

**Russische Akademie der medizinischen Wissenschaft  
Medizinisches radiologisches wissenschaftliches Zentrum**

Obninsk, Russland

Prof. M.A. Kaplan

Prof. R.A.Brodskij

*Übersetzung.25.09.03*

**Patomorphologische Untersuchung der Hirnrinde bei Ratten nach dem Einsatz der Kalt-Plasma Koagulation ( Söring)**

**Materialien und Methode**

In das Experiment wurden 24 Ratten (Männchen ; „Wistar“) mit dem Körpergewicht 220-250g einbezogen. Die Tiere wurden in 8 Gruppen aufgeteilt.

*Tab.1 Aufteilung der Gruppen*

<b>Gruppe</b>		<b>Einwirkung der Kalt-Plasma-Koagulation</b>	<b>Einwirkzeiten</b>
0	Schädeltrepanation nach 20 min	3 Stufe (15Wt) Gasflow 2,0 l/min	2sek
1 und 5	Intakte Ratten		
2 und 6	Schädeltrepanation		
3 und 7	Schädeltrepanation	3Stufe (15 Wt), Gasflow 2,0 l/min	2 sek
4 und 8	Schädeltrepanation	5Stufe, 25 Wt, Gasflow3,0 l/min	1sek

Vor dem Grundexperiment wurde das Hirn in 20 Minuten nach dem Einsatz der CPC (Stufe 3, 2 Sek) morphologisch untersucht (Gruppe 0)

Die Schädeltrepanation wurde unter Narkose nach der von uns entwickelten Methode durchgeführt. Der Schnitt (ca.1-1,5 cm lang) wurde in der Mittellinie des Schädels angelegt. Die Schädeltrepanation erfolgte mit Hilfe eines speziell angefertigten hohlen Bohrers mit dem Durchmesser von 5 mm. Die Tiere wurden nach dem 7 und 21 Tag durch Überdosierung der Narkose getötet. Der Zeitraum des Experiments entspricht den Anfangsphasen von Regenerationsprozessen und der Zeit, in der die Regenerationsprozesse völlig abgeschlossen werden könnten. Die Proben wurden innerhalb von 24 Stunden in saurer Lösung (nach Bouin) fixiert. Die feinen Schnitte (7mkm) wurden auf Gläser mit Poly-L-Lysine-Folie angebracht. Zur Untersuchung der Proliferationsaktivität von Zellen wurden die monoklonalen Maus-Antikörper für PCNA bei der Verdünnung 1:50 (Klon PC10, Calbiochem,USA) und Avidin-Peroxydase zur Ermittlung der Immunoglobulinen (Vectastain, USA) angewendet. Zur Zeit wird die immunohistochemische Lokalisation von PCNA zur Ermittlung der Proliferationsaktivität von Zellen angewendet (2,3).

Außerdem ist es bekannt, dass PCNA an -Regeneration der beschädigten DNS teilnimmt.

Immunohistochemische Ermittlung von Antigenen an den Schnitten wurden gemäß der Anforderungen (4) nach unserem Schema wie folgt durchgeführt:

1. Die Schnitte wurden im Thermostat bei 65 C innerhalb von 10 min behandelt. Entfernung vom Paraffin durch Xylol und Ethanol.
2. Endogene Peroxydase wurde durch 3% Wasserstoffperoxyd blockiert
3. Die Schnitte wurden durch 0,25% Triton X-100 (Sigma) ausgewaschen.
4. Unspezifische Anbindung der Immunoglobulinen wurde durch das 1% Blutserum des Tier-Blutspenders (2 Antikörper) innerhalb von 20 min. blockiert
5. Auf die Schnitte wurden die ersten Antikörper aufgetragen. Die Gläser wurden in der feuchten Kammer aufbewahrt. Die Inkubation erfolgte im Kühlschrank bei der Temperatur 4C innerhalb von 18 Stunden.
6. Nach der Inkubation wurden die Schnitte mit ersten Antikörpern ausgewaschen, danach wurden die gefertigten Antikörper zu Immunoglobulinen des Spenders von ersten Antikörpern aufgetragen.
7. Die Schnitte wurden ausgewaschen (3x 5 Min) und auf sie wurde Avidin-Peroxydase oder Streptavidin-Peroxydase-Komplex aufgetragen.
8. Die Schnitte wurden ausgewaschen (3x5 min). Das Marker-Ferment (Peroxydase) wurde in der Inkubationslösung mit Diaminobenzidin und Wasserstoffperoxyd innerhalb von 10 min entwickelt (DAB-system, Immunotech)
9. Die Präparate wurden mit Aqua dest. ausgewaschen. Dehydratation durch Alkohol. Klärung in Xylol. Anschließend wurden sie in Entellan (Merck) eingelegt.

## **Ergebnisse.**

### **Makroskopische Untersuchung.**

Bis zum Abschluss des Experiments blieben alle Tiere aktiv und reagierten adäquat auf äußere Reizfaktoren. Die sichtbaren Schleimhäute, Gewicht und Haut waren ohne Besonderheiten. Am Schädel bei Ratten n 2, 3, 4,6, 7, 8 ist eine saubere Naht zu sehen. Die Trepanationsöffnung ist mit einem knöchernen Fragmenten geschlossen und fest mit den Schädelknochen verbunden. Die Hirnoberfläche war sauber, glatt und glanzhell. Die weiche Hirnhaut weist keine Schädigung auf. Bei den Ratten aus der Gruppe 3 und 4 ist die geringe Schwellung des Hirngewebe in der Perforationszone und Koagulationszone sichtbar.

### **Mikroskopische Untersuchung**

#### Gruppe 1 und 5 (Kontrolle).

Die Histoarchitektonik der Hirnrinde entsprach der Norm.(Abb. 1)  
Weiche Hirnhaut ist reichlich vaskularisiert und weist keine Zeichen der Verdickung auf. Das Neuropil der Hirnrinde ist blassblau und homogen. Die Reaktion auf PCNA des mäßigen oder intensiven Färbungsgrades wurde nur in einzelnen Kernen der Endotheliozyten bestimmt. Selten fanden sich schwach angefärbte Kerne der Neurozyten und der Glia.(Abb.2)

### Gruppe 0. Das Hirngewebe in 20 min nach der Koagulation

Die weiche Hirnhaut in der Koagulationszone ist zerstört; es sind kleine hämorrhagische Bereiche zu sehen. Sichtbar ist ein kegelförmiger Defekt des Hirns, der sich in die Tiefe der Hirnrinde erstreckt. Das Neuropil ist ödematös (Abb.3)

### Gruppe. Das Hirngewebe in 7 Tagen nach der Schädeltrepanation

Die Struktur von Hirngewebe unterscheidet sich nicht von der Hirnstruktur in der Kontrollgruppe. An einigen Stellen fanden sich aber relative Verdickung und Hyperämie weicher Hirnhaut, welche, unserer Meinung nach, auf Schädeltrapanation zurückzuführen ist (Abb.4). Reaktion auf PCNA: um die Operationsöffnung herum in der Verdickungszone der weichen Hirnhaut sind angefärbte Kerne und vergrößerte Anzahl der „PCNA-positiven Kernen“ im Neuropil der grauen Substanz zu sehen (Abb.5).

### Gruppe 3. / Tage nach der Schädeltrepanation und Kalt-Plasma Koagulation (3 Stufe, 2 Sekunden).

Das histologische Bild während dieser Zeit hat sich erheblich verändert (verglichen mit der Gruppe 0 und Kontrollgruppe).

Die Schwellungszone des Neuropils verengerte sich, es bildete sich ein enger Kanal, der sich von der weichen Hirnhaut bis zur in die graue Substanz hin erstreckt. Am distalen Kanalende bildete sich ein ovaler Hohlraum. Es sind die Hyperplasie und Vaskularisation der weichen Hirnhaut vorhanden. Der Eingang in den Koagulationskanal, bei einer Ratte dieser Gruppe, ist mit der weichen Hirnhaut verschlossen (Abb.8). Die Zone mit basophilen Zellen um den Kanal herum hat sich erheblich verengt; die Anzahl der „PCNA-positiven Zellen“ hat sich vergrößert (Abb.9). Der Intensitätsgrad der Anfärbung von Kernen variiert von schwach bis stark. Bei manchen Ratten fanden sich nur die einzelnen „PCNA-positiven Kerne“ der Gliazellen. Sowie in der Gruppe 2 ist die Vergrößerung der angefärbten Kernen in der lokalen Verdickungen der weichen Hirnhaut und in den untenliegenden Schichten der grauen Substanz zu sehen (Abb. 7).

### Gruppe 4. 7 Tage nach der Schädeltrepanation und Kalt-Plasma- Koagulation (5 Stufe, 1 Sekunde)

In der Koagulationszone ist die Verdickung der weichen Hirnhaut (aufgrund der Vaskularisation) und der Eingang in den langen und engen Kanal zu sehen. In der Regel endete der Kanal mit einem kleinen und rundförmigen Hohlraum. Die Zone mit Hyperchromasie von Zellkernen und Neurozyten um den Koagulationskanal ist etwas breiter als in der Gruppe 3 (Abb.10). Kleine „PCNA- positive Kerne“ mit unterschiedlichen Farbintensitäten zeigten die Tendenz zur asymmetrischen Anordnung gegen die Kanallänge. Wie in der Gruppe 3 ist die vergrößerte Anzahl der „PCNA-positiven Kernen“ in der oberen Zone der Hirnrinde entsprechend der Trepanationsöffnung vorhanden.

### Gruppe 6. 21 Tage nach der Schädeltrepanation.

Die Resultate der histologischen Untersuchungen und immunohistochemischen Reaktion zu PCNA unterscheiden sich praktisch nicht von den Resultaten in der

Kontrolgruppe. Nur in der weichen Hirnhaut (bindegewebige Zellen) war etwas größere Anzahl der „PCNA positiven Kernen“

Gruppe 7. 21 Tage nach der Schädelreparation und Kalt-Plasma-Koagulation (Stufe 3; 2 Sekunden)

In der Koagulationszone sind die Regenerationsprozesse der weichen Hirnhaut (gekennzeichnet durch Vaskularisation und Verdickung) zu sehen. Diese Regenerationsprozesse laufen der Länge des bereits sehr eng gewordenen Koagulationskanals entlang ab. Die Breite der Zone mit basophilen Gliazellen und Neurozyten hat sich im Vergleich mit der Gruppe 3 maximal verengert (Abb.11). Der Bereich der Verteilung von „PCNA-positiven Kernen“ um den Koagulationskanal hat sich erheblich verkleinert und ist durch einen untiefen trichterförmigen Eingang in der weichen Hirnhaut begrenzt. Die Zone der Verbreitung von „PCNA-positiven Kernen“ um den Kanal war erheblich kleiner als in der Gruppe 3. Außerhalb dieser Zone hatte man einzelne, kleine „PCNA-positive Kerne“ beobachtet.

Gruppe 8. 21 Tage nach der Schädelreparation und Kalt-Plasma-Koagulation (5 Stufe; 1 Sekunde)

Das histologische Bild bei den Ratten der Gruppe 8 unterscheidet sich nicht vom histologischen Bild bei den Ratten der Gruppe 7. Der Koagulationskanal sieht ähnlich aus; die Zone mit den basophilen Zellen war sehr eng. Bei manchen Tieren am Ende des Koagulationskanals war ein kleiner Hohlraum mit glatten Wänden vorhanden. Dieser Hohlraum war mit dem eosinophilen Inhalt gefüllt.

**Abschluss**

Es lässt sich feststellen, dass bei den Ratten, die einer Kalt -Plasma Koagulation unterzogen wurden, ein bestimmter Ablauf in der Entwicklung der destruktiven Veränderungen in der Hirnrinde nach dem Koagulationstyp beobachtet wird. Unmittelbar nach der Kalt –Plasma Koagulation im Neuropil entsteht eine Zone mit Ödem und Basophilie der in dieser Zone befindlichen Zellen. Das Ödem nimmt nach dem 7 Tag ab und hieran entsteht ein Kanal, der sich von der beschädigten weichen Hirnhaut bis zu in die graue Substanz hin erstreckt. Die Hyperplasie und Vaskularisation der weichen Hirnhaut sind die Zeichen für die aktiven Regenerationsprozesse. Vergrößerte Anzahl der „PCNA(proliferating cell nuclear antigen) positiven Kernen“ spricht für den Anfang der Regenerationsprozessen in der Destruktionszone.

In 21 Tagen nach dem Einsatz der Kalt-Plasma-Koagulation (3 Stufe 15Wt; Gasflow 2,0; 2 Sekunden) gehen die Regenerationsprozesse ihrem Abschluß entgegen. Dafür sprechen die maximale Verengung des entstandenen Kanals, Reduzierung der Anzahl von basophilen Zellen und der Anzahl von „PCNA positiven Kernen“. Derselbe Ablauf in der Entwicklung von Regenerationsprozessen wird bei der Kalt-Plasma-Koagulation in der anderen Gruppe ( Stufe 5 ; 25Wt; Gasflow 3,0; 1 Sekunde) beobachtet (die Schwellung des Neuropils nimmt ab, es verengern sich das Kanallumen und die Zone des Neuropils mit basophilen Zellen).Die bindegewebigen und vaskularen Strukturen der weichen Hirnhaut dringen in die beschädigten Regionen der

Hirnrinde und gewährleisten deren Regeneration, was durch die erhöhte Anzahl der „PCNA positiven Kernen“ nachgewiesen werden kann. Die immunohistochemischen Untersuchungsergebnisse zeigen, dass nach der Koagulation, die keine Nekrose im umliegenden Gewebe verursacht, laufen die Regenerationsprozesse der Gliazellen ab. Die Breite des Neuropils, das die aktivierten Kerne der Gliazellen enthält, korreliert nach 7 Tagen mit der Intensität der Regenerationsprozesse.

Die Verkleinerung des Bereiches mit „PCNA-positiven Kernen“ um den Kanal herum nach 21 Tagen sprechen für einen Progress der Wiederherstellung von Struktur der Hirnrinde. Die Wiederherstellung der Struktur ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht im vollen Umfang beendet. In einigen Fällen am Ende des Kanals (in der Tiefe der Hirnrinde) bildet sich ein kleiner Hohlraum.

Der Normalzustand der Funktionen bei den Ratten in der postoperativen Zeit sprechen im allgemeinen für positiven Ablauf der Wiederherstellung von Hirnstruktur sowie aller Hirnfunktionen.

Die pathomorphologischen Untersuchungen der Hirnrinde bei den Ratten nach der Einwirkung der Kalt-Plasma Koagulation (Söring) lassen sich, wie folgt, zusammenfassen:

1. Die destruktiven Veränderungen in der grauen Substanz des Hirns entwickeln sich nach dem Koagulationstyp.
2. Diese Veränderungen rufen keine entzündlichen und nekrotischen Prozesse in den Gewebes, die um der Koagulationszone herumliegen, hervor.
3. Der Ausmaß der Destruktion vom Hirngewebe ist von der Leistungsstufe abhängig.
4. Die Vollständigkeit der Wiederherstellung von Hirnstruktur wird in vieler Hinsicht durch die nach der Koagulation vergangene Zeit bestimmt

Abb. 1 Das Hirn der intakten Ratten. Hämatalaun-Eosin . x 350

Abb.2 Das Hirn der Intakten Ratten. Die immunohistochemische Reaktion zu PCNA. x 65

Abb.3 Das Hirngewebe in 20 min nach der Kalt-Plasma Koagulation. Hämatalaun-Eosin. x 350

Abb.4 Das Hirngewebe in 7 Tagen nach der Schädelreparation. Hämatalaun-Eosin. x 350

Abb.5 Das Hirngewebe in 7 Tagen nach der Schädelreparation. Immunohistochemische Reaktion zu PCNA. x 65

Abb.6 Das Hirngewebe in 7 Tagen nach der Schädelreparation und Kalt-Plasma-Koagulation.

Abb.7 Das Hirngewebe in 7 Tagen nach der Schädeltrepanation und Kalt-Plasma-Koagulation. Immunohistochemische Reaktion zu PCNA. x 65

Abb.8 Das Hirngewebe in 7 Tagen nach der Schädeltrepanation und Kalt-Plasma-Koagulation. Hämatalaun-Eosin. x 65

Abb.9 Das Hirngewebe in 7 Tagen nach der Schädeltrepanation und Kalt-Plasma-Koagulation. Immunohistochemische Reaktion zu PCNA. x 350

Abb.10 Das Hirngewebe in 7 Tagen nach der Schädeltrepanation und Kalt-Plasma-Koagulation. Hämatalaun-Eosin. x 65

Abb.11 Das Hirngewebe in 21 Tagen nach der Schädeltrepanation und Kalt-Plasma-Koagulation. Hämatalaun-Eosin. x 65

#### Literaturverzeichnis:

1. Burtunek J., Vanderheyden M., Knapen M.W., et al. , Deoxyribonucleic acid damage repair proteins are elevated in the failing human myocardium dice to idiopathic dilated cardiomyopathy// J. Am Coll Cardiol. 2002 V 40, N 6 p.1097-1103
2. Conolly K.M., Bogdanffy M.S., Evaluation of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as an endogenous marker of cell proliferation in rat liver: a dual-stain comparison with 5 bromo-2deoxyuridine// J.Histochem. Cytochem.-1993 Vol.41, N1.-P.1-6
3. Galand P., Degraef C.Cyclin/PCNA immunostaining as an alternative to tritiated thymidine pulse labelling for marking S phase cells in paraffinsections from animal and human tissues// Cell and Tissue Kinetics. 1989.-Vol. 22 , N5.-P.383-392
4. Polak J.M., VanNoorden S. (Eds.) Immunocytochemistry, practical applications in pathology and biology.-John Wright and Sons, 1983.-396pp.