

Aus dem Institut für Schlaganfall- und Demenzforschung (ISD)
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hicckel

**Der CaV2.1(P/Q)-Kalziumkanal:
Bedeutung für Pathophysiologie, Therapie und Prognostik des
Sekundärschadens nach Schädelhirntrauma**

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

vorgelegt von
Reinhard Dolp
aus Memmingen

2016

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Nikolaus Plesnila

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Stefan Zausinger

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Nicole Terpolilli

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: **22.06.2017**

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Schädelhirntrauma	1
1.1.1	Definition	1
1.1.2	Einteilung	1
1.1.3	Epidemiologie und Ätiologie	3
1.1.4	Pathophysiologie	5
1.1.4.1	Primärschaden	5
1.1.4.2	Sekundärschaden	5
1.1.5	Therapie	12
1.1.6	Prognoseparameter	15
1.2	Zerebrale Kalziumkanäle	17
1.2.1	Allgemeines	17
1.2.2	Der spannungsabhängige CaV2.1(P/Q)-Kalziumkanal	18
1.3	Die kortikale Streudepolarisation (Cortical Spreading Depolarization)	20
1.3.1	Definition	20
1.3.2	Pathomechanismus	21
2	Ziel der vorliegenden Doktorarbeit	24
3	Material und Methoden	25
3.1	Allgemeine Versuchsdurchführung	25
3.1.1	Versuchstiere und Tierhaltung	25
3.1.2	Genotypisierung der S218L-Mäuse	27
3.2	Alpha-Eudesmol	29
3.2.1	Historische Verwendung und Herstellung	29
3.2.2	Wirkungsweise und Struktur von Alpha-Eudesmol	29
3.3	Narkose und Beatmung	30
3.4	Chirurgische Präparation und Überwachung	31
3.4.1	Bestimmung des Intrakraniellen Drucks (ICP)	31
3.4.2	Bestimmung des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP)	32
3.4.3	Bestimmung der zerebralen Durchblutung (CBF)	33
3.4.4	Bestimmung des Gewichts	33

3.4.5	Blutgasanalyse (BGA)	33
3.4.6	Neurophysiologische Messung	34
3.4.7	Induktion des Schädelhirntraumas – Controlled Cortical Impact.....	35
3.4.8	Applikation der verwendeten Substanzen	37
3.5	Versuchsaufbau.....	37
3.5.1	Überblick.....	37
3.5.2	Detaillierte Beschreibung	39
3.5.2.1	Versuchsserie 1: Einfluss der S218L-Mutation auf den Hirnschaden nach SHT.....	39
3.5.2.2	Versuchsserie 2: Physiologische Parameter nach Eudesmol-Injektion 40	
3.5.2.3	Versuchsserie 3: Auswirkungen von Alpha-Eudesmol auf die kortikalen Streudepolarisationen	41
3.5.2.4	Versuchsserie 4: Auswirkungen von Alpha-Eudesmol auf den Sekundärschaden nach SHT bei prätraumatischer Injektion	41
3.5.2.5	Versuchsserie 5: Auswirkungen von Alpha-Eudesmol auf den Sekundärschaden nach SHT bei posttraumatischer Injektion	42
3.6	Auswertung.....	42
3.6.1	Herstellung der Präparate	42
3.6.2	Auswertung durch Histomorphometrie	43
3.6.3	Bestimmung des Hirnwassergehalts	44
3.6.4	Statistische und graphische Auswertung	45
4	Ergebnisse.....	46
4.1	Einfluss der S218L-Mutation auf den Hirnschaden nach SHT	46
4.1.1	Mortalität nach SHT	46
4.1.2	Neurophysiologische Veränderungen	46
4.1.3	Hirnwassergehalt nach SHT.....	47
4.1.4	Parenchymschaden nach SHT.....	48
4.1.5	Intrakranieller Druck (ICP) nach SHT.....	49
4.1.6	Gewichtsabnahme nach SHT.....	50
4.1.7	Zusammenfassung der Versuchsserie 1	51
4.2	Medikamentöse Beeinflussung des CaV2.1(P/Q)-Kalziumkanals.....	51
4.2.1	Versuchsserie 2: Physiologische Auswirkungen von Alpha-Eudesmol... 51	
4.2.1.1	Blutgasanalyse (BGA).....	51

4.2.1.2	Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP)	52
4.2.1.3	Zerebrale Durchblutung (CBF)	53
4.2.1.4	Zusammenfassung der Versuchsserie 2	54
4.2.2	Versuchsserie 3: Effekt von Alpha-Eusemol auf die kortikalen Streudepolarisationen nach Trauma	54
4.2.3	Versuchsserie 4: Auswirkungen von Alpha-Eudesmol auf den Sekundärschaden nach SHT bei prätraumatischer Injektion	56
4.2.3.1	Hirnwassergehalt nach SHT	56
4.2.3.2	Läsionsvolumen 24 Stunden nach SHT	58
4.2.3.3	Intrakranieller Druck (ICP) nach SHT	59
4.2.3.4	Gewichtsverlust nach SHT	60
4.2.3.5	Zusammenfassung der Versuchsserie 4	61
4.2.4	Versuchsserie 5: Effekt von Alpha-Eudesmol auf den Sekundärschaden nach SHT bei posttraumatischer Injektion	61
4.2.4.1	Hirnwassergehalt nach SHT	61
4.2.4.2	Intrakranieller Druck (ICP) nach SHT	63
4.2.4.3	Gewichtssverlust nach SHT	65
4.2.4.4	Zusammenfassung Versuchsserie 5	65
5	Diskussion	66
5.1	Diskussion der Methoden	66
5.1.1	Auswahl des Trauma-Modells	66
5.1.2	Durchblutungsmessung	68
5.1.3	EEG- und DC-Messung	69
5.1.4	ICP-Messung	70
5.1.5	Applikation von Alpha-Eudesmol	70
5.2	Diskussion der Ergebnisse	71
5.2.1	Bedeutung des CaV2.1(P/Q)-Kalziumkanals für das SHT	71
5.2.2	Bedeutung der kortikalen Streudepolarisation für des SHT	75
5.2.3	Bedeutung der S218L-Mutation für die Prognose des SHT	78
6	Zusammenfassung und Ausblick	83
7	Literaturverzeichnis	85
8	Appendix	110
8.1	Abkürzungsverzeichnis	110

8.2	Nissl-Färbung.....	111
9	Danksagung.....	112
10	Lebenslauf	113
11	Eidesstattliche Versicherung	115

1 Einleitung

1.1 Das Schädelhirntrauma

1.1.1 Definition

Das Schädelhirntrauma (SHT) ist definiert als „Folge einer Krafteinwirkung auf die als Einheit anzusehende Körperregion Schädel (Weichteile, Knochen) und Gehirn (Hirnhäute, Hirnsubstanz, Gefäße). Betroffen sind in unterschiedlichem Maße immer beide Formationen.“⁽¹⁾ Die Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie definiert das SHT als „Folge einer Gewalteinwirkung, die zu einer Funktionsstörung und/oder Verletzung des Gehirns geführt hat und mit einer Prellung oder Verletzung der Kopfschwarte, des knöchernen Schädels, der Gefäße und/oder der Dura verbunden sein kann.“⁽²⁾ In der Internationalen statistischen Klassifikation der Krankheiten (ICD10 GM Version 2013) finden sich diese Verletzungen im Kapitel XIX unter den Punkten S00 – S09: Verletzungen des Kopfes.

1.1.2 Einteilung

Von einem offenen SHT spricht man, wenn die Dura eröffnet ist und das Gehirn dadurch eine Verbindung mit dem Schädeläußeren hat.⁽²⁾ Wird der Kopf verletzt ohne Hirnfunktionsstörung oder Verletzung des Gehirns selbst, spricht man von einer Schädelprellung (Concussio cerebri).⁽²⁾

Die gebräuchlichste Einteilung des SHT in leicht (mild), mittel (moderate), schwer (severe) und kritisch (critical) basiert auf der Glasgow Coma Scale (GCS) – ein Bewertungsscore, der den Bewusstseinszustand des Patienten anhand von allgemeiner Motorik, Sprache und Augenöffnen einschätzt.⁽³⁾ Tabelle 1 zeigt die einzelnen Beurteilungskriterien.

Einleitung

Glasgow Coma Scale	Funktion	GCS-Wert
Augen öffnen	Spontan	4
	Auf Ansprache	3
	Auf Schmerzreiz	2
	Keine Reaktion	1
Sprache	Orientiert	5
	Desorientiert	4
	Inadäquat	3
	Unverständlich	2
	Keine Antwort	1
Motorik	Befolgt Aufforderungen	6
	Gezielte Schmerzabwehr	5
	Ungezielte Schmerzabwehr	4
	Beugereaktion	3
	Streckreaktion	2
	Keine Reaktion	1
Bewertung des SHT	leicht	15 – 13
	mittel	12 – 9
	schwer	8 – 3

Tabelle 1: Beurteilungskriterien der Glasgow Coma Scale (GCS)

Die GCS beurteilt den Patienten anhand von Augenöffnen (min. 1 Punkt; max. 4 Punkte), Sprache (min. 1 Punkt, max. 5 Punkte) und Motorik (min. 1 Punkt, max. 6 Punkte). Maximal können 15 Punkte erreicht werden, minimal 3. Das Schädelhirntrauma (SHT) lässt sich damit in leicht (15-13 Punkte), mittel (12-9 Punkte) und schwer (9-3 Punkte) unterteilen. Bei einem Wert von 3-4 Punkten mit gleichzeitigem Verlust der Pupillenreaktion sowie fehlender motorischer Reaktion und/oder Dezerebrierung kann auch von einem kritischen SHT gesprochen werden.

Modifiziert nach Gleixner et al. 2009

Die GCS wurde für Erwachsene entwickelt und an diesen evaluiert. Für die posttraumatische Beurteilung von Kindern und Jugendlichen existieren altersadaptierte Modifikationen.⁽⁴⁾ Als Maximum können 15 Punkte erreicht werden – das Minimum liegt bei 3 Punkten. Ab einem GCS-Wert von unter 9 gilt der Patient als vigilanzgemindert. Von einem leichten SHT spricht man bei GCS-Werten von 15-13, von einem mittleren bei 9-12, von einem schweren bei unter 9 und von einem kritischen bei einem Wert von 3-4 mit gleichzeitigem Verlust der Pupillenreaktion sowie fehlender motorischer Reaktion und/oder Dezerebrationszeichen.⁽⁵⁾ Das leichte SHT wird umgangssprachlich auch als Gehirnerschütterung (concussion)

bezeichnet.⁽⁶⁾ Viele Einteilungen differenzieren nicht zwischen schweren und kritischem SHT, sondern bezeichnen alle Verletzungen, die mit einem GCS-Wert unter 9 einhergehen, als schwer.⁽⁴⁾ Es gibt jedoch noch keinen einheitlichen Konsens darüber, zu welchem exakten Zeitpunkt der GCS initial erhoben werden soll.⁽²⁾ Eine weitere, in Deutschland gebräuchliche Einteilung des SHT ist die Einteilung nach Tönnis und Loew, bei der die Beurteilung retrospektiv auf den verbleibenden Schäden bzw. der Erholungszeit beruht – Grad I: Vollständig reversibel in vier Tagen; Grad II: Rückbildung innerhalb von drei Wochen; Grad III: Persistierende Störung über drei Wochen.⁽⁷⁾

1.1.3 Epidemiologie und Ätiologie

Die weltweite Inzidenz des SHT steigt kontinuierlich an; somit zählt es heute zu den häufigsten neurologischen/neurochirurgischen Krankheitsbildern, was mit enormen Belastungen, sowohl für die Familien der Betroffenen als auch für das Gesundheitssystem des jeweiligen Landes, verbunden ist.^(6, 8-12) Die Zunahme der Inzidenz beruht zum einen auf der steigenden Anzahl von Verkehrsunfällen, vor allem in den Entwicklungsländern, zum anderen aber auch auf den immer präziser werdenden Diagnosemöglichkeiten, wodurch das SHT häufiger als früher und bereits in minimaler Ausprägung diagnostiziert werden kann.^(6, 9) Eine prospektive Studie aus dem Raum Hannover und Münster, die von der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie in ihrer Leitlinie zum SHT im Erwachsenenalter angeführt wird, kommt zu dem Ergebnis, dass die Inzidenz für das Schädelhirntrauma in Deutschland bei 332 Patienten pro 100.000 Bürger liegt, wovon nach dem GCS 91% als leicht, 4% als mittel und 5% als schwer zu klassifizieren sind. Dies deckt sich mit den neuesten Daten aus einem der grössten australischen Referenzkrankenhäuser für pädiatrische Traumapatienten.⁽¹³⁾ Die Angabe der Inzidenz des SHT ist aufgrund der unterschiedlichen Einschluss- und Diagnosekriterien sowie der Länge der Rekrutierungszeiträume jedoch nicht einheitlich. So beziffern zum Beispiel Baethmann et al. auf Basis einer populationsbasierten Untersuchung in Südbayern die Inzidenz des SHT in Deutschland mit 350/100.000.⁽¹⁴⁾ Ein Leitlinien-Artikel aus dem European Journal of Neurology 2012 dagegen gibt eine Inzidenz-Bandbreite von 100-300/10.000 an,^(2, 5) was durch neuere Daten, die 2014 veröffentlicht wurden, bestätigt wird.⁽¹⁵⁻¹⁷⁾ Bei einer Inzidenz von 350/100.000 (Deutschland) entstehen dem Gesundheitssystem durch Schädelhirntraumata Kosten von etwa 2,8 Milliarden

Einleitung

Euro/Jahr.^(2, 11, 18) Eine 2011 veröffentlichte Studie aus Spanien, welche die finanziellen Auswirkungen von Schlaganfällen und von SHT untersuchte, kam zu dem Ergebnis, dass jeder Patient mit einer dieser Erkrankungen im Jahr durchschnittlich 21.040 Euro an Kosten verursacht.⁽¹⁰⁾ Diese Zahlen wurden in mehreren Studien bestätigt.^(19, 20)

Die Mortalität des SHT hat sich im Gegensatz zur Inzidenz in den letzten 20 Jahren etwa halbiert. Dies ist hauptsächlich auf eine Verbesserung der Bildgebung, der Primärprävention (z.B. Helme und Sicherheitsgurte) sowie verbesserter Diagnose- und Behandlungsmöglichkeiten zurückzuführen.⁽⁶⁾

Bei einer Hochrechnung der oben genannten Studie aus dem Raum Hannover und Münster auf die Bundesrepublik Deutschland ergeben sich bei ca. 248.000 SHT-Patienten 2.750 Betroffene, die an der Erkrankung versterben.^(2, 11) Eine 2001 veröffentlichte Analyse der Daten des Bundesamts für Statistik aus dem Jahr 1996 ergab für Deutschland eine Gesamtmortalität von 11,5% für das SHT.⁽²¹⁾

Die Ursache für das SHT hängt stark vom Alter des Betroffenen ab. Baethman et al. zeigten, dass in der Altersgruppe von 15 bis 45 Jahren Verkehrsunfälle mit oder ohne begleitendem Polytrauma dominieren.⁽¹⁴⁾ Bei jüngeren (<15 Jahren) oder älteren Menschen (>65 Jahren) sind dagegen Stürze die häufigste Ursache.⁽¹⁴⁾ In den USA zeigen Daten von 1997 bis 2007, dass in der Altersgruppe von 0-24 Jahren Verkehrsunfälle die Hauptverursacher des SHT mit Todesfolge sind, zwischen 25 und 74 Jahren dominieren Schussverletzungen, die in den USA insgesamt die Hauptursache für ein tödliches SHT darstellen; ab einem Alter von über 75 Jahren sind auch hier Stürze Hauptursache für ein SHT mit tödlichem Ausgang.^(22, 23) Eine von 2003 bis 2011 in den Niederlanden durchgeführte Auswertung von Patienten, die nach Verkehrsunfall mit schwerem SHT ins Krankenhaus eingeliefert wurden, ergab zudem ein unterschiedliches Verletzungsmuster für Fußgänger, Motorrad-, Auto-, Roller- und Fahrradfahrer. Fußgänger hatten das größte Risiko, ein SHT zu erleiden und zeigten die höchste Inzidenz an Subdural- und Subarachnoidalblutungen. Motorradfahrer zeigten die höchste Rate an Kontusionen, wohingegen Rollerfahrer die höchste Inzidenz an offenen Schädelfrakturen und/oder Schädelbasisfrakturen aufwiesen.⁽²⁴⁾

Als besondere Risikogruppen mit der höchsten Inzidenz für leichtes und mittleres SHT wurden 1991 vom nationalen Institut für Gesundheitswesen der Vereinigten Staaten von Amerika (Centers for Disease Control and Prevention) Männer,

Jugendliche bzw. junge Erwachsene und Alleinstehende mit niedrigem sozioökonomischen Status identifiziert.⁽¹²⁾ Eine aktuelle Studie von Januar 2015, die retrospektiv Motocross-Unfälle minderjähriger Patienten untersuchte, konnte zudem zeigen, dass trotz Einhaltung der aktuell vorgeschriebenen Sicherheitsvorkehrungen und Tragen von Sturzhelmen keine zufriedenstellender Schutz gegen das SHT gewährleistet werden kann.⁽²⁵⁾

1.1.4 Pathophysiologie

Der Hirnschaden nach SHT setzt sich aus zwei zeitlich versetzten Komponenten zusammen – dem Primärschaden und dem sich danach entwickelnden Sekundärschaden, der die initiale Gewebeschädigung deutlich verschlimmern kann.^(2, 26)

1.1.4.1 Primärschaden

Als Primärschaden bezeichnet man die direkte Verletzung des Gehirnparenchyms sowie der umgebenden Weichteil- und Knochenstrukturen, welche durch die mechanischen Kräfte der ursprünglichen Gewalteinwirkung entsteht.^(2, 27) Das Ausmaß des Primärschadens wird allein von der Verletzungsursache und dem Verletzungsmuster determiniert, weshalb sich dieser nicht therapeutisch, sondern nur durch Primärprävention beeinflussen bzw. verhindern lässt.^(6, 26, 28, 29) Neben der Öffentlichkeitsarbeit und Aufklärung über die Notwendigkeit und Wichtigkeit von Prävention besteht die Aufgabe der Medizin deshalb in der frühzeitigen Erkennung und Behandlung des therapeutisch beeinflussbaren Sekundärschadens.^(6, 26, 28, 29)

1.1.4.2 Sekundärschaden

Der akute Sekundärschaden nach SHT entsteht durch eine Reihe unterschiedlicher pathophysiologischer Reaktionen, die sich in den ersten Minuten bis Tagen nach dem Primärschaden entwickeln und die initiale Hirnschädigung dabei vergrößern können.^(2, 26) Diese Kaskade beinhaltet intrakranielle, biochemische und physikalische Veränderungen, die - je nach Schwere der Verletzung - auch zu einer Beeinflussung wichtiger systemischer Parameter wie Blutdruck, Herzfrequenz und Atemantrieb führen können, was durch die zunehmenden Hirnschädigung verursacht wird und diese in einem Circulus vitiosus weiter verstärken kann.^(30, 31) Im Gegensatz zum Primärschaden ist der Sekundärschaden aufgrund seiner verzögerten

Einleitung

Entwicklung prinzipiell therapeutisch beeinflussbar und stellt somit das primäre Ziel der medikamentösen und medizinischen SHT-Therapie dar.⁽²⁾

Die intrakraniellen Veränderungen sind hauptsächlich auf drei miteinander verbundene Schädigungsmechanismen zurückzuführen: 1. die Entstehung eines Hirnödems, welches über den dadurch gesteigerten intrakraniellen Druck (Intracranial Pressure; ICP) die Blutversorgung des Gehirns weiter verschlechtern und auf ischämische Werte herabsetzen kann, was zum Zelluntergang führt; 2. dem Verlust der zerebrovaskulären Autoregulation in Verbindung mit einer defizienten Bluthirnschranke; 3. die Ausschüttung von exzitatorischen Neurotransmittern, inflammatorischen Zytokinen und reaktiven Sauerstoffradikalen (Reactive Oxygen Species; ROS).

Um die Primärläsion kommt es – je nach Verletzungsschwere – zu einer lokalen bis globalen Reduktion der Hirndurchblutung (Cerebral Blood Flow; CBF; Normalwert des CBF: Durchschnittlich 750mL/min bzw. 50mL/100 g Hirngewebe/min).⁽³²⁻⁴³⁾ Dies beruht hauptsächlich auf einer Störung der Mikrozirkulation; diese resultiert sowohl aus einer Einengung des Gefäßvolumens aufgrund traumatisch bedingter Zellschwellung von Gliazellen als auch aus einer Einengung des Gefäßlumens durch Erythrozyten- und Leukozytenaggregate.⁽⁴⁰⁾ Wird dabei ein CBF-Wert von 18 bis 20 mL/100g Hirngewebe/min dauerhaft unterschritten (Ischämie-Schwelle), kommt es zum ischämischen Zelluntergang.⁽⁴³⁻⁴⁶⁾ Tabelle 2 gibt einen Überblick über die wichtigsten hirnphysiologischen Parameter.

Parameter	Normwert
ICP	3-13 mmHg
CPP	60-180 mmHg
CBF	50mL/100g Hirngewebe/min
CPP=MAP-ICP	

Tabelle 2: Übersicht über die wichtigsten hirnphysiologischen Parameter

ICP: Intrakranieller Druck (Intracranial Pressure)

CPP: Zerebraler Perfusionsdruck (Cerebral Perfusion Pressure)

CBF: Zerebrale Durchblutung (Cerebral Blood Flow)

MAP: Mittlerer Arteriellen Blutdruck (Mean Arterial Pressure)

Einleitung

Die Unterversorgung der Zellen mit Sauerstoff und Glukose resultiert in einem Zusammenbruch der Ionengradienten mit konsekutiver Zellschwellung. Dies wird als zytotoxisches Ödem bezeichnet und führt letztendlich zur Ruptur der Zellmembran.^{(47, 48) (48-50)}

Simultan dazu entwickelt sich das sogenannte vasogene Ödem: Durch ischämische Schädigung der Endothelien sowie durch posttraumatische Ausschüttung von vasoaktiven Substanzen wie Bradykinin kommt es zu einem Zusammenbrechen der Blut-Hirn-Schranke, was zu einer erhöhten extrazellulären Flüssigkeitsansammlung mit Volumenzunahme des Gehirnes und in der Folge zu einer weiteren Steigerung des ICP führt.^(48, 49, 51)

Eine detaillierte Übersicht über die einzelnen Ödemarten sowie deren Pathomechanismus gibt eine 2004 von Unterberg et al. publizierte Übersichtsarbeit.⁽⁴⁸⁾ Dort wird das zytotoxische Ödem als wichtiger therapeutischer Angriffspunkt in der Therapie des Sekundärschadens nach SHT genannt, da sich dieses sehr früh entwickelt und einen großen Anteil an der Zunahme des Hirnvolumens nach SHT hat.^(49, 52, 53) Marmarou et al. berechneten für die vaskuläre Komponente der Hirnschwellung nach schwerem SHT einen Anteil von 25%.⁽⁵⁴⁾ Abbildung 1 gibt eine schematische Übersicht über die zeitliche Entwicklung des zytotoxischen sowie des vasogenen Ödems nach Trauma und deren Anteil an der Hirnschwellung.⁽⁴⁹⁾

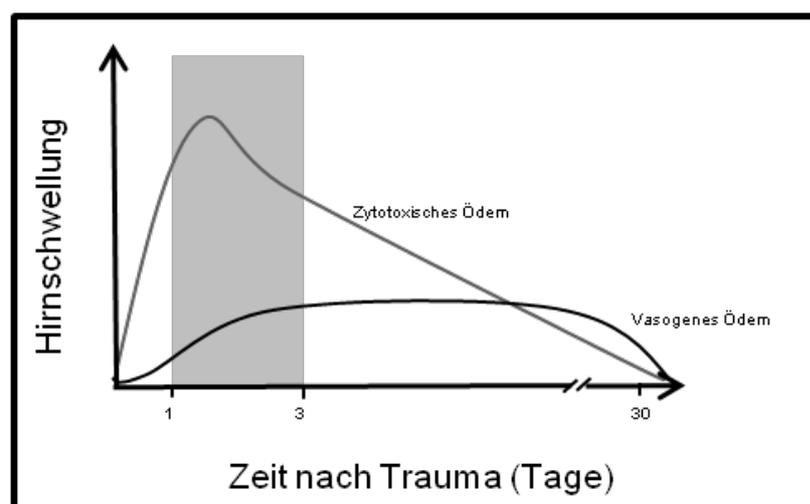


Abbildung 1: Übersicht über die zeitliche Entwicklung des zytotoxischen sowie des vasogenen Ödems nach Trauma und deren Anteil an der Hirnschwellung

Das zytotoxische Ödem gilt als Hauptverursacher der posttraumatischen Hirnschwellung. Es entwickelt sich im Gegensatz zum vasogenen Ödem direkt nach erfolgtem SHT.

Modifiziert nach Reilly P. und Bullock R. 2005

Einleitung

Auch das von uns gewählte tierexperimentelle SHT-Modell (Controlled Cortical Impact-Model, CCI-Modell; Beschreibung siehe unten) zeigt ein ausgeprägtes zytotoxisches Hirnödem.^(48, 50, 55)

Das intrakranielle Gesamtvolumen besteht laut der Monro-Kellie-Doktrin aus Liquor cerebrospinalis, Hirnparenchym und Blut.^(56, 57) Steigt das Volumen einer dieser drei Komponenten an, zum Beispiel posttraumatisch das Hirnparenchymvolumen durch ödematöse Zellschwellung, kann diese Volumenzunahme initial durch Verdrängung der anderen Komponenten (Liquor und/oder Blut) kompensiert werden.⁽⁵⁶⁻⁵⁸⁾ Wird jedoch diese Kapazitätsreserve aufgebraucht, kommt es innerhalb des Schädels zu einer exponentiellen Zunahme des ICP (Normwert: 5-18 cmH₂O bzw. 3-13 mmHg, kritischer ICP: 20-25 mmHg),^(58, 59) was letztendlich zur Herniation des Gehirns und somit zur irreversiblen Hirnschädigung und Tod führen kann.^(3, 60) Besonders die axiale transtentorielle Herniation, bei der Di- und Mesencephalon durch den Tentoriumschlitz (Incisura tentorii) hindurch verlagert werden, gilt als akut lebensbedrohliche Situation.⁽⁶⁰⁾ Durch den gesteigerten ICP verschlechtert sich die bereits vorhandene Beeinträchtigung der zerebralen Durchblutung weiter, was zu einer Verstärkung der Ischämie führt und in einem Circulus vitiosus über die ischämische Zellschädigung das Fortschreiten des zytotoxischen Ödems und einen weiteren Anstieg des intrakraniellen Drucks begünstigt.^(46, 48, 58) Abbildung 2 zeigt diesen Teufelskreis aus Ischämie, Hirnödem und Anstieg des ICPs.

Einleitung

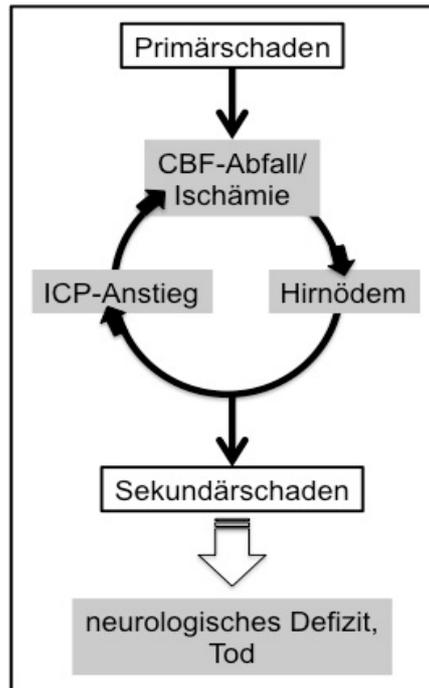


Abbildung 2: Circulus vitiosus aus Ischämie, Hirnödemen und Anstieg des intrakraniellen Drucks (Intracranial Pressure; ICP)

Durch den Primärschaden kommt es zu einer Reduktion der Hirndurchblutung (Cerebral Blood Flow; CBF). Dies führt über ischämische Zellschädigung zu einer Zellschwellung (zytotoxisches Ödem) und dadurch zu einem Anstieg des ICP. Durch die Erhöhung des ICP wird der CBF weiter reduziert und dadurch die Ischämie sowie das zytotoxische Hirnödem verstärkt.

Innerhalb von Stunden nach SHT greift so die Zellschädigung von der Primärläsion ausgehend auf Hirnregionen über, die initial nicht vom physikalischen Trauma geschädigt wurden.^(48, 50)

Posttraumatisch lassen sich in in-vitro an Hirnschnitten erhebliche Neurotransmitter- und Elektrolytveränderungen nachweisen. Experimentell konnte gezeigt werden, dass in traumatisch geschädigtem Hirnparenchym eine stark erhöhte Konzentration neuronaler Mediatoren wie Ca^{2+} , Glutamat, H^+ , Arachidonsäure, Histamin und Kininen vorliegt, was zur Entstehung sowohl eines zytotoxischen als auch eines vasogenen Ödems entscheidend beiträgt.^(50, 51, 61-63) Besondere Bedeutung hat dabei Glutamat aus präsynaptischen Nervenendigungen. Glutamat gehört unter physiologischen Bedingungen zu den wichtigsten exzitatorischen Neurotransmittern und wird für die Vermittlung von Sinneswahrnehmungen, Motorik und höheren Gehirnfunktionen (z. B. Gedächtnis- und Lernfunktionen) benötigt, weshalb es fast ubiquitär im Hirnparenchym zu finden ist.⁽⁶⁴⁾ Seine Wirkung entfaltet sich über ionotrope (direkte Öffnung eines Ionenkanals) und metabotrope (Aktivierung von Second Messangern) Rezeptoren.⁽⁴⁹⁾ Eine detaillierte Übersicht über die Glutamat-

Einleitung

Rezeptoren gibt das Buch von Peter L. Reilly und Ross Bullock „Head Injury – Pathophysiology and Management“.⁽⁴⁹⁾ Sowohl nach experimenteller als auch nach klinischer Schädigung des Hirnparenchyms zeigt sich ein exzessiver extrazellulärer Anstieg von Glutamat (Normalwert: 5-15 $\mu\text{mol/l}$,^(53, 65, 66) Anstieg bis auf 78.2 ± 73.9 $\mu\text{mol/l}$ bei schwerem SHT⁽⁶⁶⁾), welcher zum einen durch eine gesteigerte Exozytose, zum anderen durch die posttraumatisch beeinträchtigte Elimination (aufgrund Herabregulation des Glutamattransporters GLT-1) bedingt wird.^(49, 67-70) Dies führt durch Aktivierung der oben genannten Rezeptoren zu einem zytotoxischen postsynaptischen Einstrom von Natrium und Kalzium.^(26, 49) Der so entstandenen Ionen-Umverteilung folgt passiv ein Wasser- und Chlorid-Einstrom, was Zellschwellung, Nekrose und Apoptose bewirkt.⁽⁴⁹⁾ Des Weiteren sorgen die Stoffwechselfvorgänge, die durch Glutamat ausgelöst werden, sowie die Generierung von Glutamat selbst zu einer massiven Depletion der Energiereserven des Gehirns in Form von Adenosintriphosphat (ATP).⁽⁷¹⁾ Abbildung 3 zeigt eine vereinfachte Darstellung der Kalzium-Glutamat-Kalzium-Kaskade nach neuronaler Schädigung wie z.B. dem SHT.

Einleitung

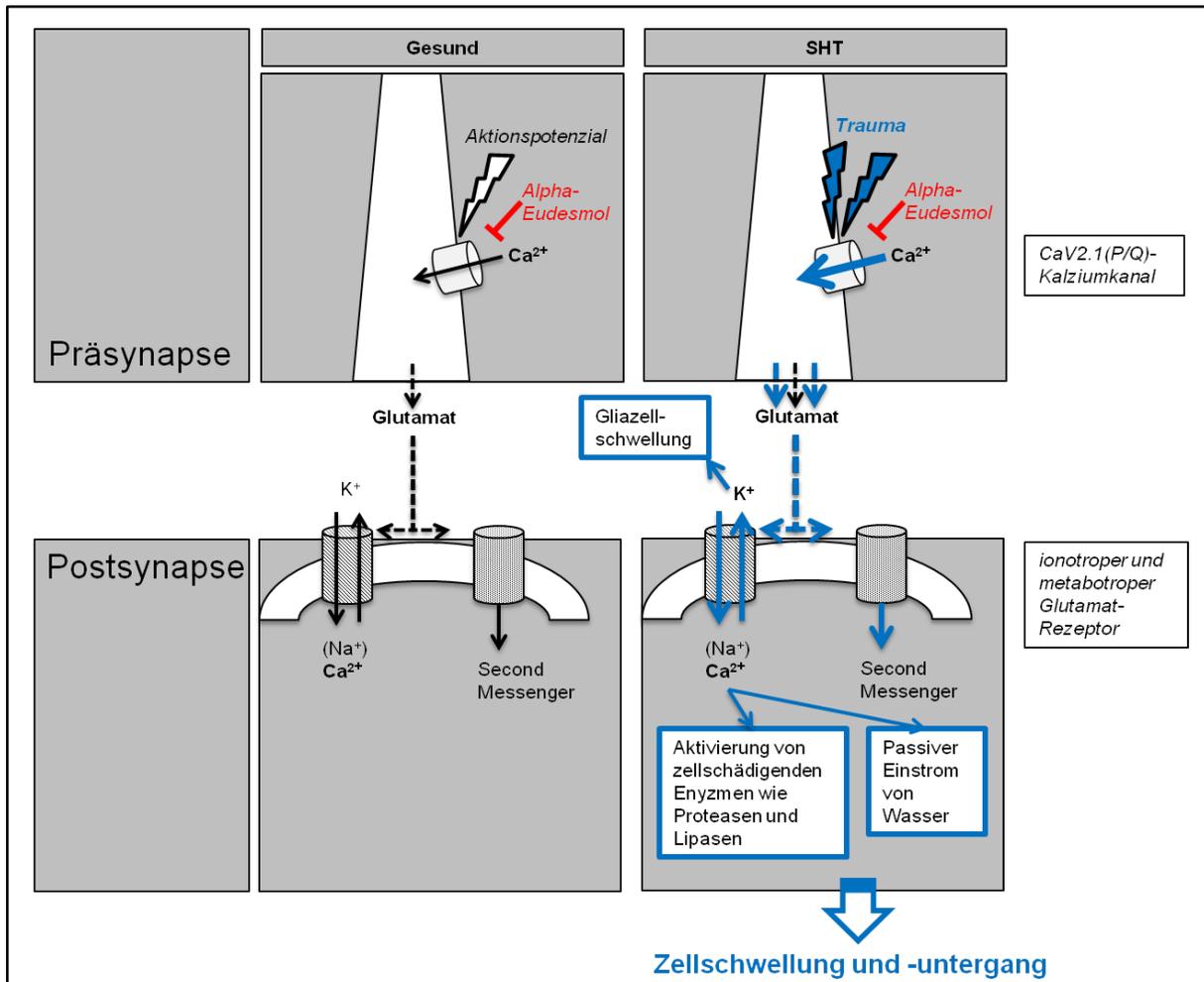


Abbildung 3: Kalzium-Glutamat-Kalzium Kaskade im gesunden Gehirn sowie nach SHT

Durch ein Aktionspotenzial wird der spannungsabhängige CaV2.1(P/Q)-Kalziumkanal aktiviert. Der Einstrom von Kalzium (Ca²⁺) in die Präsynapse löst die Exozytose von Glutamat in den synaptischen Spalt aus. Im durch Trauma geschädigten Gehirn wird der CaV2.1(P/Q)-Kalziumkanal verstärkt aktiviert, was in einer exzessiv gesteigerten Glutamatausschüttung resultiert. Über postsynaptische ionotrope Glutamat-Rezeptoren kommt es proportional zur Glutamatmenge im synaptischen Spalt zu einem Ca²⁺-Einstrom in die Zellen. Im durch SHT geschädigten Gehirn führt der verstärkte Einstrom von Ca²⁺ zu einem erhöhten passiven Einstrom von Wasser, was eine Zellschwellung (zytotoxisches Ödem) bedingt, zum anderen zu einer massiven Aktivierung von zellschädigenden Enzymen wie Lipasen und Proteasen, was zum Untergang der Zelle führt. Der Überschuss an Kaliumionen im synaptischen Spalt wird von Gliazellen aufgenommen, wodurch diese anschwellen und den ICP sowie die Hirndurchblutung negativ beeinflussen. Alpha-Eudesmol, ein Inhibitor des CaV2.1(P/Q)-Kalziumkanals, greift am Beginn dieser Kalzium-Glutamat-Kalzium Kaskade ein.

Modifiziert nach Aktories et al. 2009

Durch den progredienten Gewebeuntergang steigt die Kaliumionenkonzentration extrazellulär an.^(72, 73) Gliazellen, welche die Neurone umgeben, nehmen das überschüssige Kalium auf, was zum Anschwellen führt und somit den ICP weiter steigert und die Durchblutungssituation durch externe Kompression der Blutgefäße weiter verschlechtert.^(40, 49)

Einleitung

Das Schädelhirntrauma löst eine inflammatorische Reaktion aus und bedingt so die Produktion von zytotoxischen ROS und führt dadurch, über Lipidperoxidation, zu direkter Zellschädigung bzw. zu einer Schädigung der Phospholipidmembran, wodurch ein weiterer Einstrom von Wasser und damit die Entstehung des zytotoxischen Ödems begünstigt wird. ^(49, 74-78)

Stickstoffmonoxid spielt eine wichtige und vielfältige Rolle nach SHT.⁽⁷⁹⁾ Überschuss von NO führt über Gefäß-Weitstellung sowie Produktion freier Radikale letztlich zu einem Zusammenbrechen der Blut-Hirnschranke (vaskuläres Ödem) und direkter Zellschädigung (zytotoxisches Ödem); bei NO-Mangel kommt es zu einer weiteren Reduktion des CBF und Verschlechterung des ischämischen Zellschadens.⁽⁸⁰⁻⁸⁶⁾ Zu oben genannten intrakraniellen Vorgängen lassen sich bei SHT-Patienten häufig auch systemische Reaktionen feststellen. Der Cushing-Reflex ist eine sympatho-adrenale systemische Reaktion auf hohe ICP-Werte, welche zu Hypertension, Tachykardie und Apnoe führt.^(30, 31) Des Weiteren lässt sich in einigen Fällen eine Hyperthermie beobachten.^(87, 88) Die pathophysiologischen Veränderungen des Sekundärschadens nach SHT sind demnach nicht nur auf das Gehirn beschränkt, sondern beeinflussen wichtige Funktionen des Gesamtorganismus.

1.1.5 Therapie

Das Management des SHT muss in präklinische, d. h. direkt am Unfallort stattfindende und in klinische Maßnahmen unterteilt werden. Die Zeit zwischen Notfall- und endgültiger Versorgung in einem Krankenhaus muss so gering wie möglich gehalten werden. Schwerverletzte und bewusstlose Patienten mit SHT sollten innerhalb von 90 Minuten einer Therapie zugeführt werden.⁽⁸⁹⁾ Von SHT-Patienten sollte zusätzlich innerhalb von 60 Minuten eine Computertomographie des Kopfes (Cranial Computed Tomography; CCT) angefertigt werden.⁽⁸⁹⁾ Da das Hirnparenchym die geringste Sauerstoffmangeltoleranz aller Organe hat, ist die rechtzeitige Behandlung entscheidend für das Überleben bzw. das Ausmaß der bleibenden Behinderung des Verletzten.⁽²⁾ Die größte Auswirkung auf das Überleben und die Folgeschäden nach SHT hat heutzutage die Aufrechterhaltung bzw. Wiederherstellung lebenswichtiger physiologischer Basisparameter, insbesondere die Oxygenierung des Blutes sowie ein ausreichender Blutdruck.⁽²⁾ Von Park et al. wird jedoch ein Wandel vorhergesagt, weg von der reinen Stabilisierung der

Einleitung

Kreislauf- und Beatmungssituation und hin zur zielgerichteten medikamentösen, molekularen und genetischen Therapie.⁽²⁶⁾

Die zentrale Aufgabe im präklinischen Management des SHT besteht in der Aufrechterhaltung eines ausreichenden mittleren arteriellen Blutdrucks (Mean Arterial Pressure; MAP) bzw. einer arteriellen Normotonie sowie einer Normoxämie, um eine ausreichende Sauerstoff- und Blutversorgung des Gehirns zu gewährleisten.^(2, 90) Als Therapie bei Hypotension werden Volumenersatzmittel wie Kristalloide oder Kolloide und Vasopressoren wie Noradrenalin empfohlen.^(2, 91, 92) Letztere werden jedoch kritisch beurteilt und sollen deshalb nur kurz und zurückhaltend verabreicht werden.⁽⁹³⁾ Um eine ausreichende Oxygenierung des Patienten am Unfallort zu gewährleisten gilt generell ein GCS-Wert unter 9 als Indikation für eine Notfallnarkose und Intubation.⁽⁹³⁾ Diese Indikationsstellung muss jedoch individuell an die Traumasituation angepasst werden.^(93, 94) Besteht Verdacht auf ein Mittelhirnsyndrom durch transtentorielle Herniation ist eine milde Hyperventilation sowie die Gabe von Mannitol ohne vorherige ICP-Messung gerechtfertigt.^(2, 90) Eine antikonvulsive Prophylaxe^(2, 95, 96) sowie die Gabe von Barbituraten^(2, 97) in der prähospitalen Phase gilt als umstritten und muss als Einzelfallentscheidung individuell getroffen werden. Eine Oberkörperhochlagerung auf 30 Grad sollte erfolgen, soweit es die Behandlungssituation zulässt.⁽²⁾ Die früher gebräuchliche Gabe von Glukokortikoiden zur Prävention bzw. Reduktion eines gesteigerten intrakraniellen Drucks gilt als obsolet.^(93, 98) Für weitere Medikamente, wie Kalzium- und Glutamat-Rezeptor-Antagonisten, die experimentell eine hirnpotektive Wirkung zeigten, besteht noch unzureichende Evidenz, weshalb sie in aktuellen Leitlinien nicht empfohlen werden.⁽²⁾

Im Krankenhaus zählt das CCT zum Goldstandard der bildgebenden Diagnostik beim SHT und sollte bei allen Patienten durchgeführt werden, bei welchen Verdacht auf eine Verletzung des Gehirns besteht.⁽²⁾ Wie oben erwähnt, dient die Therapie dazu, die Ausbreitung des Sekundärschadens zu verhindern. Dies schließt auch ein, dass nicht zerstörtem, aber bereits funktionsgeschädigtem Hirngewebe optimale Bedingungen zur funktionellen Regeneration gegeben werden muss.⁽²⁾ Deshalb stellen alle raumfordernden, intrakraniellen Verletzungen (traumatische intrakranielle Blutungen oder raumfordernde Impressionsfaktoren) eine absolute und dringliche Operationsindikation dar.⁽²⁾ Auch wenn keine pauschale Empfehlung zur entlastenden Hemikraniektomie gegeben werden kann,^(2, 99, 100) zeigen neuere Daten

Einleitung

bei ischämischem Schlaganfall deren positive Auswirkung auf Mortalität und Morbidität sogar bei älteren Patienten mit Hirnschwellung.⁽¹⁰¹⁾ Die Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf das SHT ist jedoch umstritten, da die Hemikraniektomie in einer Studie sogar ein schlechteres neurologisches Outcome ohne Effekt auf die Mortalität gezeigt hat.⁽¹⁰²⁾ Eine großangelegte Multicenter-Studie (RESCUEicp-Trial)⁽¹⁰³⁾ wird weitere Erkenntnisse zur Bedeutung der Kraniektomie in der Therapie des SHT bringen. Die Entscheidung zur operativen Therapie wird sowohl anhand des CCT- als auch anhand des klinischen Befundes getroffen.⁽²⁾ Die invasive Messung des ICP ist generell bei bewusstlosen Patienten mit Verdacht auf erhöhten Intrakraniellen Druck indiziert und dient der Überwachung und Therapiesteuerung, muss jedoch an die individuelle Situation angepasst werden.^(2, 90) Durch das ICP-Monitoring können gerade bei sedierten und bewusstlosen Patienten, bei denen die Überwachung zerebraler Funktionen nicht oder nur eingeschränkt möglich ist, frühzeitig Gegenmaßnahmen gegen eine drohende Mittelhirneinklemmung ergriffen werden.⁽²⁾ Zur Behandlung eines intrakraniellen Druckes über 20 mmHg wird die Gabe von Osmodiuretika (Mannitol) oder hypertoner Natriumchlorid-Lösung empfohlen, wobei der zerebrale Perfusionsdruck (Cerebral Perfusion Pressure; CPP – Normwert: 60-180 mmHg)^(104, 105) dabei in den Grenzen von 50 bis 70 mmHg gehalten werden soll.^(2, 90, 106, 107) Für den Gebrauch von Barbituraten, Antikonvulsiva, Glukokortikoiden und Volumenersatzmittel in der klinischen Versorgung gelten dieselben Empfehlungen wie für das präklinische Management von SHT-Patienten.⁽²⁾ Maßnahmen wie der Gebrauch einer hyperbaren Sauerstofftherapie, Osmodiuretika zur ICP-Senkung, (Analgo-)Sedierung, die Induktion einer Hypothermie sowie Hyperventilation des Patienten müssen aufgrund der Nebenwirkungen an die jeweilige Situation individuell angepasst werden.^(2, 58) In Tabelle 3 sind alle aktuellen Therapieempfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie nach deren Empfehlungsgrad alphabetisch aufgeführt.^{(2) (58)}

Einleitung

A	<ul style="list-style-type: none"> • Keine Glukokortikoide • Operation mit absoluter Dringlichkeit bei raumfordernden, intrakraniellen Verletzungen
B	<ul style="list-style-type: none"> • Antikonvulsive Therapie • Operation mit aufgeschobener Dringlichkeit bei Impressionsfrakturen ohne Mittellinienverlagerung, penetrierende Verletzungen sowie basale Frakturen mit Liquorrhoe
0	<ul style="list-style-type: none"> • (Analgo)sedierung • Antibiotikaprophylaxe bei frontobasalen Frakturen mit Liquorrhoe • Barbiturate bei therapierefraktären Hirndruckkrisen • Entlastungskraniektomie bei erhöhtem intrakraniellen Druck • Gabe von Mannitol bei erhöhtem ICP, bei Verdacht auf transtentorielle Herniation auch ohne vorherige ICP-Messung • Hyperbare Sauerstofftherapie • Hypertone Kochsalzlösung • Hyperventilation bei V.a transtentorielle Herniation sowie Zeichen des Mittelhirnsyndroms • Hypothermie • Konservative Therapie bei nicht raumfordernden intrakraniellen Blutungen • Oberkörperhochlagerung auf 30 Grad

Tabelle 3: Therapieempfehlungen für das Schädel-Hirn-Trauma nach den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie aufgeteilt in Empfehlungsgrade

Empfehlungsgrad A: starke Empfehlung (Evidenzgrad nach dem Oxford Center of Evidence based Medicine 2001:1a-1b); Empfehlungsgrad B: Empfehlung (Evidenzgrad 2a-3b); Empfehlungsgrad 0: Empfehlung offen (Evidenzgrad 4-5). ICP (Intracranial Pressure)

Modifiziert nach den Leitlinien für Schädel-Hirn-Trauma im Erwachsenenalter der Dt. Ges. f. Neurochirurgie 2010

An die präklinische und klinische Akutbehandlung schließt sich für die Mehrzahl der Patienten je nach neurologischer Beeinträchtigung eine neurologisch/neurochirurgische (Früh-)Rehabilitationsbehandlung an.⁽²⁾

1.1.6 Prognoseparameter

Trotz der Tatsache, dass es sich bei dem SHT um ein Krankheitsbild mit hoher Prävalenz und steigender Inzidenz handelt, ist eine präzise Prognoseabschätzung bisher nicht sicher möglich.⁽¹⁰⁸⁾ Ein Patientenalter über 60, reduzierte Pupillenmotorik, niedrige GCS-Werte bei Eintreffen des Notarztes (vor allem für die Motorik), die Größe und Lokalisation der Läsionen im CT sowie ein erhöhter

Einleitung

intrakranieller Druck wurden als wichtige prognostische Faktoren identifiziert.^(108, 109) Jedoch bleibt die Wichtung der einzelnen Aspekte sowie ihr genauer Vorhersagewert unklar.⁽¹⁰⁸⁾ Wie oben beschrieben nimmt das zytotoxische Hirnödem eine zentrale Rolle in der Entstehung und der Schwere des Sekundärschadens ein. Durch die dadurch ausgelöste Erhöhung des ICP und das Fortschreiten der Primärläsion bedingt dieses zwei von fünf wichtigen Prognosefaktoren direkt sowie die Pupillenmotorik und den GCS-Wert indirekt. Ein valider Prädiktor für Ausprägung und Verlauf des zytotoxischen Hirnödems nach SHT existiert jedoch nicht.

Neuere Studien versuchen gezielt, genetische Prädispositionsfaktoren für ein Schadens-Outcome zu identifizieren.^(110, 111) So wurden das Apolipoprotein E Epsilon 4 (APOE4)-Allel,⁽¹¹²⁻¹²⁰⁾ der Arg/Arg - Genotyp des Arg72Pro-Polymorphismus von p53,⁽¹²¹⁾ das Dopamin D2-Rezeptor (DRD2) – T - Allel⁽¹²²⁾ und der Catechol-O-methyltransferase (COMT)Val158Met - Genotyp⁽¹²³⁾ (dieser gilt jedoch als umstritten)⁽¹²⁴⁾ als Prädiktoren für ein schlechtes, die mitochondrialen Haplogruppen T und K⁽¹¹⁶⁾ als Prädiktoren für ein besseres Outcome nach SHT identifiziert.

Einige Patienten mit Familiärer Hemiplegischer Migräne Typ1 (FHM1) – einer seltenen autosomal-dominant vererbten besonders schweren Form der Migräne⁽¹²⁵⁾ – zeigten als Zufallsbefund bereits nach Bagateltrauma des Schädels ein massiv ausgeprägtes Hirnödem.⁽¹²⁶⁻¹²⁸⁾ Die maximale klinische Ausprägung dieser Erkrankung kann auf eine Missense-Mutation, die S218L-Mutation (TCA-Triplet auf Codon 218 → TTA; Leucin→Serin; Genbanknummer AF004883)⁽¹²⁹⁾ im CACNA1A-Gen zurückgeführt werden.^(125, 130, 131) Dieses Gen kodiert die α 1A-Untereinheit (α 1A pore-forming subunit) des spannungsabhängigen CaV2.1(P/Q)-Kalziumkanals (s. u., Kapitel 1.1.2) und beeinflusst somit die Bildung der transmembranösen Ionenpore.⁽¹²⁵⁾ Durch diese Mutation kommt es zu einer Herabsetzung der Aktivierungsschwelle, einer Verzögerung der Inaktivierung bei langer Depolarisation sowie zu einer schnelleren Erholung nach Inaktivierung. Dies führt insgesamt zu einer erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit dieses Kanals und somit zu einer gesteigerten Exozytose von Glutamat aus den präsynaptischen Nervenendigungen in den synaptischen Spalt.^{(129, 130) (130, 131)} Die FHM1 wird nicht nur durch die beschriebene S218L-Mutation verursacht, sondern kann durch aktuell 17 bekannte unterschiedliche Missensemutationen im CACNA1A-Gen hervorgerufen werden.^(129, 132-135) Diese weiteren Mutationen führen jedoch zu einem weitaus milderem Phänotyp, was auf eine geringere Steigerung der Öffnungswahrscheinlichkeit des

CaV2.1(P/Q)-Kalziumkanals im Vergleich zur S218L-Mutation zurückgeführt wird.^(129, 130, 136) Die Rolle dieser Mutationen für die Prognoseabschätzung sowie die Bedeutung für den Sekundärschaden nach SHT ist jedoch noch unklar.^(137, 138)

1.2 Zerebrale Kalziumkanäle

1.2.1 Allgemeines

An der synaptischen Endplatte führt ein eintreffendes Aktionspotenzial zur Öffnung spannungsabhängiger Kalziumkanäle, was eine Exozytose von Neurotransmittern zur Folge hat; dieser Vorgang wird elektrosekretorische Koppelung genannt.⁽¹³⁹⁾ Dabei müssen gleichartige Aktionspotenziale nicht immer die gleiche Menge an Neurotransmittern freisetzen, da deren Ausschüttung auch von präsynaptischen Rezeptoren (wie z.B. dem CB1-Rezeptor) moduliert werden kann.^(139, 140) In der Regel lässt sich über diese Modulatoren der präsynaptische Kalziumeinstrom verändern, was die Wahrscheinlichkeit der Neurotransmitter-Exozytose erhöht bzw. verringert.⁽¹³⁹⁾ Glutamat, welches eine entscheidende Rolle in der Entstehung des posttraumatischen Sekundärschadens spielt, unterliegt diesem Ausschüttungs-Mechanismus: Durch spannungsabhängige Kalziumkanäle, die CaV2.1(P/Q)-Kalziumkanäle, gelangt Kalzium in die Präsynapse und löst dort die Exozytose aus. Das so ausgeschüttete Glutamat aktiviert zum einen postsynaptisch ionotrope (AMPA-, NMDA- und Kainat-) und metabotrope (mGluR) Glutamatrezeptoren (siehe Abbildung 4), zum anderen hemmt sein Stoffwechselprodukt durch die Aktivierung präsynaptischer CB1 Rezeptoren seine weitere Exozytose.^(139, 140) Durch Glutamatbindung an ionotrope Rezeptoren kommt es in der Postsynapse zum Kalziumeinstrom. Dieses aktiviert dort das Enzym Diacylglycerol-Lipase (DAGL) und katalysiert somit die Bildung von 2-Arachidonoylglycerol (2-AG). Dieses wirkt auf den CB1-Rezeptor in der Präsynapse und hemmt hierdurch den weiteren präsynaptischen Kalzium-Einstrom, der für die Exozytose von Glutamat benötigt wird.⁽¹⁴⁰⁾ Der Exozytoseapparat besteht aus den löslichen (soluble) N-Ethylmaleimide – Sensitive – Factor – Attachment - Receptor(SNARE) - Proteinen: Synaptosomal-Associated Protein(SNAP)-25 und Syntaxin in der Zellmembran, sowie Synaptobrevin und Synaptotagmin - welches für den Kalziumsensor gehalten wird - in der Vesikelmembran.⁽¹³⁹⁾ Diese Proteine führen bei präsynaptischem Einstrom von Kalziumionen zur Verschmelzung von Axoplasma- und Vesikelmembran, der Bildung

Einleitung

einer Pore und somit letztendlich zur Auswärtsdiffusion des Neurotransmitters aus dem Vesikel.^(139, 141) Eine Übersicht dieser Vorgänge zeigt Abbildung 4.

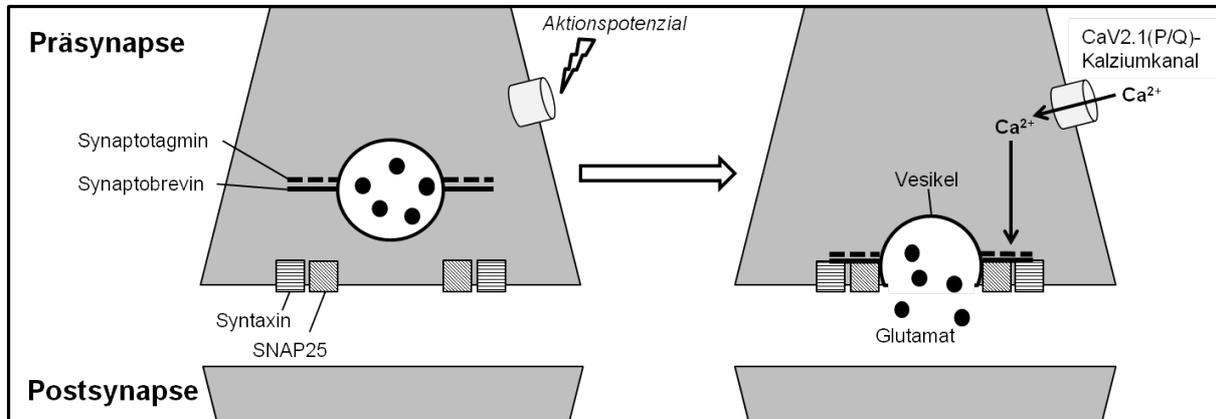


Abbildung 4: Exozytose von Glutamat

Durch den Kalzium(Ca^{2+})-Einstrom in die Präsynapse verbinden sich die N-Ethylmaleimide-Sensitive-Factor Attachment Receptor(SNARE)-Proteine: Synaptosomal-Associated Protein(SNAP)-25 und Syntaxin in der Zellmembran, sowie Synaptobrevin und Synaptotagmin der Vesikelmembran. Dies führt zur Verschmelzung von Axoplasma- und Vesikelmembran, der Bildung einer Pore sowie letztendlich zur Auswärtsdiffusion von Glutamat aus dem Vesikel in den synaptischen Spalt.

Modifiziert nach Gundelfinger et al. 2003

Jeder Kalziumkanal besteht aus vier bis fünf Untereinheiten. Die Alpha1-Untereinheit mit ihren vier homologen Domänen, welche wiederum je sechs Transmembransegmente besitzen, bildet die Pore, durch die Kalzium in die Zelle einströmen kann.^{(142, 143) (144)} Unterschiede in den Alpha1-Untereinheiten bestimmen die Eigenschaften des Ionenkanals; die anderen Untereinheiten sind für die Beeinflussung (Downstreaming) intrazellulärer Vorgänge zuständig.^(142, 143)

1.2.2 Der spannungsabhängige CaV2.1(P/Q)-Kalziumkanal

Bei dem CaV2.1(P/Q)-Kalziumkanal handelt es sich um einen transmembranösen, spannungsabhängigen Ionenkanal, welcher zur CaV2-Superfamilie gehört.⁽¹⁴²⁾ Diese Superfamilie unterscheidet sich von den anderen spannungsabhängigen Kalziumkanälen durch das Vorhandensein der Alpha1A-Untereinheit ($\alpha 1A$ pore-forming subunit), welche für die Bildung der Ionenpore verantwortlich ist. Er lässt sich experimentell durch das Spinnengift ω -Agatoxin selektiv blockieren.^(125, 142, 145) Im zentralen Nervensystem sind diese fast ubiquitär im Gehirn vorkommenden Kanäle für die synaptische Transmission zwischen Neuronen mit Glutamat und γ -Aminobuttersäure (GABA) verantwortlich.^(142, 145-148) Knockout-Mäuse für das Alpha1A

Einleitung

kodierende Gen zeigen dysfunktionale CaV2.1(P/Q)-Kalziumkanäle und haben eine deutlich reduzierte Lebenszeit sowie Ataxie und Dystonie.^(145, 149) Eine Überfunktion dieses Kanals wird als Ursache bzw. als entscheidender Faktor bei der Pathophysiologie unterschiedlicher neurologischer Krankheitsbilder sowie bestimmten Formen der Epilepsie⁽¹⁵⁰⁻¹⁵²⁾ oder der Migräne^(126-128, 130) gesehen, ohne jedoch den genauen Mechanismus zu kennen.

Wie bereits beschrieben wurde bei Patienten mit FHM Typ 1 eine Überfunktion, engl. Gain-Of-Function, des CaV2.1(P/Q)-Kalziumkanals nachgewiesen. Die maximale phänotypische Ausprägung dieser Erkrankung mit einer massiv gesteigerten Hirnödementwicklung nach bereits leichtem SHT findet sich in Patienten mit der S218L-Missensemutation (TCA-Triplet auf Codon 218 → TTA; Leucin → Serin)⁽¹²⁹⁾ im CACNA1A-Gen (auf Chromosom 19), welche im Vergleich zu den anderen CACNA1A-Mutationen die höchste Öffnungswahrscheinlichkeit dieses Kalziumkanals bedingt.^(125, 130, 131) Die R192Q-Mutation (CGG-Triplet auf Codon 192 → CAG; Arginin → Glutamin)⁽¹⁵³⁾ des CACNA1A-Gens zeigte eine deutlich geringer ausgeprägte Öffnungswahrscheinlichkeit des CaV2.1(P/Q)-Kalziumkanals als die S281L-Mutation^(129, 154) und führt beim Menschen nur zu einer leichten Ausprägung der FHM,⁽¹⁵⁵⁾ wohingegen die S218L-Mutation sowohl bei Mäusen als auch bei Menschen neben den typischen Symptomen der FHM eine exzessiven Ödementstehung nach Bagatelltraumen sowie weitere neurologische Störungen wie Ataxie und Epilepsie verursacht.^(126-128, 131) In tierexperimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass in S218L-Mutanten der CaV2.1(P/Q)-Kalziumkanal bereits bei einem Membranpotenzial nahe dem Ruhepotenzial der Neurone aktiviert wird und eine signifikant höhere Öffnungswahrscheinlichkeit besitzt als in Wildtyp-Tieren, was einem erhöhten präsynaptischen Kalziumeinstrom zur Folge hat.^(129, 153, 154, 156, 157) Diese Mutation verursacht nicht nur eine deutliche Verringerung der Aktivierungsschwelle, sie verhindert zudem eine schnelle Inaktivierung des Kanals und führt nach erfolgter Inaktivierung zu einer deutlich verkürzten Refraktärzeit.^(129, 130)

Die Bedeutung dieser S218L-Mutation und daraus resultierenden Funktionserhöhung des CaV2.1-Kalziumkanals für den Sekundärschaden nach SHT ist jedoch noch nicht untersucht.^(137, 138)

1.3 Die kortikale Streudepolarisation (Cortical Spreading Depolarization)

1.3.1 Definition

Unter dem 1944 erstmals beschriebenen Phänomen der CSD versteht man eine „simultane Depolarisationswelle, die sich über den Kortex mit einer Geschwindigkeit von 2 bis 3mm/min ausbreitet und von einer Depolarisation der neuronalen Aktivität gefolgt wird, die bis zu einigen Minuten andauern kann“. ^(138, 158) Die CSD ist dabei eine neuronale Reaktion auf einen schädigenden Stimulus – mechanischer (Trauma), chemischer (Kaliumchlorid; KCl) oder elektrischer Natur. ^(138, 158-161)

Neurophysiologisch zeigt sich bei einer CSD eine Reduktion der Amplitude des Elektroenzephalogramms (EEG) bis hin zum kompletten Amplitudenverlust (Silencing), eine darauf folgende, transiente Negativierung des Direktstrom (Direct Current; DC)-Potentials um 5-30mv; hierauf folgt eine Reduktion des CBF mit anschließender transientser Hyperperfusion. ⁽¹³⁸⁾ Abbildung 5 zeigt ein vereinfachtes Schema dieser Veränderungen.

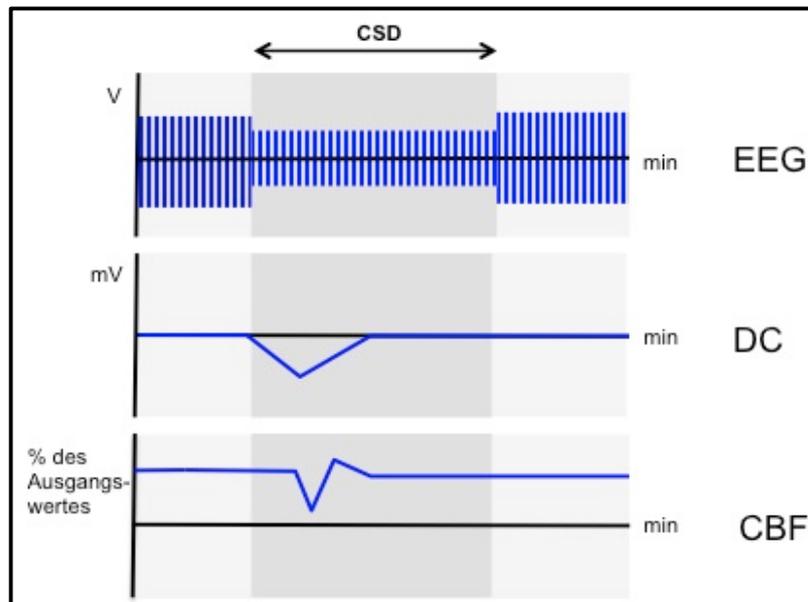


Abbildung 5: Schematische Darstellung einer kortikalen Streudepolarisation (Cortical Spreading Depolarisation; CSD)

Eine CSD zeichnet sich durch drei Merkmale aus: 1. Ein Amplitudenverlust im Elektroenzephalogramm (EEG); 2. Eine Negativierung des Direktstroms (Direct Current; DC); 3. Ein Abfall der Hirndurchblutung (Cerebral Blood Flow; CBF) mit darauffolgender kurzer Phase der Durchblutungssteigerung.

Abbildung Modifiziert nach Von Baumgarten et al. 2008 sowie Leao et al. 1944

Van den Maagdenberg et al. konnte bei S218L transgenen Mäusen eine Gen-Dosis abhängige Anfälligkeit für multiple kortikale Streudepolarisationen (Cortical Spreading

Depolarization, CSD) nach einem einzelnen elektrischen Stimulus festgestellt werden.⁽¹³⁰⁾ Nach einem Stimulus – mechanisch, chemisch oder elektrisch – auf den Cortex kommt es üblicherweise zu einer einzelnen, selten bzw. bei intensivem Stimulus zu mehreren Streudepolarisation (siehe unten). Die S218L Tiere zeigten eine ungewöhnlich hohe Frequenz multipler CSDs nach nur einem Stimulus. Tiere mit R192Q-Mutation, welche zu einer geringeren Öffnungswahrscheinlichkeit des CaV2.1-Kalziumkanals führt als die S218L-Mutation, zeigten zwar eine deutlich verringerte Auslöseschwelle (threshold) für CSDs, in diesem Genotyp traten jedoch kaum bzw. nicht häufiger als in Wildtyp-Kontrolltieren multiple CSDs durch einen einzelnen Stimulus auf.⁽¹²⁵⁾ Eine Überfunktion des CaV2.1(P/Q)-Kalziumkanals führt somit zu einer verringerten,⁽¹⁵⁷⁾ eine Unterfunktion zu einer erhöhten⁽¹⁶²⁾ Auslöseschwelle für CSDs. Die Tatsache, dass S218L-mutante Tiere sowohl eine enorm gesteigerte Anfälligkeit für CSD als auch für die Entstehung eines Hirnödems zeigten, lässt auf einen möglichen kausalen Zusammenhang zwischen CSDs und der Hirnödemenstehung nach SHT schließen.

Das Phänomen der CSD konnte sowohl in Tiermodellen als auch bei Menschen nach SHT nachgewiesen werden^(138, 163-165) und hat nach Mayevsky et al. dieselbe pathophysiologische Genese wie nach anderen zerebralen Insulten.⁽¹⁶³⁾ CSDs kommen neben dem Schädelhirntrauma auch bei anderen neurologischen Krankheitsbildern (Migräne⁽¹⁶⁶⁻¹⁶⁸⁾, Hirnblutung^(160, 169, 170), zerebraler Ischämie^(161, 171-173)) vor. Jedoch ist das Auftreten der Streudepolarisation bei oben aufgeführten Erkrankungen nicht obligat und kann in der Klinik nicht bei allen Patienten detektiert werden.^(160, 174) Auch zeigen die CSD-Wellen eine große Variabilität sowohl inter- als auch intraindividuell.⁽¹⁷⁵⁾

1.3.2 Pathomechanismus

Durch einen der oben beschriebenen Stimuli kommt es zu einer Veränderung der intra- und extrazellulären Ionenzusammensetzung (neuronal Depolarisation) – Einstrom von Natrium, Kalzium und Chlorid, Ausstrom von Kalium.^(159, 163, 167, 176)

Es wird angenommen, dass der präsynaptische Kalziumeinstrom und die daraus resultierende Glutamatexozytose der entscheidende Mechanismus für die Entstehung und Aufrechterhaltung der CSD ist.^(177, 178) Um die Ionenhomöostase

Einleitung

wieder herzustellen erhöht sich die Aktivität membranständiger Ionenpumpen, wie der Na^+/K^+ -ATPase. Da diese für ihre Funktion Energie in Form von ATP benötigen, kommt es zu einem erhöhten Sauerstoff-Verbrauch im Hirngewebe, zu einer Ausschöpfung der ATP-Reserven und zu einem Abfall der lokalen Glukose-Konzentration um fast 50%.^(71, 161, 165) Zur Regeneration der verbrauchten Energiereserven reagiert das Hirnparenchym mit einer Zunahme des oxidativen Stoffwechsels.⁽¹⁶⁵⁾ Ist das betroffene Parenchym jedoch von versorgenden Blutgefäßen weiter entfernt oder sind die Sauerstoffreserven aufgrund eines schädigenden Stimulus (Trauma, Infarkt, Blutung) reduziert, kommt es zur Entstehung einer Gewebshypoxie.⁽¹⁶⁵⁾ Die Annahme, dass es sofort nach Depolarisation zu einer Kompression der Blutgefäße und damit zu einer Oligämie kommt, die aufgrund von Astrozytenschwellung als Reaktion auf den extrazellulären Anstieg von Kalium entsteht,^(165, 179, 180) konnte nicht bestätigt werden. Vielmehr zeigt sich während und kurz nach CSD eine geringe Vasodilatation, sowohl bei Arterien, als auch bei Venen, und damit verbunden eine Zunahme des CBF.^(161, 163, 165) Die oben erwähnte Vasokonstriktion tritt erst kurz nach dieser Vasodilatation auf.⁽¹⁶⁵⁾ Zwar erhöht sich durch den initialen Anstieg des CBF die Menge des verfügbaren Sauerstoffs, dieser reicht jedoch in vorgeschädigtem Hirnparenchym teilweise nicht aus, um genug Energie über den oxidativen Stoffwechselweg zu erzeugen und um die Ionenhomöostase vollständig wiederherzustellen.⁽¹⁶⁵⁾ Die beschriebenen Veränderungen sind unter physiologischen Bedingungen ein komplett reversibles Phänomen. Obwohl also die CSD-Wellen nicht primär zu irreversiblen Gewebeschaden im Gehirn führen, können sie in einem bereits vorgeschädigten Hirnparenchym über die Depletion der Energiereserven sowie die Entstehung einer Gewebshypoxie den sekundären Hirnschaden verstärken.^(159, 165, 179) Es wurde von Nedergaard et al. nachgewiesen, dass die CSD im gesunden, ausreichend perfundierten und oxygenierten Hirn harmlos sind und zu keinem Gewebeuntergang führen.⁽¹⁵⁹⁾ Ist jedoch das Parenchym bereits durch Hypoxie und Ischämie vorgeschädigt – wie dies beim Schädelhirntrauma der Fall ist, wird angenommen, dass die Auswirkungen der CSD (Depletion von Energiereserven, veränderte Ionenhomöostase) nicht ausreichend kompensiert werden können und das betroffene Gewebe somit weiter geschädigt wird.^{(165, 179) (181-183)} Wahrscheinlich spielt die CSD eine wichtige Rolle bei der sekundären Schädigung bereits beeinträchtigten Gehirnparenchyms nach SHT,^(184, 185) die genaue Bedeutung

Einleitung

für den sekundären Hirnschaden und für die Prognose nach SHT sowie die genauen Schädigungsmechanismen sind jedoch noch unklar.^(174, 184)

2 Ziel der vorliegenden Doktorarbeit

Die vorliegende Doktorarbeit hat das Ziel, die Bedeutung des CaV2.1(P/Q)-Kalziumkanals für die Pathophysiologie, Therapie und Prognostik des Sekundärschadens nach Schädelhirntrauma zu untersuchen.

Es soll zunächst an Knock-In Mäusen, welche einen Funktionsgewinn (Gain of Function) im CaV2.1(P/Q)-Kalziumkanal haben, die Bedeutung dieser Mutation für den Sekundärschaden nach SHT untersucht werden. Durch spezifische pharmakologische Blockade des Kanals in gesunden Tieren soll hiernach untersucht werden, ob der Sekundärschaden verringert bzw. verhindert werden kann. Des Weiteren soll die Rolle des CaV2.1(P/Q)-Kalziumkanals bei der Entstehung von posttraumatisch auftretenden kortikalen Streudepolarisationen und deren Bedeutung für den Sekundärschaden nach SHT eruiert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Allgemeine Versuchsdurchführung

Die vorliegende tierexperimentelle Arbeit erfüllt die „Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments“ (ARRIVE) Kriterien und wurde am Institut für Chirurgische Forschung von November 2009 bis November 2012 durchgeführt.⁽¹⁸⁶⁾ Die beschriebenen Prozeduren und Protokolle wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt (Protokoll-Nummer: AZ 55.2-1-54-2531-118-05; AZ 55.2-1-54-2532-132-11) und im Einklang mit den aktuellen Richtlinien für Tierversuche durchgeführt.

Alle Versuche wurden randomisiert und verblindet durchgeführt, sowohl im Bezug auf die verwendeten Mäuse, als auch im Bezug auf die verwendeten Substanzen. Die Auswahl der Versuchstiere sowie der verwendeten Substanzen erfolgte durch ein Losverfahren. Die Verblindung erfolgte durch Laborpersonal, das weder an der Versuchsdurchführung noch an der Auswertung beteiligt war. Die Auflösung der Verblindung wurde erst nach kompletter Auswertung der gewonnenen Daten durchgeführt.

3.1.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Als Versuchstiere wurden männliche C57bl/6 Mäuse (Charles River, Kisslegg) sowie männliche und weibliche S218L-CACNA1A transgene Mäuse (hetero-, homozygot und Wildtyp) von unserem Kollaborationspartner Van den Maagdenberg aus den Niederlanden verwendet. Die genaue Vorgehensweise zur Induktion der Genmutation wird ausführlich von dessen Arbeitsgruppe beschrieben⁽¹³⁰⁾ und wird deshalb im Folgenden nur in kurzer Übersicht dargestellt. Ein Zielvektor, der neben der beim Menschen bekannten S218L-Mutation (Austausch des Codon 218 TCA-Triplets gegen TTA) in Exon 5 noch eine von zwei LoxP (Locus of X-over P)-DNA-Sequenzen flankierte Neomycin-Kassete enthält, wird in embryonale Stammzellen der Maus via Elektroporation eingebracht. Durch Southern-Blot Analyse wurde eine erfolgreiche Einbringung des Zielvektors in die DNA, durch PCR-Amplifikation von Exon 5 das Vorhandensein der S218L-Mutation bestätigt. Die so als erfolgreich gezüchtet bestätigten Zellen wurden in C57bl/6J Maus-Blastozysten implantiert (1. Generation). Der heterozygote Nachwuchs (2. Generation) dieser so entstandenen chimären Tiere wurde mit EIIA-Cre deleter Mäusen, in denen die Cre(Causes Recombination)-Recombinase exprimiert wird, gekreuzt. Die Cre-Recombinase greift

an den beiden gleichsinnig ausgerichteten LoxP-Sequenzen an und entfernt somit die Neomycin-Kassette. Mäuse, bei diesen der Vorgang erfolgreich war wurden gekreuzt. Die so entstehende 3. Generation bestand aus für die S218L-Mutation heterozygoten, homozygoten sowie wildtyp-Mäusen.⁽¹³⁰⁾ Abbildung 6 gibt einen schematischen Überblick über Herstellung der S218L-mutanten Zellen.⁽¹³⁰⁾

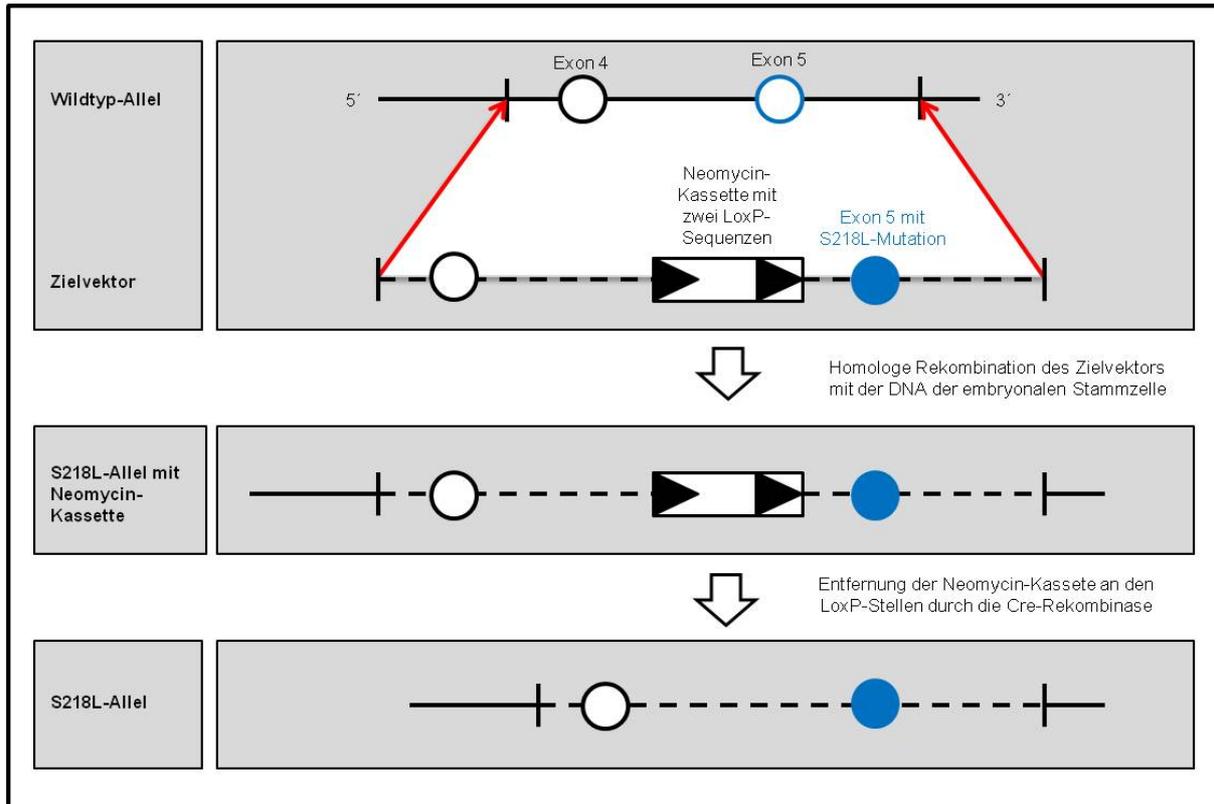


Abbildung 6: Herstellung der S218L-Mutanten

Ein Zielvektor mit der S218L-Mutation (Codon 218: TCA zu TTA) in Exon 5 sowie mit einer von zwei LoxP-Sequenzen flankierten Neomycin-Kassette wird in embryonale Stammzellen der Maus via Elektroporation eingebracht. Die durch PCR und Southern-Blot als erfolgreich infiziert bestätigten Zellen werden in C57bl/6J Maus-Blastozysten implantiert. Der heterozygote Nachwuchs dieser chimären Tiere wird mit EIIA-Cre deleter Mäusen, in denen die Cre-Recombinase exprimiert wird, gekreuzt. Die Cre-Recombinase entfernt die Neomycin-Kassette an den LoxP-Loci. Mäuse, bei welchen dieser Vorgang erfolgreich war, wurden mit C57 bl/6 Tieren gekreuzt. Cre-Recombinase: Causes Recombination-Recombinase; LoxP-Sequenz: Locus of X-over P-(DNS) Sequence.

Modifiziert nach Van den Maagdenberg et al. 2010

Die Tiere hatten ein Gewicht von 18-26g und ein Alter von 10-16 Wochen (S218L transgene Tiere) bzw. 8-10 Wochen (C57 bl/6). Die Haltung der Tiere erfolgte im Walter-Brendel-Zentrum entsprechend den erforderlichen speziellen Hygienebedingungen (FELASA erweitert) in dafür eingerichteten Räumen. Die

Mäuse wurden gewichtsabhängig in Standard Makrolon Käfigen (35x15x15cm; Korpus aus Plexiglas, Deckel aus Metallgitter, Gruppenhaltung bei Tieren mit > 20 g KGW = 5 Tiere / Käfig Typ II long) mit freiem Zugang zu Wasser und Futter bei einem Tag-Nachtrhythmus von 12 Stunden bei einer Temperatur von 22°C und einer Luftfeuchtigkeit von 55% gehalten. Als Einstreu wurde zertifizierte, staubarme Weichholzfaser verwendet. Die Fütterung erfolgte ad libitum mit einem standardisierten, pelletierten Alleinfuttermittel für Mäuse. In der Zucht erfolgte die Fütterung mit speziellem Alleinfuttermittel für Zuchttiere. Die Zucht der S218L transgenen Tiere erfolgte heterozygot. Eine Stunde vor Versuchsbeginn wurden die Tiere in Einzelkäfige gesetzt, die Futterpellets wurden zur Einhaltung der präoperativen Nüchternheit temporär entfernt. Zur Vermeidung einer Hypothermie wurden alle Mäuse der chronischen Versuche nach erfolgter Operation eine Stunde bei 34-36 Grad Celsius in einem Inkubator bei einer Luftfeuchtigkeit von 50% gehalten. Nach Versuche wurden die Mäuse mittels Isofluran tief betäubt und durch zervikale Dislokation euthanasiert.

3.1.2 Genotypisierung der S218L-Mäuse

Zur Untersuchung des Genotyps erfolgte nach bei allen Tieren eine Genotypisierung anhand von DNA, welche aus einer Schwanzspitzen-Biopsie in der 2.-3. Lebenswoche gewonnen wurde. Vor Beenden des Versuchs wurde allen Tieren eine weitere Gewebeprobe entnommen, die asserviert wurde. Zur Überprüfung des Genotyps wurde aus diesem Material stichprobenhaft eine erneute Genotypisierung durchgeführt.

Es wurde für jede Probe ein Eppendorf-Gefäß angelegt. Dieses wurde initial mit 100µl TDB-Puffer - bestehend aus 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl mit pH 9 und 0,1% Triton X-100 – 5 µl Proteinase K (Proteinkinase K recombinant PCR Grade; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) und einem 5mm großen Schwanzstück gefüllt und 12 Stunden bei 56°C in einem Thermomixer (Eppendorf Thermomixer® compact; Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf) bei 1000 Rounds per minute (rpm) inkubiert. Danach wurden die Eppendorf-Gefäße für 5 min auf 90°C erhitzt um anschließend bei 4°C für 2-3 min bei 13000 rpm zentrifugiert (Labofuge 400R; Hareus Instruments GmbH, Hanau). Der dadurch entstandene Überstand wurde abpipettiert und auf Trockeneis gefroren.

Material und Methoden

Nach vorsichtigem Auftauen wurde 1 µl der so entstandenen DNA enthaltenden Lösung mit je 20,5µl PCR-Lösung gemischt. Die PCR-Lösung bestand aus 0,2 µl Taq-Polymerase (GoTaq®, DNA-Polymerase, Konzentration 5u/µl; Promega, Madison/WI, USA), 0,4 µl dNTPs (-Deoxynucleotide Mix – 10mM, 200 µl; 5 PRIME GmbH, Hamburg), 0,5 µl Primer 271 (Primer 271, Sequenz: 5'-CTC CAT GGG AGG CAC TTG-3'; MWG-Biotech AG, Ebersberg), 0,5 µl Primer 272 (Primer 272, Sequenz: 5'-ACC TGT CCC CTC TTC AAA GC-3; MWG-Biotech AG, Ebersberg), 4 µl Puffer (5X Green GoTaq® Reaction Buffer; Promega, Madison/WI, USA) und 14,9 µl Wasser (Aqua ad iniectabilia DeltaSelect; Delta Select GmbH, Dreieich). Als Negativkontrolle wurde Wasser (Aqua ad iniectabilia DeltaSelect; Delta Select GmbH, Dreieich) verwendet. Die so entstandenen Gemische wurden im Cycler (Eppendorf Mastercycler® gradient; Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf) nach folgendem Programm erhitzt: Schritt 1: 3 min 95°C, Schritt 2: 30 sek 95°C, Schritt 3: 30s ek 54°C, Schritt 4: 30 sek 72°C, Schritt 5: 5 min 72°C – Schritt 2 bis 4 wurden 35 mal wiederholt, nach Schritt 5 wurde die Lösung auf 5°C gekühlt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben danach bei -20°C tiefgefroren.

Von der so entstandenen Lösung wurden 10 µl mit 20 µl Andau-Lösung vermennt und 18 Stunden bei 37°C im Wärmeblockschüttler inkubiert. Die Andau-Lösung bestand aus 0,3 µl Vspl (VSPL(Asel) ER0912, Konzentration 10 u/µl; Fermentas GmbH, St. Leon-Rot), 3,0 µl Puffer (- 10X Buffer O with BSA; Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) und 16,7 µl Wasser (Aqua ad iniectabilia DeltaSelect; Delta Select GmbH, Dreieich). Zur Elektrophorese wurde die Flüssigkeit auf 2% Agarose-Gel gegeben und mit 7µl eines Fluoreszenzfarbstoffs (Gel Red Nucleic Acid Stain; Biotium Inc, Hayward/CA, USA) unter 100 Volt elektroforisiert. Das Agarose-Gel bestand aus 100ml Agarose (Biozym LE Agarose; Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, und Puffer (TAE 50x5; PRIME GmbH, Hamburg). Die Proben wurden jeweils mit einer Laufkontrolle verglichen, die sich auf demselben Agarose-Gel befand. Die Auswertung erfolgte in der Gelkammer (Gel Doc 1000; Bio-Rad Laboratories GmbH, München) unter UV-Belichtung.⁽¹³⁰⁾ Die PCR-Produktlänge betrug für wildtyp-Mäuse 216 Basenpaare, für homozygote (S218L/S218L) 81+135 und für heterozygote (S218L/Wildtyp) 216+81+135. Auf Abbildung 6 zeigt das Ergebnis einer so durchgeführten Gelelektrophorese.

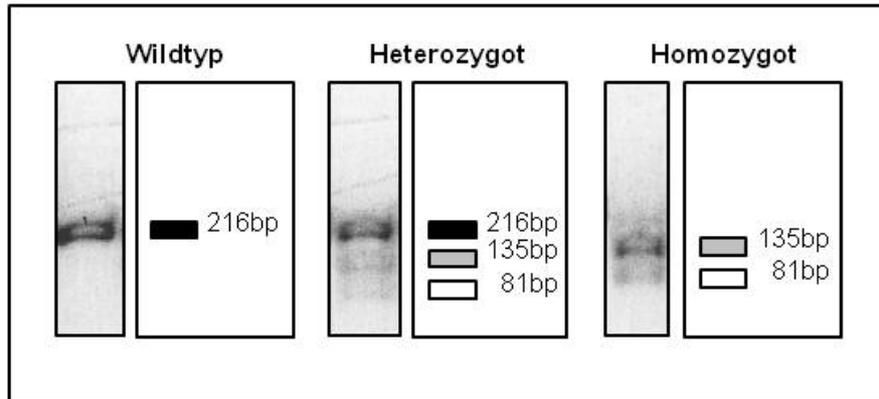


Abbildung 7: Ergebnis der Gelelektrophorese zur Genotypisierung

Wildtyp (wt): eine Bande mit 216 Basenpaaren (bp); Heterozygot (S218L/wt): drei Banden mit 216, 135 und 81 bp; Homozygot (S218L/S218L): zwei Banden mit 135 und 81 bp.

3.2 Alpha-Eudesmol

3.2.1 Historische Verwendung und Herstellung

Eudesmol war bereits Anfang des 20. Jahrhunderts Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen. Es wird dort bei der Aufschlüsselung der Bestandteile von Riechstoffen und ätherischen Ölen genannt.⁽¹⁸⁷⁾ Seit 1932 ist bekannt, dass der vorwiegend in Eukalyptusölen natürlich vorkommende Alkohol Eudesmol ein Gemisch aus verschiedenen Isomeren (alpha, beta und gamma) ist.^(188, 189) Jedoch gelang es erst 1956, diese auch einzeln zu isolieren und deren chemische Eigenschaften zu bestimmen.⁽¹⁹⁰⁾ Alpha-Eudesmol lässt sich heutzutage synthetisch aus Triene 1 oder Carvon, einem leicht verfügbaren Bestandteil von ätherischen Ölen, herstellen.^(191, 192) Für die natürliche Gewinnung dient zum Beispiel der Eukalyptusbaum *Eucalyptus marcathurii* oder der Wachholder *Juniperus virginiana*.^(192, 193)

3.2.2 Wirkungsweise und Struktur von Alpha-Eudesmol

Das alkoholische Sesquiterpen Alpha-Eudesmol^(192, 194) (siehe Abbildung 8) hemmt in Tierversuchen mit Ratten irreversibel und konzentrationsabhängig den präsynaptischen omega-Agatoxin-IVA-sensitiven CaV2.1(P/Q)-Kalziumkanal, ohne dabei die unspezifische basale Kalziumaufnahme zu verändern.^(193, 195)

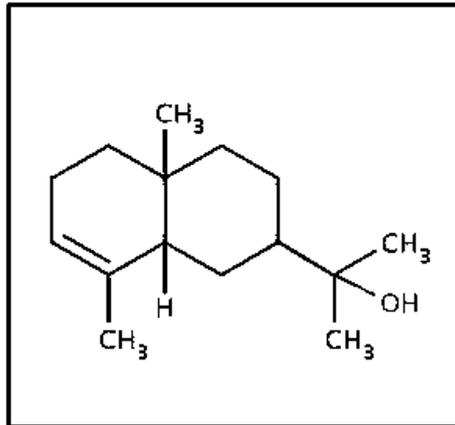


Abbildung 8: Struktur von Alpha-Eudesmol C₁₅H₂₆O

Modifiziert nach der Darstellung des Kyoto University Bioinformatics Center (GenomeNet Database Resources)

Dabei unterscheiden sich die beiden Enantiomere (-)-Alpha-Eudesmol und (+)-Alpha-Eudesmol in ihrer Wirkung nur geringfügig.⁽¹⁹¹⁾ Die Wirkung des non-peptidergen Alpha-Eudesmols auf nicht omega-Agatoxin-IVA-sensitive Kalziumkanäle vom N- oder L-Typ wird bis zu einer bestimmten Dosis als vergleichsweise gering angegeben, so dass man von einer relativen, dosisabhängigen Selektivität der Inhibition von omega-Agatoxin-IVA-sensitive Kalziumkanälen sprechen kann.⁽¹⁹³⁾ Durch die Hemmung der präsynaptischen Kalziumaufnahme wird die Ausschüttung des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat ebenfalls inhibiert, ohne jedoch die basale Glutamat-Ausschüttung zu beeinflussen.⁽¹⁹⁶⁾ Alpha-Eudesmol ist demnach ein potenter Inhibitor der kalziumabhängigen Glutamatausschüttung der zerebralen Nervenendigungen (siehe Abbildung 4).⁽¹⁹⁶⁾

3.3 Narkose und Beatmung

Es wurden zwei verschiedene Narkoseverfahren angewendet, die sich nach der Länge der jeweiligen Operationen richteten - eine Gasnarkose für Eingriffe, die nicht länger als 30 Minuten benötigten und eine intraperitoneal durchgeführte Narkose für alle längeren Versuchsserien.

Für die Gasnarkose wurden die Tiere initial für 30 Sekunden in einer luftdichten Plexigaskammer mit Isofluran betäubt (4%, Baxter Healthcare Corporation, Illinois/USA; Vernebler: Isofluran Vapor 19.3, Dräger, Lübeck). Danach wurden die Mäuse in eine stereotaktische Halterung (David Kopf Instruments, Tujunga, California) mit Gaumenplatte eingespannt und bei Spontanatmung über eine Gesichtsmaske mit einem Gasgemisch aus 1,2% Isofluran, 30% Sauerstoff und 69%

Lachgas in Narkose gehalten.

Für die intraperitoneale Narkose wurde den Mäusen eine Dreifachkombination aus Medetomidin (0,5mg/kg Körpergewicht; Dormitor©, Pfizer, Karlsruhe), Fentanyl (0,05mg/kg Körpergewicht, Janssen - Cilag, Neuss) und Midazolam (5mg/kg Körpergewicht, Ratiopharm, Ulm) unter Aspiration gespritzt (Nadel: 30G 1/2, 0,3*13 mm, BD Microlance© 3, BD Drogheda, Irland).

Für alle Versuche mit einer Dauer über 30 Minuten wurden die Tiere intraperitoneal narkotisiert und mechanisch ventiliert. Dazu wurden sie orotracheal mit einem Mikrokatheter intubiert und mit einem Beatmungsgerät kontrolliert beatmet (Minivent 845, Hugo Sachs Elektronik, March - Hungstetten). Die Sauerstoff- Konzentration wurde kontinuierlich mittels Oxymetrie (Oxydig, Dräger-Werke, Unterhaching) im inspiratorischen Schenkel gemessen; die Kohlenstoffdioxidwerte wurden durch Mikrokapnometrie im expiratorischen Schenkel des Beatmungssystems (Micro Capnograph CI240, Columbus Instruments, Columbus, OH, USA) während der gesamten Versuchsdauer überwacht und durch Anpassen der Beatmungsparameter in physiologischen Bereich gehalten. Aus Vorversuchen war bekannt, dass eine endtidale Kohlenstoffdioxidkonzentration von 30 bis 42 mmHg dem physiologischen Kohlenstoffdioxidpartialdruck von 35-45 mmHg entspricht.⁽¹⁹⁷⁾ Dies ließ sich durch eine Atemfrequenz von 140 bis 160 pro Minute und einem Atemzugvolumen von 200 bis 240 Mikrolitern erreichen.

Mit einer beheizbaren Platte (FHC, Bowdoinham, ME, USA), welche über einen rektalen Temperatursensor rückgekoppelt war, wurde über die gesamte Dauer der Narkose die Körperkerntemperatur der Maus konstant zwischen 36,5 und 37°C gehalten.

3.4 Chirurgische Präparation und Überwachung

3.4.1 Bestimmung des Intrakraniellen Drucks (ICP)

Der Intrakranielle Druck wurde mittels einer intraparenchymalen Mikrosonde gemessen. Der Druckmesskatheter (Mammendorfer Institut für Physik und Medizin, Mammendorf; Durchmesser 0,9 mm) wurde rechts neben dem Bregma durch eine Bohrlochkraniotomie, anterior zum Trauma-Areal, in das Hirnparenchym eingeführt (siehe Abbildung 11).

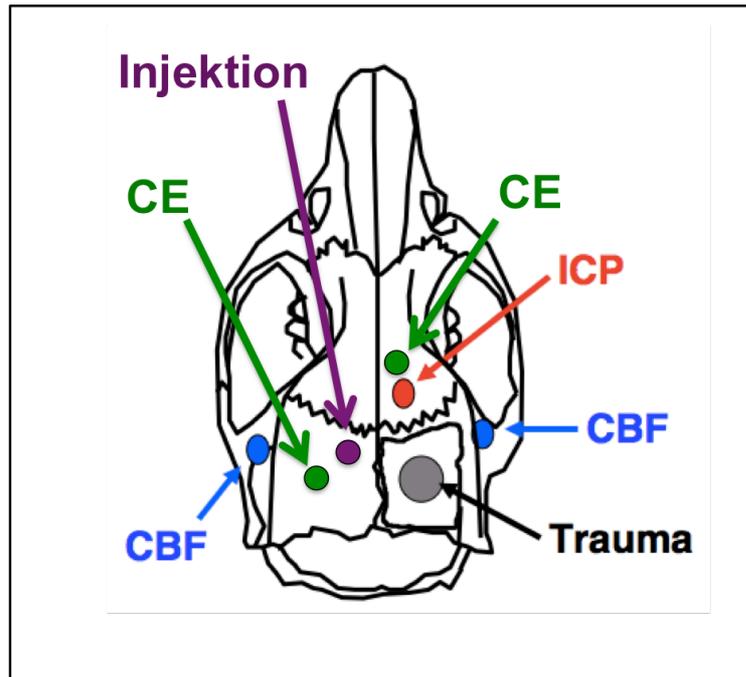


Abbildung 9: Lage der Messsonden

CE: Calomel-Elektroden zur Ableitung des EEG

CBF: Laser-Doppler-Sonden Position zur Messung der zerebralen Durchblutung (Cerebral Blood Flow)

Die dabei erhaltenen Daten wurden über einen Transducer mit dem Programm DasyLab (Version 5.02.20, Datalog GmbH, Mönchengladbach) digital aufgezeichnet. Vor jeder Messung wurde die Sonde zur Nullpunktbestimmung in destilliertem Wasser geeicht. Bei Einmalmessung wurde in den entsprechenden Versuchsserien der ICP jeweils über fünf Minuten gemittelt, bevor die Maus euthanasiert wurde.

3.4.2 Bestimmung des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP)

Zur Bestimmung des MAP wurde die rechte Femoralarterie freipräpariert und mit einem heparinisierten Kunststoffkatheter (Innendurchmesser 0,28 mm, Außendurchmesser 0,61 mm; Portex, Hythe, England) kanüliert. Dieser wurde anschließend mit einer Ligatur (Dicke 5/0, Pearsall Ltd, Taunton, England) und Gewebekleber (vetbond, 3TM Animal care products, St. Paul, MN, USA) fixiert. Der Katheter wurde mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllt und über einen piezoelektronischen Druckabnehmer (Gabarith PMSET 1DT-XX, Becton Dickinson, Sandy, USA) mit einem Computer verbunden. Die Messung wurde vor jeder Operation mit einem Blutdruck-Manometer geeicht. Die Messwerte wurden mit dem Programm DasyLab (Version 5.02.20, Datalog GmbH, Mönchengladbach) gemittelt,

aufgezeichnet und gespeichert. Zur Auswertung wurde das Programm FlexPro (Version 6.0.25, Weisang GmbH & Co KG, Kassel) verwendet.

3.4.3 Bestimmung der zerebralen Durchblutung (CBF)

Die zerebrale Durchblutung wurde mittels Laser-Doppler-Fluxmetrie bestimmt. Dazu wurden zwei Glasfaser-Kabel (MT B500-0, Perimed, Stockholm, Schweden) an der Schädelkalotte der Maus temporal über dem Stromgebiet der A. cerebri media mit einem Zweikomponentenkleber (Cyanoacrylate "Maxi - Cure", Plastruct, City of Industry, CA, USA; Härter: Accelerator "Insta - Set", City of Industry, CA, USA) fixiert (siehe Abbildung 9). Bevor die Sonden befestigt werden konnten, mussten die Ansatzstellen der Temporalmuskeln teilweise von der Kalotte abgetrennt und koaguliert werden. Die Glasfaser-Kabel wurden jeweils mit einer Laser-Doppler-Messsonde (Probe 418/1, Perimed, Stockholm, Schweden) verbunden welche an einem Laser-Doppler-Gerät (Periflux 4001 Master, Perimed, Stockholm, Schweden) angeschlossen war. Die Durchblutungswerte wurden als Prozent des Ausgangswertes angegeben; dieser Baseline-Wert wurde vor Beginn jeder Operation über mindestens 5 Minuten aufgezeichnet.

3.4.4 Bestimmung des Gewichts

Bei allen Versuchen mit 24 Stunden Versuchsdauer wurde als Parameter für das Allgemeinbefinden vor Beginn des Versuchs und nach 24 Stunden das Gewicht bestimmt (Mettler Toledo, Giessen).

3.4.5 Blutgasanalyse (BGA)

Zur Blutgasanalyse (BGA) wurde den Mäusen kurz vor und 60 Minuten nach Injektion von Alpha-Eudesmol über den zuvor beschriebenen Femoraliskatheter Blut mit Hilfe einer Glaskapillare (Mikro-Hämatokrit-Röhrchen, Länge 75mm, Innendurchmesser 1,1-1,2mm, Außendurchmesser 1,5-1,6mm; Brand GmbH & Co KG, Wertheim) abgenommen. Die Auswertung erfolgte mittels Blutgasanalysegerät (Analysegerät Nr. 860, Chiron Diagnostics Corporation, East Walpole, MA, USA). Der Femoraliskatheter wurde nach jeder Blutentnahme mit physiologischer Kochsalzlösung gespült. Während der Blutabnahme musste die MAP-Messung, die auch über den Katheter ermittelt wurde, kurzzeitig gestoppt werden.

3.4.6 Neurophysiologische Messung

Zur nichtinvasiven transkraniellen EEG- und DC-Messung wurden zwei Calomel-Elektroden (Quecksilberchlorid; Hg_2Cl_2 ; siehe Abbildung 10) verwendet.

Zur Herstellung der Calomel-Elektroden wurde eine Glaskapillare (Mikro-Hämatokrit-Röhrchen, Länge 75mm, Innendurchmesser 1,1-1,2mm, Außendurchmesser 1,5-1,6mm; Brand GmbH & Co KG, Wertheim) am oberen Ende durch einen handelsüblichen Zweikomponentenkleber mit einem Metallstecker, an welchen sich ein Kabel anschließen ließ, verbunden. In das untere (offene) Ende der Glaskapillare wurde, wie Abbildung 10 zeigt, Quecksilberchlorid, flüssiges Quecksilber und schließlich mit physiologischer Kochsalzlösung getränkte Baumwollwatte gefüllt. Die Watte ragte dabei ca. 0,5mm aus der Glaskapillare hervor. Diese Herstellungsweise entspricht dabei der bereits durch unsere Laborgruppe in der Literatur beschriebenen.^(138, 171, 198)

Eine Elektrode wurde auf die rechte (ipsilateral zum Trauma), die andere auf die linke Hemisphäre platziert (siehe Abbildung 14). Der Kontakt zwischen Schädel und den Elektroden wurde durch die mit physiologischer Kochsalzlösung angefeuchtete Watte hergestellt. Die Erdung erfolgte über eine silbergefüllte Stahl-Nadel, welche im Nackenmuskel platziert wurde.

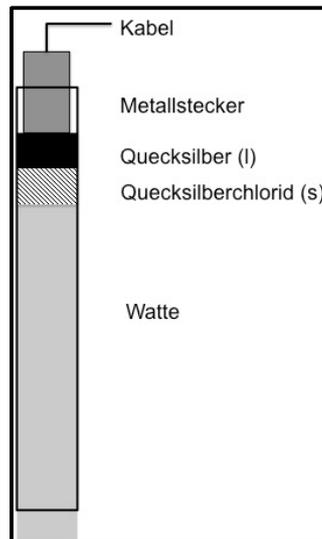


Abbildung 10: Calomel-Elektrode

l: flüssig (liquid)

s: fest (solid)

Die Elektroden selbst wurden an den stereotaktischen Haltearmen des OP-Tisches fixiert, an einen EEG-Umwandler mit DC-Verstärker (Low-Noise-Power-Supply LNPS30 und P&W MasterBox basic, medres-medical research GmbH, Köln) angeschlossen und mit einer Rate von 200 Hz aufgezeichnet, die Messwerte mit dem Programm DasyLab (Version 5.02.20, Datalog GmbH, Mönchengladbach) gemittelt. Zur Auswertung wurde das Programm FlexPro (Version 6.0.25, Weisang GmbH & Co KG, Kassel) verwendet. Die intrazerebroventrikuläre (icv.) Injektion wurde erst begonnen, wenn über mindestens fünf Minuten ein konstantes Baseline-EEG und DC Signal aufgezeichnet worden war.

Die CSDs wurden chemisch durch 2 µl 0,1 M bzw. 1 M KCl-Lösung ausgelöst, welche rechtshemisphärisch auf die Dura appliziert wurde. Während des Versuchs wurden zudem manuell die sichtbaren CSD-Wellen notiert. Die Auswertung erfolgte digital.

3.4.7 Induktion des Schädelhirntraumas – Controlled Cortical Impact

Das Schädelhirntrauma wurde nach dem bereits in der Literatur bekannten und validierten CCI-Modell⁽¹⁹⁹⁻²⁰¹⁾ erzeugt. Da bei Mäusen mit einer CACNA1A-Missensemutation eine gesteigerte Hirnschädigung sowie eine erhöhte Mortalität erwartet wurde, wurde bei diesen eine geringere Geschwindigkeit und Eindringtiefe, also ein mildes SHT, verwendet als bei C57bl/6-Tieren. Die Trauma-Maschine (MouseKatjuscha 2000, L. Kopacz, Johannes - Gutenberg - Universität Mainz) besitzt einen pressluftgetriebenen Bolzen, dessen Eindringtiefe, 1mm in C57bl/6- bzw. 0,5mm in S218L-Mäusen, über eine Millimeterschraube eingestellt wurde. Die Geschwindigkeit, mit welcher der Bolzen auf die Dura trifft, wurde von einem Messsensor, der sich über der Mikrometerschraube befindet, bestimmt; bei C57bl/6-Mäusen betrug diese 8 mm/s, bei S218L-Mäusen 6 mm/s. Die Kontaktzeit wurde von ebenfalls registriert und betrug 150 ms. Abbildung 11 zeigt das CCI-Gerät.

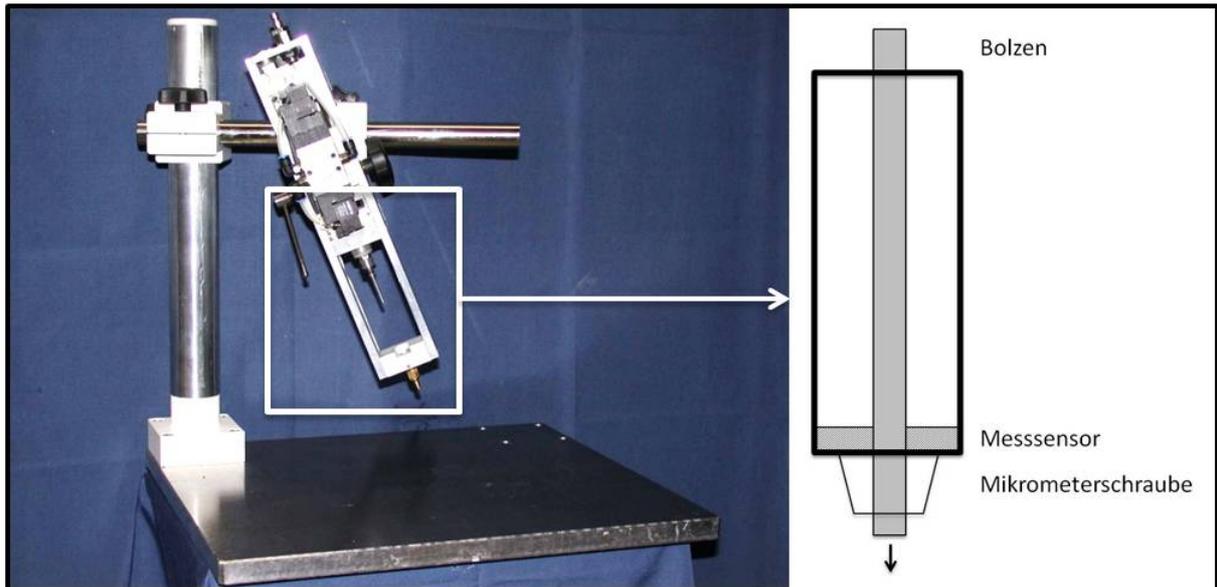


Abbildung 11: Traumagerät zur Induktion einer kontrollierten zerebralen Druckschädigung (Controlled Cortical Impact; CCI)

Links ist das CCI-Traumagerät zu sehen, rechts die schematische Darstellung. Über eine Mikrometerschraube (gold) wird die Eindringtiefe des Bolzens eingestellt. Ein Messsensor im Gehäuse über der Mikrometerschraube misst die Geschwindigkeit und die Kontaktzeit.

Zur Induktion des Traumas wurde die Maus zuerst rechts parietal kraniotomiert (siehe Abbildung 14). Ohne die Dura zu verletzen wurde der Schädelknochen dabei mit einem Diamantbohrer (Rewatronic Products, Wald - Michelbach; Bohrkopf GD890R, Durchmesser 0,6mm, Aesculap, Tuttlingen) an drei Seiten aufgebohrt. Die Knochenplatte wurde an der Mittellinie belassen und zu dieser hin nach medial hochgeklappt. Während des gesamten Bohrvorgangs wurde mit physiologischer Kochsalzlösung gespült, um die entstehende Hitzeentwicklung so gering wie möglich zu halten und um entstehendes Knochenmehl sofort aus dem Bohrbereich zu beseitigen.

Nach erfolgter Kraniotomie wurde der Bolzen der Trauma-Maschine mittig und senkrecht auf der durch Trepanation freigelegten Dura platziert und das Trauma ausgelöst. Sofort danach wurde die Kraniotomie mit Gewebekleber (Vetbond, 3TM Animal care products, St. Paul, MN, USA) verschlossen. Bei den 24 Stunden-Versuchen wurde die Hautwunde mit jeweils vier Einzelknopfnähten adaptiert (Ethibond Excel 5/0, Ethicon, Brüssel, Belgien).

Die Sham-Operationen in den Versuchen mit den S218L-Mäusen bestanden aus der Eröffnung der Schädelkalotte sowie dem Aufsetzen des CCI-Stempels.

3.4.8 Applikation der verwendeten Substanzen

Alpha-Eudesmol wurde in einem Phosphat-Puffer (Sigma-Aldrich, St.Louis/USA) mit 0,1% Dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich, St.Louis/USA) aufgelöst und stereotaktisch mit einer Hamilton-Spritze (Hamilton Gastight 1701, Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz) 3,2 mm tief 3 mm links und 0,5 mm posterior des Bregmas über ein zuvor gesetztes Bohrloch (Diamantbohrer, Rewatronic Products, Wald - Michelbach; Bohrkopf GD890R, Durchmesser 0,6 mm, Aesculap, Tuttlingen) in den linken Seitenventrikel injiziert (siehe Abbildung 9). Das Injektionsvolumen betrug 2 μ mol. Die Spritze wurde nach dem Injizieren zwei bis drei Sekunden am Injektionsort belassen und dann vorsichtig entfernt. Als Verabreichungsart wurde die icv. Injektion gewählt, da aufgrund der Molekülgröße und –beschaffenheit ein Passieren der Bluthirnschranke als unwahrscheinlich anzusehen ist.⁽²⁰²⁾

Für die Applikation von Kaliumchlorid wurde ein zusätzliches Bohrloch 1 mm vor der oben beschriebenen Injektionsstelle für Alpha-Eudesmol geschaffen. Durch dieses wurde die KCl-Lösung auf die Dura pipettiert.

3.5 Versuchsaufbau

3.5.1 Überblick

Die vorliegende Doktorarbeit besteht aus fünf tierexperimentellen Versuchsserien über die Tabelle 4 einen Überblick gibt.

Material und Methoden

Gemessene Parameter	Applikation von Alpha-Eudesmol	Verwendeter Mausstamm
---------------------	--------------------------------	-----------------------

Einfluss der S218L-Mutation auf den Hirnschaden nach SHT

Versuchsserie 1: Einfluss der S218L-Mutation auf den Hirnschaden nach SHT	<ul style="list-style-type: none"> • Mortalität • CSD • Hirnwassergehalt • Parenchymschaden • ICP • Gewichtsverlust 	Keine	S218L-transgene Tiere: homozygot, heterozygot, wildtyp
---	---	-------	--

Medikamentöse Beeinflussung des CaV2.1(P/Q)-Kalziumkanals

Versuchsserie 2: Physiologische Auswirkungen von Alpha-Eudesmol	<ul style="list-style-type: none"> • BGA • MAP • CBF 	Ohne Trauma	C57bl/6
Versuchsserie 3: Auswirkungen von Alpha-Eudesmol auf die kortikalen Streudepolarisationen	<ul style="list-style-type: none"> • EEG • DC • CBF 	Ohne Trauma	C57bl/6
Versuchsserie 4: Auswirkungen von Alpha-Eudesmol auf den Sekundärschaden nach SHT bei prätraumatischer Injektion	<ul style="list-style-type: none"> • Hirnwassergehalt • ICP • Parenchymschaden • Gewichtsverlust 	10min vor Trauma	C57bl/6
Versuchsserie 5: Auswirkungen von Alpha-Eudesmol auf den Sekundärschaden nach SHT bei posttraumatischer Injektion	<ul style="list-style-type: none"> • Hirnwassergehalt • ICP • Gewichtsverlust 	10min nach Trauma	C57bl/6

Tabelle 4: Versuchsübersicht

In der 1. Versuchsserie wurden die bereits in der Literatur vermuteten Effekte der S218L-CACNA1A-Mutation, welche eine erhöhte Funktion des CaV2.1(P/Q)-Kalziumkanals zur Folge hat, zum ersten Mal systematisch auf den Sekundärschaden nach SHT mit dem CCI-Modell untersucht.

Die darauffolgenden Versuchsserien dienten dazu die Rolle dieses Kanals in der Entstehung des Sekundärschadens nach SHT in gesunden (nicht genetisch veränderten) Tieren zu bestimmen. Dazu wurde der CaV2.1(P/Q)-Kalziumkanal

selektiv durch Alpha-Eudesmol geblockt, nachdem diese Substanz in Versuchsserie 2 auf physiologische Nebenwirkungen untersucht wurde. Der in der Literatur vermutete kausale Zusammenhang zwischen CSD-Wellen und posttraumatischer Hirnödementstehung wurde in Versuchsserie 3 ebenfalls an gesunden Tieren eruiert.

3.5.2 Detaillierte Beschreibung

3.5.2.1 Versuchsserie 1: Einfluss der S218L-Mutation auf den Hirnschaden nach SHT

Diese Versuchsserie bestand aus akuten (90 Minuten Dauer) und chronischen Versuchen (24 Stunden Dauer).

3.5.2.1.1 Akute Versuche

In der akuten Versuchsreihe wurde die Häufigkeit der CSD nach SHT untersucht. Mit einer Gruppenstärke von je n=7 wurde bei homozygoten, heterozygoten und wildtyp-Tieren für die S218L-Mutation ein SHT ausgelöst. Zur Erkennung der CSD wurde das EEG- und DC-Potenzial sowie der CBF gemessen. Die entsprechenden Sensoren wurden an der Maus fixiert und der Versuch gestartet, sobald alle Zielparameter für mindestens fünf Minuten einen konstanten Wert aufzeigten (Baseline). Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich dabei auf 90 Minuten nach erfolgtem SHT. Ein Ereignis wurde nur dann als CSD gewertet, wenn alle drei Komponenten (Amplitudenverlust im EEG, Negativierung des DC, Abfall des CBF) simultan bzw. leicht versetzt zueinander zu beobachten und auch in der digitalen Auswertung nachweisbar waren.

3.5.2.1.2 Chronische Versuche

In der ersten Versuchsgruppe wurde der Hirnwassergehalt 24 h nach CCI bestimmt. Dazu erfolgte die Aufteilung der S218L-Mutanten in drei Gruppen: Gruppe 1 (n=10-18 pro Genotyp) wurde nach dem CCI-Modell traumatisiert; Gruppe 2 (n=5 für jeweils homo-/heterozygot und wildtyp) erhielt nur eine vorübergehende Öffnung der Schädelkalotte ohne Traumatisierung (Sham-Operation); Gruppe 3 (n=5 pro Genotyp) wurde weder traumatisiert noch an der Kalotte operiert (gesund/nativ). Alle Tiere wurden 24 Stunden nach CCI euthanasiert und es erfolgte die Bestimmung des Hirnwassergehalts. Bei Tieren, die vor Erreichen des Versuchsendes verstarben wurde direkt nach Todesfeststellung das Gehirn zur Ödembestimmung entnommen. Fünf Minuten vor Euthanasierung wurde zur Ermittlung des ICP eine

intraparenchymale Hirndrucksonde in die rechte Hemisphäre eingebracht (n=4-15 pro Genotyp).

Zur Bestimmung des Parenchymschadens erhielt eine weitere Versuchsgruppe unterteilt in homozygote, heterozygote und wildtyp-Tiere (n=5-15) wie oben beschrieben ein SHT. Nach 24 Stunden erfolgte die Hirnentnahme und nach Kryokonservierung der Gehirne die Bestimmung des Läsionsvolumens.

Zusätzlich wurde in den chronischen Versuchen das Gewicht der Mäuse vor Versuchsbeginn und nach 24 Stunden gemessen, als allgemeiner Parameter für das Wohlbefinden.

Die Mortalität wurde für alle oben genannten Versuchsgruppen zusammengefasst.

3.5.2.2 Versuchsserie 2: Physiologische Parameter nach Eudesmol-Injektion

Diese Versuchsserie hatte zum Ziel, mögliche Nebenwirkungen der P/Q-Kanalblockade durch Alpha-Eudesmol Injektion auf wichtige physiologische Parameter zu untersuchen. Dazu wurden 2 µl des Wirkstoffs in einer Konzentration von 100 nmol gesunden Versuchstieren in den linken Seitenventrikel injiziert, wobei 15 Minuten vor und 60 Minuten nach Injektion eine Blutgasanalyse durchgeführt wurde. Der Maus musste dazu ein arterieller Femoraliskatheter gelegt werden, über welche nicht nur die Blutentnahme erfolgte, sondern auch die Messung des MAP. Alpha-Eudesmol wurde erst verabreicht, wenn nach der ersten Blutabnahme zur Blutgasanalyse (BGA) der MAP sowie der CBF, welcher ipsilateral zur Injektion über eine Laser-Doppler-Sonde bestimmt wurde, für mindestens 15 Minuten einen konstanten Wert zeigte (Baseline). Abbildung 12 gibt diesen Versuchsaufbau schematisch wieder.

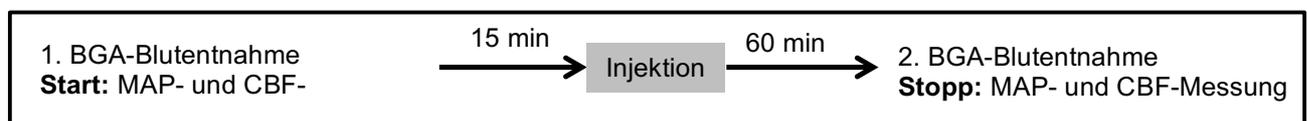


Abbildung 12: Übersicht über den Versuchsaufbau der Versuchsserie 2

Die Gruppenstärke betrug n=6-10 für die Eudesmol-Gruppe und n=5-6 für die Kontrollgruppe. Letzterer wurde nach gleichem Protokoll Vehikel ohne Wirksubstanz in den linken Seitenventrikel injiziert.

3.5.2.3 Versuchsserie 3: Auswirkungen von Alpha-Eudesmol auf die kortikalen Streudepolarisationen

Zunächst wurde dem Versuchstier 2 µl Vehikel in den linken Seitenventrikel injiziert. Zehn Minuten danach wurden 2 µl einer 0,1 M KCl-Lösung über ein neues Bohrloch (auf der rechten Schädelseite über der Injektionsstelle) auf die Dura appliziert um eine CSD auszulösen. Ein Ereignis wurde nur dann als CSD gewertet, wenn alle drei Komponenten (Amplitudenverlust im EEG, Negativierung des DC, Abfall des CBF) zu beobachten waren. Nach weiteren zehn Minuten wurden dem Versuchstier 2 µl einer 100 nmol Alpha-Eudesmol-Lösung, über denselben Zugang intraventrikulär injiziert. Es folgte die Applikation von 2 µl 0,1 M KCl-Lösung nach 10 Minuten, sowie von 2 µl 1M KCl-Lösung nach 20 Minuten. Die Auswertung des Versuchs wurde 10 Minuten nach Gabe der 1 M KCl-Lösung beendet. Die Gruppenstärke betrug n=6. Abbildung 13 gibt einen Überblick über die zeitliche Abfolge der Injektionen.

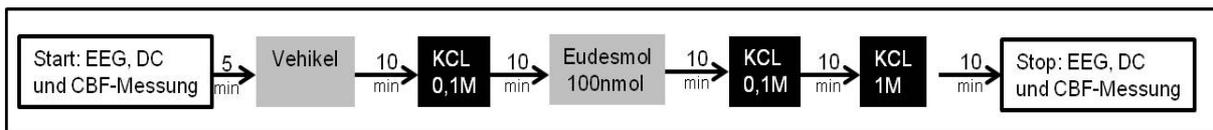


Abbildung 13: Übersicht über den Versuchsaufbau der Versuchsserie 3

3.5.2.4 Versuchsserie 4: Auswirkungen von Alpha-Eudesmol auf den Sekundärschaden nach SHT bei prätraumatischer Injektion

In der ersten Versuchsgruppe wurde Alpha-Eudesmol bei einer Gruppenstärke von je n=7-9 in aufsteigender Konzentration (50 pmol, 500 pmol, 1 nmol, 100 nmol, 500 nmol sowie 1 µmol) verabreicht. Bei der Kontrollgruppe mit n=8 erfolgte die repetitive Applikation des Vehikels in gleicher Weise. Die Substanzen wurden zehn Minuten vor Induktion des SHT in den linken Seitenventrikel injiziert. Die Versuchstiere wurden 24 Stunden nach Traumatisierung euthanasiert und der Hirnwassergehalt der einzelnen Hemisphären bestimmt. Abbildung 14 gibt diesen Versuchsaufbau schematisch wieder.

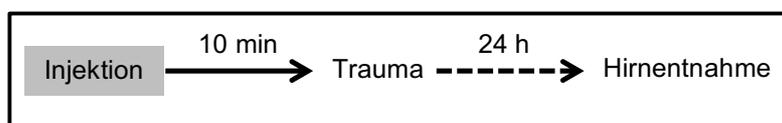


Abbildung 14: Übersicht über den Versuchsaufbau der Versuchsserie 4

In einer weiteren Versuchsgruppe mit gleichartigem Versuchsaufbau wurde bei C57bl/6 Mäusen (je n=8) nach 24 Stunden das Nekrosevolumen bestimmt. Die verabreichten Dosierungen von Alpha-Eudesmol wurden, gemäß der Wirksamkeit auf die Entstehung des posttraumatischen Hirnödems, angepasst (100 nmol als niedrigste und 1 μ mol als höchste wirksamste Dosierung in den Ödemversuchen). Auch hier erfolgte eine Kontrollgruppe mit Vehikel (n=8).

Als zusätzlicher Parameter wurde der ICP 24 Stunden nach Trauma analog zur Versuchsserie 1 gemessen (n=10-15).

Als allgemeiner Parameter für das Wohlbefinden der Tiere wurde zudem der Gewichtsverlust innerhalb von 24 Stunden ermittelt.

3.5.2.5 Versuchsserie 5: Auswirkungen von Alpha-Eudesmol auf den Sekundärschaden nach SHT bei posttraumatischer Injektion

In dieser Versuchsserie sollte die mögliche Eignung von Eudesmol als therapeutische Strategie untersucht werden. Die Eudesmol-Konzentration, die sich in den vorangegangenen Versuchsserien als effektiv erwiesen hatte (100nmol) sowie drei höhere Dosierungen (1 μ mol, 100 μ mol, 1mmol) bzw. das Vehikel wurden zehn Minuten nach Schädelhirntrauma injiziert, der Hirnwasser-Gehalt und der ICP nach 24 Stunden bestimmt. Abbildung 15 gibt diesen Versuchsaufbau schematisch wieder.

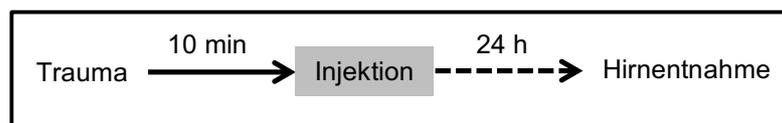


Abbildung 15: Übersicht über den Versuchsaufbau der Versuchsserie 4

Zudem erfolgte auch hier die Gewichtsbestimmung der Mäuse vor und 24 Stunden nach Operationsbeginn.

3.6 Auswertung

3.6.1 Herstellung der Präparate

Die Mäuse wurden 24 Stunden nach Trauma in tiefer Isofluran-Narkose euthanasiert. Direkt im Anschluss wurde der Schädel entlang der Mittellinie an der Sutura sagitalis eröffnet, beide Ossa parietales wurden vorsichtig zur Seite geklappt, das Gehirn mit einem Dissektor vom Rückenmark und der Schädelbasis abgetrennt, die Gehirne

entnommen und in pulverisiertem Trockeneis tiefgefroren und bei -20°C bis zur Anfertigung der Kryoschnitte aufbewahrt.

Die Gehirne wurden nach Einbettung (Tissue - Tek®, Sakura Finetek Europe, Zoeterwoude, Niederlande) mit einem Kryostat (Cryostar MH 560, Microm, Walldorf) in 14 koronare Ebenen mit je $10\mu\text{m}$ Dicke im Abstand von $500\mu\text{m}$ geschnitten, um das ganze Nekrosevolumen abzubilden (siehe Abbildung 16).

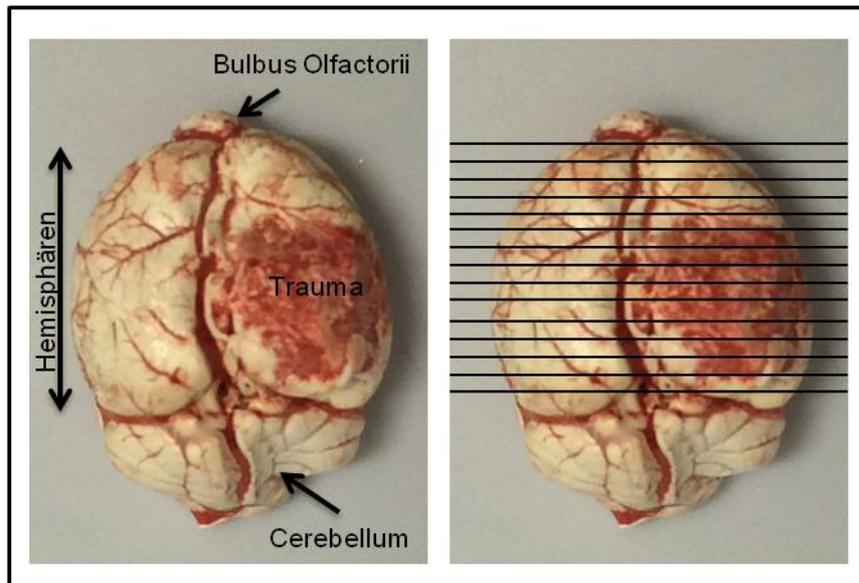


Abbildung 16: Foto des Gehirns direkt nach Entnahme

Links sieht man das Gehirn mit Beschriftung der wichtigsten anatomischen Strukturen. Der Parenchymschaden (Trauma) lässt sich makroskopisch gut erkennen. Rechts sind die 14 Schnittebenen für die sequenziellen Kryoschnitte dargestellt.

Der erste Schnitt wurde $1000\mu\text{m}$ distal des Bulbus olfactorii angesetzt. Zur Färbung wurden die Schnitte zehn Minuten mit Kresylechtviolett angefärbt (Nissl-Färbung; siehe Appendix 7.2) und sofort danach fixiert und eingedeckelt (Eukitt®, O. Kindler GmbH & Co, Freiburg); siehe Protokoll im Appendix (Kapitel 8.2).

3.6.2 Auswertung durch Histomorphometrie

Zur Auswertung des Nekrosevolumens wurden die Schnitte unter dem Mikroskop (Olympus BX 41, Olympus, Hamburg) mit 12,5 facher Vergrößerung mit einer Digitalkamera (Olympus Camedia C5050, Olympus, Hamburg) abgelichtet und gespeichert. Mit einer Auswertungssoftware (Olympus DP-Soft, analySIS, Version 3.2., Olympus, Hamburg) wurde anschließend digital das Volumen der Hemisphären

und der Nekrose auf jeder Schnittebene bestimmt; das gesamte Nekrosevolumen wurde mit nachfolgender Formel berechnet:

$A_1 \times 0,5 + A_2 \times 0,5 \dots + A_{14} \times 0,5$. Abbildung 17 zeigt einen koronaren Hirnschnitt mit und ohne markiertem Nekrosevolumen.

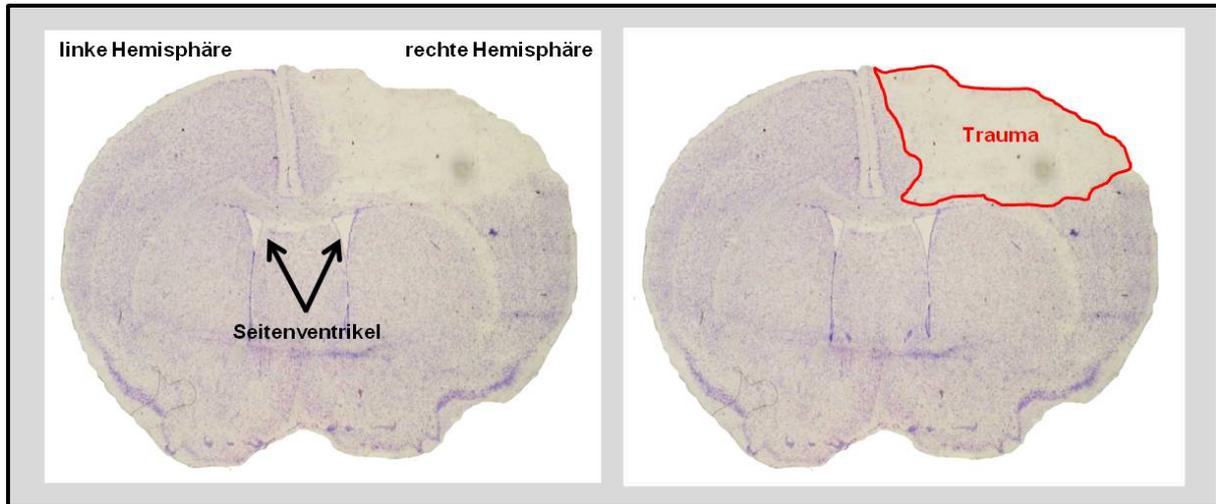


Abbildung 17: Hirnschnitt

Das linke Bild zeigt einen koronaren Hirnschnitt nach Einfärbung mit Kresylechtviolett (Nissl-Färbung). Der Parenchymschaden wird für jeden Schnitt markiert (rote Linie im rechten Bild) und seine Fläche bestimmt.

3.6.3 Bestimmung des Hirnwassergehalts

Die Gehirne wurden zur Bestimmung des Hirnwassergehaltes 24 Stunden nach CCI entnommen. Die Entnahme erfolgte wie bereits zuvor beschrieben. Das Hirn wurde in eine gekühlte Hirn-Matrix (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA) gelegt. Der Bulbus olfactorii und das Cerebellum wurden mit einer Rasierklinge entfernt und die Hemisphären entlang der Fissura longitudinalis cerebri getrennt. Jede Hemisphäre wurde separat in ein Wäageglas (35 x 30mm, Schott AG, Jena) mit bekanntem Leergewicht gelegt und das Feuchtgewicht (wet weight; ww) wurde gemessen (Mettler Toledo, Giessen). Nach Trocknung (120°C für 24 Stunden) in einem Trockenschrank (Memmert, Schwabach) wurde das Trockengewichtes (dry weight; dw) bestimmt. Der Hirnwassergehalt als Parameter für die posttraumatische Hirnödementwicklung wurde durch die Differenz beider Werte in Bezug zum Ausgangsgewicht in Prozent angegeben und wie folgt berechnet:

$$\text{Hirnwassergehalt in \%} = [(ww - dw/ww) \times 100]$$

3.6.4 Statistische und graphische Auswertung

Die statistische und graphische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm SigmaPlot (Version 12.0, Systat Software Inc, Erkrath).

Die Versuchsgruppen wurden durch den Rank-Sum-Test (Mann-Whitney-Test) miteinander verglichen. Signifikanz wurde bei einem p-Wert von unter 0,05 angenommen.

Alle Graphen und Diagramme sind entweder als Line-and-Scatter Plot oder als Balkendiagramm mit Mittelwert \pm Standardabweichung (Mean \pm SD) dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss der S218L-Mutation auf den Hirnschaden nach SHT

4.1.1 Mortalität nach SHT

Nach SHT zeigte sich innerhalb von 24 Stunden bei den homozygoten S218L-Mutanten eine deutlich erhöhte Mortalität von 60,7% im Vergleich zu 0% bei den Wildtyp-Tieren. Heterozygote S218L-Mutanten wiesen eine Gesamtmortalität von 3,6% auf (Siehe Abbildung 18).

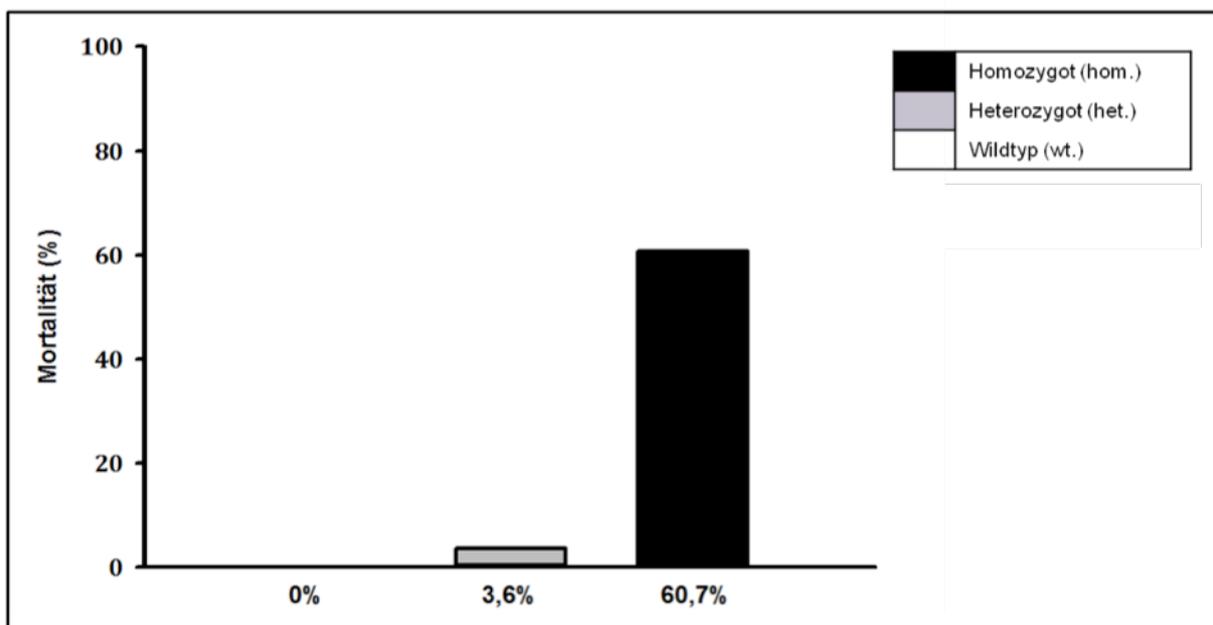


Abbildung 18: Mortalität 24 Stunden nach Schädelhirntrauma (SHT)

Hetero- sowie homozygote S218L transgene Mäuse zeigten 24 Stunden nach erfolgtem SHT eine deutlich gesteigerte Mortalität (3,6% bei Heterozygoten: 60,7% bei Homozygoten) im Vergleich zu Wildtyp-Tieren (0%). Homozygote Mäuse, welche die höchste Öffnungswahrscheinlichkeit des CaV2.1(P/Q)-Kalziumkanal besitzen, hatten die höchste Mortalität.

4.1.2 Neurophysiologische Veränderungen

Bereits vor Trauma kam es bei S218L-Mutanten-Mäusen zu einer häufigeren Spontanfrequenz von kortikalen Streudepolarisationen. Dieser Effekt zeigte eine Gen-Dosis-Abhängigkeit. Homozygote Tiere wiesen dabei die höchste Frequenz an spontanen CSDs auf, wohingegen sich diese in gesunden Tieren (Wild-Typ) kaum nachweisen ließen (siehe Abbildung 19): homozygot $2,6 \pm 2,1$ CSD pro 90min vs. heterozygot $0,4 \pm 0,5$ ($p=0,014$); homozygot $2,6 \pm 2,1$ vs. wildtyp $0,1 \pm 0,4$ ($p=0,001$).

Ergebnisse

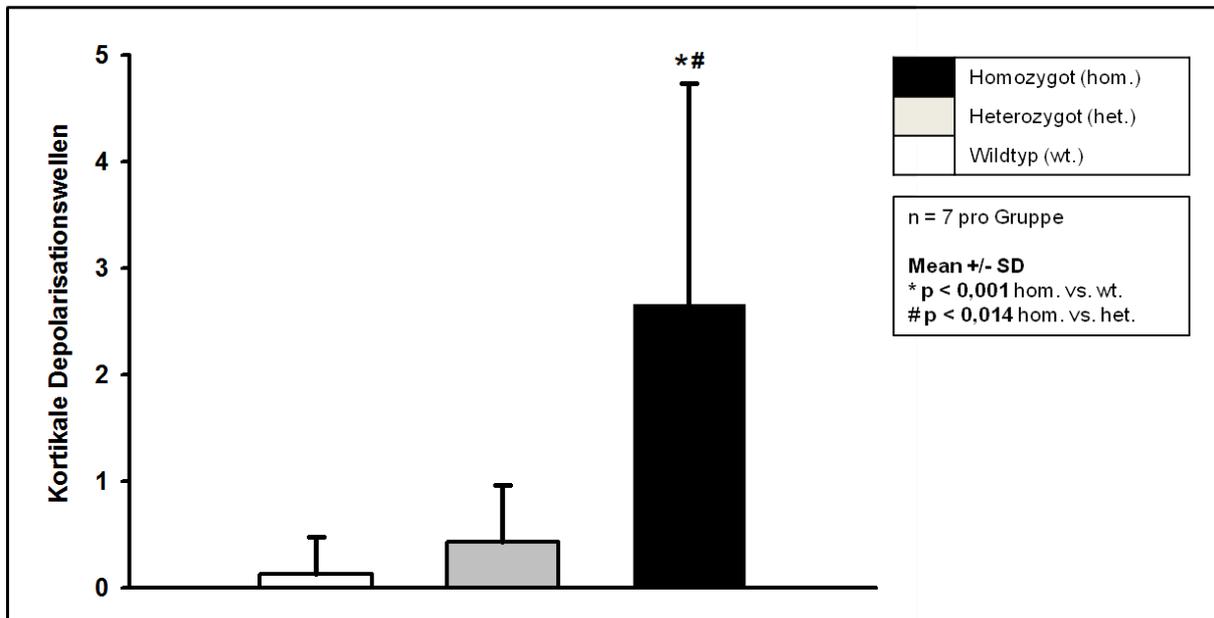


Abbildung 19: Häufigkeit der kortikalen Streudepolarisationen vor Schädelhirntrauma (SHT)

Hetero- sowie homozygot S218L transgene Mäuse zeigten über 30 Minuten eine gesteigerte Häufigkeit an kortikalen Streudepolarisationen. Bei Heterozygoten war dies nur als Trend ersichtlich, Homozygote dagegen zeigten einen statistisch signifikanten Häufigkeitsanstieg, sowohl gegenüber den Wildtyp-Tieren ($p < 0,001$), als auch gegenüber den Heterozygoten ($p < 0,014$).

4.1.3 Hirnwassergehalt nach SHT

Der Hirnwassergehalt zeigte sich in allen Tieren (homozygot, heterozygot und wildtyp), die kein SHT erhielten (gesund), normal und vergleichbar mit Werten aus Vorstudien⁽²⁰¹⁾ ($77,2 \pm 0,8\%$ für homozygot, $77,6 \pm 0,7\%$ für heterozygot und $76,7 \pm 0,4\%$ für wildtyp). Nach Sham-Operation (temporäres Eröffnen der Schädelkalotte, Aufsetzen des Stempels, ohne Auslösung des CCI) zeigte sich zwischen den einzelnen Gruppen (homozygot, heterozygot und wildtyp) kein Unterschied im Hirnwassergehalt (rechte Hemisphäre: Homozygot Sham $77,3\%$, heterozygot Sham $78,3 \pm 1,0\%$, wildtyp Sham $78,1 \pm 0,8\%$; linke Hemisphäre: Homozygot Sham $77,6\%$, heterozygot Sham $77,8 \pm 0,7\%$, wildtyp Sham $77,7 \pm 0,5\%$). Homozygot transgene Tiere zeigten im Vergleich zu ihren heterozygoten und wildtyp-Geschwistertieren einen signifikant erhöhten posttraumatischen Hirnwassergehalt, sowohl in der zum Trauma ipsilateral als auch der kontralateral gelegenen Hemisphäre. Rechte Hemisphäre: Homozygot $81,7 \pm 2,2\%$ des Ausgangsgewichts vs. heterozygot $80,1 \pm 1,2\%$ ($p = 0,028$), homozygot $81,7 \pm 2,2\%$ vs. wildtyp $80,1 \pm 1,0\%$ ($p = 0,019$), heterozygot $80,1 \pm 1,2\%$ vs. wildtyp $80,1 \pm 1,0$ ($p = 0,806$); linke Hemisphäre: Homozygot $80,1 \pm 2,3\%$ vs. heterozygot $78,6 \pm 1,0\%$ ($p = 0,026$), homozygot $80,1 \pm$

Ergebnisse

2,3% vs. wildtyp $78,8 \pm 1,1\%$ ($p=0,023$), heterozygot $78,6 \pm 1,0\%$ vs. wildtyp $78,8 \pm 1,1\%$ ($p=0,418$.) Alle S218L transgenen Tiere zeigten zudem posttraumatisch einen erhöhten Hirnwassergehalt in der rechten (traumatisierten) Hemisphäre im Vergleich zur linken (nicht traumatisierten) Hemisphäre: Homozygot $p=0,011$, heterozygot $p<0,001$ sowie wildtyp $p<0,001$.

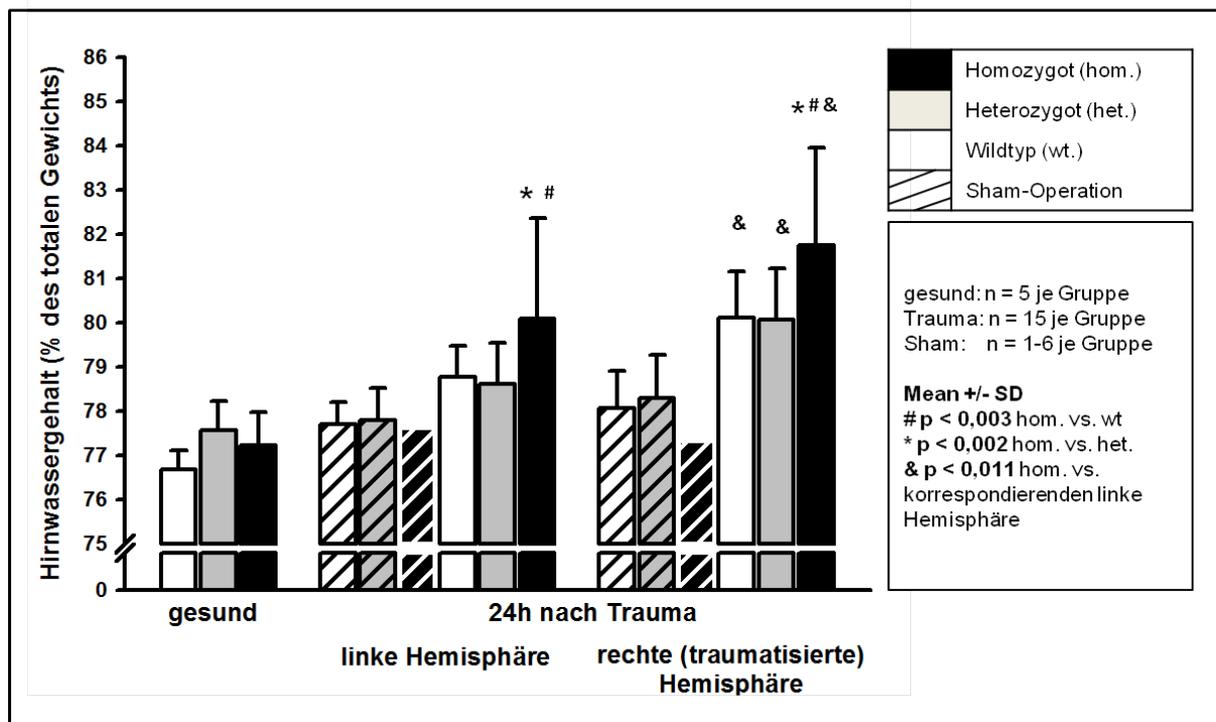


Abbildung 20: Hirnwassergehalt 24 Stunden nach erfolgtem Schädelhirntrauma (SHT)

Der Hirnwassergehalt ist in den homozygoten Tieren 24 Stunden nach Trauma signifikant erhöht, sowohl im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren ($p<0,003$), als auch zu den Heterozygoten ($p<0,002$). Die zum Trauma ipsilaterale (rechte) Hemisphäre wies dabei in Bezug auf die kontralaterale (linke) Hemisphäre, in allen Tieren statistisch signifikant ein höheres Hirnödem auf ($p<0,011$). Zum Vergleich ist in dieser Graphik zusätzlich der Hirnwassergehalt von nicht-traumatisierten nicht-operierten Tieren (gesund) sowie von nicht-traumatisierten Tieren, die jedoch die Operation der Schädelkalotte erhielten (Sham-Operation) dargestellt.

4.1.4 Parenchymschaden nach SHT

In der Homozygoten-Gruppe ließ sich posttraumatisch nicht nur ein signifikanter Anstieg der Gesamtmortalität und des Hirnwassergehalts nachweisen, sondern auch ein statistisch signifikant erhöhtes Nekrosevolumen, wie Abbildung 21 zeigt (Homozygot $24,5 \pm 4,7\text{mm}^3$ vs. heterozygot $17,9 \pm 3,7\text{mm}^3$ ($p=0,006$), homozygot $24,5 \pm 4,7\text{mm}^3$ vs. wildtyp $18,7 \pm 3,9\text{mm}^3$ ($p=0,030$), heterozygot $17,9 \pm 3,7\text{mm}^3$ vs. wildtyp $18,7 \pm 3,9\text{mm}^3$ ($p=0,629$)).

Ergebnisse

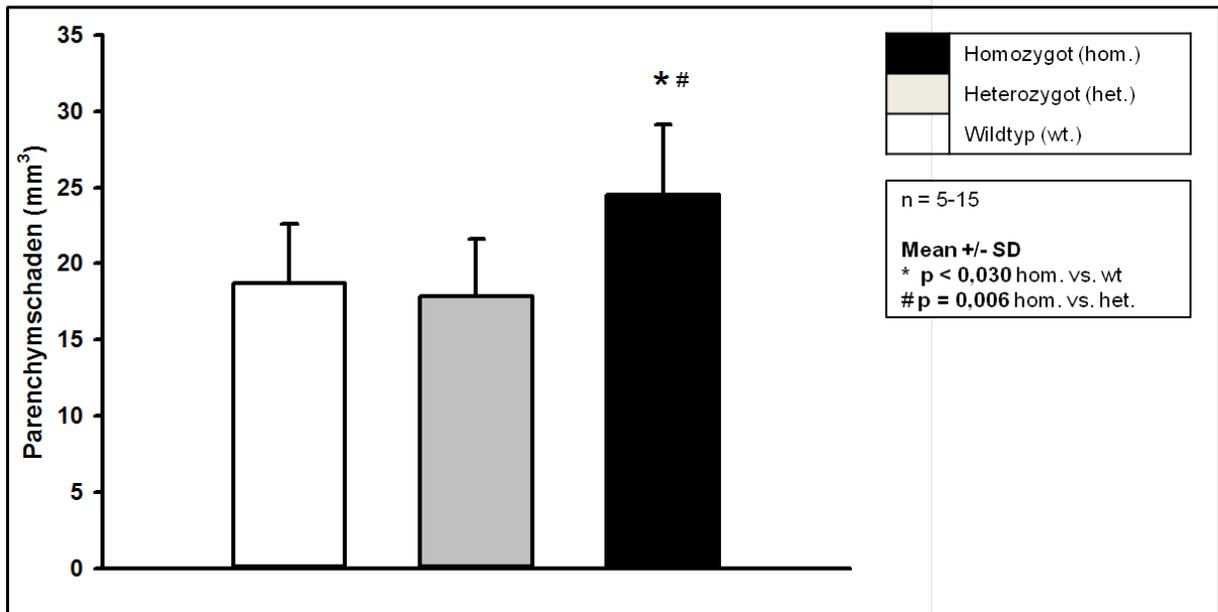


Abbildung 21: Parenchym Schaden 24 Stunden nach erfolgtem Schädelhirntrauma

Homozygote Tiere zeigten 24 Stunden nach Schädelhirntrauma ein signifikant erhöhtes Läsionsvolumen im Vergleich zur wildtyp ($p < 0,03$) sowie im Vergleich zur heterozygoten Gruppe ($p = 0,006$).

4.1.5 Intrakranieller Druck (ICP) nach SHT

Der intrakranielle Druck ist bei Kontrolltieren 24 Stunden nach SHT signifikant erhöht im Vergleich zu physiologischen Werten. Bei den homozygoten S218L-Mutantentmäusen zeigt sich eine deutliche und signifikante Steigerung (homozygot $24,4 \pm 5,8$ mmHg vs. heterozygot $18,3 \pm 4,7$ mmHg ($p = 0,015$), homozygot $24,4 \pm 5,8$ mmHg vs. wildtyp $18,6 \pm 2,5$ mmHg ($p = 0,011$), heterozygot $18,3 \pm 4,7$ mmHg vs. wildtyp $18,6 \pm 2,5$ mmHg ($p = 0,337$)).

Ergebnisse

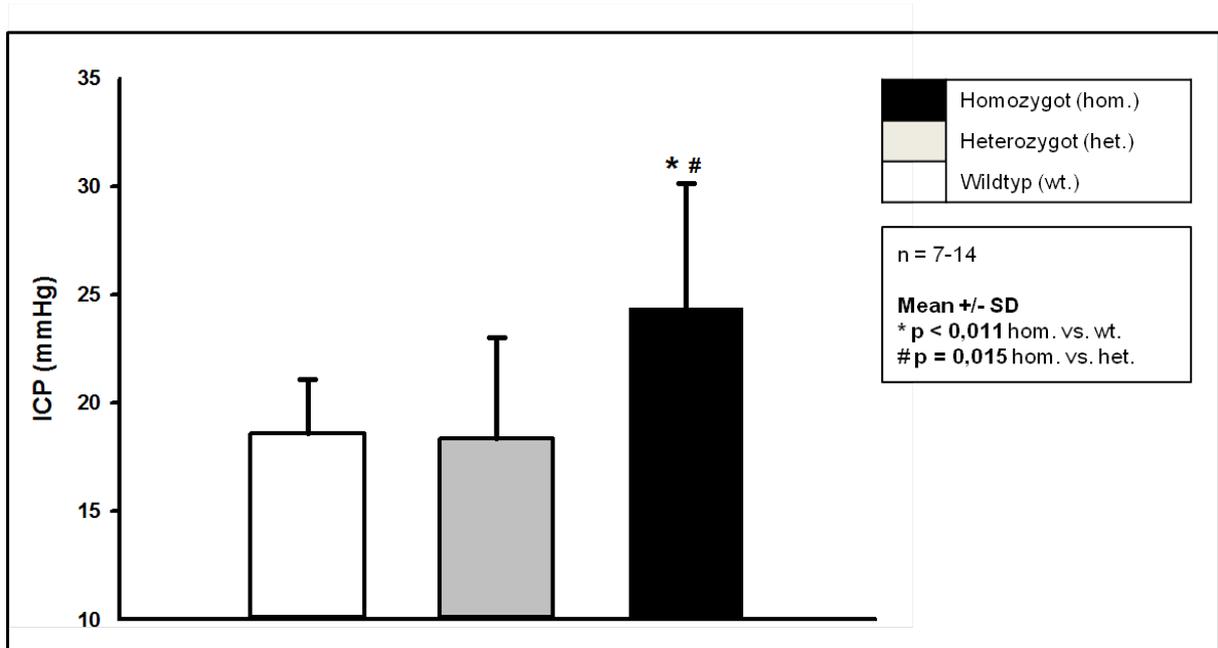


Abbildung 22: intrakranieller Druck (Intracranial Pressure; ICP) 24 Stunden nach erfolgreichem Schädelhirntrauma

Homozygote Tiere zeigten 24 Stunden nach Schädelhirntrauma einen signifikant erhöhten ICP im Vergleich zur wildtyp ($p < 0,011$) sowie im Vergleich zur heterozygoten Gruppe ($p = 0,015$).

4.1.6 Gewichtsabnahme nach SHT

Homozygote S218L-Mutanten-Tiere zeigten 24 Stunden nach Trauma einen signifikanten Unterschied im Gewicht ($-11 \pm 7,4\%$ des Ausgangsgewichts, $p < 0,001$) im Vergleich zur Wildtyp-Kontrollgruppe ($-1,0 \pm 5,3\%$). Auch bei den heterozygoten Mäusen ließ sich ein signifikanter Gewichtsverlust ($-7,1 \pm 5,7\%$; $p < 0,048$) im Vergleich zur Kontrollgruppe, welche ein nahezu konstantes Gewicht zeigten, feststellen (siehe Abbildung 23).

Ergebnisse

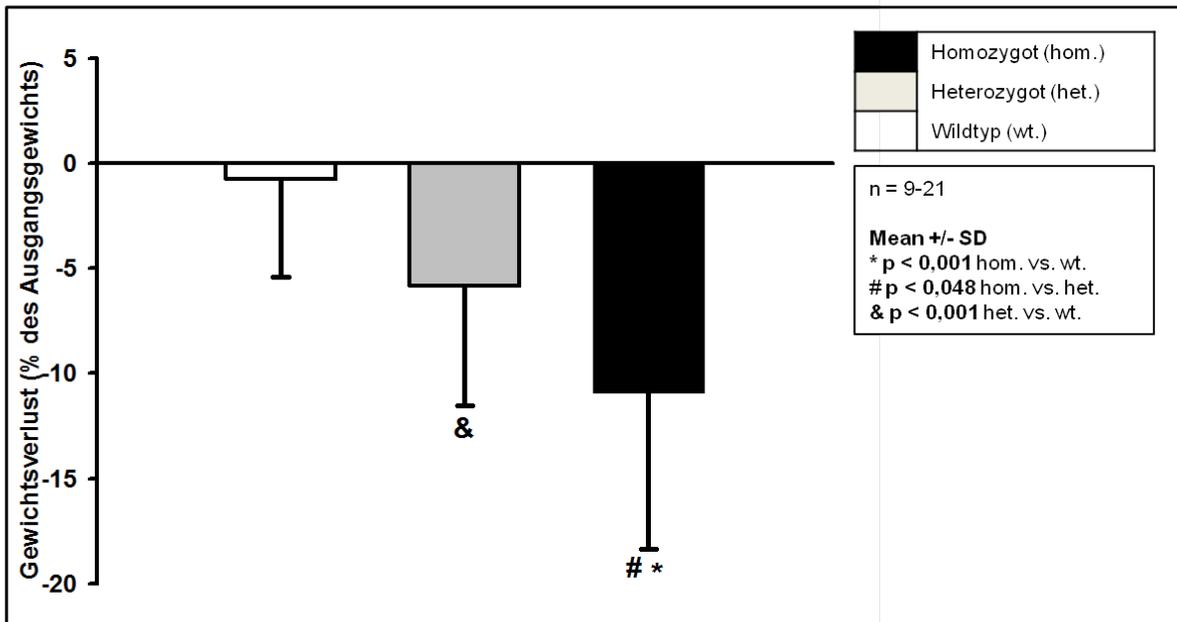


Abbildung 23: Gewichtsverlust 24 Stunden nach CCI

Homozygote Tiere zeigten 24 Stunden nach erfolgtem Schädelhirntrauma einen signifikanten Gewichtsverlust im Vergleich zur Wildtyp- ($p < 0,001$) sowie zur Heterozygoten-Gruppe ($p < 0,048$).

4.1.7 Zusammenfassung der Versuchsserie 1

Die transgenen Tiere zeigten passend zum Ausmaß der CaV2.1(P/Q)-Kalziumkanal-Überaktivierung posttraumatisch eine erhöhte Mortalität, einen erhöhten Hirnwassergehalt, ein größeres Nekrosevolumen sowie einen stärkeren Gewichtsverlust. Dieser Gen-Dosis-Effekt ließ sich auch im Bezug auf die kortikalen Streudepolarisationen feststellen: bereits prätraumatisch zeigten homozygote S218L-Mäuse die höchste Frequenz an CSDs.

4.2 Medikamentöse Beeinflussung des CaV2.1(P/Q)-Kalziumkanals

4.2.1 Versuchsserie 2: Physiologische Auswirkungen von Alpha-Eudesmol

4.2.1.1 Blutgasanalyse (BGA)

Nach intrazerebroventrikulärer Injektion von zwei Mikrolitern Alpha-Eudesmol in der Dosierung 100 nmol zeigte die BGA 60 Minuten nach Injektion keinen Unterschied im Vergleich zur Vehikel-Kontrollgruppe. In Tabelle 5 sind die Werte für pH, $p\text{CO}_2$ sowie $p\text{O}_2$ 15 Minuten vor sowie 60 Minuten nach Injektion von Alpha-Eudesmol mit den zugehörigen p-Werten aufgelistet.

Ergebnisse

Eine Maus aus der Vehikelgruppe wurde wegen bereits präoperativ unphysiologischen $p\text{CO}_2$ und $p\text{O}_2$ -Werten aus der Wertung herausgenommen (a. E. bei Fehlinjektion der Anästhetika).

	pH		$p\text{CO}_2$ (mmHg)		$p\text{O}_2$ (mmHg)	
	-15min	+60min	-15min	+60min	-15min	+60min
Vehikel	$7,4 \pm 0,1$	$7,3 \pm 0,1$	$35,5 \pm 14,7$	$46,3 \pm 11,9$	$101,0 \pm 29,9$	$79,2 \pm 31,0$
Eudesmol	$7,3 \pm 0,1$	$7,3 \pm 0,1$	$44,0 \pm 6,4$	$46,1 \pm 2,5$	$99,3 \pm 29,6$	$81,8 \pm 21,3$
P-Wert	0,70	0,93	0,49	0,94	0,94	0,82

Tabelle 5: Physiologische Parameter

Die intrazerebroventrikuläre Injektion von Alpha-Eudesmol zeigte keine Auswirkungen auf die arterielle Blutgasanalyse im Vergleich zur Vehikel-Kontrollgruppe, hinsichtlich pH, $p\text{CO}_2$ und $p\text{O}_2$, bei Blutentnahme 15 min vor und 60 min nach Injektion.

4.2.1.2 Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP)

Der mittlere arterielle Blutdruck, der 10 Minuten vor bis 60 Minuten nach Injektion aufgezeichnet wurde, unterschied sich nicht zwischen der Alpha-Eudesmol und der Vehikel-Gruppe (siehe Abbildung 24).

Vor Injektion betrug der mittlere arterielle Blutdruck bei den Kontrolltieren $63 \pm 6,9$ mmHg vs. $72,6 \pm 17,0$ mmHg in der Alpha-Eudesmol-Gruppe ($p = 0,14$). Über die Zeit kam es narkosebedingt in beiden Gruppen zu einem nicht signifikanten, leichten Abfall des systemischen Blutdrucks.

Ergebnisse

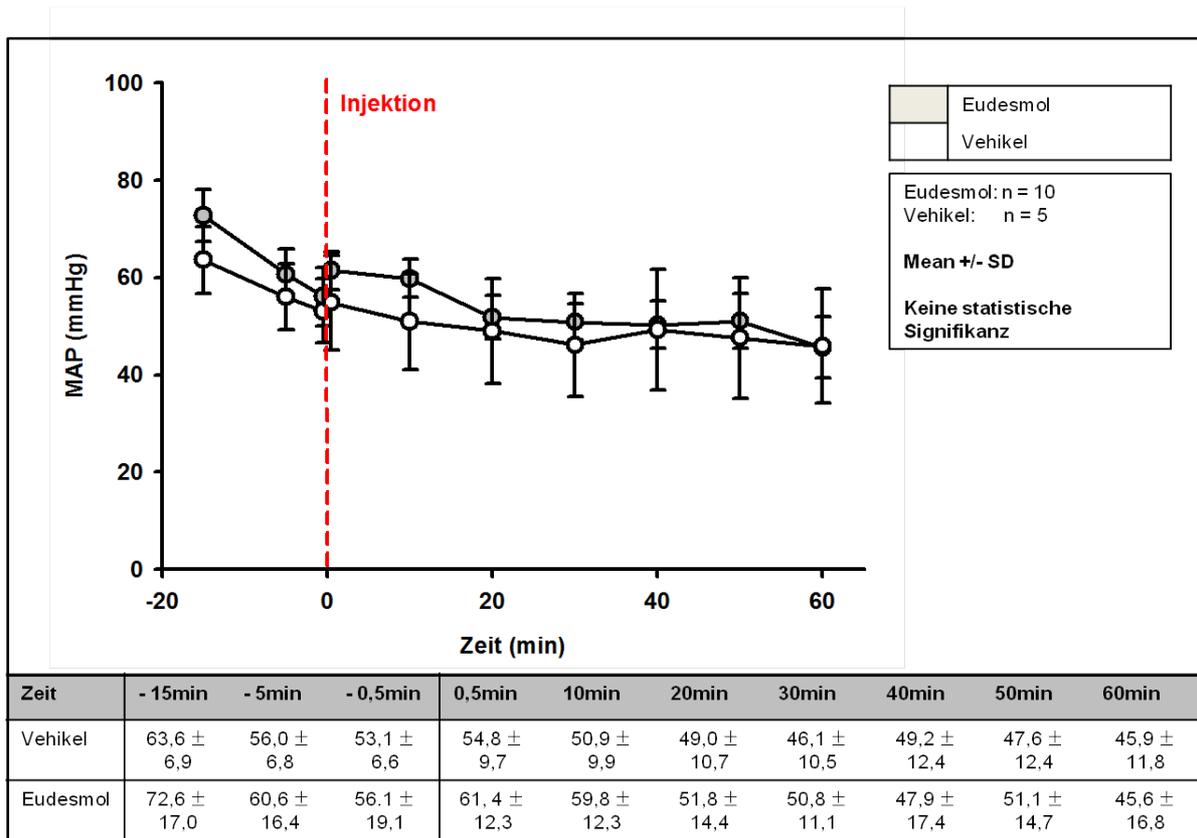


Abbildung 24: Auswirkungen von Alpha-Eudesmol auf den mittleren arteriellen Blutdruck (Mean Arterial Pressure; MAP)

Die intrazerebroventrikuläre Injektion von Alpha-Eudesmol zeigte keine Auswirkungen auf den MAP im Vergleich zur Vehikel-Kontrollgruppe.

4.2.1.3 Zerebrale Durchblutung (CBF)

Die Hirndurchblutung zeigte in dem Beobachtungszeitraum von 60 Minuten nach Injektion von Alpha-Eudesmol keinen Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe. Nach icv. Injektion kam es in beiden Gruppen zu einem leichten Abfall des CBF, welcher nicht signifikant war.

Ergebnisse

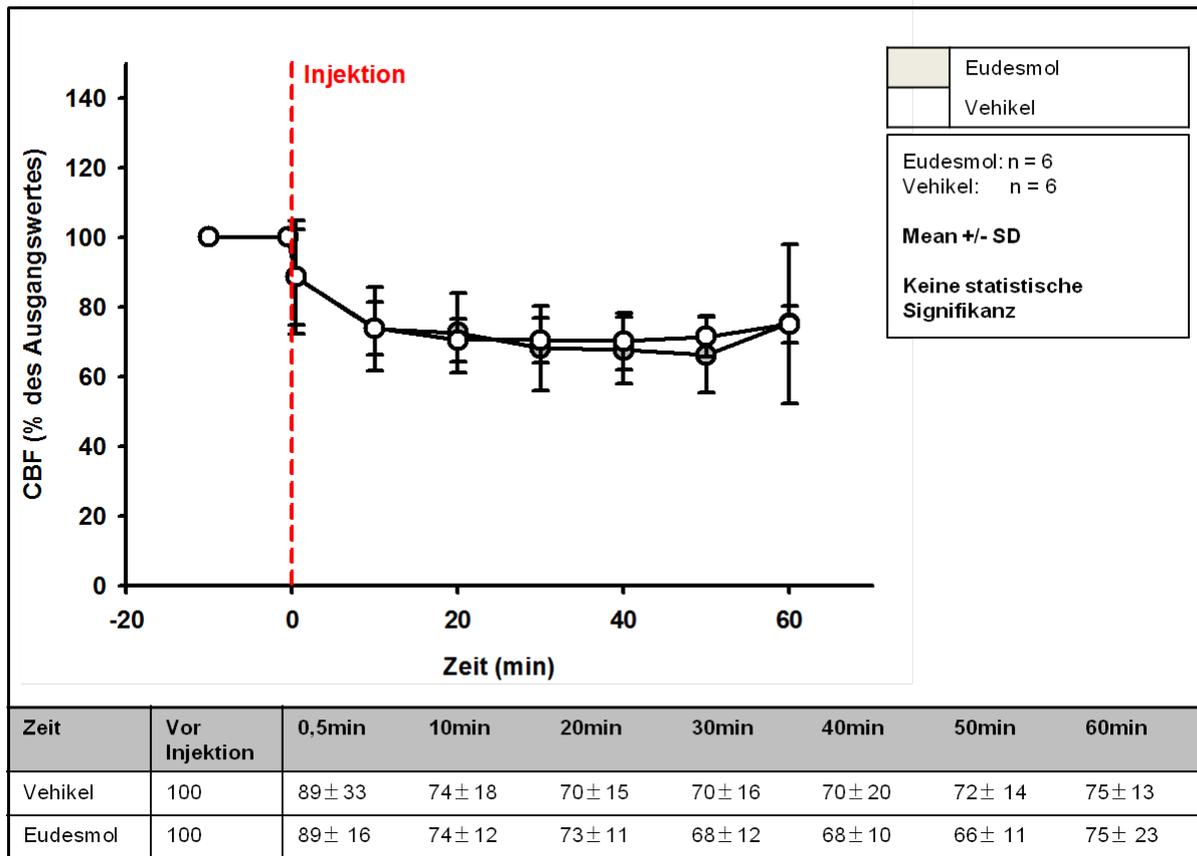


Abbildung 25: Auswirkungen von Alpha-Eudesmol auf die zerebrale Durchblutung (Cerebral Blood Flow; CBF)

Die intrazerebroventrikuläre Injektion von Alpha-Eudesmol zeigte keine Auswirkungen auf den CBF im Vergleich zur Vehikel-Kontrollgruppe.

4.2.1.4 Zusammenfassung der Versuchsserie 2

Die icv. Injektion von Alpha-Eudesmol zeigte keine unerwünschten Nebenwirkungen: Die Blutgasanalyse, der mittlere arterielle Blutdruck sowie die Hirndurchblutung unterschieden sich in den Eudesmol-Tieren nicht von den Kontrolltieren.

4.2.2 Versuchsserie 3: Effekt von Alpha-Eusemol auf die kortikalen Streudepolarisationen nach Trauma

Nach icv. Injektion des Vehikels konnte zuverlässig in allen Versuchstieren durch epidurale Applikation von 0,1 M Kaliumchlorid eine CSD ausgelöst werden. Nach Applikation von 100 nmol Alpha-Eudesmol konnten keine CSDs evoziert werden, weder mit 0,1 M noch mit 1 M KCl-Lösung. Abbildung 26 zeigt die Ergebnisse der CSD-Messungen in der Übersicht. Abbildung 27 zeigt exemplarisch die EEG und DC Veränderungen einer der mit 0,1 M KCl-Lösung provozierten CSD-Wellen.

Ergebnisse

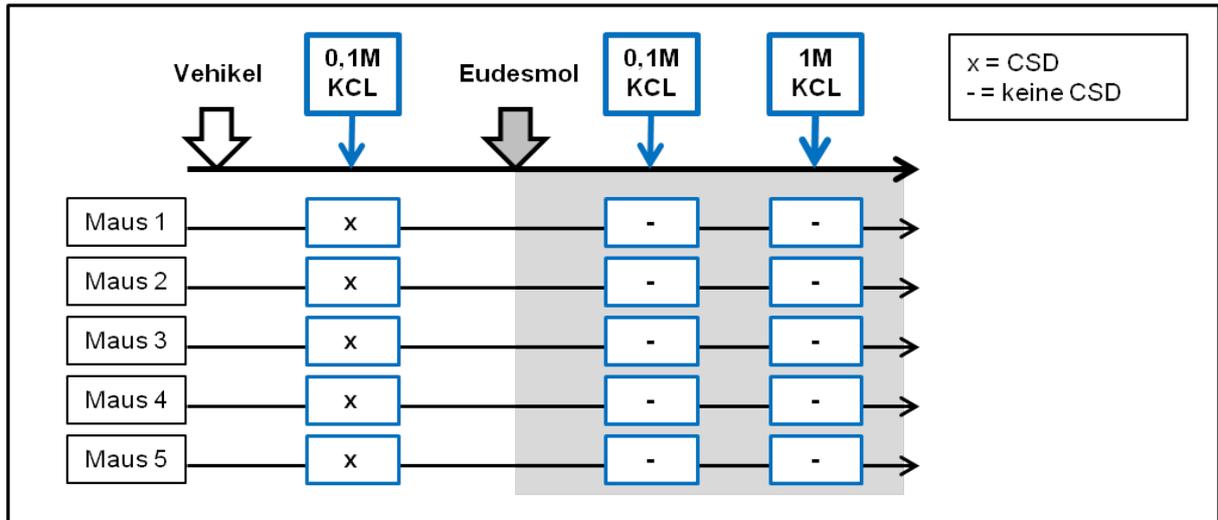


Abbildung 26: Auswirkungen von Alpha-Eudesmol auf die zerebralen Streudepolarisationen (Cortical Spreading Depolarisation, CSD)

Bei nativen Tieren konnte nach intrazerebroventrikulärer Injektion des Vehikels durch epidurale Applikation einer 0,1 M Kaliumchlorid(KCl)-Lösung zuverlässig eine CSD ausgelöst werden. Wurde denselben Tieren jedoch 100 nmol Alpha-Eudesmol intrazerebroventrikulär verabreicht, konnte weder mit 0,1 M KCl-Lösung noch mit 1 M KCl-Lösung eine CSD generiert werden.

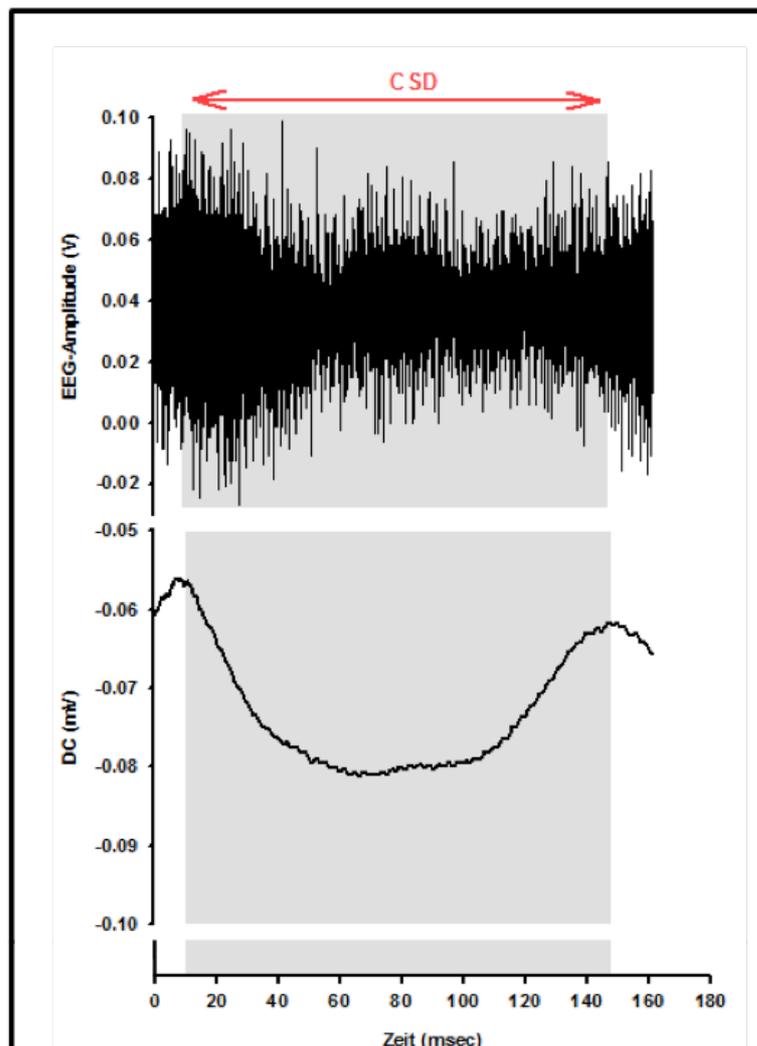


Abbildung 27: Beispiel der EEG- und DC-Veränderungen einer kortikalen Streudepolarisation

4.2.3 Versuchsserie 4: Auswirkungen von Alpha-Eudesmol auf den Sekundärschaden nach SHT bei prätraumatischer Injektion

4.2.3.1 Hirnwassergehalt nach SHT

Tiere der Vehikelgruppe (i.c.v. Injektion von 2 µl Vehikel 10 Minuten vor SHT) wiesen 24 Stunden nach CCI einen Hirnwassergehalt von $81,1 \pm 0,4\%$ ipsilateral bzw. $79,4 \pm 0,6$ kontralateral auf. In beiden Hemisphären zeigte sich im Vergleich zu dieser Vehikel-Gruppe eine signifikante Verringerung des Hirnwassergehalts nach 24 Stunden bei prätraumatischer Applikation von Alpha-Eudesmol in den Dosierungen 100 nmol (ipsilateral: $80,3 \pm 0,7\%$, $p=0,04$; kontralateral: $78,3 \pm 0,3\%$, $p=0,001$; gesamt: $79,3 \pm 1,1\%$, $p=0,029$), 500 nmol (ipsilateral: $80,2 \pm 0,3\%$, $p<0,001$; kontralateral: $78,1 \pm 0,4\%$, $p<0,001$; gesamt: $79,2 \pm 1,1\%$, $p=0,012$) sowie 1 µmol (ipsilateral: $80,2 \pm 0,8$, $p=0,009$; kontralateral: $78,5 \pm 0,8$ %, $p=0,021$; gesamt: $79,3 \pm 1,2\%$, $p=0,023$). Niedrigere Dosierungen hatten keinen Effekt: 50 pmol (ipsilateral: $81,3 \pm 0,9\%$, $p=0,336$; kontralateral: $79,4 \pm 1,3$ %, $p=0,694$; gesamt: $80,4 \pm 1,4\%$, $p=0,724$), 500 pmol (ipsilateral: $81,6 \pm 0,6\%$, $p=0,121$; kontralateral: $79,9 \pm 0,6\%$, $p=0,902$; gesamt: $80,7 \pm 1,1\%$, $p=0,467$) sowie 1 nmol (ipsilateral: $81,0 \pm 0,7\%$, $p=0,883$; kontralateral: $79,4 \pm 0,6\%$, $p=1,000$; gesamt: $80,2 \pm 1,1\%$, $p=0,909$). Abbildung 28 zeigt den Hirnwassergehalt 24 Stunden nach SHT, Abbildung 29 für die beiden effektiven Dosierungen 100 nmol sowie 1 µmol den Gesamt-Hirnwassergehalt.

Ergebnisse

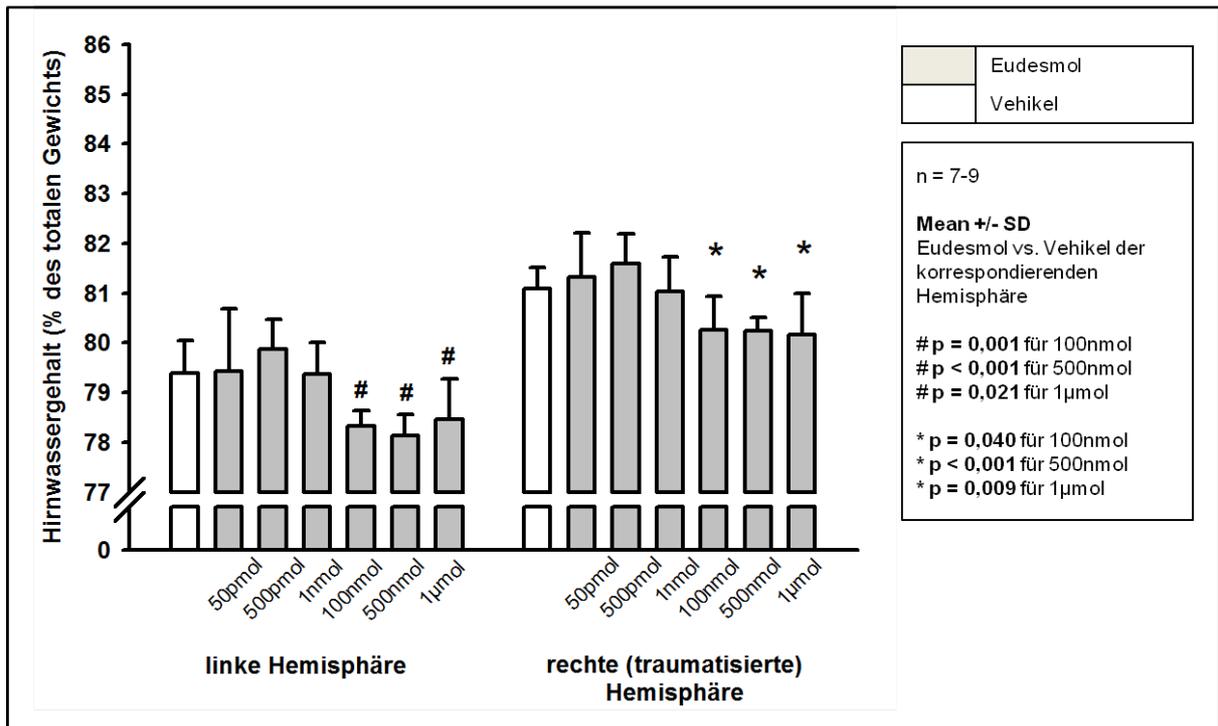


Abbildung 28: Auswirkung von Alpha-Eudesmol auf den Hirnwassergehalt nach Schädelhirntrauma (SHT) bei prätraumatischer Injektion – Hirnwassergehalt der einzelnen Hemisphären

Bei intrazerebroventrikulärer Injektion von Alpha-Eudesmol (in den Dosierungen 100 nmol, 500 nmol und 1 µmol) 10min vor CCI zeigte sich nach 24 Stunden ein signifikant verringerter Hirnwassergehalt, sowohl in der dem Trauma ipsilateralen ($p=0,040$ für 100nmol; $p<0,001$ für 500nmol; $p=0,009$ für 1 µmol) als auch kontralateralen Hemisphäre ($p=0,001$ für 100 nmol; $p<0,001$ für 500 nmol; $p=0,021$ für 1 µmol).

Ergebnisse

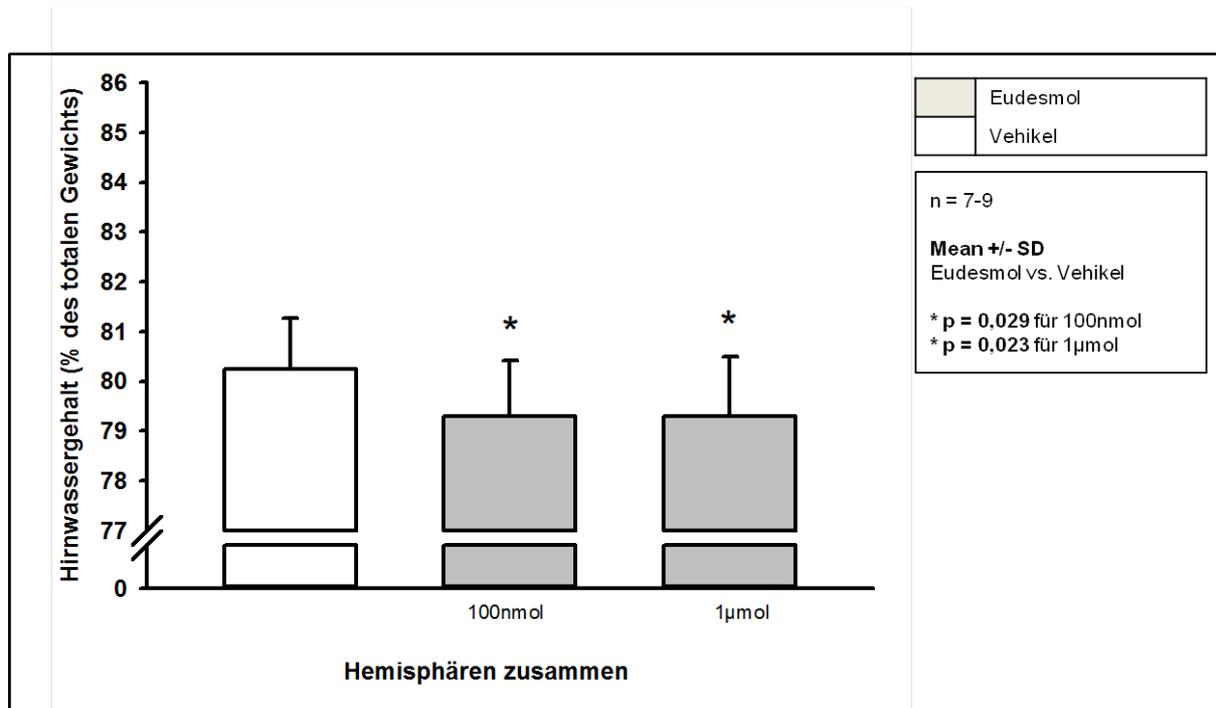


Abbildung 29: Auswirkung von Alpha-Eudesmol auf den Hirnwassergehalt nach Schädelhirntrauma (SHT) bei prätraumatischer Injektion – Hirnwassergehalt des gesamten Gehirns

4.2.3.2 Läsionsvolumen 24 Stunden nach SHT

Der Primärschaden in dem verwendeten CCI-Modell beläuft sich auf $13,6 \pm 0,9 \text{ mm}^3$. Bei prätraumatischer icv. Applikation von Alpha-Eudesmol (in den Dosierung 100 nmol und 1 µmol als niedrigste bzw. höchste Dosis, welche im vorergehenden Versuch zu einer Reduktion des Hirnwassergehaltes nach SHT geführt hat) konnte keine Verringerung des Parenchymschadens im Vergleich zur Vehikel-Kontrollgruppe nachgewiesen werden: $19,6 \pm 3,3 \text{ mm}^3$ ($p=0,65$) für 100 nmol bzw. $22 \pm 3,3 \text{ mm}^3$ ($p= 0,65$) für 1 µmol vs. $20,9 \pm 4,7 \text{ mm}^3$ des Vehikels (siehe Abbildung 30).

Ergebnisse

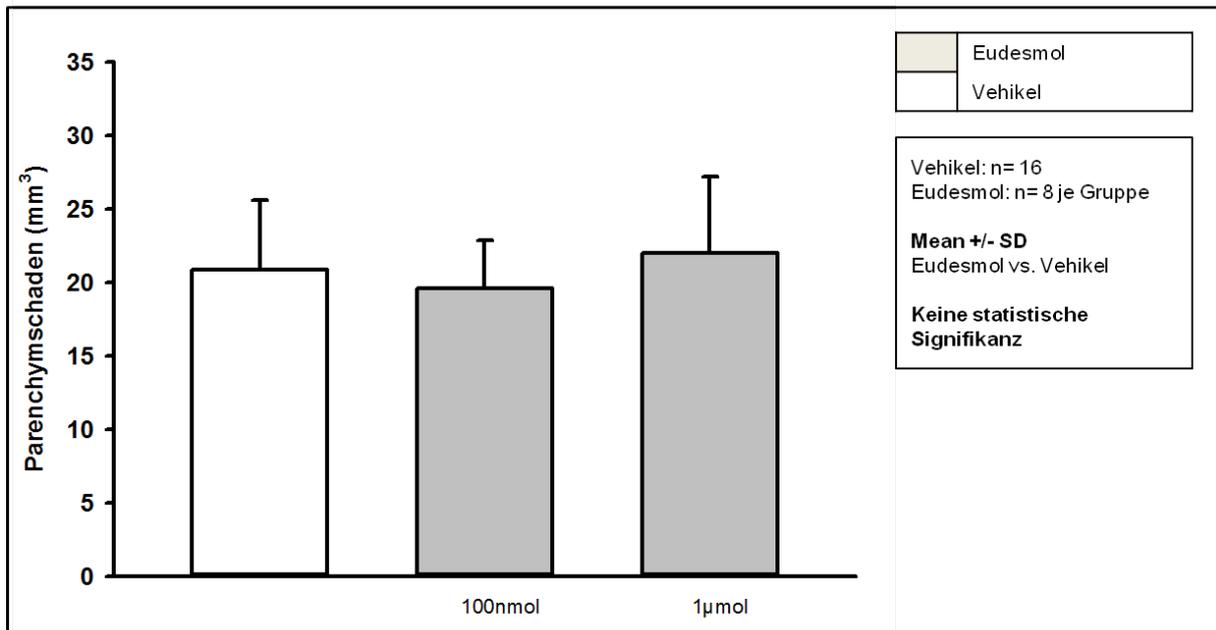


Abbildung 30: Auswirkung von Alpha-Eudesmol auf den Parenchym Schaden nach Schädelhirntrauma (SHT) bei prätraumatischer Injektion

Bei intrazerebroventrikulärer Injektion von Alpha-Eudesmol 10 min vor Traumatisierung zeigte sich nach 24 Stunden kein Effekt auf den Parenchym Schaden.

4.2.3.3 Intrakranieller Druck (ICP) nach SHT

Durch i.c.v. Injektion von 100nmol Alpha-Eudesmol 10 min vor CCI konnte die posttraumatische intrakranielle Hypertension signifikant verringert werden (Abbildung 31): $19,2 \pm 0,72$ mmHg für Eudesmol- vs. $23,0 \pm 2,04$ mmHg für die Vehikel-Gruppe ($p=0,002$). Bei einer Dosissteigerung von Alpha-Eudesmol auf $1 \mu\text{mol}$ konnte dieser positive Effekt auf den posttraumatisch gesteigerten ICP nicht mehr beobachtet werden: $22,2 \pm 1,6$ mmHg für Eudesmol vs. $23,0 \pm 2,04$ mmHg für die Vehikel-Gruppe ($p=0,589$).

Ergebnisse

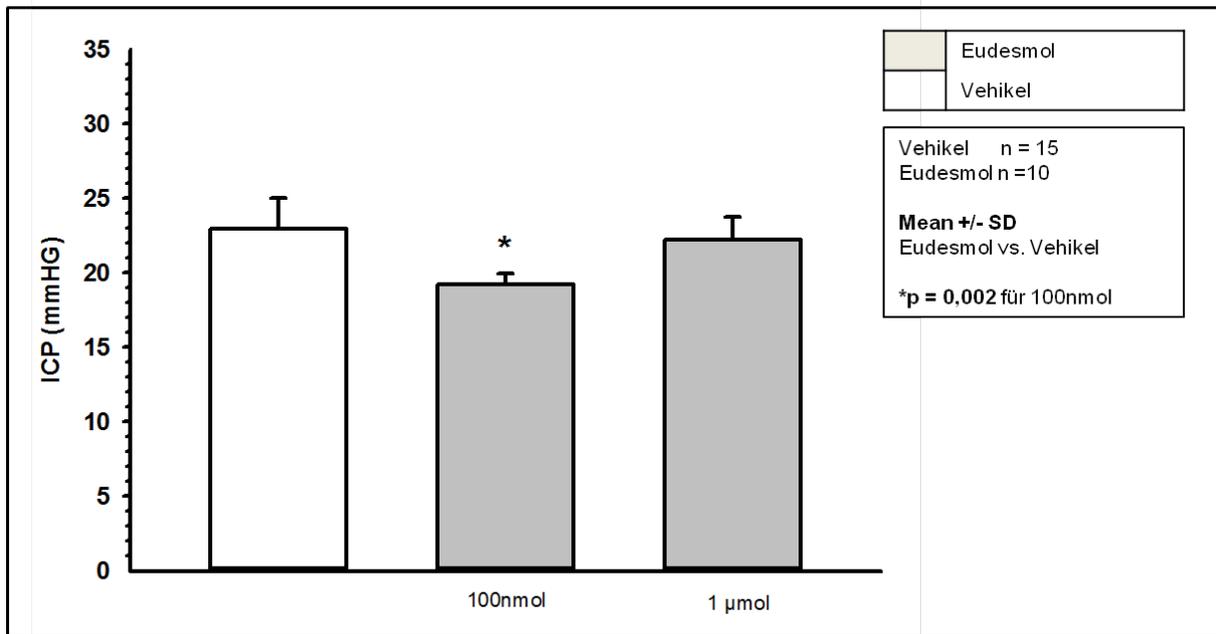


Abbildung 31: Auswirkung von Alpha-Eudesmol auf den intrakraniellen Druck (Intracranial Pressure; ICP) bei prätraumatischer Injektion

Bei intrazerebroventrikulärer Injektion von Alpha-Eudesmol, in der Dosierung 100nmol 10min vor Traumatisierung zeigte sich nach 24 Stunden ein signifikant verringerter ICP ($p=0,002$).

4.2.3.4 Gewichtsverlust nach SHT

Der Gewichtsverlust 24 Stunden nach Trauma als Parameter für das generelle Wohlbefinden zeigte keinen Unterschied zwischen der Alpha-Eudesmol- und der Vehikel-Gruppe (siehe Abbildung 32); Vehikel: $-5 \pm 2\%$ des Ausgangsgewichtes, 100nmol: $-8 \pm 3\%$ ($p=0,065$), 1 µmol $5\% \pm 5\%$ ($p=1,000$).

Ergebnisse

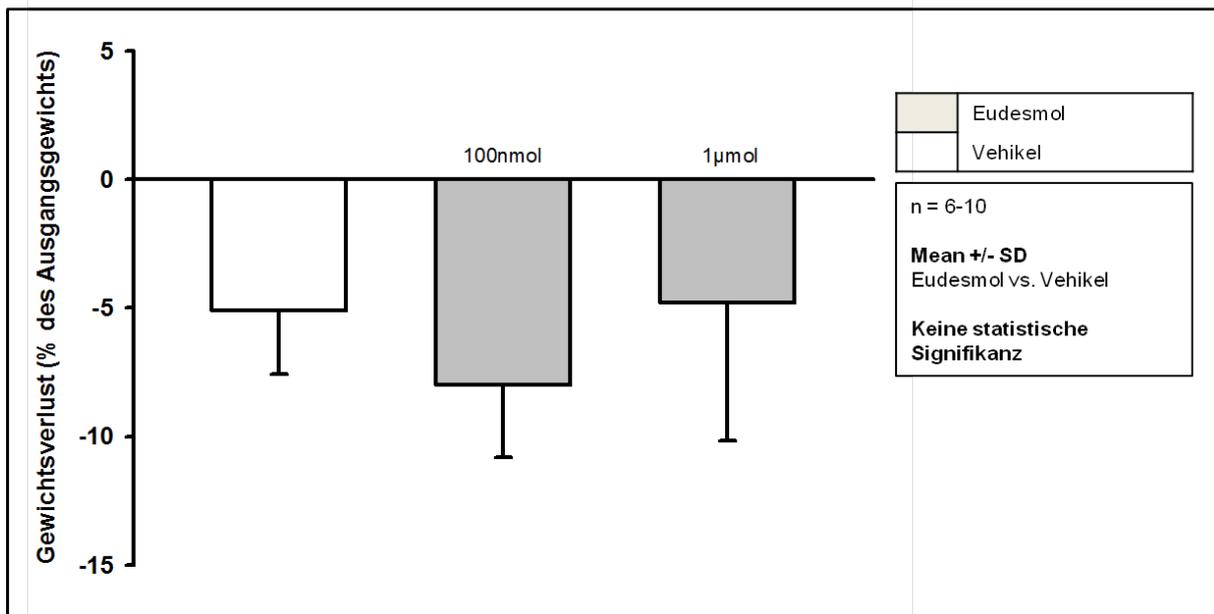


Abbildung 32: Auswirkung von Alpha-Eudesmol auf das Körpergewicht nach Schädelhirntrauma (SHT) bei prätraumatischer Injektion

Bei intrazerebroventrikulärer Injektion von Alpha-Eudesmol 10 min vor CCI zeigte sich nach 24 Stunden kein Effekt auf das Körpergewicht im Vergleich zur Vehikel-Kontrollgruppe.

4.2.3.5 Zusammenfassung der Versuchsserie 4

Die icv. Injektion von Alpha-Eudesmol in der Dosierung 100 nmol zehn Minuten vor Trauma führte sowohl zu einer statistisch signifikanten Reduktion der posttraumatischen Ödementstehung als auch des posttraumatisch gesteigerten ICPs, jedoch ohne das Nekrosevolumen zu beeinflussen.

4.2.4 Versuchsserie 5: Effekt von Alpha-Eudesmol auf den Sekundärschaden nach SHT bei posttraumatischer Injektion

4.2.4.1 Hirnwassergehalt nach SHT

Im Gegensatz zur prätraumatischen Injektion von Alpha-Eudesmol in den Dosierungen 100 nmol, 500 nmol und 1 µmol, zeigte sich bei deren Applikation 10 min nach CCI kein positiver Effekt auf den Hirnwassergehalt im Vergleich zur Vehikel-Gruppe. Auch höhere Dosierungen von Alpha-Eudesmol (100 µmol sowie 1 mmol) führten nicht zu einer signifikanten Verringerung des posttraumatischen Hirnwassergehalts. Nach Gabe von 100nmol und 100µmol zeigte sich im Vergleich zur jeweiligen Vehikel-Gruppe sogar eine Erhöhung (Abbildung 33).

Ergebnisse

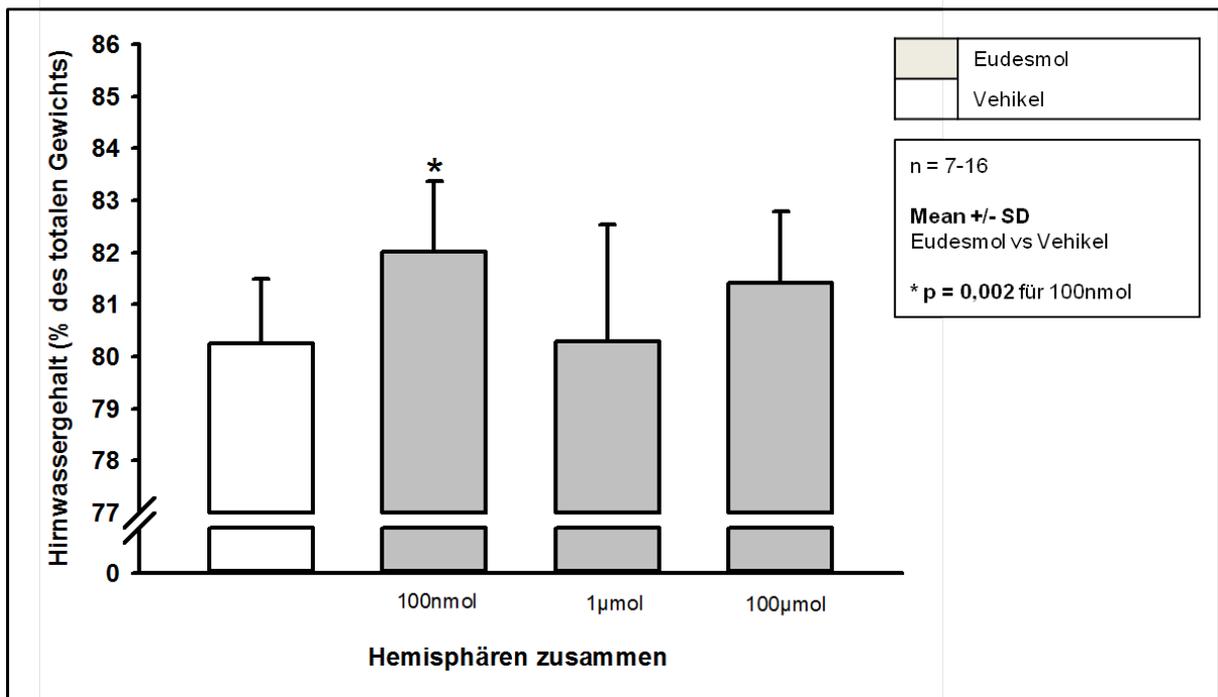


Abbildung 33: Auswirkung von Alpha-Eudesmol auf den Hirnwassergehalt nach Schädelhirntrauma (SHT) bei posttraumatischer Injektion – Hirnwassergehalt des gesamten Gehirns

Nach intrazerebroventrikulärer Injektion von Alpha-Eudesmol 10min nach Trauma zeigte sich nach 24 Stunden keine Reduktion des Hirnwassergehalts, in der Gruppe 100 nmol war dieser sogar gesteigert.

Unter der Hypothese, dass durch die veränderte Stoffwechsel- und Durchblutungssituation nach Trauma eine sehr viel höhere Konzentration an Alpha-Eudesmol benötigt wird, ergänzten wir eine Versuchsreihe, in der Alpha-Eudesmol in einer Dosierung von 1 mmol icv. verabreicht wurde. Auch hierdurch konnte keine Reduktion des Hirnwassergehaltes erzielt werden, der Wassergehalt war tendenziell sogar erhöht: 1 mmol $80,6 \pm 2,9\%$ vs. Vehikel $79,1 \pm 1,5\%$ (Abbildung 34).

Ergebnisse

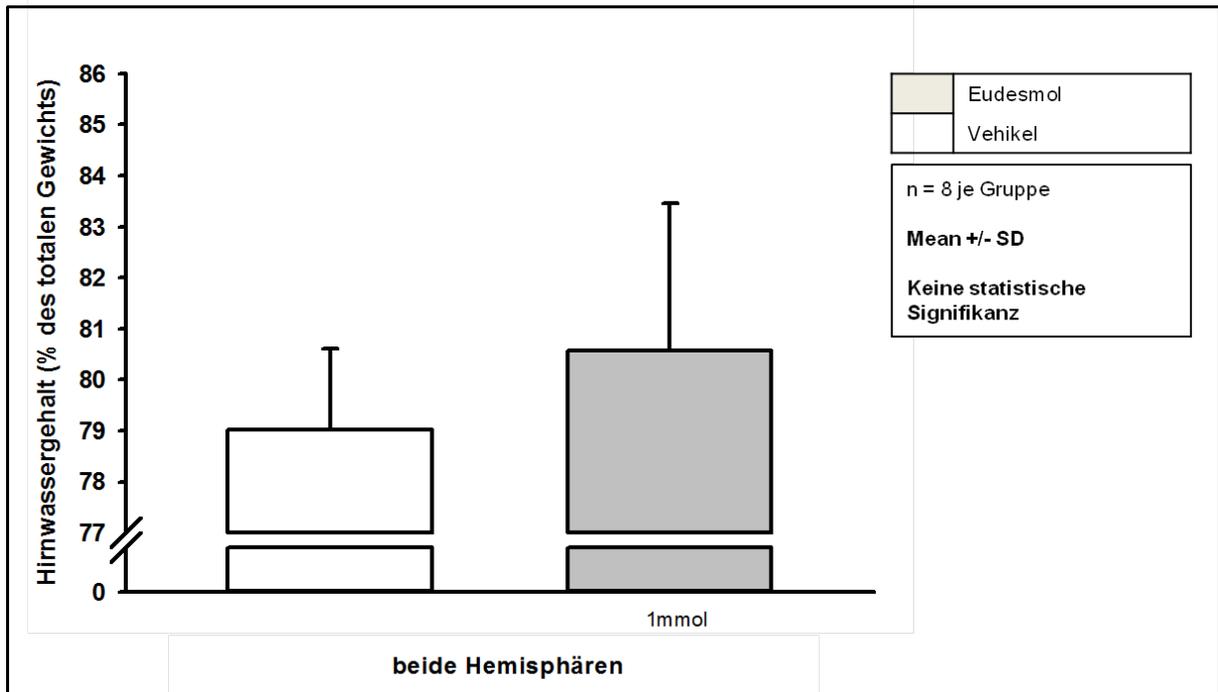


Abbildung 34: Auswirkung von Alpha-Eudesmol auf den Hirnwassergehalt nach Schädelhirntrauma (SHT) bei posttraumatischer Injektion – Hirnwassergehalt des gesamten Gehirns

Bei intrazerebroventrikulärer Injektion von Alpha-Eudesmol 10 min nach Trauma zeigte sich nach 24 Stunden keine Reduktion des Hirnwassergehalts, sondern ein tendenzieller Anstieg.

4.2.4.2 Intrakranieller Druck (ICP) nach SHT

Analog zur fehlenden Senkung des Hirnwassergehalts zeigte sich in den Gruppen mit posttraumatischer Injektion von Alpha-Eudesmol keine Reduktion des gesteigerten Intrakraniellen Drucks, der ICP zeigte sich teilweise in den Eudesmol-Gruppen sogar erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe (siehe Abbildung 35 und 36).

Ergebnisse

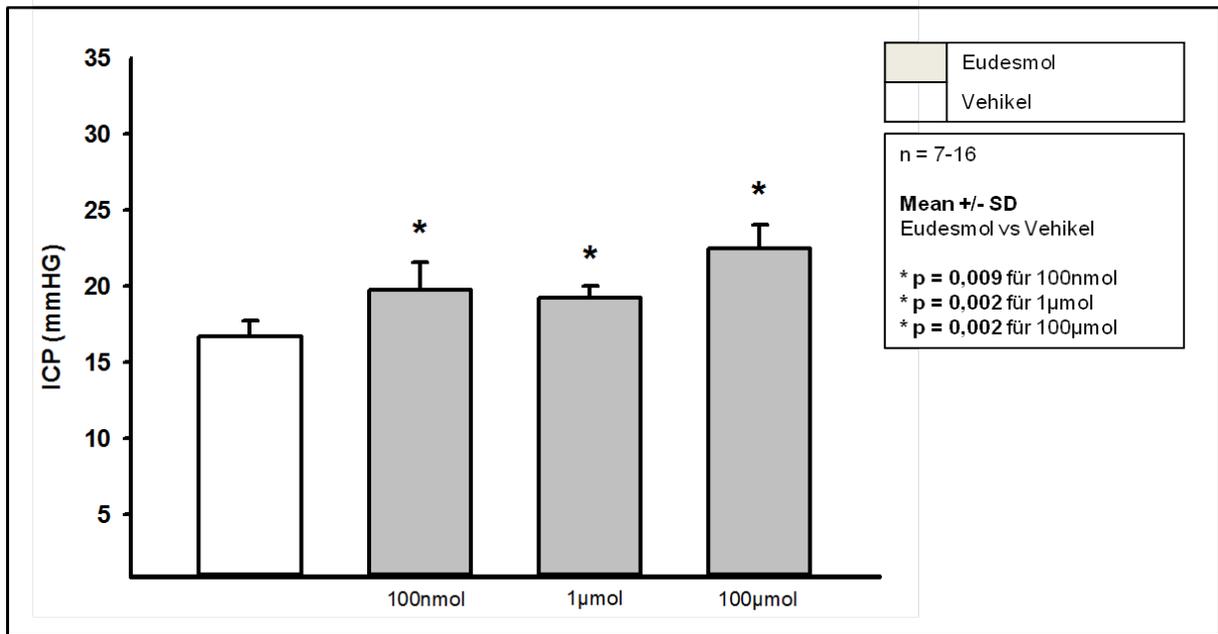


Abbildung 35: Effekt der posttraumatischen Alpha-Eudesmol Injektion auf den intrakraniellen Druck (Intracranial Pressure; ICP)

Die intrazerebroventrikulärer Injektion von Alpha-Eudesmol 10 min nach CCI zeigte zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Trauma eine Zunahme des ICP ($p=0,009$ für 100 nmol, $p=0,002$ für 1 µmol, $p=0,002$ für 100 µmol).

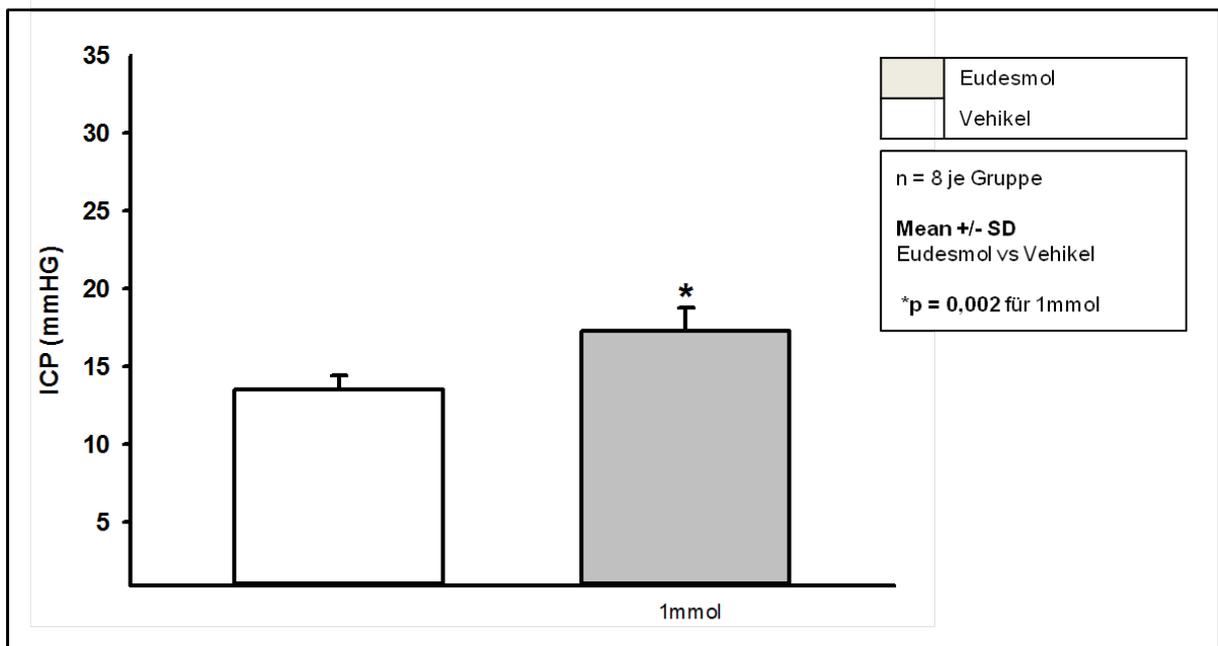


Abbildung 36: Auswirkung der posttraumatischen Alpha-Eudesmol Injektion (1mmol) auf den intrakraniellen Druck (Intracranial Pressure; ICP)

Nach intrazerebroventrikulärer Injektion von Alpha-Eudesmol (10min nach CCI) zeigte sich zum Zeitpunkt 24 Stunden eine Zunahme des ICP ($p=0,002$).

4.2.4.3 Gewichtssverlust nach SHT

Der Gewichtsverlust 24 Stunden nach Trauma zeigte keinen Unterschied zwischen den Alpha-Eudesmol- und der Vehikel-Gruppe (siehe Abbildung 37; $-9 \pm 9\%$ des Ausgangsgewichtes ($p=0,283$) für 100 nmol, $-5 \pm 2\%$ ($p=0,561$) für 500 nmol, $-5 \pm 4\%$ ($p=0,878$) für $1\mu\text{mol}$, $-8 \pm 4\%$ ($p=0,133$) für $100\mu\text{mol}$ sowie $-6 \pm 2\%$ für die Vehikel-Gruppe).

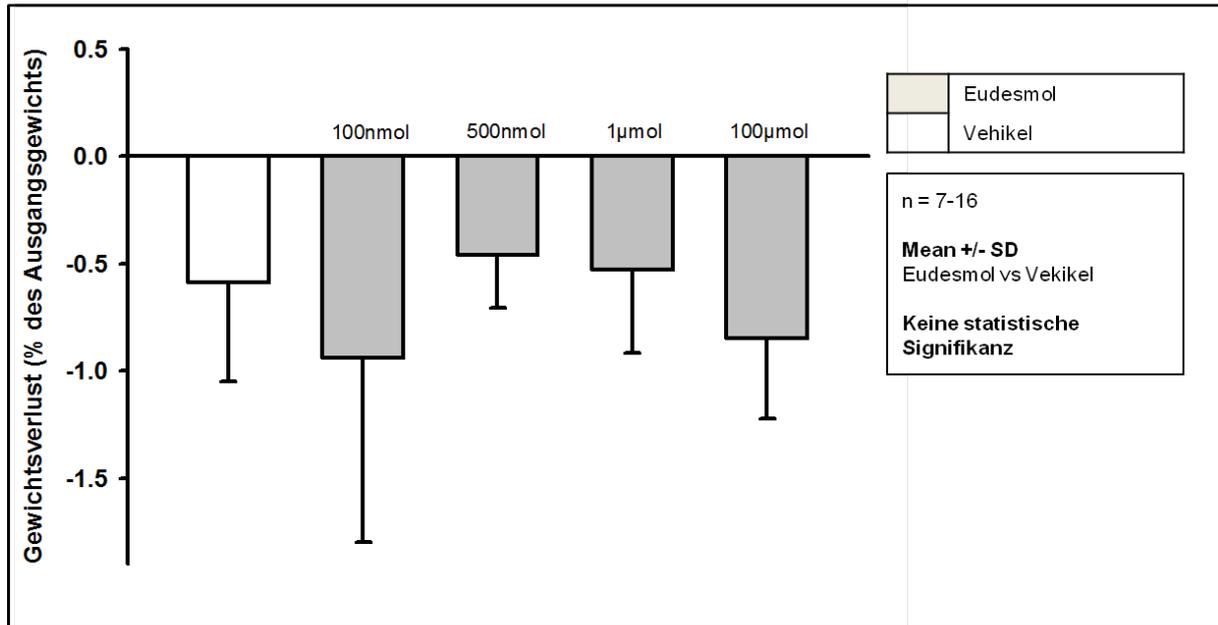


Abbildung 37: Effekt von Alpha-Eudesmol auf das Körpergewicht nach Schädelhirntrauma (SHT) bei posttraumatischer Injektion

Bei intrazerebroventrikulärer Injektion von Alpha-Eudesmol 10min nach Traumatisierung zeigte sich nach 24 Stunden kein Effekt auf das Körpergewicht im Vergleich zur Vehikel-Kontrollgruppe.

4.2.4.4 Zusammenfassung Versuchsserie 5

Die Gabe von Alpha-Eudesmol 10 Minuten nach Trauma konnte weder die Entstehung des Hirnödems noch des posttraumatischen Anstiegs des intrakraniellen Drucks positiv beeinflussen, sie führte sogar dosisabhängig zu einer (tendenziellen) Vergrößerung des Hirnschadens.

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Methoden

5.1.1 Auswahl des Trauma-Modells

Die Anforderung an ein experimentelles Modell ist die möglichst exakte Reproduktion eines klinischen Geschehens bzw. einer Krankheit an Versuchstieren.⁽²⁰³⁾ Da es sich beim SHT um eine komplexe Erkrankung mit unterschiedlichen Ätiologien und einer noch nicht vollständig erforschten Pathophysiologie handelt, wird es deshalb nicht gelingen, diese exakt und mit allen beim Menschen relevanten Aspekten in einem tierexperimentellen Modell abzubilden. Es wurden deshalb unterschiedliche Trauma-Modelle entwickelt, die - je nach zu untersuchendem Hauptaspekt - ihre Vor- und Nachteile aufweisen. Die am häufigsten in der Literatur verwendeten tierexperimentellen Modelle sind das von uns verwendete Controlled Cortical Impact-Modell, das Fluid Percussion-Modell und das Weight Drop-Modell.⁽²⁰⁴⁾

Das CCI-Modell, welches in unserer Arbeitsgruppe vor Jahren für die Maus etabliert und validiert wurde,^(86, 201, 205) wurde 1988 initial für Frettchen entwickelt^(206, 207) und später auch für andere Versuchstiere wie Ratten⁽²⁰⁸⁾ und Mäuse⁽²⁰⁰⁾ validiert. Mit diesem Modell lassen sich akute und chronische Schäden der neurologischen Funktion nach erfolgtem Schädelhirntrauma realitätsnah im Labor erzeugen,^(199, 209, 210) wobei Kontusion von zerebralem Parenchym und das zytotoxische Hirnödem in diesem Versuchsmodell die Hauptaspekte der Verletzung darstellen, da sie sich in diesem Modell – verglichen mit den anderen beiden – am besten reproduzieren lassen.^(48, 50, 55, 208, 211) Eine Kontusion kommt beim schweren Schädelhirntrauma des Menschen in zwei Drittel der Fälle vor;⁽²¹²⁾ das zytotoxische Hirnödem gilt als wichtiger therapeutischer Angriffspunkt in der Therapie des Sekundärschadens nach SHT, da sich dieses sehr früh entwickelt und auch nach Erholung der Blut-Hirn-Schrankenfunktion bestehen bleibt⁽⁴⁸⁾. Zudem steht vermutlich der hier untersuchte CaV2.1(P/Q)-Kalziumkanal, wie bereits oben beschrieben, am Beginn der auslösenden Kaskade für diese Ödemart. Posttraumatisch auftretende akute und chronische neurologische Defizite können mit dem CCI-Modell abgebildet werden und korrelieren gut mit dem Ausmaß der Verletzung.^(199, 209, 210) Ein weiterer Vorteil

Diskussion

dieses Modells ist die genaue Kontrolle des schädigenden Stimulus bezüglich Kontaktzeit, Aufprallgeschwindigkeit und Eindringtiefe.⁽²¹¹⁾

Das Schädelhirntrauma beim Fluid Percussion-Modell wird durch das schnelle Auftreffen eines Flüssigkeits-Bolus auf die intakte Dura ausgelöst, die vorher durch eine mediale oder laterale Kraniotomie freigelegt wurde.^(211, 213) Die Stärke des Traumas kann dabei durch ein Pendel eingestellt werden, welches seine Schwingkraft direkt auf die Flüssigkeit überträgt.^(211, 213) Der Hauptnachteil dieser Methode ist, dass der Impuls, der durch das Pendel auf die Flüssigkeit übertragen wird, nicht direkt mit der resultierenden mechanischen Schädigung des Hirnparenchyms korreliert.⁽²¹¹⁾ Auch lassen sich Aufprallzeit, Aufprallgeschwindigkeit und Eindringtiefe weniger exakt kontrollieren als beim CCI-Modell, da diese Parameter im Fluid Percussion-Modell von der Geometrie des Gehirnes und der verwendeten Spezies abhängen.⁽²¹¹⁾

Beim Weight Drop-Modell wird ein Gewicht aus definierter Höhe senkrecht auf die Kalotte oder direkt auf die Dura des Versuchstiers fallen gelassen.⁽²¹⁴⁻²¹⁷⁾ Das Gewicht befindet sich dabei in einer Führungsröhre.^(214, 215) Nachteile bei diesem Modell bestehen in der nicht exakt kontrollierbaren Aufprallgeschwindigkeit und in dem Risiko einer Rebound-Schädigung.⁽²¹¹⁾ Das Weight-Drop-Modell, in welchem es nebenbefundlich häufig zu Kalottenfrakturen kommt, führt hauptsächlich zu diffusen Veränderungen im Sinne eines diffusen Axonschadens.^(214, 218, 219) Dieses Schädigungsmuster spielt zwar eine wesentliche Rolle für die Langzeitprognose nach SHT, ist jedoch für die Untersuchung des sekundären Hirnschadens weniger geeignet als das CCI-Modell.⁽²²⁰⁾

Die Maus als Versuchstier für das CCI-Modell zur Untersuchung des Schadens nach Schädelhirntrauma ist seit Jahren in unserem Labor etabliert und es lassen sich CBF und MAP, aber auch die Ausbreitung des Hirnödems, Nekrosevolumen und Anstieg des ICP nach Trauma reproduzierbar erzeugen und evaluieren, wobei die dabei gewonnenen Daten vergleichbar mit den Werten sind, die in der Klinik bei Traumapatienten erhoben wurden.^(34, 209, 221, 222) Einer der wichtigen Vorteile der Maus als Versuchstier ist, dass man mit transgenen Tiermodellen arbeiten kann (wie auch im Falle dieser Arbeit).

Das CCI-Modell und die Maus als Versuchstier erscheinen deswegen angemessen, um die pathophysiologischen Vorgänge nach Schädelhirntrauma und die icv. Injektion von Alpha-Eudesmol als mögliche Therapie zu untersuchen.

5.1.2 Durchblutungsmessung

Die Messung der zerebralen Durchblutung sollte für den Versuchsaufbau der vorliegenden Arbeit über einen längeren Zeitraum (70-90 min) erfolgen und durfte nicht invasiv sein, um die pathophysiologischen Vorgänge nach erfolgtem Schädelhirntrauma nicht zu beeinflussen.

Verfahren wie die C¹⁴-Autoradiographie⁽²²³⁻²²⁵⁾ – der Goldstandard für die quantitative Messung der Hirndurchblutung – und Durchblutungsmessung mit radioaktiv oder fluoreszierend markierten Mikrosphären⁽²²⁶⁾ konnten nicht verwendet werden, da sie die Tötung des Versuchstieres erfordern und somit keine Verlaufsbeobachtung möglich ist.

Indikatorverfahren, die eine Messsonde im Hirnparenchym nötig machen, um den Konzentrationsabfall eines Markers wie zum Beispiel Wasserstoff an einer definierten Stelle zu detektieren,⁽²²⁷⁾ sind für die vorliegende Fragestellung ebenfalls ungünstig, da sie eine weitere Läsion des Hirngewebes zur Folge haben und deshalb besonders bei Verlaufsbeobachtungen über einen längeren Zeitraum bzw. in den gegenüber minimaler Traumata sehr empfindlichen S218L-transgenen Tieren einen Störfaktor darstellen können.

Verfahren wie die MRT⁽²²⁸⁻²³⁰⁾- und PET-Messung⁽²³¹⁾ der Hirndurchblutung haben den Vorteil, dass sie nicht invasiv sind und eine sehr gute Gewebsdarstellung ermöglichen, jedoch wäre die Verwendung der metallischen Sonden für die Intrakranielle Druck-, die EEG- und die DC-Messung, die ein elementarer Bestandteil der vorliegenden Arbeit sind, im MRT nicht möglich gewesen, da dies zu Artefaktbildung und Erwärmung geführt hätte; bei der PET-Messung hätte der Bedarf an Kontrastmittelapplikation eine kontinuierliche Verlaufsbeobachtung der Hirndurchblutung limitiert.

Wir haben uns deshalb für die Laser-Doppler-Fluxmetrie entschieden, da mit dieser Methode eine nichtinvasive Verlaufsbeobachtung des CBF möglich ist, ohne die Messung der Hirndrucksonde oder des EEG- bzw. DC-Potenzials zu beeinflussen.⁽²³²⁻²³⁵⁾ Die Laser-Doppler Sonde wird temporal auf den Schädelknochen geklebt, wodurch sich Bewegungsartefakte auf ein Minimum reduzieren lassen. Das Hauptproblem dieser Methode besteht darin, dass die Durchblutung nur im Kortex (A. cerebri media-Stromgebiet) bestimmt werden kann, da die Eindringtiefe des Laser-Dopplers auf ca. 1,5 mm limitiert ist. Es konnte jedoch in vorangegangenen Arbeiten gezeigt werden, dass die Messergebnisse der LDF-

Messung mit denen der C¹⁴-Autoradiographie gut korrelieren.^(236, 237) Zudem konnte von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass sich der Sekundärschaden nach Schädelhirntrauma hauptsächlich im Bereich der Arteria cerebri media entwickelt.⁽²⁰⁵⁾ Somit misst die LDF die Durchblutung in exakt dem Gebiet, das für die Fragestellung der vorliegenden Arbeit die größte Bedeutung hat.

Ein weiterer Kritikpunkt an der verwendeten Methode ist, dass sie nur relative, keine absoluten Werte der Hirndurchblutung misst. Da die vorliegende Studie jedoch die Veränderung des CBF vor und nach Trauma bzw. vor und nach icv. Injektion einer Substanz untersucht, sind Relativwerte für die vorliegende Fragestellung ausreichend.

5.1.3 EEG- und DC-Messung

Die Messung des EEG und des DC musste über einen Versuchszeitraum bis 90 min kontinuierlich durchgeführt werden und durfte weder die Injektion der Substanzen, noch die Applikation der KCl-Lösung beeinträchtigen. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Methodik der EEG- und DC-Messung mittels Calome-Elektroden zeigte sich in der Literatur bereits als effektive Methode zur Detektion der CSDs.^(130, 138) Der wichtigste Vorteil dieser Methode war die nicht-invasive Messung, die gerade bei den sehr empfindlichen S218L-Mäusen für die Länge der Versuche am geeignetsten erschien. Ein zusätzliches Gewebetrauma durch eine invasive Messung wurde so vermieden; außerdem kann die Implantation von Parenchymsonden bereits ausreichen, um bei den Tieren mit CACNA1a mutation CSDs auszulösen; somit hätte die Messung selbst das Ergebnis verfälschen können. Der Nachteil der Calomel-Elektroden besteht in ihrer Störanfälligkeit gegenüber elektromagnetischen Impulsen. Während der Messung wurde deshalb der Versuchsbereich elektromagnetisch weitgehend abgeschirmt. Zudem konnten weiterhin bestehende Störsignale direkt am Gerät herausgefiltert werden (50 Hz - Filter). Diese Art der neurophysiologischen Messung wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits etabliert und validiert.⁽¹³⁸⁾

Ein Kritikpunkt der verwendeten Methode ist die Notwendigkeit der permanenten Befeuchtung der Elektrodenenden mit physiologischer Kochsalzlösung. Dies führte zu Artefakten sowohl in der DC- als auch in der EEG-Aufzeichnung. Es wurde jedoch der genaue Zeitpunkt der Befeuchtung, sowie jedes Artefakt durch manuelle Manipulation (bei Injektion von Eudesmol und Vehikel) der Elektroden zeitgenau

festgehalten, so dass diese Artefakte auch in der postinterventionellen Auswertung zu identifizieren und manuell auszuschneiden waren.

CSDs waren in allen gesunden, unbehandelten Mäusen durch KCI-Lösung auslösbar und eindeutig anhand der aus der Literatur bzw. aus Vorversuchen bekannten Merkmale (Verringerung der EEG-Amplitude, DC-Negativierung, reaktiver CBF-Anstieg) zu identifizieren, so dass das verwendete Verfahren als angemessen erscheint.

5.1.4 ICP-Messung

Die ICP-Messung erfolgt in der vorliegenden Arbeit über eine in die rechte Hemisphäre eingebrachte intraparenchymale Drucksonde. Diese Methode entspricht der klinisch verwendeten Art der ICP-Messung bei SHT-Patienten,⁽⁵⁸⁾ eine nichtinvasive Methode der ICP-Bestimmung konnte sich bisher weder experimentell noch klinisch durchsetzen.^(58, 238) Ein Nachteil dieser Messung besteht darin, dass das Volumen der Sonde auf den Mausschädel berechnet prozentual deutlich größer ist als beim Menschen und damit potenziell den intrakraniellen Druck steigern kann. Um diesen Faktor so gering wie möglich zu halten wurde die kleinste erhältliche ICP-Sonde verwendet und erst zehn Minuten vor Tötung des Versuchstieres in das Hirnparenchym eingebracht, um auch den Sekundärschaden nach SHT so wenig wie möglich zu beeinflussen. Das Volumen des Parenchymschadens 24 Stunden nach Trauma zeigte sich im Vergleich zu Versuchsreihen vorangegangener Projekte gleich, sodass eine relevante Verstärkung der intrakraniellen Hypertension und mit des sekundären Hirnschadens unwahrscheinlich scheint. Die invasive ICP-Messung durch eine intraparenchymatöse Drucksonde erscheint demnach als ein geeignetes Verfahren zur Bestimmung des Intrakraniellen Druckes.

5.1.5 Applikation von Alpha-Eudesmol

Aufgrund der chemischen Beschaffenheit (alkoholisches Sesquiterpen; C₁₅H₂₆O)⁽²⁰²⁾ sowie des hohen Molekulargewichts von 222,4 g/mol von Alpha-Eudesmol ist ein Passieren der Blut-Hirnschranke als unwahrscheinlich zu erachten,⁽²³⁹⁾ so dass eine intrazerebrovenitrikuläre Applikation notwendig ist, um eine ausreichende Konzentration des Wirkstoffs im Hirngewebe zu gewährleisten. Bei Versuchen zur fokalen Ischämie in Ratten zeigte sich die intrazerebroventrikuläre Injektion von Alpha-Eudesmol als effektiv und sicher durchzuführen.⁽¹⁹⁶⁾ Asakura et al. konnten zwar bei Versuchen zur Reduktion einer neurogenen Entzündung des

Ganglion trigeminale im Rahmen der Migräne-Forschung durch iv. Gabe dieses Wirkstoffs eine Reduktion der oben genannten Entzündung erreichen,⁽²⁴⁰⁾ dieses Ganglion wird jedoch nicht von der Blut-Hirn-Schranke geschützt.⁽²⁴¹⁾

Die Injektion wurde zunächst durch eine mit Tusche-gefüllte Spritze geübt. Das Gehirn wurde zehn Minuten nach Injektion der Tusche in den linken Seitenventrikel entnommen und die Hemisphären durch eine Rasierklinge getrennt. Die korrekte Injektion konnte durch das angefärbte Ventrikelsystem bestätigt werden. Es ließ sich unter stereotaktisch geführter Injektion nach vorab im Anatomie-Atlas der Maus bestimmten Koordinaten auf Anhieb eine Trefferquote von 100% erzielen. Alpha-Eudesmol und die Vehikelsubstanz wurden mit separaten, aber baugleichen Hamilton-Spritzen appliziert, die Spritzen nach jeder Applikation gereinigt.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Bedeutung des CaV2.1(P/Q)-Kalziumkanals für das SHT

Derzeit besteht die Therapie des SHT bzw. des traumatischen Hirnschadens hauptsächlich in der Aufrechterhaltung bzw. Wiederherstellung einer möglichst optimalen Durchblutungs- und Oxygenierungssituation, um dem Hirnparenchym die bestmöglichen Voraussetzungen zur Regeneration zu bieten. Sind diese Voraussetzungen geschaffen, wird versucht, den pathologisch gesteigerten intrakraniellen Druck so weit wie möglich auf Normalwerte zu senken. Diese Senkung kann zum einen operativ durch Entlastungskraniektomie, zum anderen durch Hyperventilation als auch medikamentös durch Mannitol-Infusionstherapie sowie durch Sedativa wie Barbiturate und Propofol erreicht werden. Die Sedativtherapie gilt jedoch aufgrund der Nebenwirkungen als nur beschränkt einsetzbar.^(2, 58, 92, 97) So empfiehlt die Internationale Schädelhirntrauma-Gesellschaft (Brain Trauma Foundation) in ihrer aktuellen Leitlinie (Guidelines for the Management of Severe Traumatic Brain Injury, 3rd edition)⁽⁹²⁾ die Induktion eines Barbituratkomas nur bei hämodynamisch stabilen Patienten, die nicht auf die maximale Standardtherapie sowie operative Therapie ansprechen. Hohe Dosierungen von Propofol erhöhen sogar die Morbidität (Propofol Infusions Syndrom), so dass eine sorgfältige Risiko-Nutzen Abwägung erfolgen muss.⁽⁹²⁾ Bis zum heutigen Tag existiert keine krankheitsspezifische medikamentöse Therapie des SHT.⁽²⁶⁾ Trotz guter Ergebnisse in experimentellen Versuchsserien konnte sich keine

Diskussion

dieser vielversprechenden neuen Therapieansätze, wie zum Beispiel Kalzium- oder Glutamat-Antagonisten in klinischen Studien behaupten.^(49, 242, 243)

Eine veränderte Kalzium-Homöostase gilt als ein entscheidender Faktor für das Fortschreiten des Sekundärschadens, sowohl in der weißen, als auch in der grauen Hirnsubstanz.⁽²⁶⁾ Wenige Minuten nach Trauma zeigt sich intrazellulär bereits eine massiv erhöhte Konzentration freier Kalziumionen.^(244, 245) Dabei gelangt Ca^{2+} hauptsächlich über zwei Wege in die Zellen: Präsynaptisch durch spannungsabhängige Ionenkanäle sowie postsynaptisch durch Ionenkanäle, welche durch Glutamat aktiviert werden.⁽⁴⁹⁾ Ein erhöhter präsynaptischer Ca^{2+} -Influx mit konsekutiver Exozytose von Glutamat führt zu Zellschwellung (zytotoxisches Hirnödem), Apoptose, und Nekrose.^(26, 49) Traumatisch bedingt werden spannungsabhängige Kalziumkanäle aktiviert, die einen Einstrom von Kalziumionen in die Präsynapse auslösen.^(26, 49, 139) Dies führt über die Aktivierung von SNARE-Proteine zur Exozytose von Glutamat in den synaptischen Spalt.⁽¹⁴¹⁾ Der exzitatorische Neurotransmitter bindet postsynaptisch an ionotrope und metabotrope Glutamat-Rezeptoren und aktiviert über einen postsynaptischen Einstrom von Kalziumionen Enzyme (Lipasen, Proteasen, NO-Synthasen), die zum Zelluntergang führen. Dies resultiert in einem passiven Einstrom von extrazellulärem Wasser in den Intrazellularraum und in einer zytotoxischen Zellschwellung.^(47-49, 51, 74, 84-86) Diese Zellschwellung (zytotoxisches Hirnödem) erhöht den ICP und führt im ungünstigsten Fall zu einer letalen Herniation.^(48, 60) Bei starker intrazellulärer Kalzium-Akkumulation kommt es zudem zum Untergang der Mitochondrien und damit zum kompletten Verlust ihrer Kalzium-Pufferfunktion, was den intrazellulären Kalziumanstieg weiter vorantreibt.⁽²⁴⁶⁻²⁴⁸⁾ Das vermehrt im Extrazellulärraum anfallende Kalium wird wie Glutamat von Astrozyten über Natrium-getriebene Kotransporter aufgenommen.

Diese Kalzium-Glutamat-Kalzium-Kaskade, welche eine entscheidende Rolle in der Entstehung und dem Vorantreiben des Sekundärschadens nach SHT besitzt, zeigt zwei potentielle Angriffspunkte für eine zielgerichtete Therapie.⁽⁴⁹⁾ 1.) präsynaptisch durch Blockierung der Kalziumkanäle bzw. anderweitige Blockade /Reduktion der Exozytose von Glutamat; 2.) postsynaptisch durch Blockierung der Glutamat-Rezeptoren bzw. Beschleunigung der Glutamat-Elimination. Nimodipin und Nicardipin (Blockade von L-Typ-Kalziumkanälen) sowie Ziconotid (Blockade von N-Typ-Kalziumkanälen) zeigten in Phase III-Studien entweder keinen Vorteil, widersprüchliche Ergebnisse zwischen den einzelnen Studien oder sogar, wie im Fall

Diskussion

von Ziconotid, einen Anstieg der Mortalität, was durch die systemischen Nebenwirkungen (v. a. systemische Hypotension) bedingt war.^(49, 249-251) Die spezifische Blockade des CaV2.1(P/Q)-Kalziumkanals durch Alpha-Eudesmol zeigte bei Ratten nach fokaler zerebraler Ischämie, die – ähnlich wie ein SHT – zu einer massiv erhöhten Glutamat-Ausschüttung führt,^(252, 253) eine deutliche Reduktion des Hirnödems sowie des Infarktareals.⁽¹⁹⁶⁾ Der Einfluß einer CaV2.1(P/Q)-Blockade auf den Sekundärschaden nach SHT wurde jedoch bisher nicht untersucht. Riluzol, ein Inhibitor der präsynaptischen Glutamatausschüttung zeigte - jedoch nur bei Ratten - nach SHT eine Reduktion des Hirnwassergehaltes sowie der oxidativen Zellschädigung.⁽²⁵⁴⁾ Trotz anfänglich guter Ergebnisse zeigte sich die Blockade von Glutamatrezeptoren in vivo am Menschen nicht als wirkungsvoll.^(49, 255) In einer tierexperimentellen Studie aus dem Jahr 2011 zeigte sich, wiederum bei ischämischem Hirninfarkt, ein Reduktion des Zellschadens sowie der funktionellen Folgeschäden durch Steigerung der Glutamatelimination mittels Heraufregulierung der Expression von des Glutamattransporters GLT-1.⁽²⁵⁶⁾

Die selektive pharmakologische Blockade des CaV2.1-Kalziumkanals, der am Anfang der Kalzium-Glutamat-Kalzium Kaskade steht, stellt einen vielversprechenden neuen Ansatzpunkt in der SHT-Therapie dar.

Als Zufallsbefund zeigte sich in der Migräne-Forschung bei Patienten mit der S218L-Mutation, welche einen gesteigerten Kalziumeinstrom durch den CaV2.1-Kalziumkanals besitzen, eine deutlich erhöhte Prädisposition zur Entwicklung eines überproportional gesteigerten Hirnödems nach Bagatell-Schädelhirntrauma. In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung dieser Mutation zum erstmalig systematisch auf ihre Bedeutung für den Sekundärschaden nach SHT untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass ein abnorm erhöhter Kalziumeinstrom über den CaV2.1-Kalziumkanal posttraumatisch ein deutlich erhöhtes Hirnödem, ein größeres Läsionsvolumen sowie eine massiv gesteigerte Mortalität bedingt. Das Ausmaß dieser Effekte war direkt abhängig vom Grad der Öffnungswahrscheinlichkeit dieses Kanals, d.h. vom Genotyp der Versuchstiere. Die pharmakologische Blockade des Kanals vor Trauma führt zur Reduktion der Ödementstehung und zu einer deutlich geringer ausgeprägten intrakraniellen Hypertension. Bei posttraumatischer Gabe konnte der Sekundärschaden nach SHT nicht positiv beeinflusst werden. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz bietet die Arbeit von Hinzman et. Al aus dem Jahr 2012: An Ratten konnte im Fluid Percussion Modell gezeigt werden, dass

nach Trauma die fehlerhafte Elimination des bereits ausgeschütteten Glutamats der entscheidender Faktor der Aufrechterhaltung dieser zellschädigenden Kaskade darstellt und weniger eine erneute Exozytose.⁽⁶⁹⁾ Des Weiteren ist bekannt, dass icv. injizierte hydrophile Wirkstoffe nur sehr langsam in das Hirnparenchym diffundieren,^(239, 257) so dass ein posttraumatisch icv. verabreichter Inhibitor des CaV2.1(P/Q)-Kalziumkanals ggf. erst an seinem Wirkort ankommt, wenn bereits Glutamat ausgeschüttet wurde. Eine weitere mögliche Erklärung für die fehlende positive Wirksamkeit der posttraumatischen Verabreichung des spezifischen CaV2.1-Kalziumkanalblockers könnte die Tatsache sein, dass Glutamat neben seiner Rolle in der Entstehung der sekundären Hirnschädigung⁽⁶⁶⁾ auch für die Aufrechterhaltung einer normalen Hirnfunktion benötigt wird.⁽⁶⁴⁾ Zwar konnte gezeigt werden, dass Alpha-Eudesmol den CaV2.1-Kalziumkanal selektiv blockiert ohne den basalen Kalziumeinstrom und damit die basale Glutamatausschüttung zu beeinflussen,^(193, 195) inwieweit jedoch eine Steigerung dieses Kalziumeinstroms posttraumatisch zur Aufrechterhaltung wichtiger Stoffwechselfvorgänge benötigt wird ist unklar. Die Vorstellung, dass eine in gewissem Maße erhöhte Aktivität des beschriebenen Kalziumkanals posttraumatisch benötigt wird, könnte auch erklären warum eine posttraumatische Blockade des CaV2.1-Kalziumkanals eher zu einer Verstärkung des Sekundärschadens nach SHT führte. Ziel weiterer Studien muss es deshalb sein, eine Substanz zu entwickeln, welche den CaV2.1-Kalziumkanal in geringerem Maße oder reversibel inhibiert. Alpha-Eudesmol wurde für die vorliegenden Arbeit aufgrund der spezifischen und kompletten Blockierung des oben genannten Kalziumkanals^(193, 195) sowie seinem Erfolg in Ischämieversuchen an Ratten (siehe unten)⁽¹⁹⁶⁾ ausgewählt, um dessen generelle Bedeutung für den Sekundärschaden nach SHT im Sinne einer „proof of principle“ Studie zu untersuchen. Zwar konnte in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden, dass Alpha-Eudesmol keine Nebenwirkungen auf wichtige physiologische Parameter (arterieller Blutdruck, Serum-Elektrolyte und Hirndurchblutung) besitzt, eine Beeinflussung weiterer intrazerebraler Reaktionen kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Auch könnte das veränderte Milieu des Hirnparenchyms (verringerte Durchblutung,^(165, 179, 180) Gewebshypoxie⁽¹⁶⁵⁾ sowie Elektrolytdysbalance^(159, 163, 167, 176)) nach entstandener Primärläsion eine viel höhere oder niedrigere Dosierungen erfordern als sie in der durchgeführten Arbeit verwendet wurden. Zur Beantwortung dieser Fragestellungen müssen weitere Studien durchgeführt werden.

Die vorliegende Arbeit konnte erstmals die Bedeutung des CaV2.1(P/Q)-Kalziumkanals für die Entstehung des (zytotoxischen) Hirnödems mit der daraus resultierenden Steigerung des ICP im Rahmen des Sekundärschadens nach SHT nachweisen und trägt somit dazu bei, die komplexen pathophysiologischen Mechanismen des Sekundärschadens nach SHT besser zu verstehen.

5.2.2 Bedeutung der kortikalen Streudepolarisation für des SHT

Die CSD gilt im gesunden Hirngewebe als reversibles, nicht schädigendes Ereignis. Sie führt zu einer vorübergehenden Hypoxie sowie Zellschwellung der Neurone.^(159, 165, 258, 259) Treten CSDs jedoch während einer unzureichenden Durchblutungs- und Oxygenierungssituation auf, wie dies potenziell nach SHT oder fokaler Ischämie der Fall ist, kann dies zu einer irreversiblen Zellschädigung mit konsekutiver Verstärkung des Hirnödems und somit des ICPs führen.^(159, 165, 179, 258-260)

Wie bereits beschrieben löst das SHT einen präsynaptischen Einstrom von Kalziumionen über den CaV2.1-Kalziumkanal aus, der in einer massiven Glutamatausschüttung and somit in einer Veränderung der postsynaptischen Ionengradienten resultiert.^(139, 141) Dies wird als Trigger für die Entstehung einer bzw. mehrerer aufeinanderfolgender kortikaler Streudepolarisationen angesehen.^(161, 261) Ausgelöst durch die initiale physikalische Schädigung beim SHT breitet sich die CSD hemisphärenübergreifend und konzentrisch auf andere, bis dahin noch nicht betroffene Hirnareale aus.^(158, 262) Die fortschreitende Depolarisation der Neurone löst eine unphysiologische Veränderung der intra- und extrazellulären Ionenkonzentrationen aus. Zur Wiederherstellung der physiologischen Verteilung der Ionen müssen membranständige Ionenpumpen wie die Na⁺/K⁺-ATPase durch hohen Energieverbrauch in Form von ATP aktiviert werden.^(71, 161, 165) Gesundes Hirnparenchym kann diesen Mehrbedarf an Energie durch eine Steigerung des oxidativen Stoffwechsels decken, ist das Hirngewebe jedoch geschädigt, wie dies nach SHT der Fall ist, kann die unzureichende Verfügbarkeit von Sauerstoff zu einer Gewebshypoxie und zu einem fortschreitenden Gewebeuntergang losgelöst vom Primärschaden des SHT führen („Spreading Ischemia“).^(159, 165, 179, 258-260)

Die große Bedeutung von Kalzium im Pathomechanismus der CSD wurde schon 1977 von Steinberg et al. beschrieben: Während einer Streudepolarisation sinkt das interstitielle Kalzium um bis zu 90% des Ursprungswertes.⁽²⁶³⁾ Später konnte nachgewiesen werden, dass Kalzium Sekunden vor der nachweisbaren elektrischen

Veränderung einer CSD massiv intrazellulär ansteigt.⁽²⁶⁴⁻²⁶⁶⁾ Trotz des starken Kalziumeinstroms ist der intrazelluläre Kalziumanstieg geringer als der extrazelluläre Abfall dieses Ions, weshalb ein intrazellulärer Puffer vermutet wird.⁽²⁶⁶⁾ Nach einem CSD-auslösenden Stimulus wird ein dreiphasiger Anstieg des intrazellulären Kalziums in Neuronen beobachtet, welcher in zeitlicher Korrelation zu den oben beschriebenen Änderungen des DC-Potentials steht.⁽²⁶⁶⁾ Der präsynaptische Kalziumeinstrom löst eine Glutamat-Ausschüttung und damit einen postsynaptischen Kalziuminflux aus.^(139, 141) Die Ausschüttung von Glutamat gilt als entscheidender Faktor bei der Entstehung und Aufrechterhaltung der gestörten Ionen-Homöostase, die für die CSD verantwortlich gemacht wird.^(161, 261) In hippokampalen organotypischen Kulturen konnte in vitro nachgewiesen werden, dass bei Gabe eines NMDA-(Glutamat)-Rezeptor Antagonisten die Entstehung der Streudepolarisation um 83% verhindert werden konnte, bei Gabe eines selektiven P/Q-Kalziumkanal Blockers sogar um 92%.⁽²⁶⁶⁾ Es wurde nachgewiesen, dass auch nicht spezifische Kalziumkanalblocker Auswirkungen sowohl auf die Anzahl als auch auf die Ausbreitung der CSD-Wellen haben.^(266, 267) Da sie aber aufgrund ihrer fehlenden Rezeptorspezifität wahrscheinlich auch andere Mechanismen im Gehirn beeinflussen, die wiederum Auswirkungen auf die CSD haben können, waren die Ergebnisse – auch abhängig davon ob sie in vivo oder in vitro durchgeführt wurden – sehr unterschiedlich und zum Teil widersprüchlich.⁽²⁶⁶⁻²⁷⁰⁾ Die Untersuchungen auf diesem Gebiet beweisen, dass durch Blockade der Kalzium-Glutamat-Kalzium Kaskade eine quantitative Reduktion der CSD-Wellen erreicht werden kann. Die genaue Bedeutung der CSD-Wellen für den Sekundärschaden nach SHT ist jedoch noch weiterhin unklar.

CSDs sind, wie bereits oben erwähnt, nicht exklusiv im Rahmen des Sekundärschadens nach SHT zu beobachten, sondern zeigten sich auch während der Aura einer Migräne.⁽²⁷¹⁻²⁷³⁾ Auch wenn einige Daten aus der Literatur vermuten lassen, dass es sich bei diesen Streudepolarisationen um den ursächlichen Mechanismus hinter diesen Auren handelt, ist deren Rolle weiterhin unklar.⁽²⁷⁴⁾ Durch die spezifische Blockade des CaV2.1(P/Q)-Kalziumkanals durch Alpha-Eudesmol ließ sich, konform mit der bereits vorhandenen Literatur⁽²⁷⁵⁾, in der hier vorliegenden Arbeit das Auftreten der Kalium-getriggerten CSD-Wellen vollständig verhindern. In zukünftigen Studien muss evaluiert werden, ob sich Alpha-Eudesmol auch in klinisch anwendbareren Verabreichungsformen (per os, per injektionem) als wirkungsvoll

gegen die CSDs zeigt und inwieweit dies einen Effekt auf die Aura und die Schmerzsymptomatik der Migräne zeigt.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit des CaV2.1-Kalziumkanals, wie sie beim S218L homo- und heterozygoten Tier vorliegt, neben der bereits von Van den Magdenbeerg gezeigten erhöhten Anzahl an CSDs⁽¹³⁰⁾ auch ein erhöhtes Nekrosevolumen nach SHT bedingt. Diese S218L-Mutantenmäuse, die sich von normalen Mäusen nur durch eine Überfunktion des oben genannten Kalziumkanals unterscheiden, zeigten neben dem größeren Traumavolumen zudem noch ein deutlich gesteigertes Hirnödem sowie eine massiv erhöhte Mortalität, wobei der Grad dieser beobachteten Parameter direkt mit dem Ausmaß der Kanalüberfunktion korreliert (Gen-Dosis-Effekt). In nativen Tieren ließ sich durch präinterventionelle spezifische Blockade des CaV2.1-Kalziumkanals (Alpha-Eudesmol; icv.) nicht nur die Entstehung der kortikalen Streudepolarisation selbst bei maximaler Stimulation mit KCl-Lösung vollständig verhindern, es konnte zudem auch eine signifikante Reduktion des Hirnwassergehaltes sowie des erhöhten ICPs erreicht werden. Es ist deshalb anzunehmen, dass eine direkte Korrelation zwischen CSD und posttraumatischer Hirnödembildung, sowie ICP-Steigerung besteht. Rogatsky et al. zeigten zuvor in Ratten nach Fluid-Perkussion-Trauma, dass die Frequenz von CSDs nur nach schwerem SHT mit dem ICP korreliert (ICP>19 mmHg); eine Korrelation der beiden Parameter konnte in leichtem bzw. mittlerem Trauma nicht gefunden werden, was durch von Baumgarten et al. bestätigt werden konnte.^(138, 276) Von Baumgarten et al. lösten jedoch die Streudepolarisationen durch epidurale KCl-Applikation aus. Inwieweit traumatisch bedingte CSDs kompensiert werden können ist nicht bekannt. In weiteren Studien muss deswegen die Relevanz der CSD-Wellen für die posttraumatische Hirnödembildung sowie an der Steigerung des ICP untersucht werden. Zudem muss eruiert werden inwieweit es sich dabei um einen kausalen Zusammenhang handelt oder um simultan ablaufende Phänomene. In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt von Alpha-Eudesmol auf die CSDs in gesunden Tieren nach einem Kalium-Stimulus untersucht, um eine generelle Bedeutung des CaV2.1-Kalziumkanals auf die Entstehung der CSDs sowie dem Sekundärschadens nach SHT nachzuweisen. In Folgestudien muss zum einen die Auswirkung der kompletten selektiven Blockade des CaV2.1-Kalziumkanals auf die CSDs in den

S218L-transgenen Tieren, zum anderen auf die Frequenz der CSDs nach SHT in gesunden Mäusen untersucht werden.

Die prätraumatische Injektion von Alpha-Eudesmol hatte keinen Einfluss auf das Nekrosevolumen. Von Baumgarten et. al konnten bereits nachweisen, dass eine Induktion zusätzlicher CSDs nach CCI keinen Einfluss auf den posttraumatischen Parenchymschaden (Nekrosevolumen) hat.⁽¹³⁸⁾ Dies unterscheidet sich von bei fokaler zerebraler Ischämie gewonnenen Daten, die einen direkten Zusammenhang zwischen CSD-Wellen und Infarktgröße feststellen konnten.^(171, 277) In weiteren Studien muss die Frage geklärt werden, weshalb die CSD-Wellen, trotz der großen pathophysiologischen Ähnlichkeiten beider Krankheitsbilder,⁽²⁷⁸⁾ bei der fokalen zerebralen Ischämie zu einer Vergrößerung des Nekrosevolumens führen, nach SHT jedoch keinen sicheren Effekt besitzen. Zwar wird nach SHT eine deutlich geringere Frequenz an CSDs beobachtet als nach Ischämie, dies erklärt jedoch nicht die Tatsache, dass eine künstliche Steigerung dieser Streudepolarisationen auf eine, der Ischämie vergleichbaren Frequenz das Nekrosevolumen nicht verändert.⁽¹³⁸⁾

Zusammenfassend lässt sich aus den hier gewonnenen Ergebnissen unter Berücksichtigung der oben genannten Literatur schließen, dass die kortikalen Streudepolarisationen mit der posttraumatischen Hirnödementstehung und der ICP-Steigerung wahrscheinlich in Zusammenhang stehen, jedoch bezogen auf den erzielten Effekt keine Bedeutung für die Größe des Nekroseareals besitzen. Eine selektive pharmakologische Blockade des CaV2.1-Kalziumkanals führte zu einer kompletten Hemmung der kortikalen Streudepolarisationen sowie zu einer Reduktion des Hirnödems und des ICPs ohne das Nekrosevolumen zu beeinflussen.

5.2.3 Bedeutung der S218L-Mutation für die Prognose des SHT

Die Brain Trauma Foundation beschreibt in Ihren Leitlinien im Kapitel über Prognosefaktoren des SHT („Early Indicators Of Prognosis In Severe Traumatic Brain Injury“), dass eine genaue prognostische Abschätzung des Krankheitsverlaufs nach erfolgtem SHT auch heutzutage noch nicht in ausreichendem Maß möglich ist.⁽¹⁰⁸⁾ Ein im März 2014 veröffentlichter Artikel der International Collaboration on Mild Traumatic Brain Injury (MTBI), in dem Literatur von 2001 bis 2012 über die Prognose des (leichten) SHT bewertet wurde, kommt wie die Brain Trauma Foundation zu dem Ergebnis, dass die Datenlage zur Prognoseabschätzung aktuell

Diskussion

insuffizient ist und weitere Studien benötigt werden, um eine adäquate Präventionsarbeit und Behandlung von SHT-Patienten zu gewährleisten.⁽²⁷⁹⁾ Die Prognoseabschätzung basiert heutzutage, wie oben beschrieben, mit Ausnahme des Lebensalters des Patienten auf Faktoren, die erst posttraumatisch entstehen – wie reduzierte GCS-Werte oder eingeschränkte Pupillenmotorik.

In neueren Studien wird zunehmend nach bereits prätraumatisch nachweisbaren Prognosemakern für das SHT gesucht, um Risikogruppen für einen schweren Verlauf so früh wie möglich zu identifizieren. So wurde in einer im März 2014 veröffentlichten Metaanalyse das Apolipoprotein E Epsilon 4 (APOE4)-Allel als potenzieller Biomarker für ein schlechtes Outcome nach SHT identifiziert.⁽¹¹³⁾ Patienten mit diesem genetischen Merkmal zeigten in Vorstudien eine größere Anzahl an Amyloid Beta-Protein Ablagerungen im Gehirn.⁽¹¹²⁾ In der Metaanalyse wurden 662 Patienten mit vs. 1614 ohne dieses genetische Merkmal verglichen. Das APOE4-Allel war jedoch nur in Patienten mit asiatischer Ethnie sowie nur bei schwerem SHT statistisch signifikant mit einer schlechten Prognose assoziiert. Eine generelle Anwendbarkeit zur Prognoseabschätzung der SHT-Patienten lässt dies somit nicht zu. Als weiterer genetischer Marker für eine schlechte Prognose wurde der Arg/Arg-Genotyp des Arg72Pro-Polymorphismus von p53 identifiziert.⁽¹²¹⁾ Glutamat sowie oxidativer Stress, bedingt durch das SHT, erhöhen in Neuronen die Konzentration von p53, einem proapoptotischen Protein, welches für Zelluntergang und eine Verschlechterung der neurologischen Funktion v.a. bei leichtem SHT verantwortlich ist.^(280, 281) Die oben genannte Mutation führt zu einem erhöhten posttraumatischen Vorkommen von p53 und war in der vorliegenden Studie, die 90 Kaukasier mit schwerem SHT umfasste, mit einer schlechteren Prognose assoziiert.⁽¹²¹⁾ Die Catechol-O-Methyltransferase (COMT), welche Dopamin zu 3-Methoxytyramin abbaut, unterliegt einem Polymorphismus, der entweder eine hohe oder eine geringe Enzymaktivität bedingt.⁽¹²³⁾ Patienten mit einer hohen Enzymaktivität, d.h. mit einem niedrigen kortikalen Dopaminspiegel zeigten nach SHT eine schlechtere kognitive Funktion.⁽¹²³⁾ Eine neuere Studie aus dem Jahr 2014 konnte dies jedoch nicht bestätigen und zeigte, dass die kognitive Leistung nach SHT in der Frührehabilitation von der Verletzungsschwere bedingt wird, unabhängig von der Enzymaktivität der COMT.⁽¹²⁴⁾ Patienten mit dem Dopamin D2-Rezeptor (DRD2) T-Allel zeigten nach leichtem SHT eine schlechtere Leistung im California Verbal Learning Test (ein neuropsychologischer Test für das verbale Gedächtnis)⁽²⁸²⁾

sowie im Continuous Performance Test (ein computergestützter Test zur Erfassung der Aufmerksamkeit)^(122, 283) Durch diese genetischen Marker des Dopamin-Systems lässt sich jedoch bestenfalls eine Prognose der kognitiven Funktion treffen, es konnte dadurch jedoch weder das Ausmaß des Sekundärschadens noch die Mortalität nach SHT abgeschätzt werden. Einen positiven Effekt auf die Prognose nach SHT zeigten die Haplogruppen T und K der mitochondrialen DNA, wobei sich besonders die Haplogruppe K auch in Patienten mit APOE4-Allel als günstig erwies.⁽¹¹⁶⁾ Diese an 1094 Patienten mit SHT durchgeführte Studie zeigte, dass Menschen mit den oben genannten Haplogruppen einen besseren Wert im Glasgow Outcome Score (ein Score um die Erholung nach Hirnschädigung standardisiert und objektiv festzuhalten) hatten, was durch eine geringere Anfälligkeit für neuronale Degeneration erklärt wurde.⁽¹¹⁶⁾ Der genaue Einfluss auf den Sekundärschaden oder die generelle Übertragbarkeit, dieser Erkenntnis auf die Allgemeinbevölkerung ist jedoch noch unklar.

Patienten mit der S218L-Mutation im CACNA1A-Gen zeigen bereits nach leichtem SHT eine überproportionale Hirnödementwicklung sowie eine deutlich gesteigerte Anfälligkeit für posttraumatische Epilepsien.^(126-128, 284) Diese Punktmutation führt zu einer erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit des präsynaptischen CaV2.1(P/Q)-Kalziumkanals und steht somit am Beginn einer Kaskade aus Exozytose des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat mit konsekutiver Zellschädigung und Entwicklung des zytotoxischen Ödems.^(48, 130, 139, 141, 144, 285) Das Ausmaß des Hirnödems, die Anzahl der posttraumatischen CSDs sowie die Mortalität unterliegt dabei einem Gen-Dosis-Effekt: Homozygote Träger der S218L-Mutation, die eine Aktivierungsschwelle des CaV2.1(P/Q)-Kalziumkanals nahe dem Ruhepotenzial der Neurone besitzen, zeigten die stärkste Ausprägung des Hirnödems, die höchste Mortalität sowie die meisten CSDs nach SHT.⁽¹³⁰⁾ Dies konnte im ersten Teil der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Heterozygote Mutanten besitzen eine geringere Aktivität des CaV2.1(P/Q)-Kalziumkanals als homozygote, diese liegt jedoch über der von Wildtyp-Tieren.⁽¹³⁰⁾ Heterozygote Mäuse zeigten in der vorherigen Studie Werte, die im Bezug auf Mortalität, CSDs, ICP und Hirnödementwicklung zwischen homozygoten und Wildtyp-Mäusen liegen. Bei van den Maagdenberg et al. zeigten heterozygote und wildtyp Tieren dieselbe Mortalität.⁽¹³⁰⁾

Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen, dass die S218L-Mutation im CACNA1A-Gen mit konsekutiver Funktionssteigerung des CaV2.1(P/Q)-Kalziumkanals einen genetischen Prädiktor für den Sekundärschaden nach SHT darstellt: Hirnödeme, ICP sowie Mortalität zeigen sich, je nach Ausprägung der Mutation, massiv erhöht. Transgene Tiere mit der S218L-Mutation haben einen ähnlichen Phänotyp wie Patienten mit dieser Mutation,⁽¹³⁰⁾ so dass eine Übertragbarkeit der hier gewonnenen tierexperimentellen Ergebnisse auf die klinische Situation angemessen erscheint. Die genaue Prävalenz der S218L-Genmutation in der Allgemeinbevölkerung ist jedoch unbekannt. Patienten mit dem S218L-Genotyp können einen Phänotyp aufweisen, der neben dem vollen klinischen Spektrum der FMH auch völlig asymptomatisch sein kann, bis ein Erstereignis eines leichten SHTs – wie in dem von Kors et al. veröffentlichten Fallbericht⁽¹³¹⁾ – zu einer massiven Hirnödementstehung führt.⁽¹²⁷⁾ In weiteren Studien muss deshalb die Prävalenz der S218L-Mutation im CACNA1A-Gen in der Allgemeinbevölkerung untersucht werden, um diese als sinnvollen klinischen Prognoseparameter weiter beurteilen zu können.

Diese S218L-Mutation im CACNA1A-Gen ist für die klinische Maximalform der FHM1 verantwortlich: Neben den für diese Krankheit typischen hemiplegischen Migräneattacken weisen betroffene Patienten zusätzlich schwere Epilepsien, Ataxien sowie die oben beschriebene überproportionale Hirnödementstehung nach Bagatelltrauma auf.^(126-128, 284) Die R192Q-Mutation im selben Gen bewirkt eine deutliche geringere Öffnungswahrscheinlichkeit des CaV2.1(P/Q)-Kalziumkanals und ist bei Patienten nur mit einer klassischen FHM1 ohne zusätzlich neurologische Pathologien verantwortlich.^(130, 155, 286, 287)

Neben den oben beschriebenen S218L- und R192Q-Mutationen gibt es jedoch noch zahlreiche andere Punktmutationen im CACNA1A-Gen, die auch in Patienten mit klassischer/typischer Migräne sowie in klinisch unauffälligen Menschen nachgewiesen werden konnten.^(136, 288) Selbst wenn diese Genveränderungen nicht zu einer derart massiven Aktivitätssteigerung des CaV2.1(P/Q)-Kalziumkanals führen wie dies bei der S218L-Mutation der Fall ist, kann jedoch auf der Basis des hier bestätigten Gen-Dosis-Effektes angenommen werden, dass selbst leichte Genveränderungen in dem CACNA1A-Gen einen verstärkten Hirnschaden nach SHT bewirken können. Bei einer Migräne-Prävalenz von ca. 21 Millionen Menschen in Deutschland⁽²⁸⁹⁾ ist die Prävalenz der CACNA1A-Genmutationsträger bisher noch

Diskussion

unbekannt. Patienten mit FHM neigen neben den oben beschriebenen Anfällen mit Hemiplegie häufig auch zu typischen/klassischen Migräne-Anfällen. Dabei unterscheiden diese sich in Bezug auf Schmerzcharakteristik, Lokalisation und Aura nicht von den Migraine-Attacken in Nicht-FHM-Patienten. Des Weiteren haben Verwandte ersten Grades dieser FMH-Patienten eine Prävalenz von 75% für eine klassische Migräneerkrankung.^(130, 136) Es müssen weitere Studien erfolgen, um die Epidemiologie dieser Mutationen zu klären und um herauszufinden, inwieweit „normale“ Migräne-Patienten ein Risiko eines gesteigerten Sekundärschadens nach SHT aufweisen. Auch ist der Rückschluss zulässig, dass der durch Mutationen im CACNA1A-Gen verstärkt aktivierte CaV2.1(P/Q)-Kalziumkanal kausal an der Entstehung nicht nur der FHM, sondern auch der klassischen/typischen Migräne beteiligt sein könnte.⁽²⁹⁰⁾

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal systematisch in einem experimentellen Schädelhirntraumamodell gezeigt werden, dass die Ödementstehung und der ICP nach SHT am ausgeprägtesten sind, je ausgeprägter die S218L-Mutation ist, d.h. je höher die Öffnungswahrscheinlichkeit des CaV2.1(P/Q)-Kalziumkanals ist. Der Schluss scheint deshalb zulässig, dass nicht nur die S218L-Mutation, sondern auch die Ausprägung der Öffnungswahrscheinlichkeit dieses Kalziumkanals selbst einen prädiktiven Wert für die Prognose des SHT besitzt. Es wird die Aufgabe von zukünftigen Studien sein, weitere genetische Marker zu untersuchen, mit welchen sich der Funktionszustand des CaV2.1(P/Q)-Kalziumkanals vorhersagen lässt, um dadurch eine präzisere Prognose für das SHT erstellen zu können.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Das Schädelhirntrauma (SHT) ist ein häufiges Krankheitsbild mit zunehmender Inzidenz, einer hohen Mortalität und häufig gravierenden Langzeitschäden bei Überlebenden.

Nach der primären, durch das Trauma bedingten physikalischen Hirnschädigung (Primärschaden) kommt es zur potenziell therapeutisch beeinflussbaren Sekundärschädigung. Diese besteht aus einer Reihe unterschiedlicher pathophysiologischer Vorgänge, die zu einer Hirnödementstehung, einer Steigerung des intrakraniellen Drucks sowie letztendlich zu einer signifikanten Vergrößerung der Primärläsion führen. Trotz der großen Bedeutung des Sekundärschadens als potenziellen therapeutischen Angriffspunkt sind dessen Pathomechanismen noch nicht ausreichend bekannt. Eine präzise Vorhersage über den Verlauf und damit über Morbidität und Mortalität des SHT, sowie eine spezifische Therapie ist somit nicht möglich. Die Behandlung des SHT ist aktuell rein symptomatisch.

Patienten mit Familiärer Hemiplegischer Migräne (FMH), welche eine Punktmutation (S218L) im CACNA1A-Gen aufweisen, die zu einer Überfunktion im spannungsabhängigen CaV2.1(P/Q)-Kalziumkanal führt, zeigen bereits nach einem leichten SHT eine überproportionale Hirnödementwicklung. Dieser präsynaptische Kalziumkanal löst über den Einstrom von Kalzium die Exozytose des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat aus, welches durch die Aktivierung postsynaptischer Rezeptoren eine wichtige Rolle in der Entstehung des Sekundärschadens einnimmt.

Die Bedeutung dieses spezifischen Kanals für die Entstehung des Sekundärschadens nach Schädelhirntrauma wird erstmals in dieser Arbeit untersucht. Dazu wurde das gut validierte Controlled-Cortical-Impact (CCI) Modell verwendet.

Transgene Mäuse mit der oben beschriebenen S218L-Mutation im CACNA1A-Gen zeigen einen deutlich vergrößerten sekundären Hirnschaden nach SHT sowie eine erhöhte Mortalität. Zudem weisen sie eine höhere Frequenz an kortikalen Streudepolarisationen auf, ein elektrophysiologisches Phänomen, welches im Verdacht steht zum Sekundärschaden nach SHT beizutragen. Dieser Effekt zeigte sich Gen-Dosis-abhängig (homozygot > heterozygot > wildtyp).

Wurde in gesunden Tieren der CaV2.1(P/Q)-Kalziumkanal vor CCI durch Alpha-

Zusammenfassung und Ausblick

Eudesmol selektiv blockiert, konnte die traumatisch bedingte Hirndrucksteigerung sowie Hinödementstehung signifikant verringert werden. Die Blockade des CaV2.1-Kalziumkanals nach stattgehabtem SHT hatte keinen positiven Effekt auf den posttraumatischen Hirnachsen.

Die vorliegende experimentelle Studie trägt zum Verständnis der Mechanismen des Sekundärschadens nach SHT bei: Der CaV2.1(P/Q)-Kalziumkanal wurde als wichtiger Ausgangspunkt für die Entstehung des posttraumatischen Hirnödems sowie der Steigerung des intrakraniellen Drucks nachgewiesen, sowohl in Hirngewebe, welches eine Überfunktion in diesem Kanal besitzt (S218L-Mutation des CACNA1A-Gens) als auch in gesunden Gehirnen.

Es wird gezeigt, dass die prätraumatische Blockade des CaV2.1(P/Q)-Kalziumkanals einen signifikanten protektiven Effekt hinsichtlich Ödementstehung und Hirndrucksteigerung aufweist. Zudem wird die S218L Mutation des CACNA1A-Gens als möglicher genetischen Prädiktor für eine schlechte Prognose nach SHT identifiziert.

Angesichts der Tatsache, dass CACNA1A-Mutationen auch in Patienten mit klassischer Migräne ohne additional Symptomatik vorhanden sein können, könnte dieses bei 21 Mio. Migräne-Patienten allein in Deutschland ein wichtiger Schritt zur Identifizierung einer neuen Risikogruppe sein.

Die hier erstmals nachgewiesene Bedeutung des CaV2.1(P/Q)-Kalziumkanals für die Entstehung des Sekundärschadens könnte zudem einen wichtigen Ansatzpunkt für zukünftige gezielte Therapien darstellen. Es muss eruiert werden, ob der protektive Effekt, der bis jetzt nur bei prätraumatischer icv. Injektion von Alpha-Eudesmol nachgewiesen wurde, durch Dosisänderung oder Substanzadaptation auch bei posttraumatischer Gabe erzielt werden kann.

7 Literaturverzeichnis

1. Dagmar R. Roche-Lexikon Medizin 5., neu bearb. und erw. Aufl. ed. München ; Jena , Deutschland: Hofmann-La Roche AG und Urban & Fischer. ; 2003. 2086 p.
2. Fachgesellschaften AdWM. Leitlinien der Dt. Ges. f. Neurochirurgie: Schädel-Hirn-Trauma im Erwachsenenalter [updated 14.10.2010 Available from: http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/008-001_S2e_Schaedel-Hirn-Trauma_im_Erwachsenenalter_leitlinientext_abgelaufen.pdf.
3. Gleixner CM, M. & Wirth, S. Neurologie und Psychiatrie für Studium und Praxis 2009/10: Medizinische Verlags Und Informationsdienste; 2009.
4. Dietz HG, Illing P, Schmitzenbecher PP, Slongo T, Sommerfeldt DW. Praxis der Kinder- und Jugendtraumatologie: Springer; 2011.
5. Vos PE, Alekseenko Y, Battistin L, Ehler E, Gerstenbrand F, Muresanu DF, et al. Mild traumatic brain injury. Eur J Neurol. 2012;19(2):191-8.
6. Ghajar J. Essay: the future of traumatic brain injury. Mt Sinai J Med. 2009;76(2):190-3.
7. Wappler F, Tonner PH, Bürkle H. Anästhesie und Begleiterkrankungen: perioperatives Management des kranken Patienten: Georg Thieme Verlag; 2006.
8. Adekoya N, Thurman DJ, White DD, Webb KW. Surveillance for traumatic brain injury deaths--United States, 1989-1998. MMWR Surveill Summ. 2002;51(10):1-14.
9. Hirtz D, Thurman DJ, Gwinn-Hardy K, Mohamed M, Chaudhuri AR, Zalutsky R. How common are the "common" neurologic disorders? Neurology. 2007;68(5):326-37.
10. Mar J, Arrospide A, Begiristain JM, Larranaga I, Elosegui E, Oliva-Moreno J. The impact of acquired brain damage in terms of epidemiology, economics and loss in quality of life. BMC Neurol. 2011;11:46.
11. Rickels E, von Wild KRH, Wenzlaff P, Bock WJ. Schädel-Hirn-Verletzung - Epidemiologie und Versorgung: Ergebnisse einer prospektiven Studie: Zuckschwerdt Verlag; 2006.
12. Sosin DM, Sniezek JE, Thurman DJ. Incidence of mild and moderate brain injury in the United States, 1991. Brain Inj. 1996;10(1):47-54.

13. Amaranath JE, Ramanan M, Reagh J, Saekang E, Prasad N, Chaseling R, et al. Epidemiology of traumatic head injury from a major paediatric trauma centre in New South Wales, Australia. *ANZ journal of surgery*. 2014;84(6):424-8.
14. Baethmann A, Wirth A, Schlesinger-Raab A, Study Group of BRCN, Neurophysical R. Prospective system analysis of the pre- and early hospital care in severe head injury in Bavaria at a population-based level. *Eur Surg Res*. 2002;34(1-2):42-6.
15. Mauritz W, Brazinova A, Majdan M, Leitgeb J. Erratum to: Epidemiology of traumatic brain injury in Austria. *Wien Klin Wochenschr*. 2014.
16. Heim C, Bosisio F, Roth A, Bloch J, Borens O, Daniel RT, et al. Is trauma in Switzerland any different? Epidemiology and patterns of injury in major trauma - a 5-year review from a Swiss trauma centre. *Swiss Med Wkly*. 2014;144:w13958.
17. Kerr ZY, Harmon KJ, Marshall SW, Proescholdbell SK, Waller AE. The epidemiology of traumatic brain injuries treated in emergency departments in North Carolina, 2010-2011. *N C Med J*. 2014;75(1):8-14.
18. Rickels E, von Wild K, Wenzlaff P. [Treatment of traumatic brain injury in Germany]. *Unfallchirurg*. 2011;114(5):417-23.
19. Tuominen R, Joelsson P, Tenovuo O. Treatment costs and productivity losses caused by traumatic brain injuries. *Brain Injury*. 2012;26(13-14):1697-701.
20. Farhad K, Khan HM, Ji AB, Yacoub HA, Qureshi AI, Souayah N. Trends in outcomes and hospitalization costs for traumatic brain injury in adult patients in the United States. *J Neurotrauma*. 2013;30(2):84-90.
21. Firsching R, Woischneck D. Present status of neurosurgical trauma in Germany. *World J Surg*. 2001;25(9):1221-3.
22. Coronado VG, Xu L, Basavaraju SV, McGuire LC, Wald MM, Faul MD, et al. Surveillance for traumatic brain injury-related deaths--United States, 1997-2007. *Morbidity and mortality weekly report Surveillance summaries*. 2011;60(5):1-32.
23. Thurman DJ, Alverson C, Dunn KA, Guerrero J, Sniezek JE. Traumatic brain injury in the United States: A public health perspective. *The Journal of head trauma rehabilitation*. 1999;14(6):602-15.
24. Leijdesdorff HA vDJ, Krijnen P, Vleggeert-Lankamp CL, Schipper IB; on behalf of the Regional Trauma Center West-Netherlands' Research Group. Injury Pattern, Hospital Triage, and Mortality of 1250 Patients with Severe Traumatic Brain Injury Caused by Road Traffic Accidents. *J Neurotrauma*. 2013 Dec 21. .

25. Daniels DJ, Clarke MJ, Puffer R, Luo TD, McIntosh AL, Wetjen NM. High occurrence of head and spine injuries in the pediatric population following motocross accidents. *Journal of neurosurgery Pediatrics*. 2015;1-5.
26. Park E, PhD, Bell JD, BSc, Baker AJ, MD. Traumatic brain injury: Can the consequences be stopped? *CMAJ*. 2008;178(9):1163-70.
27. Guidelines of polytrauma (S3) of the German Society of Trauma Surgery.
28. Sande A, West C. Traumatic brain injury: a review of pathophysiology and management. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*. 2010;20(2):177-90.
29. Cripton PA, Dressler DM, Stuart CA, Dennison CR, Richards D. Bicycle helmets are highly effective at preventing head injury during head impact: Head-form accelerations and injury criteria for helmeted and unhelmeted impacts. *Accid Anal Prev*. 2014;70C:1-7.
30. Cushing H. The blood-pressure reaction of acute cerebral compression, illustrated by cases of intracranial hemorrhage - A sequel to the Mutter lecture for 1901. *American Journal of the Medical Sciences*. 1903;125:1017-44.
31. Schmidt EA, Czosnyka Z, Momjian S, Czosnyka M, Bech RA, Pickard JD. Intracranial baroreflex yielding an early cushing response in human. *Acta neurochirurgica Supplement*. 2005;95:253-6.
32. Bouma GJ, Muizelaar JP, Choi SC, Newlon PG, Young HF. Cerebral circulation and metabolism after severe traumatic brain injury: the elusive role of ischemia. *J Neurosurg*. 1991;75(5):685-93.
33. Kochanek PM, Marion DW, Zhang W, Schiding JK, White M, Palmer AM, et al. Severe controlled cortical impact in rats: assessment of cerebral edema, blood flow, and contusion volume. *J Neurotrauma*. 1995;12(6):1015-25.
34. Goodman JC, Cherian L, Bryan RM, Jr., Robertson CS. Lateral cortical impact injury in rats: pathologic effects of varying cortical compression and impact velocity. *J Neurotrauma*. 1994;11(5):587-97.
35. Garnett MR, Blamire AM, Corkill RG, Rajagopalan B, Young JD, Cadoux-Hudson TA, et al. Abnormal cerebral blood volume in regions of contused and normal appearing brain following traumatic brain injury using perfusion magnetic resonance imaging. *J Neurotrauma*. 2001;18(6):585-93.
36. Cherian L, Robertson CS, Contant CF, Jr., Bryan RM, Jr. Lateral cortical impact injury in rats: cerebrovascular effects of varying depth of cortical deformation and impact velocity. *J Neurotrauma*. 1994;11(5):573-85.

37. Bryan RM, Jr., Cherian L, Robertson C. Regional cerebral blood flow after controlled cortical impact injury in rats. *Anesth Analg*. 1995;80(4):687-95.
38. Bouma GJ, Muizelaar JP, Stringer WA, Choi SC, Fatouros P, Young HF. Ultra-early evaluation of regional cerebral blood flow in severely head-injured patients using xenon-enhanced computerized tomography. *J Neurosurg*. 1992;77(3):360-8.
39. Bouma GJ, Muizelaar JP. Cerebral blood flow, cerebral blood volume, and cerebrovascular reactivity after severe head injury. *J Neurotrauma*. 1992;9 Suppl 1:S333-48.
40. Schroder ML, Muizelaar JP, Bullock MR, Salvant JB, Povlishock JT. Focal ischemia due to traumatic contusions documented by stable xenon-CT and ultrastructural studies. *J Neurosurg*. 1995;82(6):966-71.
41. Foreman B, Claassen J. Quantitative EEG for the detection of brain ischemia. *Crit Care*. 2012;16(2):216.
42. Latchaw RE, Yonas H, Hunter GJ, Yuh WT, Ueda T, Sorensen AG, et al. Guidelines and recommendations for perfusion imaging in cerebral ischemia: A scientific statement for healthcare professionals by the writing group on perfusion imaging, from the Council on Cardiovascular Radiology of the American Heart Association. *Stroke*. 2003;34(4):1084-104.
43. Walters F. Intracranial pressure and cerebral blood flow. *Physiology*. 1998(8):1-4.
44. Schroder ML, Muizelaar JP, Kuta AJ, Choi SC. Thresholds for cerebral ischemia after severe head injury: relationship with late CT findings and outcome. *J Neurotrauma*. 1996;13(1):17-23.
45. Gopinath SP, Robertson CS, Contant CF, Hayes C, Feldman Z, Narayan RK, et al. Jugular venous desaturation and outcome after head injury. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 1994;57(6):717-23.
46. Nordstrom CH, Reinstrup P, Xu W, Gardenfors A, Ungerstedt U. Assessment of the lower limit for cerebral perfusion pressure in severe head injuries by bedside monitoring of regional energy metabolism. *Anesthesiology*. 2003;98(4):809-14.
47. Mendelow AD, Teasdale GM. Pathophysiology of head injuries. *Br J Surg*. 1983;70(11):641-50.
48. Unterberg AW, Stover J, Kress B, Kiening KL. Edema and brain trauma. *Neuroscience*. 2004;129(4):1021-9.

49. Reilly PB, R. Head Injury - Pathophysiology And Management. 2 ed. London: Hodder Education; 2005.
50. Unterberg AW, Stroop R, Thomale UW, Kiening KL, Pauser S, Vollmann W. Characterisation of brain edema following "controlled cortical impact injury" in rats. *Acta neurochirurgica Supplement*. 1997;70:106-8.
51. Schilling L, Wahl M. Mediators of cerebral edema. *Adv Exp Med Biol*. 1999;474:123-41.
52. Barzo P, Marmarou A, Fatouros P, Portella G, Czigner A, Bullock R, et al. [Cerebral edema and changes of cerebral blood volume in patients with head injuries]. *Orvosi hetilap*. 2002;143(27):1625-34.
53. Schulz MK, Wang LP, Tange M, Bjerre P. Cerebral microdialysis monitoring: determination of normal and ischemic cerebral metabolisms in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*. 2000;93(5):808-14.
54. Marmarou A. The contribution of brain edema to brain swelling, ICP and craniospinal dynamic. Berlin: Springer-Verlag; 1993 [525-8].
55. Stroop R, Thomale UW, Pauser S, Bernarding J, Vollmann W, Wolf KJ, et al. Magnetic resonance imaging studies with cluster algorithm for characterization of brain edema after controlled cortical impact injury (CCII). *Acta neurochirurgica Supplement*. 1998;71:303-5.
56. Mokri B. The Monro-Kellie hypothesis: applications in CSF volume depletion. *Neurology*. 2001;56(12):1746-8.
57. Stern WE. Intracranial Fluid Dynamics: The Relationship of Intracranial Pressure to the Monro-Kellie Doctrine and the Reliability of Pressure Assessment. *J R Coll Surg Edinb*. 1963;9:18-36.
58. Magnoni S, Stocchetti N. Intracranial hypertension and outcome following severe traumatic brain injury. *Minerva Anesthesiol*. 2014.
59. Mumenthaler MM, H. Neurologie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag 2001.
60. Mumenthaler MM, H. Neurologie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2001.
61. Stover JF, Dohse NK, Unterberg AW. Bradykinin 2 receptor antagonist LF 16-0687Ms reduces posttraumatic brain edema. *Acta neurochirurgica Supplement*. 2000;76:171-5.
62. Stover JF, Schoning B, Beyer TF, Woiciechowsky C, Unterberg AW. Temporal profile of cerebrospinal fluid glutamate, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha

in relation to brain edema and contusion following controlled cortical impact injury in rats. *Neurosci Lett.* 2000;288(1):25-8.

63. Stover JF, Unterberg AW. Increased cerebrospinal fluid glutamate and taurine concentrations are associated with traumatic brain edema formation in rats. *Brain research.* 2000;875(1-2):51-5.

64. Starke K. Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Starke KAUFBHK, editor. München: Elsevier, Urban & Fischer; 2009. 1224 p.

65. Reinstrup P, Stahl N, Mellergard P, Uski T, Ungerstedt U, Nordstrom CH. Intracerebral microdialysis in clinical practice: baseline values for chemical markers during wakefulness, anesthesia, and neurosurgery. *Neurosurgery.* 2000;47(3):701-9; discussion 9-10.

66. Purins K, Lewen A, Hillered L, Howells T, Enblad P. Brain tissue oxygenation and cerebral metabolic patterns in focal and diffuse traumatic brain injury. *Frontiers in neurology.* 2014;5:64.

67. Danbolt NC. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol.* 2001;65(1):1-105.

68. Goodrich GS, Kabakov AY, Hameed MQ, Dhamne SC, Rosenberg PA, Rotenberg A. Ceftriaxone treatment after traumatic brain injury restores expression of the glutamate transporter, GLT-1, reduces regional gliosis, and reduces post-traumatic seizures in the rat. *J Neurotrauma.* 2013;30(16):1434-41.

69. Hinzman JM, Thomas TC, Quintero JE, Gerhardt GA, Lifshitz J. Disruptions in the regulation of extracellular glutamate by neurons and glia in the rat striatum two days after diffuse brain injury. *J Neurotrauma.* 2012;29(6):1197-208.

70. Hutchinson PJ, al-Rawi PG, O'Connell MT, Gupta AK, Maskell LB, Hutchinson DB, et al. On-line monitoring of substrate delivery and brain metabolism in head injury. *Acta neurochirurgica Supplement.* 2000;76:431-5.

71. Khatri N, Man HY. Synaptic Activity and Bioenergy Homeostasis: Implications in Brain Trauma and Neurodegenerative Diseases. *Front Neurol.* 2013;4:199.

72. Katayama Y, Becker DP, Tamura T, Hovda DA. Massive increases in extracellular potassium and the indiscriminate release of glutamate following concussive brain injury. *J Neurosurg.* 1990;73(6):889-900.

73. Takahashi H, Manaka S, Sano K. Changes in extracellular potassium concentration in cortex and brain stem during the acute phase of experimental closed head injury. *J Neurosurg.* 1981;55(5):708-17.

74. Dawson TM, Dawson VL, Snyder SH. A novel neuronal messenger molecule in brain: the free radical, nitric oxide. *Ann Neurol.* 1992;32(3):297-311.
75. Smith SL, Andrus PK, Zhang JR, Hall ED. Direct measurement of hydroxyl radicals, lipid peroxidation, and blood-brain barrier disruption following unilateral cortical impact head injury in the rat. *J Neurotrauma.* 1994;11(4):393-404.
76. Kontos HA, Povlishock JT. Oxygen radicals in brain injury. *Cent Nerv Syst Trauma.* 1986;3(4):257-63.
77. Hall ED, Braughler JM. Central nervous system trauma and stroke. II. Physiological and pharmacological evidence for involvement of oxygen radicals and lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med.* 1989;6(3):303-13.
78. Braughler JM, Hall ED. Central nervous system trauma and stroke. I. Biochemical considerations for oxygen radical formation and lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med.* 1989;6(3):289-301.
79. Terpolilli NA. Einfluss der Stickstoff-Monoxid-Inhalation auf den sekundären Hirnschaden nach experimentellem Schädelhirntrauma 2008.
80. Hudetz AG, Shen H, Kampine JP. Nitric oxide from neuronal NOS plays critical role in cerebral capillary flow response to hypoxia. *Am J Physiol.* 1998;274(3 Pt 2):H982-9.
81. Kobari M, Fukuuchi Y, Tomita M, Tanahashi N, Takeda H. Role of nitric oxide in regulation of cerebral microvascular tone and autoregulation of cerebral blood flow in cats. *Brain research.* 1994;667(2):255-62.
82. Tanaka K, Gotoh F, Gomi S, Takashima S, Mihara B, Shirai T, et al. Inhibition of nitric oxide synthesis induces a significant reduction in local cerebral blood flow in the rat. *Neurosci Lett.* 1991;127(1):129-32.
83. Clark RS, Kochanek PM, Obrist WD, Wong HR, Billiar TR, Wisniewski SR, et al. Cerebrospinal fluid and plasma nitrite and nitrate concentrations after head injury in humans. *Crit Care Med.* 1996;24(7):1243-51.
84. Lynch DR, Dawson TM. Secondary mechanisms in neuronal trauma. *Curr Opin Neurol.* 1994;7(6):510-6.
85. Dawson VL. Nitric oxide: role in neurotoxicity. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1995;22(4):305-8.
86. Terpolilli NA, Zweckberger K, Trabold R, Schilling L, Schinzel R, Tegtmeier F, et al. The novel nitric oxide synthase inhibitor 4-amino-tetrahydro-L-biopterine

prevents brain edema formation and intracranial hypertension following traumatic brain injury in mice. *J Neurotrauma*. 2009;26(11):1963-75.

87. Bullock R. Pathophysiological alterations in the central nervous system due to trauma. *Schweiz Med Wochenschr*. 1993;123(11):449-58.

88. Soukup J, Zauner A, Doppenberg EM, Menzel M, Gilman C, Young HF, et al. The importance of brain temperature in patients after severe head injury: relationship to intracranial pressure, cerebral perfusion pressure, cerebral blood flow, and outcome. *J Neurotrauma*. 2002;19(5):559-71.

89. Eckpunktepapier zur notfallmedizinischen Versorgung der Bevölkerung in Klinik und Präklinik. *Notfall + Rettungsmedizin*. 2008;11(6):421-2.

90. Foundation BT. Guidelines for the Management of Severe Traumatic Brain Injury. *Journal of Neurotrauma*. 2007;24(28.01.2013).

91. Gabriel EJ, Ghajar J, Jagoda A, Pons PT, Scalea T, Walters BC, et al. Guidelines for prehospital management of traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2002;19(1):111-74.

92. Foundation Bt. Guidelines for the Management of Severe Traumatic Brain Injury, 3rd edition *Journal of Neurotrauma* 2007 [

93. Waydhas C, German Society of Trauma S. [Preclinical management of multiples injuries: S3 guideline]. *Unfallchirurg*. 2012;115(1):8-13.

94. Hussmann B, Lefering R, Waydhas C, Ruchholtz S, Wafaisade A, Kauther M, et al. Prehospital intubation of the moderately injured patient: a cause of morbidity? A matched-pairs analysis of 1,200 patients from the DGU Trauma Registry. *Critical Care*. 2011;15(5):R207.

95. The Brain Trauma Foundation. The American Association of Neurological Surgeons. The Joint Section on Neurotrauma and Critical Care. Role of antiseizure prophylaxis following head injury. *J Neurotrauma*. 2000;17(6-7):549-53.

96. Bhullar IS, Johnson D, Paul JP, Kerwin AJ, Tepas JJ, 3rd, Frykberg ER. More harm than good: Antiseizure prophylaxis after traumatic brain injury does not decrease seizure rates but may inhibit functional recovery. *J Trauma Acute Care Surg*. 2014;76(1):54-61.

97. The Brain Trauma Foundation. The American Association of Neurological Surgeons. The Joint Section on Neurotrauma and Critical Care. Use of barbiturates in the control of intracranial hypertension. *J Neurotrauma*. 2000;17(6-7):527-30.

98. Alderson P, Roberts I. Corticosteroids for acute traumatic brain injury. The Cochrane database of systematic reviews. 2005(1):CD000196.
99. Stiver SI. Complications of decompressive craniectomy for traumatic brain injury. *Neurosurg Focus*. 2009;26(6):E7.
100. Sahuquillo J, Arikan F. Decompressive craniectomy for the treatment of refractory high intracranial pressure in traumatic brain injury. The Cochrane database of systematic reviews. 2006(1):CD003983.
101. Juttler E, Unterberg A, Woitzik J, Bosel J, Amiri H, Sakowitz OW, et al. Hemispherectomy in older patients with extensive middle-cerebral-artery stroke. *N Engl J Med*. 2014;370(12):1091-100.
102. Cooper DJ, Rosenfeld JV, Murray L, Arabi YM, Davies AR, D'Urso P, et al. Decompressive craniectomy in diffuse traumatic brain injury. *N Engl J Med*. 2011;364(16):1493-502.
103. Hutchinson PJ, Corteen E, Czosnyka M, Mendelow AD, Menon DK, Mitchell P, et al. Decompressive craniectomy in traumatic brain injury: the randomized multicenter RESCUEicp study (<http://www.rescueicp.com/>). *Acta neurochirurgica Supplement*. 2006;96:17-20.
104. Phillips SJ, Whisnant JP. Hypertension and the brain. The National High Blood Pressure Education Program. *Arch Intern Med*. 1992;152(5):938-45.
105. Cipolla MJ. The Cerebral Circulation. *Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function*. San Rafael (CA)2009.
106. Cooper DJ, Myles PS, McDermott FT, Murray LJ, Laidlaw J, Cooper G, et al. Prehospital hypertonic saline resuscitation of patients with hypotension and severe traumatic brain injury: a randomized controlled trial. *Jama*. 2004;291(11):1350-7.
107. Wakai A, Roberts I, Schierhout G. Mannitol for acute traumatic brain injury. The Cochrane database of systematic reviews. 2007(1):CD001049.
108. Brain Trauma F. Early Indicators Of Prognosis In Severe Traumatic Brain Injury 2000 [
109. Murray GD, Butcher I, McHugh GS, Lu J, Mushkudiani NA, Maas AI, et al. Multivariable prognostic analysis in traumatic brain injury: results from the IMPACT study. *J Neurotrauma*. 2007;24(2):329-37.
110. Dardiotis E, Fountas KN, Dardioti M, Xiromerisiou G, Kapsalaki E, Tasiou A, et al. Genetic association studies in patients with traumatic brain injury. *Neurosurg Focus*. 2010;28(1):E9.

111. Jordan BD. Genetic influences on outcome following traumatic brain injury. *Neurochem Res.* 2007;32(4-5):905-15.
112. Teasdale GM, Nicoll JA, Murray G, Fiddes M. Association of apolipoprotein E polymorphism with outcome after head injury. *Lancet.* 1997;350(9084):1069-71.
113. Zeng S, Jiang JX, Xu MH, Xu LS, Shen GJ, Zhang AQ, et al. Prognostic value of apolipoprotein E epsilon4 allele in patients with traumatic brain injury: a meta-analysis and meta-regression. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2014;18(3):202-10.
114. Chiang MF, Chang JG, Hu CJ. Association between apolipoprotein E genotype and outcome of traumatic brain injury. *Acta Neurochir (Wien).* 2003;145(8):649-53; discussion 53-4.
115. Brichtova E, Kozak L. Apolipoprotein E genotype and traumatic brain injury in children--association with neurological outcome. *Childs Nerv Syst.* 2008;24(3):349-56.
116. Bulstrode H, Nicoll JA, Hudson G, Chinnery PF, Di Pietro V, Belli A. Mitochondrial DNA and traumatic brain injury. *Ann Neurol.* 2014;75(2):186-95.
117. Hsieh MY, Ponsford J, Wong D, McKay A. Exploring variables associated with change in cognitive behaviour therapy (CBT) for anxiety following traumatic brain injury. *Disabil Rehabil.* 2012;34(5):408-15.
118. Isoniemi H, Tenovuo O, Portin R, Himanen L, Kairisto V. Outcome of traumatic brain injury after three decades--relationship to ApoE genotype. *J Neurotrauma.* 2006;23(11):1600-8.
119. Ponsford J, McLaren A, Schonberger M, Burke R, Rudzki D, Olver J, et al. The association between apolipoprotein E and traumatic brain injury severity and functional outcome in a rehabilitation sample. *J Neurotrauma.* 2011;28(9):1683-92.
120. Pruthi N, Chandramouli BA, Kuttappa TB, Rao SL, Subbakrishna DK, Abraham MP, et al. Apolipoprotein E polymorphism and outcome after mild to moderate traumatic brain injury: a study of patient population in India. *Neurol India.* 2010;58(2):264-9.
121. Martinez-Lucas P, Moreno-Cuesta J, Garcia-Olmo DC, Sanchez-Sanchez F, Escibano-Martinez J, del Pozo AC, et al. Relationship between the Arg72Pro polymorphism of p53 and outcome for patients with traumatic brain injury. *Intensive Care Med.* 2005;31(9):1168-73.

122. McAllister TW, Rhodes CH, Flashman LA, McDonald BC, Belloni D, Saykin AJ. Effect of the dopamine D2 receptor T allele on response latency after mild traumatic brain injury. *Am J Psychiatry*. 2005;162(9):1749-51.
123. Lipsky RH, Sparling MB, Ryan LM, Xu K, Salazar AM, Goldman D, et al. Association of COMT Val158Met genotype with executive functioning following traumatic brain injury. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 2005;17(4):465-71.
124. Willmott C, Withiel T, Ponsford J, Burke R. COMT Val158Met and cognitive and functional outcomes after traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2014.
125. Inchauspe CG, Urbano FJ, Di Guilmi MN, Ferrari MD, van den Maagdenberg AM, Forsythe ID, et al. Presynaptic CaV2.1 calcium channels carrying familial hemiplegic migraine mutation R192Q allow faster recovery from synaptic depression in mouse calyx of Held. *J Neurophysiol*. 2012;108(11):2967-76.
126. Yamazaki S, Ikeno K, Abe T, Tohyama J, Adachi Y. Hemiconvulsion-hemiplegia-epilepsy syndrome associated with CACNA1A S218L mutation. *Pediatr Neurol*. 2011;45(3):193-6.
127. Stam AH, Luijckx GJ, Poll-The BT, Ginjaar IB, Frants RR, Haan J, et al. Early seizures and cerebral oedema after trivial head trauma associated with the CACNA1A S218L mutation. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2009;80(10):1125-9.
128. Debais S, Hommet C, Bonnaud I, Barthez MA, Rimbaux S, Riant F, et al. The FHM1 mutation S218L: a severe clinical phenotype? A case report and review of the literature. *Cephalalgia*. 2009;29(12):1337-9.
129. Tottene A, Pivotto F, Fellin T, Cesetti T, van den Maagdenberg AM, Pietrobon D. Specific kinetic alterations of human CaV2.1 calcium channels produced by mutation S218L causing familial hemiplegic migraine and delayed cerebral edema and coma after minor head trauma. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(18):17678-86.
130. van den Maagdenberg AM, Pizzorusso T, Kaja S, Terpolilli N, Shapovalova M, Hoebeek FE, et al. High cortical spreading depression susceptibility and migraine-associated symptoms in Ca(v)2.1 S218L mice. *Annals of neurology*. 2010;67(1):85-98.
131. Kors EE, Terwindt GM, Vermeulen FL, Fitzsimons RB, Jardine PE, Heywood P, et al. Delayed cerebral edema and fatal coma after minor head trauma: role of the

- CACNA1A calcium channel subunit gene and relationship with familial hemiplegic migraine. *Ann Neurol.* 2001;49(6):753-60.
132. Alonso I, Barros J, Tuna A, Seixas A, Coutinho P, Sequeiros J, et al. A novel R1347Q mutation in the predicted voltage sensor segment of the P/Q-type calcium-channel alpha-subunit in a family with progressive cerebellar ataxia and hemiplegic migraine. *Clinical genetics.* 2004;65(1):70-2.
133. Kors EE, Melberg A, Vanmolkot KR, Kumlien E, Haan J, Raininko R, et al. Childhood epilepsy, familial hemiplegic migraine, cerebellar ataxia, and a new CACNA1A mutation. *Neurology.* 2004;63(6):1136-7.
134. Haan J, Kors EE, van den Maagdenberg AM, Vanmolkot KR, Terwindt GM, Frants RR, et al. Toward a molecular genetic classification of familial hemiplegic migraine. *Current pain and headache reports.* 2004;8(3):238-43.
135. May A, Ophoff RA, Terwindt GM, Urban C, van Eijk R, Haan J, et al. Familial hemiplegic migraine locus on 19p13 is involved in the common forms of migraine with and without aura. *Human genetics.* 1995;96(5):604-8.
136. Terwindt GM, Ophoff RA, Haan J, Vergouwe MN, van Eijk R, Frants RR, et al. Variable clinical expression of mutations in the P/Q-type calcium channel gene in familial hemiplegic migraine. Dutch Migraine Genetics Research Group. *Neurology.* 1998;50(4):1105-10.
137. Hartings JA, Bullock MR, Okonkwo DO, Murray LS, Murray GD, Fabricius M, et al. Spreading depolarisations and outcome after traumatic brain injury: a prospective observational study. *Lancet Neurol.* 2011;10(12):1058-64.
138. von Baumgarten L, Trabold R, Thal S, Back T, Plesnila N. Role of cortical spreading depressions for secondary brain damage after traumatic brain injury in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2008;28(7):1353-60.
139. Aktories KF, U.; Hofmann,F. & Starke,K. *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie.* München: Elsevier GmbH - Urban&Fisher; 2009.
140. Shonesy BC, Winder DG, Patel S, Colbran RJ. The initiation of synaptic 2-AG mobilization requires both an increased supply of diacylglycerol precursor and increased postsynaptic calcium. *Neuropharmacology.* 2014;91C:57-62.
141. Gundelfinger ED, Kessels MM, Qualmann B. Temporal and spatial coordination of exocytosis and endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4(2):127-39.
142. Jones EG. Calcium channels in higher-level brain function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(46):17903-4.

143. Perez-Reyes E. Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol Rev.* 2003;83(1):117-61.
144. Catterall WA. Structure and function of neuronal Ca²⁺ channels and their role in neurotransmitter release. *Cell Calcium.* 1998;24(5-6):307-23.
145. Llinas RR, Choi S, Urbano FJ, Shin HS. Gamma-band deficiency and abnormal thalamocortical activity in P/Q-type channel mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(45):17819-24.
146. Hillman D, Chen S, Aung TT, Cherksey B, Sugimori M, Llinas RR. Localization of P-type calcium channels in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(16):7076-80.
147. Uchitel OD, Protti DA, Sanchez V, Cherksey BD, Sugimori M, Llinas R. P-type voltage-dependent calcium channel mediates presynaptic calcium influx and transmitter release in mammalian synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(8):3330-3.
148. Iwasaki S, Momiyama A, Uchitel OD, Takahashi T. Developmental changes in calcium channel types mediating central synaptic transmission. *J Neurosci.* 2000;20(1):59-65.
149. Jun K, Piedras-Rentería ES, Smith SM, Wheeler DB, Lee SB, Lee TG, et al. Ablation of P/Q-type Ca²⁺ channel currents, altered synaptic transmission, and progressive ataxia in mice lacking the α 1A-subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1999;96(26):15245-50.
150. Fletcher CF, Lutz CM, O'Sullivan TN, Shaughnessy JD, Jr., Hawkes R, Frankel WN, et al. Absence epilepsy in tottering mutant mice is associated with calcium channel defects. *Cell.* 1996;87(4):607-17.
151. Maejima T, Wollenweber P, Teusner LU, Noebels JL, Herlitze S, Mark MD. Postnatal loss of P/Q-type channels confined to rhombic-lip-derived neurons alters synaptic transmission at the parallel fiber to purkinje cell synapse and replicates genomic *Cacna1a* mutation phenotype of ataxia and seizures in mice. *J Neurosci.* 2013;33(12):5162-74.
152. Mark MD, Maejima T, Kuckelsberg D, Yoo JW, Hyde RA, Shah V, et al. Delayed postnatal loss of P/Q-type calcium channels recapitulates the absence epilepsy, dyskinesia, and ataxia phenotypes of genomic *Cacna1a* mutations. *J Neurosci.* 2011;31(11):4311-26.

153. Eikermann-Haerter K, Dilekoz E, Kudo C, Savitz SI, Waeber C, Baum MJ, et al. Genetic and hormonal factors modulate spreading depression and transient hemiparesis in mouse models of familial hemiplegic migraine type 1. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119(1):99-109.
154. Tottene A, Fellin T, Pagnutti S, Luvisetto S, Striessnig J, Fletcher C, et al. Familial hemiplegic migraine mutations increase Ca²⁺ influx through single human CaV2.1 channels and decrease maximal CaV2.1 current density in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(20):13284-9.
155. Ophoff RA, Terwindt GM, Vergouwe MN, van Eijk R, Oefner PJ, Hoffman SM, et al. Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca²⁺ channel gene CACNL1A4. *Cell*. 1996;87(3):543-52.
156. Inchauspe CG, Urbano FJ, Di Guilmi MN, Forsythe ID, Ferrari MD, van den Maagdenberg AM, et al. Gain of function in FHM-1 Cav2.1 knock-in mice is related to the shape of the action potential. *J Neurophysiol*. 2010;104(1):291-9.
157. van den Maagdenberg AM, Pietrobon D, Pizzorusso T, Kaja S, Broos LA, Cesetti T, et al. A Cacna1a knockin migraine mouse model with increased susceptibility to cortical spreading depression. *Neuron*. 2004;41(5):701-10.
158. Leao AAP. Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *Journal of Neurophysiology*. 1944;7(6):359-90.
159. Nedergaard M, Hansen AJ. Spreading depression is not associated with neuronal injury in the normal brain. *Brain research*. 1988;449(1-2):395-8.
160. Strong AJ, Fabricius M, Boutelle MG, Hibbins SJ, Hopwood SE, Jones R, et al. Spreading and synchronous depressions of cortical activity in acutely injured human brain. *Stroke*. 2002;33(12):2738-43.
161. Mies G, Paschen W. Regional changes of blood flow, glucose, and ATP content determined on brain sections during a single passage of spreading depression in rat brain cortex. *Experimental neurology*. 1984;84(2):249-58.
162. Ayata C, Shimizu-Sasamata M, Lo EH, Noebels JL, Moskowitz MA. Impaired neurotransmitter release and elevated threshold for cortical spreading depression in mice with mutations in the alpha1A subunit of P/Q type calcium channels. *Neuroscience*. 2000;95(3):639-45.
163. Mayevsky A, Doron A, Manor T, Meilin S, Zarchin N, Ouaknine GE. Cortical spreading depression recorded from the human brain using a multiparametric monitoring system. *Brain research*. 1996;740(1-2):268-74.

164. Sramka M, Brozek G, Bures J, Nadvornik P. Functional ablation by spreading depression: possible use in human stereotactic neurosurgery. *Appl Neurophysiol.* 1977;40(1):48-61.
165. Takano T, Tian GF, Peng W, Lou N, Lovatt D, Hansen AJ, et al. Cortical spreading depression causes and coincides with tissue hypoxia. *Nat Neurosci.* 2007;10(6):754-62.
166. Milner PM. Note on a possible correspondence between the scotomas of migraine and spreading depression of Leao. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1958;10(4):705.
167. Pearce JM. Is migraine explained by Leao's spreading depression? *Lancet.* 1985;2(8458):763-6.
168. Lauritzen M. Cortical spreading depression in migraine. *Cephalalgia.* 2001;21(7):757-60.
169. Dreier JP, Woitzik J, Fabricius M, Bhatia R, Major S, Drenckhahn C, et al. Delayed ischaemic neurological deficits after subarachnoid haemorrhage are associated with clusters of spreading depolarizations. *Brain.* 2006;129(Pt 12):3224-37.
170. Mun-Bryce S, Wilkerson AC, Papuashvili N, Okada YC. Recurring episodes of spreading depression are spontaneously elicited by an intracerebral hemorrhage in the swine. *Brain research.* 2001;888(2):248-55.
171. Back T, Ginsberg MD, Dietrich WD, Watson BD. Induction of spreading depression in the ischemic hemisphere following experimental middle cerebral artery occlusion: effect on infarct morphology. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996;16(2):202-13.
172. Dietrich WD, Feng ZC, Leistra H, Watson BD, Rosenthal M. Photothrombotic infarction triggers multiple episodes of cortical spreading depression in distant brain regions. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1994;14(1):20-8.
173. Somjen GG, Aitken PG, Balestrino M, Herreras O, Kawasaki K. Spreading depression-like depolarization and selective vulnerability of neurons. A brief review. *Stroke.* 1990;21(11 Suppl):III179-83.
174. Baptiste L, Marinesco S, Lieutaud T. [Cortical spreading depolarization: an underestimated phenomenon after human brain injury?]. *Neurochirurgie.* 2013;59(1):35-8.

175. Chang JC, Brennan KC, He D, Huang H, Miura RM, Wilson PL, et al. A mathematical model of the metabolic and perfusion effects on cortical spreading depression. *PLoS One*. 2013;8(8):e70469.
176. Hansen AJ, Quistorff B, Gjedde A. Relationship between local changes in cortical blood flow and extracellular K⁺ during spreading depression. *Acta Physiol Scand*. 1980;109(1):1-6.
177. Torrente D, Mendes-da-Silva RF, Lopes AA, Gonzalez J, Barreto GE, Guedes RC. Increased calcium influx triggers and accelerates cortical spreading depression in vivo in male adult rats. *Neurosci Lett*. 2014;558:87-90.
178. Grafstein B. Mechanism of spreading cortical depression. *J Neurophysiol*. 1956;19(2):154-71.
179. Hasbani MJ, Schlieff ML, Fisher DA, Goldberg MP. Dendritic spines lost during glutamate receptor activation reemerge at original sites of synaptic contact. *J Neurosci*. 2001;21(7):2393-403.
180. Tomita M, Schiszler I, Tomita Y, Tanahashi N, Takeda H, Osada T, et al. Initial oligemia with capillary flow stop followed by hyperemia during K⁺-induced cortical spreading depression in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2005;25(6):742-7.
181. Kazemi H, Speckmann EJ, Gorji A. Familial hemiplegic migraine and spreading depression. *Iranian journal of child neurology*. 2014;8(3):6-11.
182. Gorji A. Spreading depression: a review of the clinical relevance. *Brain research Brain research reviews*. 2001;38(1-2):33-60.
183. Somjen GG. Mechanisms of spreading depression and hypoxic spreading depression-like depolarization. *Physiological reviews*. 2001;81(3):1065-96.
184. Torrente D, Cabezas R, Avila MF, Garcia-Segura LM, Barreto GE, Guedes RC. Cortical spreading depression in traumatic brain injuries: is there a role for astrocytes? *Neurosci Lett*. 2014;565:2-6.
185. Jeffcote T, Hinzman JM, Jewell SL, Learney RM, Pahl C, Toliaas C, et al. Detection of spreading depolarization with intraparenchymal electrodes in the injured human brain. *Neurocrit Care*. 2014;20(1):21-31.
186. Group NCRGW. Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. *J Physiol*. 2010;588(Pt 14):2519-21.
187. Erdmann E. Bericht über die Fortschritte auf dem Gebiet der Riechstoffe und ätherischen Oele i. J. 1900. *Angewandte Chemie*. 1901;14(38):937-50.

188. Ruzicka L, Wind AH, Koolhaas DR. Polyterpene und Polyterpenoide LVIII. Über die Beziehungen zwischen Eudesmol und Selinen. *Helvetica Chimica Acta*. 1931;14(5):1132-51.
189. Semmler FW, Tobias E. Zur Kenntnis der Bestandteile ätherischer Öle (über Eudesmol und seine Derivate; Notiz über Globulol). *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*. 1913;46(2):2026-32.
190. McQuillin FJ, Parrack JD. 576. The isomeric eudesmols and their association with carissone in *Eucalyptus macarthurii*. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*. 1956:2973-8.
191. Aoyama Y, Araki Y, Konoike T. Stereoselective total synthesis of (-)-alpha-eudesmol, a P/Q-type calcium channel blocker. *Synlett*. 2001(9):1452-4.
192. Taber DF, Saleh SA. Control Elements in the Intramolecular Diels-Alder Reaction - Synthesis of Alpha-Eudesmol. *Tetrahedron Letters*. 1982;23(23):2361-4.
193. Asakura K, Kanemasa T, Minagawa K, Kagawa K, Ninomiya M. The nonpeptide alpha-eudesmol from *Juniperus virginiana* Linn (Cupressaceae) inhibits omega-agatoxin IVA-sensitive Ca²⁺ currents and synaptosomal Ca-45(2+) uptake. *Brain research*. 1999;823(1-2):169-76.
194. GenomeNet Database Resources: Kyoto University Bioinformatics Center; [Available from: http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?cpd:C09663].
195. Horak S, Koschak A, Stuppner H, Striessnig J. Use-Dependent Block of Voltage-Gated Cav2.1 Ca²⁺ Channels by Petasins and Eudesmol Isomers. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2009;330(1):220-6.
196. Asakura K, Matsuo Y, Oshima T, Kihara T, Minagawa K, Araki Y, et al. omega-Agatoxin IVA-sensitive Ca²⁺ channel blocker, alpha-eudesmol, protects against brain injury after focal ischemia in rats. *European Journal of Pharmacology*. 2000;394(1):57-65.
197. Thal S. Neuroprotektion durch hypertone Lösungen bei der experimentellen Subarachnoidalblutung. München: LMU München; 2005.
198. Trabold R, Schueler OG, Eriskat J, Plesnila N, Baethmann AJ, Back T. Arterial hypotension triggers perifocal depolarizations and aggravates secondary damage in focal brain injury. *Brain research*. 2006;1071(1):237-44.
199. Hannay HJ, Feldman Z, Phan P, Keyani A, Panwar N, Goodman JC, et al. Validation of a controlled cortical impact model of head injury in mice. *J Neurotrauma*. 1999;16(11):1103-14.

200. Smith DH, Soares HD, Pierce JS, Perlman KG, Saatman KE, Meaney DF, et al. A model of parasagittal controlled cortical impact in the mouse: cognitive and histopathologic effects. *J Neurotrauma*. 1995;12(2):169-78.
201. Zweckberger K, Stoffel M, Baethmann A, Plesnila N. Effect of decompression craniotomy on increase of contusion volume and functional outcome after controlled cortical impact in mice. *J Neurotrauma*. 2003;20(12):1307-14.
202. Roche Lexikon Medizin: Urban & Schwarzenberg; 1999.
203. Lighthall JW, Dixon CE, Anderson TE. Experimental models of brain injury. *J Neurotrauma*. 1989;6(2):83-97.
204. Alder J, Fujioka W, Lifshitz J, Crockett DP, Thakker-Varia S. Lateral fluid percussion: model of traumatic brain injury in mice. *J Vis Exp*. 2011(54).
205. Zweckberger K, Eros C, Zimmermann R, Kim SW, Engel D, Plesnila N. Effect of early and delayed decompressive craniectomy on secondary brain damage after controlled cortical impact in mice. *J Neurotrauma*. 2006;23(7):1083-93.
206. Lighthall JW. Controlled cortical impact: a new experimental brain injury model. *J Neurotrauma*. 1988;5(1):1-15.
207. Lighthall JW, Goshgarian HG, Pinderski CR. Characterization of axonal injury produced by controlled cortical impact. *J Neurotrauma*. 1990;7(2):65-76.
208. Dixon CE, Clifton GL, Lighthall JW, Yaghamai AA, Hayes RL. A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat. *J Neurosci Methods*. 1991;39(3):253-62.
209. Dixon CE, Kochanek PM, Yan HQ, Schiding JK, Griffith RG, Baum E, et al. One-year study of spatial memory performance, brain morphology, and cholinergic markers after moderate controlled cortical impact in rats. *J Neurotrauma*. 1999;16(2):109-22.
210. Fox GB, Fan L, LeVasseur RA, Faden AI. Effect of traumatic brain injury on mouse spatial and nonspatial learning in the Barnes circular maze. *J Neurotrauma*. 1998;15(12):1037-46.
211. O'Connor WT, Smyth A, Gilchrist MD. Animal models of traumatic brain injury: a critical evaluation. *Pharmacol Ther*. 2011;130(2):106-13.
212. Adams JH, Graham DI, Gennarelli TA. Head injury in man and experimental animals: neuropathology. *Acta Neurochir Suppl (Wien)*. 1983;32:15-30.

213. Hylin MJ, Orsi SA, Zhao J, Bockhorst KH, Perez AI, Moore AN, et al. Behavioral and histopathological alterations resulting from mild fluid percussion injury. *J Neurotrauma*. 2013.
214. Marmarou A, Foda MA, van den Brink W, Campbell J, Kita H, Demetriadou K. A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics. *J Neurosurg*. 1994;80(2):291-300.
215. Albert-Weissenberger C, Varrallyay C, Raslan F, Kleinschnitz C, Siren AL. An experimental protocol for mimicking pathomechanisms of traumatic brain injury in mice. *Exp Transl Stroke Med*. 2012;4:1.
216. Feeney DM, Boyeson MG, Linn RT, Murray HM, Dail WG. Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat. *Brain research*. 1981;211(1):67-77.
217. Dail WG, Feeney DM, Murray HM, Linn RT, Boyeson MG. Responses to cortical injury: II. Widespread depression of the activity of an enzyme in cortex remote from a focal injury. *Brain research*. 1981;211(1):79-89.
218. Flierl MA, Stahel PF, Beauchamp KM, Morgan SJ, Smith WR, Shohami E. Mouse closed head injury model induced by a weight-drop device. *Nat Protoc*. 2009;4(9):1328-37.
219. Foda MA, Marmarou A. A new model of diffuse brain injury in rats. Part II: Morphological characterization. *J Neurosurg*. 1994;80(2):301-13.
220. Albert-Weissenberger C, Siren AL. Experimental traumatic brain injury. *Exp Transl Stroke Med*. 2010;2(1):16.
221. Hlatky R, Lui H, Cherian L, Goodman JC, O'Brien WE, Contant CF, et al. The role of endothelial nitric oxide synthase in the cerebral hemodynamics after controlled cortical impact injury in mice. *J Neurotrauma*. 2003;20(10):995-1006.
222. Liu H, Goodman JC, Robertson CS. The effects of L-arginine on cerebral hemodynamics after controlled cortical impact injury in the mouse. *J Neurotrauma*. 2002;19(3):327-34.
223. Maeda K, Mies G, Olah L, Hossmann KA. Quantitative measurement of local cerebral blood flow in the anesthetized mouse using intraperitoneal [¹⁴C]iodoantipyrine injection and final arterial heart blood sampling. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2000;20(1):10-4.

224. Jay TM, Lucignani G, Crane AM, Jehle J, Sokoloff L. Measurement of local cerebral blood flow with [14C]iodoantipyrine in the mouse. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1988;8(1):121-9.
225. Sakurada O, Kennedy C, Jehle J, Brown JD, Carbin GL, Sokoloff L. Measurement of local cerebral blood flow with iodo [14C] antipyrine. *Am J Physiol.* 1978;234(1):H59-66.
226. Heymann MA, Payne BD, Hoffman JI, Rudolph AM. Blood flow measurements with radionuclide-labeled particles. *Prog Cardiovasc Dis.* 1977;20(1):55-79.
227. Aukland K, Bower BF, Berliner RW. Measurement of Local Blood Flow with Hydrogen Gas. *Circ Res.* 1964;14:164-87.
228. Thomas DL, Lythgoe, M. F., Calamante, F., Gadian, D. G. and Ordidge, R. J. . Simultaneous noninvasive measurement of CBF and CBV using double-echo FAIR (DEFAIR). *Magn Reson Med.* 2001;45(5):853–63.
229. Thomas DL, Lythgoe, M. F., Gadian, D. G. and Ordidge, R. J. In vivo measurement of the longitudinal relaxation time of arterial blood (T1a) in the mouse using a pulsed arterial spin labeling approach. *Magn Reson Med.* 2006;55(4):943–7.
230. Dorsten FAv, Hata, R., Maeda, K., Franke, C., Eis, M., Hossmann, K.-A. and Hoehn, M. . Diffusion- and perfusion-weighted MR imaging of transient focal cerebral ischaemia in mice. *NMR Biomed.* 1999;12(8):525–34.
231. Yee SH, Jerabek PA, Fox PT. Non-invasive quantification of cerebral blood flow for rats by microPET imaging of 15O labelled water: the application of a cardiac time-activity curve for the tracer arterial input function. *Nucl Med Commun.* 2005;26(10):903-11.
232. Stern MD. In vivo evaluation of microcirculation by coherent light scattering. *Nature.* 1975;254(5495):56-8.
233. Borgos J. Laser Doppler monitoring of cerebral blood flow. *Neurol Res.* 1996;18(3):251-5.
234. Haberl RL, Villringer A, Dirnagl U. Applicability of laser-Doppler flowmetry for cerebral blood flow monitoring in neurological intensive care. *Acta Neurochir Suppl (Wien).* 1993;59:64-8.
235. Williams PC, Stern MD, Bowen PD, Brooks RA, Hammock MK, Bowman RL, et al. Mapping of cerebral cortical strokes in Rhesus monkeys by laser Doppler spectroscopy. *Med Res Eng.* 1980;13(2):3-5.

236. Dirnagl U, Kaplan B, Jacewicz M, Pulsinelli W. Continuous measurement of cerebral cortical blood flow by laser-Doppler flowmetry in a rat stroke model. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1989;9(5):589-96.
237. Kirkeby OJ, Rise IR, Nordsetten L, Skjeldal S, Hall C, Risoe C. Cerebral blood flow measured with intracerebral laser-Dopplerflow probes and radioactive microspheres. *J Appl Physiol.* 1995;79(5):1479-86.
238. Barone DG, Czosnyka M. Brain monitoring: do we need a hole? An update on invasive and noninvasive brain monitoring modalities. *ScientificWorldJournal.* 2014;2014:795762.
239. Pardridge WM. Drug transport across the blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012;32(11):1959-72.
240. Asakura K, Kanemasa T, Minagawa K, Kagawa K, Yagami T, Nakajima M, et al. α -eudesmol, a P/Q-type Ca^{2+} channel blocker, inhibits neurogenic vasodilation and extravasation following electrical stimulation of trigeminal ganglion. *Brain research.* 2000;873(1):94-101.
241. Eftekhari S. Trigeminal Ganglion - A Site of Action for CGRP Receptor Antagonists. *Cephalalgia.* 2014;33(11):954-92.
242. Dopenberg EM, Choi SC, Bullock R. Clinical trials in traumatic brain injury: lessons for the future. *J Neurosurg Anesthesiol.* 2004;16(1):87-94.
243. Maas AI, Marmarou A, Murray GD, Steyerberg EW. Clinical trials in traumatic brain injury: current problems and future solutions. *Acta neurochirurgica Supplement.* 2004;89:113-8.
244. Fineman I, Hovda DA, Smith M, Yoshino A, Becker DP. Concussive brain injury is associated with a prolonged accumulation of calcium: a ^{45}Ca autoradiographic study. *Brain research.* 1993;624(1-2):94-102.
245. Katayama Y, Maeda T, Koshinaga M, Kawamata T, Tsubokawa T. Role of excitatory amino acid-mediated ionic fluxes in traumatic brain injury. *Brain Pathol.* 1995;5(4):427-35.
246. Buki A, Povlishock JT. All roads lead to disconnection?--Traumatic axonal injury revisited. *Acta Neurochir (Wien).* 2006;148(2):181-93; discussion 93-4.
247. Kim JS, He L, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications.* 2003;304(3):463-70.

248. Stefanis L. Caspase-dependent and -independent neuronal death: two distinct pathways to neuronal injury. *Neuroscientist*. 2005;11(1):50-62.
249. A multicenter trial of the efficacy of nimodipine on outcome after severe head injury. The European Study Group on Nimodipine in Severe Head Injury. *J Neurosurg*. 1994;80(5):797-804.
250. Harders A, Kakarieka A, Braakman R. Traumatic subarachnoid hemorrhage and its treatment with nimodipine. German tSAH Study Group. *J Neurosurg*. 1996;85(1):82-9.
251. Schmieder K, Hardenack M, Harders A. Cerebral hemodynamics in patients with traumatic subarachnoid hemorrhage-sequential studies with TCD. *Acta Neurol Scand Suppl*. 1996;166:123-7.
252. Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology*. 2008;55(3):310-8.
253. Garber K. Stroke treatment--light at the end of the tunnel? *Nat Biotechnol*. 2007;25(8):838-40.
254. Ozevren H, Toklu HZ, Berkman MZ, Turan P, Sirvanci S, Kahveci R. Riluzole alleviates early neutrophil infiltration, brain oedema and lipid peroxidation in the traumatic brain tissue but does not induce neurotoxicity in non-traumatic brain tissue in rats. *Injury*. 2014.
255. Villmann C, Becker CM. On the hypes and falls in neuroprotection: targeting the NMDA receptor. *Neuroscientist*. 2007;13(6):594-615.
256. Harvey BK, Airavaara M, Hinzman J, Wires EM, Chiocco MJ, Howard DB, et al. Targeted over-expression of glutamate transporter 1 (GLT-1) reduces ischemic brain injury in a rat model of stroke. *PLoS One*. 2011;6(8):e22135.
257. Blasberg RG, Patlak C, Fenstermacher JD. Intrathecal chemotherapy: brain tissue profiles after ventriculocisternal perfusion. *J Pharmacol Exp Ther*. 1975;195(1):73-83.
258. Gursoy-Ozdemir Y, Qiu J, Matsuoka N, Bolay H, Bempohl D, Jin H, et al. Cortical spreading depression activates and upregulates MMP-9. *The Journal of clinical investigation*. 2004;113(10):1447-55.
259. Yildirim T, Eylen A, Lule S, Erdener SE, Vural A, Karatas H, et al. Poloxamer-188 and citicoline provide neuronal membrane integrity and protect membrane stability in cortical spreading depression. *The International journal of neuroscience*. 2014.

260. Obeidat AS, Andrew RD. Spreading depression determines acute cellular damage in the hippocampal slice during oxygen/glucose deprivation. *Eur J Neurosci.* 1998;10(11):3451-61.
261. Cantu D, Walker K, Andresen L, Taylor-Weiner A, Hampton D, Tesco G, et al. Traumatic Brain Injury Increases Cortical Glutamate Network Activity by Compromising GABAergic Control. *Cereb Cortex.* 2014.
262. Kao YC, Li W, Lai HY, Oyarzabal EA, Lin W, Shih YY. Dynamic perfusion and diffusion MRI of cortical spreading depolarization in photothrombotic ischemia. *Neurobiology of disease.* 2014;71:131-9.
263. Steinberg R, Nicholson C, Bruggencate GT, Stockle H. Spreading Depression-Like $[Ca^{2+}]_O$, $[K^+]_O$, and Potential Transients Induced by Sea-Anemone Toxine li and 4-Aminopyridine. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology.* 1977;368:R30-R.
264. Basarsky TA, Duffy SN, Andrew RD, MacVicar BA. Imaging spreading depression and associated intracellular calcium waves in brain slices. *J Neurosci.* 1998;18(18):7189-99.
265. Kunkler PE, Kraig RP. Calcium waves precede electrophysiological changes of spreading depression in hippocampal organ cultures. *J Neurosci.* 1998;18(9):3416-25.
266. Kunkler PE, Kraig RP. P/Q Ca^{2+} channel blockade stops spreading depression and related pyramidal neuronal Ca^{2+} rise in hippocampal organ culture. *Hippocampus.* 2004;14(3):356-67.
267. Jing J, Aitken PG, Somjen GG. Role of calcium channels in spreading depression in rat hippocampal slices. *Brain research.* 1993;604(1-2):251-9.
268. Footitt DR, Newberry NR. Cortical spreading depression induces an LTP-like effect in rat neocortex in vitro. *Brain research.* 1998;781(1-2):339-42.
269. Takagi H, Takashima M, Liou SY. [Effect of KB-2796, a novel calcium channel blocker, on spreading depression in rat hippocampal slices]. *Nippon Yakurigaku Zasshi.* 1998;111(5):309-16.
270. Wauquier A, Ashton D, Marrasses R. The effects of flunarizine in experimental models related to the pathogenesis of migraine. *Cephalalgia.* 1985;5 Suppl 2:119-23.
271. Pietrobon D, Striessnig J. Neurobiology of migraine. *Nat Rev Neurosci.* 2003;4(5):386-98.

272. Coppola G PF, Schoenen J. Is the cerebral cortex hyperexcitable or hyperresponsive in migraine? *Cephalgia*. 2007;27:1427-139.
273. Brighina F, Palermo A, Fierro B. Cortical inhibition and habituation to evoked potentials: relevance for pathophysiology of migraine. *J Headache Pain*. 2009;10(2):77-84.
274. Richter F, Lehmenkuhler A. [Cortical spreading depression (CSD): a neurophysiological correlate of migraine aura]. *Schmerz*. 2008;22(5):544-6, 8-50.
275. Horak S, Koschak A, Stuppner H, Striessnig J. Use-dependent block of voltage-gated Cav2.1 Ca²⁺ channels by petasins and eudesmol isomers. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009;330(1):220-6.
276. Rogatsky GG, Sonn J, Kamenir Y, Zarchin N, Mayevsky A. Relationship between intracranial pressure and cortical spreading depression following fluid percussion brain injury in rats. *J Neurotrauma*. 2003;20(12):1315-25.
277. Busch E, Gyngell ML, Eis M, Hoehn-Berlage M, Hossmann KA. Potassium-induced cortical spreading depressions during focal cerebral ischemia in rats: contribution to lesion growth assessed by diffusion-weighted NMR and biochemical imaging. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1996;16(6):1090-9.
278. Bramlett HM, Dietrich WD. Pathophysiology of cerebral ischemia and brain trauma: similarities and differences. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2004;24(2):133-50.
279. Kristman VL, Borg J, Godbolt AK, Salmi LR, Cancelliere C, Carroll LJ, et al. Methodological issues and research recommendations for prognosis after mild traumatic brain injury: results of the International Collaboration on Mild Traumatic Brain Injury Prognosis. *Arch Phys Med Rehabil*. 2014;95(3 Suppl):S265-77.
280. Culmsee C, Zhu X, Yu QS, Chan SL, Camandola S, Guo Z, et al. A synthetic inhibitor of p53 protects neurons against death induced by ischemic and excitotoxic insults, and amyloid beta-peptide. *J Neurochem*. 2001;77(1):220-8.
281. Tashlykov V, Katz Y, Volkov A, Gazit V, Schreiber S, Zohar O, et al. Minimal traumatic brain injury induce apoptotic cell death in mice. *J Mol Neurosci*. 2009;37(1):16-24.
282. Miller JB, Axelrod BN, Rapport LJ, Hanks RA, Bashem JR, Schutte C. Substitution of California Verbal Learning Test, second edition for Verbal Paired Associates on the Wechsler Memory Scale, fourth edition. *Clin Neuropsychol*. 2012;26(4):599-608.

283. Conners CK. The computerized continuous performance test. *Psychopharmacol Bull.* 1985;21(4):891-2.
284. Garcia Segarra N, Gautschi I, Mittaz-Crettol L, Kallay Zetchi C, Al-Qusairi L, Van Bemmelen MX, et al. Congenital ataxia and hemiplegic migraine with cerebral edema associated with a novel gain of function mutation in the calcium channel CACNA1A. *J Neurol Sci.* 2014.
285. Tottene A, Conti R, Fabbro A, Vecchia D, Shapovalova M, Santello M, et al. Enhanced excitatory transmission at cortical synapses as the basis for facilitated spreading depression in Ca(v)2.1 knockin migraine mice. *Neuron.* 2009;61(5):762-73.
286. Pietrobon D. Insights into migraine mechanisms and CaV2.1 calcium channel function from mouse models of familial hemiplegic migraine. *J Physiol.* 2010;588(Pt 11):1871-8.
287. Haan J, Kors EE, Vanmolkot KR, van den Maagdenberg AM, Frants RR, Ferrari MD. Migraine genetics: an update. *Curr Pain Headache Rep.* 2005;9(3):213-20.
288. Ducros A, Denier C, Joutel A, Cecillon M, Lescoat C, Vahedi K, et al. The clinical spectrum of familial hemiplegic migraine associated with mutations in a neuronal calcium channel. *The New England journal of medicine.* 2001;345(1):17-24.
289. Gobel H, Petersen-Braun M, Soyka D. The epidemiology of headache in Germany: a nationwide survey of a representative sample on the basis of the headache classification of the International Headache Society. *Cephalalgia.* 1994;14(2):97-106.
290. Ferrari MD, Klever RR, Terwindt GM, Ayata C, van den Maagdenberg AM. Migraine pathophysiology: lessons from mouse models and human genetics. *Lancet neurology.* 2015;14(1):65-80.

8 Appendix

8.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Englisch	Deutsch
ATP	Adenosine Triphosphate	Adenosintriphosphat
BGA	Blood gas analysis	Blutgasanalyse
Bp	Base pair	Basenpaar
CBF	Cerebral blood flow	Zerebrale Durchblutung
CCI	Controlled cortical impact	Kontrollierte zerebrale Druckschädigung
CCT	Cranial computed Tomography	Kraniale Computertomographie
CE	Calomel electrode	Calomel-Elektrode
CPP	Cerebral perfusion pressure	Zerebraler Perfusionsdruck
CSD	Cortical spreading Depolarisation	Kortikale Streudepolarisation
DC	Direct Current	Direktstrom
EEG	Electroencephalogramm	Elektroenzephalogramm
FMH1	Familial Hemiplegic Migraine Typ 1	Familäre Hemiplegische Migräne Typ 1
GCS	Glasgow Coma Scale	Glasgow Koma Skala
ICP	Intracranial pressure	Intrakranieller Druck
icv.	Intarcerebroventricular	Intrazerebroventrikulär
KCl	Potassium chloride	Kaliumchlorid
L	Liquid	Flüssig
MAP	Mean arterial pressure	Mittlerer arterieller Blutdruck
MEAN	Mean Value	Mittelwert
NO	Nitric oxide	Stickstoffmonoxid
ROS	Reactive Oxygen Species	Reaktive Sauerstoffradikale
S	Solid	Fest

Appendix

SD	Standard Deviation	Standardabweichung
SHT	Traumatic Brain Injury	Schädelhirntrauma

8.2 Nissl-Färbung

70% Ethanol	2min
Kresylechtviolett	10min
Aqua dest.	3 x spülen
Aufsteigende Alkoholreihe je 2 x eintauchen	70%, 96%, 100%
Isopropanol	2min
Xylol I	5min
Xylol II	5min
Eindeckeln mit Eukitt® (O. Kindler GmbH & Co, Freiburg, Deutschland)	

9 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt:

Frau Dr. med. Nicole Terpolilli

für die, sowohl fachlich, als auch menschlich ausgezeichnete Betreuung

Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Pohl

für die Aufnahme in das Institut für Chirurgische Forschung im Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin

Herrn Prof. Dr. med. Nikolaus Plesnila

für die Überlassung des Themas und die exzellente Betreuung

Frau Uta Mamrak und Frau Nicole Heumos

für die qualifizierte Hilfestellung in allen Laborfragen

Herrn Dr. vet. med. Eckart Thein und Mitarbeitern

für die Tierzucht

Herrn Dr. rer. biol. hum. Dipl. Phys. Jürgen Peters

für die Hilfe in allen Computerfragen

dem Neuroteam und allen Mitdoktoranten

für die schöne Zeit

Frau Dr. med. Christine Engler

für das Korrektur-Lesen

Robert, Monika und Maximilian Dolp sowie Jonathan Ausman

für die Unterstützung

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Familienname:

Dolp

Name:

Reinhard

Geburtsdatum:



Reinhard.Dolp@gmail.com

Berufserfahrung und Praktika:

Beruf

ab 07.2015

Research Fellow **in der Abteilung für plastisch-rekonstruktive Chirurgie** am Sunnybrook Health and Science Center in Toronto/Kanada (**MSc Program** des Institute of Medical Science der University of Toronto in Toronto/Canada).

05.2013 – 06.2015

Assistenzarzt in der Allgemein- und Viszeralchirurgie (Common Trunk) der Universitätsklinik Ulm, Ulm/*Deutschland*

Praktisches Jahr

08.2011 – 10.2011

Innere Medizin: Hämatonkologie am Klinikum Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität in München/*Deutschland*

10.2011 – 12.2011

Innere Medizin: Endokrinologie am Montreal General Hospital der McGill University in Montreal/*Kanada*

12.2011 – 04.2012

Allgemeinchirurgie am Klinikum der Universität Rovira I Virgili in Reus/*Spanien*

04.2012 – 07.2012

Gynäkologie und Geburtshilfe am Klinikum Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität in München/*Deutschland*

Famulaturen

02.2009 – 04.2009

Urologie an der Urologischen Klinik Planegg in Planegg/*Deutschland*

02.2012 – 03.2010

Plastische und Rekonstruktive Chirurgie an der Clinica Dermatológica y Cirugía Estética de Puebla in Puebla/*Mexico*

03.2010 – 04.2010

Dermatologie an der Clinica Dermatológica y Cirugía Estética de Puebla in Puebla/*Mexico*

Ausbildung und Examen:

09.2014

National Assessment Collaboration (NAC) OSCE

05.2013

MCC Evaluating Examination

11.2012

Approbation

10.2012 – 11.2012

2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

10.2008

1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

2006 – 2012

Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München, Deutschland

Lebenslauf

Schule

1993 – 1997

1997 – 2006

Grundschule Amendingen in Amendingen/*Deutschland*

Bernhard-Strigel-Gymnasium in Memmingen/*Deutschland*

Forschung:

1. Poster

- **R.Dolp**, MG.Jeschke, S.Amini-Nik, Melanocyte precursor like cells in the human umbilical cord, Shock Society, 2016, Austin/United States
- **R.Dolp**, MG.Jeschke, S.Amini-Nik, Burn derived stem cells are comparable with other sources of stem cells, Gallie Day, 2016, Toronto/Canada - **WINNING POSTER**
- **R.Dolp**, N.Terpolilli, A.van den Maagdenberg, M.Ferrari N.Plesnilla, Inhibition of the neuronal voltage gated P/Q Ca²⁺ channel reduces secondary brain damage after experimental traumatic brain damage in mice, Society for Neuroscience, 2011, Washington/United States
- **R.Dolp**, N.Terpolilli, N. Plesnilla, Blockade des neuronalen spannungsabhängigen P/Q Kalzium-Kanals reduziert den sekundären Hirnschaden nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma, DoctaMed, 2011, Munich/Germany

2. Publicationen

- N.Terpolilli, **R.Dolp**, B.Todorov, K.Waehner, M.Ferrari, A.van den Maagdenberg, N.Plesnilla, Migraine-associated mutations in the Cav2.1 P/Q Ca²⁺ channel cause spreading depolarizations thereby worsening outcome following traumatic brain injury in mice, 2016, *under submission*

4. Buch Kapitel

- **R.Dolp**, S.Amini-Nik, MG.Jeschke, Chapter 10: Optimising wound healing and scar formation, The Scar Book; *vorraussichtliches Publikationsdatum Januar 2017*

Sprachen:

Deutsch (Muttersprache), **Englisch** (fließend), **Spanisch** (fließend), **Latein** (großes Latinum), **Katalanisch** (Grundkenntnisse)

11 Eidesstattliche Versicherung

Eidesstattliche Versicherung

Dolp, Reinhard

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Der CaV2.1(P/Q)-Kalziumkanal:
Bedeutung für Pathophysiologie, Therapie und Prognostik des
Sekundärschadens nach Schädelhirntrauma**

selbständig 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 einzeln 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.

Kingston, 05.11.2017

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand