

Autoradiographische Untersuchungen bei experimenteller Commotio cerebri

J. WOLTER und H. NOETZEL

Neuropathologische Abteilung (Prof. Dr. H. Noetzel)
des Pathologischen Institutes (Prof. Dr. W. Sandritter)
der Universität Freiburg i. Br.

Eingegangen am 27. Oktober 1969

Autoradiographic Investigations in Experimental Brain Concussion

Summary. Experimental concussion in rabbits lead to an increased incorporation of ^3H Thymidin in glial and mesenchymal cells. It is concluded from this that there is an increased cell proliferation. The marked ^3H Thymidin incorporation began after 24 hours and reached a maximum level after 36 hours. This glial reaction occurs simultaneously with a tendency to proliferation during experimental brain oedema.

Key-Words: Cerebral Concussion — Rabbit — Incorporation, Increase and Brain Oedema — ^3H -Thymidin.

Zusammenfassung. Nach experimenteller Commotio cerebri bei Kaninchen war ein verstärkter ^3H -Thymidin-Einbau in Glia- und Mesenchymzellen zu erkennen, der für eine deutliche Zellproliferation spricht. Schon nach 24 Std kam es zu einem deutlichen Anstieg der Markierung, die dann nach 36 Std ihren Höhepunkt erreichte. Diese Reaktion der Gliazellen verhält sich zeitlich etwa gleich der beschriebenen Proliferationstendenz beim experimentellen Hirnödem.

Schlüsselwörter: Commotio cerebri — Kaninchen — Hirnödem und Einbausteigerung — ^3H -Thymidin.

Die Commotio ist eine nach stumpfem Schädeltrauma auftretende, kurz dauernde Bewußtlosigkeit, bei der keine morphologisch erkennbare Schädigung des Gehirnes zurückbleiben soll (Kessel, Guttman u. Maurer, 1969). Diese Definition gilt für leichtere Fälle. Fälle, mit lang anhaltender Bewußtlosigkeit und gewissen Residualsymptomen sind hier nicht eingeschlossen.

Um nachzuprüfen, ob trotz Fehlens lichtoptisch sichtbarer Ausfälle nicht doch Veränderungen auftreten können, bedienten wir uns der autoradiographischen Methode. Hierzu verwendeten wir ^3H -Thymidin, einen spezifischen DNS-Vorläufer, der in der prämitotischen S-Phase mit der Verdoppelung der DNS zur DNS-Synthese verwendet wird. Möglicherweise vorhandene Proliferationstendenzen des Gewebes lassen sich hiermit frühzeitig erfassen.

Material und Methoden

Als Versuchstiere verwendeten wir Kaninchen mit etwa gleichem Gewicht von 1,5 kg. Eine Auswahl hinsichtlich des Geschlechtes wurde nicht getroffen. 10 Kaninchen wurden in Holzkästen gesperrt, die an einer Seite eine entsprechend große Öffnung aufwiesen, aus der der Kopf frei beweglich herausragte. Durch drei leichtere Schläge mit einem Hartgummihammer in direkter Folge auf den Hinterkopf wurde eine kurze, vergleichbare Bewußtlosigkeit von 10–15 sec Dauer erzeugt. Anschließend waren die Tiere für einen Zeitraum von 1–2 Std noch etwas benommen, in der Folgezeit jedoch nicht mehr von gesunden Tieren zu unterscheiden. Residualsymptome, wie z.B. Lähmungen der Extremitäten wurden nicht beobachtet.

Je 2 Tiere töteten wir durch Luftembolie nach 12, 24, 36, 48 und 60 Std, nachdem wir jeweils 60 min zuvor 0,5 ml (= 0,5 mCi) ^3H -Thymidin suboccipital in den Liquorraum injiziert hatten. Zur Kontrolle wurde weiteren 2 Kaninchen ohne vorheriges Schädeltrauma die gleiche Menge ^3H -Thymidin in den Liquorraum verabreicht.

Bei der Herausnahme des Gehirns wurde sorgfältig nach evtl. vorhandenen Schädelfrakturen und subduralen Hämatomen gesucht. Anschließend wurde das Gehirn in 10%igem Formol fixiert. Alle Hirne wurden in den gleichen Ebenen frontal geschnitten. Von jedem Tier wurden 3 Frontalscheiben (Medulla oblongata, Mittelhirn und Kleinhirn sowie Mittelhirn und Großhirn) in Paraffin eingebettet. 6 μ dicke Schnitte wurden dann nach Entparaffinieren mit einer photographischen Emulsion (Dipping-Methode; flüssige Emulsion K 5 Ilford, London) 15 Tage lang exponiert und entwickelt. Anschließend wurden die Schnitte für die mikroskopische Untersuchung mit Hämatoxilin-Eosin gefärbt. Ausgewertet wurden die Schnittflächen in ihrer Gesamtheit bei 200facher Vergrößerung, aufgeteilt in je 4 Schnittflächen der 3 eingebetteten Hirnabschnitte. Die Differenzierung der Gliazellen und der Zellen aus der mesenchymalen Reihe erfolgten nach den allgemein üblichen Kriterien (Spielmeier, 1922).

Befunde

Bei den *Kontrolltieren* fanden wir pro Schnittebene der Medulla oblongata (Abb.1) eine Gesamtzahl von 13 ± 3 Gliazellen und entsprechend 7 ± 3 markierte mesenchymale Zellelemente. Im Mittelhirn (Schnitthöhe: Kleinhirn) waren es 16 ± 3 Gliazellen und 6 ± 3 Mesenchymzellen (Abb.2). Die Auszählung des Mittelhirnabschnittes in Höhe des Großhirns ergab 36 ± 6 Gliazellen und 15 ± 3 Mesenchymzellen (Abb.3). Diese bei den Kontrolltieren ermittelten Zahlen wurden bei der Auswertung der Schnitte nach vorausgegangener Commotio als Vergleichswerte zugrunde gelegt.

12 Std nach der *experimentellen Commotio* (s. Abb.1) fand sich auf Schnitten durch die *Medulla oblongata* mit 15 ± 3 Zellen eine noch nicht signifikante Erhöhung der Anzahl markierter Gliazellen, während die Anzahl der mesenchymalen Zellelemente schon fast doppelt so hoch geworden war, 13 ± 3 Zellen. Nach 24 Std zählten wir bereits 33 ± 5 markierte Gliazellen und 17 ± 3 markierte Mesenchymzellen. Nach 36 Std hatte sich die Anzahl der mit ^3H -Thymidin inkorporierten Zellen sowohl bei den Glia- als auch bei den Mesenchymzellen annähernd ver-

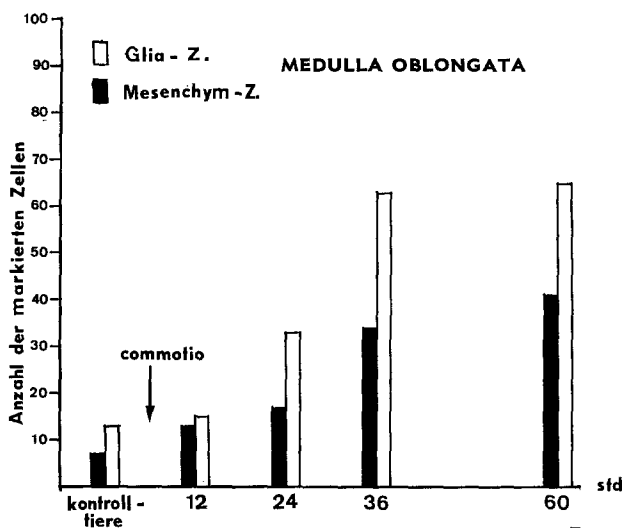


Abb. 1

Abb. 1—3. Unterschiedliches Verhalten von glösen und mesenchymalen Zellelementen nach vorausgegangener Commotio cerebri, aufgeteilt nach den verschiedenen Schnittebenen. Die Kontrolltiere kennzeichnen die Anzahl markierter Zellen bei Gehirnen ohne Vorschädigung

doppelt (63 ± 10 Gl.-Z., 34 ± 10 Mes.-Z.). Der 40 Stundenwert mußte in dieser und in allen folgenden Abbildungen vernachlässigt werden, da die intracisternale Injektion bei diesen beiden Tieren fehlschlug und in allen untersuchten Schnitten keine markierten Zellen zu finden waren. 60 Std nach dem Trauma ist eine etwa gleichhohe Zahl von Gliazellen (65 ± 2) gezählt worden, während die Mesenchymzellen (41 ± 6) noch gering angestiegen waren.

In den folgenden Abbildungen (Abb. 2 und 3) kennzeichnen die Höhen der einzelnen aufgezeichneten Säulen die Anzahl der markierten Zellen von beiden ausgezählten *Mittelhirnflächen*. Beide Zellsorten sind hierbei schon nach 12 Std etwa doppelt so hoch wie die Zahl der Kontrolltiere. Nach 24 Std steigen beide Zellzahlen weiter an; 36 Std nach dem Trauma erreichen die markierten Gliazellen einen Höchstwert, der dann bis zur 60 Std-Kontrolle wieder in Richtung des ersten ausgezählten 12 Std-Wertes abfällt. Die Mesenchymzellen haben (Abb. 2) bereits nach 24 Std ihre höchste Markierung erreicht und erreichen nach 60 Std ebenfalls wieder ihren Ausgangswert von 12 Std.

Auf eine Gegenüberstellung der getrennt ausgezählten Zahlenwerte in den mitgeschnittenen Groß- und Kleinhirnanteilen wurde verzichtet, da aufgrund der verschiedenen Massenverhältnisse schon makroskopisch

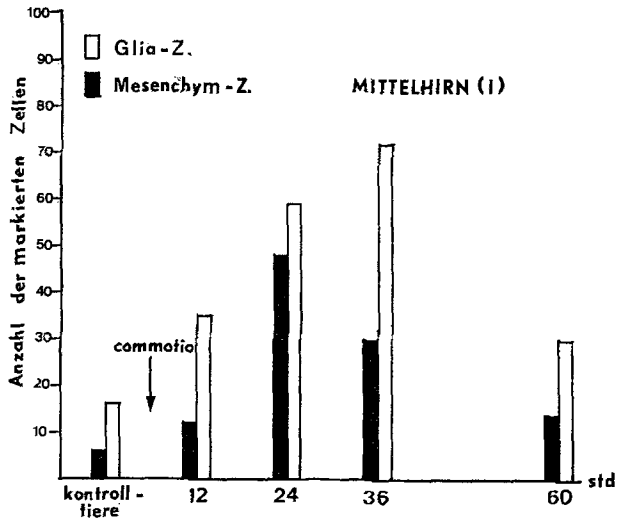


Abb. 2

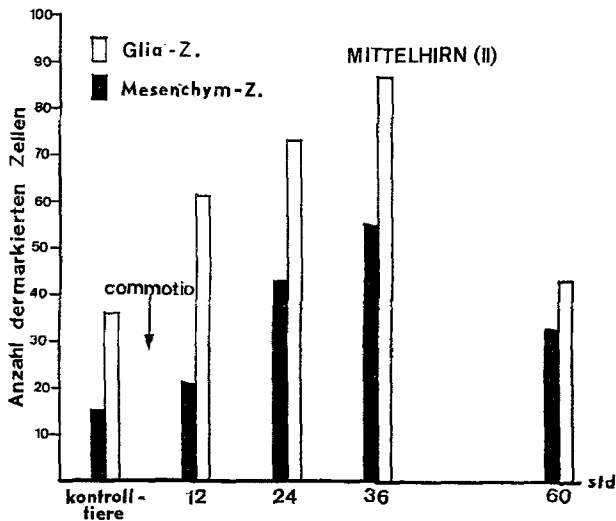


Abb. 3

deutlich unterschiedliche Flächen auszuwerten waren, während die verglichenen Mittelhirn-Schnittebenen und Medulla oblongata-Abschnitte annähernd die gleiche Fläche hatten. In Abb. 4 sind diese bisher nicht berücksichtigten Klein- und Großhirnanteile zusammen mit allen anderen ausgezählten markierten Zellen aufgetragen. Danach liegt der Gipfel der

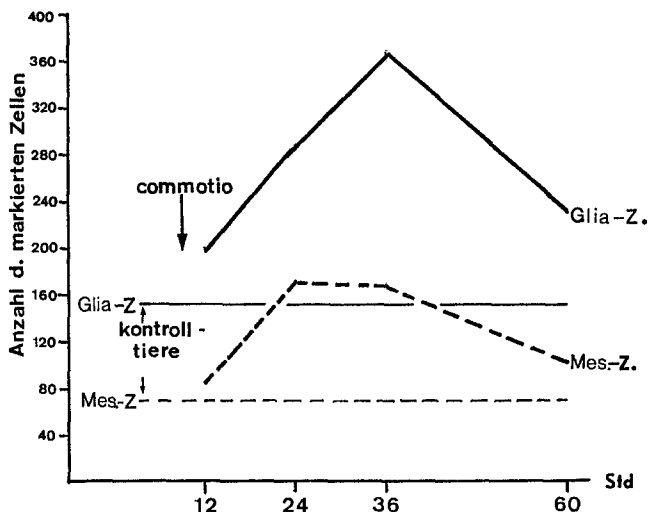


Abb. 4. Summe aller ausgezählten markierten Zellen einschließlich mitgeschnittener Groß- und Kleinhirnanteile: Die Reaktion, besonders der Gliazellen hat ihren Kulminationspunkt 36 Std nach vorausgegangener Commotio cerebri

Reaktion bei den Gliazellen zeitlich bei 30 Std, während die Mesenchymzellen zwischen 24 und 36 Std nach dem Trauma ihre höchste ^3H -Thymidin-Einbauraten zeigen.

Besprechung der Befunde

Zum Problem der Commotio sind schon zahlreiche Befunde und tierexperimentelle Ergebnisse mitgeteilt worden. Die ersten Aussagen über morphologische Änderungen gehen bis auf das Jahr 1677 zurück (Boirel). 1771 wurde von Petit erstmals die klassische Einteilung Commotio — Contusio — Compressio cerebri — eingeführt. Nach ihm und Boirel sollte die Commotio eine reine „Erschütterung“ ohne jede pathologisch-anatomische Veränderung sein. An dieser Einteilung der Schädeltraumen und an der Aussage des Fehlens jeglicher morphologischer Veränderung bei der Commotio hat sich bis heute noch nichts Wesentliches verändert.

Über die Ursache der Commotio existieren deswegen viele Theorien, einmal vasculäre, zum anderen neurogene: die vasculären Theorien sind zur Zeit in den Hintergrund getreten, da eine Ischämie oder Anämie nicht im Augenblick der Bewußtlosigkeit schon manifest werden kann (Peters, 1969). Die neurogenen Theorien deuten den Bewußtseinsverlust einmal als allgemeinen Funktionsverlust des Gehirns, zum anderen als eine temporäre Lähmung bestimmter Strukturen, z. B. des Hirnstamms.

Gerade von Ward (1966), Jefferson (1944) und Guardjian (1944) wird eine Präponderanz des Hirnstammes angenommen, speziell für die „Formatio reticularis“. Daß nach Zerstörung dieser Zone eine Bewußtlosigkeit eintritt, ist tierexperimentell bewiesen. Nach Schneider (1964) ist dieses Gebiet Bestandteil des dreigliedrigen reticulo-thalamo-corticalen Systems und zur Aufrechterhaltung des Bewußtseins mit entscheidend. Ward (1948, 1966) nimmt an, daß durch den Schlag auf den Kopf diese Zone so vorgeschädigt wird, daß periphere Reize, welche dieses aktivierende System antreiben, nicht mehr dazu imstande sind und deshalb die Bewußtlosigkeit eintritt. Morphologisch sind jedoch überzeugende anatomisch-pathologische Veränderungen nicht bekannt. Einige amerikanische Autoren haben jedoch Nervenzellalterationen festgestellt und beschrieben (Windle et al., 1946; Groat u. Simmons, 1950; Guardjian u. Webster, 1944). Die Tiere (Meerschweinchen und Rhesusaffen) erhielten einen bzw. mehrmalige Schläge auf den Schädel und wurden in verschiedenen zeitlichen Intervallen vom Experiment getötet. Dabei blieben die Nervenzellen der Hirnrinde im allgemeinen unverändert, die Zellen der Hirnstammkerne zeigten jedoch Veränderungen im Sinne einer Chromatolyse. Bei länger überlebenden Tieren wurde eine Nervenzellreduktion festgestellt, vor allem in der Substantia reticularis, im Nucleus ruber und Nucleus vestibularis lateralis. Peters (1969) bezweifelt diese Befunde und begründet das vor allem mit einem völligen Fehlen einer gliösen Reaktion, wobei degenerative Veränderungen an den Gliazellen nicht beschrieben wurden. Ebenso konnte Unterharnscheidt (1963) in seinen Tierexperimenten entsprechende Befunde nie erheben. Spatz (1937) hatte schon vorher darauf hingewiesen, daß er bei seinen zahlreichen Versuchen mit langanhaltendem Commotionssyndrom mit tödlichem Ausgang bei der Sektion keine anatomisch nachweisbaren oder nur unbedeutende, die klinische Folgen nicht erklärenden Hirnschäden gefunden hat. Zu erwähnen sind noch die Befunde von Sabine Strich (1956, 1961), die eine ausgedehnte und diffuse Degeneration der weißen Substanz des Gehirns bei Patienten fand, die 5–15 Monate vor ihrem Tode eine schwere gedeckte Gehirnprellung erlitten hatten. Sie glaubt ebenso wie Symmonds (1962), daß bei geringer Gewalteinwirkung die Nervenfasern der weißen Substanz gezerrt und gedehnt werden, so daß ihre Funktion eine gewisse Zeit ausfällt, ohne daß es später zu einer nachweislichen Degeneration kommt. Die Untersuchungen ergaben weiter, daß der Cortex anscheinend normal blieb. Hierzu wurde von Strich angegeben, daß es nicht möglich ist, einen Zellverlust der Hirnrinde festzustellen, wenn nicht mindestens 33–35% der Zellen zugrunde gegangen sind; sie hielt es aber für sicher, daß der vorhandene Ausfall von Zellen in keiner Weise ausreichte, um die ausgedehnte Degeneration im Bereich der weißen Substanz zu erklären. Es bleibt also auch hier

letztlich die Frage offen, ob die Commotio Schädigungen oder Zerstörungen von Nervenzellen zur Folge hat oder ob die Commotio „spurlos“ vorübergeht.

Bei den eigenen Versuchen waren außer einem geringen Marködem keine lichtoptischen Veränderungen festzustellen. Dagegen ließen sich histoautoradiographisch deutlich die Zeichen einer gliösen und mesenchymalen Reaktion nachweisen. Bei allen ausgewerteten Hirnschnitten fiel dabei sowohl in der Medulla oblongata als auch im Mittelhirn und Kleinhirn sowie Großhirn eine signifikante Erhöhung markierter Zellen auf. Diese erhöhte Einbaurate von ^3H -Thymidin in Zellen der Glia und des Mesenchyms ist ein eindeutiger Indicator für eine Zellproliferation. Auffällig dabei war, daß diese Reaktion schon 36 Std nach dem Trauma ihren Höhepunkt erreichte und anschließend wieder abfiel. Diese in unmittelbarem Zusammenhang mit dem Trauma stehende reaktive Proliferationstendenz wurde bisher nicht beschrieben.

Dagegen wurde eine Proliferation der Gliazellen bei experimentellem Hirnödem gefunden (Kleihues u. Schulze, 1968), wobei eine Hauptreaktion im 2 Tage-Ödem-Stadium beobachtet wurde. Das Hirnödem wurde hierbei lokal durch die Quellung eines operativ extradural eingesetzten Laminariastiftes und durch die hieraus resultierende Hirnkompression erzielt. Zieht man hiervon zeitlich den Quellungsvorgang des Laminariastiftes ab (8–10fache Volumenzunahme innerhalb von 24 Std), so nähern sich die beschriebenen „Hauptreaktionszeiten“ unseren Gipfelwerten weitgehend.

Ferner haben Noetzel u. Gollbach (1968) darauf hingewiesen, daß es nach Setzen einer umschriebenen Verletzung in einer Hirnhälfte auf der kontralateralen Seite ebenfalls zu einem allerdings wesentlich geringeren Ansteigen der Markierung von Glia- und Mesenchymzellen kam. Dabei wurde ein unspezifisches Ödem als Ursache der Reaktion diskutiert. Diffuse bzw. generalisierte Ödeme nach stumpfer Gewalteinwirkung, gerade wenn extracerebrale intrakranielle Blutungen und primär traumatische Alterationen fehlen, sind von vielen Autoren immer wieder beobachtet worden (Greenfield, 1947; Scholz, 1949 u. a.).

Für uns ergibt sich daraus die Frage, ob es sich bei der festgestellten gliösen und bindegewebigen Reaktion um sekundäre Veränderungen handelt entweder als Folge des entstandenen posttraumatischen Hirnödems oder ob diese spezifische Zellreaktion direkt auf die Einwirkung der stumpfen Gewalt zurückzuführen ist.

Auffällig war bei den markierten Zelltypen der Gliareihe eine bevorzugte ^3H -Thymidin-Einlagerung in den Oligodendrocyten. Dies könnte darauf hinweisen, daß durch die Commotio doch eine lichtoptisch nicht faßbare Markscheidenschädigung (s. o. Strich) zustande kommt, da

gerade die Oligodendrocyten an der Markscheidenbildung beteiligt sind (Alpers u. Haymaker, 1934).

Aus der signifikant höheren Reaktion und dem deutlichen Zurückbleiben der Markierung der Bindegewebszellen könnte außerdem noch geschlossen werden, daß durch das stumpfe Schädeltrauma größere Defektheilungen nicht geleistet werden müssen. Umgekehrt wurde nämlich von Noetzel u. Gollbach (1968) nachgewiesen, daß bei der Ausheilung der Hirnwunde die Zellen des Bindegewebes nach anfänglich gleichsinnigem Ansteigen mit der Gliareaktion später, ab 72 Std, Vorrang haben, was auf den bevorzugten Bindegewebsbedarf bei der Narbenbildung hindeutet. Hervorzuheben bleibt noch die gleichmäßige Verteilung aller markierten Zellen sowohl in Hirnrinde und Mark wie auch im Hirnstamm.

Die Frage nach dem Anstoß der nachgewiesenen Reaktion von Glia- und Mesenchymzellen als einer direkten Commotio-Folge oder sekundär als Ergebnis funktioneller Regulationsstörungen bleibt letztlich ungeklärt. Damit ist die Aussage von Ricker (1916), immer noch nicht zu bestätigen oder abzulehnen: „Die nach einer Commotio auftretenden Funktionsstörungen der Hirntätigkeit haben keine anatomische Grundlage, sondern umgekehrt die vorkommenden anatomischen Hirnveränderungen beruhen auf funktionellen Vorgängen an den Gefäßnerven und Gefäßen.“

Wenn auch eine direkte Beziehung zwischen Bewußtlosigkeit und Trauma nicht nachgewiesen werden kann, so kommt es doch als Folge der Gehirnerschütterung zu einer vorübergehenden Zellproliferation der Glia- und Mesenchymzellen.

Literatur

- Alpers, B. J., Haymaker, W.: The participation of the neuroglia in the formation of myelin in the prenatal infant brain. *Brain* **57**, 621—640 (1934).
- Boirel: In: *Traité de chirurgie* par Duplay et Reclus. Paris 1891. Zit. nach T. Kocher: Hirnerschütterung, Hirndruck und chirurgische Eingriffe bei Hirnkrankheiten. *Spez. Pathologie u. Therapie von Nothnagel*, Bd. IX/3. Wien: A. Höder 1901.
- Greenfield, J. S.: Oedème cérébral en neurochirurgie. *Rev. neurol.* **79**, 280—283 (1947).
- Groat, R. A., Simmons, S. A.: Loss of nerve cells in experimental cerebral concussion. *J. Neuropath. exp. Neurol.* **9**, 150—163 (1950).
- Gurdjian, E. S., Hardy, W. G., Lindner, D. W., Thomas, L. M.: Closed cervical cranial trauma associated with involvement of carotid and vertebral arteries. *J. Neurosurg.* **20**, 418 (1963).
- Webster, J. E., Stone, E. W.: Experimental head injury with special reference to certain chemical factors in acute trauma. *Surg. Gynec. Obstet.* **78**, 618—641 (1944).
- Jefferson, G.: The nature of concussion. *Brit. med. J.* **1944**, 1—5.
- Kessel, F. K., Guttmann, L., Maurer, G.: *Neuro-Traumatologie*. Bd. I: Pathologisch-physiologische Grundlagen, S. 92—117. München: Urban & Schwarzenberg 1969.

- Kleihues, P., Schulze, B.: Zellproliferation und Protein-Synthese d. Neurologia beim experimentellen Hirnödem. *Acta neuropath.* (Berl.) Suppl. IV, 121—124 (1968).
- Noetzel, H., Gollbach, M.: Autoradiographische Untersuchungen zum Verhalten der Glia- und Mesenchymzellen bei der Hirnwunde. *Acta neuropath.* (Berl.) Suppl. IV, 134—140 (1968).
- Peters, G.: Patholog. Anatomie d. Verletzungen d. Gehirns u. seiner Häute. In: *Neuro-Traumatologie*, Bd. I, S. 31—91. München: Urban & Schwarzenberg 1969.
- Petit, J.: *Traité des Maladies chirurgicales*, Paris 1774, zit. nach v. Bergmann. Stuttgart: F. Enke 1880.
- Ricker, G.: Die Entstehung der patholog.-anatomischen Befunde nach Hirnerscheinungen in Abhängigkeit vom Gefäßnervensystem d. Gehirns. *Virchows Arch. path. Anat.* **226**, 180 (1919).
- Schneider, M.: *Physiologie des Menschen*, 15. Aufl. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1964.
- Scholz, W.: Histologische und topische Veränderungen u. Vulnerabilitätsverhältnisse im menschl. Gehirn bei O₂-Mangel, Ödem und plasm. Infiltrationen. *Arch. Psychiat. Nervenkr.* **181**, 621—640 (1949).
- Spatz, H.: Über die Bedeutung d. basalen Rinde auf Grund von Beobachtungen bei d. Pickschen Krankheit und bei gedeckten Hirnverletzungen. *Z. ges. Neurol. Psychiat.* **158**, 208—232 (1937).
- Spielmeyer, W.: *Histopathologie des Nervensystems*. Berlin: Springer 1922.
- Strich, S.: Diffus degeneration of the cerebral white matter in severe dementia following head injury. *J. Neurol. Psychiat.* **19**, 163—185 (1956).
- Sherrin of nerve fibres as a cause of brain damage due to head injury. *Lancet* **1961 II**, 443—500.
- Symmonds, C.: Concussion and its sequelae. *Lancet* **1962 II**, 1—5.
- Unterharnscheidt, F.: Die gedeckten Schäden des Gehirns (Monographien aus dem Gesamtgebiet der Neurologie und Psychiatrie, H. 103). Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1963.
- Ward, A. A.: Physiology of concussion. *Clin. Neurosurg.* **12**, 95—11 (1966).
- Montgomery, L. H., Clark, S. L.: Mechanism of concussion. *Science* **107**, 349 to 352 (1948).
- Windle, W. F., Groat, R. A.: Disappearance of nerve cells after concussion. *Anat. Rec.* **93**, 201—209 (1945).
- Fox, C. A.: Experimental structural alterations in the brain during and after concussion. *Surg. Gynec. Obstet.* **79**, 561—572 (1944).
- Rambach, R. A., de Raminende Ardlano, M. J. R., Groat, R. A., Becker, R. F.: Water content of the brain after concussion and its noncontributory relation to the histopathology of concussion. *J. Neurosurg.* **3**, 157—164 (1946).

Dr. J. Wolter
 Prof. Dr. H. Noetzel
 Neuropathologische Abteilung des
 Pathologischen Institutes der Universität
 7800 Freiburg i. Br.
 Albertstraße 19