

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung im
Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Ulrich Pohl

**Einfluss der Thrombozytenaggregationshemmung
mit einem Glykoprotein IIb/IIIa-Antagonisten
auf den sekundären Hirnschaden und die zerebrale Mikrozirkulation
nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma bei der Maus**

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

vorgelegt von
Philip Gass

aus
Kaiserslautern

2013

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Nikolaus Plesnila

Mitberichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Rainer Glaß

Prof. Dr. med. Steffen Massberg

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser,
FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 05.12.2013

Meinen Eltern

1 EINLEITUNG	1
1.1 Epidemiologie.....	1
1.2 Pathophysiologie.....	2
1.2.1 Mikrothrombosen	5
1.3 Fragestellung und Ziel der Experimente.....	10
2 MATERIAL UND METHODEN	12
2.1 Versuchstiere	12
2.2 Anästhesie	13
2.2.1 Narkose und Beatmung	13
2.2.2 Überwachung physiologischer Parameter.....	14
2.3 Chirurgische Präparation.....	14
2.3.1 Arterieller und venöser Katheter.....	14
2.3.2 Trepanation kranialer Fenster	15
2.3.3 Hirnentnahme.....	17
2.4 Das Traumamodell: Controlled Cortical Impact (CCI)	17
2.5 Tirofibanapplikation	19
2.6 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie	19
2.6.1 Versuchsablauf und -protokoll.....	19
2.6.2 Gerät und Prinzip	21
2.6.3 Fluoreszenzfarbstoffe.....	23
2.6.3.1 CFDA-SE-markierte Thrombozyten	23
2.6.3.2 Rhodamin 6G.....	24
2.6.4 Auswertungsprinzip.....	25
2.6.5 Beobachtete Parameter	26
2.6.5.1 Physiologische Parameter	26
2.6.5.2 Mikrozirkulation	27
2.7 Sekundäres Nekrosewachstum.....	30
2.7.1 Versuchsprotokoll.....	30
2.7.2 Histologische Aufbereitung und Färbung nach Nissl.....	30
2.7.3 Vermessung des Nekrosevolumens.....	31
2.8 Intrakranieller Druck	32
2.9 Hirnwassergehalt.....	32
2.10 Statistische Auswertung	33

3 ERGEBNISSE	34
3.1 Intravitalmikroskopie.....	34
3.1.1 Physiologische Parameter.....	34
3.1.2 Mikrozirkulation	37
3.1.2.1 Gefäßdurchmesser	37
3.1.2.2 Zerebrale Durchblutung	42
3.1.2.3 Thrombozytenfunktion ex vivo	42
3.1.2.4 Rollende Thrombozyten.....	45
3.1.2.5 Adhärierende Thrombozyten.....	48
3.1.2.6 Rollende Aggregate	50
3.1.2.7 Adhärierende Aggregate	51
3.2 Nekrosevolumen	56
3.3 Intrakranieller Druck	57
3.4 Hirnwassergehalt.....	59
4 DISKUSSION.....	61
4.1 Diskussion der verwendeten Methoden	61
4.1.1 Maus als Versuchstier.....	61
4.1.2 Anästhesie	61
4.1.3 Traumamodell: Controlled Cortical Impact	62
4.1.4 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie	63
4.2 Diskussion der Ergebnisse	64
4.2.1 Physiologische Parameter.....	64
4.2.2 Mikrozirkulation	66
4.2.2.1 Zerebrale Durchblutung	66
4.2.2.2 Gefäßdurchmesser	67
4.2.2.3 Thrombozyten-Endothel-Interaktion.....	69
4.2.2.4 Adhärierende Aggregate	72
4.2.3 Nekrosevolumen	79
4.2.4 Hirnödem und intrakranieller Druck.....	80
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	86
6 LITERATURVERZEICHNIS.....	88
7 DANKSAGUNG.....	104

1 EINLEITUNG

1.1 Epidemiologie

Die Unfallstatistik aus dem Jahre 2009 zählte 8,09 Millionen Unfallverletzte in Deutschland, wovon 19.178 tödlich verliefen (Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAuA), 2009). Laut der Gesundheitsberichterstattung des Bundes stellen in Deutschland Unfälle und Verletzungen bei Jugendlichen und jungen Erwachsenen im Alter von 15 bis 25 Jahren die Haupttodesursache dar (Robert Koch Institut (Hrsg), 2006). Dies deckt sich mit den von Tagliaferri et al zusammengetragenen Beobachtungen aus ganz Europa, wonach Verletzungen als Haupttodesursache der 15- bis 45-jährigen ausgemacht wurden und Kopfverletzungen die Hauptursache von Unfalltoden darstellen (Tagliaferri et al., 2006). Außerdem werden die meisten lebenslangen Behinderungen nach Unfällen durch Kopfverletzungen hervorgerufen (Jennett, 1998). Auch die sozioökonomische Bedeutung schwerer Kopfverletzungen ist enorm, bedenkt man die verlorenen Aufwendungen für Schule und Berufsausbildung, sowie das Wegfallen künftigen Einkommens und die Ausgaben für die zum Teil lebenslange Pflege im Falle der schweren Behinderung (Baethmann et al., 2002).

In Deutschland ereignen sich Kopfverletzungen hauptsächlich durch Verkehrsunfälle, gefolgt von Stürzen und Selbsttötungen (Firsching and Woischneck, 2001), ebenso weitgehend in ganz Europa (Tagliaferri et al., 2006). In den USA sind Schädel-Hirn-Traumata vornehmlich durch Stürze bedingt (Faul et al., 2010), jedoch versterben die Meisten an einem Trauma durch Schusswaffengebrauch (Coronado et al., 2011).

Fasst man unter dem Begriff „Schädel-Hirn-Trauma“ alle Fälle zusammen, bei denen nach ICD-Klassifikation eine Schädelfraktur oder intrakranielle Verletzung vorliegt (ICD-9: 800-804 und 850-854, ICD-10: S02 und S06), zählte die Krankenhausstatistik Deutschlands 283.459 Fälle im Jahr 2009. Davon wurden 200.932 als Commotio cerebri (Gehirnerschütterung) eingeordnet (Statistisches Bundesamt, 2011a). Dies deckt sich mit Ergebnissen aus ganz Europa, wonach das leichte Schädel-Hirn-Trauma in den meisten Berichten die überwiegende Mehrheit ausmacht, auch wenn die Einteilung nach uneinheitlichen Kriterien erfolgt (Tagliaferri et al., 2006). In der Todesursachenstatistik von 2009 wurden 5.431 Fälle von

Schädelfraktur oder intrakranieller Verletzung gelistet. Im Jahre 1980 verstarben noch 14.488 Menschen daran (Statistisches Bundesamt, 2011b). Eine deutliche Abnahme der Todesfälle durch Kopfverletzungen zwischen 1972 und 2000 stellten auch Steudel et al. in ihrer Übersichtsarbeit fest und erklärten diesen hauptsächlich durch präventive Maßnahmen wie Verbesserungen der Sicherheitsausstattung von Kraftfahrzeugen und strengerer Gesetzgebung im Straßenverkehr (Steudel et al., 2005).

1.2 Pathophysiologie

Bei einem Schädel-Hirn-Trauma kommt es zu einer mechanischen Belastung des Kopfes, die durch physikalische Kräfte verursacht wird. Diese lassen sich größtenteils als statisch oder dynamisch kategorisieren. Letztere machen den Hauptteil aus und können beispielsweise durch einen Stoß, einen Schlag oder plötzliches Beschleunigen oder Abbremsen des bewegten Kopfes verursacht sein. Abhängig vom konkreten Mechanismus variiert das resultierende Verletzungsmuster des Kopfes (Gennarelli, 1993; Gennarelli and Graham, 1998). Die intrakranielle Verletzung kann dabei fokal, diffus oder eine Kombination aus beidem sein (Gaetz, 2004; Gennarelli and Graham, 1998; Povlishock and Katz, 2005). Pathoanatomisch finden sich hauptsächlich Kontusionen, Axonschäden, Subarachnoidalblutungen und Hämatome (epi-, subdural und intraparenchymal) (Saatman et al., 2008).

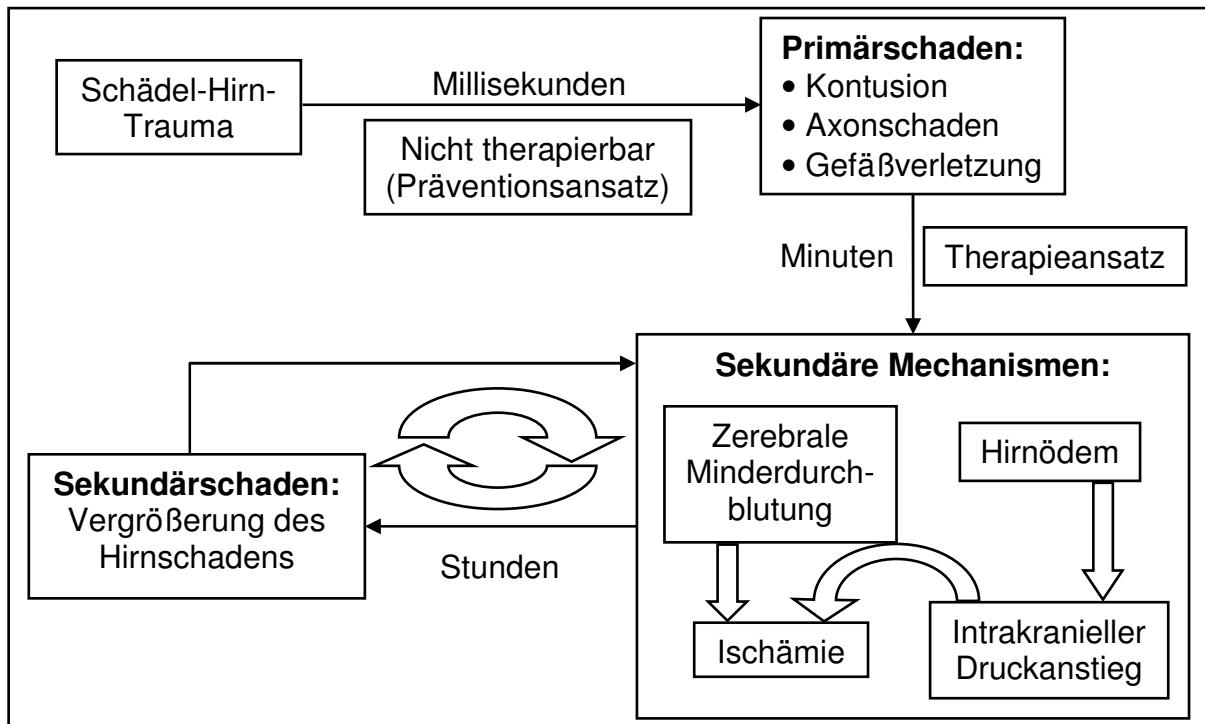


Abbildung 1: Pathophysiologie des sekundären Hirnschadens nach Schädel-Hirn-Trauma. Modifiziert nach Zweckberger (Zweckberger, 2006)

Die Pathophysiologie der zerebralen Schädigung unterliegt einer zweistufigen zeitlichen Dynamik (Abbildung 1): Zum einen der primäre Hirnschaden (mechanischer Schaden), der im Moment des Traumas entsteht und aufgrund seiner Unmittelbarkeit keiner Therapie, sondern lediglich präventiven Maßnahmen zugänglich ist. Zum anderen der sekundäre Hirnschaden (verzögter, nicht-mechanischer Schaden), der verzögert auftritt und durch sekundäre Mechanismen entsteht, die im Moment des Traumas in Gang gesetzt werden. Aufgrund dieser verzögerten Dynamik bieten sich hier mögliche Therapieansätze (Werner and Engelhard, 2007). Auf zellulärer Ebene kommt es dabei zu einem massiven Anstieg der extrazellulären Konzentration exzitatorischer Aminosäure-Neurotransmitter, insbesondere von Glutamat, sowie einer Störung des Ionengleichgewichts mit einem starken Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration. Dadurch werden unter anderem Proteasen aktiviert, die Strukturen des Zytoskeletts abbauen. Darüber hinaus kommt es zur Bildung freier Sauerstoffradikale. Diese Vorgänge wirken zellschädigend und haben zum Teil das Potenzial, sich gegenseitig zu verstärken (Greve and Zink, 2009). Daneben kommt es häufig zur Ausbildung eines Hirnödems (Werner and Engelhard, 2007). Dabei unterscheidet man nach Klatzo eine zytotoxische und eine vasogene Form (Klatzo, 1967). In den meisten Fällen finden

sich beide Formen (Klatzo, 1987). Beim zytotoxischen Hirnödem kommt es durch den Effekt verschiedener Noxen auf die Zellmembranen des Hirnparenchyms zu einer Schwellung von Zellen (Klatzo, 1987). Im Falle eines Energiemangels, wie er beim schweren Schädel-Hirn-Trauma vorkommt, versagt die ATP-abhängige Na^+/K^+ -Pumpe der Zelle und es kommt zu einem Anstieg des zellulären Ionengehalts und damit der Osmolalität. Es entsteht ein osmotischer Gradient, der zum Wassereinstrom in die Zelle führt (Donkin and Vink, 2010; Klatzo, 1987). Das vasogene Hirnödem resultiert aus einer Öffnung der Blut-Hirn-Schranke, wie sie typischerweise beim Schädel-Hirn-Trauma erfolgt (Donkin and Vink, 2010). Dadurch kommt es zu einer gesteigerten Gefäßpermeabilität, unter anderem für Serumproteine. Diese gelangen in das Hirnparenchym, wodurch ein osmotischer Gradient entsteht, der eine extrazelluläre Flüssigkeitsansammlung nach sich zieht (Klatzo, 1987; Klatzo, 1967). Dies führt zu einem Anstieg des intrakraniellen Druckes, wodurch es zur Kompression von Blutgefäßen und damit einer Reduktion der zerebralen Durchblutung mit einer Verminderung der Oxygenierung kommt und es besteht die Gefahr der Herniation lebenswichtiger Hirnstrukturen (Donkin and Vink, 2010). Ein weiterer häufig auftretender sekundärer Mechanismus ist die Ischämie, wie sie sich oft in neuropathologischen post mortem Untersuchungen von verstorbenen Schädel-Hirn-Trauma-Patienten findet (Graham et al., 1978; Graham et al., 1989). „Ischämie ist definiert als zerebrale Durchblutung, die nicht ausreicht, um die metabolischen Anforderungen des Gehirns zu decken“ (Zwienenberg and Muizelaar, 2001). Nach einem Schädel-Hirn-Trauma kommt es häufig zu Beeinträchtigungen der zerebralen Durchblutung und den Autoregulationsmechanismen, denen sie unterliegt (DeWitt and Prough, 2003; Golding et al., 1999). Sowohl beim Menschen (Marion et al., 1991; McLaughlin and Marion, 1996), als auch nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma mittels Controlled Cortical Impact (Bryan, Jr. et al., 1995; Engel et al., 2008; Kochanek et al., 1995). So beobachteten McLaughlin und Marion bei Patienten mit Schädel-Hirn-Trauma, dass die zerebrale Durchblutung innerhalb von Kontusionen zwar stark variiert, aber im Durchschnitt signifikant niedriger ist als in unmittelbar angrenzendem, normal erscheinenden Hirngewebe und der globalen zerebralen Durchblutung (McLaughlin and Marion, 1996). Bei erwachsenen Schädel-Hirn-Trauma-Patienten fanden Langfitt et al. eine gute Korrelation zwischen zerebraler Durchblutung und dem klinischen Bild, indem eine verminderte Durchblutung bei

klinischer Erholung wieder ansteigt oder bei Verschlechterung weiter absinkt (Langfitt et al., 1977). Nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma an Mäusen fanden beispielsweise Engel et al. heraus, dass die zerebrale Durchblutung 15 Minuten nach Controlled Cortical Impact im ganzen Gehirn um etwa 50% und innerhalb von Kontusionen sogar um 90% reduziert ist. Auch wenn sich binnen 24 Stunden die Durchblutung wieder Teile des Gehirns wieder normalisiert, so bleibt sie im kontusionierten Bereich um mehr als 90% vermindert (Engel et al., 2008). Plesnila et al stellten enge zeitliche und räumliche Überschneidungen zwischen Nekrosewachstum und Hypoperfusion fest und vermuteten daher, dass Hypoperfusion beim verzögerten, perikontusionalen Zelltod eine Rolle spielt. So konnten sie beobachten, dass sich bei Ratten eine durch Kälteleision hervorgerufene kortikale Nekrose in den ersten 24 Stunden auf 140% ihrer Ausgangsgröße ausbreitet, und die zerebrale Durchblutung perikontusional auf 30% des Ausgangswertes abfällt (Plesnila et al., 2003). Die Mechanismen, die für die posttraumatische Verminderung der zerebralen Durchblutung verantwortlich sind, sind bislang noch nicht vollständig aufgeklärt (Golding, 2002).

1.2.1 Mikrothrombosen

Ein weiteres Phänomen, von dem nach Schädel-Hirn-Traumata häufig berichtet wird, sind Auffälligkeiten der Blutgerinnung (Auer, 1978; Auer and Ott, 1979; Gerlach et al., 2009; Goodnight et al., 1974; Kumura et al., 1987; Olson et al., 1989; Stein et al., 1992; Talving et al., 2009; van der Sande et al., 1978; Wafaisade et al., 2010). Eine jüngst veröffentlichte Metaanalyse ergab eine mittlere Prävalenz von 32,7% für das Auftreten jeglicher Gerinnungsauffälligkeiten nach Schädel-Hirn-Trauma und stellte einen Zusammenhang zu einer ungünstigen Prognose fest (Harhangi et al., 2008). Laroche et al beschrieben die Pathogenese der Koagulopathie nach Schädel-Hirn-Trauma als einen Zusammenbruch des eng regulierten Gleichgewichts der Gerinnungsfaktoren, wodurch es entweder zu einem hypokoagulablen Zustand mit der Ausbreitung hämorrhagischer Läsionen kommt oder einem hyperkoagulablen Zustand mit einer überschießenden Gerinnung, der zur Bildung von Mikrothromben und Ischämie führt. Sie stellten jedoch auch fest, dass die zugrundeliegenden Mechanismen bislang nicht vollständig geklärt sind (Laroche et al., 2012). Berichte über das posttraumatische Auftreten zerebraler Mikrothromben finden sich zahlreich, sowohl in Tiermodellen (Dietrich et al., 1996; Dietrich et al., 1998; Hekmatpanah and

Hekmatpanah, 1985; Lu et al., 2004b; Maeda et al., 1997; Schwarzmaier et al., 2010; Segawa and Patterson, 1981; Smith et al., 1969; Stein et al., 2002), als auch beim Menschen (Huber et al., 1993; Kaufman et al., 1984; Lafuente and Cervos-Navarro, 1999; Stein et al., 2002; Stein et al., 2004). Auch Stein und Smith schilderten in ihrer 2004 erschienenen Übersichtsarbeit eine Verbindung zwischen intravaskulären Mikrothromben und der posttraumatischen zerebralen Ischämie und zogen diese als mögliche Ursache in Betracht (Stein and Smith, 2004). Untermauert wird diese These durch die Befunde von Stein et al., die eine direkte Verbindung zur posttraumatischen Ischämie beim Menschen ausmachen konnten, indem sie Hirngewebe von Patienten untersuchten, die durch ein Schädel-Hirn-Trauma zu Tode kamen. Dabei fanden sie einen starken Zusammenhang zwischen der Dichte intravaskulärer Mikrothromben und der Schwere selektiv neuronaler Nekrosen, einer Form der ischämischen Gewebsschädigung (Stein et al., 2004). Dazu passen auch die Befunde von Maeda et al., die nach einem Trauma durch Controlled Cortical Impact bei Ratten in der ersten Stunde Mikrothromben nur im Zentrum der Kontusionen, aber nach sechs und 24 Stunden auch in angrenzenden Arealen beobachteten. In diesen fiel auch die anfangs gesteigerte zerebrale Durchblutung nach drei Stunden auf ein ischämisches Niveau ab (Maeda et al., 1997). Dietrich et al. beobachteten bei Ratten nach Fluid Percussion Injury fokale Thrombozytenaggregate in der traumatisierten Hemisphäre, sowie weiträumig verteilt, Regionen mit beeinträchtigter zerebraler Durchblutung. Es bestand allerdings kein räumlicher Zusammenhang, weshalb die Autoren darin keinen Nachweis einer Kausalitätsbeziehung sahen. Sie zogen jedoch in Betracht, dass thrombozytäre, vasoaktive Substanzen die zerebrale Durchblutung beeinträchtigen könnten (Dietrich et al., 1996). Schwarzmaier et al. gelang es, einen Zusammenhang zwischen der posttraumatischen Reduktion der zerebralen Durchblutung und dem Auftreten von Mikrothrombosen zu beobachten. Dabei konnten sie innerhalb der ersten zwei Stunden nach Schädel-Hirn-Trauma mittels Controlled Cortical Impact bei Mäusen Mikrothromben in 77% aller untersuchten Venolen und bis zu 40% der Arteriolen der traumatischen Penumbra beobachten. Diese nahmen im genannten Zeitraum in ihrer Größe zu und führten zu einer Verlangsamung der Fließgeschwindigkeit des Blutes bis hin zu einem Okkludieren und Sistieren der Durchblutung in 70% der Venolen und 33% der beobachteten Arteriolen. Darüber hinaus fanden sie eine posttraumatische Vasodilatation der zerebralen Widerstandsgefäße, woraus sie

schlussfolgerten, dass die unmittelbare posttraumatische Abnahme der perikontusionalen Durchblutung nicht durch eine Vasokonstriktion der Arteriolen, sondern durch die Aktivierung von Thrombozyten und daraus folgender Bildung von Thromben in der zerebralen Mikrozirkulation verursacht ist (Schwarzmaier et al., 2010).

Die vorliegende Arbeit knüpft an die Befunde von Schwarzmaier et al. an und verfolgt das Ziel, die Mechanismen zu untersuchen, die an der Entstehung der zerebralen Mikrothromben im Rahmen eines Schädel-Hirn-Traumas beteiligt sind und welche Rolle diese bei der Ausbildung des sekundären Hirnschadens spielen. Dies erfordert eine Beschäftigung mit den grundlegenden Mechanismen der Blutgerinnung und der Entstehung von Thromben.

Die Entstehung eines Thrombus ist ein äußerst komplexer Prozess, an dem zahlreiche Vorgänge beteiligt sind. Den Ausgangspunkt stellt in der Regel eine Verletzung der Gefäßwand oder des Endothels dar, wodurch unter anderem Kollagen und Thromboplastin freigelegt werden und so in Kontakt mit dem vorbeifließenden Blut kommen. Dies führt zum einen zur Anheftung von Thrombozyten an die verletzte Gefäßwand und zu deren Aktivierung, zum anderen wird die Gerinnungskaskade angestoßen, woraus Thrombin hervorgeht, welches einerseits Fibrinogen in Fibrin umwandelt und andererseits selbst die Aktivierung weiterer Thrombozyten bewirkt (Furie and Furie, 2008). Durch die Aktivierung durchlaufen die Thrombozyten eine Reihe biochemischer und morphologischer Veränderungen. Es kommt unter anderem zur Expression von Rezeptoren, zur Anheftung an Oberflächen, zur Aggregatbildung und der Bindung an Leukozyten (Furie and Furie, 1992). Die Aktivierung von Thrombozyten kann durch vielerlei Agonisten erfolgen und führt ihrerseits selbst zur Aktivierung weiterer Thrombozyten (Jennings, 2009). So setzen adhärierende Thrombozyten Granula aus ihrem Zytoplasma frei, wodurch unter anderem ADP (Adenosin-Diphosphat) ausgeschüttet wird (Porter and Goodnight, Jr., 1977). Mit der Sekretion weiterer Agonisten, wie zum Beispiel Thromboxan A₂, Serotonin und ATP entsteht so ein Mechanismus der positiven Rückkopplung (Xiang et al., 2008). Es werden weitere Thrombozyten aus dem vorbeifließenden Blut rekrutiert (Davi and Patrono, 2007) und heften sich den bereits adhärierenden Thrombozyten an (Brass, 2003). Die Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten wird vermittelt über Glykoprotein-Rezeptoren in der

Membran der Thrombozyten, wobei es sich hauptsächlich um Integrine handelt (Lefkovits et al., 1995). Eine zentrale Rolle kommt dabei dem Glykoprotein IIb/IIIa (Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$) zu, dessen Übergang vom niedrig- zum hochaffinen Status als gemeinsame Endstrecke der Thrombozytenaktivierung betrachtet wird (Nieswandt et al., 2009) und ihn zur Ligandenbindung befähigt (Plow et al., 1992). Der primäre Ligand ist dabei Fibrinogen, sowie ferner auch von Willebrand Faktor, Fibronektin und Vitronektin (Madan et al., 1998). Fibrinogen ermöglicht aufgrund seiner dimeren Struktur die Herstellung von Querverbindungen zu anderen aktivierte Thrombozyten, so dass es zur Thrombozytenaggregation kommt (Kulkarni et al., 2000). Mit Hilfe von Thrombin wird Fibrinogen zu Fibrin umgewandelt und es entsteht eine Fibrinmatrix, die dem Aggregat Form, Stärke, Flexibilität und Stabilität verleiht (Lord, 2007). Neben seiner Funktion bei der Aggregation von Thrombozyten ist der Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptor auch an der Adhäsion beteiligt, sowohl über das Endothel (Bombeli et al., 1998; Li et al., 1996), als auch über die darunter gelegene Extrazellulärmatrix (Gruner et al., 2003; Nieswandt et al., 2011). Auch wenn die Aggregation von Thrombozyten keine exklusive Aufgabe des Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptors ist und in Abhängigkeit von der jeweils vorherrschenden Schergeschwindigkeit auch verschiedene andere Mechanismen in unterschiedlichem Ausmaß daran beteiligt sind (Jackson, 2007; Jackson et al., 2009), so gilt er dennoch gemeinhin als gemeinsame Endstrecke der Thrombozytenaggregation (Berkowitz, 2000; Boersma et al., 2002; Gowda et al., 2004). Dies hat auch pharmakologische Bedeutung, wenn man bedenkt, dass viele Medikamente jeweils nur einzelne Aktivierungswege blockieren (Schrör and Weber, 2003; Yeghiazarians et al., 2000) und die Thrombozytenaggregationshemmung damit unvollständig ist, da auch andere Wege zur Aktivierung des Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptors führen können (Coller, 1997). Durch die direkte Blockade des Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptors hingegen lässt sich die Thrombozytenaggregation unterbinden, unabhängig davon, durch welchen Aktivierungsweg sie initiiert wurde (Lefkovits et al., 1995; Lefkovits and Topol, 1996). Diese Form der Thrombozytenaggregationshemmung wird vornehmlich in der Kardiologie eingesetzt, wodurch in speziellen Fällen des Akuten Koronarsyndroms oder Koronar-Angioplastien die klinische Prognose verbessert werden kann (De Luca, 2011). Nachdem in tierexperimentellen Modellen des Schlaganfalls durch die Blockade des Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptors eine Abnahme des zerebralen Infarktvolumens und eine Verbesserung der postischämischen

zerebralen Durchblutung erreicht werden konnte (Choudhri et al., 1998), wird diese Strategie auch vermehrt im Rahmen der Behandlung des Ischämischen Schlaganfalles in Studien geprüft (Ciccone et al., 2007; Kumar et al., 2008; Mandava et al., 2008; Seitz and Siebler, 2008). Ebenso bei der Behandlung peripherer arterieller Verschlüsse (Almeda and Schaer, 2004; Altenburg and Haage, 2011; Tepe et al., 2008), sowie zur Vermeidung thromboembolischer Ereignisse im Rahmen der endovaskulären Behandlung zerebraler Aneurysmata (Bruening et al., 2006; Kang et al., 2008; Linfante et al., 2010; Ries et al., 2009) werden Inhibitoren des Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptors eingesetzt. Darüber hinaus wurde deren Einsatz für zahlreiche weitere Indikationen erprobt (Coller, 2001).

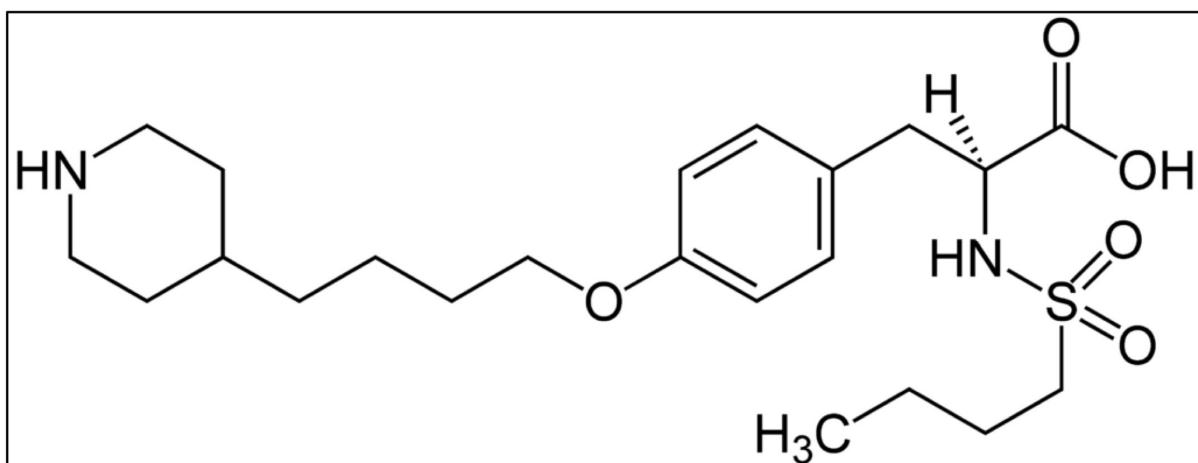


Abbildung 2: Strukturformel des Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten Tirofiban
(Quelle: Wikipedia)

In der regelmäßigen klinischen Anwendung befinden sich gegenwärtig die drei Präparate Abciximab, Eptifibatid und Tirofiban (Coller, 2001; Schneider, 2011; Xiang et al., 2008). Abciximab ist ein großer monoklonaler Antikörper, Eptifibatid und Tirofiban (Abbildung 2) sind synthetische niedermolekulare („small-molecule“) Glykoprotein IIb/IIIa-Inhibitoren (Chun et al., 2002). Eptifibatid und Tirofiban antagonisieren in reversibler, Abciximab in irreversibler Weise die Bindung zwischen Fibrinogen und dem Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptor (Leclerc, 2002) (Abbildung 3). Alle drei binden sowohl an aktive, als auch an inaktive Thrombozyten (Topol et al., 1999) und hemmen die Aggregation von Thrombozyten in dosisabhängiger Weise (Berkowitz, 2000).

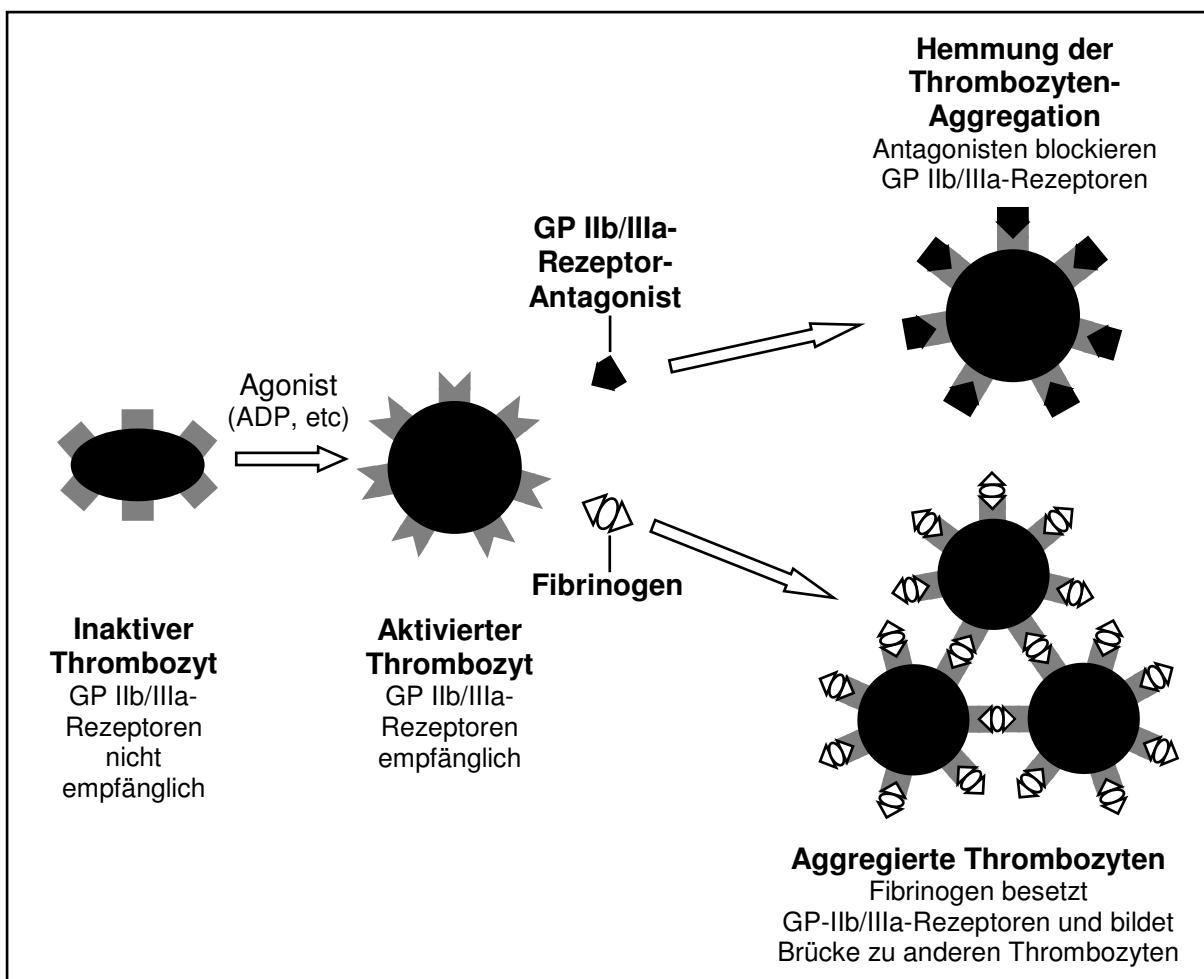


Abbildung 3: Wirkmechanismus des Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten Tirofiban. Modifiziert nach Lefkovits et al. (Lefkovits et al., 1995).

1.3 Fragestellung und Ziel der Experimente

Die vorliegende Doktorarbeit verfolgte das Ziel, die Mechanismen aufzuklären, die an der Entstehung zerebraler Mikrothromben nach Schädel-Hirn-Trauma beteiligt sind und herauszufinden, welche Rolle dabei der Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptor spielt. Außerdem sollte aufgeklärt werden, welche Bedeutung sie für die Pathophysiologie des sekundären Hirnschadens haben.

Dementsprechend formulierten wir folgende Fragestellungen:

1. Reduziert die Blockade der Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptoren die posttraumatische zerebrovaskuläre Thrombozyten-Endothel-Interaktion?
2. Vermindert die Blockade der Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptoren die Anzahl oder die Größe posttraumatisch auftretender, zerebrovaskulärer Mikrothromben und hat dies gegebenenfalls einen Einfluss auf die zerebrale Durchblutung?

3. Welche Auswirkungen hat die Blockade der Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptoren auf verschiedene Komponenten des sekundären Hirnschadens, wie intrakraniellen Druck, Hirnödem und Nekrosewachstum?

2 MATERIAL UND METHODEN

Die Experimente zur vorliegenden Arbeit wurden in den Jahren 2007 und 2008 im Institut für Chirurgische Forschung des Walter-Brendel-Zentrums für Experimentelle Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. Betreut wurde sie von Prof. Dr. med. Nikolaus Plesnila, dem Leiter der Arbeitsgruppe „Experimentelle Neurochirurgie“. Die Durchführung verlief im Rahmen des Promotionsstudiums „Molekulare und Systembiologische Medizin“ des Förderprogramms für Forschung und Lehre (FöFoLe) der Ludwig-Maximilians-Universität München, durch welches gleichzeitig finanzielle Unterstützung geleistet wurde. Die Experimente erfolgten mit Genehmigung der Regierung von Oberbayern (Tierversuchsantrag 6/04).

In den durchgeführten Experimenten wurden Mäuse einem experimentellen Schädel-Hirn-Trauma unterzogen und der Einfluss des Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptor-Blockers Tirofiban auf verschiedene Aspekte der posttraumatischen Pathophysiologie untersucht. Die durchgeführten Experimente lassen sich grob in zwei Gruppen unterteilen: Zum einen Versuche mit einem intravitalen Fluoreszenzmikroskop, bei denen die zerebrale Mikrozirkulation nach Schädel-Hirn-Trauma *in vivo* beobachtet wurde. Diese Experimente gaben Aufschluss über die Interaktionen der zellulären Elemente des Blutes mit dem Endothel, sowie über vasomotorische Aspekte des pialen Gefäßbettes, während zahlreiche physiologische Parameter des Versuchstieres überwacht werden konnten. Zum anderen Versuche, bei denen Messungen des intrakraniellen Druckes durchgeführt wurden und das Gehirn des Versuchstieres nach dem Trauma entnommen wurde, um das Ausmaß des posttraumatischen Hirnwassergehaltes oder der Größe der entstandenen Kontusionsnekrose zu quantifizieren.

2.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten männliche C57 Black 6 Mäuse mit einem Gewicht von 16,7 – 25,6 g. Diese wurden von Charles River Deutschland bezogen und hatten freien Zugang zu Wasser und Futter (Ssniff, Soest, Deutschland). Sie waren einem jeweils 12 Stunden dauernden Hell-Dunkel-Rhythmus ausgesetzt.

2.2 Anästhesie

2.2.1 Narkose und Beatmung

Die Tiere, die ein intravitalmikroskopisches Experiment durchliefen, erhielten zur Narkoseeinleitung eine zweiminütige Inhalationsnarkose. Dazu wurden sie unter einen Plastikbecher gesetzt, in den ein Gasgemisch aus einem Liter Sauerstoff, zwei Liter Raumluft und in der ersten Minute 4% Isofluran (Forene[®], Abbott, Wiesbaden, Deutschland), in der zweiten Minute 1,5% einströmte. Daraufhin verabreichten wir per intraperitonealer Injektion ein körperfrequenzadaptiert dosiertes Gemisch aus 0,05 mg/kg KG Fentanyl (Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland), 0,5 mg/kg KG Medetomidin (Domitor[®], Pfizer GmbH, Karlsruhe, Deutschland) und 5 mg/kg KG Midazolam (Dormicum[®], Roche, Basel, Schweiz) (Thal and Plesnila, 2007). Die Narkose wurde durch die wiederholte Gabe kleinerer Mengen in bedarfsabhängigen Zeitabständen aufrechterhalten.

Dann wurden die Tiere intubiert und maschinell beatmet. Als Tubus diente ein präparierter Venenverweilkatheter, wie von Thal und Plesnila beschrieben (Thal and Plesnila, 2007). Dieser Tubus war mit einem Beatmungsgerät (Minivent, Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus, March-Hugstetten, Deutschland) verbunden, über das die Atemfrequenz und das Atemzugvolumen justierbar war und dem ein Gasgemisch aus zwei Liter Raumluft und einem halben Liter Sauerstoff zufloss. Über eine Sonde, die am Tubus angebracht war, konnte mit einem Mikrokapnometer (CI240, Columbus Instruments, Columbus, USA) der endexspiratorische CO₂-Partialdruck kontinuierlich überwacht werden. Hier wurde ein Zielwert von 33 – 42 mmHg angestrebt, was über die manuelle Anpassung von Atemfrequenz (Ziel: 140 – 160 / min) und Atemzugvolumen (Ziel: 225 – 250 µl) gelang.

Alle anderen Versuche waren von weitaus kürzerer Dauer, das heißt unter einer Stunde. Hier bot sich eine dauerhafte Inhalationsnarkose mit Lachgas und Isofluran an, unter der die Tiere spontan atmeten. Die Einleitung erfolgte hier mit zwei Liter Lachgas und einem Liter Sauerstoff, sowie 4% Isofluran für eine Minute und 1,5% für eine weitere. Mit dieser Zusammensetzung wurde die Narkose auch aufrechterhalten, die das Tier nun über eine Atemmaske erhielt. Nach Beendigung des Versuchs wurden die Tiere bis zum Wiedererwachen mit reinem Sauerstoff beatmet und dann für 15 Minuten zur Vermeidung einer postoperativen Hypothermie

in einen 32°C warmen Inkubator (Intensivpflege-Inkubator 7510, Inkubator-Aggregat 7012, Drägerwerk AG, Lübeck, Deutschland) gesetzt.

2.2.2 Überwachung physiologischer Parameter

In allen Experimenten wurde die Körpertemperatur der Versuchstiere mit einem Temperaturkontrollsysteem (FHC, Bowdoinham, USA) konstant auf 37°C gehalten. Dazu lag die Maus auf einer Heizmatte, die mit einem rektalen Temperaturfühler verbunden und über einen Regelkreis rückgekoppelt war.

In den intravitalmikroskopischen Versuchen wurde der mittlere arterielle Blutdruck in der linken Femoralarterie kontinuierlich gemessen. Zu jedem intravitalmikroskopischen Aufnahmezeitpunkt wurden dann vier Werte notiert, ebenso wie für die kapnometrischen Daten des endexspiratorischen CO₂-Partialdruckes. Am Ende jedes intravitalmikroskopischen Experiments wurde noch eine arterielle Blutgasanalyse durchgeführt.

2.3 Chirurgische Präparation

Die für die intravitalmikroskopischen Experimente notwendige Intubation, die Präparation und Anlage der Gefäßkatheter, sowie die Trepanation der kranialen Fenster erfolgte mit Hilfe eines Operationsmikroskops (OpMi-1, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland).

2.3.1 Arterieller und venöser Katheter

Für die intravitalmikroskopischen Experimente war die Anlage eines arteriellen und venösen Katheters notwendig. Der arterielle Katheter diente zur invasiven Blutdruckmessung und als Zugang für eine Dauerinfusion von isotoner Kochsalzlösung 0,9% (B. Braun, Melsungen AG, Melsungen, Deutschland; Infusionsrate 0,4 ml / h; Spritzenpumpe Perfusor® Secura, B. Braun, Melsungen AG, Melsungen, Deutschland), um eine Dehydratation des Versuchstieres und ein Verschließen des Katheters zu verhindern. Über den venösen Katheter wurden Tirofiban, sowie Fluoreszenzfarbstoffe und Thrombozyten, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert waren für die Intravitalmikroskopie appliziert. Die Katheter wurden in den Femoralgefäß der linken Seite angelegt. Hierzu wurde die Maus in Rückenlage platziert und die linke Leiste eröffnet. Die Wundränder wurden seitlich abgespreizt und mit einer Pinzette wurde das Bindegewebe um den Gefäß-

/Nervenstrang aufgelockert. Ebenfalls mit einer Pinzette wurden die genannten Leitungsbahnen voneinander gelöst und freigelegt. Um Arterie und Vene wurden jeweils eine proximale und eine distale Fadenschlinge (7/0, Pearsalls Ltd., Taunton Somerset, England) gelegt. Die distale diente als Ligatur und wurde direkt zugezogen, die proximale blieb vorerst offen und diente als spätere Fixierung der Katheterschläuche. Mit Hilfe eines Metallclips wurden die beiden Blutgefäße nun proximal abgeklemmt und mit einer feinen Gefäßschere bis zur Hälfte ihres Durchmessers inzidiert. Die zuvor heparinisierten Katheterschläuche (Portex® Non Sterile Polythene Tubing, Innendurchmesser 0,28 mm, Außendurchmesser 0,61 mm, Smiths Medical International Ltd., Hythe Kent, UK) wurden nun behutsam in proximaler Richtung eingeführt und durch zuziehen der vorgelegten Fadenschlingen fixiert. Um eine stabilere Lage der Katheter zu erreichen, wurde der Operationssitus mit Gewebekleber (Vetbond™, 3M Animal Care Products, St. Paul, USA) aufgefüllt und zusätzlich per Naht verschlossen. Zur invasiven Blutdruckmessung war der arterielle Katheter an einen Druckwandler (DTX Plus, Spectramed) angeschlossen, dessen Signale an einen Verstärker (TAM-A, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland) weitergeleitet wurden und mit Hilfe eines Analog-Digital-Wandlers (PCI-9112, ADLINK Technology GmbH, Düsseldorf, Deutschland) von einem Computer mit der Software DASYLab (measX GmbH & Co. KG, Mönchengladbach, Deutschland) als kontinuierliche Werte des mittleren arteriellen Blutdrucks angezeigt wurden.

2.3.2 Trepanation kranialer Fenster

Zur Trepanation der kranialen Fenster wurde die Maus in Bauchlage platziert und ihr Kopf in einem stereotaktischen Rahmen fixiert (für intravitalmikroskopische Experimente: Modell 51600, Stoelting Company, Wood Dale, USA; für alle anderen Experimente: Modell 900 Small Animal Stereotaxic Instrument, David Kopf Instruments, Tujunga, USA). Dann wurde das Fell auf der Kopfoberseite entlang der Medianlinie inzidiert und seitlich abgespreizt. Die Trepanation erfolgte mit einem elektrischen Bohrer (Labset-N, Rewatronik, Wald-Michelbach, Deutschland) und einem Bohraufsatz mit einem Bohrkopf von 0,6 mm Durchmesser (Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland; B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland). Um einer zu großen Wärmeentwicklung vorzubeugen, erfolgte dies unter ständiger Kühlung mit isotonischer Kochsalzlösung. Gegebenenfalls auftretende kleinere

Blutungen wurden mithilfe von Saugtupfern (Sugi®, Kettenbach GmbH & Co. KG, Eschenburg, Deutschland) gestillt. Zur Applikation des Schädel-Hirn-Traumas wurde eine quadratische Kraniotomie zwischen vorderer und hinterer Koronarnaht der rechten Seite durchgeführt. In der Medianlinie wurde nicht gebohrt, so dass die Sagittalsutur als Scharnier diente, an dem der stehen gelassene Knochendeckel auf- und zugeklappt werden konnte. Dieser wurde nur für die Applikation des Traumas kurz hochgeklappt und danach direkt wieder verschlossen und mit Gewebekleber fixiert. Sofern an den Tieren keine intravitalmikroskopischen Beobachtungen durchgeführt werden sollten, wurde die Inzision per Naht wiederverschlossen (Ethibond Excel 5-0, Ethicon, Johnson & Johnson MEDICAL GmbH, Norderstedt, Deutschland). Bei Tieren, die ein intravitalmikroskopisches Experiment durchliefen, wurde ein zusätzliches, kleineres Fenster für die Intravitalmikroskopie geschaffen. Dieses lag vor der vorderen Koronarnaht rechts von der Sagittalnaht (Abbildung 4) und war nicht wiederverschließbar, so dass die Dura Mater stets feucht gehalten werden musste um nicht auszutrocknen. Dazu wurde das Kopffell an vier Ecken per Naht am stereotaktischen Rahmen befestigt und zu einem quadratischen Trichter aufgespannt, der stets mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllt war. Für die Messung des intrakraniellen Druckes wurde bei den dafür vorgesehenen Tieren zusätzlich zur Kraniotomie für das Schädel-Hirn-Trauma rostral davon ein Bohrloch für die Druckmesssonde geschaffen.

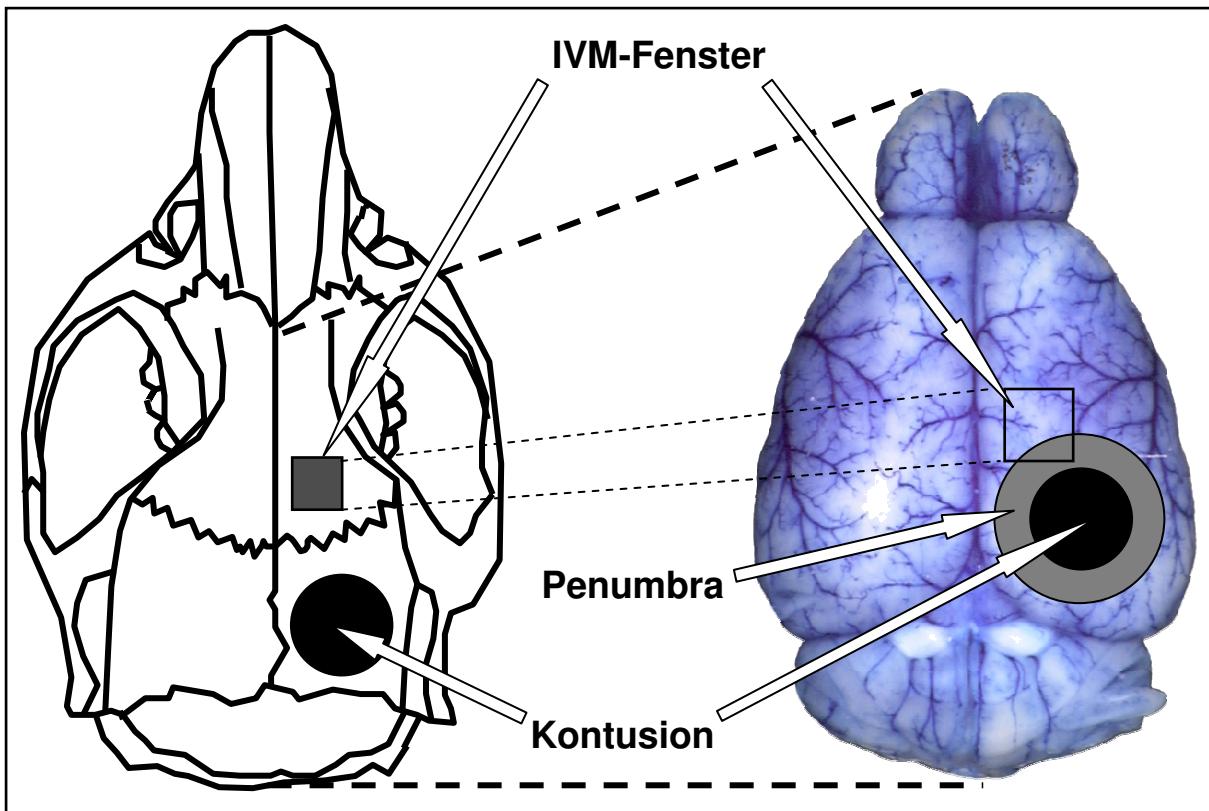


Abbildung 4: Räumliche Relation der traumatischen Kontusion und ihrer Ausdehnung zum kranialen Fenster für die Intravitalmikroskopie. Modifiziert nach Schwarzmaier et al (Schwarzmaier et al., 2010)

2.3.3 Hirnentnahme

Die Tiere wurden mit oben beschriebener Narkoseeinleitung durch Lachgas, Sauerstoff und Isofluran inhalativ narkotisiert und durch zervikale Dislokation getötet und dekapitiert. Mit einer Schere wurde der Schädelknochen entlang der Sagittalnaht aufgeschnitten und zu beiden Seiten aufgespreizt. Mit einem kleinen Spatel wurde das Gehirn dann vorsichtig herausgelöst. Für die Vermessung der Nekrosevolumina wurde es daraufhin sofort mit Trockeneis schockgefroren und einzeln in ein Kuvert aus Aluminiumfolie verpackt und bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert (siehe 2.7). Für die Bestimmung des Hirnwassergehalts wurde es sofort nach seiner Entnahme entsprechend weiter präpariert (siehe 2.9).

2.4 Das Traumamodell: Controlled Cortical Impact (CCI)

Für die Applikation eines experimentellen Schädel-Hirn-Traumas verwendeten wir das Traumamodell des Controlled Cortical Impact (CCI), das bereits für verschiedene Tiergattungen etabliert wurde (Alessandri et al., 2003; Dixon et al., 1991; Lighthall,

1988; Smith et al., 1995). Das Prinzip beruht auf einer Maschine, die über einen luftdruckgetriebenen Zylinder verfügt, der auf Knopfdruck hervorschießt und durch seinen Einschlag auf der Hirnoberfläche eine Deformation verursacht (Lighthall, 1988). Ein Vorteil dieses Modells ist die Möglichkeit, durch individuelle Einstellung bestimmter Parameter (Eindringtiefe, Geschwindigkeit und Kontaktzeit des Zylinders) das Ausmaß der Deformation festlegen, und damit die Schwere des Traumas kontrollieren zu können (Morales et al., 2005). Die Maschine (MouseKatjuscha 2000, L. Kopacz, Universität Mainz, Deutschland), die in den Versuchen der vorliegenden Arbeit zur Anwendung kam (Abbildung 5), wurde eigens für die Anwendung bei Mäusen entwickelt. Sie verfügt über eine Hochpräzisionsmikrometerschraube zur verbesserten Einstellung der Eindringtiefe und eine Vorrichtung zur Messung der Aufschlagsgeschwindigkeit. Dadurch wird eine hohe intra- und interindividuelle Reproduzierbarkeit der hervorgerufenen Kontusionsvolumina gewährleistet (Zweckberger et al., 2003).

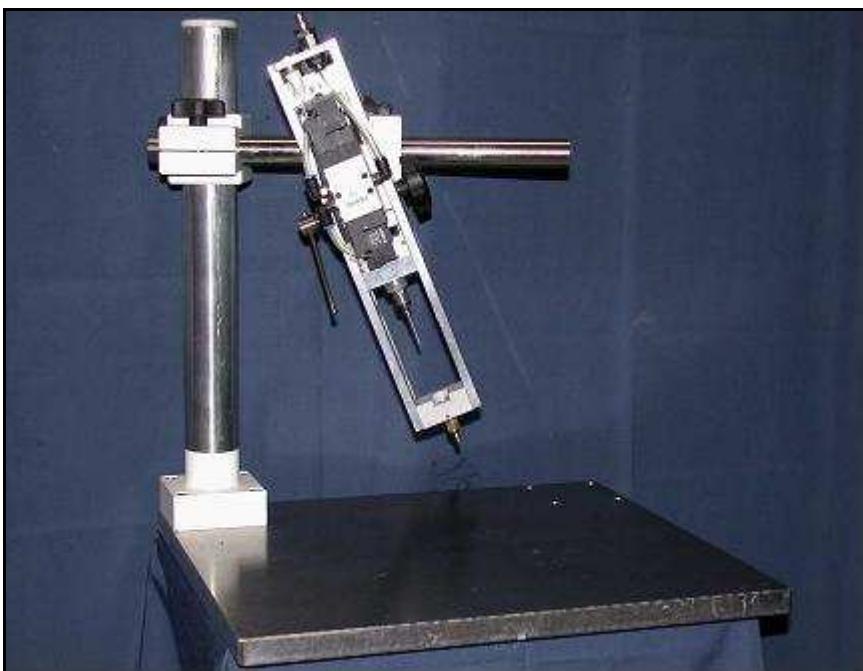


Abbildung 5: Maschine zur Applikation des Controlled Cortical Impact-Traumas

Für unsere Versuche ließen wir den Zylinder mit einer Geschwindigkeit von 8 m/s herausschießen und legten die Eindringtiefe auf 1 mm und seine Kontaktzeit auf 150 ms fest. Lediglich für die intravitalmikroskopischen Untersuchungen veränderten wir diese Parameter auf eine Eindringtiefe von 0,5 mm und eine Geschwindigkeit von 6 m/s. Dadurch applizierten wir ein etwas schwächeres Trauma, um die Gefahr von

Blutungen und infolgedessen schlechteren Sichtverhältnissen zu minimieren (Schwarzmaier et al., 2010).

2.5 Tirofibanapplikation

Basierend auf Angaben in der Literatur verabreichten wir Tirofiban (Aggrastat®, MSD Sharp & Dohme GMBH, Haar, Deutschland) in einer Dosis von 0,36 µg/g Körpergewicht (Kupatt et al., 2002). Tiere, die einer Kontrollgruppe zugeordnet wurden, erhielten ein entsprechendes Volumen isotonische Kochsalzlösung. Die Tiere, die intravitalmikroskopische Untersuchungen durchliefen, bekamen Tirofiban über den venösen Katheter verabreicht. Dabei wurde ein Drittel der Gesamtdosis als initialer Bolus direkt nach dem Trauma gespritzt. Dann erfolgte eine kurze Unterbrechung der Tirofibanapplikation, um CFDA-markierte Thrombozyten zu infundieren, woraufhin die übrige Tirofibandosis über einen Zeitraum von 30 Minuten gegeben wurde.

In allen anderen Experimenten wurde Tirofiban intravenös über eine Punktionsstelle der Schwanzvene bolusartig infundiert. Der Zeitpunkt war hier vom jeweiligen Versuchsprotokoll abhängig (siehe 2.7.1). Sofern der Infusionszeitpunkt nicht ohnehin in den Zeitraum der präparationsbedingten Narkose fiel, wurden die Tiere wie unter 2.2.1 beschrieben in eine Inhalationsnarkose versetzt. Dann wurde der Schwanzansatz mit einem Stück Katheterschlauch abgebunden um den venösen Blutstrom zu stauen. Die Vene wurde mit einer Injektionskanüle (BD Microlance™ 3, 30G ½“ 0,3 x 13 mm, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) punktiert und Tirofiban, beziehungsweise isotonische Kochsalzlösung aus einer Spritze (Inkjet®-F, 1ml, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) im Bolus infundiert.

2.6 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

2.6.1 Versuchsablauf und -protokoll

Für die intravitalmikroskopischen Experimente wurden 20 Tiere verwendet. Zehn davon erhielten Tirofiban, zehn weitere bildeten die Kontrollgruppe und erhielten physiologische Kochsalzlösung (Vehikel). Von der statistischen Auswertung ausgeschlossen wurden Tiere, bei denen der mittlere arterielle Blutdruck im Versuchsverlauf unter 40 mmHg fiel oder der kapnometrisch gemessene,

endexspiratorische CO₂-Partialdruck Werte unter 20 mmHg erreichte. Außerdem wurden Tiere nicht einbezogen, die bereits vor dem Schädel-Hirn-Trauma deutliche Beeinträchtigungen der Durchblutung in den beobachteten zerebralen Blutgefäßen zeigten. Ein Tier wurde ausgeschlossen, da im Verlauf des Experiments der Knochendeckel der Kraniotomie für das Trauma abgebrochen war. So blieben insgesamt 15 Tiere für die statistische Auswertung übrig, von denen neun Tirofiban erhielten und sechs die Kontrollgruppe bildeten.

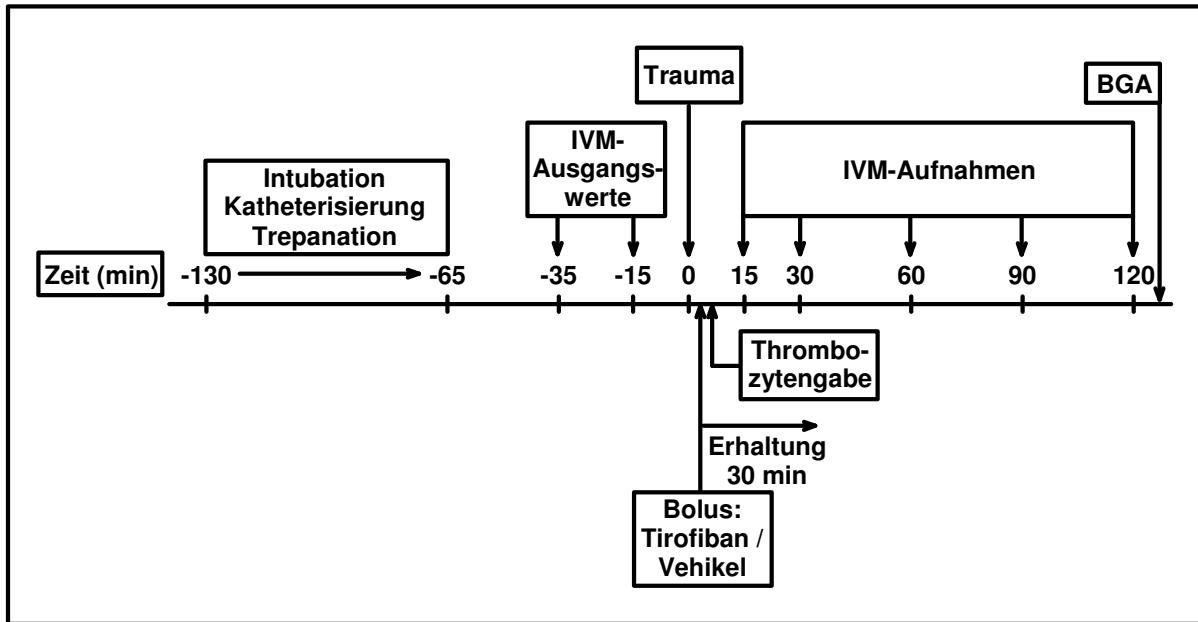


Abbildung 6: Zeitlicher Ablauf eines intravitalmikroskopischen Experiments

Der Ablauf des Versuchs gestaltete sich folgendermaßen: Zuerst wurde die Maus gewogen, narkotisiert und intubiert. Darauf folgte die Anlage des venösen und arteriellen Katheters, sowie die Trepanation der kranialen Fenster. Dann wurden zwei intravitalmikroskopische Baseline-Aufnahmen 35 und 15 Minuten vor dem Schädel-Hirn-Trauma zur Ermittlung der prätraumatischen Ausgangswerte durchgeführt. Es folgte die Applikation des experimentellen Schädel-Hirn-Traumas mittels Controlled Cortical Impact, für dessen Dauer die maschinelle Beatmung, Blutdruckmessung und Temperaturkontrolle kurzzeitig unterbrochen wurde und die Narkose vorübergehend mit einem Gemisch aus Lachgas und Sauerstoff aufrechterhalten wurde. Nach dem Trauma erhielten die Tiere unmittelbar Tirofiban oder Kochsalzlösung nach oben beschriebenem Schema (siehe 2.5), unterbrochen durch die bolusartige Infusion CFDA-markierter Thrombozyten. Dann wurden 15, 30, 60, 90 und 120 Minuten nach dem Trauma weitere intavitalmikroskopische

Aufnahmen angefertigt und zum Abschluss noch eine arterielle Blutgasanalyse durchgeführt.

2.6.2 Gerät und Prinzip

Mit der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie sind Beobachtungen der zerebralen Mikrozirkulation *in vivo* möglich (Kataoka et al., 2004; Schwarzmaier et al., 2010). Durch die Anfärbung bestimmter Strukturen mit Fluoreszenzfarbstoffen ist die Darstellung und Untersuchung unterschiedlichster pathophysiologischer Aspekte möglich.

Als Untersuchungseinheit verwendeten wir ein Epiilluminationsmikroskop (Orthoplan, Leitz, Wetzlar, Deutschland). Als Lichtquelle diente eine Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe (HBO 100 W/2, Osram, München, Deutschland). Ein System aus manuell zwischenschaltbaren Filterböcken (Ploemopak, Leitz, Wetzlar, Deutschland), von denen jeder aus einer Kombination verschiedener Filter besteht, ermöglichte das selektive Durchlassen bestimmter Wellenlängenbereiche dieser Lichtquelle. Da jeder Fluoreszenzfarbstoff durch einen bestimmten Wellenlängenbereich angeregt wird, konnten durch die Auswahl des entsprechenden Filterblocks speziell die Strukturen sichtbar gemacht werden, die mit dem entsprechenden Fluoreszenzfarbstoff markiert waren (Ploem and Walter, 2001). An das Mikroskop war eine hochauflösende SIT (Silicon intensified target) Restlichtkamera (C2400-08, Hamamatsu, Herrsching, Deutschland) angeschlossen, deren Signal an einen Videomonitor (PVM-2730, Sony, Tokio, Japan) weitergeleitet wurde, so dass die mikroskopierten Strukturen in Echtzeit beobachtet werden konnten. Mit einem daran angeschlossenen Videorekorder (AG-7350, Panasonic, Osaka, Japan) ließen sich Aufzeichnungen dieser Beobachtungen anfertigen, anhand derer die quantitative Erhebung der interessierenden Parameter dann zu einem späteren Zeitpunkt an einer separaten Auswertungsstation erfolgte. Ein Videotimer (VTG-33, For-A Company Limited, Tokio, Japan) speiste das Datum und die sekundengenaue Uhrzeit in die Videoaufzeichnung ein, wodurch bei der späteren Auswertung eine Navigation auf der Zeitachse möglich war.

Zur Durchführung der mikroskopischen Beobachtungen wurde der stereotaktische Operationstisch, auf dem sich die Maus befand, auf einen Kreuztisch (Leitz, München, Deutschland) unter das Mikroskop gestellt. Dessen Position ließ sich mit einem computergesteuerten (AlphaComm, Phytron Elektronik, Gröbenzell,

Deutschland) Schrittmotor (IXEC, Phytron Elektronik, Gröbenzell) in der Horizontalen mikrometergenau ausrichten. Die aktuelle Position war stets anhand von X- und Y-Koordinaten angegeben, so dass ein späteres Wiederauffinden beobachteter zerebraler Gefäßabschnitte anhand der notierten Koordinaten möglich war. Zuerst wurde in der Übersichtsvergrößerung (10x, 0,22 numerische Apertur, Leitz, Wetzlar, Deutschland) ein Überblick über den zerebralen Gefäßbaum gewonnen (Abbildung 7).

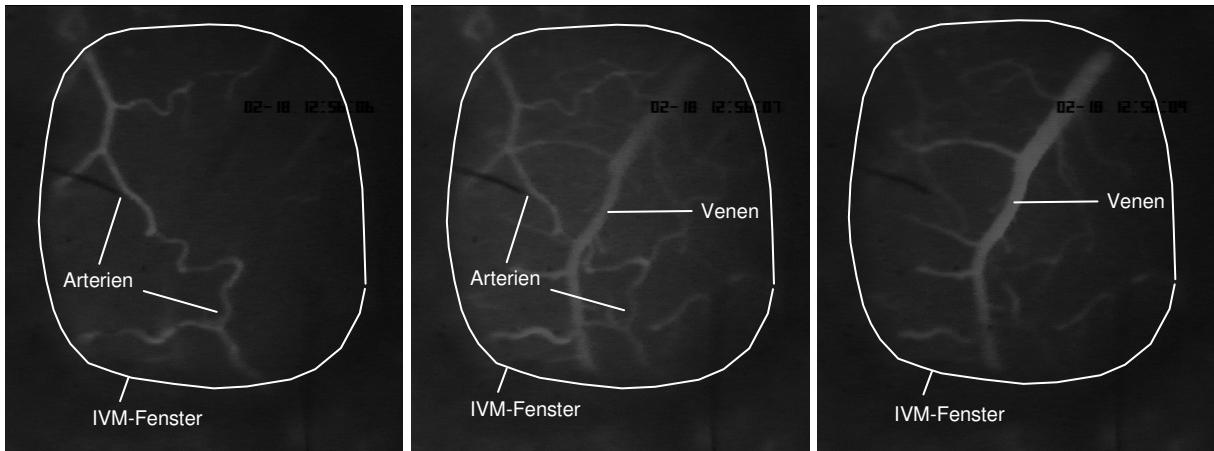


Abbildung 7: Pialer Gefäßbaum in der intravitalmikroskopischen Übersichtsaufnahme. Die Unterscheidung von Venen und Arterien gelang dabei anhand der Reihenfolge und Richtung, in der sich das infundierte Rhodamin verteilte. Die drei Abbildungen zeigen nacheinander von links nach rechts die Anflutungsreihenfolge: zuerst in Arterien, dann in Venen. In Arterien fließt das Rhodamin in die distale Richtung, in Venen in die proximale.

Um verlässliche Aussagen bezüglich der Veränderungen bestimmter Parameter über die Zeit machen zu können, war es wichtig, stets dieselben Gefäßabschnitte zu beobachten. Daher wurden für jedes Tier stets vier Ausschnitte der zerebralen Mikrozirkulation ausgewählt, wobei insgesamt mindestens eine Arterie und mindestens drei Venen zu sehen sein mussten. Sobald diese vier Ausschnitte definiert waren, wurden zwei Baselineaufnahmen jedes Gefäßausschnitts angefertigt (einmal 35 und einmal 15 Minuten vor dem Trauma). Diese und alle weiteren Aufnahmen wurden stets mit einem Salzwasser-Immersionsobjektiv (25x, 0,6 numerische Apertur, Leitz, Wetzlar, Deutschland) angefertigt. Dann wurde das Schädel-Hirn-Trauma appliziert und es erfolgten weitere Aufnahmen in oben definierten Zeitabständen (siehe 2.6.1).

2.6.3 Fluoreszenzfarbstoffe

2.6.3.1 CFDA-SE-markierte Thrombozyten

Um das Verhalten und die Bedeutung von Thrombozyten in der Pathophysiologie des Schädel-Hirn-Traumas zu untersuchen, infundierte man den Tieren Thrombozyten, die *in vitro* mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFDA-SE (5-(6)-Carboxyfluorescein Diacetat, Succinimidyl Ester) (Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, USA) markiert und dadurch in der Intravitalmikroskopie sichtbar waren. CFDA-SE gelangt als nicht fluoreszierende Vorstufe durch Diffusion in das Zellinnere – unter anderem von Thrombozyten (Tsujikawa et al., 1999). Dort wird durch Esterasen ein Teil abgespalten, so dass er zu fluoreszieren beginnt und nicht mehr aus der Zelle gelangt (Wang et al., 2005).

Die Separation und Anfärbung der Thrombozyten erfolgte aus allogenen Spendertieren nach bewährtem, leicht abgewandeltem Protokoll (Manegold et al., 2003; Massberg et al., 1998a; Massberg et al., 1998b). Hierzu wurden die Tiere in Rückenlage mit Isofluran narkotisiert und das Blut mittels Herzpunktion gewonnen. Dazu wurde eine mit 200 µl Alsever's Puffer (Stammlösung: 8 g Tri-Na Citrat x 2 H₂O, 4,2 g NaCl, 20,5 g Glucose x 1 H₂O und 0,55 g Zitronensäure gelöst in 1000 ml Aqua destillata und mit NaOH auf pH 6,2 eingestellt) und 15 µl Prostaglandin E1 (Calbiochem, Merck, Darmstadt, Deutschland) gefüllte und zuvor heparinisierte 2 ml Spritze (BD Discardit™ II, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) und eine 24G Punktionsnadel (BD Microlance™ 3, 24G 1“ Nr. 17, 0,55 x 2,5 mm, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Das Blut wurde umgehend mit 500 µl D-PBS (Dulbecco's Phosphate buffered Saline, ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) verdünnt und bei 100 g und 24°C für zehn Minuten zentrifugiert. Dabei war ein vorsichtiges Abbremsen und Beschleunigen wichtig, um die Thrombozyten nicht schon vorzeitig zu aktivieren. Der Überstand, der die Thrombozyten enthielt, wurde abpipettiert und bei 37°C für 15 Minuten im Dunkeln mit 1500 µl D-PBS, 450 µl Alsever's Puffer, 50 µl Prostaglandin E1 und 2 µl CFDA-SE inkubiert. Dann wurde erneut für zehn Minuten bei 24°C und 1430 g zentrifugiert. Der daraus gewonnene Überstand wurde verworfen und das zurückbleibende Pellet aus Thrombozyten wieder in 200 µl D-PBS resuspendiert. Abschließend wurde die Reinheit und Thrombozytenkonzentration dieser Suspension mit einem Coulter Counter (Coulter AcT 8, Beckman Coulter, Brea, USA) ermittelt und bis zu ihrer Applikation

lichtgeschützt aufbewahrt. Je nach Thrombozytengehalt der hergestellten Suspension wurde diese gegebenenfalls verdünnt, so dass die Versuchstiere 50×10^6 CFDA-markierte Thrombozyten erhielten.

Überdies wurde mittels diverser durchflusszytometrischer Analysen (FACSort und Cellquest Software, Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) überprüft, ob die entnommenen Thrombozyten prinzipiell aktivierbar waren, ob sie im Laufe der Separation, Anfärbung und anschließender Lagerung sogar vorzeitig aktiviert wurden und ob die Anfärbung der Thrombozyten durch CFDA-SE gelungen war. Hierfür wurden verschiedene Proben von Vollblut und separierten Thrombozyten, sowohl CFDA-markiert, als auch ungefärbt, sowie nach einer gewissen Lagerungsperiode untersucht. Jede Probe wurde zusätzlich nach Zugabe von Thrombin (Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) analysiert, um die Aktivierbarkeit der Thrombozyten zu testen. Darüber hinaus wurde jede Probe mit Hilfe zwei verschiedener monoklonaler Antikörper untersucht, die gegen bestimmte Membranproteine von Thrombozyten gerichtet sind. Zum einen gegen CD41, auch bekannt als Glykoprotein IIb oder Integrin- α_{IIb} (FITC-markierte Anti-Maus CD41 monoklonale Antikörper, PharMingen, Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA), Bestandteil des Glykoprotein-IIb/IIIa Komplexes auf der Oberfläche von Thrombozyten und Megakaryozyten. Dieser Antikörper ermöglicht die Identifikation und Auszählung von Thrombozyten (Bagamery et al., 2005). Zum anderen ein Antikörper gegen P-Selektin (CD62P) (FITC-markierte Anti-Maus CD62 P-Selektin monoklonale Antikörper, PharMingen, Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA), ein Zelladhäsionsmolekül, das von aktivierte Endothelzellen und Thrombozyten exprimiert wird (Vandendries et al., 2004). Somit ermöglicht dieser Antikörper die Identifikation aktiverter Thrombozyten.

2.6.3.2 Rhodamin 6G

Für die intravitalmikroskopische Ermittlung der Durchmesser zerebraler Gefäße verwendet unsere Arbeitsgruppe üblicherweise Fluorescein-Isothiocyanat-markiertes Dextran, welches nach Infusion das gesamte Plasma anfärbt (Kataoka et al., 2004). Da das Fluoreszenzspektrum von FITC-Dextran allerdings in einem ähnlichen Bereich liegt, wie das für die Thrombozytenfärbung benutzte CFDA, verwendet man für beide den gleichen intravitalmikroskopischen Filterblock. Folglich war es nicht möglich, beide Fluoreszenzfarbstoffe zeitgleich zu verabreichen und die markierten Strukturen getrennt voneinander intravitalmikroskopisch zu beobachten. Da wir

jedoch in diesen Experimenten auch Aussagen über die Durchmesser der beobachteten Blutgefäße machen wollten, verwendeten wir stattdessen zusätzlich den Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 6G (Merck, Darmstadt, Deutschland), den wir intravenös infundierte. Dieser lagert sich in den Mitochondrien von Zellen ab (Johnson et al., 1981), so dass Leukozyten und Thrombozyten *in vivo* angefärbt werden, nicht aber Erythrozyten (Dirnagl et al., 1994). Die Wände der von uns beobachteten Gefäße erschienen in unseren Experimenten ausreichend deutlich, so dass wir unter Rhodamin 6G eine Vermessung der Gefäßdurchmesser durchführen konnten. Wir verabreichten zu jedem intravitalmikroskopischem Aufnahmezeitpunkt 0,05 ml einer 0,01% Lösung Rhodamin 6G.

Außerdem ließen sich dadurch zusätzliche Aussagen über das Verhalten von Thrombozyten in der zerebralen Mikrozirkulation machen. Die Unterscheidung zu Leukozyten gelang dabei anhand des Größenunterschieds. Schwieriger gestaltete sich jedoch die Abgrenzung letzterer von kleineren, rollenden oder adhärierenden Aggregaten. Ein Vorteil dieser zusätzlichen Beurteilung der Thrombozyten mit Rhodamin 6G lag jedoch darin, dass es durch die direkte intravenöse Applikation die im Kreislauf des Tieres zirkulierenden Thrombozyten und Leukozyten anfärbte, während die Markierung mit CFDA ausschließlich die separierten Thrombozyten und damit einen weitaus geringeren Anteil sichtbar machte. Andererseits war bei letzterem keine Abgrenzung zu Leukozyten erforderlich.

2.6.4 Auswertungsprinzip

Zu jedem intravitalmikroskopischen Aufnahmezeitpunkt (2.6.1) erfolgte die Videoaufzeichnung zuerst für circa 35 Sekunden mit zwischengeschaltetem Filterblock für Rhodamin 6G, dann wurde dieser durch den Filterblock für CFDA ausgetauscht und weitere 35 Sekunden aufgezeichnet.

Die Analyse der intravitalmikroskopischen Videoaufzeichnungen erfolgte an einem separaten Auswertungsplatz nach Beendigung der Experimente. Dieser Platz bestand aus einem Videorekorder (AG-7350, Panasonic, Osaka, Japan), einem Videomonitor (PVM-2730 QM, Sony, Tokio, Japan) und einem Personal Computer, auf dem die Auswertungssoftware Cap-Image (Dr. Zeintl Ingenieurbüro, Heidelberg, Deutschland) installiert war. Mit Hilfe dieser Software war es möglich, Strecken und Flächen auf den Videoaufzeichnungen zu vermessen. Außerdem konnten wir durch

Beobachtung die Häufigkeiten bestimmter Zelltypen auszählen und ihre Verhaltensweisen untersuchen.

Da, wie beschrieben zwar stets dieselben Ausschnitte der zerebralen Mikrozirkulation beobachtet wurden, doch für uns standardisierte Angaben über Gefäßstrecken von 100 µm Länge entscheidend waren, wurde für die Offline-Auswertung eine Schablone angefertigt (Abbildung 8A), deren Ausschnitt eine Länge entsprechend einer Strecke von 100 µm im intravitalmikroskopischen Beobachtungsfenster hatte. Diese konnte mittels Klebestreifen auf dem Monitor befestigt werden und wurde immer an bestimmten Fixpunkten im beobachteten Gefäßbaum orientiert, so dass stets dieselben Gefäßabschnitte analysiert werden konnten. Alle erhobenen, mikrozirkulatorischen Parameter beziehen sich ausschließlich auf den Bereich innerhalb des Ausschnitts dieser Schablone. Für jeden intravitalmikroskopischen Aufnahmezeitpunkt wurden dann alle Gefäßabschnitte in folgender Weise untersucht: Zuerst erfolgte unter Rhodamin die Vermessung der Gefäßdurchmesser und eine Beurteilung der zerebralen Durchblutung. Dann wurden für 30 Sekunden die verschiedenen Zellen ausgezählt, beziehungsweise vermessen, sowohl unter Rhodamin wie unter CFDA, sodass für alle Zellparameter separate Werte für beide Farbstoffe vorlagen. Für jeden Zeitpunkt wurden dann Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler der einzelnen Parameter berechnet, wobei die der Zellzahlen mit zwei multipliziert wurden, sodass die Werte standardisiert als n / 100 µm / min vorlagen. Insgesamt ergaben sich aus den 15 in die Wertung einbezogenen Tieren 73 Venen (25 in Kontrollgruppe, 48 in Tirofibangruppe) und 23 Arterien (11 in Kontrollgruppe, 12 in Tirofibangruppe) zur Analyse. Wenn die Sichtverhältnisse keine klare Beurteilung eines Parameters zuließen, wurde das jeweilige Gefäß zum entsprechenden Zeitpunkt für diesen Parameter als nicht auswertbar eingestuft, so dass sich je nach Parameter und Zeitpunkt unterschiedliche Gefäßzahlen ergaben.

2.6.5 Beobachtete Parameter

2.6.5.1 Physiologische Parameter

Über den arteriellen Katheter erfolgte eine kontinuierliche invasive Messung des mittleren arteriellen Blutdrucks. Zu jedem intravitalmikroskopischen Aufnahmezeitpunkt wurde für jedes Gefäßfenster der jeweils angezeigte Messwert

notiert, so dass pro Aufnahmezeitpunkt vier Werte für jedes Tier vorlagen. In analoger Weise wurde mit dem endexspiratorischen CO₂-Partialdruck verfahren. Am Ende jedes Experiments wurde mit einer heparinbeschichteten Blutentnahmekapillare (Bayer Vital GmbH Diagnostika, Fernwald, Deutschland) arterielles Blut für die Blutgasanalyse entnommen (Chiron Diagnostics 860, Chiron Diagnostics).

2.6.5.2 Mikrozirkulation

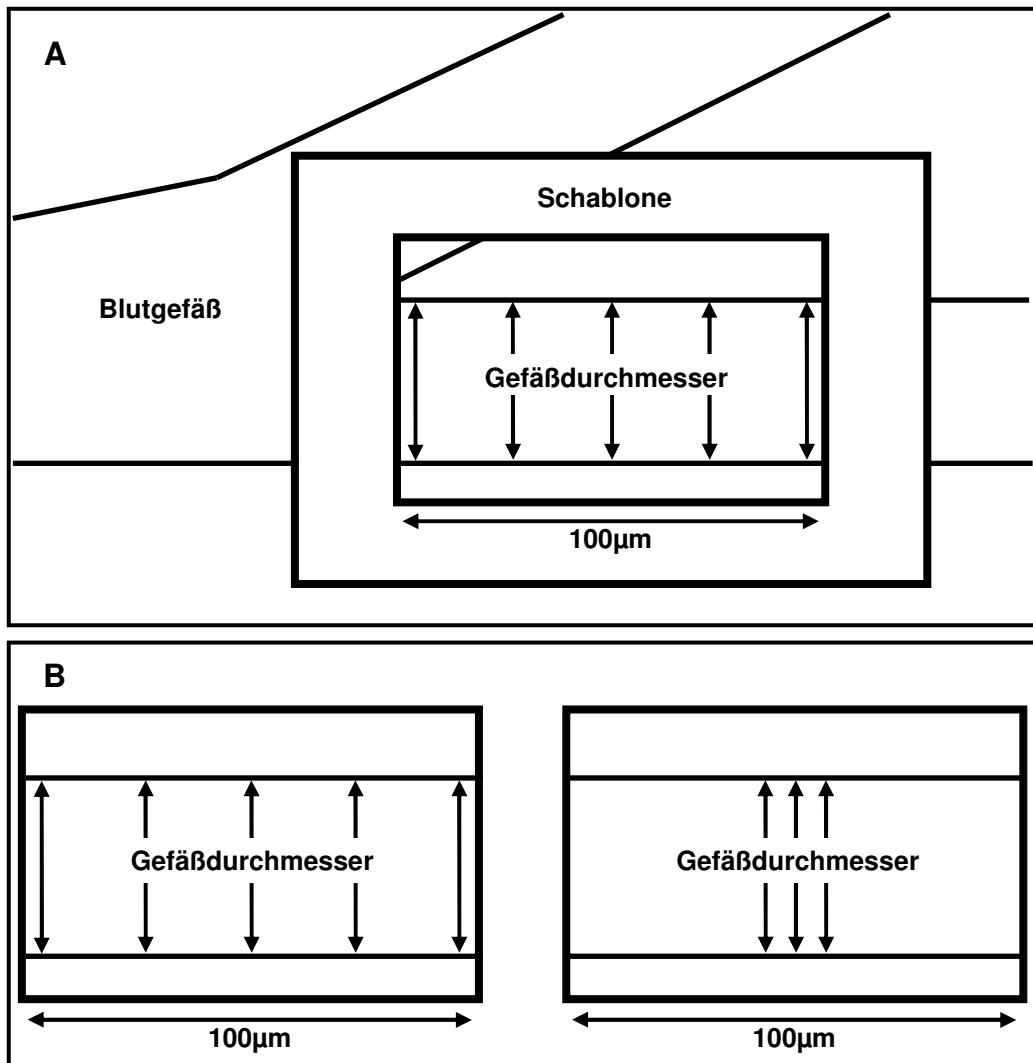


Abbildung 8: (A) Schablone für die Erhebung der mikrozirkulatorischen Parameter und des Gefäßdurchmessers. (B) Zwei Verfahren zur Messung des Gefäßdurchmessers

Zuerst wurde der Durchmesser des beobachteten Gefäßes ermittelt. Hierfür wurden orthogonale Verbindungslinien zwischen den beiden Gefäßwänden gezogen, deren Länge das Programm Cap Image anzeigen und deren Mittelwert den Gefäßdurchmesser ergab. Dabei wurde jedes Gefäß in zwei unterschiedlichen

Verfahren vermesssen (Abbildung 8B): Einmal wurden drei mittige Linien angelegt, von denen die erste in der Mitte der beobachteten Gefäßlänge lag, und jeweils eine weitere zu beiden Seiten knapp daneben. Die andere Methode erfolgte mit fünf Verbindungslien, von denen die erste in der Mitte und zwei weitere an den beiden Enden der beobachteten Strecke, sowie zwei weitere jeweils auf beiden Seiten dazwischen lag. Die Ergebnisse unterschieden sich nicht wesentlich (Abbildung 9), wobei wir für unsere Auswertungen die Resultate der letztgenannten Methode verwendeten, weil wir glauben, dass sie Kaliberschwankungen innerhalb der beobachteten Strecke besser ausgleicht.

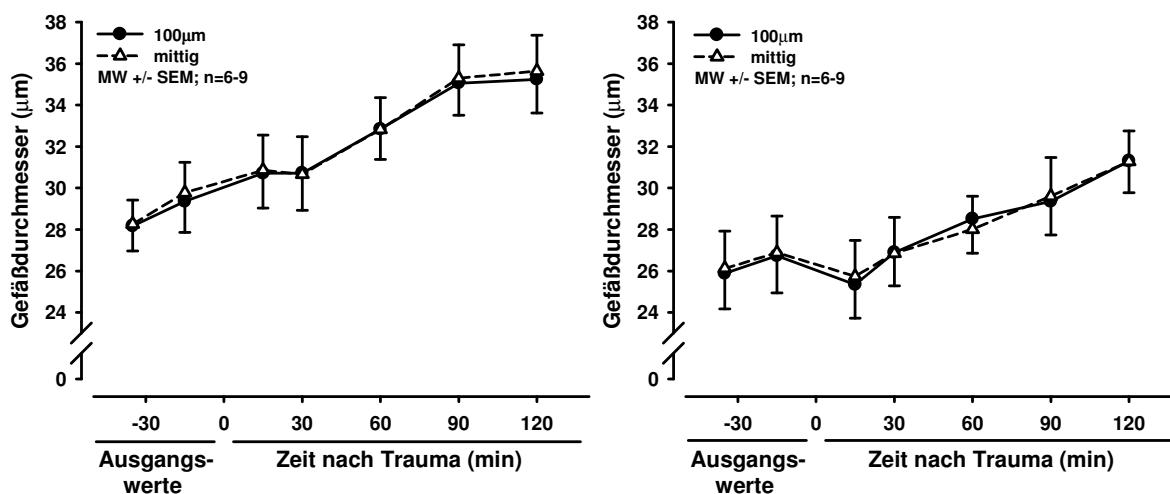


Abbildung 9: Vergleich der Ergebnisse zwei verschiedener Messmethoden zur Ermittlung der Gefäßdurchmesser. Darstellung in Absolutwerten (links: Venen, rechts: Arterien)

Um die Veränderungen der Gefäßdurchmesser nach dem Trauma darzustellen, definierten wir für jedes Gefäß den Mittelwert der beiden Ausgangswerte 35 und 15 Minuten vor dem Trauma als 100% und setzten die Werte des Gefäßes nach dem Trauma jeweils dazu in Relation, so dass diese als Veränderung in Prozent des Ausgangswertes angegeben sind.

Um noch weitere Erkenntnisse zu den Gefäßdurchmessern zu erhalten, teilten wir die Blutgefäße nach der Größe ihrer Durchmesser in Kategorien ein. Diese definierten wir in Zehnerschritten: < 20 µm, 20 – 29 µm, 30 – 39 µm, 40 – 49 µm und ≥ 50 µm. So war für jeden Beobachtungszeitpunkt eine detaillierte Aussage über die Häufigkeit bestimmter Größenkategorien möglich.

Daraufhin wurde die Fließgeschwindigkeit des Blutes in den untersuchten Gefäßabschnitten beurteilt. Hierbei ergaben sich vier Kategorien in welche diese eingeteilt wurden: normal, verlangsamt, keine Durchblutung und Umkehr der Flussrichtung.

Dann wurden die intravaskulären Zellen beurteilt. Hierbei interessierten wir uns insbesondere für das Auftreten von Mikrothromben oder Zellaggregaten und ob diese möglicherweise im Zusammenhang mit einer Beeinträchtigung der zerebralen Durchblutung stehen. Wir kategorisierten die Zellen in Abhängigkeit von ihrer Interaktion mit dem Endothel als rollende („Roller“) und adhärierende („Sticker“) Thrombozyten (Massberg et al., 1998b). Rollende Thrombozyten waren demnach Zellen, welche die beobachtete Gefäßstrecke sichtbar langsamer passierten als die Fließgeschwindigkeit des Blutes. Dabei war es unwesentlich, ob die betreffende Zelle eine kontinuierliche Geschwindigkeit hatte, oder ob sie kurze Pausen einlegte. Für rollende Aggregate wendeten wir die gleiche Definition an, mit dem Unterschied, dass diese größer waren als rollende Thrombozyten. Als adhärierende Thrombozyten werteten wir Zellen, die sich mindestens 30 Sekunden nicht fortbewegten und an einer Stelle anhafteten. Analog den rollenden Aggregaten definierten wir adhärierende Aggregate über ihren Größenunterschied zu den adhärierenden Thrombozyten. Adhärierende Aggregate wurden darüber hinaus noch in ihrer Größe vermessen, wobei wir hier aufgrund der Begrenzung auf zwei Dimensionen auf die Vermessung der Fläche des sichtbaren Querschnitts beschränkt waren. Daraus ermittelten wir einerseits die durchschnittliche Größe adhärierender Aggregate und durch Addition der Aggregatgrößen pro Gefäßabschnitt und Aufnahmepunkt die Gesamtaggregatsfläche eines Gefäßes, die „Aggregatlast“. Darüber hinaus erstellten wir eine Häufigkeitsverteilung der Aggregatgrößen, indem wir die adhärierenden Aggregate in drei Größenkategorien einteilten: klein ($< 100 \mu\text{m}^2$), mittelgroß ($100 - 499 \mu\text{m}^2$) und sehr groß ($\geq 500 \mu\text{m}^2$). So ergaben sich beispielsweise Hinweise darauf, ob die Zunahme der Gesamtgröße einer Aggregatfläche durch Konfluation der vorhandenen Aggregate zustande kam, ob Aggregate in ihrer Größe zunahmen, oder ob ihre Anzahl zunahm.

2.7 Sekundäres Nekrosewachstum

2.7.1 Versuchsprotokoll

Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die durch ein Controlled Cortical Impact hervorgerufene Kontusion innerhalb von 24 Stunden in ihrer Größe zunimmt. Dabei kann die nach 15 Minuten erreichte Größe als Primärschaden und das 24 Stunden nach dem Trauma ermittelte Kontusionsvolumen als Aspekt des Sekundärschadens betrachtet werden (Zweckberger et al., 2006; Zweckberger, 2006). Um zu untersuchen, ob Tirofiban das sekundäre Nekrosewachstum beeinflusst, wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt. In der ersten Versuchsreihe wurde den Tieren Tirofiban fünf Minuten vor dem Controlled Cortical Impact verabreicht (prätraumatische Tirofibangabe). Eine Kontrollgruppe erhielt stattdessen ein entsprechendes Volumen isotonische Kochsalzlösung. In der zweiten Versuchsreihe erhielten die Versuchstiere Tirofiban zu unterschiedlichen Zeitpunkten (10 min, 1 h, 3 h, 6 h) nach dem Trauma (posttraumatische Tirofibangabe). Eine Kontrollgruppe erhielt physiologische Kochsalzlösung 10 Minuten nach dem Trauma. Bei allen Tieren dieser Gruppen erfolgte die Entnahme des Gehirns 24 Stunden nach dem Trauma. In beiden Versuchsreihen wurde zusätzlich jeweils eine Kontrollgruppe operiert, bei der die Hirnentnahme 15 Minuten nach dem Trauma erfolgte und kein Medikament verabreicht wurde. Diese diente zur Ermittlung des primären Hirnschadens, also der Kontusion, die unmittelbar durch das Schädel-Hirn-Trauma entsteht. Die Differenz zu den Volumina der Kontusionsnekrosen nach 24 Stunden ergab das sekundäre Nekrosewachstum unter Normalbedingungen beziehungsweise unter dem Einfluss von Tirofiban.

2.7.2 Histologische Aufbereitung und Färbung nach Nissl

Zur Vermessung des posttraumatischen Nekrosevolumens wurden Gefrierschnitte der entnommenen Gehirne angefertigt und nach Nissl gefärbt. Dazu wurden die bei -20°C gelagerten Gehirne mit Einbettmedium (Tissue Tek® O.C.T.™ Compound, Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, Niederlande) überzogen und in einem Kryostaten (HM 560 Cryo-Star, Microm, Walldorf, Deutschland) geschnitten. Es wurden 15 Schnitte, beginnend kurz vor der Vordergrenze und endend kurz nach der hinteren Begrenzung der Nekrose im Abstand von 500 µm angefertigt, so dass der gesamte nekrotische Bereich abgedeckt wurde. Die 10 µm dicken Schnitte wurden

jeweils in zweifacher Ausführung angefertigt und auf Objektträger (Superfrost® Plus) aufgenommen. Nachdem sie dann wieder bei -20°C gelagert wurden, mussten sie für ihre Anfärbung etwa eine Stunde an der Luft getrocknet werden.

Dann wurden sie für zwei Minuten in 70% Ethanol fixiert und daraufhin für zehn Minuten in Kresylechtviolett angefärbt. Es erfolgte eine mehrfache Spülung in Aqua destillata und einer aufsteigenden Alkoholreihe aus 70%, 96% und 100% Ethanol. Dann wurden die Schnitte für zwei Minuten in 100% Isopropanol gegeben und abschließend zweimal für fünf Minuten in Xylol. Zur dauerhaften Aufbewahrung wurden sie mit einem Eideckmedium (Eukitt®, O. Kindler, Freiburg, Deutschland) versehen, mit Deckgläschchen abgedeckt, und über Nacht getrocknet.

2.7.3 Vermessung des Nekrosevolumens

Zur Vermessung der Nekrose wurden mit einer Digitalkamera (Camedia C-5050 ZOOM, Olympus, Hamburg, Deutschland), die an ein Mikroskop (BX41, Olympus, Hamburg, Deutschland) angeschlossen war, digitale Photographien der histologischen Schnitte angefertigt. Mit einer speziellen Auswertungssoftware (DP-Soft, Olympus, Hamburg, Deutschland) vermaßen wir auf jedem fotografierten Schnitt die Größe der nekrotisierten Fläche, der traumatisierten Hemisphäre und der kontralateralen, ungeschädigten Hemisphäre. Mit Hilfe folgender Formel konnten wir dann nach Zweckberger et al aus den Nekroseflächen das Nekrosevolumen für jedes Tier berechnen (Zweckberger et al., 2006):

$$\text{Nekrosevolumen} = 0,5 \times (A_1 + A_2 + A_3 + A_4 + \dots + A_n)$$

Abbildung 10: Formel zur Berechnung des Nekrosevolumens

Da das posttraumatische Hirnödem die Größe der nekrotischen Fläche beeinflusst, multiplizierten wir diese mit dem Quotienten aus der Größe der ungeschädigten und der traumatisierten Hemisphäre. So erhielten wir die ödemkorrigierte Nekrosefläche eines Gehirns (Zweckberger, 2006):

$$\frac{\text{ödemkorrigierte Nekrosefläche}}{\text{Nekrosefläche}} = \frac{\text{Nekrosefläche}}{\text{ipsilaterale gesunde Fläche} + \text{Nekrosefläche}} \times \frac{\text{kontralaterale Hemisphäre}}{\text{ipsilaterale gesunde Fläche} + \text{Nekrosefläche}}$$

Abbildung 11: Formel zur Berechnung der ödemkorrigierten Nekrosefläche

Mittels diesen erfolgte dann für jedes Tier zusätzlich die Berechnung des ödemkorrigierten Nekrosevolumens nach oben genannter Formel (Abbildung 10).

2.8 Intrakranieller Druck

Die Messung des intrakraniellen Drucks wurde an den Tieren der Versuchsreihe zur Ermittlung des sekundären Nekrosewachstums bei posttraumatischer Tirofibangabe durchgeführt. Sie erfolgte kurz vor der Hirnentnahme 24 Stunden nach dem Schädel-Hirn-Trauma, das heißt bei allen Tieren dieser Versuchsreihe, außer denen der Gruppe zur Ermittlung des primären Hirnschadens. Hierzu wurden die Tiere wie unter 2.2.1 beschrieben in eine Inhalationsnarkose versetzt und es wurde ein wie in 2.3.2 beschriebenes kraniales Bohrloch angefertigt, über das die Sonde zur intrakraniellen Druckmessung (Mammendorfer Institut für Physik und Medizin GmbH, Mammendorf, Deutschland) in das Hirnparenchym eingeführt wurde. Ein angeschlossener Computer zeigte kontinuierlich den aktuellen Wert des Druckes an. Dieser wurde, nachdem der initiale Anstieg infolge des raumfordernden Effekts durch das Einführen der Sonde wieder ein Plateau erreicht hatte, für jedes Tier notiert. Dann erfolgte unmittelbar die Hirnentnahme wie unter 2.3.3 beschrieben zur Ermittlung des Nekrosevolumens.

2.9 Hirnwassergehalt

Das Hirnödem lässt sich durch die Messung des zerebralen Wassergehaltes quantifizieren (Zweckberger et al., 2006). Hierzu führten wir wiederum zwei Versuchsreihen durch. In der einen wurde Tirofiban fünf Minuten vor dem Schädel-Hirn-Trauma verabreicht. In der anderen Versuchsreihe erfolgte die Tirofibangabe 10 Minuten nach dem Trauma. In beiden erhielt jeweils eine Kontrollgruppe zum gleichen Zeitpunkt vor, beziehungsweise nach Controlled Cortical Impact ein entsprechendes Volumen physiologische Kochsalzlösung. 24 Stunden nach dem Schädel-Hirn-Trauma erfolgte die Hirnentnahme wie unter 2.3.3 beschrieben. Dann wurden die entnommenen Gehirne in eine speziellen Schnittmatrix gelegt, die über ein koronares Schnittmuster und eine sagittale Schnittlinie verfügte und mit einer Rasierklinge wurden Riech- und Kleinhirn abgetrennt, sowie die Hemisphären voneinander getrennt. Jede Hirnhälfte wurde in ein eigenes, verschlossenes, gläsernes Wiegeschälchen gelegt und gewogen (AG245, Mettler Toledo, Giessen, Deutschland). Durch Subtraktion des vorher ermittelten Leergewichtes des

Schälchens konnte nun das Feuchtgewicht für jede Hemisphäre berechnet werden. Die Wiegeschälchen wurden nun geöffnet und für 24 Stunden in einen Ofen bei 120°C gestellt, so dass die Gehirnhälften austrocknen konnten. Dann wurden sie nach einer 30 Minuten dauernden Abkühlphase erneut gewogen, so dass durch erneute Subtraktion des Leergewichts des Wiegeschälchens das Trockengewicht der Hirnhälften bestimmt werden konnte. Mithilfe folgender Formel konnte dann der posttraumatische, zerebrale Wassergehalt für jede Hemisphäre getrennt ermittelt werden (Vakili et al., 2005; Zweckberger et al., 2006):

$$\text{Hirnwasser-gehalt (\%)} = \frac{\text{Feuchtgewicht} - \text{Trockengewicht}}{\text{Feuchtgewicht}} \times 100$$

Abbildung 12: Formel zur Berechnung des Hirnwassergehalts

2.10 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mithilfe der Software SigmaStat (Version 3.0, Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland), die Erstellung der Diagramme und Abbildungen mit SigmaPlot (Version 9.0, Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland). Unter der Annahme nicht normalverteilter Daten, verwendeten wir für den statistischen Vergleich zweier unverbundener Stichproben gegeneinander den Mann-Whitney Rank Sum Test und für mehrere Gruppen gegen eine Kontrollgruppe die Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks mit dem Dunn-Test als Post hoc-Analyse. Veränderungen über die Zeit untersuchten wir mit der Friedman Repeated Measures Analysis of Variance on Ranks. Als Post hoc-Test kam dabei für ungleiche Gruppengrößen der Dunn-Test und für gleiche Gruppengrößen der Student-Newman-Keul-Test zur Anwendung. Als signifikant erachteten wir Unterschiede ab einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$. Ausreißer, das heißt Werte, die mehr als zwei Standardabweichungen vom Mittelwert abwichen, wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Von dieser Regel ausgenommen waren die Aggregatgrößen, die Aggregatlast, die Gefäßdurchmesser und die physiologischen Parameter. Für die statistische Analyse der intravitalmikroskopisch erhobenen Daten wurden als Ausgangswerte die einzelnen Mittelwerte aus 35 und 15 Minuten vor dem Trauma verwendet. Lediglich bei der durchschnittlichen Aggregatgröße bildeten alle Werte beider prätraumatischer Zeitpunkte eine gemeinsame Gruppe von Ausgangswerten.

3 ERGEBNISSE

Die im Folgenden genannten Ergebniswerte sind, wenn nicht anders gekennzeichnet stets als Mittelwerte (MW) \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die Ausgangswerte (Baseline) der intravitalmikroskopisch erhobenen Parameter sind, soweit nicht anders beschrieben, die arithmetischen Mittel der beiden Mittelwerte 35 und 15 Minuten vor dem Schädel-Hirn-Trauma. Im Abschnitt Mikrozirkulation handelt es sich weitestgehend um Rhodamin-gefärbte Zellen. Falls es sich um CFDA-markierte Thrombozyten handelt, wird an betreffender Stelle darauf hingewiesen.

3.1 Intravitalmikroskopie

3.1.1 Physiologische Parameter

	pH	pCO2 (mmHg)	pO2 (mmHg)	O2-Sat. (%)	Laktat (mmol/l)
Gesamt (n=12-14)	7,16 \pm 0,02	42,1 \pm 1,2	86,2 \pm 2,1	93,3 \pm 0,6	1,71 \pm 0,15
Tirofiban (n=8-9)	7,16 \pm 0,02	41,0 \pm 0,8	89,0 \pm 1,8	94,2 \pm 0,4	1,82 \pm 0,19
Kontrolle (n=4-5)	7,15 \pm 0,02	44,1 \pm 3,2	81,0 \pm 4,3	91,7 \pm 1,5	1,50 \pm 0,23

Tabelle 1: Arterielle Blutgasanalyse 130 min nach Controlled Cortical Impact (MW \pm SEM)

Tabelle 1 zeigt Parameter der arteriellen Blutgasanalyse. Dabei lagen die Mittelwerte für Laktat, sowie für den Partialdruck von Sauerstoff und Kohlendioxid im Normbereich. Die pH-Werte lagen im sauren Bereich und wiesen auf eine Azidose hin. Signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den mit Tirofiban behandelten Tieren ergaben sich nicht.

Zeit (min)	-35	-15	15	30	60	90	120
MABP (mmHg)							
Gesamt	60 ± 1	59 ± 1	78 ± 1	66 ± 1	63 ± 1	61 ± 1	61 ± 1
Tirofiban	61 ± 2	61 ± 1	79 ± 2	67 ± 2	66 ± 2	63 ± 2	62 ± 1
Kontrolle	58 ± 1	57 ± 1	75 ± 2	63 ± 1	58 ± 1	59 ± 2	61 ± 2
CO₂ (mmHg)							
Gesamt	37,2 ± 0,2	36,8 ± 0,1	37,3 ± 0,2	36,9 ± 0,2	36,7 ± 0,2	36,9 ± 0,2	36,4 ± 0,1
Tirofiban	37,5 ± 0,2	37,0 ± 0,1	37,3 ± 0,2	37,3 ± 0,1	36,4 ± 0,2	36,9 ± 0,3	36,2 ± 0,2
Kontrolle	36,9 ± 0,2	36,6 ± 0,2	37,3 ± 0,3	36,3 ± 0,3	37,2 ± 0,3	37,0 ± 0,1	36,7 ± 0,3

Tabelle 2: Mittlerer arterieller Blutdruck und endexspiratorischer CO₂-Partialdruck im zeitlichen Verlauf vor und nach Controlled Cortical Impact (MW ± SEM)

Der mittlere arterielle Blutdruck (Tabelle 2 und Abbildung 13) stieg in den ersten 15 Minuten nach Controlled Cortical Impact von einem durchschnittlichen Ausgangswert um 59 ± 1 mmHg steil an auf 78 ± 1 mmHg. Danach fiel er ähnlich rapide wieder ab und zeigte fortan einen plateauartigen Verlauf. 120 Minuten nach dem Trauma wies er mit 61 ± 1 mmHg einen Wert nahe dem vor der Schädigung auf. Die posttraumatischen Blutdruckwerte waren jedoch durchweg signifikant höher als vor der Schädigung ($p<0,05$). Die mit Tirofiban behandelten Tiere wiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe zu allen Zeitpunkten einen unsignifikant höheren Blutdruck auf.

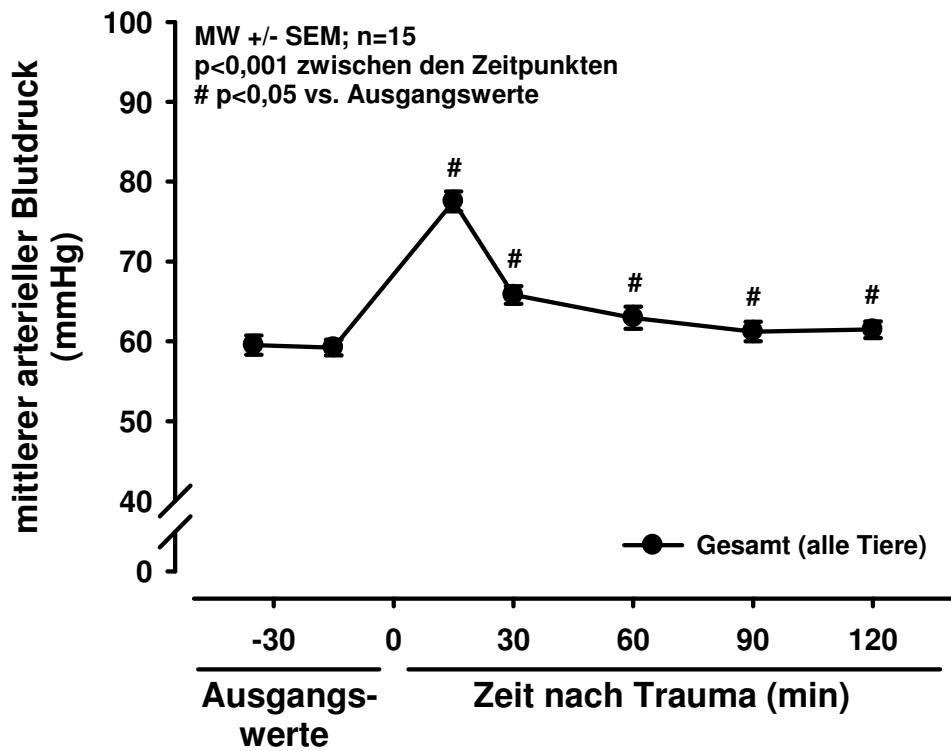


Abbildung 13: Mittlerer arterieller Blutdruck aller Tiere im zeitlichen Verlauf vor und nach Controlled Cortical Impact

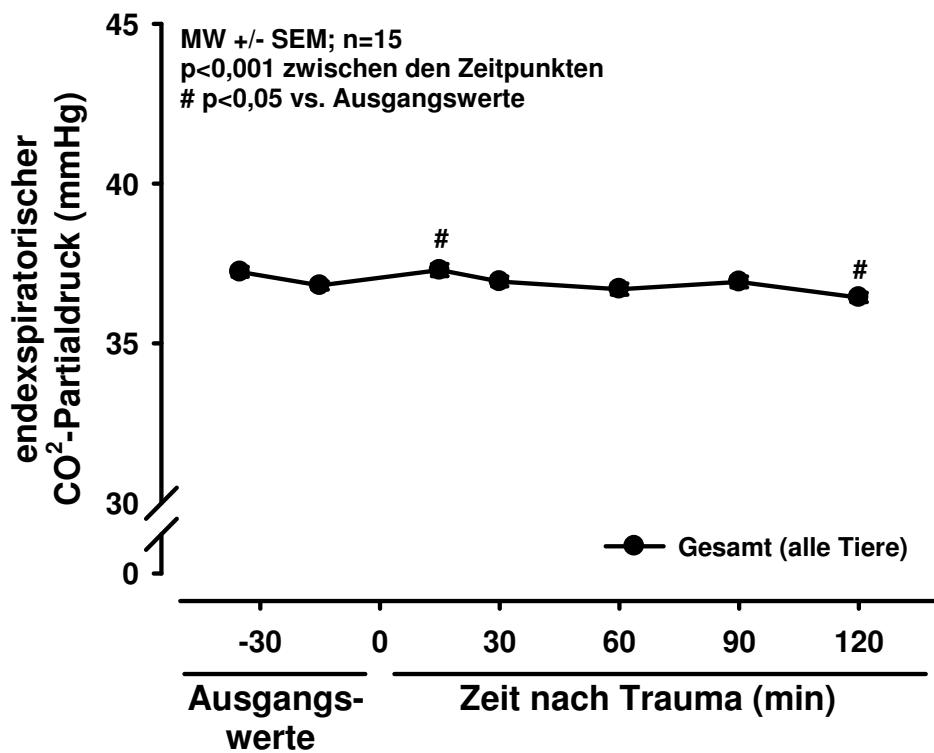


Abbildung 14: Endexspiratorischer CO₂-Partialdruck aller Tiere im zeitlichen Verlauf vor und nach Controlled Cortical Impact

Der endexspiratorische CO₂-Partialdruck (Tabelle 2 und Abbildung 14) zeigte 15 Minuten nach Controlled Cortical Impact mit $37,3 \pm 0,2$ mmHg einen signifikant höheren und 120 Minuten nach dem Trauma mit $36,4 \pm 0,1$ mmHg einen signifikant niedrigeren Wert als davor ($p<0,05$; durchschnittlicher Ausgangswert: $37,0 \pm 0,1$ mmHg). Unter Tirofiban war der CO₂-Partialdruck 30 Minuten nach Controlled Cortical Impact signifikant höher ($p<0,001$) und nach 60 Minuten signifikant niedriger ($p=0,02$) als in der Kontrollgruppe.

3.1.2 Mikrozirkulation

3.1.2.1 Gefäßdurchmesser

3.1.2.1.1 Venen

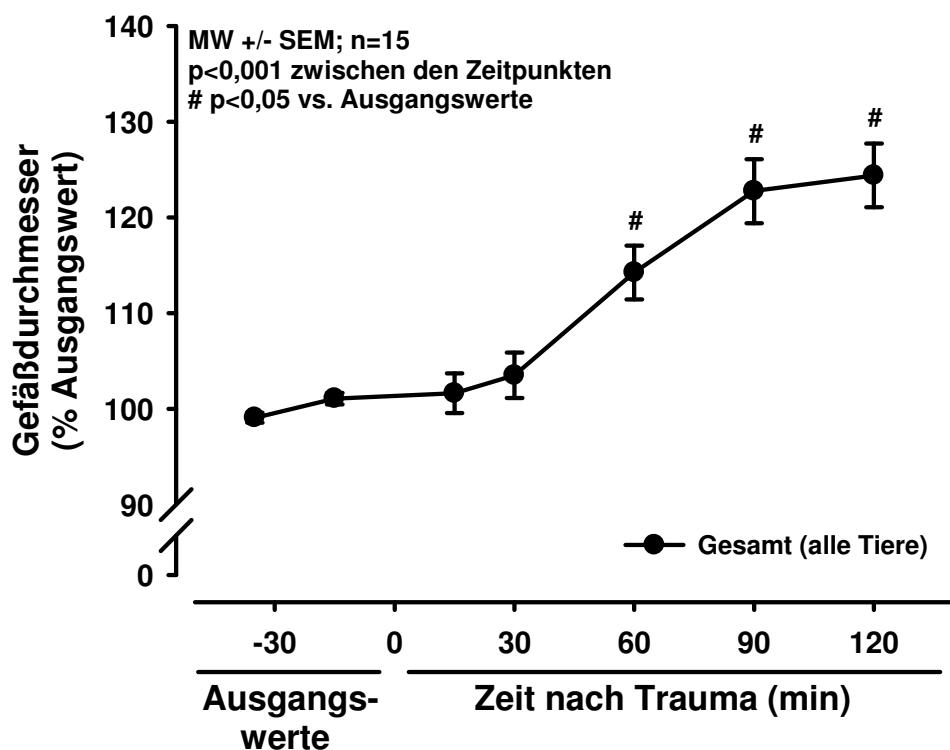


Abbildung 15: Venöse Gefäßdurchmesser aller Tiere in % der Ausgangswerte im zeitlichen Verlauf vor und nach Controlled Cortical Impact

Die Durchmesser der Venen (Abbildung 15) blieben in der Anfangszeit nach Schädel-Hirn-Trauma relativ konstant. Ab 60 Minuten danach erweiterten sie sich mit $114 \pm 3\%$ des durchschnittlichen Ausgangswertes zunehmend und stiegen weiter an, bis auf $124 \pm 3\%$ nach 120 Minuten. Ab 60 Minuten nach dem Trauma lagen die

Werte fortan signifikant über den Ausgangswerten ($p<0,05$) und insgesamt fand sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Zeitpunkten ($p<0,001$).

Eine getrennte Betrachtung der Gefäßdurchmesser unter Tirofiban und in der Kontrollgruppe (Abbildung 16) zeigte in beiden Gruppen einen ähnlichen Verlauf, mit dem Unterschied, dass die Vasodilatation – wenn auch nicht in signifikantem Ausmaß – unter Tirofiban etwas stärker ausgeprägt war als in der Kontrollgruppe.

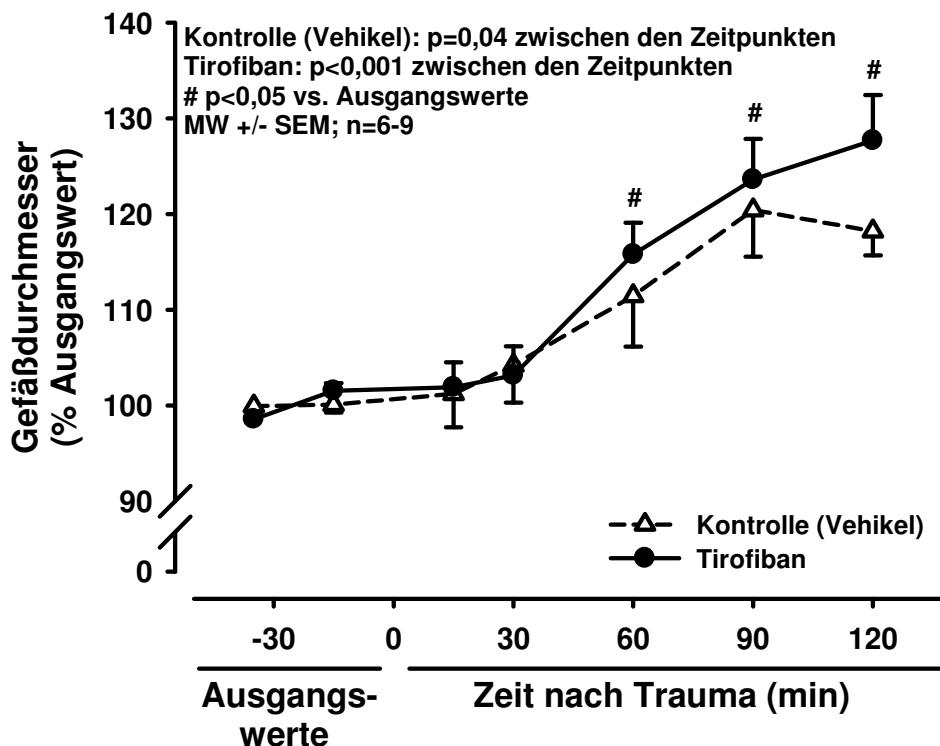


Abbildung 16: Venöse Gefäßdurchmesser mit und ohne Tirofibangabe in % der Ausgangswerte im zeitlichen Verlauf vor und nach Controlled Cortical Impact

Bei genauerer Betrachtung der relativen Häufigkeitsverteilung von Durchmesserkategorien (Abbildung 17) fiel auf, dass bereits vor dem Trauma nur ein geringer Anteil von 10% der Venen Durchmesser unter 20 µm hatte. Ab 60 Minuten nach Trauma gar keine mehr. Vor dem Trauma hatte mit 55% der größte Anteil der Venen Durchmesser zwischen 20 – 29 µm, nach 120 Minuten mit 28% der Venen weniger als ein Drittel. Man sah deutlich, wie ein größer werdender Anteil der Venen nach dem Trauma größere Durchmesser annahm. So hatten 120 Minuten nach dem Trauma 48% der Venen Durchmesser von 30 – 39 µm, vor der Schädigung dagegen nur 22%. Außerdem hatten nun 14% der Venen Durchmesser von 50 µm oder mehr, vor dem Trauma nur 3%.

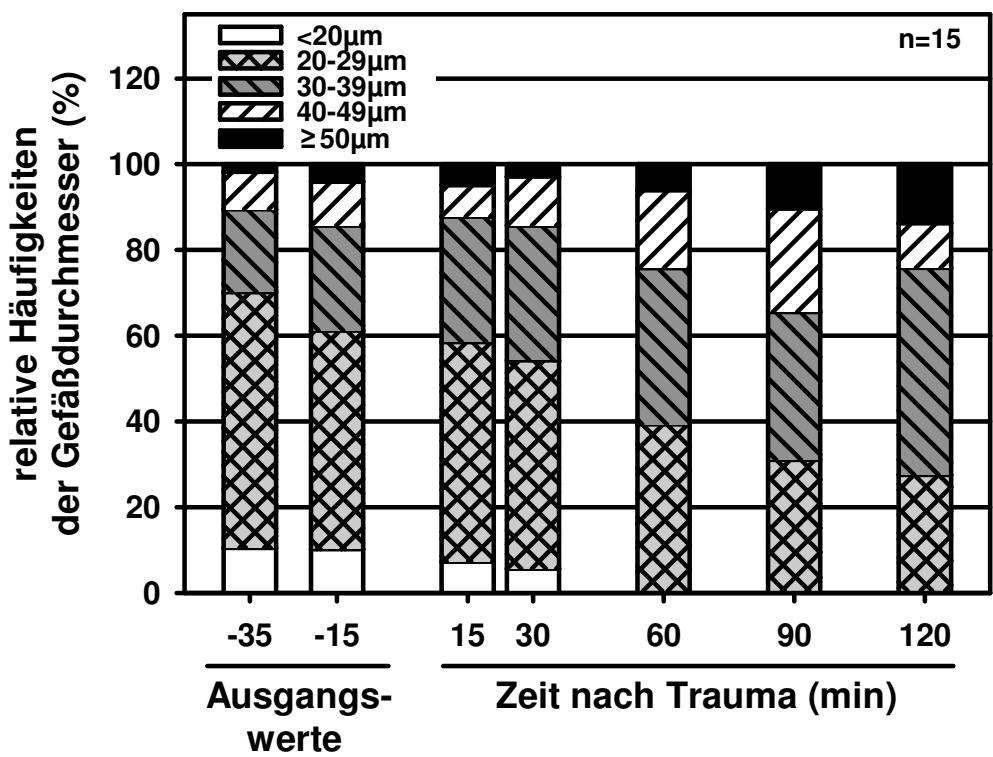


Abbildung 17: Relative Häufigkeit der Größenkategorien venöser Gefäßdurchmesser im zeitlichen Verlauf vor und nach Controlled Cortical Impact

3.1.2.1.2 Arterien

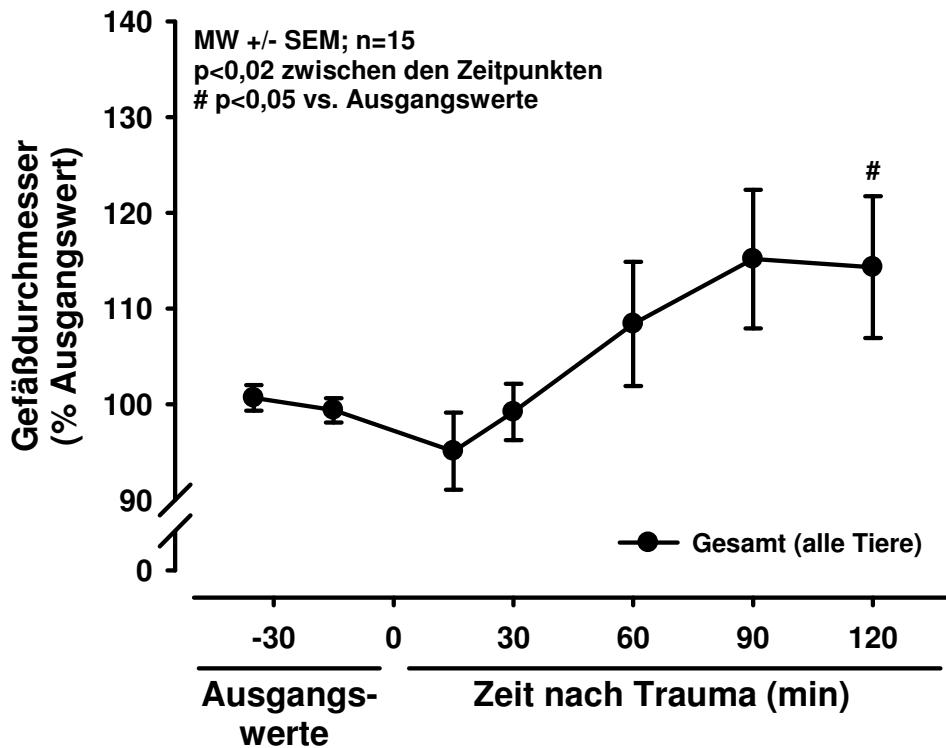


Abbildung 18: Arterielle Gefäßdurchmesser aller Tiere in % der Ausgangswerte im zeitlichen Verlauf vor und nach Controlled Cortical Impact

Die Arterien zeigten in den ersten 15 Minuten nach Controlled Cortical Impact eine leichte Tendenz zur Vasokonstriktion auf $95 \pm 4\%$ des durchschnittlichen Ausgangswertes (Abbildung 18). Diese war jedoch schon 30 Minuten nach dem Trauma kaum noch zu beobachten. Die Arterien hatten mit $99 \pm 3\%$ beinahe wieder ihren ursprünglichen Durchmesser erreicht und begannen, sich daraufhin zu erweitern. Nach 90 Minuten wiesen sie einen Durchmesser von $115 \pm 7\%$ des Ausgangswertes auf, wichen allerdings nicht statistisch signifikant von diesem ab, nach 120 Minuten mit $114 \pm 7\%$ des Ausgangswertes allerdings schon ($p<0,05$). Insgesamt fand sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Zeitpunkten ($p<0,02$).

Der Einfluss von Tirofiban auf den arteriellen Gefäßdurchmesser ließ hier kein einheitliches Muster erkennen (Abbildung 19).

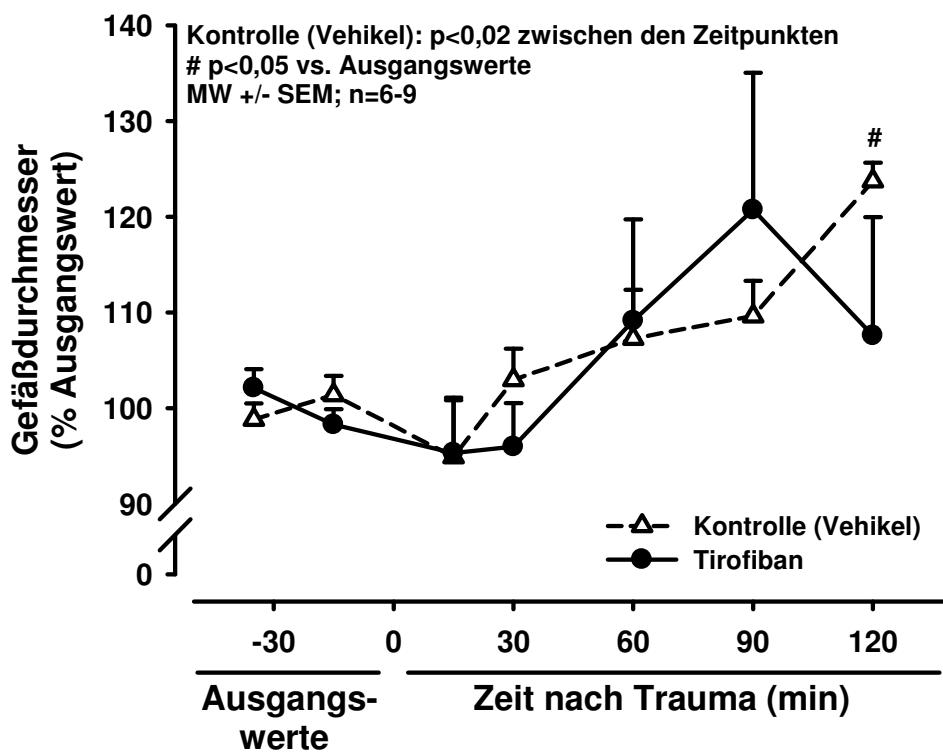


Abbildung 19: Arterielle Gefäßdurchmesser mit und ohne Tirofibangabe in % der Ausgangswerte im zeitlichen Verlauf vor und nach Controlled Cortical Impact

Abbildung 20 zeigt die relative Häufigkeitsverteilung von Durchmesserkategorien der Arterien. Hier fiel auf, dass vor dem Schädel-Hirn-Trauma 15% der Arterien einen Durchmesser von unter 20 µm und 55% einen Durchmesser von 20 – 29 µm hatten, ab 90 Minuten danach fand sich keine Arterie mehr unter 20 µm und 120 Minuten danach nur noch 31% mit 20 – 29 µm Durchmesser. Dafür hatte 120 Minuten nach dem Trauma ein mit 62% gegenüber 24% vor dem Trauma größerer Anteil der Arterien Durchmesser von 30 – 39 µm. Auffallend war auch, dass vorübergehend ein zunehmender Anteil der Arterien in der Frühphase 15 und 30 Minuten nach dem Trauma Durchmesser von 20 – 29 µm hatte, der sich danach jedoch wieder reduzierte. Durchmesser von 50 µm und größer wurden bei Arterien nicht beobachtet.

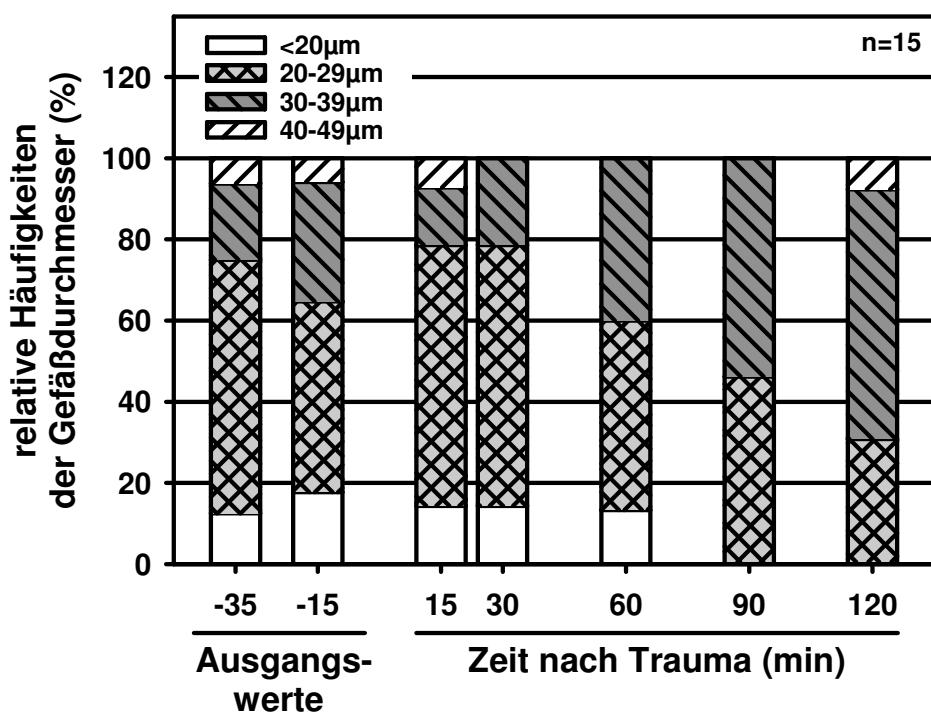


Abbildung 20: Relative Häufigkeit der Größenkategorien arterieller Gefäßdurchmesser im zeitlichen Verlauf vor und nach Controlled Cortical Impact

3.1.2.2 Zerebrale Durchblutung

Bei einem Tier der Kontrollgruppe beobachteten wir in einer Vene 120 Minuten nach dem Trauma eine verlangsamte Fließgeschwindigkeit des Blutes. Eine Umkehr der Flussrichtung präsentierte sich hingegen 90 Minuten nach Trauma in einer Vene eines Tieres das Tirofiban erhalten hatte. Diese beobachtete man auch noch nach 120 Minuten. Ein Sistieren der Durchblutung zeigte sich nicht.

In den Arterien fand sich bei einem Tier der Kontrollgruppe in einem Gefäß eine verlangsamte Fließgeschwindigkeit des Blutes. Diese trat 30 Minuten nach dem Trauma auf und blieb bis zum Ende des Experiments bestehen. Weitere Auffälligkeiten ließen sich nicht beobachten.

3.1.2.3 Thrombozytenfunktion ex vivo

Abbildung 21 zeigt die durchflussszytometrische Analyse separierter Thrombozyten in nativem Zustand (A) gegenüber solchen, die mit CFDA inkubiert wurden (B).

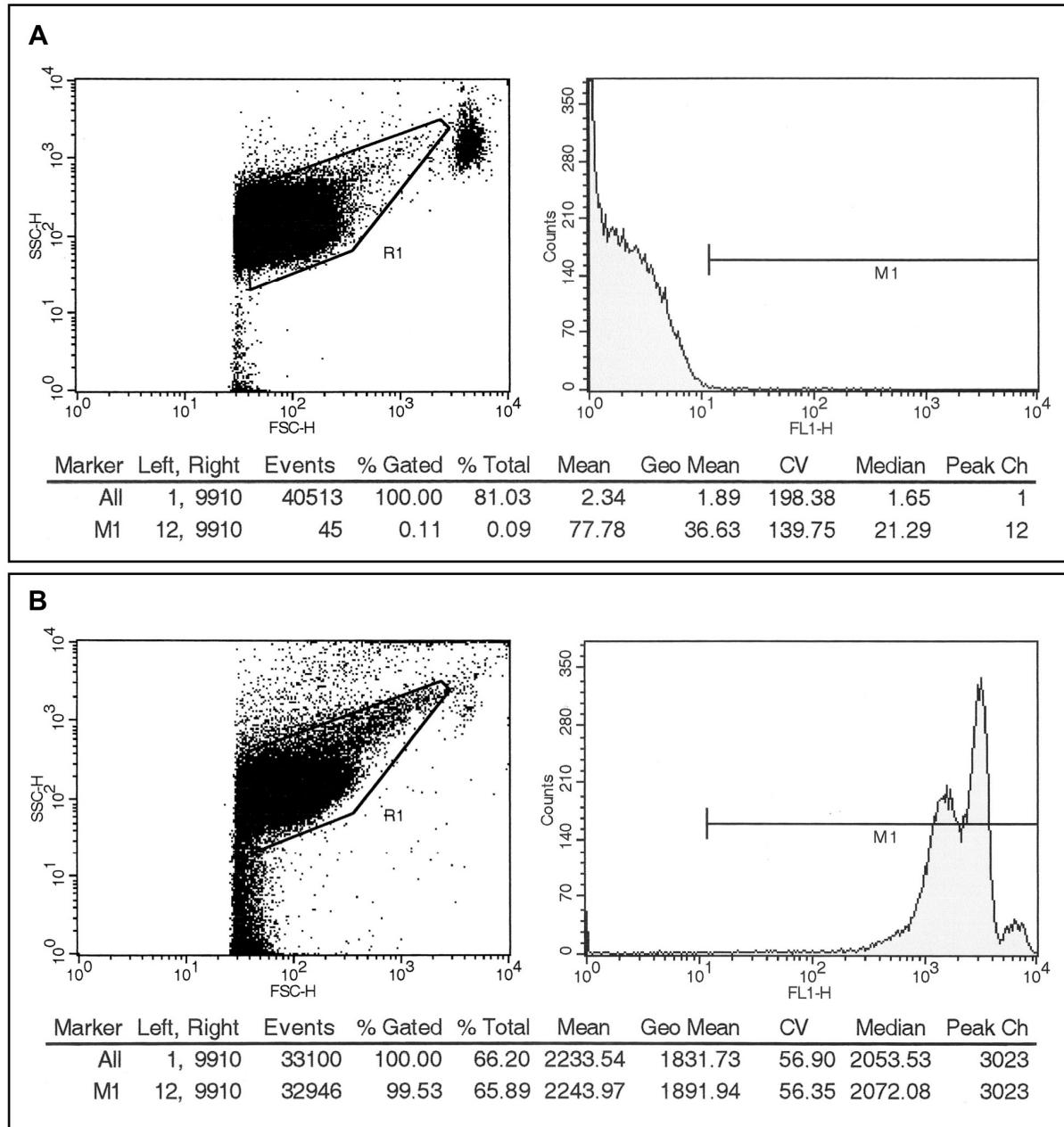


Abbildung 21: Dot Plots (links) und Häufigkeitsverteilungen der Fluoreszenzintensität (rechts) separierter Thrombozyten mit (B) und ohne (A) CFDA-Inkubation

Dabei ließ die Häufigkeitsverteilung der Fluoreszenzintensität von Thrombozyten, die mit CFDA inkubiert wurden (Abbildung 21B rechts), erkennen, dass 99,53% der nach dem von uns verwendeten Protokoll separierten und mit CFDA inkubierten Thrombozyten ein Maß an Fluoreszenz aufwies, das nicht durch die Autofluoreszenz der Zellen zu erklären war. Dieser Befund deutete auf eine erfolgreiche Markierung der Thrombozyten mit CFDA hin. Ein Vergleich der Dot Plots mit (B) und ohne (A) CFDA ließ außerdem erkennen, dass die Thrombozyten durch den Prozess der Separation (A) und Färbung (B) nicht aktiviert wurden.

Abbildung 22 zeigt die Dot Plots für separierte Thrombozyten nach einer Lagerungsphase von einer Stunde im Anschluss an die Separation, sowie für natives Vollblut und Vollblut, dem Thrombin hinzugegeben wurde.

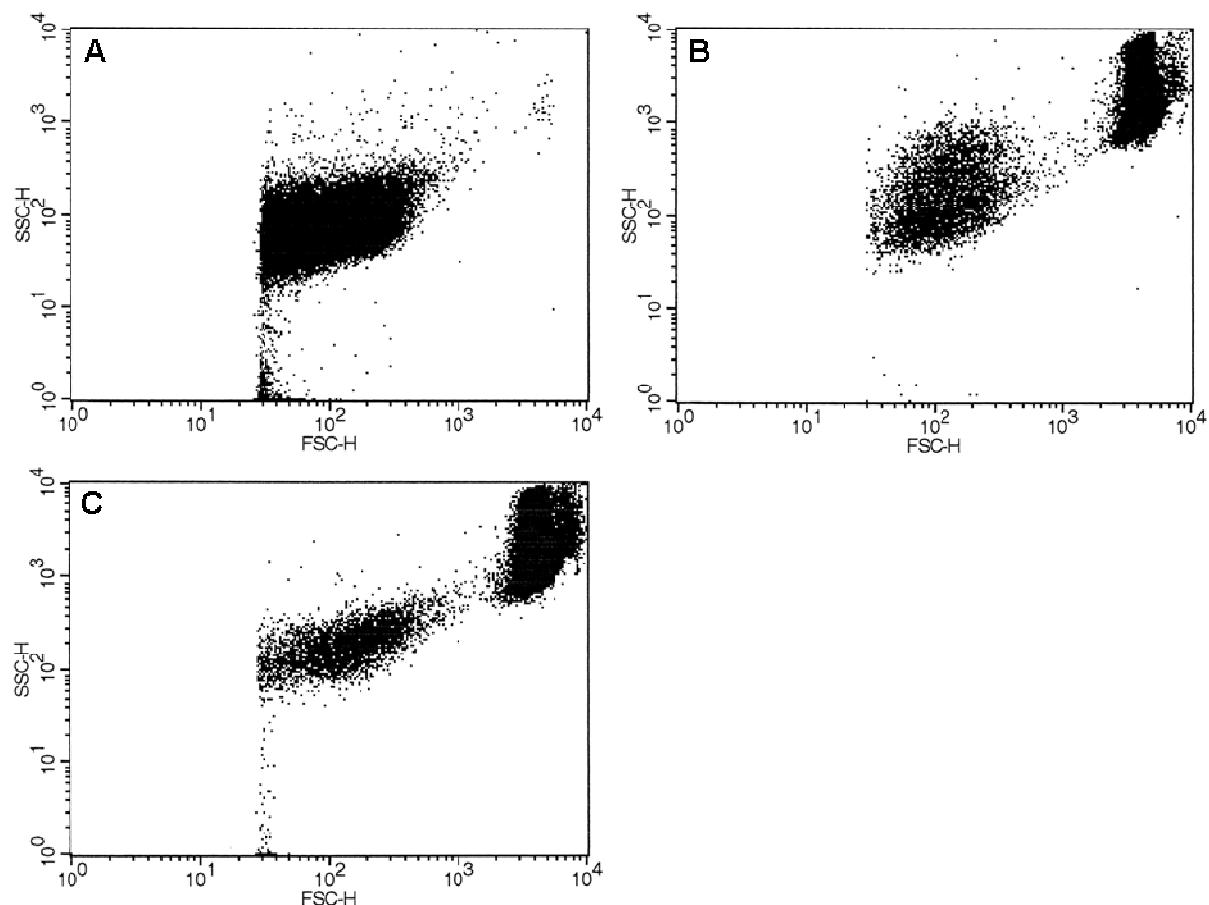


Abbildung 22: Dot Plots für separierte Thrombozyten nach einer Stunde Ruhezeit (A), natives Vollblut (B) und Vollblut, dem Thrombin beigefügt wurde (C).

Dabei zeigte sich, dass die separierten, ungefärbten Thrombozyten auch nach einer Stunde Ruhezeit (Abbildung 22A) nicht aktiviert wurden. Dies war auch der Fall für den Vorgang der Blutentnahme, wie man an der Analyse von nativem Vollblut erkennt (Abbildung 22B). Dass die von uns verwendeten Thrombozyten jedoch prinzipiell aktivierbar waren, sah man an der Veränderung, die natives Vollblut (B) nach der Zugabe von Thrombin (C) zeigte.

Ein Befund, der auch von Abbildung 23 untermauert wird, in der für verschiedene Proben die Höhe der mittleren Fluoreszenzintensität der Zellen dargestellt ist, nachdem FITC-markierte Antikörper gegen P-Selektin (CD62), welches von aktiven Thrombozyten exprimiert wird, hinzugefügt wurden.

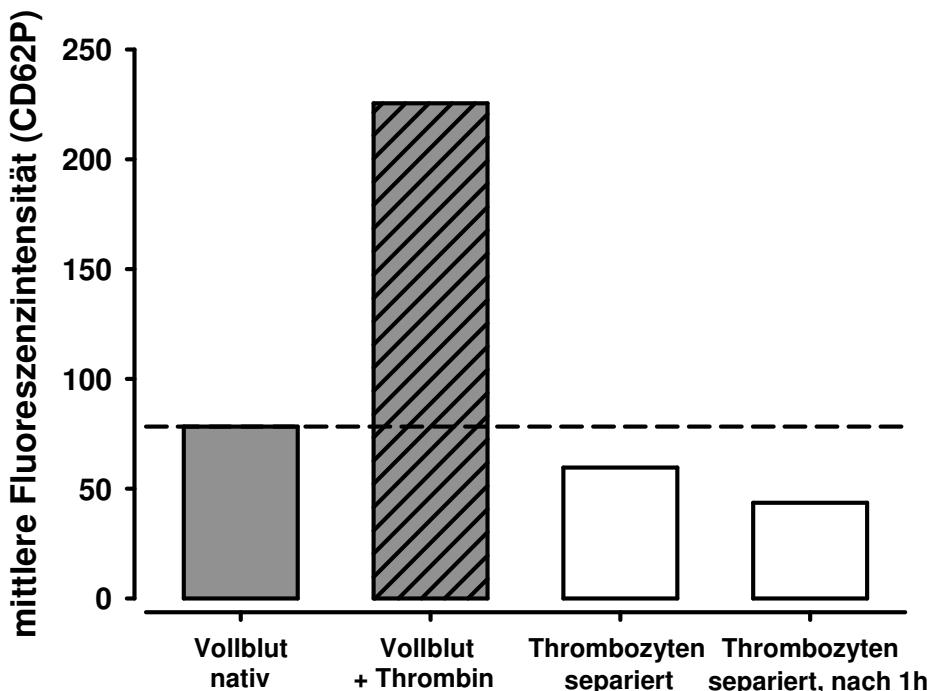


Abbildung 23: Mittlere Fluoreszenzintensität der Zellen, nach Zugabe von FITC-markierten Antikörpern gegen P-Selektin (CD62), ein Marker für aktive Thrombozyten

Hier fanden wir nach Zugabe von Thrombin zu Vollblut einen deutlichen Anstieg der mittleren Fluoreszenzintensität von 78,22 auf 225,55. Dies deutet auf eine verstärkte Expression von P-Selektin hin, was für eine Aktivierung der Thrombozyten spricht. Die Fluoreszenz von separierten Thrombozyten war niedriger als von natürlichem Vollblut, auch nach einer Lagerungsphase von einer Stunde. Dies spricht dafür, dass die Zellen durch die Separation und Lagerung nicht aktiviert wurden (Abbildung 23).

3.1.2.4 Rollende Thrombozyten

Die Beobachtung der mit Rhodamin gefärbten Zellen in Venen (Abbildung 24) zeigte einen in beiden Gruppen ähnlich verlaufenden Anstieg der rollenden Thrombozyten in den ersten 15 Minuten nach Controlled Cortical Impact. Dieser setzte sich unter Tirofiban noch bis nach 30 Minuten fort um dann ein plateauartiges Niveau zu halten. In der Kontrollgruppe wurde schon nach 15 Minuten ein niedrigeres Plateau erreicht, das sich jedoch nach 90 Minuten dem unter Tirofiban annäherte. Innerhalb der Kontrollgruppe war nun der höchste Wert erreicht ($15,8 \pm 2,8 / 100\mu\text{m} / \text{min}$), jedoch unterschied sich dieser nicht signifikant vom durchschnittlichen Ausgangswert ($3,4 \pm 0,7 / 100\mu\text{m} / \text{min}$). Es bestand jedoch ein signifikanter Unterschied zwischen den

einzelnen Zeitpunkten innerhalb der Kontrollgruppe ($p<0,02$), aber nicht zwischen den beiden Gruppen.

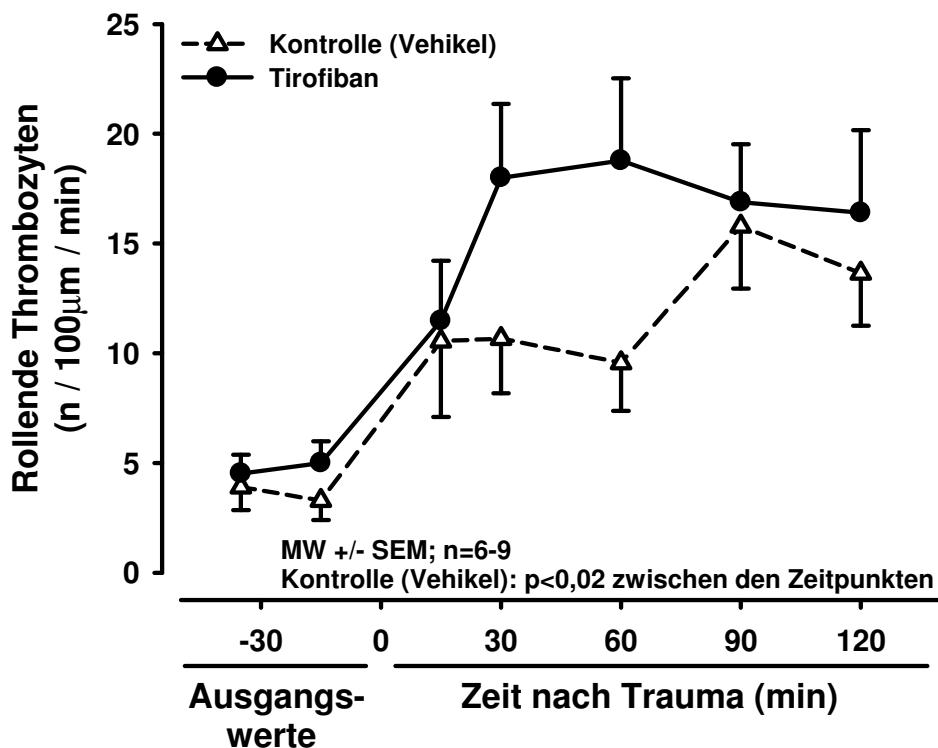


Abbildung 24: Anzahl rollender Thrombozyten in Venen im zeitlichen Verlauf vor und nach Controlled Cortical Impact, mit und ohne Tirofiban. Färbung: Rhodamin

Die Anfärbung der Thrombozyten mit CFDA (Abbildung 25) ließ in venösen Gefäßen in der Kontrollgruppe über den gesamten Beobachtungszeitraum keinen rollenden Thrombozyten erkennen. Unter Tirofiban jedoch ließen sich 15 Minuten nach dem Trauma mit $1,6 \pm 0,4 / 100\mu\text{m} / \text{min}$ gegenüber Null in der Kontrollgruppe signifikant mehr rollende Thrombozyten beobachten ($p<0,02$). Diese wurden allerdings mit der Zeit weniger, bis sich auch hier ab 90 Minuten danach keine mehr finden ließen.

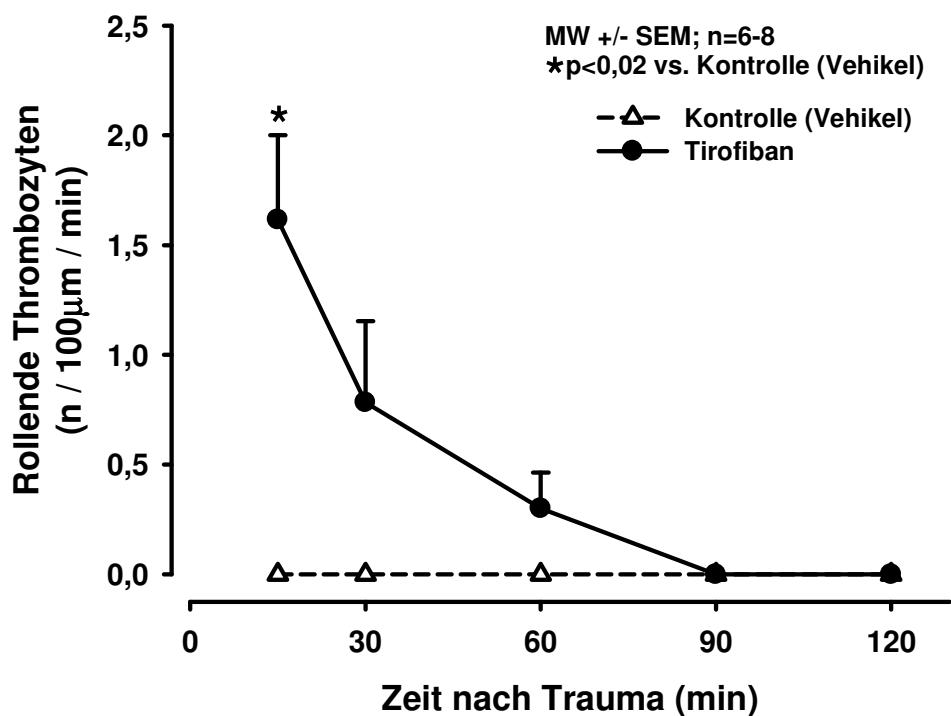


Abbildung 25: Anzahl rollender Thrombozyten in Venen im zeitlichen Verlauf nach Controlled Cortical Impact, mit und ohne Tirofiban. Färbung: CFDA-SE

In den Arterien zeigte sich zu beinahe allen Zeitpunkten weniger als ein Rhodamin-gefärbter rollender Thrombozyt pro Minute. Lediglich nach 15 Minuten fanden sich in der Kontrollgruppe mit $3,4 \pm 2,0 / 100\mu\text{m} / \text{min}$ und nach 30 Minuten unter Tirofiban mit $2,0 \pm 2,0 / 100\mu\text{m} / \text{min}$ etwas höhere Werte. Diese hatten jedoch weder gegenüber den Ausgangswerten, noch im Vergleich zueinander statistische Signifikanz

Die Färbung mit CFDA ließ in den Arterien lediglich unter Tirofiban vereinzelt rollende Thrombozyten erkennen, so dass hierzu keine eindeutige Aussage möglich ist.

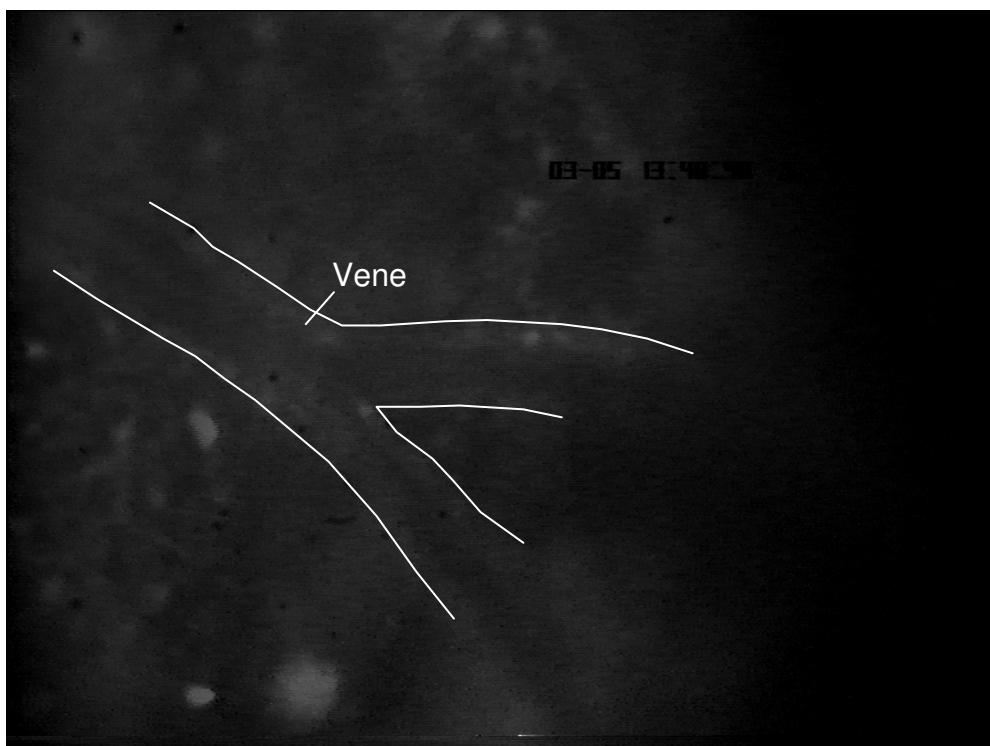


Abbildung 26: Intravitalmikroskopische Aufnahme einer Vene von einem Tier der Kontrollgruppe, 60 Minuten nach Controlled Cortical Impact, gesäumt von adhäsierenden und rollenden Thrombozyten. Färbung: Rhodamin

3.1.2.5 Adhäsierende Thrombozyten

In den venösen Gefäßen fanden sich in beiden Gruppen Rhodamin-gefärbte, adhäsierende Thrombozyten (Abbildung 27). Unter Tirofiban beobachteten wir 15 Minuten nach Controlled Cortical Impact eine Anzahl von $1,8 \pm 0,7 / 100\mu\text{m} / \text{min}$, die im weiteren Verlauf auf einem ähnlichen Niveau blieb und nach 120 Minuten mit $1,9 \pm 0,8 / 100\mu\text{m} / \text{min}$ den höchsten Wert erreichte. Bei den Tieren der Kontrollgruppe fand sich mit $3,6 \pm 1,8 / 100\mu\text{m} / \text{min}$ der höchste Wert nach 30 Minuten. Wenn auch in beiden Gruppen die Anzahl während der ersten Zeitpunkte nach der Schädigung tendenziell etwas höhere Werte annahm als davor, so hatte dies jedoch keine statistische Signifikanz, ebenso wenig der Vergleich zwischen Tirofiban und Kontrollgruppe.

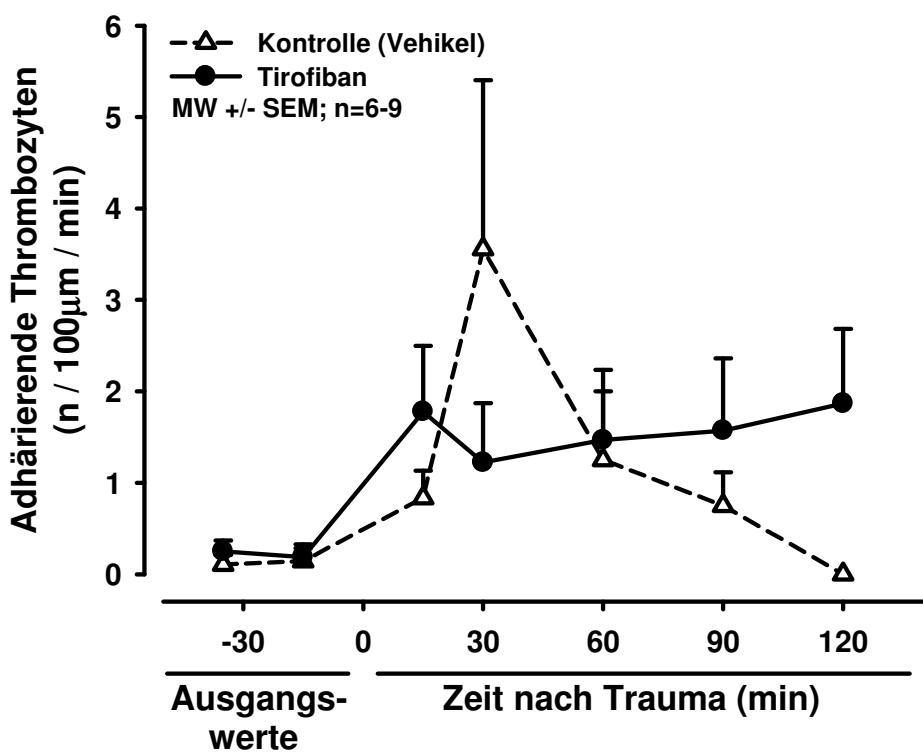


Abbildung 27: Anzahl adhäsierender Thrombozyten in Venen im zeitlichen Verlauf vor und nach Controlled Cortical Impact, mit und ohne Tirofiban. Färbung: Rhodamin

In Arterien ließen sich nahezu keine Rhodamin-gefärbten, adhäsierenden Thrombozyten erkennen.

CFDA-markierte adhäsierende Thrombozyten fanden sich weder in Venen, noch in Arterien.

3.1.2.6 Rollende Aggregate

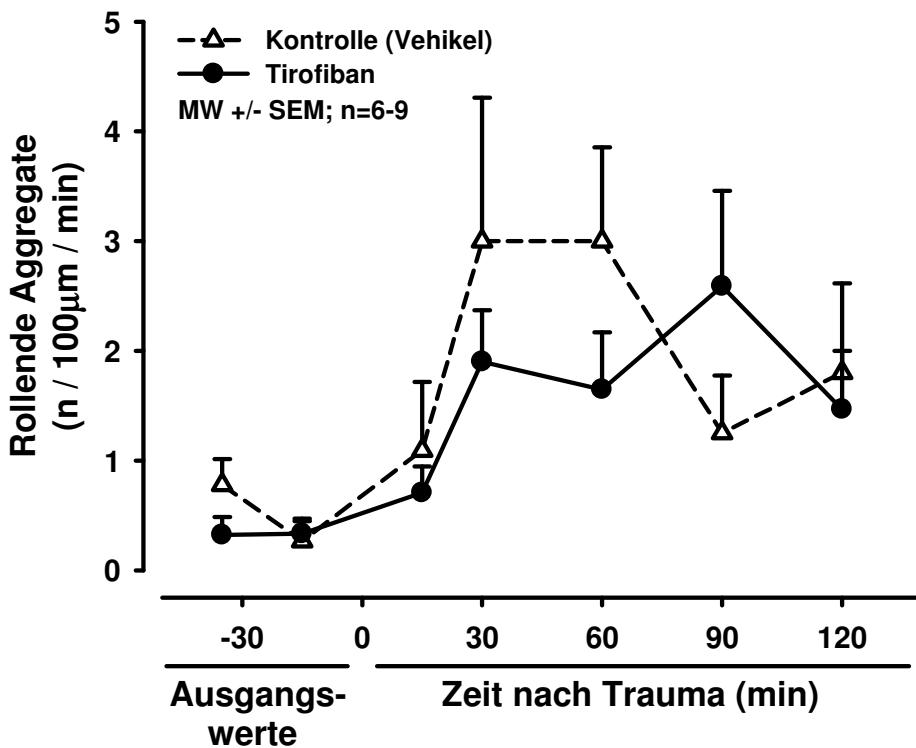


Abbildung 28: Anzahl rollender Aggregate in Venen im zeitlichen Verlauf vor und nach Controlled Cortical Impact, mit und ohne Tirofiban. Färbung: Rhodamin

Den zeitlichen Verlauf der Anzahl Rhodamin-gefärbter, rollender Aggregate in Venen zeigt Abbildung 28. Dabei fanden sich die höchsten Werte der Kontrollgruppe 30 Minuten ($3,0 \pm 1,3 / 100\mu\text{m} / \text{min}$), und 60 Minuten ($3,0 \pm 0,9 / 100\mu\text{m} / \text{min}$) nach Controlled Cortical Impact. Diese waren zwar größer als der durchschnittliche Ausgangswert von $0,6 \pm 0,2 / 100\mu\text{m} / \text{min}$, doch ergab sich hierbei kein signifikanter Unterschied. Auch unter Tirofiban waren die Werte nach dem Trauma etwas höher als davor, jedoch erneut ohne statistische Signifikanz. Ebenso wenig der Vergleich zwischen Tirofiban und Kontrollgruppe

In arteriellen Gefäßen fanden sich unter Tirofiban gar keine Rhodamin-gefärbten, rollenden Aggregate und in der Kontrollgruppe lediglich vereinzelt.

CFDA-markierte, rollende Aggregate traten in Venen und Arterien so selten auf, dass sie aufgrund des Ausschlusses von Werten außerhalb des Bereichs von zwei Standardabweichungen des Mittelwerts aus der Wertung fielen, so dass von Werten um Null auszugehen ist.

3.1.2.7 Adhäsierende Aggregate

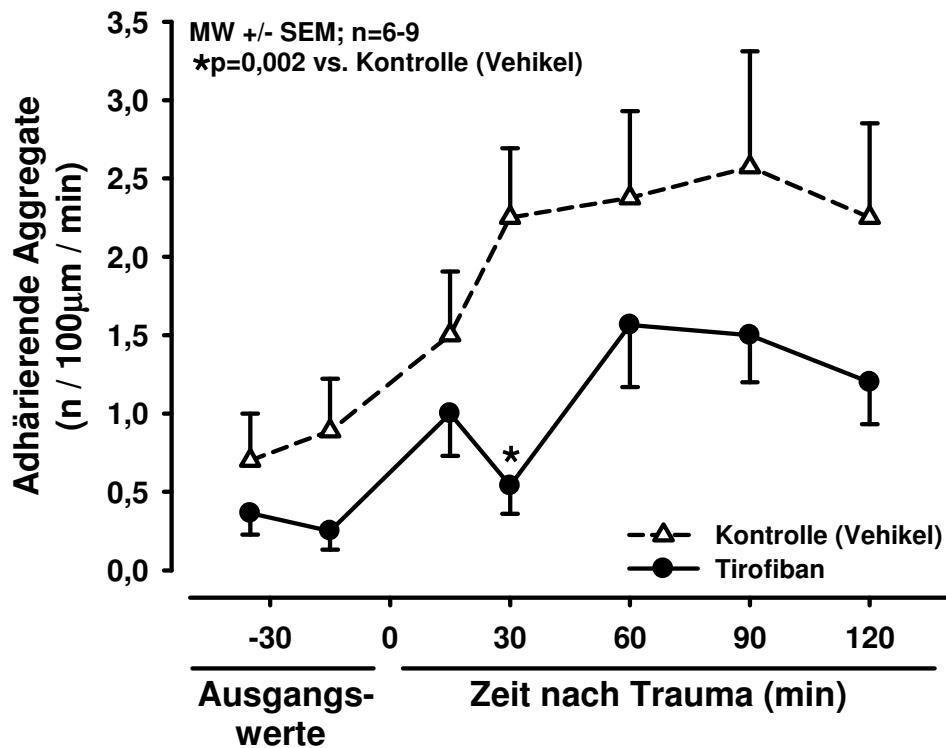


Abbildung 29: Anzahl adhäsierender Aggregate in Venen im zeitlichen Verlauf vor und nach Controlled Cortical Impact, mit und ohne Tirofiban. Färbung: Rhodamin

In den venösen Blutgefäßen nahm die durchschnittliche Anzahl Rhodamin-gefärbter, adhäsierender Aggregate (Abbildung 29) in den ersten 30 Minuten nach Controlled Cortical Impact tendenziell zu (von $0,9 \pm 0,3$ auf $2,3 \pm 0,4 / 100\mu\text{m} / \text{min}$). Danach war ein weiterer Anstieg zu verzeichnen, der allerdings flacher verlief und nach 90 Minuten bei $2,6 \pm 0,7 / 100\mu\text{m} / \text{min}$ den höchsten Wert erreichte. Es ergab sich jedoch für keinen Zeitpunkt ein statistisch signifikanter Unterschied zu den Ausgangswerten.

Unter Tirofiban waren zu jedem Zeitpunkt niedrigere Werte zu verzeichnen und 30 Minuten nach dem Trauma fanden sich mit $0,5 \pm 0,2 / 100\mu\text{m} / \text{min}$ signifikant weniger adhäsierende Aggregate als in der Kontrollgruppe ($p=0,002$).

In arteriellen Blutgefäßen fanden sich nur ganz vereinzelt Rhodamin-gefärbte, adhäsierende Aggregate, hier geringfügig häufiger nach Tirofibangabe, jedoch ohne statistische Signifikanz.

CFDA-markierte adhärierende Aggregate fanden sich in Venen und Arterien nur in so geringem Ausmaß, dass ihre Anzahl außerhalb des Bereichs von zwei Standardabweichungen des Mittelwerts lag und sie somit aus der Wertung fielen. Schenkt man der Größe der einzelnen Rhodamin-gefärbten, adhärierenden Aggregate in Venen Beachtung (Abbildung 30), so deutet sich an, dass die Aggregate nach Controlled Cortical Impact tendenziell etwas größer waren. Hatten die Aggregate vor der Schädigung noch eine durchschnittliche Größe von $73 \pm 11 \mu\text{m}^2$, so maßen sie nach 30 Minuten bereits $278 \pm 88 \mu\text{m}^2$ und nach 90 Minuten $409 \pm 164 \mu\text{m}^2$. Eine statistische Signifikanz ergab sich hierfür jedoch nicht. Ebenso wenig durch die Gabe von Tirofiban, auch wenn sie dann ab 60 Minuten nach dem Trauma mit $204 \pm 97 \mu\text{m}^2$ etwas kleiner waren als in der Kontrollgruppe ($273 \pm 91 \mu\text{m}^2$). Nach 90 Minuten $248 \pm 85 \mu\text{m}^2$ (Tirofiban) gegenüber $409 \pm 164 \mu\text{m}^2$ (Kontrollgruppe).

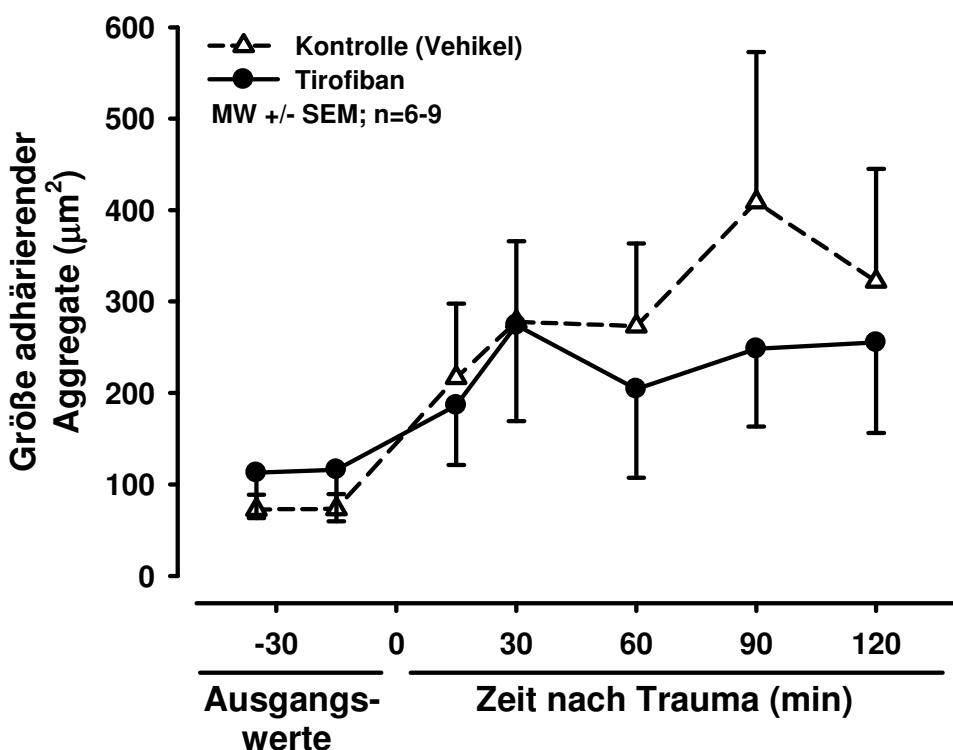


Abbildung 30: Größe der adhärierenden Aggregate in Venen im zeitlichen Verlauf vor und nach Controlled Cortical Impact, mit und ohne Tirofiban. Färbung: Rhodamin

Die Aggregatlast der Gefäße (Abbildung 31), also die Summe der Größen der einzelnen Aggregate innerhalb eines Gefäßabschnittes hatte nach Controlled Cortical Impact höhere Werte als davor. Es fand sich ein statistisch signifikanter

Unterschied zwischen den Zeitpunkten ($p=0,02$) und 120 Minuten nach dem Trauma mit $473 \pm 266 \mu\text{m}^2 / 100 \mu\text{m}$ eine signifikante Steigerung ($p<0,05$) gegenüber dem durchschnittlichen Ausgangswert von $39 \pm 12 \mu\text{m}^2 / 100 \mu\text{m}$. Der höchste Wert war mit $525 \pm 314 \mu\text{m}^2 / 100 \mu\text{m}$ schon 90 Minuten nach der Schädigung erreicht und auch 30 Minuten nach dem Trauma lag der Wert bereits bei $360 \pm 171 \mu\text{m}^2 / 100 \mu\text{m}$, wenn auch 60 Minuten nach Trauma kein signifikanter Unterschied zu den Ausgangswerten bestand. Unter Tirofiban war die Aggregatlast im Vergleich zur Kontrollgruppe über den gesamten posttraumatischen Zeitraum etwas niedriger, nach 30 Minuten mit $161 \pm 82 \mu\text{m}^2 / 100 \mu\text{m}$ gegenüber $360 \pm 171 \mu\text{m}^2 / 100 \mu\text{m}$ in signifikantem Ausmaß ($p<0,02$). Auch unter Tirofiban waren die Werte nach dem Trauma etwas höher als davor, nach 60 und 120 Minuten signifikant ($p<0,05$) und es ergab sich wiederum ein signifikanter Unterschied zwischen den Zeitpunkten ($p<0,001$).

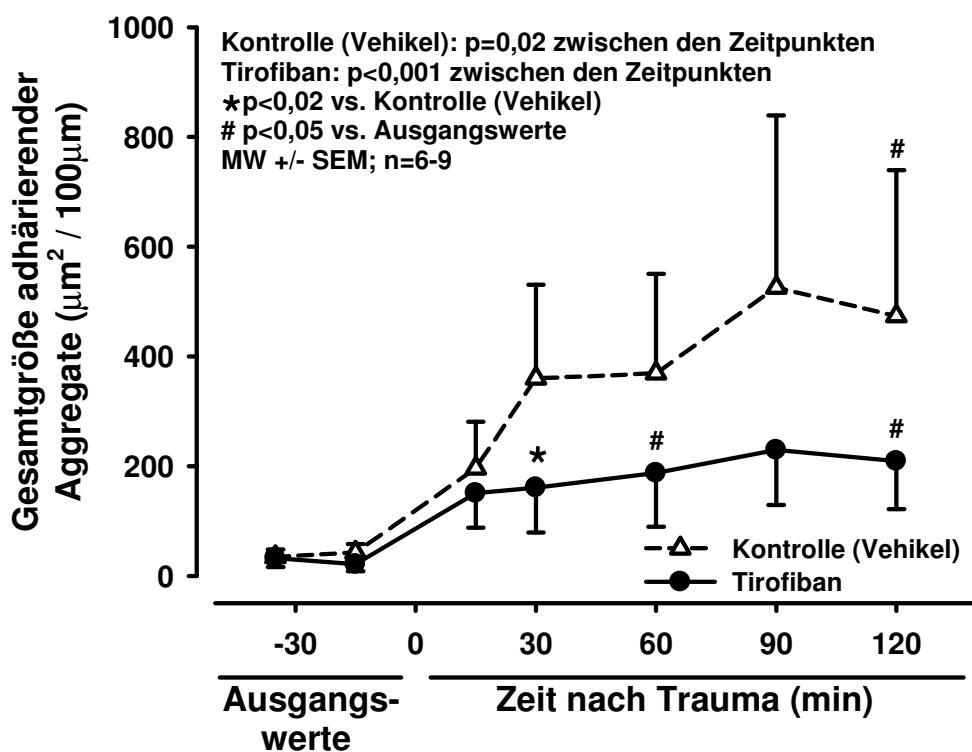


Abbildung 31: Aggregatlast der Venen (Summe der Einzelgrößen adhärierender Aggregate eines Gefäßabschnittes) im zeitlichen Verlauf vor und nach Controlled Cortical Impact, mit und ohne Tirofiban. Färbung: Rhodamin

Die Einteilung der Aggregate in Kategorien entsprechend ihrer Größe ergab folgende Häufigkeitsverteilungen (Abbildung 32).

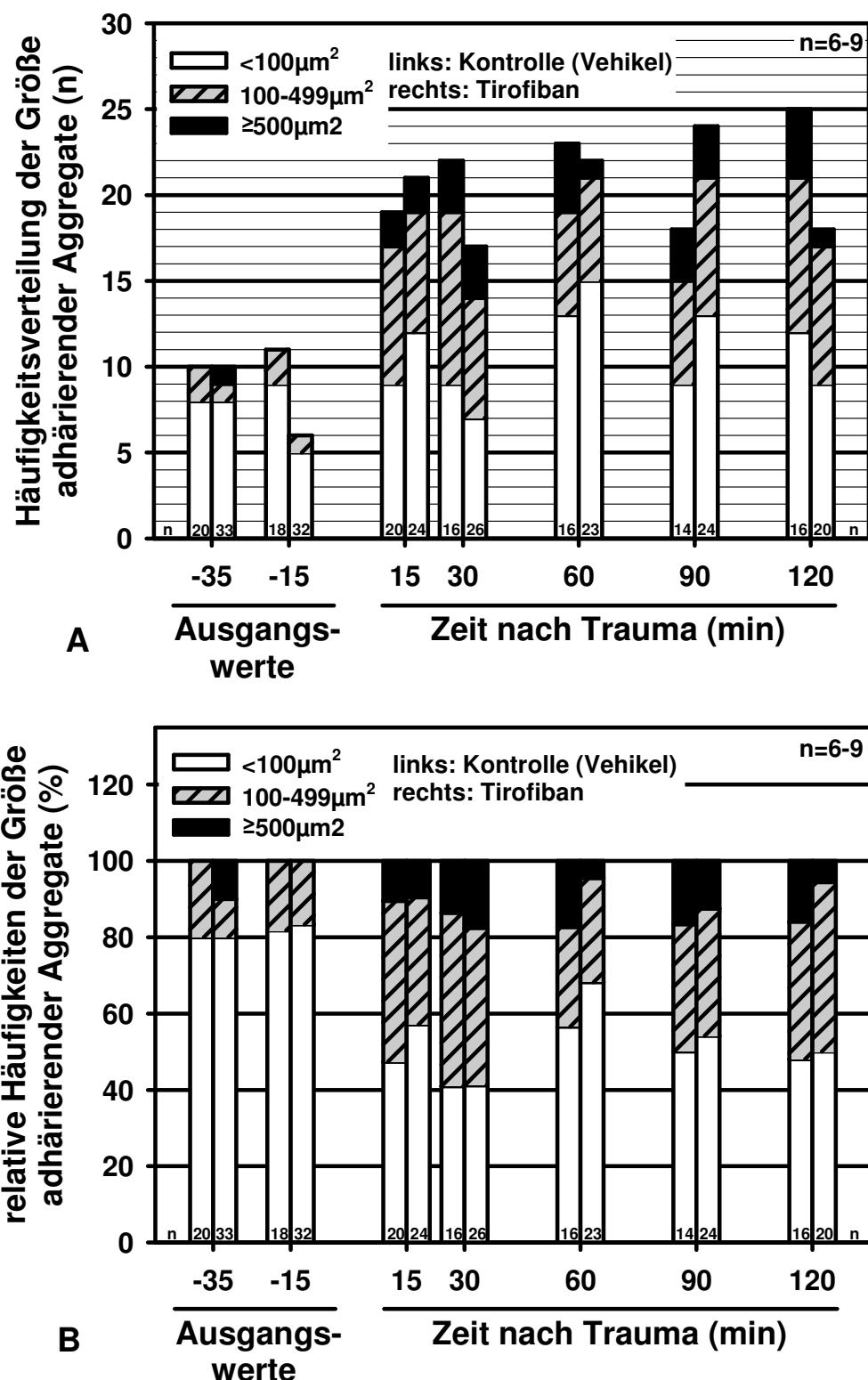


Abbildung 32: Absolute (A) und relative (B) Häufigkeit der Größenkategorien adhärierender Aggregate in Venen im zeitlichen Verlauf vor und nach Controlled Cortical Impact, mit und ohne Tirofiban. Am Fuß jeder Säule findet sich die Anzahl der jeweils in die Auswertung einbezogenen Gefäße. Färbung: Rhodamin

Vor dem Controlled Cortical Impact fanden sich hauptsächlich Aggregate, die kleiner waren als $100 \mu\text{m}^2$. Nach dem Trauma nahm deren Anzahl zwar zu, doch aufgrund der nun höheren Anzahl größerer Aggregate machten sie dann einen weitaus kleineren Anteil aus. Mittelgroße Aggregate zwischen $100 - 499 \mu\text{m}^2$ ließen sich nach dem Trauma sehr häufig beobachten. Ihre Anzahl wurde allerdings nach 60 Minuten wieder minimal geringer, was am ehesten durch die leichte Zunahme der großen Aggregate über $500 \mu\text{m}^2$ zu erklären war, die möglicherweise aus diesen hervorgingen. Wir sahen hierbei auch, dass diese Zunahme unter Tirofiban zum Teil etwas schwächer ausgeprägt war.

Tabelle 3 zeigt die Anzahl adhärierender Aggregate, eingeteilt in Größenkategorien für jeden Beobachtungszeitpunkt nach Controlled Cortical Impact mit und ohne Tirofiban, sowie die Anzahl der jeweils beobachteten Gefäße. Um Unterschiede zwischen der Kontroll- und Tirofibangruppe darzustellen und einen möglichen Effekt zu erkennen, wurden die Ausgangswerte nicht in die Gesamtzahlen einbezogen und daher nicht abgebildet.

Zeit nach Trauma (min)		15	30	60	90	120	GESAMT
Kontrolle	<100 μm^2	9	9	13	9	12	52
	100-499 μm^2	8	10	6	6	9	39
	$\geq 500 \mu\text{m}^2$	2	3	4	3	4	16
	GESAMT	19	22	23	18	25	107
	Gefäße	20	16	16	14	16	82
Tirofiban	<100 μm^2	12	7	15	13	9	56
	100-499 μm^2	7	7	6	8	8	36
	$\geq 500 \mu\text{m}^2$	2	3	1	3	1	10
	GESAMT	21	17	22	24	18	102
	Gefäße	24	26	23	24	20	117

Tabelle 3: Anzahl der adhärierenden Aggregate, eingeteilt in Größenkategorien und der jeweils ausgewerteten Gefäße, im Zeitverlauf nach Controlled Cortical Impact, mit und ohne Tirofiban. Färbung: Rhodamin

Daraus geht hervor, dass in der Tirofibangruppe eine größere Anzahl von Gefäßen beobachtet wurde ($n=20-26$), als in der Kontrollgruppe ($n=14-20$). Die Anzahl von

Aggregaten, die größer waren als $500 \mu\text{m}^2$, war dabei unter Tirofiban jedoch stets niedriger oder höchstens gleich groß wie in der Kontrollgruppe.

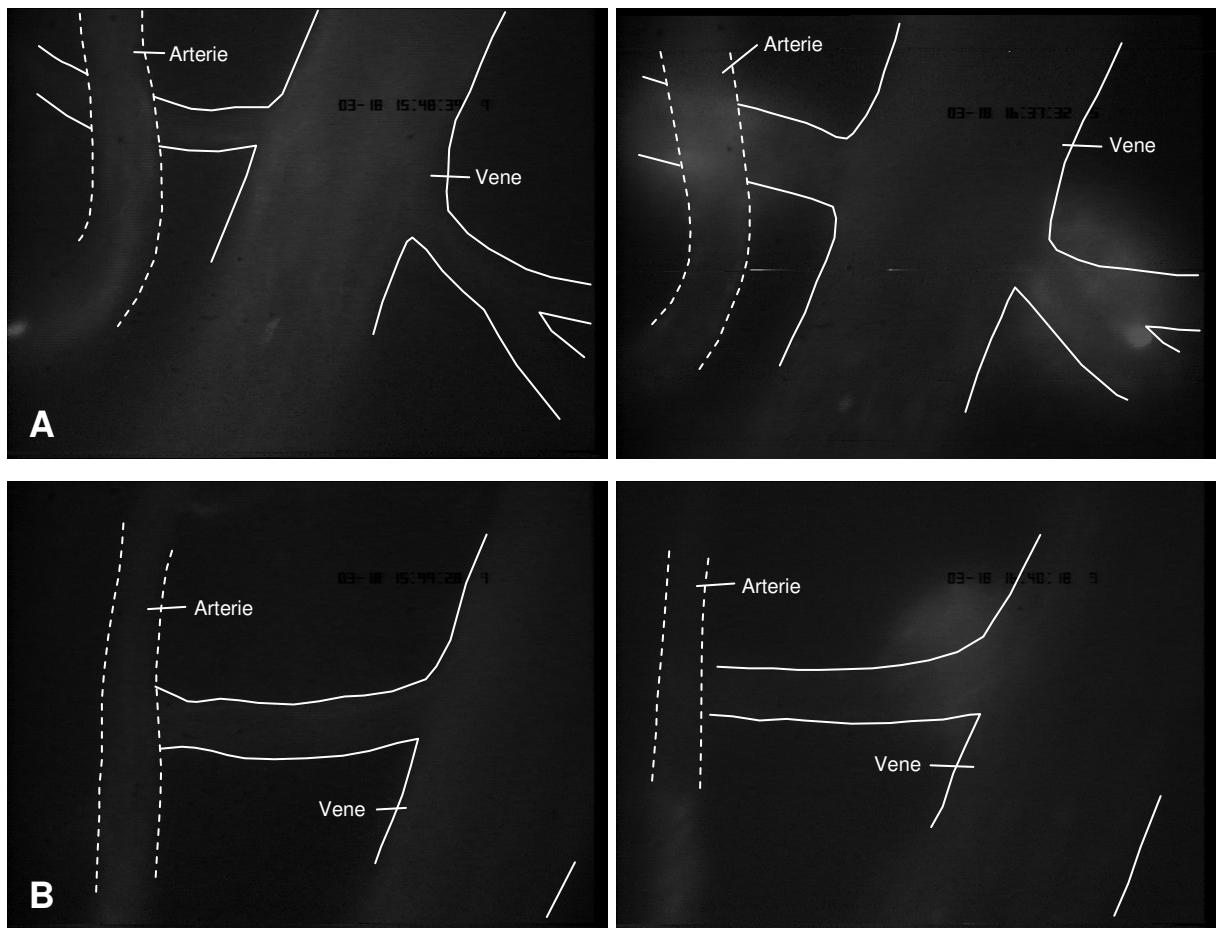


Abbildung 33: Intravitalmikroskopische Vergleichsaufnahmen zerebraler Blutgefäße von Tieren der Kontrollgruppe 35 Minuten vor (links) und 15 Minuten nach (rechts) Controlled Cortical Impact. Zu sehen sind dezente Veränderungen der Gefäßdurchmesser und Extravasationen, sowie im oberen Bild kleinere Aggregate. Färbung: Rhodamin

3.2 Nekrosevolumen

In der Versuchsreihe mit posttraumatischer Tirofibangabe nahm das Nekrosevolumen in den ersten 24 Stunden nach Controlled Cortical Impact von $13,1 \pm 1,0 \text{ mm}^3$ auf $21,9 \pm 0,8 \text{ mm}^3$ zu (ödemkorrigiert von $12,4 \pm 1,0 \text{ mm}^3$ auf $20,1 \pm 0,8 \text{ mm}^3$) (Abbildung 34). Wurde Tirofiban etwa zehn Minuten nach dem Trauma verabreicht, betrug das Nekrosevolumen nach 24 Stunden $19,3 \pm 1,3 \text{ mm}^3$ (ödemkorrigiert $17,4 \pm 1,1 \text{ mm}^3$) und war somit zwar etwas niedriger als nach Gabe des Vehikels, jedoch hatte dies keine statistische Signifikanz. Bei einer Tirofibangabe zu späteren Zeitpunkten war das Nekrosevolumen ähnlich hoch oder geringfügig

höher als ohne Tirofibangabe. Insgesamt ergab sich für keinen Tirofibangabezeitpunkt ein statistisch signifikanter Unterschied zum Nekrosevolumen unter Kontrollbedingungen 24 Stunden nach Controlled Cortical Impact.

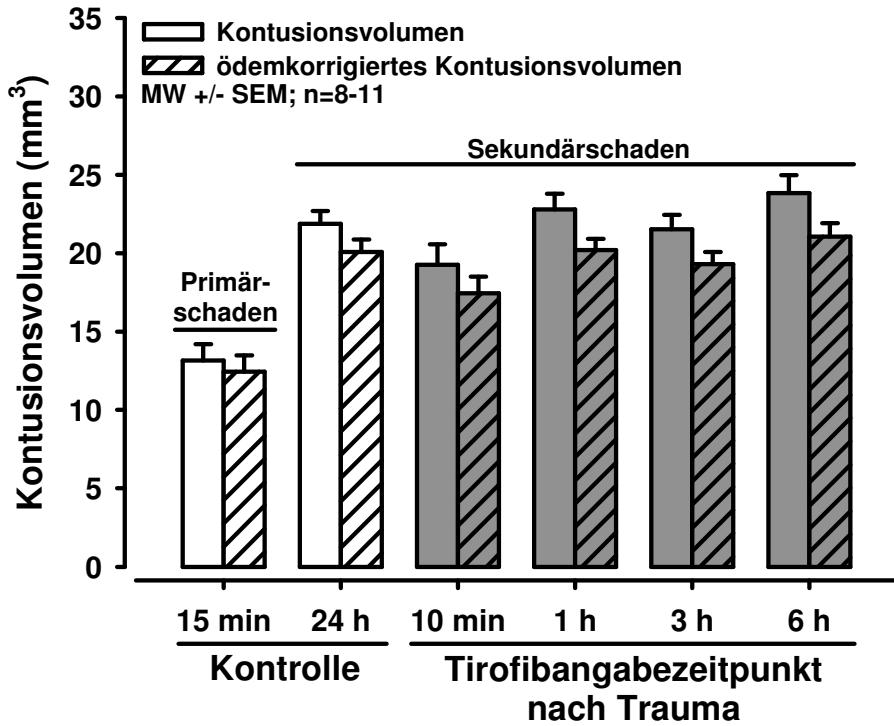


Abbildung 34: Nekrosevolumina 15 Minuten und 24 Stunden nach Controlled Cortical Impact (CCI) unter Kontrollbedingungen (weiß) und 24 Stunden nach CCI bei Tirofibangabe zu verschiedenen posttraumatischen Zeitpunkten (grau), (ödemkorrigierte Werte jeweils schraffiert).

Auch in der Versuchsreihe mit prätraumatischer Tirofibangabe ergab sich kein nennenswerter, statistisch signifikanter Effekt durch die Gabe von Tirofiban.

3.3 Intrakranieller Druck

Der intrakranielle Druck (Abbildung 35) betrug 24 Stunden nach Controlled Cortical Impact $19,0 \pm 2,0$ mmHg. Durch eine Tirofibangabe zehn Minuten nach dem Trauma lag er nach 24 Stunden bei $14,7 \pm 1,2$ mmHg. Auch eine Verabreichung von Tirofiban nach einer ($13,7 \pm 1,0$ mmHg) oder drei Stunden ($14,6 \pm 1,4$ mmHg) post Trauma führte noch zu etwas niedrigeren Werten. Wenn Tirofiban sechs Stunden nach dem Trauma gegeben wurde, war der intrakranielle Druck mit $18,7 \pm 1,3$ mmHg wieder annähernd so hoch wie in der Kontrollgruppe. Die Signifikanzanalyse ergab einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ($p<0,04$), jedoch bestand

kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Tirofibangabe nach einer Stunde und der Kontrollgruppe, obwohl deren Mittelwerte am weitesten auseinander lagen.

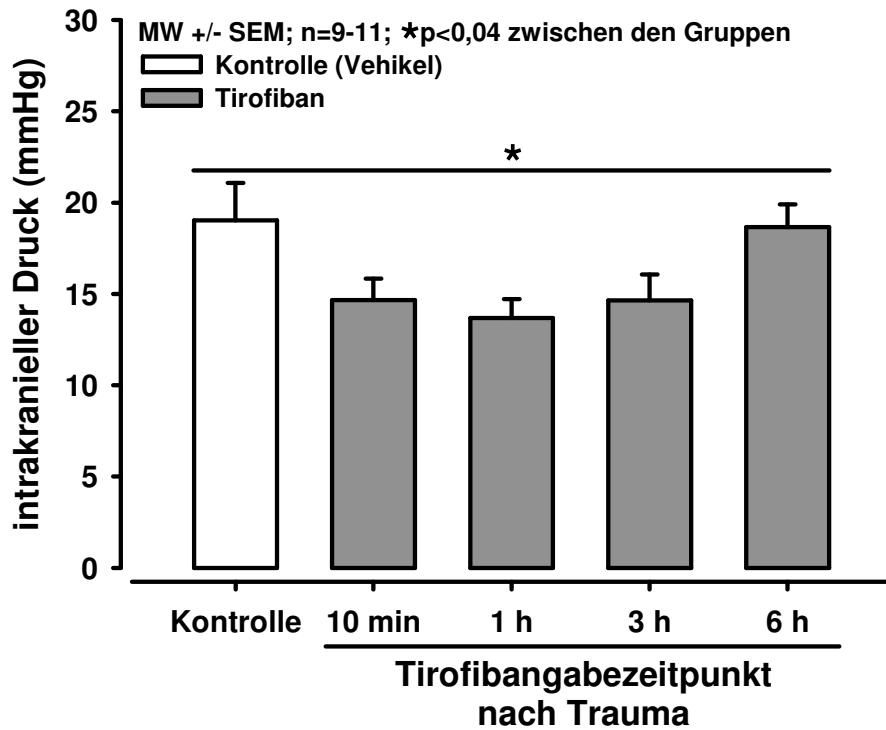


Abbildung 35: Intrakranieller Druck 24 Stunden nach Controlled Cortical Impact unter Kontrollbedingungen (weiß) und nach posttraumatischer Tirofibangabe zu verschiedenen Zeitpunkten (grau).

3.4 Hirnwassergehalt

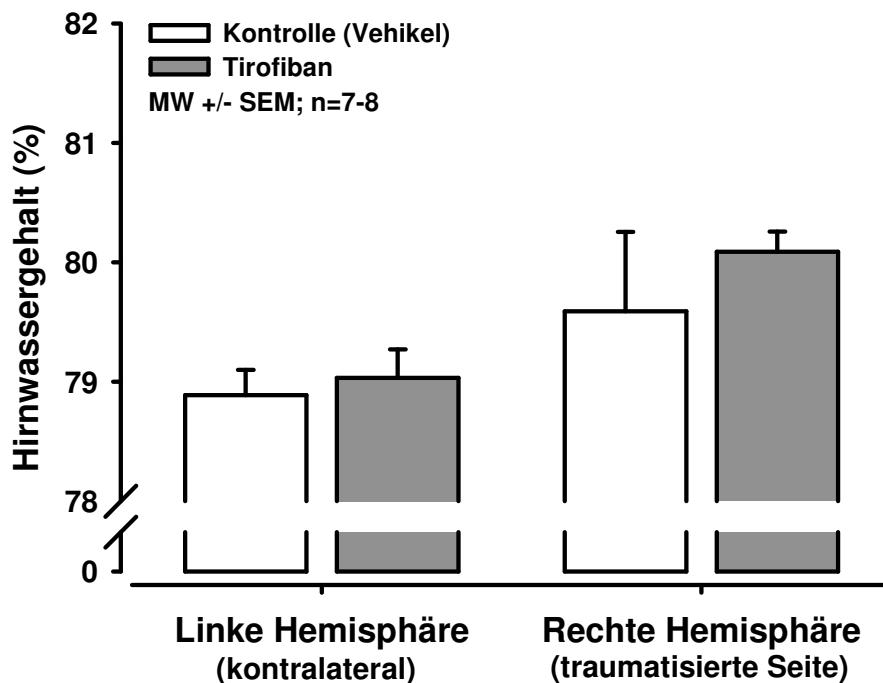


Abbildung 36: Hirnwassergehalt 24 Stunden nach Controlled Cortical Impact bei prätraumatischer Tirofibangabe

Bei prätraumatischer Tirofibangabe (Abbildung 36) zeigte sich in der traumatisierten Hemisphäre ein Wassergehalt von $80,1 \pm 0,2\%$, gegenüber $79,6 \pm 0,7\%$ in der Kontrollgruppe. In der kontralateralen Hirnhälften lag er unter Tirofiban bei $79,0 \pm 0,2\%$ und $78,9 \pm 0,2\%$ in der Kontrollgruppe.

Nach posttraumatischer Tirofibangabe (Abbildung 37) ermittelten wir in der traumatisierten Hemisphäre einen Wassergehalt von $80,9 \pm 0,3\%$, gegenüber $80,8 \pm 0,2\%$ in der Kontrollgruppe. In der kontralateralen Hirnhälften war der Hirnwassergehalt unter Tirofiban mit $79,5 \pm 0,1\%$ signifikant höher als in der Kontrollgruppe ($79,3 \pm 0,2\%$) ($p<0,03$).

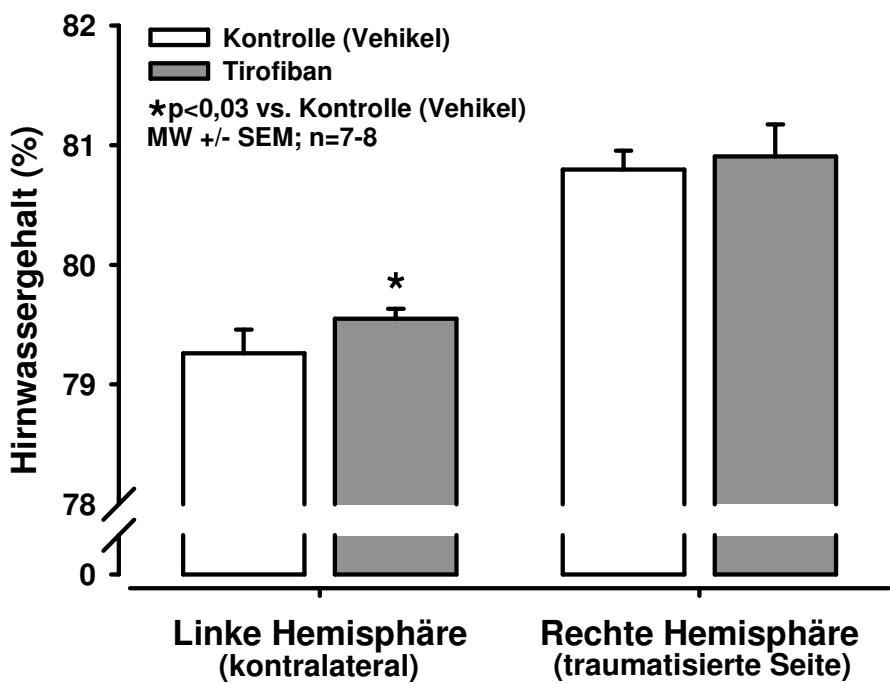


Abbildung 37: Hirnwassergehalt 24 Stunden nach Controlled Cortical Impact bei posttraumatischer Tirofibangabe

Wenn sich auch unter Tirofiban stets tendenziell etwas höhere Werte fanden als in der Kontrollgruppe, so ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied lediglich nach posttraumatischer Tirofibangabe in der nicht-traumatisierten Hemisphäre.

4 DISKUSSION

4.1 Diskussion der verwendeten Methoden

4.1.1 Maus als Versuchstier

Mäuse als Versuchstiere zu benutzen, bringt einige Vor- und Nachteile mit sich. Die Vorteile bestehen zum einen in der Verfügbarkeit genetisch veränderter Stämme, ihrer kurzen Brutperiode und einer einfachen Handhabung. Die Nachteile sind ihre geringe Größe und ein schnellerer Stoffwechsel (Thal and Plesnila, 2007).

4.1.2 Anästhesie

In den für diese Arbeit durchgeführten Experimenten kamen zwei unterschiedliche Narkoseverfahren zum Einsatz. Der Großteil der Versuche erforderte eine vorübergehende Narkose von einer Dauer unter einer, beziehungsweise unter einer halben Stunde, aus der die meisten Tiere nach Applikation des Schädel-Hirn-Traumas wieder aufwachen sollten. Hierfür verwendeten wir eine Inhalationsnarkose mit einem Gasgemisch aus Isofluran, Lachgas und Sauerstoff. Diese ermöglichte ein spontanes Wiedererwachen der Versuchstiere durch bloßes Sistieren der Zufuhr der Narkosegase. Ein anderes Narkoseverfahren kam für die intravitalmikroskopischen Untersuchungen zum Einsatz. Diese waren mit meist etwas über vier Stunden von weitaus längerer Dauer und ein wieder Aufwachen der Tiere war nicht notwendig. Hierfür wurde eine Kombinationsnarkose aus Medetomidin, Midazolam und Fentanyl intraperitoneal injiziert. Die Möglichkeit des Wiedererwachens besteht zwar auch bei dieser Form der Narkose, jedoch erfordert sie die Gabe der jeweiligen Antagonisten (Thal and Plesnila, 2007). Die von Thal und Plesnila empfohlenen Angaben zur Aufrechterhaltung der Narkose durch stündliche Injektionen eines Viertels der initialen Dosis (Thal and Plesnila, 2007) erwiesen sich in den intravitalmikroskopischen Experimenten jedoch als nicht ausreichend, um eine angemessene Narkosetiefe einzuhalten, so dass hier jeweils nach Bedarf nachgespritzt wurde. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte darin bestehen, dass die Schädelknochen der Tiere für die intravitalmikroskopischen Untersuchungen sehr fest in den stereotaktischen Rahmen eingespannt wurden, um ein mögliches Verrutschen des Schädels zu verhindern, wodurch das Wiederauffinden der zu

beobachtenden Blutgefäße stark erschwert worden wäre. Da dies für das Versuchstier einen sehr starken Schmerzreiz darstellt, könnte die vorgeschlagene Dosis möglicherweise hierfür nicht ausreichend gewesen sein.

Bei diesen Versuchen wurde eine Intubation mit anschließender maschineller Beatmung durchgeführt. Eine Anpassung der Beatmungsparameter erfolgte in Abhängigkeit vom kontinuierlich mittels Mikrokapnometer gemessenen endexspiratorischen CO₂-Partialdruck. Die auf diese Weise ermittelten Werte machen regelmäßige Blutentnahmen entbehrlich, da sie sehr gut mit dem arteriellen CO₂-Partialdruck korrelieren (Thal and Plesnila, 2007). Mit diesem von Thal und Plesnila entwickelten Modell (Thal and Plesnila, 2007) war es also möglich, Tiere über mehrere Stunden in eine Narkose zu versetzen und dabei die physiologischen Bedingungen weitgehend konstant zu halten.

4.1.3 Traumamodell: Controlled Cortical Impact

Zur experimentellen Durchführung eines Schädel-Hirn-Traumas verwendeten wir das Modell des Controlled Cortical Impact, das bereits für verschiedene Tiergattungen etabliert wurde (Alessandri et al., 2003; Dixon et al., 1991; Lighthall, 1988; Smith et al., 1995). Morphologisch finden sich nach einem Controlled Cortical Impact Kontusionen und Blutungen (Dixon et al., 1991; Lighthall, 1988), sowie Axonschäden (Lighthall et al., 1990), wodurch ein Schädigungsmuster entsteht, das häufig anzutreffende pathoanatomische Folgen des menschlichen Schädel-Hirn-Traumas enthält (Saatman et al., 2008). Vorteile dieses Modells sind die Kontrollierbarkeit der Schwere des Traumas (Morales et al., 2005), sowie die hohe intra- und interindividuelle Reproduzierbarkeit der hervorgerufenen Kontusionsvolumina (Zweckberger et al., 2003). Neben dem Controlled Cortical Impact existieren zahlreiche weitere experimentelle Modelle zur Applikation eines Schädel-Hirn-Traumas (Cernak, 2005; Morales et al., 2005; Morganti-Kossmann et al., 2010; O'Connor et al., 2011). Exemplarisch herausgegriffen seien hier das sehr häufig verwendete Modell der Lateral Fluid Percussion Injury (LFP), bei dem ein Pendel aus definierter Höhe auf den Kolben eines mit Salzwasser gefüllten Reservoirs stößt, wodurch ein Druckpuls entsteht, der einen kurzen Flüssigkeitsbolus auf die freipräparierte Dura drückt (Thompson et al., 2005). Die Verletzungsschwere lässt sich durch Anpassung der Pendelhöhe variieren, da diese die Stärke des durch das Salzwasserreservoir übertragenen Flüssigkeitsdruckpulses beeinflusst (Thompson et

al., 2005). Nachteilig an diesem Modell ist die gesteigerte Morbidität infolge einer überproportionalen Miteinbeziehung des Hirnstammes und der Entwicklung eines neurogenen Lungenödems, sowie die eingeschränkte biomechanische Kontrolle (Cernak, 2005). Da die Strömungseigenschaften der Flüssigkeit (Richtung, Verdrängungseffekt und Geschwindigkeit) unter anderem von der Hirngeometrie abhängen, erweisen sich exakte biomechanische Analysen der resultierenden Schädigung als schwierig, so dass dieses Modell für diese Zwecke wenig geeignet ist (O'Connor et al., 2011; Wang and Ma, 2010). Eine weitere Alternative der experimentellen Applikation eines Schädel-Hirn-Traumas stellt das Weight-Drop-Modell dar, bei dem ein Gewicht, geführt durch eine Plexiglasröhre auf eine Fußplatte fällt, die der Dura des Versuchstieres aufliegt (Feeney et al., 1981). Nachteile dieses Modells sind die schwankende Aufprallgeschwindigkeit des fallenden Gewichtes und die Möglichkeit eines Wiederaufprallens (sogenannter rebound impact), weshalb die biomechanischen Angaben die resultierende Deformation nicht exakt beschreiben (O'Connor et al., 2011).

Das menschliche Schädel-Hirn-Trauma ist eine heterogene Erkrankung und kein einzelnes Tiermodell kann das volle Spektrum der bei einem Menschen nach Schädel-Hirn-Trauma beobachtbaren Befunde nachahmen (O'Connor et al., 2011). Daher sollte das Design und die Auswahl eines speziellen Modells zur Fragestellung passen (Cernak, 2005).

4.1.4 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie ist eine geeignete Methode zur *in vivo*-Beobachtung der zerebralen Mikrozirkulation nach einem Controlled Cortical Impact Schädel-Hirn-Trauma bei der Maus und ermöglicht die simultane Untersuchung zahlreicher Parameter im zeitlichen Verlauf innerhalb eines traumatisierten Tieres, wodurch Aussagen über mögliche Zusammenhänge getroffen werden können (Schwarzmaier et al., 2010). Durch die Auswahl geeigneter Fluoreszenzfarbstoffe und die Möglichkeit, Filterblöcke mit unterschiedlichen Absorptionsspektren in den Strahlengang zwischenzuschalten, lassen sich verschiedene Aspekte der Mikrozirkulation isoliert nebeneinander betrachten. So wurden in der vorliegenden Arbeit das räumliche und zeitliche Muster von zerebralem Gefäßdurchmesser, der Interaktion intravaskulärer Zellen oder Zellaggregaten mit dem Endothel, der Beeinträchtigung der zerebralen Durchblutung, sowie dem Auftreten und der

Ausdehnung von Mikrothromben und Aggregaten beleuchtet. Damit bot dieses Modell die Möglichkeit, Dynamik und mögliche Einflussfaktoren des posttraumatischen Auftretens von Mikrothromben und Aggregaten zu untersuchen. So konnten Schwarzmaier et al. mit diesem Modell einen Zusammenhang zwischen Mikrothromben und einer Reduktion beziehungsweise einem Sistieren der posttraumatischen zerebralen Durchblutung ausmachen (Schwarzmaier et al., 2010). Im Vergleich zu den übrigen Versuchsdesigns, die in der vorliegenden Arbeit zur Anwendung kamen, war dieses Modell mit einem weitaus größeren zeitlichen, apparativen und handwerklichen Aufwand verbunden. Darüber hinaus erforderte es eine strenge intraoperative Überwachung physiologischer Parameter, da deren Schwankungen die komplexen Autoregulationsmechanismen der zerebralen Mikrozirkulation beeinträchtigen können (Kontos, 1981; White and Venkatesh, 2008). So hängt beispielsweise der zerebrale Gefäßdurchmesser unter anderem vom herrschenden CO₂-Partialdruck ab (Kontos, 1981). Daher wurden die Versuchstiere intubiert und kontrolliert beatmet und es wurde eine kontinuierliche invasive Überwachung des mittleren arteriellen Blutdruckes, sowie am Ende jedes Experiments eine Analyse der arteriellen Blutgase durchgeführt (Schwarzmaier et al., 2010; Thal and Plesnila, 2007).

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Physiologische Parameter

Auffallend waren die azidotischen pH-Werte des arteriellen Blutes zum Versuchsende. Eine respiratorische Azidose infolge einer inadäquaten Beatmung erschien unwahrscheinlich, wenn man sich die endexspiratorisch gemessenen Werte des CO₂-Partialdruckes ansieht, die zu keinem Zeitpunkt auf eine CO₂-Retention hinwiesen und stets im Zielbereich lagen. Auch der arterielle CO₂-Partialdruck 130 Minuten nach dem Schädel-Hirn-Trauma lag zwar mit $44,1 \pm 3,2$ mmHg in der Kontrollgruppe und $41,0 \pm 0,8$ mmHg in der Tirofibangruppe etwas über den endexspiratorisch gemessenen Werten, doch befand er sich letztlich immer noch im Normbereich. Der arterielle O₂-Partialdruck lag mit $89,0 \pm 1,8$ mmHg in der Tirofibangruppe und $81,0 \pm 4,3$ mmHg in der Kontrollgruppe zwar auch noch im Normbereich, war aber ebenso wie die noch normale Sauerstoffsättigung von $94,2 \pm 0,4\%$ für Tirofibán und $91,7 \pm 1,5\%$ in der Kontrollgruppe nicht optimal. Betrachtet

man nun für alle Versuchstiere zusammen den stark erniedrigten Basenüberschuss von $-13,7 \pm 0,6$ mmol/l im Blut, beziehungsweise $-14,1 \pm 0,6$ mmol/l extrazellulär, spricht dies für eine metabolische Azidose, ebenso wie die große Anionenlücke von $19,3 \pm 0,6$ mmol/l und das verminderte aktuelle Bikarbonat von $14,6 \pm 0,4$ mmol/l. Tirofiban ist als Ursache hierfür als wenig wahrscheinlich zu erachten, da der durchschnittliche pH-Wert von $7,16 \pm 0,02$ in der Tirofibangruppe sich nicht wesentlich vom Mittelwert $7,15 \pm 0,02$ der Kontrollgruppe unterschied und damit sogar geringfügig über diesem lag. Eine mögliche Erklärung könnte das verwendete Tierfutter sein, infolgedessen die Tiere bereits zum Versuchsbeginn eine metabolische Azidose aufgewiesen hätten. Zusätzlich dazu beigetragen haben könnte die Narkose, da die von Thal und Plesnila empfohlenen Angaben zur Aufrechterhaltung der Narkose durch stündliche Injektionen eines Viertels der initialen Dosis (Thal and Plesnila, 2007) sich in den vorliegenden Experimenten als nicht ausreichend erwiesen, eine angemessene Narkosetiefe einzuhalten, so dass hier jeweils nach Bedarf nachgespritzt wurde, womit die Narkose infolgedessen möglicherweise etwas überdosiert wurde. Eine weitere plausible Erklärung könnte eine Verdünnung des Bikarbonatgehalts des Blutes durch die mehrstündige Infusion physiologischer Kochsalzlösung sein (Dilutions-Azidose) (SHIRES and HOLMAN, 1948).

Der endexspiratorisch gemessene CO₂-Partialdruck blieb über die gesamte Versuchsdauer weitestgehend konstant und die Mittelwerte lagen stets im physiologischen Bereich. Auch wenn sich zwischen einigen Zeitpunkten vor und nach dem Trauma, sowie teilweise zwischen Tirofiban- und Kontrollgruppe statistisch signifikante Unterschiede ergaben, so sind diese aufgrund ihres erratischen Verteilungsmusters möglicherweise auf die relativ hohe Teststärke infolge des großen Stichprobenumfangs von insgesamt 60 Werten pro Aufnahmezeitpunkt zurückzuführen.

Der mittlere arterielle Blutdruck stieg unmittelbar nach Controlled Cortical Impact an, näherte sich jedoch bereits nach 30 Minuten wieder den Ausgangswerten vor dem Trauma an und verfolgte diese Richtung in einem plateauartigen Verlauf. Dennoch waren die Werte über den gesamten posttraumatischen Verlauf im Vergleich zu den Ausgangswerten signifikant erhöht. Ein transienter posttraumatischer Anstieg des mittleren arteriellen Blutdruckes ließ sich auch bei verschiedenen anderen Spezies nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma mittels Fluid-Percussion-Injury

beobachten (Armstead and Kurth, 1994; McIntosh et al., 1989; Wei et al., 1980). Unter Tirofiban waren die Blutdruckwerte in unseren Experimenten zwar zu allen Zeitpunkten etwas größer als in der Kontrollgruppe, doch in Anbetracht dessen, dass dieses Phänomen bereits vor dem Schädel-Hirn-Trauma und somit auch vor der Applikation von Tirofiban oder dem Vehikel zu beobachten war und die Unterschiede nicht von statistischer Signifikanz waren, muss Tirofiban jedoch nicht notwendigerweise ursächlich dafür sein. Zudem sind uns keine Berichte über eine blutdrucksteigernde Wirkung von Tirofiban bekannt.

4.2.2 Mikrozirkulation

Die Mikrozirkulation besteht aus den pialen und ins Gehirn eintretenden Arteriolen, sowie den Kapillaren und Venolen. Die arterielle Komponente ist dabei entscheidend für die Regulation der Durchblutung, wobei die Kapillaren und Venolen trotz ihres signifikanten Beitrags zum zerebrovaskulären Widerstand, für die Regulation der Durchblutung unter physiologischen Bedingungen lediglich eine minimale Rolle spielen (Kulik et al., 2008).

4.2.2.1 Zerebrale Durchblutung

Schwarzmaier et al konnten einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten zerebraler Mikrothromben und einer ausgedehnten Reduktion der mikrozirkulatorischen Fließgeschwindigkeit des Blutes in der traumatischen Penumbra ausmachen. Dabei ließ sich zwei Stunden nach einem Controlled Cortical Impact in 70% der untersuchten Venolen keine Durchblutung mehr und bereits nach 30 Minuten in 35% der untersuchten Arteriolen eine verlangsamte Fließgeschwindigkeit des Blutes oder gar keine Durchblutung beobachten (Schwarzmaier et al., 2010). Dieser Zusammenhang ließ sich in den für die vorliegende Arbeit durchgeführten Experimenten nicht in identischer Form reproduzieren. Wir konnten zwar auch nach dem Controlled Cortical Impact intravaskuläre, adhärierende Aggregate in der zerebralen Mikrozirkulation beobachten, jedoch fand sich in den von uns untersuchten Gefäßen nahezu ausnahmslos eine unauffällige Durchblutung. Lediglich bei zwei Venen und einer Arterie war eine Verlangsamung der Fließgeschwindigkeit des Blutes oder eine Umkehr der Flussrichtung zu verzeichnen. Ein Sistieren zeigte sich in keinem der für die Auswertung berücksichtigten Gefäße. Bezogen auf eine Gesamtanzahl von 73

Venen und 23 Arterien, die in die Auswertung einbezogen wurden, sind diese Ergebnisse als wenig relevant zu erachten. Diese Befunde müssen jedoch nicht notwendigerweise gegen einen möglichen Zusammenhang zwischen dem posttraumatischen Auftreten zerebraler Mikrothromben und einer Beeinträchtigung der zerebralen Durchblutung sprechen. Mit dem Modell des Controlled Cortical Impact lässt sich über die Einstellbarkeit der Traumaparameter zwar ein möglichst reproduzierbarer Schädigungsgrad erzielen, doch ist zwischen den Operateuren eine interindividuelle Variabilität der Größe des resultierenden morphologischen Defektes nicht vollständig auszuschließen. Letztendlich unterscheidet sich zwischen verschiedenen Operateuren fast immer die exakte Positionierung des Bolzens der Traumamaschine auf der Dura des Versuchstieres. Folglich besteht die Möglichkeit, dass die in der vorliegenden Arbeit applizierten Traumata trotz identischer Einstellparameter wie in den Versuchen von Schwarzmaier et al einen Schaden von etwas geringerem Ausmaß verursacht haben könnten, dessen relevanter Anteil seiner räumlichen Ausdehnung von unserem Beobachtungsfenster nicht mehr eingefangen wurde oder der nicht groß genug war, die zerebrale Durchblutung entsprechend zu beeinträchtigen. Dafür spricht eine Serie unveröffentlichter Daten von Schwarzmaier zum Nekrosewachstum nach Controlled Cortical Impact, die mit vergleichbaren Traumaparametern durchgeführt wurde, wie unsere Versuchsreihe zum Nekrosevolumen nach posttraumatischer Tirofibangabe. Daraus geht hervor, dass die Nekrosevolumina von Schwarzmaier annähernd doppelt so groß sind, wie in den Kontrollgruppen der genannten Versuchsreihe von uns (S. Schwarzmaier, persönliche Mitteilung, 25.10.2012). Somit besteht die Möglichkeit, dass die von Schwarzmaier et al applizierten Traumata größeren strukturellen Schaden verursacht und dadurch die Mikrozirkulation stärker beeinträchtigt haben.

4.2.2.2 Gefäßdurchmesser

In der Literatur wurde von unterschiedlichen Reaktionen des Gefäßbettes auf ein Schädel-Hirn-Trauma berichtet. Einige beobachteten eine Vasokonstriktion (Armstead, 1995; Armstead and Kurth, 1994) oder Vasospasmen (Armin et al., 2008), andere fanden eine Vasodilatation (Wei et al., 1980). Schwarzmaier et al registrierten 30 Minuten nach Controlled Cortical Impact eine Zunahme des Gefäßdurchmessers zerebraler Arteriolen auf $126,2 \pm 2,5\%$ der Ausgangswerte. Auch wenn diese daraufhin leicht nachließ, war zwei Stunden nach Controlled

Cortical Impact immer noch eine Dilatation der Gefäße um 19% zu erkennen. Daher schlussfolgerten sie, dass eine Vasokonstriktion oder Vasokompression wahrscheinlich nicht die Ursache für die Verminderung der zerebralen Durchblutung in der Frühphase nach Schädel-Hirn-Trauma sein können (Schwarzmaier et al., 2010). In unseren Experimenten zeigte sich zwar auch eine posttraumatische Dilatation zerebraler Arteriolen, doch erreichte diese ihr Maximum erst 90 Minuten nach dem Trauma, fiel mit $115 \pm 7\%$ des Ausgangswertes etwas schwächer aus und wich erst nach 120 Minuten signifikant von diesem ab. In der Frühphase nach dem Trauma unterschied sich das Verhalten der Gefäße jedoch von den Beobachtungen durch Schwarzmaier et al., die 30 Minuten nach Controlled Cortical Impact das Maximum der Dilatation verzeichneten, wohingegen bei uns die Gefäßdurchmesser zu diesem Zeitpunkt mit $99 \pm 3\%$ des Ausgangsdurchmessers nahezu unverändert waren und kurz zuvor, 15 Minuten nach dem Trauma, sogar eine dezent angedeutete Tendenz zur Vasokonstriktion auf $95 \pm 4\%$ des Ausgangswertes erkennen ließen. Möglicherweise bietet sich hier jedoch eine ähnliche Deutung an, wie für die unbeeinträchtigte zerebrale Durchblutung, wonach in unseren Experimenten der durch Controlled Cortical Impact verursachte Schaden schwächer ausfiel als bei Schwarzmaier et al. und sich die Penumbra nicht bis in das intravitalmikroskopische Beobachtungsfeld ausbreitete, so dass wir den Effekt des Traumas nicht oder nur in schwächerer Ausprägung sehen konnten. Dazu würde die verzögerte und weniger starke Vasodilatation passen und die Andeutung einer Vasokonstriktionstendenz in der Frühphase könnte lediglich eine Schwankung des Ausgangswertes darstellen.

In den zerebralen Venolen beobachteten wir ab 60 Minuten nach dem Trauma eine signifikante Vasodilatation, die kontinuierlich zunahm und am Ende des Beobachtungszeitraumes ein Maximum von $124 \pm 3\%$ des Ausgangswertes aufwies. In der Tirofibangruppe fanden wir eine zwar statistisch unsignifikante, aber minimal stärker ausgeprägte Vasodilatation der Venolen, nicht aber der Arteriolen. Möglicherweise war dieses Phänomen der Wirkung von Tirofiban geschuldet, zieht man die Ergebnisse von Heitzer et al. in Betracht, die demonstrierten, dass durch die Blockade der Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptoren bei Patienten mit symptomatischer Koronarer Herzkrankheit die endothelialabhängige und NO-vermittelte Vasodilatation verbessert werden kann (Heitzer et al., 2003). Dem steht jedoch gegenüber, dass wir dies lediglich in den Venolen und nicht den Arteriolen beobachteten und es keinerlei

statistische Signifikanz hatte. Interessant ist in diesem Zusammenhang jedoch der im Vergleich zur Kontrollgruppe zwar unsignifikant, aber dennoch etwas höhere Blutdruck unter Tirofiban. Insbesondere, wenn man die Ergebnisse von Wei et al dazu in Beziehung setzt, die nach Fluid Percussion Injury an Katzen ebenfalls von einer posttraumatischen Vasodilatation berichteten und den ebenfalls beobachteten transienten posttraumatischen Anstieg des mittleren arteriellen Blutdruckes als die Ursache ansahen, da sie keine Vasodilatation beobachteten, wenn dieser unterbunden wurde (Wei et al., 1980). Berichte über eine blutdrucksteigernde Wirkung von Tirofiban sind uns jedoch nicht geläufig und weder die Vasodilatation, noch der Blutdruck waren unter Tirofiban signifikant höher.

Inwieweit Tirofiban einen möglichen Einfluss auf die posttraumatische zerebrale Durchblutung ausübt, lässt sich anhand unserer Beobachtungen nicht feststellen, da diese auch in der Kontrollgruppe weitgehend unbeeinträchtigt blieb. Eine mögliche Erklärung für die Vasodilatation der Venolen könnte auch das posttraumatisch gesteigerte Auftreten von Mikrothromben und adhärierenden Aggregaten sein. Es erscheint jedoch fraglich, wenn man bedenkt, dass wir nahezu keine Gefäßokklusionen oder Beeinträchtigungen der zerebralen Durchblutung beobachten konnten. Inwieweit die Veränderungen der Gefäßdurchmesser also tatsächlich das Resultat des Controlled Cortical Impact waren, steht zur Debatte, hält man sich die vielfältigen Wechselbeziehungen und Einflüsse verschiedener physiologischer Parameter vor Augen und zieht in Betracht, dass es nicht durchweg gelungen ist, alle in physiologischen Grenzen zu halten.

4.2.2.3 Thrombozyten-Endothel-Interaktion

Die durchflusszytometrischen Analysen konnten zeigen, dass die Thrombozyten durch die Blutentnahme, sowie durch deren Separation, Markierung und Lagerung nicht vorzeitig aktiviert wurden. Dass sie jedoch prinzipiell aktivierbar waren, zeigte die Zugabe von Thrombin zu Vollblut. Zusätzlich war festzustellen, dass die Markierung der Thrombozyten durch CFDA gelungen war.

In den intravitalmikroskopischen Experimenten konnten wir zwar eindeutig CFDA-markierte Thrombozyten im Blutstrom der von uns untersuchten Blutgefäße erkennen, doch waren diese in nahezu allen Kategorien in so geringer Anzahl oder oft gar nicht zu beobachten, so dass ihre Auszählung keine brauchbaren Aussagen zur Thrombozyten-Endothel-Interaktion erlaubte.

Die Anzahl Rhodamin-markierter, rollender Thrombozyten in Venen war nach Controlled Cortical Impact etwas höher. Im Vergleich zur Kontrollgruppe waren unter Tirofiban zu jedem Zeitpunkt etwas mehr rollende Thrombozyten zu beobachten, insbesondere nach 30 und 60 Minuten. In den ersten 15 Minuten verlief der Anstieg in beiden Gruppen zwar noch ähnlich, doch während er unter Tirofiban noch ein wenig weiter lief, blieb er in der Kontrollgruppe dann auf einem niedrigeren Niveau und näherte sich erst nach 90 Minuten wieder dem von Tirofiban an. Gleichwohl fanden sich signifikante Unterschiede lediglich zwischen den Zeitpunkten der Kontrollgruppe, nicht aber zwischen den beiden Gruppen oder den Zeitpunkten der Tirofibangruppe. Die Befunde CFDA-markierter, rollender Thrombozyten in Venen wichen teilweise von diesen Beobachtungen ab. So fanden sich selbige nur unter Tirofiban und zeigten eine im Zeitverlauf rückläufige Anzahl. In der Initialphase nach dem Trauma fanden sich noch signifikant mehr als in der Kontrollgruppe, doch nach 90 Minuten präsentierten sich auch unter Tirofiban keine Zellen mehr. Die CFDA-Befunde waren jedoch aufgrund der sehr geringen Anzahlen nur bedingt aufschlussreich. In den Arterien fanden sich sowohl unter Rhodamin, wie auch unter CFDA-Färbung insgesamt deutlich weniger rollende Thrombozyten, möglicherweise aufgrund der Strömungsverhältnisse. Lediglich unter Rhodamin zeigten sich in der Frühphase nach dem Schädel-Hirn-Trauma in beiden Gruppen vorübergehende, leichte Zunahmen der Anzahl. Diese waren allerdings nicht signifikant.

Adhärierende Thrombozyten präsentierten sich in der Rhodamin-Färbung insgesamt deutlich seltener als rollende. In den Venen nahm ihre Anzahl während der ersten Zeitpunkte nach dem Trauma zwar sowohl unter Tirofiban als auch in der Kontrollgruppe leicht zu, doch bestand in beiden Gruppen kein statistisch signifikanter Unterschied zu den Ausgangswerten. Unter Tirofiban ließen sich mit Ausnahme des Zeitpunktes 30 Minuten nach dem Trauma stets ein wenig mehr adhärierende Thrombozyten beobachten als in der Kontrollgruppe, jedoch ebenfalls ohne statistische Signifikanz. In Arterien zeigten sich adhärierende Thrombozyten nur ganz vereinzelt, während sie in der CFDA-Färbung weder in Venen noch in Arterien zu beobachten waren.

Die Anzahl Rhodamin-gefärbter, rollender Aggregate in Venen nahm nach Controlled Cortical Impact in beiden Gruppen zwar leicht zu und war unter Tirofiban mit Ausnahme des Zeitpunktes 90 Minuten nach der Schädigung geringfügig niedriger

als in der Kontrollgruppe, jedoch hatte beides keine statistische Signifikanz. In Arterien fanden sich unter Tirofiban gar keine Rhodamin-gefärbten, rollenden Aggregate und in der Kontrollgruppe lediglich vereinzelt. CFDA-markierte, rollende Aggregate traten sowohl in Venen als auch in Arterien nur so vereinzelt auf, dass sie außerhalb des Bereichs von zwei Standardabweichungen des Mittelwerts lagen und somit aus der Wertung genommen wurden, weshalb von Werten um Null auszugehen ist.

Überwiegend war nach Controlled Cortical Impact in den Venen also eine leichte Tendenz zur Zunahme der Thrombozyten-Endothel-Interaktion festzustellen, die jedoch größtenteils nicht statistisch signifikant war. Lediglich für rollende, Rhodamin-gefärbte Thrombozyten fand sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Zeitpunkten. Der Einsatz von Tirofiban ließ nur bei den CFDA-markierten Zellen eine in der Frühphase nach Trauma im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant größere Anzahl rollender Thrombozyten erkennen, die jedoch im Zeitverlauf abnahm. Unter Rhodamin waren hingegen keine statistisch signifikanten Effekte durch Tirofiban zu erkennen, wenn auch im Vergleich zur Kontrollgruppe geringfügig mehr rollende und bis auf einen Zeitpunkt minimal mehr adhärierende Thrombozyten, sowie teilweise eine leicht niedrigere Anzahl rollender Aggregate zu beobachten waren. Auch wenn diese Befunde größtenteils nicht signifikant waren, so deuten sich zumindest Tendenzen an, die durchaus der Wirkung von Tirofiban geschuldet sein könnten. Denn zieht man in Betracht, dass das Rollen und die Adhärenz von Thrombozyten Kennzeichen der Initialphase in der Entstehung von Thromben sind (Brass, 2003) und geht man davon aus, dass die Thrombozyten infolge des Controlled Cortical Impact aktiviert werden, wäre die Konsequenz, dass sie daraufhin begännen, zu rollen, an die Gefäßwand zu adhärieren und sich zu Aggregaten zu vernetzen. Da Tirofiban letzteres jedoch bekanntermaßen verhindert, die Thrombozyten aber infolge des Traumas aktiviert sind, rollten sie an der Gefäßwand entlang. Somit erschien eine höhere Anzahl rollender Thrombozyten nach Schädel-Hirn-Trauma als die logische Konsequenz der Wirkung von Tirofiban. Demnach wären unter Tirofiban auch mehr adhärierende Thrombozyten zu erwarten. Dies war zwar bis auf einen Zeitpunkt der Fall, doch waren die Unterschiede weder sehr groß, noch signifikant. Wiederum für diese Theorie spricht die unter Tirofiban niedrigere Anzahl adhärierender Aggregate und geringere Aggregatlast. Die unter Tirofiban mit Ausnahme von einem Zeitpunkt leicht geringere Anzahl rollender Aggregate nach

dem Trauma könnte möglicherweise darauf zurück zu führen sein, dass Tirofiban die Aggregation der Thrombozyten unterband und folglich weniger rollende Aggregate im Umlauf waren. Betrachtet man allerdings rollende Aggregate als Bruchstücke adhäsierender Aggregate, wären diese dann unter Tirofiban häufiger zu erwarten gewesen.

4.2.2.4 Adhäsierende Aggregate

CFDA-markierte, adhäsierende Aggregate waren sowohl in Venen als auch in Arterien zu selten zu beobachten, um eindeutige Aussagen zu erlauben. Auch die Rhodamin-Färbung lieferte zumindest in Arterien wenig aussagekräftige Befunde für adhäsierende Aggregate, außer dass sie unter Tirofiban meist etwas häufiger auftraten. Dies hatte jedoch keine statistische Signifikanz. Die folgenden Aussagen beziehen sich daher auf Beobachtungen intravaskulärer, Rhodamin-gefärbter, adhäsierender Aggregate in Venen.

Betrachtet man die Aggregatlast der Gefäße, also die Summe der einzelnen Aggregatgrößen innerhalb eines Gefäßabschnittes, waren nach Controlled Cortical Impact höhere Werte wahrzunehmen. Es ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Zeitpunkten und 120 Minuten nach Trauma eine signifikante Steigerung gegenüber den Ausgangswerten. Insbesondere in der Initialphase bis 30 Minuten nach dem Trauma war ein Anstieg auf $360 \pm 171 \mu\text{m}^2 / 100 \mu\text{m}$ gegenüber $39 \pm 12 \mu\text{m}^2 / 100 \mu\text{m}$ vor dem Trauma festzustellen. Auch im folgenden Verlauf fand sich eine weitere Zunahme, bis nach 90 Minuten mit $525 \pm 314 \mu\text{m}^2 / 100 \mu\text{m}$ der höchste Wert erreicht war. Dennoch ergaben sich trotz höherer Werte nicht für alle Zeitpunkte signifikante Unterschiede zum Ausgangswert. So war die Aggregatlast beispielsweise 60 Minuten nach Trauma mit $369 \pm 181 \mu\text{m}^2 / 100 \mu\text{m}$ höher als vor der Schädigung (siehe oben), jedoch ergab sich hierfür keine statistische Signifikanz. Dies könnte möglicherweise der relativ großen Streubreite der Werte geschuldet sein, da sich sowohl bei den Einzelgrößen der Aggregate, als auch nach deren Addition zur Aggregatlast zum Teil sehr große Werte fanden und wir bei beiden Parametern keine statistischen Ausreißer exkludiert haben. Eine getrennte Betrachtung des Verlaufs der Anzahl und der durchschnittlichen Einzelgrößen liefert weitere Anhaltspunkte über das Entstehungsmuster adhäsierender Aggregate. Die Anzahl adhäsierender Aggregate in Venen war nach dem Trauma zwar nicht statistisch signifikant höher als davor, doch war eine

tendenzielle Zunahme zu beobachten. Der steilste Anstieg war dabei in den ersten 30 Minuten nach dem Trauma zu vernehmen (von $0,9 \pm 0,3 / 100\mu\text{m} / \text{min}$ vor dem Trauma auf $2,3 \pm 0,4 / 100\mu\text{m} / \text{min}$ nach 30 Minuten). Danach war lediglich noch ein leichter Anstieg zu erkennen, bis nach 90 Minuten der höchste Wert erreicht war ($2,6 \pm 0,7 / 100\mu\text{m} / \text{min}$). Es deutet sich also an, dass die von uns beobachteten, adhärierenden Aggregate hauptsächlich in der Initialphase nach einem Schädel-Hirn-Trauma entstehen. Ein Blick auf die durchschnittliche Größe der einzelnen Aggregate zeigte, dass auch diese nach dem Schädel-Hirn-Trauma eine leichte Tendenz zur Zunahme zeigte, auch hier mit einem relativ starken Anstieg in der Initialphase bis 30 Minuten nach dem Trauma und nach 90 Minuten einen weiteren Anstieg auf den nach Trauma höchsten Wert von $409 \pm 164 \mu\text{m}^2$ (vor Trauma: $73 \pm 11 \mu\text{m}^2$). Doch ergaben sich auch hier keine statistisch signifikanten Unterschiede zum Ausgangswert. Es sei jedoch erneut angemerkt, dass diese Werte eine relativ große Streubreite hatten, da wir hier keine statistischen Ausreißer exkludiert haben. Wie die Häufigkeitsverteilung der Größe adhärierender Aggregate erkennen lässt, war die Anzahl der kleinen adhärierenden Aggregate in den ersten 30 Minuten nach dem Trauma nur geringfügig angestiegen, beziehungsweise unverändert. Dahingegen fanden sich nun plötzlich weitaus mehr mittelgroße und einige sehr große Aggregate, von denen vor dem Trauma nur ganz vereinzelt welche zu sehen waren.

Auch wenn diese Befunde teilweise keine statistische Signifikanz hatten, so werden auch hier wiederum Tendenzen angedeutet, aus denen zusammengenommen folgende Hypothesen über das Entstehungsmuster adhärierender Aggregate nach Controlled Cortical Impact abgeleitet werden können: Nimmt man den Verlauf der Aggregatlast als Ausgangspunkt, deuteten sich im posttraumatischen Verlauf zwei Anstiege an. Der erste in der Initialphase bis 30 Minuten nach dem Trauma, der zweite nach 90 Minuten. Parallel zum ersten Anstieg beobachteten wir auch eine tendenzielle Zunahme der Anzahl und der durchschnittlichen Größe adhärierender Aggregate. Wie die Häufigkeitsverteilung der Einzelgrößen nahelegt, vornehmlich durch vermehrtes Auftreten mittelgroßer und großer Aggregate. Zeitgleich zum zweiten Anstieg der Aggregatlast fand sich eine weitere leichte Zunahme der durchschnittlichen Einzelgröße bis 90 Minuten nach dem Trauma. Da die Anzahl der adhärierenden Aggregate ab 30 Minuten nach dem Trauma nur noch minimal

zunahm, deutet dies darauf hin, dass diese Zunahme der Aggregatlast in erster Linie durch eine Größenzunahme der Aggregate zustande kam.

Folglich deutet der Verlauf der Aggregatlast auf ein zweistufiges Entstehungsmuster adhärierender Aggregate hin, das vermutlich durch zwei Vorgänge determiniert wurde: Zuerst durch einen Anstieg der Anzahl mittelgroßer adhärierender Aggregate in der Initialphase nach dem Trauma und dann durch eine Zunahme deren Größe im weiteren Verlauf. Es ist also zu vermuten, dass sich ein Großteil der Aggregate in der Initialphase nach dem Trauma bildet und diese im Anschluss daran größer werden.

Unter Tirofiban stieg die Aggregatlast infolge des Schädel-Hirn-Traumas zwar auch in teilweise signifikantem Ausmaß an, doch nahm sie über den gesamten posttraumatischen Zeitraum niedrigere Werte an als in der Kontrollgruppe. Nach 30 Minuten war sie gegenüber dieser in signifikantem Ausmaß reduziert und blieb im weiteren Verlauf auf einem relativ stabilen Niveau unterhalb der Kontrollgruppe. Interessanterweise fand sich unter Tirofiban in der Initialphase nach dem Trauma eine ähnlich leichte Zunahme der durchschnittlichen Einzelgröße adhärierender Aggregate wie in der Kontrollgruppe, zeigte dann aber ab 60 Minuten nach dem Trauma im Gegensatz zur Kontrollgruppe keinen weiteren Anstieg und war von da an etwas niedriger. Hierbei ergaben sich zwar weder statistisch signifikante Unterschiede zu den Ausgangswerten, noch zur Kontrollgruppe, doch könnte dies darauf hindeuten, dass die nach dem Trauma entstehenden Aggregate auch unter Tirofiban mittelgroß waren, doch die weitere Größenzunahme bestehender Aggregate unterbunden wurde. Auch die Häufigkeitsverteilung der in Größenkategorien eingeteilten, adhärierenden Aggregate lässt erkennen, dass über den gesamten posttraumatischen Zeitverlauf hinweg, weniger oder höchstens genauso viele sehr große Aggregate zu beobachten waren, wie in der Kontrollgruppe. Unter Tirofiban wurde jedoch eine größere Anzahl von Gefäßen beobachtet, was die Relevanz dieser Befunde zusätzlich verdeutlicht. Auch unter Tirofiban ergaben sich für die Anzahl adhärierender Aggregate posttraumatisch etwas höhere Werte als vor dem Trauma, doch lagen diese zu jedem Zeitpunkt unterhalb der Kontrollgruppe und während dort 30 Minuten nach dem Trauma die Anzahl weiter zunahm, war sie unter Tirofiban zu diesem Zeitpunkt sogar wieder etwas rückläufig und signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe. Danach stieg sie zwar erneut an, doch blieb sie unterhalb der Kontrollgruppe. Möglicherweise war

diese kurzzeitige, besonders starke Reduktion 30 Minuten nach dem Trauma der gleichzeitig stattfindenden Tirofibanapplikation geschuldet und der Wiederanstieg nach 60 Minuten ein Resultat des Infusionsstopps, so dass sich neue Aggregate auch noch nach der Initialphase bilden konnten. Eine mehr plausible Erklärung wäre allerdings, dass durch Tirofiban bestehende Aggregate zu mehreren kleineren Aggregaten aufgespaltet wurden, wodurch die bloße Anzahl natürlich auch ansteigen würde. Diese Annahme erscheint wahrscheinlicher, da die Aggregatlast trotz der gestiegenen Anzahl in diesem Zeitraum nur minimal zunahm und gleichzeitig die durchschnittliche Aggregatgröße tendenziell geringer wurde. Dies spiegelte sich auch in der Häufigkeitsverteilung der Einzelgrößen wider, wo 60 Minuten nach dem Trauma die Anzahl sehr großer adhärierender Aggregate leicht abgenommen hatte, während die Menge kleiner Aggregate leicht angestiegen war. Der relative Anteil sehr großer adhärierender Aggregate erfuhr einen leichten Rückgang zugunsten kleiner Aggregate.

Es ist folglich gelungen, durch Tirofiban nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma die Anzahl adhärierender Aggregate und die Aggregatlast teilweise bedeutsam zu reduzieren.

Die Senkung der Aggregatlast durch die frühzeitige Tirofibanapplikation nach dem Trauma unterstreicht die pathophysiologische Bedeutung der Initialphase unmittelbar nach einem Schädel-Hirn-Trauma. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein Großteil der adhärierenden Aggregate in dieser Phase entsteht und dass durch deren Abwesenheit die Aggregatlast über die Initialphase hinaus reduziert werden kann. Zur genaueren Untersuchungen der Bedeutung von Infusionszeitpunkt und –dauer wären an dieser Stelle weitere Experimente nützlich. Inwieweit sich die Aggregatlast und das zeitliche Auftretensmuster adhärierender Aggregate im Anschluss an den Zeitraum 120 Minuten nach einem Schädel-Hirn-Trauma hinweg verhält, müsste ebenso weiter untersucht werden. Interessant sind in diesem Zusammenhang Berichte von Lu et al, die zeigen konnten, dass die Entstehung posttraumatischer Aggregate nicht auf die unmittelbare Initialphase nach dem Trauma beschränkt ist, sondern in verschiedenen Hirnarealen zu unterschiedlichen Zeitpunkten stattfindet. So fanden sie heraus, dass in bestimmten Bereichen des Gehirns, wie beispielsweise der Grenzzone des geschädigten Bereichs die Entstehung von Thromben einer verzögerten Dynamik folgt und ihr Maximum erst ein

bis drei Tage nach dem Trauma erreicht, während es in den geschädigten Bereichen bereits zum ersten Beobachtungszeitpunkt nach einer Stunde erreicht ist und drei Tage anhält (Lu et al., 2004b). Ebenfalls erwähnenswert sind in diesem Zusammenhang Berichte über die Auswertung von Hirnpräparaten verstorbener Schädel-Hirn-Trauma-Patienten, wonach bis neun Tage nach dem Trauma von einem Anstieg der Anzahl von Mikrothromben auszugehen ist, die daraufhin nachlässt (Huber et al., 1993; Lafuente and Cervos-Navarro, 1999). Überdies waren sogar in Bereichen abseits von Kontusionen, wie der kontralateralen, ungeschädigten Hemisphäre Mikrothromben zu verzeichnen (Lafuente and Cervos-Navarro, 1999).

Unsere Befunde lassen keine zweifelsfreien Aussagen über die Zusammensetzung der gesehenen Aggregate zu, da die Beobachtungen der Thrombozyten, die mit CFDA, dem für Thrombozyten selektiven Fluoreszenzfarbstoff markiert waren, keine eindeutigen Ergebnisse lieferten. Die geschilderten Schlussfolgerungen beziehen sich daher auf Rhodamin-markierte Zellen, weshalb nicht auszuschließen ist, dass auch Leukozyten an der Aggregation beteiligt waren. Dass Thrombozyten jedoch wesentlicher Bestandteil der Aggregate waren, legt die unter Tirofiban deutlich veränderte Dynamik nahe. Einen weiteren Hinweis liefert in diesem Zusammenhang eine Studie von Lu et al., in der sie Thrombozyten, Fibrin und von Willebrand Faktor als Bestandteile der von ihnen bei Ratten nach Controlled Cortical Impact beobachteten Thromben ausmachen konnten (Lu et al., 2004b). Letztendlich wären an dieser Stelle weitere Untersuchungen notwendig, um die Frage nach den Bestandteilen weiter aufzuklären. Zahlreiche Studien, in denen durch die Anwendung unterschiedlichster Substanzen entweder das Auftreten posttraumatischer Mikrothromben beeinflusst werden konnte oder durch Präparate mit gerinnungshemmender Wirkung relevante Parameter der posttraumatischen Pathophysiologie auf günstige Weise beeinflusst werden konnten, deuten jedoch auf eine bedeutende Rolle der Blutgerinnung oder eine mögliche Beteiligung von Thrombozyten in der Pathophysiologie des Schädel-Hirn-Traumas hin. So gelang es beispielsweise Lu et al. durch die Gabe des HMG-CoA-Reduktase-Inhibitors Atorvastatin die Anzahl der Gefäße mit den zuvor geschilderten, verzögert auftretenden Thromben zu reduzieren (Lu et al., 2004b). In einer weiteren Studie konnten sie erneut Mikrothromben nach Controlled Cortical Impact beobachten und mittels Atorvastatin die posttraumatische Perfusion verbessern und die intravaskuläre

Gerinnung reduzieren, sowie die durch das Trauma verursachte Dysfunktion des räumlichen Gedächtnisses verringern. Lu et al. führten die Verbesserung des funktionellen Outcomes nach Schädel-Hirn-Trauma darauf zurück, dass Atorvastatin die Bildung von Mikrothromben reduziert und die Gefäßdichte in den gefährdeten Arealen erhöht (Lu et al., 2004c). Maeda et al. berichteten, dass nach Controlled Cortical Impact bei Ratten anfangs Mikrothromben nur im Zentrum der Kontusion zu sehen waren und sich ihr Auftreten mit der Zeit in peripherer Richtung auf perikontusionales Gewebe ausbreitete, das initial histopathologisch intakt erschien und im fortschreitenden Zeitverlauf auch Ödeme und eine ischämische zerebrale Durchblutung aufwies. Durch die Gabe von Etizolam, einem Antagonisten des Plättchen-aktivierenden-Faktors konnten sie den perikontusionalen Abfall der Durchblutung und auch die Größe der kontusionalen Nekrose verringern. So schlussfolgerten sie, dass die posttraumatische Ausdehnung des Auftretens von Mikrothromben für die hämodynamische Krise und dem daraus resultierenden sekundären Gewebsschaden verantwortlich ist und der Plättchen-aktivierende-Faktor eine wichtige Rolle dabei spielt (Maeda et al., 1997). Stein et al. berichteten von neuroprotektiven Effekten des Erythrozyten-gebundenen, gewebsspezifischen Plasminogen-Aktivators, mit dem sie bei Ratten nach Fluid-Percussion-Injury die Größe der hervorgerufenen Läsion und des hippocampalen Zellverlusts signifikant vermindern konnten. Jedoch konnten sie diese nicht eindeutig auf dessen thrombolytische Eigenschaften zurückführen oder die Mechanismen benennen, wie dieser Befund zustande kommt (Stein et al., 2009). Auch Enoxaparin, ein niedermolekulares Heparin, zeigte neuroprotektive Effekte. So ließen sich nach Fluid-Percussion-Injury bei Ratten das Hirnödem und das Kontusionsvolumen reduzieren, sowie das funktionelle Outcome verbessern. Doch auch hier konnten die Autoren diese Befunde nicht eindeutig auf die antikoagulatorischen Eigenschaften des Medikaments zurückführen, da es daneben auch andere Effekte hat (Wahl et al., 2000). Ein weiteres interessantes Phänomen sind Berichte über die Wirkung von Prostacyclin nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma. So berichteten beispielsweise Bentzer et al. nach Fluid Percussion Injury bei Ratten von einer verbesserten kortikalen Perfusion (Bentzer et al., 2003) und einer Verkleinerung des Kontusionsvolumens (Bentzer et al., 2001) bei Anwendung von Prostacyclin. Da die Hemmung der Aggregation und Adhäsion von Thrombozyten jedoch nicht der einzige Effekt von Prostacyclin ist (Bentzer et al., 2003; Bentzer et al., 2001), müssen diese

Befunde nicht unbedingt das Resultat verminderter Mikrothrombenbildung sein. Ähnlich verhält es sich mit dem Plättchen-aktivierenden-Faktor, dessen Effekt der Aktivierung der Thrombozytenaggregation lediglich einer neben zahlreichen anderen ist (Maeda et al., 1997), so dass der Effekt seines Antagonisten Etizolam, nicht eindeutig auf eine verminderte Mikrothrombenbildung zurückzuführen ist. Auch Atorvastatin hat viele verschiedene Auswirkungen auf die Parameter der Hämostase (Lu et al., 2004b), sowie zahlreiche andere Effekte (Lu et al., 2004c; Lu et al., 2004a). Angesichts dieses Aspektes deutet die von uns unter Tirofiban beobachtete, veränderte Dynamik der posttraumatischen Aggregatbildung zwar auf eine relevante Beteiligung von Thrombozyten hin, doch erlaubt sie keine eindeutigen Aussagen über die pathophysiologische Relevanz der Blutgerinnung für die posttraumatische Mikrozirkulation, da bedeutsame Beeinträchtigungen der Durchblutung in unseren Experimenten kaum zu beobachten waren und wir die von Schwarzmaier et al beobachteten Beeinträchtigungen der zerebralen Durchblutung nicht in ähnlichem Ausmaß reproduzieren konnten (Schwarzmaier et al., 2010). Von besonderem Interesse wäre hierbei gewesen, inwieweit Tirofiban es vermag, diese positiv zu beeinflussen oder gar zu unterbinden. Im Gegensatz zu den geschilderten Experimenten von Schwarzmaier et al (Schwarzmaier et al., 2010) und der vorliegenden Arbeit wurde in keiner der vorgenannten Studien die posttraumatische zerebrale Mikrozirkulation *in vivo* beobachtet. Zudem liefert die vorliegende Arbeit mit dem Konzept der Aggregatlast ein Maß zur Graduierung der Aggregate und erlaubt damit mehr als dichotome Aussagen über deren Auftreten oder Ausbleiben. Zwar formulierten Stein et al mit dem Ausdruck „Microclot burden“ bereits einen ähnlichen Begriff zur Beschreibung der Belastung durch Aggregate, doch quantifiziert dieses hingegen als histologisches Dichtemaß die Anzahl von Mikrothromben pro Fläche und lässt damit deren Größe unberücksichtigt (Stein et al., 2002; Stein et al., 2009). Gleichwohl ist die pathophysiologische Relevanz einer hohen Aggregatlast für die zerebrale Durchblutung nicht eindeutig, denn sie erlaubt keine Aussage über das Ausmaß der okkludierenden Durchmesserreduktion und Beeinträchtigung der Durchblutung oder Verschlussgefahr. Auch über das Ausmaß der Permeabilitätseinschränkung sagt sie wenig aus, da sich adhärierende Aggregate stets in drei Dimensionen ausbreiten können. So kann eine hohe Aggregatlast durch ein sehr großes oder viele kleinere nicht okklusive Aggregate verursacht sein. Das Große kann sich entweder entlang der Gefäßwand ausbreiten und dadurch die

Permeabilität beeinträchtigen oder in Richtung des Gefäßlumens und den Durchmesser reduzieren, wodurch die Durchgängigkeit und damit die Durchblutung beeinträchtigt wird. Die Aussagekraft der Aggregatlast hat somit ein eingeschränktes Ausmaß.

Den zuvor geschilderten Studien über neuroprotektive Effekte nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma durch Präparate mit gerinnungshemmenden Eigenschaften stehen die unerwünschten Wirkungen solcher Medikamente gegenüber. So stellten die Autoren einer Übersichtsarbeit zur Morbidität und Mortalität eines Schädel-Hirn-Traumas bei Patienten unter antithrombotischer Therapie fest, dass das Risiko intrakranieller Blutungen erhöht ist. Dieser Bericht bezog sich jedoch vornehmlich auf Aspirin, Clopidogrel, Warfarin und Heparine (McMillian and Rogers, 2009), und gibt folglich kein Risikoprofil für die meisten der vorgenannten neuroprotektiven Präparate oder gar Tirofiban ab. Außerdem haben nicht alle Medikamente den gleichen Wirkmechanismus und unterscheiden sich teilweise in ihrer gerinnungshemmenden Potenz. Die Gefahr von Blutungen ist jedoch ein Aspekt, der prinzipiell bei der Anwendung gerinnungshemmender Medikamente in Betracht zu ziehen ist. In der vorliegenden Arbeit wurden keine gesonderten Untersuchungen zu Häufigkeit oder Ausmaß intrakranieller Blutungen nach dem Trauma durchgeführt, so dass hierzu an dieser Stelle keine Aussage möglich ist. Tirofiban diente in der vorliegenden Arbeit in erster Linie als experimentelles Werkzeug, mit dem bestimmte Aspekte der Pathophysiologie eines Schädel-Hirn-Traumas beleuchtet werden sollten, anstatt es als therapeutische Option in den Fokus zu rücken.

4.2.3 Nekrosevolumen

Zweckberger et al konnten mit dem Modell des Controlled Cortical Impact wichtige Erkenntnisse über die Morphologie und Dynamik des primären und sekundären Hirnschadens gewinnen. Dabei stellten sie fest, dass der 15 Minuten nach dem Trauma ermittelte, primäre Hirnschaden eine Kontusion aufweist, in der keine Perfusion mehr stattfindet und sich massive Blutungen finden und in deren Kern nahezu alle zellulären Elemente zerstört sind. Nach 24 Stunden hatte sich diese Kontusion weit in den lateralen Kortex ausgedehnt, jedoch ohne Anzeichen von Blutungen oder mechanischer Gewebezerstörung. Die Größenzunahme, also das Nekrosewachstum betrug dabei etwas mehr als 60%. Daraufhin setzt der Abbau von

abgestorbenem Gewebe ein, der in einer Größenabnahme der Kontusion im weiteren Verlauf nach einigen Tagen resultiert (Zweckberger et al., 2006).

Auch in den Experimenten zum Nekrosewachstum nach posttraumatischer Tirofibangabe war in der Kontrollgruppe eine Zunahme des Nekrosevolumens um etwas mehr als 60% innerhalb der ersten 24 Stunden nach Controlled Cortical Impact zu beobachten. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen posttraumatischer Mikrothrombosierung und dem Nekrosewachstum zu beleuchten, untersuchten wir, ob sich dieses durch Tirofiban beeinflussen lässt und variierten zusätzlich den Applikationszeitpunkt von Tirofiban beziehungsweise dem Vehikel. Dabei konnten wir zwar bei einer Gabe von Tirofiban zehn Minuten nach Controlled Cortical Impact ein etwas niedrigeres sekundäres Nekrosevolumen feststellen, doch hatte dies keine statistische Signifikanz. Dieses Zeitfenster überschneidet sich teilweise mit dem Infusionszeitraum in den intravitalmikroskopischen Experimenten, in denen sich die Dynamik der adhärierenden Aggregate beeinflussen ließ. Die Infusion eines Tirofibolanbolus zu späteren Zeitpunkten oder vor dem Schädel-Hirn-Trauma hatte keinen nennenswerten Einfluss auf das posttraumatische Nekrosevolumen.

4.2.4 Hirnödem und intrakranieller Druck

Die Summe der Volumina von Gehirn, Liquor cerebrospinalis und intrakraniellem Blut bleibt konstant, indem die Zunahme eines Teilvolumens die Abnahme eines oder beider anderen bedingt (Mokri, 2001). Ist dieser Kompensationsmechanismus erschöpft, kommt es aufgrund der fehlenden Dehnbarkeit des knöchernen Schädelknochens zu einem exponentiellen Anstieg des intrakraniellen Druckes (ICP), was die zerebrale Durchblutung beeinträchtigen und eine zerebrale Ischämie verursachen kann (Smith, 2008). Aktuelle Übersichtsarbeiten zum Thema nannten als Mechanismen, die nach einem Schädel-Hirn-Trauma zu Veränderungen im intrakraniellen Volumen und folglich zu einem posttraumatischen Anstieg des intrakraniellen Druckes führen können, intrakranielle Blutungen, Hirnödem, Zunahme des zerebralen Blutvolumens (Padayachy et al., 2010), traumatisch bedingte, intrakranielle Raumforderungen sowie Kontusionen (Smith, 2008) und verwiesen auf Berichte von Marmarou et al., die Hinweise finden konnten, dass die posttraumatische Schwellung des Gehirns hauptsächlich durch das Hirnödem und nicht durch eine Zunahme des zerebralen Blutvolumens verursacht wird (Marmarou

et al., 2000; Marmarou et al., 1997). Der intrakranielle Druck und sein Verlauf nach einem Schädel-Hirn-Trauma haben große prognostische Bedeutung für das neurologische Outcome (Treggiani et al., 2007). Er ist ein Zielparameter zahlreicher Behandlungsalgorithmen und ermöglicht zusammen mit dem mittleren arteriellen Blutdruck (MAP) die Berechnung des zerebralen Perfusionsdruckes (CPP), welcher ebenfalls häufig als therapeutisches Ziel nach einem Schädel-Hirn-Trauma dient ($CPP = MAP - ICP$) (Steiner and Andrews, 2006) und meist stellvertretend für Messungen der zerebralen Durchblutung verwendet wird (White and Venkatesh, 2008). Ein ungenügender zerebraler Perfusionsdruck beeinträchtigt die zerebrale Durchblutung, sowie die Geweboxygenierung und führt zur Entwicklung des Hirnödems, wodurch es zur strukturellen und funktionellen Gewebsschädigung und somit zu einer ungünstigen neurologischen Prognose kommt (Unterberg et al., 2004). Murr et al fassten die Beziehung zwischen Störungen der zerebralen Durchblutung und der Ausbildung eines Hirnödems als sich wechselseitig begünstigend zusammen, indem das Hirnödem die Aufrechterhaltung der zerebralen Durchblutung beeinträchtigt und umgekehrt eine gestörte Durchblutung zum Hirnödem führt (Murr et al., 1993).

Aus früheren Studien unserer Arbeitsgruppe von Zweckberger et al zum posttraumatischen Zeitverlauf des intrakraniellen Druckes wissen wir, dass dieser bei nicht traumatisierten, anästhesierten Mäusen $1,3 \pm 1,2$ mmHg beträgt und unmittelbar nach Controlled Cortical Impact beginnt, anzusteigen. Nach sechs Stunden erreicht er seinen Höhepunkt bei $23,7 \pm 3,1$ mmHg und fällt daraufhin wieder ab, während er jedoch auch nach 48 Stunden mit $7,0 \pm 0,1$ mmHg noch signifikant erhöht ist (Zweckberger et al., 2003). Die Messungen für die vorliegende Arbeit erfolgten 24 Stunden nach dem Trauma an den Tieren, bei denen das Nekrosewachstum nach posttraumatischer Tirofibangabe untersucht wurde. Dabei fanden wir im Vergleich zur Kontrollgruppe etwas niedrigere Werte für den intrakraniellen Druck, wenn Tirofiban zehn Minuten, eine oder drei Stunden nach dem Trauma verabreicht wurde. Bei einer Gabe von Tirofiban sechs Stunden nach dem Trauma war er wieder nahezu so hoch wie in der Kontrollgruppe. Insgesamt ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen, jedoch nicht zwischen den beiden zahlenmäßig am weitesten auseinander liegenden Gruppen der Tirofibangabe nach einer Stunde und der Kontrollgruppe.

Das Hirnödem nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma mittels Controlled Cortical Impact entwickelt sich vornehmlich in den ersten sechs Stunden und erreicht sein Maximum nach 24 Stunden, woraufhin die Rückbildung einsetzt (Zweckberger et al., 2006). Aus diesem Grund wurden in den Experimenten der vorliegenden Arbeit die Gehirne 24 Stunden nach dem Trauma entnommen, um den Hirnwassergehalt zu bestimmen. Dabei zeigte sich, dass der posttraumatische Hirnwassergehalt bei Tieren, die Tirofiban erhielten, tendenziell etwas höher war als bei denen der Kontrollgruppe. Teilweise ergab sich dafür eine statistische Signifikanz. Interessant sind in diesem Kontext die Befunde von Segawa und Patterson, die bei Katzen nach lokaler Kälteläsion des Gehirns intravaskuläre, zerebrale Thromben beobachten konnten und durch Injektion einer Pyrimidopyrimidinverbindung, welche die Thrombozytenaggregation hemmt und die Adhäsion vermindert, ein signifikant stärkeres Hirnödem neben einer signifikanten Verbesserung der zerebralen Perfusion verzeichneten. Sie schlussfolgerten, dass Thrombozyten eine Abdichtungsfunktion in den nach Trauma verstärkt durchlässigen zerebralen Gefäßen haben und eine Rolle in der Wiederherstellung der Blut-Hirn-Schranke spielen und so das Ausbreiten des Austritts von Ödemflüssigkeit eindämmen, jedoch auch die Mikrozirkulation beeinträchtigen (Segawa and Patterson, 1981). Segawa und Patterson machten in ihrem Bericht allerdings keine Angaben über Messungen des intrakraniellen Druckes (Segawa and Patterson, 1981). Einen weiteren, in diesem Zusammenhang interessanten Aspekt erwähnten Donkin und Vink, laut denen das zytotoxische Hirnödem nicht zu einer Zunahme des Hirnwassergehalts oder einer Schwellung des Gehirns führt und es daher nicht zu einem Anstieg des intrakraniellen Druckes kommt, da es sich lediglich um eine Kompartimentverschiebung von Wasser im Schädel handele, bei der Wasser vom extrazellulären in den intrazellulären Bereich verschoben wird (Donkin and Vink, 2010). Sie bezogen sich dabei auf ein von Simard et al beschriebenes Experiment, in dem die Exzision eines Gewebestückes aus vitalem Gehirn die Zellen darin absterben lässt und Verschiebungen von Wasser- und Ionengehalt zwischen intra- und extrazellulären Bereichen zu erkennen sind, die charakteristisch für das zytotoxische Hirnödem sind. Dabei kommt es jedoch weder zu einer Schwellung oder Gewichtszunahme des Gewebes, noch lassen sich Kennzeichen eines ionischen oder vasogenen Ödems oder einer hämorrhagischen Konversion erkennen, da keine Durchblutung vorhanden ist, die zusätzliches Wasser, Ionen oder Blut liefern könnte,

um eine Schwellung des Gewebes zu verursachen (Simard et al., 2007). Bezogen auf das Schädel-Hirn-Trauma ermöglicht die dort typischerweise zu beobachtende offene Blut-Hirn-Schranke die Entstehung des vasogenen Hirnödems, bei dem es aufgrund eines Austritts vaskulärer Komponenten ins Hirnparenchym zur Ausbildung eines osmotischen Gradienten kommt, der eine Verschiebung von Wasser aus den Gefäßen in den Extrazellulärraum nach sich zieht, die zu einer Zunahme des Hirnwassergehalts, Gewebsschwellung und letztlich zu einem Anstieg des intrakraniellen Druckes führt (Donkin and Vink, 2010). Folgt man dieser Hypothese, dass ein intrakranieller Druckanstieg nur durch die vasogene, nicht aber die zytotoxische Hirnödemkomponente vermittelt wird, könnte man zunächst annehmen, dass die in unseren Experimenten unter Tirofiban teilweise etwas niedrigeren Werte des intrakraniellen Druckes durch eine Verminderung des vasogenen Ödems durch Tirofiban und das vornehmliche Auftreten eines zytotoxischen Ödems zu erklären sind. Allerdings fanden wir unter Tirofiban keinen verminderten, sondern mindestens ebenso hohen posttraumatischen Hirnwassergehalt wie bei Gabe des Vehikels, tendenziell war er sogar etwas höher, teilweise signifikant. Ein Phänomen, das jedoch nach oben beschriebener Theorie durch ein zytotoxisches Ödem allein nicht zu erklären ist. Daher ist es als wahrscheinlich zu erachten, dass in unseren Experimenten eine vasogene Hirnödemkomponente beteiligt war. Man hätte sogar einen bedeutend höheren Wassergehalt unter Tirofiban zu erwarten gehabt, wenn man sich die Schlussfolgerungen von Segawa und Patterson vergegenwärtigt, die nach Kältelesion ein stärkeres Ödem beobachteten, wenn eine Substanz mit antiaggregatorischer Wirkung verabreicht wurde, von der sie annahmen, dass sie die Aggregate auflöste, welche die nach dem Trauma verstärkt durchlässige Blut-Hirn-Schranke abdichteten. Dabei bezogen sie sich auf Berichte, wonach das von ihnen verwendete Traumamodell der Kältelesion ein vasogenes Hirnödem verursacht (Segawa and Patterson, 1981). Wir konnten zwar unter Tirofiban nur teilweise ein statistisch signifikant stärkeres Hirnödem finden, jedoch waren die übrigen Werte nicht niedriger, sondern zumindest tendenziell etwas höher als bei Gabe des Vehikels. Ein anderer in diesem Kontext interessanter Aspekt wurde von Marmarou angesprochen, laut dem das Fluid-Percussion-Modell oder der direkte Dura-Aufschlag nicht für die Erforschung des Hirnödems, wie es beim geschlossenen Schädel-Hirn-Trauma entsteht, geeignet sind, da sie einen plötzlichen Blutdruckanstieg hervorrufen, durch den die Blut-Hirn-Schranke durchbrochen

werden kann und der intrakranielle Druck nur vorübergehend ansteigt und mit der Zeit wieder abfällt (Marmarou, 2004). Ein interessanter Gesichtspunkt, wenn man bedenkt, dass auch wir einen posttraumatischen Anstieg des mittleren arteriellen Blutdruckes beobachteten, und unter Tirofiban über den gesamten Zeitverlauf tendenziell etwas höhere Werte vorfanden. Möglicherweise besteht darin ein Zusammenhang zu dem unter Tirofiban ebenfalls teilweise erhöhten zerebralen Wassergehalt. Allerdings waren unter Tirofiban die Blutdruckwerte lediglich minimal höher und nicht statistisch signifikant und auch der zerebrale Wassergehalt war nur teilweise signifikant erhöht. Ferner sind uns auch keine Berichte über eine blutdrucksteigernde Wirkung von Tirofiban bekannt.

Marmarou et al lieferten Befunde, die sie davon ausgehen ließen, dass die nach einem Schädel-Hirn-Trauma beim Menschen für die Schwellung des Gehirns und den intrakraniellen Druckanstieg verantwortliche und vorherrschende Form des Hirnödems zellulärer Natur ist (Marmarou et al., 2006). Donkin und Vink beriefen sich in der Frage nach der bei einem Schädel-Hirn-Trauma vorherrschenden Form des Hirnödems auf experimentelle Modelle, wonach das posttraumatische Hirnödem eine vasogene und eine zytotoxische Komponente aufweist, die in einem biphasischen Verlauf zutage treten. Demnach entwickelt sich das vasogene Hirnödem in den ersten Stunden nach dem Trauma, gefolgt vom zytotoxischen Hirnödem, welches sich etwas langsamer über die nächsten Tage entwickelt und bis zu zwei Wochen bestehen bleibt. Die Blut-Hirn-Schranke hat dabei ihre maximale Permeabilität in den ersten Stunden nach dem Trauma, so dass große Plasmaproteine nur in dieser Zeit hindurch treten können und schließt sich dann graduell über die nächsten sieben Tage hinweg, so dass noch einige Zeit Durchlässigkeit für kleinere Komponenten besteht (Donkin and Vink, 2010).

Abschließend lässt sich an dieser Stelle nicht endgültig klären, wie der unter Tirofiban teilweise etwas niedrigere intrakranielle Druck bei zum Teil signifikant erhöhtem zerebralen Wassergehalt zustande kam. Unklar bleibt außerdem, wie die in den ersten zwei Stunden nach dem Trauma beobachtete, stetig zunehmende Vasodilatation der Venen mit dem sich entwickelnden Ödem in Einklang zu bringen ist, da letzteres einen Kompressionseffekt auf die zerebralen Gefäße haben müsste. Möglicherweise lässt sich der tendenziell erhöhte zerebrale Wassergehalt zumindest teilweise durch eine Zunahme des intravasalen Volumens erklären. Dafür sprächen

zumindest die nach Trauma größeren Gefäßdurchmesser. Letztendlich wären weitere Studien notwendig, um diese Fragestellungen weiter zu vertiefen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Pathophysiologie des Schädel-Hirn-Traumas folgt einer zweistufigen zeitlichen Dynamik. Im Moment des Traumas entsteht durch die bloße mechanische Schädigung des Hirnparenchyms der primäre Hirnschaden. Gleichzeitig werden sekundäre Mechanismen in Gang gesetzt, die mit einer zeitlichen Verzögerung zum nicht-mechanischen, sekundären Hirnschaden führen. Man geht davon aus, dass die therapeutische Beeinflussung dieser Mechanismen eine Ausdehnung des Hirnschadens verhindern könnte. Als einer dieser Mechanismen wird häufig eine Verminderung der zerebralen Durchblutung angenommen, die zu einer Ischämie des Hirngewebes führt. Da es zahlreiche Berichte über Beobachtungen intravaskulärer, zerebraler Aggregate und Mikrothromben infolge experimenteller oder klinischer Schädel-Hirn-Traumata gibt, wird vermutet, dass ein Zusammenhang zwischen beiden besteht. Dieser konnte auch in früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe hergestellt werden.

Um diesen Aspekt eingehend zu untersuchen, führten wir eine Reihe von Experimenten durch, in denen wir Mäuse einem experimentellen Schädel-Hirn-Trauma mittels Controlled Cortical Impact unterzogen und den Einfluss des antiaggregatorisch wirkenden Glykoprotein IIb/IIIa-Antagonisten Tirofiban auf verschiedene Parameter der Pathophysiologie des Schädel-Hirn-Traumas untersuchten. Hierzu visualisierten wir mit Hilfe der intravitalem Fluoreszenzmikroskopie zunächst die posttraumatische Dynamik der Thrombozyten-Endothel-Interaktion und der Entstehung adhäsierender Aggregate in der zerebralen Mikrozirkulation und überwachten dabei zahlreiche physiologische Parameter. Um eine mögliche Relevanz von Mikrothromben für die Entwicklung des sekundären Hirnschadens zu beleuchten, führten wir weitere Versuche durch, in denen wir den Einfluss der medikamentösen Thrombozytenaggregationshemmung mittels Tirofiban auf die räumliche Ausbreitung der traumatisch hervorgerufenen zerebralen Kontusion, den intrakraniellen Druck und den zerebralen Wassergehalt, ein Maß für das Hirnödem, untersuchten.

Dabei konnten wir beobachten, dass in Venen die Thrombozyten-Endothel-Interaktion infolge eines Controlled Cortical Impact-Traumas überwiegend eine

Tendenz zur Zunahme zeigte, die jedoch größtenteils nicht statistisch signifikant war. Lediglich für Rhodamin-gefärbte, rollende Thrombozyten ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Zeitpunkten. Unter Tirofiban fand sich in der Frühphase nach Trauma eine im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant größere Anzahl CFDA-markierter, rollender Thrombozyten, die jedoch im Zeitverlauf abnahm. Die Aggregatlast, also die Summe der in einem Gefäß vorgefundenen Aggregatgrößen nahm nach dem Trauma zu und ließ sich, ebenso wie die Anzahl adhärierender Aggregate durch Tirofiban teilweise signifikant reduzieren. In Arterien fanden sich keine nennenswerten Befunde zur Thrombozyten-Endothel-Interaktion oder zur Dynamik der Aggregatbildung. Ein möglicher Zusammenhang zwischen Mikrothromben und einer Verminderung der zerebralen Durchblutung konnte in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden, denn es waren insgesamt kaum nennenswerte Beeinträchtigungen der Durchblutung in den beobachteten Gefäßen zu registrieren.

In den Blutgasanalysen am Versuchsende zeigten sich Hinweise auf eine metabolische Azidose. Der mittlere arterielle Blutdruck war während des posttraumatischen Beobachtungszeitraums erhöht, mit einem transienten Höhepunkt während der Initialphase nach dem Trauma. Die Durchmesser der beobachteten Blutgefäße zeigten infolge des Traumas eine Vasodilatation, in den Arteriolen mit einer leichten zeitlichen Verzögerung.

Der posttraumatische intrakranielle Druck war unter Tirofiban teilweise etwas niedriger. Das sekundäre Wachstum der durch das Trauma hervorgerufenen Kontusionsnekrose war durch Tirofiban nicht signifikant beeinflussbar, wenn auch die Infusion unmittelbar nach Trauma zu einem etwas niedrigeren Wert führte. Der posttraumatische zerebrale Wassergehalt war unter Tirofiban teilweise signifikant erhöht.

Bei der Anwendung gerinnungshemmender Medikamente ist prinzipiell die Gefahr intrakranieller Blutungen in Betracht zu ziehen, insbesondere im Rahmen eines Schädel-Hirn-Traumas. Wir haben in unseren Experimenten kein gesondertes Augenmerk auf Häufigkeit oder Ausmaß möglicherweise auftretender intrakranieller Blutungen gerichtet, so dass hierzu an dieser Stelle keine Aussage möglich ist. Tirofiban diente uns in erster Linie als experimentelles Werkzeug, mit dem bestimmte Aspekte der Pathophysiologie eines Schädel-Hirn-Traumas beleuchtet werden sollten, anstatt es als therapeutische Option in Erwägung zu ziehen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

ALESSANDRI B, HEIMANN A, FILIPPI R, KOPACZ L, KEMPSKI O (2003). Moderate controlled cortical contusion in pigs: effects on multi-parametric neuromonitoring and clinical relevance. *J. Neurotrauma*, **20**: 1293-1305.

ALMEDA FQ, SCHAER GL (2004). Noncardiac applications of glycoprotein IIb/IIIa inhibitors. *Catheter. Cardiovasc. Interv.*, **62**: 530-538.

ALTENBURG A, HAAGE P (2011). Antiplatelet and Anticoagulant Drugs in Interventional Radiology. *Cardiovasc. Intervent. Radiol.*.

ARMIN SS, COLOHAN AR, ZHANG JH (2008). Vasospasm in traumatic brain injury. *Acta Neurochir. Suppl.*, **104**: 421-425.

ARMSTEAD WM (1995). Relationship between opioids and activation of phospholipase C and protein kinase C in brain injury induced pial artery vasoconstriction. *Brain Res.*, **689**: 183-188.

ARMSTEAD WM, KURTH CD (1994). Different cerebral hemodynamic responses following fluid percussion brain injury in the newborn and juvenile pig. *J. Neurotrauma*, **11**: 487-497.

AUER L (1978). Disturbances of the coagulatory system in patients with severe cerebral trauma. I. *Acta Neurochir. (Wien.)*, **43**: 51-59.

AUER LM, OTT E (1979). Disturbances of the coagulatory system in patients with severe cerebral trauma II. Platelet function. *Acta Neurochir. (Wien.)*, **49**: 219-226.

BAETHMANN A, WIRTH A, SCHLESINGER-RAAB A (2002). Prospective system analysis of the pre- and early hospital care in severe head injury in Bavaria at a population-based level. *Eur. Surg. Res.*, **34**: 42-46.

BAGAMERY K, KVELL K, LANDAU R, GRAHAM J (2005). Flow cytometric analysis of CD41-labeled platelets isolated by the rapid, one-step OptiPrep method from human blood. *Cytometry A*, **65**: 84-87.

BENTZER P, MATTIASSEN G, MCINTOSH TK, WIELOCH T, GRANDE PO (2001). Infusion of prostacyclin following experimental brain injury in the rat reduces cortical lesion volume. *J. Neurotrauma*, **18**: 275-285.

BENTZER P, VENTUROLI D, CARLSSON O, GRANDE PO (2003). Low-dose prostacyclin improves cortical perfusion following experimental brain injury in the rat. *J. Neurotrauma*, **20**: 447-461.

BERKOWITZ SD (2000). Current knowledge of the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonists for the treatment of coronary artery disease. *Haemostasis*, **30 Suppl 3**: 27-43.

BOERSMA E, HARRINGTON RA, MOLITERNO DJ, WHITE H, THEROUX P, VAN DE WF, et al. (2002). Platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors in acute coronary syndromes: a meta-analysis of all major randomised clinical trials. *Lancet*, **359**: 189-198.

BOMBELI T, SCHWARTZ BR, HARLAN JM (1998). Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), alphavbeta3 integrin, and GPIbalpha. *J. Exp. Med.*, **187**: 329-339.

BRASS LF (2003). Thrombin and platelet activation. *Chest*, **124**: 18S-25S.

BRUENING R, MUELLER-SCHUNK S, MORHARD D, SEELOS KC, BRUECKMANN H, SCHMID-ELSAESSER R, et al. (2006). Intraprocedural thrombus formation during coil placement in ruptured intracranial aneurysms: treatment with systemic application of the glycoprotein IIb/IIIa antagonist tirofiban. *AJNR Am. J. Neuroradiol.*, **27**: 1326-1331.

BRYAN RM, JR., CHERIAN L, ROBERTSON C (1995). Regional cerebral blood flow after controlled cortical impact injury in rats. *Anesth. Analg.*, **80**: 687-695.

BUNDESANSTALT FÜR ARBEITSSCHUTZ UND ARBEITSMEDIZIN (BAUA) (2009). *Unfallstatistik - Unfalltote und Unfallverletzte 2009 in Deutschland* Dortmund.

CERNAK I (2005). Animal models of head trauma. *NeuroRx.*, **2**: 410-422.

CHOUDHRI TF, HOH BL, ZERWES HG, PRESTIGIACOMO CJ, KIM SC, CONNOLLY ES, JR., et al. (1998). Reduced microvascular thrombosis and improved outcome in acute murine stroke by inhibiting GP IIb/IIIa receptor-mediated platelet aggregation. *J. Clin. Invest.*, **102**: 1301-1310.

CHUN R, ORSER BA, MADAN M (2002). Platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors: overview and implications for the anesthesiologist. *Anesth. Analg.*, **95**: 879-888.

CICCONE A, ABRAHA I, SANTILLI I (2007). Glycoprotein IIb-IIIa Inhibitors for Acute Ischemic Stroke. *Stroke*, **38**: 1113-1114.

COLLER BS (1997). Platelet GPIIb/IIIa antagonists: the first anti-integrin receptor therapeutics. *J. Clin. Invest.*, **99**: 1467-1471.

COLLER BS (2001). Anti-GPIIb/IIIa drugs: current strategies and future directions. *Thromb. Haemost.*, **86**: 427-443.

CORONADO VG, XU L, BASAVARAJU SV, MCGUIRE LC, WALD MM, FAUL MD, et al. (2011). Surveillance for traumatic brain injury-related deaths--United States, 1997-2007. *MMWR Surveill Summ.*, **60**: 1-32.

DAVI G, PATRONO C (2007). Platelet activation and atherothrombosis. *N. Engl. J. Med.*, **357**: 2482-2494.

DE LUCA G (2011). Glycoprotein IIb-IIIa Inhibitors. *Cardiovasc. Ther..*

DEWITT DS, PROUGH DS (2003). Traumatic cerebral vascular injury: the effects of concussive brain injury on the cerebral vasculature. *J. Neurotrauma*, **20**: 795-825.

DIETRICH WD, ALONSO O, BUSTO R, PRADO R, DEWANJEE S, DEWANJEE MK, et al. (1996). Widespread hemodynamic depression and focal platelet accumulation after fluid percussion brain injury: a double-label autoradiographic study in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **16**: 481-489.

DIETRICH WD, ALONSO O, BUSTO R, PRADO R, ZHAO W, DEWANJEE MK, et al. (1998). Posttraumatic cerebral ischemia after fluid percussion brain injury: an autoradiographic and histopathological study in rats. *Neurosurgery*, **43**: 585-593.

DIRNAGL U, NIWA K, SIXT G, VILLRINGER A (1994). Cortical hypoperfusion after global forebrain ischemia in rats is not caused by microvascular leukocyte plugging. *Stroke*, **25**: 1028-1038.

DIXON CE, CLIFTON GL, LIGHTHALL JW, YAGHMAI AA, HAYES RL (1991). A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat. *J. Neurosci. Methods*, **39**: 253-262.

DONKIN JJ, VINK R (2010). Mechanisms of cerebral edema in traumatic brain injury: therapeutic developments. *Curr. Opin. Neurol.*, **23**: 293-299.

ENGEL DC, MIES G, TERPOLILLI NA, TRABOLD R, LOCH A, DE ZEEUW CI, et al. (2008). Changes of cerebral blood flow during the secondary expansion of a cortical contusion assessed by ¹⁴C-iodoantipyrine autoradiography in mice using a non-invasive protocol. *J. Neurotrauma*, **25**: 739-753.

FAUL M, XU L, WALD MM, CORONADO VG (2010). *Traumatic Brain Injury in the United States: Emergency Department Visits, Hospitalizations and Deaths 2002–2006*. Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Injury Prevention and Control: Atlanta (GA).

FEENEY DM, BOYESON MG, LINN RT, MURRAY HM, DAIL WG (1981). Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat. *Brain Res.*, **211**: 67-77.

FIRSCHING R, WOISCHNECK D (2001). Present status of neurosurgical trauma in Germany. *World J. Surg.*, **25**: 1221-1223.

FURIE B, FURIE BC (2008). Mechanisms of thrombus formation. *N. Engl. J. Med.*, **359**: 938-949.

FURIE B, FURIE BC (1992). Molecular and cellular biology of blood coagulation. *N. Engl. J. Med.*, **326**: 800-806.

GAETZ M (2004). The neurophysiology of brain injury. *Clin. Neurophysiol.*, **115**: 4-18.

GENNARELLI TA (1993). Mechanisms of brain injury. *J. Emerg. Med.*, **11 Suppl 1**: 5-11.

GENNARELLI TA, GRAHAM DI (1998). Neuropathology of the Head Injuries. *Semin. Clin. Neuropsychiatry*, **3**: 160-175.

GERLACH R, KRAUSE M, SEIFERT V, GOERLINGER K (2009). Hemostatic and hemorrhagic problems in neurosurgical patients. *Acta Neurochir. (Wien.)*, **151**: 873-900.

GOLDING EM (2002). Sequelae following traumatic brain injury. The cerebrovascular perspective. *Brain Res. Brain Res. Rev.*, **38**: 377-388.

GOLDING EM, ROBERTSON CS, BRYAN RM, JR. (1999). The consequences of traumatic brain injury on cerebral blood flow and autoregulation: a review. *Clin. Exp. Hypertens.*, **21**: 299-332.

GOODNIGHT SH, KENOYER G, RAPAPORT SI, PATCH MJ, LEE JA, KURZE T (1974). Defibrillation after brain-tissue destruction: A serious complication of head injury. *N. Engl. J. Med.*, **290**: 1043-1047.

GOWDA RM, KHAN IA, VASAVADA BC, SACCHI TJ (2004). Therapeutics of platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonism. *Am. J. Ther.*, **11**: 302-307.

GRAHAM DI, ADAMS JH, DOYLE D (1978). Ischaemic brain damage in fatal non-missile head injuries. *J. Neurol. Sci.*, **39**: 213-234.

GRAHAM DI, FORD I, ADAMS JH, DOYLE D, TEASDALE GM, LAWRENCE AE, et al. (1989). Ischaemic brain damage is still common in fatal non-missile head injury. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **52**: 346-350.

GREVE MW, ZINK BJ (2009). Pathophysiology of traumatic brain injury. *Mt. Sinai J. Med.*, **76**: 97-104.

GRUNER S, PROSTREDNA M, SCHULTE V, KRIEG T, ECKES B, BRAKEBUSCH C, et al. (2003). Multiple integrin-ligand interactions synergize in shear-resistant platelet adhesion at sites of arterial injury in vivo. *Blood*, **102**: 4021-4027.

HARHANGI BS, KOMPANJE EJ, LEEBEEK FW, MAAS AI (2008). Coagulation disorders after traumatic brain injury. *Acta Neurochir. (Wien.)*, **150**: 165-175.

HEITZER T, OLLMANN I, KOKE K, MEINERTZ T, MUNZEL T (2003). Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade improves vascular nitric oxide bioavailability in patients with coronary artery disease. *Circulation*, **108**: 536-541.

HEKMATPANA J, HEKMATPANA CR (1985). Microvascular alterations following cerebral contusion in rats. Light, scanning, and electron microscope study. *J. Neurosurg.*, **62**: 888-897.

HUBER A, DORN A, WITZMANN A, CERVOS-NAVARRO J (1993). Microthrombi formation after severe head trauma. *Int. J. Legal Med.*, **106**: 152-155.

JACKSON SP (2007). The growing complexity of platelet aggregation. *Blood*, **109**: 5087-5095.

JACKSON SP, NESBITT WS, WESTEIN E (2009). Dynamics of platelet thrombus formation. *J. Thromb. Haemost.*, **7 Suppl 1**: 17-20.

JENNETT B (1998). Epidemiology of head injury. *Arch. Dis. Child*, **78**: 403-406.

JENNINGS LK (2009). Mechanisms of platelet activation: need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis. *Thromb. Haemost.*, **102**: 248-257.

JOHNSON LV, WALSH ML, BOCKUS BJ, CHEN LB (1981). Monitoring of relative mitochondrial membrane potential in living cells by fluorescence microscopy. *J. Cell Biol.*, **88**: 526-535.

KANG HS, KWON BJ, ROH HG, YOON SW, CHANG HW, KIM JE, et al. (2008). Intra-arterial tirofiban infusion for thromboembolism during endovascular treatment of intracranial aneurysms. *Neurosurgery*, **63**: 230-237.

KATAOKA H, KIM SW, PLESNILA N (2004). Leukocyte-endothelium interactions during permanent focal cerebral ischemia in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **24**: 668-676.

KAUFMAN HH, HUI KS, MATTSON JC, BORIT A, CHILDS TL, HOOTS WK, et al. (1984). Clinicopathological correlations of disseminated intravascular coagulation in patients with head injury. *Neurosurgery*, **15**: 34-42.

KLATZO I (1987). Pathophysiological aspects of brain edema. *Acta Neuropathol.*, **72**: 236-239.

KLATZO I (1967). Presidential address. Neuropathological aspects of brain edema. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **26**: 1-14.

KOCHANEK PM, MARION DW, ZHANG W, SCHIDING JK, WHITE M, PALMER AM, et al. (1995). Severe controlled cortical impact in rats: assessment of cerebral edema, blood flow, and contusion volume. *J. Neurotrauma*, **12**: 1015-1025.

KONTOS HA (1981). Regulation of the cerebral circulation. *Annu. Rev. Physiol.*, **43**: 397-407.

KULIK T, KUSANO Y, ARONHIME S, SANDLER AL, WINN HR (2008). Regulation of cerebral vasculature in normal and ischemic brain. *Neuropharmacology*, **55**: 281-288.

KULKARNI S, DOPHEIDE SM, YAP CL, RAVANAT C, FREUND M, MANGIN P, et al. (2000). A revised model of platelet aggregation. *J. Clin. Invest.*, **105**: 783-791.

KUMAR S, RAJSHEKHER G, PRABHAKAR S (2008). Platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors in acute ischemic stroke. *Neurol. India*, **56**: 399-404.

KUMURA E, SATO M, FUKUDA A, TAKEMOTO Y, TANAKA S, KOHAMA A (1987). Coagulation disorders following acute head injury. *Acta Neurochir. (Wien.)*, **85**: 23-28.

KUPATT C, WICHELS R, HORSTKOTTE J, KROMBACH F, HABAZETTL H, BOEKSTEGERS P (2002). Molecular mechanisms of platelet-mediated leukocyte recruitment during myocardial reperfusion. *J. Leukoc. Biol.*, **72**: 455-461.

LAFUENTE JV, CERVOS-NAVARRO J (1999). Craniocerebral trauma induces hemorheological disturbances. *J. Neurotrauma*, **16**: 425-430.

LANGFITT TW, OBRIST WD, GENNARELLI TA, O'CONNOR MJ, WEEME CA (1977). Correlation of cerebral blood flow with outcome in head injured patients. *Ann. Surg.*, **186**: 411-414.

LAROCHE M, KUTCHER ME, HUANG MC, COHEN MJ, MANLEY GT (2012). Coagulopathy Following Traumatic Brain Injury. *Neurosurgery*.

LECLERC JR (2002). Platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonists: lessons learned from clinical trials and future directions. *Crit Care Med.*, **30**: S332-S340.

LEFKOVITS J, PLOW EF, TOPOL EJ (1995). Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine. *N. Engl. J. Med.*, **332**: 1553-1559.

LEFKOVITS J, TOPOL EJ (1996). Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonists in coronary artery disease. *Eur. Heart J.*, **17**: 9-18.

LI JM, PODOLSKY RS, ROHRER MJ, CUTLER BS, MASSIE MT, BARNARD MR, et al. (1996). Adhesion of activated platelets to venous endothelial cells is mediated via GPIIb/IIIa. *J. Surg. Res.*, **61**: 543-548.

LIGHTHALL JW (1988). Controlled cortical impact: a new experimental brain injury model. *J. Neurotrauma*, **5**: 1-15.

LIGHTHALL JW, GOSHGARIAN HG, PINDERSKI CR (1990). Characterization of axonal injury produced by controlled cortical impact. *J. Neurotrauma*, **7**: 65-76.

LINFANTE I, ETEZADI V, ANDREONE V, DELEO M, ALEHASHEMI S, SHAW K, et al. (2010). Intra-arterial abciximab for the treatment of thrombus formation during coil embolization of intracranial aneurysms. *J. Neurointerv. Surg.*, **2**: 135-138.

LORD ST (2007). Fibrinogen and fibrin: scaffold proteins in hemostasis. *Curr. Opin. Hematol.*, **14**: 236-241.

LU D, GOUSSEV A, CHEN J, PANNU P, LI Y, MAHMOOD A, et al. (2004a). Atorvastatin reduces neurological deficit and increases synaptogenesis, angiogenesis, and neuronal survival in rats subjected to traumatic brain injury. *J. Neurotrauma*, **21**: 21-32.

LU D, MAHMOOD A, GOUSSEV A, QU C, ZHANG ZG, CHOPP M (2004b). Delayed thrombosis after traumatic brain injury in rats. *J. Neurotrauma*, **21**: 1756-1766.

LU D, MAHMOOD A, GOUSSEV A, SCHALLERT T, QU C, ZHANG ZG, et al. (2004c). Atorvastatin reduction of intravascular thrombosis, increase in cerebral microvascular patency and integrity, and enhancement of spatial learning in rats subjected to traumatic brain injury. *J. Neurosurg.*, **101**: 813-821.

MADAN M, BERKOWITZ SD, TCHENG JE (1998). Glycoprotein IIb/IIIa integrin blockade. *Circulation*, **98**: 2629-2635.

MAEDA T, KATAYAMA Y, KAWAMATA T, AOYAMA N, MORI T (1997). Hemodynamic depression and microthrombosis in the peripheral areas of cortical contusion in the rat: role of platelet activating factor. *Acta Neurochir. Suppl*, **70**: 102-105.

MANDAVA P, THIAGARAJAN P, KENT TA (2008). Glycoprotein IIb/IIIa antagonists in acute ischaemic stroke: current status and future directions. *Drugs*, **68**: 1019-1028.

MANEGOLD PC, HUTTER J, PAHERNIK SA, MESSMER K, DELLIAN M (2003). Platelet-endothelial interaction in tumor angiogenesis and microcirculation. *Blood*, **101**: 1970-1976.

MARION DW, DARBY J, YONAS H (1991). Acute regional cerebral blood flow changes caused by severe head injuries. *J. Neurosurg.*, **74**: 407-414.

MARMAROU A (2004). The pathophysiology of brain edema and elevated intracranial pressure. *Cleve. Clin. J. Med.*, **71 Suppl 1**: S6-S8.

MARMAROU A, BARZO P, FATOUROS P, YAMAMOTO T, BULLOCK R, YOUNG H (1997). Traumatic brain swelling in head injured patients: brain edema or vascular engorgement? *Acta Neurochir. Suppl*, **70**: 68-70.

MARMAROU A, FATOUROS PP, BARZO P, PORTELLA G, YOSHIHARA M, TSUJI O, 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, SIGNORETTI S, AYGOK G, FATOUROS P, PORTELLA G (2006). Traumatic brain edema in diffuse and focal injury: cellular or vasogenic? *Acta Neurochir. Suppl.*, **96**: 24-29.

MASSBERG S, EISENMENGER S, ENDERS G, KROMBACH F, MESSMER K (1998a). Quantitative analysis of small intestinal microcirculation in the mouse. *Res. Exp. Med. (Berl)*, **198**: 23-35.

MASSBERG S, ENDERS G, LEIDERER R, EISENMENGER S, VESTWEBER D, KROMBACH F, et al. (1998b). Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. *Blood*, **92**: 507-515.

MCINTOSH TK, VINK R, NOBLE L, YAMAKAMI I, FERNYAK S, SOARES H, et al. (1989). Traumatic brain injury in the rat: characterization of a lateral fluid-percussion model. *Neuroscience*, **28**: 233-244.

MCLAUGHLIN MR, MARION DW (1996). Cerebral blood flow and vasoresponsivity within and around cerebral contusions. *J. Neurosurg.*, **85**: 871-876.

MCMILLIAN WD, ROGERS FB (2009). Management of prehospital antiplatelet and anticoagulant therapy in traumatic head injury: a review. *J. Trauma*, **66**: 942-950.

MOKRI B (2001). The Monro-Kellie hypothesis: applications in CSF volume depletion. *Neurology*, **56**: 1746-1748.

MORALES DM, MARKLUND N, LEBOLD D, THOMPSON HJ, PITKANEN A, MAXWELL WL, et al. (2005). Experimental models of traumatic brain injury: do we really need to build a better mousetrap? *Neuroscience*, **136**: 971-989.

MORGANTI-KOSSMANN MC, YAN E, BYE N (2010). Animal models of traumatic brain injury: is there an optimal model to reproduce human brain injury in the laboratory? *Injury*, **41 Suppl 1**: S10-S13.

MURR R, BERGER S, SCHURER L, KEMPSKI O, STAUB F, BAETHMANN A (1993). Relationship of cerebral blood flow disturbances with brain oedema formation. *Acta Neurochir. Suppl (Wien.)*, **59**: 11-17.

NIESWANDT B, PLEINES I, BENDER M (2011). Platelet adhesion and activation mechanisms in arterial thrombosis and ischaemic stroke. *J. Thromb. Haemost.*, **9 Suppl 1**: 92-104.

NIESWANDT B, VARGA-SZABO D, ELVERS M (2009). Integrins in platelet activation. *J. Thromb. Haemost.*, **7 Suppl 1**: 206-209.

O'CONNOR WT, SMYTH A, GILCHRIST MD (2011). Animal models of traumatic brain injury: a critical evaluation. *Pharmacol. Ther.*, **130**: 106-113.

OLSON JD, KAUFMAN HH, MOAKE J, O'GORMAN TW, HOOTS K, WAGNER K, et al. (1989). The incidence and significance of hemostatic abnormalities in patients with head injuries. *Neurosurgery*, **24**: 825-832.

PADAYACHY LC, FIGAJI AA, BULLOCK MR (2010). Intracranial pressure monitoring for traumatic brain injury in the modern era. *Childs Nerv. Syst.*, **26**: 441-452.

PLESNILA N, FRIEDRICH D, ERISKAT J, BAETHMANN A, STOFFEL M (2003). Relative cerebral blood flow during the secondary expansion of a cortical lesion in rats. *Neurosci. Lett.*, **345**: 85-88.

PLOEM JS, WALTER F (2001). Multi-wavelength epi-illumination in fluorescence microscopy. *Scientific and Technical Information - Mitteilungen für Wissenschaft und Technik*, **5**: 1-16.

PLOW EF, D'SOUZA SE, GINSBERG MH (1992). Ligand binding to GPIIb-IIIa: a status report. *Semin. Thromb. Hemost.*, **18**: 324-332.

PORTER JM, GOODNIGHT SH, JR. (1977). The role of the platelet in coagulation and clinical thrombotic events. *Am. J. Surg.*, **134**: 231-235.

POVLISHOCK JT, KATZ DI (2005). Update of neuropathology and neurological recovery after traumatic brain injury. *J. Head Trauma Rehabil.*, **20**: 76-94.

RIES T, SIEMONSEN S, GRZYSKA U, ZEUMER H, FIEHLER J (2009). Abciximab is a safe rescue therapy in thromboembolic events complicating cerebral aneurysm coil

embolization: single center experience in 42 cases and review of the literature. *Stroke*, **40**: 1750-1757.

ROBERT KOCH INSTITUT (HRSG) (2006). *Gesundheit in Deutschland. Gesundheitsberichterstattung des Bundes*. Robert Koch-Institut: Berlin.

SAATMAN KE, DUHAIME AC, BULLOCK R, MAAS AI, VALADKA A, MANLEY GT (2008). Classification of traumatic brain injury for targeted therapies. *J. Neurotrauma*, **25**: 719-738.

SCHNEIDER DJ (2011). Anti-platelet therapy: glycoprotein IIb-IIIa antagonists. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **72**: 672-682.

SCHRÖR K, WEBER AA (2003). Comparative pharmacology of GP IIb/IIIa antagonists. *J. Thromb. Thrombolysis.*, **15**: 71-80.

SCHWARZMAIER SM, KIM SW, TRABOLD R, PLESNILA N (2010). Temporal profile of thrombogenesis in the cerebral microcirculation after traumatic brain injury in mice. *J. Neurotrauma*, **27**: 121-130.

SEGAWA H, PATTERSON RH (1981). Role of platelets in vasogenic brain edema. I. Significance of thrombus formation in the damaged vessels. *Arch. Neurol.*, **38**: 265-270.

SEITZ RJ, SIEBLER M (2008). Platelet GPIIb/IIIa receptor antagonists in human ischemic brain disease. *Curr. Vasc. Pharmacol.*, **6**: 29-36.

SHIRES GT, HOLMAN J (1948). Dilution acidosis. *Am. J. Med.*, **4**: 467.

SIMARD JM, KENT TA, CHEN M, TARASOV KV, GERZANICH V (2007). Brain oedema in focal ischaemia: molecular pathophysiology and theoretical implications. *Lancet Neurol.*, **6**: 258-268.

SMITH DH, SOARES HD, PIERCE JS, PERLMAN KG, SAATMAN KE, MEANEY DF, et al. (1995). A model of parasagittal controlled cortical impact in the mouse: cognitive and histopathologic effects. *J. Neurotrauma*, **12**: 169-178.

SMITH DR, DUCKER TB, KEMPE LG (1969). Experimental in vivo microcirculatory dynamics in brain trauma. *J. Neurosurg.*, **30**: 664-672.

SMITH M (2008). Monitoring intracranial pressure in traumatic brain injury. *Anesth. Analg.*, **106**: 240-248.

STATISTISCHES BUNDESAMT (2011a). *Krankenhausstatistik - Diagnosedaten der Patienten und Patientinnen in Krankenhäusern Zweigstelle Bonn*.

STATISTISCHES BUNDESAMT (2011b). *Todesursachenstatistik Zweigstelle Bonn*.

STEIN SC, CHEN XH, SINSON GP, SMITH DH (2002). Intravascular coagulation: a major secondary insult in nonfatal traumatic brain injury. *J. Neurosurg.*, **97**: 1373-1377.

STEIN SC, GANGULY K, BELFIELD CM, XU X, SWANSON EW, CHEN XH, et al. (2009). Erythrocyte-bound tissue plasminogen activator is neuroprotective in experimental traumatic brain injury. *J. Neurotrauma*, **26**: 1585-1592.

STEIN SC, GRAHAM DI, CHEN XH, SMITH DH (2004). Association between intravascular microthrombosis and cerebral ischemia in traumatic brain injury. *Neurosurgery*, **54**: 687-691.

STEIN SC, SMITH DH (2004). Coagulopathy in traumatic brain injury. *Neurocrit. Care*, **1**: 479-488.

STEIN SC, YOUNG GS, TALUCCI RC, GREENBAUM BH, ROSS SE (1992). Delayed brain injury after head trauma: significance of coagulopathy. *Neurosurgery*, **30**: 160-165.

STEINER LA, ANDREWS PJ (2006). Monitoring the injured brain: ICP and CBF. *Br. J. Anaesth.*, **97**: 26-38.

STEUDEL WI, CORTBUS F, SCHWERDTFEGER K (2005). Epidemiology and prevention of fatal head injuries in Germany--trends and the impact of the reunification. *Acta Neurochir. (Wien.)*, **147**: 231-242.

TAGLIAFERRI F, COMPAGNONE C, KORSIC M, SERVADEI F, KRAUS J (2006). A systematic review of brain injury epidemiology in Europe. *Acta Neurochir. (Wien.)*, **148**: 255-268.

TALVING P, BENFIELD R, HADJIZACHARIA P, INABA K, CHAN LS, DEMETRIADES D (2009). Coagulopathy in severe traumatic brain injury: a prospective study. *J. Trauma*, **66**: 55-61.

TEPE G, WISKIRCHEN J, PEREIRA P, CLAUSSEN CD, MILLER S, DUDA SH (2008). GP IIb/IIIa blockade during peripheral artery interventions. *Cardiovasc. Intervent. Radiol.*, **31**: 8-13.

THAL SC, PLESNILA N (2007). Non-invasive intraoperative monitoring of blood pressure and arterial pCO₂ during surgical anesthesia in mice. *J. Neurosci. Methods*, **159**: 261-267.

THOMPSON HJ, LIFSHITZ J, MARKLUND N, GRADY MS, GRAHAM DI, HOVDA DA, et al. (2005). Lateral fluid percussion brain injury: a 15-year review and evaluation. *J. Neurotrauma*, **22**: 42-75.

TOPOL EJ, BYZOVA TV, PLOW EF (1999). Platelet GPIIb-IIIa blockers. *Lancet*, **353**: 227-231.

TREGGIARI MM, SCHUTZ N, YANEZ ND, ROMAND JA (2007). Role of intracranial pressure values and patterns in predicting outcome in traumatic brain injury: a systematic review. *Neurocrit. Care*, **6**: 104-112.

TSUJIKAWA A, KIRYU J, NONAKA A, YAMASHIRO K, NISHIWAKI H, TOJO SJ, et al. (1999). In vivo evaluation of platelet-endothelial interactions in retinal microcirculation of rats. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.*, **40**: 2918-2924.

UNTERBERG AW, STOVER J, KRESS B, KIENING KL (2004). Edema and brain trauma. *Neuroscience*, **129**: 1021-1029.

VAKILI A, KATAOKA H, PLESNILA N (2005). Role of arginine vasopressin V1 and V2 receptors for brain damage after transient focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab*, **25**: 1012-1019.

VAN DER SANDE JJ, VELTKAMP JJ, BOEKHOUT-MUSSERT RJ, BOUWHUIS-HOOGERWERF ML (1978). Head injury and coagulation disorders. *J. Neurosurg.*, **49**: 357-365.

VANDENDRIES ER, FURIE BC, FURIE B (2004). Role of P-selectin and PSGL-1 in coagulation and thrombosis. *Thromb. Haemost.*, **92**: 459-466.

WAFAISADE A, LEFERING R, TJARDES T, WUTZLER S, SIMANSKI C, PAFFRATH T, et al. (2010). Acute coagulopathy in isolated blunt traumatic brain injury. *Neurocrit. Care*, **12**: 211-219.

WAHL F, GROSJEAN-PIOT O, BAREYRE F, UZAN A, STUTZMANN JM (2000). Enoxaparin reduces brain edema, cerebral lesions, and improves motor and cognitive impairments induced by a traumatic brain injury in rats. *J. Neurotrauma*, **17**: 1055-1065.

WANG HC, MA YB (2010). Experimental models of traumatic axonal injury. *J. Clin. Neurosci.*, **17**: 157-162.

WANG XQ, DUAN XM, LIU LH, FANG YQ, TAN Y (2005). Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester fluorescent dye for cell labeling. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, **37**: 379-385.

WEI EP, DIETRICH WD, POVLISHOCK JT, NAVARI RM, KONTOS HA (1980). Functional, morphological, and metabolic abnormalities of the cerebral microcirculation after concussive brain injury in cats. *Circ. Res.*, **46**: 37-47.

WERNER C, ENGELHARD K (2007). Pathophysiology of traumatic brain injury. *Br. J. Anaesth.*, **99**: 4-9.

WHITE H, VENKATESH B (2008). Cerebral perfusion pressure in neurotrauma: a review. *Anesth. Analg.*, **107**: 979-988.

XIANG YZ, XIA Y, GAO XM, SHANG HC, KANG LY, ZHANG BL (2008). Platelet activation, and antiplatelet targets and agents: current and novel strategies. *Drugs*, **68**: 1647-1664.

YEGHIAZARIANS Y, BRAUNSTEIN JB, ASKARI A, STONE PH (2000). Unstable angina pectoris. *N. Engl. J. Med.*, **342**: 101-114.

ZWECKBERGER K (2006). Einfluss der Entlastungskraniektomie und des Kallikrein-Kinin Systems auf den sekundären Hirnschaden nach experimentellem Schädel-Hirntrauma. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.

ZWECKBERGER K, EROS C, ZIMMERMANN R, KIM SW, ENGEL D, PLESNILA N (2006). Effect of early and delayed decompressive craniectomy on secondary brain damage after controlled cortical impact in mice. *J. Neurotrauma*, **23**: 1083-1093.

ZWECKBERGER K, STOFFEL M, BAETHMANN A, PLESNILA N (2003). Effect of decompression craniotomy on increase of contusion volume and functional outcome after controlled cortical impact in mice. *J. Neurotrauma*, **20**: 1307-1314.

ZWIENENBERG M, MUIZELAAR JP (2001). Cerebral perfusion and blood flow in neurotrauma. *Neurolog. Res.*, **23**: 167-174.

7 DANKSAGUNG

Ich möchte mich zunächst bei Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Pohl, dem Direktor des Walter-Brendel-Zentrums für Experimentelle Medizin der Ludwig-Maximilians-Universität München für die Aufnahme in sein Institut bedanken.

Größten Dank schulde ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Nikolaus Plesnila für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die ausgezeichnete Betreuung. Seine inhaltlich-sachliche Unterstützung war eine unschätzbar große Hilfe bei der Durchführung und Fertigstellung der vorliegenden Arbeit. Die Art und Weise, wissenschaftlich zu denken und eigenständig nach Lösungen zu suchen, wurden in hervorragender Weise geschult. Auch die durch ihn geschaffene, freundliche Atmosphäre innerhalb der Arbeitsgruppe machte die Arbeit zu einer angenehmen und immer interessanten Tätigkeit.

Außerdem danke ich dem Förderprogramm für Forschung und Lehre (FöFoLe) der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München und dessen Vorsitzendem, Herrn Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann für die finanzielle Unterstützung durch ein Stipendium im Rahmen des Promotionsstudiengangs "Molekulare und Systembiologische Medizin".

Darüber hinaus danke ich Herrn Dr. Eckart Thein für die Beratung bei allen tiermedizinischen Aspekten, sowie Herrn Dr. Jürgen Peters für die Unterstützung in allen Software- und Computerfragen.

Besonderer Dank gebührt außerdem den anderen Doktoranden, Kollegen und Mitarbeitern, mit denen ich zusammen arbeiten durfte und die mich in die zahlreichen Methoden eingearbeitet haben. Ihre Ratschläge und Hilfestellungen waren von außerordentlich großem Wert und sorgten für ein überaus angenehm kollegiales und produktives Arbeitsklima.

Außerordentlich dankbar bin ich außerdem den medizinisch-technischen Assistentinnen, Frau Uta Mamrak für ihre große Hilfsbereitschaft und die Einarbeitung in zahlreiche Methoden, sowie Frau Silvia Münzing für ihr großes Engagement bei der Durchführung und Auswertung der FACS-Analysen.

Schließlich möchte ich noch meinen Eltern danken, die mich immer unterstützt und stets ermutigt haben.

Eidesstattliche Versicherung

Gass, Philip

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema
**Einfluss der Thrombozytenaggregationshemmung mit einem Glykoprotein
IIb/IIIa-Antagonisten auf den sekundären Hirnschaden und die zerebrale
Mikrozirkulation nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma bei der Maus**

selbständige verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und
alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als
solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle
einzelne nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in
ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades
eingereicht wurde.

Berlin, 27.04.2013

Ort, Datum