

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-  
Universität München

Komm. Leiter : Prof. Dr. med. U. Pohl

**Einfluss der Entlastungskraniektomie und des Kallikrein-Kinin  
Systems auf den sekundären Hirnschaden nach experimentellem  
Schädel- Hirntrauma**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität

vorgelegt von  
Klaus Zweckberger

aus Rosenheim

2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Nikolaus Plesnila

Mitberichterstatter: Prof. Dr.Dr.E. Fink  
Priv.Doiz. Dr. M. Dichgans

Betreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. Nikolaus Plesnila

Dekan: Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 27.07.2006

Für meine  
Eltern



## INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung .....	7
1.1. Epidemiologie und Ätiologie des Schädel-Hirntraumas .....	7
1.2. Pathophysiologie des SHT .....	8
1.3. Therapieoptionen nach SHT .....	13
1.4. Ziel der Arbeit .....	14
2. Material und Methoden .....	15
2.1. Versuchstiere und Tierhaltung .....	15
2.2. Allgemeine Versuchsbedingungen .....	15
2.2.1 Narkose .....	16
2.2.2. Temperaturregulation .....	18
2.3. Traumaapplikation .....	19
2.4. Untersuchungen zur Modelletablierung .....	21
2.4.1. Bestimmung des Nekrosevolumens .....	21
2.4.2. Quantifizierung der motorischen Funktion .....	23
2.5. Untersuchung pathophysiologischer Veränderungen nach CCI Trauma .....	28
2.5.1. Bestimmung des Hirnödems .....	28
2.5.2. Messung des CBF und ICP .....	28
2.5.3. Bestimmung des Nekrosevolumens .....	30
2.6. Einfluss der Entlastungskraniektomie auf den sekundären Hirnschaden .....	31
2.6.1. Versuchsprotokoll .....	31
2.6.2. Durchführung der Entlastungskraniektomie .....	32
2.6.3. Messung der Hirntemperatur .....	32
2.7. Einfluss des Kallikrein-Kinin System für die Entstehung des sekundären Hirnschaden .....	33
2.7.1. Messung der Bradykininkonzentration .....	33
2.7.2. Die Rolle der Bradykinin B <sub>1</sub> und B <sub>2</sub> Rezeptoren .....	34
2.7.3. LF 16-0687 – ein spezifischer Bradykinin B <sub>2</sub> Rezeptor Antagonist .....	34
2.7.3.1. Versuchsprotokoll .....	35
2.7.3.1.1. Therapiegruppe mit 0,3 mg/kg KG LF 16-0687.....	36
2.7.3.1.2. Therapiegruppe mit 3,0 mg/kg KG LF 16-0687.....	38
2.8. Statistik .....	39
3. Ergebnisse .....	40
3.1. Narkose .....	40
3.2. Etablierung des Traumamodells .....	41
3.3. Pathophysiologische Veränderungen nach experimentellem SHT .....	52
3.3.1. Anstieg des intrakraniellen Drucks .....	52
3.3.2. Abfall der cerebralen Durchblutung .....	53
3.3.3. Bestimmung der Kontusionsvolumina .....	54
3.3.4. Entwicklung des Nekrosevolumens über die Zeit .....	55
3.3.5. Bestimmung des Wassergehalts des Hirngewebes .....	56
3.4. Einfluss der Entlastungskraniektomie auf die pathophysiologischen Veränderungen nach CCI .....	57
3.4.1. ICP .....	57
3.4.2. CBF.....	58
3.4.3. Sekundäre Nekrosewachstum .....	60
3.4.4. Hirnödem .....	61
3.4.5. Neurologische Outcome .....	62
3.4.5.1. Der Verlauf des Körpergewichtes .....	62
3.4.5.2. Ergebnisse beim Beam walking Test .....	63
3.4.6. Das therapeutische Fenster der Entlastungskraniektomie .....	64
3.5. Messung der intrakraniellen Temperatur nach Kraniektomie .....	65
3.6. Einfluss des Kallikrein-Kinin Systems auf die Entstehung des sekundären Hirnschadens .....	66
3.6.1. Messung der Bradykininkonzentration im Hirngewebe nach CCI Trauma .....	66
3.6.2. Bedeutung des Bradykinin B <sub>1</sub> Rezeptor für das sekundäre Nekrosewachstum .....	67
3.6.3. Bedeutung des Bradykinin B <sub>2</sub> Rezeptor für das sekundäre Nekrosewachstum .....	67
3.6.3.1. Einfluss auf das Nekrosevolumen .....	67
3.6.3.2. Einfluss auf das Hirnödem .....	68
3.6.3.3. Einfluss auf die neurologische Funktion .....	69
3.6.4. Selektive Blockade des Bradykinin B <sub>2</sub> Rezeptors durch LF 16-0687 Ms .....	71

3.6.4.1. Wirkung von LF 16-0687 (0,3 mg/kg KG) auf den ICP, den CBF, den MAP, auf das Nekrosevolumen und die Ausbildung des Hirnödems .....	71
3.6.4.1.1. ICP .....	71
3.6.4.1.2. CBF .....	72
3.6.4.1.3. MAP .....	72
3.6.4.1.4. Nekrosevolumen .....	73
3.6.4.1.5. Hirnödem .....	74
3.6.4.2. Wirkung von LF 16-0687 (3,0 mg/kg KG) auf den ICP und das Nekrosevolumen .....	75
3.6.4.2.1. ICP .....	75
3.6.4.2.2. Kontusionsvolumen .....	76
4. Diskussion .....	78
4.1. Maus als Versuchstier .....	78
4.2. Modellauswahl .....	78
4.2.1. Modell des Controlled Cortical Impact .....	79
4.2.2. Alternative Modelle des SHT .....	80
4.3. Narkoseführung .....	82
4.4. Einfluss der Hypothermie auf die Untersuchungsergebnisse .....	84
4.4.1. Wirkung der Hypothermie nach SHT bei Kleintieren .....	84
4.4.2. Kontrolle der Temperatur während der Versuche .....	84
4.5. Pathophysiologische Veränderungen nach CCI Trauma .....	85
4.5.1. Veränderungen des CBF und ICP .....	85
4.5.2. Ausbildung des Hirnödems .....	88
4.5.3. Das sekundäre Nekrosewachstum .....	89
4.6. Neuroscores .....	90
4.6.1. Allgemeine Verhalten und Wohlbefinden .....	91
4.6.2. Motorik und Motorkoordination .....	92
4.6.3. Kognition und Orientierung im Raum .....	93
4.7. Einfluss der Entlastungskraniektomie .....	94
4.7.1. Aktueller Stand der Therapie .....	94
4.7.2. Frühkraniektomie bei Kindern .....	98
4.7.3. Diskussion der experimentellen Ergebnisse .....	98
4.8. Das Kallikrein-Kinin System .....	100
4.8.1. Die Bedeutung von Bradykinin B <sub>1</sub> - und B <sub>2</sub> Rezeptoren .....	100
4.8.2. Selektive Blockade des Bradykinin B <sub>2</sub> Rezeptors durch LF 16-0687 .....	102
4.8.3. Interpretation der Ergebnisse .....	104
5. Zusammenfassung .....	106
6. Literaturverzeichnis .....	107
7. Abkürzungsverzeichnis .....	117
8. Publikationen .....	118
9. Danksagung .....	119
10. Lebenslauf .....	120

# **1. EINLEITUNG**

## **1.1. Epidemiologie und Ätiologie des Schädel-Hirntraumas**

Jährlich werden in Deutschland etwa 280.000 Patienten mit dem Verdacht auf ein Schädel-Hirntrauma (SHT) ins Krankenhaus aufgenommen. 5% der Betroffenen zeigen dabei so schwere Verletzungsmuster, dass von einem schweren SHT mit initialem Glasgow Coma Scale (GCS) von  $\leq 8$  Punkten zu sprechen ist. Die Inzidenz des schweren SHT beläuft sich laut dem statistischen Bundesamt in Wiesbaden auf 10 pro 100.000; dies entspricht einer jährlichen Patientenzahl von 12.630 mit einer Mortalität von  $> 50\%$  (7.705 im Jahre 1999) (Baethmann A. et al. 2002; Fischeing R. et al., 2001).

Das Durchschnittsalter aller Patienten mit Kopfverletzungen liegt bei 39 Jahren, wobei sich zwei Häufigkeitsgipfel beschreiben lassen. Zum einen sind es junge Erwachsene, die mit dem Auto oder mit dem Motorrad verunfallen und zum anderen existiert ein Häufigkeitsgipfel aufgrund von Stürzen in der Altersgruppe  $> 65$  Jahren. Insgesamt sind 71% aller Betroffenen Männer. 56% der Verletzungen werden durch Unfälle, 31% durch Stürze aus großer Höhe und 12% in suizidale Absicht verursacht (Fischeing R. et al., 2001; Rudehill A. et al., 2002).

Im Zeitraum zwischen 1986 und 1996 wurden am Karolinska Hospital in Schweden die Daten von 1508 Patienten mit einem SHT bezüglich ihres Outcomes über 8 Jahre hinweg erfasst. 69 % der Patienten erholten sich gut (Glasgow Outcome Scale: GOS 4-5) und zeigten langfristig nur eine mäßiggradige Behinderung, 11% schwere Behinderungen (GOS 2-3) oder verblieben im vegetativen Status und 20% verstarben (GOS 1) (Rudehill A. et al., 2002; Jiang J. et al., 2002). Es konnte dabei eine enge, fast lineare Korrelation zwischen initialem GCS und dem endgültigen GOS ermittelt werden. Als Extremwerte sieht man einen GOS von 5 bei 64% aller Patienten mit einem GCS von 9-15 und eine 70%ige Mortalität bei Patienten mit einem GCS von nur 3. Es spielt jedoch nicht nur der initiale GCS eine entscheidende Rolle, sondern auch Alter und Geschlecht des Patienten, sowie intrakranielle

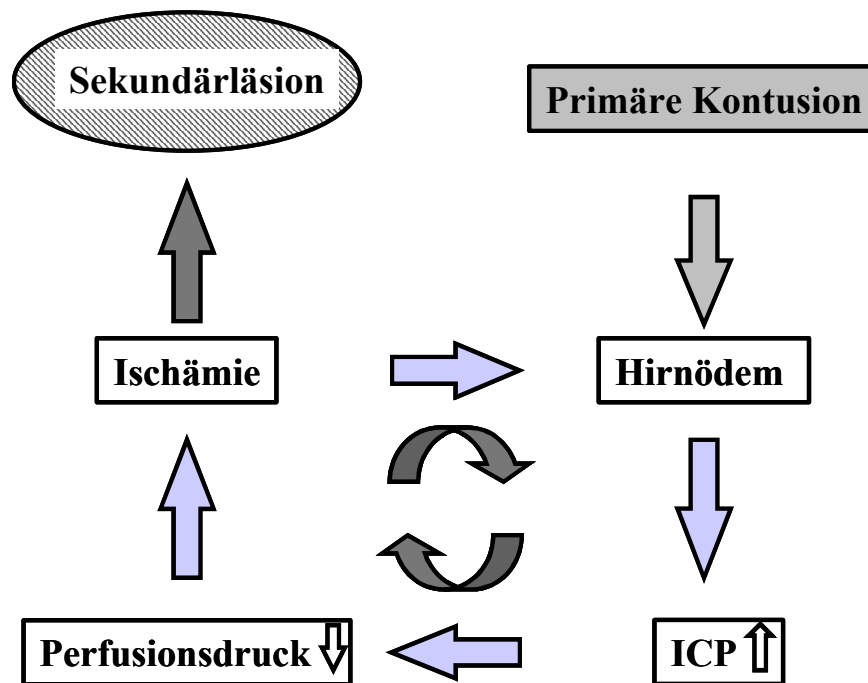
Verletzungsmuster. Das Outcome bei intrakraniellen Blutungen ist beispielsweise deutlich schlechter als bei epiduralen- oder subduralen Blutungen. Ebenso erholen sich jüngere Patienten deutlich besser als ältere. Während 11-20 Jährige zu 80% ein GOS von 4-5 haben und nur 1-2% ein GOS von 1, zeigen Patienten im Alter von 70 Jahren nur noch zu 40% ein GOS von 4-5, jedoch zu 30% ein GOS von 1. Es wird angenommen, dass der Grund dafür in der bereits prätraumatisch schlechteren cerebrovaskulären Versorgung des Hirngewebes älterer Patienten liegt (Rudenhill A. et al., 2002; Redondo von JA. et al., 1967).

## **1.2. Pathophysiologie des SHT**

Die Pathophysiologie des SHT umfasst eine primäre und sekundäre Komponente. Durch Akzelerations- und Dezelerationsbewegungen, Deformationen und Frakturen des Schädels können Kontusionen und Gefäßzerreißen entstehen, die zusammen mit dem diffusen Axonschaden durch Überdehnung und Zerrung der Nervenfasern die primäre Läsion zum Zeitpunkt des Traumas charakterisieren (Ommaya A.K. et al., 1974; Adams H. et al., 1977). Diese Läsion kann nur durch Prävention verhindert werden. Die Aufmerksamkeit der Forschung richtet sich daher auf den Sekundärschaden, der sich mit einer Verzögerung von mehreren Stunden entwickelt und daher prinzipiell therapeutisch beeinflussbaren Pathomechanismen unterliegt. Der Sekundärschaden ist für die Prognose des Patienten ebenso wichtig, wie die Primärläsion (Reilly P.L. et al., 1975; Baethmann A. et al., 1982; Marshall L.F. et al., 1983; Baethmann A. et al., 1988; Lynch D. R. et al., 1994).

Die Entstehung des Sekundärschadens erklärt man sich derzeit folgendermaßen: ausgehend von der primären Kontusion entwickelt sich ein perifokales Ödem. Aufgrund der knöchernen Begrenzung des Schädels kann sich das Hirngewebe jedoch nicht uneingeschränkt ausdehnen und es kommt, wie aus Abb. 1 ersichtlich, zur intrakraniellen Hypertension.





**Abb. 1:** Vereinfachte Schemadarstellung der pathophysiologischen Mechanismen für die Entstehung des sekundären Hirnschadens

Für das Überleben von Patienten mit einem SHT ist der Anstieg des intrakraniellen Drucks (ICP) der limitierende Faktor (Bouma GJ. Et al., 1998; Marmarou A. et al., 2000). Narayan et al. (Narayan RK. et al., 1981) berichten, dass bei SHT Patienten mit einem ICP von über 20 mmHg die Mortalitätsrate auf 51% anstieg, während in einer Vergleichsgruppe ohne ICP Anstieg (Normalwerte: 10-12 mmHg) die Mortalität nur bei 16% lag. In einer vielbeachteten Veröffentlichung beschrieb Igor Klatzo bereits 1967 die pathophysiologischen Grundlagen der Hirnschwellung, die nach Trauma zu einem Anstieg des ICP führen (Klatzo I. et al., 1967). Klatzo definierte das Hirnödem folgendermaßen: „*In simple terms Brain edema can be defined as an abnormal accumulation of the fluid associated with volumetric enlargement of the brain tissue.*“

Ausgehend von den zugrunde liegenden Mechanismen kann man das Hirnödem in ein vasogenes und ein cytotoxisches Ödem einteilen:

Die Grundlage für das vasogene Hirnödem ist die Verletzung des cerebralen Gefäßnetzes und der mit dem Endothelschaden im Zusammenhang stehende Zusammenbruch der Blut-Hirnschranke (BBB). Die Folge ist ein Austritt von Plasmaflüssigkeit, Proteinen und Elektrolyten, vor allem  $\text{Na}^+$  Ionen in den Extrazellulärraum (Marmarou A. et al., 1994; Sharma H.S. et al., 1998; Klatzo I. et al., 1967). Dies führt zur Verschiebung des onkotischen Gleichgewichts und zur Flüssigkeitsakkumulation im Intestitium (Mendelow A.D. et al., 1983).

Im Gegensatz dazu steht beim cytotoxischen Hirnödem eine intrazelluläre Flüssigkeitsansammlung und eine damit verbundene Zellschwellung im Vordergrund. Das cytotoxische Hirnödem wird vor allem als Antwort auf eine zelluläre Minderversorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen und einem daraus resultierenden Energiemangel gesehen und steht nicht in direktem Zusammenhang mit einer Schädigung der BBB (Mendelow A.D. et al., 1983). Beide Ödemformen führen letztendlich zur Volumenzunahme des Hirngewebes und damit zum Anstieg des ICP und zur Minderperfusion des Hirngewebes.

Der entscheidende Faktor für das Überleben der Zellen ist jedoch eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen. In einer ganzen Reihe von Studien wurde experimentell gezeigt, dass nach Trauma die ipsilaterale Durchblutung des Hirngewebes deutlich abnimmt (Kochanek P.M. et al., 1995; Long J.B. et al., 1996; Nilsson P. et al., 1996; Meixensberger J. et al., 1998; Friedrich D.H. et al., 2000). In der Arbeitsgruppe von Hillered et al. (Nilsson P. et al., 1996) konnte gezeigt werden, dass die cerebrale Durchblutung (CBF) von 100% innerhalb von nur 2 Minuten auf 60% des Ausgangswertes abfällt und die Hypoperfusion für mindestens 20 Minuten anhält, während auf der kontralateralen Seite zunächst eine Hyperperfusion von 172% für 4 Minuten und anschließend eine geringgradige Hypoperfusion von ungefähr 80% festzustellen war. Mit Hilfe der Xenon Computertomographie konnte

gezeigt werden, dass sich das ischämische Gebiet von der primären Nekrose durch sekundären Zelluntergang weiter in die Penumbra ausbreitet (Oettingen von G. et al., 2002). Der Abfall der regionalen cerebralen Durchblutung stellt somit die Grundlage für den weiteren Zelluntergang dar (Friedrich D.H. et al., 2000). Nach einem SHT kommt es innerhalb der ersten Stunden zu dynamischen Veränderungen der lokalen cerebralen Durchblutung sowie des Metabolismus der Zellen. Anschließend findet man einen deutlich vergrößerten irreversiblen neuronalen Schaden und ein schlechteres Outcome der Patienten (Jiang X.B. et al., 2000; Kelly D.F. et al., 1997). Im Groben werden drei Phasen des sekundären Hirnschadens beschrieben: Zeitnah nach dem SHT kommt es aufgrund des Zusammenbruchs der BBB und dem Untergang von Zellen zur Freisetzung von Sauerstoffradikalen, Kalium und der akzessorischen Aminosäure Glutamat (Vespa P. et al., 1998; Lynch D.R. et al., 1994). Glutamat ist ein streng intrazellulär vorkommender Mediator und wirkt extrazellulär in hohen Dosen toxisch (Baethmann A. et al., 1988). Das extrazelluläre Kalium wird als eine der Hauptursachen für die massive Astrocytenschwellung nach SHT gesehen und trägt somit zum raschen Anstieg des ICP und zum schlechten Outcome der Patienten bei (Kimmelberg H.K. et al., 1992; Bullock R. et al., 1993; Reinert M. et al., 2000). Gefolgt werden diese akuten Vorgänge von inflammatorischen Reaktionen durch die Aktivierung von Prostaglandinen, Leukotriene, Proteinkinase C und Bradykinin (Baethmann A. et al., 1988; Lynch D.R. et al., 1994; Bullock R. et al., 1993; Schwab J.M. et al., 2001). Zeitlich überlappend schließen sich nach mehreren Stunden bis einigen Tagen apoptotische Vorgänge an.

Bradykinin ist der Hauptmediator des Kallikrein-Kinin Systems und wird sowohl am geschädigten Gefäßendothel, wie im Gewebe gebildet. Durch die Kontaktaktivierung des Komplexes aus Prekallikrein und HMW-Kininogen (high moleculare weight) mit Hilfe des Co-Faktors XII (Hagemannfaktor) am geschädigten Gefäßendothel oder Gewebe kommt es zur Aktivierung von Kallikrein. Dies bewirkt die Proteolyse des Bradykinins aus Kininogen (Regoli D. et al., 1984; Unterber A. et al., 1986;

Baethmann A. et al., 1988, Walker K. et al., 1995; Mayhan W.G. et al., 1996; Pela I.R. et al., 1996). Bradykinin wirkt spezifisch an Kinin B<sub>1</sub>- und B<sub>2</sub>- Rezeptoren. B<sub>1</sub>-Rezeptoren finden sich vorwiegend im Thalamus, Hypothalamus und in den spinalen Nervenfasern. B<sub>2</sub>- Rezeptoren hingegen sind v.a. im Hirnstamm, in den Basalkernen, im Cortex, aber auch im Thalamus und Hypothalamus, sowie in den Endothelien des Sinus sagittalis superior und den Ependymzellen der seitlichen und des dritten Ventrikels lokalisiert (Raidoo D.M. et al., 1997; Mahabeer R. et al. 2000; Gröger M. et al., 2005). Kinine wirken auf den Widerstand der Arterien, Kapillaren und Venen. Während die Relaxation der glatten Muskulatur der Arterien zur Vasodilatation führt, bewirkt die Kontraktion der glatten Muskelfasern in den Venolen eine Öffnung der tight junctions und damit eine Lückenbildung in der Gefäßwand. Dies bewirkt eine erhöhte Flüssigkeitsextravasation ins umliegende Gewebe, die, so die gängige Meinung, maßgeblich zur Ausbildung des vasogenen Hirnödems beiträgt (Regoli D. et al., 1984; Mayhan W.G. et al., 1996).

Der vasomotorische Effekt des Bradykinins auf die cerebrale Zirkulation scheint vorwiegend von B<sub>2</sub>- Rezeptoren vermittelt zu sein (Lindsey C.J. et al., 1989; Mayhan W.G. et al., 1996; Wahl M. et al., 1996; Wahl M. et al., 1999). Diese Überlegungen werden dadurch gestärkt, dass experimentell durch die selektive Hemmung der B<sub>2</sub>-Rezeptoren durch LF 16-0687 oder Hoe 140 die Ödembildung signifikant reduziert werden konnte (Plesnila N. et al., 2001), jedoch die Blockade von B<sub>1</sub> Rezeptoren experimentell keinen Effekt zeigte (Görlach C. et al., 2001).

Durch das sich bildende Hirnödem entsteht ein Circulus vitiosus mit ansteigendem ICP. Dieser verstärkt einerseits die Hypoperfusion und führt andererseits durch den mechanischen Druck zur Herniation von Hirngewebe in den Tentoriumspalt oder in das Foramen magnum und dadurch zur Funktionseinschränkung lebenswichtiger Hirnregionen, wie dem Hirnstamm.

### 1.3. Therapieoptionen nach SHT

Um die aktuellen wissenschaftlichen Erkenntnisse in die Rettungsmedizin einzuflechten gibt die Amerikanische und Europäische Gesellschaft für Neurochirurgie Behandlungsrichtlinien des SHT heraus (The Brain Trauma Foundation. The American Association of Neurological Surgeons. The Joint Section of Neurotrauma and Critical Care, 2000; Schlechtriemen T., 2002). Neben Allgemeinmaßnahmen, wie die korrekte Kopflagerung, um das Abklemmen der Venae jugulares zu vermeiden, das zu einem cerebralen Blutstau führen würde (Simmons B.J. et al., 1997; Meixensberger J. et al., 1997) und der Aufrechterhaltung der Atmungs- und Kreislauffunktion (Chesnut R.M. et al., 1995), wird ein feststehender Algorithmus für die Diagnostik und das Therapieregime vorgeschlagen. Dieser umfasst die sofortige Bildgebung mittels CT, Ultraschalluntersuchung cerebraler Gefäße und die Hirndruckmessung. Im zentralen Interesse der Therapie steht die Reduktion der Ödembildung und die Kontrolle des ICP. Eine Hyperventilationstherapie mit einem Zielwert  $\text{paCO}_2$  von  $< 35$  mmHg bewirkt eine Vasokonstriktion cerebraler Gefäße. Dadurch nimmt das intrakranielle Blutvolumen ab und das schwellende Gehirn kann sich, auf die Gefahr hin einer Sauerstoff- und Nährstoffminderversorgung des Parenchyms, weiter ausdehnen (Marion D.W. et al., 1995; Andrade de F.C. et al., 2000). Zudem kann versucht werden der Extravasation von Flüssigkeit ins Interstitium durch die Gabe von hyperosmolaren Lösungen oder Mannitol entgegenzuwirken (Muizelaar J.P. et al., 1984; Berger S. et al., 1995; Hartl R. et al., 1997; Hartl R. et al., 1997; Qureshi A.I. et al., 1998; Schierhout G. et al., 2000; Doyle J.A. et al., 2001; Schrot R.J. et al., 2002).

Um den ICP zu kontrollieren ist die Durchführung einer Entlastungskraniektomie heutzutage eine gängige Methode (Polin R.S. et al., 1997; Kunze E. et al., 1998; Munch E. et al., 2000; Whitfield P.C. et al., 2001; Piek J. et al., 2002; Schneider G.H. et al., 2002). Die Entlastungskraniektomie wird jedoch meist erst dann

eingesetzt, wenn konservative Therapiemethoden versagt haben. Dadurch kann zwar der ICP kontrolliert werden, Sekundärschäden sind jedoch auf Grund des langen Zuwartens meist nicht mehr zu vermeiden. Es ist somit nicht verwunderlich, dass durch eine Trepanation 60 Stunden nach Trauma zwar der ICP gesenkt wird, das langfristige Outcome der Patienten nach 6 bzw. 12 Monaten nicht verbessert werden konnte (Schneider G.H. et al., 2002). Aus der Erfahrung bei Kindern weiß man, dass durch eine Kombination einer sehr frühen Entlastungskraniektomie mit einem konservativen Therapieansatz das Behandlungsergebnis 6 Monaten nach Trauma signifikant verbessert werden kann (Taylor A. et al., 2001).

#### **1.4. Ziel der Arbeit**

Diese Arbeit verfolgt mehrere Ziele:

1. Die Entablierung eines SHT Modells zur Untersuchung pathophysiologischer Veränderungen an der Maus. Im Mittelpunkt unseres Interesses standen dabei die Veränderungen der CBF und des ICP, die Hirnödembestimmung, die histologische Nekrosevermessung, sowie die Quantifizierung des neurologischen Outcomes der Tiere.
2. Ausgehend von den pathophysiologischen Vorstellung in Abb.1 und den positiven Ergebnisse einer frühen Kraniektomie bei Kindern untersuchten wir experimentell die therapeutische Bedeutung der Kraniektomie nach SHT hinsichtlich ICP, CBF, Nekrosevolumen und dem funktionellen Outcome der Tiere. Eine besonderes Interesse wurde dabei dem Zeitfenster der Kraniektomie gewidmet.
3. Zudem untersuchten wir anhand von knock-out Tieren und durch selektive pharmakologische Blockade des B<sub>2</sub>- Rezeptors durch die Gabe von LF 16-0687 die Rolle des Bradykinin B<sub>1</sub>- und B<sub>2</sub>- Rezeptors für die Entstehung des Hirnödems. Wir konzentrierten uns dabei nicht nur auf das Hirnödem, sondern auch auf den ICP, den CBF, sowie auf die Größe der Nekrose und auf das funktionelle Outcome der Tiere, über deren Beeinflussbarkeit bislang in der Literatur nichts bekannt ist.

## **2. MATERIAL UND METHODEN**

Die Experimente wurden im Zeitraum zwischen Mai 2002 und Juni 2004 am Institut für Chirurgische Forschung in München durchgeführt. Die Untersuchungen sind in drei Abschnitte unterteilt. Im ersten Abschnitt etablierten wir ein standardisiertes und reproduzierbares Traumamodell; im zweiten untersuchten wir die therapeutische Beeinflussbarkeit der Entstehung des sekundären Hirnschadens durch eine Entlastungskraniektomie. Schließlich prüften wir im dritten Abschnitt den Beitrag des Bradykinin B<sub>1</sub>- und B<sub>2</sub>- Rezeptors an der Ausbildung des sekundären Hirnschadens an Hand von knock-out Tieren und durch pharmakologische Rezeptorblockade durch den B<sub>2</sub>- Rezeptorantagonisten LF 16-0687.

### **2.1. Versuchstiere und Tierhaltung**

Für unsere Versuche verwendeten wir männliche Mäuse des Stammes C57/Bl6, die wir entweder von Charles River, (*C.R., Kisslegg, Germany*) oder aus unserer Eigenzucht im Haus bezogen. Wir achteten darauf, dass wir in einer Studie nur Mäuse gleicher Herkunft verwendeten. Die Tiere hatten ein Körpergewicht zwischen 25 und 28 Gramm und wurden während der Versuche in Einzelkäfigen mit einer hell-dunkel Tageszeitrythmik von 12 Stunden gehalten. Die Versuchstiere erhielten zu jeder Zeit prä- und postoperativ Futter (Ssnif, Soest) und Wasser ad libitum.

### **2.2. Allgemeine Versuchsbedingungen**

In allen Versuchsabschnitten erfolgte die Gruppeneinteilung der Versuchstiere randomisiert. Der Operateur war während der Versuchsdurchführung und der Auswertung, insbesondere auch bei der Durchführung der neurologischen Nachuntersuchung der Tiere, verblindet. Die Applikation von pharmakologischen

Substanzen erfolgte nach codierter Zubereitung durch medizinisch-technische Assistentinnen ebenfalls blind durch den Operateur.

### 2.2.1. Narkose

Bei unseren Experimenten kamen, abhängig von der Dauer des Eingriffs, zwei Arten von Narkose zum Einsatz:

Bei einer Anästhesiezeit von unter 40 Minuten wurde die Narkose mit einem Gasgemisch aus 30% Sauerstoff (O<sub>2</sub>), 68% Lachgas (N<sub>2</sub>O) und 1,0 bis 1,5% Halothan (*Halothan Eurim, Eurim-Pharma Arzneimittel GmbH, Piding, Deutschland*) durchgeführt. Die Tiere ließen wir spontan über eine Maske atmen. Zur Narkoseeinleitung wurden die Tiere in eine kleine Plastikkammer gesetzt und atmeten für 1 Minute 4% und für weitere 2 Minuten 2% Halothan (30% O<sub>2</sub> und 67% N<sub>2</sub>O). Zur Ausleitung der Narkose wurde die Zufuhr von Halothan und Lachgas gestoppt und den Mäusen für eine weitere Minute reiner Sauerstoff zum Atmen angeboten.

Für Langzeitbeobachtungen über 4 bis 5 Stunden ist es nicht möglich eine Maskennarkose durchzuführen. Durch die Akkumulation der Gase im Fettgewebe käme es zur Lähmung der Atemmuskulatur und zur drastischen Verschlechterung der Blutgase. Für derartige Fragestellungen wurden den Tieren ein Narkosecocktail aus den Sedativa Midazolam (5 mg/kg KG, Roche, Basel, Schweiz) und Medetomidin (0,5 mg/kg KG, Dr. E. Graub AG, Basel, Schweiz), sowie dem Analgetikum Fentanyl (0,05 mg/kg KG, Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland) gewichtsadaptiert intraperitoneal (i.p.) injiziert (vgl. Abb. 2).



	Meditomedin	Midazolam	Fentanyl	Meditomidin	Midazolam	Fentanyl	Gesamt
mg/kg KG	0,5	1	0,05				
Tiergewicht	mg	mg	mg	ml	ml	ml	ml
23	0,0115	0,1150	0,0012	0,0115	0,1150	0,0230	0,1495
24	0,0120	0,1200	0,0012	0,0120	0,1200	0,0240	0,1560
25	0,0125	0,1250	0,0013	0,0125	0,1250	0,0250	0,1625
26	0,0130	0,1300	0,0013	0,0130	0,1300	0,0260	0,1690
27	0,0135	0,1350	0,0014	0,0135	0,1350	0,0270	0,1755
28	0,0140	0,1400	0,0014	0,0140	0,1400	0,0280	0,1820
29	0,0145	0,1450	0,0015	0,0145	0,1450	0,0290	0,1885
<b>1000</b>	<b>0,5000</b>	<b>5,000</b>	<b>0,0500</b>	<b>0,5000</b>	<b>5,000</b>	<b>1,000</b>	<b>6,5000</b>

**Abb. 2 :** Gewichtsabhängige Injektionsmengen von Meditomidin, Midazolam und Fentanyl zur intraperitonealen Verabreichung bei der Narkoseeinleitung.

Um die Anästhesie aufrecht zu erhalten, mußte alle 60 Minuten 1/3 der Ausgangsdosis nachgespritzt werden. Die Tiere wurden intubiert und kontrolliert mit einem Respirator für Kleintiere (*MiniVent 845, Hugo Sachs Elektronik, March-Hungstetten, Deutschland*) beatmet (Atemfrequenz 150 / min, Atemvolumen 200 µl). Zur Kontrolle der Narkoseführung wurde mit Hilfe der Mikrokapnometrie (*Micro-Capnograph CI 240, Columbus Instruments, Columbus, Ohio, USA*) kontinuierlich der  $\text{paCO}_2$  in der Expirationsluft der Mäuse gemessen. Als Zielparameter wurde ein  $\text{paCO}_2$  von 35 bis 45 mmHg angestrebt. Zur Ausleitung der Narkose wurde jedes der verwendeten Medikamente einzeln gewichtsadaptiert antagonisiert (Naloxon (*1,2 mg/kg KG, CuraMed Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland*), Flumazenil (*0,5 mg/kg KG, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland*) und Antipamezol (*2,5 mg/kg KG, Orion Pharma, Pfizer, Karlsruhe, Deutschland*) (vgl. Abb.3). Aufgrund der kürzeren Halbwertszeiten der Antagonisten mussten diese mehrmals nachinjiziert werden.

	Atipamezol	Flumazenil	Naloxon	Atipamezol	Flumazenil	Naloxon	Gesamt
mg/kg KG	2,5	0,5	1,2				
Tiergewicht	mg	mg	mg	ml	ml	ml	ml
23	0,0575	0,0115	0,0276	0,0115	0,1150	0,0690	0,1955
24	0,0600	0,0120	0,0288	0,0120	0,1200	0,0720	0,2040
25	0,0625	0,0125	0,0300	0,0125	0,1250	0,0750	0,2125
26	0,0650	0,0130	0,0312	0,0130	0,1300	0,0780	0,2210
27	0,0675	0,0135	0,0324	0,0135	0,1350	0,0810	0,2295
28	0,0700	0,0140	0,0336	0,0140	0,1400	0,0840	0,2380
29	0,0725	0,0145	0,0348	0,0145	0,1450	0,0870	0,2465
<b>1000</b>	<b>2,5000</b>	<b>0,5000</b>	<b>1,2000</b>	<b>0,5000</b>	<b>5,000</b>	<b>3,000</b>	<b>8,5000</b>

**Abb. 3:** Gewichtsadaptierte und spezifische Antagonisierung von Medetomidin, Midazolam und Fentanyl durch Atipamezol, Flumazenil und Naloxon zur Ausleitung der Narkose.

Zur Kontrolle der Narkoseführung entnahmen wir Blutgase. Bei maskenbeatmeten Tieren an repräsentativen Kontrollgruppen aus der Arteria carotis communis, bei intubierten vor und am Ende des Beobachtungszeitraums aus der Arteria femoralis sinistra. Auf Grund der geringen Blutmenge der Tiere war es nicht möglich mehrmals am gleichen Tier Blutgasanalysen vorzunehmen.

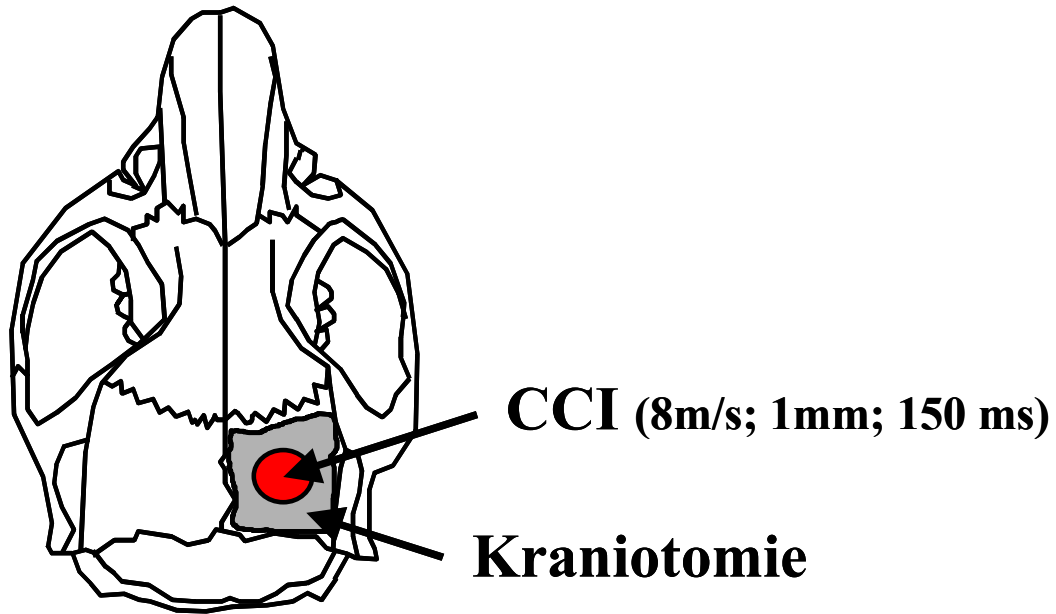
### 2.2.2. Temperaturregulation

Um das rasche Auskühlen der Mäuse während der Versuche zu vermeiden, wurden die Tiere auf einer Heizplatte (*DC Temperature Control Module 40-90-8C, FHC, Inc. Frederick Haer & Co., Bowdoinham, ME, USA*), die mit einer rektalen Temperatursonde rückgekoppelt war, gelagert. Die Körpertemperatur der Tiere war während unserer Experimente konstant bei  $36,5 \pm 0,1$  °C. Nach Ausleitung der Maskennarkose kamen die Tiere für 60 Minuten zur Regeneration in einen Inkubator (*Intensiv-Pflegeinkubator 7510, Drägerwerk AG, Lübeck, Deutschland*) mit einer Temperatur von 36,0 Grad. Bei Tieren nach Intubationnarkosen wurde diese Zeit auf 4 Stunden verlängert.

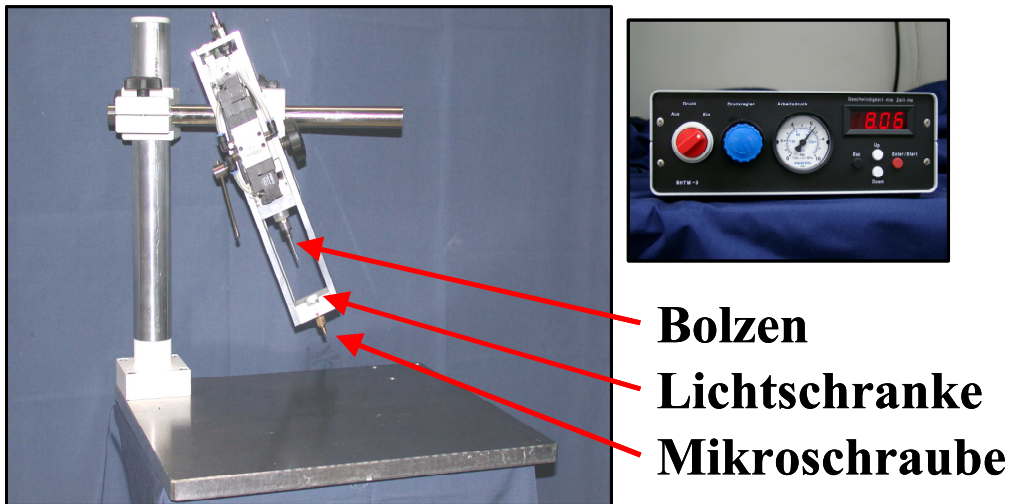
### 2.3. Traumaapplikation

Zur Applikation des Traumas wurde der Kopf der narkotisierten Maus in einem Steriotaxierahmen (*Small Animal Steriotactic Frame, Model 900, David Kopf Instruments, Tujunga, Ca, USA*) fixiert ( $0^\circ$  horizontal und  $3^\circ$  nach links gedreht) und eine 15 mm lange frontookzipitale Inzision der Kopfhaut in der Medianlinie vorgenommen. Die Galea und das Periost wurde über der rechten Schädelkalotte stumpf abpräpariert. Unter ständiger Kühlung mit 0,9% NaCl-Lösung wurde mit einem Bohrer (*Uni-drive M, Labset, Paggen Werkzeugtechnik, Starnberg, Deutschland*) der Stärke 0,8 mm (*Hartmetall carbide, Rundkopffräser, 0,8mm, Nr. 3,241, Paggen Werkzeugtechnik, Starnberg, Deutschland*) die Schädelkalotte entlang des Ansatzes des rechten Musculus temporalis und der rechten Sutura lambdoidea aufgebohrt. Unter Schonung des Sinus sagittalis superior und der Dura mater wurde die Kalotte manuell über die Sutura sagittalis aufgeklappt und blieb am Periost hängen (vgl. Abb. 4). Anschließend wurde die Unversehrtheit der Dura mikroskopisch kontrolliert und mit physiologischer NaCl- Lösung feucht gehalten. Etwaige Knochenzacken am Trepanationsrand wurden, um das schwellende Hirngewebe nicht zusätzlich zu schädigen, entfernt.

Das Trauma selbst wurde nach dem Modell des *Controlled Cortical Impact (CCI)* nach C.E. Dixon durchgeführt (Dixon C.E. et al., 1991). Bei unsere Maschine (*Mouse Katjuscha 2000, L.Kopacz, Universität Mainz, Deutschland*) (vgl. Abb. 5) konnte man die Geschwindigkeit des pneumatisch angetriebenen Bolzens (Durchmesser 3 mm), dessen Eindringtiefe ins Hirnparenchym und die Kontaktzeit auf dem Gewebe frei wählen. Alle Versuche wurden, auf der Basis von Vorversuchen (vgl. S. 42) in gleicher Einstellung mit einer Geschwindigkeit von 8 m/s, einer Eindringtiefe von 1 mm und einer Kontaktzeit des Bolzens auf dem Gewebe von 150 ms durchgeführt.



**Abb. 4:** Schematische Zeichnung des Mäuseschädels mit Darstellung der Traumaposition und des Kraniotomiegebietes.



**Abb. 5:** Traumamaschine (Controlled Cortical Impact) mit dazugehörigem Steuergerät. Mit Hilfe der Mikrometerschraube lässt sich die Eindringtiefe des Bolzens ins Hirnparenchym exakt einstellen.

Die Geschwindigkeit des Bolzens wurde mit Hilfe einer im Gerät integrierten Laser Lichtschranke 1 cm oberhalb der Hirnoberfläche gemessen.

Durch das mechanische Trauma riss in 50% der Fälle die Dura mater ein und es kam zu kleinen Blutungen. Unmittelbar nach der Blutstillung wurde die Schädelkalotte repositioniert und mit Histoacryl Gewebekleber (Histoacryl<sup>®</sup>, Braun-Melsungen, Melsungen, Deutschland) fixiert. Nach Spülung des Situs (NaCl-Lösung) wurde die Wunde mit einer Hautnaht verschlossen (*Ethibond Excel 5/0, geflochten Polyester beschichtet, Manufacturer Johnson & Johnson Intl., c/o European Logistics Centre, Brüssel, Belgien*).

## **2.4. Untersuchungen zur Modeletablireung**

### 2.4.1. Bestimmung des Nekrosevolumens

In einer ersten orientierenden Studie wurde an 30 Tieren das Kontusionsvolumen 12 Stunden nach CCI Trauma bestimmt. In den 9 Traumagruppen (plus 1 sham Gruppe, n=3) wurden unterschiedliche Geschwindigkeiten (6 m/s, 8 m/s und 10 m/s) und Eindringtiefen des Bolzens ins Hirngewebe (0,5 mm, 1,0 mm und 1,5 mm) kombiniert.

Zur Quantifizierung des Kontusionsvolumens wurden die Gehirne zu dem gewünschten Zeitpunkt den Mäusen entnommen. Dazu wurde die Schädelkalotte medial von occipital nach frontal eröffnet und auseinandergedrängt. Nach Abtrennung der spinalen Fasern und Durchtrennung der Hirnnerven konnte das Gehirn mit einem Dissektionsspatel mobilisiert und entnommen werden. Unmittelbar daran wurde es mit Hilfe von Trockeneis schockgefrohren und konnte bei -20°C gelagert werden. Anschließend wurden mit einem Kryostaten (*CryoStar HM 560, Microm, Walldorf, Deutschland*) 10 µm dicke koronare Schnitte angefertigt. Im Abstand von 500 µm wurden die Schnitte auf einen Objektträger aufgenommen (*76 x 26 x 1 mm, Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland*)

und nach Nissl gefärbt. Die gefärbten Hirnschnitte wurden fotografiert und mit einem digitalen Bildbearbeitungsprogramm (*Opitmate 6.51, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA*) vermessen. Dabei haben wir jeweils die Nekrosefläche, die ungeschädigte ipsilaterale und die gesamte kontralaterale Fläche bestimmt.

Um den Einfluss der Hirnschwellung auf die Größe der nekrotischen Fläche auszugleichen, wurden diese mit einem Quotienten aus der gesunden Hemisphäre und der geschädigten Hemisphäre multipliziert (vgl. Abb. 6). Somit ließen sich ödemkorregierte Nekroseflächen berechnen.

Durch Multiplikation der Nekroseflächen mit deren Abstände konnte man unter Zuhilfenahme der Formel aus Abb. 7 auf die entgültige Kontusionsgröße schließen.

$$\text{Nekrose- fläche (korr.)} = \frac{\text{gesunde Hemisphäre}}{(\text{Nekrosefläche} + \text{ipsilat. ungeschädigte Fläche})} * \text{Nekrosefläche}$$

**Abb. 6:** Formel zur Ödemkorrektur der Nekroseflächen

$$0,5 (A_1 + A_2 + A_3 + \dots + A_n)$$

**Abb. 7:** Formel zur Berechnung der Kontusionsgröße

#### 2.4.2. Quantifizierung der motorischen Funktion

Um den Einfluss des Kontusionsschadens auf die neurologische Funktion der Tiere zu bestimmen, unterzogen wir diese einen Tag vor und bis zu 3 Tage nach Trauma eine Batterie funktionaler Tests. Um einen Überblick über die neurologischen Defizite zu bekommen, fassten wir die 9 Einzelgruppen (n=3) in 3 Übergruppen (n=9) mit geringgradiger (*mild*), mittelgradiger (*moderate*) und starker Traumaschädigung (*strong*), sowie einer sham operierten Kontrollgruppe (n=3), zusammen. Die *mild* Gruppe umfasste Tiere mit folgenden Traumaparametern: Geschwindigkeit 6 m/s und Eindringtiefe 0,5 mm, 6 m/s und 1,0 mm sowie 8 m/s und 0,5mm. Zu den *moderate* geschädigten Mäusen rechneten wir Tiergruppen, die mit einer Geschwindigkeit von 6 m/s und einer Eindringtiefe von 1,5 mm, 8 m/s und 1mm sowie 10 m/s und 0,5 mm traumatisiert wurden. Die Gruppen, die wir zu den *strong* geschädigten zählten, wurden mit 8m/s und 1,5 mm, 10 m/s und 1,0 mm sowie 10 m/s und einer Eindringtiefe von 1,5 mm traumatisiert. Bei unseren Untersuchungen berücksichtigten wir neben dem Allgemeinbefinden der Tiere, Verhaltensveränderungen und Paresen auch das Koordinationsvermögen der Mäuse.

Zur objektiven Beurteilung des Allgemeinbefindens der Tiere nach traumatischer Hirnschädigung ist die Beobachtung des Gewichtsverlaufs ein sensitiver Marker. Dazu wurden die Mäuse täglich auf einer automatischen Waage, die Bewegungsartefakte der Tiere ausschließt, gewogen (*Navigator<sup>®</sup>, Ohaus, Pine Brooks, NJ, USA* ). Um die geringen Gewichtsschwankungen anschaulich darstellen zu könne, wurde das Ausgangsgewicht der Mäuse 1 Tag vor Traumaapplikation als 100% angenommen und die Veränderungen in Prozent dazu angegeben.

Zur objektiven Verhaltensbeurteilung der Mäuse entwickelten wir einen neurologischen Score. In ihn flossen physiologische Parameter, wie Atmung und

Aktivität, die Beurteilung des allgemeinen Verhaltens wie Klettern, Nestbau, Stehen auf den Hinterpfoten, Interesse bei Käfigöffnung oder Fluchtverhalten ebenso mit ein, wie die Prüfung der Sensomotorik. Hierzu verwendeten wir den Meatus ear Reflex (heftiges Kopfschütteln bei Berührung des Meatus acusticus mit einem Wattestäbchen), den Moving whiskers Reflex (Bewegung der Barthaare bei Berührung), den Pinch tail Reflex (Fluchtverhalten bei geringem mechanischen Schmerzreiz am Schwanz) und den Flection Reflex (Hochheben der entsprechenden Extremität bei mechanischem Druck auf die Pfote). Wie aus der nachstehenden Tabelle (Abb. 8) ersichtlich, ergab sich ein maximaler Punktwert von 80.

Für die Messung der Kraft und der Motorik der vorderen Extremität verwendeten wir den Grasp strength Test und den Forepaw contraflexion Test.

Die Apparatur des Grasp strength Tests bestand aus einem 70 cm langen Draht, der auf 1 m Höhe zwischen zwei hölzernen Seitenplatten eingespannt war. Zur Quantifizierung der Kraft wurde die Zeit gemessen, wie lange die Mäuse mit ihren vorderen Extremitäten in der Mitte des Drahtes hängen konnten, wobei eine maximale Zeit von 30 Sekunden festgesetzt wurde. Mit einer Regenerationspause von 5 Minuten wurden die Versuche täglich 3 mal wiederholt und der Mittelwert bestimmt.

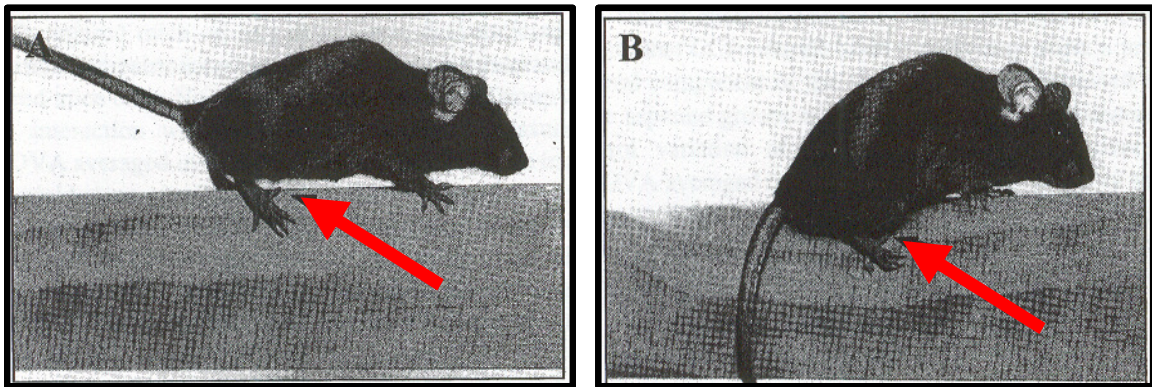
Beim Forepaw contraflexion Test wurden die Tiere am Schwanz 3 cm über einer glatten Tischoberfläche gehalten. Gesunde Mäuse streckten dabei beide Vorderpfoten in Richtung der Oberfläche aus, um den Boden zu berühren. Nach Schädigung der Kortexstruktur treten dabei Paresen oder Plegien der korrespondierenden Extremitäten auf. Die Funktionalität wurde mit intakt (1 Punkt) oder nicht intakt (0 Punkte) bewertet.



<b>Neuroscore</b>			
Allgemeines Befinden	Atmung	normal	10
		leichte Dyspnoe	5
		massive Dyspnoe	0
	Aktivität	aufgeweckt	10
		eingeschränkt	5
		somnolent	0
	Verhalten	normal	10
		ängstlich (zittert)	5
		aggressiv	1
Spezifische Verhaltensmuster	Klettern		5
	Nestbau		5
	Stehen auf den Hinterpfoten		5
	Interesse bei Käfigöffnung		5
	Flucht von freien Flächen		5
	Stopp am Tischrand		5
Sensomotorik	Meatus ear Reflex		5
	Moving whiskers Reflex		5
	Pinch tail Reflex		5
	Flection Reflex		5
<b>Gesamt</b>		<b>80</b>	

**Abb. 8:** Punkteverteilung beim Neuroscore mit Berücksichtigung des Allgemeinbefindens, spezifischer Verhaltensmuster und der Sensomotorik der Mäuse.

Zur Beurteilung der motorischen Funktion der hinteren Extremität und des Koordinationsvermögens verwendeten wir den Beam walking Test. Die Anordnung bestand aus einem im Durchmesser 8 mm starken und 1 m langen Holzstab, der auf 75 cm Höhe zwischen zwei seitlichen Platten eingespannt war. Beim Überschreiten des Balkens wurden die Fehltritte der zur Seite des Traumas korrespondierenden kontralateralen hinteren Extremität abgezählt (Abb. 9). Um einen Anreiz für die Tiere zu schaffen den Holzstab zu überqueren, nutzten wir die Lichtscheue der Mäuse aus und bestrahlten die Konstruktion mit einer OP-Leuchte. Der Versuch wurde mit einer Regenerationspause von jeweils 1 Minute 3 mal täglich durchgeführt und aus den Ergebnissen ein Mittelwert gebildet.



**Abb. 9:** Fotografische Darstellung der Befunde beim Beam walking Test: A) korrekte Position der hinteren Extremität beim Aufsetzen auf den Balken; B) Abrutschen der hinteren Extremität vom Balken infolge der cerebralen Schädigung.

Neben den motorischen Fähigkeiten untersuchten wir auch Orientierungs-, Koordinations- und Lernvermögen der Tiere mit dem Barnes circular Maze und dem Morris water Maze Test:

Die Vorrichtung des Barnes Maze bestand aus einer runden Plattform mit einem Durchmesser von 150 cm, auf der 40 Löcher (Durchmesser 5 cm) in exakt gleichen Abständen, und einer Distanz von 5 cm vom Rand, angebracht waren. Um den Antrieb der Tiere zu stimulieren, wurde die Konstruktion von einer OP-Leuchte bestrahlt. Unter einem der 40 Löcher war ein dunkler Käfig (12 x 5 x 3 cm) angebracht. Der Versuchsaufbau war optisch vom restlichen Raum abgeschirmt. Zu

Beginn der Experimente wurden die Mäuse für 1 Minute in den Käfig gesetzt. Anschließend wurden sie inmitten der hell ausgeleuchteten Plattform positioniert. Wegen ihrer Lichtscheue, suchten die Mäuse den dunklen Käfig unter eines der 40 Löcher. Zur Orientierungshilfe waren an drei der vier Seiten in Augenhöhe der Mäuse ein Kreis, ein Rechteck und eine Raute von je 30 cm Durchmesser angebracht. Zur quantitativen Auswertung wurden die Fehlversuche innerhalb von 5 Minuten gezählt, separat dazu die Fehlversuche, bei der sich die Mäuse um mehr als 5 Löcher geirrt hatten. Um eine Beeinflussung der Orientierung durch Geruchsmarken zu vermeiden, wurde die gesamte Vorrichtung zwischen den einzelnen Versuchen desinfiziert.

Die Vorrichtung des Morris water Maze bestand aus einem 1 m tiefen Wasserbecker (Durchmesser 86 cm), der mit  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  warmen Wasser gefüllt war. Das Wasser wurde mit ungiftiger Kindermalkastenfarbe (*Faber Kastell 402*) schwarz eingefärbt. In dem Wasserpool wurde eine höhenverstellbare schwarze Plattform so positioniert, dass deren Oberfläche 5 mm unterhalb der Wasseroberfläche und in mitten eines der vier Quadranten positioniert war. Zur Orientierung wurden den Tieren ein 15 cm großes weißes Kreuz, ein Rechteck und ein Kreis an den Wänden von drei der vier Quadranten angeboten. Für die Durchführung der Versuche wurden die Mäuse, nachdem man sie mit der Existenz der Plattform vertraut gemacht hatte, in randomisierter Blickrichtung inmitten des Wasserbeckens gesetzt. Zur Quantifizierung der Orientierungs-, Kognitions- und motorischen Fähigkeiten wurde die Zeit gestoppt, bis die Maus die Plattform gefunden hatte (maximal 60 Sekunden). Zur Einprägung der optischen Situation ließen wir die Mäuse anschließend für weitere 30 Sekunden auf der Plattform sitzen. Dieser Versuch wurde dreimal täglich wiederholt, wobei den Tiere zwischen den einzelnen Versuchen eine Regenerationspause von mindestens 5 Minuten gewährt wurde. Um das Auskühlen der Tier zu vermeiden, wurden deren Käfige mit einer Wärmelampe bestrahlt.

## 2.5. Untersuchung pathophysiologischer Veränderungen nach CCI Trauma

### 2.5.1. Bestimmung des Hirnödems

Um das Hirnödem nach CCI Trauma zu quantifizieren, wurde an 30 Tieren (n=6) in einer sham Gruppe und 6h, 12h, 24h und 48h nach Trauma der prozentuale Hirnwassergehalt der ipsi- und der kontralateralen Hemisphäre bestimmt. Dazu wurde das Feucht- und Trockengewicht, nach Abtrennung des Bulbus olfactorius und des Cerebellums, ermittelt (*Mettler Toledo AG-Waagen, AG245, Greifensee, Schweiz*) und das Ödem mit nachstehender Formel berechnet (vgl. Abb. 10). Um den Hirnen jegliche Flüssigkeit zu entziehen wurden diese, nach Entnahme und erstem Wiegen, für 24h in einem 100°C heißen Inkubator getrocknet.

$$\text{Wassergehalt} = \left( \frac{\text{Gewicht des feuchten Gewebes} - \text{Gewicht des trockenen Gewebes}}{\text{Gewicht des trockenen Gewebes}} \right) * 100$$

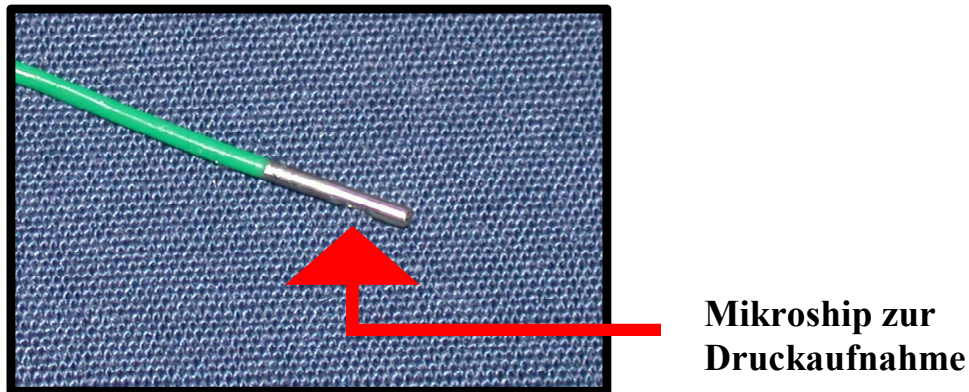
**Abb. 10:** Formel zur Berechnung des prozentualen Hirnwassergehalts bei bekanntem Feucht und Trockengewicht der Hirne

### 2.5.2. Messung des ICP und des CBF

Um akute Veränderungen des Hirndrucks und der cerebralen Durchblutung nach experimentellem SHT nachzuweisen, wurden diese an 7 Tieren für einen Zeitraum von 10 Minuten vor und bis 120 Minuten nach CCI Trauma kontinuierlich bestimmt. Zudem wurde an zwei weiteren Gruppen (n=7) 3 und 6, sowie 12, 24 und 48 Stunden nach CCI ICP-Kontrollmessungen vorgenommen.

Der intrakraniellen Druck wurde mit Hilfe einer Mikro-ICP Sonde (*ICP-Sonde, Mammendorfer Institut für Physik und Medizin, Mammendorf, Deutschland*)

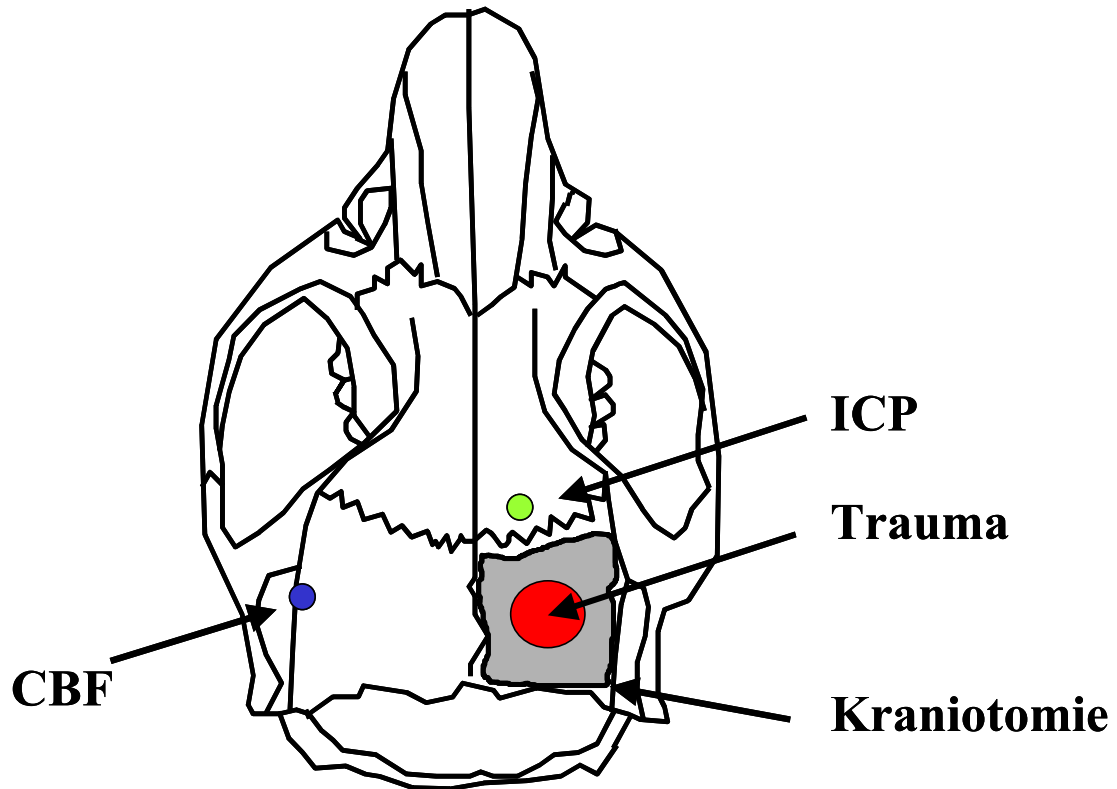
aufgezeichnet. Die Sonde hat einen Durchmesser von 0,9 mm und an deren Spitze einen Mikrochip zur Druckaufnahme (vgl. Abb. 11).



**Abb. 11:** Mikro-ICP Sonde ( $\varnothing$  0,9 mm)

Nach Anlage eines 1,1 mm großen Bohrlochs ca. 1,0 mm rostral der Trepanationsvorderkante (vgl. Abb. 12), wurde die kalibrierte Sonde mit einem Mikromanipulator 3 mm in das Hirnparenchym eingeführt.

Die cerebrale Durchblutung wurde unter Verwendung der Laser Doppler Fluxmetrie (*Perflux 4001 Master, Perimed, Stockholm, Schweden*) über der kontralateralen Hemisphäre gemessen (vgl. Abb. 12). Dazu wurde der linke Musculus temporalis stumpf von dessen Knochenansatz abpräpariert und die Glasfasersonde (*Masterprobe 418-1, Perimed, Järfälla, Schweden*) zwischen der Gabelung der Arteria menigea media, die durch den dünnen Schädelknochen durchscheint, platziert und mit Krazy Glue Zweikomponenten Kleber fixiert (*Krazy Glue, Elmers Products Canada Inc., Ontario, Canada und Insta-set, Plastruct, City of Industry, CA, USA*).



**Abb. 12:** Lokalisation der ICP- und der CBF Sonden, sowie der Kraniotomie.

### 2.5.3. Bestimmung des Nekrosevolumens

In einer ersten Studie wurde an 14 Tieren untersucht, ob sich nach experimentellem SHT innerhalb von 24 h ein sekundäres Nekrosewachstum zeigt. Dazu wurde an n=7 Tieren, in oben beschriebender Technik (vgl. Kap. 2.4.1.), das Nekrosevolumen 15 Minuten und 24 Stunden nach CCI bestimmt. Zur Untersuchung der Dynamik des sekundären Nekrosewachstums wurden an weiteren 49 Mäusen (n=7) die Nekrosevolumina zu unterschiedlichen Zeitpunkten ermittelt (15 min., 2h, 6h, 12h, 24h, 4d und 7d).

## **2.6. Einfluss der Entlastungskraniektomie auf den sekundären Hirnschaden**

### 2.6.1. Versuchsprotokoll

An insgesamt 140 Tieren wurde die therapeutische Beeinflussbarkeit des sekundären Hirnschadens nach CCI Trauma untersucht. Die Versuche wurden in Intubations- oder Masekennarkose durchgeführt (vgl. Kap. 2.2.1).

Im einzelnen wurde der ICP und der CBF von kraniektomierten und nicht kraniektomierten Mäusen (insg. 42; n=7) kontinuierlich 120 Minuten nach Traumaapplikation, bzw. in zwei weiteren Gruppen 3h und 6h, sowie 12h, 24h und 48h nach Trauma gemessen.

Zur Quantifizierung des strukturellen Gewebeschadens wurde an insgesamt 28 kraniektomierten und nicht kraniektomierten Tieren das Kontusionsvolumen 15 Minuten und 24h nach CCI Trauma bestimmt.

Zudem wurde an Hand einer sham-, Kontroll- und Kraniektomiegruppe (n=7) an 21 Mäusen die Beeinflussbarkeit der Hirnödembildung untersucht. Dazu wurde der Hirnwassergehalt ermittelt (vgl. Kap. 2.5.1.).

Um einen Einfluss der Kraniektomie auf die neurologische Funktion der Tiere zu überprüfen, untersuchten wir 14 Mäuse (n=7) repräsentativ mit dem Beam walking Test und bestimmten deren Körpergewichte (vgl. Kap. 2.4.2.) täglich in einem Zeitraum von 3 Tagen prä- bis zu 8 Tagen postoperativ.

Abschließend haben wir das therapeutische Fenster der Entlastungskraniektomie untersucht. Dazu haben wir bei 35 (n=7) Versuchstieren das Kontusionsvolumen 24h post CCI Trauma in oben beschriebener Weise bestimmt. Die Kraniektomie wurde dabei entweder unmittelbar nach dem Trauma (15 min.), oder mit einer Verzögerung von 1h, 3h oder 8h ausgeführt. Als Kontrolle wurde bei einer weiteren Gruppe auf die Kraniektomie verzichtet.

### 2.6.2. Durchführung der Entlastungskraniektomie

Die Präparation der Maus und die Durchführung des CCI Traumas erfolgte wie in Kapitel 2.3. beschrieben. Erst nach Applikation des Traumas wurde die Maus durch das Ziehen eines Loses in die Kraniektomie oder nicht-Kraniektomiegruppe randomisiert. Während bei nicht kraniektomierten Mäusen die eröffnete Schädelkalotte repositioniert und fixiert wurde, wurde bei kraniektomierten Tieren das gesamte Knochenstück vom Periost gelöst und entfernt. Es folgte ein Wundverschluß durch Hautnaht und Gewebekleber.

### 2.6.3. Messung der Hirntemperatur

Um einen neuroprotektiven Effekt einer lokalen Hypothermie des Hirngewebes im Kraniektomiegebiet auszuschließen, haben wir 12 Stunden nach Traumaapplikation die Hirngewebetemperatur repräsentativ an 3 kraniektomierten und 3 nicht-kraniektomierten Versuchstieren gemessen. Hierzu wurde ein kleines Bohrloch über dem traumatisierten Areal angelegt und die Mini- Temperatursonde (*Miniatur-Thermoelement 2ABAc 025, Ø 0,61 mm, Philips, Thermocoax, Hamburg, Deutschland*) mit Hilfe eines Mikromanipulators 1 mm in das Hirngewebe eingeführt.



## **2.7. Einfluss des Kallikrein-Kinin Systems für die Entstehung des sekundären Hirnschadens**

### 2.7.1. Messung der Bradykininkonzentration

In unseren ersten Untersuchungen gingen wir der Frage nach, ob Bradykinin, als Hauptmediator des Kallikrein-Kinin Systems, nach experimentellem Schädel-Hirntrauma an der Maus, vermehrt im Gewebe freigesetzt wird. Ein besonderes Interesse galt dabei dem Zeitpunkt, wann und wie lange Bradykinin im Parenchym nachweisbar ist. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Jürg Nussberger (*Abteilung für Hypertension und vaskuläre Erkrankungen, Universitätsklinikum Vaudois (CHUV), Lausanne, Schweiz*), ließen wir die Bradykininkonzentrationen im Hirnparenchym zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach CCI Trauma bestimmen.

15 C57/Bl6 Mäusen wurden, in Halothan Maskennarkose, einem CCI Trauma der rechten Hirnhemisphäre unterzogen. Zudem wurden zwei Bradykinin B<sub>2</sub>- knockout Mäuse B<sub>2</sub> (-/-) traumatisiert und 3 C57/Bl6 Tiere sham operiert. Nach 2h, 4h, 8h, 24h und 48h wurden je n = 3 der 15 C57/Bl6 Mäuse geopfert. Die sham operierten und die B<sub>2</sub> (-/-) Mäuse wurden 6h nach Trauma getötet. Anschließend wurden die Hirne der Tiere entnommen und die Hemisphären getrennt. Aus der traumatisierten Hemisphäre haben wir mit einem Skalpell einen Gewebeblock (4 x 4 x 4 mm) herausgeschnitten, der sowohl den Kontusionsherd, wie auch umliegendes Gewebe enthielt. Somit konnten wir davon ausgehen, dass nicht nur nekrotisches Gewebe, sondern auch Penumbrawebe in diesem Parenchymblock enthalten war. Aus der kontralateralen Hemisphäre entnahmen wir ebenfalls einen korrespondierenden Gewebeblock. Um weitere Stoffwechselfvorgänge zu unterbrechen, wurden die Proben in Trockeneis fixiert, bei -80 °C gelagert und verschickt. Mit Hilfe von RIAs wurde im Labor von Prof. Nussberger die Bradykininkonzentration in fmol /g Gewebe bestimmt (Pellacani A., et al., 1994; Nussberger J. et al., 1998).

### 2.7.2. Die Rolle der Bradykinin B<sub>1</sub>- und B<sub>2</sub>- Rezeptoren

Um zu differenzieren, ob die Wirkung der Bradykinine über Bradykinin B<sub>1</sub>- oder B<sub>2</sub>-Rezeptoren vermittelt ist, haben wir an 14 B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub> knock-out Mäusen (n=7) im Vergleich zu 14 rezeptorkompetenten C57/Bl6 Kontrolltieren (n=7) die Kontusionsvolumina 24h, bzw. 12h, nach CCI Trauma, in Kap. 2.4.1. beschriebener Technik, bestimmt.

Aufgrund der begrenzten Tierzahl konnten wir das Hirnödem und das neurologische Outcome nur bei B<sub>2</sub> knock-out Mäusen untersuchen. In drei Gruppen, bestehend aus sham operierten-, C57/Bl6 Wildtyp- und B<sub>2</sub> knock-out Tieren (n=6), haben wir den Hirnwassergehalt 24h nach Trauma gemessen (vgl. Kap. 2.5.1.).

Zudem haben wir, zur Überprüfung der neurologischen Funktion, den Verlauf des Körpergewichtes vom OP Tag bis zu 7 Tage post CCI, sowie deren motorischen Fähigkeiten im Beam walking Test in einem Zeitraum von 4 Tagen vor, bis zu 7 Tagen nach dem Trauma, bei B<sub>2</sub> knock-out versus C57/Bl6 Tieren (n=6) untersucht (vgl. Kap. 2.4.2.).

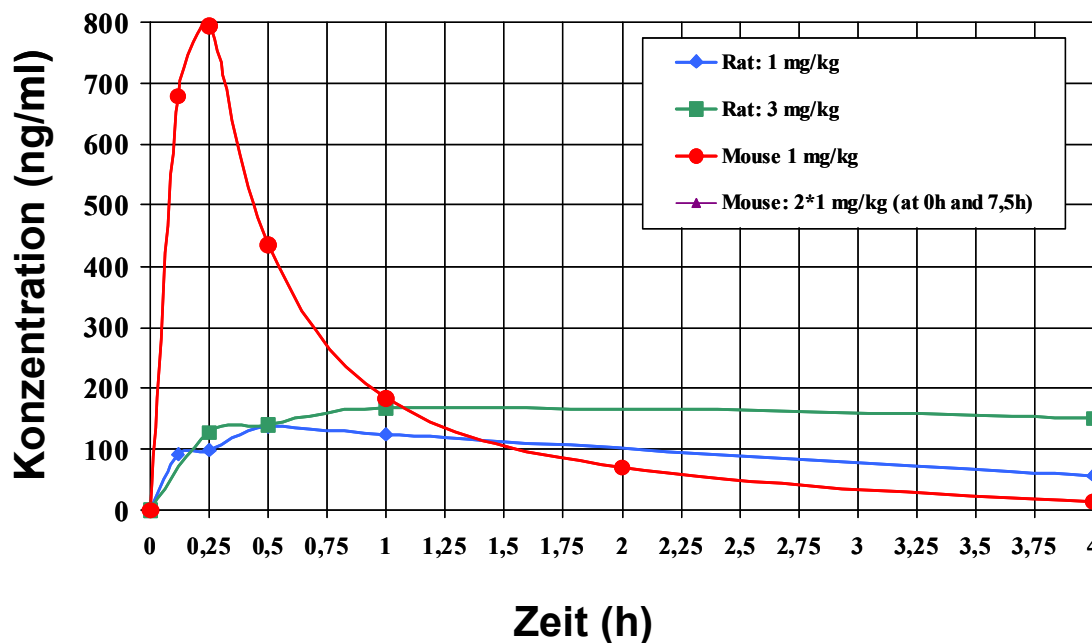
### 2.7.3. LF 16-0687 – ein spezifischer B<sub>2</sub>- Rezeptor Antagonist

Das nicht-Peptid LF 16-0687 Ms. (*1-[[2,4-dichloro-3-[[[(2,4-di-methylquinolin-8-yl)oxy]methyl]phenyl]sulfonyl]-N-[3-[[4-(aminoiminomethyl)phenyl]carbonylamino]propyl]-2(S) – pyrrolidine) carboxamide, MW989 (Didi Pruneau et al., Dr.P.Dodey, Fournier Research Laboratories, Daix, Frankreich)* wird als spezifischer Inhibitor des Bradykinin B<sub>2</sub> Rezeptors beschrieben (Pruneau D. et al., 1999 (a); Pruneau D. et al., 1999 (b); Houle S. et al., 2000; Stover J.F. et al., 2000 (a); Stover J.F. et al., 2000 (b); Rachinsky M. et al., 2001; Kaplanski J. et al., 2002; Zausinger S. et al., 2002; Asa I. et al., 2003; Kaplanski J. et al., 2003).

Die Substanz lag in Pulverform vor und wurde bei maximal 4°C und ohne Zufuhr von Licht gelagert. Für jede einzelne Verabreichung wurde sie mit NaCl in einer Konzentration 1 mg / 5 ml aufgelöst.

### 2.7.3.1. Versuchsprotokoll

Ausgehend von der von Laboratories Fournier vorgelegten Enzymkinetik von LF 16-0687 bei Mäusen und Ratten (vgl. Abb. 13), und der bereits zur Verfügung stehenden Literatur, haben wir unsere Versuche mit zwei verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen durchgeführt.



**Abb. 13:** Pharmakokinetik von LF 16-0687 bei der Maus und der Ratte für unterschiedliche Konzentrationen; Fournier Research Laboratories, Daix .

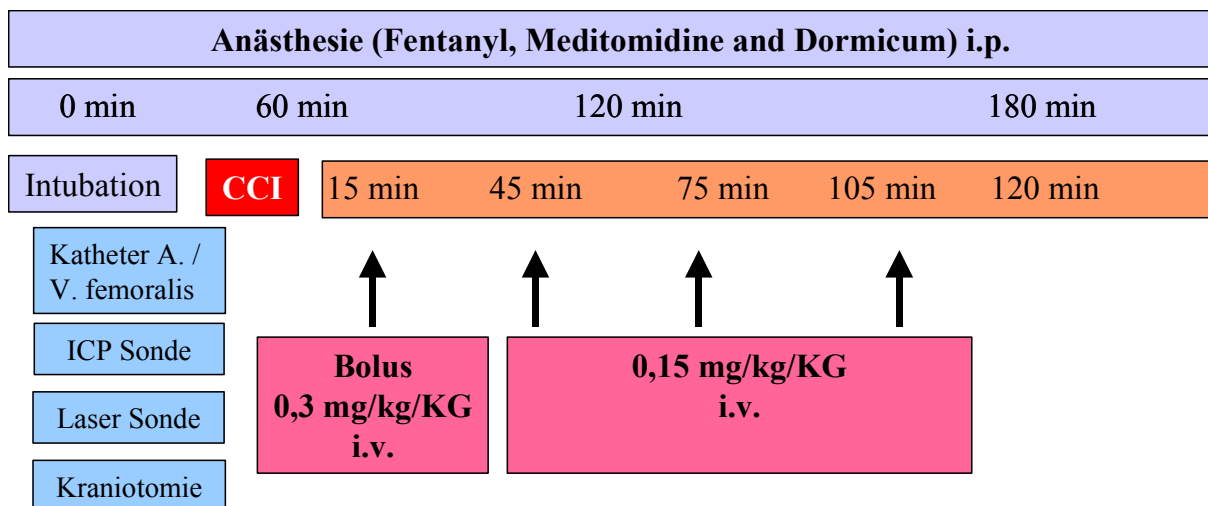
#### 2.7.3.1.1. Therapiegruppe mit 0,3 mg/kg KG LF16-0687

An n = 12 C57/Bl6 Mäuse untersuchten wir den Einfluss von LF 16-0687 Ms. auf den Verlauf des ICP, CBF und des MAP nach CCI Trauma. Dazu wurden die Tiere mit Midazolam, Dormicor und Fentanyl narkotisiert, intubiert und kontrolliert beatmet (vgl. Kap. 2.2.1). Das Trauma wurde über der rechten Hemisphäre appliziert (vgl. Kap. 2.3.). Während der gesamten Beobachtungszeit von 10 Minuten vor und bis zu 120 Minuten post CCI Trauma wurde der ICP, der CBF und der MAP kontinuierlich gemessen (vgl. Kap. 2.5.2.).

Für die Applikation des Pharmakons und zur Messung des MAP und zur Blutgasanalyse wurden Katheter in die linke Arteria und Vena femoralis implantiert. Dazu wurde die intubierte Maus auf dem Rücken gelagert und ein 15 mm langer Hautschnitt in Verlaufsrichtung des Ligamentum inguinale angelegt. Nach stumpfer Präparation stieß man auf die Gefäß-Nervenscheide des Beins. Unter Schonung des Nervus femoralis wurde die A. femoralis von der direkt daneben liegenden V. femoralis gelöst. Ein mikro-Gefäßklipp (*Zen Temporary Clip, No.10-b, Ohwa Tsusho Co. Ltd., Tokyo, Japan*) wurde auf die A. und V. femoralis direkt distal des Lig. inguinale gesetzt. Die Blutversorgung des Beins war damit unterbrochen. Anschließend ligierten wir die A. und V. femoralis circa 8 mm distal des Klipps (*Ethibond Excel 5/0, geflochten Polyester beschichtet, Manufacturer Johnson & Johnson Intl., c/o European Logistics Centre, Brüssel, Belgien*) und koagulierten die in diesem Gebiet abgehenden Aa. und Vv. perforantes. Mit einer Mikroschere wurde die Arterie 0,5 bis 1 mm in Längsrichtung eingeschnitten und ein spitz zugeschnittener Katheter ( *0,61 mm OD, 0,28 mm ID, Portex Non Sterile Polythene Tubing, Sims Portex Ltd., Kent, UK*) in das Gefäß eingeführt und 10 mm vorgeschoben. Mit einer zuvor angelegten Schlinge wurde dieser befestigt und zusätzlich mit einem kleinen Tropfen Histoacryl Gewebekleber fixiert, ohne dabei die direkt daneben verlaufende Vene zu manipulieren. Anschließend wurde die

gestaute Vene ebenfalls mit einem Faden umschlungen und ein spitz zugeschnittener Katheter, ohne vorheriges Einschneiden des Gefäßes, hineingestoichen und 10 mm weit vorgeschoben und in gleicher Weise wie der arterielle Katheter fixiert. Der Gefäßklipp konnte nun entfernt werden. Um einen thrombusbedingten Verschluss der Katheter zu vermeiden, wurden diese vor Implantation mit Heparin benetzt (*Heparin-Natrium 25000 I.E. / 5ml, B. Braun, Melsungen AG, Melsungen, Deutschland*) und anschließend mit 150 µl/ h NaCl Lösung perfundiert (*Digital Infusion Syringe Pumps, SP 100i, World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL, USA*).

15 Minuten nach Trauma wurde intravenös eine initiale Bolusgabe von 0,3 mg/kg KG LF 16-0687 injiziert und diese alle 30 Minuten in einer Dosis von 0,15 mg/kg KG wiederholt. Kontrolltieren wurden die gleichen Volumina NaCl Lösung verabreicht (vgl. Abb. 14).



**Abb. 14:** Versuchprotokoll zur Messung der pharmakologischen Beeinflussbarkeit von ICP, CBF und MAP durch LF 16-0687.

An weiteren 28 C57/Bl6 Mäuse (n=7) wurden der Einfluss von LF 16-0687 Ms. auf das Nekrosevolumen und die Ödementwicklung 24h nach Trauma untersucht.

Zur kontinuierlichen Applikation des Pharmakons wurden den Tieren subcutan zwischen den Schulterblättern Alzet Micropumpen (*Alzet micro-osmotic pump, Model 1003D, DURECT Corporation, Cupertino, CA, USA*) implantiert.

15 Minuten nach Trauma injizierten wir n = 14 Tieren randomisiert einen initialen Bolus von 0,5 mg/kg KG LF 16-0687 s.c. und infundierten anschließend über die implantierten Mikropumpen für 24 Stunden 1 µl/h LF16-0687 in einer Konzentration von 0,25 mg/kg KG. Den Kontrolltieren (n = 14) wurden gleiche Volumina NaCl Lösung verabreicht. 24 Stunden nach Durchführung des Traumas wurde das Nekrosevolumen bzw. das Hirnödem in oben beschriebener Weise bestimmt.

#### 2.7.3.1.2. Therapiegruppe mit 3,0 mg/kg KG LF 16-0687

In einem zweiten Versuchsansatz applizierten wir LF 16-0687 in 10facher Dosis und haben den ICP an 10 Tieren (n=5) in Halothan Kurznarkose 3h, 6h und 10h post CCI in oben beschriebener Technik bestimmt. LF 16-0687 haben wir dabei in einer Konzentration von 3,0 mg/kg KG 15 min. und 8h post CCI Trauma s.c. injiziert. An weiteren 14 Mäusen (n=7) haben wir das Kontusionsvolumen 24h post CCI untersucht.

## 2.8. Statistik

Alle Ergebnisse wurden, wenn nicht anders beschrieben, als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Für den statistischen Vergleich zwischen verschiedenen Gruppen wurde, für normalverteilte Daten, der Student-t-Test und für nicht normalverteilte Daten der Mann-Whitney Rank Sum Test verwendet. Für Untersuchungen über die Zeit wurden der Friedman Repeated Measures ANOVA on the Ranks Test, gefolgt vom Dunnett's All Pairwise Multiple Comparison Procedure als *post hoc* Test verwendet. Alle statistischen Berechnungen wurden mit Sigma Stat 2.0 (*Sigma Stat 2,0, Jandel Scientific, Erkarth, German*) durchgeführt.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1. Narkose

Grundlage für die Validität unserer Versuchsergebnisse war eine adäquate Narkoseführung und die Vermeidung unphysiologischer Vitalparameter. Abgesehen von Einzelfällen konnten wir bei unseren Experimenten keine Mortalität beobachten. Bis zu einer Narkosezeit von 45 Minuten konnten wir mit der Halothan Maskennarkose, bei der die Tiere spontan atmeten, unter physiologischen Blutgaswerten Versuche durchführen (vgl. Abb 15).

<b>Blutgasanalyse 45 Minuten in Halothan Anästhesie</b> (n=6, repräsentativ)				
pH	pO <sub>2</sub> [mmHg]	pCO <sub>2</sub> [mmHg]	Hb Sätt [%]	Laktat [mmol/l]
7,3 +/- 0,03	126,6 +/- 15,6	44,22 +/- 8,94	98,1 +/- 0,48	1,65 +/- 0,77

**Abb.15:** Blutgaswerte 45 Minuten nach Narkosebeginn bei Tieren mit Halothan Maskennarkose.

Bei Anwendung der Intubationsnarkose nach Gabe von Midazolam, Medetomidine und Fentanyl lag der MAP ( $79 \pm 7$  mmHg), der pH Wert ( $7,38 \pm 0,07$ ), sowie der pCO<sub>2</sub> ( $36 \pm 9$  mmHg) und der pO<sub>2</sub> ( $119 \pm 32$  mmHg) der Mäuse im physiologischen Bereich.



Anästhesie für Narkosen > 45 Minuten	Blutgase nach 45 Minuten Anästhesie				Blutgase nach 220 Minuten Anästhesie			
	MAP [mmHg]	pH	pCO <sub>2</sub> [mmHg]	pO <sub>2</sub> [mmHg]	MAP [mmHg]	pH	pCO <sub>2</sub> [mmHg]	pO <sub>2</sub> [mmHg]
Meditomidin	79	7,38	36	119	58	7,14	44	75
Fentanyl	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
Midazolam	7	0,07	9	32	2	0,07	6	9

**Abb. 16:** Blutgaswerte für Langzeitnarkosen 45 Minuten und 220 Minuten nach Narkosebeginn und Applikation von Midazolam, Medetomidin und Fentanyl.

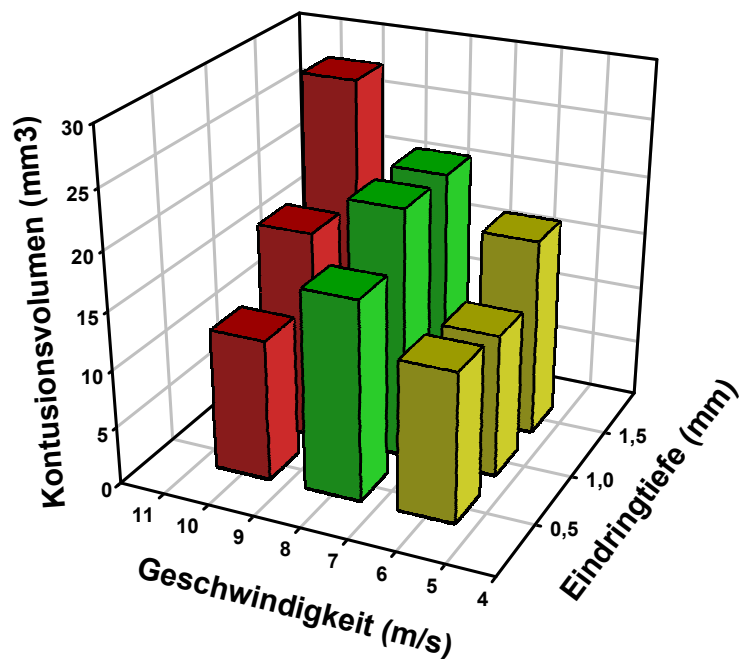
### 3.2. Etablierung des Traumamodells

Mit dem Modell des Controlled Cortical Impact (CCI) gelang es uns reproduzierbare Schädel-Hirntraumata zu erzeugen. Die digital eingestellte Geschwindigkeit von 8,0 m/s wurde bei 15 Probemessungen mit einer Genauigkeit von  $8,01 \pm 0,06$  m/s ( $n = 15$ ) erreicht.

Die Vermessung der Kontusionsgröße bei unterschiedlichen Geschwindigkeiten (6 m/s, 8 m/s und 10 m/s) und Eindringtiefen des Bolzens ins Hirnparenchym (0,5 mm, 1,0 mm und 1,5 mm) 12 Stunden nach CCI Trauma zeigte eine Abhängigkeit zu den gewählten Parametern. Bei geringer Geschwindigkeit mit niedriger Eindringtiefe (6 m/s und 0,5 mm) war der Schaden mit  $12,96 \pm 4,02$  mm<sup>3</sup> nur etwa halb so groß wie bei mittlerer- ( $21,54 \pm 0,04$  mm<sup>3</sup>) und nur ein Drittel so groß wie bei maximaler Schädigung mit 1,5 mm Eindringtiefe und einer Geschwindigkeit von 10 m/s ( $28,33 \pm 2,52$  mm<sup>3</sup>) (vgl. Abb. 17 und 18). Bei  $n = 3$  sham operierten Tieren konnte mikroskopisch kein Gewebeschaden festgestellt werden.

Geschwindigkeit (m/s)	Eindringtiefe (mm)		
	0,5 mm	1,0 mm	1,5 mm
6 m/s	12,96 ± 4,02	12,35 ± 10,23	17,15 ± 6,44
8 m/s	17,25 ± 1,95	21,54 ± 0,04	31,57 ± 10,26
10 m/s	11,40 ± 3,06	18,07 ± 6,55	28,33 ± 2,52

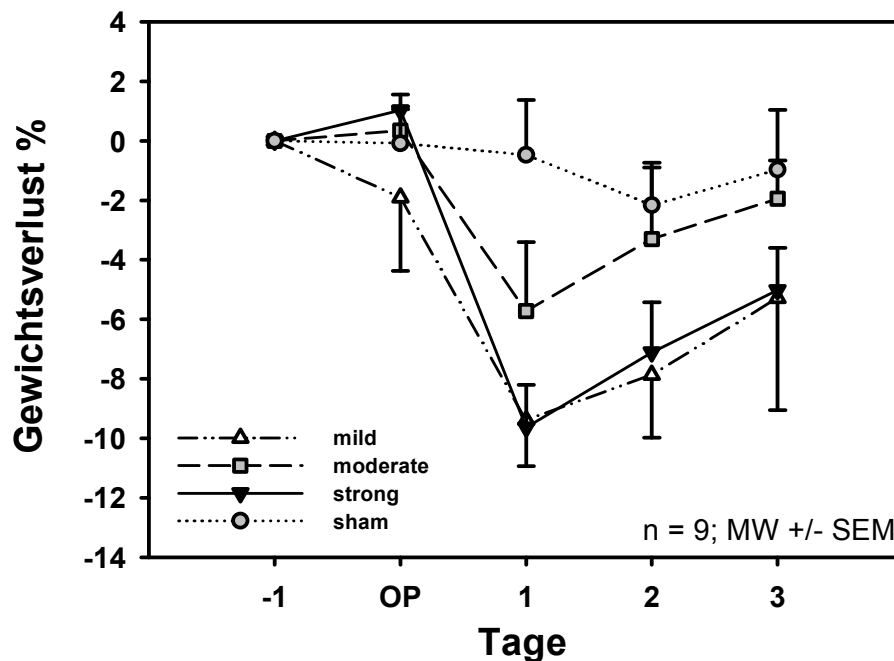
**Abb. 17:** Kontusionsvolumina für unterschiedliche Geschwindigkeiten und Eindringtiefen des Bolzens ins Hirnparenchym 12h post CCI (n=3).



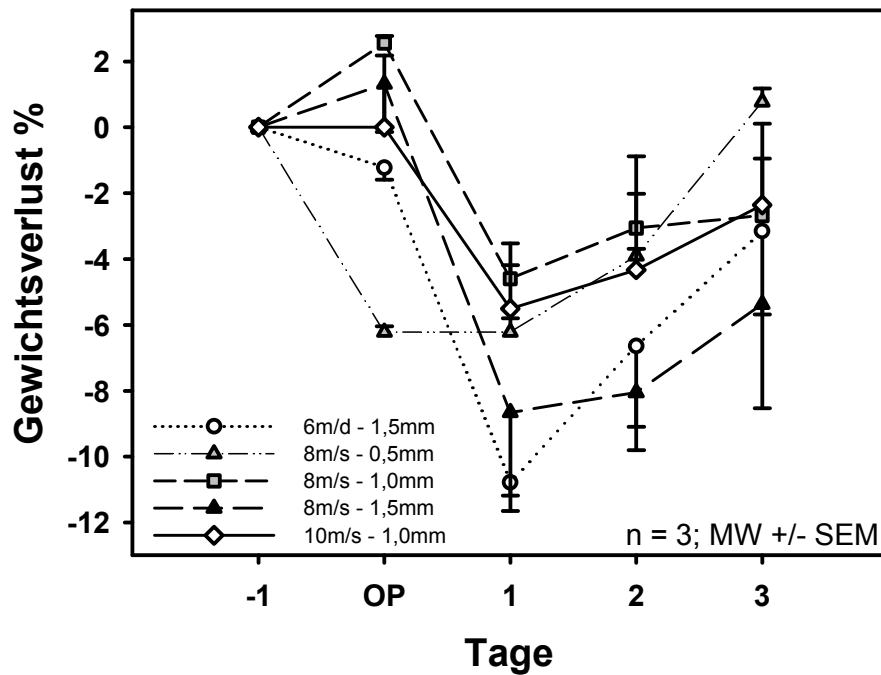
**Abb. 18:** Kontusionvolumina bei unterschiedlichen Geschwindigkeiten und Eindringtiefen des Bolzens ins Hirnparenchym 12h nach experimentellem SHT (n=3).

Bei der perioperativen Kontrolle des Körpergewichtes zeigte sich, dass bei *sham* operierten Tieren kein relevanter Gewichtsverlust festzustellen war ( $-0,47 \pm 3,19\%$ ; 1. post OP Tag; n = 3). Bei traumatisierten Mäusen fiel jedoch, unabhängig von den

jeweiligen Gruppen, ein Gewichtsverlust von bis zu 10% auf (**Abb. 19**). Tiere der *mild* Gruppe zeigten annähernd den gleichen Gewichtsverlust ( $-9,39 \pm 2,60\%$ ;  $n = 9$ ) wie Mäuse, die *strong* traumatisiert wurden ( $-9,62 \pm 3,90\%$ ;  $n = 9$ ). Auch bei der anschließenden Einzelgruppenanalyse, unter Weglassung der Randgruppen mit minimalen und maximalen Traumaparametern, ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen nachweisen (**Abb. 20**).

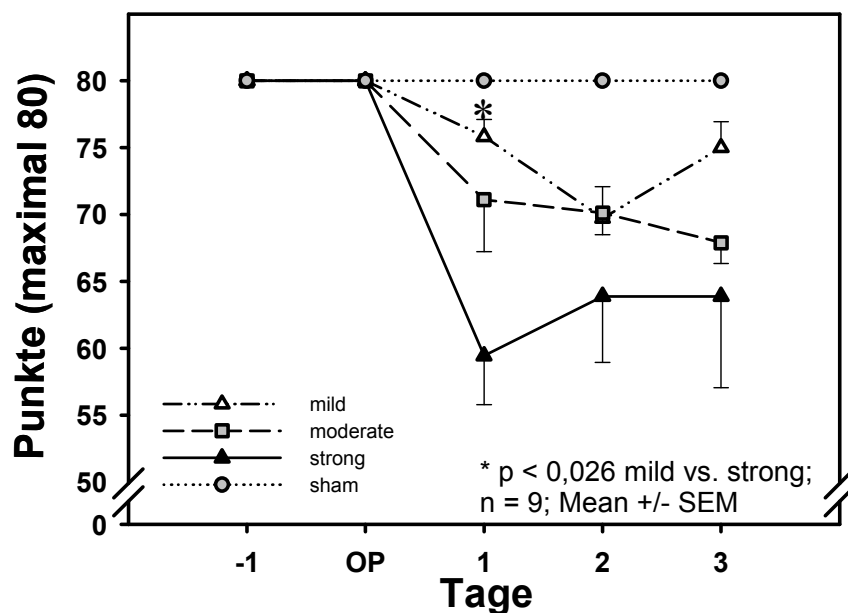


**Abb. 19:** Prozentualer Gewichtsverlauf nach Controlled Cortical Impact Trauma 1 Tag vor und bis zu 3 Tagen nach CCI Trauma.



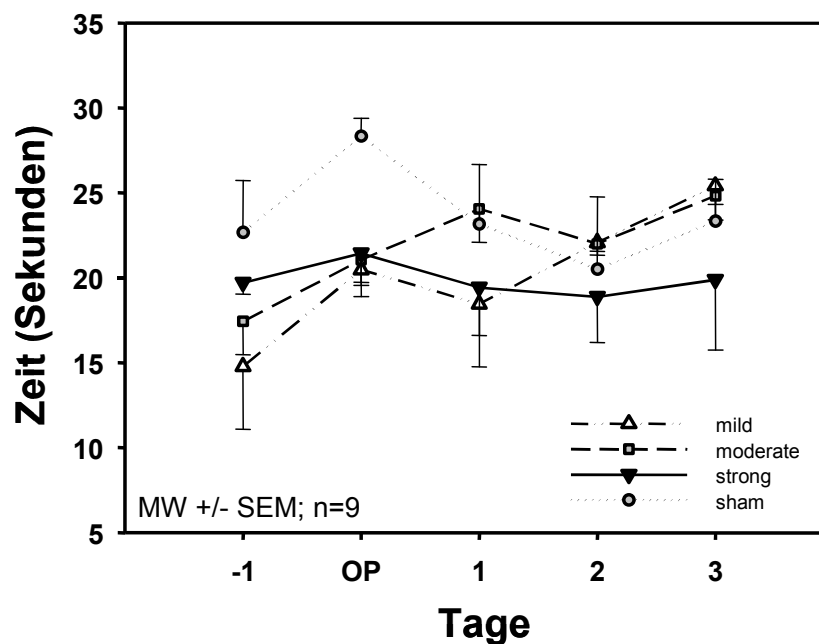
**Abb. 20:** Prozentualer Gewichtsverlauf der Einzeltiergruppen unter Weglassung der extrem gering und stark traumatisierten Gruppen 1 Tag vor und bis zu 3 Tagen post CCI.

Bei der neurologischen Untersuchung der Tiere im Neuroscore zeigten *sham* operierte Kontrolltiere durchgehend einen maximalen Scorewert von 80 Punkten. Bei allen traumatisierten Tieren hingegen fiel der Punktwert bereits am ersten Tag nach CCI Trauma signifikant ab. Am ersten postoperativen Tag war ein signifikanter Unterschied zwischen den *strong* traumatisierten Tieren mit  $59,44 \pm 7,68$  Punkten und den *mild* traumatisierten mit  $75,83 \pm 4,17$  Punkten ( $p=0,026$ ;  $n = 9$ ) festzustellen. An den darauffolgenden beiden Beobachtungstagen ergaben sich jedoch keine weiteren signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen.



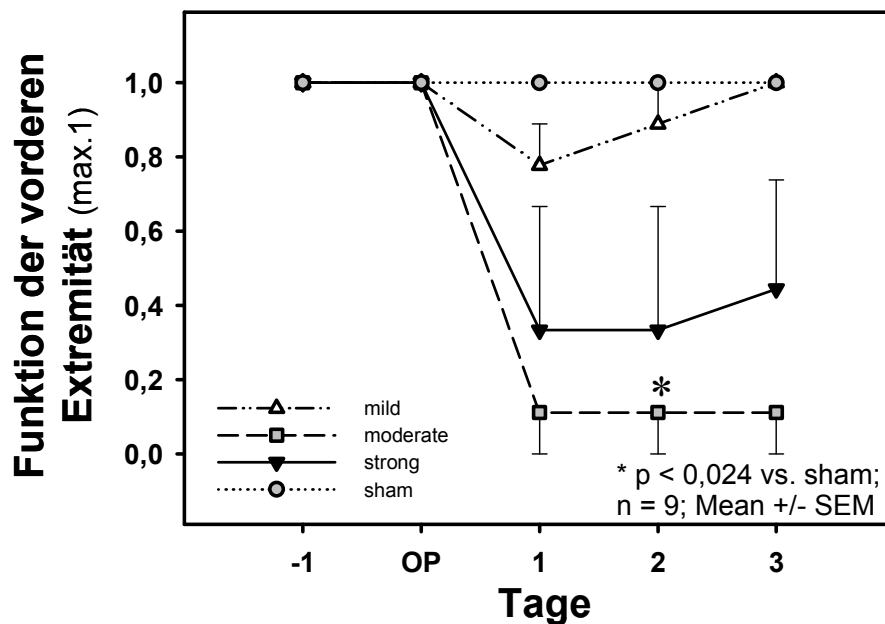
**Abb. 21:** Punkteverteilung beim Neuroscore Test mit einer maximalen Anzahl von 80 1 Tag vor und bis zu 3 Tagen post CCI.

Zur objektiven Quantifizierung der Motorik der vorderen Extremität verwendeten wir den Grasp strength und den Forepaw contraflexion Test. Beim Grasp strength Test konnten wir jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen feststellen. Tiere der *strong* traumatisierten Gruppe zeigten lediglich einen negativen Trend an den Tagen zwei und drei im Vergleich zu den *mild*, *moderate* und *sham* operierten Mäusen ( $19,88 \pm 10,43$  Sekunden vs.  $25,41 \pm 7,30$  und  $24,83 \pm 7,54$  und  $23,33 \pm 6,05$  Sekunden am Tag 3; n = 9). Auffallend war auch die starke Variation der einzelnen Werte vor Traumaapplikation und der stark schwankende Verlauf der Werte der *sham* Gruppe.



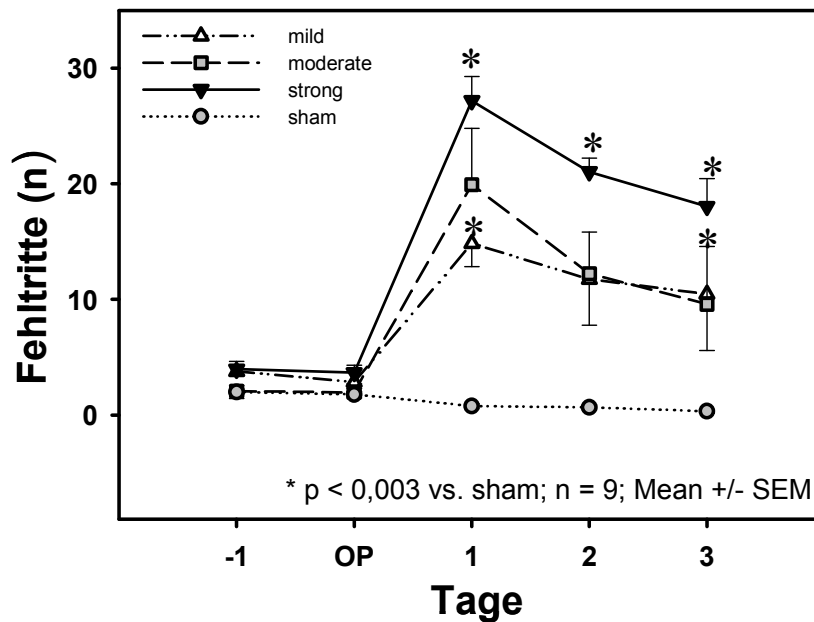
**Abb. 22:** Grasp strength Test: Darstellung der maximalen Zeit (s), die sich die Tiere mit den vorderen Extremitäten an dem Drahtseil halten konnten.

Bei der Prüfung der Streckfunktion der vorderen Extremitäten im Forepaw contraflexion Test zeigten *sham* operierte Tiere keine Beeinträchtigung. *Mild* traumatisierte Tiere zeigten tendenziell eine geringgradige, nicht signifikante Schwäche, die bereits am dritten postoperativen Tag wieder vollständig regeneriert war (1. Tag:  $0,78 \pm 0,19$ ; 2. Tag:  $0,89 \pm 0,19$  und 3. Tag:  $1,00 \pm 0$ ;  $n = 9$ ). Die Gruppen *moderate* und *strong* wiesen tendenziell jedoch erheblich größere Defizite auf. Am zweiten Tag nach Trauma konnte ein singular signifikanter Unterschied zwischen der *moderate* und *sham* Gruppe ( $0,11 \pm 0,19$  vs.  $1,00 \pm 0$ ;  $n = 9$ ;  $p < 0,024$ ) nachgewiesen werden.



**Abb. 23:** Punkteverteilung beim Forepaw contraflexion Test 1 Tag vor und bis zu 3 Tagen nach experimentellem SHT.

Die aussagekräftigsten Ergebnisse bei der Untersuchung der motorischen Funktion und der Motorkoordination erzielten wir mit dem Beam walking Test. Gesunde Tiere zeigten einen Tag vor CCI Trauma  $3,27 \pm 1,24$  ( $n = 30$ ) Fehlritte. Am ersten Tag nach Traumaapplikation wiesen *strong* und *moderate* geschädigte Tiere eine im Vergleich zur *sham* Gruppe signifikant gesteigerte Fehlrittrate der korrespondierenden hinteren Extremität auf ( $19,93 \pm 9,66$  und  $27,18 \pm 7,51$  vs.  $0,77 \pm 0,66$  Fehlritte;  $n = 9$ ;  $p < 0,003$ ). An den Beobachtungstagen zwei und drei zeigten alle drei Gruppen eine nicht signifikante Tendenz zur Verbesserung im Vergleich zum jeweiligen Vortag. Zudem zeigten die *strong* traumatisierten Tiere einen an den Tagen zwei und drei weiterhin bestehenden signifikanten Unterschied zur *sham* Gruppe ( $21,04 \pm 4,09$  vs.  $0,66 \pm 0,71$  und  $18,04 \pm 6,20$  vs.  $0,33 \pm 0,50$  Fehlritte;  $n = 9$ ;  $p < 0,003$ ).

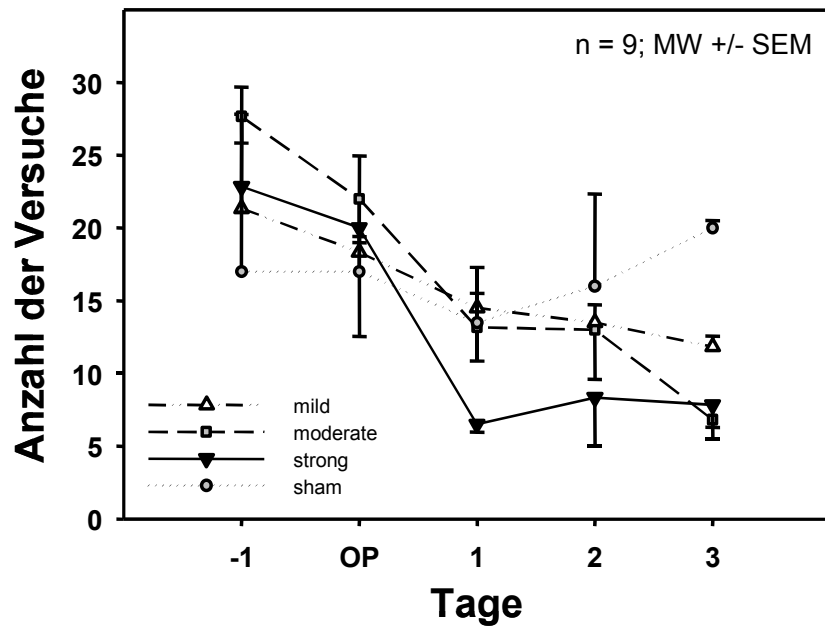


**Abb. 24:** Beam walking Test: Anzahl der Fehlritte 1 Tag vor und bis zu 3 Tagen nach CCI.

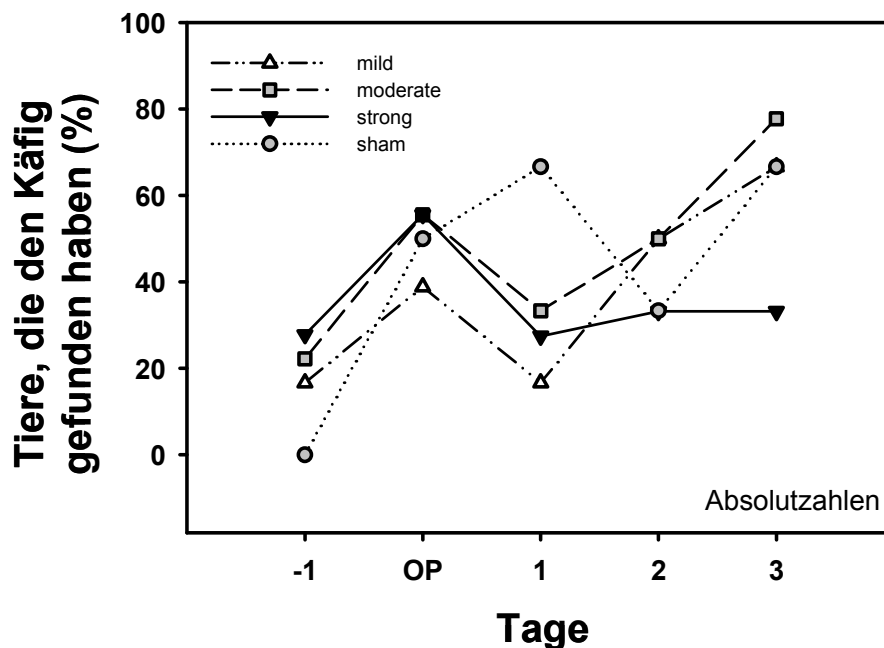
Mit Hilfe des Barnes Maze und des Morris Water maze Test überprüften wir das Zusammenspiel von kognitiver Leistungsfähigkeit, Orientierung und der motorischen Funktion. Beim Barnes Maze war am ersten Versuchstag die Bandbreite der Ergebnisse sehr weit: sie reichte von  $22,83 \pm 12,61$  Fehlversuchen in der *sham* operierten Tiergruppe bis zu  $27,72 \pm 10,77$  Versuchen in der *moderate* traumatisierten Gruppe (n = 9). Bereits am zweiten Versuchstag war ein Trainingseffekt und eine tendenzielle Annäherung der Werte festzustellen. Auch nach Trauma nahm die Anzahl der Fehlversuche weiter ab. Ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen war jedoch nicht nachweisbar. *Sham* operierte Tiere zeigten am dritten Tag post OP mit  $15,16 \pm 12,86$  deutlich mehr Fehlversuche als *moderate* oder *strong* traumatisierte Mäuse ( $7,55 \pm 4,92$  und  $7,16 \pm 8,74$ ; p = 0,32; n = 9). Auffällig war jedoch, dass die prozentuale Anzahl der Tiere, die innerhalb des Beobachtungszeitraums von 5 Minuten den Käfig gefunden haben, vom ersten auf den zweiten Tag tendenziell zugenommen hat. Nach CCI Trauma zeigte sich eine im Vergleich zur *sham* Gruppe nicht signifikante Abnahme der



prozentualen Anzahl in den traumatisierten Tiergruppen. Abgesehen von *strong* traumatisierten Mäusen (mit nur 33%) haben am dritten post OPTag 66% der *mild* und *sham* traumatisierten Mäuse und 77% der *moderate* geschädigten Tiere innerhalb von 5 Minuten den Käfig gefunden.



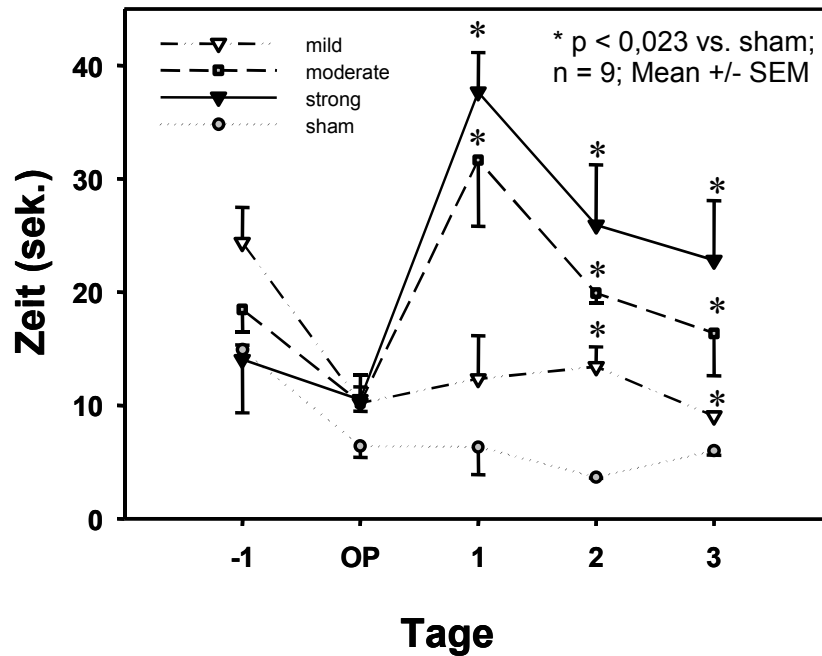
**Abb. 25:** Barnes ciculare Maze: Anzahl der Versuche bis die Tiere den versteckten Käfig gefunden haben 1 Tag vor und bis zu 3 Tage post CCI.



**Abb. 26:** Barnes Maze: Prozentuale Darstellung der erfolgreichen Mäuse, die innerhalb der vorgegebenen Zeit den Käfig gefunden haben.

Auch beim Morris water Maze Test reichte die Bandbreite der Ergebnisse am ersten Versuchstag von  $14,06 \pm 13,72$  Sekunden (*strong*) bis  $24,39 \pm 22,12$  Sekunden (*mild*) ( $n = 9$ ) und hat sich, auf Grund des Trainingseffekts, bereits am zweiten Versuchstag deutlich konzentriert ( $6,41 \pm 2,64$  Sekunden bei *sham* Tieren vs.  $10,50 \pm 11,63$  Sekunden bei *strong* traumatisierten Mäusen,  $n = 9$ ). *Sham* operierte Tiere zeigten mit  $6,33 \pm 4,85$  Sekunden an Tag 1 und mit  $6,0 \pm 3,49$  Sekunden an Tag 3 nach Trauma konstante Werte. Am ersten Tag nach CCI haben *moderate* und *strong* traumatisierte Mäuse signifikant länger gebraucht die Plattform zu erreichen als *sham* operierte Tiere ( $31,67 \pm 21,97$  Sekunden. und  $37,67 \pm 20,93$  Sekunden vs.  $6,33 \pm 4,85$  Sekunden;  $n = 9$ ;  $p < 0,033$ ). An den darauffolgenden Beobachtungstagen haben sich traumatisierte Tiere deutlich verbessert, wiesen jedoch sowohl an den Tagen 2 und 3 nach CCI Trauma im Vergleich zur *sham* Gruppe signifikant erhöhte

Werte auf. Im Vergleich der unterschiedlichen Traumagruppen miteinander zeigten sich jedoch nur ein tendenzielle Unterschiede.

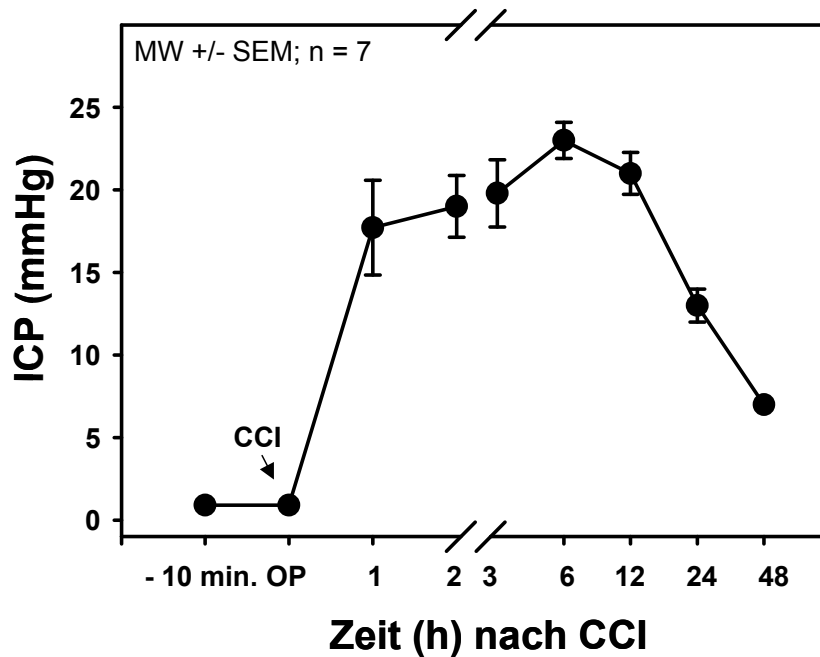


**Abb. 27:** Morris water Maze Test: Angabe der Zeit (s) bis die Mäuse die versteckte Plattform gefunden haben 1 Tag vor und bis zu 3 Tagen post CCI.

### **3.3. Pathophysiologische Veränderungen nach experimentellem Schädel-Hirntrauma (CCI)**

#### 3.3.1. Anstieg des intrakraniellen Drucks

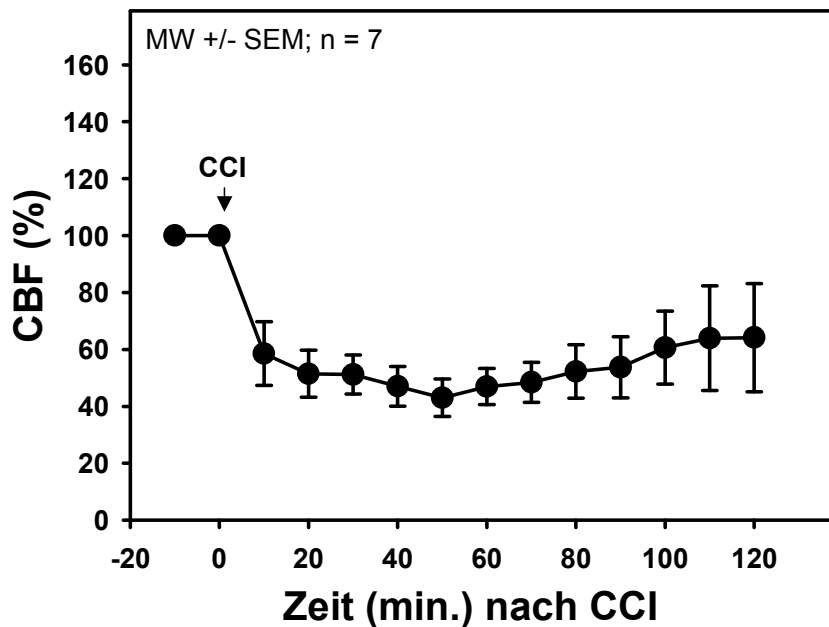
Die Messung des physiologischen intrakraniellen Drucks 10 Minuten vor Applikation des experimentellen SHT erbrachte bei pro Minute wiederholten Messungen durchschnittliche Werte von  $1,05 \pm 0,89$  mmHg. Die Werte wiesen dabei eine Bandbreite von  $0,83 \pm 0,75$  mmHg bis  $1,28 \pm 1,25$  mmHg ( $n = 7$ ) auf. Nach Controlled Cortical Impact Trauma stieg der ICP der Mäuse bereits innerhalb der ersten 10 Minuten auf  $6,57 \pm 2,82$  mmHg ( $n = 7$ ) an. Nach 30 Minuten erreichte er einen Wert von  $14,86 \pm 8,62$  mmHg, nach 60 Minuten  $17,71 \pm 7,59$  mmHg und nach 120 Minuten einen Wert von  $19,0 \pm 4,18$  mmHg. Sein Maximum erreichte der intrakranielle Druck mit  $23,0 \pm 2,45$  mmHg 6 Stunden nach Durchführung des Traumas. Bereits 12 Stunden nach CCI begann der ICP wieder langsam zu sinken ( $21,0 \pm 2,83$  mmHg;  $n = 7$ ) und hatte 24 Stunden nach Trauma einen Wert von nur noch  $13,1 \pm 2,24$  mmHg erreicht.



**Abb. 28:** Intrakranieller Druck 10 Minuten vor und bis zu 48 Stunden nach CCI Trauma bei nicht kraniektomierten Tieren. Die ICP Sonde lag dabei in der traumatisierten Hemisphäre rostral der Kontusion.

### 3.3.2. Abfall der cerebralen Durchblutung

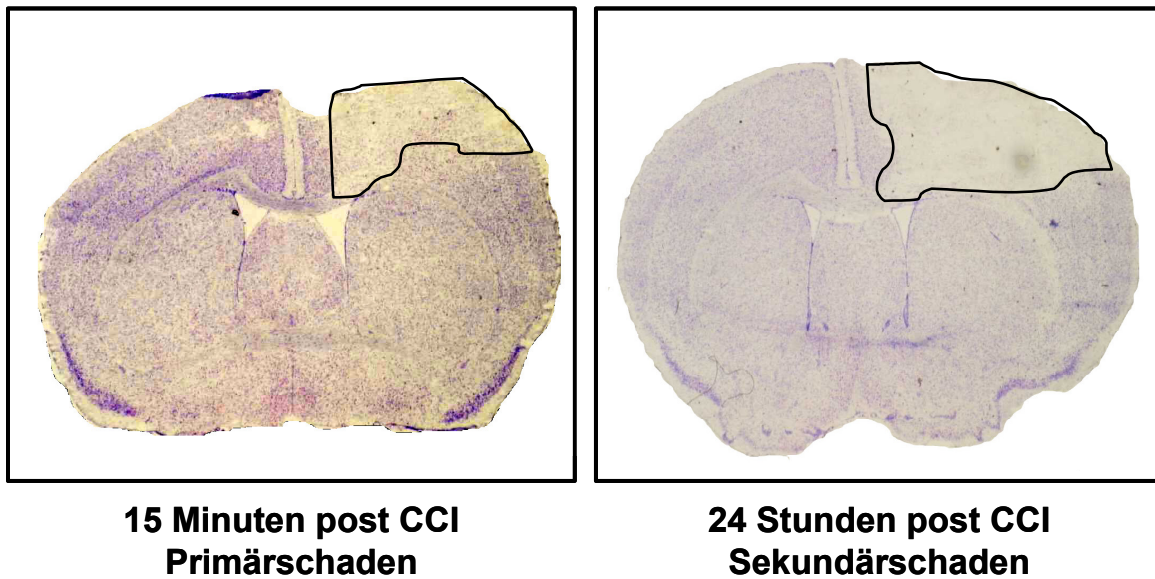
Parallel zur Aufzeichnung des intrakraniellen Drucks haben wir über der kontralateralen Hemisphäre kontinuierlich die cerebrale Durchblutung gemessen. Die jeweilig erreichten Ausgangswerte vor Applikation des Traumas haben wir als 100% angenommen. Unmittelbar nach CCI ist der CBF der kontralateralen Seite von 100% auf  $58,55 \pm 29,56\%$  (10 min post CCI;  $n = 7$ ) abgefallen. Im weiteren Beobachtungszeitraum hat die CBF weiter kontinuierlich abgenommen und seinen niedrigsten Wert mit  $43,01 \pm 17,54\%$  50 Minuten nach Traumaapplikation erreicht. Nach einer Beobachtungszeit von 120 Minuten lag sie bei  $64,14 \pm 37,96\%$  des Ausgangswerts.



**Abb. 29:** Lokale cerebrale Durchblutung über der kontralateralen Hemisphäre 10 Minuten vor und bis zu 120 Minuten nach CCI Trauma bei nicht-kraniektomierten Tieren.

### 3.3.3. Bestimmung der Kontusionsvolumina

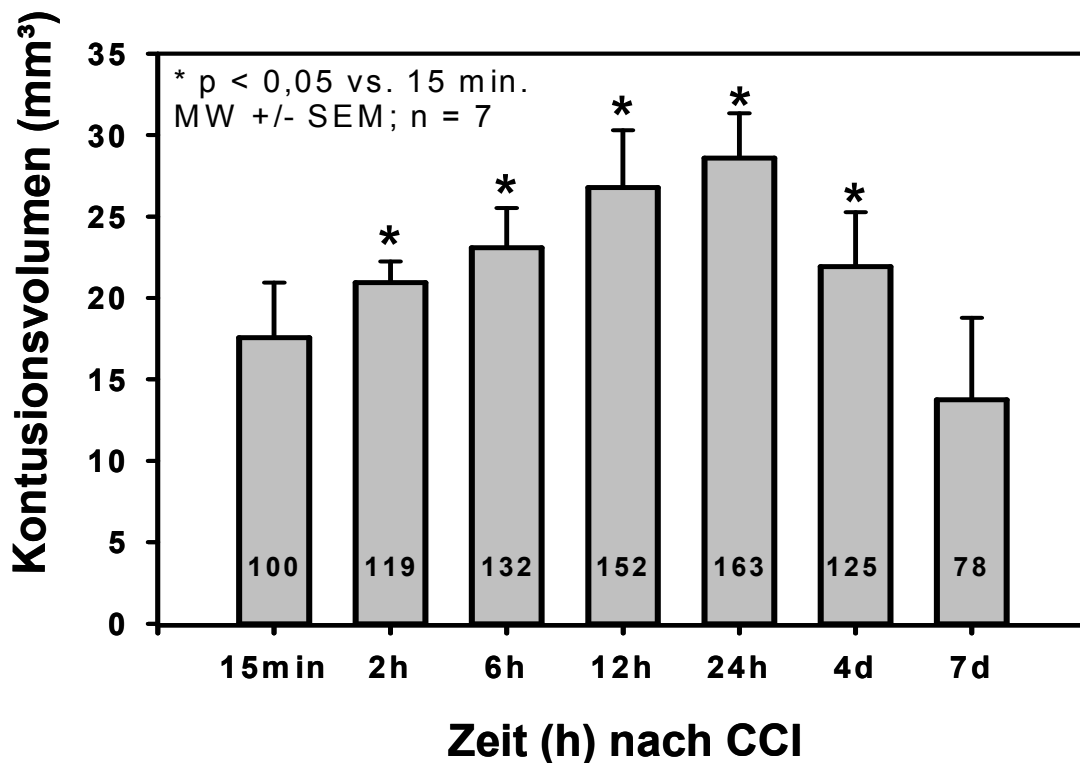
Das Nekrosevolumen unmittelbar nach Applikation des Controlled Cortical Impact Traumas belief sich auf  $21,28 \pm 4,06 \text{ mm}^3$  (15 min. post CCI; n = 7). Dieser Wert entspricht dem primären Hirnschaden, der direkt durch die mechanische Kraft des Traumas verursacht wurde. Innerhalb eines Zeitraums von 24 Stunden hat sich das Kontusionsvolumen durch sekundäre Schädigungsmechanismen um  $8,86 \text{ mm}^3$  signifikant auf  $30,14 \pm 8,49 \text{ mm}^3$  vergrößert ( $p < 0,029$ ; n = 7). Auf der kontralateralen Hemisphäre war weder makro-, noch mikroskopisch ein Parenchymschaden festzustellen.



**Abb. 30:** Fotografische Abbildung Nissl gefärbter Gefrierschnitte 15 Minuten und 24 Stunden nach CCI Trauma nicht-kraniektomierter Mäuse. Das nekrotische Gewebe demarkiert sich deutlich vom ungeschädigten Parenchym.

### 3.3.4. Entwicklung des Nekrosevolumens über die Zeit

Um den zeitlichen Verlauf des Nekrosewachstums quantifizieren zu können, haben wir die Kontusionsvolumina zu unterschiedlichen Zeitpunkten von 15 Minuten bis zu 7 Tagen nach CCI Trauma bestimmt. Dabei haben wir festgestellt, dass das Nekrosevolumen innerhalb der ersten 24 Stunden signifikant zum Primärschaden 15 Minuten nach Traumaapplikation ( $17,56 \pm 3,38 \text{ mm}^3$ ;  $n = 7$ ) zugenommen hat. Bereits nach 2 Stunden betrug das Nekrosevolumen  $20,93 \pm 1,29 \text{ mm}^3$ , nach 6 Stunden  $23,09 \pm 2,43 \text{ mm}^3$  und nach 12 Stunden  $26,78 \pm 3,52 \text{ mm}^3$ . Das Kontusionsvolumen erreichte 24 Stunden nach Controlled Cortical Impact Trauma mit  $28,59 \pm 2,74 \text{ mm}^3$  ( $n = 7$ ) sein Maximum, bevor es auf Grund von Abbauprozessen der Nekrose wieder kleiner wurde und nach 4 Tagen nur noch  $21,93 \pm 3,34 \text{ mm}^3$  ( $n = 7$ ) betrug.



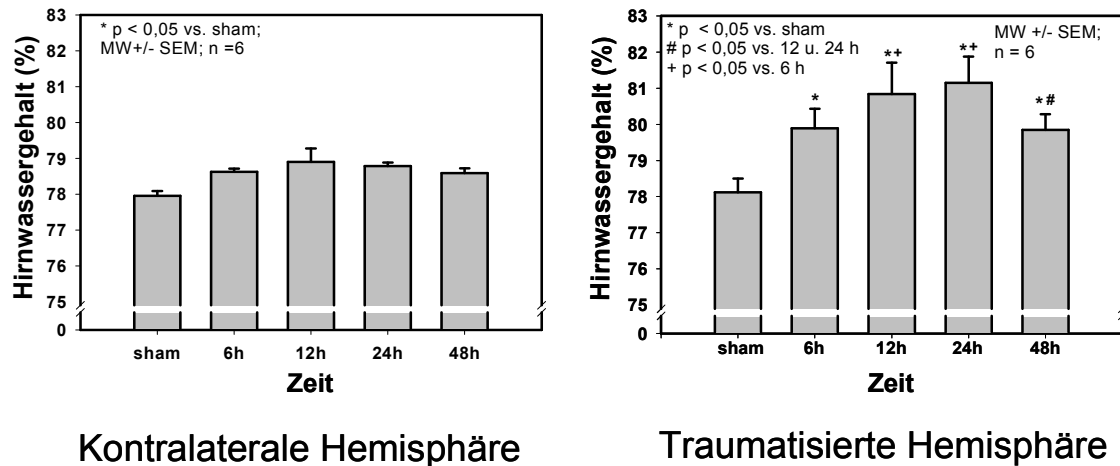
**Abb. 31:** Kontusionsvolumina zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach CCI Trauma nicht-kraniektomierter Mäuse von 15 Minuten bis zu 7 Tagen nach Schädel- Hirntrauma.

### 3.3.5. Bestimmung des Wassergehalts des Hirngewebes

Parallel zum Verlauf des Nekrosewachstums haben wir den Wassergehalt des Hirnparenchyms beider Hemisphären bestimmt. Bei *sham* operierten Tieren zeigte sich 12 Stunden nach experimentellem SHT zwischen beiden Hemisphären kein signifikanter Unterschied des Wassergehalts ( $77,95 \pm 0,33\%$  links vs.  $78,12 \pm 0,39\%$  rechts;  $n = 6$ ;  $p > 0,05$ ). Er entsprach auf beiden Seiten physiologischen Werten nativer Tiere ( $78,02 \pm 0,19\%$ ;  $n = 4$ ). Bereits 6 Stunden nach Controlled Cortical Impact Trauma hat der Wassergehalt der traumatisierten Hemisphäre hoch signifikant zugenommen ( $79,89 \pm 0,54\%$ ;  $p < 0,001$ ;  $n = 6$ ) und erreichte 24 Stunden nach Traumaapplikation mit  $81,15 \pm 0,73\%$  ( $p < 0,001$ ;  $n=6$ ) sein Maximum. Zum gleichen Zeitpunkt konnten wir histologisch auch ein maximales, ödemkorrigiertes



Nekrosevolumen nachweisen (vgl. Kap. 3.3.4). Auf der nicht- traumatisierten kontralateralen Hemisphäre haben wir einen minimalen, nicht signifikanten Anstieg des Wassergehalts des Hirngewebes feststellen können, der 12 Stunden nach Trauma am stärksten ausgeprägt war ( $78,89 \pm 0,92\%$  vs. sham;  $p > 0,05$ ;  $n = 6$ ).



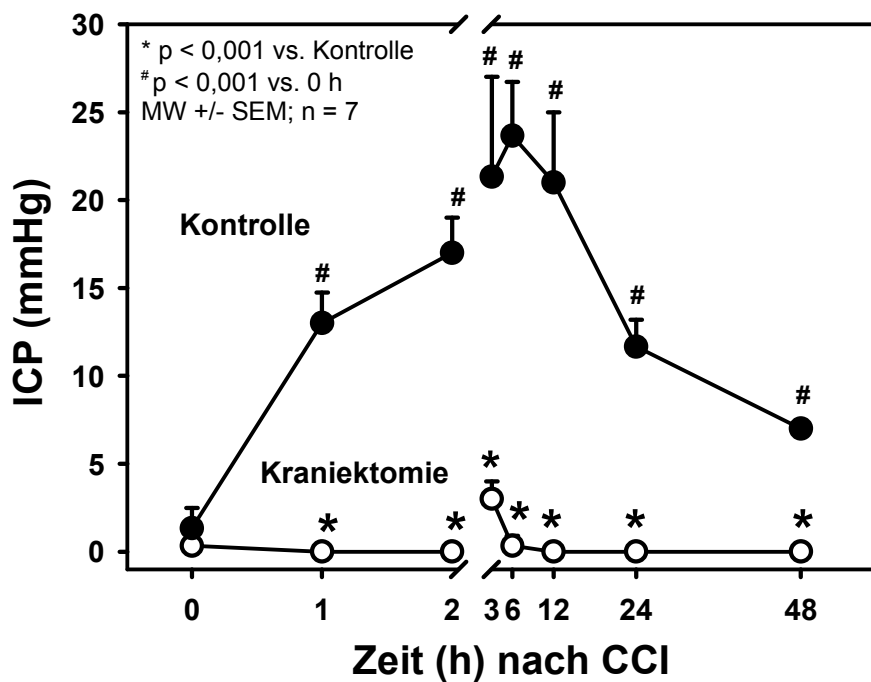
**Abb: 32:** Hirnwassergehalt der kontralateralen (linke) und der traumatisierten (rechte) Hemisphäre zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach CCI Trauma im Vergleich zu sham operierten Mäusen. Für die Untersuchungen wurde die Feucht-Trockengewichts Methode verwendet.

### 3.4. Einfluss der Entlastungskraniektomie auf die pathophysiologischen Veränderungen nach CCI Trauma

#### 3.4.1. Einfluss der Entlastungskraniektomie auf den ICP

Mäuse mit geschlossener Schädelkalotte wiesen vor der Durchführung des Controlled Cortical Impact Traumas einen durchschnittlichen ICP Wert von  $0,58 \pm 0,79$  mmHg ( $n = 14$ ) auf. Die kontinuierliche Messung des ICP über 120 Minuten nach CCI zeigte, dass durch eine unmittelbar nach Traumaapplikation durchgeführte Entlastungskraniektomie der Anstieg des intrakraniellen Drucks nach CCI Trauma vollständig verhindert werden konnte ( $0,0 \pm 0,0$  mmHg vs.  $19,0 \pm 4,18$  mmHg;  $p < 0,001$ ;  $n = 7$ ). Seinen höchsten Wert erreichte der intrakranielle Druck bei

kraniektomierten Mäusen 3 Stunden post CCI ( $2,6 \pm 0,89$  mmHg vs.  $23,0 \pm 2,45$  mmHg bei nicht kraniektomierten Tieren;  $p < 0,001$ ;  $n = 7$ ). Hiermit konnten wir zeigen, dass durch eine Entlastungskraniektomie der Anstieg des intrakraniellen Drucks nach Controlled Cortical Impact Trauma vollständig verhindert werden konnte.

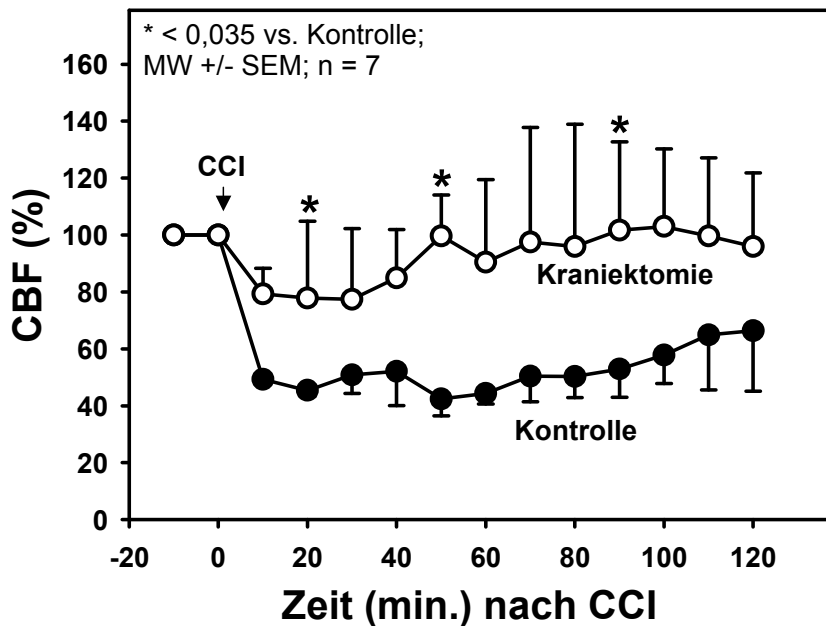


**Abb. 33:** Verlauf des intrakraniellen Drucks kraniektomierter und nicht-kraniektomierter Mäuse nach CCI Trauma bis zu 48 Stunden nach Trauma.

### 3.4.2. Einfluss der Kraniektomie auf die cerebrale Durchblutung

Einen signifikanten Effekt der Entlastungskraniektomie sahen wir auch auf die cerebrale Durchblutung der kontralateralen Hemisphäre. Bei Tieren, bei denen unmittelbar nach Traumaapplikation eine Entlastungskraniektomie durchgeführt wurde, fiel der CBF 20 Minuten nach CCI auf nur  $89,75 \pm 33,72\%$  des Ausgangswerts ab (vs.  $51,45 \pm 21,86\%$ ;  $p = 0,035$ ;  $n = 7$  bei Tieren ohne Kraniektomie). Im Gegensatz dazu erholte sich die cerebrale Durchblutung bei

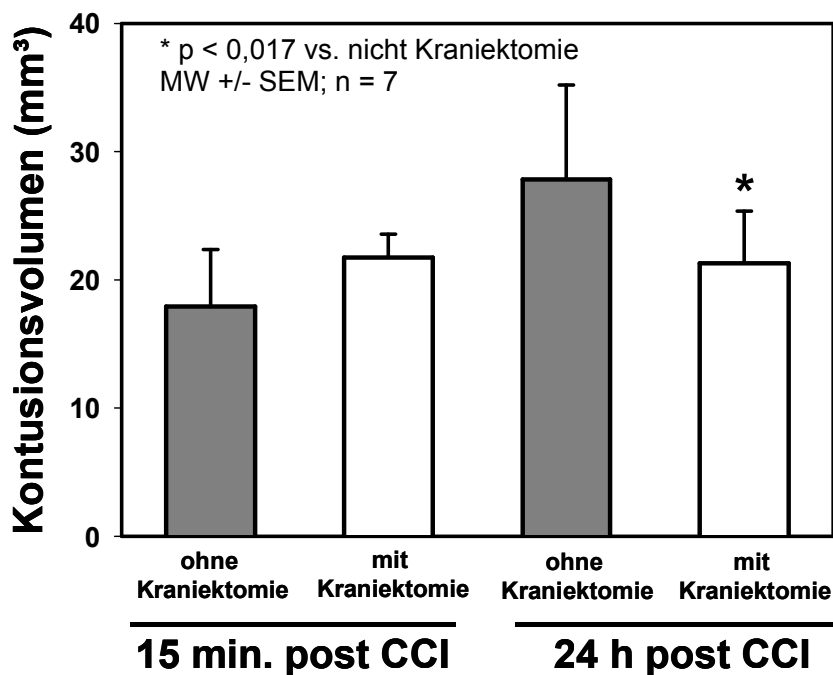
kraniektomierten Mäusen deutlich rascher und erreichte bereits nach einer Stunde wieder das Niveau des Ausgangswerts ( $103,42 \pm 36,03\%$  vs.  $46,96 \pm 16,79\%$ ;  $p = 0,003$ ;  $n = 7$ ). Im darauffolgenden Beobachtungszeitraum von weiteren 60 Minuten stieg die Durchblutung über die des Ausgangswerts an und erreichte 80 Minuten nach experimentellem SHT ihr Maximum mit  $117,17 \pm 48,73\%$  (vs.  $52,24 \pm 22,90$  bei nicht kraniektomierten Mäusen;  $p = 0,009$ ;  $n = 7$ ). Somit konnten wir nachweisen, dass auch der Abfall der cerebralen Durchblutung nach CCI Trauma durch eine unmittelbar nach Traumaapplikation durchgeführte Entlastungskraniektomie deutlich reduziert werden konnte.



**Abb. 34:** Cerebrale Druchblutung der kontralateralen Hemisphäre 10 Minuten vor und bis zu 120 Minuten nach CCI Trauma bei kraniektomierten Mäusen und nicht- kraniektomierten Kontrolltieren.

### 3.4.3. Einfluss der Kraniektomie auf das sekundäre Nekrosewachstum

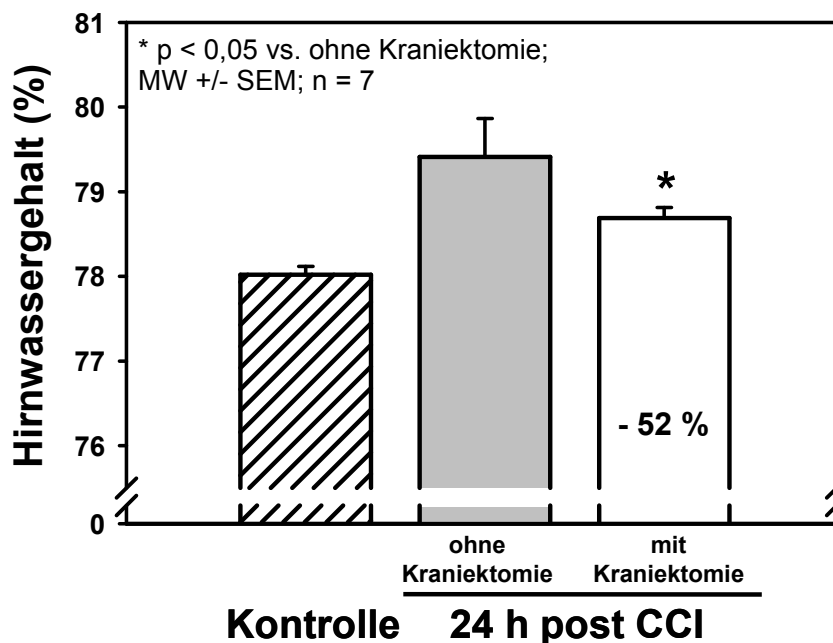
Unsere Ergebnisse zeigen, dass durch die Durchführung einer Entlastungskraniektomie die Ausbildung des sekundären Hirnschadens nach CCI Trauma komplett verhindert werden konnte. Kraniektomierte Tiere wiesen 24h post CCI ein Kontusionsvolumen auf, das dem des Primärschadens 15 Minuten nach Trauma entspricht; im Gegensatz dazu zeigten nicht- kraniektomierte Tieren eine signifikante Größenzunahme der Nekrose ( $18,26 \pm 5,33 \text{ mm}^3$  vs.  $28,59 \pm 2,75$ ;  $p < 0,017$ ;  $n = 7$ ).



**Abb. 35:** Darstellung der Nekrosevolumina 15 Minuten und 24 Stunden nach CCI Trauma bei kraniektomierten und nicht- kraniektomierten Mäusen.

### 3.4.4. Einfluss der Entlastungskraniektomie auf die Entstehung des Hirnödems

Nach Controlled Cortical Impact Trauma ist der Hirnwassergehalt beider Hemisphären innerhalb von 24 Stunden von physiologischen Ausgangswerten ( $78,02 \pm 0,12\%$ ) signifikant auf  $79,41 \pm 0,45\%$  ( $p < 0,02$ ;  $n = 7$ ) angestiegen. Durch eine unmittelbar nach Traumaapplikation durchgeführte Entlastungskraniektomie konnte die Ödementwicklung um  $-52\%$  signifikant reduziert werden; kraniektomierte Tiere zeigten 24 Stunden nach CCI ein Hirnwassergehalt von  $78,69 \pm 0,32\%$  ( $p < 0,011$ ;  $n = 7$ ).

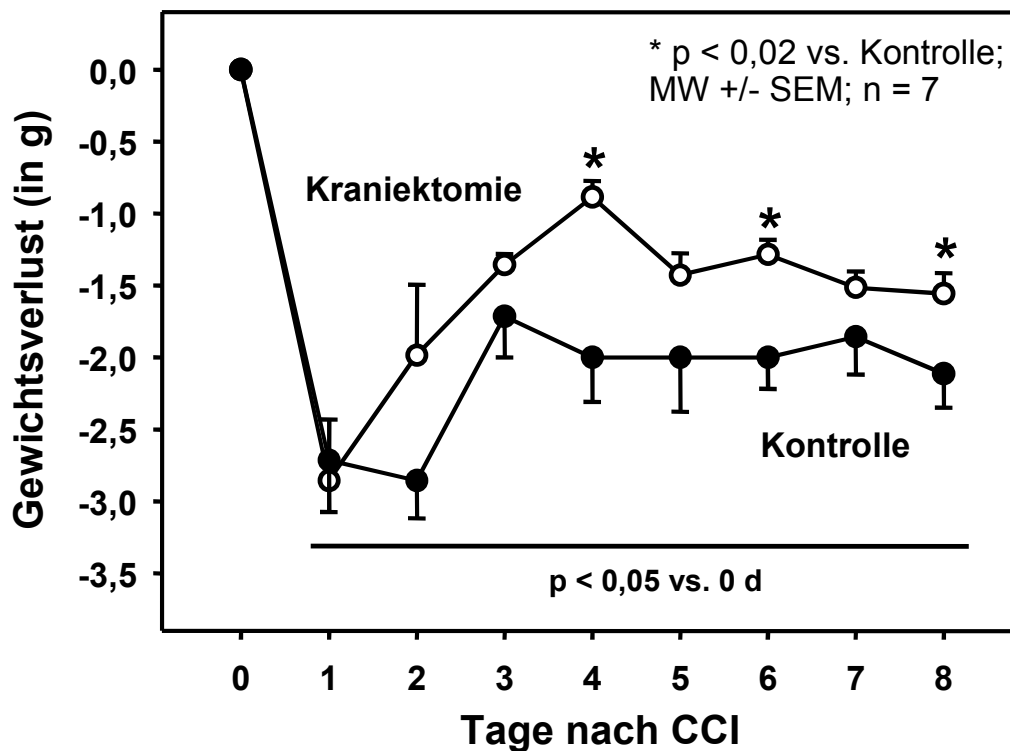


**Abb. 36:** Prozentuale Darstellung des Hirnwassergehalts 24 Stunden nach CCI Trauma kraniektomierter und nicht- kraniektomierter Mäuse. Das Parenchym beider Hemisphären wurde gemeinsam untersucht.

### 3.4.5. Einfluss der Entlastungskraniektomie auf das neurologische Outcome

#### 3.4.5.1. Der Verlauf des Körpergewichtes

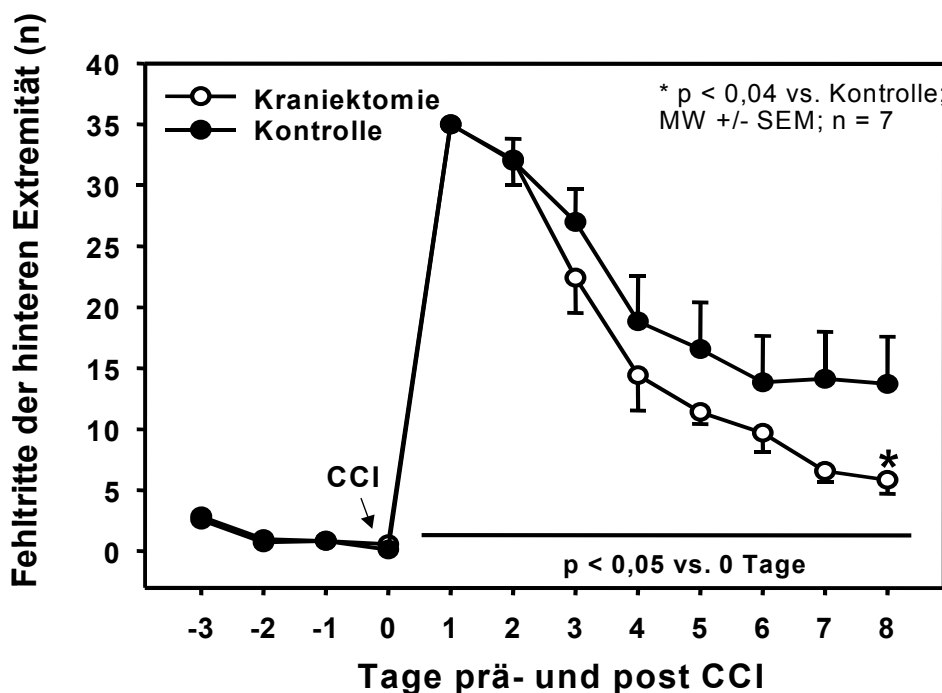
Nach Durchführung des Traumas fiel das Körpergewicht der Tiere sowohl in der Gruppe mit, als auch in der Gruppe ohne Kraniektomie am ersten Tag um signifikante 11% ab ( $89,3 \pm 5,19\%$  und  $89,0 \pm 4,5\%$  vs.  $100\%$ ;  $n = 7$ ;  $p < 0,05$ ). Ab dem zweiten Tag nach Traumaapplikation erholten sich kraniektomierte Tiere tendenziell schneller und besser. Bereits am vierten Tag nach CCI zeigten beide Gruppen einen signifikanten Unterschied zueinander ( $96,6 \pm 1,1\%$  vs.  $94,1 \pm 7,41\%$ ;  $n = 7$ ;  $p < 0,02$ ), der auch an den weiteren Beobachtungstagen 5 bis 8 nachzuweisen war. Unsere Ergebnisse zeigen somit eindrucksvoll, dass eine unmittelbar nach CCI Trauma durchgeführte Entlastungskraniektomie die allgemeine Erholung der Tiere signifikant beschleunigt.



**Abb. 37:** Gewichtsverlauf kraniektomierter und nicht- kraniektomierter Mäuse 1 Tag vor und bis zu 8 Tagen nach CCI Trauma.

### 3.4.5.2. Ergebnisse beim Beam walking Test

Im Beam walking Test wurde die motorische Funktion und die Motorkoordination der Tiere getestet. Sowohl bei kraniektomierten Tieren, als auch bei Mäusen ohne Entlastungskraniektomie zeigte sich, im Vergleich zu gesunden Tieren, in einem Beobachtungszeitraum von 8 Tagen nach Traumaapplikation ein signifikantes Defizit der motorischen Funktion der hinteren Extremität ( $p < 0,05$ ;  $n = 14$ ). Nach Trauma ist die Anzahl der Fehlritte der hinteren korrespondierenden Extremität von  $0,65 \pm 0,37$  auf  $35,0 \pm 0,00$  angestiegen (die Tiere konnten den Balken am ersten Tag nach CCI nicht überqueren). In den darauffolgenden Tagen erholten sich Mäuse ohne Kraniektomie von  $32,08 \pm 5,17$  auf  $15,92 \pm 10,84$  Fehlritte und verblieben bei diesem Wert bis zum Ende des Beobachtungszeitraums. Kraniektomierte Tiere hingegen erholten sich tendenziell schneller und verbesserten sich bis einschließlich des 8 Beobachtungstages kontinuierlich. Am achten Tag nach CCI Trauma zeigten kraniektomierte Mäuse signifikant weniger Fehlritte als Tiere ohne Therapie ( $6,21 \pm 2,94$  Fehlritte vs.  $13,66 \pm 11,27$  Fehlritte;  $n = 7$ ;  $p < 0,04$ ).



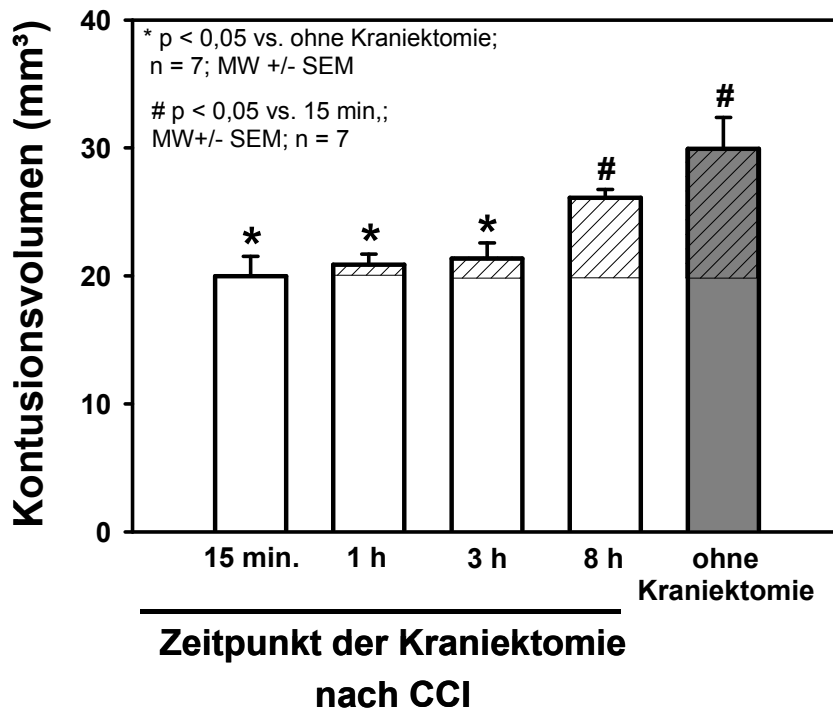
**Abb. 38:** Beam walking Test: Darstellung der Fehlritte kraniektomierter und nicht-kraniektomierter Tiere 3 Tage vor und bis zu 8 Tagen nach CCI Trauma.

### 3.4.6. Das therapeutische Fenster der Entlastungskraniektomie

Nachdem wir zeigen konnten, dass durch eine unmittelbar nach Trauma durchgeführte Entlastungskraniektomie in unserem experimentellen Modell das sekundäre Nekrosewachstum vollständig verhindert werden konnte und die Tiere neurologisch ein signifikant besseres Outcome aufwiesen, haben wir das therapeutische Fenster der Entlastungskraniektomie genauer untersucht.

Dazu wurde die Entlastungskraniektomie zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach CCI durchgeführt. Bei Tieren, bei denen unmittelbar nach Trauma eine Kraniektomie durchgeführt wurde, belief sich das Nekrosevolumen 24 h post CCI auf  $19,99 \pm 4,05 \text{ mm}^3$ . Dies entspricht dem Primärschaden nach experimentellem Schädel- Hirntrauma. Tiere ohne Therapie zeigten 24 Stunden nach Trauma ein signifikant vergrößertes Kontusionsvolumen von  $29,94 \pm 6,44 \text{ mm}^3$  (vs.  $19,99 \pm 4,05 \text{ mm}^3$ ;  $n = 7$ ;  $p < 0,05$ ). Bei diesen Tieren konnte sich der Sekundärschaden ungehindert ausbilden. Wurde die Entlastungskraniektomie nach Trauma um 1 oder 3 Stunden verzögert, so zeigte sich 24 Stunden nach CCI nur ein minimales sekundäres Nekrosewachstum, das signifikant kleiner war als in der Kontrollgruppe ohne Kraniektomie ( $20,86 \pm 2,22 \text{ mm}^3$  und  $21,35 \pm 3,27 \text{ mm}^3$  vs.  $29,94 \pm 6,44 \text{ mm}^3$ ;  $n = 7$ ;  $p < 0,05$ ). Wurde die Kraniektomie jedoch um 8 Stunden verzögert, hat das sekundäre Nekrosewachstum signifikant zugenommen, war jedoch nur halb so groß, wie bei Tieren ohne Entlastungskraniektomie ( $26,10 \pm 1,77 \text{ mm}^3$  vs.  $19,99 \pm 4,05 \text{ mm}^3$ ;  $n = 7$ ;  $p < 0,05$ ). Somit konnten wir nachweisen, dass auch bei einer Verzögerung der Entlastungskraniektomie um 1 oder 3 Stunden nach CCI Trauma das sekundäre Nekrosewachstum nahezu vollständig verhindert werden konnte.





**Abb. 39:** Darstellung der Nekrosevolumina 24 Stunden nach CCI Trauma und nach unterschiedlichen Kraniektomiezeitpunkten im Vergleich zu Tieren ohne Durchführung einer operativen Entlastung. Der sekundäre Hirnschaden ist durch die schraffierte Fläche herausgehoben.

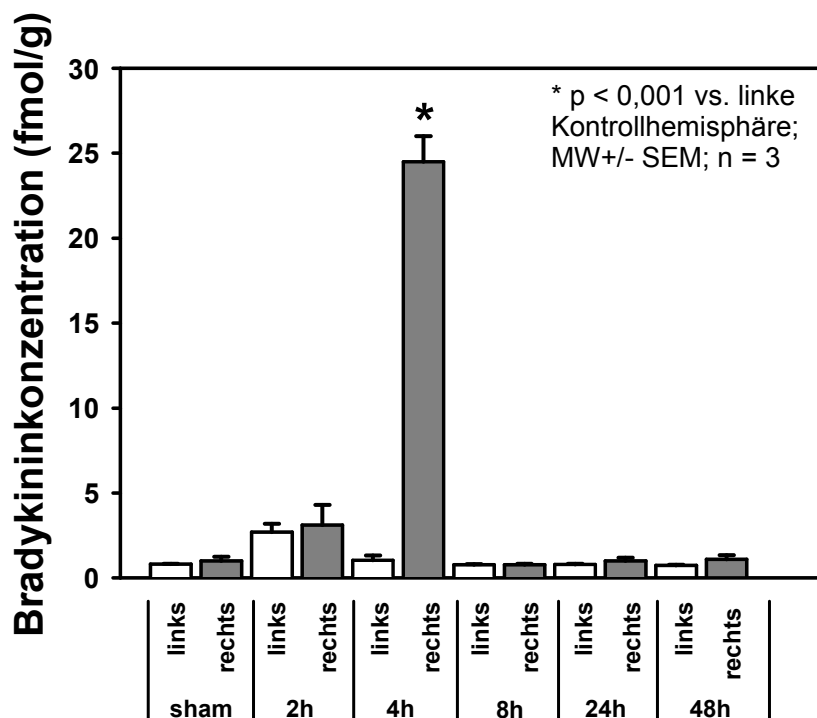
### 3.5. Messung der intrakraniellen Temperatur nach Kraniektomie

Um auszuschließen, dass der Effekt der Entlastungskraniektomie nicht durch die Verhinderung des ICP-Anstiegs und der daraus resultierenden verbesserten cerebralen Durchblutung, sondern durch eine fokale Hypothermie verursacht wurde, haben wir 12 Stunden nach Durchführung der Kraniektomie die Hirntemperatur 1 mm unterhalb der Hirnoberfläche gemessen. Dabei haben wir festgestellt, dass Tiere ohne Kraniektomie eine Hirnparenchymtemperatur von  $37,47 \pm 0,15$  °C und kraniektomierte Tiere eine Temperatur von  $37,0 \pm 0,26$ °C aufwiesen (n = 3; p > 0,1). Somit konnte eine Kraniektomie-bedingte signifikante fokale Hypothermie ausgeschlossen werden.

### 3.6. Der Einfluss des Kallikrein-Kinin Systems auf die Entstehung des sekundären Hirnschadens

#### 3.6.1. Messung der Bradykininkonzentration im Hirnparenchym nach CCI Trauma

Die Messung der Bradykinin Konzentration im Hirnparenchym zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach experimentellem SHT hat gezeigt, dass es 4 Stunden nach CCI Trauma zu einem hochsignifikanten Anstieg im perikontusionellen Gewebe kommt ( $16,63 \pm 2,12$  fmol/g vs.  $1,03 \pm 0,75$  fmol/g;  $n = 3$ ;  $p < 0,001$ ). Bereits zwei Stunden nach CCI-Trauma konnte ein nicht signifikanter Anstieg der Bradykininkonzentration in beiden Hemisphären nachgewiesen werden. Zu allen anderen Zeitpunkten (bis 48 h post CCI) lag die Konzentration auf dem Niveau sham operierter Tiere.



**Abb. 40:** Bradykininkonzentrationen im Hirnparenchym der traumatisierten und kontralateralen Hemisphäre zu unterschiedlichen Zeitpunkten bis zu 48 Stunden nach CCI Trauma.

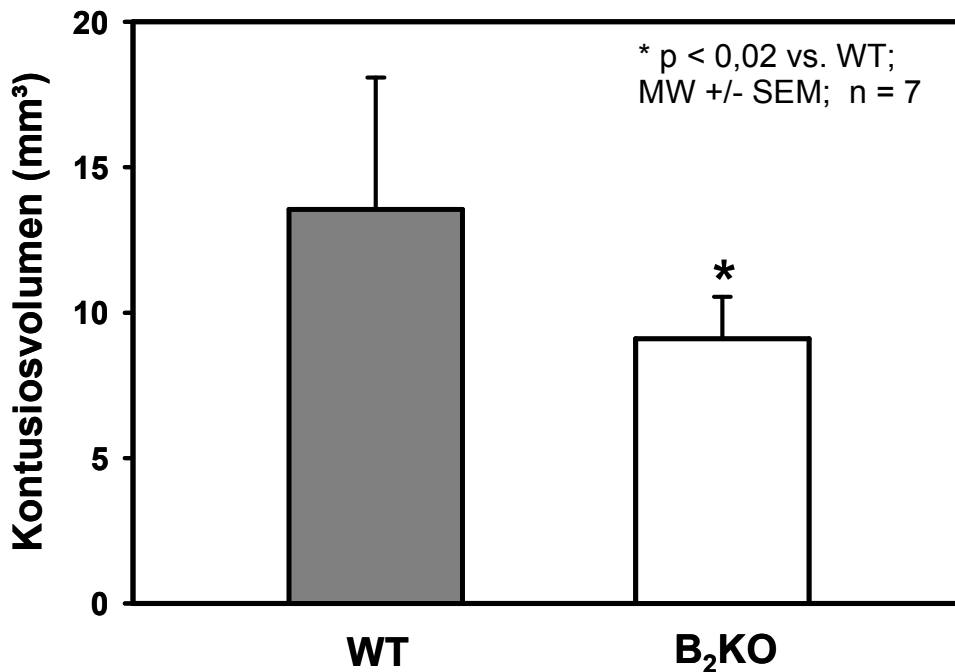
### 3.6.2. Bedeutung des Bradykinin B<sub>1</sub>- Rezeptors für das sekundäre Nekrosewachstum

Bei der Untersuchung des Kontusionsvolumens 24 h nach experimentellem SHT konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Bradykinin B<sub>1</sub>- Rezeptor knock-out Mäusen und rezeptorkompetenten C57/B16 Kontrolltieren festgestellt werden (B<sub>1</sub><sup>-/-</sup> 30,29 ± 3,72 mm<sup>3</sup> vs. C57/B16 mit 28,99 ± 5,58 mm<sup>3</sup>; n = 7; p = 0,64).

### 3.6.3. Bedeutung des Bradykinin B<sub>2</sub>- Rezeptors für das sekundäre Nekrosewachstum

#### 3.6.3.1. Einfluss des Bradykinin B<sub>2</sub>- Rezeptors auf des Nekrosevolumen

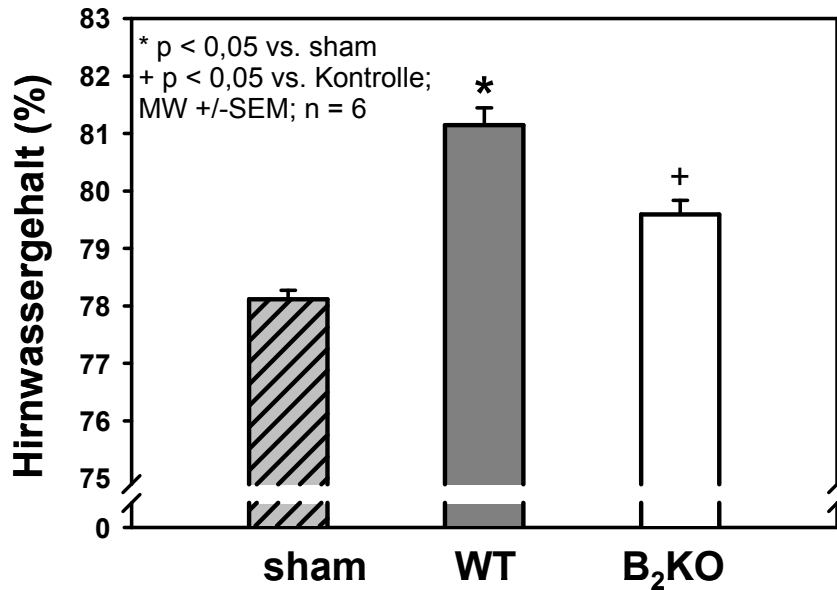
Bradykinin B<sub>2</sub>- Rezeptor knock-out Mäusen zeigten, im Gegensatz zu den Ergebnissen mit Bradykinin Rezeptor B<sub>1</sub> knock-out Tieren, und im Gegensatz zu Bradykinin B<sub>2</sub>- Rezeptor kompetenten C57/B16 Kontrolltieren, ein signifikant geringeres Nekrosevolumen 12 Stunden nach CCI Trauma (13,55 ± 9,11 mm<sup>3</sup> vs. 9,11 ± 1,44 mm<sup>3</sup>; p < 0,02; n = 7).



**Abb. 41:** Kontusionsvolumina 12 Stunden nach CCI Trauma von B<sub>2</sub>KO Mäusen im Vergleich zu rezeptorkompetenten Wildtyp C57/Bl6 Kontrolltieren.

### 3.6.3.2. Einfluss des Bradykinin B<sub>2</sub>- Rezeptors auf die Entwicklung des Hirnödems

24 Stunden nach Traumaapplikation zeigten C57/Bl6 Wildtyp Kontrolltiere einen signifikanten Anstieg des Hirnwassergehalts im Vergleich zu sham operierten Tieren ( $81,15 \pm 0,73\%$  vs.  $78,12 \pm 0,39\%$ ;  $p < 0,05$ ,  $n = 6$ ). Bradykinin B<sub>2</sub>- Rezeptor knock-out Mäuse wiesen jedoch, im Vergleich zu Wildtyp Tieren, eine um 33% geringere Ausdehnung des Hirnödems auf ( $79,59 \pm 0,59$  vs.  $81,15 \pm 0,73\%$ ;  $p < 0,05$ ;  $n = 6$ ).

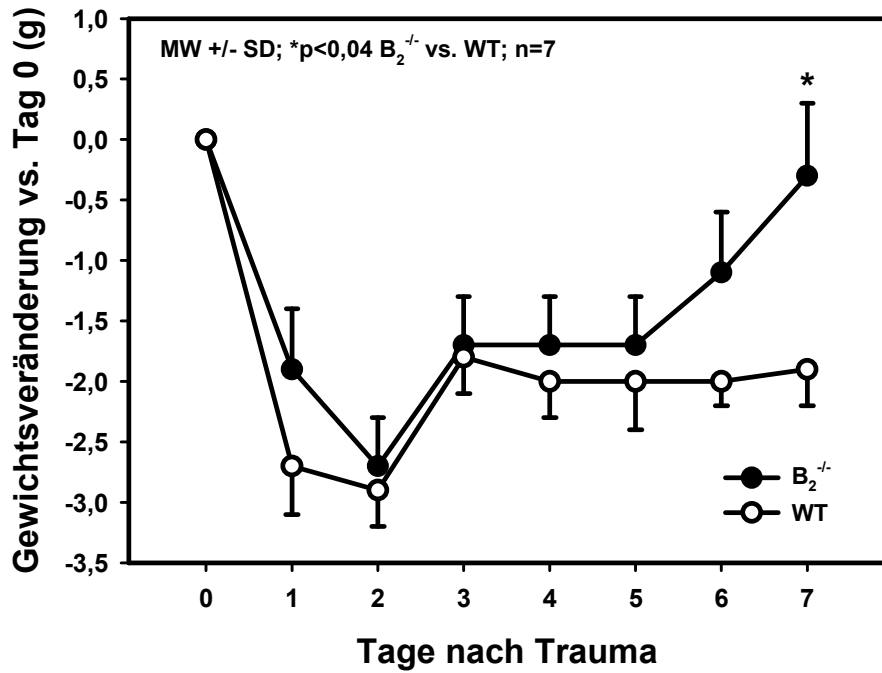


**Abb. 42:** Prozentuale Darstellung des Hirnwassergehalts 24 Stunden nach CCI Trauma bei B<sub>2</sub>KO Mäusen im Vergleich zu C57/Bl6 Wildtyp Mäusen und sham operierten Tieren.

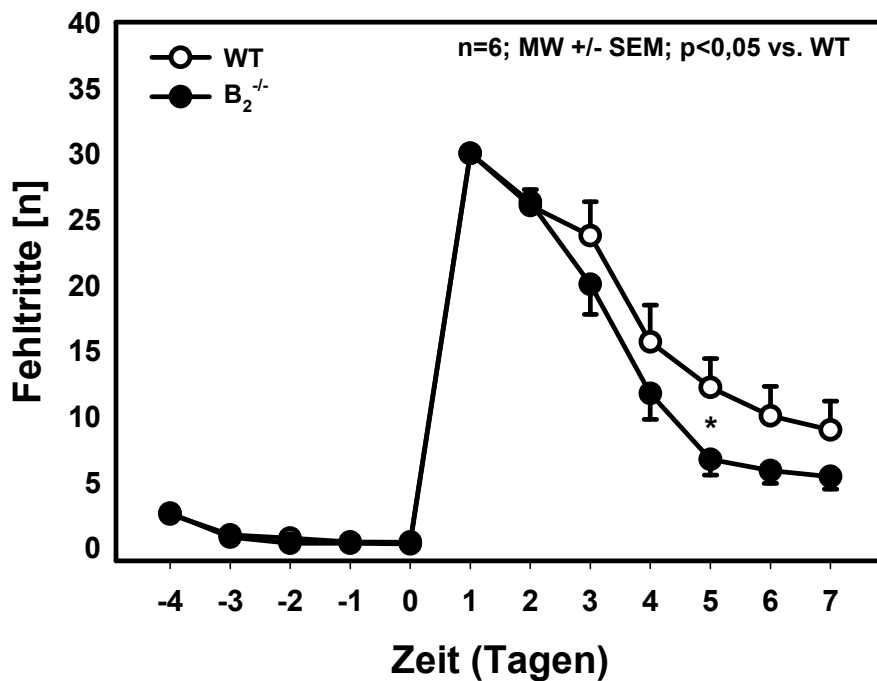
### 3.6.3.3. Einfluss des Bradykinin B<sub>2</sub>- Rezeptors auf die neurologische Funktion der Tiere

2 Tage nach experimentellem SHT hat das Körpergewicht der Bradykinin B<sub>2</sub>-Rezeptor knock-out Mäuse und der C57/Bl<sub>6</sub> Wildtyp Kontrolltiere um  $2,4 \pm 0,6$  und um  $2,8 \pm 0,7$  g abgenommen. Während Wildtyp Mäuse auf einem Residualzustand von  $-2$ g verblieben, haben sich B<sub>2</sub> knock-out Mäuse über den 5 postoperativen Tag hinaus kontinuierlich erholt und zeigten am 7. post OP Tag einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe ( $-0,2 \pm 0,6$  g vs.  $-1,9 \pm 0,4$  g; n = 7; p < 0,04).

Auch die motorische Funktion der Bradykinin B<sub>2</sub>-Rezeptor knock-out Mäuse hat sich im Beam walking Test signifikant besser erholt (6. Tag:  $6,2 \pm 0,7$  vs.  $12,3 \pm 0,8$  Fehlritte; n = 6; p < 0,05).



**Abb. 43:** Gewichtsverlauf 0 - 7 Tage post CCI Trauma von Bradykinin B<sub>2</sub>- Rezeptor knock out Mäusen vs. rezeptorkompetenten C57/Bl6 Kontrolltieren.



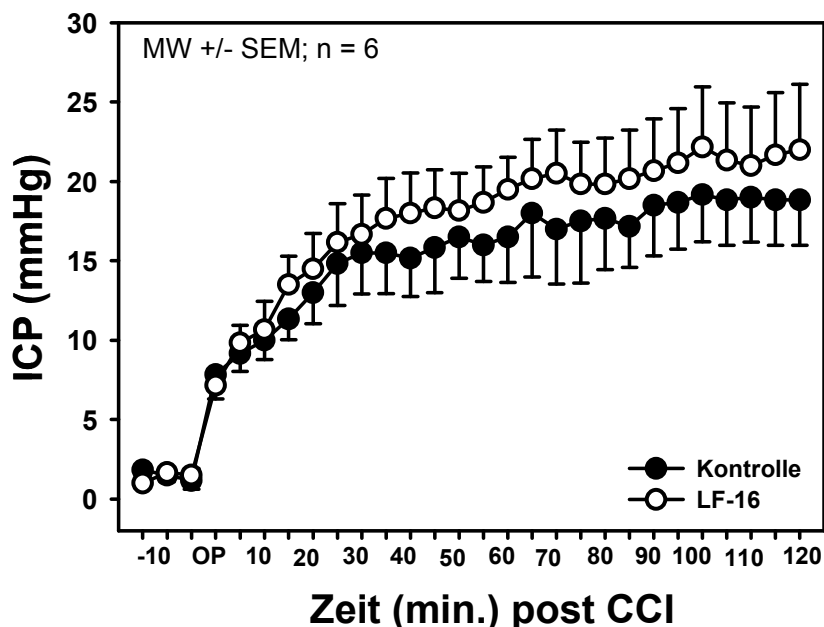
**Abb. 44:** Fehlritte beim Beam walking Task 0 - 7 Tage post CCI Trauma von Bradykinin B<sub>2</sub>- Rezeptor knock out Mäusen vs. rezeptorkompetenten C57/Bl6 Kontrolltieren.

### 3.6.4. Selektive Blockade des Bradykinin B<sub>2</sub>- Rezeptors durch LF 16-0687 Ms.

#### 3.6.4.1. Wirkung von LF 16-0687 (0,3 mg/kg KG) auf den ICP, den CBF, den MAP, auf das Nekrosevolumen und die Ausbildung des Hirnödems

##### 3.6.4.1.1. Einfluss von LF 16-0687 Ms. auf den ICP

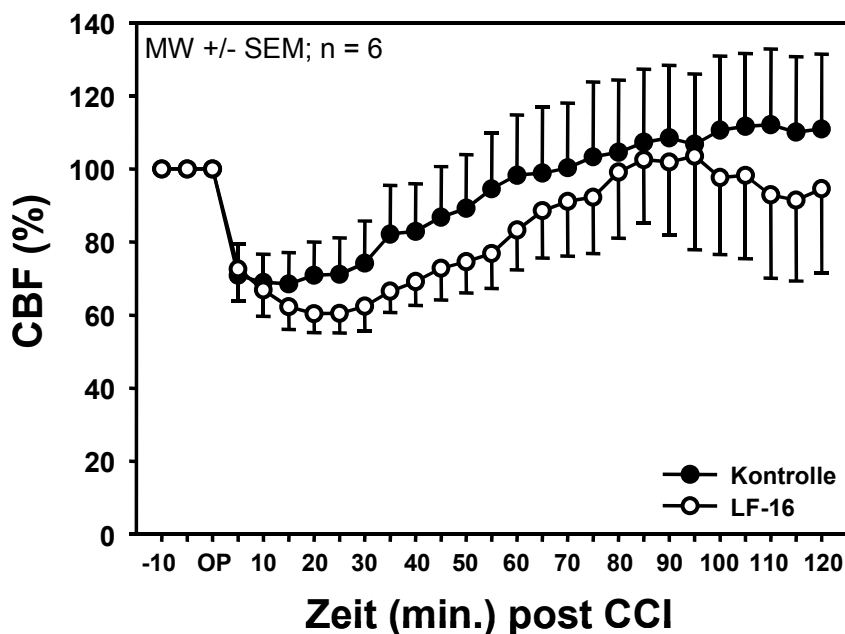
Vor Applikation des Traumas zeigten Tiere beider Gruppen (Kontrolle und LF 16-0687) annähernd einen gleichen ICP Wert ( $1,50 \pm 1,05$  mmHg vs.  $1,33 \pm 1,03$  mmHg;  $n = 6$ ;  $p = 0,74$ ). Nach CCI Trauma stieg sowohl in der Gruppe der behandelten Tiere, wie auch in der Kontrollgruppe, der ICP innerhalb der ersten 30 Minuten auf  $16,67 \pm 6,67$  mmHg und  $14,83 \pm 6,46$  mmHg ( $n = 6$ ;  $p = 0,59$ ) an. Im weiteren Beobachtungszeitraum bis zu 120 Minuten nach Trauma stieg der ICP weiter ( $22,00 \pm 10,10$  mmHg vs.  $18,83 \pm 7,03$  mmHg;  $n = 6$ ;  $p = 0,81$ ). Ein therapeutisch günstiger Effekt von LF 16-0687 konnte dabei jedoch nicht festgestellt



**Abb. 45:** ICP Werte 10 Minuten vor und bis zu 120 Minuten nach CCI Trauma und Applikation des selektiven Bradykinin B<sub>2</sub>- Rezeptor Blockers LF 16-0687 versus der Applikation gleicher Volumina NaCl Lösung in der Kontrollgruppe

### 3.6.4.1.2. Einfluss von LF 16-0687 Ms. auf den CBF

Nach Traumaapplikation fiel die cerebrale Durchblutung der kontralateralen Hemisphäre von 100% innerhalb von 30 Minuten auf  $74,22 \pm 28,27$  % bei Kontrolltieren bzw. auf  $62,46 \pm 16,46$ % bei therapierten Tieren ab ( $n = 6$ ;  $p = 0,24$ ). In der weiteren Beobachtungszeit von 2 Stunden erholte sich der CBF allmählich wieder, wobei sich der CBF therapierter Tiere tendenziell langsamer und weniger gut regenerierte als bei unbehandelten Mäusen.



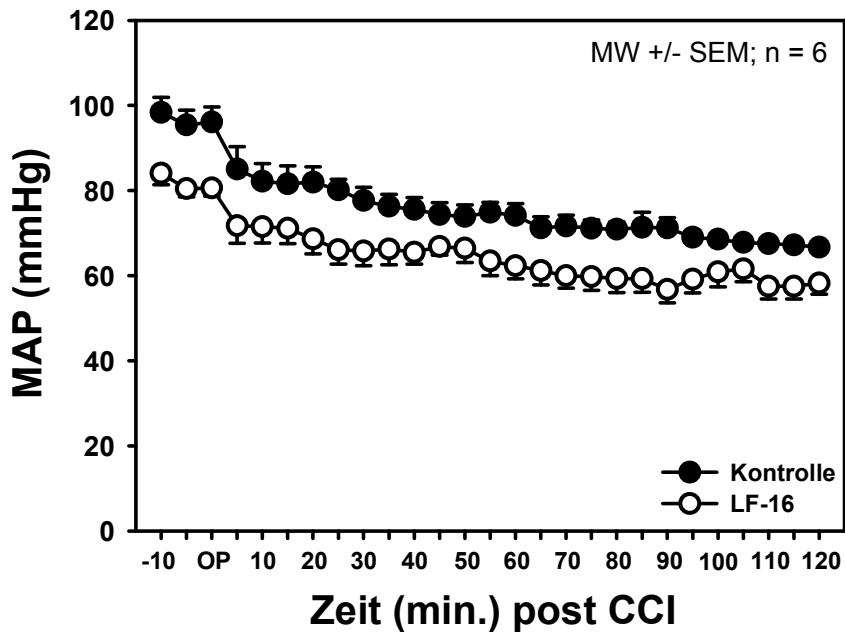
**Abb. 46:** Cerebrale Durchblutung der kontralateralen Hemisphäre 10 Minuten vor und bis zu 120 Minuten nach CCI Trauma und der Applikation von LF 16-0687 vs. NaCl in der Kontrollgruppe.

### 3.6.4.1.3. Einfluss von LF 16-0687 auf den arteriellen Blutdruck (MAP)

Parallel zur ICP und CBF Messung haben wir den mittleren arteriellen Blutdruck (MAP) bestimmt. Dabei konnten wir keine signifikanten Unterschiede des MAP zwischen der Therapiegruppe mit LF 16-0687 und der Kontrollgruppe feststellen. Es zeigte sich ein zufallsbedingter Unterschied zwischen beiden Gruppen



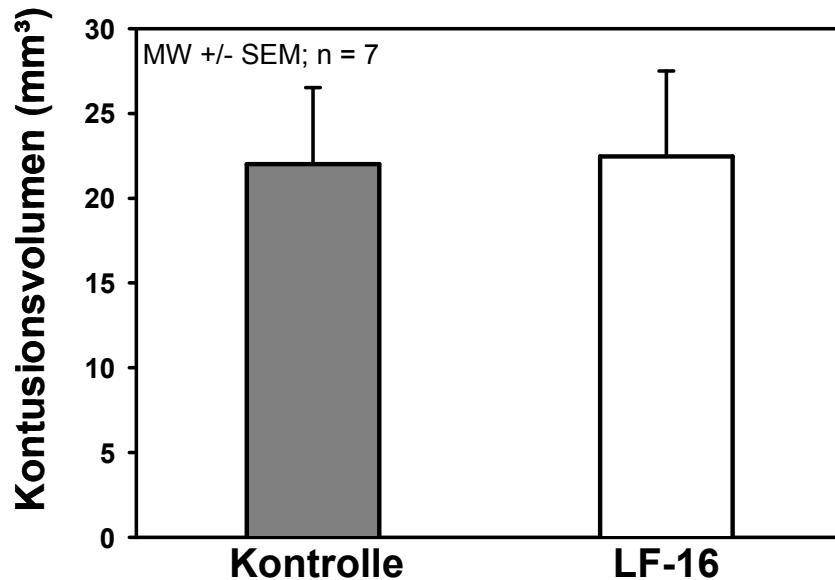
(Kontrolltiere:  $98,38 \pm 8,65$  mmHg vs. Therapiegruppe:  $84,08 \pm 6,65$  mmHg;  $n = 6$ ;  $p > 0,05$ ), der schon vor Traumaapplikation vorhanden war und sich bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes konstant nachweisen lies.



**Abb. 47:** MAP 10 Minuten vor und bis zu 120 Minuten nach CCI Trauma und Applikation von LF 16-0687, sowie NaCl in der Kontrollgruppe. Der MAP wurde mit Hilfe eines Katheters in der A. femoralis kontinuierlich gemessen.

#### 3.6.4.1.4. Einfluss von LF 16-0687 auf das Nekrosevolumen 24h post CCI

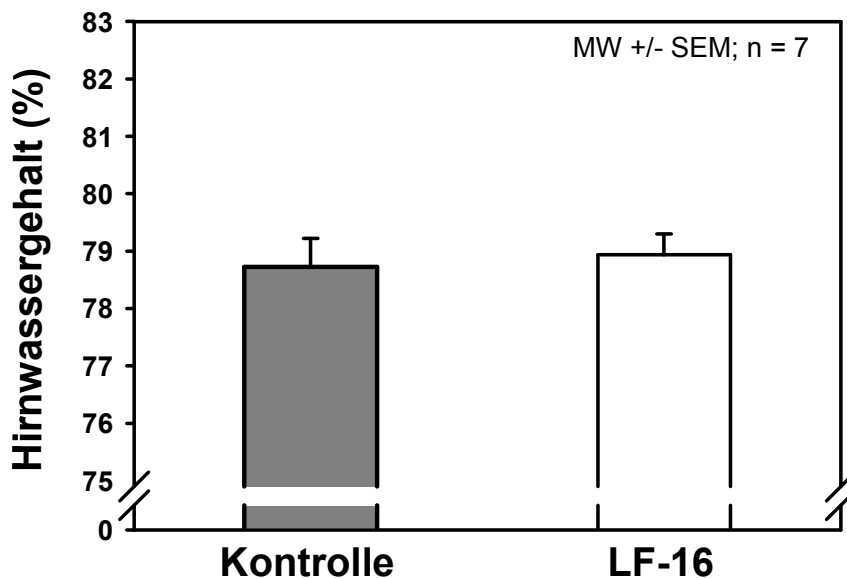
Bei der bildmorphologischen Vermessung des Nekrosevolumens, ließ sich zwischen der Kontrollgruppe und der LF16-0687 Therapiegruppe 24 Stunden nach experimentellem SHT kein signifikanter Unterschied nachweisen ( $22,00 \pm 4,51$  mm<sup>3</sup> vs.  $22,47 \pm 5,03$  mm<sup>3</sup>;  $n = 7$ ;  $p = 0,82$ ).



**Abb. 48:** Nekrosevolumina 24 Stunden nach CCI Trauma und nach kontinuierlicher subcutaner Applikation des Bradykinin B<sub>2</sub>- Rezeptorblockers LF 16-0687 vs. NaCl Lösung in der Kontrollgruppe via Alzet Mikropumpen .

#### 3.6.4.1.5. Einfluss von LF 16-0687 auf die Entwicklung des Hirnödems

Bei der Messung des Hirnwassergehaltes 24 Stunden nach CCI Trauma zeigte sich, wie bei der Bestimmung des Kontusionsvolumens, kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen, die mit LF 16-0687 und NaCl therapierten wurden ( $78,93 \pm 0,36\%$  vs.  $78,73 \pm 0,49\%$ ;  $n = 7$ ;  $p = 0,35$ ).

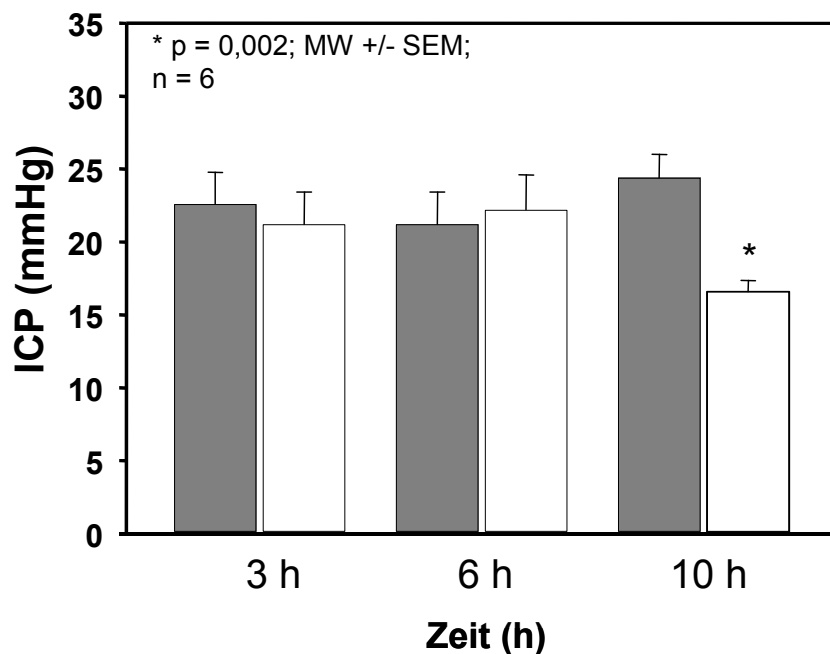


**Abb. 49:** Hirnwassergehalt beider Hemisphären 24 Stunden nach CCI und nach Therapie mit dem Bradykinin B<sub>2</sub>-Rezeptorblocker LF 16-0687 vs. NaCl.

### 3.6.4.2. Wirkung von LF 16-0687 (3,0 mg/kg KG) auf auf den ICP und auf das Nekrosevolumen

#### 3.6.4.2.1. Wirkung von LF 16-0687 auf den ICP

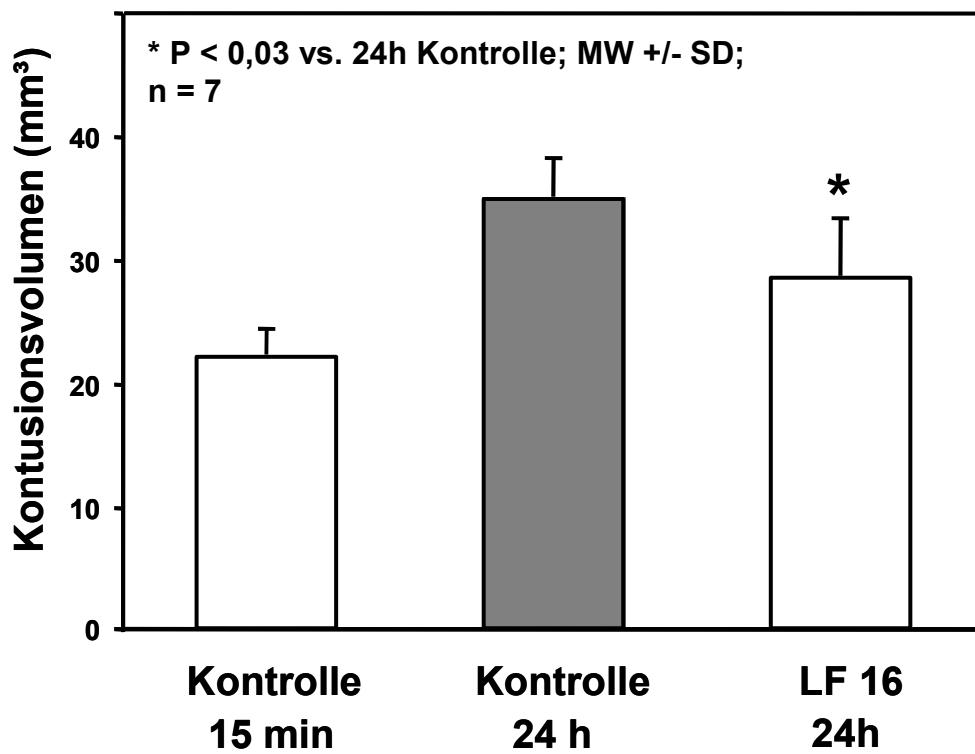
Bei der repetitiven Messung des ICP nach subcutaner LF16-0687 Applikation 15 Minuten und 8 Stunden post CCI Trauma in 10 fach höherer Dosierung (3,0 mg/kg KG), zeigten sich 3h und 6h nach Trauma keine signifikanten Unterschiede zwischen der Therapie- und der Kontrollgruppe (3h:  $21,4 \pm 5,27$  mmHg vs.  $22,6 \pm 4,88$  mmHg; n = 6; p > 0,05. 6h:  $22,2 \pm 5,40$  mmHg vs.  $21,2 \pm 4,97$  mmHg; n = 6; p > 0,05). 10 Stunden nach Trauma jedoch, war eine signifikante Abnahme des intrakraniellen Drucks in der LF 16-0687 Therapiegruppe nachweisbar ( $16,6 \pm 1,67$  vs.  $24,4 \pm 3,58$  mmHg; n = 6; p = 0,002).



**Abb. 50:** ICP Messungen 3h, 6h und 10h nach experimentellem SHT und nach Therapie mit LF 16-0687 (weiß) versus NaCl in der Kontrollgruppe (schwarz).

#### 3.6.4.2.2. Wirkung von LF 16-0687 auf das Kontusionsvolumen

Direkt nach experimentellem SHT wurde ein primärer Kontusionsschaden von  $21,83 \pm 2,67 \text{ mm}^3$  bildmorphologisch nachgewiesen, der sich im Verlauf von 24 h signifikant auf  $35,0 \pm 3,32 \text{ mm}^3$  vergrößerte ( $p < 0,005$ ;  $n = 7$ ). Durch die subcutane Applikation von LF 16-0687 konnte die Zunahme des Sekundärschadens um 51% auf  $28,28 \pm 5,18 \text{ mm}^3$  reduziert werden ( $p = 0,003$ ;  $n = 7$ ).



**Abb. 51** Kontusionsvolumen 15 min. und 24h nach CCI Trauma mit und ohne Gabe von LF 16-0687.

## **4. DISKUSSION**

### **4.1. Maus als Versuchstier**

Bereits in früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurden Mäuse als Versuchstiere verwendet. Sie weisen im Vergleich zu anderen Tieren, z.B. Ratten, Kaninchen, einige Vor- und Nachteile auf:

1. Nur bei Mäusen ist es möglich, die Rolle einzelner Rezeptoren im Rahmen pathophysiologischer Prozesse an Hand von Rezeptor knock-out Tieren zu untersuchen, wie in der vorliegenden Arbeit für Bradykinin B<sub>1</sub>- und B<sub>2</sub>-Rezeptoren.
2. Die Tiere sind klein und dadurch kostengünstig zu halten und zu züchten.
3. Die Tiere verfügen über ein robustes Herz-Kreislaufsystem, das die Durchführung von Langzeitnarkosen und die neurologische Testung der Tiere ermöglicht.
4. Aufgrund des geringen Körpergewichts von nur 25 Gramm sind die mikrochirurgische Präparation und die mehrstündige Narkoseführung komplex.

### **4.2. Modellauswahl**

Die pathologische Manifestation eines Schädel-Hirntraumas ist vielgestaltig und es ist kein Modell verfügbar, das sämtliche Aspekte vollständig repräsentiert. Vielmehr konzentrieren sich die vorhandenen experimentellen Modelle auf verschiedene Einzelaspekte des SHT.

Ziel unserer Untersuchungen waren die Aufklärung und Beeinflussbarkeit verschiedener Pathomechanismen als Ursache des sekundären Hirnschadens. Die Anforderungen an das Modell waren somit folgende:

1. Das Modell sollte eine fokale Rindenkontusion erzeugen, deren Ausmaß sich sicher quantifizieren lässt, um den Einfluss einer pharmakologischen oder genetischen Intervention auf die Nekroseausdehnung sensitiv nachweisen zu können.
2. Das Modell sollte reproduzierbar sein, um für alle Versuchstiere gleiche Ausgangsbedingungen zu schaffen.
3. Das Modell sollte realitätsnah sein und viele Einzelkomponenten des SHT abdecken.

#### 4.2.1. Das Modell des Controlled Cortical Impact

Die vorliegenden Untersuchungen wurde am Modell des Controlled Cortical Impacts nach C.E. Dixon durchgeführt (Dixon C.E. et al., 1991; Dixon C.E. et al., 1999). In diesem Versuchsaufbau konnte man die Einzelkomponenten des Traumas (Geschwindigkeit des Bolzens, Eindringtiefe des Bolzens ins Hirnparenchym und die Kontaktzeit des Bolzens mit der Dura mater) frei wählen. Um eine unkontrollierte Frakturierung der Knochen zu vermeiden, wurde die in einem steriotaktischen Rahmen fixierten Tiere vor Traumaapplikation kraniotomiert. In bereits 1995 veröffentlichten kernspintomografischen Untersuchung von P.M. Kochanek (Kochanek P.M. et al., 1995) konnte die reproduzierbare Größe der Nekroseflächen, die prozentuale ipsilaterale Zunahme des Hirnwassergehaltes und autoradiographisch der Abfall der cerebralen Durchblutung bei der Ratte nachgewiesen werden. C.G. Markgraf et al. konnten die Auswirkung unterschiedlicher Eindringtiefen des Bolzens ins Hirnparenchym auf die motorischen und kognitiven Fähigkeiten bei Ratten nachweisen. So zeigten Tiere mit einer Eindringtiefe von 2,5 mm signifikant schlechtere Ergebnisse beim Beam

balance Test als Tiere mit einer Eindringtiefe von nur 1,0 mm (Markgraf C.G. et al., 2001). Zudem gelang es, dieses Modell bereits auf die Maus zu übertragen. Somit eröffnete sich die Möglichkeit auch an genetisch veränderten Tieren, z.B. an knock-out Mäusen, SHT-Untersuchungen durchzuführen. Auch hier konnte bereits gezeigt werden, dass es nach CCI Trauma zur Eröffnung der Blut-Hirnschranke (BBB) und zur Ausbildung eines Hirnödems kommt. Zudem wurde bereits fragmentarisch der Zusammenhang zwischen Größe des Nekrosevolumens und motorischer Defizite beschrieben (Smith D.H. et al., 1995; Chen Y. et al., 1996; Hannay H.J. et al., 1999). Somit stellte das Controlled Cortical Impact Trauma ein ideales Modell für unsere Untersuchungen bezüglich der pathophysiologischen Veränderungen nach experimentellem fokalem Schädel-Hirntrauma dar.

#### 4.2.2. Alternative Modelle des Schädel-Hirntraumas

Zur Simulation eines Schädel-Hirntraumas wurden zahlreiche weitere Modelle beschrieben (Prins M.L. et al., 2003). Sie lassen sich in kinetische und nicht-kinetische Modelle einteilen:

Eines der am häufigsten verwendeten Modelle, ist das Fluid Percussion Injury Modell (Gurrdjian E.S. et al., 1954). Dabei wird ein Druckpuls über eine Wassersäule direkt auf die Dura mater übertragen. Der Impuls wird dabei von einem Metallpendel erzeugt, das mit definierter Geschwindigkeit auf einen Korken auftrifft, der die Wassersäule abschließt (Dixon C.E. et al., 1987; Povlishock J.F. et al., 1995). Neben kleineren subarachnoidalen und intraparenchymalen Einblutungen entstehen vorwiegend axonale und vaskuläre Schäden im Hirnstamm, die zu einer erhöhten Mortalität der Tiere bei nur kleiner Rindenkontusion führt (Dixon C.E. et al., 1987; Hayes R.L. et al., 1987; Dixon C.E. et al., 1988; Hayes R.L. et al., 1988). Eine Kontusion, wie man sie z.B. bei Patienten nach einem Fahrradsturz sieht, erhält man nicht (Prins M.L. et al., 1996; Phillips L.L. et al., 1994; Carbonell W.S. et al., 1998).



Der erste Versuchsaufbau eines Impact Trauma Modells wurde von Denny- Brown und Russel im Jahre 1945 beschrieben (Denny-Brown D. et al., 1945). Sie ließen auf einen frei beweglichen Kopf eines Primaten ein an einem Pendel aufgehängtes Gewicht fallen. Dieses Modell spiegelt viele Komponenten des realen Unfallmechanismus eines SHT wieder, z.B. die Entstehung einer Contrecoup-Läsion, das Einreißen von Brückenvenen, intracerebrale Blutungen, Halswirbelsäulenverletzungen und Knochenbrüche. Aber gerade diese wirklichkeitsnahe Vielfalt der Einzelkomponenten, z.B. die unkontrollierbare Frakturierung der Schädelknochen, machen dieses Modell nicht reproduzierbar.

Diesbezüglich etablierte Marmarou A. (1994) den Einsatz von Helmen und Platten, die die Frakturierung der Schädelknochen verhindern sollten (Marmarou A. et al., 1994; Foda M.A. et al., 1994). Bei diesem Modell fällt das Pendel nicht direkt auf die Dura oder den Knochen, sondern auf kleine, auf dem Schädelknochen fixierte Metallplättchen. Der Kopf der Tiere ist dabei jedoch nicht in einem steriotaktischen Rahmen eingespannt, sondern auf einem Schaumstoffkissen gelagert. Somit erzeugte man mit diesem Modell vor allem Akzelerations- und Dezelerationsbewegungen des Gehirns innerhalb des knöchernen Schädels, das einem stumpfen, diffusen Schädel-Hirntrauma entspricht.

Zu den nicht-kinetischen Modellen zählen die thermischen und chemischen Läsionen. Die fokale Vereisung der freiliegenden Hirnoberfläche nach Trepanation führt zum Entzug von Wasser und dadurch zu einer extrem hohen Solutkonzentration der verbleibenden flüssigen Phase. Die Zellmembranen und andere Zellstrukturen werden zerstört. Es resultiert eine bei Wiedererwärmung erkennbare, gleichmäßige Nekrose aller in dem vereisten Areal befindlichen Ganglien-, Glia- und Endothelzellen (Haas G.M. et al., 1948; Clasen R.A. et al., 1953; Klatzo I. et al., 1958). Daneben wurden auch durch Hitze verursachte Parenchymschäden beschrieben. Pappius verwendete einen auf 70 °C erhitzten

Stempel, der auf die Dura aufgesetzt wurde (Pappius H.M. et al., 1981). Diese Methode hat jedoch keine Verbreitung gefunden. Yamagami verwendete zur Erzeugung einer Nekrose einen Laser (Yamagami T. et al., 1985). Neben den hohen Anschaffungskosten, hat dieses Modell zudem den Nachteil keine besonders hohe klinische Relevanz zu besitzen (Eggert H.R. et al., 1985; Frerichs K.U. et al., 1990). Schließlich sind noch chemische Modelle zu nennen, bei denen der Zellschaden durch Einbringen z.B. exzitatorischer Aminosäuren wie Ibotenat, Kainat oder NMDA, die mit Glutamatrezeptoren interagieren, ausgelöst wird. Sie eignen sich jedoch eher für spezielle biochemische Fragestellungen als für die Untersuchung eines Kontusionsschadens (Choi D.W. et al., 1990).

Das kinetische Modell des Controlled Cortical Impact erscheint somit allen anderen, insbesondere den nicht-kinetischen Modellen, überlegen. Es lässt sich eine exakt reproduzierbare Kontusion mit frei wählenden Intensitätsparametern erzeugen, und dennoch sind viele Schädigungsmechanismen des realen SHT, wie epidurale Blutungen, Parenchymlutungen, Abreißen von Brückenvenen, Hirnödementstehung und Parenchymuntergang repräsentiert.

### **4.3. Narkoseführung**

Grundlage der Untersuchung pathophysiologischer Veränderungen nach experimentellem SHT ist die Führung der Narkose unter Berücksichtigung physiologischer Vitalparameter, wie z.B. Blutdruck und Blutgase.

Kurzzeitnarkosen mit einer Dauer von unter 30 Minuten, wie sie z.B. bei der Durchführung einer Trepanation und Traumaapplikation zum Einsatz kam, führten wir mit Halothan, Lachgas und Sauerstoff durch. Bei der kurzen Zeit des Eingriffs zeigt diese Art der Narkose keine Ateminsuffizienz bei nicht intubierten Tieren. Ein weiterer Vorteil ist das rasche Wiedererwachen der Tiere aus der Narkose, ohne die

einzelnen Pharmaka antagonisieren zu müssen. Die Narkose ist somit sehr gut steuerbar. Ein bekannter Nachteil ist der durch Halothan induzierte Anstieg der cerebralen Durchblutung und des intrakraniellen Drucks (Cunitz G. et al., 1976; Hans P. et al., 1980; Drummond J.C. et al., 1986; Scheller M.S. et al., 1986; Scheller M.S. et al., 1987). Aufgrund der extrem kurzen Narkosezeit ist dieser Effekt bei unseren Versuchen vernachlässigbar gering. Bei kurzen Versuchszeiten konnten wir mit der Halothan Maskennarkose somit suffiziente Narkosen mit physiologischen Vitalparametern durchführen.

Langzeitbeobachtungen über mehrere Stunden, z.B. bei der Untersuchung des posttraumatische ICP Verlaufs, ist bei spontan atmenden Tieren in Halothan Maskennarkose nicht möglich. Die mehrstündig Applikation von Halothan würde zur Akkumulation im Fettgewebe und zur Atemdepression der Tiere führen und schließlich zur Verschiebung des homöostatischen Gleichgewichtes mit Hyperkapnie und Hypoxygenie. Aus diesem Grund wurden die Tiere mit Medetomidin, Fentanyl und Midazolam i.p. anästhesiert, intubiert und kontrolliert beatmet (Schwarte L.A. et al., 2000). Diese Medikamentenkombination hat einen deutlich geringeren Einfluss auf die cerebrale Durchblutung als Halothan (Zornow M.H. et al., 1992). Zur Beendigung der Narkose müssen die einzelnen Pharmaka antagonisiert werden. Aufgrund unterschiedlicher Halbwertszeiten besteht zudem die Gefahr eines Rebounds. Zur Kontrolle der Homöostase wurde zu Beginn und am Ende der Operation Blutgase gemessen. Ein mehrmaliges Bestimmen ist auf Grund der geringen Blutmenge der Mäuse nicht möglich. Als Anhaltspunkt für die Steuerung der Beatmung diente uns deswegen die Mikrokapnometrie, mit der wir kontinuierlich den endexpiratorischen  $p\text{CO}_2$  der Ausatemluft gemessen haben. Dieser Wert korreliert ausgezeichnet mit dem arteriellen  $p\text{CO}_2$  und ist deshalb für die Steuerung der Beatmung narkotisierter Tiere ideal geeignet.

Mit diesem aufwendigen Set-up gelang es uns auch bei Mäusen Narkosen mit physiologischen Vitalparametern über mehrere Stunden durchzuführen.

#### **4.4. Einfluss der Hypothermie auf die Untersuchungsergebnisse**

Eine bedeutende Störgröße bei der Untersuchung von physiologischen Parametern an narkotisierten Kleintieren ist die Hypothermie.

##### **4.4.1. Wirkung der Hypothermie nach SHT an Kleintieren**

In einer Reihe von tierexperimentellen Untersuchungen konnte die neuroprotektive Wirkung einer milden bis moderaten Hypothermie nachgewiesen werden. W.D. Dietrich zeigte 1994 (Dietrich W.D. et al., 1994), dass die ipsilaterale Anzahl geschädigter Zellen nach experimentellem SHT durch eine moderate Hypothermie von 30°C für einen Zeitraum von 5 Minuten bis 3 Stunden nach Trauma signifikant reduziert werden kann. Im Vergleich zu normothermen Tieren (952 +/-130 Zellen) zeigten hypotherme Ratten nur 519 +/- 122 pyknotische Zellen ( $p < 0,004$ ). In weiteren Arbeiten konnte nachgewiesen werden, dass sowohl die Ausdehnung des Hirnödems, das Nekrosevolumen und die Mortalität durch die Hypothermie gesenkt werden können (Palmer A.M. et al., 1993; Clark R.S. et al., 1996; Smith S.L. et al., 1996; Heegaard W. et al., 1997). Letztendlich führte dies erwartungsgemäß auch zu einer Verbesserung des motorischen Outcomes der Tiere (Markgraf C.G. et al., 2001).

##### **4.4.2. Kontrolle der Temperatur während der Versuche**

Ohne iatrogene Temperaturkontrolle und Gegensteuerung kühlen narkotisierte Mäuse innerhalb weniger Minuten um einige Grad Celsius ab. In unseren Versuchen wurde mittels rektaler Temperaturkontrolle und einer rückgekoppelten Heizplatte, auf der die Tiere lagen, die Körpertemperatur stets konstant bei 36,5 +/- 0,1 °C gehalten. Um auch während der Aufwachphase eine Auskühlung zu vermeiden wurden die Tiere in einen 36,0 °C warmen Inkubator gestellt.

Ferner haben wir die Temperatur des Hirnparenchyms 1 mm unter der Dura mater gemessen, um den Einfluss der Entlastungskraniektomie auf die lokale Hirntemperatur zu untersuchen. Mit unseren Ergebnissen konnten wir auch eine durch die Kraniektomie bedingte lokale Hypothermie ausschließen.

Somit konnten wir sicher gehen, dass weder eine globale noch eine lokale Hypothermie unsere Untersuchungsergebnisse beeinflussen.

#### **4.5. Pathophysiologische Veränderungen nach CCI Trauma**

##### 4.5.1. Veränderungen des CBF und des ICP

An unserem Modell konnten wir nachweisen, dass nach experimentellem SHT der ICP innerhalb eines Beobachtungszeitraums von 120 Minuten kontinuierlich anstieg und nach 6 Stunden sein Maximum erreichte. Gleichzeitig fiel auf der kontralateralen Hemisphäre die cerebrale Durchblutung unmittelbar nach Traumaapplikation (5 Minuten post CCI) auf 50% des Ausgangswerts ab und sank innerhalb der ersten 60 Minuten weiter auf 40%. In den darauffolgenden 60 Minuten erholte sich die Durchblutung langsam auf 70% des Ausgangswerts und verblieb auf diesem Niveau bis zum Ende des Beobachtungszeitraums nach 120 Minuten.

Es wurde bereits 1995 von der Arbeitsgruppe um Patrick M. Kochanek (Kochanek P.M. et al., 1995) gezeigt, dass nach CCI Trauma bei der Ratte die cerebrale Durchblutung sowohl auf der ipsi-, wie auch auf der kontralateralen Hemisphäre abnimmt. Im MRT stellte er 2h nach CCI Trauma ipsilateral eine Abnahme der cerebralen Durchblutung um -78% und nach 24h eine weiterhin persistierende Minderdurchblutung von -67% fest. Aber auch kontralateral zeigte sich eine Abnahme von -40% 2 Stunden nach CCI Trauma, jedoch 24h später eine Hyperämie von +36%. Ähnlich Ergebnisse fand auch Joseph B. Long (Long J.B. et al., 1996) bei der Messung der cerebralen Durchblutung nach Fluid Percussion Injury (FPI) bei

der Ratte mittels Laser Doppler Fluxmetrie. Diese Messmethode wurde auch bei unseren Versuchen verwendet. Er stellte eine initiale Abnahme des CBF 5 Minuten nach FPI um  $-29\%$  (ipsilateral) und  $-16\%$  (kontralateral) fest, die sich nach weiteren 5 Minuten auf  $-29\%$  und  $-20\%$  ausweitete. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen und den Daten von P. Kochanek fiel der Abfall der cerebralen Durchblutung hier jedoch deutlich geringer aus. Dies kann zum einen an den nicht direkt vergleichbaren Traumamodellen liegen (FPI und CCI) zum anderen aber auch an den unterschiedlichen Narkoseprotokollen. J.B. Long verwendete zur Aufrechterhaltung der Anästhesie Halothan  $0,75\%$ . Wie in Kapitel 4.3. dargestellt ist für Halothan eine starke neuroprotektive Wirkung nachgewiesen, die diesen Unterschied erklären könnte.

Durch den Abfall der cerebralen Durchblutung ist eine ausreichende Sättigung des Hirnparenchyms mit Sauerstoff nicht mehr gewährleistet. Die cerebrale Durchblutung korreliert hochsignifikant mit der Sauerstoffpartial sättigung des Gewebes (Doppenberger E.M. et al., 1998). Doppenberger zeigte an 25 Patienten mit einem GCS  $< 8$ , dass CBF Werte unter  $18 \text{ ml}/100\text{g}/\text{min}$  einen  $\text{pO}_2$  Gewebepartialdruck von  $< 26 \text{ mmHg}$  zur Folge hatte. Experimentelle und klinische Studien haben den fatalen Einfluss der cerebralen Ischämie nach SHT auf den sekundären Hirnschaden gezeigt (Andrew P.J. et al., 1990; Bouma G.J. et al., 1991; Chesnut R.M. et al., 1993; Cruz J. et al., 1995).

Nach SHT kommt es nicht nur zu intracerebralen Blutungen und Gewebekontusionen, sondern auch zum Zusammenbruch der Autoregulation des Gehirns. Unter Autoregulation versteht man den Mechanismus, der auch bei schwankenden cerebralen Perfusionsdrücken ( $\text{CPP} = \text{MAP} - \text{ICP}$ ) eine gleichmäßige und ausreichende cerebrale Durchblutung (CBF) gewährleistet (Golding E.M. et al., 1998). Die Autoregulation wird vor allem von zwei Mechanismen getragen: der erste ist metabolisch, d.h., dass ein plötzlicher Abfall des lokalen CBF, z.B. durch das Absinken des CPP, zur Abnahme des  $\text{pO}_2$  führt. Die zweite Komponente ist myogen. Dabei regulieren glatte Muskelzellen der arteriellen

Gefäßwände den Gefäßtonus. Per Definition ist die myogene Antwort durch die Kontraktion der Gefäße bei erhöhtem intravaskulärem Druck und der Vasodilatation bei niedrigem Druck charakterisiert. E.M. Golding (Golding E.M. et al., 1998) konnte an der Arteria cerebri media der Ratte zeigen, dass nach CCI Trauma vor allem die myogene Komponente der Autoregulation sowohl ipsi-, wie auch kontralateral unmittelbar nach Trauma ausfällt. Nur so kann erklärt werden, dass es bereits einige Minuten nach CCI Trauma, bevor der ICP angestiegen ist und dieser zur Gefäßkontraktion beiträgt, es zum dramatischen Abfall der cerebralen Durchblutung auf der kontralateralen Hemisphäre kommt.

Parallel zum Abfall der cerebralen Durchblutung haben wir eine kontinuierliche Zunahme des intrakraniellen Drucks nachweisen können. Von einem Ausgangswert von 1,05 mmHg stieg der ICP innerhalb von 120 Minuten auf 19,0 mmHg an und erreichte 6 h post CCI mit 23,0 mmHg sein Maximum. Untersuchungen von H. Liu zeigten 2002 erstmals an der Maus nach CCI Trauma den Verlauf des intrakraniellen Drucks (Liu H. et al., 2002). In seinen Untersuchungen lag der Ausgangsdruck mit 12 mmHg deutlich höher als bei unseren Experimenten. Zudem beschreibt Liu eine unmittelbar nach Trauma stattfindenden Anstieg des intrakraniellen Drucks auf 46 mmHg und einen zweiten ICP-Peak mit 28 mmHg 30 Minuten nach CCI. 3 Stunden nach Trauma war der ICP jedoch auf 7 mmHg abgefallen. Die unterschiedlichen Ausgangsdrucke lassen sich möglicherweise dadurch erklären, dass Liu die Mäuse mit Halothan narkotisiert hatte, das bekanntlich zu einer Zunahme des CBF und einem Anstieg des ICP führt. Der akute Anstieg des ICP unmittelbar nach CCI lässt sich bei physiologischen MAP Werten nur durch eine traumabedingte Blutung erklären. 3 Stunden nach CCI hatten die Mäuse in Liu's Studie einen durchschnittlichen MAP von nur 36 mmHg, und einen fast gänzlich erloschenen CPP, was nach dem Zusammenbruch der Autoregulation auch die Abnahme des ICPs erklärt. Liu's Versuchsergebnisse liegen somit jenseits physiologischer Rahmenparameter und sind auf Grund dessen nicht direkt mit unseren Ergebnissen

vergleichbar. S. Rooker hat den Verlauf des ICP an wachen Ratten nach weight drop Trauma über einen Zeitraum von 10 Stunden untersucht und stellte einen kontinuierlichen Anstieg des ICP fest (Rooker S. et al., 2003). Moderat traumatisierte Tiere zeigten ein ICP-Maximum von 47,3 mmHg 10 Stunden post SHT und einen ICP Wert von etwa 28 mmHg 6 Stunden nach Trauma, der unseren Ergebnissen, unter Einbeziehung eines höheren ICP Ausgangswertes bei Rookers Versuchen, entspricht.

#### 4.5.2: Ausbildung eines Hirnödems

In unseren Experimenten konnten wir einen Anstieg des Hirnwassergehalts beider Hemisphären von  $77,95 \pm 0,33\%$ , der etwa physiologischen Werten nativer Tiere entspricht (78,02%), auf  $79,89 \pm 0,54\%$  6 Stunden, und eine weitere hochsignifikante Zunahme auf  $81,15 \pm 0,73\%$  24 Stunden nach Trauma feststellen.

Durch ein SHT wird die Intaktheit der Blut-Hirnschranke (BBB) gestört und es kommt zur Flüssigkeitsextravasation ins Hirnparenchym und zur Ausbildung eines Hirnödems. Mit Hilfe des photometrischen Nachweises von intravasal injiziertem Evans Blue im Hirnparenchym konnte vielfach gezeigt werden, dass es 4 - 6 Stunden und nochmals 3 Tage nach Trauma biphasisch zum Austritt von Flüssigkeit ins Hirngewebe kommt. Dabei wird der unmittelbar nach Trauma stattfindende Zusammenbruch der BBB vor allem den direkten Traumaauswirkungen zugeschrieben, wie dem Abfall des CPP oder der Torquierung von Gefäßen, während der verzögerte Austritt von Evans Blue vor allem sekundären Mechanismen, wie dem Reperfusionsschaden oder metabolischen Veränderungen, wie der Ausbildung der Gewebsazidose zugeschrieben wird (Baskaya M.K. et al., 1997).



Eine Zunahme des Hirnwassergehaltes von etwa 3% wurde bereits von P.M. Kochanek nach CCI an der Ratte gezeigt (Kochanek P.M. et al., 1995). Ähnliche Beobachtungen beschrieb auch J.F. Stover (Stover J.F. et al., 2000). Er stellte eine Zunahme des Hirnwassergehalts 24h nach CCI von 7,5% fest. Dieser Wert liegt deutlich höher als in unseren Experimenten (4,1%). Dies lässt sich dadurch erklären, dass Stover mit der wet-dry Methode die traumatisierte Hemisphäre isoliert untersucht hatte, wir hingegen beide Hemisphären gemeinsam. Da das Ödem perikontusional am größten ist, hatte Stover somit weniger ungeschädigtes Gewebe und erreichte dadurch einen höheren Prozentanteil des Wassergehalts. Auch R.J. Dempsey und A. Unterberg konnten 24 Stunden nach CCI an der Ratte ein Hirn-Wassergehalt der traumatisierten Hemisphäre von über 82% nachweisen (Unterberg A. et al., 1997; Dempsey R.J. et al., 2000). Durch C. Lundblad konnte auch am Mausmodell ein Anstieg von 79,3% auf 79,9% 24h post CCI festgestellt werden. Dieser Wert fällt jedoch deutlich geringer aus als bei unseren Experimenten, was auf eine geringere Traumaintensität zurückgeführt werden könnte (Lundblad C. et al., 2004).

Unsere Ergebnisse stehen somit im Konsens mit der aktuellen wissenschaftlichen Literatur.

#### 4.5.1. Das sekundäre Nekrosewachstum

M.U. Schuhmann beschrieb 2002 anhand von kombiniert durchgeführten Bestimmungen des Hirn-Wassergehalts mit der wet-dry Methode und des Kontusionsvolumens mittels T2 gewichteter MRI Aufnahmen an Sprague-Dawley Ratten einen streng parallelen Verlauf sowohl für absolute wie auch für relative Werte zwischen der Zunahme des Hirnödems und der Größe des Nekrosevolumens (Schuhmann M.U. et al., 2002). Durch den Abfall der cerebralen Durchblutung kommt es, dramatisiert durch einen posttraumatischen Abfall des systemischen mittleren arteriellen Drucks (MAP), zur signifikanten Reduktion des CPP und zur

dadurch bedingten Sauerstoffminderversorgung des Hirngewebes und damit zur Zunahme von nekrotischem Gewebe (Pfenninger E.G. et al., 1989; Kelly D.F. et al., 1997; Doppenberger E.M. et al., 1998; Stocchetti N. et al., 1998; Ter Minassian A. et al., 2002).

Unsere Ergebnisse zeigen, dass es nach CCI Trauma innerhalb von 24 Stunden zu einer signifikanten Zunahme des Nekrosevolumens um knapp 40% von 17,5 mm<sup>3</sup> auf 28,6 mm<sup>3</sup> kommt.

R.M. Bryan (Bryan R.M Jr. et al., 1995) konnte autoradiographisch nach CCI an der Ratte zeigen, dass es 30 Minuten nach Trauma zu einer scharf demarkierten Ischämiezone kommt, die von einer hyperperfundierten Randzone (Penumbra) umgeben ist. Vier Stunden später jedoch ist die Demarkierung unscharf und die Randzone ebenfalls deutlich hypoperfundiert. Das nekrotische Areal hat, wie in unseren Untersuchungen, innerhalb weniger Stunden zugenommen.

#### **4.6. Neuroscores**

Um die therapeutische Wirkung der Dekompressionskraniektomie oder der Gabe von LF 16-0687 auf das Outcome der Tiere zu quantifizieren bedienten wir uns verschiedener neurofunktionaler Tests. Diese mussten verschiedene Anforderungen erfüllen:

1. Die Aufgaben sollten in kurzer Zeit (3 Tage prä-OP) erlernbar sein.
2. Bereits innerhalb eines Beobachtungszeitraums von 8 Tagen sollten sich signifikante Unterschiede ablesen lassen.
3. Die Tests sollten einfach durchzuführen und schonend für frisch operierte Tiere sein.

4. In den einzelnen Tests sollten verschiedene Verhaltensqualitäten repräsentiert sein:
  - a. Allgemeines Verhalten und Wohlbefinden
  - b. Motorik und Motorkoordination
  - c. Kognition und Orientierung im Raum

#### 4.6.1. Untersuchung des allgemeinen Verhaltens und Wohlbefindens

Um einen Überblick über das allgemeine Verhalten der Tiere zu bekommen entwickelten wir einen orientierenden neurologischen Score mit maximal 80 Punkten, in dem sowohl die Sensomotorik, spezifische Verhaltensmuster, wie Nestbau oder das Zeigen von Interesse bei Käfigöffnung, wie auch Vitalparameter (Atmung) berücksichtigt waren. Aufgrund der vielen Einzelkomponenten war dieser Test sehr aufwendig, ließ jedoch keine signifikanten Aussagen ableiten.

Deutlich aussagekräftiger bezüglich des Allgemeinbefindens, und sehr einfach durchzuführen, ist es die Veränderungen der Körpergewichte der Tiere zu beobachten. Es ist ein sensibler Marker für das Allgemeinbefinden der Mäuse und korreliert mit der cerebralen Schädigung der Tiere (Piot-Grosjean O. et al., 2001; Hamm R.J. et al., 1992; Zausinger S. et al., 2004). Sham operierte Tiere zeigten in unseren Versuchen post OP nahezu keinerlei Gewichtsverlust, während traumatisierte Mäuse bis zu 10% ihres Körpergewichts verloren.

#### 4.6.2. Motorik und Motorkoordination

Um die motorische Funktion der vorderen Extremität zu untersuchen verwendeten wir den Forepaw contraflexion- und den Grasp strenght Test. Beide Tests zeigten

jedoch keine signifikanten Unterschiede der einzelnen Gruppen zueinander, obgleich festzustellen war, dass *moderate* und *strong* geschädigte Tiere deutliche Defizite beim Forepaw contraflexion Test aufwiesen.

Die Inkohärenz der einzelnen Gruppen zueinander lässt sich darauf zurückführen, dass die vordere Extremität bei Mäusen jeweils auf beiden Hemisphären repräsentiert ist und somit die Schädigung einer Hemisphäre ausgeglichen werden kann. G.B. Fox zeigte jedoch bereits 1998 (Fox G.B. et al., 1998), dass es nach CCI Trauma bei C57/Bl6 Mäusen zu einem Flexionsdefizit der vorderen Extremitäten kommt, das 2 Wochen nachgewiesen werden konnte.

Wesentlich aussagekräftiger ist die Untersuchung der motorischen Funktion der hinteren Extremität, die nur auf der korrespondierenden Hemisphäre repräsentiert ist. An Hand des Beam walking Tests konnten somit motorische Defizite der hinteren Extremität eindeutig quantifiziert werden (Goldstein L.B. et al., 1990; Soblosky J.S. et al., 1996; Beaumont A. et al., 1999; Dixon C.E. et al., 1999), die Rückschlüsse auf die Funktionsbeeinträchtigung der jeweiligen Hemisphäre zulässt, obgleich auch die Gleichgewichtsfunktion und die Koordination die Ergebnisse mit beeinflussen (Allen G.V. et al., 2001).

Abhängig von der Stärke des Traumas zeigten die Tiere in unseren Versuchen eine signifikante Zunahme der Fehlritte beim Überqueren des Balkens. In Einklang mit unseren Ergebnissen konnte auch G.B. Fox (Fox G.B. et al., 1998) ausgehend von 3 - 5 Fehlritten vor Trauma eine Zunahme der Fehlritte auf über 40 nach experimentellem SHT beobachten. In einem Zeitraum von 14 Tagen verbesserten sich die motorischen Defizite signifikant, verblieben jedoch auf einem Residualzustand von 20 Fehlritten. Das motorische Defizit der Tiere zeigt sich zudem auch in der signifikant verlängerten Zeit, die die Mäuse zum Überschreiten des Balkens benötigen (10 Sekunden prä-OP vs. 45-55 Sekunden 2 Tag post OP) (Piot-Grosjean O. et al., 2001; Wagner A.K. et al., 2003).

#### 4.6.3. Kognition und Orientierung im Raum

Um die örtliche Orientierung und das räumliche Gedächtnis der Tiere zu testen entwickelte R. Morris 1984 eine Versuchsanordnung, bei der Ratten eine Plattform, die in einem Wasserbecken versteckt ist, finden müssen. Dabei können sich die Tiere an Kreise und Vierecke an den Wänden des Wasserbeckens orientieren. Die Plattform darf dabei jedoch nicht sichtbar sein (Zohar O. et al., 2003). Seither ist diese Versuchsanordnung als Morris water Maze bekannt (Morris R. et al., 1984).

Unsere Beobachtungen erstrecken sich von 1 Tag prä-OP bis zu 3 Tage post-OP. Dabei zeigten unsere Untersuchungen, wie auch Ergebnisse um die Gruppen von D.H. Smith, J.Isaksson und N. Aoyama (Smith D.H. et al., 1995; Isaksson J. et al., 2001; Aoyama N. et al., 2002), im Vergleich zu sham operierten Tieren, eine signifikante Verlängerung der Zeit, bis traumatisierte Tiere die Plattform gefunden haben. Einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen *strong*, *moderate* und *mild* traumatisierter Tiere konnten wir jedoch nicht feststellen.

Ein Grund dafür könnte in dem relativ kurzen und traumanahen Beobachtungszeitpunkt liegen. Bei Untersuchungen 7-14 Tage nach CCI an der Ratte konnte S.W. Scheff (Scheff S.W. et al., 1997), im Gegensatz zu N. Aoyama (Aoyama N. et al., 2002), durchaus eine traumaintensitätsabhängige Verlängerung der Suchzeit bei Ratten feststellen. Andererseits konnte auch C.E. Dixon bei Langzeituntersuchungen bis zu 90 Tage nach Trauma (weight drop und CCI) kein signifikanter Unterschied zwischen leicht und stärker geschädigten Tieren feststellen, jedoch einen signifikanten Unterschied zur sham operierten Kontrollgruppe (Dixon C.E. et al., 1999; Zohar O. et al., 2003). Die Inkohärenz der publizierten Ergebnisse lässt vermuten, dass dieser Test neben dem räumlichen Orientierungsvermögen und der Kognition, stark von den motorischen Fähigkeiten, der Motivationslage und dem Stress für die Tiere im Wasser abhängig ist.

Eine Alternative zu dem stressverbunden Morris water Maze Test die räumliche Orientierungsfähigkeit und die kognitive Leistung der Mäuse zu quantifizieren, stellt der Barnes circular Maze Test dar. C.A. Barnes entwickelte 1974 diesen Test um den Einfluss des Alterns der Ratten auf die neurophysiologischen Veränderungen und das Verhalten zu untersuchen (Barnes C.A. et al., 1979). G. Koopmans (Koopmans G. et al., 2003) hat 2003 das Modell des Barnes circular Maze für unterschiedliche Mausstämme untersucht. Er stellte dabei fest, dass bei C57/Bl6 Mäusen die Zeit und die Anzahl der Fehlversuche durch tägliches Trainieren gesenkt werden kann. Bereits 1998 hat G.B. Fox zudem gezeigt, dass nach CCI Trauma bei Mäusen, die Zeit, bis die Tiere den Fluchttunnel finden, im Vergleich zu Kontrolltieren signifikant verlängert ist (Fox G.B. et al., 1998).

In unseren Experimenten konnten wir jedoch keinen Unterschied zwischen sham operierten und unterschiedlich stark traumatisierten Tieren nachweisen.

Ein Grund dafür liegt, wie beim Morris water Maze Test, sicherlich an den kurzen Trainingszeiten, dem frühen Untersuchungszeitpunkt 1-3 Tage post CCI Trauma und an den kleinen Tiergruppen.

In Zusammenschau der Befunde erschien uns zur Beurteilung des Allgemeinbefindens und des neurologischen Outcomes der Tiere die Verwendung der Gewichtskurven und der Beam walking Test adequat. Beide Untersuchungen sind einfach, und ohne großes Training durchzuführen und lassen signifikante Aussagen zu.

## **4.7. Einfluss der Entlastungskraniektomie**

### **4.7.1. Aktueller Stand der Therapie**

Obgleich in der Diagnostik und Rehabilitation von Patienten mit schweren SHT in den letzten 30 Jahren enorme Fortschritte erzielt wurden, bleibt die Therapie des

malignen Hirnödems, das zur raschen Zunahme des intrakraniellen Drucks führt, für Neurochirurgen und Intensivmediziner ein ungelöstes Problem. Bei Versagen konservativer Therapien (Hyperventilation, Mannitol, hyperosmolaren Lösungen, Hypothermie und hochdosis Barbiturat Therapie) wird daher von der Amerikanischen und Europäischen Society für Neurochirurgie die Entlastungskraniektomie, als Therapie der zweiten Wahl, empfohlen (The Brain Trauma Foundation. The American Association of Neurological Surgeons. The Joint Section of Neurotrauma and Critical Care 1996; Maas A.I. et al., 1997). Aufgrund eines Mangels an klinisch randomisierten prospektiven Studien und nur wenigen retrospektiven Studien wird der Nutzen der Kraniektomie für das Outcome der Patienten jedoch stark kontrovers diskutiert. In einem klinischen Übersichtsartikel hat V. Kontopoulos (Kontopoulos V. et al., 2002) eine Auswahl der aktuelle Literatur zum Einsatz der Kraniektomie zusammengestellt.

<b>Outcome (GOS)</b>	<b>Polin et al. (1997)</b>	<b>Kunze et al. (1998)</b>	<b>Guerra et al. (1999)</b>	<b>Münch et al. (2000)</b>	<b>Thessaloniki Kontopoulos et al. (2000)</b>
Mortalität (1)	23%	11%	19%	59%	22%
Vegetativer Status und schwere Behinderung (2-3)	40%	32%	20%		11%
Moderate Behinderung (3-4)	37%	56%	58%	41%	66%

**Abb. 52:** Outcome von Patienten nach Schädel-Hirntrauma und Kraniektomie an Hand ausgewählter Literaturbeispielen (T. Kontopoulos)

In der Studie von Polin (Polin R.S. et al., 1997) wurden im Zeitraum zwischen 1984 und 1993 35 Patienten mit malignem cerebralen Ödem einer bifrontalen Kraniektomie unterzogen. Das Durchschnittsalter der Patienten lag bei 18,7 Jahren und einem initialen GCS von 5,6. Das Outcome der Patienten wurde an Hand des GOS am Tag der Entlassung aus dem Krankenhaus, durchschnittlich  $63 \pm 46,1$  Tage (Range: 10 – 220 Tage) nach Trauma, evaluiert. 7% der Patienten wurden in gutem Zustand, 26% mit leichten und 32% mit schweren Behinderungen und 17% im vegetativem Status entlassen. 23% verstarben während des Klinikaufenthaltes. Insgesamt zeigten, trotz des niedrigen Durchschnittsalters, 63% ein schlechtes Outcome, wobei Patienten, die innerhalb von 48 Stunden post Trauma operiert wurden (46%), ein signifikant besseres Outcome aufwiesen ( $p < 0,022$ ) als Patienten die erst nach 48 Stunden operiert wurden. Als ausgesprochen kritisch in dieser Studie ist die Ligatur des Sinus sagittalis superior anzusehen, weil dadurch der venöse Blutabfluss massiv gestört wird.

In den Untersuchungen von Guerra et al. waren deutlich weniger Patienten mit GOS von 1 oder 2 verzeichnet. Auch er führte eine bifrontale Kraniektomie bei 57 Patienten zwischen 1977 und 1997 durch, wobei er jedoch den Sinus sagittalis während der OP schonte. Auf Grund seiner erhobenen Daten empfiehlt Guerra die Kraniektomie nur bei Patienten, die jünger als 50 Jahren sind, sich unter konservativer Therapie bereits im GCS verbesserten und keinerlei Hirnstammzeichen aufweisen (Guerra WK-W. et al., 1999).

Elke Münch (Münch E. et al., 2000) unterschied bei der retrospektiven Auswertung ihrer Patientendaten (49 zwischen 1995 bis 1998) zwischen unmittelbar nach Trauma kraniektomierten (63,3%;  $4,5 \pm 3,8$  Stunden) und Patienten mit einer verzögerten Kraniektomie (36,7%;  $56,2 \pm 57,0$  Stunden). Subdural- oder Epiduralhämatome mit einem Durchmesser von  $> 1$  cm, oder intrakranielle Hämatome  $> 25$  ml und eine einseitige intrakranielle Läsion mit einer Mittellinienverlagerung von  $> 1$ cm wurden sofort operiert, während eine verzögerte Kraniektomie erst dann durchgeführt wurde, wenn der ICP, trotz konservativer



Therapie, für über 15 Minuten  $> 30$  mmHg lag. Bei Patienten, die jedoch auf beiden Seiten intrakranielle Läsionen aufwiesen oder lichtstarre Pupillen zeigten, wurden keine operativen Maßnahmen durchgeführt. Es wurde eine große, unilaterale frontotemporoparieto-okkzipitale Kraniektomie durchgeführt. Das mittlere Alter der Patienten lag bei  $43 \pm 17,8$  Jahren; der initiale GCS bei  $8 \pm 4$  Punkten. Bei der Auswertung ihrer Daten zeigte sich, dass Patienten mit initialem GCS  $> 8$  und einem Alter jünger als 50 Jahre signifikant besser abschnitten als ältere Patienten oder solche mit einem GCS  $< 8$  Punkten. Das Zeitintervall zwischen Trauma und Kraniektomie hatte jedoch keinen Einfluss auf den GOS bei der Entlassung der Patienten von der Intensivstation. Das Outcome 6 Monate nach Trauma war jedoch bei Patienten mit einer unmittelbar nach Trauma durchgeführten Kraniektomie signifikant besser als bei Patienten mit einer verzögert durchgeführten Kraniektomie. Eine ähnliche Differenzierung in früh- und spätkraniektomierte Patienten ( $n=40$ ) nahm auch J. Albanèse (Albanèse J. et al., 2003) vor. Patienten mit einem initialen GCS  $< 6$ , klinischen Zeichen einer Einklemmung und im CT nachgewiesene Zeichen für eine Hirnschwellung (ICP wurde nicht gemessen) wurden innerhalb der ersten 24 Stunden nach Trauma operiert. In die spätkraniektomierte Gruppe der (OP  $> 24$  Stunden nach Trauma) wurden Patienten mit konservativ nicht kontrollierbaren ICP Werten  $> 35$  mmHg, ein- oder beidseitigem Ausfall der Pupillenreflexe oder im CT nachgewiesene Zeichen einer Hirnschwellung oder Herniation eingeschlossen. Bei der Untersuchung der Patienten 1 Jahr nach Kraniektomie zeigte sich in der spätkraniektomierten Gruppe ein GOS von 4 + 5 in 38%, ein GOS von 2 + 3 in ebenfalls 38% und in 23% ein GOS von 1, wohingegen frühkraniektomierte nur in 18,4% ein GOS von 4 + 5, und nur 29,4% ein GOS von 2 + 3 erreichten. 52% der Patienten verstarben (GOS = 1). Eine Erklärung für diese starke Diskrepanz, v.a. zu den Ergebnissen von Elke Münch, ist sicherlich in den Einschlusskriterien zu finden, da nur die schwersten Fälle, inklusive Patienten mit einer Hirnstammsymptomatik, in die frühkraniektomierte Gruppe eingeschlossen wurden, und dadurch die beiden Gruppen miteinander nicht vergleichbar sind.

Eine ähnliches Problem liegt auch der Studie von A.M. Messinger-Jünger (Messinger-Jünger A.M. et al., 2003; Unterberg A. et al., 2003) zu Grunde. An 87 Patienten untersuchte sie retrospektive das Outcome zwischen früh- und spätkraniektomierten Patienten. Auch sie konnte keinen signifikanten Vorteil einer frühzeitigen Kraniektomie nachweisen, wobei frühkraniektomierte Patienten auch hier einen initialen GCS von 4,4 und spätkraniektomierte von 7,8 aufwiesen.

#### 4.7.2. Frühkraniektomie bei Kindern

Aus Studien, die bei Kindern durchgeführt wurden, weiß man jedoch, dass sehr früh nach Trauma durchgeführte Kraniektomien durchaus das Outcome erheblich verbessern können (Dam Hieu P. et al., 1996; Taylor A. et al., 2001; Hejazi N. et al., 2002; Figaji A.A. et al., 2003). In der Arbeit von A. Tayler wurden die Kinder durchschnittlich 19,3 Stunden nach Trauma operiert. Er verglich den Verlauf des ICP und das langfristige Outcome der Patienten (n = 13) mit einer ausschließlich konservativ behandelten Kontrollgruppe (n = 14). Dabei stellte er fest, dass der durchschnittliche ICP Wert der kraniektomierten und konservativ weiterbehandelten Patienten 48 Stunden nach OP um 8,98 mmHg niedriger lag als in der Kontrollgruppe. Zudem zeigten sie innerhalb der ersten 48 Stunden post OP signifikant weniger Episoden erhöhter ICP Werte (ICP > 20 mmHg: 107 vs. 223 mal pro 48 h und ICP > 30 mmHg: 9 vs. 59 mal pro 48 h). 6 Monate nach Trauma wiesen 7 von 13 kraniektomierten Kindern ein gutes und nur 6 von 13 ein schlechtes neurologisches Outcome auf, wohingegen in der konservativ behandelten Kontrollgruppe nur 2 von 14 ein gutes und 12 von 14 ein schlechtes Outcome zeigten.

### 4.7.3. Diskussion der experimentellen Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit konnten wir erstmals nachweisen, dass durch eine unmittelbar nach experimentellem SHT durchgeführten Entlastungskraniektomie der Anstieg des intrakraniellen Drucks komplett verhindert werden konnte und der Abfall der cerebralen Durchblutung deutlich reduziert wurde. Bei Mäusen, die in einem Zeitfenster von bis zu 3 Stunden nach CCI Trauma kraniektomiert wurden, konnte somit die Ausbildung des sekundäre Hirnschadens innerhalb der ersten 24 Stunden nahezu vollständig verhindert werden. Dadurch hatten kraniektomierte Tiere eine deutlich verbesserte neurologische Funktion im Vergleich zu Tieren der nicht kraniektomierten Kontrollgruppe.

Unsere Ergebnisse unterstützen somit die Hypothese, dass eine frühzeitige Kraniektomie auch beim Menschen die Ausbildung des sekundären Hirnschadens deutlich reduzieren könnte. In einer 2002 veröffentlichten Arbeit konnte G.H. Schneider (Schneider G.H. et al., 2002) eindrucksvoll darstellen, dass durch die Kraniektomie der ICP von 40 mmHg auf 10 mmHg gesenkt und die cerebrale Durchblutung von 65 mmHg auf 78 mmHg gesteigert werden konnte. Diese Ergebnisse zeigen einen ähnlichen Verlauf wie wir ihn auch experimentell an der Maus beobachten konnten. Es wäre folglich auch vorstellbar, bei frühzeitig durchgeführter Kraniektomie, den sekundären Hirnschaden beim Menschen zu verhindern.

Gegenstand der Diskussion sind jedoch nach wie vor die Einschlusskriterien für die Durchführung einer Kraniektomie und die anzuwendende Technik. Es verdichten sich jedoch Anzeichen für eine frühzeitige und weit ausgedehnte Kraniektomie, z.T. auch die Durchführung einer bilateralen Kraniektomie, und ein Ausschluss von Patienten mit Hirnstambbeteiligung (Holland M. et al., 2004). Zur weiteren Klärung dieser Fragen müssten jedoch klinisch randomisierte prospektive Studien mit vergleichbaren Ausgangsgruppen durchgeführt werden. Nur somit kann verhindert

werden, dass eine effektive Therapieoption für Patienten mit schweren SHT nicht oder zu spät eingesetzt wird.

## **4.8. Das Kallikrein-Kinin System**

### 4.8.1. Die Bedeutung von Bradykinin B<sub>1</sub>- und B<sub>2</sub>- Rezeptoren für die Ausbildung des sekundären Hirnschadens

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Prof. Nussberger konnten wir einen signifikanten Anstieg der Bradykininkonzentration im traumatisierten Hirnparenchym 4 Stunden nach experimentelem SHT nachweisen. Um die pathologische Bedeutung der Bradykinin B<sub>1</sub>- und B<sub>2</sub>- Rezeptoren zu untersuchen, haben wir das Nekrosevolumen von Bradykinin B<sub>1</sub>- und B<sub>2</sub>- Rezeptor knock-out Mäusen, sowie das Hirnödem von B<sub>2</sub> knock-out Tieren im Vergleich zu rezeptorkompetenten C57/Bl6 Kontrolltieren, 24 Stunden nach CCI Trauma bestimmt. Dabei haben wir eine signifikante Reduktion des Nekrosevolumens und des Hirnödems bei Bradykinin B<sub>2</sub>KO Tieren nachweisen können, während die Nekrosevolumina von B<sub>1</sub>KO vs. C57/Bl6 Kontrolltieren keinen Unterschied zeigten.

Bereits mehrfach wurde in der Literatur beschrieben, dass es im Rahmen einer posttraumatischen Entzündungsreaktion zur Aktivierung des Kallikrein-Kinin Systems kommt (Rodell T.C. et al., 1996). Bereits 1989 zeigte Andreasson (Andreasson S. et al., 1989), dass das Kallikrein-Kinin System nach experimentellem Lungenkontusionstrauma bei Schafen aktiviert wird. Auch bei Patienten mit ARDS (Acute respiratory distress syndrome) konnte eine Aktivierung dieses Systems nachgewiesen werden (Carvalho A.C. et al., 1988). Dabei kommt es zur peripheren Vasodilatation, zum Anstieg der Gefäßdurchlässigkeit, zur Stimulation von Immunzellen und zur Auslösung von Schmerzen (Walker K. et al., 1995; Pela I.R. et al., 1996).

Auch im zentralen Nervensystem wurde bereits der Nachweis für die Existenz von Bradykinin B<sub>1</sub>- und B<sub>2</sub>- Rezeptoren erbracht (Regoli D. et al., 1984; Murone C. et al., 1997; Raidoo D.M. et al., 1997; Chen E.Y. et al., 2000; Mahabeer R. et al., 2000). Die Aktivierung des Kallikrein-Kinin Systems führt vor allem zu einer Zunahme des Blutflusses und zur Eröffnung der Blut- Hirnschranke (Walker K. et al., 1995). Bereits 1986 beschrieb A. Unterberg (Unterberg A. et al., 1986) am Kälteläsions Traumamodell bei Ratten, dass es durch die gezielte Blockade der Plasmaproteasen des Kallikreins zur signifikanten Reduktion des Hirnödems kommt. In einer ersten klinischen multizentrischen Studie konnte A. Marmarou (Marmarou A. et al., 1999) an 133 SHT Patienten nachweisen, dass eine Applikation des Bradykinin Blockers Bradykor (3µg/kg/min) innerhalb von 12 Stunden nach Trauma, und Fortführung der Therapie bis zum 5. Tag, eine Reduktion des ICP und der Mortalität zeigte. Die Unterschiede zur Kontrollgruppe waren jedoch nicht signifikant. Die systemischen Blutdruckwerte entsprachen dabei der Kontrollgruppe. Obgleich es Hinweise gibt, dass Bradykinin B<sub>1</sub>- Rezeptoren bei der Signaltransduktion via Inositoltrisphosphat und NO zur Blutdruckregulation und zur Hirnödementstehung beitragen (Emanueli C. et al., 1999; Prat A. et al., 2000), verdichten sich die Hinweise, dass es vor allem Bradykinin B<sub>2</sub>- Rezeptoren sind, die zur Eröffnung der Blut- Hirnschranke führen (Regoli D. et al., 1984; Mayhan W.G. et al., 1996; Wahl M. et al., 1996; Wahl M. et al., 1999). Neben einer cerebralen Vasodilatation (Lindsey C.J. et al., 1989; Wahl M. et al., 1996), konnte von M. Wahl (Wahl M. et al., 1996) und A. Unterberg (Unterberg A. et al., 1984) bereits 1984 gezeigt werden, dass es durch die Ca<sup>2+</sup> vermittelte Kontraktion von Endothelzellen zur Eröffnung der tight junctions und zur Flüssigkeitsextravasation ins umliegende Gewebe und zur Ausbildung eines Ödems kommt. Die kontinuierliche Applikation von Hoe 140, einem selektiven Bradykinin B<sub>2</sub>- Rezeptor Antagonisten, 1 Stunde vor, und bis zu 24 Stunden nach Kälteläsionstrauma zeigte bei Ratten eine signifikante Reduktion des Nekrosevolumens um -19% und des Hirnödems um -14% (Görlach C. et al., 2001). Durch die Applikation des Bradykinin B<sub>1</sub>-

Rezeptorblockers B 9858 oder 0,9% Na<sup>+</sup>Cl-Lösung konnte kein positiver Effekt erzielt werden.

Diese Untersuchungen bestätigen unsere Ergebnisse, dass vor allem der Bradykinin B<sub>2</sub>- Rezeptor für die Ausbildung des Hirnödems, dem dadurch bedingten Anstieg des ICP und der Zunahme des Nekrosevolumens verantwortlich ist.

Neben Hoe 140 wurden noch weitere spezifische B<sub>2</sub>- Rezeptorantagonisten entwickelt und charakterisiert. Zu erwähnen sind hierbei WIN 64338, NPC 18884, FR 167344, FR 173657, LF 16-0335 und LF 16-0687 (Hall J.M. et al., 1997; Regoli D., 1998; Heitsch H. et al., 2002; Robert C. et al., 2002).

#### 4.8.2. Selektive Blockade des Bradykinin B<sub>2</sub>- Rezeptors durch LF 16-0687

In der vorliegenden Arbeit haben wir die Wirkung von LF 16-0687 auf den ICP, CBF, MAP, das Hirnödem und das Nekrosevolumen in zwei unterschiedlichen Dosierungen untersucht:

Unter repetitiv intravenös verabreichten, niedrig dosierten LF 16-0687 Gaben (Bolus 15 min. post CCI: 0,3 mg/kgKG + 0,15 mg/kgKG alle 30 min.) konnte innerhalb des Beobachtungszeitraums von 120 Minuten kein positiver oder negativer Einfluss auf den ICP, den CBF oder den MAP nachgewiesen werden. Ebenso zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bei der Quantifizierung des Hirnödems und des Nekrosevolumens nach kontinuierlicher Gabe des Pharmakons via Alzet Mikro Pumpen (Bolus 15 min. post CCI: 0,5mg/kgKG s.c. + kontinuierliche Gabe von 1 µl/h mit einer Konzentration von 0,25 mg/kgKG).

Nach Verabreichung von hoch dosiertem LF 16-0687 (3,0 mg/kgKG 15min und 8h post CCI s.c.) konnte der ICP 10h und das Nekrosevolumen 24h nach experimentellem SHT signifikant reduziert werden.

D. Pruneau (Pruneau D. et al., 1999 (a)) zeigte erstmals 1999 an Ratten nach weight-drop Trauma, dass die kontinuierliche intravenöse Infusion von LF 16-0687 (in

maximaler Dosis von 100 µg/kg/min = 138 mg/kg KG Gesamtdosis) zur signifikanten Reduktion der Zunahme des Hirnödems um 64% führte. Dabei wurde das Pharmakon von 1 Stunde bis 23 Stunden nach Trauma kontinuierlich infundiert. Parallel dazu hatte D. Pruneau den Einfluss der Substanz auf den systemischen Blutdruck 1 h prä- und bis zu 2 Stunden post Trauma gemessen und zeigen können, dass der MAP nach Trauma nur tendenziell niedriger ist als in der Kontrollgruppe. Mit einer Dosierung von 10 oder 30 µg/kg/min. (= 13,8 mg/kgKG und 41,4 mg/kg Gesamtdosis) konnte die Ausbildung des Hirnödems jedoch nicht beeinflusst werden. Ferner konnte D. Pruneau nachweisen, dass durch die subkutane Injektion von LF 16-0687 vor einer 20 minütigen transjugulären Bradykinininfusion die Bindung von Bradykinin an Rezeptoren am Rattenuterus, an menschlichen Umbilikalvenen und am Ileum von Schweinen kompetitiv gehemmt wird (Pruneau D. et al., 1999 (b)). J.F. Stover (Stover J.F. et al., 2000 (c); Stover J.F. et al., 2000 (a)) zeigte an Ratten nach CCI Trauma, dass eine subkutane Injektion von 3mg/kgKG und 30 mg/kgKG LF 16-0687 5 Minuten nach Trauma zur signifikanten Reduktion der prozentualen Hirnschwellung führte. Auf der nicht traumatisierten Hemisphäre nahm jedoch der Wassergehalt um den gleichen Prozentteil zu. Zudem wurde das Zeitfenster der Applikationsmöglichkeit untersucht. Dabei stellte J. Kaplanski (Kaplanski J. et al., 2002) fest, dass bei einer subkutanen Verabreichung von 2,5 mg/kgKG LF 16-0687 1h (-45%), 2h (-52%) und 4h (-63%) nach diffusem SHT es zu einer signifikanten Reduktion des Hirnödems 24h nach Trauma kam. Eine Applikation erst 10 Stunden nach Trauma zeigte sich jedoch nur wenig effektiv (-24%). Interessanterweise wurden ähnliche Ergebnisse bei völlig unterschiedlichen Applikationsformen und Konzentration erzielt. Ähnlich wie D. Pruneau injizierte M. Rachinsky (M. Rachinsky. et al., 2001) LF 16-0687 intravenös, beginnend 1 Stunde nach Trauma. Bei einer Konzentration von 100µg/kg/min (=138 mg/kgKG Gesamtdosis) konnte er im Vergleich zu einer Konzentration von 10 µg/kg/min. (=13,8 mg/kgKG) eine signifikante Reduktion des Hirnödems auf  $80,0 \pm 1,4\%$  im Vergleich zur Kontrollgruppe mit NaCl ( $82,9 \pm 1,3\%$ ) erzielen. In der Gruppe mit

niedriger Dosierung hingegen nahm das Ödem auf  $84,0 \pm 1,4\%$  zu. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu Arbeiten von N. Plesnila (Plesnila N. et al., 2001), S. Zausinger (Zausinger S. et al., 2002) und J. Schulz (Schulz J. et al., 2000), die gerade in mit niedrigen LF 16-0687 Konzentrationen die größte Ödemreduktion erzielten.

In der derzeit zur Verfügung stehenden Literatur wurde bislang nie der Einfluss von LF 16-0687 auf das Nekrosevolumen beschrieben. Insofern bleibt die Frage offen, ob in den publizierten Studien nur das Hirnödem kleiner wird, beziehungsweise sich verlagert, oder tatsächlich eine zelluläre Neuroprotektion stattfindet.

#### 4.8.1. Interpretation der Ergebnisse

Alle Untersuchungen mit LF 16-0687 wurden bislang an Ratten durchgeführt. Die Ergebnisse bezüglich einer empfohlenen Dosierung waren stark widersprüchlich. Die Pharmakokinetik bei Mäusen unterscheidet sich aber grundsätzlich von der bei Ratten. LF 16-0687 erzielt innerhalb von 30 Minuten eine 8 fach höhere Serumkonzentrationen und fällt rasch innerhalb von 2h wieder unter den empfohlenen Wirkstoffspiegel ab. Es fehlten uns somit Vergleichsarbeiten zur Wahl einer adequaten Dosis und Verabreichungsform des Pharmakons. Von Laboratories Fournier Research haben wir Kurven der Enzymkinetik der Mäuse, im Vergleich zur Rattenkinetik, zur Verfügung gestellt bekommen. Ausgehend von diesen Untersuchungen haben wir die entsprechenden Dosierungen berechnet und verabreicht. Die Ergebnisse zeigen allerdings, dass die gewählte Dosierung (von 0,3 mg/kg KG) zu niedrig zu sein scheint. Nach Erhöhung der Dosis um den Faktor 10 (auf 3,0 mg/kg KG) konnte auch an der Maus eine Reduktion des ICP 10h, und erstmals auch eine Verkleinerung des Nekrosevolumens 24h nach Trauma nachgewiesen werden. Somit konnte eine Neuroprotektion von LF 16-0687 durch die spezifische Blockade des Bradykinin B<sub>2</sub>- Rezeptors erstmals bewiesen werden.



Da wir in unseren Untersuchungen den Hirnwassergehalt beider Hemisphären gemeinsam bestimmt haben, kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich eine eventuelle Abnahme des Wassergehalts der traumatisierten Hemisphäre durch eine Zunahme der kontralateralen Seite, wie in Arbeiten von J.F. Stover beschrieben (Stover J.F. et al., 2000 (c); Stover J.F. et al., 2000 (a)), nivelliert hatte. Im Vergleich zu Ratten ist der Trennungsfehler der Hemisphären bei Mäusen so groß, dass sich kleine Unterschiede ausgleichen können.

Da der Zustand von Patienten nach einem SHT sich im Laufe des klinischen Aufenthaltes auf Grund des fortschreitenden sekundären Nekrosewachstums verschlechtert, erscheint der Einsatz der Entlastungskraniektomie in vielen Fällen erst retrospektiv indiziert. Somit stellt die Hemmung spezifischer Pathomechanismen des sekundären Nekrosewachstums eine sinnvolle Therapieoption dar.

Der Beweis für die Involvierung des Kallikrein-Kinin Systems bei der posttraumatischen Hirnschädigung wurde bereits erbracht, dennoch scheint der detaillierte pathophysiologische Ablauf z.T. noch unverstanden zu sein und die Ergebnisse der Literatur erscheinen widersprüchlich (Regoli D., 1984; Unterberg A. et al., 1986; Baethmann A., et al., 1988; Wahl M. et al., 1993; Wahl M., et al., 1996; Rodell T.C., 1996; Wahl M., et al. 1999). Somit ist die weitere Erforschung dieses Systems unverzichtbar. So wurde z.B. in Untersuchungen über die Rolle des Bradykinin Systems bei pulmonalen Erkrankungen bereits 1989 die Existenz eines Bradykinin B<sub>3</sub>- Rezeptors angenommen (Farmer SG., 1989; Farmer SG., 1991; Richard T., 2003; Farmer SG., 1994). Es gibt derzeit jedoch keine einzige Untersuchung, über die Existenz oder die Wirkungsweise dieses Rezeptors im Gehirn. Somit könnte man mutmaßen, dass bei der Ausbildung des sekundären Hirnschadens, neben Bradykinin B<sub>1</sub>- und B<sub>2</sub>- Rezeptoren, auch B<sub>3</sub>- Rezeptoren involviert sein könnten.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Das schwere Schädel- Hirntrauma ist die häufigste Ursache für Mortalität und dauerhafte Morbidität in der Altersgruppe unter 45 Jahren. Die therapeutischen Möglichkeiten sind jedoch begrenzt. Der Einsatz einer Entlastungskraniektomie wird auf Grund des Mangels an prospektiven randomisierten klinischen Studien kontrovers diskutiert. Auch die Möglichkeit, das sekundäre Nekrosewachstum durch spezifische Einflussnahme auf pathophysiologische Veränderungen zu reduzieren, wie die Aktivierung des Kallikrein-Kinin Systems, ist derzeit Gegenstand wissenschaftlicher Überlegungen. Aufgrund dessen befasst sich die vorliegende Arbeit mit folgenden Fragestellungen:

- 1) Wie verhält sich im tierexperimentellem Modell der ICP, der CBF, das Nekrosevolumen und das funktionelle Outcome der Mäuse nach Controlled Cortical Impact Trauma?
- 2) Welchen Einfluss hat eine Entlastungskraniektomie auf den ICP, CBF, das Nekrosevolumen und das neurologisch Outcome der Tiere, und wann sollte diese durchgeführt werden?
- 3) Zu welchem Zeitpunkt nach experimentellem SHT kommt es zum Anstieg der perikontusionellen Bradykinin-Konzentration und über welche Rezeptoren (Bradykinin B<sub>1</sub>- oder B<sub>2</sub>- Rezeptoren) ist deren Wirkung vermittelt.
- 4) Kann durch eine spezifische pharmakologische Inhibition des Bradykinin B<sub>2</sub>-Rezeptors durch LF 16-0687 der Anstieg des ICP und die Ausbildung des sekundären Hirnschadens reduziert werden?

An dem Model des Controlled Cortical Impact Traumas konnten wir reproduzierbar einen postkontusionellen Anstieg des ICP und einen Abfall der CBF der kontralateralen Hemisphäre nachweisen. Zugleich quantifizierten wir den morphologischen Schaden an Nissl gefärbten Gefrierschnitten, den Hirnwassergehalt und das neurlogische Outcome der Tiere an Hand funktionaler Tests.

Wir konnten erstmals zeigen, dass durch den Einsatz der Entlastungskraniektomie, auch bei einer Verzögerung bis zu 3 Stunden nach experimentellem SHT, die Ausbildung des sekundären Hirnschadens nahezu vollständig verhindert werden konnte. Auch der Anstieg des ICP und der Abfall des CBF konnte dadurch deutlich reduziert werden. Dies führte zu einer signifikant verbesserten neurologischen Funktion der Tiere.

4 Stunden nach experimentellem SHT konnten wir in der traumatisierten Hemisphäre ein Maximum der Bradykinin Konzentration im perikontusionalen Gewebe nachweisen. Die Ausbildung des sekundären Hirnschadens scheint dabei über Bradykinin B<sub>2</sub>- Rezeptoren vermittelt zu sein. Im Gegensatz zu Bradykinin Rezeptor B<sub>1</sub> knock-out Mäusen, war bei B<sub>2</sub> knock-out Tieren das Nekrosevolumen 12 Stunden und das Hirnödem 24 Stunden nach CCI signifikant kleiner.

Durch die spezifische Blockade des Bradykinin B<sub>2</sub>- Rezeptors durch LF 16-0687 konnten der ICP 10h und das Nekrosevolumen 24h nach CCI Trauma signifikant reduziert werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der Einsatz der Entlastungskraniektomie, ebenso wie die pharmakologische Hemmung von Bradykinin B<sub>2</sub>- Rezeptoren, vielversprechend ist. In klinisch randomisierten prospektiven Studien sollte dies weiter untersucht werden. Dadurch könnte ein besseres Therapiekonzept für SHT Patienten entwickelt und das weitgehend schlechte Outcome der Patienten verbessert werden.

## **6. LITERATURVERZEICHNIS**

- ADAMS H., MITCHELL D.E., GRAHAM D.I. et al. (1977). Diffuse brain damage of immediate impact type. Ist relationship to „primary brain stem damage“ in head injury. *Brain* 100: 489-502.
- ALBANÈSE J., LEONE M., ALLIEZ J-R., et al. (2003). Decompressive Craniectomy for Severe Traumatic Brain Injury: Evaluation of the Effects at One Year. *Crit Care Med* 31, 10: 2535-2538.
- ALLEN GV., CHASE T. (2001). Induction of Head Shock Proteins and Motor Function Deficits after Focal Cerebellar Injury. *Neuroscience* 102, 3: 603-614.
- ANDRADE de FC., ANDRADE de FC. Jr. (2000). Use and Abuse of Hyperventilation in Severe Traumatic Brain Injury. *Arq Neuropsiquiatr.* 58, 3: 648-655.
- ANDREASSON S., SMITH L., AASEN AO., et al. (1989). Proteolytic and Lysosomal Enzymes in Acute Trauma-Induced Lung Injury in Sheep. *Acta Chir Scand* 155, 1: 1-6.
- ANDREW PJ., PIPER IR., DEARDEN NM., et al. (1990). Secondary Insults during Intrahospital Transport of Head Injured Patients. *The Lancet* 335: 327-330.
- AOYAMA N., KATAYAMA Y., KAWAMATA T., et al. (2002). Effects of Antioxidant, OPC-14117, on Secondary Cellular Damage and Behavioral Deficits following Cortical Contusion in the Rat. *Brain Research* 934: 117-124.
- ASA I., IVASHKOVA Y., ARTRU AA., et al. (2003). LF 16-0687 Ms, a New Bradykinin B2 Receptor Antagonist, Improves Neurological Outcome but Not Brain Tissue Prostaglandine E2 Release in a Rat Model of Closed Head Trauma Combined with Ethanol Intoxication. *J Trauma* 54, 5: 881-887.
- BAETHMANN A., KEMPSKI O., Unterberg A., et al. (1982). Origin and therapy of secondary brain damage. *MMW. Münch.Med.Wochenschr.* 124: 941-944.
- BAETHMANN A., MAIER-HAUFF K., KEMPSKI O. et al. (1988). Mediators of Brain Edema and Secondary Brain Damage. *Crit Care Med.* 16, 10: 972-978.
- BAETHMANN A., WIRTH A., SCHLESINGER-RAAB A. and Study Group of the BMBF Research Consortium Neurotraumatology and Neuropsychological Rehabilitation (2002). Prospectiv System Analysis of the Pre- and Early Hospital Care in Severe Head Injury in Bavaria at a Population-Based Level. *Eur Surg Res* 2002; 34: 42-46.
- BARNES CA. (1979). Memory Deficits Associated with Senescence: a Neurophysiological and Behavioral Study in the Rat. *J Comp Physiol Psychol.* 93, 1: 74-104.
- BASKAYA MK., RAO AM., DOGAN A., et al. (1997). The Biphasic Opening of the Blood- Brain Barrier in the Cortex and Hippocampus after Traumatic Brain Injury in Rats. *Neuroscience Letters* 226: 33-36.
- BEAUMONT A., MARMAROU A., CZIGNER A., et al. (1999). The Impact-Acceleration Model of Head Injury: Injury Servity Predicts Motor and Cognitive Performance after Trauma. *J Neurol Res.* 21, 8: 742-754.
- BERGER S., SCHURER L., HARTL R., et al. (1995). Reduction of Post-traumatic Intracranial Hypertension by Hypertonic/Hyperosmotic Saline/Dextran and Hypertonic Mannitol. *Neurosurgery* 37, 1: 98-108.
- BOUMA GJ., MUIZELAAR JP., BANDO K., et al. (1992). Blood Pressure and Intracranial Pressure-volume Dynamics in Severe Head Injury: Relationship with Cerebral Blood Flow. *J Neurosurg* 77, 1: 15-19.
- BOUMA GJ., MUIZELAAR JP., CHOI SC., et al. (1991). Cerebral Circulation and Metabolism after Severe Traumatic Brain Injury. The Elusive Role of Ischemia. *J Neurosurg* 75, 5: 685-693.
- BOUMA GJ., MUIZELAAR JP., FATOUROS P. (1998). Pathogenesis of Traumatic Brain Swelling: Role of Cerebral Blood Volume. *Acta Neurochir (Suppl.)* 71: 272-275.
- BRYAN RM Jr., CHERIAN L., ROBERTSON C. (1995). Regional Cerebral Blood Flow after Controlled Cortical Impact Injury in Rats. *Anesthesia & Analgesia* 80: 687-695.
- BULLOCK R. (1993). Pathophysiological Alterations in the Central Nervous System due to Trauma. *Schweiz. Med. Wschr.* 123, 11: 449-458.

- CARBONELL WS., MARIS DO., McCALL T., et al. (1998). Adaptation of the Fluid Percussion Injury Model to the Mouse. *J Neurotrauma* 15, 3: 217-229.
- CARVALHO AC., DeMARINIS S., SCOTT CF., et al. (1988). Activation of the Contact System of Plasma Proteolysis in the Adult Respiratory Distress Syndrom. *J Lab Clin Med* 122: 270-277.
- CHEN EY., EMERICH DF., BARTUS RT., et al. (2000). B2 Bradykinin Receptor Immunoreactivity in Rat Brain. *J Comp Neurol* 427, 1: 1-18.
- CHEN Y., CONSTANTINI S., TREMBOVLER V., et al. (1996). An Experimental Model of Closed Head Injury in Mice: Pathophysiology, Histopathology, and Cognitive Deficits. *J Neurotrauma* 13, 10: 557-568.
- CHESNUT RM. (1995). Secondary Brain Insults after Head Injury: Clinical Perspectives. *New Horiz.* 3, 3: 366-375.
- CHESNUT RM., MARSHALL LF., KLAUBER MR., et al. (1993). The Role of Secondary Brain Injury in Determining Outcome from Severe Head Injury. *J Trauma* 34: 216-222.
- CHOI DW. (1990). Methods for antagonizing glutamate neurotoxicity. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.* 2: 105-147.
- CLARK RS., KOCHANEK PM., MARION DW., et al. (1996). Mild Posttraumatic Hypothermia Reduces Mortality after Severe Controlled Cortical Impact in Rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 16, 2: 253-261.
- CLASEN RA., BROWN DV., LEAVITT S., et al. (1953). The production by liquid nitrogen of acute closed cerebral lesion. *Surg Gynecol Obstet* 96: 605-616.
- CRUZ J., JAGGI JL., HOFFSTAD OJ. (1995). Cerebral Blood Flow, Vascular Resistance and Oxygen Metabolism in Acute Head Injury. *Crit Care Med.* 23, 8: 1412-1417.
- CUNITZ G., DANHAUSER I., GRUSS P. (1976). Effect of Enflurane on Intracranial Pressure in Comparison with Halothane. *Anaesthesist* 25, 7: 323-330.
- DAM HIEU P., SIZUN J., PERSON H., et al. (1996). The Place of Decompressive Surgery in the Treatment of Uncontrollable Post-Traumatic Intracranial Hypertension in Children. *Childs Nerv Syst* 12, 5: 270-275.
- DEMPSEY RJ., BASKAYA MK., DOGAN A. (2000). Attenuation of Brain Edema, Blood-Brain Barrier Breakdown, Injury Volume by Ifenprodil, a Polyamin-site-N-methyl-D-aspartate Receptor Antagonist, after Experimental Traumatic Brain Injury in Rats. *Neurosurgery* 47, 2: 399-406.
- DENNY-BROWN D. (1945). Cerebral Contusion. *Physiol. Rev.* 25: 296-325.
- DIETRICH WD., ALONSO O., BUSTO R., et al. (1994). Post-Traumatic Brain Hypothermia Reduces Histopathological Damage Following Concussive Brain Injury in the Rat. *Acta Neuropathol* 87, 3: 250-258.
- DIXON CE., CLIFTON GL., LIGHTHALL JW., et al. (1991). A Controlled Cortical Impact Model of Traumatic Brain Injury in the Rat. *J Neuroscience Methods* 39: 253-262.
- DIXON CE., KOCHANEK PM., YAN HQ., et al. (1999). One-Year Study of Spatial Memory Performance, Brain Morphology, and Cholinergic Markers after Moderate Controlled Cortical Impact in Rats. *J Neurotrauma* 16, 2: 109-122.
- DIXON CE., KRAUS MF., KLINE AE., et al. (1999). Amantadine Improves Water Maze Performance without Affecting Motor Behavior following Traumatic Brain Injury in Rats. *Restor Neurol Neurosci* 14, 4: 285-294.
- DIXON CE., LIGHTHALL JW., ANDERSON TE. (1988). Physiologic, histopathologic, and cineradiographic characterization of a new fluid-percussion model of experimental brain injury in the rat. *J. Neurotrauma.* 5 : 91-104.
- DIXON CE., LYETH BG., POVLISHOCK JT., et al. (1987). A Fluid Percussion Model of Experimental Brain Injury in the Rat. *J Neurosurg* 67: 110-119.
- DOPPENBERGER EM., ZAUNER A., BULLOCK R., et al. (1998). Correlation between Brain Tissue Oxygen Tension, Carbon Dioxide Tension, pH, and Cerebral Blood Flow – a Better Way of Monitoring the Severely Injured Brain. *Surg Neurol* 49, 6: 650-654.
- DOPPENBERGER EM., ZAUNER A., WATSON JC., et al. (1998). Determination of the Ischemic Threshold for Brain Oxygen Tension. *Acta Neurochir Suppl.* 71: 166-169.
- DOYLE JA., DAVIS DP., HOYT DB. (2001). The Use of Hypertonic Saline in the Treatment of Traumatic Brain Injury. *J Trauma* 50, 2: 367-383.

- DRUMMOND JC., TODD MM., SCHELLER MS., et al. (1986). A Comparison of the Direct Cerebral Vasodilating Potencies of Halothane and Isoflurane in the New Zealand White Rabbit. *Anesthesiology* 65, 5: 462-467.
- EGGERT HR., KIESSLING M., KLEIHUES P. (1985). The course of spatial distribution of neodymium: yttrium-aluminum-garnet (Nd:YAG) laser-induced lesions in the rat brain. *Neurosurgery* 16: 443-448.
- EMANUELI C., CHAO J., REGOLI D., et al. (1999). The Bradykinin B1 Receptor and the Central Regulation of Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats. *Br J Pharmacol* 126, 8: 1769-76.
- FARMER SG., BURCH RM., MEEKER SA., et al. (1989). Evidence for a Pulmonary B3 Bradykinin Receptor. *Mol Pharmacol* 36, 1: 1-8.
- FARMER SG., DeSIATO MA. (1994). Effects of a Novel Nonpeptide Bradykinin B2 Receptor Antagonist on Intestinal and Airway Smooth Muscles: Further Evidence for the Tracheal B3 Receptor. *Br J Pharmacol* 112, 2: 461-464.
- FARMER SG., ENSOR JE., BURCH RM. (1991). Evidence that Cultured Airway Smooth Muscle Cells Contain Bradykinin B2 and B3 Receptors. *Am J Respir Cell Mol Biol* 4, 3: 273-277.
- FIGAJI AA., FIEGGEN AG., PETER JC. (2003). Early Decompressive Craniotomy in Children with Severe Traumatic Brain Injury. *Childs Nerv Syst* 19: 666-673.
- FIRSCHING R., WOISCHNECK D. (2001). Present Status of Neurosurgical Trauma in Germany. *World J. Surg.* 25: 1221-1223.
- FODA MA., MARMAROU A. (1994). A New Model of Diffuse Brain Injury in Rats: Part II: Morphological Characterization. *J Neurosurg* 80, 2: 301-313.
- FOX GB., FADEN AI. (1998). Traumatic Brain Injury Causes Delayed Motor and Cognitive Impairment in a Mutant Mouse Strain Known to Exhibit Delayed Wallerian Degeneration. *J Neuroscience Research* 53: 718-727.
- FOX GB., FAN L., LeVASSEUR RA., et al. (1998). Effect of Traumatic Brain Injury on Mouse Spatial and Nonspatial Learning in the Barnes Circular Maze. *J Neurotrauma* 15, 12: 1037-1046.
- FRERICHS KU., LINDSBERG., HALLENBECK JM., et al. (1990). Platelet-activating factor and progressive brain damage following focal brain injury. *J Neurosurg.* 73: 223-233.
- FRIEDRICH DH., PLESNILA N., ERISKAT J., et al. (2000). Cerebral Blood Flow and the Secondary Growth of Brain Tissue Necrosis after Trauma. *Acta Neurochir (Suppl.)* 76: 257-259.
- GHAJAR j. (2000). Traumatic Brain Injury. *The Lancet* 356, 9: 923-929.
- GOLDING EM., CONTANT CF Jr., ROBERTSON CS. (1998). Temporal Effect of Severe Controlled Cortical Impact Injury in the Rat on the Myogenic Response of the Middle Cerebral Artery. *J Neurotrauma* 15, 11: 973-984.
- GOLDSTEIN LB., DAVIS JN. (1990). Beam Walking in Rats: Studies towards Developing an Animal Model of Functional Recovery after Brain Injury. *J Neuroscience Methods* 31, 2: 101-107.
- GÖRLACH C., HORTOÁGYI T., HORTOÁGYI S., et al. (2001). Bradykinin B2, but Not B1, Receptor Antagonism has a Neuroprotective Effect after Brain Injury. *J Neurotrauma* 18, 8: 833-838.
- GRÖGER M., LEBESGUE D., PRUNEAU D., et al. (2005). Release of Bradykinin and Expression of Kinin B<sub>2</sub> Receptors in the brain: role for cell death and brain edema formation after focal cerebral ischemia in mice. *J. Cereb. Blood Flow and Metab.* 25(8): 978-89.
- GUERRA WK-W., GAAB MR., DIETZ H., et al. (1999). Surgical Decompression for Traumatic Brain Swelling: Indications and Results. *J Neurosurg* 90: 187-196.
- GURDJIAN ES., LISSNER HP., WEBSTER., et al. (1954). Studies on experimental concussion relation of physiologic effect-time duration of intracranial pressure increase at impact. *Neurology* 4: 674-681.
- HALL JM. (1997). Bradykinin Receptors. *Gen Pharmac* 28, 1: 1-6.
- HAMM RJ., WHITE-GBADEBO DM., LYETH BG., et al. (1992). The Effect of Age on Motor and Cognitive Deficits after Traumatic Brain Injury in Rats. *Neurosurgery* 31, 6: 1072-1077.
- HANNY HJ., FELDMAN Z., PHAN P., et al. (1999). Validation of a Controlled Cortical Impact Model of Head Injury in Mice. *J Neurotrauma* 16, 11: 1103-1114.
- HANS P., DETHIER JC., GODIN D., et al. (1980). Compared Effects of Enflurane and of Halothane on the Intracranial Perfusion Pressure in the Dog. *Acta Anaesthesiol Belg. Suppl.* 31: 49-59.

- HARTL R., BRANDT TF., KIENING KL., et al. (1997). Mannitol Decrease ICP but does not Improve Brain-tissue pO<sub>2</sub> in Severly Head-injured Patients with Intracranial Hypertension. *Acta Neurochir Suppl.* 70: 40-42.
- HARTL R., GHAJAR J., HOCHLEUTHNER H., et al. (1997). Hypertonic/Hyperosmotic Saline reliably Reduces ICP in Severly Head-injured Patients with Intracranial Hypertension. *Acta Neurochir Suppl.* 70: 126-129.
- HASS GM., TAYLOR Y. (1948). A quantitative hypothermal method for the production of local injury of tissue. *AMA Arch Path* 45:563-580.
- HAYER RL., KATAYAMA Y., YOUNG Y., et al. (1988). Coma associated with flaccidity produced by fluid percussion concussion in the cat. I: Is it due to depression of activity within the brainstem reticular formation? *Brain Inj.* 2: 31-49.
- HAYER RL., STALHAMMAR D., POVLISHOCK., et al. (1987). A new model of concussive brain injury in the cat produced by extradural fluid volume loading: II Physiological and neuropathological observations. *Brain Inj.* 1: 93-112.
- HEEGAARD W., BIROS M., ZINK J. (1997). Effect of Hypothermia, Dichloroacetate, and Deferoxamine in the Treatment for Cortical Edema and Functional Recovery after Experimental Cortical Impact in the Rat. *Acad Emerg Med.* 4, 1: 33-39.
- HEITSCH H. (2002). Non-Peptide Antagonists and Agonists of the Bradykinin B<sub>2</sub> Receptor. *Curr Med Chem* 9, 9: 913-928.
- HEJAZI N., WITZMANN A., FAE P. (2002). Unilateral Decompressive Craniectomy for Children with Sever Brain Injury. Report of Seven Cases and Review of the Relevant Literature. *Euro J Pediatr* 161, 2: 99-104.
- HOLLAND M., NAKAJI P. (2004). Craniectomy: Surgical Indications and Technique. *Operative Technique in Neurosurgery* 7, 1: 10-15.
- HOULE S., LARRIVÉE J-F., BACHVAROVA M., et al. (2000). Antagonist Induced Intracellular Sequestration of Rabbit Bradykinin B<sub>2</sub> Receptor. *Hypertension* 35, 6: 1319-1333.
- ISAKSSON J., HILLERED L., OLSSON Y. (2001). Cognitive and Histopathological Outcome after Weight-Drop Brain Injury in the Rat: Influence of Systemic Administration of Monoclonal Antibodies to ICAM-1. *Acta Neuropathol* 102: 246-256.
- JIANG J., GAO G., LI W., et al. (2002). Early Indicators of Prognosis in 846 Cases of Severe Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma* 19, 7: 869-874.
- JIANG XB., OHNO K., QIAN L., et al. (2000). Changes in Local Cerebral Blood Flow, Glucose Utilization, and Mitochondrial Function following Traumatic Brain Injury in Rats. *Neurol Med Chir* 40, 1: 16-28.
- JORGENSEN JB. (1988). Trepanation as a Therapeutic Measure in Ancient (pre-Inka) Peru. *Acta Neurochir* 93, 1-2: 3-5.
- KAPLANSKI J., ASA I., ARTRU AA., et al. (2003). LF 16-0687 Ms, a New Bradykinin B<sub>2</sub> Receptor Antagonist, Decreases ex vivo Brain Tissue Prostaglandin E<sub>2</sub> Synthesis after Closed Head Trauma in Rats. *Resuscitation* 56, 2: 207-213.
- KAPLANSKI J., PRUNEAU D., ASA I., et al. (2002). LF 16-0687, a Bradykinin B<sub>2</sub> Receptor Antagonist, Reduces Brain Edema and Improves Long-term Neurological Function Recovery after Closed Head Trauma in Rats. *J Neurotrauma* 19, 8: 953-564.
- KELLY DF., MARTIN NA., KORDESTANI R., et al. (1997). Cerebral Blood Flow as a Predictor of Outcome following Traumatic Brain Injury. *J Neurosurg* 86: 633-641.
- KIMELBERG HK. (1992). Astrocytic Edema in CNS Trauma. *J Neurotrauma* 9 (Suppl.1): 71-81.
- KLATZO I. (1967). Neuropathological Aspect of Brain Edema. *J. Neuropathology and Experimental Neurology* 26, 1: 1-14.
- KLATZO I., PIRAUX A., LASKOWSKI EJ. (1958). The relation between edema, blood- brain barrier and tissue elements in a local brain injury. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 17: 548-564.
- KOCHANEK PM., MARION DM., ZHANG W., et al. (1995). Severe Controlled Cortical Impact in Rats: Assessment of Cerebral Edema, Blood Flow, and Contusion Volume. *J Neurotrauma* 12, 6: 1015-1025.
- KONTOPOULOS V., FOGOULOU N., PASALAS J., et al. (2002). Decompressive Craniectomy for the Management of Patients with Refractory Hypertension: Should it be Reconsidered? *Acta Neurochir* 144: 791-796.
- KOOPMANS GUIDO., BLOKLAND ARJAN., NIEUWENHUIJZEN VAN P., et al. (2003). Assessment of Spatial Learning Abilities of Mice in a New Circular Maze. *Physiology & Behavior* 79: 683-693.
- KOPPENSTEDT SN., KERN M., THOMALE UW., et al. (1999). Effect of Cerebral Perfusion Pressure on Contusion Volume following Impact Injury. *J Neurosurg* 90: 520-526.

- KUNZE E., MEIXENSBERGER J., JANKA M., et al. (1998). Decompressive Craniectomy in Patients with Uncontrollable Intracranial Hypertension. *Acta Neurochir Suppl.* 71: 16-18.
- LANG EW., CHESNUT RM. (1994). Intracranial Pressure. Monitoring and Management. *Neurosurg Clin N Am.* 5, 4: 573-605.
- LINDSEY CJ., NAKAIE CR., MARTINS DT. (1989). Central Nervous System Kinin Receptors and the Hypertensive Response Mediated by Bradykinin. *Br J Pharmacol* 97, 3: 763-768.
- LIU H., GOODMAN JC., ROBERTSON CS. (2002). The Effect of L-Arginine on Cerebral Hemodynamics after Controlled Cortical Impact Injury in the Mouse. *J Neurotrauma* 19, 3: 327-334.
- LONG JB., GORDON J., BETTENCOURT JA., et al. (1996). Laser-Doppler Flowmetry Measurements of Subcortical Blood Flow Changes after Fluid Percussion Brain Injury in Rats. *J Neurotrauma* 13, 3: 149-162.
- LUNDBLAD C., GRANDE PO., BENTZER P. (2004). A Mouse Model for Evaluation of Capillary Perfusion, Microvascular Permeability, Cortical Blood Flow, and Cortical Edema in the Traumatized Brain. *J Neurotrauma* 21, 6: 741-753.
- LYNCH DR., DAWSON TM. (1994). Secondary Mechanisms in Neuronal Trauma. *Current Opinion in Neurology* 7: 510-516.
- MAAS AI., DEARDEN M., TEASDALE GM., et al. (1997). EBIC Guidelines for the Management of Severe Head Injury in Adults: European Brain Injury Consortium. *Acta Neurochir* 139: 286-294.
- MAHABEER R., NAIDOO S., RAIDOO DM. (2000). Detection of Tissue Kallikrein and Kinin B1 and B2 Receptor mRNAs in Human Brain by in situ RT-PCR. *Metab Brain Dis* 15, 4: 325-335.
- MARION DW., FIRLIK A., McLAUGHLIN MR. (1995). Hyperventilation Therapy for Severe Traumatic Brain Injury. *New Horiz.* 3, 3: 439-447.
- MARKGRAF CG., CLIFTON GL., AGUIRRE M., et al. (2001). Injury Severity and Sensitivity to Treatment after Controlled Cortical Impact Injury in Rats. *J Neurotrauma* 18, 2: 175-186.
- MARMAROU A. (1994). Traumatic Brain Edema: An Overview. *Acta Neurochir (Suppl.)* 60: 421-424.
- MARMAROU A., FATOUROS P., BARZÓ P. et al. (2000). Contribution of Edema and Cerebral Blood Volume to Traumatic Brain Swelling in Head-injured Patients. *J Neurosurg* 93: 183-193.
- MARMAROU A., FODA MA., BRINK VON DEN W., et al. (1994). A New Model of Diffuse Brain Injury in Rats: Part I: Pathophysiology and Biochemistry. *J Neurosurg* 80, 2: 291-300.
- MARMAROU A., NICHOLS J., BURGESS D. (1999). Effects of Bradykinin Antagonist Bradycor™ (Deltibant, CP-1027) in Severe Traumatic Brain Injury: Results of a Multi-Center, Randomized, Placebo-Controlled Trial. *J Neurotrauma* 16, 6: 431-444.
- MARSHALL L.F., TOOLE B.M., BOWERS S.A. (1983). The National Traumatic Coma Data Bank. Part 2: Patient who talk and deteriorate: implications of treatment. *J. Neurosurg.* 59: 285-288.
- MAYHAN WG. (1996). Role of Activation of Bradykinin B2 Receptors in Disruption of the Blood-Brain Barrier during Acute Hypertension. *Brain Research* 738: 337-341.
- MEIXENSBERGER J., BAUNACH S., AMSCHLER J., et al. (1997). Influence of Body Position and Intracranial Pressure in Patients with Acute Brain Injury. *Neurol Res* 19, 3: 249-253.
- MEIXENSBERGER J., ROOSEN K. (1998). Clinical and Pathophysiological Significance of Severe Neurotrauma in Polytraumatized Patients. *Langenbeck's Arch Surg* 383: 214-219.
- MENDELOW AD., TEASDALE GM. (1983). Pathophysiology of Head Injuries. *Br. J. Surg.* 70: 641-650.
- MESCHING R., SCHADEWALDT H. (1981). Skull Trepanation in Eastern Africa. *Hexagon Roche* 9, 3: 17-24.
- MESSING-JÜNGER AM., MARZOG J., WÖBKER G., et al. (2003). Decompressive Craniectomy in Severe Brain Injury. *Zentralbl Neurochir* 64: 171-177.
- MORRIS R. (1984). Developments of a Water-Maze Procedure for Studying Spatial Learning in the Rat. *J Neurosci Methods* 11, 1: 47-60.
- MUIZELAAR JP., LUTZ HA., BECKER DP. (1984). Effect of Mannitol on ICP and CBF and Correlation with Pressure Autoregulation in Severely Head-injured Patients. *J Neurosurg* 61, 4: 700-706.



- MUNCH E., HORN P., SCHURER L., et al. (2000). Management of Severe Traumatic Brain Injury by Decompressive Craniectomy. *Neurosurgery* 47, 2: 315-323.
- MURONE C., PAXINOS G., MCKINLEY MJ., et al. (1997). Distribution of Bradykinin B2 Receptors in Sheep and Spinal Cord Visualized by In Vitro Autoradiography. *J Comp Neurol* 381, 2: 203-218.
- NARAYAN RK., GREENBERG RP., MILLER DJ., et al. (1981). Improved Confidence of Outcome Prediction in Severe Head Injury. *J Neurosurg* 54: 751-762.
- NILSSON P., GAZELIUS B., CARLSON H. et al. (1996). Continuous Measurement of Changes in Regional Cerebral Blood Flow following Cortical Compression Contusion Trauma in the Rat. *J Neurotrauma* 13, 4: 201-207.
- NUSSBERGER J., CUGNO M., AMSTUTZ C. et al. (1998). Plasma bradykinin in angio-edema. *Lancet* 6; 351 (9117): 1693-7.
- OETTINGEN VON G., BERGHOLT B., GYLDENSTED C., et al. (2002). Blood Flow and Ischemia within Traumatic Cerebral Contusions. *Neurosurgery* 50, 4: 781-788.
- OMMAYA A.K., GENERALLI T.A. (1974). Cerebral concussion and traumatic unconsciousness. Correlation of experimental and clinical observations of blunt head injuries. *Brain* 97: 633-654.
- PALMER AM., MARION DW., BOTSCHHELLER ML., et al. (1993). Therapeutic Hypothermia is Cytoprotective Without Attenuating the Traumatic Brain Injury- Induced Elevations in Interstitial Concentration of Aspartat and Glutamate. *J Neurotrauma* 10, 4: 363-372.
- PAPPIUS HM. (1981). Local cerebral glucose utilization in thermally traumatized rat brain. *Ann. Neurol.* 9: 484-491.
- PELA IR., ROSA AL., SILVA CA. (1996). Cerebral B2 Receptor Involvement in the Antinociceptive effect of Bradykinin in Rats. *Br J Pharmacol* 118, 6: 1488-1492.
- PELLACANI A., BRUNNER HR., NUSSBERGER J. (1994): Plasma kinins increase after angiotensin-converting enzyme inhibition in human subjects. *Clin Sci. (Lond.)* 87(5): 567-74.
- PFENNINGER EG., REITH A., BREITIG D., et al. (1989). Early Changes of Intracranial Pressure, Perfusion Pressure, and Blood Flow after Acute Head Injury. Part I: An Experimental Study of the Underlying Pathophysiology. *J Neurosurg* 70, 5: 774-779.
- PHILLIPS LL., LYETH BG., HAMM RJ., et al. (1994). Combined Fluid Percussion Brain Injury and Entorhinal Cortical Lesion: A Model for Assessing the Interaction between Neuroexcitation and Deafferentation. *J Neurotrauma* 11, 6: 641-656.
- PIEK J. (2002). Decompressive Surgery in the Treatment of Traumatic Brain Injury. *Curr Opin Crit Care.* 8, 2: 134-138.
- PION-GROSJEAN O., WAHL F., GOBBO O., et al. (2001). Assessment of Sensomotor and Cognitive Deficits Induced by a Moderate Traumatic Injury in the Right Parietal Cortex of the Rat. *Neurobiology of Disease* 8: 1082-1093.
- PLESNILA N., SCHULZ J., STOFFEL M. et al. (2001). Role of Bradykinin B2 Receptors in the Formation of Vasogenetic Brain Edema in Rats. *J Neurotrauma* 18, 10: 1049-1058.
- POLIN RS., SHAFFREY ME., BOGAEV CA. (1997). Decompressive Bifrontal Craniectomy in the Treatment of Severe Refractory Posttraumatic Cerebral Edema. *Neurosurgery* 41, 1: 84-94.
- POVLISHOCK JT., CHRISTMAN CW. (1995). The Pathobiology of Traumatically Induced Axonal Injury in Animals and Humans: a Review of Current Thoughts. *J Neurotrauma* 12: 799-811.
- PRAT A., BIERNACKI K., POULY S., et al. (2000). Kinin B1 Receptor Expression and Function on Human Brain Endothelial Cells. *J Neuropathol Exp Neurol* 59, 10: 896-906.
- PRINS ML., HOVDA DA. (2003). Developing Experimental Models to Address Traumatic Brain Injury in Children. *J Neurotrauma* 20, 2: 123-137.
- PRINS ML., LEE SM., CHENG CLY., et al. (1996). Fluid Percussion Brain Injury in the Developing and Adult Rat: a Comparative Study of Mortality, Morphology, Intracranial Pressure and Mean Arterial Blood Pressure. *Dev. Brain Res.* 95: 272-282.
- PRUNEAU D., CHORNY I., BENKOVITZ V., et al. (1999) (a). Effect of LF 16-0687 Ms., a New Nonpeptide Bradykinin B2 Receptor Antagonist, in a Rat Model of Closed Head Trauma. *J Neurotrauma* 16, 11: 1057-1065.
- PRUNEAU D., PAQUET JL., LUCCAINI JM., et al. (1999) ( b). Pharmacological Profile of LF 16-0687, a New Potent Non-Peptide Bradykinin B2 Receptor Antagonist. *Immunopharmacology* 43: 187-194.

- QURESHI AI., SUAREZ JI., BHARDWAJ A. et al. (1998). Use of Hypertonic (3%) Saline/Acetate Infusion in the Treatment of Cerebral Edema: Effect on Intracranial Pressure and Lateral Displacement of the Brain. *Crit Care Med.* 26, 3: 440-446.
- RACHINSKI M., PRUNEAU D., ARTRU AA., et al. (2001). The Importance of Kinin Antagonist Treatment timing in Closed Head Trauma. *J Trauma* 51, 5: 944-948.
- RAIDOO DM., BHOOLA KD. (1997). Kinin Receptors on Human Neurons. *J Neuroimmunol* 77, 1: 39-44.
- REDONDO J., LAUSBERG G., (1967). Das Schädel Hirntrauma im höheren Lebensalter. *Zbl. Neurochir.* 28, 3: 181-191.
- REGOLI D. (1984). Neurohumoral Regulation of Precapillary Vessels: The Kallikrein-Kinin System. *J Cardiovascular Pharmacology* 6: 401-412.
- REGOLI D., ALLOGHO SN., RIZZI A., et al. (1998). Bradykinin Receptors and their Antagonists. *European J Pharmacology* 348: 1-10.
- REILLY P.L., GRAHAM D.I., ADAMS J.H., et al. (1975). Patients with head injury who talk and die. *Lancet* 2: 375-377.
- REINERT M., KHALDI A., ZAUNER A., et al. (2000). High Level of Extracellular Potassium and its Correlates after Severe Head Injury: Relationship to High Intracranial Pressure. *J Neurosurg* 93: 800-807.
- RICHARD T., DELAUNAY JC., MERILLON JM., et al. (2003). Is the C-Terminal Region of Bradykinin the Binding Site of Phenols? *J Biomol Struct Dyn* 21, 3: 379-385.
- ROBERT C., PRUNEAU D., PAQUET JL. (2002). Pharmacological and Functional Characterization of the Guinea-Pig B2 Bradykinin Receptor Stably Expressed in CHO-K1 Cell Line. *Br J Pharmacol* 135, 2: 462-468.
- RODELL TC. (1996). The Kallikrein / Kinin System and Kinin Antagonists in Trauma. *Immunopharmacology* 33: 279-283.
- ROOKER S., JORENS PG., REEMPTS JV., et al. (2003). Continuous Measurement of Intracranial Pressure in Awake Rats after Experimental Closed Head Injury. *J Neuroscience Methods* 131: 75-81.
- RUDEHILL A., BELLANDER B., WEITZBERG E. et al. (2002). Outcome of Traumatic Brain Injuries in 1508 Patients: Impact of Prehospital Care. *J Neurotrauma* 19, 7: 855-868.
- SCHEFF SW., BALDWIN SA., BROWN RW., et al. (1997). Morris Water Maze Deficits in Rats following Traumatic Brain Injury: Lateral Controlled Cortical Impact. *J Neurotrauma* 14, 9: 615-627.
- SHELLER MS., TODD MM., DRUMMOND JC. (1986). Isoflurane, Halothane, and Regional Cerebral Blood Flow at Various Levels of  $\text{paCO}_2$  in Rabbits. *Anesthesiology* 64, 5: 598-604.
- SHELLER MS., TODD MM., DRUMMOND JC., et al. (1987). The Intracranial Pressure Effects of Isoflurane and Halothane Administered following Cryogenetic Brain Injury in Rabbits. *Anesthesiology* 67, 4: 507-512.
- SCHIERHOUT G., ROBERTS I. (2000 / 2003). Mannitol for Acute Traumatic Brain Injury. *Cochrane Database Syst Rev.*
- SCHLECHTRIEMEN T., SCHAEFER S., STOLPE E., (2002). Präklinische Versorgung von Traumapatienten in der Luftrettung. *Unfallchirurg* 105: 974-985.
- SCHNEIDER GH., BRANDT T., LANKSCH WR., et al. (2002). Decompressive Craniectomy following Traumatic Brain Injury: ICP, CPP, and Neurological Outcome. *Acta Neurochir Suppl.* 81: 77-79.
- SCHORT RJ., MUIZELAAR JP. (2002). Mannitol in Acute Traumatic Brain Injury. *The Lancet* 11, 359: 1633-1634.
- SCHUHMAN MU., STILLER D., SKARDELLY M. et al. (2002). Determination of Contusion and Oedema Volume by MRI Corresponds to Changes of Brain Water Content following Controlled Cortical Impact Injury. *Acta Neurochir Suppl.* 81: 213-215.
- SCHUHMAN MU., STILLER D., SKARDELLY M. et al. (2003). Metabolic Changes in Vicinity of Brain Contusions: A Proton Magnetic Resonance Spectroscopy and Histology Study. *J Neurotrauma* 20, 8: 725-743.
- SCHULZ J., PLESNILA N., ERISKAT J., et al. (2000). LF 16-0687 a Novel Non-Peptide Bradykinin B2 Receptor Antagonist Reduces Vasogenic Brain Edema from a Focal Lesion in Rats. *Acta Neurochir Suppl* 76: 137-139.
- SCHWAB JM., SEID K., SCHLUESENER HJ. (2001). Traumatic Brain Injury Induces Prolonged Accumulation of Cyclooxygenase-1 Expressing Microglia/Brain Macrophages in Rats. *J Neurotrauma* 18, 9: 881-890.
- SCHWARTE LA., ZUURBIER CJ., INCE C. (2000). Mechanical ventilation in mice. *Basic Res Cardiol* 95: 510-520.

- SHANN F. (2003). Hypothermia for Traumatic Brain Injury: how Soon, how Cold, and how Long? *The Lancet* 362, 13: 1950-1951.
- SHARMA HS., WESTMAN J., NYBERG F. (1998). Pathophysiology of Brain Edema and Cell Changes Following Hyperthermic Brain Injury. *Progress in Brain Research* 115: 351-412.
- SIMMONS BJ. (1997). Management of Intracranial Hemodynamics in the Adult: a Research Analysis of Head Positioning and Recommendations for Clinical Practice and Future Research. *J Neurosci Nurs.* 29, 1: 44-49.
- SMITH DH., SOARES HD., PIERCE JS., et al. (1995). A Model of Parasagittal Controlled Cortical Impact in the Mouse: Cognitive and Histopathologic Effects. *J Neurotrauma* 12, 2: 169-178.
- SMITH SL., HALL ED. (1996). Mild Pre- and Posttraumatic Hypothermia Attenuates Blood-Brain-Barrier Damage following Controlled Cortical Impact Injury in the Rat. *J Neurotrauma* 13, 1: 1-9.
- SOBLOSKY JS., MATTHEWS MA., DAVIDSON JF., et al. (1996). Traumatic Brain Injury of the Forelimb and Hindlimb Sensorimotor Areas in the Rat: Physiological, Histological and Behavioral Correlates. *Behav Brain Res.* 79, 1-2: 79-92.
- STOCCHETTI N., CHEREGATO A., DeMARCHI M., et al. (1998). High Cerebral Perfusion Pressure Improves Low Values of Local Brain Tissue O<sub>2</sub> Tension (P<sub>t</sub>O<sub>2</sub>) in Focal lesions. *Acta Neurochir Suppl.* 71: 162-165.
- STONE JL., MILES ML. (1990). Skull Trepanation among the Early Indians of Canada and the United States. *Neurosurgery* 26, 6: 1015-1020.
- STOVER JF., DOHSE NK., UNTERBERG AW. (2000) (c). Bradykinin 2 Receptor Antagonist LF 16-0687 Reduces Posttraumatic Brain Edema. *Acta Neurochir Suppl.* 76: 171-175.
- STOVER JF., DOHSE NK., UNTERBERG AW. (2000) (a). Significant Reduction in Brain Swelling by Administration of Nonpeptide Kinin B2 Receptor Antagonist LF 16-0687 Ms. after Controlled Cortical Impact Injury in Rats. *J Neurosurg* 92, 5: 853-859.
- STOVER JF., SCHÖNING B., BEYER TF., et al. (2000) (b). Temporal Profile of Cerebrospinal Fluid Glutamate, Interleukin-6, and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  in Relation to Brain Edema and Contusion following Controlled Cortical Impact Injury in Rats. *Neuroscience Letters* 288: 25-28.
- TAYLOR A., BUTT W., ROSENFELD J., et al. (2001). A Randomized Trial of Very Early Decompressive Craniectomy in Children with Traumatic Brain Injury and Sustained Intracranial Hypertension. *Childs Nerv Syst* 17, 3: 154-162.
- TER MINASSIAN A., DUBE L., GUILLEUX AM., et al. (2002). Changes in Intracranial Pressure and Cerebral Autoregulation in Patients with Severe Traumatic Brain Injury. *Crit Care Med* 30, 7: 1616-1622.
- THE BRAIN TRAUMA FOUNDATION. THE AMERICAN ASSOCIATION OF NEUROLOGICAL SURGEONS. THE JOINT SECTION ON NEUROTRAUMA AND CRITICAL CARE (1996). Guidelines of the Management of Severe Head Injury. *J Neurotrauma* 13: 643-734.
- THE BRAIN TRAUMA FOUNDATION. THE AMERICAN ASSOCIATION OF NEUROLOGICAL SURGEONS. THE JOINT SECTION ON NEUROTRAUMA AND CRITICAL CARE (2000). Critical Pathway for the Treatment of Established Intracranial Hypertension. *J Neurotrauma* 17, 6-7: 537-547.
- UNTERBERG A. (2003). Editorial Comment. *Zentralbl Neurochir* 64: 143-144
- UNTERBERG A., DAUTERMANN C., BAETHMANN A. (1986). The Kallikrein-kinin System as Mediator in Vasogenetic Brain Swelling. Part 3. *J Neurosurg* 64: 269-276.
- UNTERBERG A., STROOP R., THOMALE UW., et al. (1997). Characterisation of Brain Edema following “Controlled Cortical Impact Injury” in Rats. *Acta Neurochir Suppl.* 70: 106-108.
- UNTERBERG A., WAHL M., BAETHMANN A. (1984). Effects of Bradykinin on Permeability and Diameter of Pial Vessels in Vivo. *J Cereb Blood Flow Metab.* 4, 4: 574-585.
- VESPA P., PRINS M., RONNE-ENGSTROM E. et al. (1998). Increase in Extracellular Glutamate caused by Reduced Cerebral Perfusion Pressure and Seizures after Human Traumatic Brain Injury: a Microdialysis Study. *J Neurosurg* 89: 971-982.
- WAGNER AK., LAUREN AW., KLINE AE., et al. (2004). Evaluation of Estrous Cycle Stage and Gender on Behavioral Outcome after Experimental Traumatic Brain Injury. *Brain Reserch* 998: 113-121.
- WAHL M., GORLACH C., HORTOBAGYI T. (1999). Effect of Bradykinin in the Cerebral Circulation. *Acta Physiol Hung* 86, 2: 155-160.

- WAHL M., SCHILLING L., UNTERBERG A., et AL. (1993). Mediators of Vascular and Parenchymal Mechanisms in Secondary Brain Damage. *Acta Neurochir. Supp.* 57: 64-72.
- WAHL M., WHALLY ET., UNTERBERG A. et al. (1996). Vasomotor and Permeability Effects of Bradykinin in the Cerebral Microcirculation. *Immunopharmacology* 33: 257-263.
- WALKER K. PERKINS M., DRAY A. (1995). Kinins and Kinin Receptors in the Nervous System. *Neurochem Int* 26, 1: 1-16.
- WEBER J., CZARNETZKI A. (2001). Trepanation from the Early Medieval Period of Southwestern Germany – Indications, Complications and Outcome. *Zentralbl Neurochir* 62, 1: 10-14.
- WHITFIELD PC., PATEL H., HUTCHINSON PJ., et al. (2001). Bifrontal Decompression Craniectomy in the Management of Posttraumatic Intracranial Hypertension. *Br J Neurosurg* 15, 6: 500-507.
- YAMAGAMI T., HANDA H., TAKEUCHI J., et al. (1985). Histologic study of normal rat brain tissue after neodymium-yttrium aluminum garnet laser irradiation. I: Cerebral hemisphere. *Surg. Neurol.* 23: 475-482.
- ZAUSINGER S., LUMENTA DB., PRUNEAU D., et al. (2002). Effects of LF 16-0687 Ms., a Bradykinin B<sub>2</sub> Receptor Antagonist, on Brain Edema Formation and Tissue Damage in a Rat Model of Temporary Focal Cerebral Ischemia. *Brain Res.* 20, 950 (1-2): 268-278.
- ZAUSINGER S., THAL SC., KREIMEIER U., et al. (2004). Hypertonic Fluid Resuscitation from Subarachnoidal Hemorrhage in Rats. *Neurosurgery* 55, 3: 679-687.
- ZOHAR O., SCHREIBER S., GETSLEV V., et al. (2003). Closed-Head Minimal Traumatic Brain Injury Produces Long-Term Cognitive Deficits in Mice. *Neuroscience* 118: 949-955.
- ZORNOW MH., SCHELLER MS., SHEEHAN PB., et al. (1992). Intracranial Pressure Effects of Dexmedetomidine in Rabbits. *Anesth Analg.* 75, 2: 232-237.

## 7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A.	Arterie
BBB	Blut- Hirnschranke
CBF	Cerebrale Durchblutung
CCI	Controlled Cortical Impact
GCS	Glasgow Coma Scale
GOS	Glasgow Outcome Scale
ICP	Intrakranieller Druck
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
KO	knock-out
s.c.	subkutan
SHT	Schädel- Hirntrauma
V.	Vene
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel

## **8. Publikationen**

1. Effect of Decompression Craniotomy on Increase of Contusion Volume and Functional Outcome after Controlled Cortical Impact in Mice (2003). Klaus Zweckberger; Michael Stoffel, MD; Alexander Baethmann; MD PhD; and Nikolaus Plesnila, MD. J. Neurotrauma Vol. 20, No.12, 1307-1314.

2. Quantification of Secondary Brain Damage after Controlled Cortical Impact in Mice: Effect of Early and Delayed Decompression Craniotomy (2006). Klaus Zweckberger, MD; Ricarda Zimmermann MD; Christian Erös, MD; Alexander Baethmann, MD, PhD; Nikolaus Plesnila MD, PhD. J. Neurotrauma (in press).

## **9. DANKSAGUNG**

Mit dem Abschluss der vorliegenden Arbeit möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Alexander Baethmann, ehemaligem komm. Direktor des Instituts für Chirurgische Forschung, für die Aufnahme in sein Institut herzlich danken. Doktoranden werden dort in beispielgebender Weise ausgebildet und gefördert. Sein scharfer Verstand und sein wissenschaftliches Engagement gelten mir als Vorbild.

Die gleiche wissenschaftliche und menschliche Wertschätzung bringe ich meinem akademischen Lehrer und Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Nikolaus Plesnila entgegen, dem ich nicht nur für die Überlassung des interessanten Themas, sondern auch für die freundliche Aufnahme in sein Neuro-Team und die hervorragende Betreuung besonderen Dank schulde. Die dort herrschende einzigartige Atmosphäre ist Garant für kreatives und produktives Arbeiten.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Nussberger, der die quantitative Analyse der Bradykinin-gewebekonzentration durchführte.

Mein besonderer Dank gilt nicht zuletzt den medizinisch-technischen Assistentinnen Uta Mamrak und Veronika Bischoff für ihre wertvolle Hilfe bei den Versuchen und den Laborauswertungen. Ohne die tatkräftige Unterstützung wäre die Durchführung dieses Projektes nur schwer möglich gewesen.

## **10. LEBENS LAUF:**

Klaus Zweckberger

Geburtsdatum: 11.10.1978

Geburtsort: Rosenheim

Eltern: Sabine Zweckberger, geb. Klampt  
Erich Zweckberger

Familienstand: ledig

Ausbildung:

1985-1989 Grundschule Rosenheim-Pang

1989-1998 Finsterwalder Gymnasium Rosenheim, dort Abitur

1998-1999 Grundwehrdienst, Sanitätsbataillon 8 Brannenburg

1999-2005 Studium der Humanmedizin, LMU München

2005 Approbation als Arzt

2005 Assistenzarzt der Neurochirurgischen Klinik der  
Universität Heidelberg