

Aus dem Institut für Schlaganfall- und Demenzforschung  
der

Ludwig–Maximilians–Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Martin Dichgans

**Einfluss organischer Lösungsmittel auf den  
sekundären Hirnschaden nach  
experimentellem Schädel-Hirn-Trauma**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig–Maximilians–Universität zu München

vorgelegt von

Johannes Walter

aus Magdeburg

2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Nikolaus  
Plesnila

Mitberichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Ingrid  
Boekhoff  
PD Dr. med. Viktoria Bogner-  
Flatz

Mitbetreuung durch: Dr. med. Nicole Angela  
Terpolilli

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

Tag der mündlichen Prüfung: 09.11.2017

**Für Opa**



# Inhalt

1. Einleitung.....	9
1.1 Das Schädel-Hirn-Trauma .....	9
1.1.1 Definition.....	9
1.1.2 Epidemiologie und Ätiologie.....	9
1.1.3 Einteilung.....	11
1.1.4 Pathophysiologie .....	14
1.1.4.1 Primärer Hirnschaden .....	15
1.1.4.2 Sekundärer Hirnschaden .....	15
1.1.4.3 Rolle der Inflammation nach Schädel-Hirn-Trauma .....	20
1.1.4.4 Extrakranielle Faktoren des posttraumatischen Hirnschadens .....	21
1.1.5 Therapie .....	21
1.1.5.1 Klinische Standardtherapie in Anlehnung an die Guidelines der Brain Trauma Foundation.....	22
1.1.5.2 Experimentelle Therapieansätze.....	25
1.2 Ziel der Arbeit.....	25
2. Material und Methoden.....	26
2.1 Versuchstiere .....	26
2.2 Randomisierung und Verblindung.....	26
2.2 Narkose.....	27
2.3 Analgesie .....	27
2.4 Controlled-Cortical-Impact-Modell .....	27

2.5. Arteria-Cerebri-Media-Okklusionsmodell (MCAo) – Modell des ischämischen Schlaganfalls .....	30
2.6 Körpergewicht .....	31
2.7 Bestimmung des Nekrosevolumens .....	32
2.7.1 Histologische Aufarbeitung .....	32
2.7.2 Histomorphometrie .....	33
2.8 Bestimmung des Hirn-Wassergehaltes.....	34
2.9 Neurological Severity Score (NSS) zur Bewertung der neurologischen Funktion.....	34
2.10 Testsubstanzen.....	36
2.10.1 Dimethylsulfoxid (DMSO).....	36
2.10.1.1 Effekt von DMSO auf das Gehirn.....	38
2.10.2 Polyethylenglykol-40 (PEG-40).....	39
2.10.2.1 Effekt von PEG auf das Gehirn .....	40
2.10.3 N-Methyl-2-pyrrolidon (NMP) .....	41
2.10.3.1 Effekt von NMP auf das Gehirn.....	42
2.10.4 Miglyol® 812.....	43
2.10.4.1 Effekt von Miglyol® 812 auf das Gehirn.....	45
2.11 Experimentelle Gruppen .....	45
2.12 Statistische Auswertung.....	45
3. Ergebnisse .....	46
3.1 Einfluss verschiedener Lösungsmittel auf den sekundären Hirnschaden.....	46
3.2 Einfluss von NMP bei Gabe vor Traumainduktion .....	47

3.2.1 Einfluss verschiedener NMP-Konzentrationen auf den sekundären Hirnschaden nach Trauma .....	47
3.2.1.1 Nekrosevolumen .....	47
3.2.1.2 Hirnwassergehalt .....	49
3.2.1.3 Neurological Severity Score .....	51
3.2.1.4 Körpergewicht .....	53
3.2.2 Wirkung von NMP auf das Infarktvolumen nach experimentellem ischämischen Schlaganfall .....	55
3.2.2.1 Infarktvolumen .....	56
3.3 Einfluss von NMP bei Gabe nach Traumainduktion .....	57
3.3.1 Verschiedene Applikationszeitpunkte von NMP 1% .....	57
3.3.1.1 Nekrosevolumen .....	57
3.3.1.2 Neurological Severity Score .....	58
3.3.1.3 Körpergewicht .....	59
3.3.2 Applikation verschiedener NMP-Konzentrationen eine Stunde nach CCI .....	61
3.3.2.1 Nekrosevolumen .....	61
3.3.2.2 Neurological Severity Score .....	62
3.3.2.3 Körpergewicht .....	63
3.4. Zusammenfassung der Ergebnisse .....	64
4. Diskussion .....	65
4.1 Diskussion der Methode .....	65
4.1.1 Auswahl der Versuchstiere .....	65
4.1.2 Auswahl des experimentellen Traumamodells .....	65
4.1.3 Bestimmung des Nekrosevolumens .....	70
4.1.4 Bestimmung des neurologischen Schädigungsmusters .....	72

4.1.5 Bestimmung des Hirnwassergehaltes .....	73
4.2 Diskussion der Ergebnisse .....	74
4.2.1 Einfluss verschiedener Lösungsmittel auf den strukturellen Hirnschaden nach Schädel-Hirn-Trauma .....	74
4.2.2 Einfluss von NMP auf den sekundären Hirnschaden .....	80
4.2.3 Potentielle klinische Einsatzgebiete von NMP .....	84
5. Zusammenfassung und Ausblick .....	85
6. Literaturnachweise .....	87
7. Abkürzungsverzeichnis .....	103
8. Bereits veröffentlichte Aspekte der Arbeit .....	105
8.1 Vorträge .....	105
9. Lebenslauf .....	105
10. Danksagung .....	108

# 1. Einleitung

## 1.1 Das Schädel-Hirn-Trauma

### 1.1.1 Definition

Die Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie definiert das Schädel-Hirn-Trauma 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 mater verbunden sein kann" [1]. Es werden geschlossene Schädel-Hirn-Traumata, welche sich durch die Unversehrtheit der Dura mater auszeichnen, und offene Schädel-Hirn-Traumata, bei denen die Dura mater zerrissen ist, unterschieden [1].

### 1.1.2 Epidemiologie und Ätiologie

Auf Basis der Datenerhebungen des Statistischen Bundesamtes lassen sich die Sterbefälle in Folge eines Schädel-Hirn-Traumas in Deutschland sehr genau angeben. So starben in Deutschland im Jahr 2014 7.573 Menschen an den Folgen von Verletzungen des Kopfes (ICD-Code S00 - S09, [2]) [3]. Betrachtet man nur die Todesfälle als Folge von intrakraniellen Verletzungen (ICD-Code S06.0 - S06.9, [2]), so ergibt sich für das Jahr 2014 eine Zahl von 5.995 Verstorbenen, was einem Anteil von etwa 0,7% der insgesamt im Jahre 2014 in Deutschland verstorbenen Personen entspricht (siehe Abb. 1) [3]. Der Anteil männlicher Verstorbener ist dabei deutlich höher als der weiblicher Verstorbener (60,25% vs. 39,75%) [3]. Im Gegensatz zu den Sterbefällen schwanken die Angaben zur Inzidenz des Schädel-Hirn-Traumas aufgrund des Fehlens flächendeckend erhobener Daten, unterschiedlicher Einschlusskriterien klinischer Studien und der Tatsache, dass ein bedeutender Teil der Patienten mit Schädel-Hirn-Trauma sich nicht in ärztliche Behandlung begibt, beträchtlich [4, 5]. Rickels et al. publizierten 2011 eine groß angelegte Studie, die die Epidemiologie des Schädel-Hirn-Traumas in zwei Regionen Deutschlands beurteilte [4]. Demnach beträgt die Inzidenz des Schädel-Hirn-Traumas in Deutschland 332 Fälle/ 100.000 Einwohner. Rechnet man dies auf die Gesamtbevölkerung Deutschlands hoch, so ergeben sich absolut etwa 270.000 Schädel-Hirn-Traumata pro Jahr.

	<b>Insgesamt</b>	<b>Männlich</b>	<b>Weiblich</b>
S06.0 Gehirnerschütterung	67	31	36
S06.1 Traumatisches Hirnödem	46	29	17
S06.2 Diffuse Hirnverletzung	128	86	42
S06.3 Umschriebene Hirnverletzung	554	296	258
S06.4 Epidurale Blutung	50	26	24
S06.5 Traumatische subdurale Blutung	1415	756	659
S06.6 Traumatische subarachnoidale Blutung	529	296	233
S06.7 Intrakranielle Verletzung mit verlängertem Koma (Coma prolonge)	15	8	7
S06.8 Sonstige intrakranielle Verletzungen	473	259	214
S06.9 Intrakranielle Verletzung, n. n. bez.	2718	1825	893
<b>Summe</b>	<b>5995</b>	<b>3612</b>	<b>2383</b>
<b>Anteil in %</b>	<b>100</b>	<b>60,25</b>	<b>39,75</b>

Abb. 1: Todesfälle in Folge intrakranieller Verletzungen  
(ICD-Code S06.0 - S0.6.9), modifiziert nach [3]

In einem Übersichtsartikel über die Inzidenz des Schädel-Hirn-Traumas in Europa berichteten Tagliaferri et al. im Jahre 2006 über Inzidenzen zwischen 91 Fällen/ 100.000 Einwohner in einer Region Spaniens und 546 Fällen/ 100.000 Einwohner in Schweden [6]. Insgesamt errechneten die Autoren dieser Studie eine Inzidenz von 235 Fällen/ 100.000 Einwohner für Gesamteuropa [6]. In den USA liegt die Inzidenz laut einer Studie des Centers for Disease Control and Prevention (CDC) aus dem Jahre 2010 mit 577 Fällen/ 100.000 Einwohnern deutlich höher als in Europa [7]. Die World Health Organisation schätzt die Inzidenz des Schädel-Hirn-Traumas sogar noch deutlich höher ein als sie bisher in der Literatur beschrieben wurde. So geht sie von einer Inzidenz allein der leichten Schädel-Hirn-Traumata von etwa 600 Fällen/ 100.000 Einwohnern aus [8]. Weltweit sind Männer deutlich häufiger von Schädel-Hirn-Traumata betroffen als Frauen (ca. 60% zu 40%) [4]. Besonders häufig betroffen sind junge Männer im Alter von 20-25 Jahren und ältere Frauen im Alter von über 80 Jahren. Insgesamt sind Stürze mit über der Hälfte aller Fälle die häufigste Ursache von Schädel-Hirn-Traumata, jedoch dominieren je nach Altersgruppe verschiedene Unfallmechanismen. Im Kindesalter stellen Stürze den häufigsten Trauma-Mechanismus dar, während im jungen Erwachsenenalter Verkehrsunfälle für die Mehrheit der Schädel-Hirn-Traumata ursächlich sind. Mit steigenden Alter nimmt dann der Anteil der sturzbedingten Schädel-Hirn-Traumata wieder kontinuierlich zu, bis dieser Trauma-Mechanismus im hohen Erwachsenenalter erneut die Hauptursache

von Schädel-Hirn-Traumata darstellt [9]. Die meisten Schädel-Hirn-Traumata sind entsprechend der Einteilung des klinischen Schweregrades anhand der Glasgow Coma Scale (GCS, siehe unten) als leicht und nur ein geringer Anteil als mittelschwer oder schwer einzustufen (90,9%; 3,9% bzw. 5,2%) [4]. Die Letalität des Schädel-Hirn-Traumas steigt mit zunehmendem Lebensalter und hat sich in der Gruppe der über 75-Jährigen im Vergleich zur Gruppe der 36-45-Jährigen mehr als verdreifacht (3,1% vs. 1,0%) [4]. Trotz der verhältnismäßig geringen Letalität im Kindesalter ist das Schädel-Hirn-Trauma in dieser Altersgruppe die zweithäufigste Todesursache (siehe Abb. 2). Etwa einem Viertel aller Schädel-Hirn-Traumata geht ein Verkehrsunfall voraus; bei schweren Schädel-Hirn-Traumata steigt dieser Anteil auf über 50%.

### Die 10 häufigsten Todesursachen bei Kindern

Sterbefälle 2014 nach der ICD-10

ICD-10 Positionsnummer	Todesursache	Von 1 Jahr bis unter 15 Jahren	
		Gestorbene <sup>1</sup>	Anteil in %
C71	Bösartige Neubildung des Gehirns (Hirntumor)	95	9,8
S06	Intrakranielle Verletzung	51	5,3
R99	Sonstige ungenau oder nicht näher bezeichnete Todesursachen	40	4,1
G40	Epilepsie	37	3,8
T71	Erstickung	37	3,8
T75	Schäden durch sonstige äußere Ursachen	27	2,8
C91	Lymphatische Leukämie	26	2,7
T07	Nicht näher bezeichnete multiple Verletzungen	23	2,4
C74	Bösartige Neubildung der Nebenniere	20	2,1
G31	Sonstige degenerative Krankheiten des Nervensystems, anderenorts nicht klassifiziert	16	1,6

Abb. 2: Die häufigsten Todesursachen im Kindesalter [10]

### 1.1.3 Einteilung

Die Einteilung des Schädel-Hirn-Traumas erfolgt nach verschiedenen Gesichtspunkten wie klinischem Schweregrad, dem Verletzungsmechanismus, der Hauptpathologie in der Bildgebung oder der Pathophysiologie [11]. Die in der Klinik am häufigsten angewendete Einteilung beruht auf dem Bewusstseinszustand des Patienten und orientiert sich in der Regel an der erstmals 1974 von Teasdale und

Jennett beschriebenen Glasgow Coma Scale (GCS) [12]. Die Glasgow Coma Scale ist ein leicht durchführbares, gut reproduzierbares Instrument zur schnellen Beurteilung des Bewusstseinsgrades. Es werden drei verschiedene Aspekte bewertet: motorische Antwort, verbale Antwort und Augenöffnen. Wache und allseits orientierte Patienten erhalten die Maximalpunktzahl von 15 Punkten, tief komatöse Patienten ohne jegliche Reaktion auf äußere Reize die Minimalpunktzahl von drei Punkten (siehe Abb. 3). Die Beurteilung intubierter Patienten stellt allerdings ein Problem dar, da die verbale Antwort aufgrund von Intubation und Sedierung nicht beurteilbar ist [13, 14]. Die GCS erlaubt in eingeschränktem Maße eine Abschätzung der Prognose des klinischen Verlaufes. Während nur etwa 20% der Patienten mit einem initialen GCS von drei überleben und nur 8-10% langfristig in ihrem Alltag unabhängig von personeller Hilfe bleiben, liegt die Mortalität bei einem initialen GCS-Score von acht oder höher bei nur etwa 15% und etwa 80% dieser Patienten haben ein gutes neurologisches Outcome [15].

<b>Prüfung</b>	<b>Reaktion</b>	<b>Punkte</b>
<b>Augenöffnen</b>	Spontan	4
	Auf Ansprache	3
	Auf Schmerzreiz	2
	Keine Reaktion	1
<b>Motorik</b>	Befolgen von Aufforderungen	6
	Gezielte Abwehr auf Schmerzreiz	5
	Fluchtreaktion auf Schmerzreiz	4
	Beugesynergismus auf Schmerzreiz	3
	Strecksynergismus auf Schmerzreiz	2
	Keine Reaktion	1
<b>Sprache</b>	Orientierte Antwort	5
	Desorientierte Antwort	4
	Sinnlose Worte	3
	Einzelne Laute	2
	Keine Reaktion	1
		<b>3-15</b>

Abb. 3: Glasgow Coma Scale, modifiziert nach [16]

Bei 13-15 Punkten spricht man von einem leichten Schädel-Hirn-Trauma. Es findet sich keine oder lediglich eine kurz andauernde Bewusstseinsstörung, jedoch keine fokale-neurologischen Defizite oder strukturellen Schäden des Hirnparenchyms [17]. In der Regel kommt es nach einem leichten Schädel-Hirn-Trauma zu einer vollständigen Remission, jedoch werden auch persistierende Kopfschmerzen sowie lang anhaltende Störungen des Kurzzeitgedächtnisses und der Konzentration beobachtet [18, 19]. Ein mittelschweres Schädel-Hirn-Trauma liegt bei einem GCS von 9-13 Punkten vor; ab einem Punktwert von acht Punkten oder weniger spricht man von einem schweren Schädel-Hirn-Trauma. In der Gruppe der schweren Schädel-Hirn-Traumata finden sich in nahezu allen Fällen strukturelle Hirnschäden wie Kontusionen, Blutungen (epidural, subdural, subarachnoidal, intraparenchymatös), Ödem, ischämische Nekrosen und Shearing Injuries [20, 21]. Etwa ein Drittel der Patienten mit schwerem Schädel-Hirn-Trauma benötigt eine neurochirurgische Intervention, etwa 60% der Patienten weisen ernsthafte Verletzungen weiterer Organsysteme auf und die Mortalität ist mit etwa 40% sehr hoch [21, 22]. Im Verlauf können Epilepsie, Hydrozephalus und Hypophysenfunktionsstörungen auftreten [23-25]. Eine weitere auf dem klinischen Schweregrad beruhende Einteilung des Schädel-Hirn-Traumas, welche im Gegensatz zur Glasgow Coma Scale eine verbesserte Beurteilung intubierter Patienten zulässt, ist der Full Outline of UnResponsiveness Score (FOUR-Score), der leicht und gut reproduzierbar zu erheben ist und eine Einschätzung der Prognose zulässt [26]. Er bewertet wie die Glasgow Coma Scale die Reaktion der Augen sowie die motorische Antwort/ Funktion. Zusätzlich werden Hirnstammreflexe und das Atemmuster evaluiert, was im Gegensatz zur Beurteilung der verbalen Antwort auch bei intubierten Patienten möglich ist [26]. Weiterhin existiert eine Vielzahl weiterer auf dem klinischen Schweregrad basierender Einteilungssysteme, welche jedoch im klinischen Alltag kaum verwendet werden [21, 27-29].

Eine weitere Möglichkeit, das Schädel-Hirn-Trauma einzuteilen, beruht auf dem Verletzungsmechanismus. Es werden direkte stumpfe, penetrierende sowie Akzelerations-/ Dezelerationstraumata unterschieden [11, 21]. Direkte stumpfe und Akzelerations-/ Dezelerationstraumata führen eher zu diffusen Verletzungen wie z.B. dem diffus axonalem Schaden (diffuse axonal injury, DAI) als Folge von Scherverletzungen der Nervenzellfortsätze, während penetrierende Traumata eher zu Gefäßverletzungen führen [11]. Zusätzlich kann zwischen offenem und geschlossenem Schädel-Hirn-Trauma unterschieden werden, was vor allem im

Hinblick auf die deutlich erhöhte Infektionsgefahr bei offenen Verletzungen von Bedeutung ist [30]. In der Literatur wird zudem der Verletzungsmechanismus des Explosionstraumas (blast induced traumatic brain injury/ blast injury) beschrieben, der vor allem im militärischen Bereich wichtig ist, da er mit Schuss- oder Bombenverletzungen assoziiert ist und zunehmend im Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen steht [11, 31]. Das Explosionstrauma zeichnet sich durch ein Zusammenspiel dreier pathophysiologischer Prozesse aus: Der durch die Explosion entstehende Überdruck führt zur Ausbildung eines Hirnödems, freigesetzte Metallfragmente verursachen penetrierende Verletzungen des Schädels sowie des Hirngewebes und starke Hitzeentwicklung resultiert in Verbrennungen von Haut und Schleimhäuten [32]. Zusätzlich kann das Wegschleudern durch die entstehende Druckwelle eine äußere physische Gewalteinwirkung auf den Schädel und andere Körperteile verursachen und so zu Verletzungen führen.

Eine bildmorphologische Klassifikation stellt der 1992 erstbeschriebene und in der Folge modifizierte Marshall-Score dar, welcher auf der computertomographischen Bildgebung basiert [33, 34]. Er unterscheidet sechs Kategorien, wobei unter anderem die Abgrenzbarkeit der basalen Zisternen, das Vorhandensein einer Mittellinienverlagerung oder einer intrakraniellen Blutung bewertet werden. Insgesamt stellt er eine verhältnismäßig komplizierte, jedoch prognostisch präzise Einteilung des Schädel-Hirn-Traumas dar [34].

Schließlich ist auch eine Klassifikation beruhend auf der Pathophysiologie in primären und sekundären Hirnschaden möglich [11].

#### **1.1.4 Pathophysiologie**

Die Schädigung des Gehirngewebes läuft nach dem Schädel-Hirn-Trauma in zwei Phasen ab. Es wird der sofort entstehende Primärschaden, der durch direkte Gewalteinwirkung auf den Schädel und das Gehirn entsteht, vom so genannten sekundären Hirnschaden unterschieden, welcher sich mit Verzögerung von bis zu mehreren Tagen durch eine Vielzahl von durch die primäre Schädigung ausgelöste Prozesse entwickelt [11]. Da primäre Hirnschädigungen im Moment des Traumas entstehen und von Art und Schwere der Verletzung abhängig sind, sind sie lediglich durch präventive Maßnahmen zu verhindern, während sekundäre Prozesse durch die

zeitliche Verzögerung ihres Auftretens potentielle Angriffspunkte für therapeutische Ansätze darstellen [35, 36].

#### **1.1.4.1 Primärer Hirnschaden**

Der primäre Hirnschaden entsteht im Moment der direkten, äußeren Gewalteinwirkung auf Schädel und Gehirngewebe [37]. Dabei kann es zu fokalen und diffusen Verletzungen kommen. Die nach einem Schädel-Hirn-Trauma am häufigsten beobachteten fokalen Verletzungen sind vor allem frontal und temporal auftretende Kontusionen, Epidural- und Subduralhämatome, traumatische Subarachnoidalblutungen, intrazerebrale und intraventrikuläre Blutungen sowie Frakturen des Schädeldaches, der Schädelbasis und der Orbita [37-40]. Frakturen können dabei imprimiert, disloziert oder nicht disloziert sowie offen oder geschlossen vorliegen. Das vor allem nach indirektem Schädel-Hirn-Trauma am häufigsten beobachtete diffuse Verletzungsmuster ist der diffuse axonale Schaden als Folge von auf die Nervenzellfortsätze (Axone, daher axonaler Schaden) einwirkenden Scherkräften [37-39, 41]. Hierbei kommt es zu einer durch Unterbrechung des axonalen Transportes bedingten Schwellung und einer unter anderem durch Kalziumeinstrom verursachten Schädigung des Zytoskeletts der Axone vor allem im Corpus callosum und in Fasertrakten, die Groß- und Kleinhirn verbinden [41-44]. Letztendlich können diese Prozesse zum Absterben der Axone führen.

#### **1.1.4.2 Sekundärer Hirnschaden**

Direkt nach einem Schädel-Hirn-Trauma kommt es um den Bereich der primären Schädigung zu einem deutlichen Abfall der Hindurchblutung (cerebral blood flow, CBF) vom physiologischen Normwert von etwa 50 ml/ 100 g/ min [45-49]. Als Mechanismus dieses Abfalls der zerebralen Durchblutung werden sowohl Vasospasmen, Thrombosen als auch ein NO-Mangel diskutiert [50-52]. Die Zellen werden in der Folge nicht mehr in ausreichendem Maße mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt; es resultieren Gewebshypoxie und Energiesubstratmangel [53, 54]. Ab einem Durchblutungsabfall unter 10 ml/100 g/ min kommt es zu einem Versagen der Ionenpumpen der Zellmembran und damit zum Zusammenbruch der Elektrolythomöostase [53-56]. Es kommt in der Folge zur Depolarisation der Zellen mit

konsekutiver Freisetzung von Glutamat in den Extrazellarraum [57, 58]. Das freigesetzte Glutamat wird entlang des extra-intrazellulären Na<sup>+</sup>-Gradienten gemeinsam mit Na<sup>+</sup>-Ionen von Astrozyten in den Intrazellarraum aufgenommen, was zum Anstieg der intrazellulären Osmolarität und somit schließlich zum Einstrom von Wasser nach intrazellulär führt – das so genannte zytotoxische Ödem entsteht [59, 60]. Weitere Faktoren, die die Entstehung des zytotoxischen Hirnödems begünstigen, sind die aufgrund von anaeroben Stoffwechselprozessen entstehende Laktatazidose [59, 61-63] und die durch Kalziueinstrom bedingte Entstehung von Sauerstoffradikalen und oxidativem Stress [53]. Die modifizierte Monroe-Kellie-Doktrin besagt, dass im starren und geschlossenen System der Schädelkalotte der intrakranielle Druck durch die Summe der drei Kompartimente Hirnparenchym, intrakranielles Blutvolumen und Liquorvolumen bestimmt wird [64-66]. Vergrößert sich das Volumen eines der drei Kompartimente, wie im Falle des zytotoxischen Hirnödems, so kann diese Volumenzunahme in bestimmtem Maße durch eine Reduktion des Volumens eines oder beider anderen Kompartimente, also Verdrängung von Blutvolumen oder Liquor nach extrakraniell, kompensiert werden. Übersteigt die Volumenzunahme des Hirnparenchyms jedoch die Kompensationskapazität, kommt es aufgrund der fehlenden Compliance des starren Schädels zu einer exponentiellen Zunahme des intrakraniellen Drucks (intracranial pressure, ICP). Der intrakranielle Druck hat Einfluss auf den zerebralen Perfusionsdruck (cerebral perfusion pressure, CPP), welcher wiederum die zerebrale Durchblutung determiniert [39].

$$\begin{array}{rclclcl} \text{zerebraler Perfusionsdruck} & = & \text{mittlerer arterieller Blutdruck} & - & \text{intrakranieller Druck} \\ \text{CPP} & = & \text{MAP} & - & \text{ICP} \end{array}$$

Abb. 4: Zusammenhang zwischen zerebralem Perfusionsdruck, mittlerem arteriellem Blutdruck und intrakranielllem Druck, modifiziert nach [39]

Steigt nun der intrakranielle Druck aufgrund des zytotoxischen Ödems, sinkt die ohnehin schon kritisch eingeschränkte zerebrale Durchblutung insbesondere um den Primärschaden herum weiter. Dies ist besonders problematisch, da das an die primäre Läsion angrenzende, noch vitale Gewebe, die sogenannte Penumbra, deutlich vulnerabler gegenüber Ischämie als intaktes Hirngewebe ist [67, 68]. Das Penumbra-Konzept beschreibt um die primäre Läsion gelegene Gewebeareale, welche nicht wie die primäre Läsion irreversibel, sondern reversibel geschädigt sind. In diesen Gewebearealen kommt es unter anderem aufgrund eines Durchblutungsabfalls auf etwa 50% des Normalwertes zur Minderversorgung mit Sauerstoff und zur Gewebshypoxie, welche wiederum dazu führt, dass hauptsächlich anaerobe Stoffwechselprozesse, wie z.B. die anaerobe Glykolyse, ablaufen [69, 70]. Weiterhin kommt es zur Einwanderung und Aktivierung von inflammatorischen Zellen, was den Energiebedarf steigert [71]. Dieser gesteigerte Bedarf kann durch anaerobe Stoffwechselprozesse nur für eine bestimmte Zeit sichergestellt werden, danach kommt es zum irreversiblen Absterben des Gewebes. Eine therapeutische Beeinflussung der pathophysiologischen Prozesse in der traumatischen Penumbra, wie z.B. eine Verbesserung der Gewebeischämie, kann eine irreversible Schädigung verhindern und somit den sekundären Hirnschaden verringern [72]. Sinkt die zerebrale Durchblutung allerdings unter die kritische Schwelle von 10 ml/ 100 g/ min, kommt es sowohl im Bereich der primären Schädigung als auch in der traumatischen Penumbra zu irreversiblen Nekrosen [46-48]. Durch den Zelluntergang kommt es zum Zusammenbruch der zunächst noch intakten Blut-Hirn-Schranke und in der Folge zum Einstrom osmotisch wirksamer Moleküle, wie z.B. intrazellulärer Proteine, in das Interstitium; das so genannte vasogene Ödem entsteht [53, 54, 73]. Neben dem Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke spielen in der klassischen Definition vor allem auch eine durch die Ischämie bedingte Vasoparalyse und eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität als Ursache des vasogenen Ödems eine große Rolle [73-75]. Diese pathophysiologischen Prozesse können bereits direkt nach dem Trauma und damit deutlich vor dem Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke oder auch zeitgleich auftreten, sodass die eine Form des Hirnödems nicht zwingend als Ursache der anderen angesehen werden kann. Letztendlich ist die zeitliche Abfolge der dem posttraumatischen Hirnödem zugrundeliegenden pathophysiologischen Prozesse nicht vollends aufgeklärt und bleibt Grundlage kontroverser Diskussionen [76-78].

Die Zunahme des Hirnparenchymvolumens führt im Sinne eines Circulus vitiosus zu einem fortschreitenden Anstieg des ICP, welcher wiederum in einer Reduktion des zerebralen Perfusionsdrucks und damit der zerebralen Durchblutung resultiert. Als Folge der Schwellung des Hirnparenchyms kommt es je nach Lokalisation der Läsion zur Verdrängung von Hirngewebe in unterschiedliche Bereiche des Schädels. Dabei kann es an anatomischen Engstellen innerhalb der Kalotte zur Druckschädigung des Hirnparenchyms kommen, der sogenannten Herniation („Einklemmung“, siehe Abb. 5). Man unterscheidet je nach Lokalisation transtentorielle, subfalcine, aufsteigende zerebelläre, tonsilläre und die seltenen transalaren (Herniation durch den großen Keilbeinflügel) und transkraniellen (Herniation durch einen Kalottenfrakturspalt) Herniationen [37, 79]. Klinisch sind dabei verschiedene Einklemmungssyndrome zu beobachten, welche durch progressive Beeinträchtigung von Pupillo-, Okulo- und Willkürmotorik sowie von Atmung und Hirnstammreflexen imponieren [29, 79]. Es lassen sich diencephale, mesenzepale, pontine und medulläre Syndrome unterscheiden [79].

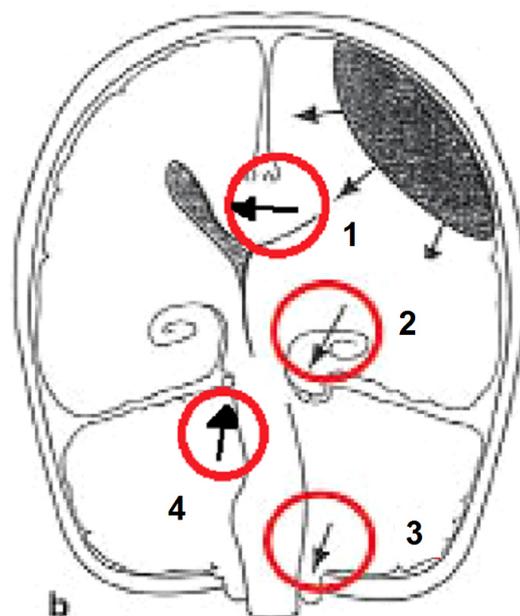


Abb. 5: Schematische Darstellung der häufigsten Herniationstypen:  
 1: subfalcine Herniation, 2: transtentorielle Herniation, 3: tonsilläre Herniation,  
 4: aufsteigende cerebelläre Herniation; modifiziert nach [80]

Zusätzlich zur Herniation des Hirnparenchyms mit den resultierenden klinischen Symptomen wird durch Einengung des Foramen magnum auch der venöse Abstrom und der Liquorabfluss in den Spinalkanal behindert, was zu einem Anstieg des intrakraniellen Flüssigkeitsvolumens und somit ebenfalls zur Erhöhung des intrakraniellen Drucks führt, wodurch die zerebrale Mangel durchblutung und somit das Fortschreiten des sekundären Hirnschadens weiter begünstigt wird [39].

Über die genannten Faktoren hinaus gibt es eine Vielzahl von weiteren Pathomechanismen, die zur Entstehung des sekundären Hirnschadens nach Schädel-Hirn-Trauma beitragen. So konnte gezeigt werden, dass das Kallikrein-Kinin-System nach Schädel-Hirn-Trauma aktiviert wird und durch Erhöhung der Gefäßpermeabilität und Bildung von Sauerstoffradikalen die Entstehung des posttraumatischen Hirnödems begünstigt [51, 53, 74, 81-84]. Ein weiterer Faktor, der das sekundäre Nekrosewachstum beeinflusst, ist die gestörte Wasserhomöostase über Aquaporine. Mehrere Studien geben Hinweise darauf, dass es nach einem Schädel-Hirn-Trauma zu einer vermehrten Expression von Aquaporin-4 kommt und dieses über eine Verstärkung der Schwellung der Astrozytenfortsätze eine ursächliche Rolle in der Entstehung des Hirnödems spielt [85-87]. Ferner scheint auch eine Beeinträchtigung der Funktion der Mitochondrien eine Rolle in der Entstehung des sekundären Hirnschadens zu spielen [53, 88]. So konnte gezeigt werden, dass es nach Schädel-Hirn-Trauma zur Translokation des Apoptose-Induzierenden-Faktors (AIF), eines mitochondrialen, pro-apoptotischen Moleküls, in den Zellkern kommt, was zur Caspase-unabhängigen Apoptoseinduktion führt. Die Inhibition von AIF führt zu einer Reduktion des Zelluntergangs. Schließlich kommt es direkt nach dem Trauma zu einer erhöhten Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) [52, 89-93]. Dieser Anstieg dauert jedoch nur sehr kurz an, anschließend kommt es zu einer lang anhaltenden Hemmung von nNOS und eNOS sowie einem Anstieg von iNOS [52, 89-91, 94]. Es resultiert insgesamt ein NO-Mangel, welcher durch inhalative Applikation von NO, welche selektiv Arteriolen in der traumatischen Penumbra dilatiert, therapeutisch beeinflusst werden kann und den sekundären Schaden deutlich reduziert [95, 96]. Des Weiteren scheint der Anstieg von iNOS die Ausbildung des Sekundärschadens zu unterstützen, da die Inhibition von iNOS das sekundäre Nekrosewachstum reduziert [97]. Als mögliche Mechanismen dieser NO-bedingten Schädigung gelten eine Induktion von oxidativem Stress über die Bildung von Peroxynitrit, ein Versagen der

Energieproduktion durch Hemmung von glykolytischen und mitochondrialen Enzymen sowie eine DNA-Schädigung und Hemmung der DNA-Replikation [98].

#### **1.1.4.3 Rolle der Inflammation nach Schädel-Hirn-Trauma**

Einen weiteren wichtigen pathophysiologischen Aspekt der Entstehung des sekundären Hirnschadens stellen durch das Schädel-Hirn-Trauma angestoßene inflammatorische Prozesse dar. Dabei kommt es zunächst innerhalb von Minuten nach dem Trauma durch Freiliegen von negativ geladenen Oberflächen, wie z.B. Basalmembranen und Freisetzung von intrazellulären Molekülen, wie DNA, RNA und ATP, zur Aktivierung des Kontaktsystems [51]. Dieses besteht aus den Gerinnungsfaktoren XI und XII, Prekallikrein sowie dem nicht-enzymatischen Kofaktor Kininogen und führt nach Aktivierung zur enzymatischen Freisetzung von Bradykinin aus Kininogen [99]. Bradykinin wiederum bedingt eine verstärkte Freisetzung von NO, was zur Vasodilatation, Erhöhung der Gefäßpermeabilität und somit schließlich zur Ödementstehung führt [74, 81, 83, 84]. Stunden bis Tage nach Trauma kommt es zur Einwanderung von Leukozyten, wobei nicht eindeutig geklärt ist, ob diese einen direkten Einfluss auf die Entstehung des sekundären Hirnschadens haben. So konnte z.B. in Mäusen, in denen das Adhäsionsmolekül ICAM-1 (intracellular adhesion molecule-1) ausgeknockt worden war, eine deutliche Reduktion des Hirnödems nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma nachgewiesen werden, während die Leukozyten-Akkumulation unbeeinflusst war, was eher für eine untergeordnete Rolle der Leukozyten-Einwanderung in der Entstehung des akuten sekundären Hirnschadens spricht [100, 101]. Während die Rolle der zellulären Immunantwort in der Entstehung des akuten Sekundärschadens eine eher geringere Bedeutung zu haben scheint, könnte sie in der Entstehung von chronischen Funktionseinschränkungen nach Schädel-Hirn-Trauma umso wichtiger sein. So konnte Tage bis Monate und sogar Jahre nach Schädel-Hirn-Trauma eine Aktivierung von Mikroglia und Einwanderung von Monozyten nachgewiesen werden [102, 103]. Insgesamt wird der akute sekundäre Schaden nach Schädel-Hirn-Trauma vor allem durch die Aktivierung des Kontaktsystems beeinflusst, während die zelluläre Immunantwort hauptsächlich in der Entstehung chronischer Pathologien nach Hirnschädigung beteiligt zu sein scheint [50, 51, 101, 104].

#### **1.1.4.4 Extrakranielle Faktoren des posttraumatischen Hirnschadens**

Neben lokalen Mechanismen gibt es auch systemische Faktoren, die die Entstehung des sekundären Hirnschadens begünstigen. Viele Studien konnten eindeutig zeigen, dass bereits eine einzige Episode systemischer arterieller Hypotonie die Prognose nach Schädel-Hirn-Trauma negativ beeinflusst, unabhängig davon, ob sie sich in der Prähospitalphase oder im klinischen Setting ereignet [105-108]. Der untere Grenzwert scheint dabei bei einem mittleren arteriellen Blutdruck (mean arterial pressure, MAP) von 80-90 mmHg zu liegen [106, 107]. Des Weiteren stellt auch eine systemische Hypoxie mit einer Blutsauerstoffsättigung unter 90% einen unabhängigen Risikofaktor für ein schlechtes Outcome nach Schädel-Hirn-Trauma dar [108-111]. Ferner haben Patienten, die ein Schädel-Hirn-Trauma erlitten haben, ein deutlich erhöhtes Risiko für die Entstehung einer tiefen Venenthrombose, welche in der Folge zur Lungenembolie und damit zur vitalen Bedrohung führen kann [112]. Nach einem Schädel-Hirn-Trauma steigt der tägliche Kalorienbedarf deutlich an, sodass insbesondere bei intubierten Patienten auf ausreichende Kalorienzufuhr geachtet werden muss, da eine Hypoglykämie mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet ist [113, 114]. Dabei gilt es jedoch zu beachten, dass auch Hyperglykämie einen unabhängigen Risikofaktor für ein schlechtes Outcome darstellt und der Blutzuckerwert somit engmaschig überwacht und gegebenenfalls korrigiert werden muss [115, 116]. Die pathophysiologischen Prozesse, die in Folge eines Schädel-Hirn-Traumas in Gang gesetzt werden, können zudem eine systemische Entzündungsreaktion auslösen, welche den sekundären Hirnschaden wiederum aufgrund der mit der Entzündung vergesellschafteten systemischen Hypotonie, Hypoxie sowie Fieber negativ beeinflussen kann [50, 51, 117-119]. Auch eingebrachtes Fremdmaterial, wie externe Ventrikeldrainagen oder Messsonden zur Bestimmung des intrakraniellen Drucks, und insbesondere eine Beatmung mittels orotrachealer Intubation können zur Entstehung von Infektionen beitragen und somit die Prognose negativ beeinflussen [120, 121].

#### **1.1.5 Therapie**

Obwohl die Pathophysiologie des Schädel-Hirn-Traumas in den letzten Jahrzehnten Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen war und so vielfältige Angriffspunkte für spezifische Therapien identifiziert werden konnten, ist es bisher nicht gelungen, in klinischen Studien einen Nutzen einer spezifischen Therapie des Schädel-Hirn-

Traumas zu belegen [1, 36, 40, 122, 123]. Daher ist die aktuelle Standardtherapie weiterhin auf die Beeinflussung der Symptome der Erkrankung und nicht deren kausaler pathophysiologischer Prozesse fokussiert.

#### **1.1.5.1 Klinische Standardtherapie in Anlehnung an die Guidelines der Brain Trauma Foundation**

Das Hauptaugenmerk der im klinischen Alltag durchgeführten Therapie des Schädel-Hirn-Traumas liegt auf der therapeutischen Beeinflussung von intrakraniellm Druck und zerebralem Perfusionsdruck. Systemische Hypotonie unter einem systolischen Wert von 90 mmHg und Hypoxie unter einer Sauerstoffsättigung im Blut von unter 90% haben einen negativen Einfluss auf die Prognose nach Schädel-Hirn-Trauma und müssen daher in allen Stadien der Therapie intensiv überwacht und umgehend korrigiert werden [109]. Dies geschieht üblicherweise mittels intravenöser Infusion von iso- oder hypertonen kristalloiden Lösungen, bei Therapieresistenz auch durch den Einsatz von Bluttransfusionen und Katecholamintherapie und im Falle der Hypoxie mittels Sauerstofftherapie per Nasenbrille oder Sauerstoffmaske bzw. bei komatösem Patienten mittels orotrachealer Intubation und kontrollierter Ventilation [1, 109]. Weiterhin sollte zunächst eine Oberkörperhochlagerung auf 30° sowie gegebenenfalls eine Sedierung des Patienten zur Vermeidung von mit Spitzen des intrakraniellen Drucks einhergehenden Unruhezuständen erfolgen [1, 35, 39]. Ist der intrakranielle Druck durch diese Maßnahmen nicht adäquat zu kontrollieren, kann die Gabe von Osmodiuretika wie Mannitol oder hyperosmolaren Lösungen (z. B. 7,5%ige Kochsalzlösung) erfolgen [1, 35, 39]. Bei komatösen Patienten, deren Vigilanzniveau nicht durch serielle klinische Untersuchungen zu überwachen ist, wird eine invasive Messung des intrakraniellen Drucks, z.B. mittels einer an einen Drucksensor gekoppelten externen Ventrikeldrainage (EVD), empfohlen [1, 35, 39]. Dieses Vorgehen bringt zudem die Möglichkeit mit sich, kontinuierlich oder in Fällen von Spitzen des intrakraniellen Drucks auch intermittierend über die EVD Liquor zu drainieren und so den ICP zu senken [1, 35, 36, 39]. Eine weitere Therapieoption stellt die moderate Hyperventilation (Kohlendioxidpartialdruck im Blut (PaCO<sub>2</sub>) 30 - 33 mmHg, Normwert 35-45 mmHg) dar [1, 35, 39]. Diese führt zur Hypokapnie (angestrebter PaCO<sub>2</sub> 30 - 33 mmHg) und induziert in der Folge eine Vasokonstriktion der Hirngefäße, was wiederum zur Reduktion des zerebralen Blutvolumens führt und

somit den intrakraniellen Druck senkt [1, 35, 39]. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die ohnehin posttraumatisch meist eingeschränkte zerebrale Durchblutung durch die Vasokonstriktion kompromittiert und die ischämische Komponente des sekundären Hirnschadens somit negativ beeinflusst werden kann. Schließlich werden bei weiterer Therapieresistenz Barbiturate eingesetzt, welche eine Reduktion des zerebralen Sauerstoffbedarfs und eine Umverteilung des Blutes zugunsten ischämischer Areale bewirken [35, 36, 39]. Hierbei sind jedoch häufig die Tonusverminderung des sympathischen Nervensystems mit resultierender arterieller Hypotonie und die kardiodepressive Wirkung der Barbiturate therapielimitierend [39].

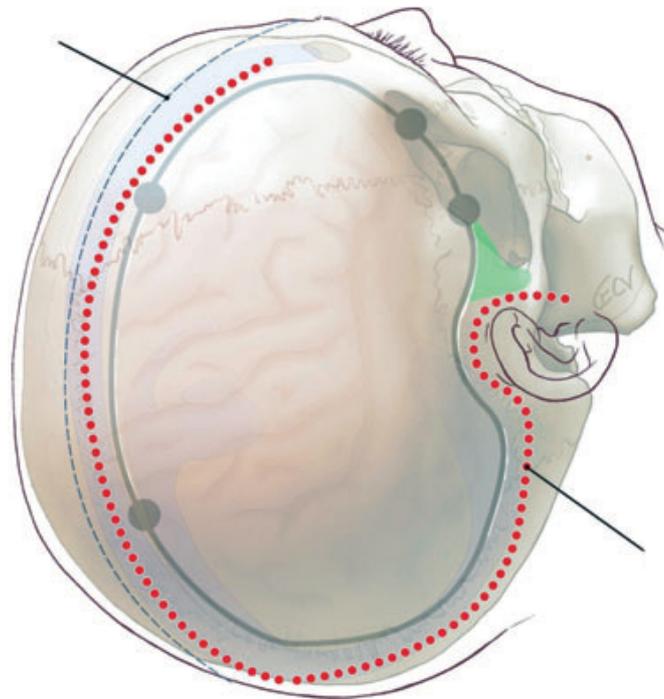


Abb. 6: Schematische Darstellung der dekompressiven Hemikraniektomie, aus [124]

Konnten in der Bildgebung, z.B. mittels Computertomographie oder Magnetresonanztomographie, raumfordernde intrakranielle Verletzungen nachgewiesen werden, sollten diese umgehend chirurgisch entlastet werden [1, 35, 36]. Absolute und dringliche Operationsindikationen sind hierbei das (raumfordernde) akut subdurale sowie das epidurale Hämatom oder über Kalottenbreite dislozierte Kalottenfrakturen. Eine wirksame operative Therapiemöglichkeit zur Senkung des intrakraniellen Drucks stellt je nach Lokalisation des Traumas die dekompressive uni-

oder bilaterale Hemikraniektomie bzw. die bifrontale Kraniektomie dar [1, 35, 36, 39]. Bei dieser sogenannten Entlastungskraniektomie wird ein großer Teil des Schädeldachs operativ entfernt und die Dura mater eröffnet bzw. mittels Duraplastik erweitert, um dem traumatisierten Hirngewebe die Expansion zu ermöglichen und so den intrakraniellen Druck zu senken (siehe Abb. 6) [124, 125]. Nachdem in der DECRA-Studie, der ersten großen prospektiven, randomisierten, kontrollierten, multizentrischen Studie zur Evaluation des Effekts der dekompressiven Kraniektomie, kein positiver Effekt auf die Mortalität und das funktionelle Outcome beobachtet werden konnte, zeigen Hutchinson et al. in der aktuell publizierte RESCUEicp-Studie, dass die Durchführung einer dekompressiven Kraniektomie bei unzureichendem Therapieerfolg unter konservativen Therapiemaßnahmen die Mortalität nach zwölf Monaten signifikant von 52% auf 30% senkt, wobei sich der Anteil der Patienten mit gutem neurologischen Outcome nach zwölf Monaten auch in dieser Studie nicht signifikant von dem der Kontrollgruppe unterscheidet [126, 127]. Weitere Studien müssen in Zukunft klären, welche Patienten nicht nur im Hinblick auf die Mortalität, sondern auch auf das funktionelle Outcome von einer dekompressiven Kraniektomie profitieren, um eine optimale Patientenselektion zu ermöglichen.

Die Standardtherapieoptionen zur Therapie des Schädel-Hirn-Traumas werden in Abbildung 7 zusammengefasst.

	Euvolämie (ZVD 5-10 mmHg)	MAP (≥90 mmHg)	CPP (≈70 mmHg)	Liquordrainage	PaCO <sub>2</sub>	Mannitol	Sedierung
ICP <25 mmHg	+	+	+	+	35	-	-
ICP >25 mmHg	+	+	+	+	30-35	±	+
Herniation	+	+	+	+	25-30	+	+

Abb. 7: Übersicht über die routinemäßig in der Klinik eingesetzten Therapieoptionen des Schädel-Hirn-Traumas, modifiziert nach [35].

In allen Therapiestufen sind chirurgisch erreichbare Raumforderungen von signifikanter Größe zu evakuieren. Weitere Therapieoptionen der Stufe zwei und drei umfassen die dekompressive Hemikraniektomie und den Einsatz von Anästhetika.

ZVD: zentralvenöser Druck

### **1.1.5.2 Experimentelle Therapieansätze**

Zusätzlich zu den standardmäßig im klinischen Alltag eingesetzten Therapien des Schädel-Hirn-Traumas existieren weitere Therapieoptionen, deren Wirksamkeit jedoch bisher in klinischen Studien nicht sicher nachgewiesen werden konnte [1, 40, 122, 123]. So besteht in Deutschland aktuell keine klare Empfehlung für den Einsatz von therapeutischer Hypothermie, hyperbarer Sauerstofftherapie, hämostatischen Medikamenten, wie z.B. Tranexamsäure, Antibiotika bei offenen Schädel-Hirn-Verletzungen und den routinemäßigen Einsatz von Antikonvulsiva [1].

Neben symptomatischen Therapieansätzen wurde am Tiermodell und in vitro eine Vielzahl an Möglichkeiten, in die pathophysiologischen Mechanismen des Schädel-Hirn-Traumas einzugreifen und auf diese Weise einen neuroprotektiven Effekt zu erzielen, beschrieben. Dazu zählen beispielsweise die Inhibition des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B, der Lipidperoxidase, der Cyclooxygenase 2, von NMDA- und Kalziumrezeptoren, des Tumornekrosefaktors  $\alpha$  und des Kallikrein/Kinin-Systems sowie die Gabe von Torasemid, Progesteron und inhalativem NO [40, 83, 95, 123, 128, 129]. Allerdings konnte bisher für keinen dieser Ansätze im Rahmen einer klinischen Studie ein eindeutiger Nutzen für den Patienten nachgewiesen werden. So zeigen zum Beispiel zwei aktuelle, groß angelegte Studien mit insgesamt über 2.000 Patienten, dass Progesteron, eines der aufgrund von experimentell gewonnenen Daten sowie positiven Ergebnissen in Phase II Studien vielversprechendsten Pharmaka, letztlich keinen positiven Effekt auf das klinische Outcome nach schwerem Schädel-Hirn-Trauma hat [130, 131].

## **1.2 Ziel der Arbeit**

Trotz jahrzehntelanger Anstrengungen, neue Therapiekonzepte zu entwickeln, ist die Therapie des Schädel-Hirn-Traumas weiterhin rein symptomatisch [1]. In Tier- und In-Vitro-Modellen wurde eine Vielzahl an neuen pharmakologischen Therapieansätzen, welche die pathophysiologischen Vorgänge des sekundären Hirnschadens beeinflussen sollen, beschrieben [40, 122, 123]. Um die Effekte neuer Wirkstoffe im Tiermodell beurteilen zu können, müssen diese häufig vor Applikation durch eine Trägersubstanz in Lösung gebracht werden. Damit die Wirkung dieser Pharmaka exakt beurteilt werden kann, darf die Trägersubstanz selbst keinen Effekt auf die zu

untersuchenden Parameter haben, da die beobachtete Wirkung sonst nicht eindeutig einer bestimmten Substanz zuzuordnen ist. Als Trägersubstanzen in der Erforschung neuer neuroprotektiver Wirkstoffe, aber auch im klinischen Alltag kommen sehr häufig organische Lösungsmittel zum Einsatz [132-137]. Bisher ist es jedoch weitestgehend unklar, ob diese selbst neuroprotektives Potential besitzen und somit Einfluss auf die Beobachtungen klinischer und experimenteller Studien nehmen können. Daher war es Ziel der vorliegenden Studie, den Effekt verschiedener, häufig verwendeter Lösungsmittel auf den sekundären Hirnschaden nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma zu evaluieren und dadurch die geeignetsten Substanzen zur Verwendung als Trägerstoff in der Erforschung neuer neuroprotektiver Therapien zu identifizieren. Die im Rahmen der Arbeit untersuchten Substanzen werden im folgenden Abschnitt ausführlich beschrieben. Bei Nachweis einer Beeinflussung sollte der Effekt auf unterschiedliche Parameter des sekundären Hirnschadens untersucht werden.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Versuchstiere**

Die Experimente wurden an männlichen C57Bl/ 6 Mäusen (Charles River, Kißlegg, Deutschland) mit einem Körpergewicht von 20-25 g durchgeführt. Die Versuchstiere wurden unter einem Zyklus von 12 Stunden Helligkeit gefolgt von 12 Stunden Dunkelheit gehalten und hatten freien Zugang zu Nahrung und Flüssigkeit. Sämtliche Versuche erfolgten in Einklang mit den Tierschutzbestimmungen und nach dem von der Regierung von Oberbayern genehmigten Protokoll Az. 55.2-1-54-2531-132-11.

### **2.2 Randomisierung und Verblindung**

Die Versuchstiere wurden den Experimenten zufällig zugeteilt; vor Beginn des Experiments wurden sie durch Losziehung in die verschiedenen Versuchsgruppen randomisiert. Die die zu injizierenden Substanzen beinhaltenden Spritzen wurden für alle Versuchsreihen von einer nicht in die Durchführung oder Auswertung der Versuche einbezogenen Person präpariert, die Zuordnung einer Versuchsgruppe zu einer Substanz war bis zur Entblindung nicht möglich. Die an der Durchführung und

Auswertung der Daten beteiligten Personen wurden erst nach abgeschlossener Datenauswertung entblindet.

## **2.2 Narkose**

Die Narkoseeinleitung erfolgte in einer speziell angefertigten Narkosekammer mit 5%igem Isofluran (Forene©, Abbot GmbH, Wiesbaden, Deutschland) per inhalationem über 45 Sekunden. Während der CCI-Operation wurde die Narkose über eine Beatmungsmaske mit einer Erhaltungsdosis von 1%igem Isofluran in einem Luft-/Sauerstoffgemisch (69%/30%) aufrechterhalten. Die Körpertemperatur der Versuchstiere wurde intraoperativ mit Hilfe einer über eine rektale Temperatursonde rückgekoppelten Heizplatte (FHC, Bowdoinham, Maine, USA) konstant bei 37°C gehalten.

## **2.3 Analgesie**

Die Analgesie der Mäuse wurde durch intraperitoneale Injektion von Buprenorphin (Temgesic©, RB Pharmaceuticals Ltd., Berkshire, Vereinigtes Königreich) in einer Dosierung von 0,1 mg/Kg Körpergewicht 15 Minuten vor Versuchsbeginn und alle acht Stunden nach erstmaliger Applikation sichergestellt.

## **2.4 Controlled-Cortical-Impact-Modell (CCI)**

Zur Traumainduktion wurde das in der Literatur erstmalig 1988 von James W. Lighthall an Frettchen beschriebene und von unserer Arbeitsgruppe vor 15 Jahren etablierte Controlled-Cortical-Impact-Modell verwendet [138]. Die Operation erfolgte in Bauchlagerung. Der Kopf der Maus wurde in einer stereotaktischen Halterung (Kopf Instruments®, Tujunga, Kalifornien, USA) fixiert und die Augen der Maus für die Dauer der Operation durch Applikation einer Dexpanthenol-Creme (Bepanthen®, Bayer, Leverkusen, Deutschland) vor dem Austrocknen geschützt. Nach Anlegen eines etwa zwei Zentimeter messenden Hautschnittes über der Sagittalnaht wurde die Galea aponeurotica mittels zweier Pinzetten nach lateral abpräpariert. Anschließend erfolgte mit Hilfe einer Diamantfräse (Rewatronic Products, Wald - Michelbach, Deutschland;

Bohrkopf GD890R, Durchmesser 0,6 mm, Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) unter dem OP-Mikroskop (Zeiss OPMI® 1, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) eine Kraniotomie von etwa 1 x 1 Zentimetern, wobei penibel auf die Schonung der Dura mater geachtet wurde. Die Begrenzungen der Kraniotomie stellten nach rostral die Koronarnaht und nach medial die Sagittalnaht mit dem darunter liegenden Sinus sagittalis superior dar (siehe Abb. 8). Der präparierte Knochendeckel wurde im Rahmen der Kraniotomie nach medial hin an der Sagittalnaht fixiert belassen, sodass er vor dem Aufsetzen des Stempels nach medial aufgeklappt werden konnte.

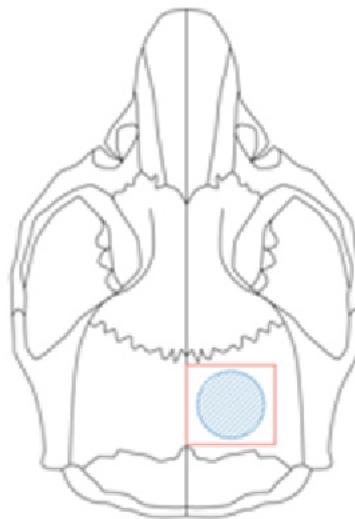


Abb. 8: Position der Kraniotomie und des Traumas. Rotes Rechteck: Kraniotomie; blauer Kreis: Position der Traumainduktion

Die Traumainduktion erfolgte mit Hilfe eines pressluftbetriebenen Stempels (Spezialanfertigung, L. Kopacz, Universität zu Mainz, Deutschland, siehe Abb. 9). Das Gerät ermöglicht, die Eindringtiefe und die Kontaktzeit des Stempels mit der Dura mater sowie dessen Aufprallgeschwindigkeit auf der Dura mater separat zu justieren. Weiterhin kann die Trajektorie des Stempels in allen drei Raumebenen millimetergenau definiert werden. In allen Versuchsreihen wurde die Eindringtiefe auf einen Millimeter, die Kontaktzeit auf 150 Millisekunden und die Aufprallgeschwindigkeit auf acht Meter pro Sekunde justiert. Vor Traumainduktion erfolgte eine Rotation der Kopfhaltung des stereotaktischen Rahmens und damit des Schädels des Versuchstieres um drei Grad nach links, um ein exakt senkrecht Auftreffen des

Stempels auf der Dura mater zu gewährleisten. Anschließend wurde der gesamte Operationstisch so unter der CCI-Maschine platziert, dass der Stempel rechtwinklig auf die Dura mater auftreffen konnte. Das Auslösen des CCI erfolgte mittels Knopfdruck. Der Operationstisch wurde anschließend schnellstmöglich wieder in die Ausgangsposition unter dem OP-Mikroskop gebracht, sodass die Kraniotomie umgehend mittels Gewebekleber (Histoacryl®, Braun-Melsungen, Melsungen, Deutschland) verschlossen werden konnte. Der Hautverschluss erfolgte abschließend in Einzelknopftechnik mittels monofilem Nahtmaterial (5-0 Prolene, Ethicon®, Johnson & Johnson®, Norderstedt, Deutschland).

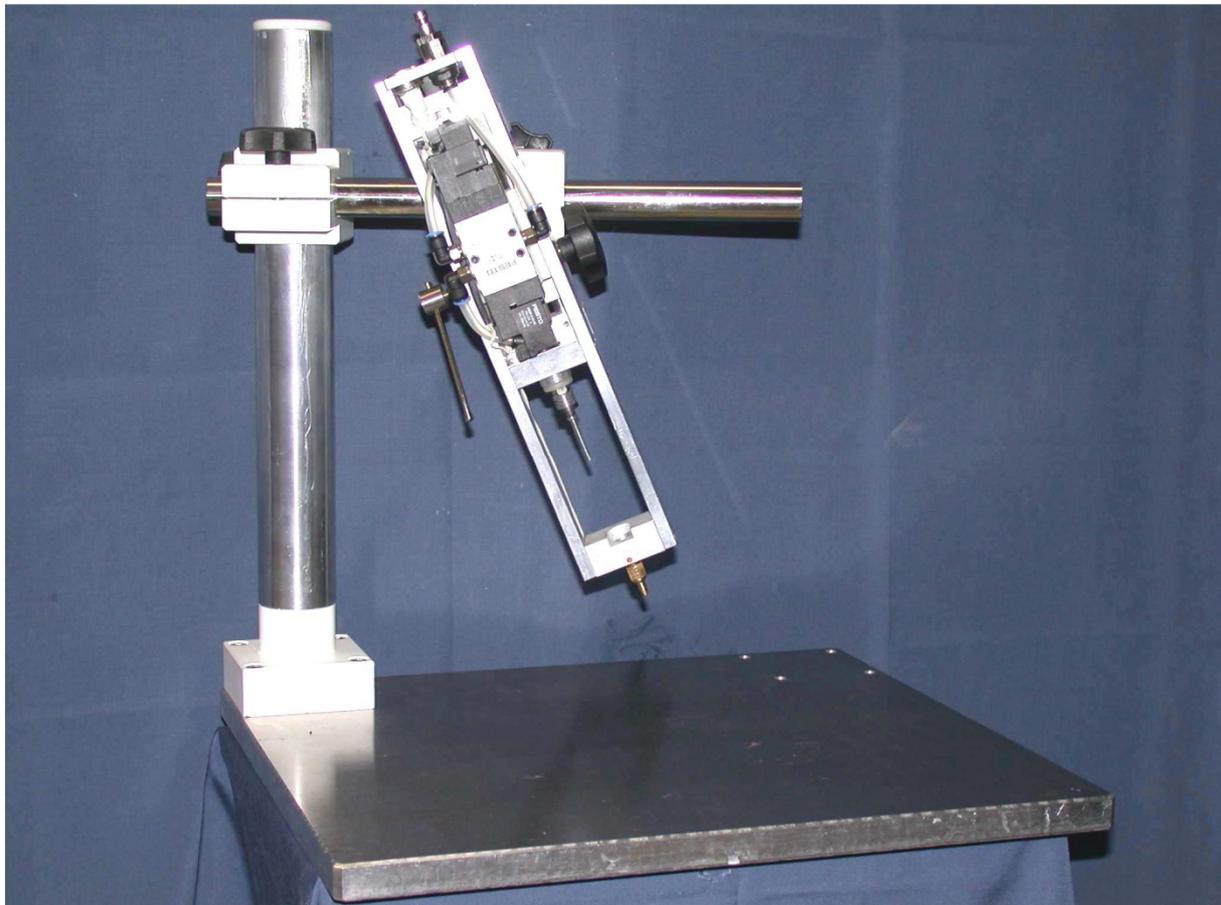


Abb. 9: Die CCI-Maschine

## **2.5. Arteria-Cerebri-Media-Okklusionsmodell (MCAo) – Modell des ischämischen Schlaganfalls**

Die Versuche zur zerebralen Ischämie wurden am in unserer Arbeitsgruppe bereits vielfach verwendeten MCAo-Modell durchgeführt [96, 139-143]. Hierbei wurden die Mäuse zunächst wie bereits beschrieben anästhesiert und in Rückenlage gelagert. Nach medianer zervikaler Hautinzision erfolgte die Darstellung der linken A. carotis communis sowie der linken A. carotis externa. Nach Ligieren dieser beiden Gefäße wurde eine Arteriotomie der A. carotis communis durchgeführt und ein silikonbeschichtetes Monofilament der Stärke 8-0 bis in die linke A. cerebri media vorgeschoben. Bei korrekter Filamentlage konnte mittels transkranieller Laser-Doppler-Messung (Perimed 4001 Master, Perimed, Järfälla, Schweden) im Versorgungsgebiet der A. cerebri media ein signifikanter Abfall des CBF nachgewiesen werden. Die Ischämiedauer betrug in allen Versuchen 60 Minuten. Schließlich wurden sowohl das Filament als auch die Laser-Doppler-Messsonde entfernt, die Ischämie somit beendet und die Haut in Einzelknopftechnik mittels monofilem Faden (5-0 Prolene, Ethicon©, Johnson & Johnson©, Norderstedt, Deutschland) verschlossen. Nach 24 Stunden erfolgte die Hirnentnahme und die Bestimmung des Infarktolumens (siehe unten).

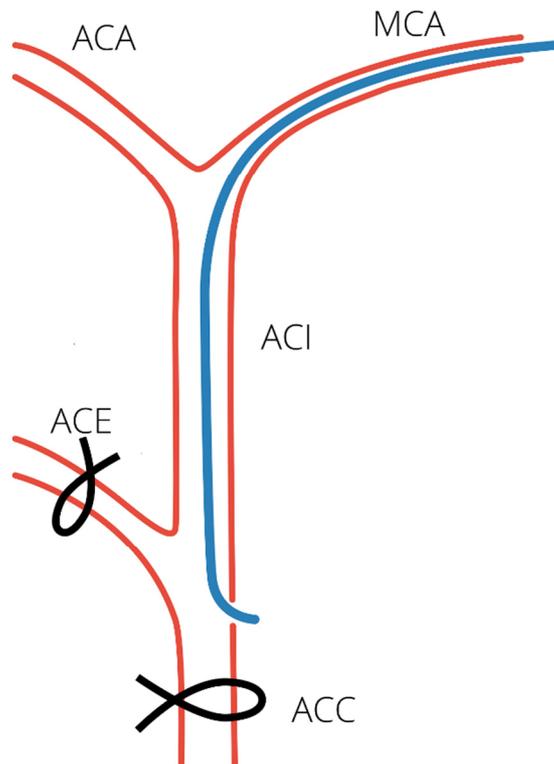


Abb. 10: Schematische Darstellung des A. cerebri media- Okklusions-Modell der zerebralen Ischämie. ACC: A. carotis communis, ACE: A. carotis externa, ACI: A. carotis interna, ACA: A. cerebri anterior, MCA: A. cerebri media, Blau: silikonbeschichtetes Filament

## 2.6 Körpergewicht

Das Körpergewicht als Parameter für das Allgemeinbefinden der Versuchstiere wurde jeweils direkt vor Versuchsbeginn und 24 Stunden nach Traumainduktion mit einer Präzisionswaage (Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland) bestimmt. Der Gewichtsverlust wird absolut (in Gramm) und als Prozent des Ausgangsgewichts angegeben.

## 2.7 Bestimmung des Nekrosevolumens

### 2.7.1 Histologische Aufarbeitung

Zur histologischen Bestimmung des Nekrosevolumens wurden coronare Gefrierschnitte der Gehirne angefertigt. Die Hirnentnahme erfolgte je nach Versuchsgruppe 15 Minuten bzw. 24 Stunden nach Traumainduktion. Hierzu wurden die Versuchstiere mittels hochdosierter Isofluraninhalation (5% über eine Minute, Forene©, Abbot GmbH, Wiesbaden, Deutschland) in tiefe Narkose versetzt und per zervikaler Dislokation getötet. Der Kopf wurde abgetrennt und das Gehirn unter Verwendung von Mikrodissektoren sorgfältig aus dem Schädel präpariert. Nach Abtrennen der Bulbi olfactorii und des Hirnstammes wurde das Gehirn in Trockeneispulver eingebettet und in pulverisiertem Trockeneis gefroren. Bis zur weiteren Verarbeitung erfolgte die Lagerung bei -20°C. Die Anfertigung der Gefrierschnitte erfolgte mit Hilfe eines Kryostaten (Cryostar MH 560, Microm, Walldorf, Deutschland). Nach Einbettung (Tissue - Tek®, Sakura Finetek Europe, Zoeterwoude, NL) wurden 1000 Mikrometer hinter dem Bulbus olfactorius beginnend alle 500 Mikrometer insgesamt 14 koronare Schnitte von jeweils zehn Mikrometern Dicke angefertigt und auf Objektträger aufgebracht. Die Gewebeschnitte wurden anschließend nach Nissl (siehe Abb. 11) zehn Minuten in Kresylechtviolett gefärbt, fixiert und eingedeckelt (Eukitt®, O. Kindler GmbH & Co, Freiburg, Deutschland).

1. 70% Ethanol	2 min eintauchen
2. Kresylechtviolett	10 min eintauchen
3. Destilliertes Wasser	in drei Becken jeweils zweimaliges Eintauchen
4. Aufsteigende Alkoholreihe	
- 70% Ethanol	zweimaliges Eintauchen
- 96% Ethanol	zweimaliges Eintauchen
- 100% Ethanol	zweimaliges Eintauchen
- Xylol 1	5 min eintauchen
- Xylol 2	5 min eintauchen

Abb. 11: Färbeprotokoll modifiziert nach Nissl

## 2.7.2 Histomorphometrie

Die histomorphometrische Auswertung der Gefrierschnitte erfolgte mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Olympus BX 41, Olympus, Hamburg, Deutschland) bei 12,5-facher Vergrößerung. Mittels einer auf das Mikroskop montierten, mit einem Computer verbundenen Kamera (Olympus Camedia C5050, Olympus, Hamburg, Deutschland), wurden digitale Aufnahmen der Schnitte angefertigt. Mit Hilfe einer Auswertungssoftware (Olympus DP-Soft, analySIS, Version 3.2., Olympus, Hamburg, Deutschland) wurden für jede Schnittebene die Flächen der beiden Großhirnhemisphären sowie des jeweiligen Nekroseareals vermessen und das Nekrosevolumen schließlich anhand der Formel  $V_n = A_1 \times 0,5 + A_2 \times 0,5 \dots + A_{14} \times 0,5$  errechnet (siehe Abb. 12).

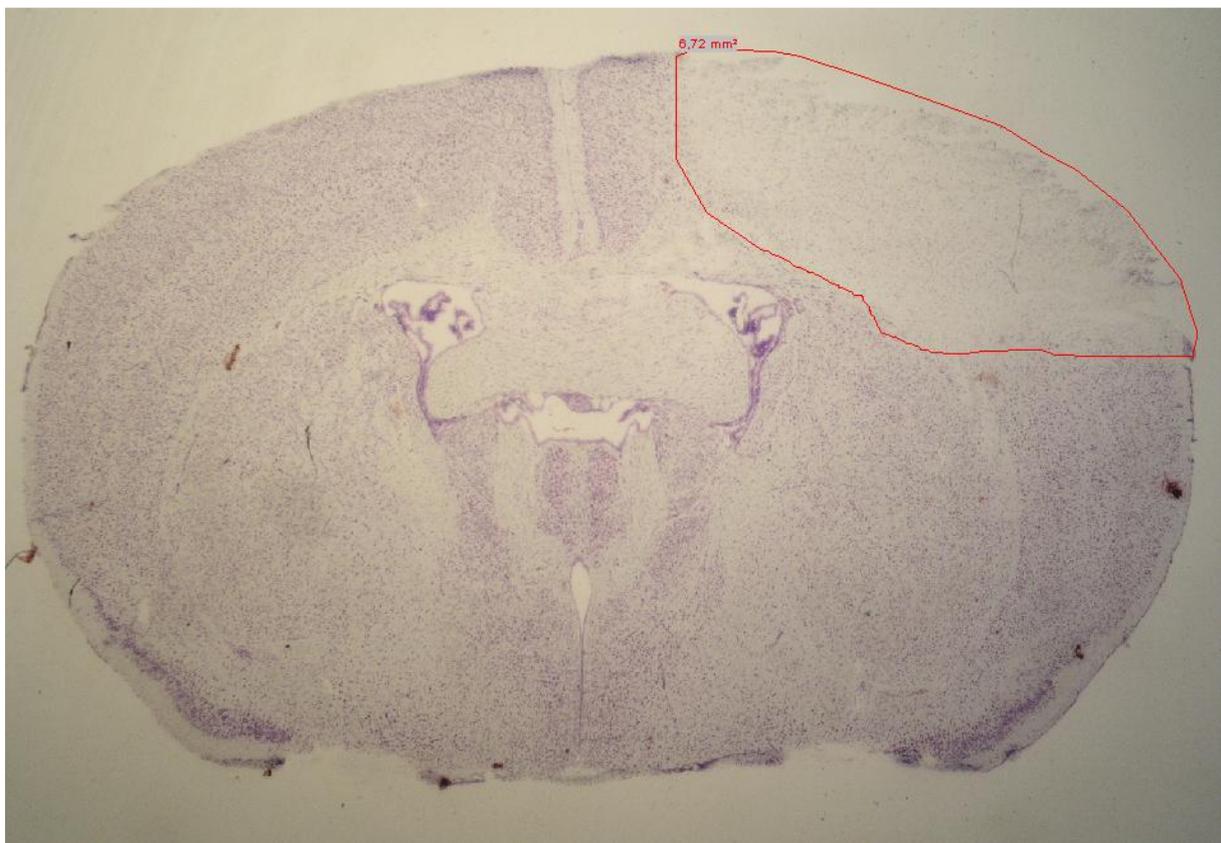


Abb. 12: Histomorphometrische Bestimmung des Nekrosevolumens

## 2.8 Bestimmung des Hirn-Wassergehaltes

Die Bestimmung des Hirn-Wassergehaltes als Parameter für die Hirnödementwicklung erfolgte mit der Feucht-Trocken-Methode. Hierfür wurden die Gehirne wie oben beschrieben aus dem Schädel präpariert und im Anschluss an die Entfernung des Hirnstamms in eine gekühlte Schnittmatrix gegeben. Danach wurden die beiden Hemisphären mit einer Rasierklinge exakt median voneinander getrennt und jeweils in ein vorher abgewogenes Wägegglas (35 x 30mm, Schott AG, Jena, Deutschland) gegeben. Auf die Bestimmung des Feuchtgewichtes (Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland) folgte die Trocknung der Proben in einem Wärmeschrank (Memmert, Schwabach, Deutschland) bei einer Temperatur von 100°C für 24 Stunden. Anschließend erfolgte die Bestimmung des Trockengewichtes. Der Hirn-Wassergehalt wurde gemäß Abb. 13 errechnet.

$$\text{Hirnwassergehalt (\%)} = \frac{\text{Feuchtgewicht (g)} - \text{Trockengewicht (g)}}{\text{Feuchtgewicht (g)}} \times 100$$

Abb. 13: Formel zur Berechnung des Hirnwassergehaltes

## 2.9 Neurological Severity Score (NSS) zur Bewertung der neurologischen Funktion

Zur Evaluation der neurologischen Funktion der Versuchstiere wurde eine modifizierte Form des in der Literatur vorbeschriebenen Neurological Severity Scores erhoben [95, 144]. Diese neurologische Testbatterie besteht aus zehn Teilbereichen und bewertet Motorik, Orientierung, Reflexe, Koordination und Gleichgewicht. Es können minimal null Punkte und maximal 20 Punkte erreicht werden, wobei höhere Punktwerte für ein schlechteres neurologisches Outcome sprechen. Die genaue Punkteverteilung ist in Abb. 14 dargestellt. Der Neurological Severity Score wurde jeweils direkt vor Beginn des Experiments und 24 Stunden nach Traumainduktion erhoben. Tiere, die bereits präoperativ einen Score von über zwei Punkten erreichten, wurden von der Randomisierung ausgeschlossen.

<b>Open Field Versuch</b>	
1) Maus verlässt den Versuchsbereich binnen einer Minute	0 Punkte
2) Maus betritt den Ring mit den Vorderpfoten	1 Punkt
3) Weder 1) noch 2)	2 Punkte
<b>Suchverhalten</b>	
1) Physiologisches Suchverhalten	0 Punkte
2) Verlangsamtes Suchverhalten	1 Punkt
3) Keine Bewegung	2 Punkte
<b>Geradeauslaufen</b>	
1) Möglich	0 Punkte
2) Nicht möglich	1 Punkt
3) Keine Bewegung	2 Punkte
<b>Schreckreflex</b>	
1) Maus springt nach dem Klatschen reflexartig hoch	0 Punkte
2) Maus springt nach dem Klatschen nicht hoch	2 Punkte
<b>Beam Walk (dreimalige Durchführung, 1cm, 2cm und 3cm Kantenlänge)</b>	
1) Zügiges Laufen, keine Fehlritte	0 Punkte
2) Verlangsamtes Laufen, Fehlritte	0,5 Punkte
3) Herabfallen nach einigen Schritten	1 Punkt
4) Sofortiges Herabfallen	2 Punkte
<b>Hemiparese</b>	
1) Volle Kraft	0 Punkte
2) Verringerte Kraft	1 Punkt
3) Keine Bewegung möglich	2 Punkte
<b>Klettern am Holzstab (zweimalige Durchführung, runder und eckiger Holzstab)</b>	
1) Kein Herabfallen auch unter Schütteln	0 Punkte
2) Festhalten mit zwei Pfoten nach Schütteln	0,5 Punkte
3) Herabfallen nach Schütteln	1 Punkt
4) Herabfallen ohne Schütteln	2 Punkte
<b>Maximalwert</b>	<b>20 Punkte</b>

Abb. 14: Bewertung der neurologischen Funktion anhand des Neurological Severity Scores (NSS)

## 2.10 Testsubstanzen

### 2.10.1 Dimethylsulfoxid (DMSO)

Dimethylsulfoxid ist ein amphiphatisches Molekül mit der Summenformel  $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ . Es besteht aus einer polaren und zwei apolaren Gruppen (s. Abb. 15), was seine Löslichkeit sowohl in wässrigen als auch in organischen Medien erklärt [145]. Bei Raumtemperatur ist es flüssig sowie farb- und geruchlos [146].

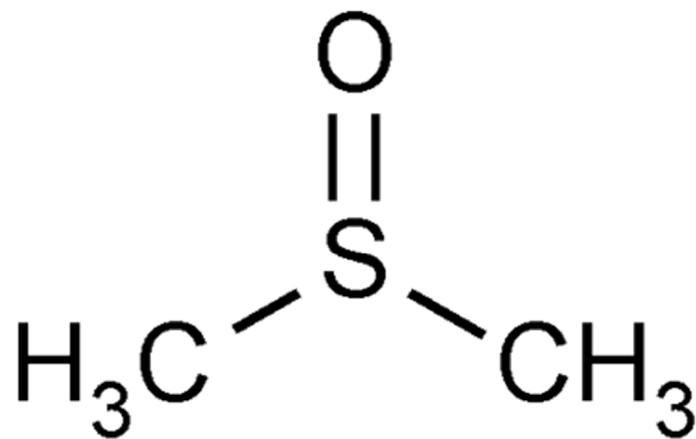


Abb. 15: Strukturformel des DMSO

Aufgrund seiner physikalischen Eigenschaften ist DMSO ein sowohl klinisch als auch experimentell sehr häufig eingesetztes Lösungsmittel [129, 132-135, 145, 147-160]. In der vorliegenden Studie kam eine 1%ige DMSO-Lösung zum Einsatz. Diese relativ niedrige Konzentration wurde gewählt, weil für höhere Dosierungen vielfältige Effekte von DMSO auf die im Gehirn nach Schädigung ablaufende Prozesse beschrieben wurden, welche die Versuchsbeobachtungen verfälschen könnten, und ein Einsatz als Lösungsmittel auch in deutlich geringeren Dosierungen möglich ist. Bereits seit den 1960er-Jahren wurden die pharmakologischen Eigenschaften von DMSO von mehreren Arbeitsgruppen genauer untersucht [161-163]. Für die Maus wurden dabei abhängig vom jeweiligen Applikationsweg  $\text{LD}_{50}$ -Werte von 3,1-9,2 g/kg KG bei intravenöser Applikation bis 21,4-28,3 g/kg KG bei peroraler Applikation ermittelt [146,

161, 163]. Der LD<sub>50</sub>-Wert beschreibt hierbei jene Dosierung, bei der 50% der Versuchstiere gestorben sind. Beim Menschen sind bei Dosierungen bis 8 g/kg KG pro Tag keine Nebenwirkungen zu erwarten, jedoch wird eine Tagesgesamtdosis von maximal 1 g/kg KG empfohlen [159, 164, 165]. Die maximale Konzentration im Gewebe ist beim Menschen etwa vier bis sechs Stunden nach Aufnahme erreicht [146, 159]. Die Halbwertszeit  $t_{1/2}$  beträgt abhängig von der Applikationsart zwischen 12 Stunden bei transdermaler und 96 Stunden bei intravenöser Applikation. Die Ausscheidung erfolgt hauptsächlich renal, jedoch in geringem Maße auch in Form des Abbauproduktes Dimethylsulfid pulmonal [146, 159]. DMSO wird gut über die Haut aufgenommen und ermöglicht so die transdermale Applikation von Wirkstoffen [166]. Weiterhin hat es einen anti-inflammatorischen und bakteriostatischen Effekt [154, 166, 167], ist ein freier Radikalfänger [154, 157, 166-170], wirkt analgetisch [145, 166, 171], steigert die Diurese [146, 166, 167] und kann die Wirksamkeit einiger Arzneimittel verstärken [166]. Darüber hinaus inhibiert DMSO die Cholinesterase [166], unterdrückt die NMDA- und AMPA-Rezeptoraktivität, die Na<sup>+</sup>-Kanalaktivität sowie den Kalziumeinstrom in die Zelle [145, 154, 167], setzt Histamin frei [146, 166] und verhindert die Plättchenaggregation [154, 166, 167]. Außerdem wird die Zellproliferation und -funktion durch DMSO beeinflusst [166, 167, 172, 173] und die Nervenleitgeschwindigkeit peripherer Nerven verringert [149]. DMSO wurde 1978 von der amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) zur Behandlung der interstitiellen Zystitis zugelassen und wird auch zur Behandlung vieler weiterer Krankheitsbilder therapeutisch eingesetzt [145, 167, 174-176]. Zu den mit DMSO therapierten Krankheitsbildern gehören gastrointestinale Erkrankungen, wie z.B. Colitis ulcerosa [177-182], chronische Prostatitis [175], dermatologische Erkrankungen, wie z.B. Keloide [145, 152, 153, 176, 183], rheumatologische Erkrankungen [184], verschiedene Formen der Amyloidose [176, 185-188], pulmonale Adenokarzinome [172], Schizophrenie [189] und das traumatische Hirnödem [168, 176]. Darüber hinaus wird DMSO auch als topisches Analgetikum eingesetzt [171]. DMSO-assoziierte Nebenwirkungen treten in der Regel erst in hohen Konzentrationen, welche die in der vorliegenden Studie verwendeten Konzentrationen deutlich übersteigen, und bei schneller, v.a. intraarterieller Applikation auf [150, 161]. In der Literatur beschriebene Nebenwirkungen umfassen bei topischer Anwendung Juckreiz, Brennen und Hautausschlag [145, 146, 176], bei intravenöser Anwendung Übelkeit, Erbrechen, Hämolyse, einen durch die pulmonale Eliminierung des Abbauproduktes

Dimethylsulfid bedingten Knoblauchgeruch der Ausatemluft, anaphylaktische Reaktionen, Bronchospasmus, Mastzelldegranulation, Leukozytose, Hypertonie, Bradykardie, Sauerstoffentsättigung des Blutes, Sulfhämoglobinämie, je nach applizierter Konzentration Hypo- oder Hyperosmolarität, Lungenödem und Herzstillstand [132, 145, 146, 159, 164, 167, 176]. Des Weiteren kann DMSO bestimmte Applikationskatheter angreifen und zersetzen [132, 150]. Im Zusammenhang mit dem Einsatz von DMSO zur Kryokonservierung von Stammzellen sind mehrere Fälle epileptischer Anfälle und reversibler Enzephalopathie nach Stammzelltransplantation beschrieben [165, 190-193]. Im Mausmodell wurden außerdem bei Applikation hoher Dosen zunächst eine reversible neuromuskuläre Übererregbarkeit gefolgt von einer chronischen Verringerung der motorischen Aktivität, Allodynie, Myasthenie, Ataxie, Polyurie, Polydipsie und Hämoglobinurie beobachtet [146, 148, 161, 162, 194, 195].

#### **2.10.1.1 Effekt von DMSO auf das Gehirn**

DMSO kommt sehr häufig als Vehikel in Studien zur Untersuchung (patho-)physiologischer Prozesse im Gehirn zum Einsatz [129, 133, 135, 156, 158, 167, 170]. Des Weiteren ist DMSO Bestandteil von Onyx®, einem weit verbreiteten Agens zur Embolisation zerebraler Aneurysmata und arteriöser Malformationen, und wurde auch als Lösungsmittel in der Entwicklung neuer embolisierender Agenzien eingesetzt [132, 134, 150, 164, 169, 196-198]. Aufgrund dieser sehr häufigen Verwendung in experimentellen und klinischen Studien sind für DMSO vielfältige Effekte auf das Gehirn und dort ablaufende (patho-)physiologische Prozesse beschrieben. Diese umfassen einerseits ein reversibles Öffnen der Blut-Hirn-Schranke, eine Reduktion des intrakraniellen Drucks, des Hirnödems sowie des neuronalen Zelltodes nach Schädel-Hirn-Trauma, ein positiver Einfluss auf ischämische Gewebeareale, eine Funktion als Radikalfänger sowie eine Unterdrückung der Glutamat-Toxizität [135, 151, 154, 166, 167, 170]. Andererseits führt vor allem die intraarterielle Injektion von DMSO zu Vasospasmen, Inflammation der Gefäßwand, Thrombosen, Mikroaneurysmen, Nekrosen des benachbarten Hirngewebes und Subarachnoidalblutungen und die intraperitoneale Injektion verschlechtert die neurologische Funktion nach CCI [133, 134, 150, 158, 169, 197, 199].

### 2.10.2 Polyethylenglykol-40 (PEG-40)

Polyethylenglykol ist ein Polymer bestehend aus einer verschiedenen Anzahl an Ethylenglykol-Molekülen (Strukturformel siehe Abb. 16). Die Summenformel des Monomers Ethylenglykol lautet  $C_2H_6O_2$ , die der Polyethylenglykole dementsprechend  $C_{2n}H_{4n+2}O_{n+1}$  [200-203]. Die Nomenklatur richtet sich nach dem jeweiligen Molekulargewicht. So wird ein Polyethylenglykol-Molekül mit einem Molekulargewicht von 40 g/mol als PEG-40, ein Polyethylenglykol-Molekül mit einem Molekulargewicht von 400 g/mol als PEG-400 usw. bezeichnet [204]. Bei Zimmertemperatur sind Polyethylenglykolpolymere bis zu einem Molekulargewicht von etwa 400 g/mol visköse, farb- und geruchlose Flüssigkeiten; bei höherem Molekulargewicht sind sie wächserne Feststoffe [200, 201].

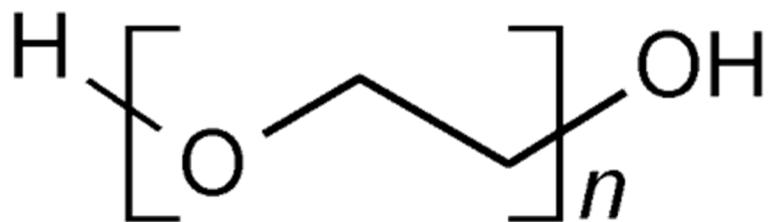


Abb. 16: Strukturformel PEG

PEG wird weit verbreitet zur Stabilisierung und damit Wirkungsverlängerung, Verbesserung der Bioverfügbarkeit und Penetration der Blut-Hirn-Schranke von Arzneimitteln sowie als Lösungsmittel in pharmakologischen Studien eingesetzt [40, 154, 160, 205-211]. Zusätzliche Einsatzgebiete sind die Kosmetikindustrie, die präprozedurale Darmreinigung vor Koloskopien sowie die Therapie der Obstipation [201, 212-216]. Weitere in der Literatur beschriebene Wirkungen von PEG sind eine Reduktion von oxidativem Stress sowie des Kalziuminfluxes in geschädigte Zellen [217-219], ein zytoprotektiver Einfluss auf Mitochondrien [217, 220] sowie eine Reduktion der Darmpassagezeit [221]. Bei Einsatz von PEG als Lösungsmittel wurden stets 100%ige Lösungen verwendet, daher kam auch in der vorliegenden Studie eine

100%ige PEG-Lösung zum Einsatz. Insgesamt ist PEG sehr gut verträglich [202, 203]. Nebenwirkungen sind erst ab sehr hohen Dosierungen weit über der in der vorliegenden Studie verwendeten Dosierung zu erwarten. Zu den beschriebenen Nebenwirkungen im Tiermodell gehören reduzierte Gewichtszunahme, Nieren- und Leberschwellung mit Erhöhung der Leberenzyme im Blut, leichte Peritonitis sowie eine Erhöhung des Stickstoffs im Blut [222-225]. Die LD<sub>50</sub>-Werte für die Maus liegen je nach Applikationsart und Molekulargewicht des PEG-Polymers zwischen 2000 mg/kg Körpergewicht bei intraperitonealer und etwa 10000 mg/kg Körpergewicht bei dermalen Applikation [201, 202, 226]. Insgesamt wird PEG schlecht über die Haut und die Schleimhaut des Gastrointestinaltraktes aufgenommen, wobei kleinere Moleküle tendenziell besser resorbiert werden als solche mit einem höheren Molekulargewicht [201, 227]. Wird PEG jedoch auf geschädigte Haut appliziert, kann es im Menschen in Einzelfällen zu Nierenschäden und im schlimmsten Fall zu einer Ethylenglykol-Vergiftung, welche mit neurologischen, kardiovaskulären und pulmonalen Symptomen einhergehen kann, kommen [200, 228-230]. In der Regel wird PEG jedoch nicht in klinisch relevanten Mengen zu Ethylenglykol metabolisiert und eine Ethylenglykol-Vergiftung als Folge einer vorhergehenden PEG-Applikation ist daher sehr selten [201]. Die Ausscheidung von PEG erfolgt hauptsächlich unverändert renal und über den Stuhl [201].

#### **2.10.2.1 Effekt von PEG auf das Gehirn**

PEG wird häufig als Lösungsmittel oder Bestandteil von Arzneimittelformulierungen in Studien zur Pathophysiologie nach Hirnschädigungen eingesetzt [160, 205-208, 210, 211, 231]. Des Weiteren kommt PEG aufgrund seiner seit Langem bekannten Eigenschaft, Membranen zu fusionieren, als Therapeutikum sowohl in Modellen des Rückenmarks- als auch des Schädel-Hirn-Traumas zum Einsatz [205, 217, 219, 232-246]. Dabei konnte gezeigt werden, dass PEG in beiden Modellen geschädigte Zellmembranen wiederherstellen, den oxidativen Stress und auch den Zelltod nach traumatischer Schädigung von Neuronen reduzieren und die Funktion der Neurone verbessern kann [217-220, 233-237, 242].

### 2.10.3 *N*-Methyl-2-pyrrolidon (NMP)

*N*-Methyl-2-pyrrolidon ist ein amphiphiles Molekül mit der Summenformel C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>NO [247]. Aufgrund seiner Molekülstruktur wird es zu den  $\gamma$ -Lactamen gezählt (s. Abb. 17). Bei Zimmertemperatur ist NMP flüssig und hat eine hellgelbe Farbe sowie einen leichten Amingeruch [247, 248].

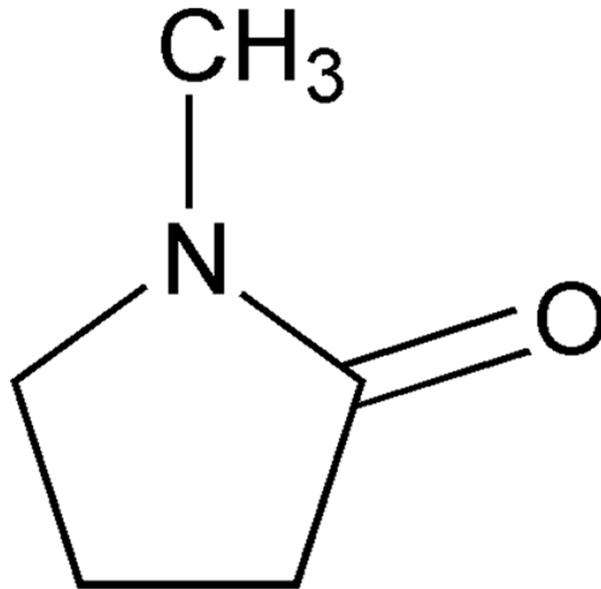


Abb. 17: Strukturformel NMP

Es wird weit verbreitet als Lösungsmittel in verschiedenen Arzneimittelzubereitungen und -applikationssystemen eingesetzt [137, 247-254]. Weitere Anwendungsgebiete umfassen die Petrochemie, die Mikroelektronik, den Einsatz als Lack- und Graffiti-entferner, die Herstellung von Insektiziden, Herbiziden und Fungiziden sowie die Textil- und Kosmetikindustrie [247, 248, 255, 256]. Aufgrund seines weit verbreiteten Einsatzes sind die pharmakologischen Eigenschaften von NMP umfangreich untersucht. Es wird sehr gut über die Haut sowie über Schleimhäute und den Gastrointestinaltrakt aufgenommen und unterliegt einem sehr geringen First-Pass-Effekt [247, 248, 257-259]. Die Halbwertszeit beträgt je nach Applikationsroute zwischen drei Stunden bei dermalen und 12 Stunden bei oraler Applikation [247, 248, 255, 260]. Der Abbau erfolgt über die Zwischenprodukte 5-Hydroxy-*N*-Methyl-2-Pyrrolidon (5-HNMP), *N*-Methylsuccinimid (MSI) und 2-Hydroxy-*N*-Methylsuccinimid (2-

HMSI) unter Beteiligung des Enzyms CYP2E1 [247, 261-263]. Die Elimination erfolgt hauptsächlich renal [257, 258, 261, 264]. Der für die Maus ermittelte LD<sub>50</sub>-Wert liegt bei 3,5 ml/kg KG bei intraperitonealer, 4,3 ml/kg KG bei oraler und 7,5 ml/kg KG bei topischer Anwendung [265]. In der Literatur beschriebene Nebenwirkungen im Tiermodell umfassen trockene Haut, hellen Urin, geringere Nahrungsaufnahme, reduzierte Gewichtszunahme, Thrombozytose, Reduktion des Gesamtcholesterins im Blut, pulmonale Inflammation, Veränderungen des Atemmusters, reduzierte Geräuschempfindlichkeit, Lethargie, Atrophie von lymphatischem Gewebe, Knochenmarkshypoplasie, Nephropathie und Hepatopathie [247, 248, 256, 266-274]. Für den Menschen sind lokale Überwärmung, Juckreiz und Schwellung bei topischer Applikation sowie Leukozytose und eine Erhöhung des Hämoglobingehaltes, der Alanin- und Aspartat-Aminotransferase beschrieben [247, 255], wobei auch Untersuchungen existieren, die keinerlei Beeinträchtigung des Menschen durch NMP nachweisen konnten [275, 276]. Des Weiteren ist NMP trotz Studien mit gegenteiliger Aussage [256, 271, 272, 277, 278] in hohen Dosen, welche die in der vorliegenden Studie verwendeten Dosen deutlich übersteigen, gering mutagen und reproduktionstoxisch [266, 267, 274, 279-284]. Dabei haben nicht seine Metaboliten, sondern NMP selbst den höchsten reproduktionstoxischen Effekt [285]. Aktuell beschreiben Ghayor et al., dass NMP über eine Unterdrückung der Aktivierung von NFκB und der Expression von iNOS und COX-2 anti-inflammatorische Aktivität entfalten kann [286]. Weiterhin aktiviert NMP das Bone Morphogenic Protein (BMP) und hat daher einen positiven Effekt auf die Knochenregeneration [287-289]. Außerdem hat NMP laut Shortt et al. einen immunmodulierenden und anti-myelomatösen Effekt [290].

#### **2.10.3.1 Effekt von NMP auf das Gehirn**

Dudeck et al. evaluierten 2006 den Einsatz verschiedener Substanzen als Lösungsmittel in Arzneimittelzubereitungen zur Embolisation zerebraler Aneurysmata und konnten zeigen, dass NMP sehr gering vasospasmogen wirkt und keinen schädigenden Einfluss auf die Gefäßwand hat [134, 137]. Trotz seiner weit verbreiteten Anwendung als Lösungsmittel und Bestandteil von Arzneimittelzubereitungen liegen für NMP darüber hinaus keine weiteren Daten zum Effekt auf das Gehirn vor.

### 2.10.4 Miglyol® 812

Miglyol® 812 ist ein Gemisch aus mehreren mittelkettigen gesättigten Fettsäuren. Es besteht zu 50-65% aus Octansäure, zu 30-45% aus Decansäure, zu maximal 5% aus Dodecansäure und zu maximal 3% aus Hexansäure (Strukturformeln siehe Abb. 18-21) [291]. Bei Zimmertemperatur ist Miglyol® 812 eine ölige, geruchlose Flüssigkeit von blass gelber Farbe [291].



Abb. 18: Strukturformel Hexansäure

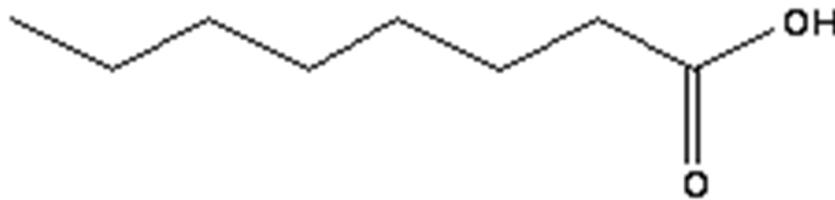


Abb. 19: Strukturformel Octansäure

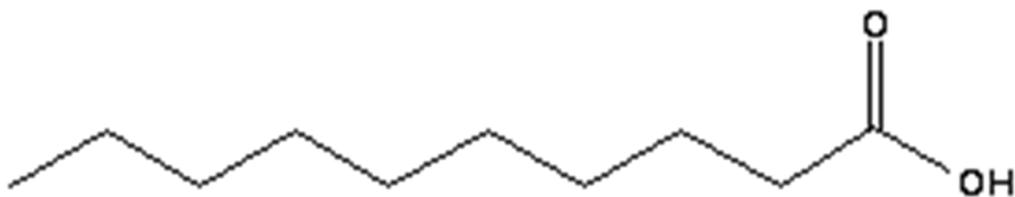


Abb. 20: Strukturformel Decansäure

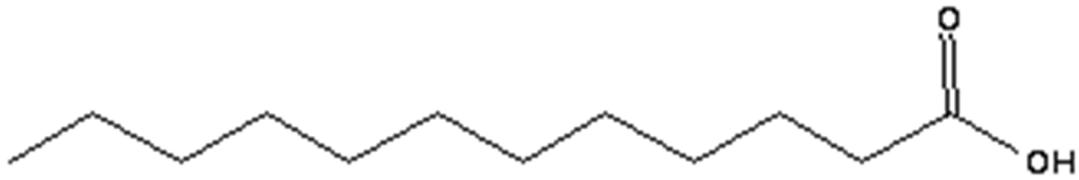


Abb. 21: Strukturformel Dodecansäure

Es wird weit verbreitet als Bestandteil von Mikroemulsionen zur Applikation von hydrophilen Substanzen verwendet [249, 292-298]. Außerdem kommt es auch als Lösungsmittel in Studien zur Evaluation neuroprotektiver Eigenschaften lipophiler Wirkstoffe zum Einsatz [136, 140]. Es wurde dabei stets eine 100%ige Lösung verwendet; daher kam auch in der vorliegenden Studie eine 100%ige Miglyol® 812-Lösung zum Einsatz. Weitere Einsatzgebiete von mittelkettigen Fettsäuren sind die Behandlung von Fettabsorptionsstörungen und die Nahrungsmittel- sowie die Kosmetikindustrie [291]. Obwohl Miglyol® 812 seit langer Zeit weitverbreiteten Einsatz findet, existieren bisher wenige Daten zu Nebenwirkungen und toxikologischen Eigenschaften. Zu den beschriebenen Nebenwirkungen im Tiermodell gehören weicher, farbveränderter Stuhl, eine verringerte Nahrungsaufnahme, ein transienter Tremor, eine Reduktion des harnstoffgebundenen Stickstoffs im Blut, des Gesamtproteins und des Gesamtglobulins im Blut, eine Erhöhung des Cholesterins sowie der Triglyzeride im Blut und eine interstitielle pulmonale Inflammation, wobei letztere wahrscheinlich auf Aspirationen im Rahmen des Applikationsweges per Magensonde zurückzuführen ist [295, 299]. Sehr hohe Dosen von über 25 ml/kg KG führten in der Maus zu Lethargie, motorischem Aktivitätsverlust, Ataxie, Dyspnoe und einer gesteigerten Diurese, wobei alle beschriebenen Nebenwirkungen nach Sistieren der Applikation voll reversibel waren [291, 299]. Ein LD<sub>50</sub>-Wert konnte im Mausmodell aufgrund der insgesamt sehr guten Verträglichkeit von Miglyol® 812 nicht ermittelt werden, jedoch wurden ab Dosen von 2160 mg/kg KG Bewusstseinsintrübung und Koma beobachtet [291]. Für den Menschen sind mittelkettige Fettsäuren insgesamt sehr gut verträglich. Beschriebene Nebenwirkungen bei hoher Dosierung umfassen abdominelle Krämpfe, Diarrhoe, eine Verringerung der Darmpassagezeit, eine

Erhöhung der Triglyzeride sowie eine Erniedrigung von LDL und HDL im Blut [300-302]. Der Abbau von mittelkettigen Fettsäuren erfolgt bei oraler Aufnahme durch Lipasen in Mund und Darm mit anschließendem Transport in die Leber. Bei dermalen Applikation erfolgt der Transport direkt über das Blut zur Leber, wo die weitere Metabolisierung stattfindet [291].

#### **2.10.4.1 Effekt von Miglyol® 812 auf das Gehirn**

Trotz seiner Anwendung in verschiedensten Arzneimittelzubereitungen und als Lösungsmittel in Studien zur (Patho-)Physiologie nach Hirnschädigung liegen bisher keinerlei Daten zum Effekt von Miglyol® 812 auf das Gehirn vor.

## **2.11 Experimentelle Gruppen**

In der vorliegenden Studie wurde der Effekt der organischen Lösungsmittel DMSO (1%ige Lösung), PEG-40 (100%ige Lösung), NMP (1%ige Lösung) und Miglyol® 812 (100%ige Lösung) auf das Nekrosevolumen 24 Stunden nach Traumainduktion untersucht. Als Kontrollsubstanz diente phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline, PBS). Die Versuchsgruppen bestanden aus jeweils sechs Versuchstieren. Den Versuchstieren wurden zehn Minuten vor Traumainduktion jeweils 100 Mikroliter der entsprechenden Testsubstanz kontralateral zur Narkose intraperitoneal injiziert. Die Hirnentnahme erfolgte 24 Stunden nach Traumainduktion.

## **2.12 Statistische Auswertung**

Die Gruppengröße der jeweiligen Versuchsreihen wurde unter der Annahme, dass die Hauptzielgrößen ähnliche statistische Verteilungen haben, berechnet. Diese Annahme hat sich in zahlreichen vorhergehenden Studien der Arbeitsgruppe bestätigt. Um eine Veränderung von mindestens 30% zu detektieren, ergibt sich bei einer Standardabweichung von 15-20% vom Mittelwert, einer Power von 0,8 und einem Fehler erster Art von 0,05 eine Gruppengröße von sechs bis zehn Tieren. Der Fehler erster Art ist 0,05, der Fehler zweiter Art 0,2. Die statistische Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte computergestützt mit Hilfe einer Statistiksoftware (Sigma

Stat 3.0, Jandel Scientific, Erkrath, Deutschland). Die Messwerte sind, soweit nicht anders vermerkt, als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben. Für den Vergleich zweier Versuchsgruppen wurde der Wilcoxon-Rank-Sum-Test (Whitney-Mann-Test), für den Vergleich mehrerer Versuchsgruppen der ANOVA-on-Ranks Test verwendet. Statistische Signifikanz wurde bei  $p \leq 0,05$  angenommen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Einfluss verschiedener Lösungsmittel auf den sekundären Hirnschaden

Die Mäuse der einzelnen Versuchsgruppen unterschieden sich nicht bezüglich ihres präoperativen Gewichtes ( $22,0 \pm 0,57$  g für Kontrolle,  $21,3 \pm 0,42$  g für DMSO 1%,  $22,0 \pm 0,45$  g für NMP 1%,  $22,4 \pm 0,52$  g für PEG 40,  $21,3 \pm 0,25$  g für Miglyol).

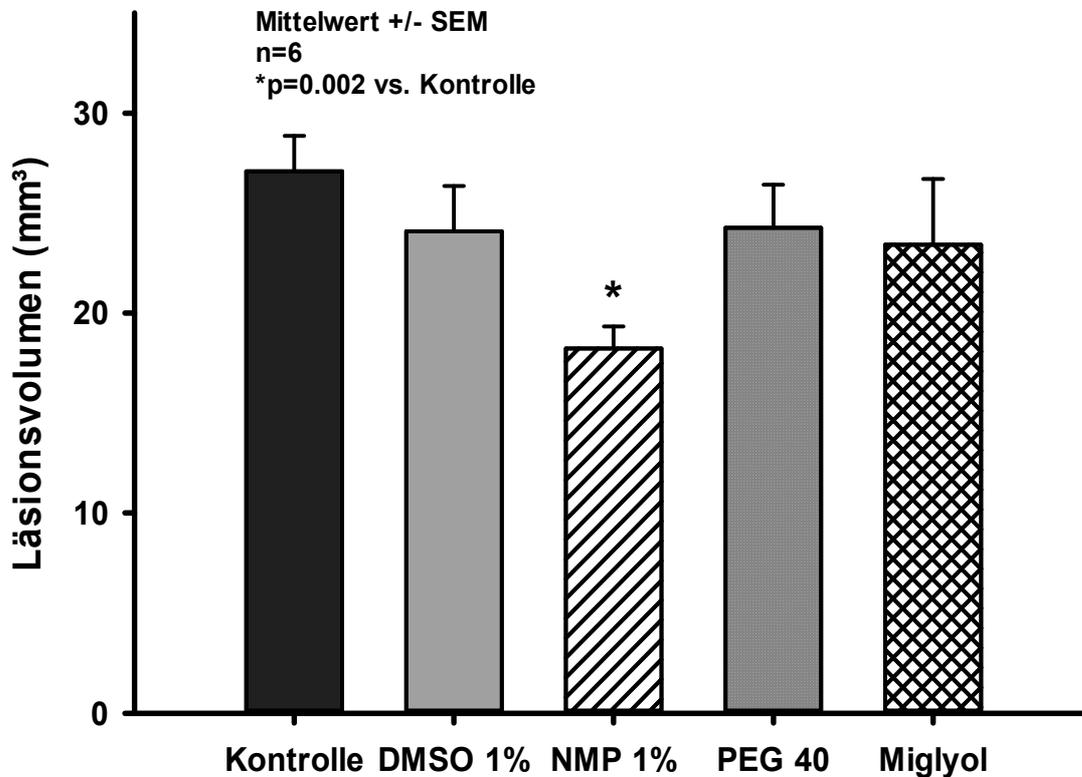


Abb. 22: Läsionsvolumen 24 Stunden nach Traumainduktion und i.p. Applikation verschiedener Lösungsmittel oder PBS (Kontrolle) zehn Minuten vor CCI

Das Nekrosevolumen 24 Stunden nach Traumainduktion betrug in der Kontrollgruppe  $27,1 \pm 1,8 \text{ mm}^3$ . Die Nekrosevolumina der DMSO- ( $24,1 \pm 2,3 \text{ mm}^3$ ), PEG- ( $24,3 \pm 2,1 \text{ mm}^3$ ) und Miglyol-Versuchsgruppe ( $23,4 \pm 3,3 \text{ mm}^3$ ) unterschieden sich nicht von dem der Kontrollgruppe. Die präoperative Gabe von NMP hingegen reduzierte das Nekrosevolumen statistisch signifikant um  $8,9 \text{ mm}^3$  auf  $18,2 \pm 1,1 \text{ mm}^3$  ( $p=0,002$ ), was einer Reduktion um etwa ein Drittel entsprach.

## **3.2 Einfluss von NMP bei Gabe vor Traumainduktion**

### **3.2.1 Einfluss verschiedener NMP-Konzentrationen auf den sekundären Hirnschaden nach Trauma**

Nachdem sich in der ersten Versuchsreihe ein signifikanter Unterschied zwischen der NMP-Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe gezeigt hatte, war das Ziel der weiteren Versuchsreihen, die Effekte dieser Substanz auf den sekundären Hirnschaden genauer zu untersuchen. Zunächst wurde der Effekt verschiedener NMP-Konzentrationen (0,5%, 1%, 3%, jeweils  $n=8$ ) auf das Nekrosevolumen, die neurologische Funktion und die Gewichtsabnahme 24 Stunden nach Traumainduktion untersucht. Die intraperitoneale Injektion von jeweils 100 Mikroliter der entsprechenden NMP-Lösung erfolgte zehn Minuten vor Traumainduktion. Die Hirnentnahme sowie die Bestimmung des NSS und des postoperativen Körpergewichtes erfolgten 24 Stunden nach Traumainduktion. Die Kontrollgruppe ( $n=8$ ) erhielt 100 Mikroliter PBS. Um den primären Hirnschaden quantifizieren zu können, wurden weitere acht Tiere behandelt und operiert, deren Hirne 15 Minuten nach Traumainduktion entnommen wurden.

#### **3.2.1.1 Nekrosevolumen**

Das Nekrosevolumen 15 Minuten nach Traumainduktion, also der primäre Hirnschaden, betrug  $8,7 \pm 0,7 \text{ mm}^3$  und wuchs 24 Stunden nach Traumainduktion statistisch signifikant auf  $24,4 \pm 1,6 \text{ mm}^3$  an ( $p < 0,001$ ). Somit errechnet sich ein sekundäres Nekrosewachstum von  $15,7 \text{ mm}^3$ , was einem Anteil von etwa 65% des Gesamtnekrosevolumens entspricht. In der 0,5%-NMP-Versuchsgruppe betrug das Nekrosevolumen 24 Stunden nach Traumainduktion mit  $18,0 \pm 1,6 \text{ mm}^3$  etwa 26% und

damit statistisch signifikant weniger als jenes der Kontrollgruppe ( $p = 0,01$ ). In Bezug auf das sekundäre Nekrosewachstum betrug die Reduktion 41%. In der 1%-NMP-Versuchsgruppe zeigte sich das Nekrosevolumen 24 Stunden nach Traumainduktion mit  $20,0 \pm 1,7 \text{ mm}^3$  ebenfalls geringer als in der Kontrollgruppe, jedoch erreichte diese Reduktion um etwa 18% knapp keine statistische Signifikanz. Das Nekrosevolumen in der 3%-NMP-Versuchsgruppe betrug  $25,4 \pm 3,3 \text{ mm}^3$  und war somit mit jenem der Kontrollgruppe vergleichbar.

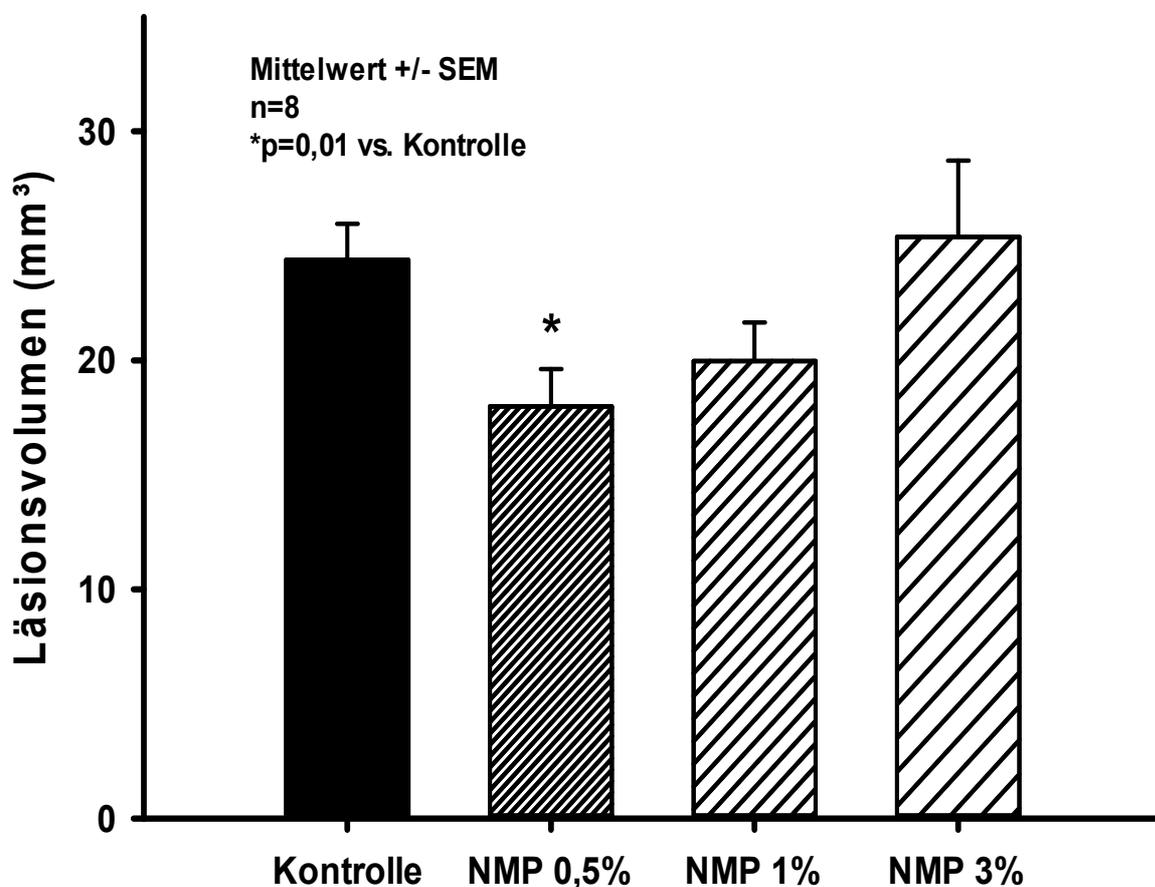


Abb. 23: Läsionsvolumen 15 Minuten bzw. 24 Stunden nach Traumainduktion und Applikation verschiedener NMP-Konzentrationen zehn Minuten vor CCI

### 3.2.1.2 Hirnwassergehalt

Abbildung 24 ist zu entnehmen, dass der Hirnwassergehalt der vom Trauma betroffenen rechten Großhirnhemisphäre 24 Stunden nach Traumainduktion und NMP-Applikation 10 Minuten vor CCI in allen Versuchsgruppen signifikant höher war als jener der nicht traumatisierten linken Großhirnhemisphäre (ipsilateral  $81,1 \pm 0,2\%$ , kontralateral  $78,6 \pm 0,2\%$  in der Kontrollgruppe; ipsilateral  $80,6 \pm 0,2\%$ , kontralateral  $78,9 \pm 0,1\%$  in der 0,5%-NMP-Versuchsgruppe; ipsilateral  $81,1 \pm 0,1\%$ , kontralateral  $78,9 \pm 0,1\%$  in der 1%-NMP-Versuchsgruppe; jeweils  $p < 0,001$ ).

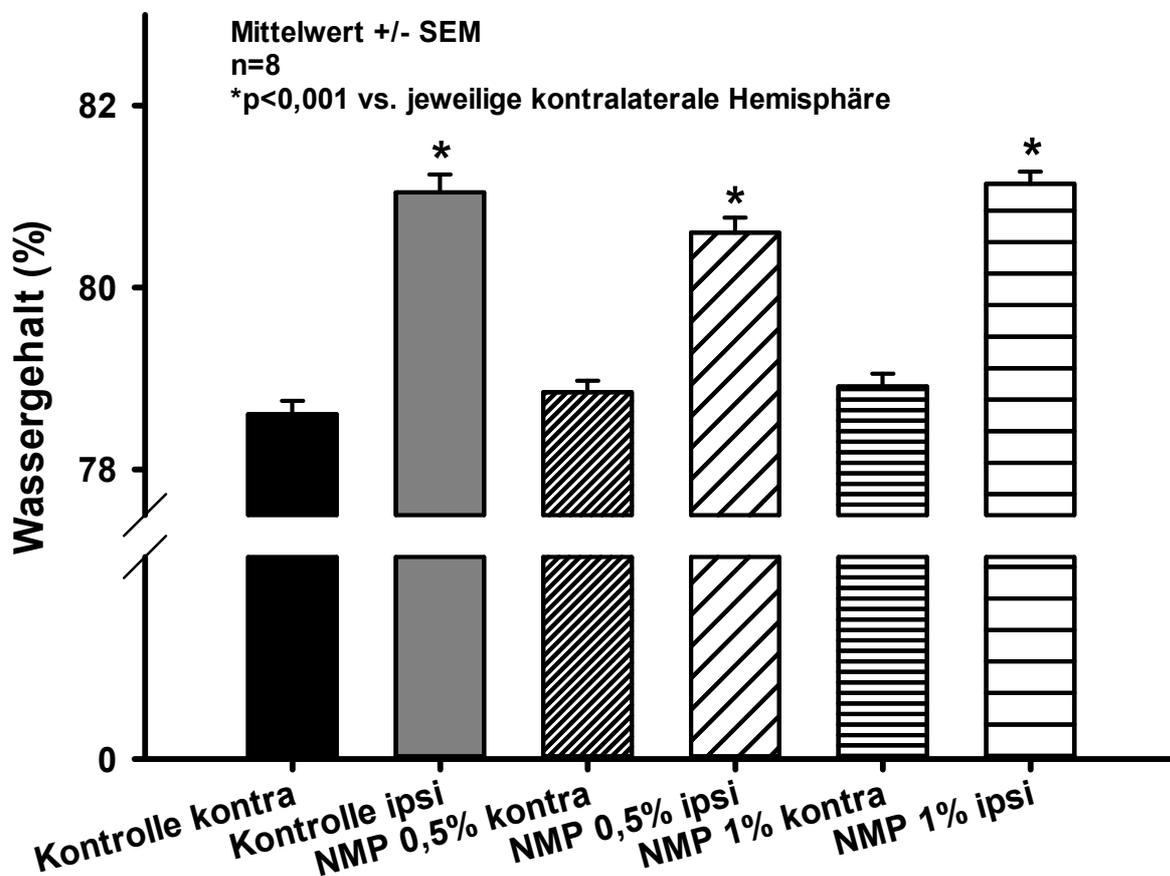


Abb. 24: Hirnwassergehalt der Großhirnhemisphären 24 Stunden nach Traumainduktion und Applikation verschiedener NMP-Konzentrationen zehn Minuten vor CCI

Die Gabe von 1%igem NMP reduzierte den Hirnwassergehalt der ipsilateralen Hemisphäre im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht, wohingegen die Applikation von 0,5%igem NMP den Hirnwassergehalt der ipsilateralen, traumatisierten Hemisphäre

im Vergleich zu Kontrollgruppe absolut um 0,4% verringerte. Diese Reduktion erreichte jedoch keine statistische Signifikanz.

Weiterhin wurde auch der Anstieg des Hirnwassergehaltes der ipsilateralen gegenüber der kontralateralen Großhirnhemisphäre derselben Versuchsgruppe betrachtet.

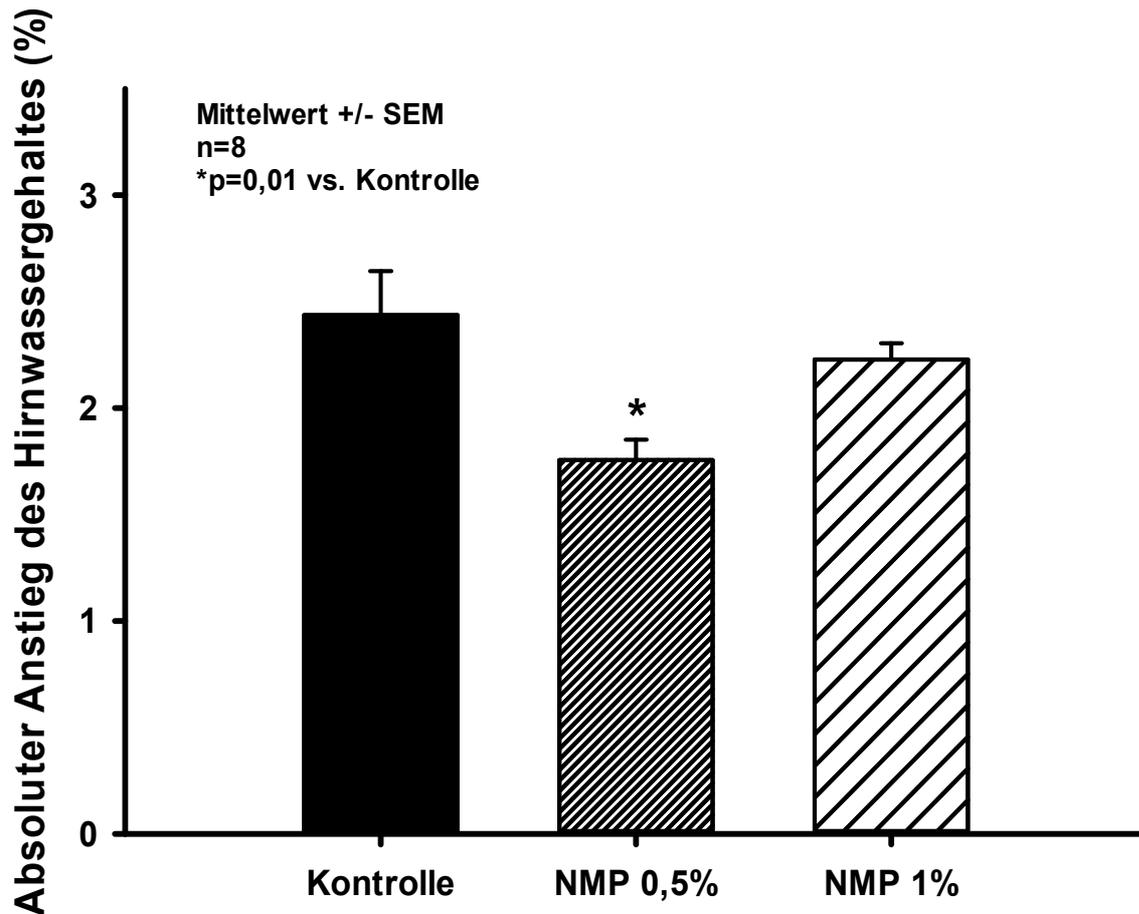


Abb. 25: Anstieg des Hirnwassergehaltes der ipsilateralen Hemisphäre gegenüber der kontralateralen Hemisphäre 24 Stunden nach Traumainduktion und Applikation verschiedener NMP-Konzentrationen zehn Minuten vor CCI

Der Anstieg des Hirnwassergehaltes der ipsilateralen gegenüber der kontralateralen Hemisphäre betrug in der Kontrollgruppe  $2,4 \pm 0,2\%$ , in der 0,5%-NMP-Versuchsgruppe  $1,8 \pm 0,1\%$  und in der 1%-NMP-Kontrollgruppe  $2,2 \pm 0,1\%$ . Somit reduzierte die Applikation von 0,5%igem NMP den Anstieg des Hirnwassergehaltes

statistisch signifikant ( $p = 0,01$ ), während die Gabe von 1%igem NMP den Anstieg des Hirnwassergehaltes zwar ebenfalls verringerte, dieser Effekt aber keine statistische Signifikanz erreichte.

### **3.2.1.3 Neurological Severity Score**

Sowohl in der Nekrose- als auch in der Ödem-Versuchsreihe wurde 24 Stunden nach CCI die neurologische Funktion der Versuchstiere mit der NSS Testbatterie bestimmt. Abbildung 26 stellt die Ergebnisse der Nekrose-Versuchsreihe, Abbildung 27 die der Ödem-Versuchsreihe dar.

In der Nekrose-Versuchsreihe unterschieden sich die Mäuse der verschiedenen Versuchsgruppen vor Beginn der Experimente nicht bezüglich ihres NSS (0 Punkte für alle Gruppen mit Ausnahme der 1%-NMP-Versuchsgruppe, hier  $0,1 \pm 0,1$  Punkte). 24 Stunden nach Traumainduktion hatten sich die Versuchstiere aller Versuchsgruppen signifikant gegenüber ihrem präoperativen Ergebnis verschlechtert: In der Kontrollgruppe um  $4,6 \pm 1,0$  Punkte, in der 0,5%-NMP-Versuchsgruppe um  $4,4 \pm 0,6$  Punkte, in der 1%-NMP-Versuchsgruppe um  $3,4 \pm 0,4$  Punkte und in der 3%-NMP-Versuchsgruppe um  $4,1 \pm 0,6$  Punkte (jeweils  $p < 0,001$ ). Die Mäuse der 1%-NMP-Versuchsgruppe verschlechterten sich demnach deutlich, jedoch knapp nicht statistisch signifikant weniger als die Versuchstiere der Kontrollgruppe, während sich die Ergebnisse der 0,5%-NMP-Versuchsgruppe und der 3 %-NMP-Versuchsgruppe nicht von dem der Kontrollgruppe unterschieden.

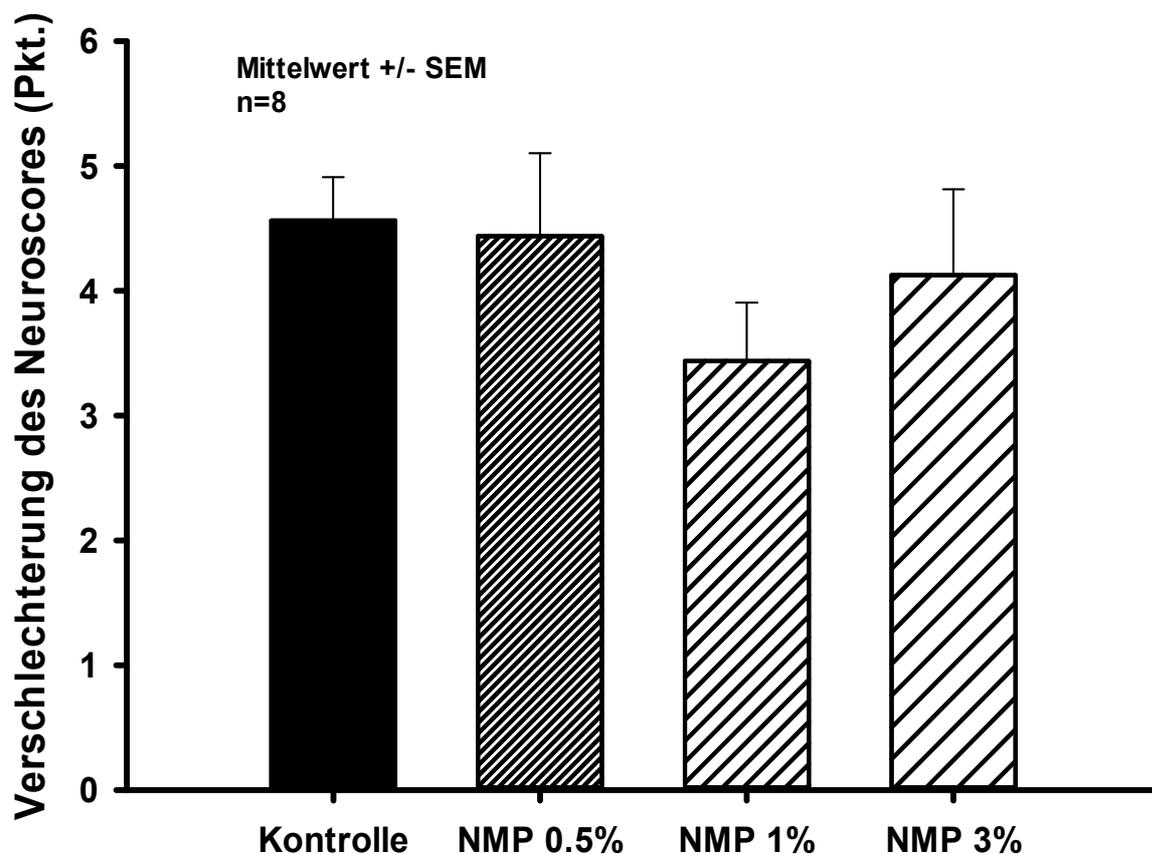


Abb. 26: Veränderung des Neuroscores 24 Stunden nach Traumainduktion gegenüber dem präoperativen Ergebnis nach Applikation verschiedener NMP-Konzentrationen zehn Minuten vor CCI in der Nekrose-Versuchsgruppe

Auch in der Ödem-Versuchsreihe unterschieden sich die Versuchstiere präoperativ nicht bezüglich ihres NSS (0 Punkte in der Kontrollgruppe,  $0,1 \pm 0,1$  Punkte in der 0,5%-NMP-Versuchsgruppe,  $0,3 \pm 0,2$  Punkte in der 1%-NMP-Versuchsgruppe) und verschlechterten sich in allen Versuchsgruppen 24 Stunden nach Traumainduktion statistisch signifikant gegenüber ihrem präoperativen Ergebnis ( $4,1 \pm 0,5$  Punkte in der Kontrollgruppe,  $2,9 \pm 0,4$  Punkte in der 0,5%-NMP-Versuchsgruppe,  $3,6 \pm 0,6$  Punkte in der 1%-NMP-Versuchsgruppe, jeweils  $p < 0,001$ ). Im Gegensatz zur Nekrose-Versuchsreihe erzielten in der Ödem-Versuchsreihe somit die Versuchstiere der 0,5%-NMP-Versuchsgruppe ein deutlich besseres Ergebnis als die Tiere der Kontrollgruppe, wobei auch dieser Unterschied knapp nicht statistisch signifikant war. Das Ergebnis in

der 1%-NMP-Kontrollgruppe unterschied sich nicht signifikant von dem der Kontrollgruppe.

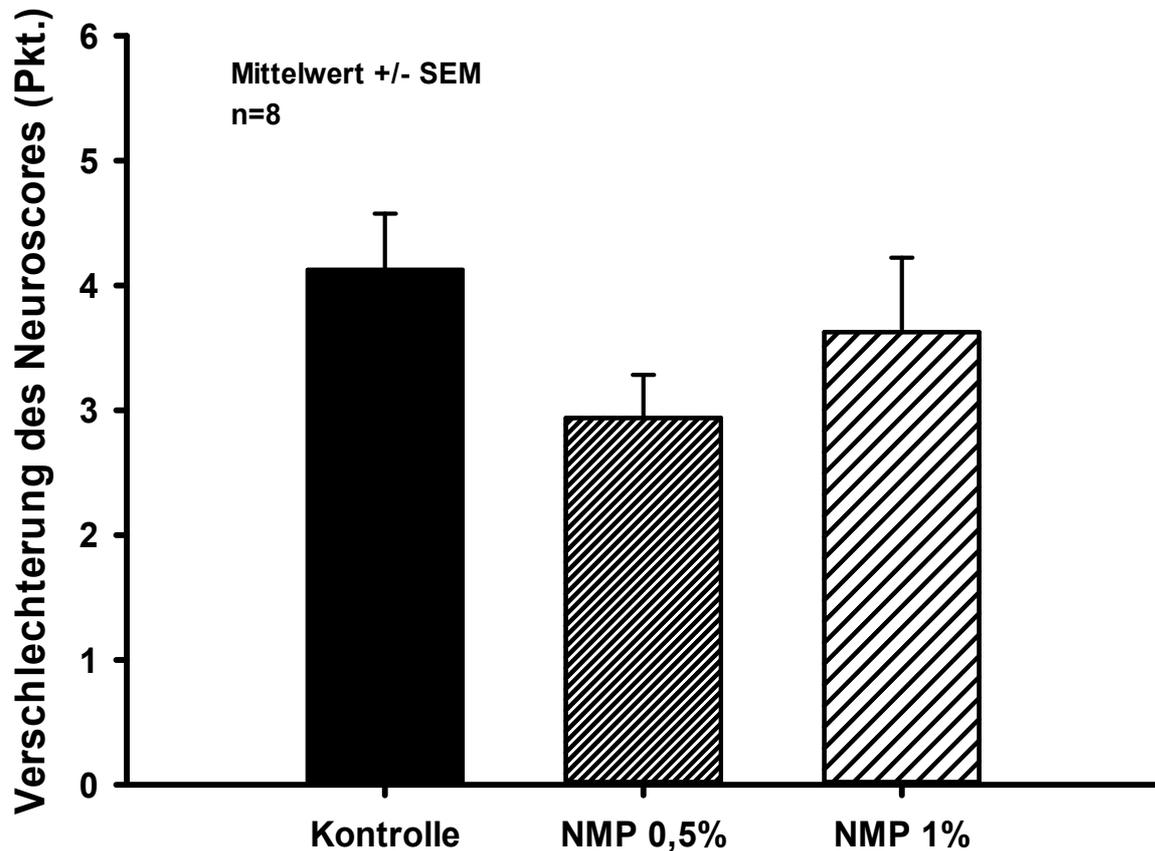


Abb. 27: Veränderung des Neuroscores 24 Stunden nach Traumainduktion gegenüber dem präoperativen Ergebnis nach Applikation verschiedener NMP-Konzentrationen zehn Minuten vor CCI in der Ödem-Versuchsgruppe

#### 3.2.1.4 Körpergewicht

Neben dem NSS wurde sowohl in der Nekrose- als auch in der Ödem-Versuchsreihe das Körpergewicht der Versuchstiere präoperativ sowie 24 Stunden nach Traumainduktion bestimmt.

In der Nekrose-Versuchsreihe unterschieden sich die Mäuse der verschiedenen Versuchsgruppen vor Beginn der Experimente nicht statistisch signifikant bezüglich

ihres Gewichtes ( $23,5 \pm 0,9$  g für die Kontrollgruppe,  $23,4 \pm 0,6$  g für die 0,5%-NMP-Versuchsgruppe,  $21,9 \pm 0,8$  g für die 1%-NMP-Versuchsgruppe,  $24,0 \pm 0,4$  g für die 3%-NMP-Versuchsgruppe). Während die Versuchstiere nach Applikation von 1%igem NMP zehn Minuten vor CCI gegenüber der Kontrollgruppe innerhalb von 24 Stunden statistisch signifikant weniger Körpergewicht verloren ( $5,1 \pm 0,8$  % vs.  $7,4 \pm 0,6$  %,  $p = 0,04$ ), zeigte die Gabe von 0,5%igem ( $6,8 \pm 1,2\%$ ) und 3%igem NMP ( $6,4 \pm 1,2\%$ ) keinen statistisch signifikanten Effekt auf den postoperativen Gewichtsverlust.

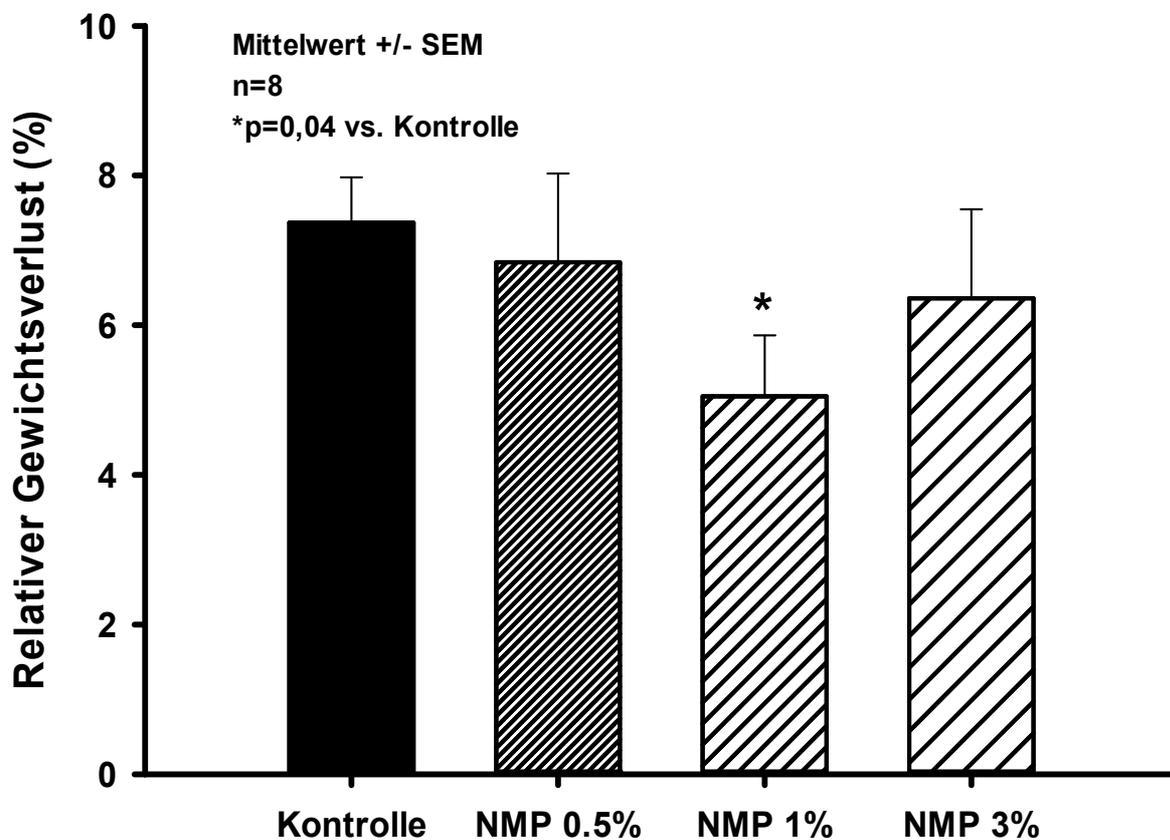


Abb. 28: Relativer Gewichtsverlust 24 Stunden nach Traumainduktion gegenüber dem präoperativen Körpergewicht nach Applikation verschiedener NMP-Konzentrationen zehn Minuten vor CCI in der Nekrose-Versuchsgruppe

In der Ödem-Versuchsreihe unterschieden sich die Mäuse der verschiedenen Versuchsgruppen vor Beginn der Experimente ebenfalls nicht statistisch signifikant

bezüglich ihres Körpergewichtes ( $24,8 \pm 0,6\text{g}$  für die Kontrollgruppe,  $24,5 \pm 0,5\text{g}$  für die 0,5%-NMP-Versuchsgruppe,  $25,3 \pm 0,5\text{g}$  für die 1%-NMP-Versuchsgruppe). Die Versuchstiere der 0,5%-NMP-Versuchsgruppe ( $7,1 \pm 1,1\%$ ) verloren geringfügig, jedoch nicht statistisch signifikant weniger Gewicht im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $8,9 \pm 0,9\%$ ), während die Applikation von 1%igem NMP keinen Einfluss auf den postoperativen Gewichtsverlust hatte ( $8,9 \pm 0,8\%$ ).

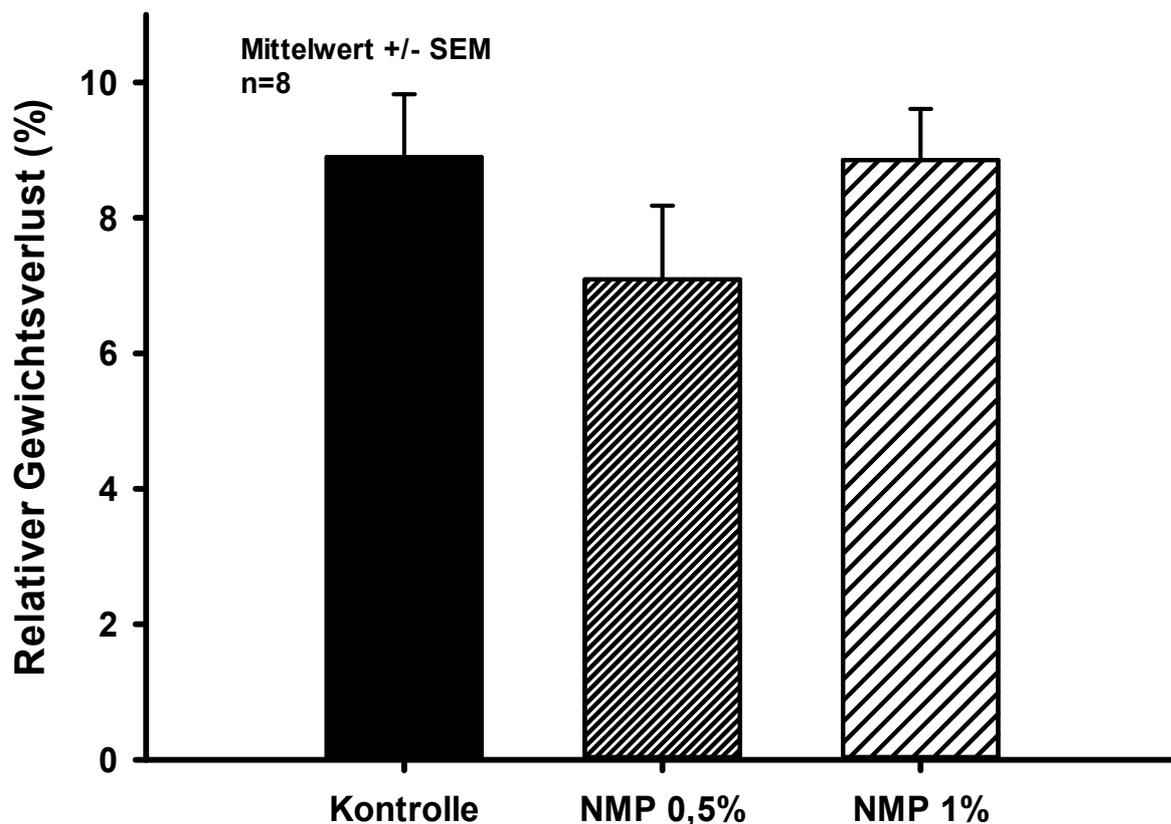


Abb. 29: Relativer Gewichtsverlust 24 Stunden nach Trauma-induktion gegenüber dem präoperativen Körpergewicht nach Applikation verschiedener NMP-Konzentrationen zehn Minuten vor CCI in der Ödem-Versuchsgruppe

### 3.2.2 Wirkung von NMP auf das Infarkt-volumen nach experimentellem ischämischen Schlaganfall

Wie in der Einleitung geschildert, spielt die zerebrale Ischämie eine wichtige Rolle bei der Entstehung des sekundären posttraumatischen Hirnschadens. Zur genaueren

Untersuchung des Effektes von NMP auf eine transiente zerebrale Ischämie wurden in einer separaten Versuchsreihe untersucht, inwieweit NMP das Infarktvolumen in ein einem Modell der transienten zerebralen Ischämie, dem MCA-Okklusions--Modell, beeinflusst. Dabei wurde 0,5%iges NMP zehn Minuten vor Induktion der Ischämie intraperitoneal injiziert, eine Filament-Okklusion für 60 Minuten induziert und der Effekt auf das Infarktvolumen 24 Stunden nach Ischämieinduktion (23 Stunden nach Reperfusion) untersucht.

### 3.2.2.1 Infarktvolumen

In der 0,5%-NMP-Versuchsgruppe starb ein Tier intraoperativ, sodass diese Gruppe nur neun Versuchstiere umfasste. Das Infarktvolumen betrug in der NMP-Versuchsgruppe 24 Stunden nach Ischämieinduktion  $127,68 \pm 10,73 \text{ mm}^3$  und damit statistisch signifikant mehr als das der Kontrollgruppe ( $98,66 \pm 7,70 \text{ mm}^3$  in der Kontrollgruppe,  $p=0,04$ ).

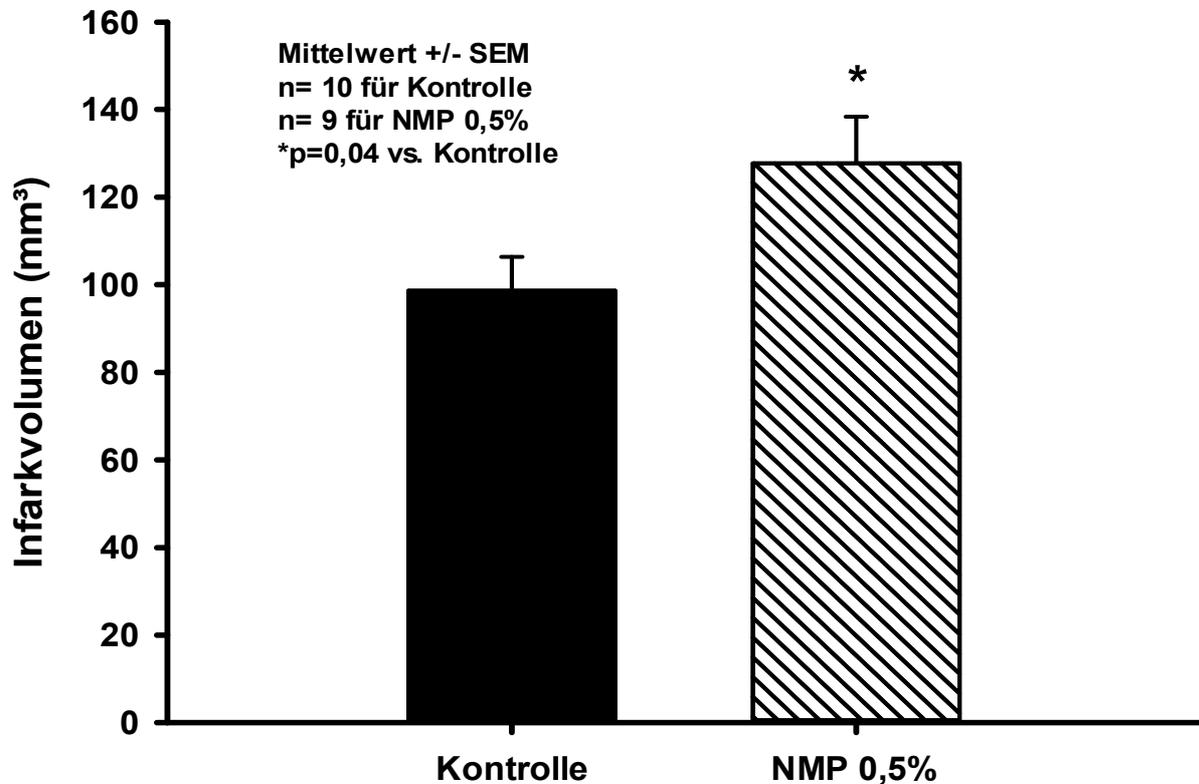


Abb. 30: Infarktvolumen 24 Stunden nach 60-minütiger Okklusion der A. cerebri media nach Applikation von 0,5%-igem NMP zehn Minuten vor Ischämieinduktion

## **3.3 Einfluss von NMP bei Gabe nach Traumainduktion**

### **3.3.1 Verschiedene Applikationszeitpunkte von NMP 1%**

Nachdem sich in der vorhergehenden Versuchsreihe gezeigt hatte, dass NMP bei Applikation vor Traumainduktion einen neuroprotektiven Effekt entfaltet, war es ein weiteres Ziel der vorliegenden Studie, zu untersuchen, ob NMP auch bei Applikation nach CCI den Hirnschaden verkleinern kann. Dazu wurde eine 1%ige NMP Lösung 15 Minuten sowie eine und drei Stunden nach CCI appliziert. NMP wurde in einer Konzentration von 1% gegeben, da diese Konzentration sowohl das sekundäre Nekrosewachstum und den postoperativen Gewichtsverlust reduzieren als auch tendenziell das Ergebnis der neurologischen Funktionstestung verbessern konnte und in Zusammenschau der erhobenen Daten das größte neuroprotektive Potential zu besitzen schien. In der 1-Stunden- und der 3-Stunden-NMP-Versuchsgruppe starb jeweils ein Versuchstier während der Operation, sodass in diesen Versuchsgruppen nur jeweils sieben Versuchstiere für die Auswertung berücksichtigt werden konnten.

#### **3.3.1.1 Nekrosevolumen**

Für alle getesteten Applikationszeitpunkte (15 Minuten, 1h, 3h nach CCI) zeigte die NMP-Gabe keine signifikante Reduktion des 24 Stunden nach Traumainduktion bestimmte Nekrosevolumens gegenüber der jeweiligen Kontrollgruppe (18,45 ± 2,88 mm<sup>3</sup> in der 15-Minuten-Kontrolle, 18,92 ± 1,90 mm<sup>3</sup> in der 15-Minuten-NMP-Versuchsgruppe; 23,74 ± 3,01 mm<sup>3</sup> in der 1-Stunden-Kontrolle, 21,85 ± 1,45 mm<sup>3</sup> in der 1-Stunden-NMP-Versuchsgruppe; 21,80 ± 2,28 mm<sup>3</sup> in der 3-Stunden-Kontrolle, 21,92 ± 2,99 mm<sup>3</sup> in der 3-Stunden-NMP-Versuchsgruppe).

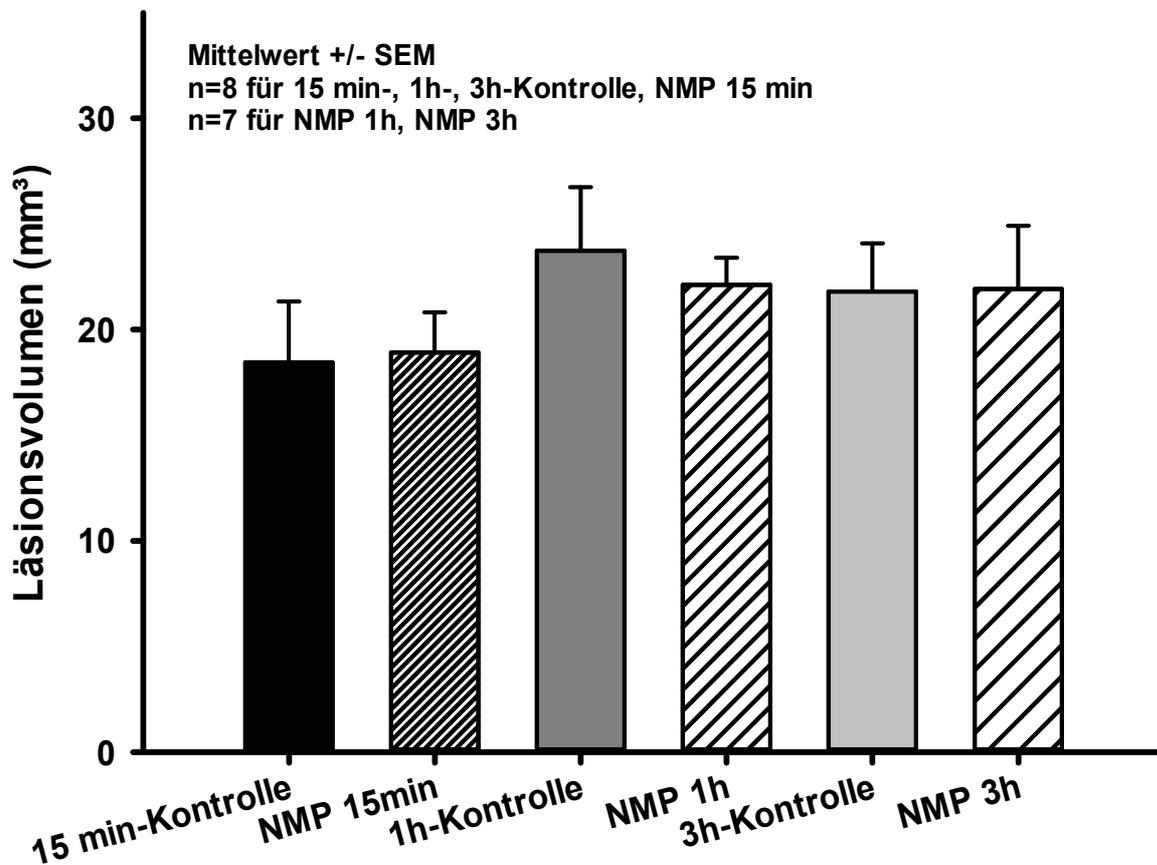


Abb. 31: Nekrosevolumen 24 Stunden nach Traumainduktion nach Applikation von 1%igem NMP zu verschiedenen Zeitpunkten nach CCI

### 3.3.1.2 Neurological Severity Score

Die Versuchsgruppen unterschieden sich vor Beginn der Experimente nicht statistisch signifikant bezüglich des NSS (0 Punkte in allen Versuchsgruppen außer der 3-Stunden-NMP-Versuchsgruppe, hier  $0,1 \pm 0,1$  Punkte). In allen Versuchsgruppen verschlechterten sich die Versuchstiere 24 Stunden nach CCI statistisch signifikant im Vergleich zu ihrem präoperativen Ergebnis (jeweils  $p < 0,001$  gegenüber Baseline-Wert). Die Versuchstiere der 15-Minuten-NMP-Gruppe hatten sich 24 Stunden nach Traumainduktion um  $3,1 \pm 0,5$  Punkte und damit etwas weniger als die Tiere der zugehörigen Kontrollgruppe ( $3,6 \pm 0,4$  Punkte) gegenüber ihrem präoperativen Ergebnis verschlechtert. Dies entsprach jedoch keiner statistisch signifikanten Verbesserung. Die Ergebnisse der Versuchstiere der weiteren Versuchsgruppen

unterschieden sich nicht von denen der jeweiligen Kontrollgruppen ( $3,4 \pm 0,7$  Punkte in der 1-Stunden-NMP-Versuchsgruppe,  $3,7 \pm 0,5$  Punkte in der 1-Stunden-Kontrollgruppe;  $4,1 \pm 0,6$  Punkte in der 3-Stunden-Kontrollgruppe,  $3,9 \pm 0,6$  Punkte in der 3-Stunden-NMP-Versuchsgruppe).

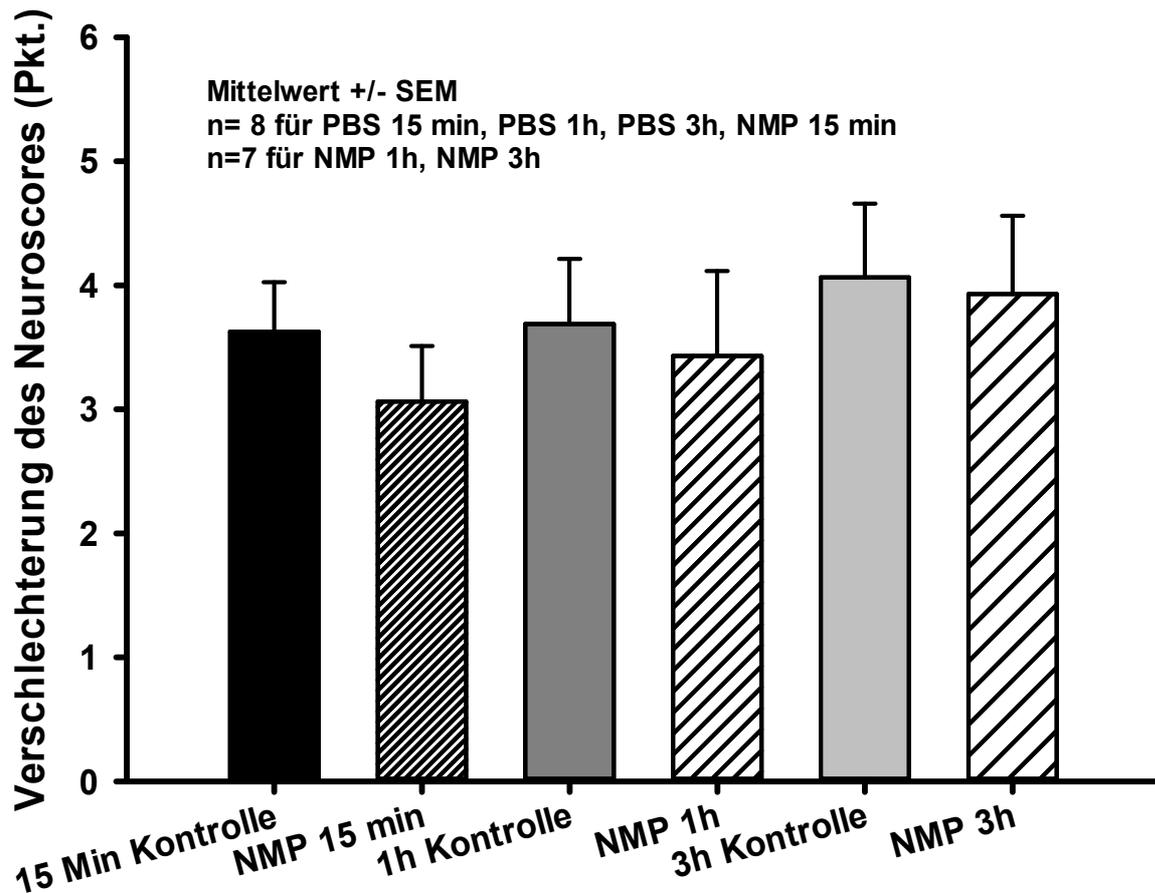


Abb. 32: Veränderung des Neuroscores 24 Stunden nach Traumainduktion gegenüber dem präoperativen Ergebnis nach Applikation von 1%igem NMP zu verschiedenen Zeitpunkten nach CCI

### 3.3.1.3 Körpergewicht

Das Körpergewicht der Versuchstiere der verschiedenen Versuchsgruppen unterschied sich vor Beginn der Experimente nicht statistisch signifikant von jenem der Tiere der jeweiligen Kontrollgruppen ( $21,6 \pm 0,5g$  für die 15-Minuten-Kontrollgruppe,

22,7 ± 0,5 g für die 15-Minuten-NMP-Kontrollgruppe; 22,5 ± 0,6 g für die 1-Stunden-Kontrollgruppe, 22,8 ± 0,4 g für die 1-Stunden-NMP-Versuchsgruppe; 23,9 ± 0,4 g für die 3-Stunden-Kontrollgruppe, 24,1 ± 0,4 g für die 3-Stunden-NMP-Versuchsgruppe).

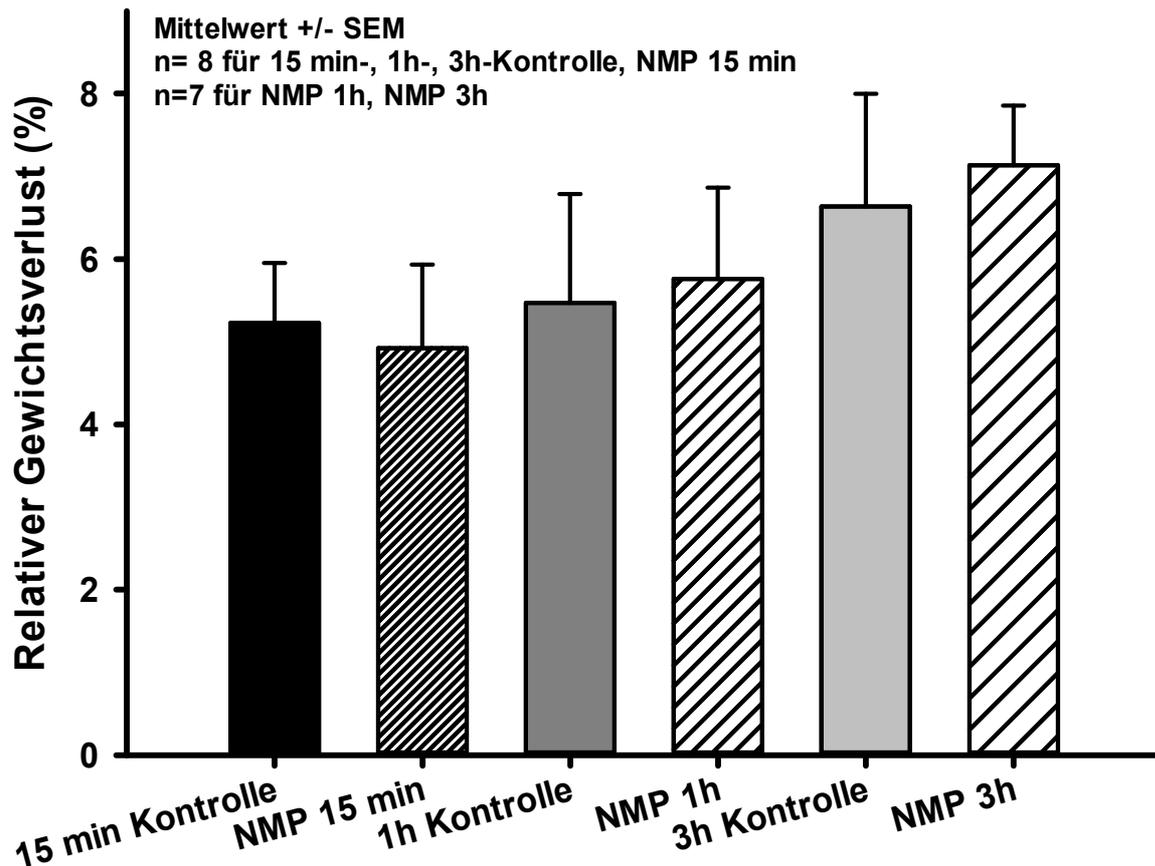


Abb. 33: Relativer Gewichtsverlust 24 Stunden nach Traumainduktion gegenüber dem präoperativen Körpergewicht nach Applikation von 1%igem NMP zu verschiedenen Zeitpunkten nach CCI

Für keinen Applikationszeitpunkt konnte eine statistisch signifikante Reduktion des Gewichtsverlustes gegenüber der jeweiligen Kontrollgruppe durch Gabe von NMP beobachtet werden (5,2 ± 0,7% in der 15-Minuten-Kontrollgruppe, 4,9 ± 1,0% in der 15-Minuten-NMP-Versuchsgruppe; 5,5 ± 1,3% in der 1-Stunden-Kontrollgruppe, 5,8 ±

1,1% in der 1-Stunden-NMP-Versuchsgruppe;  $6,6 \pm 1,4\%$  in der 3-Stunden-Kontrollgruppe,  $7,1 \pm 0,7\%$  in der 3-Stunden-NMP-Versuchsgruppe).

### **3.3.2 Applikation verschiedener NMP-Konzentrationen eine Stunde nach CCI**

Nachdem die Applikation von 1%igem NMP zu verschiedenen Zeitpunkten nach Traumainduktion keinen Effekt auf die untersuchten Parameter hatte, wurden weitere NMP-Konzentrationen untersucht. Die Applikation von 0,5%igem NMP hatte bereits bei Applikation zeitlich vor CCI einen neuroprotektiven Effekt gezeigt und geringere Konzentrationen hatten tendenziell einen größeren Einfluss auf die untersuchten Parameter als höhere, sodass zusätzlich die Applikation von 0,25%igem NMP getestet wurde.

#### **3.3.2.1 Nekrosevolumen**

Zur Quantifizierung des Primärschadens wurde in einer Versuchsgruppe das Nekrosevolumen bereits 15 Minuten nach CCI bestimmt. Es betrug  $23,36 \pm 2,71 \text{ mm}^3$  und war statistisch signifikant geringer als 24 Stunden nach CCI ( $40,20 \pm 3,90 \text{ mm}^3$  in der 24-Stunden-Kontrollgruppe,  $p = 0,01$ ). Der Sekundärschaden betrug mit  $16,84 \text{ mm}^3$  etwa 42% des Gesamtnekrosevolumens. Die Applikation von 0,5%igem NMP reduzierte das Gesamtnekrosevolumen gegenüber der Kontrollgruppe um etwa 23% auf  $32,10 \pm 2,40 \text{ mm}^3$ , was jedoch keiner statistisch signifikanten Reduktion entsprach. Bezogen auf den Sekundärschaden, also den Schaden, den man therapeutisch beeinflussen kann, betrug die Reduktion jedoch knapp 50%. Weder die Applikation von 0,25%igem NMP noch von 1%igem NMP führte zu einer Verringerung des Nekrosevolumens gegenüber der Kontrollgruppe ( $41,64 \pm 3,53 \text{ mm}^3$  in der 0,25%-NMP-Versuchsgruppe;  $42,99 \text{ mm}^3 \pm 1,93 \text{ mm}^3$  in der 1%-NMP-Versuchsgruppe). Das Nekrosevolumen der NMP-Versuchsgruppen war jeweils statistisch signifikant höher als das der 15-Minuten-Versuchsgruppe ( $p = 0,003$  in der 0,25%-NMP-Versuchsgruppe,  $p = 0,044$  in der 0,5%-NMP-Versuchsgruppe,  $p < 0,001$  in der 1%-NMP-Versuchsgruppe).

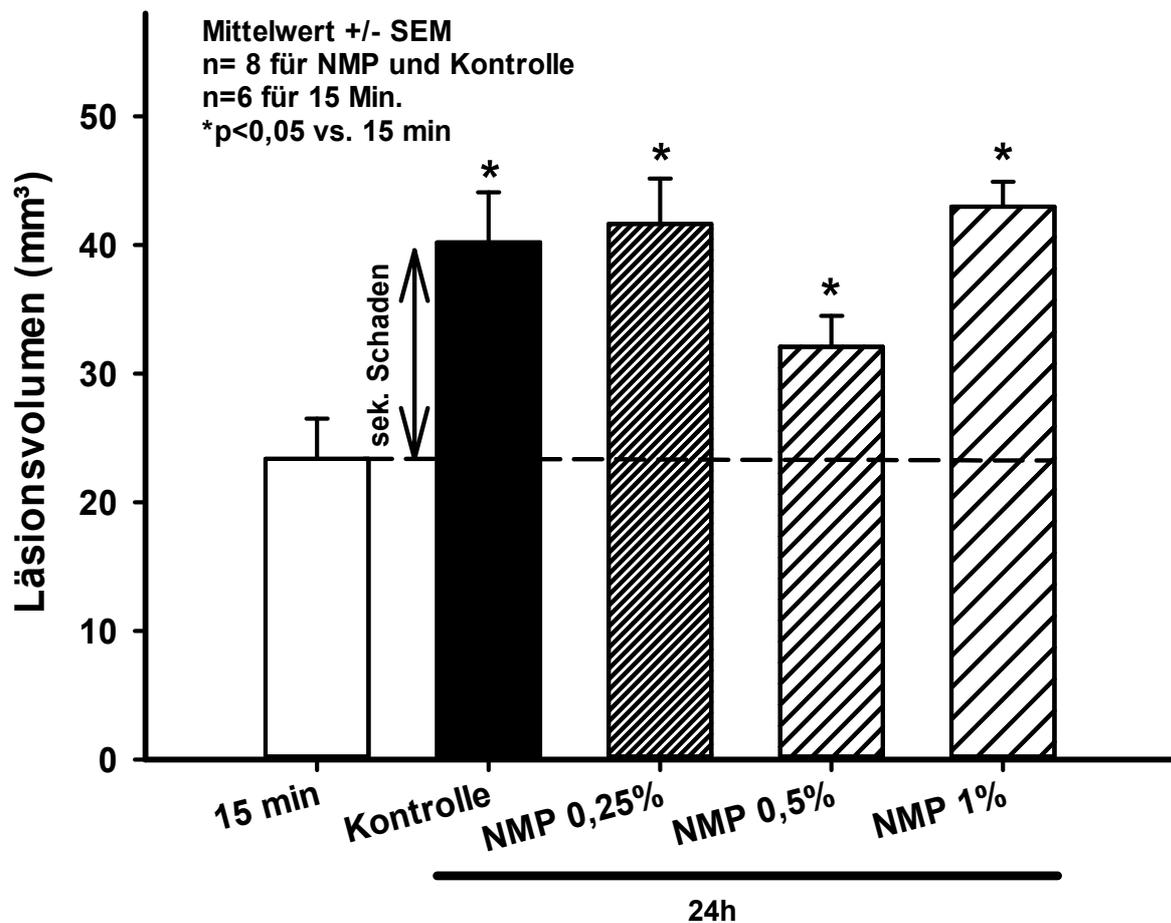


Abb. 34: Nekrosevolumen 24 Stunden nach Traumainduktion und Applikation verschiedener NMP-Konzentrationen jeweils eine Stunde nach CCI

### 3.3.2.2 Neurological Severity Score

Vor Beginn der Experimente unterschieden sich die Mäuse der verschiedenen Versuchsgruppen nicht statistisch signifikant bezüglich ihres NSS-Punktwertes (0 Punkte in allen Versuchsgruppen außer der 1%-NMP-Versuchsgruppe, hier  $0,1 \pm 0,1$  Punkte). Die Ergebnisse der Versuchstiere aller Versuchsgruppen waren 24 Stunden nach CCI statistisch signifikant schlechter als vor Beginn der Experimente (jeweils  $p < 0,001$  gegenüber dem präoperativen Baseline-Wert). Weder in der 0,25%-NMP-Versuchsgruppe ( $3,8 \pm 0,5$  Punkte) noch in der 1%-NMP-Versuchsgruppe ( $4,1 \pm 0,8$  Punkte) erreichten die Versuchstiere statistisch signifikant bessere Ergebnisse als die Tiere der Kontrollgruppe ( $3,7 \pm 0,5$  Punkte). Die Gabe von 0,5%igem NMP führte zwar zu einer geringeren Verschlechterung der Versuchstiere im Vergleich zur

Kontrollgruppe, jedoch war dieser Effekt nicht statistisch signifikant ( $2,8 \pm 0,2$  Punkte in der 0,5%-NMP-Versuchsgruppe).

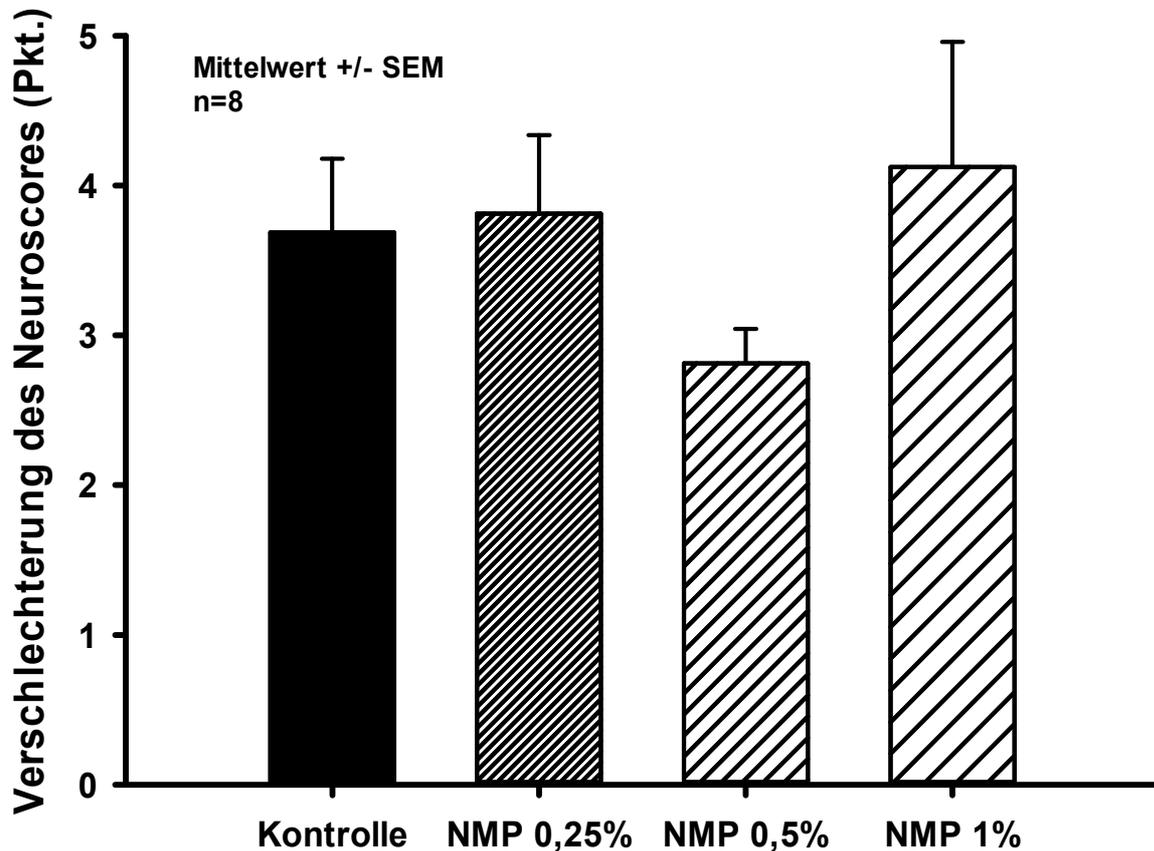


Abb. 35: Veränderung des Neuroscores 24 Stunden nach Traumainduktion gegenüber dem präoperativen Ergebnis nach Applikation von verschiedenen NMP-Konzentrationen jeweils eine Stunde nach CCI

### 3.3.2.3 Körpergewicht

Die Mäuse der verschiedenen Versuchsgruppen unterschieden sich vor Beginn der Experimente nicht statistisch signifikant bezüglich ihres Körpergewichtes ( $22,1 \pm 0,4$  g für die 15-Minuten-Kontrollgruppe;  $22,5 \pm 0,4$  g für die 24-Stunden-Kontrollgruppe;  $23,0 \pm 20,5$  g für die 0,25%-NMP-Versuchsgruppe;  $22,4 \pm 0,3$  g für die 0,5%-NMP-Kontrollgruppe;  $22,8 \pm 0,1$  g für die 1%-NMP-Kontrollgruppe). Weder die Applikation von 0,25%igem NMP ( $10,8 \pm 1,4\%$ ) noch von 1%igem NMP ( $10,5 \pm 1,1\%$ ) führte zu

einer statistisch signifikanten Reduktion des Gewichtsverlustes im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $11,7 \pm 1,8\%$ ). Die Applikation von 0,5%igem NMP reduzierte zwar den Gewichtsverlust gegenüber der Kontrollgruppe, allerdings war diese Reduktion nicht statistisch signifikant ( $7,6 \pm 1,2\%$ ).

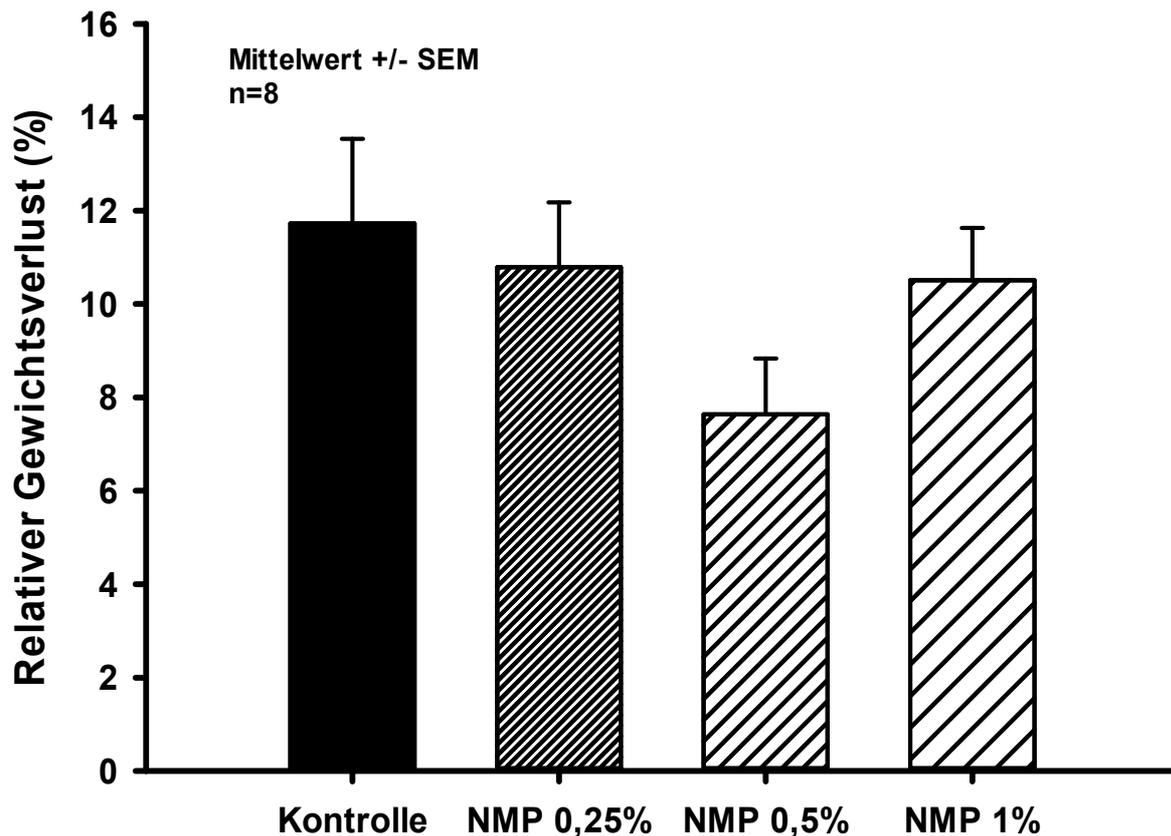


Abb. 36: Gewichtsverlust 24 Stunden nach Traumainduktion gegenüber dem präoperativen Körpergewicht nach Applikation von verschiedenen NMP-Konzentrationen jeweils eine Stunde nach Traumainduktion

### 3.4. Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend konnte beobachtet werden, dass die intraperitoneale Applikation von 1%igem DMSO, 100%igem PEG-40 und 100%igem Miglyol keinen Einfluss auf das sekundäre Nekrosewachstum nach CCI hat, während die Applikation von NMP das sekundäre Nekrosewachstum deutlich reduziert. Dieser Effekt ist sowohl bei Applikation vor als auch nach CCI zu beobachten. Dabei scheint eine Konzentration

zwischen 0,5% und 1% am wirksamsten zu sein. Weiterhin hat die NMP-Applikation auch einen positiven Effekt auf die neurologische Funktion und den postoperativen Gewichtsverlust der Versuchstiere, wobei dieser Effekt im Gegensatz zum sekundären Nekrosewachstum nicht signifikant ist.

## **4. Diskussion**

### **4.1 Diskussion der Methode**

#### **4.1.1 Auswahl der Versuchstiere**

Als Versuchstiere wurden für die vorliegende Studie männliche C57Bl/6 Mäuse gewählt. Mäuse sind neben Ratten die am häufigsten für Tiermodelle des Schädel-Hirn-Traumas verwendeten Versuchstiere, da sie eine Reihe von Vorteilen aufweisen. So können sie aufgrund von kurzen Reproduktionszyklen schnell und kostengünstig gezüchtet werden, sind einfach unterzubringen und bieten die Möglichkeit der Zucht von genetisch veränderten Stämmen. Zusätzlich besitzt unsere Arbeitsgruppe große Erfahrung in der Durchführung von Versuchen an Mausmodellen [70, 95, 101, 144, 303-309]. Der Vorteil von männlichen Mäusen gegenüber weiblichen Artgenossen liegt in der deutlich geringeren endogenen Produktion von Östrogenen und Progesteron, welche neuroprotektiven Einfluss im Tiermodell haben und so die Beobachtungen beeinflussen könnten [40, 129, 310]. Nachteile der Maus als Versuchstier liegen vor allem in der geringen Körpergröße, die zu Schwierigkeiten bei der Präparation führen kann. Dies kann jedoch durch Verwendung von Operationsmikroskopen, mikrochirurgischen Techniken und Erfahrung des Operateurs ausgeglichen werden. Weiterhin ist es schwierig, neuropsychologische Testungen an Mäusen vorzunehmen, und der Metabolismus von Pharmaka kann von dem des Menschen zum Teil erheblich abweichen [311-313].

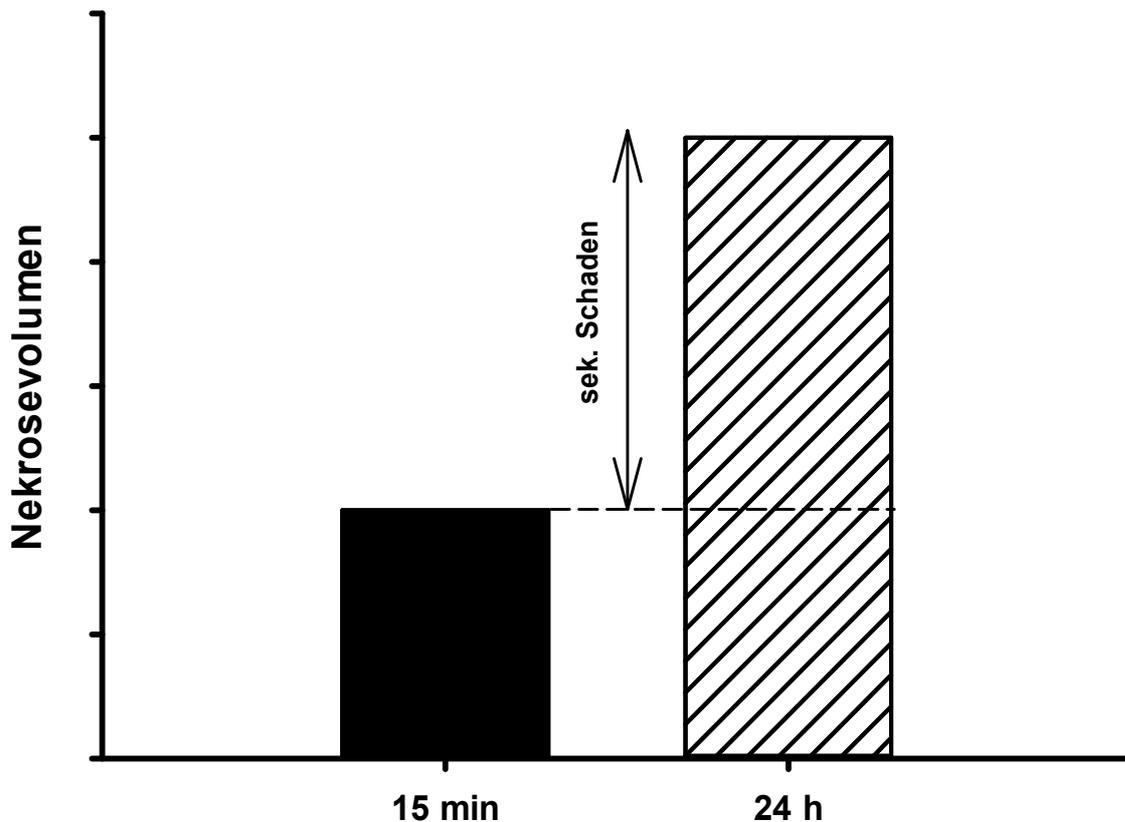
#### **4.1.2 Auswahl des experimentellen Traumamodells**

Es existieren verschiedene Modelle, um die pathophysiologischen Prozesse des Schädel-Hirn-Traumas in Versuchstieren zu simulieren [314-316]. In der vorliegenden

Studie wurde das Controlled Cortical Impact Modell verwendet. Das Modell wird seit vielen Jahren routinemäßig in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt, was zur Optimierung der einzelnen Arbeitsschritte und so weiter zur Standardisierung beigetragen hat [50, 70, 84, 95, 101, 144, 303-309, 317-319]. Weiterhin wurden vor Durchführung der Versuchsreihen der vorliegenden Studie Validierungsexperimente durchgeführt um sicherzustellen, dass der Operateur die einzelnen Arbeitsschritte des Modells sicher beherrscht und standardisiert durchführen kann.

Beim CCI wird kurz zusammengefasst mit Hilfe eines pneumatisch getriebenen Stempels, d.h. mechanisch, eine genau definierte Kontusion induziert. Da sowohl die Eindringtiefe als auch die Aufprallgeschwindigkeit und die Kontaktzeit des Bolzens mit der Dura mater separat bestimmt und genau festgelegt werden können und die Kontaktfläche des Bolzens mit der Dura mater immer gleich ist ( $3 \text{ mm}^2$ ), ermöglicht das CCI eine sehr gute Reproduzierbarkeit und Standardisierbarkeit der Kontusion. In der vorliegenden Studie wurden eine Eindringtiefe von einem mm, eine Aufprallgeschwindigkeit von 8 m/s und eine Kontaktzeit von 150 ms gewählt. Die Durchführung des CCI mit diesen Parametern führt zur Induktion einer gut quantifizierbaren Kontusion entsprechend eines mittelschweren Schädel-Hirn-Traumas; die Versuchstiere zeigen nach Trauma deutliche neurologische Einschränkungen, sind jedoch nach Aufwachen aus der Narkose nicht komatös. Ein weiterer Vorteil des CCI ist die gut standardisierbare und genaue Quantifizierbarkeit des sekundären Hirnschadens (siehe Abb.37).

Hypothermie wirkt im Tierexperiment neuroprotektiv [320-323]. Um ein Auskühlen der Versuchstiere und somit einen potentiellen Einfluss von Hypothermie auf die Beobachtungen auszuschließen, wurden die Mäuse während der gesamten Dauer der Operation auf einer mit einer rektalen Temperatursonde rückgekoppelten Wärmematte gelagert und die Körpertemperatur konstant bei  $37^\circ\text{C}$  gehalten. Zusätzlich erfolgte die postoperative Aufwachphase in einem auf  $37^\circ\text{C}$  erwärmten Inkubator.



**Sek. Hirnschaden = Nekrosevolumen nach 24 h - Nekrosevolumen nach 15 min**

Abb. 37: Quantifizierung des sekundären Hirnschadens

Im Gegensatz zu anderen experimentellen Schädel-Hirn-Trauma-Modellen liegt der pathophysiologische Fokus beim CCI auf der Kontusion, was gut mit dem Verletzungsmuster nach Schädel-Hirn-Trauma beim Menschen übereinstimmt [20]. Im Gegensatz dazu verursacht das von Marmarou entwickelte Weight Drop Modell vor allem einen diffusen axonalen Schaden und hippocampalen Zelltod [324, 325]. Bei diesem Modell wird das Schädel-Hirn-Trauma durch den Aufprall eines aus einer definierten Höhe fallen gelassenen Gewichtes, welches durch eine Plexiglasröhre geführt wird, auf den Schädel des Versuchstiers induziert. Dabei ist der Schädel zur Vermeidung von Schädelfrakturen und einem somit resultierendem offenen Schädel-Hirn-Trauma durch einen Metallkegel, welcher auf der Kalotte angebracht wird, geschützt und das Versuchstier auf einer Schaummatte gelagert. Auch beim häufig

verwendeten Fluid Percussion Injury Modell, bei dem das Trauma durch Injektion einer Flüssigkeit in den geschlossenen Schädel des Versuchstieres verursacht wird, stehen nicht die beim Menschen am häufigsten beobachteten Kontusionen, sondern subarachnoidale und intraparenchymatöse Blutungen sowie hippocampale Zellschädigungen im Vordergrund. Insgesamt stimmt somit die durch das CCI verursachte Läsion im Vergleich zu anderen Traumamodellen am besten mit dem am häufigsten im Menschen nach Schädel-Hirn-Trauma beobachteten Verletzungsmuster überein und ist daher sehr gut zur experimentellen Untersuchung pathophysiologischer Prozesse nach Schädel-Hirn-Trauma geeignet. Dies gilt auch im Hinblick auf die posttraumatische Ödementstehung. Marmarou et al. bestimmten in Jahre 2000 magnetresonanztomografisch den Hirnwassergehalt gesunder, freiwilliger Versuchspersonen und von Patienten, die ein schweres Schädel-Hirn-Trauma erlitten hatten [326]. Sie ermittelten einen Hirn-Wasseranteil von 77,34 % in der Gruppe der gesunden Probanden und 78,74 % in der Gruppe der Schädel-Hirn-Trauma-Patienten. Marmarou et al. bestimmten den Wert bezogen auf das gesamte Gehirn. Errechnet man den Hirnwassergehalt bezogen auf das gesamte Gehirn für die Kontrollgruppe der vorliegenden Studie, so ergibt sich ein Wert von 79,83 %, welcher sehr nahe an dem von Marmarou et al. in Menschen bestimmten Wert liegt. Geht man davon aus, dass der Anstieg des Hirnwassergehaltes im Modell der fokalen Schädigung wie beim CCI nur auf der dem Trauma ipsilateralen Hemisphäre stattfindet, kann man die dem Trauma kontralaterale Hemisphäre als Kontrolle betrachten. Der Mittelwert des Hirnwassergehaltes der dem Trauma kontralateralen Hemisphäre betrug in der vorliegenden Studie 78,61% und lag damit ebenfalls sehr nahe an dem von Marmarou et al. ermittelten Wert für gesunde Probanden. Auch der Anstieg des Hirnwassergehaltes um 1,22% in der vorliegenden Studie entspricht relativ gut dem von Marmarou et al. im Menschen beschriebenen Anstieg von 1,40% nach schwerem Schädel-Hirn-Trauma. Der Vergleich mit dieser an Menschen durchgeführten Studie zeigt, dass das CCI-Modell eine posttraumatische Hirnödementwicklung induziert, die der im Menschen sehr ähnlich ist, und daher sehr gut geeignet ist, um potentielle pharmakologische Einflüsse auf die Hirnödementstehung nach einem Schädel-Hirn-Trauma zu untersuchen. Schließlich wird der posttraumatische ICP-Anstieg, welcher als einer der entscheidenden Mechanismen zur Entstehung des sekundären Hirnschadens beiträgt, durch den Verschluss der knöchernen Schädeldecke unmittelbar nach der Traumainduktion gewährleistet, was einen entscheidenden

Vorteil gegenüber Modellen ohne Verschluss des knöchernen Schädels darstellt [35, 53].

Neben vielen Vorteilen existieren auch einige Nachteile des CCI, welche eine Translation der experimentell gewonnenen Erkenntnisse in den klinischen Alltag erschweren könnten. Wird das CCI mit den in der vorliegenden Studie gewählten Parametern durchgeführt, resultiert eine Gewebeverletzung entsprechend eines mittelschweren Schädel-Hirn-Traumas. Viele klinische Studien werden jedoch an Patienten mit schweren Schädel-Hirn-Traumata durchgeführt, da sich in dieser Gruppe die Wahl und letztendlich die Messung des primären Endpunktes, meistens der Mortalität, einfacher gestaltet als in anderen Patientenkollektiven und diese Patientengruppe potentiell am meisten von neuartigen Therapien profitieren könnte [40]. Man geht davon aus, dass die pathophysiologischen Prozesse in der Gruppe der mittelschwer traumatisierten Patienten mit denen mit schweren Schädel-Hirn-Traumata übereinstimmen; letztlich kann aber nicht sicher ausgeschlossen werden, dass bestimmte Prozesse beim schweren Trauma in anderem Ausmaß oder anderer Geschwindigkeit ablaufen oder gar weitere Prozesse beteiligt sind. Um dieses Problem zu lösen, könnten beispielsweise die Parameter des CCI so angepasst werden, dass eine einem schweren Schädel-Hirn-Trauma entsprechende Kontusion entsteht, was aber wiederum aufgrund der dann resultierenden postoperativen Vigilanzminderung bis zur Beatmungspflichtigkeit der Versuchstiere weitreichende infrastrukturelle Konsequenzen für die Versuchsdurchführung hätte. Weiterhin würden sich aufgrund einer zu erwartenden höheren Mortalität auch tierschutzrechtliche Bedenken ergeben, während in Studien unserer Arbeitsgruppe mehrfach gezeigt werden konnte, dass die Traumainduktion mit den in der vorliegenden Studie gewählten Parametern bei sehr guter Reproduzierbarkeit einer definierten Kontusion mit gut quantifizierbarem sekundären Nekrosewachstum und neurologischen Ausfällen mit einer sehr geringen Mortalität der Versuchstiere einhergeht [303, 305]. Eine weitere Einschränkung des CCI-Modells stellt die Tatsache dar, dass viele Patienten mit Schädel-Hirn-Trauma einerseits mehr als eine intrakranielle Pathologie, andererseits aber auch häufig zusätzlich Verletzungen weiterer Organsysteme aufweisen [22, 39]. Das CCI-Modell induziert jedoch nur eine definierte fokale Läsion; weitere zerebrale und periphere Verletzungsmuster, wie z.B. diffus axonale Schäden oder Thoraxverletzungen, welche bei Patienten häufig in Kombination mit fokalen zerebralen Verletzungen auftreten und einen entscheidenden Einfluss auf das klinische Outcome haben können, bleiben

durch dieses Modell allerdings weitestgehend unberücksichtigt. Weiterhin haben sowohl arterielle Hypotonie als auch systemische Hypoxie einen negativen Einfluss auf die Prognose nach Schädel-Hirn-Trauma und es konnte auch in tierexperimentellen Studien gezeigt werden, dass systemische Hypotonie die Hirndurchblutung senkt, perifokale Depolarisationen auslöst und somit schließlich den Sekundärschaden vergrößert [109, 327, 328]. In verschiedenen Studien, in denen das CCI-Modell verwendet wurde, zeigte sich jedoch, dass allein die Traumainduktion zumindest in der Akutphase keine höhergradige arterielle Hypotonie oder systemische Hypoxie auslöst [95, 319, 329]. Die Lösung des Problems könnte in der Etablierung von kombinierten Modellen liegen, welche verschiedene Verletzungsmuster und systemische Faktoren, die die pathophysiologischen Prozesse des sekundären Hirnschadens nach Schädel-Hirn-Trauma beeinflussen, berücksichtigen. Vor Etablierung solcher kombinierter Traumamodelle sollten zunächst jedoch die im Bereich des Gehirns ablaufenden pathophysiologischen Prozesse abschließend aufgeklärt werden. Hierfür ist das CCI-Modell sehr gut geeignet, da es eine Vielzahl der auch im Menschen ablaufenden Prozesse abbildet und so deren Untersuchung ermöglicht.

#### **4.1.3 Bestimmung des Nekrosevolumens**

Es existieren verschiedene Methoden zur Bestimmung des Nekrosevolumens nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma. Diese erfolgt vor allem in den letzten Jahren zunehmend mittels CT- oder MRT-Bildgebung, was den Vorteil mit sich bringt, dass nicht nur das Nekrosevolumen, sondern auch andere Parameter wie z.B. die zerebrale Durchblutung oder das Ödem in der gleichen Untersuchung ermittelt werden können [330, 331]. Allerdings unterliegt die Auswertung der MRT-Daten, wie bei den meisten Auswertungsverfahren, einer gewissen interindividuellen Schwankung und es sind bisher keine standardisierten Untersuchungsbedingungen z.B. zur Bestimmung des Nekrosevolumens definiert worden, sodass Ergebnisse verschiedener Studien schwer miteinander vergleichbar sind [332]. In der MRT-Bildgebung kommt außerdem nicht die Nekrose allein, sondern auch begleitende Läsionen, wie z.B. ein begleitendes Ödem, zur Darstellung und eine Differenzierung zwischen den verschiedenartigen Läsionen und somit eine Bestimmung des exakten Nekrosevolumens ist allein aufgrund des Signalverhaltens nicht eindeutig möglich. Daher entspricht die Ermittlung

des Nekrosevolumens mittels MRT lediglich einer Annäherung an das tatsächliche Nekrosevolumen, was einen entscheidenden Nachteil zu der in der vorliegenden Studie verwendeten histologischen Bestimmungsmethode darstellt. Zudem ist für die MRT-Bildgebung in Mäusen eine sehr hohe Auflösungsleistung der MRT-Geräte notwendig und Untersuchungen mit Geräten mit einer zu geringen Auflösung liefern ungenaue Daten, was die Präzision der Bestimmung des Nekrosevolumens weiter reduziert. Zusätzlich müssen die Versuchstiere für die Untersuchung erneut narkotisiert werden, was die untersuchten Parameter verfälschen kann [333]. Histomorphometrische Verfahren, wie sie z.B. in der vorliegenden Studie verwendet wurden, sind ohne großen infrastrukturellen Aufwand und kostengünstig durchzuführen. Auch diese Verfahren unterliegen interindividuellen Schwankungen in der Auswertung und die artefaktfreie Erstellung der Gewebeschnitte erfordert Erfahrung im Umgang mit den verwendeten Geräten und Substanzen. Unsere Arbeitsgruppe arbeitet seit vielen Jahren mit der Nissl-Färbung und erreicht daher einen sehr hohen qualitativen Standard in der Herstellung der Gewebeschnitte [95, 303, 305, 319, 329]. Der entscheidende Vorteil der Färbung von Gefrierschnitten nach Nissl gegenüber der TTC-Färbung liegt in der Möglichkeit, geschädigte Neurone eindeutig identifizieren und somit das Nekrosevolumen äußerst exakt bestimmen zu können, was nach TTC-Färbung u.a. auch aufgrund der höheren Schichtdicke nicht der Fall ist.

Die Nekrosevolumina der jeweiligen 15-Minuten-Kontrollgruppen in den Versuchsreihen zur Evaluation der Applikation verschiedener NMP-Konzentrationen vor bzw. nach Traumainduktion unterscheiden sich deutlich voneinander. Dies ist vor allem damit zu begründen, dass die Versuche in einem gewissen zeitlichen Abstand voneinander durchgeführt wurden. Zwischen der Durchführung der Versuche der beiden Versuchsreihen wurde eine Wartung der Traumamaschine notwendig, in deren Rahmen eine Neukalibrierung erfolgte. Dies kann auch bei Einstellung der exakt gleichen Parameter an der Traumamaschine zu in einer minimal abweichenden Traumainduktion mit daraus resultierenden Veränderungen des induzierten Nekrosevolumens nach 24 Stunden geführt haben. Allerdings wurden alle Experimente innerhalb der einzelnen Versuchsreihen zum gleichen Zeitpunkt vor bzw. nach der Wartung der Traumamaschine, d.h. unter den exakt gleichen Versuchsbedingungen durchgeführt und es wurde für die beiden Versuchsreihen jeweils eine eigene Kontrollgruppe installiert. Daher resultierten innerhalb der

einzelnen Versuchsreihen nur sehr geringe Abweichungen, sodass die Daten innerhalb der Versuchsreihen sehr gut miteinander vergleichbar und die Aussagen daher insgesamt valide sind.

#### **4.1.4 Bestimmung des neurologischen Schädigungsmusters**

Insgesamt ist es schwierig, das neurologische Schädigungsmuster in Nagetieren exakt zu untersuchen. Zwar existieren viele verschiedene Testverfahren zur Evaluation des neurologischen Outcomes von Versuchstieren, jedoch stellt die genaue Beurteilung der Beobachtungen ein Problem dar [95, 144, 334-336]. So gibt es beispielsweise viele verschiedene Tests, um das Lernvermögen und das Gedächtnis der Versuchstiere zu untersuchen. Beispiele sind der Object-Recognition-Test, mit dem anhand der Zeit, die sich das Versuchstier mit einem Gegenstand beschäftigt, bewertet wird, ob das Objekt wiedererkannt wird oder "neu" ist, oder der Water-Maze-Test, bei dem die Versuchstiere eine Plattform in einem Wasserbecken wiederfinden müssen. Das Problem aller dieser Tests besteht darin, dass der beobachtete Endpunkt von einer Vielzahl von Parametern beeinflusst wird und somit allein anhand der Beobachtung des Endpunktes nicht exakt darauf zu schließen ist, welche Funktion hauptsächlich beeinträchtigt ist. So kann ein schlechteres Ergebnis im Water-Maze beispielsweise durch ein beeinträchtigtes Gedächtnis, aber auch durch eine Parese bedingt sein. Weiterhin sind Verhaltensänderungen häufig nur durch sehr genaue Beobachtung zu detektieren, was bei mangelnder Erfahrung des Untersuchers zu einem signifikanten Untersucher-Bias führen kann. Diesem Problem kann durch computergestützte Auswertung der Verhaltenstests, z.B. durch Aufzeichnung von Zeit und zurückgelegter Wegstrecke in einem Open-Field-Versuch mittels einer Kamera, begegnet werden. Zusätzlich werden Verhaltenstests zumeist unter Laborbedingungen durchgeführt, welche nicht der natürlichen Umgebung der Versuchstiere entsprechen und somit das Verhalten beeinflussen können [337]. Schließlich reagieren verschiedene Spezies unterschiedlich auf den gleichen Test, was dazu führt, dass z.B. das Ergebnis einer Ratte im Object-Recognition-Test nicht unbedingt mit dem einer Maus zu vergleichen ist [337].

In der vorliegenden Studie wurde ein zehnteiliger Score direkt vor und 24 Stunden nach CCI erhoben. Dies diente dem Ziel, möglichst eine Vielzahl verschiedener

Bereiche der Hirnfunktion zu testen (Aktivität, Orientierung, Koordination, Motorik). Gleichzeitig ist die Erhebung leicht zu erlernen und gut reproduzierbar. Alle Tiere zeigten 24 Stunden nach Traumainduktion neurologische Auffälligkeiten, welche vor Beginn der Experimente noch nicht bestanden hatten, was belegt, dass das induzierte Trauma auch funktionelle Schäden verursacht hatte. Die Bestimmung des postoperativen Neuroscores erfolgte einmalig 24 Stunden nach Traumainduktion. Es ist jedoch möglich, dass Therapieeffekte sich erst nach mehreren Tagen in einer Verbesserung des neurologischen Outcomes niederschlagen, sodass der gewählte Beobachtungszeitraum möglicherweise zu kurz war [95]. Außerdem wurden die verschiedenen Merkmale nur qualitativ bewertet. Eine quantitative Bewertung, z.B. der Motorik durch Zählen der Fehlritte im Beam Walk oder der Orientierung durch Messen der Zeit bis zum Verlassen des Reifens im Open Field Versuch, könnten möglicherweise aussagekräftiger sein und Unterschiede sensitiver detektieren. Andererseits ist eine qualitative Auswertung eindeutiger zu bewerten und führt daher zu einer besseren Reproduzierbarkeit der Untersuchungsergebnisse. Ein weiterer Nachteil der verwendeten Methode liegt darin, dass keine automatisierte Auswertung erfolgte, was einerseits zeitintensiv ist und andererseits einen möglichen Untersucher-Bias begünstigt. Letzteres wurde allerdings durch die randomisierte und verblindete Versuchsdurchführung ausgeschlossen. Insgesamt ist der verwendete Neurological Severity Score ein valider Test zur Bewertung der neurologischen Funktion der Versuchstiere, da er mehrere Funktionsbereiche bewertet und zudem mehrfach gezeigt werden konnte, dass er in der Lage ist, Unterschiede in der neurologischen Funktion der Versuchstiere sensitiv zu detektieren [95, 96, 305, 334, 335].

#### **4.1.5 Bestimmung des Hirnwassergehaltes**

Das Hirnödem, das als pathologische Zunahme des Hirnwassergehalts definiert ist, erfolgte mit der seit langem etablierten und in unserer Arbeitsgruppe routinemäßig durchgeführten Feucht-Trocken-Methode [84, 95, 303]. Die Methode ist nach Erlernen sehr einfach durchzuführen und unterliegt einer sehr geringen Untersucherabhängigkeit. Allerdings muss die Aufbereitung des Probenmaterials sehr exakt und gründlich erfolgen, da bereits bei kleinen Ungenauigkeiten sehr hohe Schwankungen resultieren. Wird die Methode jedoch exakt durchgeführt, liefert sie sehr gut reproduzierbare Ergebnisse mit sehr geringem Fehler. Eine weitere Methode

zur Ödembestimmung ist die MRT-Untersuchung, die im Gegensatz zur Feucht-Trocken-Methode eine serielle Messung auch mehrerer Parameter gleichzeitig ermöglicht und so ein intraindividueller Verlauf beobachtet werden kann. Dabei gelten wiederum die bereits genannten Limitationen der hohen infrastrukturellen und finanziellen Anforderungen sowie des Untersucher-Bias bei der Auswertung und die Notwendigkeit einer erneuten Narkose, welche Einfluss auf die bestimmten Parameter nehmen kann. Eine weitere neue Möglichkeit zur Bestimmung des Hirn-Wasser-Gehaltes stellt die Quantifizierung der Fluoreszenzintensität nach Gabe von Tetramethylrhodamin-Dextran (TMRM) mittels Intravitalmikroskopie dar [308]. Der große Vorteil dieser Methode liegt darin, dass der zeitliche Ablauf und die genaue Lokalisation der Ödementstehung visualisiert und quantifiziert werden können. Allerdings ist die Anwendung der Methode sehr aufwändig und es ist nur eine Beobachtung über mehrere Stunden möglich; eine Beobachtung des zeitlichen Verlaufs der Ödementstehung und des Verlaufs über Tage ist nicht möglich.

## **4.2 Diskussion der Ergebnisse**

### **4.2.1 Einfluss verschiedener Lösungsmittel auf den strukturellen Hirnschaden nach Schädel-Hirn-Trauma**

Die Therapie des Schädel-Hirn-Traumas ist trotz intensiver Forschung weiterhin vor allem auf die Kontrolle des intrakraniellen Drucks und die Optimierung der zerebralen Durchblutung fokussiert. Zielgerichtete bzw. kausale Therapien, die direkt in die pathophysiologischen Prozesse des Gewebes Schadens nach einem Schädel-Hirn-Trauma eingreifen, existieren bisher nicht. Um dies zu ändern, werden viele verschiedene Pharmaka in tierexperimentellen Studien auf eine mögliche neuroprotektive Wirkung untersucht. Die meisten dieser Pharmaka müssen mit Hilfe einer Trägersubstanz vor der Injektion zunächst in Lösung gebracht werden. Möglicherweise haben diese Trägersubstanzen jedoch selbst einen Effekt auf die pathophysiologischen Prozesse, was jedoch nicht immer im Studiendesign berücksichtigt wird. Daher wurden in der vorliegenden Studie häufig verwendete Lösungsmittel auf einen möglichen Effekt auf den sekundären Hirnschaden nach Schädel-Hirn-Trauma untersucht.

Verschiedene Studien an Nagetiermodellen suggerieren einen neuroprotektiven Effekt von DMSO. De la Torre et al. zeigten 1995 am Mausmodell, dass der Zelluntergang, gemessen drei Stunden nach Traumainduktion durch Weight Drop Modell, durch intravenöse Injektion von 0,07 ml 100%igem DMSO drei Minuten nach Traumainduktion signifikant reduziert werden kann [338]. Die verwendete Menge DMSO entsprach dabei in etwa einer Dosis von 2,8 ml/kg KG. Dieser Effekt konnte durch zusätzliche Applikation von Fruktose 1,6- biphosphat (FDP) sogar noch weiter gesteigert werden, was die Autoren darauf zurückführen, dass die Gabe von FDP zur vermehrten aeroben Glykolyse und ATP-Produktion führt und somit den Energiemangel mindert. Di Giorgio et al. beobachteten 2008 an Sprague-Dawley-Ratten, dass 100%iges DMSO nach dreimaliger intraperitonealer Injektion in einer Dosis von 1 ml/kg KG 30 Minuten vor sowie 30 und 90 Minuten nach Fluid Percussion Injury den hippocampalen Zelluntergang 24 Stunden nach Traumainduktion statistisch signifikant reduziert [135]. Die Studie war eigentlich darauf ausgelegt, den Effekt des Antioxidans Curcumin mit DMSO als Vehikel auf den sekundären Hirnschaden zu evaluieren. Es zeigte sich jedoch, dass das als Lösungsmittel verwendete DMSO allein schon einen neuroprotektiven Effekt hat. Bardutzky et al. zeigten 2005 an Wistar-Ratten, dass 33%iges DMSO nach intravenöser Infusion in einer Dosis von 1,5 g/kg KG über drei Stunden das Infarktareal 24 Stunden sowie drei Tage nach Verschluss der A. cerebri media signifikant verringert, solange die Infusion innerhalb einer Stunde nach Beginn der Ischämie gestartet wird [339]. Die Arbeitsgruppe um de la Torre konnte in den 1970er-Jahren auch in einem Ballon-Kompressions-Modell, bei dem ein Ballon über ein Bohrloch in den Epiduralraum eingebracht und anschließend mit einer definierten Menge NaCl-Lösung gefüllt wurde, in Affen einen neuroprotektiven Effekt von DMSO nach Schädel-Hirn-Trauma zeigen [340]. In dieser Versuchsreihe wurde 50%iges DMSO in einer Dosierung von 2 g/kg KG und einer Injektionsgeschwindigkeit von 8 ml/min intravenös injiziert. Die Injektion wurde jeweils ab der ersten spontanen respiratorischen Aktivität des Versuchstieres nach posttraumatischer Apnoephase gestartet. Die Mortalität konnte durch DMSO-Injektion von 100% in der Kontrollgruppe auf 7% in der DMSO-Gruppe gesenkt werden. Dem gegenüber stehen Berichte der Arbeitsgruppe um Little et al., die in Ischämie-Modellen weder in Katzen noch in Pavianen nach intravenöser Applikation von 30-50%igem DMSO in einer Dosis 2,5 g/kg KG direkt nach Ischämiebeginn bzw. achtstündiger intravenöser Infusion einer Dosis von 1 g/kg KG beginnend 30 Minuten oder zwei Stunden nach Ischämieinduktion

einen neuroprotektiven Effekt von DMSO belegen konnten [341, 342]. In der vorliegenden Studie konnte ebenfalls kein neuroprotektiver Effekt einer DMSO-Applikation beobachtet werden. Dies könnte vor allem daran liegen, dass in allen Studien, die einen neuroprotektiven Effekt von DMSO beschreiben, weitaus höhere Dosen als in der vorliegenden Studie verwendet wurden. Die kleinste Dosis, für welche ein neuroprotektiver Effekt von DMSO belegt werden konnte, war jene von de la Torre et al. 1995 verwendete. Sie betrug insgesamt etwa 2,8 ml/kg KG und war damit 56 mal so hoch wie die in der vorliegenden Studie verwendete Dosis von 0,05 ml/kg KG (es wurde 1%-iges DMSO verwendet und 5 ml/kg KG appliziert;  $5 \text{ ml/kg} * 0,01 = 0,05 \text{ ml/kg}$ ). Dies erklärt jedoch nicht hinreichend, warum Little et al., die ähnliche Dosen wie de la Torre et al. und di Giorgio et al. verwendeten, keinen neuroprotektiven Effekt beobachten konnten. Es sei jedoch darauf verwiesen, dass Little et al. ihre Untersuchungen an einem Ischämiemodell durchführten, während die Arbeitsgruppen um de la Torre und di Giorgio Schädel-Hirn-Trauma-Modelle verwendeten, sodass unterschiedliche pathophysiologische Grundlagen der verwendeten Modelle die gegensätzlichen Ergebnisse erklären könnten. So hat zwar auch die Ischämie einen Effekt auf die Entstehung des sekundären Hirnschadens, jedoch spielen im Kontext eines Schädel-Hirn-Traumas auch eine Vielzahl anderer Prozesse eine Rolle, sodass die Beeinflussung der ischämischen Komponente allein nicht unbedingt einen signifikanten Effekt auf den Gesamtschaden haben muss. Weiterhin ist es denkbar, dass die ischämische Komponente in dem von De la Torre verwendeten Weight Drop Modell und in dem von DiGiorgio verwendeten Fluid-Percussion-Modell eine größere Rolle spielt als in dem in der vorliegenden Studie verwendeten CCI Modell, sodass eine Beeinflussung der Ischämie durch DMSO einen größeren Effekt auf den Gesamtschaden haben könnte. Zusammenfassend ist festzustellen, dass DMSO in der in der vorliegenden Studie getesteten Dosis von 0,5 ml/kg KG und sehr wahrscheinlich auch in höheren Dosen als Lösungsmittel für Studien zur Pathophysiologie des Schädel-Hirn-Traumas verwendet werden kann, da ein die Beobachtungen beeinflussender neuroprotektiver Effekt des Lösungsmittels selbst erst ab deutlich höheren Dosen von etwa 1ml/kg KG zu erwarten ist.

Auch nach Applikation von PEG wurden in einigen Studien neuroprotektive Effekte beobachtet. So zeigten Koob et al. 2005 an Ratten unter Verwendung des 1994 von Marmarou et al. beschriebenen Impact Acceleration Injury Modells, dass es nach intravenöser Injektion von einem Milliliter 30%igem PEG-2000 direkt nach

Traumainduktion zu einer signifikanten Reduktion des strukturellen Hirnschadens im Bereich des Traumas acht Stunden nach Traumainduktion kommt [235, 324]. Dies wurde als Nachweis des Membran reparierenden Effektes von PEG-2000, welcher zuvor bereits mehrfach von Borgens et al. an einem Traumamodell des Rückenmarks nachgewiesen werden konnte, gewertet [217, 219, 237, 239, 240, 242]. In weiteren Studien konnte die gleiche Arbeitsgruppe zudem zeigen, dass es nach intravenöser Injektion von 30%igem PEG-2000 direkt nach Trauma zu geringeren Amyloid-Precursor-Protein-Ablagerungen als Zeichen eines verringerten axonalen Schadens kommt, und dass die dreimalige subkutane Anwendung der gleichen Substanz zwei, vier und sechs Stunden nach Traumainduktion zu einem verbesserten neurologischen Outcome der Versuchstiere führt [233, 234]. Auch die Arbeitsgruppe um Ping konnte im Jahr 2014 einen neuroprotektiven Effekt von PEG beobachten [208]. Sie untersuchte den Effekt einer intravenösen Injektion von Monomethoxy - Poly(Ethylenglykol) - Poly(D, L-Laktat) Di-Block Copolymer Mizellen (mPEG-PDLLA) in einer Dosis von 10mg/kg KG zum Zeitpunkt der Traumainduktion durch CCI in Mäusen sowie vier Stunden danach auf post mortem in vitro abgeleitete Aktionspotentiale. Es konnte gezeigt werden, dass es unabhängig vom Applikationszeitpunkt nach Applikation der Mizellen zu einer signifikanten Steigerung der Amplitude der 48 Stunden nach Traumainduktion abgeleiteten Aktionspotentiale kommt, was die Arbeitsgruppe als Nachweis eines Membran-reparierenden Effektes der applizierten Substanz wertete. Cheney et al. verwendeten 2%iges DMSO in PEG gelöst als Vehikel in einer Studie zum Effekt eines Kalium-Kanal-Öffners auf die posttraumatische Hirnödementstehung nach Fluid-Perkussion-Injury in Ratten [160]. Als Kontrolle wurde eine nicht genannte Menge der Vehikelpräparation zehn Minuten nach Traumainduktion intravenös injiziert. Die intravenöse Administration des Kalium-Kanal-Öffners BMS-204352 zehn Minuten nach Traumainduktion reduzierte in dieser Studie den Hirnwassergehalt 48 Stunden nach Trauma und verbesserte die Motorik der Versuchstiere bis zu zwei Wochen nach Trauma jeweils signifikant gegenüber der Vehikelgruppe. Es gab allerdings keine weitere Kontrollgruppe, welche einen Effekt des Vehikels selbst hätte ausschließen können, sodass anhand dieser Studie keine Aussage über den Effekt von 2%-igem DMSO in PEG gemacht werden kann. Allerdings deuten die ermittelten Werte für den Hirnwassergehalt darauf hin, dass PEG zumindest die Entstehung des posttraumatischen Hirnödems nicht beeinflusst, da sie gut mit den in Kontrollgruppen anderer Studien ermittelten Werten für den

Hirnwassergehalt nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma in Ratten übereinstimmen [128, 343, 344]. Turkoglu et al. verwendeten PEG ebenfalls als Vehikel für ihre Studie zum Effekt von Atorvastatin auf die posttraumatische Hirnödementstehung nach Traumainduktion in Ratten [211, 345]. Das Trauma wurde nach modifizierter Feeney-Methode, bei der nach parietaler Kraniotomie ein definiertes Gewicht aus einer bestimmten Höhe durch eine Führungsröhre aus Teflon auf die durch ein Stahlplättchen geschützte Dura mater fallen gelassen wird, induziert [345]. In dieser Studie wurden 0,5 ml PEG direkt nach Traumainduktion intraperitoneal appliziert und es zeigte sich, dass PEG keinen Effekt auf die Entstehung des posttraumatischen Hirnödems hat. Keiner der Autoren der beiden zuvor beschriebenen Studien gab das Molekulargewicht des verwendeten PEG an. Da das Molekulargewicht von PEG aber einen Einfluss auf dessen biologische Aktivität hat, bleibt unklar, in wieweit die Ergebnisse dieser Studien mit denen der vorliegenden Studie vergleichbar sind. Die vorliegende Studie konnte keinen Effekt von PEG-40 auf die sekundäre Nekroseentwicklung nach Schädel-Hirn-Trauma nachweisen. In allen Studien, die einen neuroprotektiven Effekt von PEG nachweisen konnten, kamen PEGs mit deutlich höheren Molekulargewichten als das des in der vorliegenden Studie verwendeten PEG-40 zum Einsatz [233-235, 324]. Die Molekülgröße und das Molekulargewicht des PEG haben einen Einfluss auf dessen biologische Aktivität. So werden kleinere Moleküle deutlich schneller resorbiert als jene mit einem höheren Molekulargewicht [201, 227]. Daher ist nicht auszuschließen, dass eine Ursache der unterschiedlichen Beobachtungen im Molekulargewicht der verwendeten Testsubstanzen liegt. Weiterhin wurde in den meisten Studien, welche einen neuroprotektiven Effekt von PEG nachweisen konnten, das Impact Acceleration Modell verwendet [233-235, 324]. Dieses Modell verursacht primär einen diffusen axonalen Schaden, während der Fokus des in der vorliegenden Studie verwendeten CCI-Modells auf der Kontusion liegt. Möglicherweise hat der von Koob. et al. postulierte Wirkungsmechanismus von PEG, Membranen zu reparieren, einen größeren Einfluss auf die pathophysiologischen Vorgänge nach diffusem axonalen Schaden als auf jene der Kontusion, was die unterschiedlichen Ergebnisse erklären könnte. Ping et al. beobachteten in Mäusen auch nach Traumainduktion mittels CCI einen neuroprotektiven Effekt von PEG [208]. Allerdings wurde PEG in dieser Studie in Mizellenform in Kombination mit dem hydrophoben PDLLA appliziert, sodass insgesamt ein amphiphiles Molekül verwendet wurde. Es ist möglich, dass der

beobachtete Effekt durch die amphiphile Molekülstruktur bedingt und daher nicht allein auf den PEG-Anteil zurückzuführen ist. Dann wäre bei alleiniger Applikation von PEG kein neuroprotektiver Effekt zu erwarten, was wiederum gut mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie übereinstimmt. Insgesamt scheint eine Verwendung von PEG-40 als Lösungsmittel in Studien zur Pathophysiologie des Schädel-Hirn-Traumas möglich, da ein die Versuchsbeobachtungen beeinflussender Effekt nur bei PEGs mit höheren Molekulargewichten ab etwa 2 kD oder in Kombination mit hydrophoben Substanzen zu erwarten ist.

Obwohl Miglyol® 812 als Bestandteil verschiedenster Arzneimittelzubereitungen weit verbreiteten Einsatz in der pharmakologischen Industrie findet, liegen bisher keine Daten zum Einfluss von Miglyol® 812 auf die pathophysiologischen Vorgänge nach experimenteller Hirnschädigung vor. Gröger und Plesnila verwendeten Miglyol® 812 als Vehikel in einer Studie zum neuroprotektiven Effekt von 17 $\beta$ -Estradiol nach experimentellem Schlaganfall [140]. Die Testsubstanz wurde 48 h und 24 h vor Okklusion der A. cerebri media sowie zum Zeitpunkt der Reperfusion und 3h danach in einer Gesamtdosis von 1,4 mg/kg KG intraperitoneal injiziert. Es konnte gezeigt werden, dass der neuroprotektive Effekt von 17 $\beta$ -Estradiol nicht auf dessen antioxidative Wirkung zurückzuführen ist. Allerdings gab es in der Studie keine Versuchsgruppe, der lediglich Miglyol® 812 appliziert wurde, sodass keine sichere Aussage zum Effekt von Miglyol® 812 auf die untersuchten Parameter Infarkt volumen, Gewichtsverlust und neurologische Funktion gemacht werden kann. Nuglich et al. verwendeten Miglyol® 812 im Jahre 1990 als Vehikel zur oralen Applikation von Nimodipin, um dessen Einfluss auf den neuronalen Zelltod und die zerebrale Durchblutung nach bilateralem Abklemmen der Aa. carotides communes in Ratten zu evaluieren [136]. Den Versuchstieren der Kontrollgruppe wurde eine Stunde vor bilateraler Okklusion der A. carotis communis eine nicht genannte Dosis Miglyol® 812 p.o. verabreicht. Die Studie beinhaltete keine weitere Kontrollgruppe, um einen Effekt der Vehikelsubstanz auf die zu bestimmenden Zielparameter auszuschließen. Allerdings zeigte die Applikation von Miglyol® 812 keinen negativen Einfluss auf den mittleren arteriellen Blutdruck sowie den Sauerstoffgehalt im Blut, welcher die Entstehung von Sekundärschäden nach Hirnverletzung hätte begünstigen können. In der vorliegenden Studie konnte erstmalig gezeigt werden, dass die intraperitoneale Applikation von Miglyol® 812 keinen Einfluss auf die sekundäre Nekroseentwicklung nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma hat. Aufgrund der erhobenen Daten

erscheint es daher unproblematisch, Miglyol® 812 als Lösungsmittel in Studien zur Pathophysiologie des Schädel-Hirn-Traumas einzusetzen.

Zusammenfassend hat sich im ersten Teil der vorliegenden Studie gezeigt, dass sowohl der Einsatz von DMSO in Dosen unter 1 ml/kg KG als auch von PEG-40 und Miglyol® 812 als Lösungsmittel in pharmakologischen Studien zum Schädel-Hirn-Trauma unbedenklich erscheint, da keine der genannten Substanzen bei Applikation vor der Traumainduktion selbst einen Effekt auf den sekundären Schaden nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma hat.

#### **4.2.2 Einfluss von NMP auf den sekundären Hirnschaden**

Ähnlich wie für Miglyol® 812 liegen auch für NMP trotz weit verbreiteter Anwendung als Lösungsmittel verschiedenster Arzneimittelzubereitungen keinerlei Daten bezüglich eines möglichen Einflusses auf sekundäre Prozesse nach einer Hirnschädigung vor. Dudeck et al. evaluierten im Jahre 2006 NMP als möglichen Bestandteil eines Agens zur interventionellen transarteriellen Embolisation von zerebralen Aneurysmata [134, 137]. Zunächst wurden 0,8 ml verschiedener Lösungsmittel, u.a. auch NMP, über 60 Sekunden intraarteriell in das Rete mirabile, ein arterielles Gefäßnetz im Bereich der A. carotis, von Schweinen injiziert. Anschließend erfolgte eine angiografische Evaluation der Vasospasmogenität der Versuchssubstanzen. Schließlich wurden die Gehirne der Versuchstiere und speziell die Gefäße des Rete mirabile makroskopisch und mikroskopisch auf Auffälligkeiten untersucht. Es zeigte sich, dass NMP im Vergleich zu den anderen Testsubstanzen wie z.B. DMSO, Ethyllaktat oder Dimethylisosorbit, am wenigsten vasospasmogen wirkt und keinerlei makroskopische oder mikroskopische Schäden am Gehirn und speziell an den Gefäßen des Rete mirabile verursacht. In einer weiteren Studie evaluierte die Arbeitsgruppe um Dudeck den Einsatz von jodhaltigem Polyvinylalkohol (I-PVA) zur Embolisation von artifiziell induzierten zerebralen Aneurysmata in Schweinen. Es zeigte sich, dass in NMP gelöstes I-PVA die Aneurysmata sehr gut embolisiert. Weiterhin führte die Anwendung von NMP als Lösungsmittel weder zu Herzrhythmusstörungen im EKG noch zu Hämolyse. Die zwei Studien von Dudeck et al. belegen zwar keinen direkten neuroprotektiven Effekt von NMP, zeigen jedoch, dass NMP nur äußerst gering vasospasmogen wirkt und keine EKG-Veränderungen

hervorrufft. Dies ist erwähnenswert, weil Vasospasmen eine Rolle in der Entstehung des sekundären Hirnschadens nach Schädel-Hirn-Trauma, insbesondere beim Auftreten einer traumatischen Subarachnoidalblutung, spielen und ebenso wie neu aufgetretene EKG-Veränderungen mit einem schlechten Outcome verbunden sind [346-349]. Im ersten Abschnitt der vorliegenden Studie wurde erstmalig nachgewiesen, dass NMP neuroprotektives Potential besitzt. Die intraperitoneale Applikation von 1%igem NMP in einer Dosis von 5 ml/kg KG zehn Minuten vor Traumainduktion reduziert das Nekrosevolumen 24 Stunden nach CCI statistisch signifikant um etwa ein Drittel gegenüber der Kontrollgruppe. Dies bedeutet, dass NMP unter den o.g. Bedingungen die sekundäre Nekroseexpansion, welche in der vorliegenden Studie etwa 65% des Primärschadens beträgt (vgl. Abb. 25), um etwa 40% reduziert, was einem deutlichen therapeutischen Effekt entspricht. Aufgrund dieser Ergebnisse eignet sich NMP in den getesteten Konzentrationen nicht als Lösungsmittel in pharmakologischen Studien, da es aufgrund seiner protektiven Wirkung auf den sekundären Hirnschaden die Beobachtungen verfälschen kann; alternativ sollte bei Verwendung neben der Vehikel-Kontrollgruppe mit NMP zusätzlich eine weitere Kontrollgruppe mit Applikation von Trägersubstanz (PBS) geplant werden.

In der weiteren Untersuchung dieses unerwarteten neuroprotektiven Effektes zeigte sich, dass mittlere NMP-Konzentrationen zwischen 0,5% und 1% die größte Reduktion des Nekrosevolumens bewirken. Auch nach i.p.-Injektion von 0,5%igem NMP eine Stunde nach Traumainduktion war der Trend einer Reduktion des Nekrosevolumens im Vergleich zur Kontrollgruppe zu beobachten. Die NMP-Injektion zeigt auch einen positiven Effekt auf die neurologische Funktion und reduziert den Gewichtsverlust der Versuchstiere sowie die posttraumatische Hirnödementstehung. Dass die mittlere Konzentration, d.h. 0,5%, den besten Effekt hatte, stimmt gut mit der Tatsache überein, dass in vielen pharmakologischen Experimenten zur Dosis-Wirkungs-Beziehung umgekehrte U-Kurven beobachtet wurden [122, 350-352]. Dies kann dadurch erklärt werden, dass geringere Dosen zu niedrig sind, um einen therapeutischen Effekt zu entfalten, während zu hohe Dosen bereits toxisch wirken, was den therapeutischen Effekt schmälern oder gar Schaden verursachen kann. Insgesamt ist festzuhalten, dass NMP auch bei Applikation nach Traumainduktion neuroprotektive Wirkung entfalten kann. Dadurch hat die Substanz theoretisch klinisches Potential.

In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass NMP intrazelluläre, pro-inflammatorische Signalwege inhibiert. Ghayor et al. konnten 2015 an einem Makrophagen-Modell in vitro zeigen, dass NMP die Genexpression von pro-inflammatorischen Zielgenen unterdrückt. Zu diesen Zielgenen gehört unter anderem auch Interleukin-1. Tehranian et al. wiesen 2002 in einer Studie zum Effekt eines Interleukin-1-Rezeptor-Antagonisten auf die Expression von proinflammatorischen Zytokinen nach Traumainduktion durch ein modifiziertes Weight Drop Modell in Mäusen nach, dass es bereits eine Stunde nach Traumainduktion zu deutlich erhöhter Expression von Interleukin-1 kommt [353]. Die Expression von Interleukin-1 führt zu einer Aktivierung vielfältiger Signalwege, u.a. auch zur Expression von iNOS (siehe Abb. 38) [353, 354].

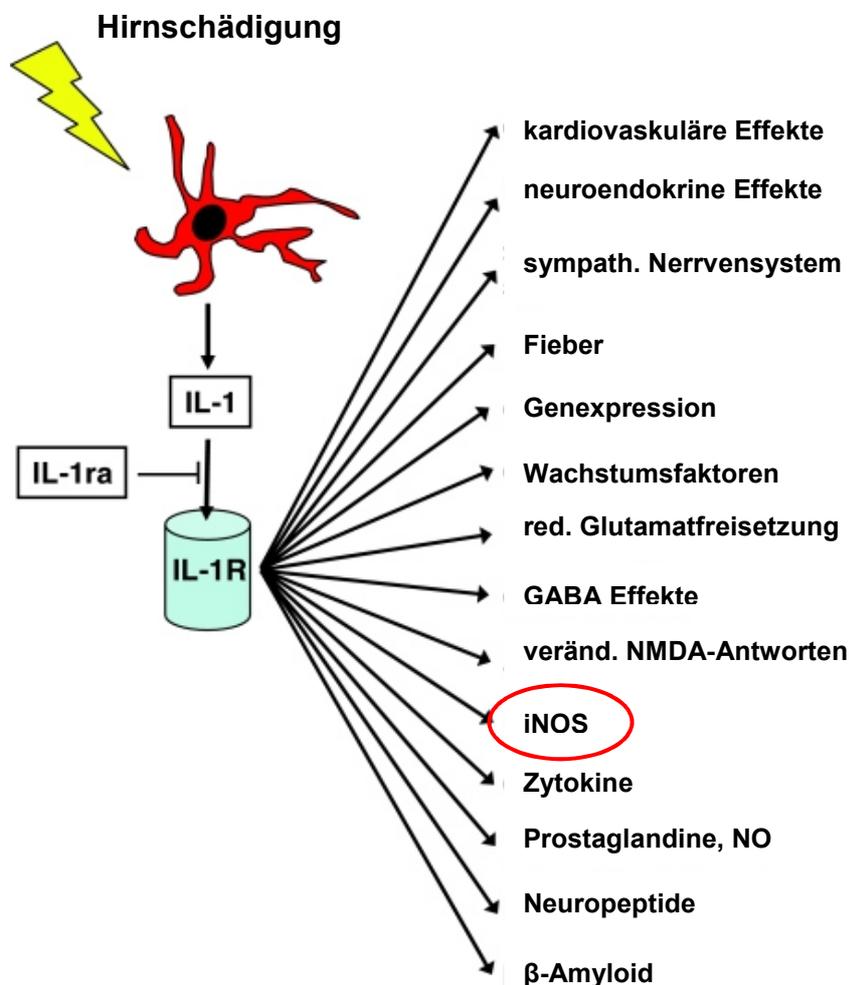


Abb. 38: Effekte von Interleukin-1 nach Schädel-Hirn-Trauma. Modifiziert nach [354]

Es wurde bereits mehrfach belegt, dass es nach einem Schädel-Hirn-Trauma zum Anstieg von iNOS kommt und dass dessen Inhibition den sekundären Schaden nach Schädel-Hirn-Trauma reduziert [89, 93, 94, 97]. Daher ist der akute neuroprotektive Effekt von NMP möglicherweise durch eine Inhibition der Interleukin-1- und schließlich der iNOS-Expression zu erklären. Es fällt auf, dass der Effekt von NMP auf das Nekrosewachstum deutlich größer ist als der auf den NSS. Dies könnte damit zu erklären sein, dass der Beobachtungszeitpunkt 24 Stunden nach Traumainduktion deutlich zu früh gewählt ist, um Unterschiede der Versuchsgruppen bezüglich ihres NSS zu detektieren. Viele Versuchsgruppen, die einen Effekt einer bestimmten Therapie auf die neurologische Funktion der Versuchstiere untersucht haben, wählten daher deutlich längere Beobachtungszeiträume. So beobachteten zum Beispiel Zweckberger et al. 2003 die Versuchstiere in einer Studie zum Effekt der dekompressiven Hemikraniektomie auf das Nekrosevolumen und die neurologische Funktion in Mäusen nach CCI über einen Zeitraum von acht Tagen [305]. Dabei unterschieden sich die Versuchsgruppen am ersten Tag nach Traumainduktion nicht bezüglich der Hinterpfotenfunktion; nach acht Tagen bestand jedoch ein signifikanter Unterschied. Zhao et al. beobachteten die Versuchstiere in einer Studie zum Effekt von Geranylgeranylaceton auf Zelltod, Aktivierung der Mikroglia sowie funktionelles Outcome in Mäusen nach CCI sogar 28 Tage nach Traumainduktion [355]. Es konnte in den ersten drei Tagen nach Trauma kein Unterschied bezüglich der Gedächtnisfunktion zwischen den Versuchsgruppen beobachtet werden. Erst ab dem vierten Tag nach Traumainduktion unterschieden sich die Ergebnisse der Versuchsgruppen signifikant voneinander. Es zeigt sich also, dass es durchaus möglich ist, dass sich Unterschiede in der neurologischen Funktion, welche durch eine bestimmte therapeutische Intervention beeinflusst werden, erst einige Tage nach Traumainduktion manifestieren. Daher ist es denkbar, dass auch NMP einen größeren Effekt auf die neurologische Funktion der Versuchstiere hat als aufgrund der in der vorliegenden Studie erhobenen Daten anzunehmen ist. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass Ghayor et al. zeigen konnten, dass NMP in vitro die Expression von Interleukin-1 unterdrücken kann [286]. Es gibt Hinweise, dass die Expression von Interleukin-1 und Monozyten-Aktivierung einen negativen Einfluss auf die neurologische Funktion von Versuchstieren mehrere Tage und Wochen nach Traumainduktion hat [356, 357]. Daher ist ein möglicher Wirkungsmechanismus von

NMP auf die neurologische Funktion Tage und Wochen nach Schädel-Hirn-Trauma die Unterdrückung der Expression von Interleukin-1.

Ein weiterer möglicher Wirkungsmechanismus von NMP liegt in seiner Molekülstruktur begründet. Die Entstehung von freien Radikalen nach Schädel-Hirn-Trauma führt zu einem verstärkten sekundären Hirnschaden [53, 74, 358]. Daher ist eine Möglichkeit der Reduktion des Sekundärschadens der Einsatz von Radikalfängern. Die meisten im Kontext des experimentellen Schädel-Hirn-Traumas getesteten freien Radikalfänger, wie z.B. U-83836E, Edaravon oder Neuroglobin, beinhalten eine Ringstruktur [359-361]. Auch das NMP-Molekül beinhaltet eine Ringstruktur, sodass aufgrund der Molekülstruktur eine Wirkung als Radikalfänger möglich ist.

Einen weiteren wichtigen Pathomechanismus in der Entstehung des sekundären Hirnschadens nach Schädel-Hirn-Trauma stellt die Ischämie im direkten Kontusionsbereich, aber auch in umliegenden Arealen, der sog. traumatischen Penumbra, dar [47, 53, 68]. Eine Beeinflussung dieser ischämischen Komponente als Wirkungsmechanismus von NMP erscheint jedoch eher unwahrscheinlich, da in der vorliegenden Studie gezeigt werden konnte, dass die intraperitoneale Applikation von NMP zehn Minuten vor Ischämieinduktion durch Okklusion der A. cerebri media in Mäusen keinerlei positiven Einfluss auf das Nekrosevolumen 24 Stunden nach Ischämieinduktion hat (s. Abb. 30).

Letztendlich konnte der Einfluss von NMP auf einen spezifischen pathophysiologischen Prozess, welcher zur Entstehung des sekundären Hirnschadens nach einem Schädel-Hirn-Trauma beiträgt, bisher noch in keiner Studie direkt in vivo nachgewiesen werden, sodass Aussagen zum Wirkungsmechanismus sehr spekulativ erscheinen. Daher ist es umso wichtiger, in Zukunft weitere Studien unter anderem mit einem längeren Beobachtungszeitraum durchzuführen, die den genauen Wirkungsmechanismus von NMP aufklären.

#### **4.2.3 Potentielle klinische Einsatzgebiete von NMP**

In der vorliegenden Studie konnte zum ersten Mal das neuroprotektive Potential des organischen Lösungsmittels NMP nachgewiesen werden. Diese Wirkung konnte sowohl bei NMP-Applikation zeitlich vor als auch nach einer Hirnschädigung belegt

werden. Diese Eigenschaften eröffnen eine Vielzahl an klinischen Anwendungsmöglichkeiten. Nachdem die Effekte in der vorliegenden Studie an einem Modell des Schädel-Hirn-Traumas nachgewiesen wurden, liegt ein Einsatz als Therapeutikum im Rahmen der Behandlung dieser Erkrankung nahe. So könnte NMP aufgrund der vielfältigen möglichen Applikationswege und der nachgewiesenen guten Verträglichkeit für den Menschen bereits im Rahmen der notärztlichen Versorgung verabreicht werden. Weiterhin könnten potentiell ebenfalls neuroprotektiv wirkende Pharmaka zukünftig in NMP gelöst werden, um einen synergistischen Effekt zu erzielen. Neben dem Einsatz in der Schädel-Hirn-Trauma-Versorgung kommen jedoch auch weitere Einsatzgebiete in Frage. So wurde der Einsatz als Lösungsmittel von Agenzien zur Embolisation von zerebralen Aneurysmata oder vaskulären Malformationen bereits von Dudeck et al. evaluiert und es zeigte sich, dass NMP günstigere Eigenschaften als das bisher verwendete DMSO besitzt, sodass ein routinemäßiger Einsatz auf diesem Gebiet naheliegend erscheint [134, 137]. Weiterhin wirkt NMP möglicherweise nicht nur im Rahmen von Schädel-Hirn-Traumata, sondern auch von anderen, pathophysiologisch verwandten Krankheitsbildern, wie z.B. subarachnoidalen oder intrazerebralen Blutungen, neuroprotektiv. Sollte sich eine solche Wirkung bestätigen, könnte NMP beispielsweise als synergistisch wirkendes Lösungsmittel im Rahmen der kathetergestützten intraarteriellen Lyse zum Einsatz kommen.

## **5. Zusammenfassung und Ausblick**

Das primäre Ziel der vorliegenden Studie war es, den Effekt verschiedener, häufig verwendeter, organischer Lösungsmittel auf den sekundären Hirnschaden nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma zu untersuchen, um deren Eignung für den Einsatz als Lösungsmittel in Studien zur Neuroprotektion zu evaluieren. Es zeigte sich, dass sowohl DMSO als auch PEG-40 und Miglyol® 812 zumindest in den getesteten Dosen und bei Applikation vor der Traumainduktion keinen Einfluss auf den Sekundärschaden nehmen und daher unproblematisch als Lösungsmittel in experimentellen Studien zur Neuroprotektion eingesetzt werden können. Überraschenderweise konnte erstmalig in einer experimentellen Studie das neuroprotektive Potential des Lösungsmittels NMP belegt werden, sodass weitere

Untersuchungen zur Charakterisierung des von NMP hervorgerufenen Effektes durchgeführt wurden. Dabei konnte gezeigt werden, dass NMP das größte neuroprotektive Potential in einer Konzentration von 0,5% entfaltet und sowohl bei Applikation zeitlich vor als auch nach Traumainduktion Wirkung zeigte. NMP verringert die sekundäre Nekroseentwicklung, verbessert das neurologische Outcome der Versuchstiere und reduziert die posttraumatische Ödementwicklung. Trotz der neu gewonnenen Erkenntnisse bestehen weiterhin viele offene Fragen, welche in zukünftigen Untersuchungen adressiert werden müssen. So konnte zwar ein Einfluss von NMP auf die posttraumatische Hirnödementwicklung bei Applikation zehn Minuten vor Traumainduktion nachgewiesen werden; allerdings bleibt unklar, ob dieser Effekt auch bei Applikation zeitlich nach der Traumainduktion zu beobachten ist. Weiterhin ist zu untersuchen, ob zusätzlich zur intraperitonealen Injektion auch andere Applikationswege als Alternative in Frage kommen, was eine klinische Anwendung potentiell erleichtern könnte. Außerdem bleibt der Wirkungsmechanismus von NMP trotz einiger Hinweise weitestgehend unklar. Die Aufklärung des Wirkungsmechanismus ist ein vorrangiges Ziel zukünftiger Studien, um potentielle synergistische Effekte mit weiteren neuroprotektiven Pharmaka abschätzen zu können. Schließlich bleibt abzuwarten, ob NMP sein neuroprotektives Potential auch im Kontext anderer Schädigungen des Gehirns, wie z.B. subarachnoidalen oder intrazerebralen Blutungen, entfalten kann und ob die Wirkung im Tiermodell auch auf den Menschen übertragbar ist. Im Falle positiver Ergebnisse würden diese einen Fortschritt zur aktuell rein symptomatischen Therapie des Schädel-Hirn-Traumas darstellen; NMP könnte sowohl als (Mono-) Therapeutikum als auch als Lösungsmittel/Zusatz zu anderweitigen Medikamentenzubereitungen bei der Entwicklung einer kausalen, neuroprotektiven Therapie nach einem Schädel-Hirn-Trauma zum Einsatz kommen.

## 6. Literaturnachweise

1. Firsching, R.R., E.; Mauer, U.M.; Sakowitz, O.W.; Messing-Jünger, M.; Engelhard, K.; Schwenkreis, P.; Linn, J.; Schwerdtfeger, K. *Leitlinie Schädelhirntrauma im Erwachsenenalter*. 21.01.2016]; Update 2015:[Available from: [http://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/008-001I\\_S2e\\_Schaedelhirntrauma\\_SHT\\_Erwachsene\\_2015-12.pdf](http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/008-001I_S2e_Schaedelhirntrauma_SHT_Erwachsene_2015-12.pdf).
2. Krollner, B. and D.M. Krollner. *ICD und OPS Code-Suche*. 2016 16.04.2016]; Available from: <http://www.icd-code.de/icd/code/S06.-.html>.
3. Bundesamt, S. *Gestorbene nach ICD-10 - Sterbefälle, Sterbeziffern*. 2015 16.04.2016]; Available from: [http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/WS0100/XWD\\_PROC?XWD\\_2/2/XWD\\_CUBE.DRILL/XWD\\_30/D.946/25377](http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/WS0100/XWD_PROC?XWD_2/2/XWD_CUBE.DRILL/XWD_30/D.946/25377).
4. Rickels, E., K. von Wild, and P. Wenzlaff, [*Treatment of traumatic brain injury in Germany*]. *Unfallchirurg*, 2011. **114**(5): p. 417-23.
5. Setnik, L. and J.J. Bazarian, *The characteristics of patients who do not seek medical treatment for traumatic brain injury*. *Brain Inj*, 2007. **21**(1): p. 1-9.
6. Tagliaferri, F., et al., *A systematic review of brain injury epidemiology in Europe*. *Acta Neurochir (Wien)*, 2006. **148**(3): p. 255-68; discussion 268.
7. Faul, M., et al., *Traumatic Brain Injury in the United States: Emergency Department Visits, Hospitalizations and Deaths 2002–2006*. 2010, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Injury Prevention and Control.
8. Holm, L., et al., *Summary of the WHO Collaborating Centre for Neurotrauma Task Force on Mild Traumatic Brain Injury*. *J Rehabil Med*, 2005. **37**(3): p. 137-41.
9. Bruns, J., Jr. and W.A. Hauser, *The epidemiology of traumatic brain injury: a review*. *Epilepsia*, 2003. **44 Suppl 10**: p. 2-10.
10. Statistisches Bundesamt. *Die 10 häufigsten Todesursachen bei Kindern*. 21.01.2016]; Available from: <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/SterbefaelleKindern.html>.
11. Hawryluk, G.W.J. and G.T. Manley, *Classification of traumatic brain injury: past, present, and future*, in *Handbook of Clinical Neurology, Traumatic Brain Injury, Part I*, J. Grafman and A.M. Salazar, Editors. 2015, Elsevier B. V.
12. Teasdale, G. and B. Jennett, *Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale*. *Lancet*, 1974. **2**(7872): p. 81-4.
13. Teasdale, G., R. Knill-Jones, and J. van der Sande, *Observer variability in assessing impaired consciousness and coma*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1978. **41**(7): p. 603-10.
14. *The Brain Trauma Foundation. The American Association of Neurological Surgeons. The Joint Section on Neurotrauma and Critical Care. Glasgow coma scale score*. *J Neurotrauma*, 2000. **17**(6-7): p. 563-71.
15. Chesnut, R.M., et al., *The Brain Trauma Foundation. The American Association of Neurological Surgeons. The Joint Section on Neurotrauma and Critical Care. Glasgow coma scale score*. *J Neurotrauma*, 2000. **17**(6-7): p. 563-571.
16. Deutsche Gesellschaft für Unfallchirurgie. 25.01.2016]; Available from: [http://www.dgu-online.de/fileadmin/processed/csm\\_glasgow\\_coma\\_scale\\_0061403d5e.png](http://www.dgu-online.de/fileadmin/processed/csm_glasgow_coma_scale_0061403d5e.png).
17. Alexander, M.P., *Mild traumatic brain injury: pathophysiology, natural history, and clinical management*. *Neurology*, 1995. **45**(7): p. 1253-60.
18. Kelly, J.P. and J.H. Rosenberg, *Diagnosis and management of concussion in sports*. *Neurology*, 1997. **48**(3): p. 575-80.
19. Rimel, R.W., et al., *Disability caused by minor head injury*. *Neurosurgery*, 1981. **9**(3): p. 221-8.

20. Strich, S.J., *Lesions in the cerebral hemispheres after blunt head injury*. J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol), 1970. **4**: p. 166-71.
21. Andriessen, T.M., B. Jacobs, and P.E. Vos, *Clinical characteristics and pathophysiological mechanisms of focal and diffuse traumatic brain injury*. J Cell Mol Med, 2010. **14**(10): p. 2381-92.
22. Saul, T.G. and T.B. Ducker, *Effect of intracranial pressure monitoring and aggressive treatment on mortality in severe head injury*. J Neurosurg, 1982. **56**(4): p. 498-503.
23. Chua, K.S., et al., *A brief review of traumatic brain injury rehabilitation*. Ann Acad Med Singapore, 2007. **36**(1): p. 31-42.
24. Bondanelli, M., et al., *Occurrence of pituitary dysfunction following traumatic brain injury*. J Neurotrauma, 2004. **21**(6): p. 685-96.
25. Chang, B.S., D.H. Lowenstein, and N. Quality Standards Subcommittee of the American Academy of, *Practice parameter: antiepileptic drug prophylaxis in severe traumatic brain injury: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology*. Neurology, 2003. **60**(1): p. 10-6.
26. Wijdicks, E.F., et al., *Validation of a new coma scale: The FOUR score*. Ann Neurol, 2005. **58**(4): p. 585-93.
27. Brihaye, J., F. R., and L. S., *Report on the meeting of the W.F.N.S. neuro-traumatology Committee Brussels, 19-23 September*. Acta Neurochir, 1976. **40**: p. p. 181-186.
28. Fleischer, A.S., N.S. Payne, and G.T. Tindall, *Continuous monitoring of intracranial pressure in severe closed head injury without mass lesions*. Surg Neurol, 1976. **6**(1): p. 31-4.
29. Gerstenbrand, F. and C.H. Lucking, [*Acute traumatic brainstem lesions*]. Arch Psychiatr Nervenkr (1970), 1970. **213**(3): p. 264-81.
30. Marion, D.W., *Complications of head injury and their therapy*. Neurosurg Clin N Am, 1991. **2**(2): p. 411-24.
31. Saatman, K.E., et al., *Classification of traumatic brain injury for targeted therapies*. J Neurotrauma, 2008. **25**(7): p. 719-38.
32. Rosenfeld, J.V., R.S. Bell, and R. Armonda, *Current concepts in penetrating and blast injury to the central nervous system*. World J Surg, 2015. **39**(6): p. 1352-62.
33. Marshall, L.F., et al., *The diagnosis of head injury requires a classification based on computed axial tomography*. J Neurotrauma, 1992. **9 Suppl 1**: p. S287-92.
34. Maas, A.I., et al., *Prediction of outcome in traumatic brain injury with computed tomographic characteristics: a comparison between the computed tomographic classification and combinations of computed tomographic predictors*. Neurosurgery, 2005. **57**(6): p. 1173-82; discussion 1173-82.
35. Ghajar, J., *Traumatic brain injury*. Lancet, 2000. **356**(9233): p. 923-9.
36. Unterberg, A., A. Baethmann, and W. Lanksch, *Prevention and treatment of secondary brain damage. Clinical aspects*. Chest, 1991. **100**(3 Suppl): p. 200S-202S.
37. Currie, S., et al., *Imaging assessment of traumatic brain injury*. Postgrad Med J, 2016. **92**(1083): p. 41-50.
38. Gennarelli, T.A., et al., *Influence of the type of intracranial lesion on outcome from severe head injury*. J Neurosurg, 1982. **56**(1): p. 26-32.
39. Greenberg, M.S., *Head Trauma*, in *Handbook of Neurosurgery*. 2010, Thieme. p. 850-929.
40. McConeghy, K.W., et al., *A review of neuroprotection pharmacology and therapies in patients with acute traumatic brain injury*. CNS Drugs, 2012. **26**(7): p. 613-36.
41. Gennarelli, T.A., et al., *Diffuse axonal injury and traumatic coma in the primate*. Ann Neurol, 1982. **12**(6): p. 564-74.
42. Johnson, V.E., W. Stewart, and D.H. Smith, *Axonal pathology in traumatic brain injury*. Exp Neurol, 2013. **246**: p. 35-43.
43. Povlishock, J.T., *Pathobiology of traumatically induced axonal injury in animals and man*. Ann Emerg Med, 1993. **22**(6): p. 980-6.
44. Smith, D.H., R. Hicks, and J.T. Povlishock, *Therapy development for diffuse axonal injury*. J Neurotrauma, 2013. **30**(5): p. 307-23.

45. Tenjin, H., et al., *Positron emission tomographic studies on cerebral hemodynamics in patients with cerebral contusion*. Neurosurgery, 1990. **26**(6): p. 971-9.
46. Schroder, M.L., et al., *Focal ischemia due to traumatic contusions documented by stable xenon-CT and ultrastructural studies*. J Neurosurg, 1995. **82**(6): p. 966-71.
47. Plesnila, N., et al., *Relative cerebral blood flow during the secondary expansion of a cortical lesion in rats*. Neurosci Lett, 2003. **345**(2): p. 85-8.
48. Bouma, G.J., et al., *Ultra-early evaluation of regional cerebral blood flow in severely head-injured patients using xenon-enhanced computerized tomography*. J Neurosurg, 1992. **77**(3): p. 360-8.
49. Pires, P.W., et al., *The effects of hypertension on the cerebral circulation*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2013. **304**(12): p. H1598-614.
50. Schwarzmaier, S.M. and N. Plesnila, *Contributions of the immune system to the pathophysiology of traumatic brain injury - evidence by intravital microscopy*. Front Cell Neurosci, 2014. **8**: p. 358.
51. Plesnila, N., *The immune system in traumatic brain injury*. Curr Opin Pharmacol, 2015. **26**: p. 110-117.
52. Cherian, L., R. Hlatky, and C.S. Robertson, *Nitric oxide in traumatic brain injury*. Brain Pathol, 2004. **14**(2): p. 195-201.
53. Unterberg, A.W., et al., *Edema and brain trauma*. Neuroscience, 2004. **129**(4): p. 1021-9.
54. Hossmann, K.A., *The pathophysiology of experimental brain edema*. Neurosurg Rev, 1989. **12**(4): p. 263-80.
55. Hossmann, K.A. and F.J. Schuier, *Experimental brain infarcts in cats. I. Pathophysiological observations*. Stroke, 1980. **11**(6): p. 583-92.
56. Strong, A.J., et al., *A comparison of the effects of ischaemia on tissue flow, electrical activity and extracellular potassium ion concentration in cerebral cortex of baboons*. Biochem Soc Trans, 1977. **5**(1): p. 158-60.
57. Baethmann, A., et al., *Release of glutamate and of free fatty acids in vasogenic brain edema*. J Neurosurg, 1989. **70**(4): p. 578-91.
58. Stoffel, M., et al., *Release of excitatory amino acids in the penumbra of a focal cortical necrosis*. J Neurotrauma, 2002. **19**(4): p. 467-77.
59. Staub, F., et al., *Swelling of glial cells in lactacidosis and by glutamate: significance of Cl(-)-transport*. Brain Res, 1993. **610**(1): p. 69-74.
60. Kimelberg, H.K., S. Pang, and D.H. Treble, *Excitatory amino acid-stimulated uptake of  $^{22}\text{Na}^+$  in primary astrocyte cultures*. J Neurosci, 1989. **9**(4): p. 1141-9.
61. Ringel, F., A. Baethmann, and N. Plesnila, *Lactacidosis-induced glial cell swelling depends on extracellular  $\text{Ca}^{2+}$* . Neurosci Lett, 2006. **398**(3): p. 306-9.
62. Ringel, F., et al., *Contribution of anion transporters to the acidosis-induced swelling and intracellular acidification of glial cells*. J Neurochem, 2000. **75**(1): p. 125-32.
63. Staub, F., et al., *Effects of lactacidosis on glial cell volume and viability*. J Cereb Blood Flow Metab, 1990. **10**(6): p. 866-76.
64. Mokri, B., *The Monro-Kellie hypothesis: applications in CSF volume depletion*. Neurology, 2001. **56**(12): p. 1746-8.
65. Kellie, G., *Appearance observed in the dissection of two individuals; death from cold and congestion of the brain*. Trans Med Chir Soc Edinburgh 1824(1): p. 84.
66. Monro, A., *Observations on structure and function of the nervous system*. 1783, Edinburgh: Creech and Johnson.
67. Menon, D.K., *Procrustes, the traumatic penumbra, and perfusion pressure targets in closed head injury*. Anesthesiology, 2003. **98**(4): p. 805-7.
68. Nordstrom, C.H., et al., *Assessment of the lower limit for cerebral perfusion pressure in severe head injuries by bedside monitoring of regional energy metabolism*. Anesthesiology, 2003. **98**(4): p. 809-14.
69. Wu, H.M., et al., *Redefining the pericontusional penumbra following traumatic brain injury: evidence of deteriorating metabolic derangements based on positron emission tomography*. J Neurotrauma, 2013. **30**(5): p. 352-60.

70. Engel, D.C., et al., *Changes of cerebral blood flow during the secondary expansion of a cortical contusion assessed by 14C-iodoantipyrine autoradiography in mice using a non-invasive protocol*. J Neurotrauma, 2008. **25**(7): p. 739-53.
71. Yu, I., et al., *Glial cell-mediated deterioration and repair of the nervous system after traumatic brain injury in a rat model as assessed by positron emission tomography*. J Neurotrauma, 2010. **27**(8): p. 1463-75.
72. Wang, K., B. Liu, and J. Ma, *Research progress in traumatic brain penumbra*. Chin Med J (Engl), 2014. **127**(10): p. 1964-8.
73. Klatzo, I., *Presidential address. Neuropathological aspects of brain edema*. J Neuropathol Exp Neurol, 1967. **26**(1): p. 1-14.
74. Wahl, M., et al., *Vasomotor and permeability effects of bradykinin in the cerebral microcirculation*. Immunopharmacology, 1996. **33**(1-3): p. 257-63.
75. Alves, J.L., *Blood-brain barrier and traumatic brain injury*. J Neurosci Res, 2014. **92**(2): p. 141-7.
76. Thal, S.C. and W. Neuhaus, *The blood-brain barrier as a target in traumatic brain injury treatment*. Arch Med Res, 2014. **45**(8): p. 698-710.
77. Donkin, J.J. and R. Vink, *Mechanisms of cerebral edema in traumatic brain injury: therapeutic developments*. Curr Opin Neurol, 2010. **23**(3): p. 293-9.
78. Shlosberg, D., et al., *Blood-brain barrier breakdown as a therapeutic target in traumatic brain injury*. Nat Rev Neurol, 2010. **6**(7): p. 393-403.
79. Greenberg, M.S., *Coma*, in *Handbook of Neurosurgery*. 2010, Thieme. p. 279-288.
80. Gruber, A. and E. Knosp. *Intracranielle Massenverschiebung und Herniation am Beispiel Epiduralhämatom*. 2012; Available from: <http://www.springermedizin.at/img/db/pics/37525.jpg>.
81. Maier-Hauff, K., et al., *The kallikrein-kinin system as mediator in vasogenic brain edema. Part 2: Studies on kinin formation in focal and perifocal brain tissue*. J Neurosurg, 1984. **61**(1): p. 97-106.
82. Unterberg, A. and A.J. Baethmann, *The kallikrein-kinin system as mediator in vasogenic brain edema. Part 1: Cerebral exposure to bradykinin and plasma*. J Neurosurg, 1984. **61**(1): p. 87-96.
83. Unterberg, A., et al., *The kallikrein-kinin system as mediator in vasogenic brain edema. Part 3: Inhibition of the kallikrein-kinin system in traumatic brain swelling*. J Neurosurg, 1986. **64**(2): p. 269-76.
84. Trabold, R., et al., *The role of bradykinin B(1) and B(2) receptors for secondary brain damage after traumatic brain injury in mice*. J Cereb Blood Flow Metab, 2010. **30**(1): p. 130-9.
85. Zhang, C., J. Chen, and H. Lu, *Expression of aquaporin-4 and pathological characteristics of brain injury in a rat model of traumatic brain injury*. Mol Med Rep, 2015. **12**(5): p. 7351-7.
86. Lopez-Rodriguez, A.B., et al., *Changes in cannabinoid receptors, aquaporin 4 and vimentin expression after traumatic brain injury in adolescent male mice. Association with edema and neurological deficit*. PLoS One, 2015. **10**(6): p. e0128782.
87. Liang, F., et al., *Deletion of aquaporin-4 is neuroprotective during the acute stage of micro traumatic brain injury in mice*. Neurosci Lett, 2015. **598**: p. 29-35.
88. Slemmer, J.E., et al., *Causal role of apoptosis-inducing factor for neuronal cell death following traumatic brain injury*. Am J Pathol, 2008. **173**(6): p. 1795-805.
89. Stoffel, M., et al., *Nitric oxide in the penumbra of a focal cortical necrosis in rats*. Neurosci Lett, 2002. **324**(3): p. 201-4.
90. Cherian, L., J.C. Goodman, and C.S. Robertson, *Brain nitric oxide changes after controlled cortical impact injury in rats*. J Neurophysiol, 2000. **83**(4): p. 2171-8.
91. Rao, A.M., et al., *Fluorometric assay of nitrite and nitrate in brain tissue after traumatic brain injury and cerebral ischemia*. Brain Res, 1998. **793**(1-2): p. 265-70.
92. Sakamoto, K.I., et al., *Effects of mild hypothermia on nitric oxide synthesis following contusion trauma in the rat*. J Neurotrauma, 1997. **14**(5): p. 349-53.

93. Wada, K., et al., *Role of nitric oxide in traumatic brain injury in the rat*. J Neurosurg, 1998. **89**(5): p. 807-18.
94. Wada, K., et al., *Inducible nitric oxide synthase expression after traumatic brain injury and neuroprotection with aminoguanidine treatment in rats*. Neurosurgery, 1998. **43**(6): p. 1427-36.
95. Terpolilli, N.A., et al., *Inhaled nitric oxide reduces secondary brain damage after traumatic brain injury in mice*. J Cereb Blood Flow Metab, 2013. **33**(2): p. 311-8.
96. Terpolilli, N.A., et al., *Inhalation of nitric oxide prevents ischemic brain damage in experimental stroke by selective dilatation of collateral arterioles*. Circ Res, 2012. **110**(5): p. 727-38.
97. Stoffel, M., et al., *Role of nitric oxide in the secondary expansion of a cortical brain lesion from cold injury*. J Neurotrauma, 2001. **18**(4): p. 425-34.
98. Iadecola, C., *Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury*. Trends Neurosci, 1997. **20**(3): p. 132-9.
99. Wu, Y., *Contact pathway of coagulation and inflammation*. Thromb J, 2015. **13**: p. 17.
100. Whalen, M.J., et al., *Reduced brain edema after traumatic brain injury in mice deficient in P-selectin and intercellular adhesion molecule-1*. J Leukoc Biol, 2000. **67**(2): p. 160-8.
101. Schwarzmaier, S.M., et al., *In vivo temporal and spatial profile of leukocyte adhesion and migration after experimental traumatic brain injury in mice*. J Neuroinflammation, 2013. **10**: p. 32.
102. Johnson, V.E., et al., *Inflammation and white matter degeneration persist for years after a single traumatic brain injury*. Brain, 2013. **136**(Pt 1): p. 28-42.
103. Ramlackhansingh, A.F., et al., *Inflammation after trauma: microglial activation and traumatic brain injury*. Ann Neurol, 2011. **70**(3): p. 374-83.
104. Loane, D.J. and A. Kumar, *Microglia in the TBI brain: The good, the bad, and the dysregulated*. Exp Neurol, 2016. **275 Pt 3**: p. 316-27.
105. Manley, G., et al., *Hypotension, hypoxia, and head injury: frequency, duration, and consequences*. Arch Surg, 2001. **136**(10): p. 1118-23.
106. Struchen, M.A., et al., *The relation between acute physiological variables and outcome on the Glasgow Outcome Scale and Disability Rating Scale following severe traumatic brain injury*. J Neurotrauma, 2001. **18**(2): p. 115-25.
107. Fearnside, M.R., et al., *The Westmead Head Injury Project outcome in severe head injury. A comparative analysis of pre-hospital, clinical and CT variables*. Br J Neurosurg, 1993. **7**(3): p. 267-79.
108. Chesnut, R.M., et al., *The role of secondary brain injury in determining outcome from severe head injury*. J Trauma, 1993. **34**(2): p. 216-22.
109. Gabriel, E.J., et al., *Guidelines for prehospital management of traumatic brain injury*. J Neurotrauma, 2002. **19**(1): p. 111-74.
110. Jones, P.A., et al., *Measuring the burden of secondary insults in head-injured patients during intensive care*. J Neurosurg Anesthesiol, 1994. **6**(1): p. 4-14.
111. Stocchetti, N., A. Furlan, and F. Volta, *Hypoxemia and arterial hypotension at the accident scene in head injury*. J Trauma, 1996. **40**(5): p. 764-7.
112. Kaufman, H.H., et al., *Deep vein thrombosis and pulmonary embolism in head injured patients*. Angiology, 1983. **34**(10): p. 627-38.
113. Taylor, S.J., et al., *Prospective, randomized, controlled trial to determine the effect of early enhanced enteral nutrition on clinical outcome in mechanically ventilated patients suffering head injury*. Crit Care Med, 1999. **27**(11): p. 2525-31.
114. Borzotta, A.P., et al., *Enteral versus parenteral nutrition after severe closed head injury*. J Trauma, 1994. **37**(3): p. 459-68.
115. Young, B., et al., *Relationship between admission hyperglycemia and neurologic outcome of severely brain-injured patients*. Ann Surg, 1989. **210**(4): p. 466-72; discussion 472-3.
116. Lam, A.M., et al., *Hyperglycemia and neurological outcome in patients with head injury*. J Neurosurg, 1991. **75**(4): p. 545-51.

117. Anthony, D.C. and Y. Couch, *The systemic response to CNS injury*. Exp Neurol, 2014. **258**: p. 105-11.
118. Madden, L.K. and H.A. DeVon, *A Systematic Review of the Effects of Body Temperature on Outcome After Adult Traumatic Brain Injury*. J Neurosci Nurs, 2015. **47**(4): p. 190-203.
119. Bao, L., et al., *Fever burden is an independent predictor for prognosis of traumatic brain injury*. PLoS One, 2014. **9**(3): p. e90956.
120. Sirvent, J.M., et al., *Protective effect of intravenously administered cefuroxime against nosocomial pneumonia in patients with structural coma*. Am J Respir Crit Care Med, 1997. **155**(5): p. 1729-34.
121. Hsieh, A.H., et al., *Pneumonia following closed head injury*. Am Rev Respir Dis, 1992. **146**(2): p. 290-4.
122. Bullock, M.R., B.G. Lyeth, and J.P. Muizelaar, *Current status of neuroprotection trials for traumatic brain injury: lessons from animal models and clinical studies*. Neurosurgery, 1999. **45**(2): p. 207-17; discussion 217-20.
123. Vink, R., A.J. Nimmo, and I. Cernak, *An overview of new and novel pharmacotherapies for use in traumatic brain injury*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2001. **28**(11): p. 919-21.
124. Quinn, T.M., et al., *Decompressive craniectomy: technical note*. Acta Neurol Scand, 2011. **123**(4): p. 239-44.
125. Diedler, J., et al., *Decompressive surgery for severe brain edema*. J Intensive Care Med, 2009. **24**(3): p. 168-78.
126. Hutchinson, P.J., et al., *Trial of Decompressive Craniectomy for Traumatic Intracranial Hypertension*. N Engl J Med, 2016. **375**(12): p. 1119-30.
127. Cooper, D.J., et al., *Decompressive craniectomy in diffuse traumatic brain injury*. N Engl J Med, 2011. **364**(16): p. 1493-502.
128. Staub, F., et al., *Treatment of vasogenic brain edema with the novel Cl<sup>-</sup> transport inhibitor torasemide*. J Neurotrauma, 1994. **11**(6): p. 679-90.
129. Carswell, H.V., et al., *Neuroprotection by a selective estrogen receptor beta agonist in a mouse model of global ischemia*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **287**(4): p. H1501-4.
130. Wright, D.W., et al., *Very early administration of progesterone for acute traumatic brain injury*. N Engl J Med, 2014. **371**(26): p. 2457-66.
131. Skolnick, B.E., et al., *A clinical trial of progesterone for severe traumatic brain injury*. N Engl J Med, 2014. **371**(26): p. 2467-76.
132. Ayad, M., E. Eskioglu, and R.A. Mericle, *Onyx: a unique neuroembolic agent*. Expert Rev Med Devices, 2006. **3**(6): p. 705-15.
133. Budinich, C.S., et al., *Short and long-term motor and behavioral effects of diazoxide and dimethyl sulfoxide administration in the mouse after traumatic brain injury*. Pharmacol Biochem Behav, 2013. **108**: p. 66-73.
134. Dudeck, O., et al., *Organic solvents as vehicles for precipitating liquid embolics: a comparative angiotoxicity study with superselective injections of swine rete mirabile*. AJNR Am J Neuroradiol, 2006. **27**(9): p. 1900-6.
135. Di Giorgio, A.M., et al., *Dimethyl sulfoxide provides neuroprotection in a traumatic brain injury model*. Restor Neurol Neurosci, 2008. **26**(6): p. 501-7.
136. Nuglisch, J., et al., *Protective effect of nimodipine against ischemic neuronal damage in rat hippocampus without changing postischemic cerebral blood flow*. J Cereb Blood Flow Metab, 1990. **10**(5): p. 654-9.
137. Dudeck, O., et al., *Embolization of experimental wide-necked aneurysms with iodine-containing polyvinyl alcohol solubilized in a low-angiotoxicity solvent*. AJNR Am J Neuroradiol, 2006. **27**(9): p. 1849-55.
138. Lighthall, J.W., *Controlled cortical impact: a new experimental brain injury model*. J Neurotrauma, 1988. **5**(1): p. 1-15.
139. Groger, M., et al., *Release of bradykinin and expression of kinin B2 receptors in the brain: role for cell death and brain edema formation after focal cerebral ischemia in mice*. J Cereb Blood Flow Metab, 2005. **25**(8): p. 978-89.

140. Groger, M. and N. Plesnila, *The neuroprotective effect of 17beta-estradiol is independent of its antioxidative properties*. Brain Res, 2014. **1589C**: p. 61-67.
141. Kataoka, H., S.W. Kim, and N. Plesnila, *Leukocyte-endothelium interactions during permanent focal cerebral ischemia in mice*. J Cereb Blood Flow Metab, 2004. **24**(6): p. 668-76.
142. Vakili, A., H. Kataoka, and N. Plesnila, *Role of arginine vasopressin V1 and V2 receptors for brain damage after transient focal cerebral ischemia*. J Cereb Blood Flow Metab, 2005. **25**(8): p. 1012-9.
143. Culmsee, C., et al., *Apoptosis-inducing factor triggered by poly(ADP-ribose) polymerase and Bid mediates neuronal cell death after oxygen-glucose deprivation and focal cerebral ischemia*. J Neurosci, 2005. **25**(44): p. 10262-72.
144. Terpolilli, N.A., 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): p. 1963-75.
145. Santos, N.C., et al., *Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects*. Biochem Pharmacol, 2003. **65**(7): p. 1035-41.
146. Willhite, C.C. and P.I. Katz, *Toxicology updates. Dimethyl sulfoxide*. J Appl Toxicol, 1984. **4**(3): p. 155-60.
147. Bauwens, D., et al., *Recurrent seizure and sustained encephalopathy associated with dimethylsulfoxide-preserved stem cell infusion*. Leuk Lymphoma, 2005. **46**(11): p. 1671-4.
148. Castro, C.A., et al., *Behavioral effects of vehicles: DMSO, ethanol, Tween-20, Tween-80, and emulphor-620*. Pharmacol Biochem Behav, 1995. **50**(4): p. 521-6.
149. Cavaletti, G., et al., *Effect on the peripheral nervous system of systemically administered dimethylsulfoxide in the rat: a neurophysiological and pathological study*. Toxicol Lett, 2000. **118**(1-2): p. 103-7.
150. Chaloupka, J.C., et al., *Technical feasibility and histopathologic studies of ethylene vinyl copolymer (EVAL) using a swine endovascular embolization model*. AJNR Am J Neuroradiol, 1994. **15**(6): p. 1107-15.
151. Broadwell, R.D., M. Salcman, and R.S. Kaplan, *Morphologic effect of dimethyl sulfoxide on the blood-brain barrier*. Science, 1982. **217**(4555): p. 164-6.
152. Lopez, A.M., et al., *Topical DMSO treatment for pegylated liposomal doxorubicin-induced palmar-plantar erythrodysesthesia*. Cancer Chemother Pharmacol, 1999. **44**(4): p. 303-6.
153. Bertelli, G., et al., *Topical dimethylsulfoxide for the prevention of soft tissue injury after extravasation of vesicant cytotoxic drugs: a prospective clinical study*. J Clin Oncol, 1995. **13**(11): p. 2851-5.
154. Rivers-Auty, J. and J.C. Ashton, *Vehicles for lipophilic drugs: implications for experimental design, neuroprotection, and drug discovery*. Curr Neurovasc Res, 2013. **10**(4): p. 356-60.
155. Sampei, K., et al., *Histological changes in brain tissue and vasculature after intracarotid infusion of organic solvents in rats*. Neuroradiology, 1996. **38**(3): p. 291-4.
156. Song, Q., et al., *Rapamycin protects neurons from brain contusion-induced inflammatory reaction via modulation of microglial activation*. Mol Med Rep, 2015. **12**(5): p. 7203-10.
157. Tunes, I., et al., *Hepato- and neurotoxicity induced by thioacetamide: protective effects of melatonin and dimethylsulfoxide*. Pharmacol Res, 2005. **52**(3): p. 223-8.
158. Varma, M.R., et al., *Administration of adenosine receptor agonists or antagonists after controlled cortical impact in mice: effects on function and histopathology*. Brain Res, 2002. **951**(2): p. 191-201.
159. Yellowlees, P., C. Greenfield, and N. McIntyre, *Dimethylsulphoxide-induced toxicity*. Lancet, 1980. **2**(8202): p. 1004-6.
160. Cheney, J.A., et al., *The maxi-K channel opener BMS-204352 attenuates regional cerebral edema and neurologic motor impairment after experimental brain injury*. J Cereb Blood Flow Metab, 2001. **21**(4): p. 396-403.

161. Willson, J.E., D.E. Brown, and E.K. Timmens, *A Toxicologic Study of Dimethyl Sulfoxide*. Toxicol Appl Pharmacol, 1965. **7**: p. 104-12.
162. Worthley, E.G. and C.D. Schott, *The toxicity of four concentrations of DMSO*. Toxicol Appl Pharmacol, 1969. **15**(2): p. 275-81.
163. Caujolle, F.M., et al., *Limits of toxic and teratogenic tolerance of dimethyl sulfoxide*. Ann N Y Acad Sci, 1967. **141**(1): p. 110-26.
164. Pamuk, A.G., et al., *A contribution to the controversy over dimethyl sulfoxide toxicity: anesthesia monitoring results in patients treated with Onyx embolization for intracranial aneurysms*. Neuroradiology, 2005. **47**(5): p. 380-6.
165. Junior, A.M., et al., *Neurotoxicity associated with dimethylsulfoxide-preserved hematopoietic progenitor cell infusion*. Bone Marrow Transplant, 2008. **41**(1): p. 95-6.
166. Jacob, S.W. and R. Herschler, *Pharmacology of DMSO*. Cryobiology, 1986. **23**(1): p. 14-27.
167. Jacob, S.W. and J.C. de la Torre, *Pharmacology of dimethyl sulfoxide in cardiac and CNS damage*. Pharmacol Rep, 2009. **61**(2): p. 225-35.
168. Ikeda, Y. and D.M. Long, *Comparative effects of direct and indirect hydroxyl radical scavengers on traumatic brain oedema*. Acta Neurochir Suppl (Wien), 1990. **51**: p. 74-6.
169. Bakar, B., et al., *Evaluation of the toxicity of onyx compared with n-butyl 2-cyanoacrylate in the subarachnoid space of a rabbit model: an experimental research*. Neuroradiology, 2010. **52**(2): p. 125-34.
170. Osakada, F., et al., *Serofendic acid, a sulfur-containing diterpenoid derived from fetal calf serum, attenuates reactive oxygen species-induced oxidative stress in cultured striatal neurons*. J Pharmacol Exp Ther, 2004. **311**(1): p. 51-9.
171. Geertzen, J.H., et al., *Reflex sympathetic dystrophy: early treatment and psychological aspects*. Arch Phys Med Rehabil, 1994. **75**(4): p. 442-6.
172. Goto, I., Y. Yamamoto-Yamaguchi, and Y. Honma, *Enhancement of sensitivity of human lung adenocarcinoma cells to growth-inhibitory activity of interferon alpha by differentiation-inducing agents*. Br J Cancer, 1996. **74**(4): p. 546-54.
173. Banasik, M., et al., *The effects of organic solvents on poly(ADP-ribose) polymerase-1 activity: implications for neurotoxicity*. Acta Neurobiol Exp (Wars), 2004. **64**(4): p. 467-73.
174. Bond, G.R., S.C. Curry, and D.W. Dahl, *Dimethylsulphoxide-induced encephalopathy*. Lancet, 1989. **1**(8647): p. 1134-5.
175. Shirley, S.W., B.H. Stewart, and S. Mirelman, *Dimethyl sulfoxide in treatment of inflammatory genitourinary disorders*. Urology, 1978. **11**(3): p. 215-20.
176. Swanson, B.N., *Medical use of dimethyl sulfoxide (DMSO)*. Rev Clin Basic Pharm, 1985. **5**(1-2): p. 1-33.
177. Salim, A.S., *Allopurinol and dimethyl sulfoxide improve treatment outcomes in smokers with peptic ulcer disease*. J Lab Clin Med, 1992. **119**(6): p. 702-9.
178. Salim, A.S., *Role of oxygen-derived free radical scavengers in the management of recurrent attacks of ulcerative colitis: a new approach*. J Lab Clin Med, 1992. **119**(6): p. 710-7.
179. Salim, A.S., *Scavengers of oxygen-derived free radicals prolong survival in advanced colonic cancer. A new approach*. Tumour Biol, 1993. **14**(1): p. 9-17.
180. Salim, A.S., *A new approach to the treatment of nonsteroidal anti-inflammatory drugs induced gastric bleeding by free radical scavengers*. Surg Gynecol Obstet, 1993. **176**(5): p. 484-90.
181. Salim, A.S., *Role of free radical scavengers in the management of refractory duodenal ulceration. A new approach*. J Surg Res, 1994. **56**(1): p. 45-52.
182. Salim, A.S., *Role of oxygen-derived free radical scavengers in the treatment of recurrent pain produced by chronic pancreatitis. A new approach*. Arch Surg, 1991. **126**(9): p. 1109-14.
183. Wong, C.K. and C.S. Lin, *Remarkable response of lipid proteinosis to oral dimethyl sulfoxide*. Br J Dermatol, 1988. **119**(4): p. 541-4.

184. Rosenstein, E.D., *Topical agents in the treatment of rheumatic disorders*. Rheum Dis Clin North Am, 1999. **25**(4): p. 899-918, viii.
185. Ozkaya-Bayazit, E., et al., *Intermittent use of topical dimethyl sulfoxide in macular and papular amyloidosis*. Int J Dermatol, 1998. **37**(12): p. 949-54.
186. Hsieh, S.D., et al., *Amyloidosis presented with whitening and loss of hair which improved after dimethylsulfoxide (DMSO) treatment*. Jpn J Med, 1987. **26**(3): p. 393-5.
187. McCammon, K.A., et al., *Intravesical dimethyl sulfoxide for primary amyloidosis of the bladder*. Urology, 1998. **52**(6): p. 1136-8.
188. Iwasaki, T., et al., *A case of pulmonary amyloidosis associated with multiple myeloma successfully treated with dimethyl sulfoxide*. Acta Haematol, 1994. **91**(2): p. 91-4.
189. Ramirez, E. and S. Luza, *Dimethyl sulfoxide in the treatment of mental patients*. Ann N Y Acad Sci, 1967. **141**(1): p. 655-67.
190. Marcacci, G., et al., *DMSO-associated encephalopathy during autologous peripheral stem cell infusion: a predisposing role of preconditioning exposure to CNS-penetrating agents?* Bone Marrow Transplant, 2009. **44**(2): p. 133-5.
191. Mueller, L.P., et al., *Neurotoxicity upon infusion of dimethylsulfoxide-cryopreserved peripheral blood stem cells in patients with and without pre-existing cerebral disease*. Eur J Haematol, 2007. **78**(6): p. 527-31.
192. Otrock, Z.K., et al., *Transient global amnesia associated with the infusion of DMSO-cryopreserved autologous peripheral blood stem cells*. Haematologica, 2008. **93**(3): p. e36-7.
193. Hoyt, R., J. Szer, and A. Grigg, *Neurological events associated with the infusion of cryopreserved bone marrow and/or peripheral blood progenitor cells*. Bone Marrow Transplant, 2000. **25**(12): p. 1285-7.
194. Authier, N., et al., *Behavioural assessment of dimethylsulfoxide neurotoxicity in rats*. Toxicol Lett, 2002. **132**(2): p. 117-21.
195. Kaye, T.S., et al., *The plasma pharmacokinetics and tissue distribution of dimethyl sulfoxide in mice*. Life Sci, 1983. **33**(13): p. 1223-30.
196. Molyneux, A.J., et al., *Cerebral Aneurysm Multicenter European Onyx (CAMEO) trial: results of a prospective observational study in 20 European centers*. AJNR Am J Neuroradiol, 2004. **25**(1): p. 39-51.
197. Murayama, Y., et al., *Nonadhesive liquid embolic agent for cerebral arteriovenous malformations: preliminary histopathological studies in swine rete mirabile*. Neurosurgery, 1998. **43**(5): p. 1164-75.
198. Taki, W., et al., *A new liquid material for embolization of arteriovenous malformations*. AJNR Am J Neuroradiol, 1990. **11**(1): p. 163-8.
199. Chaloupka, J.C., et al., *A reexamination of the angiotoxicity of superselective injection of DMSO in the swine rete embolization model*. AJNR Am J Neuroradiol, 1999. **20**(3): p. 401-10.
200. Brent, J., *Current management of ethylene glycol poisoning*. Drugs, 2001. **61**(7): p. 979-88.
201. Fruijtier-Polloth, C., *Safety assessment on polyethylene glycols (PEGs) and their derivatives as used in cosmetic products*. Toxicology, 2005. **214**(1-2): p. 1-38.
202. Gad, S.C., et al., *Tolerable Levels of Nonclinical Vehicles and Formulations Used in Studies by Multiple Routes in Multiple Species With Notes on Methods to Improve Utility*. Int J Toxicol, 2016.
203. Gad, S.C., et al., *Nonclinical vehicle use in studies by multiple routes in multiple species*. Int J Toxicol, 2006. **25**(6): p. 499-521.
204. O'Neill, M.J., in *The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*. 2006, Merck and Co., Inc.: Whitehouse Station, NJ. p. p. 1306.
205. Cho, Y. and R.B. Borgens, *Polymer and nano-technology applications for repair and reconstruction of the central nervous system*. Exp Neurol, 2012. **233**(1): p. 126-44.
206. Young, B., et al., *Effects of pegorgotein on neurologic outcome of patients with severe head injury. A multicenter, randomized controlled trial*. JAMA, 1996. **276**(7): p. 538-43.

207. Muizelaar, J.P., et al., *Improving the outcome of severe head injury with the oxygen radical scavenger polyethylene glycol-conjugated superoxide dismutase: a phase II trial*. J Neurosurg, 1993. **78**(3): p. 375-82.
208. Ping, X., et al., *PEG-PDLLA micelle treatment improves axonal function of the corpus callosum following traumatic brain injury*. J Neurotrauma, 2014. **31**(13): p. 1172-9.
209. Ashiru, D.A., R. Patel, and A.W. Basit, *Polyethylene glycol 400 enhances the bioavailability of a BCS class III drug (ranitidine) in male subjects but not females*. Pharm Res, 2008. **25**(10): p. 2327-33.
210. Kwon, B.K., et al., *Magnesium chloride in a polyethylene glycol formulation as a neuroprotective therapy for acute spinal cord injury: preclinical refinement and optimization*. J Neurotrauma, 2009. **26**(8): p. 1379-93.
211. Turkoglu, O.F., et al., *Atorvastatin efficiency after traumatic brain injury in rats*. Surg Neurol, 2009. **72**(2): p. 146-52; discussion 152.
212. Parra-Blanco, A., et al., *Achieving the best bowel preparation for colonoscopy*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(47): p. 17709-26.
213. Zorzi, M., et al., *Comparison between different colon cleansing products for screening colonoscopy. A noninferiority trial in population-based screening programs in Italy*. Endoscopy, 2016.
214. Martel, M., et al., *Split-Dose Preparations Are Superior to Day-Before Bowel Cleansing Regimens: A Meta-analysis*. Gastroenterology, 2015. **149**(1): p. 79-88.
215. Chaussade, S. and M. Minic, *Comparison of efficacy and safety of two doses of two different polyethylene glycol-based laxatives in the treatment of constipation*. Aliment Pharmacol Ther, 2003. **17**(1): p. 165-72.
216. Henry-Stanley, M.J. and C.L. Wells, *Polyethylene glycol influences microbial interactions with intestinal epithelium*. Shock, 2009. **31**(4): p. 390-6.
217. Luo, J., R. Borgens, and R. Shi, *Polyethylene glycol improves function and reduces oxidative stress in synaptosomal preparations following spinal cord injury*. J Neurotrauma, 2004. **21**(8): p. 994-1007.
218. Luo, J. and R. Shi, *Diffusive oxidative stress following acute spinal cord injury in guinea pigs and its inhibition by polyethylene glycol*. Neurosci Lett, 2004. **359**(3): p. 167-70.
219. Luo, J., R. Borgens, and R. Shi, *Polyethylene glycol immediately repairs neuronal membranes and inhibits free radical production after acute spinal cord injury*. J Neurochem, 2002. **83**(2): p. 471-80.
220. Luo, J. and R. Shi, *Polyethylene glycol inhibits apoptotic cell death following traumatic spinal cord injury*. Brain Res, 2007. **1155**: p. 10-6.
221. Schulze, J.D., et al., *Concentration-dependent effects of polyethylene glycol 400 on gastrointestinal transit and drug absorption*. Pharm Res, 2003. **20**(12): p. 1984-8.
222. Pellegrini, G., et al., *Intraperitoneal administration of high doses of polyethylene glycol (PEG) causes hepatic subcapsular necrosis and low-grade peritonitis with a rise in hepatic biomarkers*. Toxicology, 2013. **314**(2-3): p. 262-6.
223. Luduena, F.P., J.K. Fellows, and et al., *Toxicity of polyethylene glycols by repeated epidermal applications*. J Ind Hyg Toxicol, 1947. **29**(6): p. 390-2.
224. Smyth, H.F., Jr., C.P. Carpenter, and C.B. Shaffer, *The toxicity of high molecular weight polyethylene glycols; chronic oral and parenteral administration*. J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc, 1947. **36**(5): p. 157-60.
225. Smyth, H.F., Jr., C.P. Carpenter, and C.S. Weil, *The chronic oral toxicology of the polyethylene glycols*. J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc, 1955. **44**(1): p. 27-30.
226. Shideman, F.E. and L. Procita, *Some pharmacological actions of polypropylene glycols of average molecular weight 400, 750, 1200 and 2000*. J Pharmacol Exp Ther, 1951. **103**(3): p. 293-305.
227. Chadwick, V.S., S.F. Phillips, and A.F. Hofmann, *Measurements of intestinal permeability using low molecular weight polyethylene glycols (PEG 400). I. Chemical analysis and biological properties of PEG 400*. Gastroenterology, 1977. **73**(2): p. 241-6.

228. Bruns, D.E., et al., *Polyethylene glycol intoxication in burn patients*. Burns Incl Therm Inj, 1982. **9**(1): p. 49-52.
229. Caravati, E.M., et al., *Ethylene glycol exposure: an evidence-based consensus guideline for out-of-hospital management*. Clin Toxicol (Phila), 2005. **43**(5): p. 327-45.
230. Descamps, C., et al., *Acute renal insufficiency after colon cleansing*. Endoscopy, 2000. **32**(2): p. S11.
231. Armstead, W.M., J. Riley, and M.S. Vavilala, *TBI sex dependently upregulates ET-1 to impair autoregulation, which is aggravated by phenylephrine in males but is abrogated in females*. J Neurotrauma, 2012. **29**(7): p. 1483-90.
232. Krause, T.L. and G.D. Bittner, *Rapid morphological fusion of severed myelinated axons by polyethylene glycol*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(4): p. 1471-5.
233. Koob, A.O. and R.B. Borgens, *Polyethylene glycol treatment after traumatic brain injury reduces beta-amyloid precursor protein accumulation in degenerating axons*. J Neurosci Res, 2006. **83**(8): p. 1558-63.
234. Koob, A.O., J.M. Colby, and R.B. Borgens, *Behavioral recovery from traumatic brain injury after membrane reconstruction using polyethylene glycol*. J Biol Eng, 2008. **2**: p. 9.
235. Koob, A.O., et al., *Intravenous polyethylene glycol inhibits the loss of cerebral cells after brain injury*. J Neurotrauma, 2005. **22**(10): p. 1092-111.
236. Borgens, R.B., *Cellular engineering: molecular repair of membranes to rescue cells of the damaged nervous system*. Neurosurgery, 2001. **49**(2): p. 370-8; discussion 378-9.
237. Borgens, R.B., R. Shi, and D. Bohnert, *Behavioral recovery from spinal cord injury following delayed application of polyethylene glycol*. J Exp Biol, 2002. **205**(Pt 1): p. 1-12.
238. Liu-Snyder, P., et al., *Neuroprotection from secondary injury by polyethylene glycol requires its internalization*. J Exp Biol, 2007. **210**(Pt 8): p. 1455-62.
239. Shi, R. and R.B. Borgens, *Anatomical repair of nerve membranes in crushed mammalian spinal cord with polyethylene glycol*. J Neurocytol, 2000. **29**(9): p. 633-43.
240. Shi, R. and R.B. Borgens, *Acute repair of crushed guinea pig spinal cord by polyethylene glycol*. J Neurophysiol, 1999. **81**(5): p. 2406-14.
241. Baptiste, D.C., et al., *Systemic polyethylene glycol promotes neurological recovery and tissue sparing in rats after cervical spinal cord injury*. J Neuropathol Exp Neurol, 2009. **68**(6): p. 661-76.
242. Borgens, R.B. and D. Bohnert, *Rapid recovery from spinal cord injury after subcutaneously administered polyethylene glycol*. J Neurosci Res, 2001. **66**(6): p. 1179-86.
243. Davidson, R.L. and P.S. Gerald, *Improved techniques for the induction of mammalian cell hybridization by polyethylene glycol*. Somatic Cell Genet, 1976. **2**(2): p. 165-76.
244. Ditor, D.S., et al., *Effects of polyethylene glycol and magnesium sulfate administration on clinically relevant neurological outcomes after spinal cord injury in the rat*. J Neurosci Res, 2007. **85**(7): p. 1458-67.
245. Mbye, L.H., et al., *Kollidon VA64, a membrane-resealing agent, reduces histopathology and improves functional outcome after controlled cortical impact in mice*. J Cereb Blood Flow Metab, 2012. **32**(3): p. 515-24.
246. Nakajima, N. and Y. Ikada, *Fusogenic activity of various water-soluble polymers*. J Biomater Sci Polym Ed, 1994. **6**(8): p. 751-9.
247. Jouyban, A., M.A. Fakhree, and A. Shayanfar, *Review of pharmaceutical applications of N-methyl-2-pyrrolidone*. J Pharm Pharm Sci, 2010. **13**(4): p. 524-35.
248. World Health Organization, *Concise International Chemical Assessment Document 35*. 2001.
249. Strickley, R.G., *Solubilizing excipients in oral and injectable formulations*. Pharm Res, 2004. **21**(2): p. 201-30.
250. Saw, C.L., et al., *Superiority of N-methyl pyrrolidone over albumin with hypericin for fluorescence diagnosis of human bladder cancer cells implanted in the chick chorioallantoic membrane model*. J Photochem Photobiol B, 2007. **86**(3): p. 207-18.

251. Reynolds, D.W., et al., *The use of N-methylpyrrolidone as a cosolvent and oxidant in pharmaceutical stress testing*. J Pharm Sci, 2012. **101**(2): p. 761-76.
252. Solanki, H.K., J.H. Thakkar, and G.K. Jani, *Recent Advances In Implantable Drug Delivery*. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, 2010. **4**(3): p. 168-177.
253. Avdeef, A., *Solubility of sparingly-soluble ionizable drugs*. Adv Drug Deliv Rev, 2007. **59**(7): p. 568-90.
254. Barry, B.W. and S.L. Bennett, *Effect of penetration enhancers on the permeation of mannitol, hydrocortisone and progesterone through human skin*. J Pharm Pharmacol, 1987. **39**(7): p. 535-46.
255. Bader, M., S.A. Keener, and R. Wrbitzky, *Dermal absorption and urinary elimination of N-methyl-2-pyrrolidone*. Int Arch Occup Environ Health, 2005. **78**(8): p. 673-6.
256. Solomon, H.M., et al., *1-Methyl-2-pyrrolidone (NMP): reproductive and developmental toxicity study by inhalation in the rat*. Drug Chem Toxicol, 1995. **18**(4): p. 271-93.
257. Keener, S.A., R. Wrbitzky, and M. Bader, *Human volunteer study on the influence of exposure duration and dilution of dermally applied N-methyl-2-pyrrolidone (NMP) on the urinary elimination of NMP metabolites*. Int Arch Occup Environ Health, 2007. **80**(4): p. 327-34.
258. Sitarek, K. and A. Kilanowicz, *Tissue distribution and excretion of N-methyl-2-pyrrolidone in male and female rats*. Int J Occup Med Environ Health, 2006. **19**(2): p. 142-8.
259. Midgley, I., et al., *Percutaneous absorption of co-administered N-methyl-2-[14C]pyrrolidinone and 2-[14C]pyrrolidinone in the rat*. Food Chem Toxicol, 1992. **30**(1): p. 57-64.
260. Akesson, B., M.A. Carnerup, and B.A. Jonsson, *Evaluation of exposure biomarkers from percutaneous absorption of N-methyl-2-pyrrolidone*. Scand J Work Environ Health, 2004. **30**(4): p. 306-12.
261. Akesson, B. and B.A. Jonsson, *Major metabolic pathway for N-methyl-2-pyrrolidone in humans*. Drug Metab Dispos, 1997. **25**(2): p. 267-9.
262. Carnerup, M.A., A.M. Saillenfait, and B.A. Jonsson, *Concentrations of N-methyl-2-pyrrolidone (NMP) and its metabolites in plasma and urine following oral administration of NMP to rats*. Food Chem Toxicol, 2005. **43**(9): p. 1441-7.
263. Ligocka, D., D. Lison, and V. Haufroid, *Contribution of CYP2E1 to N-methyl-2-pyrrolidone metabolism*. Arch Toxicol, 2003. **77**(5): p. 261-6.
264. Payan, J.P., et al., *Toxicokinetics and metabolism of N-[(14)C]N-methyl-2-pyrrolidone in male Sprague-Dawley rats: in vivo and in vitro percutaneous absorption*. Drug Metab Dispos, 2003. **31**(5): p. 659-69.
265. Bartsch, W., et al., *Acute toxicity of various solvents in the mouse and rat. LD50 of ethanol, diethylacetamide, dimethylformamide, dimethylsulfoxide, glycerine, N-methylpyrrolidone, polyethylene glycol 400, 1,2-propanediol and Tween 20*. Arzneimittelforschung, 1976. **26**(8): p. 1581-3.
266. Saillenfait, A.M., et al., *Developmental toxicity of N-methyl-2-pyrrolidone administered orally to rats*. Food Chem Toxicol, 2002. **40**(11): p. 1705-12.
267. Saillenfait, A.M., F. Gallissot, and G. Morel, *Developmental toxicity of N-methyl-2-pyrrolidone in rats following inhalation exposure*. Food Chem Toxicol, 2003. **41**(4): p. 583-8.
268. Malley, L.A., et al., *Chronic toxicity and oncogenicity of N-methylpyrrolidone (NMP) in rats and mice by dietary administration*. Drug Chem Toxicol, 2001. **24**(4): p. 315-38.
269. Malley, L.A., et al., *90-day subchronic toxicity study in rats and mice fed N-methylpyrrolidone (NMP) including neurotoxicity evaluation in rats*. Drug Chem Toxicol, 1999. **22**(3): p. 455-80.
270. Malek, D.E., et al., *Repeated dose toxicity study (28 days) in rats and mice with N-methylpyrrolidone (NMP)*. Drug Chem Toxicol, 1997. **20**(1-2): p. 63-77.
271. Lee, K.P., et al., *Toxicity of N-methyl-2-pyrrolidone (NMP): teratogenic, subchronic, and two-year inhalation studies*. Fundam Appl Toxicol, 1987. **9**(2): p. 222-35.

272. Engelhardt, G. and H. Fleig, *1-Methyl-2-pyrrolidinone (NMP) does not induce structural and numerical chromosomal aberrations in vivo*. *Mutat Res*, 1993. **298**(3): p. 149-55.
273. Bonisch, U., et al., *Volatile organic compounds enhance allergic airway inflammation in an experimental mouse model*. *PLoS One*, 2012. **7**(7): p. e39817.
274. Becci, P.J., et al., *Teratogenicity study of N-methylpyrrolidone after dermal application to Sprague-Dawley rats*. *Fundam Appl Toxicol*, 1982. **2**(2): p. 73-6.
275. van Thriel, C., et al., *Chemosensory effects during acute exposure to N-methyl-2-pyrrolidone (NMP)*. *Toxicol Lett*, 2007. **175**(1-3): p. 44-56.
276. Haufroid, V., et al., *Biological monitoring and health effects of low-level exposure to N-methyl-2-pyrrolidone: a cross-sectional study*. *Int Arch Occup Environ Health*, 2014. **87**(6): p. 663-74.
277. Mortelmans, K., et al., *Salmonella mutagenicity tests: II. Results from the testing of 270 chemicals*. *Environ Mutagen*, 1986. **8 Suppl 7**: p. 1-119.
278. Wells, D.A., H.F. Thomas, and G.A. Digenis, *Mutagenicity and cytotoxicity of N-methyl-2-pyrrolidinone and 4-(methylamino)butanoic acid in the Salmonella/microsome assay*. *J Appl Toxicol*, 1988. **8**(2): p. 135-9.
279. Flick, B., et al., *Embryotoxic potential of N-methyl-pyrrolidone (NMP) and three of its metabolites using the rat whole embryo culture system*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009. **237**(2): p. 154-67.
280. Hass, U., B.M. Jakobsen, and S.P. Lund, *Developmental toxicity of inhaled N-methylpyrrolidone in the rat*. *Pharmacol Toxicol*, 1995. **76**(6): p. 406-9.
281. Hass, U., S.P. Lund, and J. Elsner, *Effects of prenatal exposure to N-methylpyrrolidone on postnatal development and behavior in rats*. *Neurotoxicol Teratol*, 1994. **16**(3): p. 241-9.
282. Sitarek, K. and J. Stetkiewicz, *Assessment of reproductive toxicity and gonadotoxic potential of N-methyl-2-pyrrolidone in male rats*. *Int J Occup Med Environ Health*, 2008. **21**(1): p. 73-80.
283. Sitarek, K., J. Stetkiewicz, and W. Wasowicz, *Evaluation of reproductive disorders in female rats exposed to N-methyl-2-pyrrolidone*. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 2012. **95**(3): p. 195-201.
284. Solomon, G.M., et al., *Stillbirth after occupational exposure to N-methyl-2-pyrrolidone. A case report and review of the literature*. *J Occup Environ Med*, 1996. **38**(7): p. 705-13.
285. Saillenfait, A.M., J.P. Sabate, and F. Gallissot, *Comparative developmental toxicities of the three major metabolites of N-methyl-2-pyrrolidone after oral administration in rats*. *J Appl Toxicol*, 2007. **27**(6): p. 571-81.
286. Ghayor, C., et al., *N-methyl pyrrolidone (NMP) inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation by suppressing NF-kappaB signaling*. *Inflamm Res*, 2015. **64**(7): p. 527-36.
287. Miguel, B.S., et al., *N-methyl pyrrolidone as a potent bone morphogenetic protein enhancer for bone tissue regeneration*. *Tissue Eng Part A*, 2009. **15**(10): p. 2955-63.
288. Ghayor, C., et al., *Inhibition of osteoclast differentiation and bone resorption by N-methylpyrrolidone*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(27): p. 24458-66.
289. Gjoksi, B., et al., *The epigenetically active small chemical N-methyl pyrrolidone (NMP) prevents estrogen depletion induced osteoporosis*. *Bone*, 2015. **78**: p. 114-21.
290. Shortt, J., et al., *The drug vehicle and solvent N-methylpyrrolidone is an immunomodulator and antimyeloma compound*. *Cell Rep*, 2014. **7**(4): p. 1009-19.
291. Traul, K.A., et al., *Review of the toxicologic properties of medium-chain triglycerides*. *Food Chem Toxicol*, 2000. **38**(1): p. 79-98.
292. Atanase, L.I. and G. Riess, *Block copolymer stabilized nonaqueous biocompatible sub-micron emulsions for topical applications*. *Int J Pharm*, 2013. **448**(2): p. 339-45.
293. Bondi, M.L., et al., *Lipid nanocarriers containing sorafenib inhibit colonies formation in human hepatocarcinoma cells*. *Int J Pharm*, 2015. **493**(1-2): p. 75-85.
294. Liu, D., et al., *In vitro and in vivo evaluation of a water-in-oil microemulsion system for enhanced peptide intestinal delivery*. *AAPS J*, 2013. **15**(1): p. 288-98.

295. Le Bars, G., et al., *Oral toxicity of Miglyol 812((R)) in the Gottingen((R)) minipig*. Regul Toxicol Pharmacol, 2015. **73**(3): p. 930-7.
296. von Corswant, C., P. Thoren, and S. Engstrom, *Triglyceride-based microemulsion for intravenous administration of sparingly soluble substances*. J Pharm Sci, 1998. **87**(2): p. 200-8.
297. Nanjwade, B.K., et al., *Functions of lipids for enhancement of oral bioavailability of poorly water-soluble drugs*. Sci Pharm, 2011. **79**(4): p. 705-27.
298. Watkinson, R.M., et al., *Optimisation of cosolvent concentration for topical drug delivery III--influence of lipophilic vehicles on ibuprofen permeation*. Skin Pharmacol Physiol, 2011. **24**(1): p. 22-6.
299. Sellers, R.S., et al., *Effects of miglyol 812 on rats after 4 weeks of gavage as compared with methylcellulose/tween 80*. Drug Chem Toxicol, 2005. **28**(4): p. 423-32.
300. Hill, J.O., et al., *Changes in blood lipids during six days of overfeeding with medium or long chain triglycerides*. J Lipid Res, 1990. **31**(3): p. 407-16.
301. Hopman, W.P., et al., *Effect of equimolar amounts of long-chain triglycerides and medium-chain triglycerides on plasma cholecystokinin and gallbladder contraction*. Am J Clin Nutr, 1984. **39**(3): p. 356-9.
302. Verkijk, M., et al., *Effects of medium-chain and long-chain triglycerides on antroduodenal motility and small bowel transit time in man*. Dig Dis Sci, 1997. **42**(9): p. 1933-9.
303. Zweckberger, K., et al., *Effect of early and delayed decompressive craniectomy on secondary brain damage after controlled cortical impact in mice*. J Neurotrauma, 2006. **23**(7): p. 1083-93.
304. Zweckberger, K. and N. Plesnila, *Anatibant, a selective non-peptide bradykinin B2 receptor antagonist, reduces intracranial hypertension and histopathological damage after experimental traumatic brain injury*. Neurosci Lett, 2009. **454**(2): p. 115-7.
305. Zweckberger, K., et al., *Effect of decompression craniotomy on increase of contusion volume and functional outcome after controlled cortical impact in mice*. J Neurotrauma, 2003. **20**(12): p. 1307-14.
306. Meissner, L., et al., *Temporal Profile of MicroRNA Expression in Contused Cortex after Traumatic Brain Injury in Mice*. J Neurotrauma, 2015.
307. Rauen, K., et al., *Arginine vasopressin V1a receptor-deficient mice have reduced brain edema and secondary brain damage following traumatic brain injury*. J Neurotrauma, 2013. **30**(16): p. 1442-8.
308. Schwarzmaier, S.M., M. Gallozzi, and N. Plesnila, *Identification of the Vascular Source of Vasogenic Brain Edema following Traumatic Brain Injury Using In Vivo 2-Photon Microscopy in Mice*. J Neurotrauma, 2015. **32**(13): p. 990-1000.
309. Schwarzmaier, S.M., et al., *Temporal profile of thrombogenesis in the cerebral microcirculation after traumatic brain injury in mice*. J Neurotrauma, 2010. **27**(1): p. 121-30.
310. Mannix, R., et al., *Sex differences in the effect of progesterone after controlled cortical impact in adolescent mice: a preliminary study*. J Neurosurg, 2014. **121**(6): p. 1337-41.
311. Hager, H., *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis: Folgeband 1: Waren und Dienste*. 2013, Springer Verlag. p. 554-555.
312. Kleiber, M., *Metabolic turnover rate: a physiological meaning of the metabolic rate per unit body weight*. J Theor Biol, 1975. **53**(1): p. 199-204.
313. West, G.B. and J.H. Brown, *The origin of allometric scaling laws in biology from genomes to ecosystems: towards a quantitative unifying theory of biological structure and organization*. J Exp Biol, 2005. **208**(Pt 9): p. 1575-92.
314. Wang, H.C., et al., *Where are we in the modelling of traumatic brain injury? Models complicated by secondary brain insults*. Brain Inj, 2014. **28**(12): p. 1491-503.
315. Zhang, Y.P., et al., *Traumatic brain injury using mouse models*. Transl Stroke Res, 2014. **5**(4): p. 454-71.
316. Lighthall, J.W., C.E. Dixon, and T.E. Anderson, *Experimental models of brain injury*. J Neurotrauma, 1989. **6**(2): p. 83-97.

317. Krieg, S.M., et al., *Effect of small molecule vasopressin V1a and V2 receptor antagonists on brain edema formation and secondary brain damage following traumatic brain injury in mice*. J Neurotrauma, 2015. **32**(4): p. 221-7.
318. Trabold, R., et al., *Role of vasopressin V(1a) and V2 receptors for the development of secondary brain damage after traumatic brain injury in mice*. J Neurotrauma, 2008. **25**(12): p. 1459-65.
319. von Baumgarten, L., et al., *Role of cortical spreading depressions for secondary brain damage after traumatic brain injury in mice*. J Cereb Blood Flow Metab, 2008. **28**(7): p. 1353-60.
320. Dietrich, W.D. and H.M. Bramlett, *The evidence for hypothermia as a neuroprotectant in traumatic brain injury*. Neurotherapeutics, 2010. **7**(1): p. 43-50.
321. Sahuquillo, J. and A. Vilalta, *Cooling the injured brain: how does moderate hypothermia influence the pathophysiology of traumatic brain injury*. Curr Pharm Des, 2007. **13**(22): p. 2310-22.
322. Urbano, L.A. and M. Oddo, *Therapeutic hypothermia for traumatic brain injury*. Curr Neurol Neurosci Rep, 2012. **12**(5): p. 580-91.
323. Christian, E., et al., *A review of selective hypothermia in the management of traumatic brain injury*. Neurosurg Focus, 2008. **25**(4): p. E9.
324. Marmarou, A., et al., *A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics*. J Neurosurg, 1994. **80**(2): p. 291-300.
325. Kotapka, M.J., et al., *Selective vulnerability of hippocampal neurons in acceleration-induced experimental head injury*. J Neurotrauma, 1991. **8**(4): p. 247-58.
326. Marmarou, A., et al., *Contribution of edema and cerebral blood volume to traumatic brain swelling in head-injured patients*. J Neurosurg, 2000. **93**(2): p. 183-93.
327. Kroppenstedt, S.N., et al., *Effect of cerebral perfusion pressure on contusion volume following impact injury*. J Neurosurg, 1999. **90**(3): p. 520-6.
328. Trabold, R., et al., *Arterial hypotension triggers perifocal depolarizations and aggravates secondary damage in focal brain injury*. Brain Res, 2006. **1071**(1): p. 237-44.
329. Plesnila, N., et al., *Delayed neuronal death after brain trauma involves p53-dependent inhibition of NF-kappaB transcriptional activity*. Cell Death Differ, 2007. **14**(8): p. 1529-41.
330. Budinger, T.F., D.A. Benaron, and A.P. Koretsky, *Imaging transgenic animals*. Annu Rev Biomed Eng, 1999. **1**: p. 611-48.
331. Koretsky, A.P., *New developments in magnetic resonance imaging of the brain*. NeuroRx, 2004. **1**(1): p. 155-64.
332. Milidonis, X., et al., *Magnetic resonance imaging in experimental stroke and comparison with histology: systematic review and meta-analysis*. Stroke, 2015. **46**(3): p. 843-51.
333. Kimbler, D.E., et al., *Activation of P2X7 promotes cerebral edema and neurological injury after traumatic brain injury in mice*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e41229.
334. Stahel, P.F., et al., *Experimental closed head injury: analysis of neurological outcome, blood-brain barrier dysfunction, intracranial neutrophil infiltration, and neuronal cell death in mice deficient in genes for pro-inflammatory cytokines*. J Cereb Blood Flow Metab, 2000. **20**(2): p. 369-80.
335. Shohami, E., M. Novikov, and R. Bass, *Long-term effect of HU-211, a novel non-competitive NMDA antagonist, on motor and memory functions after closed head injury in the rat*. Brain Res, 1995. **674**(1): p. 55-62.
336. Chen, Y., et al., *An experimental model of closed head injury in mice: pathophysiology, histopathology, and cognitive deficits*. J Neurotrauma, 1996. **13**(10): p. 557-68.
337. Branchi, I. and L. Ricceri, *Refining learning and memory assessment in laboratory rodents. An ethological perspective*. Ann Ist Super Sanita, 2004. **40**(2): p. 231-6.
338. de la Torre, J.C., *Treatment of head injury in mice, using a fructose 1,6-diphosphate and dimethyl sulfoxide combination*. Neurosurgery, 1995. **37**(2): p. 273-9.

339. Bardutzky, J., et al., *Effects of intravenous dimethyl sulfoxide on ischemia evolution in a rat permanent occlusion model*. J Cereb Blood Flow Metab, 2005. **25**(8): p. 968-77.
340. de la Torre, J.C., et al., *Dimethyl sulfoxide in central nervous system trauma*. Ann N Y Acad Sci, 1975. **243**: p. 362-89.
341. Little, J.R., A. Cook, and R.P. Lesser, *Treatment of acute focal cerebral ischemia with dimethyl sulfoxide*. Neurosurgery, 1981. **9**(1): p. 34-9.
342. Little, J.R., et al., *Ineffectiveness of DMSO in treating experimental brain ischemia*. Ann N Y Acad Sci, 1983. **411**: p. 269-77.
343. Plesnila, N., et al., *Role of bradykinin B2 receptors in the formation of vasogenic brain edema in rats*. J Neurotrauma, 2001. **18**(10): p. 1049-58.
344. Stoffel, M., et al., *The effect of dietary alpha-tocopherol on the experimental vasogenic brain edema*. J Neurotrauma, 1997. **14**(5): p. 339-48.
345. Feeney, D.M., et al., *Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat*. Brain Res, 1981. **211**(1): p. 67-77.
346. Modi, N.J., M. Agrawal, and V.D. Sinha, *Post-traumatic subarachnoid hemorrhage: A review*. Neurol India, 2016. **64 Suppl**: p. S8-S13.
347. Izzy, S. and S. Muehlschlegel, *Cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage and traumatic brain injury*. Curr Treat Options Neurol, 2014. **16**(1): p. 278.
348. Kramer, D.R., et al., *Cerebral vasospasm in traumatic brain injury*. Neurol Res Int, 2013. **2013**: p. 415813.
349. Grunsfeld, A., J.J. Fletcher, and B.R. Nathan, *Cardiopulmonary complications of brain injury*. Curr Neurol Neurosci Rep, 2005. **5**(6): p. 488-93.
350. Xiong, Y., et al., *Mitochondrial dysfunction after experimental traumatic brain injury: combined efficacy of SNX-111 and U-101033E*. J Neurotrauma, 1998. **15**(7): p. 531-44.
351. Hayes, R.L., et al., *Pretreatment with phencyclidine, an N-methyl-D-aspartate antagonist, attenuates long-term behavioral deficits in the rat produced by traumatic brain injury*. J Neurotrauma, 1988. **5**(4): p. 259-74.
352. Faden, A.I., A.E. Takemori, and P.S. Portoghesi, *Kappa-selective opiate antagonist nor-binaltorphimine improves outcome after traumatic spinal cord injury in rats*. Cent Nerv Syst Trauma, 1987. **4**(4): p. 227-37.
353. Tehranian, R., et al., *Improved recovery and delayed cytokine induction after closed head injury in mice with central overexpression of the secreted isoform of the interleukin-1 receptor antagonist*. J Neurotrauma, 2002. **19**(8): p. 939-51.
354. Lucas, S.M., N.J. Rothwell, and R.M. Gibson, *The role of inflammation in CNS injury and disease*. Br J Pharmacol, 2006. **147 Suppl 1**: p. S232-40.
355. Zhao, Z., et al., *Neuroprotective effects of geranylgeranylacetone in experimental traumatic brain injury*. J Cereb Blood Flow Metab, 2013. **33**(12): p. 1897-908.
356. Clausen, F., et al., *Neutralization of interleukin-1beta modifies the inflammatory response and improves histological and cognitive outcome following traumatic brain injury in mice*. Eur J Neurosci, 2009. **30**(3): p. 385-96.
357. Morganti, J.M., et al., *CCR2 antagonism alters brain macrophage polarization and ameliorates cognitive dysfunction induced by traumatic brain injury*. J Neurosci, 2015. **35**(2): p. 748-60.
358. Hall, E.D., R.A. Vaishnav, and A.G. Mustafa, *Antioxidant therapies for traumatic brain injury*. Neurotherapeutics, 2010. **7**(1): p. 51-61.
359. Taylor, J.M., et al., *Neuroglobin overexpression improves sensorimotor outcomes in a mouse model of traumatic brain injury*. Neurosci Lett, 2014. **577**: p. 125-9.
360. Miyamoto, K., et al., *Therapeutic time window for edaravone treatment of traumatic brain injury in mice*. Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 379206.
361. Mustafa, A.G., et al., *Mitochondrial protection after traumatic brain injury by scavenging lipid peroxyl radicals*. J Neurochem, 2010. **114**(1): p. 271-80.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

2-HMSI	2-Hydroxy-N-Methysucinimid
5-HNMP	5-Hydroxy-N-Methyl-2-Pyrrolidon
Abb.	Abbildung
AIF	Apoptosis Inducing Factor, Apoptose induzierender Faktor
al.	altera
BMP	Bone Morphogenic Protein
bzw.	beziehungsweise
CBF	Cerebral Blood Flow, Hirndurchblutung
CCI	Controlled Cortical Impact
COX-2	Cyclooxygenase 2
CPP	Cerebral Perfusion Pressure, zerebraler Perfusionsdruck
DMSO	Dimethylsulfoxid
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
EVD	externe Ventrikeldrainage
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FDP	Fruktose 1,6-bisphosphat
GCS	Glasgow Coma Scale
ICP	Intracranial Pressure, intrakranieller Druck
I-PVA	iodhaltiger Polyvinylalkohol
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
KG	Körpergewicht
LD <sub>50</sub>	Letale Dosis, bei der 50% der Versuchstiere versterben

MAP	Mean Arterial Pressure, mittlerer arterieller Blutdruck
mPEG-PDLLA	Monomethoxy - Poly(Ethylenglykol) - Poly(D, L-Laktat)
MSI	N-Methylsuccinimid
NFκB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NMDA	<i>N</i> -Methyl- <i>D</i> -Aspartat
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NSS	Neurological Severity Score
PBS	Phosphate Buffered Saline, phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PEG	Polyethylenglykol
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
vgl.	vergleiche

## 8. Bereits veröffentlichte Aspekte der Arbeit

### 8.1 Vorträge

- 11/2015 *“1-N-2-Methyl-Pyrrolidon (NMP), ein klinisch verwendetes organisches Lösungsmittel, senkt den sekundären Hirnschaden nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma”*
41. Jahrestagung der Sektion Intrakranieller Druck, Hirndurchblutung und Hydrozephalus der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (Gießen, 6. November 2015)

## 9. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Johannes Walter

Geburtsdatum: 22.01.1990

Nationalität: Deutsch

Email: johannes.walter@med.uni-heidelberg.de

Sprachen: Deutsch (Muttersprache)

Englisch (verhandlungssicher)

Latein (Latinum)

### Berufstätigkeit

seit 04/2016 Assistenzarzt der Neurochirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Heidelberg

## **Ausbildung**

2015	3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note „gut“)
2014	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note „sehr gut“)
2011	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note „gut“)
2009 - 2015	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
2008 - 2009	Zivildienstleistender in der chirurgischen Abteilung des St. Joseph Krankenhauses Haan
2008	Abitur (Note 1,1)
2006 - 2008	Gymnasium Hochdahl, Erkrath
2005 - 2006	Schüleraustausch an der Selkirk Secondary School, Kimberley, British Columbia, Kanada
1999 - 2005	Gymnasium Hochdahl, Erkrath
1998 - 1999	Städtische Gemeinschaftsgrundschule Unterfeldhaus, Erkrath
1996 - 1998	Grundschule Stormstraße, Magdeburg

## **Praktika**

06/2015 - 10/2015	PJ-Tertial „Chirurgie“ in der Klinik für Allgemeine, Viszeral-, Transplantations-, Gefäß- und Thoraxchirurgie am Klinikum der Universität München
03/2015 - 06/2015	PJ-Wahltertial in der Neurochirurgischen Klinik des Universitätsspitals Zürich
11/2014 - 03/2015	PJ-Tertial „Innere Medizin“ im Sana Hanse Klinikum Wismar

09/2013 - 10/2013	Famulatur in der Neurochirurgischen Klinik des Kantonsspitals St. Gallen
02/2013 - 03/2013	Famulatur in der Nothilfe der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Murnau
08/2012 - 09/2012	Famulatur in der Neurochirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Großhadern, München
02/2012 - 03/2012	Famulatur in der Abteilung für Radiologie und Nuklearmedizin des Klinikums Dritter Orden, München

### **Sonstige Tätigkeiten**

10/2013 - 07/2014	Mitglied des Studentenvertreterteams von „Arzt und Zukunft“, einem Projekt, in dessen Rahmen ein Businessplan zur Eröffnung einer eigenen Praxis erstellt wird
10/2012 - 02/2013	Teamleader beim Projekt „Arzt und Zukunft“
seit 10/2012	Doktorand in der Arbeitsgruppe für vaskuläre/traumatologische Neurochirurgie im Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin, München
11/2009 - 10/2014	OP-Assistent in der Abteilung für Orthopädische Chirurgie und Unfall-/Wiederherstellungschirurgie des Klinikums Dritter Orden

## 10.Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt folgenden Personen, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre:

**Prof. Dr. med. M. Dichgans** für die freundliche Aufnahme in sein Institut.

**Prof. Dr. med. U. Pohl** für die freundliche Aufnahme in sein Institut.

**Prof. Dr. med. Nikolaus Plesnila** für die Überlassung des Themas und die exzellente Betreuung; ich denke, besser kann man die Rolle als Doktorvater wissenschaftlich, aber vor allem auch menschlich nicht ausfüllen.

**Dr. med. N. Terpolilli** für ihre grenzenlose Geduld und ihren unermüdlichen Einsatz. Was für Nick als Doktorvater gilt für dich als Betreuerin: es geht nicht besser. Ich bin stolz und dankbar, Teil dieser Arbeitsgruppe zu sein.

**Uta Mamrak und Nicole Heumos** für ihre Unterstützung in labortechnischen Fragen.

**Dr. rer. biol. hum. Dipl. Phys. Jürgen Peters** für die eine oder andere Rettungsaktion am Computer.

**Ari Dienel**, dem frisch gebackenen Herrn Doktor, für viele Diskussionen über den Sinn des Lebens.

**Meiner Familie**, die mir das Medizinstudium ermöglicht hat und in allen Lagen bedingungslos hinter mir steht.

**Sabine und Bernd Kuhlin**, die mir eine stete Motivationsquelle sind.

Meinem Bruder im Herzen, **Manuel Kuhlin**, für die geduldige Hilfe beim Layout.

Schließlich der wichtigsten Person in meinem Leben: meiner Partnerin, **Beatrice Kuhlin**, ohne die ich nicht der Mensch wäre, der ich bin.

# Eidesstattliche Versicherung

**Walter, Johannes**

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Effekt organischer Lösungsmittel auf den sekundären Hirnschaden nach  
experimentellem Schädel-Hirn-Trauma**

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.

Wannheim 13.11.17

Ort, Datum