

Aus dem Institut für Anatomie II - Experimentelle Morphologie  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf  
(Direktor: Prof. Dr. Udo Schumacher)

## **Vorkommen und Verteilung von Hyaluronan im normalen Gehirn und bei Hirnödemen**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin  
dem Fachbereich der Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Marian Schmidt-Belden  
aus Bielefeld  
Hamburg 2010

**(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)**

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 27.01.2011**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: *Prof. Dr. U. Schumacher***

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: *PD Dr. C. Buhmann***

**Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: *Prof. Dr. E. Förster***

# **Inhaltsverzeichnis**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG</b> -----   | <b>2</b>  |
| <b>2. EINLEITUNG</b> -----   | <b>3</b>  |
| <b>3. MATERIAL UND METHODEN</b> -----  | <b>15</b> |
| <b>3.1 HISTOLOGISCHES UNTERSUCHUNGSGUT</b> -----   | <b>15</b> |
| <b>3.2 DIE ANFERTIGUNG VON PARAFFINSCHNITTEN</b> -----   | <b>16</b> |
| <b>3.3 HISTOCHEMIE MIT EINEM HYALURONSÄURE BINDENDEN PROTEIN (HABP)</b> --                               | <b>16</b> |
| <b>3.4 HÄMATOXYLIN-EOSIN FÄRBUNG</b> -----   | <b>18</b> |
| <b>3.5 FÄRBUNG DER AQUAPORINE</b> -----  | <b>18</b> |
| <b>4. ERGEBNISSE</b> -----   | <b>19</b> |
| <b>4.1 KORRELATION ZWISCHEN DER SCHWERE DES HIRNÖDEMS UND DEM<br/>    VORKOMMEN VON HYALURONAN</b> ----- | <b>20</b> |
| <b>4.2 KORRELATION ZWISCHEN DER SCHWERE DES HIRNÖDEMS UND DER<br/>    AQUAPORINEXPRESSION</b> -----      | <b>22</b> |
| <b>5. DISKUSSION</b> -----   | <b>28</b> |
| <b>6. ZUSAMMENFASSUNG</b> -----  | <b>33</b> |
| <b>7. LITERATURVERZEICHNIS</b> -----   | <b>34</b> |
| <b>8. DANKSAGUNG</b> -----   | <b>40</b> |
| <b>EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG</b> -----  | <b>41</b> |

# 1. Arbeitshypothese und Fragestellung

Die molekularen Vorgänge und die Pathophysiologie des Hirnödems nach Schädel-Hirntraumen sind immer noch weitgehend ungeklärt. Da die Hyaluronsäure bzw. Hyaluronan ein wasserbindendes Biopolymer ist, das von allen menschlichen Organen im Gehirn mit in seiner höchsten Konzentration vorliegt, stellt sich die Frage, ob eine vermehrte Produktion von Hyaluronsäure mit dem Hirnödem assoziiert ist. In Anlehnung an Arbeiten zur Untersuchung von Veränderungen in der Hyaluronan-Produktion nach einem Schlaganfall soll nun geklärt werden, ob die histologische Darstellung des Vorkommens und der Menge des Hyaluronans im menschlichen Gehirn zur Diagnosestellung und möglichen Therapie eines Hirnödems beitragen kann.

Nach Entdeckung von wassertransportierenden Transmembranproteinen, den Aquaporinen, und neueren Erkenntnissen, dass auch deren Anwesenheit für die Entstehung eines Hirnödems verantwortlich sein kann, werden deren zwei wichtigsten Vertreter im menschlichen Gehirn, das Aquaporin 1 und Aquaporin 4, in unsere Untersuchungen mit einbezogen.

Wir nehmen demnach an, dass es eine Korrelation zwischen dem Vorkommen und der Verteilung von Hyaluronan und / oder den Aquaporinverteatern 1 und 4 und dem Ausprägungsgrad eines Hirnödems gibt. Bei Bestätigung unserer Hypothese würden sich neue therapeutische Möglichkeiten zur Behandlung eines Hirnödems ergeben.

## 2. Einleitung

Hyaluronsäure, oder nach neuerer Bezeichnung Hyaluronan (HA), ist ein großes lineares Glycosaminoglycan, welches hauptsächlich in der Extrazellulärmatrix vorkommt und für die Bildung dieser von großer Bedeutung ist [26]. Dort wird es von Fibroblasten aus Vorstufen synthetisiert und sezerniert [41]. Neben Fibroblasten sind aber auch andere Zellen, z. B. Chondroblasten, in der Lage Hyaluronan zu bilden [44]. Die Stoffgruppe der Glycosaminoglycane besitzt als wesentlichstes Merkmal einen polyanionischen Charakter. Diese langen, mit vielen Negativladungen versehenen Polysaccharidketten sind sperrig und beanspruchen daher viel Platz. Zur Wahrung der Elektroneutralität beherbergen sie in den intra- und intermolekularen Lücken viele Kationen. Diese ziehen wiederum aus osmotischen Gründen viel Wasser an. Folglich besteht eine wichtige Aufgabe dieser Stoffklasse in der Bindung von Wasser, das auf diese Weise gespeichert wird und zugleich als nicht-komprimierbarer Stoff mechanischen Zwecken dient [28]. Ein Hyaluronanmolekül bindet also dank seines hydrophilen Charakters viel Wasser, beansprucht so in wässriger Lösung ein riesiges Volumen und bildet ein visköses Gel [26,28].

Hyaluronan ist das einzige Glycosaminoglycan, das nicht sulfatiert ist und keinen Proteinanteil enthält bzw. nicht kovalent an ein Protein gebunden ist [26,28]. Hyaluronan bildet zusammen mit Proteoglycanen, Kollagenen und Elastin ein dreidimensionales Netzwerk. Dabei lagern sich an die sehr langen Hyaluronanmoleküle mithilfe spezifischer Proteine Proteoglycane an. Diese stark verzweigte und geladene Struktur tritt mit Kollagen- bzw. Elastinfibrillen in Wechselwirkung. Das Verhältnis der einzelnen Komponenten zueinander bestimmt die mechanischen Eigenschaften des Gewebes. So zeichnen sich z. B. straffes Bindegewebe und Sehnen durch einen sehr hohen Gehalt an parallel verlaufenden Kollagenfasern aus, was eine hohe Zugfestigkeit ergibt. Im lockeren Bindegewebe oder Knorpel dagegen findet sich ein vergleichsweise hoher Gehalt an Proteoglycanen und Hyaluronan [26]. In der Extrazellulärmatrix des Gehirns fehlt ein Netzwerk von Kollagenfibrillen ganz und die Hydrophilie von an Hyaluronan bindenden Proteoglycanen (und damit ihr Volumen) ist hier durch eine veränderte Struktur herabgesetzt [62]. Das Glycosaminoglycan Hyaluronan wird von

den meisten Zellen synthetisiert und diese Synthese findet an der Zellmembran statt. Hyaluronan wird dann in die Extrazellulärmatrix transloziert [43,20].

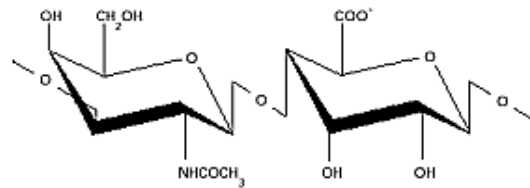


Abb. 1. Strukturformel des Hyaluronan-Moleküls [Quelle: www.biocoat.com]

Die Hyaluronan-Biosynthese beginnt bei abwechselndem Transfer der Vorläufer-Nukleotid-Zucker UDP-GlcA und UDP-GlcNAc an ihrem reduzierten Ende auf der Innenseite der Plasmamembran im Cytoplasma, von wo aus die wachsende Hyaluronan-Kette direkt in die Extrazellulärmatrix exportiert wird [20,41-43]. Ein fertiges Hyaluronanmolekül besteht aus sich wiederholenden Disaccharideinheiten aus N-Acetyl-D-glucosamin, das  $\beta(1-4)$ -glycosidisch mit D-Glucuronsäure verknüpft ist (siehe Abb. 1). Die in etwa 250-50.000 langen Disaccharideinheiten sind untereinander  $\beta(1-3)$ -glycosidisch verbunden, womit Hyaluronan ein durchschnittliches Molekulargewicht von  $1-3 \times 10^6$  (D) besitzt [26,46]. Die Produktionsenzyme der Hyaluronanmoleküle sind die Hyaluronansynthasen (HAS). Das Hyaluronan-Niveau wird aufrechterhalten durch die Regulation der enzymatischen Aktivität der Hyaluronansynthasen-Isozyme HAS1, HAS2 und HAS3 und abgebaut bzw. vermindert durch Hyaluronidasen (HYAL) [56].

Für den Export von Hyaluronan aus eukaryoten Zellen sind nicht, wie ursprünglich angenommen, die Hyaluronansynthasen selbst verantwortlich, sondern multidrug resistance Transporter (MDR-Transporter). Sie sind der größten Transmembrantransporterfamilie angehörig, nämlich den ATP bindenden Kassettentransportern (ABC-Transporter) [45]. Das Hyaluronan wird durch Energie abhängige Transportproteine aus dem Zytoplasma aktiv in den Extrazellulärraum sezerniert. In menschlichen Fibroblasten handelt es sich dabei im Besonderen um das multidrug resistance associated protein Nummer 5 (MRP5), welches für den Hyaluronanexport verantwortlich ist [45].

Die wachsende Hyaluronankette bewirkt einen negativen Rückkopplungseffekt auf die Hyaluronansynthese, hemmt sie also. Auch Insulinmangel und Kortikoide führen zu einer Verminderung der Biosynthese [27,37,46]. Dies wiederum hat eine verminderte Zellproliferation zur Folge. Krankheiten wie z. B. eine Ödembildung nach

Verletzungen, Entzündungen und Metastasenbildung sind hingegen durch eine Überproduktion von Hyaluronan charakterisiert [7,45]. Auch unter ischämischen Bedingungen im Herzmuskel, beim Myokardinfarkt, steigt die Hyaluronan-Biosynthese an [59].

Entzündliche Läsionen außerhalb des zentralen Nervensystems zeigen erhöhten Umsatz von Hyaluronan [57]. Während einer Entzündungsreaktion in der Peripherie sezernieren aktivierte Fibroblasten oder andere Zellen Hyaluronidase, welche den Hyaluronan-Gehalt reduziert [50,60]. Reaktive Sauerstoffarten am Entzündungsort fördern diese Reduzierung weiterhin [1,35].

Wie bereits erwähnt, ist Hyaluronan eines der Hauptbestandteile der Extrazellulärmatrix, besonders im lockeren Bindegewebe, und bildet dort einen Teil der Kittsubstanz [23,46]. Des Weiteren kommt Hyaluronan in der Synovialflüssigkeit, im Glaskörper des Auges, in der Nabelschnur, in der Dermis und im Knochen vor [26,46]. Das dort als nicht komprimierbares, visköses Gel vorliegende Hyaluronan dient z. B. als Wasserspeicher. In der Synovialflüssigkeit wirkt es als „Schmiermittel“ für Gelenke und im Glaskörper, der Nabelschnur, der Dermis und anderen Geweben hilft es bei der Aufrechterhaltung des Turgors, sowie der Widerstandsfähigkeit gegen Druck [28]. Es wurden aber noch viele andere Funktionen von Hyaluronan bezüglich der Zellregulation festgestellt, so dient es z. B. der Freihaltung von Verkehrswegen für die Zellmotilität, es hilft bei der Zellinvasion und -proliferation durch Interaktion mit Hyaluronanrezeptoren an Zelloberflächen (z. B. bei embryonalen Zellen und auch Tumorzellen), fördert die Zellgestaltung mit und ist bei metabolischen Reaktionen anwesend [28,44]. Viele dieser Prozesse sind grundlegend für menschliche Krankheiten, wie z. B. Krebsmetastasen, Infektionsabwehr und Arthritis [45].

Die Wirkungsweise von Hyaluronan ist dabei größenabhängig. Formen von Hyaluronan mit von der Norm abweichendem Molekulargewicht haben verschiedene Funktionen. Kleinere Formen von Hyaluronan unterstützen so die Aktivierung von T-Zellen in frühen entzündlichen Läsionen, während größere, hochmolekulare Formen von Hyaluronan die Remyelinisierung von Nervenbahnen in chronisch entzündetem Gewebe verhindern können [5]. Die Wirkungsweise wird durch spezifische Oberflächenrezeptoren der Zellen übertragen, welches im Wesentlichen Rezeptoren für Hyaluronan vermittelte Motilität (RHAMM) und CD44 sind [53-55]. Mögliche

Ergebnisse sind dann die Modulation der Endothelzell-Funktion und Angiogenese [53-55,61], sowie Einleitung einer Entzündungsreaktion via Makrophagen-Aktivierung nach Verletzung [39].

Therapeutisch macht man sich derzeit Hyaluronan z. B. als Ophtalmikum bei chirurgischen Eingriffen am Auge zunutze, oder verwendet es bei Arthrose (intraartikulär), zur Korrektur von Deformationen der Haut (Faltenglättung) und zur Wundbehandlung (Angiogenese) [46].

Auch im zentralen Nervensystem (ZNS) findet man Hyaluronan. So ist in der Extrazellulärmatrix des menschlichen Gehirns reichlich Hyaluronan zusammen mit Hyaluronan bindenden Proteinen vorhanden [13,51]. Es wurde in den verschiedensten Regionen des Gehirns, wie z. B. der grauen und weißen Substanz des Großhirns aber auch des Kleinhirns, dem Corpus callosum, dem Liquor und auch in den Hirnhäuten, gefunden [5,24,45]. Das Gewebe des Gehirns ist dabei diffus mit Hyaluronan durchzogen, dabei findet es sich mehr in der weißen als in der grauen Substanz. Am höchsten ist seine Konzentration in den äußeren begrenzenden Schichten des Cortex. Im Plexus choroideus und in den Leptomeningen hingegen ist sein Gehalt niedrig [24]. Seine Aufgaben und Wirkungsweisen sind dabei ebenso vielfältig wie in den übrigen Geweben. So dient es als Cofaktor zur Neuronendifferenzierung, Neuronenextension und -motilität sowie zur Übertragung synaptischer Signale [29,36]. Des Weiteren wird die Entwicklung von erwachsenen Neuronen und Oligodendrozyten beeinflusst, sowie die Astrozytenmotilität, Neuritenwanderung und das axonale Wachstum [29].

Im ZNS sind Astrozyten die hauptsächliche Quelle von Hyaluronan [32]. Rund um entzündliche und entmyelinisierte Läsionen, die bei verschiedenen Krankheiten wie z. B. Multipler Sklerose auftreten, sind typischerweise Progenitorzellen der Oligodendrozyten (OPC) anwesend, welche sich normalerweise in Myelin bildende Oligodendrozyten weiterentwickeln. Dieser Vorgang bleibt aber aus und die beschädigten Axone werden nicht remyelinisiert [5]. Es wurde herausgefunden, dass sich Hyaluronan an entmyelinisierte Läsionen bei Patienten mit Multipler Sklerose und bei Mäusen mit experimentell autoimmuner Encephalomyelitis anlagert. Es handelt sich dabei um eine Hyaluronanform mit hohem Molekulargewicht (high molecular weight, HMW), die von Astrozyten synthetisiert wird und sich an chronisch entmyelinisierten



Läsionen anlagert [5]. Diese Form von Hyaluronan hemmt die Remyelinisierung nach Lysolecithin-induzierter Entmyelinisierung der weißen Substanz. OPCs sammeln sich an und entwickeln sich nicht in entmyelinisierten Läsionen, wo HMW Hyaluronan präsent ist, in Myelin bildende Zellen weiter [5,6]. In dieser Studie hemmte die Zugabe von HMW Hyaluronan zu OPC Kulturen reversibel die Progenitorzellenumwandlung, während reduziertes Hyaluronan in Astrozyten-OPC Cokulturen die Oligodendrozytenbildung sogar förderte. Die HMW-Form von Hyaluronan kann daher zum Fehlschlagen der Remyelinisierung durch Verhinderung der Umwandlung von OPCs, die zu den entmyelinisierten Läsionen herangezogen wurden, substantiell beitragen [5].

Auch das Hyaluronan bindende Transmembranglycoprotein CD44 ist ein beitragender Faktor zum Scheitern der Remyelinisierung [5]. Obwohl es selbst für die Hyaluronansynthese nicht benötigt wird, so reguliert es doch die zelluläre Antwort auf Hyaluronan [40] und die Ansammlung von auf Hyaluronan basierender Extrazellulärmatrix [22]. Im ZNS wird CD44 in niedrigem Niveau von Astrozyten und Mikroglia synthetisiert [34]. In entmyelinisierten Läsionen bei Patienten mit Multipler Sklerose synthetisieren die Gliazellen kontinuierlich vermehrt CD44. Diese durch die Gliazellen verursachte Mehrproduktion des Hyaluronan bindenden Transmembranproteins erhöht die Möglichkeit, zu einem Fortschreiten der Krankheit beizutragen [15,16]. Hyaluronan akkumuliert also in der weißen Substanz zusammen mit der erhöhten CD44-Expression nach Nervenstrangverletzung/-schaden und die vermehrte Ausschüttung von CD44 führt zu einer Entmyelinisierung [58]. Chronisch erhöhte Expression von CD44 könnte schließlich die auf Hyaluronan basierende Extrazellulärmatrix in entmyelinisierten Läsionen verändern, was wiederum zum Fehlschlagen einer Remyelinisierung beitrüge [5]. Es wurde herausgefunden, dass Antikörper gegen CD44 die weitere Entwicklung von experimentell autoimmuner Encephalomyelitis verhindern können [8].

Ebenso konnte bei einem anderen Krankheitsbild, dem Schlaganfall, eine Veränderung in der Hyaluronankonzentration festgestellt werden. Es wurde herausgefunden, dass die Produktion im Gehirn von Hyaluronan und kleingewichtigen Disacchariden von Hyaluronan (o-HA, oligosaccharides of hyaluronan) in abgestorbenem Gewebe und im Serum von Patienten an bis zu 14 Tagen nach einem Schlaganfall angestiegen war.

Auch die Hyaluronidaseaktivität in den Serumproben war angestiegen, was den nachfolgenden Anstieg von o-HA erklärt. Außerdem konnte eine verstärkte Ablagerung in Blutzellen und sowohl intrazellulär als auch in den Zellkernen der dem Infarkt benachbarten Neuronen festgestellt werden, sowie eine Vermehrung der Hyaluronansynthese- und Hyaluronidaseaktivität in vom Schlaganfall entzündeten Zellen und auch in den benachbarten Gehirnregionen. Rezeptoren für Hyaluronan vermittelte Motilität (RHAMM) wurden intrazellulär und in den Nuclei von Neuronen beobachtet, außerdem in der Tunica media von größeren Blutgefäßen und in Endothelzellen von Kleingefäßen in vom Schlaganfall betroffenem Gewebe, während die Expression von anderen Rezeptoren für Hyaluronan, CD44 und das Tumor Nekrosefaktor stimulierte Gen 6 (TSG-6) hauptsächlich in infiltrierten, mononukleären Zellen von entzündlichen Regionen erhöht waren. Die Hyaluronananalyse ist also ein wichtiger Befund im akuten Stadium von Schlaganfallschäden. Angestiegene o-HA-Produktion, bald nach dem Schlaganfall, deutet auf eine Verstärkung der Entzündungsreaktion hin und ist somit schädlich, wohingegen die Aktivierung von Hyaluronan und/oder o-HA-induzierten zellulären Signaltransduktionen in Neuronen und Kleingefäßen durch Stimulation von Angiogenese auf den Erneuerungsprozess wirken können und auf das Überleben empfindlicher Neuronen [3].

Im Liquor cerebrospinalis (cerebrospinal fluid, CSF) sind die Konzentration und das Vorkommen von Hyaluronan bei verschiedenen Krankheiten, abhängig von der Lokalisation und vom Alter des Patienten, mitunter sehr unterschiedlich: das Hyaluronan-Niveau im lumbalen Liquor zeigt z. B. einen Anstieg mit dem Alter. Gesunde Kinder verglichen mit gesunden Erwachsenen haben deutlich differierende Werte von 50 µg/L zu 166 µg/L. Der Gehalt steigt schrittweise im Zeitraum der Pubertät und weitergehend mit dem Alter. Auch ist der Gehalt von Erwachsenen im ventrikulären Liquor deutlich niedriger als im lumbalen Liquor [24].

Sehr hohe Werte wurden bei Patienten mit Krankheiten wie Meningitis und auch Tumormetastasen gefunden (8000 bzw. 4000 µg/L). Des Weiteren wurden deutlich erhöhte Werte vor allem bei Spinalstenose, Kopfverletzungen und Hirninfarkt gefunden, aber auch bei entzündlichen Heilungsstörungen, beim Hydrocephalus und bei Encephalitis. Bei Multipler Sklerose und sonstigen neurologischen Krankheiten ist ein signifikanter Anstieg im Liquor cerebrospinalis nicht bekannt [24]. Die Hyaluronan-

Konzentration im CSF ist jedoch generell um vieles höher als die im Plasma oder Serum [14]. Die Gehirne von Föten und jungen Menschen weisen höhere Mengen an Hyaluronan auf als die von Erwachsenen. Im Liquor cerebrospinalis hingegen zeigt sich eine gegenläufige Entwicklung, der Gehalt steigt hier mit dem Alter [24].

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der Gehalt von Hyaluronan und anderen Bestandteilen der Extrazellulärmatrix des menschlichen Gehirns (und auch anderer Gewebe) mit dem Reifungsprozess des jeweiligen Gewebes abnimmt. Ein erhöhter und angestiegener Wert sowie eine Veränderung in der Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix deutet auf pathologische Prozesse hin [48]. Daher können Hyaluronan und die begleitenden Hyaluronan bindenden Proteoglycane einen wichtigen Faktor zur Früherkennung von Krankheiten, besonders die das Zentralnervensystem betreffenden, darstellen.

Ein Ödem ist eine Schwellung aufgrund pathologischer Vermehrung der interstitiellen Flüssigkeit. Ihm liegt ein Missverhältnis zwischen dem aus den Blutkapillaren austretenden Flüssigkeitsvolumen (relativ zu groß) und dessen Abfluss (relativ zu klein) zugrunde. Ursächlich dafür können z. B. ein erhöhter Druck in den Blutkapillaren, verminderte Proteinkonzentration im Plasma, erhöhte Endothelpermeabilität oder ein gestörter Lymphabfluss sein [28].

Eine Hirnschwellung, entstanden durch die unnormal vermehrte Einlagerung von Flüssigkeit in das Gehirn, wird als Hirnödem bezeichnet [46]. Bei einem Hirnödem ist das Gehirn in der Regel im Ganzen vergrößert und füllt den Schädelinnenraum vollkommen aus. Dadurch werden die Windungen abgeplattet, die Furchen verstreichen, auch können die für den Blutabfluss verantwortlichen Sinus komprimiert werden. Die Folge von Letzterem ist eine Ischämie, die bis zum Hirntod führen kann. Gleichzeitig werden infolge des erhöhten Innendrucks im Schädel die Kleinhirntonsillen in das Foramen magnum eingepresst. Die Flüssigkeitsvermehrung in der grauen Substanz spielt sich dabei im intrazellulären Raum ab und betrifft in erster Linie die Fortsätze der Astrocyten, während in der weißen Substanz auch eine extrazelluläre Flüssigkeitsansammlung vorkommt. Bei länger bestehendem Ödem können nicht nur die Gliafasern, sondern auch Markscheiden anschwellen und zerfallen, man spricht dann von einer Ödemnekrose [17,46].

Das Hirnödem entsteht durch Störungen des Wasser- und Elektrolythaushaltes oder infolge einer Schädigung der Blut-Hirn-Schranke oder der Blut-Liquor-Schranke [46,52]. Ursächlich dafür sind pathologische Prozesse im ZNS, wie z. B. diverse Entzündungen (Meningitis, Ventrikulitis, Abszess, Encephalitis), Tumore, Ischämien (z. B. nach Schlaganfall), intracerebrale/subarachnoidale Blutungen und Intoxikationen sowie traumatische Verletzungen (Schädel-Hirntraumata) und Störungen nach Operationen [30,46,47].

Bei Veränderungen des Wasser- und Elektrolythaushaltes sind vor allem ein Salzdefizit sowie Wasserüberschuss entscheidend. Bei ersterem fällt die Osmolalität und das Flüssigkeitsvolumen wandert von extrazellulär nach intrazellulär. Mögliche Ursachen hierfür sind u. a. starkes Erbrechen, Durchfall, Schwitzen, Aldosteronmangel, Hypokaliämie, Läsionen des zentralen Nervensystems oder eine salzverlierende Nephritis. Bei einem Wasserüberschuss hingegen steigt zunächst das Extrazellulärvolumen an, es sinkt die Osmolalität und infolge dessen findet wieder eine Flüssigkeitsverschiebung von extrazellulär nach intrazellulär statt. Ein Wasserüberschuss kann z. B. beim Trinken von Wasser, bei übermäßiger ADH-Ausschüttung, bei intensiver Magenspülung oder bei Infusion von Glucoselösungen entstehen [52].

Man unterscheidet diverse Formen des Hirnödems. So ist das vasogene Hirnödeme hauptsächlich extrazellulär lokalisiert und entsteht infolge einer Störung der Kapillarpermeabilität und Hämodynamik. Man findet es z. B. nach einem Schädel-Hirntrauma, oder als perifokales Hirnödeme bei Hirntumoren, Hirnabszess, Encephalitis und intrazerebraler Massenblutung. Bei letzterem schwindet das Ödeme jedoch im späteren Verlauf mehr und mehr, wenn sich das ausgetretene Blut eindickt [17,46]. Das zytotoxische Hirnödeme macht sich intrazellulär bemerkbar und entsteht infolge einer Störung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase durch Zellverletzungen bei Ischämie, Urämie, Wasserintoxikation und Hypoxie, aber auch nach Schädel-Hirntrauma. Das interstitielle Hirnödeme schließlich entsteht durch vermehrten Einstrom von Liquor cerebrospinalis, z. B. beim Hydrozephalus [30,46]. Mittlerweile wurde herausgefunden, dass diese Hauptformen des Hirnödems gleichzeitig auftreten können, besonders bei traumatischen Hirnverletzungen sind das vasogene und das zytotoxische Hirnödeme kombiniert, was eine effektive Behandlung erschwert [30]. Für die Hemiatrophia cerebri, die narbige

Verkleinerung einer gesamten Großhirnhemisphäre (einer Erkrankung im fetalen oder frühkindlichen Alter), wird ein halbseitiges Hirnödem als ursächlich angesehen, dessen schädigende Wirkung durch Kreislaufstörungen bei frühkindlichen Krampfanfällen noch verstärkt wird [17].

Klinisch kann das Hirnödem verschiedenste Symptome hervorrufen, welche die Entwicklung des Ödems anzeigen, wie z. B. Kopfschmerz, Übelkeit und Erbrechen sowie Bewusstseinsstörungen. Als frühestes klinisch verwertbares Zeichen wurde zunehmende Schläfrigkeit beobachtet [4]. Die Hirndrucksteigerung infolge der Volumenzunahme des Gehirns kann bis zum Tode führen [4,17,30,52]. Das festgeschriebene Volumen der intrakranialen Kavität diktiert dabei, dass die Expansion von irgendeinem Teil des Hirns, des Liquor cerebrospinalis oder des Gefäßsystems auf die Kosten eines anderen ausgeglichen wird. Der Hirndruck bleibt dadurch solange relativ normal, bis die Anpassungsmechanismen des verminderten Liquor- und venösen Blutvolumens erschöpft sind. Ab diesem Punkt steigt der intrakranielle Druck überproportional an [31]. Ist dies der Fall, dann werden der cerebrale Durchblutungsdruck und Blutfluss, bedingt durch die autoregulatorische Vasodilatation, reduziert. Wenn der cerebrale Blutdruck die kritische Grenze von ca. 50-60 mm Hg unterschreitet, öffnen sich die Arteriolen maximal und die Autoregulation versagt. Jetzt wird der cerebrale Blutfluss ganz geschlossen und die Gewebischämie fördert die Verschlimmerung des Ödems. Schließlich reduziert das weiter anwachsende Ödem den globalen Blutfluss des Gehirns auf ein Maß, welches die Stoffwechselfunktionen nicht weiter gewährleistet. Der Hirntod ist die Folge [4].

Vor allem das zelluläre Hirnödem wirft noch eine Reihe von Fragen bezüglich der Behandlung auf. Es ist eine lebensbedrohende Komplikation des Hirninfarktes bzw. des Schlaganfalls. Seine molekulare Kaskade beginnt mit der cerebralen Ischämie und beinhaltet den Verlust der Ionenpumpen in der Zellmembran sowie das Anschwellen der Zellen [30]. Als erstes steigt dabei der  $\text{Na}^+$ -Spiegel im Gewebe und der Wassergehalt, gefolgt von erhöhter Aktivität der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase auf der Gegenseite des Endothels. Dies geschieht noch bevor irgendein struktureller Schaden eintritt. Es wird dann durch die wieder eintretende Durchblutung verstärkt. Der anschließende Prozess resultiert aus dem verspäteten Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke, der mit dem Infarkt des Parenchyms und des Gefäßsystems verbunden ist. Die treibende osmotische

Kraft für die jetzige Entstehung des Ödems ist das immer noch erhöhte Gewebs-Na<sup>+</sup> sowie die extravasalen Serumproteasen, die zu einer weiteren Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke und einer Gewebsaufweichung führen [4]. Als Folge wird wiederum der Blutfluss im Gehirn vermindert. Kommt es zu einer kompletten Unterbindung des cerebralen Blutflusses, so folgt ein schnelles Ende jeglicher elektrophysiologischer und metabolischer Funktionen des Gehirns. Das zytotoxische und vasogene Ödem haben ihre größte Ausdehnung dabei zwischen 24 und 72 Stunden nach dem ischämischen Ereignis [30], die klinische Manifestation der ischämischen Hirnschwellung zeigt sich generell jedoch erst 2 bis 5 Tage nach dem Infarkt [4]. Kombinationsbehandlungen des zellulären Ödems bei Ischämie mit vasogenem Ödem waren bislang nicht erfolgreich [30]. Andere Autoren sehen generell das vasogene Ödem als Hauptursache zu einer Hirnschwellung nach einem Schlaganfall bzw. einer Ischämie an. Das zytotoxische Ödem spiele dabei nur eine lokale und untergeordnete Rolle [4].

Auch ist die Entwicklung eines Ödems bei intracerebraler Blutung nicht genau bekannt [30]. Es wurde lediglich gezeigt, dass intracerebrale, intraventrikuläre und subarachnoidale Blutungen häufig radiologische Faktoren zur Vorhersage von schlechter neurologischer Genesung sowie vom Tod sind. Das cerebrale Ödem ist jedoch keine zwingende Folge z. B. der subarachnoidalen Blutung, es tritt viel mehr als prognostische Variable auf. Jedoch ist es ein großer Risikofaktor für den Tod oder schwere Behinderungen nach einer subarachnoidalen Blutung. Generelle Anzeichen für ein globales cerebrales Ödem waren wiederum der Bewusstseinsverlust bzw. Bewusstseinsstörungen, große Aneurismen und Patienten mit höherem Alter [11]. Bei intracerebralen Blutungen wurde experimentell gezeigt, dass Blutbestandteile, wie z. B. Thrombin, Entzündungen und vasogene Ödeme hervorrufen können [25].

Beim Schädel-Hirntrauma wird nach neuesten Forschungen mittlerweile das zytotoxische Ödem als Hauptfolge angesehen. Es entsteht durch ein Elektrolytungleichgewicht und einen Verschluss von Ionenkanälen, wodurch die Zellen anschwellen [30].

Als generelle Therapiemöglichkeiten werden derzeit die Osmotherapie (Infusion von osmotisch wirksamen Diuretika, z.B. Mannitol) angewand, die künstliche Beatmung mit Hyperventilation und die Gabe von Barbituraten und Vasopressoren. Glukokortikoide

werden nur bei perifokalem vasogenem Hirnödem verwandt. Sie erwiesen sich, bezogen auf das zytotoxische und auch das interstitielle Ödem, sowie bei Schädel-Hirntrauma, als nicht sehr effektiv [30,47]. Eine weitere Alternative, wenngleich sehr invasiv, ist die Ventrikulostomie (Drainage des Liquor cerebrospinalis) und derzeit noch vielfach diskutiert wird die Hypothermie [30,19]. Hyperventilation sollte nur sehr vorsichtig und klinisch überwacht angewandt werden. Sie dient lediglich für kurze Zeiten (4 bis 6 Stunden) zur Überbrückung, bis definiertere Therapien ergriffen werden. Dennoch bewirkt die Hyperventilation über einen sinkenden CO<sub>2</sub>-Partialdruck ein dazu proportionales Absinken des cerebralen Blutflusses und Blutvolumens, was wiederum in einer schnellen Reduktion des intrakraniellen Druckes resultiert. Bei längerer Anwendung aber verschlechtert sie die Prognose für Patienten mit Schädel-Hirntrauma und führt zur cerebralen Ischämie [47]. Zur Osmotherapie braucht man möglichst ideale osmotische Wirkstoffe, damit sie das bestehende Ödem nicht noch verschlimmern oder den intrakraniellen Druck erhöhen. Solche Stoffe sollen einen günstigen osmotischen Gradienten produzieren, reaktionsarm und nicht toxisch sein, von einer intakten Blut-Hirn-Schranke zurückgehalten werden und minimale systemische Nebenwirkungen haben. Diesen Anforderungen wird Mannitol gut gerecht, noch besser sollen aber hypertone Salze (z.B. Natriumchlorid) sein. Das Mittel der Wahl stellt dennoch derzeit Mannitol dar, da noch nicht ausreichend viele menschliche Studien über die Anwendung und Wirkung hypertoner Salze vorliegen [47].

Doch trotz aggressiver und sofortiger Behandlung mit Mannitol, Vasopressoren, Hyperventilation und Barbituraten kann der Anstieg des intrakraniellen Druckes so schnell sein, dass Hernien des Gehirns und/oder der Tod innerhalb von 36 Stunden nach Verletzung eintreten können [30]. Die derzeitige Erklärung dafür ist die exponentielle Beziehung zwischen dem intrakraniellen Druck und dem Gehalt der Gehirnflüssigkeit. Wenn sich ein Ödem entwickelt, wird eine Schwelle erreicht, bei der sich der intrakranielle Druck exponentiell bei nur geringfügigen Änderungen des Hirnödems erhöht [4,31].

Als letzte Möglichkeit besteht die operative Trepanation bzw. die dekompresive Kraniektomie oder Hemikraniektomie, wenn alle herkömmlichen Maßnahmen fehlgeschlagen sind oder wenn bei Patienten mit z. B. vielfachen schweren

traumatischen Hirnverletzungen herkömmliche Behandlungsmethoden von Anfang an nicht effektiv wären [4,19,46]. Die Hemikraniektomie gilt als sehr zuverlässig, um den Blutfluss im Gehirn in den ischämischen Arealen zu verbessern und den erhöhten intrakranialen Druck zu verhindern [4]. Jedoch liegt die Sterblichkeitsrate nach einer Hemikraniektomie noch bei über 20 %, die vollständige Genesung je nach Studie zwischen 30 und 50% [9,12,19]. Abhängig sind diese Zahlen natürlich auch von Art und Ausprägungsgrad des Ödems sowie vom Alter des Patienten. So stehen die Chancen älterer Patienten wesentlich schlechter als die von jüngeren, und bei Fällen mit mehreren und größeren betroffenen arteriellen Gebieten ist die Sterblichkeitsrate ebenfalls höher [4]. Auch tragen viele Patienten bleibende Behinderungen bis hin zu geistiger Behinderung mit der Unfähigkeit, sich selbst zu versorgen, davon [9,12]. Der ideale Zeitpunkt für einen operativen Eingriff konnte noch nicht festgesetzt werden, neuere Meinungen weisen aber darauf hin, dass frühere Kraniektomien innerhalb der ersten 24 Stunden die besseren Prognosen aufweisen [4].

Ganz neue Hoffnung, bezogen auf die Therapie, wird derzeit auf die weitere Erforschung von Wasserkanälen, den Aquaporinen, gelegt. Gemessen an ihrer Permeabilität für diverse Moleküle wurden sie von 1-10 in drei funktionelle Gruppen eingeteilt. Hervorgestochen ist bislang das Aquaporin 4, welches im ZNS entdeckt wurde und dort von Astroglia angrenzend an Blutgefäße sezerniert wird. Es wurde in mehreren Studien als Hauptfaktor bei ischämie-induzierten Hirnödemen beobachtet und kann bei Abwesenheit eine solche Entstehung verhindern. Man hofft die Aquaporine pharmakologisch kontrolliert zur Kontrolle der Entstehung und zum Abbau von Ödemen bei Trauma und Ischämie einsetzen zu können. Derzeit werden sie aber noch nicht zur Therapie am Menschen verwendet [30].



## 3. Material und Methoden

### 3.1 Histologisches Untersuchungsgut

Aus dem Institut für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf wurden insgesamt 16 Gewebeproben aus drei unterschiedlichen Arealen des menschlichen Gehirns entnommen (Cortex cerebri, Pons und Cerebellum).

Diese Proben sollten mikroskopisch auf Vorkommen und Verteilung von Hyaluronsäure untersucht werden, wobei die Immunreaktivität der angefärbten Schnitte in der visuellen Auswertung abzuschätzen war. Es wurde ein Bewertungsmaßstab angesetzt, der von negativer (-) bis zu dreifacher positiver Wertung reichte (+++). Es wurde die Verteilung der Hyaluronsäure in der weißen Substanz sowie dem Zytoplasma von Neuronen und Gliazellen bewertet. Zum Zeitpunkt der Sektion wurde der Grad des Hirnödems dokumentiert und in drei Stadien (leicht, mittel, schwer) eingeteilt. Die Ergebnisse dieser Einteilung waren bei der Auswertung der Histologie nicht bekannt. Außerdem wurden die Gewebe auf Anwesenheit der Aquaporine 1 und 4 untersucht. Die Anwesenheit der Aquaporine 1 wurde weiter differenziert in Vorkommen im Cortex cerebri, in der weißen Substanz und im Cortex des Kleinhirns, dort sowohl im Stratum granulosum als auch im Stratum moleculare. Die Anwesenheit der Aquaporine 4 wurde in der weißen Substanz und im Cortex von Großhirn und Kleinhirn überprüft, im letzteren auch separat in der Purkinjezellschicht.

Die einzelnen Ergebnisse werden im Folgenden mit Hilfe von Balkendiagrammen dargestellt. Die Hirnödemgrade haben wir dabei vereinfacht, lediglich die zwei Grade 1, leichtes bis kein Hirnödem, und 3, schweres Hirnödem, werden dargestellt. Ebenso wurden in den histologischen Präparaten lediglich die Grade „+“ und „+++“ gemessen. Der Anfärbungsgrad wird aus den Symbolen von „-, (+), +, +/++, ++, ++/+++ und +++“ umgesetzt in die Zahlenskala 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 und 3. Der mittlere Färbegrad errechnet sich schließlich aus der Anzahl der vorkommenden Grade (z. B. zwei mal der Grad 1, drei mal der Grad 2,5 und drei mal der Grad 3 = 18,5), dividiert durch die Anzahl der Präparate des jeweiligen Hirnabschnittes bei den unterschiedlichen Hirnschwellungsgraden (meist jeweils 8 Stück). So würde sich in diesem Fall ein mittlerer Färbegrad von 2,3 ergeben. Der mittlere Färbegrad wurde immer auf eine Nachkommastelle gerundet.

Um die gesamte Bandbreite der ermittelten Anfärbungsgrade aus der histologischen Untersuchung mit zu erfassen und ein aussagekräftigeres Ergebnis zu erzielen, wurden jeweils zusätzlich zu den jeweiligen, den Mittelwert ergebenden Messreihen die Standardabweichungen in die Grafiken eingepflegt.

### **3.2 Die Anfertigung von Paraffinschnitten**

Die entnommenen Gewebeproben wurden zunächst in einer Formaldehydlösung fixiert und anschließend gespült. Daraufhin erfolgte die Einbettung in Paraffin. Zu diesem Zweck wurden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und dann mit Paraplast<sup>®</sup> plus/2 durchdrungen. Zur Vorbereitung zum Schneiden wurden die Paraffinblöcke für 2-3 Stunden auf 4° Celsius vorgekühlt, um anschließend mit einem Schlittenmikrotom in fünf µm dicke Schnitte geschnitten zu werden, welche dann auf einen silanbeschichteten Objektträger (Histo Bond<sup>®</sup> Marienfeld, Deutschland) aufgebracht wurden. Diese kamen zum Trocknen über Nacht in einen 37° C warmen Brutschrank. Die anschließende Entparaffinierung erfolgte am nächsten Tag mit Hilfe einer absteigenden Alkoholreihe (Ethanol). Die Schnitte wurden so rehydriert.

### **3.3 Histochemie mit einem Hyaluronsäure bindendem Protein (HABP)**

Die entparaffinierten und rehydrierten Schnitte wurden zunächst in der Mikrowelle vorbehandelt. Sie wurden in 10 mM Citratpuffer (pH 6,0) fünf Mal für je zwei Minuten gekocht (400 W) und nach etwa 20 Minuten Abkühlen anschließend in Aqua dest. gespült. Dann erfolgte die Inkubation in konzentrierter Ameisensäure für 15 Minuten in einer Küvette. Danach wurde wieder gründlich in Aqua dest. gespült. Nun wurden die Objektträger für zwei Mal fünf Minuten mit TBS-Puffer gespült.

Die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte mit TBS (pH 7,6) mit 1 % BSA, für 30 Minuten RT. Ohne zu spülen wurden die Präparate jetzt mit dem biotinyliertem Hyaluronsäure bindenden Protein (HABP, 6 µg/ml) in TBS + 1 % BSA für eine Stunde RT inkubiert. Die anschließende Spülung zur Entfernung des ungebundenen HABPs erfolgte für drei Mal fünf Minuten in TBS. Es folgte die Inkubation mit dem ABC AP Komplex für 30 Minuten RT. Nach erneutem Spülen für

drei Mal fünf Minuten folgte die Entwicklung der AP-Enzymreaktion mit Neufuchsin für 30 Minuten im Dunkeln. Die Objektträger wurden dann mit fließendem Leitungswasser für drei bis fünf Minuten gewässert und anschließend mit Aqua dest. gespült.

Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun für zehn Sekunden, dann wurde mit fließendem Leitungswasser für fünf Minuten gebläut. Noch einmal wurden die Schnitte mit Aqua dest. nachgespült und dann mit Crystal Mount (Biomedica, Foster City, Kalifornien, USA) eingedeckelt.

### **3.3.1 HABP-Histochemie nach Verdauung durch Hyaluronidase aus bovinem Testes**

Abweichend zu dem oben beschriebenen Verfahren wurde ein Teil der Präparate zur Spezifität vor dem Spülen und Blockieren mit TBS erst im PB Puffer nach Sörensen gespült. Darauf erfolgte die erste Inkubation mit Hyaluronidase aus bovinem Testes für vier Stunden bei 37° Celsius in feuchter Kammer mit Deckgläschen mit Paraffinfüßchen, bei einer Konzentration von 980 U/ml (PB Puffer). Anschließend folgte die zweite Inkubation über Nacht bei 37° Celsius in gleicher Konzentration. Nach dem Spülen mit TBS für drei Mal fünf Minuten am nächsten Tag wurde wie oben beschrieben mit dem Blockieren und den weiteren Arbeitsschritten fortgefahren.

### **3.3.2 HABP-Histochemie nach Verdauung durch Hyaluronidase aus Streptomyces**

Zur Erzielung einer noch höheren Spezifität der Enzymreaktion wurde ein weiterer Teil der Präparate vor dem Spülen und Blockieren mit TBS zunächst in 0,020 M Na-Acetat Puffer gespült, um dann mit Streptomyces Hyaluronidase für vier Stunden bei 37° Celsius in feuchter Kammer mit Deckgläschen mit Paraffinfüßchen inkubiert zu werden, bei einer Konzentration von 10 U bzw. 18,9 TRU/ml in Na-Acetat Puffer. Die zweite Inkubation erfolgte bei gleicher Konzentration und über Nacht bei 37 ° Celsius. Am zweiten Tag wurde mit TBS für drei Mal fünf Minuten gespült und anschließend wie gewohnt mit dem Blockieren fortgefahren.

### **3.4 Hämatoxylin-Eosin Färbung**

Zur histologischen Beurteilung wurde von jeder Gewebereihe jeweils ein Schnitt HE gefärbt.

Die HE-Färbung wurde in einem Färbeautomaten nach einem Standardprotokoll durchgeführt. Die Schnitte wurden hierfür in Xylol entparaffiniert und über eine absteigende Alkoholreihe rehydriert. Anschließend wurde in destilliertem Wasser für zwei Minuten inkubiert, danach für eine Minute in Hämatoxylin, dann wieder für zwei Minuten in Aqua dest., in Leitungswasser für fünf Minuten, in Eosin für drei Minuten und abschließend erneut in Aqua dest. für 30 Sekunden. Nun wurden die Schnitte über eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert, drei Mal für je fünf Minuten in Xylol belassen und mit Eukitt (Kindler, Freiburg, Deutschland) eingedeckelt.

### **3.5 Färbung der Aquaporine**

Die entparaffinierten und rehydrierten Schnitte wurden im „Chemmate antibody diluent“ Dako Cytomations, S2022, für 30 Minuten inkubiert und anschließend über Nacht bei 40° C mit den primären polyklonalen Antikörpern Anti-Aquaporin 1 von Chemicon oder Alpha Diagnostic im „Chemmate“ verdünnt (1:400 / 1:1200). Die primären Antikörper wurden bei Nutzung des Dako Cytomation EnVision + DualLink Systems, Peroxidase (DAB+), Code K4011 und K4007, beim Vorgehen entsprechend der Gebrauchsanweisung des Herstellers nachgewiesen.

Die Gegenfärbung der Schnitte erfolgte mit Mayers Hämatoxylin oder Toluidin blau, dehydriert wurden sie in einer abgestuften Alkoholreihe, gefolgt von Xylen. Anschließend wurden sie mit DPX mounting media eingedeckelt.

Die Kontrollschnitte, bei denen jeder der drei Antikörper weggelassen wurde, erschienen jeweils immer blank.

## 4. Ergebnisse

Die Ergebnisse aus der histologischen Untersuchung der einzelnen Präparate sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

| Fallnummer    | Fasern der weißen Substanz | Neurone und Gliazellen des Cortex | Hirnödemgrad | AQP-1              |           | AQP-4              |           | AQP-4 |    |
|---------------|----------------------------|-----------------------------------|--------------|--------------------|-----------|--------------------|-----------|-------|----|
|               |                            |                                   |              | In weißer Substanz | Im Cortex | In weißer Substanz | Im Cortex | GL    | ML |
| NP 1 / 05 A   | + / ++                     | ++ / +++                          | +            | +++                | -         | (+)                | -         | -     |    |
| NP 1 / 05 B   | +                          | + / ++                            |              |                    |           |                    |           |       |    |
| NP 1 / 05 C   | -                          | -                                 |              |                    | +++       | -                  | (+)       | -     | -  |
| NP 13 / 05 A  | +                          | ++                                | +            | +                  | -         | (+)                | -         | -     |    |
| NP 13 / 05 B  | -                          | (+)                               |              |                    |           |                    |           |       |    |
| NP 13 / 05 C  | -                          | -                                 |              |                    | +         | +                  | -         | -     | -  |
| NP 17 / 05 A  | +                          | (+)                               | +            | ++                 | -         | -                  | -         | -     |    |
| NP 17 / 05 B  | -                          | -                                 |              |                    |           |                    |           |       |    |
| NP 17 / 05 C  | -                          | -                                 |              |                    | +         | (+)                | -         | -     | -  |
| NP 61 / 06 A  | +                          | ++ / +++                          | +            | ++                 | -         | ++                 | -         | -     |    |
| NP 61 / 06 B  | +++                        | (+)                               |              |                    |           |                    |           |       |    |
| NP 61 / 06 C  | ++ / +++                   | -                                 |              |                    | ++        | ++                 | -         | -     | -  |
| NP 108 / 05 A | -                          | +                                 | +++          | +                  | -         | + / ++             | -         | -     |    |
| NP 108 / 05 B | -                          | -                                 |              |                    |           |                    |           |       |    |
| NP 108 / 05 C | -                          | -                                 |              |                    | +         | +                  | -         | -     | -  |
| NP 11 / 06 A  | + / ++                     | + / ++                            | +            | +                  | + / ++    | -                  | -         | -     |    |
| NP 11 / 06 B  | ++ / +++                   | -                                 |              |                    |           |                    |           |       |    |
| NP 11 / 06 C  | +++                        | +++                               |              |                    | +         | +                  | -         | -     | -  |
| NP 101 / 05 A | -                          | -                                 | +++          | + / ++             | -         | +                  | -         | -     |    |
| NP 101 / 05 B | +                          | -                                 |              |                    |           |                    |           |       |    |
| NP 101 / 05 C | partial ++                 | -                                 |              |                    | + / ++    | ++                 | -         | +     | -  |
| NP 63 / 05 A  | -                          | -                                 | +++          | ++                 | -         | -                  | -         | -     |    |
| NP 63 / 05 B  | -                          | -                                 |              |                    |           |                    |           |       |    |
| NP 63 / 05 C  | -                          | -                                 |              |                    | + / ++    | +                  | (+)       | +     | +  |
| NP 22 / 05 A  | +                          | +                                 | +++          | ++                 | -         | -                  | -         | -     |    |
| NP 22 / 05 B  | +                          | -                                 |              |                    |           |                    |           |       |    |
| NP 22 / 05 C  | n.d.                       | n.d.                              |              |                    | (+)       | +                  | -         | -     | -  |
| NP 14 / 05 A  | +                          | +                                 | +            | ++                 | -         | -                  | -         | -     |    |
| NP 14 / 05 B  | -                          | -                                 |              |                    |           |                    |           |       |    |
| NP 14 / 05 C  | -                          | -                                 |              |                    | +         | +                  | (+)       | -     | -  |
| NP 76 / 05 A  | +                          | + / ++                            | +++          | ++                 | -         | +                  | -         | -     |    |
| NP 76 / 05 B  | +                          | +                                 |              |                    |           |                    |           |       |    |
| NP 76 / 05 C  | +++                        | (+)                               |              |                    | +         | ++                 | (+)       | -     | -  |
| NP 168 / 05 A | +                          | (+)                               | +++          | ++                 | -         | +                  | -         | -     |    |
| NP 168 / 05 B | +                          | -                                 |              |                    |           |                    |           |       |    |
| NP 168 / 05 C | +                          | ++                                |              |                    | ++        | -                  | (+)       | -     | -  |
| NP 18 / 05 A  | +                          | ++                                | +            | +                  | -         | (+)                | -         | -     |    |
| NP 18 / 05 B  | +                          | +                                 |              |                    |           |                    |           |       |    |
| NP 18 / 05 C  | -                          | -                                 |              |                    | + / ++    | +                  | -         | -     | -  |
| NP 78 / 06 A  | + / ++                     | + / ++                            | +            | +++                | -         | + / +++            | -         | -     |    |
| NP 78 / 06 B  | ++ / +++                   | +                                 |              |                    |           |                    |           |       |    |
| NP 78 / 06 C  | ++ / +++                   | -                                 |              |                    | +++       | +++                | +         | ++    | +  |
| NP 58 / 06 A  | ++ / +++                   | ++ / +++                          | +++          | +++                | -         | +++                | -         | -     |    |
| NP 58 / 06 B  | ++                         | +++                               |              |                    |           |                    |           |       |    |
| NP 58 / 06 C  | +++                        | ++                                |              |                    | +++       | +++                | ++        | -     | -  |
| NP 97 / 05 A  | -                          | -                                 | +++          | (+)                | -         | n.d.               | -         | -     |    |
| NP 97 / 05 B  | -                          | -                                 |              |                    |           |                    |           |       |    |
| NP 97 / 05 C  | -                          | ++ / +++                          |              |                    | (+)       | (+)                | -         | -     | -  |

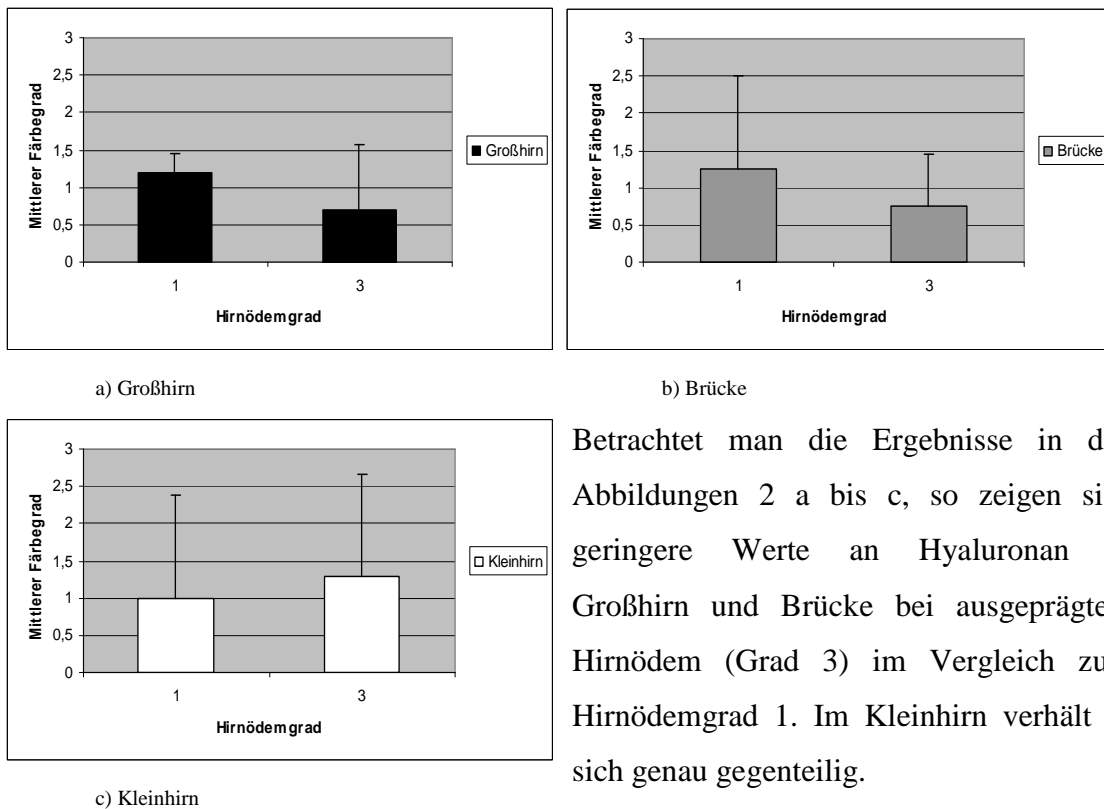
Tabelle 1 Auswertung der histologischen Präparate - Vorkommen von Hyaluronan und den Aquaporinen 1 und 4 sowie Angabe des jeweiligen Hirnödemgrades

Im Folgenden werden das Auftreten und der Ausprägungsgrad der einzelnen Kenngrößen (Hyaluronan und AQP 1 bzw. AQP 4 bei jeweiligem Hirnödem) miteinander verglichen und versucht, mögliche Korrelationen herzustellen.

#### 4.1 Korrelation zwischen der Schwere des Hirnödems und dem Vorkommen von Hyaluronan

##### 4.1.1 Korrelation zwischen der Schwere des Hirnödems und dem Vorkommen von Hyaluronan in der weißen Substanz des Großhirns, der Brücke und des Kleinhirns

Abb. 2 Vorkommen von Hyaluronan in der weißen Substanz in Abhängigkeit vom Schweregrad des Hirnödems



Betrachtet man die Ergebnisse in den Abbildungen 2 a bis c, so zeigen sich geringere Werte an Hyaluronan in Großhirn und Brücke bei ausgeprägtem Hirnödem (Grad 3) im Vergleich zum Hirnödemgrad 1. Im Kleinhirn verhält es sich genau gegenteilig.

Jedoch sind die Abweichungen mit durchschnittlichen Färbegraden von 1,2 zu 0,7 im Großhirn, 1,3 zu 0,8 in der Brücke und 1,0 zu 1,3 im Kleinhirn gering. Die besonders im Kleinhirn relativ hohen Standardabweichungen zeigen, dass ein nicht unerhebliches Spektrum an Messwerten vorlag. Lediglich alle gemessenen Werte des leichten Hirnödems in der weißen Substanz des Großhirns lagen dicht beieinander.

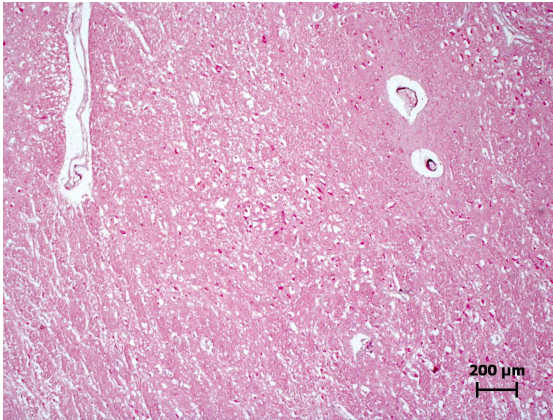
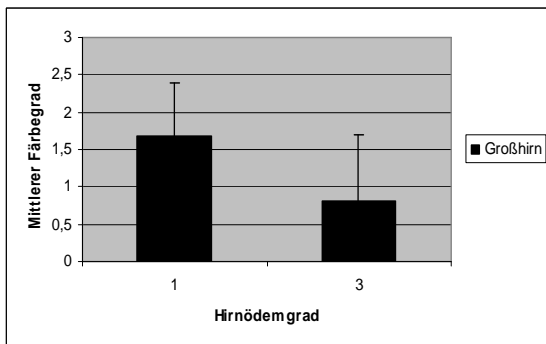


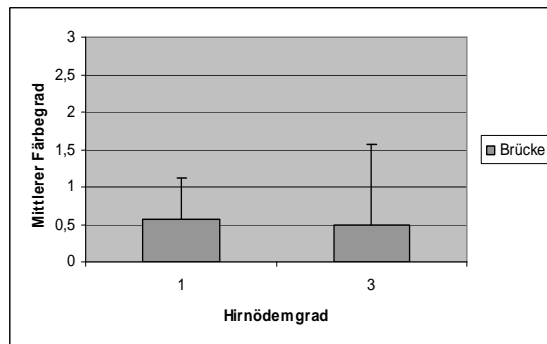
Abb. 3 Mittlere Hyaluronanfarbung in der Brücke bei Hirnödemgrad 3

#### 4.1.2 Korrelation zwischen der Schwere des Hirnödems und dem Vorkommen von Hyaluronan im Zytoplasma der Neurone und Gliazellen des Großhirns, der Brücke und des Kleinhirns

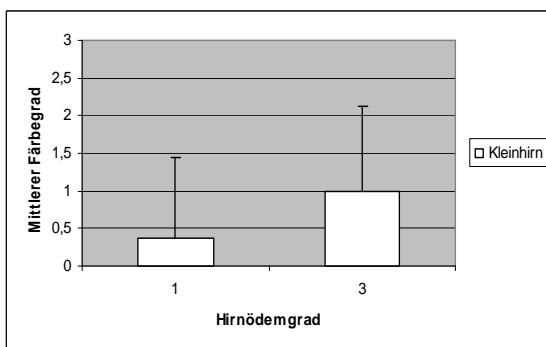
Abb. 4 Vorkommen von Hyaluronan im Zytoplasma in Abhängigkeit vom Schweregrad des Hirnödems



a) Großhirn



b) Brücke



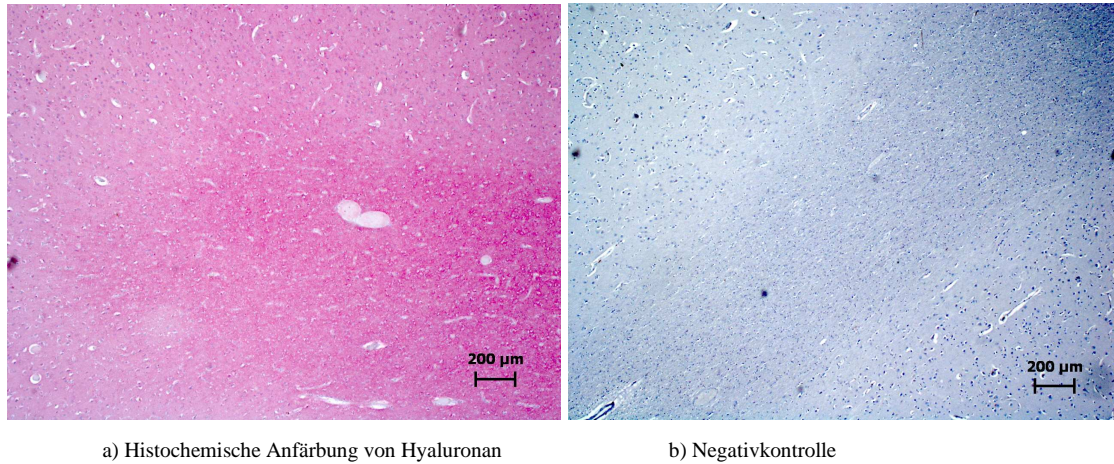
c) Kleinhirn

Bei der Anfärbung des Zytoplasmas zeigen sich größere Unterschiede in dem Vorkommen von Hyaluronan zwischen den Hirnödemgraden 1 und 3 im Großhirn (1,7 zu 0,8) und wieder gegenteilig auch im Kleinhirn (0,4 zu 1,0), wie die Abbildungen 4 a) und c) zeigen, während

die Werte in der Brücke nahezu identisch sind (0,6 zu 0,5, siehe Abbildung 4 b)). Auch hier sind wieder relativ hohe Abweichungen von den Mittelwerten zu verzeichnen. Etwas geringer fällt diese erneut beim leichten Ödemgrad im Großhirn, und diesmal auch in der Brücke aus.

Abbildung 5 zeigt beispielhaft ein Präparat mit Hyaluronanfärbung und die dazugehörige Negativkontrolle.

Abb. 5 Geringer bis mittlerer Anfärbegrad von Hyaluronan im Großhirn bei Hirnödemgrad 1



a) Histochemische Anfärbung von Hyaluronan

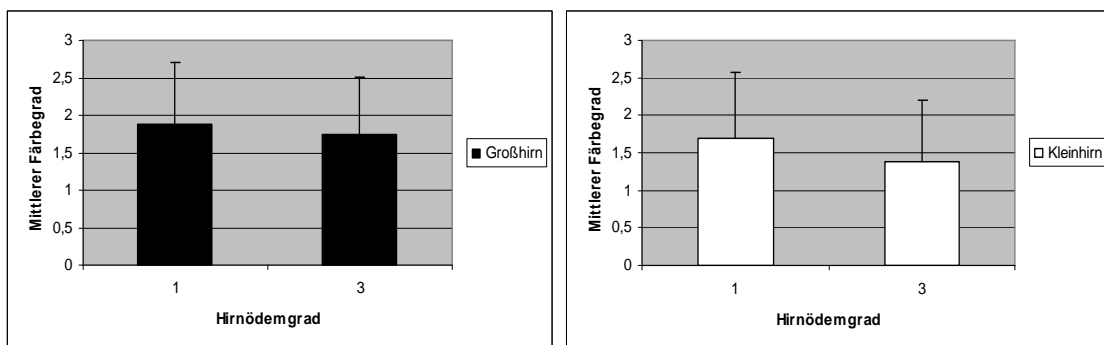
b) Negativkontrolle

## 4.2 Korrelation zwischen der Schwere des Hirnödems und der Aquaporinexpression

### 4.2.1 Korrelation zwischen der Schwere des Hirnödems und der Aquaporin 1-Expression in der weißen Substanz von Groß- und Kleinhirn

Keine erkennbare Korrelation besteht zwischen der Schwere des Hirnödems und der Aquaporin 1-Expression in der weißen Substanz. Die Werte der mittleren Färbegrade unterscheiden sich sowohl im Großhirn (1,9 zu 1,8) als auch im Kleinhirn (1,7 zu 1,4) nur geringfügig, wie aus den Abbildungen 6 a) und b) ersichtlich wird. Die Standardabweichungen zeigen, dass die gemessenen Werte jedoch variieren.

Abb. 6 AQP 1-Expression in der weißen Substanz in Abhängigkeit vom Schweregrad des Hirnödems



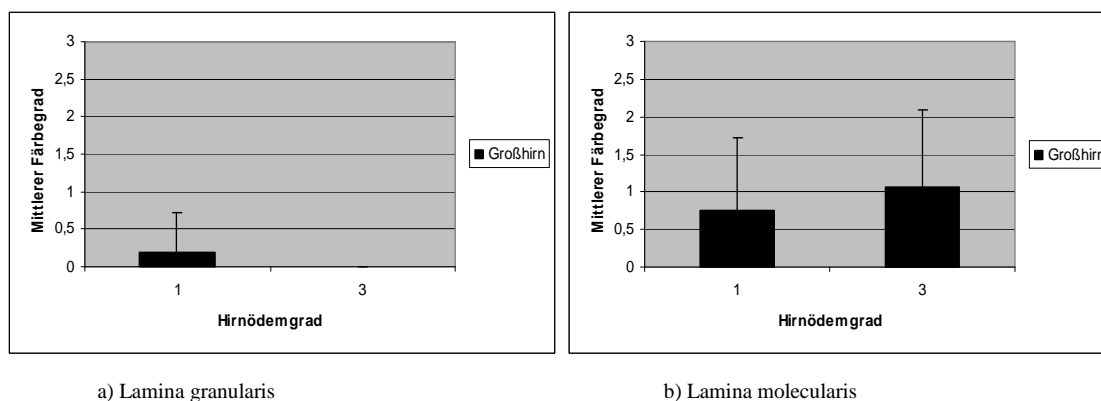
a) Großhirn

b) Kleinhirn



#### 4.2.2 Korrelation zwischen der Schwere des Hirnödems und der Aquaporin 1-Expression im granulären Cortex und in der Lamina molecularis des Cortex cerebri

Abb. 7 AQP 1-Expression im Cortex cerebri in Abhängigkeit vom Schweregrad des Hirnödems

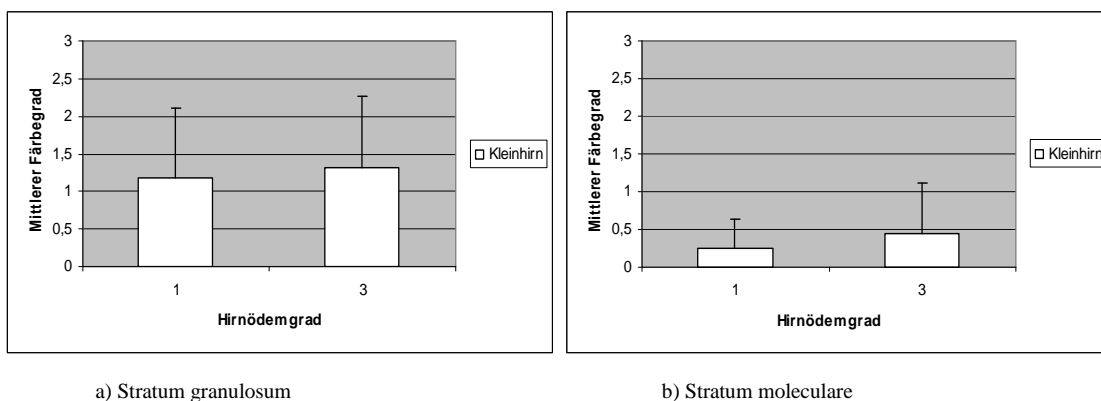


Im granulären Neocortex findet sich nahezu kein Aquaporin 1 (0,2 zu 0,0, Abb. 7 a)), unabhängig von der Schwere des Hirnödems. Auch die Standardabweichung ist mit 0,5 gering. In der Lamina molecularis hingegen wird Aquaporin 1 sichtbar, mit mittleren Färbegraden von 0,8 beim Hirnödemgrad 1 und 1,1 beim Hirnödemgrad 3 jedoch nur geringfügig, ebenso lässt sich aufgrund der geringen Differenz der beiden Werte bei den Ödemgraden 1 und 3 keine Korrelation feststellen (siehe Abbildung 7 b)). Wie die Standardabweichung zeigt, ist die Variation der gemessenen Werte relativ hoch.

#### 4.2.3 Korrelation zwischen der Schwere des Hirnödems und der Aquaporin 1-Expression im Stratum granulosum und im Stratum moleculare des Cortex cerebelli

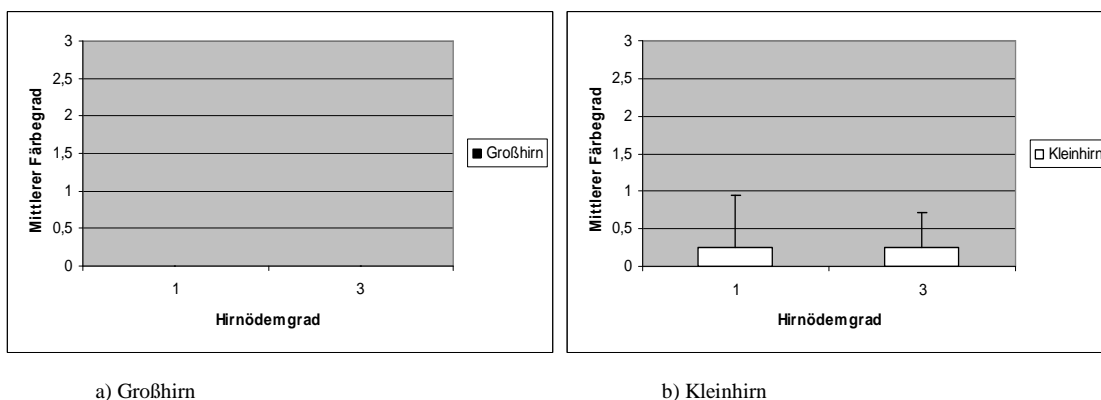
Die Abbildungen 8 a) und b) zeigen, dass bei tendenziell leicht vermehrtem Vorkommen von Hyaluronan beim Hirnödemgrad 3 im Vergleich zum Hirnödemgrad 1 die Unterschiede mit lediglich 0,1 Punkten sowohl im Stratum granulosum als auch im Stratum moleculare des Kleinhirns gering sind (Str. granulosum: 1,2 zu 1,3; Str. moleculare: 0,3 zu 0,4). Die Bandbreite der gemessenen Werte, wie der Fehlerindikator zeigt, ist im Stratum granulosum höher als im Stratum moleculare.

Abb. 8 AQP 1-Expression im Cortex cerebelli in Abhängigkeit vom Schweregrad des Hirnödems



#### 4.2.4 Korrelation zwischen der Schwere des Hirnödems und der Aquaporin 4-Expression in der weißen Substanz von Groß- und Kleinhirn

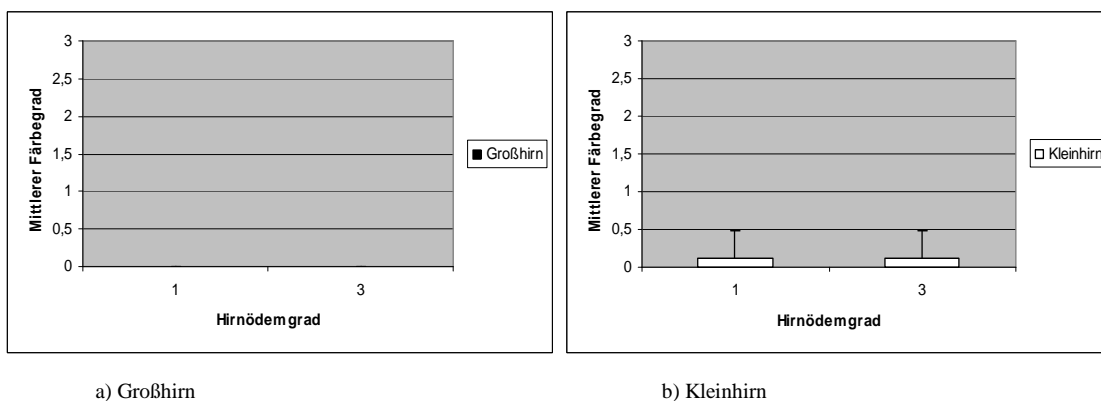
Abb. 9 AQP 4-Expression in der weißen Substanz in Abhängigkeit vom Schweregrad des Hirnödems



Das Aquaporin 4 tritt unabhängig vom Grad des Hirnödems nur dreimal in unserer Testreihe (s. Tab. 1) in der weißen Substanz des Kleinhirns auf, der mittlere Färbegrad ist dabei für die beiden gemessenen Hirnödemgrade gleich (Werte 0,3 zu 0,3, siehe Abbildung 9 b)), die Standardabweichung geringfügig höher für den leichten Hirnödemgrad. In der weißen Substanz des Großhirns ist Aquaporin 4 gar nicht nachweisbar.

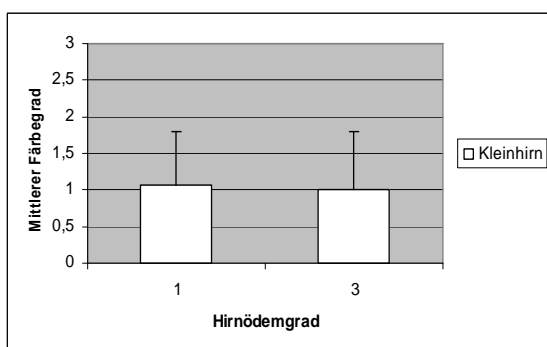
4.2.5 Korrelation zwischen der Schwere des Hirnödems und der Aquaporin 4-Expression in der grauen Substanz von Groß- und Kleinhirn (Abbildungen 10 a) und b)) Ähnlich verhält es sich mit dem Vorkommen von Aquaporin 4 im Cortex, wo es wieder nur im Kleinhirn zweimal zu finden ist. Die mittleren Färbegrade sind bei den beiden Hirnödemgraden identisch (0,1 zu 0,1), ebenso die Standardabweichungen.

Abb. 10 AQP 4-Expression in der grauen Substanz in Abhängigkeit vom Schweregrad des Hirnödems



#### 4.2.6 Korrelation zwischen der Schwere des Hirnödems und der Aquaporin 4-Expression in den Purkinje-Zellen (nur Kleinhirn)

Abb. 11 AQP 4-Expression in den Purkinje-Zellen in Abhängigkeit vom Schweregrad des Hirnödems

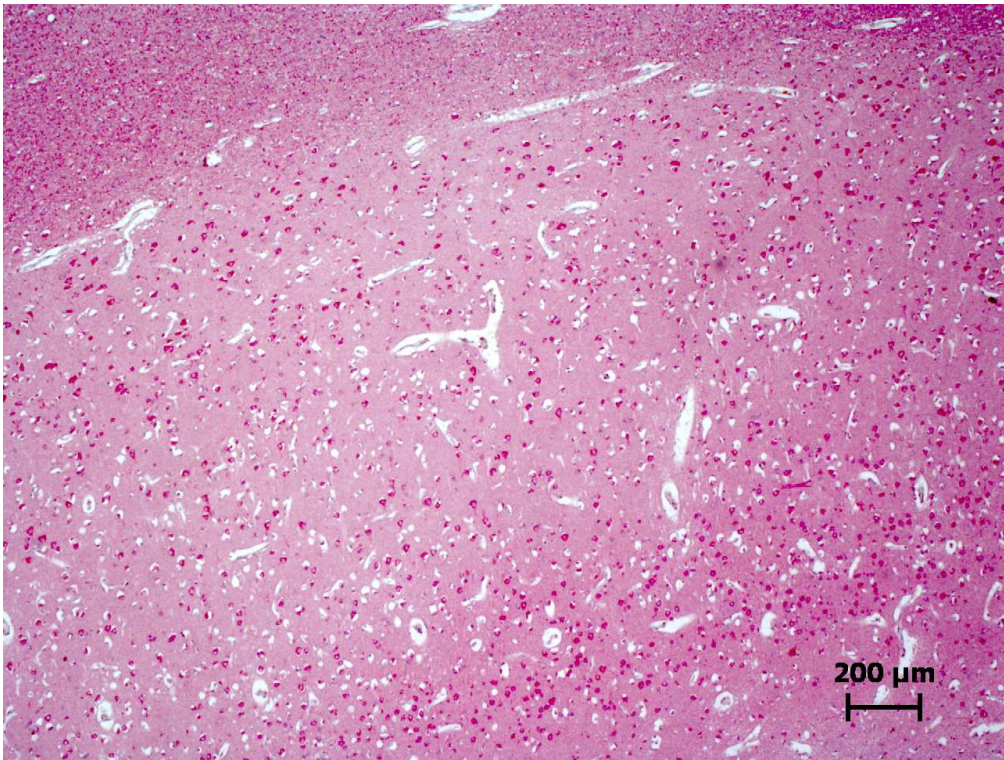


Zwischen der Schwere des Hirnödems und der Aquaporin 4-Expression in den Purkinje-Zellen des Kleinhirns gibt es mit nahezu identischen Werten von 1,1 zu 1,0 keine erkennbare Korrelation. Auch die Standardabweichungen sind

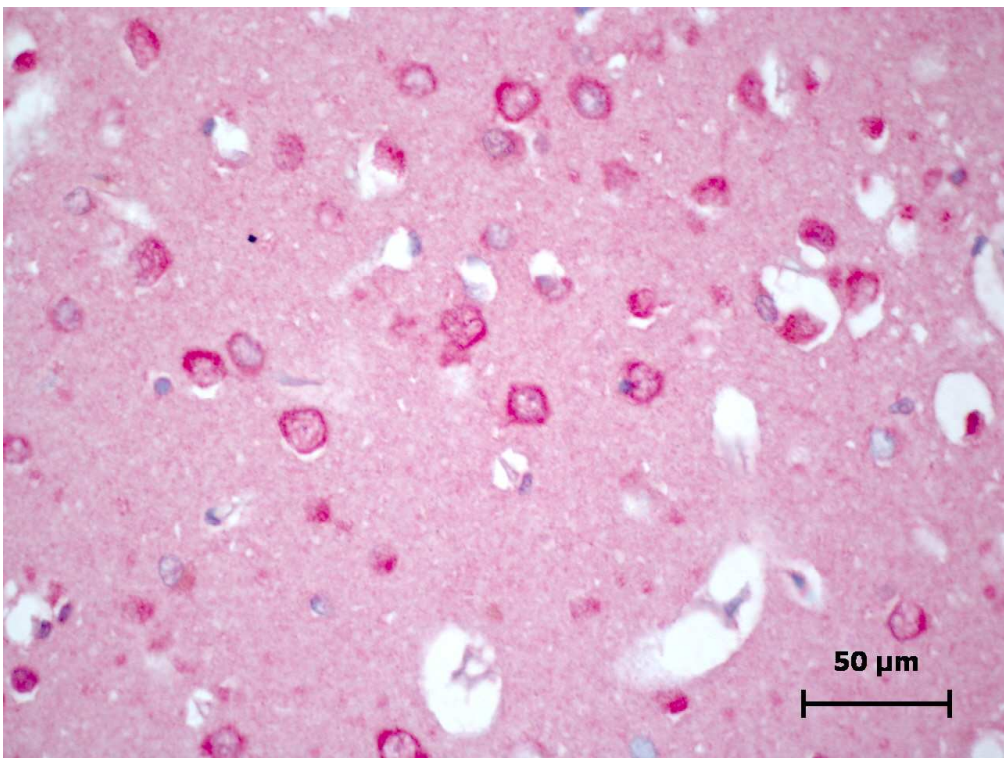
mit Werten von 0,7 für das leichte zu 0,8 für das schwer ausgeprägte Hirnödem praktisch identisch.

Die folgenden Abbildungen zeigen exemplarisch eine starke Hyaluronananfärbung im Großhirn und im Kleinhirn bei ausgeprägtem Hirnödem (Grad 3).

Abb. 12 Hyaluronan anfärbung im Großhirn



a) Übersichtsdarstellung

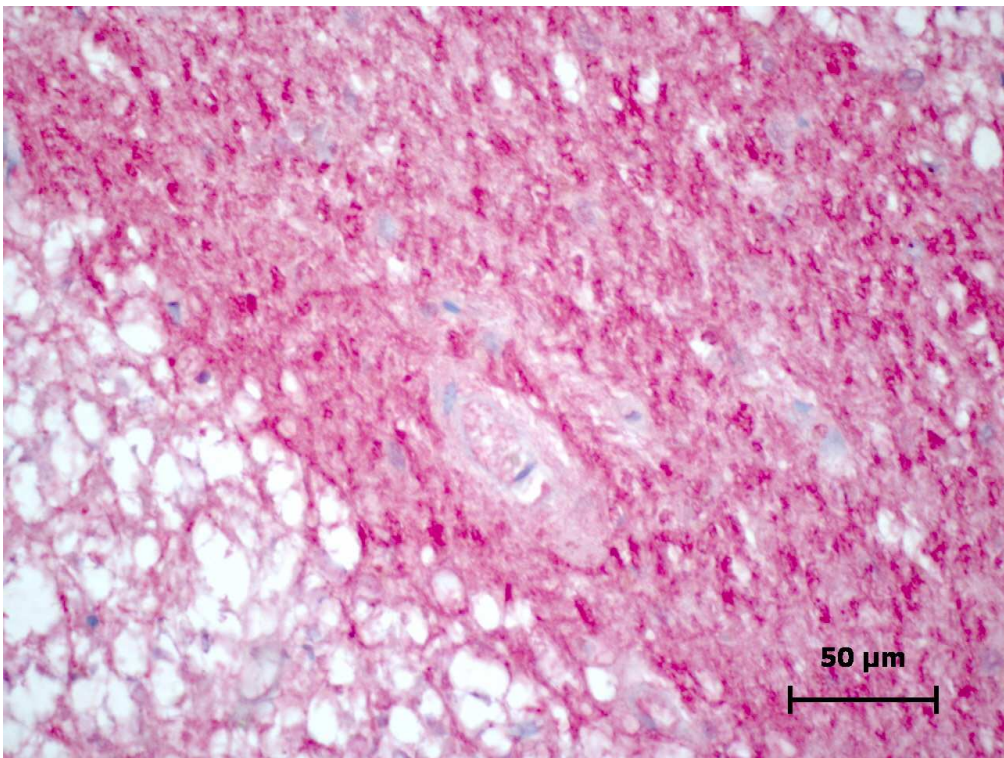


b) 40-fache Vergrößerung

Abb. 13 Hyaluronan anfärbung im Kleinhirn



a) Übersichtsdarstellung



b) 40-fache Vergrößerung

## 5. Diskussion

Mit der Untersuchung vom Vorkommen und der Verteilung von Hyaluronsäure bzw. Hyaluronan im normalen Hirn und beim Hirnödemen erhofften wir uns, einen Marker zur Diagnostik des Hirnödems zu finden, wie es bereits bei anderen das zentrale Nervensystem betreffenden Krankheiten der Fall ist [48]. Hyaluronan als Marker für das Hirnödemen wurde deshalb gewählt, weil es das wasserbindendste Biopolymer des menschlichen Körpers ist [26,28]. Auch in anderen Geweben außerhalb des ZNS wurde bereits ein erhöhter Umsatz von Hyaluronan für die Dauer von Entzündungsreaktionen nachgewiesen [57]. So gilt Hyaluronan als wichtiger Bestandteil der frühen Wundheilung [10], da es an die Zelloberfläche der die Wunde bzw. Entzündung infiltrierenden Leukozyten bindet und ihnen so die Migration in die korrekte Richtung erlaubt [2]. Ebenso ist es für die Rekrutierung von Makrophagen an den Entzündungsort für die Dauer der Wundheilung verantwortlich [21].

Dass Hyaluronan im menschlichen Gehirn in unterschiedlichen Arealen diffus verteilt zu finden ist, ist hinlänglich bekannt [5,13,45,51]. Die höheren Konzentrationen sind im normalen Gehirn vor allem in den äußeren Schichten des Cortex beobachtet worden, wenngleich die weiße Substanz von Hyaluronan stärker durchzogen scheint als die graue Substanz [24].

Unsere Ergebnisse zeigen erhöhte Werte an Hyaluronan in der weißen Substanz des Großhirns und der Brücke beim Hirnödemengrad 1, während diese Werte bei dem stark ausgeprägten Hirnödemengrad 3 leicht vermindert sind. Gegenteilig verhält es sich jedoch bei unseren Werten aus der weißen Substanz des Kleinhirns, hier steigt das Vorkommen von Hyaluronan mit ausgeprägterem Hirnödemengrad. Dies ist mit Untersuchungen aus dem ZNS in Übereinstimmung zu bringen, in denen bei Entzündungsprozessen (Entmyelinisierung), Krankheiten wie z. B. dem Schlaganfall oder Proliferationen von Zellen (Tumorstadium) ein erhöhter Hyaluronan-Gehalt in dem entzündeten bzw. abgestorbenen Hirngewebe (nach Schlaganfall) oder auch in dem um das Tumorstadium umgebenden Gewebe nachgewiesen werden konnte [3,5].

Unsere Ergebnisse aus den Anfärbungen des Zytoplasmas der Neurone und Gliazellen der drei verschiedenen Hirnareale zeigen ähnliche Tendenz wie die Ergebnisse aus der weißen Substanz. Während im Zytoplasma des Großhirns eine Reduktion des

Hyaluronan-Gehaltes vom schwachen zum stark ausgeprägten Hirnödemgrad zu beobachten war, verhält es sich erneut gegenteilig bei den Werten aus dem Zytoplasma des Kleinhirns. Die nahezu identischen Werte aus der Brücke lassen keine aussagekräftige Interpretation zu.

Die Ursache für das gegenteilige Vorkommen von Hyaluronan im Groß- bzw. Kleinhirn bei den unterschiedlichen Hirnödemgraden ist nicht bekannt. Möglicherweise hängt dies mit einer verzögerten Freisetzung oder Produktion von Hyaluronan in den verschiedenen Hirnarealen als Reaktion auf den Entzündungsprozess zusammen. Um dies jedoch beurteilen zu können, müssten detaillierte Studien zur Produktions- bzw. Freisetzungsgeschwindigkeit von hyaluronan-produzierenden Zellen bzw. deren Vorkommen in den einzelnen Hirnregionen angelegt werden. Fraglich bliebe dann aber noch, weshalb die Menge an Hyaluronan in den Arealen des Großhirns mit steigendem Hirnödemgrad wieder abnimmt. Möglich wäre jedoch auch ein Zusammenhang mit dem zeitlich verzögerten Auftreten des Hirnödems in den verschiedenen Hirnarealen, da das festgeschriebene Volumen der intrakranialen Kavität zunächst diktiert, dass die Expansion von irgendeinem Teil des Hirns auf Kosten eines anderen ausgeglichen wird [31]. So wäre eine unterschiedliche Hyaluronanexpression in verschiedenen Teilen des Hirns zu den verschiedenen Stadien des Hirnödemgrades denkbar.

Die ziemlich hohen Werte der Standardabweichungen relativieren die oben angestellten Überlegungen wieder etwas, wobei die Aussagekraft unserer Untersuchungen durch die nur geringe Anzahl der zur Verfügung stehenden Proben humanen Gehirns von vornherein limitiert war. Das arithmetische Mittel und die Standardabweichung würden sich bei größeren Messreihen möglicherweise annähern.

Die in der Zellmembran gelegenen Wasserkanäle, die Aquaporine, kommen in verschiedenen Molekülklassen vor, die in Gruppen von 1 bis 10 eingeteilt wurden [28]. Von besonderem Interesse waren für uns die Aquaporine 1 und 4, da sie in den Strukturen des zentralen Nervensystems vermehrt beobachtet wurden. So findet man das Aquaporin 1 verstärkt im für die Liquorproduktion verantwortlichen Plexus choroideus [28], während dem Aquaporin 4 besonders bei ischämie-induzierten Ödemen Bedeutung beigemessen wird, da bei dessen Abwesenheit eine solche Entstehung verhindert werden kann [30].

Wenn auch viele der Funktionen der Aquaporine noch nicht hinreichend erforscht sind, so besteht doch Hoffnung darauf, dass diese in Zukunft einmal therapeutisch zur Kontrolle und Entstehung von Ödemen nach Traumata und Ischämien eingesetzt werden können [18,30]. Diverse Forschungsarbeiten beschäftigten sich in den letzten Jahren mit diesen Transmembranproteinen, und so erhofften auch wir uns Ergebnisse im Zusammenhang mit dem Hirnödem in verschiedenen Hirnarealen finden zu können. Unsere Werte vom Aquaporin 1 aus der weißen Substanz zeigen jedoch lediglich, dass sowohl im Großhirn als auch im Kleinhirn AQP 1 vorhanden ist. Die absolute Menge an angefärbten AQP 1-Kanälen ist dabei eher gering, beim stark ausgeprägten Hirnödeme Grad 3 ist AQP 1 im Groß- und im Kleinhirn sogar etwas weniger vorhanden. Auch unsere Untersuchungen der Schichten des Cortex vom Großhirn (Lamina granularis und Lamina molecularis) geben eher Aussagekraft darüber, wo sich das Aquaporin 1 befindet (höhere Werte in der Lamina molecularis). Bei den Werten aus dem Stratum granulosum und Stratum moleculare des Cortex cerebelli verhält es sich zwar gegenteilig (höhere Werte im Stratum granulosum), dennoch sind die Unterschiede zwischen den zwei gemessenen Hirnödeme Graden wieder sehr gering. Die zumeist hohen Standardabweichungen würden sich auch hier möglicherweise den Mittelwerten mit einer umfassenderen Messreihe angleichen.

Insgesamt besteht jedoch, mit Ausnahme der Werte aus dem granulären Cortex cerebri, die leichte Tendenz zum Anstieg von AQP 1 bei stärkerem Hirnödem. Dies deckt sich mit der allgemeinen Beobachtung, dass ein Anstieg der Aquaporine 1 und 4 einen drastischen Anstieg der Wasserdurchlässigkeit zur Folge hat [33], was die Entstehung eines Hirnödems begünstigen könnte. Unsere generell geringen Messwerte vom Vorkommen des bislang wenig untersuchten Aquaporins 1 können mit der Tatsache zusammenhängen, dass das AQP 1 bislang im menschlichen Hirn hauptsächlich in der Nähe des Plexus choroideus gefunden wurde und somit eher für die Liquorproduktion verantwortlich ist [28] und nicht an der Entwicklung des Hirnödems beteiligt zu sein scheint.

Das Aquaporin 4 war in unseren Schnitten in der weißen und der grauen Substanz des Großhirns nicht vorhanden. In der weißen und der grauen Substanz des Kleinhirns kam es nur in sehr geringen Mengen vor, seine Expression war nicht vom Grad des Hirnödems abhängig, denn die Intensität der Immunreaktivität war jeweils für die



Hirnödeme grade 1 und 3 identisch. Dies war überraschend, da der Anwesenheit des AQP 4 mit ziemlicher Sicherheit sowohl die Verantwortung für das Vorhandensein bzw. den Anstieg eines Hirnödems nach Traumata im verletzten Gewebe, als auch das einen Hirntumor umgebende Ödem zugerechnet wurde [18,30,33,38].

Ebenso überraschend sind auch die Ergebnisse aus den Purkinje-Zellen des Kleinhirns. Hier war zwar das Vorkommen von AQP 4 festzustellen, allerdings völlig unabhängig vom Hirnödeme grad, die beiden Werte waren nahezu identisch.

Aquaporin 4 wird in den Fortsätzen von Astrozyten in der Nähe von kleinen Blutgefäßen gebildet, jedoch wird es nicht in Neuronen synthetisiert [38]. Im normalen Hirngewebe wurde es bereits rund um Mikrogefäße herum lokalisiert [18]. Auch wurde nachgewiesen, dass das Vorkommen von AQP 4 nach traumatischen Hirnverletzungen, in Hirntumoren umgebendem Gewebe sowie im Zentrum eines vom Hirngewebe abstammenden Tumors angestiegen war [18]. Des Weiteren sind Hirntumoren meist von Hirnödemen umgeben [49]. Daher glaubten wir auch in der weißen und grauen Substanz von Großhirn und Kleinhirn AQP 4 und dessen Abhängigkeit vom Hirnödeme nachweisen zu können, da in den Randschichten auch reichlich Neuroglia und damit Astrozytenfortsätze zu finden sind. Diese Vermutung hat sich jedoch nicht bestätigt. Die langen, sich durch mehrere Schichten des Cortex cerebelli ziehenden Fortsätze der Purkinjezellen scheinen mehr Kontakt zu Astrozytenfortsätzen zu haben, dennoch bestand auch hier keine Korrelation zwischen der AQP 4-Expression und dem Grad des Hirnödems. Möglicherweise waren unsere Bedingungen verantwortlich für die geringen Messwerte an Aquaporin 4. So wurde bereits ein hauptsächlichlicher Anstieg von AQP 4 nach 15 Stunden und nach 8 Tagen nach einer Hirnverletzung gemessen [18]. In Bezug auf diesen (zeitlichen) Parameter sind unsere Bedingungen nicht standardisiert. Ebenso wurde vermutet, dass die AQP 4 Ausschüttung in normalen Astrozyten in vivo von anderen Zellfaktoren herunterreguliert wird [49]. Solange über diese Regulationsmechanismen nichts Genaueres bekannt ist, kann nicht gesagt werden, inwieweit sie eine Rolle bei der Anfertigung unserer Schnitte und Auswertung der Immunreaktivität gespielt haben können. Auch wurde bekannt, dass die Bedingungen in Zellkulturen ein Verlust sowohl an Aquaporin 4 als auch an Aquaporin 1 bewirken können, was mit der fehlenden konstanten Stimulation der Zellen durch Osmolaritätsänderungen zusammenhängen mag [33].

Abschließend lässt sich sagen, dass es reichliche Annahmen gab, die unsere Hypothese stützten, dass die Expression von Hyaluronan und von Vertretern der Aquaporin-Familie mit dem Auftreten eines Hirnödems korreliert sind. Entsprechend verbunden war damit die Hoffnung auf Erschließung neuer therapeutischer Wege zur Behandlung eines Hirnödems mittels gezielter Einsatzes von Hyaluronan oder auch von Aquaporinen. Nach unseren Ergebnissen sind jedoch sowohl das Auftreten von Hyaluronan als auch das von den Aquaporinen 1 und 4 nicht verantwortlich für den Ausprägungsgrad eines Hirnödems. Somit wären auch dieses Molekül bzw. diese Membranproteine für eine Therapie des Hirnödems nicht geeignet. Die Auseinandersetzung mit dem internationalen wissenschaftlichen Umfeld zeigt aber auch, wie viele Unsicherheiten bezüglich der Untersuchung solcher Substanzen im menschlichen Gehirn noch bestehen. So erlangt man z. B. die Ergebnisse, wie auch bei unseren Untersuchungen, zumeist aufgrund einer Abschätzung der Immunreaktivität. Ein absolut objektives Auswertungsverfahren wäre hilfreich. Auch die zumeist begrenzte Anzahl an zur Verfügung stehendem humanen Gewebe limitiert die Aussagekraft einer solchen Studie. Die Standardabweichung in unseren Ergebnissen vermag anzudeuten, dass sich mit einer größeren Messreihe auch andere Ergebnisse ableiten ließen. Letztlich bedarf es daher noch weiterer ähnlich angelegter Studien, um eine abschließende Aussage treffen zu können.

## 6. Zusammenfassung

Das Hirnödem infolge eines Schädel-Hirntraumas stellt im heutigen klinischen Alltag immer noch eine ernst zu nehmende Komplikation dar, da sowohl seine Pathophysiologie noch weitgehend unbekannt ist, als auch seine Diagnostik häufig Schwierigkeiten bereitet. Das wasserbindende Biopolymer Hyaluronan ist im menschlichen Körper ubiquitär vorhanden, speziell im menschlichen Gehirn jedoch in sehr hoher Konzentration. Aufgrund seiner enormen Kapazität bezüglich der Wasserbindung stellte sich uns die Frage, inwieweit das Vorkommen und die Verteilung von Hyaluronan im menschlichen Gehirn mit dem Ausprägungsgrad eines Hirnödems assoziiert ist. Andere Studien belegten bereits den Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von Hyaluronan und dem Auftreten pathologischer Zustände, wie z. B. dem Schlaganfall oder der Meningitis. Auch zwei Unterarten der wassertransportierenden Transmembranproteine, die Aquaporine 1 und 4, untersuchten wir auf eine Korrelation mit dem Auftreten eines Hirnödems hin, da sie bereits als Faktoren für die Entstehung eines ischämie-induzierten Hirnödems beobachtet wurden. Wir nahmen 16 Gewebeproben aus drei unterschiedlichen Arealen des menschlichen Gehirns, dem Großhirn, der Brücke und dem Kleinhirn, und fertigten davon jeweils Paraffinschnitte an. In immunhistochemischen Verfahren brachten wir das Hyaluronan und die Aquaporine 1 und 4 zur Darstellung. Ausgewertet wurde jeweils der Anfärbungsgrad in den verschiedenen Abschnitten des Gehirns. Dem setzten wir das Ausmaß des Hirnödems gegenüber, welches bereits zuvor bei der Gewebentnahme bestimmt worden war. Unsere Ergebnisse zeigten jedoch keine Korrelationen zwischen dem Vorkommen von Hyaluronan bzw. der Aquaporine 1 und 4 und dem Grad des Hirnödems. Die ermittelten Werte unterschieden sich nur geringfügig, in einigen Fällen konnten wir sogar mehr Hyaluronan oder Aquaporine bei dem geringeren Hirnödemgrad feststellen. Nach unseren Ergebnissen ist somit das Vorkommen von Hyaluronan und von den Aquaporinen für den Ausprägungsgrad eines Hirnödems nicht verantwortlich. Unter Einbeziehung der eigenen Fehlerquote sowie der internationalen Literatur zeigen sich jedoch noch viele Unsicherheiten bezüglich der Untersuchung der beiden Moleküle im menschlichen Gehirn auf. Wie oben bereits deshalb erwähnt, sind weitere Untersuchungen notwendig, um ein endgültiges Resultat zu erstellen.

## 7. Literaturverzeichnis

- [1] Agren UM, Tammi RH, Tammi MI. Reactive oxygen species contribute to epidermal hyaluronan catabolism in human skin organ culture. *Free Radic. Biol. Med.* 1997; 23: 996-1001
- [2] Ali S, Palmer AC, Banerjee B, Fritchley SJ, Kirby JA. Examination of the function of RANTES, MIP-1 $\alpha$  and MIP-1 $\beta$  following interaction with heparin-like glycosaminoglycans. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 11721-27
- [3] Al`Qteishat A, Gaffney J, Krupinski J, Rubio F, West D, Kumar S, Kumar P, Mitsios N, Slevin M. Changes in hyaluronan production and metabolism following ischaemic stroke in man. *Brain Advance Acces* 2006; 10: 1093/brain/awl139
- [4] Ayata C, Ropper AH. Ischaemic brain oedema. *J Clin. Neuroscience* 2002; 9: 113-24
- [5] Back SA, Tuohy TMF, Chen H, Wallingford N, Craig A, Struve J, Luo NL, Banine F, Liu Y, Chang A, Trapp BD, Bebo BF, Rao MS, Sherman LS. Hyaluronan accumulates in demyelinated lesions and inhibits oligodendrocyte progenitor maturation. *Nature Medicine* 2005; 10: 1038/nm1279
- [6] Blakemore WF, Gilson JM, Crang AJ. The presence of astrocytes in areas of demyelination influences remyelination following transplantation of oligodendrocyte progenitors. *Exp. Neurol.* 2003; 184: 955-63
- [7] Brecht M, Mayer U, Schlosser E, Prehm P, Increased hyaluronate synthesis is required for fibroblast detachment and mitosis, *Biochem J* 1986; 239: 445-50
- [8] Brocke S, Piercy C, Steinman L, Weissman IL, Veromaa T. Antibodies to CD44 and integrin alpha4, but not L-selectin, prevent central nervous system inflammation and experimental encephalomyelitis by blocking secondary leukocyte recruitment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999; 96: 6896-901
- [9] Carter BS, Ogilvy CS, Candia GJ, Rosas HD, Buonanno F. One-year outcome after decompressive surgery for massive nondominant hemispheric infarction. *Neurosurg.* 1997; 40: 1168-75
- [10] Chen WY, Abatangelo G. Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound Repair Regen.* 1999; 7: 79-89

- [11] Claassen J, Carhuapoma JR, Kreiter KT, Du EY, Conolly ES, Mayer SA. Global Cerebral Edema After Subarachnoid Hemorrhage: Frequency, Predictors, and Impact on Outcome. *Stroke* 2002; 33: 1225-32
- [12] Delashaw JB, Broaddus WC, Kassell NF et al. Treatment of right hemispheric cerebral infarction by hemicraniectomy. *Stroke* 1990; 21: 874-81
- [13] Delpech B, Delpech A, Bruckner G, Girard N, Maingonnat C, Hyaluronan and hyaluronectin in the nervous system. *Ciba Found Symp* 1989; 143: 208-20
- [14] Engström-Laurent A, Laurent UBG, Lilja K, Laurent TC. Concentration of sodium hyaluronate in serum. *Scand. J. Clin. Lab. Invest* 1985; 45: 497-504
- [15] Girgrah N et al. Localization of the CD44 glycoprotein to fibrous astrocytes in normal white matter and to reactive astrocytes in active lesions in multiple sclerosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1991; 50: 779-92
- [16] Haegel H, Tolg C, Hofmann M, Ceredig R. Activated mouse astrocytes and T cells express similar CD44 variants. Role of CD44 in astrocyte/T cell binding. *J. Cell Biol.* 1993; 122: 1067-77
- [17] Hamperl H. *Lehrbuch der allgemeinen Pathologie und pathologischen Anatomie*, 27. neubearbeitete Auflage. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1966; 413-25, 589
- [18] Hu H, Yao HT, Zhang WP, Zhang L, Ding W, Zhang SH, Chen Z, Wei EQ. Increased expression of aquaporin-4 in human traumatic brain injury and brain tumors. *J. Zhejiang Univ. SCI* 2005; 6B(1): 33-37
- [19] Hutchinson P, Timofeev I, Kirkpatrick P. Surgery for brain edema. *Neurosurg. Focus* 2007; 22: E14
- [20] Itano N, Kimata K., Mammalian hyaluronan synthases, *Life* 2002; 54: 195-9
- [21] Jameson JM, Cauvie G, Sharp LL, Witherden DA, Havran WL.  $\gamma\delta$  T cell-induced hyaluronan production by epithelial cells regulates inflammation. *JEM* 2005; 201: 1269-79
- [22] Jiang H et al. A requirement for the CD44 cytoplasmic domain for hyaluronan binding, pericellular matrix assembly, and receptor-mediated endocytosis in COS-7 cells. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 10531-38
- [23] Laurent TC, Fraser JRE, Hyaluronan, *FASEB J*; 1992, 6: 2397-404

- [24]Laurent UBG, Laurent TC, Hellsing LK, Persson L, Hartman M, Lilja K. Hyaluronan in human cerebrospinal fluid. *Acta Neurol. Scand.* 1996; 94: 194-206
- [25]Lee KR, Colon GP, Betz AL, Keep RF, Kim S, Hoff JT. Edema from intracerebral hemorrhage: the role of thrombin. *J Neurosurg.* 1996; 84: 91-6
- [26]Löffler G, *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*, 3. vollst. überarb. Aufl., Berlin Heidelberg New York Barcelona Budapest Hongkong London Mailand Paris Singapur Tokio: Springer; 1999, 97, 665-73
- [27]Lüke HJ, Prehm P, Synthesis and shedding of hyaluronan from plasma membranes of human fibroblasts and metastatic and non-metastatic melanoma cells, *Biochem J* 1999; 343: 71-5
- [28]Lüllmann-Rauch R, *Histologie*, Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag; 2003, 82, 104-21, 172, 221
- [29]Lynn BD, Turley EA, Nagy JI, Subcellular distribution, calmodulin interaction, and mitochondrial association of the hyaluronan-binding protein RHAMM in rat brain, *J Neurosci Res* 2001; 65: 6-16
- [30]Marmarou A. A review of progress in understanding the pathophysiology and treatment of brain edema. *Neurosurg. Focus* 22 2007; 5: E1
- [31]Marmarou A, Signoretti S, Fatouros PP, Portella G, Aygok GA, Bullock MR. Predominance of cellular edema in traumatic brain swelling in patients with severe head injuries. *J Neurosurg.* 2006; 720-30
- [32]Marret S et al. Expression and effects of hyaluronan and of the hyaluronan-binding protein hyaluronectin in newborn rat brain glial cell cultures. *J. Neurochem.* 1994; 62: 1285-95
- [33]McCoy E, Sontheimer H. Expression and Function of Water Channels (Aquaporins) in Migrating Malignant Astrocytes. *Glia* 2007 August 1; 55(10): 1034-43
- [34]Moretto G, Xu RY, Kim SU. CD44 expression in human astrocytes and oligodendrocytes in culture. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1993; 52: 419-23
- [35]Moseley R, Waddington RJ, Embery G. Degradation of glycosaminoglycans by reactive oxygen species derived from stimulated polymorphonuclear leukocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1997; 1362: 221-31

- [36] Nagy JI, Hacking J, Frankenstein UN, Turley EA, Requirement of the Hyaluronan receptor RHAMM in neurite extension and motility as demonstrated in primary neurons and neuronal cell lines, *J Neurosci* 1995; 15: 241-52
- [37] Nickel V, Prehm S, Lansing M, Mausolf A, Podbielski A, Deutscher J, et al., An ectoprotein kinase of group C streptococci binds hyaluronan and regulates capsule formation, *J Biol Chem* 1998; 273: 23668-73
- [38] Nielsen S, Nagelhus EA, Amiry-Moghaddam M, Bourque C, Agre P, Ottersen OP. Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J Neurosci* 1997; 17(1): 171-80
- [39] Noble PW, Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair, *Matrix Biol* 2002; 21: 25-9
- [40] Ponta H, Sherman L, Herrlich PA. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nav. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003; 4: 33-45
- [41] Prehm P, Synthesis of hyaluronate in differentiated teratocarcinoma cells, Characterization of the synthase, *Biochem J*; 1983, 211: 181-9
- [42] Prehm P, Synthesis of hyaluronate in differentiated teratocarcinoma cells, Mechanism of chain growth, *Biochem J*; 1983, 211: 191-8
- [43] Prehm P, Hyaluronate is synthesized at plasma membranes, *Biochem J*; 1984, 220: 597-600
- [44] Prehm P, Hyaluronan, In: Steinbüchel A (Editor), *Biopolymers*, 15. Weinheim, Germany: Wiley-VCH-Verlag; 2002, 3790-406
- [45] Prehm P, Schumacher U, Inhibition of hyaluronan export from human fibroblasts by inhibitors of multidrug resistance transporters, *Biochemical Pharmacology* 2004; 68: 1401-10
- [46] *Pschyrembel klinisches Wörterbuch*, 259. Aufl., Version 2002, Berlin New York: Walter de Gruyter; 2002
- [47] Raslan A, Bhardwaj A. Medical management of cerebral edema. *Neurosurg. Focus* 2007; 22: E12
- [48] Rauch U. Extracellular matrix components associated with remodelling process in brain. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 2004; 61: 2031-45

- [49]Saadoun S, Papadopoulos MC, Davies DC, Krishna S, Bell BA. Aquaporin-4 expression is increased in oedematous human brain tumors. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002; 72: 262-65
- [50]Sampson PM, Rochester CL, Freundlich B, Elias JA. Cytokine regulation of human lung fibroblast hyaluronan (hyaluronic acid) production. Evidence for cytokine-regulated hyaluronan (hyaluronic acid) degradation and human lung fibroblast-derived hyaluronidase. *J. Clin. Invest* 1992; 90: 1492-503
- [51]Sherman LS, Struve JN, Rangwala R, Wallingford NM, Tuohy MF, Kuntz C, IV. Hyaluronate-based extracellular matrix: keeping glia in their place. *Glia* 2002; 38: 93-102
- [52]Silbernagel S, Despopoulos A. *dtv-Atlas der Physiologie*, 2. überarbeitete und erweiterte Auflage 1983, Deutscher Taschenbuch Verlag und Georg Thieme Verlag; 138-43, 204
- [53]Slevin M, Krupinski J, Kumar S, Gaffney J, Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan induce protein tyrosine kinase activity in endothelial cells and activate a cytoplasmic signal transduction pathway resulting in proliferation, *Lab Invest* 1998; 78: 987-1003
- [54]Slevin M, Kumar S, Gaffney J, Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan induce multiple signal transduction pathways affecting vascular endothelial cell mitogenic and wound healing responses, *J Biol Chem* 2002; 277: 41046-59
- [55]Slevin M, West D, Kumar S, Hyaluronan, angiogenesis and malignant disease, *Int J Cancer* 2004; 109: 793-4
- [56]Stern R, Devising a pathway for hyaluronate catabolism, are we there yet? *Glycobiology* 2003; 12: 105R-15R
- [57]Toole BP. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nat. Rev. Cancer* 2004; 4: 528-39
- [58]Tuohy TM et al. CD44 overexpression by oligodendrocytes: a novel mouse model of inflammation-independent demyelination and dysmyelination. *Glia* 2004; 47: 335-45
- [59]Waldenstrom A, Martinussen HJ, Gerdin B, Hällgren R. Accumulation of hyaluronan and tissue edema in experimental myocardial infarction. *J Clin Invest* 1991; 88: 1622-8



- [60] Weigel PH, Fuller GM, LeBoeuf RD. A model for the role of hyaluronic acid and fibrin in the early events during the inflammatory response and wound healing. *J. Theor. Biol.* 1986; 119: 219-34
- [61] West DC, Lees VC, Fan TP, Angiogenesis in a delayed revascularisation model is accelerated by oligosaccharides of hyaluronan, *Lab Invest* 1995; 73: 259-66
- [62] Yamaguchi Y. Leticans: organizers of the brain extracellular matrix. *Cell. Mol. Life Sci.* 2000; 57: 276-89

## **8. Danksagung**

Ich möchte allen Beteiligten ganz herzlich danken, die mir bei der Realisierung dieser Arbeit geholfen haben. Ganz speziell möchte ich an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. med. Udo Schumacher für die Überlassung des Themas, sowie für seine hervorragende Betreuung und Hilfe bei der Planung meiner Arbeit danken. Ein Dank gebührt auch Frau Maike Märker für die Einarbeitung in das komplexe Thema der Immunhistochemie und Herrn Carsten Köpke sowie Frau Susanne Feldhaus für deren Hilfe bei technischen Fragen. Herrn Prof. Kjeld Møllgard (Kopenhagen) danke ich für die Aquaporinfärbungen.

Ein besonderes Dankeschön geht schließlich an meine engsten Unterstützer, meine Eltern Dr. Christian und Astrid Schmidt-Belden, die mir stets mit einem offenen Ohr sowie Rat und Tat zur Seite standen.

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: \_\_\_\_\_