacol*, 26, 18--23.
- TIKKA, T., FIEBICH, B. L., GOLDSTEINS, G., KEINANEN, R. & KOISTINAHO, J. 2001. Minocycline, a tetracycline derivative, is neuroprotective against excitotoxicity by inhibiting activation and proliferation of microglia. *J Neurosci*, 21, 2580--2588.
- TIKKA, T. M. & KOISTINAHO, J. E. 2001a. Minocycline provides neuroprotection against N-methyl-D-aspartate neurotoxicity by inhibiting microglia. *J Immunol*, 166, 7527-33.
- TIKKA, T. M. & KOISTINAHO, J. E. 2001b. Minocycline provides neuroprotection against N-methyl-D-aspartate neurotoxicity by inhibiting microglia. *J Immunol*, 166, 7527--7533.
- TIKKA, T. M., VARTIAINEN, N. E., GOLDSTEINS, G., OJA, S. S., ANDERSEN, P. M., MARKLUND, S. L. & KOISTINAHO, J. 2002. Minocycline prevents neurotoxicity induced by cerebrospinal fluid from patients with motor neurone disease. *Brain*, 125, 722-31.
- TOMAS-CAMARDIEL, M., RITE, I., HERRERA, A. J., DE PABLOS, R. M., CANO, J., MACHADO, A. & VENERO, J. L. 2004. Minocycline reduces the lipopolysaccharide-induced inflammatory reaction, peroxynitrite-mediated nitration of proteins, disruption of the blood-brain barrier, and damage in the nigral dopaminergic system. *Neurobiol Dis*, 16, 190-201.
- TSUJI, M., WILSON, M. A., LANGE, M. S. & JOHNSTON, M. V. 2004. Minocycline worsens hypoxic-ischemic brain injury in a neonatal mouse model. *Exp Neurol*, 189, 58-65.
- ULVESTAD, E., WILLIAMS, K., BO, L., TRAPP, B., ANTEL, J. & MORK, S. 1994. HLA class II molecules (HLA-DR, -DP, -DQ) on cells in the human CNS studied in situ and in vitro. *Immunology*, 82, 535-41.
- UNTERBERG, A. W., STOVER, J., KRESS, B. & KIENING, K. L. 2004. Edema and brain trauma. *Neuroscience*, 129, 1021-9.
- UYLINGS, H. B., VAN EDEN, C. G. & HOFMAN, M. A. 1986. Morphometry of size/volume variables and comparison of their bivariate relations in the nervous system under different conditions. *J Neurosci Methods*, 18, 19-37.
- VAHSEN, N., CANDE, C., BRIERE, J. J., BENIT, P., JOZA, N., LAROCLETTE, N., MASTROBERARDINO, P. G., PEQUIGNOT, M. O., CASARES, N., LAZAR, V., FERAUD, O., DEBILI, N., WISSING, S., ENGELHARDT, S., MADEO, F., PIACENTINI, M., PENNINGER, J. M., SCHAGGER, H., RUSTIN, P. & KROEMER, G. 2004. AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation. *EMBO J*, 23, 4679-89.

- VAN LANDEGHEM, F. K. H., WEISS, T., OEHMICHEN, M. & VON DEIMLING, A. 2006. Decreased expression of glutamate transporters in astrocytes after human traumatic brain injury. *J Neurotrauma*, 23, 1518--1528.
- VAN LOO, G., SAELENS, X., VAN GURP, M., MACFARLANE, M., MARTIN, S. J. & VANDENABEELE, P. 2002. The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death Differ*, 9, 1031-42.
- VASS, K. & LASSMANN, H. 1990. Intrathecal application of interferon gamma. Progressive appearance of MHC antigens within the rat nervous system. *Am J Pathol*, 137, 789-800.
- VISCOMI, M. T., LATINI, L., FLORENZANO, F., BERNARDI, G. & MOLINARI, M. 2008. Minocycline attenuates microglial activation but fails to mitigate degeneration in inferior olive and pontine nuclei after focal cerebellar lesion. *Cerebellum*, 7, 401-5.
- VIVIANI, B., BARTESAGHI, S., CORSINI, E., GALLI, C. L. & MARINOVICH, M. 2004. Cytokines role in neurodegenerative events. *Toxicol Lett*, 149, 85--89.
- WADA, T. & PENNINGER, J. M. 2004. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene*, 23, 2838-49.
- WANG, C. X., YANG, T. & SHUAIB, A. 2003a. Effects of minocycline alone and in combination with mild hypothermia in embolic stroke. *Brain Res*, 963, 327--329.
- WANG, J., WEI, Q., WANG, C.-Y., HILL, W. D., HESS, D. C. & DONG, Z. 2004. Minocycline up-regulates Bcl-2 and protects against cell death in mitochondria. *J Biol Chem*, 279, 19948--19954.
- WANG, K. K. W., LARNER, S. F., ROBINSON, G. & HAYES, R. L. 2006. Neuroprotection targets after traumatic brain injury. *Curr Opin Neurol*, 19, 514--519.
- WANG, X., ZHU, S., DROZDA, M., ZHANG, W., STAVROVSKAYA, I. G., CATTANEO, E., FERRANTE, R. J., KRISTAL, B. S. & FRIEDLANDER, R. M. 2003b. Minocycline inhibits caspase-independent and -dependent mitochondrial cell death pathways in models of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 10483--10487.
- WANG, X., ZHU, S., DROZDA, M., ZHANG, W., STAVROVSKAYA, I. G., CATTANEO, E., FERRANTE, R. J., KRISTAL, B. S. & FRIEDLANDER, R. M. 2003c. Minocycline inhibits caspase-independent and -dependent mitochondrial cell death pathways in models of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 10483-7.
- WENNERSTRAND, J., DEL CORRAL-GUTIERREZ, J. F. & SARBY, B. 1967. Histologic and volumetric study of intracerebral cold lesions. *Acta Neurol Scand*, 43, 451-63.

- WERNER, C. & ENGELHARD, K. 2007. Pathophysiology of traumatic brain injury. *Br J Anaesth*, 99, 4--9.
- WILLIAMS, K. A., HART, D. N., FABRE, J. W. & MORRIS, P. J. 1980. Distribution and quantitation of HLA-ABC and DR (Ia) antigens on human kidney and other tissues. *Transplantation*, 29, 274-79.
- WOODROOFE, M. N., SARNA, G. S., WADHWA, M., HAYES, G. M., LOUGHLIN, A. J., TINKER, A. & CUZNER, M. L. 1991. Detection of interleukin-1 and interleukin-6 in adult rat brain, following mechanical injury, by in vivo microdialysis: evidence of a role for microglia in cytokine production. *J Neuroimmunol*, 33, 227--236.
- WU, D. C., JACKSON-LEWIS, V., VILA, M., TIEU, K., TEISMANN, P., VADSETH, C., CHOI, D. K., ISCHIROPOULOS, H. & PRZEDBORSKI, S. 2002. Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson disease. *J Neurosci*, 22, 1763-71.
- XIONG, Y., MAHMOOD, A. & CHOPP, M. 2009. Emerging treatments for traumatic brain injury. *Expert Opin Emerg Drugs*, 14, 67-84.
- XU, J., KAUR, C. & LING, E. A. 1993. Variation with age in the labelling of amoeboid microglial cells in rats following intraperitoneal or intravenous injection of a fluorescent dye. *J Anat*, 182 ( Pt 1), 55-63.
- XU, L., FAGAN, S. C., WALLER, J. L., EDWARDS, D., BORLONGAN, C. V., ZHENG, J., HILL, W. D., FEUERSTEIN, G. & HESS, D. C. 2004. Low dose intravenous minocycline is neuroprotective after middle cerebral artery occlusion-reperfusion in rats. *BMC Neurol*, 4, 7.
- YAKOVLEV, A. G. & FADEN, A. I. 2001. Caspase-dependent apoptotic pathways in CNS injury. *Mol Neurobiol*, 24, 131-44.
- YAKOVLEV, A. G., KNOBLACH, S. M., FAN, L., FOX, G. B., GOODNIGHT, R. & FADEN, A. I. 1997. Activation of CPP32-like caspases contributes to neuronal apoptosis and neurological dysfunction after traumatic brain injury. *J Neurosci*, 17, 7415-24.
- YANG, L., SUGAMA, S., CHIRICHIGNO, J. W., GREGORIO, J., LORENZL, S., SHIN, D. H., BROWNE, S. E., SHIMIZU, Y., JOH, T. H., BEAL, M. F. & ALBERS, D. S. 2003. Minocycline enhances MPTP toxicity to dopaminergic neurons. *J Neurosci Res*, 74, 278-85.
- YONG, V. W., WELLS, J., GIULIANI, F., CASHA, S., POWER, C. & METZ, L. M. 2004. The promise of minocycline in neurology. *Lancet Neurol*, 3, 744--751.

- YRJANHEIKKI, J., KEINANEN, R., PELLIKKA, M., HOKFELT, T. & KOISTINAHO, J. 1998. Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 15769-74.
- YRJANHEIKKI, J., TIKKA, T., KEINANEN, R., GOLDSTEINS, G., CHAN, P. H. & KOISTINAHO, J. 1999. A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 13496-500.
- ZARUBIN, T. & HAN, J. 2005. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res*, 15, 11-8.
- ZHANG, W., NARAYANAN, M. & FRIEDLANDER, R. M. 2003. Additive neuroprotective effects of minocycline with creatine in a mouse model of ALS. *Ann Neurol*, 53, 267--270.
- ZHANG, Z., ARTELT, M., BURNET, M., TRAUTMANN, K. & SCHLUESENER, H. J. 2006. Early infiltration of CD8+ macrophages/microglia to lesions of rat traumatic brain injury. *Neuroscience*, 141, 637-44.
- ZHANG, Z. G., CHOPP, M. & POWERS, C. 1997. Temporal profile of microglial response following transient (2 h) middle cerebral artery occlusion. *Brain Research*, 744, 189-198.
- ZHU, S., STAVROVSKAYA, I. G., DROZDA, M., KIM, B. Y. S., ONA, V., LI, M., SARANG, S., LIU, A. S., HARTLEY, D. M., WU, D. C., GULLANS, S., FERRANTE, R. J., PRZEDBORSKI, S., KRISTAL, B. S. & FRIEDLANDER, R. M. 2002. Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Nature*, 417, 74--78.

## 7 Anhang

### 7.1 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt *Herrn Prof. Dr. med. Alexander Brawanski*, der die Durchführung der Dissertation in den Forschungslaboren seiner Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie am Universitätsklinikum Regensburg ermöglicht hat.

Meiner *Betreuerin Frau Dr. med. Sylvia Bele* danke ich für die Überlassung dieser sehr interessanten Fragestellung sowie ihre Unterstützung und ständige Erreichbarkeit während der Durchführung meiner Arbeit. Die Gelassenheit und die Ruhe mit der sie mir während jeder Phase der Erstellung zur Seite stand, haben mich sehr beeindruckt.

Dem *Forschungsleiter Herrn Dr. med. Martin Proescholdt* möchte ich für seine freundliche und konstruktive Kritik, sowie seine Hilfe bei der Erstellung der Statistik danken.

*Frau Eva-Maria Störr* hat mich sowohl als MTA bei der praktischen Durchführung der Experimente als auch menschlich in wertvoller Weise unterstützt. Ihre unkomplizierte Art, ihre fachliche Kompetenz sowie ihre ständige Hilfsbereitschaft habe ich sehr geschätzt. Ich möchte mich daher in diesem Rahmen nochmals besonders dafür bedanken.

Der speziellste Dank gilt meiner *Familie* sowie meiner Freundin *Anne-Kathrin Tamm*, bei denen ich immer Unterstützung und ausgleichende Ruhe fand.

## 7.2 Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

Name:	Christoph Geier
Geburtstag:	8. September 1983
Geburtsort:	Landshut
Familienstand:	Ledig
Konfession:	Katholisch

### Schulische Ausbildung

---

1990-1994:	Grundschule Karl Heiss, Landshut
1994-2001:	Hans-Carossa-Gymnasium, Landshut
2001-2003:	Hans-Leinberger-Gymnasium, Landshut
Juni 2003:	Abitur

### Hochschulausbildung

---

2003 - 2009:	Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg
09 / 2005:	Abschluss des ersten Abschnitts der ärztlichen Prüfung
11 / 2009:	Abschluss des zweiten Abschnitts der ärztlichen Prüfung

### Beruflicher Werdegang

---

04/2010– 04/2012	Assistenzarzt an der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie, Uniklinikum Leipzig, Prof. U. Kaisers
Seit 06/2012	Assistenzarzt an der Klinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie, Hôpital Riviera, Montreux, Schweiz