

Aus der Klinik für Anaesthesiologie der Technischen Universität München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. E. Kochs),

aus dem Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der
Technischen Universität München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. B. Gänsbacher)

Angefertigt unter der Leitung von Herrn Univ.-Prof. Dr. med. C. Werner

und dem Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie
am Institut für Tierpathologie
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. vet. W. Schmahl)

**Der dosisabhängige Einfluss von Propofol auf den histopathologischen
Frühschaden und die Aktivierung des neuronalen Apoptosemarkers
Caspase-3 im Gehirn der Ratte nach kontrolliertem zerebralen Trauma**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Kerstin Heimann
aus
Schondorf
München, 2005

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
Referent: Univ.-Prof. Dr. W. Schmahl
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. B. Kaspers

Tag der Promotion: 15.Juli 2005

Meiner Mutter und meinem Bruder und in Erinnerung an meinen Vater

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	7
2.	Schriftum.....	9
2.1	Nervensystem.....	9
2.1.1	Anatomie des Gehirns.....	10
2.1.2	Stoffwechsel des Gehirns.....	10
2.1.3	Blutversorgung des Gehirns.....	11
2.1.4	Hippokampus.....	13
2.1.5	Kortex.....	14
2.2	Schädel-Hirn-Trauma.....	17
2.2.1	Tiermodelle zum Schädel-Hirn-Trauma.....	19
2.2.2	Pathophysiologie des Schädel-Hirn-Traumas.....	25
	Nekrose und Apoptose.....	29
	Hämatom und Ödem.....	34
2.2.3	Therapieformen nach SHT.....	37
2.3	Propofol.....	41
2.3.1	Allgemeine Informationen.....	41
2.3.2	Pharmakokinetik.....	41
2.3.3	Pharmakodynamik.....	42
2.3.4	Einsatz in der Medizin.....	42
2.3.5	Neuroprotektives Potential von Propofol.....	44
2.4	Halothan.....	47
2.4.1	Allgemeine Informationen.....	47
2.4.2	Pharmakokinetik.....	47
2.4.3	Pharmakodynamik.....	48
2.5	Elektroenzephalographie (EEG).....	49
3.	Eigene Untersuchungen.....	53
3.1	Zielvorstellung.....	53
3.2	Material und Methodik.....	55
3.2.1	Versuchstiere.....	55
3.2.2	Versuchsaufbau.....	56
3.2.3	Gruppeneinteilung.....	58
3.2.4	Narkose und maschinelle Beatmung.....	60
3.2.5	Präparation der Gefäßzugänge.....	60

3.2.6	Gemessene Parameter	61
3.2.7	Schädel-Hirn-Trauma-Induktion.....	64
3.2.8	Nachbeatmung unter Versuchsnarkose.....	66
3.2.9	Probengewinnung	67
3.2.9.1	Dekapitierung.....	67
3.2.9.2	Präparation, Entnahme und Einfrieren des Gehirns.....	68
3.2.9.3	Schneiden des Gehirns	68
3.2.10	Untersuchung des Gehirns	71
3.2.10.1	Kresylviolett- (KV-) Färbung	72
3.2.10.1.1	Färbevorgang	72
3.2.10.1.2	Untersuchung mit dem Lichtmikroskop	73
3.2.10.1.3	Auswertung	74
3.2.10.2	Hämatoxylin Eosin- (HE-) Färbung.....	75
3.2.10.2.1	Färbevorgang	75
3.2.10.2.2	Untersuchung mit dem Lichtmikroskop	77
3.2.10.2.3	Auswertung.....	77
3.2.10.3	Doppelfärbung von aktivierter Caspase-3 und NeuN.....	79
3.2.10.3.1	Färbevorgang	79
3.2.10.3.2	Untersuchung mit dem Lichtmikroskop	82
3.2.10.3.3	Auswertung.....	82
3.2.11	Antikörper, Chemikalien, Geräte, Verbrauchsmaterialien und Lösungen für die histologische Untersuchung	86
3.2.12	Statistische Bewertung der Befunde	89
3.3	Ergebnisse	90
3.3.1	Physiologische Variablen während des operativen Abschnitts	91
3.3.2	Narkose	96
3.3.3	Untersuchung des Gehirns	98
3.3.3.1	Kresylviolett- (KV-) Färbung	98
3.3.3.1.1	Erfassen der Läsionsflächen und -volumen	98
3.3.3.2	Hämatoxylin Eosin- (HE-) Färbung.....	103
3.3.3.2.1	Erfassen der Läsionsflächen und -volumen	103
3.3.3.2.2	Beurteilung der Hippokampusregion.....	109
3.3.3.3	Doppelfärbung von aktivierter Caspase-3 und NeuN.....	117
3.3.3.4	Tiere mit kortikalen Einblutungen.....	119
4.	Diskussion.....	123
4.1	Diskussion der Methoden	124

4.1.1	Schädel-Hirn-Trauma-Modell.....	124
4.1.2	Läsionsvolumenbestimmung anhand der Kresylviolett- (KV-) Färbung	126
4.1.3	Hämatoxylin Eosin- (HE-) Färbung.....	128
4.1.4	Doppelfärbung von aktivierter Caspase-3 und NeuN.....	129
4.2	Diskussion der Ergebnisse	132
4.2.1	Physiologische Variablen.....	132
4.2.2	Kresylviolett- (KV-) Färbung	134
4.2.3	Hämatoxylin Eosin- (HE-) Färbung.....	136
4.2.4	Doppelfärbung von aktivierter Caspase-3 und NeuN.....	139
4.3	Abschlussbetrachtung	142
5.	Zusammenfassung.....	144
6.	Summary	145
7.	Literaturverzeichnis	146
8.	Tabellenverzeichnis	163
9.	Abbildungsverzeichnis.....	164
10.	Abkürzungsverzeichnis.....	167
11.	Danksagung.....	170
12.	Lebenslauf.....	172

1. Einleitung

In Deutschland erleiden jährlich ca. 250.000-300.000 Menschen ein Schädel-Hirn-Trauma (SHT). Es liegen aber keine exakten epidemiologischen Daten über die Häufigkeit sowie die Schwere von SHT vor. Ungefähr 10.000 Menschen sterben an den Folgen eines Schädel-Hirn-Traumas. Bei ca. 40 bis 60 % der Patienten liegen Begleitverletzungen vor. Gerade bei polytraumatisierten Unfallopfern kommt dem Ausmaß des Schädel-Hirn-Traumas die entscheidende prognostische Bedeutung zu. Vor allem junge Erwachsene stellen einen Großteil der Verletzten dar. Männer sind zwei- bis viermal häufiger betroffen als Frauen (GRAHAM et al. 1989; SCHÜTTLER et al. 1995). Zu den häufigsten Ursachen eines SHT zählen neben Verkehrsunfällen, Haus-, Sport- und Berufsunfälle. Die Letalität eines schweren SHT ist mit 30 bis 40 % als hoch anzusehen. Viele Patienten benötigen aufwendige Rehabilitationsmaßnahmen und behalten bleibende neurologische Schäden. 10 bis 20 % der Patienten sind nach einem schweren SHT dauerhaft behindert (MILLER 1993).

Bei Patienten mit einem schweren SHT hat vor allem die Qualität der Erstversorgung einen entscheidenden Einfluss auf die Prognose. In dieser Patientengruppe kann bei ungenügender Primärversorgung eine Zunahme der Letalität um das Dreifache registriert werden (SCHÜTTLER et al. 1995). Aus diesem Grund ist in den letzten Jahren versucht worden, die Therapie des SHT zu standardisieren, um eine Reduzierung der Morbidität und Mortalität zu erreichen. Verschiedene internationale und interdisziplinäre Expertengruppen (u.a. die Brain Trauma Foundation, das European Brain Injury Consortium und die European Society for Intensive Care Medicine) arbeiten an Empfehlungen mit dem Ziel der Standardisierung der Primärversorgung des Patienten mit schwerem SHT. In Deutschland wurden dazu von der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie, Anästhesiologie und Intensivmedizin die „Leitlinien zur Primärversorgung von Patienten mit SHT“ herausgegeben (JANTZEN u. PIEK 1997).

Die Wirksamkeit der Therapiemaßnahmen hängen von der erfolgreichen Intervention in die pathophysiologischen Mechanismen ab, die innerhalb der ersten Stunden nach Trauma ablaufen und von entscheidender Bedeutung für den klinischen Verlauf und das Endergebnis sind (CHERIAN et al. 1996). Studien über die letzten zwei Jahrzehnte zeigten, dass ein signifikanter Anteil des zerebral entstandenen Schadens nach einem SHT auf sekundäre autodestruktive Insulte zurückzuführen ist. So wird das Endergebnis von SHT Patienten einerseits durch das Ausmaß und die Schwere des primären Hirnsubstanzdefektes infolge des Traumas determiniert, andererseits durch den Sekundärschaden, der sich nach dem Trauma infolge extra- und intrakranieller Einflüsse manifestiert und die Prognose entscheidend

bestimmt (WERNER u. ENGELHARD 2001). Aufgrund der Tatsache, dass der Sekundärschaden erkennbar und therapierbar ist, kann die Prognose durch eine differenzierte Patientenüberwachung und eine geeignete Therapie relevant verbessert werden (WERNER u. ENGELHARD 2001).

Obwohl man die neuroprotektive Wirkung zahlreicher Medikamente im Tiermodell unter Beweis stellen konnte, hat bisher kein einziges von ihnen auch klinisch eine eindeutige Verbesserung in der humanmedizinischen Klinik erzielen können (LIGHTHALL et al. 1989). So werden viele Patienten nach einem SHT einer Allgemeinanästhesie unterzogen, auch wenn die Wirkungsmechanismen, über die die Anästhetika ihre neuroprotektive Wirkung entfalten, nicht bis ins letzte Detail verstanden sind. Anästhetika gelten trotz lebhafter Diskussionen traditionell als Baustein hirnpotektiver Konzepte. Als neuroprotektive Mechanismen werden die verbesserte Balance zwischen Substratangebot und -bedarf, die Suppression der Sympathikusaktivität und der Krampfpotentiale, die Senkung des intrakraniellen Drucks, die Umverteilung der Hirndurchblutung zugunsten ischämischer Gefäßareale, die Hypothermie und das Abfangen freier Radikale diskutiert.

Propofol reduziert ähnlich wie volatile Anästhetika und Barbiturate die neuronale Aktivität und den Hirnstoffwechsel. Inwieweit Propofol tatsächlich zur Hirnprotektion geeignet ist, kann trotz ermutigender laborexperimenteller Befunde bis zum heutigen Tag nicht abschließend beurteilt werden (WERNER 2000a).

Um weitere Erkenntnisse über das Anästhetikum Propofol und über sein möglicherweise neuroprotektives Potential nach einem SHT zu erlangen, kommt in der vorliegenden Studie das *Controlled-cortical-impact-* (CCI-) Modell an der Ratte zum Einsatz, das eine kontrollierte traumatische Hirnrindenkontusion verursacht. Mit Hilfe dieses Verfahrens soll der dosisabhängige Einfluss von Propofol auf den histopathologischen Schaden anhand zweier histologischer Färbemethoden und in einer immunhistochemischen Färbetechnik bestimmt werden.

2. Schriftum

2.1 Nervensystem

Die Einteilung des Nervensystems wird sowohl nach topographischen als auch nach funktionellen Kriterien vorgenommen. Nach topographischen Gesichtspunkten erfolgt die Untergliederung in das Zentralnervensystem (ZNS) sowie in das periphere Nervensystem (PNS, periphere Nerven und Ganglien). Nach funktionellen Kriterien gliedert man in das somatische (willkürliche) und in das autonome (vegetative, unwillkürliche) Nervensystem, die beide teils zum ZNS und teils zum PNS gehören. Das autonome Nervensystem gliedert sich in den Sympathikus und in den Parasympathikus, die überwiegend als Gegenspieler fungieren. Das somatische Nervensystem ermöglicht die Auseinandersetzung mit der Außenwelt (BUDRAS et al. 1996).

Das ZNS besteht aus dem Gehirn (*Encephalon*) und dem Rückenmark (*Medulla spinalis*). Seine Funktion liegt in der koordinierten Reizaufnahme, -verarbeitung und -beantwortung.

Beim anatomischen Aufbau von Gehirn und Rückenmark unterscheidet man eine graue Substanz (*Substantia grisea*) und eine weiße Substanz (*Substantia alba*). In der grauen Substanz liegen die Zellkörper der Nervenzellen, die vom Neuropil umgeben sind. Die weiße Substanz wird vor allem von den Leitungsbahnen gebildet, deren phospholipidhaltige Markscheiden auffallend weiß sind. Im Groß- und Kleinhirn liegt die graue Substanz vor allem peripher, während die weiße Substanz als Marksubstanz zentral vorkommt. Im Gegensatz dazu bildet die graue Substanz im Rückenmark die typische „Schmetterlingsfigur“ und ist vom peripheren Weiß umgeben, in dem die Leitungsbahnen vom und zum Gehirn ziehen (SILBERNAGL u. DESPOPOULOS 1991).

Histogenetisch betrachtet baut sich das Nervensystem aus zwei verschiedenen Komponenten auf:

- aus der ektodermalen nervösen Substanz, dem Nervengewebe, und
- aus dem umhüllenden Bindegewebe und den sekundär einwachsenden Blutgefäßen, beides mesodermalen Ursprungs (RÜSSE u. SINOWATZ 1991).

Das Nervengewebe selbst besteht wiederum aus zwei funktionell verschiedenen Zelltypen. Zum einen sind dies die Neurogliazellen, die Abgrenzungs- und Stoffwechselfunktionen übernehmen, zum anderen handelt es sich um die erregungsbildenden und -leitenden Nervenzellen mit ihren Fortsätzen (NICKEL et al. 1992).

2.1.1 Anatomie des Gehirns

Das Gehirn nimmt als übergeordnetes Integrations-, Koordinations- und Regulationsorgan eine zentrale Rolle im nervösen Geschehen ein. Seine Leistungsfähigkeit steht im unmittelbaren Zusammenhang mit seinem morphologischen Aufbau (NICKEL et al. 1992).

Das Gehirn liegt in der knöchernen Schädelhöhle (*Cavum crani*), die vom Kleinhirnzelt (*Tentorium cerebelli*) in eine rostrale größere für das Großhirn und in eine kaudal gelegene, kleinere Höhle für das Kleinhirn, unterteilt wird. Das gesamte Zentralnervensystem wird von drei übereinander liegenden bindegewebigen Hüllen (*Meninges*) umgeben: der harten Hirnhaut (*Dura mater*) und der weichen Hirnhaut (*Leptomeninges*), die wiederum aus der Spinnwebhaut des Gehirns (*Arachnoidea*) und der zarten Hirnhaut (*Pia mater*) besteht.

Aus Sicht der Ontogenese und der Phylogenese kann das Gehirn in fünf Hauptabschnitte unterteilt werden. Danach bilden sich während der fetalen Entwicklung kranial des Rückenmarks folgende Abschnitte aus:

- das Rautenhirn (*Rhombencephalon*) mit dem
 - Nachhirn (*Myelencephalon*) und dem
 - Hinterhirn (*Metencephalon*),
- das Mittelhirn (*Mesencephalon*),
- das Vorderhirn (*Prosencephalon*) mit dem
 - Zwischenhirn (*Diencephalon*) und dem
 - Endhirn (*Telencephalon*) (KÖNIG u. LIEBICH 1999).

2.1.2 Stoffwechsel des Gehirns

Obwohl das Gehirngewicht nur 2 % der Körpermasse beträgt, wird es von 20 % des Herzzeitvolumens durchströmt. Die starke Hirndurchblutung (50 ml Blut/100 g Gehirngewebe/min) ist Ausdruck seines hohen Energiebedarfs und für den normalen Ablauf des nervösen Geschehens von ausschlaggebender Bedeutung. Der Energiebedarf des Gehirns wird fast ausschließlich durch oxidative Phosphorylierung gedeckt. Das Gehirn verbraucht 20 % des Sauerstoffs (3 bis 5 ml Sauerstoff/100 g Gehirngewebe/min) und über ein Viertel der Glukose (31 μ mol/100 g/min) des gesamten Organismus. Das Gehirn verfügt nur über sehr geringe Energiespeicher, die bei Zirkulationsstörungen jeglicher Genese schnell verbraucht sind (KEMPSKI 1994; KEMPSKI 2000).

Der durch autoregulatorische Maßnahmen konstant gehaltene Perfusionsdruck (Differenz zwischen arteriellem und intrakraniellm Druck) ist für eine ausreichende Hirndurchblutung erforderlich (KEMPSKI 2000).

Sobald der Perfusionsdruck unter einen kritischen Schwellenwert sinkt, kann die Autoregulation nicht aufrechterhalten werden, die Durchblutung des Gehirns fällt ab (Unterbrechung der Substratzufuhr von Sauerstoff und Glukose) und der Struktur- wie auch der Funktionsstoffwechsel sistieren. Der Strukturstoffwechsel liefert die Energie, die notwendig ist, um die neuronale Integrität aufrecht zu erhalten, wie beispielsweise die Erhaltung des Membranpotentials, die Biosynthese von Proteinen und Neurotransmittern und der axonale Transport von Substanzen. Sein Anteil am Gesamtstoffwechsel beträgt 40 %. Der Funktionsstoffwechsel, der 60 % des Gesamtstoffwechsels repräsentiert, erhält die funktionelle Zelleistung d.h. die efferenten und afferenten neuronalen Prozesse (WERNER 1997).

Wenn der zerebrale Blutfluss unter 20 bis 18 ml/100 g/min sinkt, kommt es zum Erliegen des Funktionsstoffwechsels, erkennbar am isoelektrischen Elektroenzephalogramm (EEG). Morphologische Veränderungen und Zelluntergänge werden erst bei Blutflusswerten unter 12 bis 10 ml/100 g/min beobachtet. Bei Werten zwischen 12 und 18 ml/100 g/min bleibt der Strukturstoffwechsel erhalten. Im Grenzgebiet zwischen Infarkt und gesundem Gewebe entsteht eine Penumbra. Der dort entstehende temporäre Funktionsverlust ist bei Wiederherstellung des Blutflusses voll oder partiell reversibel (KEMPSKI 1994).

2.1.3 Blutversorgung des Gehirns

Die arterielle Blutversorgung des Gehirns erfolgt über den *Circulus arteriosus cerebri*, der seitlich durch die paarige *Arteria (A.) carotis interna* und kaudal von der unpaaren *A. basilaris* gespeist wird. Die *A. carotis interna* entspringt der *A. carotis communis* und steht über die *A. intercarotica caudalis* und *A. intercarotica rostralis* mit der *A. carotis interna* der Gegenseite in Verbindung. Innerhalb des *Cavum leptomeningicum* teilt sich die *A. carotis interna* beiderseits in die *A. communicans caudalis* und in die *A. cerebri rostralis* auf. Während sich die beiden *Arteriae (Aa.) communicantes caudales* mit der *A. basilaris* vereinigen, fließen die beiden *Aa. cerebri rostrales*, jedoch nicht in allen Fällen, zur gemeinsamen *A. communicans rostralis* zusammen (NICKEL et al. 1992). Hierdurch bildet sich um den Hypophysenstil an der Gehirnbasis der *Circulus arteriosus cerebri* aus. Dieser ist beim Hund geschlossen, bei den übrigen Tieren ist er spangenartig und rostral meistens

geöffnet. Aus dem *Circulus arteriosus cerebri* und der *A. basilaris* entspringen folgende Hauptäste des Gehirns:

- die *A. cerebri rostralis* (Versorgung der kranialen und medialen Abschnitte der Hemisphäre)
- die *A. cerebri media* (Vaskularisation der gesamten Lateralfläche der Hemisphäre)
- die *A. cerebri caudalis* (Durchblutung der medialen Fläche des Hinterhauptlappens)
- die *A. cerebelli rostralis* und *A. cerebelli caudalis* (Blutversorgung des Kleinhirns).

Von den großen Gefäßen, die ausschließlich an der Gehirnoberfläche verlaufen, ziehen kleine Arterien und Arteriolen senkrecht in die Gehirnsubstanz, um sich dort weiter aufzuteilen. Das Kapillarnetz in der grauen Substanz ist sehr dicht, in der weißen Substanz hingegen weitmaschiger (KÖNIG u. LIEBICH 1999).

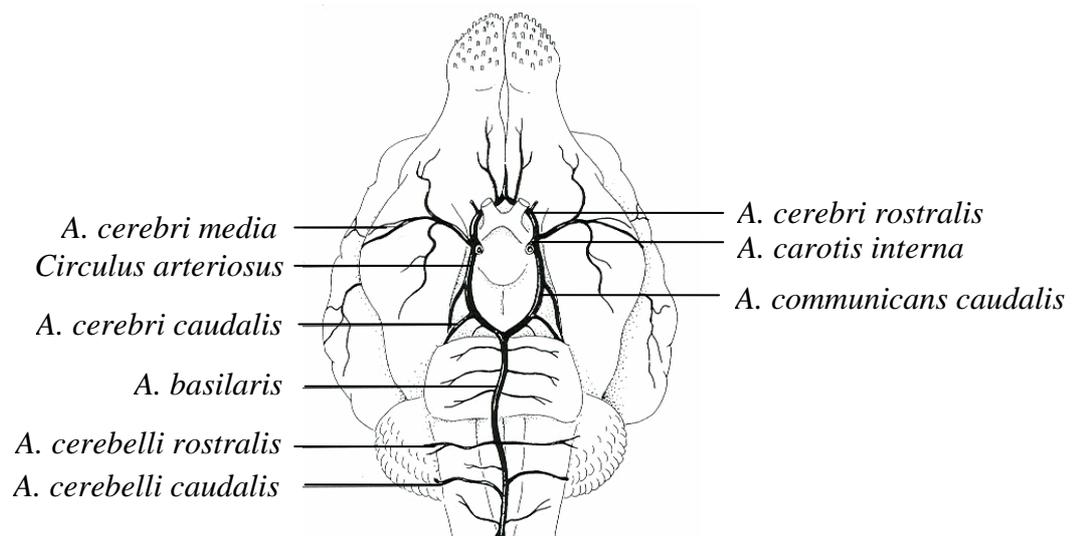


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Arterien an der Gehirnbasis in der Ventralansicht nach (BUDRAS et al. 1996).

Die Venen, die unabhängig zu den Arterien verlaufen, sind in die *Dura mater encephali* eingebettet. Aus diesem Grund besitzen sie weder eine Muskelwand noch Klappen (NICKEL et al. 1992). Man kann zwischen dorsalen, basalen und inneren Venen unterscheiden. Diese münden in die ebenfalls klappenlosen *Sinus durae matris* (Hirnbrutleiter) (KÖNIG u. LIEBICH 1999).

Man unterteilt ein dorsales und ein ventrales Hirnbrutleitersystem. Zum dorsalen System gehört der *Sinus sagittalis dorsalis*, der in der *Falx cerebri* verläuft. Er nimmt sowohl die *Venae (Vv.) cerebri dorsales* auf, wie auch die *Vena (V.) cerebri magna*, die das Blut aus

inneren Bereichen des Gehirns sammelt. Nach einer Anastomose zum ventralen System erfolgt der Übergang in die *V. maxillaris* (BUDRAS et al. 1996). Das ventrale Hirnblutleitersystem ist im Wesentlichen durch den *Sinus cavernosus* repräsentiert. Er umrandet die Hypophyse und ist mit dem distalen Ende der *A. carotis interna (Rete mirabile epidurale)* gekoppelt. Kaudal setzt sich das ventrale System in den *Sinus petrosus ventralis* fort. Dieser entlässt eine Emissionsvene zur *V. jugularis interna*, bevor er mit dem dorsalen System anastomosiert und im weiteren Verlauf über den *Sinus basilaris* in den *Plexus vertebralis internus ventralis* übergeht (KÖNIG u. LIEBICH 1999).

2.1.4 Hippokampus

Der Hippokampus ist ein Kerngebiet des limbischen Systems und besitzt hauptsächlich Verbindung zum Riechhirn. Zur Hippokampusformation gehören:

- Hippokampus oder das Ammonshorn (*Cornu ammonis*)
- *Gyrus parahippocampalis*
- *Gyrus dentatus*
- *Fimbria hippocampi* und der *Fornix* (NICKEL et al. 1992).

Entstehungsgeschichtlich gehört der Hippokampus zum *Telencephalon* und wird hier dem *Archicortex* zugerechnet. Dieser zählt zusammen mit dem *Palaeocortex* zum *Allocortex*. Im Laufe der Embryonalentwicklung entsteht der *Archicortex* auf der dorsomedialen Seite der Hemisphärenwand, dorsal von der *Fissura chorioidea*. Hier verdickt sich dessen Wand und rollt sich als Hippokampusformation (*Gyrus hippocampi*) ein. Dabei bildet sich der tiefe *Sulcus hippocampi* aus, der den *Gyrus hippocampi* vom *Gyrus dentatus* trennt. Mit der Ausweitung des *Corpus callosum* und der Ausweitung des *Telencephalon* wird der Hippokampus in den Temporallappen verlagert (RÜSSE u. SINOWATZ 1991).

Die glatte Oberfläche des Hippokampus wird erst nach Eröffnung des Seitenventrikels sichtbar. Die innere Oberfläche des Hippokampus ist von einer dünnen Markschiebt, dem Muldenblatt (*Alveus*) überzogen, das sich am medialen Rand freimacht und in das Adergeflecht übergeht. Nach innen können histologisch drei weitere Schichten unterschieden werden:

- *Stratum moleculare* (hier liegen Endverzweigungen afferenter Nervenfasern sowie der Spitzendendriten der großen Pyramidenzellen)
- *Stratum pyramidale* (vor allem große, dicht gelagerte Pyramidenzellen)
- *Stratum multiforme* (Schicht der polymorphen Zellen, locker verteilte kleine

Assoziationszellen)

Der *Gyrus dentatus* ist zum Teil im *Sulcus hippocampi* versenkt und sitzt im Querschnitt dem freien Ende des Hippokampus kappenartig auf. Auch er weist im Feinbau von innen nach außen drei Schichten auf:

- *Stratum moleculare* (siehe oben)
- *Stratum granulare* (kleine modifizierte Pyramidenzellen)
- *Stratum multiforme* (siehe oben)

Es ist anzunehmen, dass der *Gyrus dentatus* der Ausbreitung ihm zuströmender Erregung in der Hippokampusformation dient (NICKEL et al. 1992). Die Hippokampusformation lässt sich in die CA1-, CA2-, CA3- und die CA4-Region einteilen, die sich zwischen den oberen und unteren Ast des Gyrus dentatus schiebt.

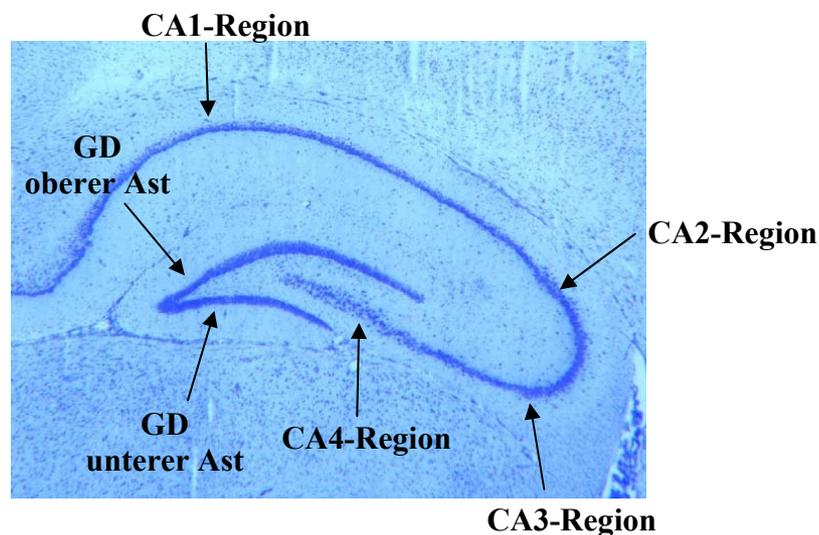


Abbildung 2: Hippokampusformation (CA1-CA4-Region) mit den Ästen des Gyrus dentatus (GD) in der Kresylviolett-Färbung (nach PAXINOS und WATSON 1998).

2.1.5 Kortex

Die Großhirnrinde (*Cortex cerebri*) überzieht, mit Ausnahme der *Lamina tectoria* der Adergeflechte, als dünne, graubräunliche Schicht die ganze Oberfläche des Hirnmantels. Sie liegt einem mächtigen weißen Marklager (*Corpus medullare cerebri*) auf. Ihre Dicke variiert sowohl regional wie auch tierartlich betrachtet unterschiedlich stark (NICKEL et al. 1992).

Der Kortex wird nach phylogenetischen Gesichtspunkten in den *Isocortex* (*Neocortex*) und in den *Allocortex* (umfasst *Pallaeocortex* und *Archicortex*) unterteilt. Der entwicklungs geschichtlich jüngere *Isocortex* weist im Feinbau sechs Schichten auf, die

embryonal immer vorhanden, postnatal sowohl weiter untergliedert als auch reduziert sein können. Von der Oberfläche zur Tiefe lassen sich folgende Schichten unterscheiden:

- *Lamina molecularis*
- *Lamina granularis externa*
- *Lamina pyramidalis externa*
- *Lamina granularis interna*
- *Lamina pyramidalis interna*
- *Lamina multiformis* (HEES u. SINOWATZ 1992)

Der *Allocortex* ist gegenüber dem *Isocortex* scharf abgegrenzt. Er unterscheidet sich entweder von diesem durch die fehlende Schichtung oder dadurch, dass er nur aus drei Schichten (z.B. Hippokampus) aufgebaut ist (NICKEL et al. 1992).

Gemäß ihrer spezifischen Zytoarchitektur werden zahlreiche Rindenfelder (*Area*) abgegrenzt (beim Mensch *Area* 1 bis 52), die teilweise für die Bezeichnung von Hirndetails herangezogen werden. Eine somatotopie Gliederung in sensomotorische Felder erfolgt nach funktionellen Gesichtspunkten. Einer bestimmten Empfindung an einer eng begrenzten Körperstelle oder einer bestimmten Bewegung von Körperteilen kann ein umschriebenes sensibles und sensorisches oder motorisches Projektionsfeld der Großhirnrinde zugeordnet werden. Die sensomotorischen Regionen der Großhirnrinde sind einerseits untereinander und andererseits mit tiefen Anteilen des Zentralnervensystems durch zu- oder abführende Bahnen des Großhirnmarks verbunden (BUDRAS et al. 1996).

Die Großhirnrinde lässt sich in die folgenden sensiblen und sensorischen bzw. motorischen Projektionsfelder und diese verbindenden Binnen- oder Assoziationsfelder einteilen (KÖNIG u. LIEBICH 1999):

- Das sensibel-sensorische Projektionsfeld schließt sich kaudal an das motorische Rindenfeld an und nimmt die kaudale Hälfte des *Gyrus postcruciatius* und den *Gyrus suprasylvius rostralis* ein. Man kann hierbei die *Area sensorica contralateralis* (empfängt Impulse von der gegenüberliegenden Körperseite) von der *Area sensorica bilateralis* (Impulswahrnehmung von beiden Körperseiten) unterscheiden. Letztere befindet sich im vorderen Schenkel des *Gyrus ectosylvius*. Neben Reizen von der Haut werden auch solche von tieferen somatischen Geweben und von den Sinnesorganen empfangen.
- Das motorische Rindenfeld (*Area motoria*) liegt rostral des sensiblen Rindenfeldes. Ungefähr die Hälfte des *Gyrus postcruciatius* und *coronalis*, sowie der ventrolaterale Abschnitt des *Gyrus praecruciatius* bis zum *Sulcus praesylvius* werden eingenommen. Die Skelettmuskulatur der Gegenseite erhält über die gekreuzten Pyramidenbahnen die Impulse zur Ausführung willkürlicher Bewegungen.

- Die Sehsphäre (*Area optica*) erstreckt sich über die mediale, zum Teil auch über die dorsolaterale Fläche des *Lobus occipitalis*.
- Die Hörsphäre (*Area acustica*) befindet sich im *Lobus temporalis*.
- Die Riechsphäre ist zusammen mit der Geschmackssphäre in der *Area olfactoria* und im *Lobus piriformis* lokalisiert.

Die Assoziationsfelder sind als größere Bezirke zwischen die Projektionsfelder eingeschoben. Reizversuche können hier keine Reaktionen auslösen (so genannte „stumme“ Rindengebiete). Ihr Umfang nimmt mit steigender Entwicklungshöhe zu. Es wird ein frontales, ein parietales und ein okzipitales Assoziationsfeld unterschieden. Sie stehen durch komplizierte Fasersysteme mit den Primärzentren der Hirnrinde in Verbindung und sorgen für deren Zusammenspiel im Dienst des Gesamtorganismus. Man kann annehmen, dass ähnlich wie beim Menschen, auch bei den Tieren das Erkennungs-, Erinnerungs- und Handlungsvermögen an diese Rindenbezirke gebunden ist (NICKEL et al. 1992).

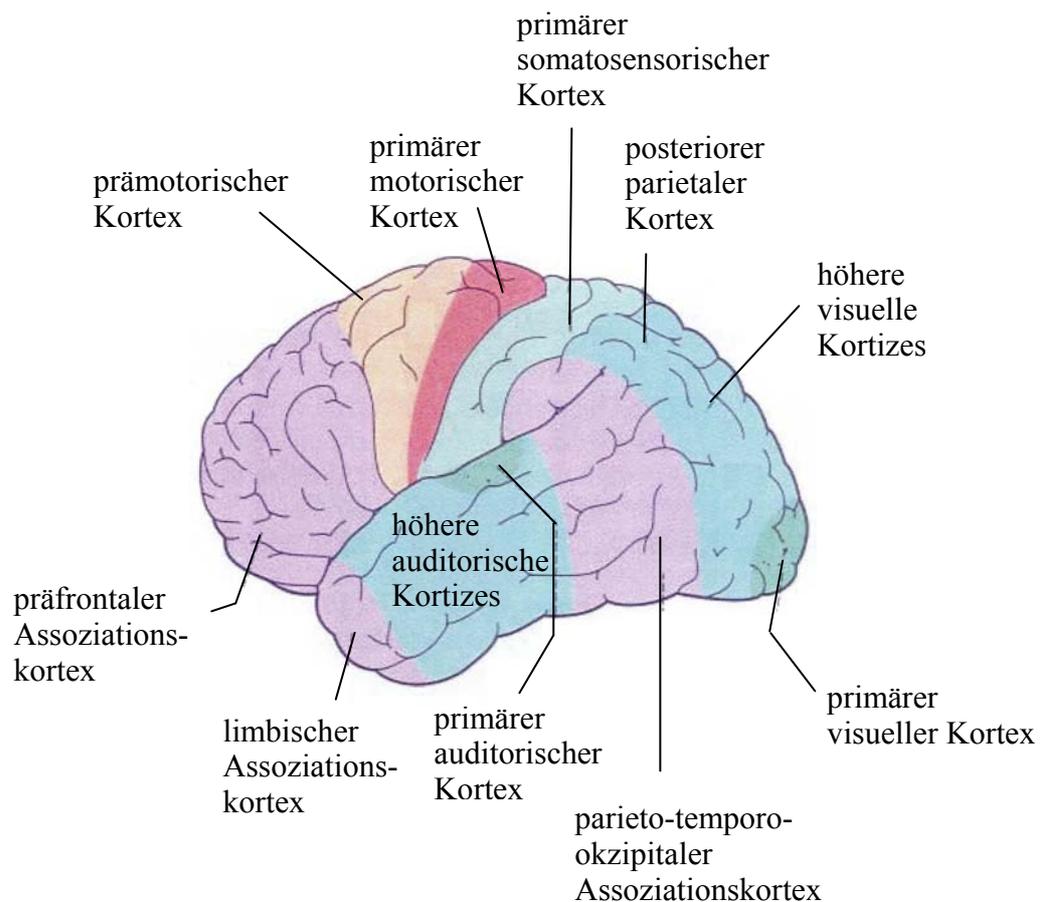


Abbildung 3: Funktionelle Gliederung der Großhirnrinde in Projektionsfelder (primäre Rindengebiete einer definierten motorischen und sensorischen Funktion) und Assoziationsfelder (violett) (Quelle Internet: www.Cortexcerebralis.de).

2.2 Schädel-Hirn-Trauma

Ein Schädel-Hirn-Trauma (SHT) liegt vor, wenn durch äußere Gewalteinwirkung die funktionelle Integrität des Gehirns gestört ist. Hierbei kann das Ausmaß der Schädigung von Weichteilen, Schädelknochen und Hirngewebe unterschiedlich stark ausgeprägt sein. Von einem geschlossenen SHT spricht man, wenn die Dura mater unversehrt ist. Ein offenes SHT schließt eine verletzte Dura mater mit ein (HENNES 2000).

Beim Menschen kommt es beispielsweise am Unfallort durch Gewalteinwirkungen zur mechanischen Zerstörung von Neuronen, Axonen und Gefäßen. Dieser Primärschaden führt aufgrund der Funktionsstörung des Gehirns zur Bewusstseinsstörung, was als Leitsymptom für ein SHT angesehen wird. Die durch den Primärschaden ausgelöste Kaskade pathobiochemischer Prozesse wird als Sekundärschaden bezeichnet. Der Primärschaden ist im Gegensatz zum Sekundärschaden irreversibel (LAURER u. MCINTOSH 1999).

Laut den Angaben des Bundesamtes für Statistik, Wiesbaden, wurden 1996 in Deutschland 279.029 schädelhirntraumatisierte Menschen vollstationär behandelt. Bei einer Gesamtbevölkerung von 81.895.637 Einwohnern im Jahr 1996 ergibt sich damit eine Inzidenz von 340 Schädelhirnverletzungen pro 100.000 Einwohner. Eine zahlenmäßige Häufung der Behandlungsfälle findet man in der Altersgruppe der 15 bis 25-Jährigen, jedoch besteht eine erhöhte Inzidenz im Säuglings- und Kleinkindesalter. Die Sterbefälle nach Schädelhirnverletzungen haben in Deutschland seit 1972 von mehr als 16.000 Fällen kontinuierlich bis auf 9.415 Fälle im Jahr 1996 abgenommen. Damit ergibt sich eine schädelhirntraumabedingte Mortalität von 11,5/100.000 Einwohnern. Die Analyse der Altersverteilungen ergab die höchste Mortalität in der Altersgruppe der über 75jährigen, wo sie mehr als das Zehnfache gegenüber der Mortalität im Kindesalter beträgt. Ein weiterer, jedoch kleinerer Anstieg der Mortalität findet sich in der Altersgruppe der 15 bis 25-Jährigen (CORTBUS u. STEUDEL 1999).

Die Beurteilung eines SHT erfolgt anhand der *Glasgow Coma Scale (GCS)*. Diese Einteilung beruht auf einer klinischen Untersuchung, wobei hier neben der Fähigkeit die Augen zu öffnen, die beste verbale und motorische Reaktion bewertet wird. Der maximale Wert beträgt 15 Punkte, der minimale Wert drei Punkte. Ein schweres SHT liegt vor, wenn die Punktwerte zwischen drei und acht liegen (HENNES 2000).

Tabelle 1: Einteilung des SHT nach der Glasgow Coma Scale (GCS)

GCS-Punkte	SHT-Schweregrad
3-8	schwer
9-12	mittelschwer
13-15	leicht

Eine klinische Studie an 59.713 Patienten weist auf die enge Korrelation zwischen dem Schweregrad des SHT und der Mortalität hin (GENNARELLI 1994).

Die Ausprägungen und die Ursachen eines SHT in der Humanmedizin sind sehr unterschiedlich und deshalb für vergleichende Studien ungeeignet. Ferner kommen in klinischen Studien zusätzliche Variablen wie Alter, Basiserkrankung, Zeit bis zum Therapiebeginn, Behandlungsmöglichkeiten, Kontrollgruppe, Randomisierung und Blindung hinzu, die eine Standardisierung erschweren. In den letzten Jahrzehnten wurden zahlreiche Tiermodelle entwickelt, um neurologische Syndrome, sowie biomechanische und pathologische Aspekte aus der Humanmedizin gezielt reproduzieren zu können. Die Tiermodelle sind notwendig, um die pathophysiologischen Schadensmechanismen nach einem SHT zu verstehen und um verschiedene Therapieansätze entwickeln und testen zu können. Die ganze Komplexität des humanen SHT kann jedoch nicht in einem einzigen Modell erfasst werden. Daher existieren mehrere Tiermodelle, die selektiv bestimmte Teilaspekte aus der Humanmedizin imitieren können (DIXON et al. 1991; GENNARELLI 1994).

2.2.1 Tiermodelle des Schädel-Hirn-Traumas

Die Einteilung der SHT-Modelle basiert auf den Studien von DENNY-BROWN und RUSSELL aus dem Jahr (1941). Demnach unterteilt man experimentelle Schädelhirnverletzungen in zwei Hauptkategorien:

- *Percussion concussion*

- *Acceleration concussion*

Zu den momentan gebräuchlichsten Tiermodellen zählen:

- Kontrollierte traumatische Hirnrindenkontusion (*Controlled-cortical-impact*, CCI)

- Kompression durch Flüssigkeit (*Fluid-percussion*, FP)

- Fallgewicht (*Weight-drop*)

- Aufprallbeschleunigung (*Impact-acceleration*)

- Trägheitsbeschleunigung (*Inertial-acceleration*)

Das Fluid-percussion- und das CCI-Modell stellen die moderne Version des von DENNY-BROWN und RUSSEL (1941) beschriebenen Percussion-concussion-Modells dar. Beide Modelle können zentral, lateral oder lateral mit gleichzeitiger kontralateraler Öffnung der Dura mater ausgeübt werden. Das Weight-drop-, Impact-acceleration- und Inertial-acceleration-Modell werden dem damaligen Acceleration-concussion-Modell zugeordnet.

Die am häufigsten verwendeten Tiermodelle bei Ratten stellen das CCI-Modell und das Fluid-percussion-Modell dar (GENNARELLI 1994).

Kontrollierte traumatische Hirnrindenkontusion (Controlled-cortical-impact)

Das Controlled-cortical-impact- (CCI-) Modell wurde erstmals beim Frettchen beschrieben (LIGHTHALL 1988) und später auf die Ratte (DIXON et al. 1991) und die Maus (SMITH et al. 1995) übertragen. Das Tier wird hierzu in einem stereotaktischen Rahmen fixiert, kraniotomiert und die intakte Dura mater freigelegt. Danach wird das Tier unter dem Schädel-Hirn-Trauma-Gerät platziert. Das Gerät besteht aus einem druckluftbetriebenen, computergesteuerten Stempel, der in einer Führungshülse gehalten wird. Die plane Führungshülse des Schlagbolzens wird auf der intakten Dura mater aufgesetzt. Hierdurch

wird einerseits eine exakte Reproduzierbarkeit der Gehirnschädigung erreicht, andererseits eine kontrollierte Variation der Traumastärke ermöglicht. Nach dem mechanischen Insult erfolgt das sofortige Verschließen der Kraniotomie. Eine genaue Darstellung von diesem Modell erfolgt im Kapitel 3.2.7.

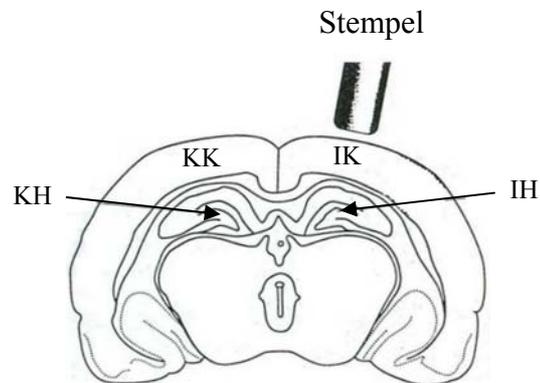


Abbildung 4: Platzierung des Stempels beim lateralen Controlled-cortical-impact am Rattengehirn mit Übersicht über die angrenzenden Gehirnregionen. IK=ipsilateraler Kortex, IH= ipsilateraler Hippokampus, KK=kontralateraler Kortex, KH=kontralateraler Hippokampus (modifiziert nach BASKAYA et al. 1997).

Viele pathophysiologische Phänomene der Humanmedizin, wie Kontusion, intraparenchymale Hämorrhagie, Hämatome und diffuse Axonenschäden können mit diesem Tiermodell reproduziert werden (LIGHTHALL 1988). Neben einer fokalen Kontusion des Kortex treten auch Ablösungen der grauen, weniger der weißen Substanz, in Schadensnähe auf (GOODMAN et al. 1994; SMITH et al. 1995). Anzeichen für den apoptotischen Zelltod sind ebenfalls zu finden. Sowohl das CCI-Modell, wie auch das Fluid-percussion-Modell produzieren Apoptose und Nekrose im Kortex und im Hippokampus (COLICOS u. DASH 1996; CONTI et al. 1998; FOX et al. 1998). Der Zusatz von sekundären Insulten zum CCI-Modell lässt den Grad der Apoptose im Hippokampus ansteigen (CLARK et al. 1997). Das CCI produziert auf der Einschlagseite neben der Kontusion auch einen nekrotischen Zellverlust. Eine Abnahme der Pyramidenzellen in der CA1- und CA3-Region des Hippokampus konnte zwei Wochen nach Trauma festgestellt werden (GOODMAN et al. 1994). Abhängig von der Traumaschwere, speziell der Einschlagtiefe und der Lokalisation des Schadens, verursacht das CCI-Modell Ödembildung und Änderungen im zerebralen Blutfluss (KOCHANNEK et al. 1995). Beim CCI-Modell hängt die Blutflussreduktion mit der Traumastärke zusammen. So ist nach einem mildem CCI (3 m/s, Tiefe: 2,5 mm) der Blutfluss auf der ipsilateralen Seite um ca. 50 % reduziert. In allen anderen Gehirnregionen ist der Blutfluss im Normbereich (GIRI et al. 2000). Diese Senkung reicht zwar nicht aus, um einen

ischämischen Schaden zu verursachen, jedoch steigert sie die Sensitivität des Gehirns gegenüber sekundär ischämischen Insulten.

Nach einem schwereren CCI (5 m/s, Tiefe 3 mm) nimmt der Blutfluss auf der ipsilateralen Seite um über 75 % ab. Dies kann zu einer ischämischen Schädigung führen (CHERIAN et al. 1994). Defizite im räumlichen Vorstellungsvermögen, im Lernprozess, in der Gedächtnisleistung und in der neurologisch motorischen Funktion werden bei Ratten und Mäusen sowohl beim CCI- wie auch beim FP-Modell beschrieben (MCINTOSH et al. 1989).

Kompression durch Flüssigkeit (Fluid-percussion)

Das Fluid-percussion-Modell wurde bei zahlreichen Tierspezies (Hunden, Katzen, Kaninchen, Ratten, Schweinen) etabliert. Insbesondere bei der Anwendung am Nagetier gehört das Fluid-percussion-Modell gegenwärtig zum weit verbreitetsten SHT-Modell. 1987 beschrieben DIXON et al. an der Ratte den Versuchsaufbau: Nach der Fixierung des Kopfes im stereotaktischen Rahmen erfolgt eine sagittale Kraniotomie mit 4,8 mm Durchmesser. Ein starres Plastikrohr (Innendurchmesser 2,6 mm) wird auf die Dura mater aufgesetzt, festgeklebt und die Lücken mit Zahnzement aufgefüllt. Die Dauer der Aushärtung des Zahnzements wird mit einem Tag angegeben. Ein Metallpendel induziert einen kurzen messbaren und variablen Flüssigkeitsimpuls (isotonische Kochsalzlösung, 37 °C) auf die intakte Duraoberfläche, der sich im epiduralen Spalt konzentrisch ausbreitet. Eine kurze Verdrängung und Deformation des neuronalen Gewebes sind die Folgen. Die Schadensstärke korreliert eng mit der Höhe, aus der das Pendel fällt. Extrakranielle Druckimpulse, die durch das Fluid-percussion-Modell induziert werden, sind eng assoziiert mit intrakraniellen Druckänderungen (LINDGREN u. RINDER 1966). Abhängig von der Traumastärke und der Lokalisation des Schadens ist das Modell durch Veränderungen im Blutfluss (GINSBERG et al. 1997), im Metabolismus (DIETRICH et al. 1994a) und in der Ionenhomöostase (KATAYAMA et al. 1990) charakterisiert. Hinzu kommen chronische Beeinträchtigungen der neuro-motorischen Funktionen (PIERCE et al. 1998) sowie kognitive Defizite (SMITH et al. 1991). Neben dem Verlust der Blut-Hirn-Schranke (MCINTOSH et al. 1989), wird eine reaktive Astrozytose (CORTEZ et al. 1989), nekrotischer und apoptotischer Zelltod am Aufprallort und in selektiv vulnerablen Gehirnregionen beschrieben (SMITH et al. 1991; RINK et al. 1995; CONTI et al. 1998).

Im Gegensatz zum lateralen Fluid-percussion-Modell neigt das zentrale Fluid-percussion-Modell zu variableren und relativ kleineren Kontusionen in der Nähe des Flüssigkeitsimpulses. Bei Katzen und Ratten ist in diesem Modell ein diffuser Axonschaden,

der größtenteils im Hirnstamm lokalisiert ist, nachgewiesen worden (SHIMA u. MARMAROU 1991).

Das laterale Fluid-percussion-Modell verursacht ebenfalls zerebrale Kontusionen, die sich lateral und entfernt vom Flüssigkeitsimpuls befinden. Trotz einer gewissen kontralateralen Schädigung handelt es sich hierbei um ein unilaterales Schadensmodell. Typische Merkmale für dieses Modell sind ein diffuser Axonschaden in der ipsilateralen, subkortikalen weißen Substanz (GENNARELLI 1994) und eine unilaterale Schädigung der Hippokampusformation. Im Hintergrund stehen bei diesem Modell Verletzungen im Bereich des Hirnstamms.

Die Vorteile des Fluid-percussion-Modells beruhen in erster Linie auf seiner Simplizität und der Möglichkeit eine signifikante histopathologische Schädigung des Gehirns zu produzieren, die unter anderem intraparenchymale Hämorrhagien und Axonschäden mit einschließt (POVLISHOCK et al. 1992). Als nachteilig erweist sich bei diesem Modell eine geringe Kontrolle der Verletzungsparameter, die oftmals von Verletzungen des Hirnstamms bis hin zum Tod reichen (GENNARELLI 1994).

Fallgewicht (Weight-drop)

Das Weight-drop-Modell stellt eine Modifikation des Impact-acceleration-Modells dar, das (1994) von MARMAROU et al. beschrieben wurde. Nach ENGELBORGHS et al. (1998) besteht der Versuchsaufbau des Weight-drop-Modells aus einer horizontalen Plattform, die auf Federn gelagert ist, um beim Aufprall eine vertikale Abwärtsbewegung zu ermöglichen. Der Kopf des Tieres wird auf der Plattform im stereotaktischen Rahmen fixiert. Darüber ist eine 1,5 m lange Plexiglassäule montiert (Durchmesser: 20 mm), die einen 400 g schweren Stahlzylinder (Durchmesser: 19 mm) beinhaltet, der von einer beliebig festgelegten Höhe (hier: 70 cm) im freien Fall auf den uneröffneten Schädel auftrifft. Als Schutz vor Frakturen wird eine Silikonscheibe (Durchmesser: 9 mm, Dicke: 2 mm) auf das Bregma aufgelegt. Der Schaden ist abhängig von der Masse und der Beschleunigung des Gewichts. Mit dem Weight-drop-Modell können mehrere wichtige Aspekte der Humanmedizin nachgestellt werden. An der Aufprallstelle kommt es zur fokalen Kontusion des Kortex und zum selektiven Verlust von Neuronen im Kortex und Hippokampus (CA2- und CA3-Region) (TANG et al. 1997b) im Thalamus und im Gehirnstamm.

Generalisiert treten Störungen im Metabolismus, eine akute und chronische intrakranielle Hypertension, Blutungen und Ödeme auf (ENGELBORGHS et al. 1998). Verhaltensänderungen wie reduzierte Spontanaktivität sowie beeinträchtigte motorische und

kognitive Funktionen (SHAPIRA et al. 1988; TANG et al. 1997a) und Krämpfe werden ferner beobachtet. Durch die fehlende Geschwindigkeitskontrolle des herabfallenden Gewichts und die nicht vorhandene Steuerbarkeit über die Tiefe der Duraimpression ist das Ausmaß des SHT schlecht steuerbar.

Aufprallbeschleunigung (Impact-acceleration)

Bei diesem Modell erfolgt die Induktion des SHT durch Aufschlagen eines Gewichts auf den uneröffneten Schädel. Aufgrund der geringen Inzidenz von Schädelfrakturen in der Humanmedizin wird dem Tier eine Art Stahlhelm aufgesetzt, um Frakturen zum Zeitpunkt des Aufschlags zu verhindern (MARMAROU et al. 1994). Der Kopf liegt frei auf einer Schaumstoffunterlage, um eine Bewegung nach dem Aufschlag zu gewährleisten. Der Schaden, der eng mit der Traumastärke korreliert, repräsentiert sich in einem Axonschaden (BUKI et al. 1999) und in einer Schädigung der Dendriten ohne fokale Kontusionen (FOLKERTS et al. 1998). Weiterhin kommt es bei diesem Modell zu einem posttraumatischen Ödem, geschrumpften Neuronen im Kortex und subarachnoidalen wie auch intraventrikulären Blutungen (FODA u. MARMAROU 1994). ADELSON et al. (1997) beschrieben eine Beeinträchtigung motorischer und kognitiver Funktionen. Ein großer Nachteil dieses Modells ist die schlechte Reproduzierbarkeit des Schadens.

Trägheitsbeschleunigung (Inertial-acceleration)

Durch eine uneingeschränkte Rotationsbewegung des Kopfes wird ein Rotations- und Deformationsschaden des Gehirns erzielt. Entwickelt und evaluiert wurde dieses Modell von ROSS et al. (1994) am Minipig. In enger Korrelation mit der Rotationsbeschleunigung steht ein traumatischer Axonschaden in der tiefen weißen Substanz ohne fokale Kontusionen oder Blutungen. Metabolische Veränderungen wurden im Zusammenhang mit kortikalem, subkortikalem und zerebralem neuronalen Schaden von SMITH et al. (1997) beschrieben.

Table 2: Einsatzmöglichkeiten der verschiedenen SHT-Modelle, um gezielt pathophysiologische Aspekte aus der Humanmedizin zu reproduzieren (modifiziert nach GENNARELLI 1994):

Modelle: Aspekte:	CCI (lateral)	Fluid percussion	Impact acceleration	Inertial acceleration
Gehirn- erschütterung	++	+++	+++	+++
Axonschaden	+	+	++	+++
Gehirnschwellung	-	-	-	-
Kontusion	+	+	+	+/-
Akutes subdurales Hämatom	-	-	-	++
Intrazerebrales Hämatom	-	-	-	-
Schädelfrakturen	-	-	+/-	-

(Bewertungsschlüssel von - = ungeeignet bis +++ = sehr gut geeignet)

2.2.2 Pathophysiologie des Schädel-Hirn-Traumas

Die pathophysiologischen Abläufe bei Patienten mit einem SHT können in zwei Phasen unterteilt werden: in den Primärschaden und in den Sekundärschaden (WERNER u. ENGELHARD 2001). Unter dem Primärschaden, der unmittelbar und irreversibel ist, wird die direkte mechanische Einwirkung auf das ZNS verstanden. Der primäre Hirnschaden ist nicht therapierbar. Der Sekundärschaden entwickelt sich als Konsequenz eines primären Hirnschadens. Er stellt eine bisher wenig verstandene Abfolge pathologischer Prozesse intra- und extrakranieller Genese dar, die zum Zeitpunkt des mechanischen Insults beginnen und Monate, sogar Jahre voranschreiten können. In diesem Zusammenhang spielen neben strukturellen und funktionellen Veränderungen auch Änderungen auf der zellulären und molekularen Ebene eine wichtige Rolle. Dem Sekundärschaden wird der Verlust der Blut-Hirn-Schranke, die Ödembildung, eine Beeinträchtigung im Gehirnstoffwechsel und Veränderungen des zerebralen Perfusionsdruckes (CPP) zugeordnet. Weiterhin kommt es zur Ionendyshomöostase, zur Aktivierung von autodestruktiven Enzymen und Transmittern, zur Entstehung freier Radikale und zu Veränderungen im Genom. Im Gegensatz zum Primärschaden ist der Sekundärschaden therapierbar (LAURER u. MCINTOSH 1999).

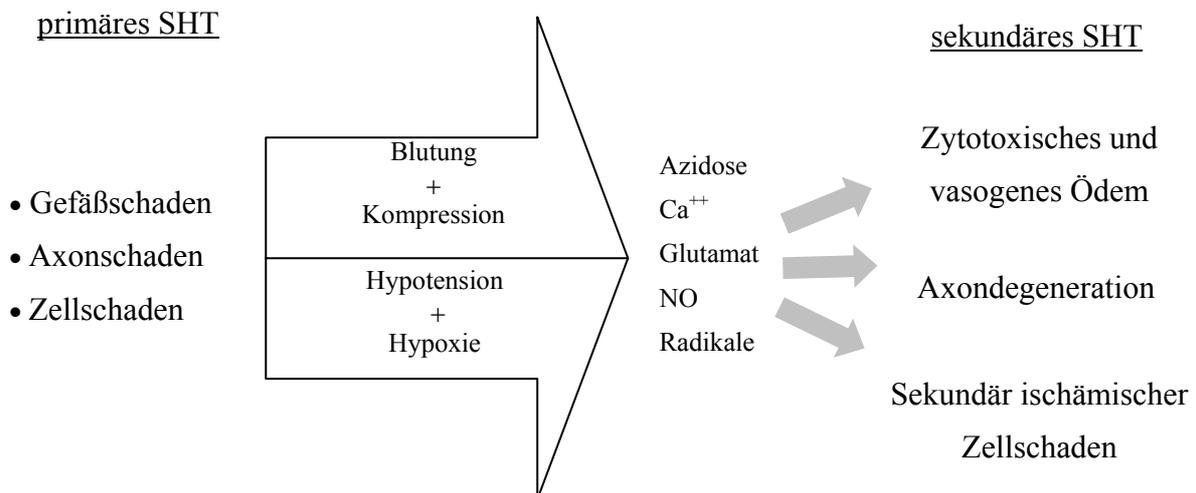


Abbildung 5: Darstellung des primären und sekundären Hirnschadens nach einem Schädel-Hirn-Trauma (SHT) (nach KOLENDA 1999);
NO = Stickstoffmonoxid

Arterielle Hypotonie (systolischer Blutdruck <90 mmHg) und Hypoxämie sind die Hauptursachen des sekundären Hirnschadens nach einem Schädel-Hirn-Trauma (CHESNUT et al. 1993). Bei ca. 15 bis 20 % derart Verletzter ist mit dem Auftreten einer Hypoxämie, bei etwa 10 bis 15 % mit einer Hypotonie zu rechnen (WAHJOEPRAMONO et al. 1993). Epidemiologische Studien zeigten, dass das Vorliegen einer Hypoxie (arterieller Sauerstoffpartialdruck <60 mmHg) oder Hypotension bei Einlieferung ins Krankenhaus die Mortalitätsrate verdoppelt (MILLER 1985). Die Prävention der Hypoxämie und Hypotonie ist geeignet, um die Prognose von SHT Patienten zu verbessern (CHESNUT 1995).

Ein weiterer Sekundärschaden ist die zerebrale Ischämie (BOUMA et al. 1991). Die zerebrale Ischämie kommt nach schweren Kopfverletzungen vor und trägt zur Mortalität und einem schlechteren neurologischen Ergebnis bei. GRAHAM et al. (1978) stellten durch histopathologische Untersuchungen eine ischämische Schädigung des Gehirns in ca. 90 % der Fälle fest. Die primäre zerebrale Ischämie tritt unmittelbar nach dem Trauma auf und ist proportional zur Schwere der Verletzung. Es konnte gezeigt werden, dass die Hirndurchblutung in den ersten sechs Stunden nach schwerem SHT vermindert ist und in den folgenden 18 Stunden wieder ansteigt. Bei einem Drittel der Patienten liegt die Durchblutung unterhalb der Ischämieschwelle von 18 ml/100 g/min (BOUMA et al. 1991). Die zerebrale Ischämie tritt unabhängig von Hypotonie, Hypoxie oder Hypokapnie auf. Das Vorhandensein der zerebralen Ischämie bei Einlieferung im Krankenhaus ist assoziiert mit einem schlechten Ergebnis. Die Ursache für die zerebrale Ischämie ist in einer venösen Okklusion zu suchen, die auf einer Plättchenaggregation oder auf einer durch Hirnschwellung verursachten Gefäßkompression beruht (CHERIAN et al. 1996). Auch die sekundäre zerebrale Ischämie/Hypoxie findet man nach schweren Kopfverletzungen. Die Ursache hierfür kann einerseits systemischer Natur (Hypotension, Hypokapnie, Hypoxie, Anämie) andererseits aber auch zerebraler Genese (intrakranielle Hypertension, Vasospasmus) sein. Diese sekundären ischämischen Insulte treten vor allem kurz- bis mittelfristig nach dem Trauma auf. Sie können jedoch auch in der gesamten akuten Erholungsphase vorkommen. Auch sie sind mit einem schlechten neurologischen Ergebnis verbunden (MILLER 1985). Das geschädigte Gehirn ist vermindert in der Lage ischämische/hypoxische Insulte zu tolerieren, die in ihrer Ausprägung bei gesunden Personen keine Schädigung hervorrufen würden. Das traumatisch geschädigte ischämische Hirnareal ist von einer partiell ischämischen Zone, der Penumbra umgeben, die über Kollateralgefäße perfundiert wird. Die Penumbra besteht aus reversibel geschädigtem Hirngewebe, das durch Hypotonie und Hypoxie in irreversiblen Strukturverlust mit Zelluntergang übergehen kann, so dass sich die Prognose gravierend verschlechtert (CHESNUT et al. 1993; CHESNUT 1995).

Nach einer traumatischen Gehirnverletzung kommt es zu hämodynamischen Änderungen, die in drei charakteristische Phasen (unmittelbar, früh, spät) einteilbar sind. In der Zeit unmittelbar nach dem CCI kommt es zur Hypertension, die nur flüchtig besteht und von einer Hypotension abgelöst wird. Die Hypertension bewirkt einen Anstieg des intrakraniellen Drucks (ICP), der unbeeinflusst vom Blutdruckabfall bestehen bleibt (CHERIAN et al. 1994). Die frühe Antwort auf eine schwere Gehirnverletzung ist geprägt durch eine intrakranielle Hypertension, eine systemische Hypotension und eine Reduktion des zerebralen Blutflusses (CBF), in Folge eines sinkenden CPP. Jedoch ist der CPP nicht niedrig genug, um eine Reduktion des Blutflusses um 50 % zu erklären (CHERIAN et al. 1994). Der CBF bleibt erniedrigt, auch wenn der Blutdruck wieder im physiologischen Bereich liegt. BOUMA et al. (1991) fanden ein ähnliches Hypoperfusionsmuster in den ersten sechs Stunden nach einer Gehirnverletzung. Der regionale CBF lag bei 33 % der Patienten unter 18 ml/100 g/min. Innerhalb der ersten 24 Stunden stieg der CBF auf normale bis hyperämische Werte an. In den ersten acht Stunden nach Trauma bestand eine signifikante Korrelation zwischen dem CBF und dem klinischen Status. Eine ähnliche Beziehung existierte zwischen dem CBF und dem neurologischen Endergebnis. Auch MARION et al. (1991) dokumentierten regionale CBF Werte unter 18 ml/100 g/min in kontusionsnahen Bereichen. KOCHANNEK et al. (1995) fanden eine deutliche Reduktion des lokalen CBF in der ipsilateralen Hemisphäre, die anfangs auf den parietalen Kortex, das *Corpus callosum* und den Hippokampus beschränkt war. Bereits nach zwei Stunden konnte in der gesamten geschädigten Hemisphäre eine Hypoperfusion verzeichnet werden. Nach 24 h fand man ein heterogenes Perfusionsverhältnis: Zonen, reichend von moderater Flussreduktion bis hin zur schwerer Ischämie (2,2 ml/100 g/min) waren von normal bis hoch perfundierten Arealen (Luxusperfusion) umgeben. Auch sieben Tage nach dem Insult war das heterogene Verhalten im Blutfluss nachweisbar. MARTIN et al. (1997) beschrieben anhand einer klinischen Studie drei verschiedene hämodynamische Phasen. Die ersten 24 Stunden waren von einer Hypoperfusion geprägt, der sich bis zum dritten Tag eine hyperämische Phase anschloss. Diese wurde in den folgenden vier bis 15 Tagen von einem Vasospasmus abgelöst.

Die späte hämodynamische Antwort auf eine Schädel-Hirn-Verletzung wurde hauptsächlich in klinischen Studien untersucht. Sie ist charakterisiert durch einen CBF im physiologischen bis leicht erhöhten Bereich. Der zerebrale Metabolismus ist reduziert und die arteriovenöse Sauerstoffdifferenz ist erniedrigt. Unter diesen Umständen kann sogar ein CBF innerhalb der physiologischen Grenzen zu hoch für den reduzierten zerebralen metabolischen Bedarf sein (OBRIST et al. 1984). Die Entkopplung der Metabolismus-CBF-Regulation wurde schon 1966 als so genanntes „luxury perfusion syndrom“ bezeichnet (LASSEN 1966). Eine

Beziehung zwischen einem erhöhten CBF und der Entwicklung einer intrakraniellen Hypertension wurde festgestellt (OBRIST et al. 1984).

Die Ursache der regional verminderten Hirndurchblutung ist im Vasospasmus zu suchen (MARTIN et al. 1992). Ungefähr ein Drittel der Patienten mit einem schweren SHT entwickelt innerhalb der ersten Tage einen Vasospasmus. Die Erhöhung der Flussgeschwindigkeit bleibt bis zu zwei Wochen erhalten. In ca. 50 % der Fälle ist die Autoregulation (BOUMA u. MUIZELAAR 1995) bei erhaltener Kohlendioxid- (CO_2 -) Reagibilität gestört. Die Hirndurchblutung folgt passiv dem systemischen Blutdruck, die Gefahr besteht im Blutdruckabfall. Andererseits kann eine Hypertonie eine Hyperämie mit Anstieg des ICP verursachen. Die Erhöhung des ICP bei einem SHT ist häufig. Ein Anstieg des ICP (>20 bis 25 mmHg) erhöht um 69 % bis 95 % die Mortalität (MILLER et al. 1977). Als Ursache kommt neben intrakraniellen Hämatomen und Hirnödemen auch die Zunahme des intrazerebralen Blutvolumens durch zerebrale Vasoparalyse in Frage (KELLY et al. 1996).

Der primäre und der sekundäre Hirnschaden besitzen als gemeinsamen pathophysiologischen Endpunkt die zerebrale Ischämie. Das hieraus resultierende Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und -bedarf blockiert die oxidative Phosphorylierung und führt zu einer schnellen Entleerung der Adenosintriphosphat- (ATP-) Speicher. Die Sauerstoffabwesenheit begünstigt die Zunahme der anaeroben Glykolyse mit der Ausbildung einer Laktatazidose, einer konsekutiven Zunahme der Zellpermeabilität (vasogenes und zytotoxisches Ödem) und einer progressiven Störung der kollateralen Perfusion. Aufgrund der fehlenden ATP-Bildung kann das Membranpotential nicht mehr aufrechterhalten werden. Der hieraus resultierende unkontrollierte Einstrom von Natrium- (Na^+ -) Ionen und der ungebremste Ausstrom von Kalium- (K^+ -) Ionen induzieren eine terminale Membrandepolarisation. Die nun folgende Freisetzung exzitatorischer Neurotransmitter (z.B. Glutamat) stimuliert postsynaptische Agonisten-gesteuerte Rezeptorsysteme (N-Methyl-D-Aspartat, NMDA; α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionicacid, AMPA) und Spannungs-abhängige Membrankanäle. Der resultierende starke Einstrom von Kalzium- (Ca^{++} -) und Na^+ -Ionen in die Zelle bewirkt eine intrazelluläre Akkumulation von Ca^{++} , die wiederum verantwortlich ist für die Aktivierung kataboler Prozesse (z.B. die neuronale Stickoxid-Synthetasen, Phospholipasen, Proteasen und Lipidperoxidasen), wodurch Zellmembranen und intrazelluläre Organellen hydrolysiert werden. Die hierbei entstehenden hohen Konzentrationen an freien Fettsäuren werden zu Prostaglandinen, Thromboxanen, Leukotrienen und freien Radikalen abgebaut. Daneben induzieren die katabolen Enzymsysteme die Lyse von neuronalen, glialen und vaskulären Membranen, und es kommt zum Zelluntergang (WERNER 2000a).

COLICOS et al. (1996) teilten den neuronalen Zelltod in drei Kategorien ein:

- Der Zelltod, der direkt auf den physikalischen Schaden im Moment des Traumas zurückzuführen ist.
- Der nekrotische Zelltod, der auf der exzessiven Freisetzung von exzitatorischen Neurotransmittern wie beispielsweise Glutamat beruht.
- Der programmierte Zelltod (Apoptose), der verzögert eintritt und somit ein therapeutisches Zeitfenster zur klinischen Intervention offen lässt.

Nekrose und Apoptose

Ähnlich zur zerebralen Ischämie reicht auch nach traumatisch entstandenen Gehirnverletzungen das phänotypische Spektrum des Zelluntergangs von der Nekrose bis hin zur Apoptose (RINK et al. 1995; CLARK et al. 1997). Der direkt entstandene mechanische Schaden ist in erster Linie nekrotischer Natur. Die Zellyse hängt in diesem Fall mit osmolaren Verschiebungen und der intrazellulären Hirnschwellung zusammen. Mittlerweile ist klar geworden, dass auch Apoptose zu einem signifikant erhöhten Maß nach Gehirnverletzungen vorkommt. Das Verhältnis zwischen nekrotischem und apoptotischem Zelltod hängt zum einen vom Ausmaß des Traumas und der Gehirnregion ab, zum anderen von sekundären Faktoren.

Initiatoren der Nekrose und der Apoptose sind neben Ischämie und Hypoxie freie Radikale, mitochondriale Dysfunktionen, sowie Mangel bzw. Entzug von zellulären Wachstumsfaktoren (MAC MANUS u. LINNIK 1997). Im Gegensatz zur Nekrose, bei der es sich um einen unmittelbaren und frühen Prozess handelt, der „herdförmig“ auftritt und in der Regel ganze Gruppen von Zellen beinhaltet, tritt die Apoptose als aktiver Energieverbrauchender Prozess zeitlich verzögert auf und betrifft einzelne, verstreut liegende Zellen. Welche Form des Zelluntergangs eintritt, ist neben Faktoren wie Reizstärke und -dauer auch vom intrazellulären ATP-Gehalt abhängig (LEIST et al. 1997).

Nekrose und Apoptose können histologisch voneinander unterschieden werden. Ganz im Gegensatz zur Apoptose kommt es bei der Nekrose primär zu einem Versagen metabolischer Prozesse bzw. zu einem Zusammenbrechen der zellulären Energieversorgung. Konsekutiv kommt es zu einem Ausfall der Ionenpumpen und zum Verlust der Membranintegrität der Zelle (MAJNO u. JORIS 1995). Morphologisch betrachtet fällt die Nekrose zuerst durch Zellschwellung und später durch Auflösungsprozesse der Zelle auf. Dabei kommt es zu einer

explosionsartigen Freisetzung von Zellorganellen mit einer sich anschließenden entzündlichen Begleitreaktion (Ödem, Leukozyteninfiltration).

Erstes morphologisches Anzeichen der Apoptose ist die Kondensation des Chromatins mit anschließender Fragmentierung. Die typische internukleosomale Fragmentierung der Desoxyribonukleinsäure (DNA) in Segmente mit ca. 180 Basenpaaren bzw. Vielfachen davon imponieren in der Gelelektrophorese als so genanntes „DNA laddering“ und können als Nachweismethode der Apoptose (terminal transferase mediated dUTP-biotin nick end labeling, TUNEL) genutzt werden (GAVRIELI et al. 1992). Die Zellmembran bleibt trotz ausgeprägter Bewegung der Zelle (*boiling stadium*) intakt, sie kann sich jedoch ausstülpfen (*blebbing stadium*). In der Folge kommt es zur Schrumpfung der Zelle, zum Verlust der Zell-Zellkontakte und zur Abschnürung (*budding*) membranumschlossener Vesikel, der *apoptotic bodies*. Die Phagozytose dieser Zellreste durch angrenzende Zellen läuft ohne inflammatorische Begleitreaktion ab (PADOSCH et al. 2001).

Die Apoptose repräsentiert ein genetisch determiniertes, aktives Sterbeprogramm einer Zelle. Der damit assoziierte Prozess wird auch als „programmierter Zelltod“ bezeichnet. Der Arzt und Philosoph Galen von Pergamon (129-203 n. Chr.) beschrieb bereits den koordinierten Zelluntergang anhand der Embryonalentwicklung von Föten und bei der Entwicklung von Insektenlarven. KERR et al. (1972) prägten den Begriff der Apoptose als eine Form des aktiven gesteuerten Zelluntergangs neben der Nekrose. Die Apoptose spielt in physiologischen Prozessen, wie z.B. bei der Embryonalentwicklung des Gehirns und der Extremitäten, in Keimzentren von Lymphknoten sowie beim zellulären Turn-over (z.B. Haut) und in verschiedenen Involutionsprozessen (z.B. im senilen Ovar) eine wichtige Rolle (PADOSCH et al. 2001). Auch bei spontanen Zelluntergängen in malignen Tumoren (KERR et al. 1972) und bei der Regression nach Therapie von Neoplasmen kommt es zu apoptotischen Zelluntergängen. Die Apoptose stellt unter anderem einen physiologischen Gegenpol zur Mitose dar. Die neuronale Apoptose ist jedoch auch von Bedeutung bei neurodegenerativen Erkrankungen (Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson etc.), bei akuten Erkrankungen wie Trauma, zerebralen Krampfanfällen und nach zerebraler Ischämie bzw. Reperfusion (PADOSCH et al. 2001).

Die aktuellen Theorien zum Ablauf der Apoptose gehen von mehrstufigen Kaskaden (*pathways*) zwischen dem initialen Reiz und der finalen DNA-Fragmentierung und Spaltung lebenswichtiger Proteine aus. Man unterscheidet zwischen der extrinsischen und der intrinsischen Apoptosekaskade.

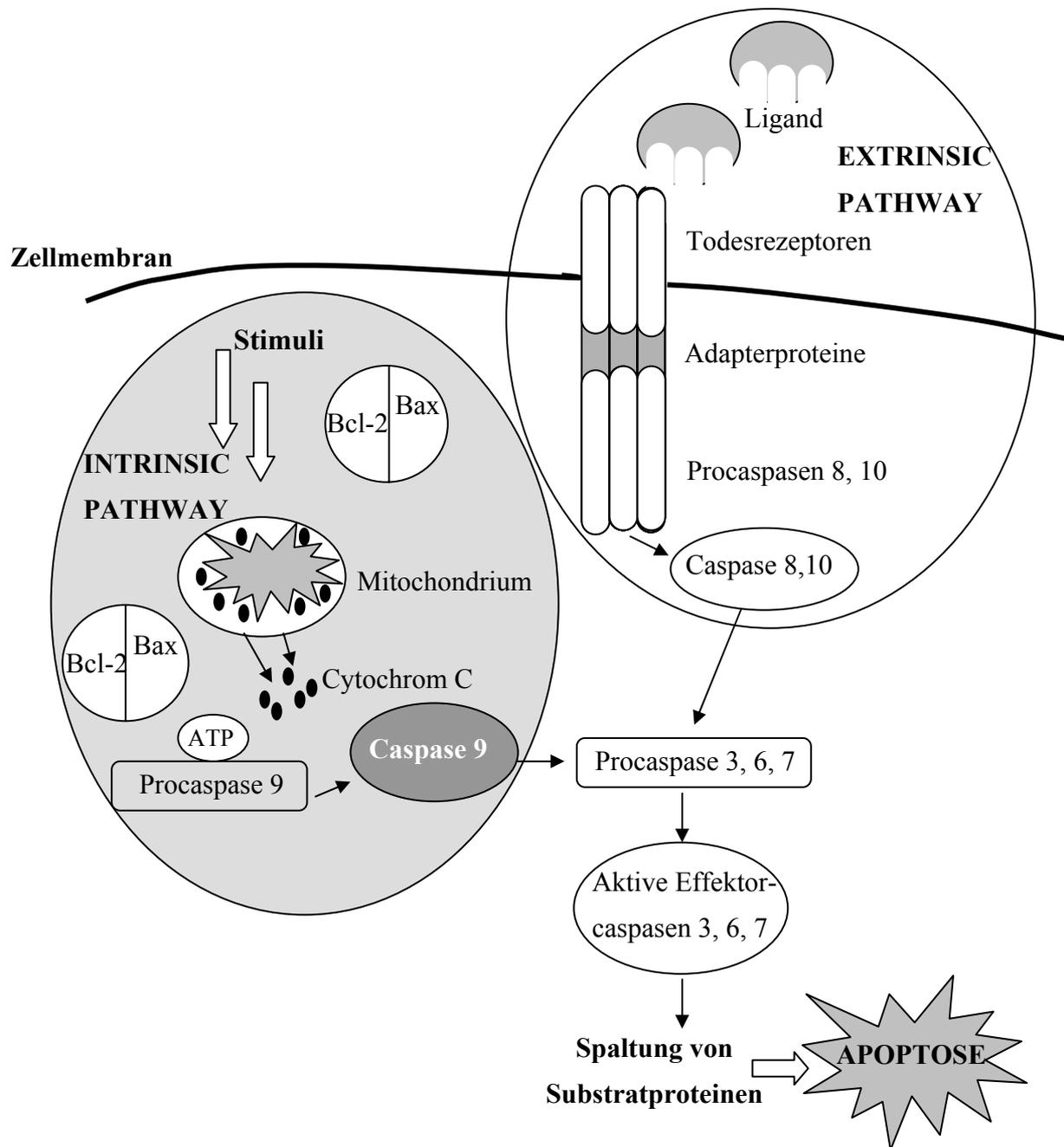


Abbildung 6: Extrinsische und intrinsische Apoptosekaskade (nach PADOSCH et al. 2001).

Die Rezeptor-vermittelte extrinsische Apoptosekaskade wird durch unterschiedliche Signale aus der Zellumgebung initiiert. Nach der Anlagerung von Liganden binden sich intrazelluläre Caspase-Adapterproteine an die Todesrezeptoren (z.B. Fas/CD95), die zur *Tumor-necrosis-factor-* (TNF-)/*nerve-growth-factor-* (NGF-) Rezeptorfamilie gehören. Die Adaptermoleküle

fungieren als Bindeglied zwischen aktivierten Todesrezeptoren und den Procaspasen. Die Procaspasen der Initiatorcaspasen-8 und -10 werden an dem Rezeptor-Liganden-Komplex gebunden und aktivieren sich dort gegenseitig (MUZIO 1998).

Die intrinsische Apoptosekaskade wird durch eine mitochondriale Dysfunktion mediert, die durch eine Vielzahl von Stimuli ausgelöst werden kann (Ischämie, Hypoxie, Reperfusion, Noxen, Toxine, etc.). Sobald eine Störung des empfindlichen Gleichgewichts zwischen pro- und anti-apoptotisch wirksamen Modulatorproteinen (z.B. Bax und Bcl-2) eintritt, kommt es in der Mitochondrienmembran zur Porenbildung. Das hierdurch ins Zytoplasma freigesetzte Cytochrom C, ein Enzym aus der Atmungskette, ist in einem ATP-abhängigen Prozess an der Aktivierung der Caspase-9 beteiligt, indem es an das Caspase Aktivierungs-Protein (Apaf-1) bindet. Hierdurch oligomerisiert das Apaf-1 und bewirkt seinerseits die Bindung zu Procaspase-9, was dessen Spaltung bzw. Aktivierung auslöst (PADOSCH et al. 2001). LEWEN et al. (2001) beobachteten bereits eine Stunde nach CCI einen Anstieg der zytosolischen Cytochrom-C-Reaktivität. Die hierdurch ausgelöste DNA-Fragmentation wurde drei Stunden später detektiert. Die massive Cytochrom-C-Freisetzung, zum Teil durch freie Radikale verursacht, endet vor allem im nekrotischen Zelluntergang. Letztendlich münden beide Wege der Apoptosekaskade in die Aktivierung der so genannten Effektorcaspasen (Spaltung der Procaspasen-3, -6 und -7) bzw. in die konsekutive Spaltung von Targetproteinen (ELDADAH u. FADEN 2000).

Der Name „Caspase“ leitet sich von der Zystein-abhängigen Aspartat Spezifität des Enzyms ab. Aktuell sind 14 strukturell unterschiedliche Caspasen der Proteasenfamilie bekannt. Sie liegen als inaktive Vorstufen (Procaspasen) vor und werden durch Spaltung in große und kleine Untereinheiten unter Bildung eines Heterotetramers mit enzymatischer Aktivität in ihre aktive Form überführt. Je nach Funktionalität lassen sich die Caspasen in Effektorcaspasen (Caspase-3, -6, -7), Initiatorcaspasen (Caspase-2, -8, -9, -10) und inflammatorische Caspasen (Caspase-1, -4, -5, -11) unterteilen (THORNBERRY u. LAZEBNIK 1998). Die Effektorcaspasen bewirken durch folgende Aktionen die Elimination der Zelle:

Destruktion von Zell-Zell-Interaktionen und des Zytoplasmas

Stillstand von DNA-Replikation und -Reparaturmechanismen

DNA-Spaltung und Unterbrechung der Ribonukleinsäure- (RNA-) Editierung (*Splicing*).

Die nukleären Strukturen werden abgebaut und letztendlich kommt es zur Abschnürung der *apoptotic bodies*.

Die erste formale Evaluierung des programmierten Zelltods erfolgte durch RINK et al. (1995) anhand des Fluid-percussion-Modells. Sie beschrieben das Vorkommen TUNEL-positiver Neuronen mit typischen und atypischen Apoptosemerkmalen im ipsilateralen Kortex und Hippokampus. Mittlerweile wurde der programmierte Zelltod auch in zahlreichen anderen Studien anhand der verschiedensten Tiermodelle nachgewiesen. So berichteten YAKOVLEV et al. (1997) erstmals über die Schlüsselrolle des Caspase-3-vermittelten Zelltods nach Fluid-percussion. Sie stellten 24 Stunden nach Trauma eine Erhöhung der Caspase-3-mRNA um das fünffache im ipsilateralen Kortex und um das zweifache im Hippokampus fest. Ein Anstieg der enzymatischen Aktivität der Caspase-3 wurde in zytosolischen Extrakten des verletzten Kortex nachgewiesen. Eine einsetzende DNA-Fragmentierung wurde nach vier Stunden im ipsilateralen Kortex und im Hippokampus detektiert. Unter Verwendung des gleichen Tiermodells konnten KNOBLACH et al. (2002) bereits eine Stunde nach lateraler Fluid percussion Spaltprodukte von Caspase-3 und -9, in erster Linie in kortikalen Neuronen, nachweisen. Schon eine Stunde nach Traumasetzung konnte aktivierte Caspase-3 und -9 im geschädigten Kortex und Hippokampus detektiert werden. Auch KEANE et al. (2001) untersuchten die Expression von Caspase in einem moderaten parasagittalen Fluid-percussion-Modell. Innerhalb einer Stunde konnte eine Expression von Caspase-8 und -9, zwei Initiatoren der Apoptose, überwiegend in superfizialen Kortexbereichen angrenzend zum Trauma und im Thalamus nachgewiesen werden. Aktivierte Caspase-3 konnte sechs Stunden nach Trauma im traumatisierten zerebralen Kortex und im Hippokampus detektiert werden.

Auch im CCI-Modell ist der programmierte Zelltod nachgewiesen worden (COLICOS u. DASH 1996; FOX et al. 1998). NEWCOMB et al. (1999) zeigten, dass ein moderates CCI einen beträchtlichen DNA-Schaden produziert, der sowohl mit apoptotischem wie auch nekrotischem Zelluntergang, in erster Linie auf der Seite des kortikalen Impakts und im Bereich der fokalen Kontusion, assoziiert ist. Apoptotische Veränderungen, gezeigt durch positive TUNEL-Färbung und internukleosomaler DNA-Fragmentation, setzten bereits nach sechs Stunden ein. Zu diesem Zeitpunkt wiesen 33 % der TUNEL-positiven Zellen apoptotische Merkmale auf. Nach einem Tag erreichten sie ihr Maximum. Hier zeigten 48 % der positiven Zellen apoptotische Kennzeichen. Apoptotische DNA konnte nur in Neuronen, nicht jedoch in Gliazellen nachgewiesen werden. Auch BEER et al. (2000) bestätigten, dass der Prozentsatz der kortikalen Neuronen, die Caspase-3 exprimierten, signifikant höher war als bei Astrozyten und Oligodendrozyten. Zu keinem Zeitpunkt wurde aktivierte Caspase-3 im kontralateralen Kortex oder im kontralateralen und ipsilateralen Hippokampus detektiert. Im Gegensatz dazu konnten COLICOS und DASH (1996) neuronale Apoptose im ipsilateralen Hippokampus nachweisen.

Neben den beschriebenen Formen des Zelluntergangs (Nekrose und Apoptose) kann es durch das SHT auch zu Gefäßschäden und somit zur Blutung und zur Ausbildung eines Hämatoms kommen.

Im Rahmen des sekundären SHT kann sich durch anaerobe Glykolyse, Laktatazidose und Zunahme der Zellpermeabilität ein vasogenes und zytotoxisches Ödem entwickeln.

Hämatom und Ödem

Eine traumatisch bedingte Raumforderung im Gehirn, wie beispielsweise durch Hämatom, Hirnschwellung oder Ödem, führt nach Verbrauch der Reserveräume zum Anstieg des ICP und setzt dadurch Regelmechanismen zur Aufrechterhaltung des zerebralen Blutflusses in Gang. Der primäre Anstieg des ICP senkt den CPP, dies bewirkt eine kompensatorische Abnahme des zerebralen Gefäßwiderstands (CVR=mittlerer arterieller Blutdruck (MAP)/CBF). Die resultierende zerebrale Vasodilatation erhöht das zerebrale Blutvolumen (CBV) mit der Folge eines weiteren Ansteigens des ICP (BAETHMANN et al. 1997).

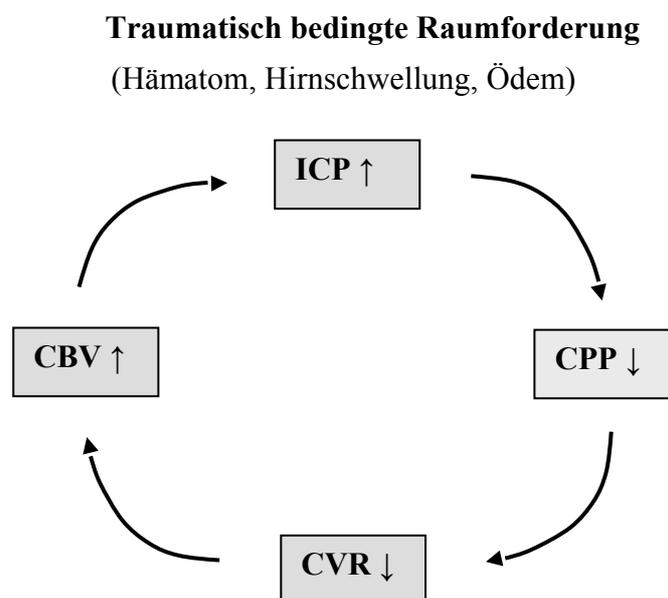


Abbildung 7: *Circulus vitiosus der traumatisch bedingten Raumforderung. ICP=intrakranieller Druck, CPP=zerebraler Perfusionsdruck, CVR=zerebraler Gefäßwiderstand, CBV=zerebrales Blutvolumen (übernommen von BAETHMANN et al. 1997).*

Hämatom

Beim SHT kann es zu raumfordernden intrakraniellen Blutungen kommen. Man unterscheidet das epidurale Hämatom, das akute Subduralhämatom und das intrazerebrale Hämatom. Das epidurale Hämatom entsteht meist durch Blutungen aus Ästen der *A. meningea media* zwischen Kalotte und Dura mater und findet sich häufig temporal in Zusammenhang mit einer Kalottenfraktur. Die Inzidenz ist im Vergleich zum akuten Subduralhämatom geringer, auch die Letalität ist niedriger (HENNES 2000).

Das akute Subduralhämatom ist das häufigste intrakranielle Hämatom bei schwerem SHT und stellt oftmals eine Kombination aus venöser und arterieller Blutung dar. Es kann zusammen mit Kontusionsherden auftreten (HENNES 2000). Obgleich die wirkliche Inzidenz der Kontusion schwer abzuschätzen ist, stellt sie ein klinisches Schlüsselmerkmal in Fällen von schweren traumatischen Gehirnverletzungen dar und wurde in nahezu 42 % der Fälle von Patienten mit fatalen Kopfverletzungen beobachtet. Kontusionen weisen hinsichtlich der Schweregrade und der pathologischen Charakteristiken ein umfangreiches Spektrum auf. Das klinische Bild reicht von multiplen petechialen Hämorrhagien bis hin zu großen intrazerebralen Hämatomen. Die intrazerebralen Hämatome werden durch die Koaleszenz von multiplen verletzten Bereichen gebildet (RIBAS u. JANE 1992).

Ödem

Fast alle zerebralen Insulte werden von einem Hirnödem begleitet, welches als intrakranielle Raumforderung wirken kann. Dadurch kann neben dem primären Schaden ein weiterer ischämisch-hypoxischer Schaden entstehen. Beim traumatischen Hirnödem handelt es sich immer um eine Kombination aus zytotoxischem und vasogenem Hirnödem (HENNES 2000). Bei einem zytotoxischen Hirnödem kommt es durch zellmembranschädigende Substanzen primär zum Astrozytenhydrox (d.h. zur Gliazellschwellung). Im Gegensatz zum vasogenen Hirnödem ist hier die Blut-Hirn-Schranke (BHS) primär intakt. Beim zytotoxischen Hirnödem liegt jedoch eine Schädigung der Hirnzellmembranen mit Störung der membranären Ionenpumpen und der intrazellulären Osmoregulation vor (FANDINO 1995).

Bei dem vasogenen Hirnödem ist die BHS zerstört. Gründe hierfür können neben einer endothelialen Schädigung und einer Verbreiterung der *tight junctions* auch die Induktion eines abnormen vesikulären Transports sein. All diese Mechanismen führen zu einer Zunahme von Blutplasmakomponenten im Gehirn (KLATZO 1985). Geschwindigkeit und Ausbreitung des Ödems werden durch hämodynamische Faktoren entscheidend bestimmt (FANDINO 1995).

Im Tiermodell konnten BASKAYA et al. (1997) eine biphasische Öffnung der BHS nachweisen. Die erste Öffnungsphase der BHS, vier bis sechs Stunden nach CCI, steht in direktem Zusammenhang mit der Ödembildung, die bereits zwei Stunden nach Trauma einsetzt. Das Ödem, welches initial auf die traumatisch geschädigte Seite beschränkt ist, erreicht nach 24 Stunden seine maximale Ausbreitung und dehnt sich auch auf den kontralateralen Kortex und Hippokampus aus. Die zweite Öffnungsphase der BHS, drei Tage nach Trauma, führt nicht mehr zu einer Ödemzunahme. Die zugrunde liegenden Theorien, die zu einem biphasischen Öffnen der BHS führen, sind spekulativ. Einen möglichen Ansatz stellt der gemeinsame Pathomechanismus von Ischämie und SHT dar. So wurde ein signifikantes Absinken des CBF in Kortex und Hippokampus nach kortikaler Kontusion nachgewiesen (CHERIAN et al. 1994). Ebenso ist bekannt, dass sich ischämische Veränderungen im Gehirn unmittelbar nach einem SHT ereignen und bis zu zwölf Stunden persistieren (MARION et al. 1991). Somit kann die zweite Öffnungsphase der BHS mit einer verspäteten Reperfusion des ischämisch geschädigten Gewebes zusammenhängen (BASKAYA et al. 1997).

Ein zweiter möglicher Mechanismus für die biphasische Öffnung der BHS kann sein, dass der Primärschaden zur Gefäßzerreißung und Zerrüttung von endothelialen Membranen führt und dadurch für die erste Öffnungsphase der BHS verantwortlich ist. An der zweiten Öffnungsphase sind möglicherweise Mediatoren beteiligt, die zur Schädigung der BHS führen. Hierunter fallen vor allem Metaboliten der Arachnidonsäurekaskade wie Leukotriene und Prostaglandine, Polyamine, Histamine und freie Radikale (BASKAYA et al. 1997). SOARES et al. (1995) berichteten, dass die Rekrutierung inflammatorischer Leukozyten initial in den geschädigten Gefäßen vorkommt und sich dann in den geschädigten Kortex und Hippokampus ausbreitet. Eine Aktivierung von Leukozyten wurde nur in Bereichen mit zerstörter BHS festgestellt. Folglich kann die Akkumulation von Leukozyten in geschädigten Gehirnregionen zur zweiten Öffnungsphase beitragen, indem die Leukozyten zytotoxische Substrate wie lysosomale Enzyme und Zytokine sezernieren (BASKAYA et al. 1997).

KOCHANNEK et al. (1995) zeigten, dass das Maximum der Ödembildung nach 24 Stunden erreicht ist und bis zum zweiten Tag in dieser Stärke erhalten bleibt. Jedoch konnten sie zu keinem Zeitpunkt eine Ödemformation in der kontralateralen Hemisphäre beobachten. Weiterhin zeigten sie, dass das Gehirnödem bereits nach einer Woche zu etwa 70 % resorbiert ist.

2.2.3 Therapieformen nach SHT

Die Prognose eines Patienten mit schwerem Schädel-Hirn-Trauma hat sich in den letzten 20 Jahren deutlich verbessert. Die Wirksamkeit der Behandlung weist in der Frühphase die höchste Effizienz auf (*golden hour of shock*). Aus diesem Grund ist eine Verbesserung der Prognose vor allem von einer Optimierung der Akutbehandlung in der Prähospitalphase und in der Notaufnahme zu erwarten. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgemeinschaft Intensivmedizin/Neurotraumatologie der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC) und unter Beteiligung der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI) ist vom wissenschaftlichen Arbeitskreis Neuroanästhesie der DGAI eine Leitlinie zur Primärversorgung bei schwerem SHT erarbeitet worden (DINKEL u. HENNES 1998).

Die vorrangige Aufgabe der innerklinischen Akutversorgung stellt die Vermeidung Prognose-limitierender zerebraler Sekundärschäden dar, die bei etwa 90 % aller letalen SHT bestehen (GRAHAM et al. 1989). Vor allem die arterielle Hypotonie wie auch die Hypoxämie sind die entscheidenden extrakraniellen Determinanten eines ungünstigen Heilungsverlaufes nach SHT (MILLER et al. 1981; CHESNUT et al. 1993). Trotz präklinischer Erstversorgung liegen bei stationärer Aufnahme bei 10 bis 15 % der Patienten eine Hypoxämie und bei 15 bis 20 % eine Hypotonie vor (WAHJOEPARAMONO et al. 1993). Die Aufrechterhaltung eines ausreichend hohen zerebralen Perfusionsdrucks (CPP=MAP-ICP) ist von herausragender Bedeutung, da in der Regel die Hindurchblutung in der Frühphase nach einem SHT erniedrigt ist (BOUMA et al. 1991; BOUMA u. STRINGER 1992; MARTIN et al. 1992). Ischämische Hirnläsionen konnten durch Autopsie bei über 80 % der Patienten mit einem letalen SHT gefunden werden (GRAHAM et al. 1989). Um ischämische zerebrale Sekundärschäden zu vermeiden, ist ein CPP über 70 mmHg anzustreben. Hierzu sollte bei erhöhtem intrakraniellen Druck ein MAP über 90 mmHg und ein systolischer Blutdruck über 120 mmHg anvisiert werden. Um diese Richtwerte zu erreichen, muss im gegebenen Fall eine Volumentherapie, der Einsatz von vasoaktiven Substanzen und das Stillen einer evtl. vorhandenen Blutung durchgeführt werden bzw. auch eine Hypertonie korrigiert werden (DINKEL u. HENNES 1998).

Zur Vermeidung von zerebralen Sekundärschäden trägt, neben der Kreislaufstabilisierung, die Prävention der Hypoxämie, Hyperkapnie und extremen Hypokapnie bei. Bis zu 70 % aller Patienten mit einem schweren SHT weisen neben der Hypoxämie eine Hyperkapnie auf, die durch zerebrale Vasodilatation den ICP steigert (CHESNUT et al. 1993). Vorrangige Therapieziele sind daher eine Normoxämie ($\text{SaO}_2 > 95\%$, $\text{PaO}_2 > 100\text{ mmHg}$) und eine

Normokapnie im unteren Normbereich ($\text{PaCO}_2 \approx 35$ mmHg, $\text{PetCO}_2 \approx 30$ mmHg). Falls diese Kriterien bei stationärer Aufnahme nicht erfüllt sind, müssen alle Patienten mit acht bzw. weniger als acht Punkten auf der Glasgow Coma Scale und alle Patienten mit einer beeinträchtigten Sauerstofftransportkapazität endotracheal intubiert, volumenkontrolliert beatmet und adäquat (Pulsoxymetrie, Kapnometrie, Blutgasanalysen) kontrolliert werden (DINKEL u. HENNES 1998). Ein schweres SHT verursacht bei 70 bis 80 % der Patienten einen Anstieg des ICP. Die Mortalität korreliert eng mit der Höhe des ICP. Eine Senkung des ICP ist bei Werten über 20 mmHg indiziert. Die Therapie ist auf die Reduktion des ICP und auf die Erhöhung des CPP (≥ 70 mmHg) ausgerichtet (JOINT SECTION ON NEUROTRAUMA AND CRITICAL CARE 1995). Die Beseitigung intra- und extrakranieller Ursachen einer ICP-Erhöhung (z.B. Hämatom, Hyperkapnie, Hypotonie) hat Vorrang vor symptomatischen Maßnahmen.

Stress- und schmerzinduzierte Anstiege des ICP müssen durch Analgosedierung oder Narkose verhindert werden. Eine Analgesie ist bei komatösen Patienten erforderlich (BRUDER et al. 1994).

Das Hypnotikum Propofol wird bevorzugt zur Sedierung von Patienten mit einem SHT auf der Intensivstation eingesetzt (s. Kapitel 2.3).

Die Stabilisierung der Vitalfunktionen, die Wiederherstellung und Aufrechterhaltung des normalen CPP durch Volumensubstitution und Vasokonstringenzen sind neben dem Hochlagern des Oberkörpers (Vorraussetzung hierfür ist eine störungsfreie zerebrovenöse Drainage) bis maximal 30 °C wirksame Basismaßnahmen (FELDMANN et al. 1992). Die Liquordrainage und der Einsatz von Mannitol gelten als wichtige Zusatzmaßnahmen. Dabei sind Kurzinfusionen von Mannitol (0,25-1 g/kg) wirkungsvoller und mit weniger Komplikationen verbunden als eine Dauerinfusionen. Ein Ansteigen der Serumosmolarität über 320 mosmol/l und eine Hypovolämie sind zu verhindern (SMITH et al. 1986). Zusätzlich können bei ungenügender osmotischer Wirkung Schleifendiuretika verabreicht werden. Wenn der ICP mit diesen Maßnahmen nicht reduziert werden kann, ist die therapeutische Hyperventilation zu erwägen. Die Hyperventilation ist Teil des traditionellen Therapiekonzepts bei intubierten und kontrolliert beatmeten Patienten mit erhöhtem intrakraniellen Druck. Dem therapeutischen Einsatz der Hyperventilation liegt die CO_2 -Reagibilität der Hirngefäße zugrunde, die bei Abnahme des arteriellen Kohlendioxidpartialdruckes (PaCO_2) zu einer Reduktion der Hirndurchblutung und des zerebralen Blutvolumens führt. Zusätzlich soll die Hyperventilationstherapie eine Zunahme

des interstitiellen und neuronalen pH-Werts und damit eine Reduktion der ischämischen Azidose bewirken (WERNER 2000a).

Als weitere Maßnahmen gelten neben der Hyperventilation auch die milde Hypothermie und die Therapie mit Barbituraten. Der Einsatz der Hypothermie erwies sich im Tiermodell als neuroprotektiv (DINKEL u. HENNES 1998). Durch eine milde Hypothermie (36,5 °C bis 34,0 °C Kerntemperatur) konnte in klinischen Untersuchungen eine Senkung des zerebralen Sauerstoffverbrauchs, eine Reduktion des erhöhten ICP, eine verminderte Freisetzung toxischer Neurotransmitter, eine Abnahme in der Mortalität und ein verbessertes neurologisches Ergebnis erzielt werden (MARION et al. 1993). Jedoch kann aufgrund unzureichender Erkenntnisse über das optimale Ausmaß, Einsatzdauer und Maßnahmen zur Kühlung und Wiedererwärmung die aktive Kühlung derzeit nicht als Routinebehandlung empfohlen werden. Barbiturate werden klassisch zur Senkung des erhöhten intrakraniellen Drucks eingesetzt (EISENBERG et al. 1988). Sie senken den zerebralen Sauerstoffverbrauch und sollen unter anderem dadurch hirnpotektiv wirken. Der Patient erhält eine kontinuierliche Infusion unter EEG-Monitoring (Burst-Suppression-EEG).

Spezifische Maßnahmen zur Hirnpotektion konnten entweder aufgrund des fehlenden Beweises der klinischen Wirksamkeit nicht empfohlen werden (Bsp. Glukokortikoide) oder sind speziellen Indikationen, wie beispielsweise Kalziumantagonisten bei traumatischer Subarachnoidalblutung, vorbehalten. So wird die Indikation und Wirksamkeit einer Therapie mit Glukokortikoiden beim Neurotrauma kontrovers beurteilt (GUDEMAN et al. 1979). In mehreren SHT Studien (GUDEMAN et al. 1979; COOPER et al. 1979; DEARDEN et al. 1986) konnte keine günstige Beeinflussung des neurologischen Ergebnisses erzielt werden. Daneben galt das wissenschaftliche Interesse der Reduktion der Ca^{++} -Freisetzung durch Kalziumantagonisten (DINKEL u. HENNES 1998). Die ischämiebedingte Erhöhung der intrazellulären Ca^{++} -Konzentration ist ein Trigger für die Vermittlung einer Vielzahl von neurodegenerativen Prozessen. So wurde für das Medikament Nimodipin eine Hemmung der Ca^{++} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern nachgewiesen. Die Blockade von Dehydropyridin-sensitiven Ca^{++} -Kanälen mit Nimodipin nach traumatischer Subarachnoidalblutung ist wirkungsvoll, da es eine Hypoperfusion, die durch Vasospasmen induziert wurde, vermeiden kann (HARDERS et al. 1996).

Indomethacin, ein Zyclooxygenasehemmer, senkt nach einer Bolusinjektion von 50 mg signifikant den ICP. Allerdings tritt nach dem Absetzen ein Rebound-Phänomen auf (BIESTRO et al. 1995).

Da die bisherigen Konzepte zur Therapie des SHT unzureichend sind, bedarf es weiterer Studien, um Patienten gezielter vor neurologischen Folgeschäden nach einem SHT zu schützen. Nach wie vor ist die Anästhesie Gegenstand der SHT-Forschung, da sie regelmäßig in die Erstbehandlung von SHT-Patienten eingebunden ist.

2.3 Propofol

2.3.1 Allgemeine Informationen

Propofol (z. B. Disoprivan 2 %, Astra-Zeneca, Wedel) ist ein einfach gebauter Phenolabkömmling (siehe Abb. 8). Aufgrund der phenolischen Hydroxylgruppe in der Strukturformel ist Propofol ein potentes Antioxidans und zusätzlich ein Inhibitor der Lipidperoxidation (MURPHY et al. 1992).

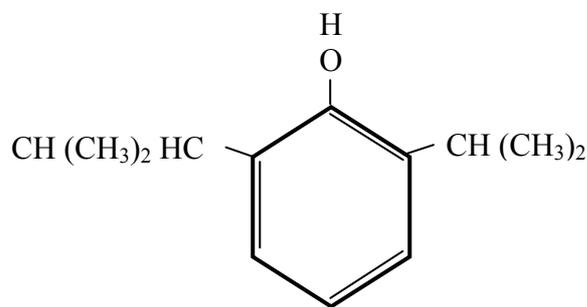


Abbildung 8: Molekülstruktur von Propofol.

Seit den 1980er Jahren wird Propofol als allgemeines Anästhetikum und Hypnotikum ohne analgetische Potenz eingesetzt (JAMES u. GLEN 1980). Zur Anwendung kommt es als 1%iges oder 2%iges 2,6-Diisopropylphenol in Form einer Öl in Wasser Emulsion mit 10 % Sojabohnenöl, 2,5 % Glycerol und 1,2 % Eiphosphatiden mit einem pH-Wert zwischen 6 und 8,5. Im März 1993 wurde Propofol als Sedativum in der Intensivbetreuung von künstlich beatmeten Patienten zugelassen (MIRENDA u. BROYLES 1995).

2.3.2 Pharmakokinetik

Propofol wird aufgrund seiner hohen Lipophilie sehr schnell im Rahmen eines offenen 3-Kompartimentsystems umverteilt und metabolisiert. Rückverteilungen aus dem schlechter durchbluteten Fettgewebe finden protrahiert statt (FREY u. LÖSCHER 1996). Propofol wird hauptsächlich in der Leber biotransformiert. Einige Berichte weisen auf einen

extrahepatischen Metabolismus von Propofol hin. DAWIDOWICZ et al. (2000) konnten nachweisen, dass Propofol beim Menschen in der Lunge zu 2,6-diisopropyl-1,4-quinol transformiert wird. Die inaktiven Hauptmetaboliten sind das Glukuronsäure-konjugierte Propofol und das Glukuronsäure- und Sulphat-konjugierte, hydroxylierte Derivat 2,6-diisopropyl-1,4-quinol. Die Metaboliten werden zu 88 % über den Urin ausgeschieden, nur 2 % über den Kot. Weniger als 0,3 % der Ausgangsdosis wird unverändert ausgeschieden (SIMONS et al. 1988).

2.3.3 Pharmakodynamik

Propofol führt innerhalb einer Minute zum Toleranzstadium ohne Exzitationserscheinungen. Aufgrund einer sehr schnellen Biotransformation ist die Wirkungsdauer nach einmaliger Applikation nur ca. 5 bis 10 min. Da die Metaboliten rasch ausgeschieden werden, sind Rückstandsbildungen in Muskulatur und Fettgewebe unwahrscheinlich. Aus diesem Grund sind kumulative Effekte beim Menschen nicht zu erwarten (FORTH et al. 1996). Propofol ist kombinierbar mit Inhalationsnarkotika, Analgetika und Sedativa. Auch Infusionen sind möglich. Zur Narkoseeinleitung benötigt man in der Humanmedizin ca. 1,5 bis 2,5 mg/kg intravenös (i.v.) und für die Narkoseaufrechterhaltung ca. 4 mg/kg/h Propofol (FREY u. LÖSCHER 1996). In der Veterinärmedizin bewegt sich die Propofol-Dosierung zur Narkoseeinleitung (ohne Prämedikation) beim Hund zwischen 5 und 7 mg/kg/i.v. und bei der Katze zwischen 5 und 8 mg/kg/i.v. Zur Narkoseaufrechterhaltung benötigt man beim Hund 9 mg/kg/h und bei der Katze bis zu 30 mg/kg/h Propofol (ERHARDT et al. 2004; LENDL u. HENKE 2004).

2.3.4 Einsatz in der Medizin

Im Mittelpunkt der Therapie von SHT-Patienten steht die Minimierung des zerebralen Sekundärschadens. Hierbei stellen Analgesie und Sedierung essentielle Therapiebestandteile dar, jedoch lässt sich ein Beweis für deren Wirksamkeit in Bezug auf die Prognose in der vorliegenden Literatur nicht finden. Neben der Kontrolle des ICP kommt auch dem CPP eine

große Bedeutung zu. Ziel hierbei ist es, die zerebrale Stoffwechselrate (CMR) zu verringern. Dadurch kommt es in Gebieten mit erhaltener Autoregulation der Hirngefäße zu einer Verminderung des CBF, des CBV und des ICP. In minderperfundierte Bereiche kann eine Senkung der Sauerstoffaufnahme einem ischämischen Schaden vorbeugen (GREMMELT u. BRAUN 1995). Es existieren einige klinische Studien, die sich mit dem Einsatz von Propofol in der Intensivmedizin beschäftigten. In einer der ersten Studien zu dieser Thematik untersuchten FARLING et al. (1989) die Verwendung von Propofol als Sedativum bei schweren Kopfverletzungen. Hierzu wurde über 24 Stunden eine 1%ige Propofol Infusion (48 µg/kg/min) an zehn Patienten verabreicht, nachdem initial Morphin (5-10 mg/h), Midazolam (5-10 mg/h) und Vecuronium (0,1 mg/kg/h) gegeben wurde. Im Gegensatz zum ICP, der unverändert blieb, war der CPP am Ende der 24 Stunden signifikant gestiegen. In einer anderen 24-stündigen Untersuchung von MERGAERT et al. (1991) wurde der Effekt einer Infusion mit 1%igen Propofol (15 Patienten, 1 bis 3 mg/kg/h) mit einer Fentanyl Infusion (16 Patienten, 0,3 bis 0,5 mg/h) verglichen. Beide Gruppen erhielten zusätzlich Pancuronium (4 bis 6 mg/h). In der Propofolgruppe stieg der CPP signifikant von 75 auf 93 mmHg an. Der ICP blieb stabil in der <16 mmHg ICP Untergruppe, stieg aber in der >16 mmHg ICP Untergruppe an. In der Studie von STEWART et al. (1994) wurden neun Patienten mit Propofol infundiert (im Mittel 55 µg/kg/min) und sechs Patienten mit Morphin (0 bis 4 mg/h) und Midazolam (0 bis 5 mg/h) sediert. Nach 40 Stunden waren keinerlei Unterschiede in den beiden Gruppen hinsichtlich Blutdruck, ICP oder CPP zu erkennen. HARTUNG (1987) untersuchte das intrakranielle Druckverhalten bei fünf Patienten mit Schädel-Hirn-Trauma im Alter von 17 bis 18 Jahren nach Propofol- (1 mg/kg/KG) bzw. Thiopental-Applikation (2 mg/kg KG). Die Werte von ICP, MAP, CPP, Blutdruck (blutig), Herzfrequenz (HF) und die Blutgase wurden vor, sowie 1, 3, 5, 10 und 15 min nach Applikation bestimmt. Der ICP fiel bei Propofolgabe initial ab, jedoch wurden die Ausgangswerte nach 5 min wieder erreicht. Die Reduktion des MAP war deutlich, die Ausgangssituation war nach 10 min wieder hergestellt. Der CPP verringerte sich bei drei Patienten leicht, bei einem deutlich und stieg bei einem weiteren leicht an. Die Blutgasanalyse belegte über den Messzeitraum unveränderte Ventilations- und Oxygenierungsverhältnisse.

KELLY et al. (1999) untersuchten den Einsatz von Propofol an Patienten mit moderaten und schweren Kopfverletzungen. Die Studie umfasste 42 Patienten wobei hiervon 19 Patienten der Morphingruppe (1,3 +/- 0,7 mg/h) zugeteilt waren und 23 Patienten der Propofolgruppe (55 +/- 42 µg/kg/min) angehörten. Eine ausreichende Analgesie wurde bei allen Patienten durch Morphin erzielt. Die durchschnittliche Therapiedauer betrug in der Propofolgruppe 95 +/- 87 Stunden, in der Morphingruppe 70 +/- 54 Stunden. Der ICP wie auch der CPP verhielten sich

in beiden Gruppen gleich, jedoch sank der ICP in der Propofolgruppe am 3. Tag der Therapie. Obwohl in der Propofolgruppe ein höherer Einsatz von Vasopressoren und Mannitol beschrieben wurde, sank der Verbrauch von Muskelrelaxantien, Benzodiazepinen, Pentobarbital und Liquordrainagen. In der Langzeitbeobachtung (sechs Monate) erzielten beide Gruppen ähnliche Ergebnisse, bessere Resultate wurden bei Patienten erzielt die in den sechs Monaten eine Propofol-Gesamtdosis von mindestens 100 mg/kg Körpergewicht erhielten.

2.3.5 Neuroprotektives Potential von Propofol

Die zerebrale Neuroprotektion umfasst all jene prophylaktischen Maßnahmen, die die Toleranz des ZNS gegenüber Hypoxie und Ischämie verbessern. Die Geschichte der zerebralen Neuroprotektion begann 1960, als festgestellt wurde, dass anästhesierte Patienten weniger EEG-Schwankungen unterworfen waren, als dies im Wachzustand der Fall war, und als zusätzlich für Barbiturate nachgewiesen wurde, dass sie in der Lage sind, die Toleranz des Gehirns hinsichtlich Hypoxie und Ischämie zu verbessern (WELLS et al. 1963; GOLDSTEIN et al. 1966). Danach wurde für mehrere anästhetische Regime herausgefunden, dass sie die Inzidenz für eine neuronale Schädigung im Vergleich zum Wachzustand senken. Trotz einer beachtlichen Anzahl an experimentellen und klinischen Studien und Erkenntnissen in der Grundlagenforschung, ist die Rolle der Anästhetika als Neuroprotektiva immer noch nicht bis ins letzte Detail geklärt (POL 2000). Zahlreiche Studien haben sich vor allem anhand zerebraler Ischämie- und Hypoxie-Modelle, sowohl in In-vitro- wie auch In-vivo-Versuchsansätzen mit der neuroprotektiven Wirkung von Propofol befasst (YAMASAKI et al. 1999). Bis zum heutigen Tag existieren drei experimentelle Traumastudien, die sich mit der neuroprotektiven Wirkung von Propofol beschäftigt haben. So untersuchten HOLLRIEGEL et al. (1996) in einem In-vitro-Zellversuch den Einfluss von Propofol auf die Neuronenüberlebensrate und auf die Erhaltung der synaptischen Integrität nach einer künstlichen Amputation der Dendriten. Sie fanden heraus, dass Propofol über Gamma-Amino-Buttersäure (GABA_A) Rezeptoren seine neuroprotektive Wirkung dosisabhängig ausübt. Dieser neuroprotektive Effekt, Propofol ist ein GABA_A Agonist, wurde allerdings nur erzielt, wenn Propofol bereits vor der Dendritotomie gegeben wurde.

Eine zweite experimentelle Studie zu diesem Thema untersuchte die neuroprotektive Wirkung von Propofol und zwei weiteren Anästhetika, Halothan und Chloralhydrat, im Weight-drop-

Modell an der Maus. Das einzige Bewertungskriterium war das Erfassen des neurologischen Status nach der Traumainduktion. Parameter wie Blutdruck, Blutgase etc. wurden nicht aufgezeichnet (TECOULT et al. 2000). Auch eine weitere Studie beschäftigte sich mit dem Weight-drop-Modell, allerdings an der Ratte. Dem experimentell induzierten Trauma schloss sich eine Phase der moderaten Hypothermie (33 bis 24 °C) an, entweder unter Propofolanästhesie oder Isoflurannarkose. Die Messung der physiologischen Variablen ergab, dass eine Kombination von Hypothermie und Propofolanästhesie nach einem SHT der Isoflurannarkose vorzuziehen ist, da Propofol eine Senkung des ICP und einen Anstieg des CPP und des lokalen CBF induziert (KAHVECI et al. 2001).

Es existieren einige klinische Studien über das neuroprotektive Potential von Propofol. So untersuchten STEPHAN et al. (1987) die Auswirkungen von Propofol auf die Gehirndurchblutung und den Sauerstoffverbrauch des Gehirns an Patienten mit koronarer Herzkrankheit. Sie fanden heraus, dass Propofol (0,2 mg/kg/min) zu einer Senkung des mittleren Perfusionsdrucks um 25 % führte, die Autoregulation in diesem Bereich jedoch erhalten blieb. Aufgrund einer Abnahme der zerebralen Sauerstoffaufnahme ($CMRO_2$) um 36 %, die eng mit einem Absinken der neuronalen Aktivität im EEG korreliert, sank die Hirndurchblutung um 51 %. Der Hirngefäßwiderstand stieg um 55 % an. Propofol übt wahrscheinlich über die Senkung der zerebralen Sauerstoffaufnahme und der Hirndurchblutung eine hirnprotektive Wirkung aus.

Auch VANDESTEENE et al. (1988) stellten unter Propofolgabe (0,1 mg/kg/min) eine Reduktion der Hirndurchblutung um 28 % und eine Senkung der zerebralen Sauerstoffaufnahme um 18 % fest. Sowohl STEPHAN et al. (1987) als auch VANDESTEENE et al. (1988) führen die Reduktion der Hirndurchblutung während einer Propofol-Infusion auf einen sinkenden Stoffwechselbedarf zurück.

Zwischen der Hirndurchblutung und der metabolischen Stoffwechselrate des Sauerstoffs besteht eine lineare Korrelation. Propofol senkt beide proportional beim Menschen, ohne die zerebrale arteriovenöse Sauerstoffgehaltsdifferenz (cerebral arteriovenous oxygen content difference) zu beeinflussen (OSHIMA et al. 2002). WERNER et al. (1992) zeigten an Hunden, dass Propofol (0,8 mg/kg/min) die Hirndurchblutung, die Blutflussgeschwindigkeit und die metabolische Stoffwechselrate des Sauerstoffs in ähnlichem Umfang senkt. KOCHS et al. (1992) wiesen nach, dass Propofoldosierungen, die zu einem Burst-Suppression-Muster im EEG führten, sowohl ein signifikant verbessertes neurologisches wie auch ein histopathologisches Endergebnis nach inkompletter zerebraler Ischämie im Vergleich zu einer Fentanyl/Lachgas-Anästhesie erzielten. Zudem konnte durch diese Studie belegt werden, dass die neuroprotektive Wirkung von Propofol unabhängig vom Plasma-Glukosespiegel ist.

YAMASAKI et al. (1999) stellten fest, dass Propofoldosierungen, die in der Lage sind, ein Burst-Suppression-Muster im EEG zu erzielen, neuroprotektiv sind.

Propofol reduziert die Aktivität kortikaler Neuronen, indem es die durch GABA_A Rezeptoren vermittelte synaptische Inhibition verstärkt (ANTKOWIAK u. KIRSCHFELD 2000). HANS et al. (1994) zeigten in einer Zellkultur, dass hohe Propofolkonzentrationen in der Lage sind, die über N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) Rezeptoren vermittelte Neurotoxizität von Glutamat signifikant zu vermindern. Die Autoren machten hierfür eine vermutlich allosterische Hemmung der NMDA Rezeptoren verantwortlich (ORSER et al. 1995). ZHU et al. (1997) hingegen stellten unter Propofolgabe und Normothermie (37 °C) eine Erhöhung des neuronalen Zellschadens durch NMDA fest.

Auch AMORIM et al. (1995) zeigten in einem In-vitro-Versuch, dass Propofol unter normothermen Bedingungen (37 °C) nicht zu einer Verminderung des anoxischen Schadens führt, allerdings unter hyperthermen Bedingungen (39 °C). Grund hierfür ist einerseits die Verminderung des Ca⁺⁺- und Na⁺-Influx und andererseits der K⁺-Efflux. Die Reduzierung des elektrophysiologischen Schadens war jedoch nur dann signifikant, wenn Propofol bereits vor Beginn der Hyperthermie angewandt wurde. Dass Propofol den Glutamat abhängigen Ca⁺⁺-Eintritt in die Synaptosomen blockiert, stellten BIANCHI et al. (1991) in einem Versuch an Ratten fest. VELLY et al. (2003) bestätigten die neuroprotektive Wirkung von Propofol in einem In-vitro-Sauerstoff-Glukose-Mangel-Modell. Propofol senkt in der Zellkultur, bei Verwendung von klinisch relevanten Dosen (0,05-10 µmol/90min), sowohl signifikant die Freisetzung von Laktatdehydrogenase (LDH) wie auch die extrazelluläre Glutamatkonzentration, während die Aufnahme von Glutamat verstärkt wird.

2.4 Halothan

2.4.1 Allgemeine Informationen

Halothan, ein fluorierter (halogenerter) Kohlenwasserstoff, wird seit über 30 Jahren in der Human- und Veterinärmedizin als dampfförmiges Inhalationsnarkotikum eingesetzt. Als klare Flüssigkeit (Siedepunkt 50 °C) wird es unter dem Zusatz von 0,01 % Thymol (Stabilisator) in braunen Flaschen aufbewahrt, da durch Lichteinfluss Brom und flüchtige Säuren freigesetzt werden können. Halothan riecht süßlich und hat eine geringgradige Reizwirkung auf die Schleimhäute im Respirationstrakt. Aufgrund seines hohen Dampfdruckes muss es über spezielle Verdampfer appliziert werden (FORTH et al. 1996).

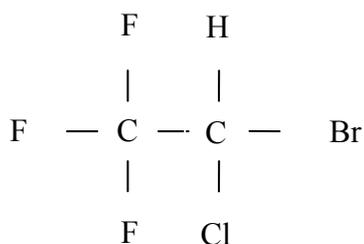


Abbildung 9: Molekülstruktur von Halothan.

2.4.2 Pharmakokinetik

Die hohe Lipophilie des Halothan kann schon während der Anflutungsphase zur Umverteilung in das schlechter durchblutete Fettgewebe führen. Da nach Beendigung der Narkose innerhalb von 30 min 60 bis 80 % des applizierten Halothan unverändert abgeatmet werden, ist die Gefahr der Rückstandsbildung nach einmaliger Anwendung gering (FREY u. LÖSCHER 1996). Bis zu 20 % der Halothangesamtmenge werden in der Leber durch mischfunktionelle Oxidasen (Monooxygenasen im endoplasmatischen Retikulum) biotransformiert. Dies geschieht überwiegend erst nach der Narkose im Zeitraum bis 48 Stunden und mehr. Die dabei entstehenden Brom- und Fluorionen führen bei Dauerbelastung zu Nieren- und Leberschäden (Leberstoffwechseldepression). Die nichtflüchtigen Metaboliten (Hauptmetabolit: Trifluoressigsäure) werden mit dem Harn eliminiert (FORTH et al. 1996).

2.4.3 Pharmakodynamik

Halothan wird seit 1956 klinisch eingesetzt und war für lange Zeit das meist verwendete Narkotikum. Der MAC_{50} von Halothan beträgt 0,8 Vol%. Aufgrund seiner geringen Blutlöslichkeit und hohen Lipophilie wird sowohl die Einleitungsphase rasch durchlaufen wie auch eine schnelle Anflutung im ZNS erreicht. Man nimmt an, dass die Lipophilie Stoffwechsel- und Austauschvorgänge in den Membranen des ZNS beeinflusst, und somit Ursache für eine Hemmung bestimmter Impulsleitungen und Transmitterbewegungen sein kann (FREY u. LÖSCHER 1996). Halothan zeichnet sich durch eine schwach analgetische Wirkung aus. Seine skelettmuskelrelaxierende Wirkung ist ebenfalls gering, jedoch erhöht sich die Wirksamkeit peripherer Muskelrelaxantien. Das Toleranzstadium wird beim Menschen mit 0,5 bis 1,2 Vol% Halothan aufrechtgehalten (FORTH et al. 1996). Um eine ausreichende Anästhesie ohne eine Beeinträchtigung der Herz-Kreislauf-Funktion zu erreichen, wird Halothan relativ häufig mit Lachgas oder einem Opioid (z.B. Fentanyl) kombiniert. Aufgrund seiner atemdepressiven Wirkung sollten längere Halothannarkosen unter kontrollierter Beatmung erfolgen (FREY u. LÖSCHER 1996).

2.5 Elektroenzephalographie (EEG)

Das EEG erfasst als nicht invasives und kontinuierliches zerebrales Monitoringverfahren die spontane hirnelektrische Aktivität. Die über Oberflächenelektroden abgeleiteten hirnelektrischen Signale repräsentieren im Wesentlichen die synaptische Aktivität kortikaler Neuronen und gestatten ein Abschätzen der funktionellen neuronalen Integrität und des zerebralen Metabolismus. Beide Größen können durch physiologische Variablen, Pharmaka, erhöhten ICP oder zerebrale Ischämie beeinflusst werden. Durch Messung am Zielorgan (Gehirn) orientiert an der Wirkung, nicht an einer fixen Dosis, sind pharmakokinetische und pharmakodynamische Unterschiede zwischen den Tieren berücksichtigt (WERNER u. ENGELHARD 2001).

Eine Abnahme in der Hirnfunktion geht in der Regel mit einer Verlangsamung des EEG einher. Somit bietet die Frequenzzusammensetzung des EEG einen Anhalt zur Einschätzung der Schwere einer zerebralen Funktionsstörung. Die Frequenz des EEG wird als Anzahl der Potentialschwankungen pro Sekunde angegeben.

In der Elektroenzephalographie werden bestimmte Frequenzen zu Frequenzbereichen bzw. Frequenzbändern zusammengefasst. Man kann folgende Frequenzbereiche unterscheiden:

- Betawellen (β): 13 bis 30/s. Sie kommen beim aufmerksamen, wachen Erwachsenen vor.
- Alphawellen (α): 8 bis 13/s. Sie stellen den Grundrhythmus des ruhenden Gehirns bei geschlossenen Augen dar. Beim Öffnen der Augen kommt es zur α -Blockade, es treten hochfrequente Wellen auf, die β -Wellen.
- Thetawellen (θ): 4 bis 8/s. Sie treten bei abnehmender Vigilanz in Erscheinung, es kommt zur Verlangsamung des EEG.
- Deltawellen (δ): 0,5 bis 4/s: Sie treten bei weiterer Dämpfung der Hirnfunktion auf.

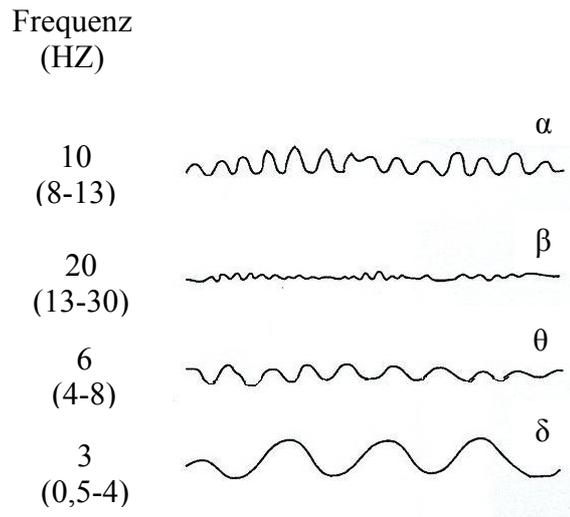


Abbildung 10: Einteilung der klassischen Frequenzbänder (modifiziert nach SCHMIDT u. BISCHOFF 2004)

Die klassische Einteilung der Frequenzbänder wird sowohl im hochfrequenten Bereich (>30/s) mit den Gammawellen (γ) als auch im unteren Bereich mit den Sub- δ -Wellen ergänzt (SCHMIDT u. BISCHOFF 2004).

Generell kommt es mit zunehmender Anästhetikadosierung zur Abnahme der schnellen und zu einer Zunahme der langsamen Frequenzanteile. Bei geringen Anästhetikakonzentrationen sind die hochfrequenten EEG-Anteile im Sinne einer Exzitation verstärkt. Folglich kommt es bei der Narkoseeinleitung zur Frequenzsteigerung.

EEG-Veränderungen sind medikamentenspezifisch. Alle Hypnotika oder Anästhetika haben jedoch bei sehr tiefer Narkose als gemeinsames Muster das Auftreten von Burst-Suppression-Mustern (BS). Hierunter wird die teilweise Unterdrückung der kortikalen EEG-Aktivität (*Suppression*) im Wechsel mit hochfrequenter EEG-Aktivität (*Burst*) verstanden (SCHMIDT u. BISCHOFF 2004).



Abbildung 11: Bildliche Darstellung von Burst-Suppression-Mustern im EEG (modifiziert nach SCHMIDT u. BISCHOFF 2004).

Unter der Burst-Suppression-Ratio versteht man den prozentualen Anteil des supprimierten EEG pro Zeit. Die Burst-Suppression-Ratio kann 0 bis 100 % betragen. In der vorliegenden Studie kommen in den beiden Propofolgruppen zwei verschiedene Burst-Suppression-Ratio zum Einsatz. Hierbei bedeutet eine BS-Ratio von 1 bis 5 % eine beginnende Suppression der Bursts, wohingegen die BS-Ratio von 30 bis 40 % eine tiefere Burst-Suppression bedeutet.



Abbildung 12 : Links: Beispielhafte Darstellung von einer Burst-Suppression-Ratio von 1-5 %, Rechts: Burst-Suppression-Ratio von 30-40 % (modifiziert nach SCHMIDT u. BISCHOFF 2004).

Bei Patienten mit einem SHT ist eine EEG-Überwachung sinnvoll, wenn ein Barbituratcoma zur Reduktion des Hirnstoffwechsels und des ICP indiziert ist. So kann die adäquate Barbituratdosierung durch Definition von Burst-Suppression-Mustern titriert werden (WINER et al. 2001).

Grundsätzlich unterscheidet man zwischen generalisierten und fokalen EEG-Veränderungen. Die generalisierten Veränderungen sind über allen Schädelregionen ähnlich ausgeprägt, wohingegen bei fokalen Veränderungen nur Teilbereiche des Schädels betroffen sind. Eine generalisierte EEG-Veränderung kann durch Narkotika, Sedativa und durch Faktoren hervorgerufen werden, die den Metabolismus bzw. die Energieversorgung des Gehirns beeinflussen und dadurch die Zellfunktion verändern. Zu derartigen Einflussfaktoren zählen neben der Hypoxie die Ischämie, die Hypothermie, die Hypo-/Hyperkapnie und die Hypoglykämie (SCHMIDT u. BISCHOFF 2004).

Fokale EEG-Veränderungen können ihre Ursache in Tumoren, Kontusionsblutungen, subduralen Hämatomen oder in lokal begrenzten Hypoxien haben. Bei Sedierungskonzepten mit noch erhaltener hirnelektrischer Aktivität kann das Auftreten fokaler oder globaler Insulte durch ein EEG-Monitoring erfasst werden. Die Überwachung der spontanen hirnelektrischen Aktivität kann zudem das Auftreten nichtkonvulsiver epileptischer Episoden darstellen, die als Hauptursache für posttraumatische hypoxisch-ischämische Zustände gelten (VESPA et al. 1999).

Ein typisches intraoperatives EEG-Signal umfasst nicht nur die Potentialschwankungen einer Frequenz sondern kann sich aus schnellen sowie langsamen Potentialschwankungen zusammensetzen. Der hieraus resultierende komplexe Informationsgehalt ist visuell kaum zu erfassen und muss komprimiert werden. Aus diesem Grund wurden digitale, computergestützte EEG-Signalverarbeitungen eingeführt, wobei hierbei die Spektralanalyse mit Hilfe der Fast-Fourier-Transformation (FFT) eine Standardmethode zur EEG-Auswertung darstellt (PRIESTLEY 1981). Bei der Spektralanalyse wird ein EEG-Abschnitt in seine Frequenzkomponenten zerlegt. Dabei bleiben die Form und zeitlichen Abfolgen der EEG-Wellen unberücksichtigt. Man geht davon aus, dass sich der zu analysierende EEG-Abschnitt in eine Reihe von Sinus- und Kosinusschwingungen mit bekannten Wellenlängen zerlegen lässt. Für jede einzelne Wellenlänge kann nun die Übereinstimmung anhand von Korrelationsanalysen mit dem zu analysierenden EEG-Abschnitt überprüft werden und ergibt die so genannte Kovarianz. Aus der Summe der Sinus- und Kosinusfunktionen ergibt sich die Information über die Amplitude und die Phasenlage des analysierten EEG-Abschnitts. Eine grafische Darstellung der FFT-Ergebnisse im Leistungsspektrum verdeutlicht die visuelle Verteilung der Frequenzanteile (SCHMIDT u. BISCHOFF 2004).

3. Eigene Untersuchungen

3.1 Zielvorstellung

In der vorliegenden Studie sollen das Ausmaß des Schädel-Hirn-Traumas (SHT) und das Vorkommen Apoptose-assoziiierter Proteine in Kortex und Hippokampus des Rattengehirns sechs Stunden nach kontrolliertem zerebralen Trauma unter EEG-gesteuerter Propofolnarkose in zwei Dosierungen anhand dreier immunhistochemischer Färbungen erfolgen.

Um weitere Erkenntnisse über das Anästhetikum Propofol und über sein möglicherweise neuroprotektives Potential nach einem SHT zu erlangen, kommt in dieser Arbeit das *Controlled-Cortical-Impact-* (CCI-) Modell zum Einsatz, das eine kontrollierte traumatische Hirnrindenkontusion verursacht. Bisher ist noch nicht untersucht worden, inwieweit Propofol, in unterschiedlichen Dosierungen, nach einem experimentell induzierten Schädel-Hirn-Trauma neuroprotektiv wirksam ist, insbesondere wenn dieses realitätsnah kurz nach dem Insult gegeben wird.

Propofol gilt nach moderatem oder starkem Trauma als neuroprotektiv (KELLY et al. 1999). In zwei vorangehenden Studien der eigenen Arbeitsgruppe wurde bereits die neuroprotektive Wirkung von Propofol nach einem längeren Überlebenszeitraum von vier Wochen im Ischämiemodell unter Beweis gestellt. So untersuchte KELLERMANN (2004) u. a. den Einfluss von Propofol auf den nekrotischen und apoptotischen Zelltod über einen Beobachtungszeitraum von 28 Tagen und konnte eine neuroprotektive Wirkung auf das neuronale Gewebe nachweisen. Auch STEGEMANN (2004) zeigte, dass Propofol bis zu 28 Tagen nach einem ischämischen Insult im Zusammenhang mit Apoptose-assoziierten Proteinen neuroprotektiv wirkt.

Da die neuroprotektive Wirkung von Propofol nach längeren Überlebensspannen erwiesen ist soll nun in der vorliegenden Arbeit das neuroprotektive Potential von Propofol bereits nach einer sehr kurzen Überlebenszeit untersucht werden. Die Evaluierung des histologischen Schadens erfolgt sechs Stunden nach kontrolliertem SHT und anschließender Nachbeatmungszeit unter Propofol- bzw. Halothannarkose.

Eine Bestimmung der Läsionsflächen in Gehirnschnitten mit definiertem Abstand zueinander und der prozentualen Häufigkeit der eosinophilen und apoptotischen Nervenzellen erfolgt durch Färbungen mit Kresylviolett und Hämatoxylin Eosin, sowie einer Markierung aktivierter Caspase-3-positiver Neuronen durch Antikörper. Durch digitale Aufnahmen dieser einzelnen Gehirnschnitte kann das gesamte Läsionsvolumen des Gehirns berechnet werden.

Mit dieser Studie sollen bereits bestehende Untersuchungen über die protektiven Wirkungen von Propofol z.B. bei zerebraler Ischämie (KELLERMANANN 2004, STEGEMANN 2004) ergänzt und erweitert werden. Das übergeordnete Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, dazu beizutragen, dass die neuroprotektiven Mechanismen der Anästhetika nach einem SHT besser verstanden werden, und möglicherweise die Analgosedierung mit Propofol als Teil einer Therapie im klinischen Betrieb angewendet werden kann.

3.2 Material und Methodik

3.2.1 Versuchstiere

Die Untersuchungen werden an 39 männlichen Sprague-Dawley Ratten (Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld) durchgeführt.

Die Ratten sind gemäß den Vorgaben zur Versuchstierhaltung bei einer Raumtemperatur von 20 bis 23 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 bis 60 % und bei einem konstanten Luftwechsel (500 l/min) untergebracht.

Der Beleuchtungswechsel zwischen hell (50 bis 100 Lux) und dunkel im Käfig findet alle zwölf Stunden statt.

Mindestens sieben Tage vor Versuchsbeginn werden die Tiere in einem Gruppenkäfig (Makrolon Typ IV, 1800 cm²) untergebracht. Ihr Einstallgewicht beträgt ca. 320-350 g. Bei einer durchschnittlichen Gewichtszunahme von sechs Gramm pro Tag erreichen die Tiere bis zum vorgesehenen Op-Termin ein Körpergewicht von ca. 350-450 g. Als Einstreu dient entkeimtes und entstaubtes Weichholzgranulat (Fa. Altromin, Lage/Lippe).

Alleinfutterpellets (Alleinfutterpellets für Ratten und Mäuse ssniff R/M-Haltung, 10 mm, nitrosaminarm der Fa. ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) und Wasser werden ad libitum angeboten. Die Tiere werden präoperativ nicht nüchtern gesetzt.

Das Tierversuchsvorhaben wurde gemäß § 8 des Deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG i.d.F. vom 25.05.1998, BGBII S. 1105) durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

3.2.2 Versuchsaufbau

Der Versuch gliedert sich in einen operativen Teil (Anästhesie, Präparation, Induktion des Schädel-Hirn-Traumas (SHT), Nachbeatmungsphase) und in einen postoperativen Abschnitt, der eine mikroskopische Analyse des Gehirns beinhaltet. Nur klinisch gesunde Tiere werden für den Versuch zugelassen. Zudem werden sämtliche technischen Geräte vor Operationsbeginn auf ihre Funktionalität hin überprüft.

Während der Präparation (ca. 1,5 h) erfolgt bei allen Tieren die Anästhesie durch 1,2 bis 1,7 Vol% Halothan (Halothan-Eurin 250 ml, Halocarbon Laboratories, Riveredge, NJ, USA) in N_2O/O_2 ($FiO_2=0,33$). Zum Zeitpunkt der ersten Messung 0:00 (Ausgangswert = AW) wird die Halothankonzentration auf $< 1,0$ Vol% verringert. Bei der sich anschließenden Randomisierung in die entsprechende Versuchsgruppe unterscheidet man die SHT-Gruppe (Controlled-cortical-impact=CCI), in der bei allen Tieren ein Trauma induziert wird, von der SHAM-Gruppe (=Scheinversuch). Bei der SHAM-Gruppe erfolgt exakt die gleiche Präparation wie in der SHT-Gruppe, ebenso wird der Schädelknochen trepaniert (s. 3.2.7 SHT-Induktion, Präparation), eine Induktion des SHT jedoch unterbleibt.

Per Losverfahren erfolgt nun die Zuteilung der Tiere in die jeweilige Versuchsgruppe. Bei Tieren der Propofolgruppe (=Behandlungsgruppe) wird Halothan entfernt und Propofol infundiert (Disoprivan 2 %, Astra-Zeneca, Wedel), dosiert nach EEG-Muster mit einer Burst-Suppression-Ratio (BS) in der höher dosierten Propofolgruppe von 30-40 %, in der niedrigeren dosierten Propofolgruppe mit einer BS von 1-5 %. Tiere der Halothangruppe (=Kontrollgruppe) erhalten weiterhin Halothan in Luft/ O_2 ($FiO_2=0,33$).

Innerhalb der 6-stündigen Nachbeatmungszeit erfolgt die Messung der physiologischen Variablen zu genau definierten Messzeitpunkten. Die Überlebenszeit von sechs Stunden endet mit der Dekapitierung und Entnahme des Gehirns. Das Gehirn wird für die sich anschließenden histologischen Untersuchungen bei -70 °C gelagert.

Die nachfolgende Abbildung soll einen schematischen Überblick über die einzelnen Phasen des operativen Versuchsablaufs aufzeigen:

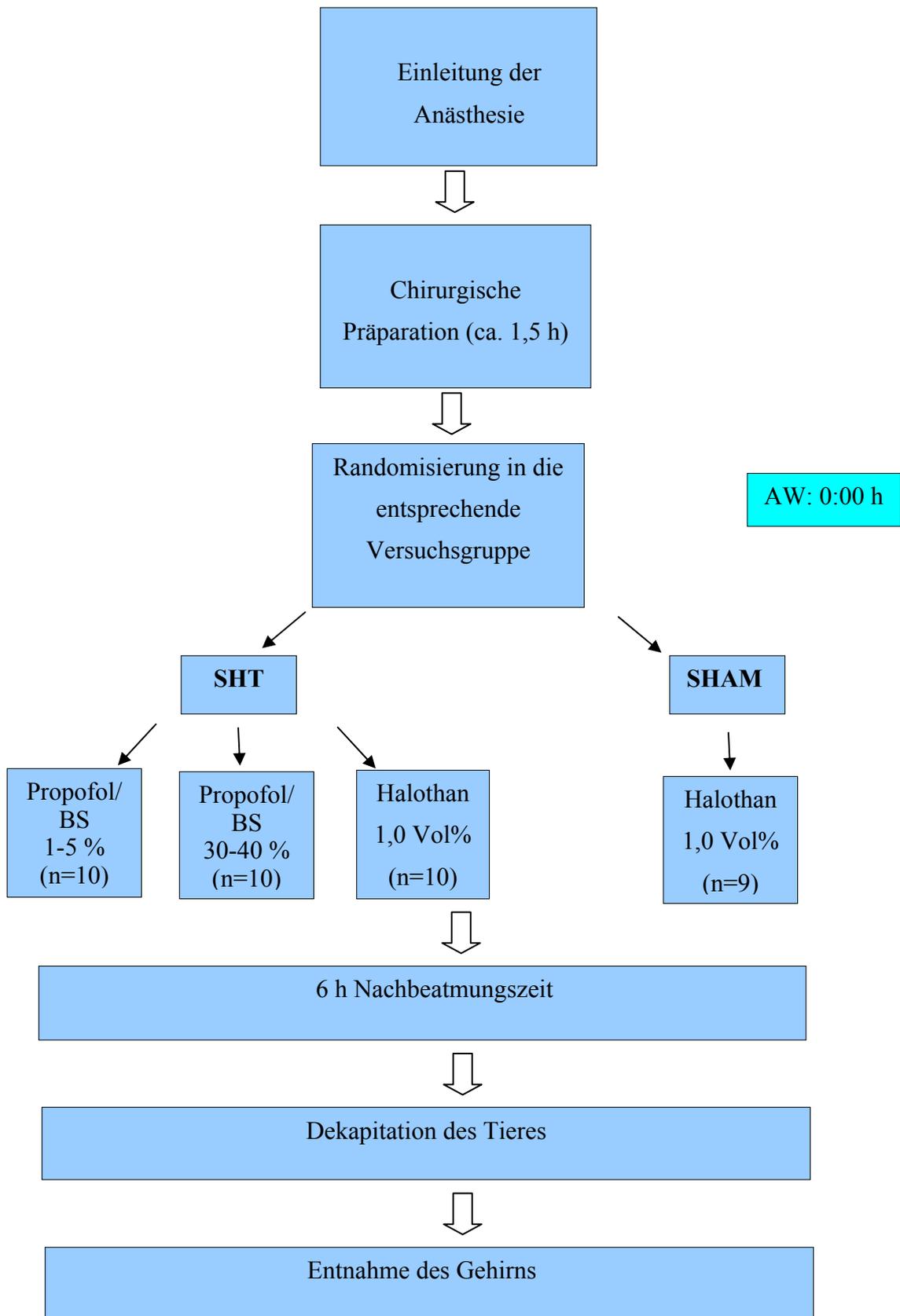


Abbildung 13: Schematische Übersicht über den operativen Abschnitt des Versuchs. AW=Ausgangswert, BS=Burst-Suppression-Ratio, SHAM=Scheinversuch, SHT=Schädel-Hirn-Trauma.

3.2.3 Gruppeneinteilung

Um die 39 Tiere des Versuchs auf die insgesamt vier Gruppen aufzuteilen, erfolgt vor der Induktion des Schädel-Hirn-Traumas die Randomisierung. Per Losverfahren wird das Tier erstens einer der zwei Versuchsgruppen (SHT oder SHAM) und zweitens einer der drei Anästhetikagruppen (Propofol BS1-5 %, Propofol BS30-40 % und 1,0 Vol% Halothan) zugewiesen. Die Evaluierung des histologischen Schadens erfolgt sechs Stunden nach kontrolliertem SHT und anschließender Nachbeatmung unter Versuchsnarkose. Eine Beschreibung der vier Gruppen findet sich im Folgenden:

1. Tiere der SHT/Propofol-Gruppe, Burst-Suppression-Ratio 1-5 % (SHT/Prop BS1-5 %)

Die zehn Tiere dieser Gruppe durchlaufen alle sieben Phasen des operativen Versuchsablaufs von Präparation über SHT-Induktion und Nachbeatmungszeit bis hin zur Euthanasie (s. Abb. 13). Während der 6-stündigen Nachbeatmungsphase erhalten alle Tiere eine Versuchsnarkose mit Propofol, dosiert nach EEG-Muster mit einer Burst-Suppression-Ratio von 1-5 % und werden volumengesteuert beatmet. Durch die Steuerung der Propofolnarkose über das Vorhandensein einer Burst-Suppression-Ratio von 1 bis 5 % im EEG wird bei jedem Tier die gleiche Tiefe des Narkosestadiums gewährleistet.

2. Tiere der SHT/Propofol-Gruppe, Burst-Suppression-Ratio 30-40 % (SHT/Prop BS30-40 %)

Die zehn Tiere dieser Gruppe durchlaufen ebenfalls alle sieben operativen Phasen des Versuchs. In der 6-stündigen Nachbeatmungszeit werden auch hier alle Tiere volumenkontrolliert beatmet während sie ebenfalls eine Versuchsnarkose mit Propofol, dosiert nach EEG-Muster, jedoch hier mit einer Burst-Suppression-Ratio von 30 bis 40 %, erhalten.

3. Tiere der SHT/Halothan-Gruppe (SHT/Halo)

Nachdem die zehn Tiere alle sieben Phasen des operativen Abschnitts durchlaufen haben, werden sie unter einer Kontrollnarkose mit Halothan (1,0 Vol% Halothan in Luft/O₂ (FiO₂=0,33) sechs Stunden nachbeatmet.

4. Tiere der SHAM/Halothan-Gruppe

Die neun Tiere der SHAM-Gruppe erhalten exakt die gleiche Präparation wie die Tiere der SHT-Gruppe, einschließlich einer Trepanation und Eröffnung des Schädelknochens, jedoch unterbleibt eine Induktion des SHT. In der 6-stündigen Nachbeatmungszeit werden alle Tiere der SHAM-Gruppe ebenfalls unter einer Kontrollnarkose mit 1,0 Vol% Halothan in Luft/O₂ (FiO₂=0,33) sechs Stunden nachbeatmet.

Die Tiere aller Gruppen erhalten sofort nach Induktion des Schädel-Hirn-Traumas eine kontinuierliche analgetische Versorgung mit Fentanyl (Fentanyldihydrogencitrat 0,1 mg/2ml, Janssen-Cilag, Neuss) in der Dosierung von 8-10 µg/h intravenös (i.v.).

Arterenol (Norepinephrinhydrochlorid 1 ml, Aventis Pharma, Frankfurt a. M.) wird in allen vier Gruppen zur Erhaltung des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) in physiologischen Bereichen (90-100 mmHg) eingesetzt. Nach der 6-stündigen Nachbeatmungsphase unter Versuchsnarkose werden die Tiere euthanasiert und das Gehirn zur weiteren Analyse entnommen.

3.2.4 Narkose und maschinelle Beatmung

Die Ratten müssen für die Intubation anästhesiert sein. Hierzu werden sie in einen Glaszylinder gesetzt, der eine mit Halothan getränkte Zellstofflage enthält. Mit Eintritt der Bewusstlosigkeit wird das Tier mit einem abgestumpften 18G Herzkatheter (Cavafix Certo 358, Braun, Melsungen) als Tubus, unter Sichtkontrolle mit Hilfe eines eigens von Steigenberger konstruierten Laryngoskop intubiert.

Das Tier wird mit einer volumengesteuerten Beatmungspumpe (Harvard Rodent Ventilator, Model 683, Harvard Apparatus Inc., South Natick, MA, USA) mit 1,2 bis 1,7 Vol% Halothan in N₂O/O₂ (FiO₂=0,33) kontrolliert beatmet. Die durch einen Atemgasmonitor (Capnomac, Fa. Datex, Helsinki, Finnland) überwachten Parameter umfassen die endexpiratorischen Gaskonzentrationen von CO₂, O₂, N₂O und Halothan. Die endexpiratorische CO₂ Konzentration wird durch Regulierung der Beatmungsfrequenz bei Werten zwischen 38 und 42 mmHg konstant gehalten.

Bei diesem Narkosesystem handelt es sich um ein halboffenes System ohne Rückatmung mit einer konstanten Frischgaszufuhr von mindestens 2 l/min und einer Gasabsaugung.

3.2.5 Präparation der Gefäßzugänge

Zur Vorbereitung wird das Tier auf den Rücken gedreht, die Präparationsstellen rasiert und mit Desinfektionsmittel (CutaseptRF, Fa. Bode, Hamburg) eingesprüht. Die verwendeten Katheter werden mit heparinisierendem (Liquemin N 25000, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen) Thromboelastin (Thromboelastin Infusions-Lsg 500 ml, Deltaselect, Pfullingen) 1000 I.E. pro 500 ml gespült, um einer Thrombosierung vorzubeugen.

Zur Katheterisierung der A. coccygea wird auf der Schwanzunterseite in der Medianen ein ca. 1 cm langer Hautschnitt gesetzt und nach stumpfer Präparation des subkutanen Fettgewebes die darüber liegende Faszie dargestellt. Nach Einschneiden der Faszie liegt die A. coccygea frei. Es wird ein Katheter zur invasiven Blutdruckmessung (Cardiicap II, Datex, Helsinki, Finnland) und zur Probenentnahme für die Bestimmung der Blutgase und der Blutglukose in das Gefäß gelegt.

Zur Darstellung der linken V. jugularis erfolgt ein Hautschnitt paramedian an der linken Halsseite. Die Präparation des subkutanen Fettgewebes erfolgt stumpf. Die V. jugularis, die im Sulcus jugularis zwischen dem M. brachiocephalicus und dem M. sternooccipitalis verläuft, wird freigelegt. In die V. jugularis werden drei Katheter zur Medikamentenapplikation (Propofol, Arterenol, Fentanyl) eingeführt. Um Blutungen zu verhindern, wird das Gefäß mit Tabotamp (Ethicon, Norderstedt), einem Hämostyptikum, abgedichtet.

3.2.6 Gemessene Parameter

Während der operativen Phase werden zu genau definierten Messzeitpunkten verschiedene Parameter erhoben und dokumentiert. Dies erfolgt einerseits, um die Narkose des einzelnen Tieres exakt überwachen zu können, andererseits um einen konstanten Versuchsablauf gewährleisten zu können.

Der erste Messzeitpunkt 0:00 h (Ausgangswert) liegt unmittelbar vor der Induktion des Schädel-Hirn-Traumas. Weitere Messungen werden in der 6-stündigen Nachbeatmungsphase nach 20 min (0:20 h), 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h und 6 h erhoben und dokumentiert.

Table 3: Messzeitpunkte der physiologischen Variablen

Messzeitpunkt	Physiologische Variablen
0:00 h (Ausgangswert)	MAP (mittlerer arterieller Blutdruck) HF (Herzfrequenz) Gesamthämoglobin PaO ₂ (arterieller Sauerstoffpartialdruck) PaCO ₂ (arterieller Kohlendioxidpartialdruck) pH-Wert AF (Atemfrequenz) Blutglukose rektale Temperatur Perikranielle Temperatur
0:20 h nach SHT/SHAM	
1 h nach SHT/SHAM	
2 h nach SHT/SHAM	
3 h nach SHT/SHAM	
4 h nach SHT/SHAM	
5 h nach SHT/SHAM	
6 h nach SHT/SHAM	

Messzeitpunkte der physiologischen Variablen, die während der operativen Phase erhoben werden.

Messparameter (Blutdruck, Herzfrequenz, Blutgasanalyse, Atmung, Blutglukose, Temperatur)

Der **Blutdruck** wird invasiv durch einen Katheter in der *A. coccygea* gemessen. Dieser ist an einen Druckdom (MX 960, Medex, Lancashire, Großbritannien) angeschlossen. Als Gegendruck zum arteriellen Blutdruck dient ein angeschlossener Beutel mit NaCl 0,9 %, der auch als Gegenspülung dient. Vom Druckdom geht direkt eine Verbindung zur eigentlichen Messstation, dem Cardiocap II (Datex, Helsinki, Finnland). Neben dem systolischen und dem diastolischen Blutdruck wird auch der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) angezeigt. Vor Versuchsbeginn erfolgt zur Kalibration des Geräts ein Druckausgleich.

Durch Ausmessen des Elektrokardiogramms lässt sich die **Herzfrequenz** ermitteln. Das Elektrokardiogramm (Cadiocap II, Datex, Helsinki, Finnland) wird über zwei Nadelelektroden abgeleitet, die ca. 1,5 cm rechts und links vom Sternum auf Höhe der Achselhöhlen subkutan eingestochen werden.

Zu den oben genannten Messzeitpunkten während des Versuchs erfolgt die Bestimmung der **Blutgase**. Folgende Parameter werden mit Hilfe des pH/ Blutgas Analyzer 1306 (Instrumentation Laboratory, 20128 Mailand, Italien) bestimmt:

Hämoglobinkonzentration (g/dl)

PaO₂ (arterieller Sauerstoffpartialdruck in mmHg)

PaCO₂ (arterieller Kohlendioxidpartialdruck in mmHg)

Blut-pH (-log H⁺-Ionenkonzentration)

Die **Atmung** wird durch einen Atemgasmonitor (Capnomac, Datex, Helsinki, Finnland) kontrolliert. Neben den endexpiratorischen Gaskonzentrationen von Sauerstoff, Kohlendioxid, Lachgas und Halothan werden auch die Atemfrequenz, der Atemdruck und das Atemvolumen überwacht und kontrolliert.

Die **Blutglukosebestimmung** erfolgt mit einem Schnelltestgerät (Glucometer Elite, Bayer Diagnostics, München).

Die **Temperaturmessung** erfolgt zum einem rektal zum anderen perikraniell. Die rektale Temperaturmessung erfolgt durch eine in den Enddarm eingeführte Temperatursonde und dient lediglich der Kontrolle der peripheren Körpertemperatur.

Die Installation der perikraniellen Temperatursonde (Hypodermic needle probe, Omega Technologies Co, Standford CT, USA) erfolgt schädelnah in den rechten M. temporalis. Die Sonde ist mit einer Rotlichtlampe gekoppelt, die direkt über dem Tier installiert ist. Sobald das Kontrollgerät (Omega Technologies Co, Standford CT, USA) eine Temperatur unterhalb der physiologischen Körpertemperatur von 37,3 °C misst, schaltet sich die Wärmelampe an, über 37,8 °C aus.

Elektroenzephalographie (EEG)

Die Messung des EEG erfolgt über fünf Nadelelektroden, die vor der Induktion des SHT implantiert werden. Jeweils zwei der Sonden werden auf jeder Seite 2 mm kaudal des lateralen Augenwinkels senkrecht zur Haut eingestochen. Auf die gleiche Weise werden zwei weitere Elektroden je 3 mm kranial der Ohrbasis platziert. Eine Erdungselektrode in der Schwanzwurzel ermöglicht die störungsfreie Ableitung des Elektroenzephalogramms der linken und rechten Gehirnhälfte (Aspect Medical Systems Inc., A-1000, Natick, MA, USA). Da die EEG Amplituden sehr klein sind, sie liegen im Mikrovoltbereich, müssen die Ableitungen sehr sorgfältig vorgenommen werden, um Störungen weitgehend zu vermeiden.

3.2.7 Schädel-Hirn-Trauma-Induktion

Präparation

Nach Platzierung der Gefäßkatheter und der EKG-Sonden wird das Tier wieder auf den Bauch gedreht und in dem stereotaktischen Rahmen (Kopf Instruments, Modell 961 u. 962, Tujunga, CA, USA) fixiert.

Am Kopf setzt man in der Medianen einen Hautschnitt. Die weitere Präparation bis zum Periost erfolgt stumpf. Durch das Anbringen von vier Haltefäden in der Unterhaut schafft man sich ein übersichtliches Präparationsfeld. Nun erfolgt die Durchtrennung des Periost in der Medianen mit einem Skalpell und dessen stumpfe Abpräparation vom Schädeldach. Die Aufbohrung des knöchernen Schädeldachs über der rechten Hemisphäre erfolgt an der kranialen (kaudal von *Bregma* gelegen), lateralen (parallel zum Ansatz des *M. temporalis*) und kaudalen (kranial von *Lambda* gelegen) Seite (Diamantbohrer, Kugelform Ø 5 mm, Proxxon GmbH, Niersbach). Während dem Bohren wird durch Thomaejonin[®]-Spülung gekühlt. Zum Schluss muss der Knochendeckel vorsichtig über der Sutura sagittalis hochgeklappt werden. Danach wird ein Knochenschuppenhalter angebracht und festgeklebt. Die Bedeckung des Gehirns erfolgt mit Thomaejonin[®]-Lösung. Bei dem ganzen Vorgang muss die Dura mater intakt bleiben. Ein Einreißen der Dura mater würde den Ausschluss aus dem Versuch bedeuten. Vor der Verringerung der Halothankonzentration auf < 1,0 Vol% werden die EEG-Sonden installiert.

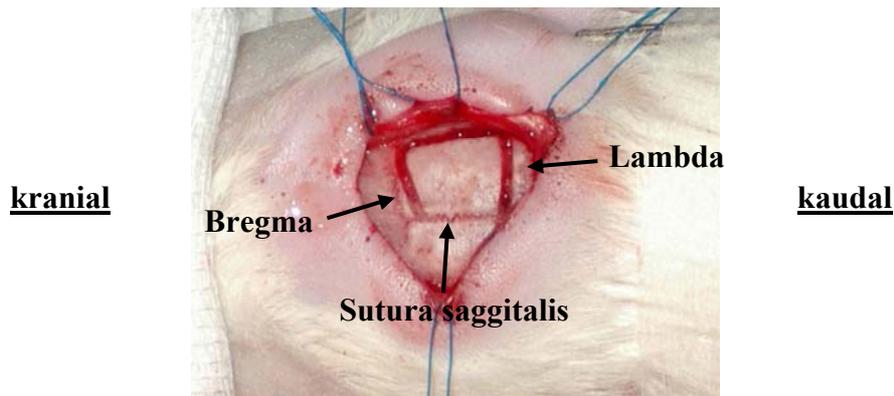


Abbildung 14: Anatomische Begrenzungslinien: kranial (links) Bregma, kaudal (rechts) Lambda und in der Mitte die Sutura sagittalis.

Schädel-Hirn-Trauma-Induktion

Zwischen 0:00 und 0:20 wird das Tier mit dem stereotaktischen Rahmen unter das Schädel-Hirn-Trauma-Gerät (Typ SHTM-3 und SHT-3 CCI Controller, Eigenbau, Mainz) gelegt. Über dem Loch im Schädeldach wird ein speziell für diesen Zweck konzipiertes Gerät platziert, mit dem das Schädel-Hirn-Trauma ausgelöst wird. Das Gerät besteht aus einem druckluftbetriebenen Stempel (Durchmesser 5,0 mm) der vertikal auf dem Gehirn aufgesetzt wird. Die computergesteuerten Schussparameter sind: 1,75 mm Eindringtiefe, 4-5 m/s Einschlaggeschwindigkeit und 200 ms Eindringdauer. Kurz vor dem Schlag wird das Gehirn vorsichtig getrocknet und der Schlagbolzen mit Vaseline eingerieben. Nach dem Schlag soll die Dura mater intakt sein. Tiere, deren Dura mater eingerissen ist, werden aus dem Versuch genommen. Während der ganzen Zeit wird die Gehirntemperatur des Tieres konstant bei 37,5 °C gehalten.

Nach dem Schlag wird das Tier aus dem Schädel-Hirn-Trauma-Gerät genommen und der Knochendeckel sofort auf dem geschädigten Gehirn platziert und mit Gewebekleber (Histoacryl 0,5 ml, B. Braun, Tuttlingen) fixiert. Der Hautschnitt wird mit einem Lokalanästhetikum Bupivacainhydrochlorid (Bucain 0,5 %, Curasan AG, Kleinostheim) unterspritzt und die Haut mit 4/0 Prolene (Prolene 4/0, Ethicon, Brüssel, Belgien) vernäht. Als Flüssigkeitsdepot für die Nachbeatmungsphase wird jedem Tier 10 ml angewärmte Elektrolytlösung (Thomaejonin) s.c. verabreicht. N₂O wird durch Luft ersetzt.

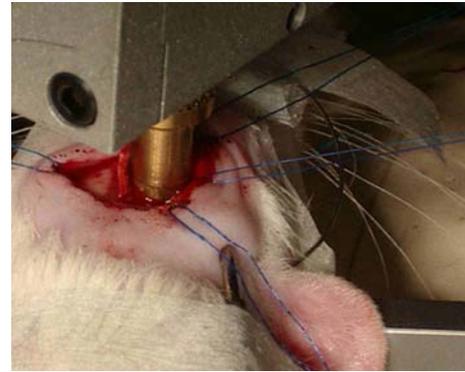


Abbildung 15: Links: Druckluftbetriebener Schussapparat, Rechts: Präparationsstelle mit aufgesetzter Führungshülse.

3.2.8 Nachbeatmung unter Versuchsnarkose

Nach Randomisierung der Tiere in ihre entsprechende Anästhetikagruppe wird die Narkose je nach Versuchsgruppe umgestellt. In der Halothangruppe beträgt die inspiratorische Halothankonzentration 1,0 Vol%. Unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit wird jedem Tier kontinuierlich 8-16 $\mu\text{g/h}$ Fentanyl verabreicht. Arterienol wird in beiden Gruppen bei Bedarf zu einer Erhaltung des MAP in physiologischen Bereichen (MAP 90 bis 100 mmHg) eingesetzt.

In der Propofolgruppe wird die Narkosetiefe für jedes Tier individuell über das Vorhandensein eines Burst-Suppression-Musters im EEG gesteuert. Direkt nach dem SHT werden die Sonden mit den Kabeln des Monitors konnektiert. Zuerst erfolgt eine Impedanzmessung, um eventuell vorhandene Störungen in den EEG-Ableitungen zu erkennen und durch Umstecken der Sonden zu korrigieren. Bei den Tieren der Propofolgruppe wird als erstes die Zufuhr von Halothan und N_2O abgestellt und Luft zugeführt bevor ein initialer Propofolbolus von ca. 12,8 ml/h/Tier (640 mg/kg/h) über einen Perfusor (Spritzenpumpe Modell 11, Harvard Apparatus, Marktheidenfeld) injiziert wird. Die Propofolmenge wird nach der Bolusgabe so titriert bis das geforderte Burst-Suppression-Muster im EEG sichtbar wird. In der vorliegenden Studie werden zwei unterschiedliche Propofolgruppen unterschieden. Die „niedrig“ dosierte Propofolgruppe, die eine Burst-Suppression-Ratio von

1-5 % aufweisen soll und die „hoch“ dosierte Propofolgruppe mit einer Burst-Suppression-Ratio von 30-40 %. Während der 6-stündigen Nachbeatmungszeit erfolgen eine laufende Kontrolle des Burst-Suppression-Musters im EEG und eine entsprechende Anpassung der Dosierung des Propofols. Zeitgleich zur Gabe des Propofolbolus wird ein Bolus des Kreislauf-stabilisierenden Arterenols von ebenfalls 12,8 ml/h/Tier (40.000 fach verdünnt) über einen Perfusor verabreicht, um einen physiologischen MAP zwischen 90 bis 100 mmHg aufrecht zu halten. Während der 6-stündigen Nachbeatmungszeit findet eine kontinuierliche Kontrolle des MAP statt, der durch Titration der Arterenolmenge (30 µg/kg/h) in seinem physiologischen Bereich gehalten wird. Eine weitere Auswertung des EEG erfolgt nicht.

Am Ende der 6-stündigen Nachbeatmungszeit wird die Narkose vertieft und das Tier euthanasiert.

3.2.9 Probengewinnung

Nach einer Überlebenszeit von sechs Stunden werden die Tiere euthanasiert und das Gehirn für die histologische Untersuchung entnommen.

3.2.9.1 Dekapitierung

In Vollnarkose erfolgt die Tötung des Tieres durch zervikale Dislokation, danach durchtrennt man mit einer Schere zuerst die Nackenmuskulatur und anschließend die Halswirbelsäule.

3.2.9.2 Präparation, Entnahme und Einfrieren des Gehirns

Für die Darstellung des Gehirns muss zuerst die Kopfhaut, von den Ohren nach rostral bis zu den Augen abpräpariert werden. Anschließend erfolgt beiderseits die Abhebung des *M. temporalis* vom Schädelknochen. Mit einer Hohlmeißelzange muss die Nackenmuskulatur, das *Os occipitale* und das *Os parietale* entfernt werden.

Nach der Platzierung des Spatels basal des Gehirns kann man dieses nun vorsichtig aus den umgebenden Schädelknochen heraushebeln. Im Anschluss daran wird das Gehirn in einen Aluminiumzylinder (Höhe 2,5 cm, Durchmesser 1,5 cm) verbracht, der zur Hälfte mit einem Einfriermedium (Tissue Freezing Medium, Jung, Leica Instruments, Nussloch) gefüllt ist. Nachdem man das Gewebe vorsichtig auf den Boden des Zylinders gedrückt hat, kann dieser vollständig mit Einfriermedium aufgefüllt werden. Unter Zuhilfenahme einer Klemme wird nun der Aluminiumzylinder in ein mit Methylbutan gefülltes und auf Trockeneis gelagertes Gefäß gehalten. Nachdem das Einfriermedium komplett durchgefroren ist, erfolgt die weitere Lagerung des Gehirns, bis zu seiner weiteren Verarbeitung, bei -70 °C.

3.2.9.3 Schneiden des Gehirns

Vor dem Schneiden wird das Gehirn aus dem Aluminiumzylinder entnommen und unter Zuhilfenahme des Einfriermediums auf einen Objektisch aufgefroren. Danach wird das Präparat soweit wie möglich vom Einfriermedium befreit. Nach einer kurzen Äquilibrationszeit von ca. 10 min auf eine Objekttemperatur von -15 °C werden zunächst von rostral beginnend 30 µm dicke Scheiben des Gehirns mit dem Kryotom (Microtom-Kryostat, HM 500 QM, Microtom GmbH, Walldorf) bei einer Kammertemperatur von -23 °C abgehobelt. Hierdurch soll die Ausrichtung des Gehirns zum Messer (Symmetrie der beiden Gehirnhälften) geprüft und gegebenenfalls geändert werden, sowie die richtige Schnittebene erreicht werden. Angestrebt wird hierbei die Schnittebene „Plate 11“, die als Nullpunkt festgelegt ist und im Atlas “Maps and Guide to Microdissection of the Rat Brain“ (PALKOVITS u. BROWNSTEIN 1988) definiert ist. Von diesem ausgehend, werden zunächst bei 1000, 2000 und 3000 µm, pro Ebene insgesamt drei Objektträger (Objektträger SuperFrost Plus, Menzel-Gläser, Braunschweig) mit zwei 10 µm dicken Schnitten aufgenommen. Von 3000 bis 9000 µm werden alle 500 µm die entsprechende Anzahl an

Schnitten aufgenommen. Die letzten beiden Schnittebenen 9000 und 10000 μm weisen wieder einen Abstand von 1000 μm auf. In einem Vorversuch konnte man bei der Auswertung feststellen, dass der eigentliche Schaden ab ca. 3000 μm nach dem festgelegten Nullpunkt beginnt und im Durchschnitt bei 9000 μm endet. Aus diesem Grund wird in dieser Studie kranial und kaudal des Schadens alle 1000 μm („Hauptebenen“) die erwähnte Anzahl an Schnitten aufgenommen und im Schadensbereich zusätzlich alle 500 μm („Nebenebenen“). Sofern der Schaden makroskopisch über die 10000 μm Ebene hinausgeht, werden auch die 11000 μm und 12000 μm Ebenen als Schnitte aufgenommen.

Eine Dokumentation verschiedenster Parameter wie beispielsweise Erreichen des Nullpunkts, Anzahl der zu trimmenden Schnitte, Schneidetemperatur etc. erfolgt in einem Schneideprotokoll (s. Tab. 4).

Für die Immunhistochemie benötigt man als Positiv- und Negativkontrollen Gefrierschnitte von Thymus und Gehirn so genannter Nativ-Tiere. Diese Tiere werden keinerlei Behandlung oder Manipulation unterzogen, deshalb können die gefärbten Organe als physiologische Vergleichswerte herangezogen werden.

Die fertigen Schnitte werden in Objektträgerkästen (Neo Lab, Heidelberg) bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ für die weitere Verarbeitung gelagert.

Tabelle 4: Schneideprotokoll

Datum:

Tiernummer:

0-Pkt (Bregma A2400 µm)	zu trim- mende µm	Anzahl Trimm- schnitte 30µm	Anzahl Trimm- schnitte 10µm	Aufzu- nehmende Schnitte bei µm	Anzahl der aufge- nom- menen OTs	Schaden in Ansicht der Schnitt- ebene	Schaden in der Kortex- Ansicht	mm-Abstand des Schadens vom 0-Pkt in Kortex-Ansicht bis zum Anfang Ende	Schnei- detemp- eratur -20 °C	Sym- metrie in der Gewebe- struktur gegeben
				1000						
				2000						
				3000						
				3500						
				4000						
				4500						
				5000						
				5500						
				6000						
				6500						
				7000						
				7500						
				8000						
				8500						
				9000						
				10000						

OT=Objektträger

3.2.10 Untersuchung des Gehirns

Aus Gründen der Übersichtlichkeit finden sich die Angaben zu Herstellerfirma einschließlich Ort und Land aller Antikörper, Chemikalien, Geräte, Verbrauchsmaterialien und Lösungen im Kapitel 3.2.11. Die nachfolgende Abbildung zeigt eine Übersicht über die histologische Untersuchung:

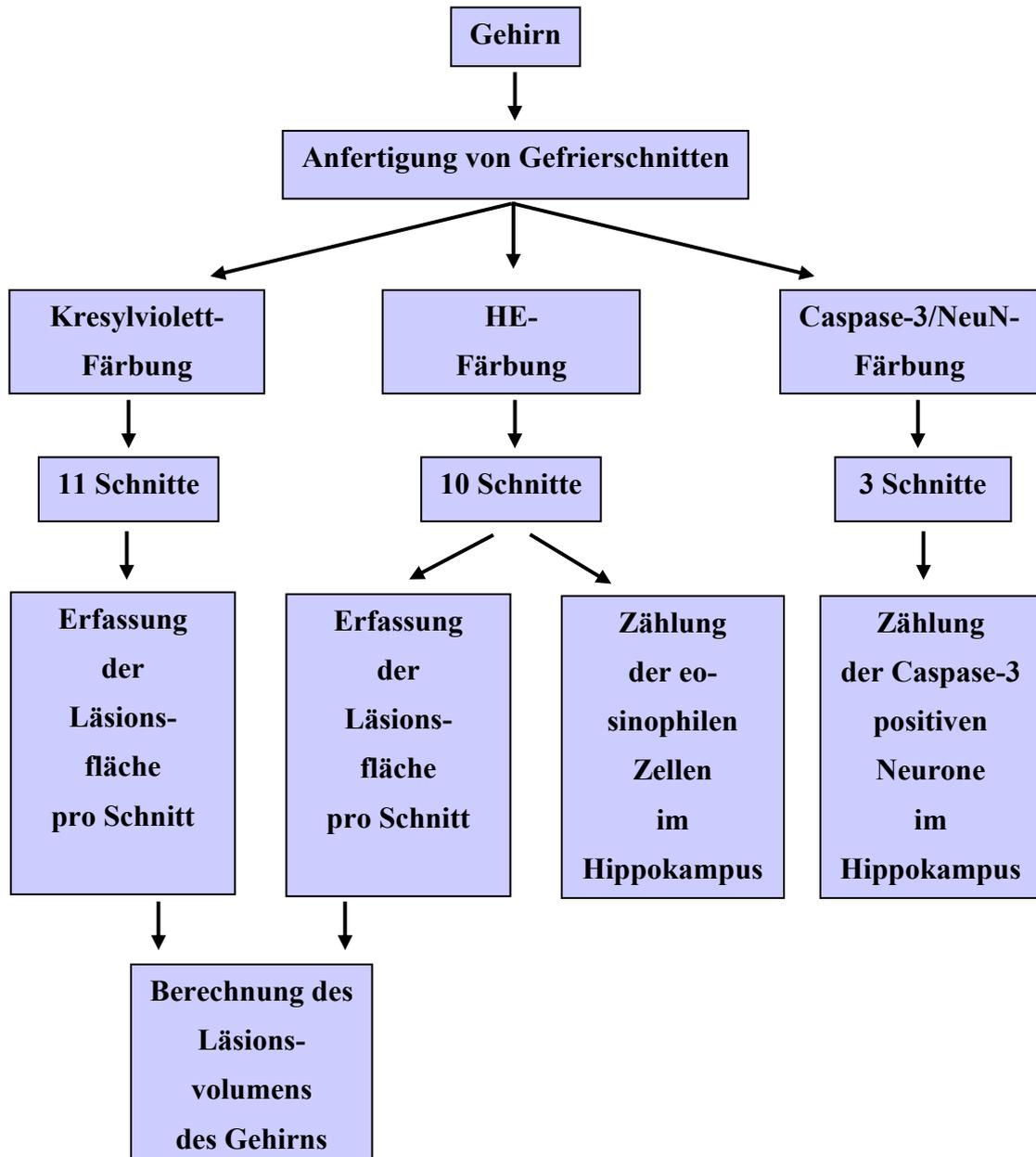


Abbildung 16: Übersicht über die histologische Untersuchung.

3.2.10.1 Kresylviolett- (KV-) Färbung

Mit Hilfe der Kresylviolett-Färbung, auch Nissl-Färbung genannt, können Nervenkerne und Tigroidschollen (Nissl-Schollen) in den Nervenzellen dargestellt werden. Das Substrat der Färbung sind Ribonukleoproteine (ROMEIS 1989). Aufgrund gleicher Zusammensetzung aus DNS verhalten sich beide den Farbstoffen gegenüber indentisch. Der basische Teerfarbstoff Kresylviolett lagert sich in saurem Milieu (pH-Wert 4) nach dem Prinzip der Endpunktfärbung elektropolar an die sauren Gruppen der Nukleinsäuren (BURCK 1988). In der Färbung stellen sich Tigroidschollen, Kernmembranen und Nukleolen intensiv blau oder violett dar. Das Zytoplasma der Ganglienzellen und Gliazellen färben sich blassblau, Zellfortsätze bleiben ungefärbt (ROMEIS 1989).

Von jedem Tier werden elf konsekutive Gefrierschnitte des Gehirns mit bekannten Abständen zueinander mit Kresylviolett gefärbt.

3.2.10.1.1 Färbevorgang

Die Färbung erfolgt nach eigenem Protokoll. Pro Ebene erfolgt die Färbung eines Objektträgers mit zwei 10 µm dicken Gefrierschnitten.

Kurz beschrieben, stellt sich der Färbevorgang wie folgt dar:

1. absteigende Alkoholreihe:

- 15 min in 100 % Ethanol pro analysi
- 1 min in 96 % Ethanol
- 1 min in 70 % Ethanol

2. destilliertes Wasser (zwei Gefäße, jeweils kurz hintereinander eintauchen)

3. 5 min in Kresylviolett

4. < 30 sec in 1 % Essigsäure (zwei Gefäße, jeweils kurz eintauchen)

5. aufsteigende Alkoholreihe:

- < 15 sec in Ethanol 96 %
- 2 min in Ethanol 100 % pro analysi

6. 2 min in Rotihistol

7. 5 min in Rotihistol

Die Gefrierschnitte werden aus dem -70 °C kalten Gefrierschrank entnommen, beschriftet und 15 min lang in Ethanol 100% pro analysi durch Flüssigkeitsentzug fixiert. Durch die anschließende absteigende Alkoholreihe werden die Schnitte rehydriert. Danach wäscht man die Gefrierschnitte zwei Mal für jeweils ca. 30 sec in destilliertem Wasser. Nun erfolgt die Färbung mit Kresylviolett, wobei die Schnitte für 5 min im Farbstoff belassen werden. Nach dem zweimaligen Waschen in Essigsäure folgt die aufsteigende Alkoholreihe, um die Gefrierschnitte vor dem Eindecken zu dehydrieren. Nach der aufsteigenden Alkoholreihe werden die Schnitte in Rotihistol verbracht. Nach dem Einbringen in Rotihistol werden die Gefrierschnitte unter Verwendung von Roti Histokitt eingedeckt und dadurch haltbar gemacht.

3.2.10.1.2 Untersuchung mit dem Lichtmikroskop

Die elf mit KV gefärbten Gehirnschnitte werden unter dem Lichtmikroskop begutachtet. Von den zwei Gefrierschnitten pro Objektträger geht der qualitativ hochwertigere in die Auswertung ein. Mit Hilfe der mikroskopischen Betrachtung wird von einem geblindeten Untersucher die Schnittebene gesucht, in der eine beginnende zerebrale Schädigung ausgemacht werden kann. In den folgenden konsekutiven Schnittebenen (zunehmender Abstand vom festgelegten Nullpunkt) wird der Verlauf der Schadensausdehnung bis hin zu der Schnittebene, in der kein Schaden mehr festzustellen ist, dokumentiert. Durch den Vergleich des traumatisch geschädigten Gehirnareals der rechten Hemisphäre zur ungeschädigten linken Gehirnhälfte wird der zerebrale Schaden pro Gehirn bestimmt und durch die - nachfolgend erklärte- Computer gestützte Auswertung erfasst. Als Abgrenzung zwischen geschädigtem und gesundem Bereich dient neben den schwächer mit KV angefärbten Neuronen im Schadensbereich eine Auflockerungen des Zellverbands und Ödembildung.

3.2.10.1.3 Auswertung

Zur **Läsionsvolumenbestimmung** wird der Objektträger auf das LED-Leuchtfeld (Kompaktes LED-Leuchtfeld, Leuchtfläche 83x75 mm²) aufgelegt und ein Gehirnschnitt mit homogenem Durchlicht beleuchtet. Darüber sind die hochauflösende Kamera (Evolution MP Digital Color Kit inkl. Treiber IEEE Kamera MP ungekühlt für IPP/ IPD /IPE) und das Makro-Zoom-Objektiv (Makro-Video-Zoom, Präzisions-Zoom-Objektiv 2/3“) angebracht, die ein Live-Bild auf den Monitor (21“ Samsung-Monitor IS-Computersysteme, Erding) projizieren. Die Bildeinstellung wird optimiert und dann ein Bild des Gehirnschnittes angefertigt.

Der digital erfasste Gehirnschnitt wird wie folgt mit Hilfe des Softwareprogramms (Software: Image-Pro Express Version 4.5, Weiss, Imaging and Solutions GmbH, Günding/ Bergkirchen; Komplettrechner P4, 512 MB RAM, 80 GB HDD, Intel CPU 2,66 GHZ) bearbeitet:

Zunächst wird mit dem Cursor die linke, ungeschädigte Hemisphäre vollständig umfahren. Im Anschluss daran wird die rechte Hemisphäre unter Auslassung des traumatisch geschädigten Gehirnareals umfahren. Mit Hilfe dieser Flächen berechnet die Software eine ödemkorrigierte Fläche des Traumas. Mit den elf konsekutiven Schnitten, mit bekanntem Abstand zueinander, lässt sich schließlich das Volumen des Traumabereichs im Gehirn berechnen.

Die Flächenwerte werden für jeden Schnitt in eine Excel-Tabelle eingetragen.

Auffällige mikroskopische Besonderheiten der Gefrierschnitte wie beispielsweise Ventrikeldilatation, kortikale Einblutungen, deutliche Asymmetrie der beiden Gehirnhemisphären etc. werden in einer weiteren Excel-Tabelle beschreibend festgehalten.

Tiere mit schwerwiegenden kortikalen und subkortikalen Einblutungen, die zu einer Verfälschung der Werte des tatsächlich vorhandenen Läsionsvolumens führen würden, werden von der Läsionsflächen- und Läsionsvolumenbestimmung in der KV- und Hämatoxylin Eosin- (HE-) Färbung ausgeschlossen. Bei diesen hochgradig eingebluteten Tieren findet eine rein deskriptive Beschreibung des morphologischen Schadens in der HE-Färbung statt (siehe Kapitel 3.3.3.4). Eine Bestimmung der eosinophilen Zellzahl in der Hippokampusformation findet bei diesen Tieren nach wie vor in der HE-Färbung statt (siehe Kapitel 3.2.10.2.3).

3.2.10.2 Hämatoxylin Eosin- (HE-) Färbung

Die HE-Färbung der Gehirngefrierschnitte erfolgt mit Hämalaun nach Mayer, welches aus Hämatoxylin hergestellt wird (ROMEIS 1989).

(Hämatoxylin, ein natürlicher Pflanzenfarbstoff, gehört zu den Kernfärbungen. Es färbt Zellkerne und Zytoplasmaanteile, die reich an rauem endoplasmatischen Retikulum sind, blau-violett (WELSCH 2003). Hämatoxylin an sich ist farblos und wird erst durch Dehydrieren (Oxydation) in den richtigen Farbstoff Hämatein überführt. Der saure Farbstoff Hämatein hat in saurer Lösung eine rötliche Farbe ohne färberischen Nutzen. Zur Kernfärbung ist eine Beizung unbedingt erforderlich, zum Beispiel mit Alaun-Hämatoxylin (Hämalaun) (BURCK 1988). Die Kernfärbung kommt am besten in stark saurem Milieu zustande, indem sich das positiv geladene Hämalaun mit Phosphorgruppen der Nukleinsäuren des Chromatins verbindet. Ein pH-Wert über drei (wird durch das Leitungswasser erreicht, s. Färbeprotokoll) ist notwendig für die Erzielung der blauen Farbe.)

Eosin, schwach sauer und in die Fluoreszein-Gruppe gehörend, wird zu den Plasmafärbungen gezählt. Es färbt mit einem Zusatz von Eisessig (ein Tropfen auf 100 ml Farblösung) Zytoplasma, Bindegewebe und Kollagenfasern kräftig rot (BURCK 1988). (Die Eosinophilie des Zytoplasmas tritt ein, wenn der Zellstoffwechsel auf anaerobe Glykolyse umgestellt wird und deswegen vermehrt Laktat in der Zelle produziert wird und somit der pH-Wert der Zelle sinkt (GRAHAM u. LANTOS 1997).)

3.2.10.2.1 Färbevorgang

Bei jedem Tier werden nach dem Erreichen der festgelegten Nullebene zehn Gefrierschnitte des Gehirns in 1000 µm Abständen mit HE angefärbt. Pro Ebene erfolgt die Färbung eines Objektträgers mit zwei 10 µm dicken Gefrierschnitten.

Das nachstehende Protokoll soll eine Übersicht über den folgenden Färbevorgang geben:

1. absteigende Alkoholreihe:

- 10 min in 100 % Ethanol pro analysi
- 1 min in 96 % Ethanol
- 1 min in 70 % Ethanol

2. 5 min in Hämalaun nach Mayer

3. 10 min in leicht warmem Leitungswasser (so oft wechseln, bis das Wasser farblos ist)

4. 30 sec in Eosin (Eosin ca. 2 min zuvor auf den Magnetrührer stellen)

5. Waschen in destilliertem Wasser (zwei Gefäße, jeweils kurz hintereinander eintauchen)

6. aufsteigende Alkoholreihe:

- 5 min in 70 % Ethanol
- 1 min in 96 % Ethanol
- 1 min in 100 % Ethanol pro analysi

7. 2 min in Rotihistol

8. 5 min in Rotihistol

Die Gefrierschnitte werden aus dem -70 °C kalten Gefrierschrank entnommen, beschriftet und 10 min lang in Ethanol 100 % pro analysi durch Entwässerung fixiert. Durch die folgende absteigende Alkoholreihe erfolgt die Rehydratation der Schnitte. Bei der sich nun anschließenden Färbung mit Hämalaun nach Mayer (eigene Herstellung), verbleiben die Präparate für 5 min im Farbstoff. Durch das Spülen in Leitungswasser (ph-Wert über drei wird erreicht) führt man den Hämatoxylinlack in seine blaue Form über (Bläuen) (BURCK 1988). Dies bedeutet zugleich eine Fixierung der Färbung, da die Farbe im Alkalischen schlecht löslich ist und die Haltbarkeit des Präparates begünstigt wird. Nach dem Waschen taucht man die Schnitte für 30 sec in Eosin (wässrige Eosin-Dinatrium Lösung, eigene Herstellung). Im Anschluss daran werden die Gefrierschnitte zwei Mal für jeweils 30 sec in destilliertem Wasser gewaschen. Durch die nun folgende aufsteigende Alkoholreihe erfolgt die Dehydratation der Präparate. Danach verbringt man die Schnitte in Rotihistol.

Die Eindeckung der Gehirnschnitte auf den Objektträgern erfolgt mit Roti Histokitt. Die Schnitte werden in Objektträgerkästen bei Raumtemperatur aufbewahrt.

3.2.10.2 Untersuchung mit dem Lichtmikroskop

Wie bereits in der KV-Färbung beschrieben wird auch in der HE-Färbung eine **Läsionsvolumenbestimmung** anhand von einem Gefrierschnitt pro Objektträger durchgeführt. Durch die lichtmikroskopische Betrachtung können wiederum Beginn, Ausmaß und Ende (s.Kapitel 3.2.10.1.2, S. 73) des traumatisch geschädigten Gehirnareals festgelegt werden. In der HE-Färbung dient die eosinophile Zellgrenze als Abgrenzung zwischen geschädigtem und gesundem Bereich.

Des Weiteren erfolgt in der HE-Färbung eine **Beurteilung des Hippokampus**. Um eine aussagekräftige Auswertung der gefärbten Schnitte zu erreichen, wird der Hippokampus in sechs verschiedene Regionen (CA1, CA2, CA3, CA4, oberer Ast des Gyrus dentatus und unterer Ast des Gyrus dentatus) eingeteilt. In der Übersichtsvergrößerung (25-fach, mit eingeklappter Lupe) betrachtet man das Gesamtbild des Schadens und vergleicht den Hippokampus der rechten mit der linken Hemisphäre. In den höheren Vergrößerungen (100-, 200-, und 400-fach) wird der Hippokampus stets nach dem gleichen Schema untersucht: man beginnt in der CA1-Region, fährt dann den gesamten Hippokampus entlang ab bis zum Ende der CA4-Region und betrachtet dann zuerst den oberen Ast des Gyrus dentatus und dann den unteren Ast des Gyrus dentatus.

3.2.10.2.3 Auswertung

Die **Läsionsvolumenbestimmung** erfolgt in Anlehnung an Kapitel 3.2.10.1.3

Die **Beurteilung der Hippokampusformation** erfolgt unter Zuhilfenahme einer Zählvorrichtung. In der 400-fachen Vergrößerung werden alle eosinophilen Zellen der Hippokampusformation getrennt nach Regionen ausgezählt.

Aus den Werten dieser gezählten Zellen wird die Gesamtzellzahl der eosinophilen Zellen ermittelt.

Beispielhafte Darstellungen der eosinophilen Zellschäden in der Hippokampusformation finden sich in Abb. 17 und Abb. 18.

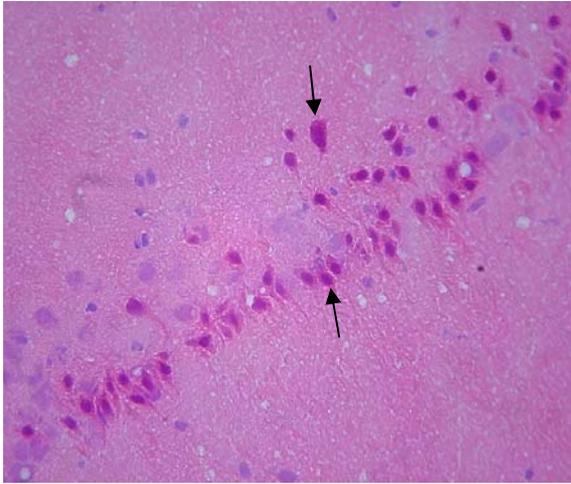


Abbildung 17: (Vergr.: 400 x): HE-Färbung rechte CA1-Region 6 h post Trauma, eosinophile Zellen sichtbar (s. Pfeile).

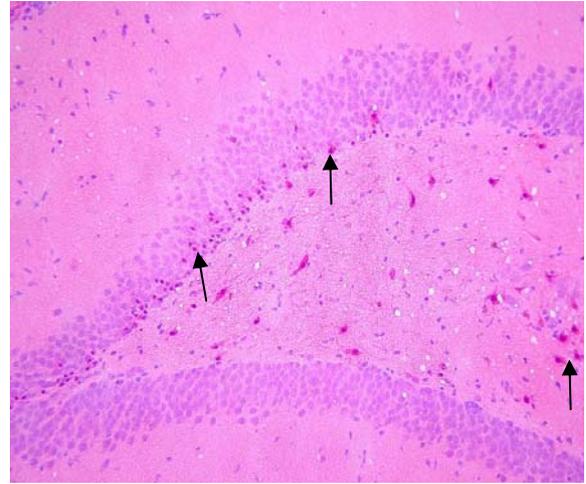


Abbildung 18: (Vergr.: 200 x): HE-Färbung rechter Gyrus dentatus und CA4-Region des Hippokampus 6 h post Trauma, eosinophile Zellen sichtbar (s. Pfeile).

Bei Tieren die aufgrund schwerwiegender Einblutungen in den Kortex und in subkortikale Strukturen nicht einer Läsionsflächen- und Läsionsvolumenbestimmung unterzogen werden können, wird eine rein deskriptive Beschreibung der Einblutung vorgenommen. Pro Tier werden zehn Gehirnschnitte mit HE-gefärbt und unter dem Lichtmikroskop begutachtet. Mit Hilfe der mikroskopischen Betrachtung werden Beginn, Lokalisation und Ausdehnung der Einblutung in das traumatisch geschädigte Gehirnareal der rechten Hemisphäre und der ungeschädigten linken Gehirnhälfte bestimmt und dokumentiert (siehe Kapitel 3.3.3.4).

3.2.10.3 Doppelfärbung von aktivierter Caspase-3 und NeuN

Bei Verwendung der einfach aktivierten Caspase-3-Färbung ist es dem Betrachter nicht möglich zwischen einer Nervenzelle und einer Gliazelle (Astrozyten, Oligodendrozyten, Mesogliazellen und Ependymzellen) (HEES u. SINOWATZ 1992) zu unterscheiden, da von der Apoptose beide Zelltypen betroffen sind. Indem man zusätzlich zum Antikörper gegen aktivierte Caspase-3 auch noch einen Antikörper gegen neuronales Strukturprotein verwendet, das so genannte NeuN, ist man in der Lage, bei der lichtmikroskopischen Betrachtung zwischen aktivierter Caspase-3-positiven Gliazellen und Caspase-3-positiven Neuronen zu unterscheiden. In der Färbung stellen sich aktivierte Caspase-3-positive Neuronen rot dar, aktivierte Caspase-3-positive Gliazellen hingegen braun.

3.2.10.3.1 Färbevorgang

Die Färbung erfolgt nach etabliertem Protokoll (MATZ 2003).

Von jeder SHT-Gruppe werden beispielhaft zwei Tiere gegen aktivierte Caspase-3 und NeuN doppelgefärbt. Pro Tier werden drei Gefrierschnitte des Gehirns aus dem Schadensbereich gefärbt. In jedem Färbedurchgang wird ein Thymuspräparat als Positivkontrolle und ein Schnitt von einem Nativ-Tier als Negativkontrolle mitgeführt.

Zusammenfassend stellt sich der Färbevorgang folgendermaßen da:

1. 5 min Fixieren in Paraformaldehyd (PFA) 4 %
2. 5 min Waschen in PBS (immer auf Schüttler)
3. 10 min Blockieren der endogenen Peroxidase mit 3 %-H₂O₂-Methanol
4. 2x3 min Waschen in PBS
5. Blockierung auftragen (DAKO serum-free protein block, 80 µl/Objektträger) 20 min inkubieren
6. Primär-Antikörper (AK) gg. Aktivierte Caspase-3 (rabbit) auftragen; 50 min Inkubieren; Verdünnung 1:100 (80 µl/Objektträger, verdünnen mit DAKO serum-free protein block)

7. 2x3 min Waschen in PBS
8. Biotinylierten anti-rabbit SekundärAK auftragen; Inkubationszeit 45 min Verdünnung 1:200 (80 µl/Objektträger, verdünnen mit DAKO serum-free protein block)
9. 2x3 min Waschen in PBS
10. Horseradish Peroxidase konjugiertes Streptavidin auftragen; Inkubationszeit 30 min
11. 2x3 min Waschen in PBS
12. DAKO DAB auftragen, 20 min braune Farbe in der feuchten Kammer entwickeln (1 Tropfen DAB/ml)
13. 3 min Waschen in destilliertem Wasser
14. Umstellen in PBS (kurz)
15. PrimärAK gegen aGFAP/NeuN (mouse) auftragen; 50 min inkubieren, Verdünnung 1:500 (80 µl/Objektträger, verdünnen mit DAKO serum-free protein block)
16. 2x3 min Waschen in PBS
17. Biotinylierten anti-mouse SekundärAK auftragen; Inkubationszeit 45 min, Verdünnung 1:200 (80 µl/Objektträger, verdünnen mit DAKO serum-free protein block)
18. 2x3 min Waschen in PBS
19. Alkalische Phosphatase konjugiertes Streptavidin auftragen; Inkubationszeit 30 min, Verdünnung 1:200
20. 2x3 min Waschen in PBS
21. Vector Red auftragen, 30 min rote Farbe entwickeln
22. 2x3 min Waschen in PBS
23. kurz Abspülen in Leitungswasser
24. Aufsteigende Alkoholreihe:
 - 1 min in 70 % Ethanol
 - 1 min in 96 % Ethanol
 - 1 min in 100 % Ethanol pro analysi
25. 2 min in Rotihistol
26. 5 min in Rotihistol

Die Gefrierschnitte werden aus dem -70 °C kalten Gefrierschrank entnommen, beschriftet und 5 min lang in 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Das sich daran anschließende Waschen erfolgt in PBS-Pufferlösung. Um die endogene Peroxidase zu blockieren, werden die Schnitte in H₂O₂-Methanol für 10 min verbracht. Nach einem weiteren Waschgang in PBS-Pufferlösung erfolgt die Blockierung. Hierzu wird pro Objektträger ein Gehirnschnitt mit

einem Liquid-Blocker Stift umfahren und dann auf diesen Schnitt 80 µl einer Serum-freien Proteinblockierungslösung aufgetragen. Im Anschluss daran werden die Schnitte in eine feuchte Kammer verbracht, um eine Austrocknung zu verhindern. Nach der Inkubationszeit von 20 min wird pro Schnitt 80 µl des Primärantikörpers aus dem Kaninchen in der Verdünnung 1:100 aufgetragen und für 50 min in der feuchten Kammer inkubiert. Der nun folgende Waschgang in PBS-Pufferlösung soll einen eventuellen Überschuss an Primärantikörper entfernen. Jetzt werden pro Gehirnschnitt 80 µl des biotinylierten Sekundärantikörpers in einer Verdünnung 1:200 aufgetragen, der gegen Kaninchen-Antigen gerichtet ist. Nach einer Inkubationszeit von 45 min in der feuchten Kammer schließt sich ein weiterer Waschgang in PBS an. Im Anschluss daran trägt man pro Objektträger 80 µl Streptavidin auf, das mit Horseradish Peroxidase konjugiert ist, und inkubiert für 30 min in der feuchten Kammer. Nach einem erneuten Waschgang in PBS wird der Farbstoff Diaminobenzidin in Pufferlösung auf die Gehirnschnitte aufgetragen, die Inkubationszeit in der feuchten Kammer beträgt 20 min. Unter dem Einfluss der Peroxidase wird das Diaminobenzidin in ein unlösliches braunes Farbstoffprodukt umgesetzt.

Nach dem Waschen in destilliertem Wasser erfolgt ein kurzes Umstellen in PBS. Hiermit ist der erste Teil (1.-14.) der Doppelfärbung beendet.

Im Folgenden wird der Gehirnschnitt mit dem zweiten Primärantikörper aus der Maus in der Verdünnung 1:500 beschichtet und für 50 min in der feuchten Kammer inkubiert. Nach einem erneuten Waschgang in PBS trägt man 80 µl des Sekundärantikörpers, der gegen Maus-Antigen gerichtet ist und mit Biotin konjugiert ist, in einer Verdünnung 1:200 auf und inkubiert in der feuchten Kammer für 45 min. Im Anschluss an einen weiteren Waschgang in PBS folgt das Auftragen des Streptavidins, das mit alkalischer Phosphatase konjugiert ist, in einer Verdünnung von 1:200 und einem 30minütigen inkubieren in der feuchten Kammer. Es folgt ein weiterer Waschgang in PBS, bevor der Farbstoff Vector Red aufgetragen wird und sich die rote Farbe in der feuchten Kammer innerhalb von 30 min entwickeln kann. Um die überflüssigen Farbreste zu entfernen, erfolgt ein weiterer Waschgang in PBS.

Nach einem kurzen Eintauchen in Leitungswasser folgt die aufsteigende Alkoholreihe, die eine Dehydration der Schnitte bewirkt. Danach werden die Schnitte in Rotihistol verbracht.

Die Eindeckung der Gehirnschnitte auf den Objektträgern erfolgt mit Roti Histokitt. Die Schnitte werden in Objektträgerkästen bei Raumtemperatur aufbewahrt.

3.2.10.3.2 Untersuchung mit dem Lichtmikroskop

Eigene Vorversuche ergaben, dass eine **Läsionsvolumenbestimmung** anhand der Zellgrenze der Caspase-3 und NeuN positiven Zellen im Kortex sechs Stunden post Trauma nicht möglich ist.

Es soll jedoch in der vorliegenden Studie festgestellt werden, ob bereits sechs Stunden nach CCI, aktivierte Caspase-3 und NeuN positive Zellen in der **Hippokampusformation** zu finden sind.

Bei dieser Färbung unterscheidet man grundsätzlich zwischen Zellen, die nur gegen aktivierte Caspase-3 positiv markiert sind (braun) und Neuronen, die sowohl aktivierte Caspase-3 positiv sind als auch mit NeuN angefärbt sind, also eine Kombination der beiden Farbstoffe braun (akt. Caspase-3) und rot (NeuN) darstellen.

3.2.10.3.3 Auswertung

Die Auswertung der **Hippokampusformation** wird, wie in der HE-Färbung bereits beschrieben auch hier durch Auszählen der positiven Zellen durchgeführt.

Die nachfolgende bildliche Illustration stellt die drei angewendeten Färbetechniken (KV-, HE- und akt. Caspase-3/NeuN-Färbung) an einem und demselben Tier aus der SHT/Prop BS 30-40-Gruppe einander gegenüber. Für die Abbildung wurden sehr dicht beieinander liegende Schnittebenen gewählt, um die Unterschiede in den drei Färbungen besser vergleichend darstellen zu können.

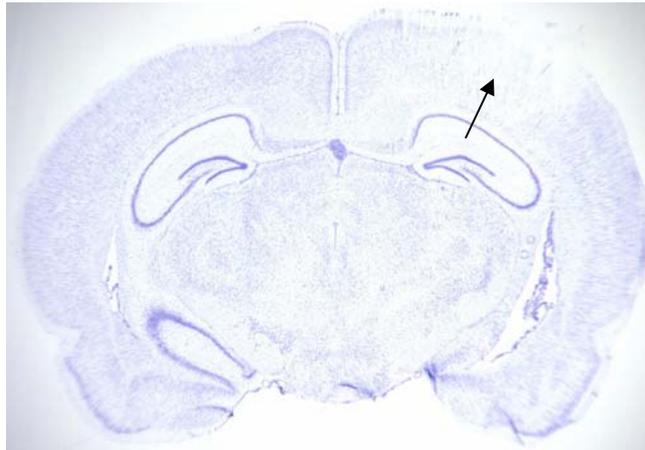


Abbildung 19: (Vergr.: 10 x, Kresylviolett-Färbung, Schnittebene: 8500 μm): aufgelockertes Gewebe im rechten Kortex 6 h post Trauma sichtbar (s. Pfeil).

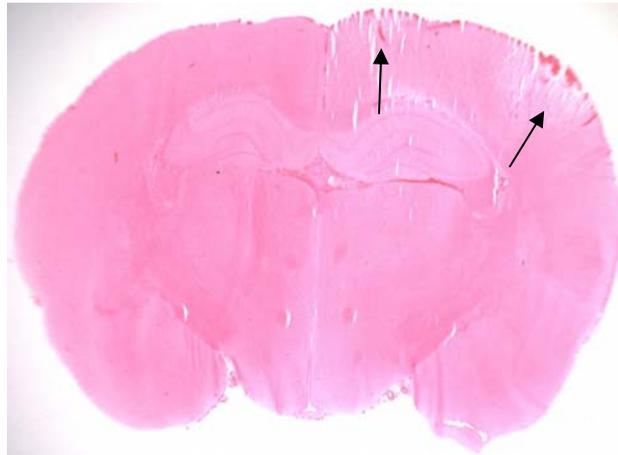


Abbildung 20: (Vergr.: 10 x, Hämatoxylin Eosin-Färbung, Schnittebene: 7000 μm): aufgelockertes Gewebe und minimale Einblutungen im rechten Kortex 6 h post Trauma erkennbar (s. Pfeile).

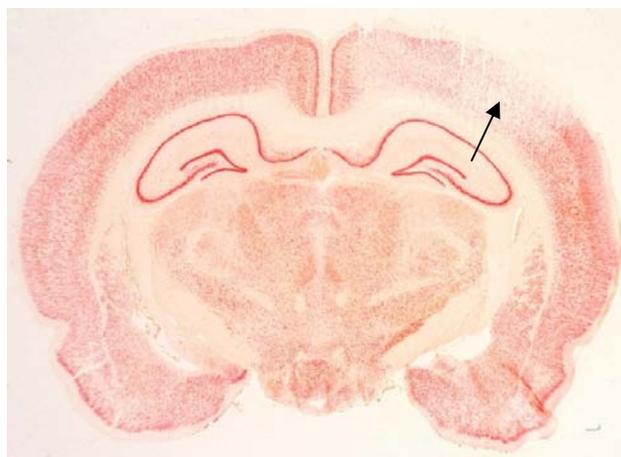


Abbildung 21: (Vergr.: 10 x, akt. Caspase-3/NeuN-Färbung, Schnittebene: 7000 μm): aufgelockertes Gewebe im rechten Kortex 6 h post Trauma erkennbar (s. Pfeil).

Eine zusammenfassende übersichtliche Darstellung über die Gruppeneinteilung der 39 Versuchstiere und die sich anschließende histologischen Analysen findet sich in der nachfolgenden Tabelle.

Tabelle 5: Übersicht über die Gruppeneinteilung und die histologische Untersuchung

	SHT/PROPOFOL BS1-5 % n=10	SHT/PROPOFOL BS30-40 % n=10	SHT/HALOTHAN 1,0 Vol% n=10	SHAM/HALOTHAN 1,0 Vol% n=9
I.) Kresylviolett- Färbung	Kortex Läsionsvolumenbestimmung	Kortex Läsionsvolumenbestimmung	Kortex Läsionsvolumenbestimmung	Kortex Läsionsvolumenbestimmung
II.) HE- Färbung	Hippokampus Eosinophile Zellen nach Regionen zählen			
	Kortex Läsionsvolumenbestimmung anhand eosinophiler Zellen	Kortex Läsionsvolumenbestimmung anhand eosinophiler Zellen	Kortex Läsionsvolumenbestimmung anhand eosinophiler Zellen	Kortex Läsionsvolumenbestimmung anhand eosinophiler Zellen
III.) Caspase3/NeuN- Färbung	Hippokampus Caspase-3 positive Neuronen nach Regionen zählen			

3.2.11 Antikörper, Chemikalien, Geräte, Verbrauchsmaterialien und Lösungen für die histologische Untersuchung

Antikörper:

Doppelfärbung

1. Antikörper:

- Antikörper, monoklonal, gegen akt. Caspase-3, BD PharMingen, San Jose, USA
- Mouse Anti-Neuronal Nuclei Monoclonal Antibody, NeuN, Chemicon International, Temecula, USA

2. Antikörper:

- Biotinylierter anti-mouse Antikörper, VectorLabs, Burlingame, USA (Vector Cat. S.39; Cat# BA-2001)
- Biotinylierter anti-rabbit Antikörper, VectorLabs, Burlingame, USA (Vector Cat. S.39; Cat# BA-1000)

Chemikalien:

- Alkalische Phosphatase-konjugiertes Streptavidin, Fa. VectorLabs, Burlingame, USA (Vector Cat. S.66; Cat# SA-5100)
- BSA, bovine Albumin Fraktion V, Fa. Sigma, Steinheim
- DAB liquid DAB Substrate-Chromogen System, Fa. DAKO, Hamburg
- Eisessig 100%, Fa. Merck, Darmstadt
- Ethanol 100% pro analysi, Fa. Merck, Darmstadt
- Ethanol 96%, Fa. Merck, Darmstadt
- Horseradish Peroxidase-konjugiertes Streptavidin in einer "ready-to-use-solution", Fa. VectorLabs, Burlingame, USA (Horseradish Peroxidase konjugiertes Streptavidin auftragen (Vector Cat. S.66; Cat# SA-5004 = concentrate bzw. als ready-to use solution Cat.# SA-5704)
- Kresylviolett (Acetat), Merck, Darmstadt
- Methanol 100% pro analysi, Merck, Darmstadt
- Paraformaldehyd (PFA), Merck, Darmstadt
- PBS-Dulbecco w/o Ca²⁺, Mg²⁺, Biochrom Ag, Berlin

- Proteinblockierungsreagenz, serumfrei, DAKO, Hamburg
- Rotihistol, Roth, Karlsruhe
- Roti Histokitt, Roth, Karlsruhe
- Saures Hämalaun nach Mayer, hausinterne Apotheke
- Schüttler Rocky 3D, Fröbel Labortechnik, Lindau

- Tissue Freezing Medium, Jung, Leica Instruments, Nussloch
- Tris (Puffer 2-Amino-2-(hydroxy methyl)-1,3 propanediol
- Universal-LSAB TM 2 Kit, DAKO, Hamburg
- VectorRed alkalische Phosphatase Substrat Kit I, Fa. VectorLabs, Burlingame, USA (Vector Cat# SK-5100)
- Wasserstoffperoxid 30%, Merck, Darmstadt
- Wässrige Eosin DiNatrium Lösung, NRF 11.95, 0,5% / 1%, hausinterne Apotheke

Geräte und Verbrauchsmaterialien:

- Deckgläser 22 x 50 mm, Menzel-Gläser, Braunschweig
- Eppendorf Reference Pipetten 100-1000 µl; 20-200 µl; 10-100 µl; 2-20 µl; 0,5-10 µl
- Eppendorf Reaktionsgefäße 1,5 ml mit Deckel, Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
- Fettstift PapPen, Daido Sangyo Co., Peske, Aindling
- Feuchte Kammer, Eigenbau
- Kryotom HM 500, Microm, Walldorf
- Objektträger SuperFrost Plus, Menzel-Gläser, Braunschweig
- Plastikschalen, Kriba, Neuss
- Plastiktüten, Plastibrand, Brand, Wertheim
- Reamix Assistent, Karl Hecht, Sondheim
- Schüttler Rocky 3D, Fröbel Labortechnik, Lindau
- Tischzentrifuge, Neo Lab, Heidelberg
- Vielzweck Etiketten #3321, Fa. Zweckform, Holzkirchen
- Zählvorrichtung, Four Digit Hand-Held Tally Counter, Aldrich, Milwaukee, USA

Lösungen:

- Ethanol, 70%, 200 ml
 - 140 ml Ethanol pro analysi
 - 60 ml destilliertes Wasser
- Kresylviolett-Lösung
 - 2 g Kresylviolett (Acetat)
 - 200 ml destilliertes Wasser
- H₂O₂-Methanol, 3 %, 200 ml
 - 194 ml Methanol pro analysi
 - 6 ml destilliertes Wasser
- Paraformaldehyd, 4%
 - 200 ml destilliertes Wasser
 - 8 g Paraformaldehyd
 - 15 µl 15 M NaOH

- PBS 20-fach, Phosphate Buffered Saline
 - 320 g NaCl
 - 57,6 g NaHPO₄
 - 9,6 g KH₂PO₄
 - 8 g KCl
 - ad 2000 ml destilliertes Wasser

- Saures Hämalaun nach Mayer
 - 1,0 g Hämatoxin
 - 0,2 g Natriumjodat
 - 50 g Kaliumaluminiumsulfat-12-Hydrat
 - 50 g Chloralhydrat
 - 0,91 g Zitronensäure wasserfrei
 - in 1 l destilliertem Wasser

- Wässrige Eosin-Dinatrium Lösung; NRF 11.95; 0,5% / 1%
 - 80 ml Eisessig
 - 200 ml Eosin

3.2.12 Statistische Bewertung der Befunde

Stetige Variablen werden als Mittelwert +/- Standardabweichung angegeben.

Die Vergleichbarkeit der Versuchsgruppen hinsichtlich physiologischer Parameter wurde mit dem Kruskal-Wallis Test und im Falle von signifikantem Unterschied mit bivariatem Mann-Whitney-Test überprüft. Der Friedman Test and post hoc Wilcoxon Test wurde angewandt um innerhalb der Gruppen zeitliche Änderungen zu untersuchen.

Titration des Narkosemittels zwischen den Gruppen wurde mit einem Repeated Measurement Model untersucht. Im Falle signifikanter Effekte wurden post-hoc Tests angeschlossen.

Eosinophile Zellen im Hippokampus wurden als Gesamtzahl sowie als mittlere Anzahl pro Schnitt berücksichtigt. Außerdem wurden diese Variablen kategorisiert in zwei gleich große Gruppen.

Für die Auswertung wurde der Kruskal Wallis Test und post hoc Mann-Whitney-Tests verwendet. Kategorisierte Variablen wurden mit dem Chi²- Test bzw. Fischer Exakt Test analysiert.

Bonferroni Korrektur wurde für die gesamte Auswertung zur Adjustierung multipler Tests verwendet. Alle Tests wurden zweiseitig zu einem Signifikanzniveau von 5 % durchgeführt. Die Auswertung wurde mit SPSS Version 11.5 durchgeführt.

Der Zusammenhang zwischen Läsionsvolumen und Gesamtschaden (Gesamtzahl abgestorbener Zellen über alle Regionen hinweg) wurde mit Pearson Korrelationskoeffizienten berechnet. Lineare Regression wurde angewendet, um den Effekt zu quantifizieren und auf Gruppenunterschiede zu testen.

3.3 Ergebnisse

In die Ergebnisse fließen die intraoperativ erhobenen Werte von 39 männlichen Sprague-Dawley Ratten ein. Vor der Induktion des Schädel-Hirn-Traumas erfolgt die Randomisierung in eine der zwei Versuchsgruppen: SHT oder SHAM. Die SHT Tiere werden entweder einer der zwei Versuchsnarkosen, Propofol BS1-5 % bzw. Propofol BS30-40 %, oder der Kontrollnarkose Halothan zugeteilt. SHAM ist der Scheinversuch unter der Kontrollnarkose Halothan.

Die physiologischen Parameter werden zu genau definierten Messzeitpunkten erhoben. Der erste Messzeitpunkt 0:00 h (Ausgangswert) erfolgt unmittelbar vor der Induktion des Schädel-Hirn-Traumas. Weitere Messungen werden in der 6-stündigen Nachbeatmungsphase nach 0:20 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h und 6 h erhoben und dokumentiert. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird sowohl der 1.-, 2.- und 3.-Stundenwert nach SHT wie auch der 4.-, 5.- und 6.-Stundenwert zu einem Wert zusammengefasst.

3.3.1 Physiologische Variablen während des operativen Abschnitts

Tabelle 6: Mittlerer arterieller Blutdruck, Herzfrequenz und Hämoglobin

	Messzeit- punkt	SHT/ Prop BS1-5 %	SHT/ Prop BS30-40 %	SHT/ Halo	SHAM/ Halo
MAP (mmHg)	Ausgangswert	85 ± 6	85 ± 7	83 ± 7	86 ± 5
	SHT	93 ± 6	98 ± 5	96 ± 6	95 ± 8
	1.-3. h	95 ± 4	93 ± 5	92 ± 5	95 ± 4
	4.-6. h	89 ± 7	90 ± 5	94 ± 5	96 ± 6
Herz- frequenz (/min)	Ausgangswert	322 ± 29	312 ± 31	321 ± 33	339 ± 48
	SHT	336 ± 37	323 ± 49	352 ± 43	374 ± 54
	1.-3. h	311 ± 23	288 ± 33	367 ± 53	384 ± 61
	4.-6. h	297 ± 11	292 ± 63	368 ± 65	388 ± 54
Hämo- globin (g/dl)	Ausgangswert	12,6 ± 0,6	12,8 ± 0,9	12,2 ± 0,8	13,2 ± 0,4
	SHT	12,3 ± 0,5	12,4 ± 0,6	12,2 ± 0,7	13,3 ± 0,7
	1.-3. h	11,7 ± 0,6	11,6 ± 0,7	11,8 ± 0,5	13,0 ± 0,6
	4.-6. h	11,3 ± 0,8	11,0 ± 0,9	11,6 ± 1,1	12,8 ± 0,9

Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (\pm SD) des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP), der Herzfrequenz und des Hämoglobingehalts zu den vier definierten intraoperativen Zeitpunkten der vier Versuchsgruppen (SHT/Prop BS1-5 %, SHT/Prop BS30-40 % und SHT/Halo (jeweils $n = 10$) sowie SHAM/Halo ($n = 9$)).

Signifikanzen: keine

Der mittlere arterielle Blutdruck zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen oder den gemessenen Zeitpunkten. Der MAP steigt kurzzeitig tendenziell in allen vier Versuchsgruppen nach dem SHT auf über 90 mmHg an. Im weiteren Verlauf wird durch die Dauerinfusion des Kreislauf-stabilisierenden Arterenols der MAP kontinuierlich zwischen 80 und 100 mmHg gehalten und fällt nicht in einen kritischen Bereich unter 80 mmHg ab.

Hinsichtlich der Herzfrequenz lassen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Versuchsgruppen erkennen. Die Herzfrequenz sinkt im Verlauf tendenziell in beiden Propofolgruppen. In beiden Halothangruppen bleibt die Herzfrequenz tendenziell erhöht. Im Verlauf des Versuchs bleiben alle gemessenen Werte im physiologischen Bereich.

Die Messung des Gesamthämoglobins ergibt zu keinem Zeitpunkt und in keiner Gruppe eine signifikante Erhöhung oder Erniedrigung der errechneten Mittelwerte. Ein tendenzielles Absinken der Gesamthämoglobinkonzentration in Bezug auf den Ausgangswert ist feststellbar. Es bleiben jedoch während der gesamten Versuchsdauer alle Werte im physiologischen Bereich.

Tabelle 7: Ergebnisse der Blutgasanalyse sowie der Atemfrequenz

	Messzeitpunkt	SHT/ Prop BS1-5 %	SHT/ Prop BS30-40 %	SHT/ Halo	SHAM/ Halo
PaO₂ (mmHg)	Ausgangswert	105 ± 19	115 ± 11	118 ± 21	114 ± 6
	SHT	125 ± 14	136 ± 17	125 ± 24	126 ± 17
	1.-3. h	109 ± 9	119 ± 10	118 ± 13	127 ± 12
	4.-6. h	110 ± 13	114 ± 14	126 ± 13	127 ± 10
PaCO₂ (mmHg)	Ausgangswert	41,3 ± 2,5	40,6 ± 2,1	40,6 ± 3,5	42,8 ± 2,1
	SHT	42,5 ± 3,1	40,2 ± 4,0	41,1 ± 3,4	42,7 ± 2,3
	1.-3. h	43,1 ± 2,3	42,4 ± 2,5	42,9 ± 2,0	42,5 ± 1,6
	4.-6. h	40,8 ± 1,5	40,6 ± 2,7	40,6 ± 2,3	40,1 ± 1,2
pH-Wert	Ausgangswert	7,43 ± 0,03	7,43 ± 0,02	7,42 ± 0,03	7,42 ± 0,03
	SHT	7,42 ± 0,03	7,42 ± 0,03	7,43 ± 0,03	7,44 ± 0,01
	1.-3. h	7,41 ± 0,03	7,38 ± 0,02	7,40 ± 0,03	7,43 ± 0,02
	4.-6. h	7,42 ± 0,04	7,40 ± 0,03	7,43 ± 0,03	7,44 ± 0,02
Atemfrequenz (/min)	Ausgangswert	68 ± 10	63 ± 9	68 ± 16	63 ± 8
	SHT	69 ± 9	67 ± 10	71 ± 18	66 ± 6
	1.-3. h	77 ± 14	73 ± 10	77 ± 13	72 ± 6
	4.-6. h	78 ± 14	77 ± 16	82 ± 15	75 ± 7

Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (\pm SD) des arteriellen Sauerstoffpartialdrucks (PaO₂), des arteriellen Kohlendioxidpartialdrucks (PaCO₂), des pH-Werts und der Atemfrequenz zu den vier definierten intraoperativen Zeitpunkten der vier Versuchsgruppen (SHT/Prop BS1-5 %, SHT/Prop BS30-40 % und SHT/Halo (jeweils n = 10) sowie SHAM/Halo (n = 9)).

Signifikanzen: keine

Es ergeben sich keinerlei signifikante Unterschiede bei den Variablen der Blutgasanalyse und der Atemfrequenz zwischen den Messzeitpunkten innerhalb einer Gruppe und zwischen den Gruppen zum gleichen Messzeitpunkt.

Der PaO₂ wird durch die Zufuhr von Sauerstoff im konstanten Bereich, immer über 100 mmHg, gehalten. Es liegen keine Differenzen zwischen den einzelnen Versuchsgruppen oder den gemessenen Zeitpunkten vor. Auch bei der Messung des PaCO₂ lassen sich keine Unterschiede zwischen den vier Versuchsgruppen oder den gemessenen Zeitpunkten feststellen. Alle Werte liegen im physiologischen Bereich.

Ebenso wie beim PaO₂ und beim PaCO₂ liegt auch beim pH-Wert keine Besonderheit zwischen den einzelnen Versuchsgruppen oder den gemessenen Zeitpunkten vor. Alle Werte befinden sich im physiologischen Bereich.

Bei der Atemfrequenz ist über die Zeit ein tendenzieller Anstieg der Frequenz zu erkennen. Jedoch bleiben auch hier alle Werte innerhalb ihrer physiologischen Grenzen.

Tabelle 8: Ergebnisse der Blutglukosekonzentration

	Messzeitpunkt	SHT/ Prop BS1-5 %	SHT/ Prop BS30-40 %	SHT/ Halo	SHAM/ Halo
Glukose mg/dl	Ausgangswert	162 ± 26	146 ± 27	137 ± 27	159 ± 36
	SHT	148 ± 12	128 ± 22	130 ± 13	148 ± 23
	1.-3. h	116 ± 14*	106 ± 17*	109 ± 9*	124 ± 19
	4.-6. h	99 ± 14*	103 ± 24*	104 ± 15*	115 ± 22*

Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (\pm SD) der Glukosekonzentration zu den vier definierten intraoperativen Zeitpunkten der vier Versuchsgruppen (SHT/Prop BS1-5 %, SHT/Prop BS30-40 % und SHT/Halo (jeweils n = 10) sowie SHAM/Halo (n = 9)).

Signifikanzen: ohne Sonderzeichen = nicht signifikant; (*) = $p < 0,05$ vs. Ausgangswert

Eine detaillierte Darstellung des Glukoseabfalls über die Zeit findet sich in Abbildung 22.

Glukose

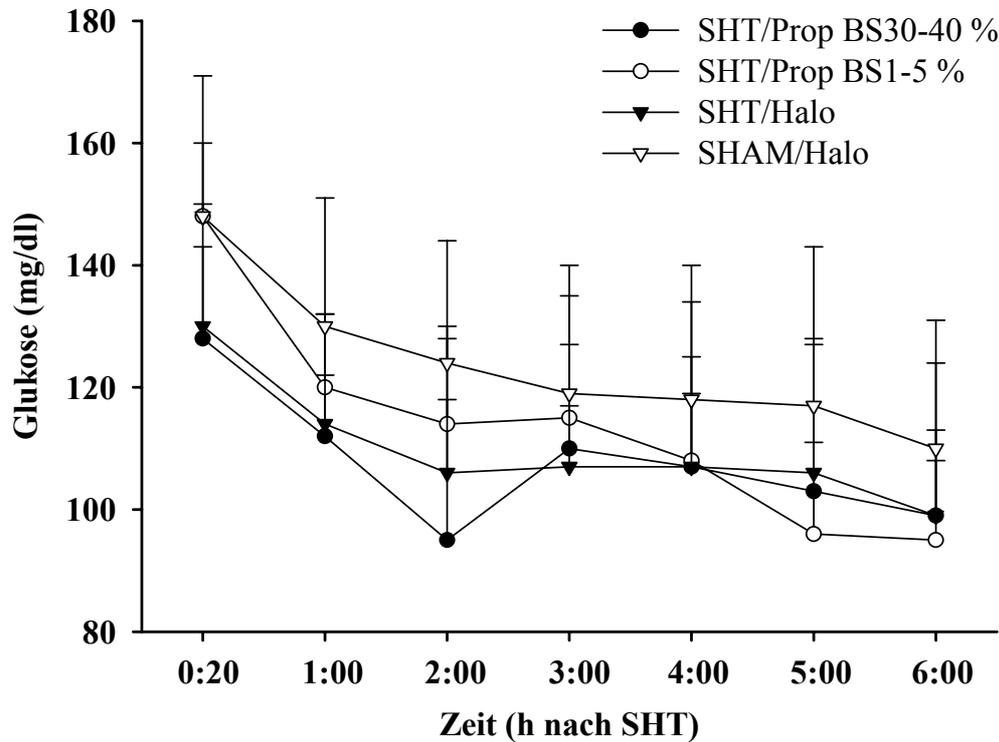


Abbildung 22: Glukosekonzentration ($MW \pm SD$) der vier Versuchsgruppen über die Zeit (h nach SHT).

Die SHT/Halo-Gruppe und die SHT/Prop BS30-40 %-Gruppe zeigen tendenziell einen geringeren Glukoseausgangswert als die beiden anderen Gruppen, SHAM/Halo und SHT/Prop BS1-5 %. Direkt nach dem SHT fällt der Glukosespiegel tendenziell in allen vier Versuchsgruppen. Eine signifikante Erniedrigung der Glukosekonzentration besteht in allen SHT-Gruppen drei Stunden nach SHT. Im Zeitraum von vier bis sechs Stunden nach SHT kann in allen vier Versuchsgruppen ein signifikanter Abfall im Vergleich zum Ausgangswert festgestellt werden.

Temperatur

Während der gesamten Versuchsdauer werden sowohl die periphere als auch die perikranielle Körpertemperatur in allen Gruppen und zu allen Zeitpunkten erfasst und durch eine rückgekoppelte Wärmelampe konstant bei 37,5 °C gehalten.

Körpergewicht

Die Versuchstiere werden vor dem operativen Abschnitt des Versuchs gewogen. Das Körpergewicht aller Tiere schwankt zwischen 350-450 g.

3.3.2 Narkose

In der Propofolgruppe wird die Narkosetiefe in der 6-stündigen Nachbeatmungsphase für jedes Tier individuell über das Vorhandensein eines Burst-Suppression-Musters im EEG gesteuert. In der vorliegenden Studie werden zwei Propofolgruppen unterschieden. Die „niedrig“ dosierte Propofolgruppe, die eine Burst-Suppression-Ratio von 1-5 % aufweist und die „hoch“ dosierte Propofolgruppe mit einer Burst-Suppression-Ratio von 30-40 %.

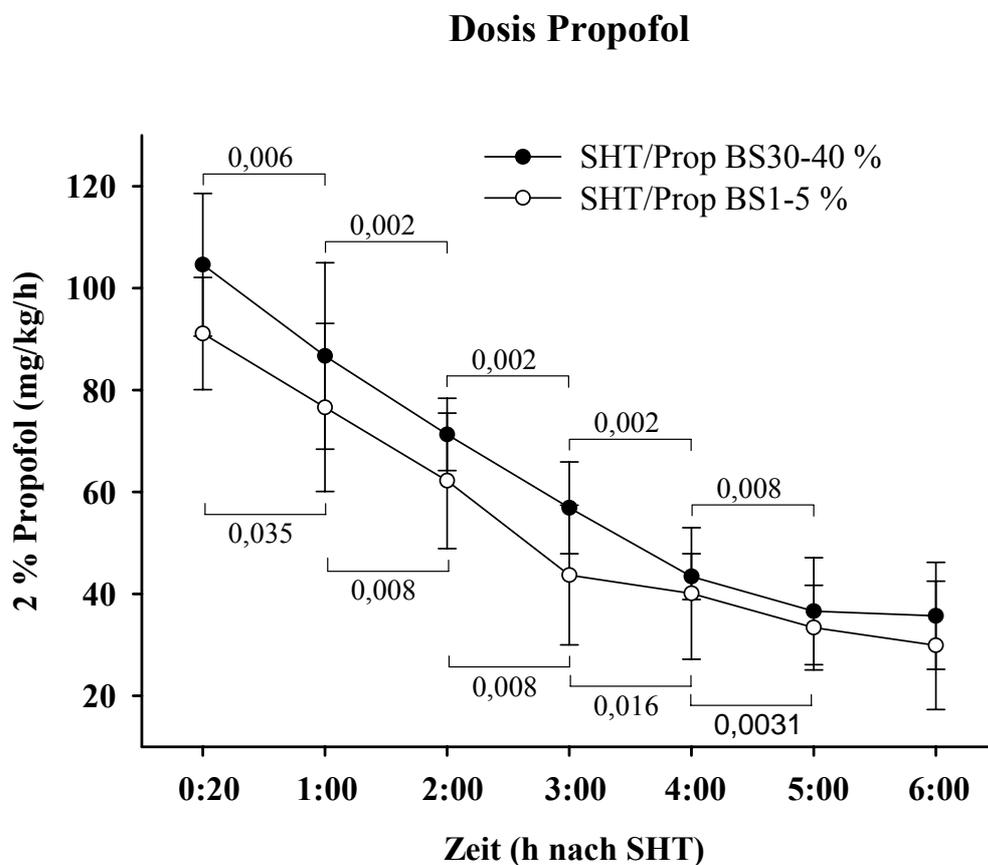


Abbildung 23: Übersicht über die Dosierung des 2 %igen Propofol (mg/kg/h) über die Zeit (h nach SHT) der zwei Propofolgruppen zur Erhaltung der geforderten Burst-Suppression-Ratio. Signifikanzen: siehe p-Werte

Die Propofoldosis sinkt kontinuierlich in beiden Gruppen mit der Zeit. Von der Stunde fünf auf sechs nach SHT besteht kein signifikanter Unterschied in der Dosierung von Propofol. Mit dieser Dosierung ist es möglich, die vorgegebene Burst-Suppression-Ratio (BS) der zwei Propofolgruppen aufrecht zu halten. Eine detaillierte Darstellung der Burst-Suppression-Ratio der zwei Propofolgruppen über die Zeit findet sich in Abbildung 24.

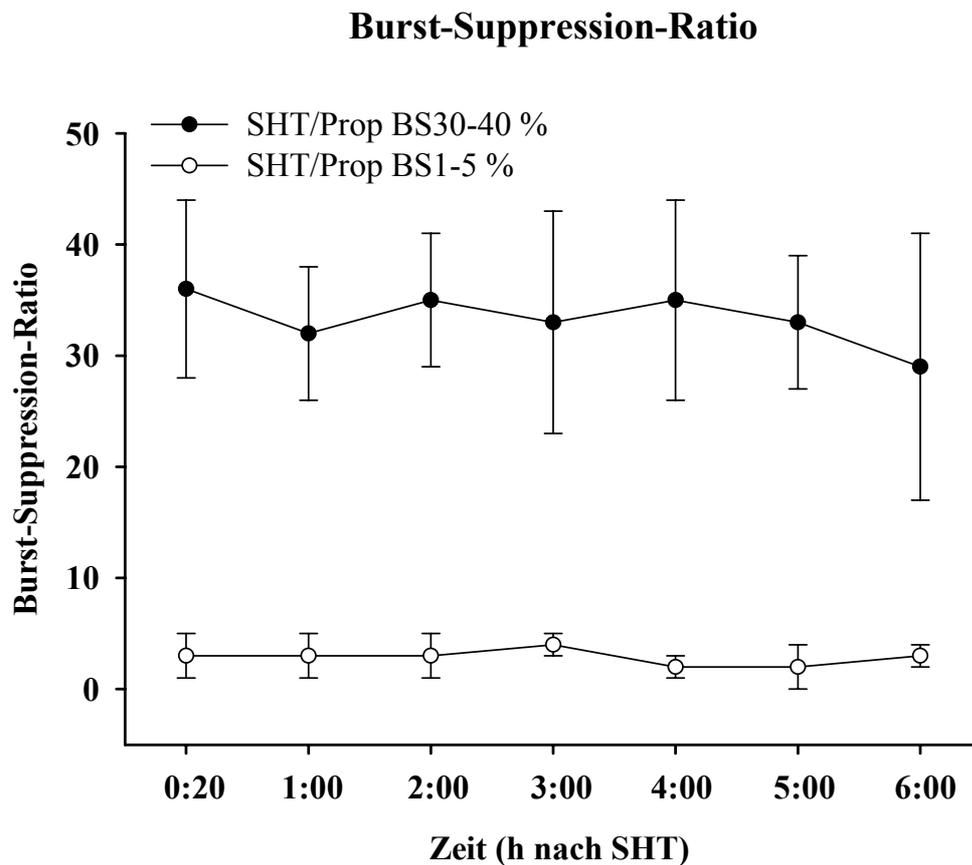


Abbildung 24: Grafische Darstellung der Burst-Suppression-Ratio (MW \pm SD) der zwei Propofolgruppen über die Zeit (h nach SHT).

Die vorliegende Grafik zeigt den kontinuierlichen Verlauf der Burst-Suppression-Ratio in den zwei SHT/Prop-Gruppen. Sowohl in der SHT/Prop-Gruppe, in der die Burst-Suppression-Ratio 1-5 % beträgt, wie auch in der SHT/Prop-Gruppe mit einer Burst-Suppression-Ratio von 30-40 % wird während der gesamten Versuchszeit die BS innerhalb des geforderten Bereichs konstant aufrecht gehalten.

3.3.3 Untersuchung des Gehirns

3.3.3.1 Kresylviolett- (KV-) Färbung

3.3.3.1.1 Erfassen der Läsionsflächen und -volumen

In jeder der vier Versuchsgruppen werden pro Tier elf mit Kresylviolett gefärbte Gehirnschnitte unter dem Lichtmikroskop begutachtet. Mit Hilfe der mikroskopischen Betrachtung werden Beginn, Ausmaß und Ende des traumatisch geschädigten Gehirnareals bestimmt (siehe Kapitel 3.2.10.1.2, S. 73).

Von insgesamt sieben Tieren der SHT-Gruppen konnte aufgrund von Einblutungen in das Gehirn keine Läsionsflächenbestimmung durchgeführt werden und in der Folge kein Aussage-kräftiges Läsionsvolumen berechnet werden. Deshalb werden sowohl in der nachfolgenden Grafik wie auch in den folgenden Tabellen nur die Ergebnisse von sieben bzw. acht Tieren dargestellt. Insgesamt mussten aus der SHT/Prop BS1-5 %-Gruppe zwei, aus der SHT/Prop BS30-40 % drei und aus der SHT/Halo wiederum zwei Tiere aufgrund schwerwiegender kortikaler und subkortikaler Einblutungen von der Läsionsflächen- und Läsionsvolumenbestimmung ausgeschlossen werden.

Die errechneten Flächenwerte der rechten Hemisphäre und der ungeschädigten linken Gehirnhälfte werden in eine Excel-Tabelle eingetragen. Mit Hilfe dieser Flächen berechnet die Software jeweils eine ödemkorrigierte Fläche des Traumas (s. Tab. 9 bis 11).

Die nachfolgende Grafik stellt die ermittelten Läsionsflächen der drei SHT-Gruppen vergleichend dar.

Läsionsflächen (KV-Färbung)

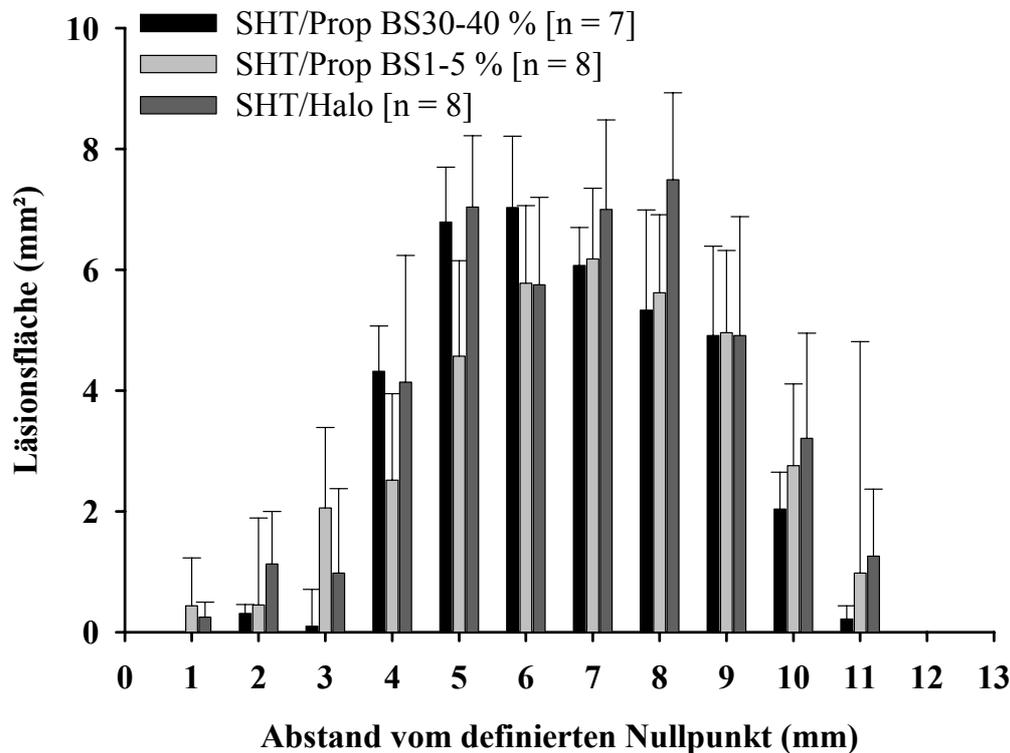


Abbildung 25: Vergleichende grafische Darstellung der Mittelwerte (MW) und des Standardfehlers (SEM) von den Läsionsflächen (mm^2) der Gehirne der Tiere der drei SHT-Gruppen (SHT/Prop BS1-5 % ($n = 8$), SHT/Prop BS30-40 % ($n = 7$) und SHT/Halo ($n = 8$)) im jeweiligen Abstand (mm) vom definierten Nullpunkt in der Kresylviolet- (KV-) Färbung.

Die Läsionsflächen der drei SHT-Gruppen nehmen mit zunehmendem Abstand vom definierten Nullpunkt zu. In einer Entfernung von 5 bis 8 mm vom definierten Nullpunkt erreichen sie ihr Läsionsflächen-Maximum. Ab einem Abstand von 8 mm vom definierten Nullpunkt kann eine kontinuierliche Abnahme der Läsionsflächen in allen drei SHT-Gruppen beobachtet werden. Signifikante Unterschiede der Läsionsflächen zwischen den drei SHT-Gruppen bestehen nicht. Im Vergleich zu den beiden SHT/Prop-Gruppen zeigt die SHT/Halo-Gruppe tendenziell erhöhte Läsionsflächenwerte. Die tendenziell kleinsten Läsionsflächenwerte sind in der SHT/Prop BS30-40 %-Gruppe zu verzeichnen (s. Abb. 25).

Aus den Läsionsflächenwerten lässt sich mit Hilfe der elf konsekutiven Schnitte, mit bekanntem Abstand zueinander das Volumen des Traumas des Gehirns berechnen. Hierbei wird der Mittelwert zweier nebeneinanderliegenden Flächen errechnet und dann mit dem dazwischen liegenden Abstand multipliziert (Formel s. Tab. 9).

In den nachfolgenden Tabelle sind die Läsionsflächenwerte und Läsionsvolumina der Gehirne in der KV-Färbung für jede SHT-Gruppe getrennt voneinander aufgeführt.

Tabelle 9: Läsionsflächen (mm²) und Läsionsvolumina (mm³) der SHT/Prop BS1-5 %-Gruppe in der KV-Färbung

SHT/ Prop BS 1-5 % (n = 8)	Abstand vom definierten Nullpunkt in [mm]												Läsions- volumen [mm ³] der SHT/ Prop BS1-5 % (n = 8)
	1	2	3	3,5	4,5	5,5	6,5	7,5	8,5	9	10	11	
	Läsionsflächen [mm ²] der SHT/Prop BS1-5 % (n = 8) in der KV-Färbung												
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	
1	0,00	0,00	1,13	0,83	3,24	3,45	3,03	6,77	5,43	2,35	0,00		23,8
2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-0,23	2,49	3,48	3,12	0,00		7,2
3	0,00	0,00	-1,17	7,87	1,44	-1,17	5,77	6,62	7,64	2,30	0,00		25,1
4	0,00	2,17	9,17	8,24	2,91	3,86	7,19	5,01	0,00	0,00	0,00		34,2
5	0,00	0,00	-1,11	-1,15	-1,92	5,33	7,30	4,87	10,7	9,32	9,49	8,05	46,4
6	0,00	-5,66	-5,43	-0,38	9,31	9,93	10,5	12,2	8,69	10,1	7,81	-5,12	48,7
7	0,00	0,00	0,00	0,00	-1,96	3,35	3,08	2,34	7,31	8,78	2,71	0,00	21,6
8	0,00	0,00	0,99	1,07	7,11	11,8	9,60	9,14	1,78	3,68	2,04		45,4
MW	0,00	-0,44	0,45	2,06	2,52	4,57	5,78	6,18	5,62	4,96	2,76	0,98	MW 31,55 ± SD 14,66
SEM	0,00	0,79	1,44	1,33	1,43	1,58	1,28	1,17	1,29	1,36	1,35	3,83	
Formel zur Berechnung des Läsionsvolumens: $((A+B)/2*d+((B+C)/2*d+((C+D)/2*d+((D+E)/2*d+((E+F)/2*d+((F+G)/2*d+((G+H)/2*d+((H+I)/2*d+((I+J)/2*d+((J+K)/2*d+((K+L)/2*d$													

d = Abstand zwischen zwei konsekutiven Schnitten

Tabellarische Darstellung der Mittelwerte (MW) und des Standardfehlers (SEM) von den Läsionsflächen (mm²) der Gehirne der Tiere der SHT/Prop BS1-5 %-Gruppe (n = 8), im jeweiligen Abstand (mm) vom definierten Nullpunkt in der Kresylviolett- (KV-) Färbung und dem daraus errechneten Läsionsvolumina (mm³) mit dem dazugehörigen Mittelwert (MW) und Standardabweichung (±SD) vom Gesamtergebnis der jeweiligen SHT-Gruppe

Tabelle 10: Läsionsflächen (mm^2) und Läsionsvolumina (mm^3) der SHT/Prop BS30-40 %-Gruppe in der KV-Färbung

		Abstand vom definierten Nullpunkt in [mm]													
SHT/ Prop BS 30-40 % (n = 7)		1	2	3	3,5	4,5	5,5	6,5	7,5	8,5	9	10	11	Läsions- volumen [mm^3] der SHT/ Prop BS30-40 % (n = 7)	
		Läsionsflächen [mm^2] der SHT/Prop BS30-40 % (n = 7) in der KV-Färbung													
1		0,00	0,00	0,00	-1,30	6,02	6,70	10,1	7,13	9,39	7,34	3,89		45,4	
2		0,00	0,00	0,92	-0,07	5,22	5,66	5,41	2,99	6,62	5,24	3,73		32,5	
3		0,00	0,00	0,63	2,73	4,53	3,01	9,93	5,51	0,00	0,00	0,00		25,5	
4		0,00	0,00	0,00	1,37	3,63	11,1	10,8	7,83	7,39	10,9	2,93	0,00	49,7	
5		0,00	0,00	0,00	-1,34	5,45	7,27	3,07	6,76	4,27	6,18	1,45	0,00	30,8	
6		0,00	0,00	0,60	-0,51	0,14	7,19	5,61	7,13	10,5	4,77	2,25	-0,67	33,2	
7		0,00	0,00	0,00	-1,55	5,25	6,58	4,37	5,15	-0,83	0,00	0,00		19,6	
MW		0,00	0,00	0,31	-0,10	4,32	6,79	7,03	6,07	5,33	4,91	2,04	-0,22	MW 33,81	
SEM		0,00	0,00	0,15	0,61	0,75	0,91	1,18	0,63	1,66	1,48	0,61	0,22	± SD 10,57	

Tabellarische Darstellung der Mittelwerte (MW) und des Standardfehlers (SEM) von den Läsionsflächen (mm^2) der Gehirne der Tiere der SHT/Prop BS30-40 %-Gruppe (n = 7), im jeweiligen Abstand (mm) vom definierten Nullpunkt in der Kresylviolett- (KV-) Färbung und dem daraus errechneten Läsionsvolumina (mm^3) mit dem dazugehörigen Mittelwert (MW) und Standardabweichung (\pm SD) vom Gesamtergebnis der jeweiligen SHT-Gruppe

Tabelle 11: Läsionsflächen (mm^2) und Läsionsvolumina (mm^3) der SHT/Halo-Gruppe in der KV-Färbung

Abstand vom definierten Nullpunkt in [mm]													
SHT/ Halo (n = 8)	1	2	3	3,5	4,5	5,5	6,5	7,5	8,5	9	10	11	Läsions- volumen [mm^3] der SHT/ Halo (n = 8)
	Läsionsflächen [mm^2] der SHT/Halo (n = 8) in der KV-Färbung												
1	0,00	0,00	0,25	5,69	4,32	3,09	-1,76	2,2	0,03	0,00	0,00		12,3
2	0,00	0,00	-1,1	0,31	5,93	7,74	3,1	3,14	4,45	-1,98	-1,67		19,5
3	0,00	1,97	1,92	2,65	11,0	7,97	6,03	6,16	6,34	2,86	0,00	0,00	43,5
4	0,00	0,00	-3,26	-2,43	8,37	9,66	10,9	13,4	12,5	11,7	7,09	-1,21	61,8
5	0,00	0,00	1,41	0,94	2,44	10,7	5,87	4	5,83	0,00	0,00		27,2
6	0,00	0,00	-4,89	-3,05	-3,12	4,52	4,3	10,5	10,9	11,6	8,87	2,9	38,5
7	0,00	0,00	0,00	-3,34	-5,48	2,27	6,89	5,2	9,79	9,99	8,21	3,36	32,8
8	0,00	0,00	-3,39	7,08	9,66	10,4	10,7	11,4	10,5	5,04			55,8
													MW 36,42
MW	0,00	0,25	-1,13	0,98	4,14	7,04	5,75	7,00	7,49	4,91	3,21	1,26	± SD 17,06
SEM	0,00	0,25	0,87	1,40	2,10	1,18	1,45	1,48	1,44	1,97	1,74	1,11	

Tabellarische Darstellung der Mittelwerte (MW) und des Standardfehlers (SEM) von den Läsionsflächen (mm^2) der Gehirne der Tiere der SHT/Halo-Gruppe (n = 8), im jeweiligen Abstand (mm) vom definierten Nullpunkt in der Kresylviolett- (KV-) Färbung und dem daraus errechneten Läsionsvolumina (mm^3) mit dem dazugehörigen Mittelwert (MW) und Standardabweichung (\pm SD) vom Gesamtergebnis der jeweiligen SHT-Gruppe.

Im Vergleich der drei SHT-Gruppen ist eine Tendenz dahingehend zu erkennen, dass die SHT/Halo-Gruppe tendenziell ein größeres Läsionsvolumen aufweist, als die beiden SHT/Prop-Gruppen.

3.3.3.2 Hämatoxylin Eosin- (HE-) Färbung

3.3.3.2.1 Erfassen der Läsionsflächen und -volumen

Wie bereits in der KV-Färbung beschrieben, werden auch in der HE-Färbung in jeder der vier Versuchsgruppen pro Tier zehn mit Hämatoxylin-Eosin gefärbte Gehirnschnitten unter dem Lichtmikroskop begutachtet. Als Abgrenzung zwischen geschädigtem und gesundem Bereich dient einem die eosinophile Zellgrenze im Kortex.

Aufgrund schwerwiegender Einblutungen konnten nur sieben bzw. acht Tiere pro Gruppe bei der Läsionsflächen- und Läsionsvolumenbestimmung ausgewertet werden. Insgesamt mussten auch in der HE-Färbung aus der SHT/Prop BS1-5 %-Gruppe zwei, aus der SHT/Prop BS30-40 % drei und aus der SHT/Halo wiederum zwei Tiere aufgrund schwerwiegender kortikaler und subkortikaler Einblutungen von der Läsionsflächen- und Läsionsvolumenbestimmung ausgeschlossen werden.

Die errechneten Flächenwerte der rechten Hemisphäre und der ungeschädigten linken Gehirnhälfte werden in eine Excel-Tabelle eingetragen. Aus diesen Flächen berechnet die Software jeweils eine ödemkorrigierte Fläche des Traumas. Die nachfolgende Grafik stellt die ermittelten Läsionsflächen der drei SHT-Gruppen einander gegenüber.

Läsionsflächen (HE-Färbung)

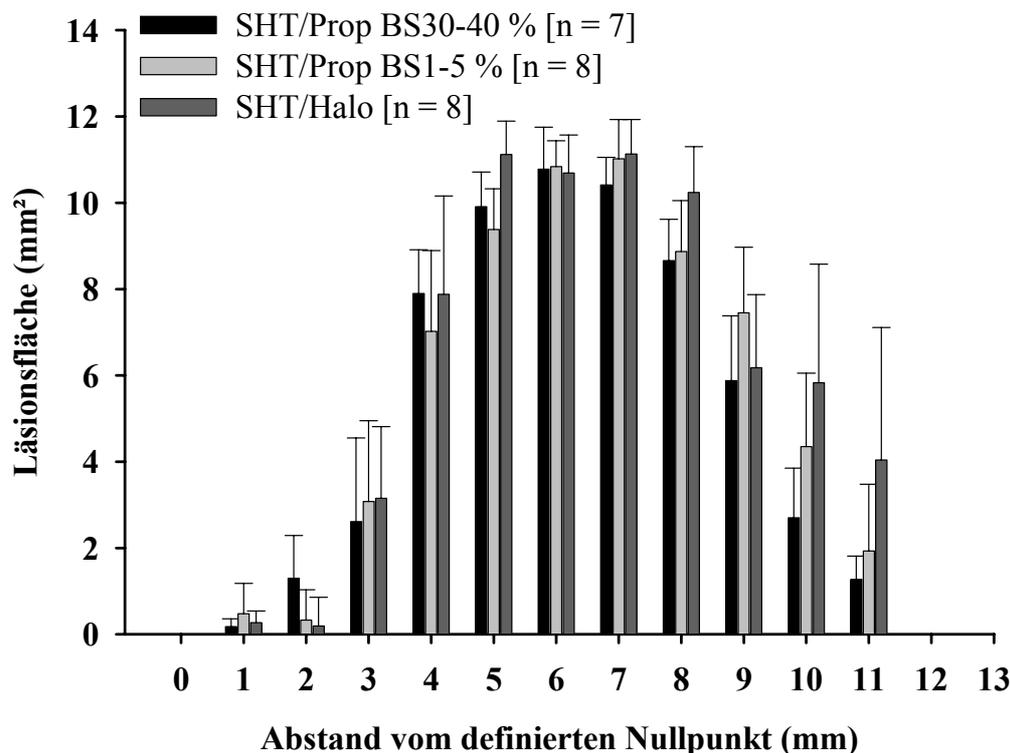


Abbildung 26: Vergleichende grafische Darstellung der Mittelwerte (MW) und des Standardfehlers (SEM) von den Läsionsflächen der Gehirne (mm²) der Tiere der drei SHT-Gruppen (SHT/Prop BS1-5 % (n = 8), SHT/Prop BS30-40 % (n = 7) und SHT/Halo (n = 8)) im jeweiligen Abstand (mm) vom definierten Nullpunkt in der Hämatoxylin Eosin- (HE-) Färbung.

Die ermittelten Läsionsflächen in der HE-Färbung der drei SHT-Gruppen nehmen mit zunehmender Entfernung vom definierten Nullpunkt zu. Sie erreichen in einem Abstand von 5 bis 8 mm vom definierten Nullpunkt ihr Läsionsflächen-Maximum. Ab 8 mm Entfernung vom definierten Nullpunkt kann eine kontinuierliche Abnahme der Läsionsflächen in allen drei SHT-Gruppen beobachtet werden. Signifikante Unterschiede der Läsionsflächen zwischen den drei SHT-Gruppen bestehen nicht. Im Vergleich zu den beiden SHT/Prop-Gruppen zeigt die SHT/Halo-Gruppe tendenziell erhöhte Läsionsflächenwerte. Die tendenziell kleinsten Läsionsflächenwerte bestehen in der SHT/Prop BS30-40 % (s. Abb. 26). Im Vergleich zu den Läsionsflächen in der KV-Färbung lassen sich keine signifikanten Unterschiede finden. Die drei SHT-Gruppen der HE-Färbung zeigen im Gegensatz zu den Läsionsflächenwerten der drei SHT-Gruppen in der KV-Färbung tendenziell größere Läsionsflächenwerte.

Aus den Läsionsflächenwerten lässt sich mit den zehn konsekutiven Schnitten, bei bekanntem Abstand zueinander, schließlich das Volumen des Traumas des Gehirns berechnen (Formel s. Tab. 9, S. 100).

In den folgenden Tabellen sind die Läsionsflächenwerte und Läsionsvolumina der Gehirne für jede SHT-Gruppen getrennt voneinander aufgeführt.

Tabelle 12: Läsionsflächen (mm²) und Läsionsvolumina (mm³) der SHT/Prop BS1-5 %-Gruppe in der HE-Färbung

		Abstand vom definierten Nullpunkt in [mm]													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11			
SHT/ Prop BS1-5 % (n = 8)	Läsionsflächen [mm²] der SHT/Prop BS1-5 % (n = 8) in der HE-Färbung											Läsions- volumen [mm³] der SHT/ Prop BS1-5 % (n = 8)			
	1	0,00	0,00	2,62	12,22	13,95	13,76	13,58	10,55	7,21	1,78			0,00	65,1
	2	0,00	0,00	0,00	0,00	5,66	11,57	7,86	9,25	11,31	4,78			2,68	43,9
	3	0,00	0,00	11,43	13,04	9,86	8,86	9,29	8,70	4,19	-0,75				55,9
	4	1,38	2,18	11,26	10,18	8,38	11,29	7,24	1,39	0,00	0,00				51,2
	5	0,00	0,00	-1,71	3,62	6,99	10,02	13,56	12,89	12,33	13,68			7,47	66,0
	6	-5,21	-4,83	-0,73	7,92	9,12	10,18	13,26	10,60	11,07	8,80			-1,53	50,7
	7	0,00	0,00	0,00	-0,39	8,85	8,81	11,64	8,53	8,91	3,86			1,01	42,7
	8	0,00	0,00	1,79	9,58	12,19	12,23	11,72	9,01	4,54	2,66				54,7
MW	-0,48	-0,33	3,08	7,02	9,38	10,84	11,02	8,87	7,45	4,35	1,93	MW 53,77 ± SD 8,62			
SEM	0,70	0,70	1,87	1,87	0,94	0,60	0,91	1,18	1,52	1,70	1,55				

Tabellarische Darstellung der Mittelwerte (MW) und des Standardfehlers (SEM) von den Läsionsflächen (mm²) der Gehirne der Tiere der SHT/BS1-5 %-Gruppe (n = 8), im jeweiligen Abstand (mm) vom definierten Nullpunkt in der Hämatoxylin Eosin- (HE-) Färbung und dem daraus errechneten Läsionsvolumina (mm³) mit dem dazugehörigen Mittelwert (MW) und Standardabweichung (±SD) vom Gesamtergebnis der jeweiligen SHT-Gruppe.

Tabelle 13: Läsionsflächen (mm^2) und Läsionsvolumina (mm^3) der SHT/Prop BS30-40 %-Gruppe in der HE-Färbung

Abstand vom definierten Nullpunkt in [mm]												
SHT/ Prop BS 30-40 % (n = 7)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Läsions- volumen [mm^3] der SHT/ Prop BS30-40 % (n = 7)
	Läsionsflächen [mm^2] der SHT/Prop BS30-40 % (n = 7) in der HE-Färbung											
1	0,00	0,00	0,00	7,20	10,40	12,40	12,67	10,89	9,45	7,47	2,64	62,23
2	0,00	0,00	1,87	3,79	9,07	11,59	9,18	10,16	6,87	5,32	1,16	48,85
3	0,00	2,13	7,87	7,69	7,09	5,54	8,14	5,70	-0,08	0,00		38,38
4	1,28	6,94	11,49	12,31	12,30	11,64	12,45	5,72	1,72	0,00		69,49
5	0,00	0,00	-2,82	8,47	7,66	9,55	9,53	6,51	5,27	1,73	0,00	39,39
6	0,00	0,00	0,47	6,23	10,22	13,15	10,94	10,51	11,05	4,36	1,27	57,69
7	0,00	0,00	-0,59	9,61	12,60	11,59	9,95	11,13	6,89	0,00		50,05
												MW 52,30
MW	0,18	1,30	2,61	7,90	9,91	10,78	10,41	8,66	5,88	2,70	1,27	±
SEM	0,18	0,99	1,94	1,01	0,80	0,97	0,64	0,96	1,50	1,15	0,54	SD 11,55

Tabellarische Darstellung der Mittelwerte (MW) und des Standardfehlers (SEM) von den Läsionsflächen (mm^2) der Gehirne der Tiere der SHT/Prop BS30-40 %-Gruppe (n = 7), im jeweiligen Abstand (mm) vom definierten Nullpunkt in der Hämatoxylin Eosin- (HE-) Färbung und dem daraus errechneten Läsionsvolumina (mm^3) mit dem dazugehörigen Mittelwert (MW) und Standardabweichung (\pm SD) vom Gesamtergebnis der jeweiligen SHT-Gruppe.

Table 14: Läsionsflächen (mm^2) und Läsionsvolumina (mm^3) der SHT/Halo-Gruppe in der HE-Färbung

Abstand vom definierten Nullpunkt in [mm]												
SHT/ Halo (n = 8)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Läsions- volumen [mm^3] der SHT/ Halo (n = 8)
	Läsionsflächen [mm^2] der SHT/Halo (n = 8) in der HE-Färbung											
1	0,00	0,00	7,94	9,62	10,89	10,29	7,90	6,86	0,00	0,00		46,6
2	0,00	0,00	0,60	8,12	11,86	11,40	13,10	11,04	9,00	-0,73		53,3
3	0,00	1,59	2,11	14,62	14,8	14,86	14,44	10,5	4,62	0,00	0,00	67,0
4	0,00	0,00	-2,91	8,98	12,79	13,50	13,09	14,51	6,45	10,23	-2,31	59,8
5	2,13	3,34	10,4	15,07	11,54	8,58	9,22	5,58	0,00	0,00		59,2
6	0,00	0,00	0,00	0,86	8,93	8,36	9,41	13,47	12,05	13,71	10,27	63,6
7	0,00	0,00	0,00	-3,86	7,82	7,86	10,60	9,43	12,26	11,76	8,20	54,6
8	0,00	-3,39	7,08	9,66	10,35	10,66	11,38	10,51	5,04			50,8
												MW 56,87
MW	0,27	0,19	3,15	7,88	11,12	10,69	11,13	10,24	6,18	5,83	4,04	±
SEM	0,27	0,67	1,66	2,28	0,77	0,88	0,80	1,06	1,69	2,75	3,07	SD 6,79

Tabellarische Darstellung der Mittelwerte (MW) und des Standardfehlers (SEM) von den Läsionsflächen (mm^2) der Gehirne der Tiere der SHT/Halo-Gruppe (n = 8), im jeweiligen Abstand (mm) vom definierten Nullpunkt in der Hämatoxylin Eosin- (HE-) Färbung und dem daraus errechneten Läsionsvolumina (mm^3) mit dem dazugehörigen Mittelwert (MW) und Standardabweichung (\pm SD) vom Gesamtergebnis der jeweiligen SHT-Gruppe.

In der HE-Färbung zeigt die SHT/Halo-Gruppe tendenziell ein größeres Läsionsvolumen, als die beiden SHT/Prop-Gruppen.

Im direkten Vergleich zwischen den beiden Färbungen, HE und KV, weisen alle Gruppen in der HE-Färbung ein tendenziell größeres Läsionsvolumen auf als in der KV-Färbung.

3.3.3.2.2 Beurteilung der Hippokampusregion

Um eine aussagekräftige Auswertung der gefärbten Schnitte zu erreichen, wird der Hippokampus in sechs verschiedene Regionen (CA1, CA2, CA3, CA4, oberer Ast des Gyrus dentatus und unterer Ast des Gyrus dentatus) eingeteilt. In die Auswertung gehen jedoch nur die CA1-, CA3-, CA4- Region und der Gyrus dentatus mit ein. Zellen, die sich eindeutig eosinophil darstellen, werden sowohl in der rechten als auch in der linken Hemisphäre ausgezählt und dokumentiert (siehe Tabelle 15,16,17).

Aufgrund schwerwiegender kortikaler und subkortikaler Einblutungen muss ein Tier in der SHT/Prop BS30-40 %-Gruppe von der Beurteilung der Hippokampusformation ausgeschlossen werden.

Tabelle 15: Anzahl der eosinophilen Zellen in der CA1-, CA3- und CA4-Region des Hippokampus in der rechten Hemisphäre

Anzahl eosinophiler Zellen	CA1		CA3		CA4	
	MW	Summe	MW	Summe	MW	Summe
SHT/ Prop BS1-5 % (n = 10)	21	147	5	35	24	165
	2	8	7	40	38	228
	10	58	8	46	29	174
	7	49	0	0	13	91
	4	22	0	0	27	161
	18	108	16	97	49	293
	7	42	5	34	31	216
	5	29	1	8	30	177
	41	327	8	62	37	260
	13	64	16	96	44	261
Gesamtergebnis MW±SD	13 ± 12	85 ± 94	7 ± 6	42 ± 35	32 ± 10	203 ± 60
SHT/ Prop BS 30-40 % (n = 9)	5	27	5	27	34	171
	23	139	10	58	45	268
	5	24	8	40	25	125
	22	134	10	59	39	235
	15	91	1	4	21	126
	23	140	2	10	25	148
	9	55	2	10	33	198
	12	69	4	22	39	233
	26	129	16	79	49	244
Gesamtergebnis MW±SD	16 ± 8	81 ± 53	6 ± 5	31 ± 27	34 ± 9	175 ± 80
SHT/ Halo (n = 10)	4	23	1	8	22	131
	18	92	9	44	23	115
	32	227	6	43	40	278
	19	111	7	44	38	227
	5	26	8	42	24	118
	9	66	14	99	46	321
	43	258	5	36	47	328
	20	121	5	32	37	261
	29	176	10	60	44	266
	53	210	31	122	78	311
Gesamtergebnis MW±SD	23 ± 16	131 ± 83	10 ± 8	53 ± 33	40 ± 16	236 ± 85

Mittelwerte (MW) und Gesamtanzahl (Summe) der eosinophilen Zellen in der CA1-, CA3- und CA4-Region des Hippokampus der rechten Gehirnhemisphäre aller Tiere der drei SHT-Gruppen (SHT/Prop BS1-5 %, SHT/Prop BS30-40 % und SHT/Halo) sowie der Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (\pm SD) vom Gesamtergebnis der jeweiligen SHT-Gruppe. MW = Gesamtanzahl der eosinophilen Zellen in der jeweiligen Hippokampusregion geteilt durch die Anzahl der ausgezählten Schnittebenen pro Gehirn in dieser Region. Summe = Gesamtanzahl der eosinophilen Zellen pro Gehirn in der jeweiligen Hippokampusregion

Die SHT/Halo-Gruppe weist im direkten Vergleich mit den beiden SHT/Prop-Gruppen in der CA1-, CA3- und CA4-Region tendenziell mehr eosinophile Zellen auf. Die wenigsten eosinophilen Zellen sind in allen drei Regionen des Hippokampus in der Gruppe SHT/Prop BS30-40 % vorhanden.

In der linken Hemisphäre der drei SHT-Gruppen und in beiden Hemisphären der Scheinversuchsgruppe, SHAM/Halo, konnten keine eosinophilen Zellen detektiert werden.

Tabelle 16: Anzahl der eosinophilen Zellen im Gyrus dentatus der rechten Hemisphäre

	GD oben		GD unten	
Anzahl eosinophiler Zellen	MW	Summe	MW	Summe
SHT/ Prop BS1-5 % (n = 10)	33	228	10	73
	35	212	16	93
	17	99	9	52
	13	93	2	11
	27	159	4	21
	48	285	22	130
	28	195	11	77
	24	146	5	30
	54	430	60	480
	38	228	14	85
Gesamtergebnis MW±SD	32 ± 13	208 ± 99	15 ± 17	105 ± 137
SHT/ Prop BS 30-40 % (n = 9)	22	112	7	35
	32	194	9	56
	28	138	6	29
	39	233	15	91
	31	186	11	63
	25	152	10	59
	29	171	8	46
	32	190	18	107
	32	159	14	71
Gesamtergebnis MW±SD	30 ± 5*	154 ± 63	11 ± 4	56 ± 31
SHT/ Halo (n = 10)	18	110	1	4
	35	176	12	58
	45	317	36	250
	34	206	15	91
	16	80	4	20
	41	286	10	68
	41	288	10	67
	43	301	13	89
	34	201	19	116
	82	329	43	173
Gesamtergebnis MW±SD	39 ± 18	229 ± 88	16 ± 13	94 ± 73

Mittelwerte (MW) und Gesamtanzahl (Summe) der eosinophilen Zellen im Gyrus dentatus der rechten Gehirnhemisphäre aller Tiere der drei SHT-Gruppen (SHT/Prop BS1-5 %, SHT/Prop BS30-40 % und SHT/Halo) sowie der Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (±SD) vom Gesamtergebnis der jeweiligen SHT-Gruppe.

Signifikanzen: ohne Sonderzeichen = nicht signifikant; () = $p < 0,05$*

*MW = Gesamtanzahl der eosinophilen Zellen in der jeweiligen Hippokampusregion geteilt durch die Anzahl der ausgezählten Schnittebenen pro Gehirn in dieser Region
Summe = Gesamtanzahl der eosinophilen Zellen pro Gehirn in der jeweiligen Hippokampusregion*

Die meisten eosinophilen Zellen finden sich in allen SHT-Gruppen tendenziell im oberen Ast des Gyrus dentatus. Zwischen der SHT/Halo und der SHT/Prop BS30-40 % besteht bei Vergleich der Mittelwerte ein signifikanter Unterschied in der eosinophilen Zellzahl im oberen Ast des Gyrus dentatus. Im Gruppenvergleich ist eine schwache Tendenz dahingehend zu erkennen, dass die SHT/Halo-Gruppe im gesamten Gyrus dentatus tendenziell mehr eosinophile Zellen aufweist als die beiden SHT/Prop-Gruppen. Die tendenziell geringste Anzahl an eosinophilen Zellen im oberen und unteren Ast des Gyrus dentatus ist in der SHT/Prop BS30-40 %-Gruppe festzustellen.

Im linken Gyrus dentatus aller drei SHT-Gruppen und in der Scheinversuchsgruppe, SHAM/Halo, können keine eosinophilen Zellen detektiert werden.

Zusätzlich wird in der HE-Färbung für jedes Tier der jeweiligen SHT-Gruppe die Gesamtanzahl an eosinophilen Zellen in der Hippokampusformation (CA1-, CA3-, CA4-Region und Gyrus dentatus) errechnet. Die Summenwerte der eosinophilen Zellen in der Hippokampusformation sind für alle Tiere, getrennt nach den SHT-Gruppen, in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 17: Gesamtanzahl der eosinophilen Zellen in der Hippokampusformation in den drei SHT-Gruppen

	SHT/ Prop BS1-5 % (n = 10)	SHT/ Prop BS 30-40 % (n = 9)	SHT/ Halo (n = 10)
Hippokampus Summe	648	372	162
	581	715	485
	429	356	1115
	244	752	679
	363	470	286
	913	509	840
	564	480	977
	390	621	804
	1559	682	819
	734		1145
	Gesamtergebnis MW±SD	643 ± 377	551 ± 147

Gesamtanzahl (Summe) der eosinophilen Zellen im Bereich der gesamten Hippokampusformation der rechten Gehirnhemisphäre aller Tiere der drei SHT-Gruppen (SHT/Prop BS1-5 %, SHT/Prop BS30-40 % und SHT/Halo) in der Hämatoxylin Eosin- (HE-) Färbung ebenso wie der Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (±SD) vom Gesamtergebnis der jeweiligen SHT-Gruppe.

Im Vergleich der drei SHT-Gruppen ist eine Tendenz dahingehend zu erkennen, dass die SHT/Halo-Gruppe im Bereich der Hippokampusformation (CA1, CA3, CA4 und GD) die höchste Anzahl an eosinophilen Zellen aufweist. Die tendenziell geringste Gesamtzahl an eosinophilen Zellen ist in der SHT/Prop BS30-40 %-Gruppe zu erkennen.

Über alle Gruppen betrachtet wird eine Korrelation nach Spearman zwischen dem Läsionsvolumen und der Anzahl eosinophiler Zellen (MW) bzw. dem Läsionsvolumen und der Gesamtanzahl eosinophiler Zellen (Summe) durchgeführt. Dabei zeigen sich folgende Ergebnisse (siehe Tabelle 18).

Tabelle 18: Korrelation nach Spearman zwischen dem Läsionsvolumen der Gehirne (mm^3) und der Anzahl eosinophiler Zellen (MW) bzw. zwischen Läsionsvolumen der Gehirne (mm^3) und Gesamtanzahl eosinophiler Zellen (Summe) der drei SHT-Gruppen

	Läsionsvolumen vs. Anzahl eosinophiler Zellen (MW)	Läsionsvolumen vs. Gesamtanzahl eosinophiler Zellen (Summe)
Korrelation nach Spearman	0,502(*)	0,581(**)
Signifikanz (2-seitig)	0,015	0,004
N	23	23

* Die Korrelation ist auf dem 0,05 Niveau signifikant (zweiseitig).

** Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).

Die Korrelation zwischen Läsionsvolumen und Anzahl eosinophiler Zellen (MW) ist zweiseitig auf dem Niveau 0,05 signifikant. Die Korrelation zwischen Läsionsvolumen und Gesamtanzahl eosinophiler Zellen (Summe) stellt sich auf dem Niveau 0,01 zweiseitig signifikant dar.

Eine Grafik über die Verteilung der Korrelation findet sich unter Abb. 27.

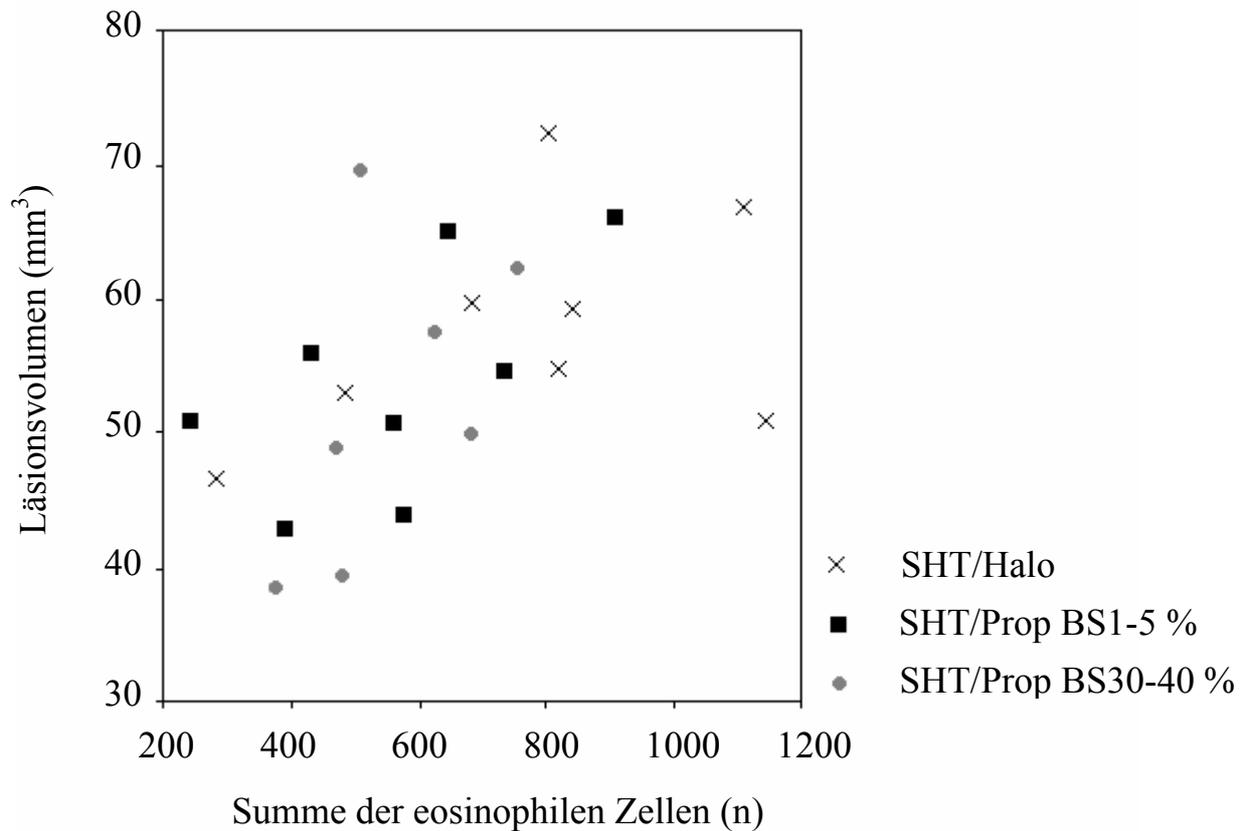


Abbildung 27: Grafische Darstellung der Korrelation zwischen dem Läsionsvolumen der Gehirne (mm³) der Tiere der drei SHT Gruppen (SHT/Prop BS1-5 % (n = 8), SHT/Prop BS30-40 % (n = 7) und SHT/Halo (n = 8)) in der Hämatoxylin Eosin-Färbung und der Gesamtanzahl eosinophiler Zellen (Summe) im Hippokampus.

Durch die Korrelation kann gezeigt werden, dass ein signifikanter gleichsinniger linearer Zusammenhang von Läsionsvolumen in der HE-Färbung und der Gesamtanzahl eosinophiler Zellen im Hippokampus besteht.

3.3.3.3 Doppelfärbung von aktivierter Caspase-3 und NeuN

Um festzustellen ob Apoptose bereits sechs Stunden nach CCI im Kortex und Hippokampus detektierbar ist, werden von jeder SHT-Gruppe jeweils zwei Tiere einer Doppelfärbung gegen aktivierte Caspase-3 und NeuN unterzogen. Sechs Stunden nach CCI ist die Expression von akt. Caspase-3 in Neuronen in allen SHT-Gruppen im ipsilateralen Hippokampus nachweisbar. Aufgrund der geringen Anzahl an akt. Caspase-3 und NeuN positiver Zellen in allen drei SHT-Gruppen erfolgt keine zählerische Auswertung der Hippokampusformation sondern lediglich eine deskriptive Beschreibung. Im gesamten Kortex sind sechs Stunden nach CCI keine doppelgefärbten Zellen zu sehen. Beispielhafte Darstellungen von Zellen der Hippokampusformation die sowohl NeuN in der Farbe rot als auch akt. Caspase-3 in brauner Farbe zeigen finden sich in Abb. 28 bis 31.



Abbildung 28: (Vergr.: 400 x) SHT/Halo: akt. Casp-3/NeuN, rechte CA1-Region 6 h post Trauma, Caspase positive Neuronen sichtbar (s. Pfeile).

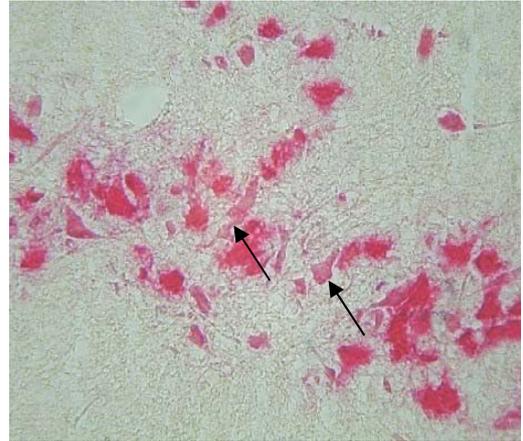


Abbildung 29: (Vergr.: 400 x) SHT/Prop BS30-40 %: akt. Casp-3/NeuN, rechte CA4-Region 6 h post Trauma, Caspase positive Neuronen sichtbar (s. Pfeile).



Abbildung 30: (Vergr.: 400 x) SHT/Prop BS1-5 %: akt. Casp-3/NeuN, rechter Gyrus dentatus 6 h post Trauma, Caspase positive Neuronen sichtbar (s. Pfeile).

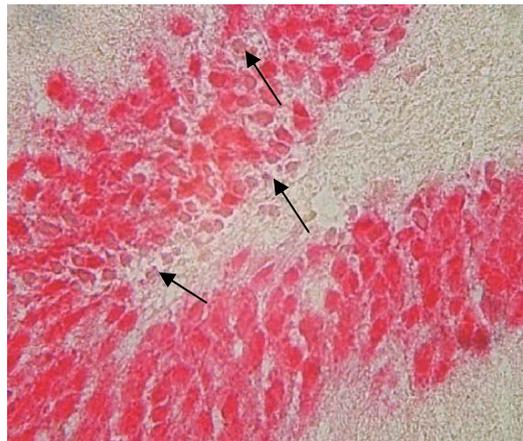


Abbildung 31: (Ausschnitt von Abb. 28) SHT/Prop BS1-5 %: akt. Casp-3/NeuN, rechter Gyrus dentatus 6 h post Trauma, Caspase positive Neuronen sichtbar (s. Pfeile).

3.3.3.4 Tiere mit kortikalen Einblutungen

Jede der drei SHT-Gruppen weist eine unterschiedliche Anzahl an Tieren auf, die aufgrund schwerwiegender Einblutungen in den Kortex und in subkortikale Strukturen nicht einer Läsionsvolumenbestimmung unterzogen werden können. Bei diesen Tieren wird eine rein deskriptive Beschreibung der Einblutung vorgenommen. Pro Tier werden zehn Gehirnschnitte mit HE-gefärbt und unter dem Lichtmikroskop begutachtet. Mit Hilfe der mikroskopischen Betrachtung wird die Schnittebene gesucht in der die Einblutung erstmals sichtbar ist. In den folgenden konsekutiven Schnitten (zunehmender Abstand vom definierten Nullpunkt) werden Lokalisation und Ausdehnung der Einblutung in das traumatisch geschädigte Gehirnareal der rechten Hemisphäre und der ungeschädigten linken Gehirnhälfte bestimmt und dokumentiert. In der Häufigkeitsverteilung weisen die drei SHT-Gruppen eine unterschiedliche Anzahl von Tieren mit Einblutungen auf. So kommen in der SHT/Prop BS1-5 % und in der SHT/Halo-Gruppe zwei Tiere mit gravierender Einblutung vor, wohingegen in der SHT/Prop BS30-40 %-Gruppe drei solcher Tiere zu finden sind. Bereits in der makroskopischen Betrachtung des ganzen Gehirns kann man die unterschiedliche Stärke der Einblutung erkennen. Beispiele von Gehirnen mit starker Einblutung finden sich in Abb. 32 und 33. Beispiele mit moderater bis schwacher Einblutung von Gehirnen finden sich in Abb. 34 und 35.



Abbildung 32: Beispiel eines Gehirns mit starker Einblutung aus der Gruppe SHT/Prop BS1-5 %: Aufsicht auf das entnommene Rattengehirn mit umschriebenem traumatisierten Areal auf dem rechten Parietal-/Temporallappen.

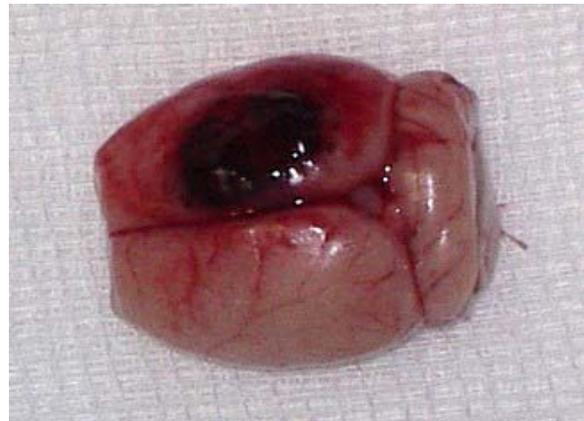


Abbildung 33: zweites Beispiel eines Gehirns aus der Gruppe SHT/Prop BS1-5 % mit starker Einblutung: Aufsicht auf das entnommene Rattengehirn mit umschriebenem traumatisierten Areal auf dem rechten Parietal-/Temporallappen.

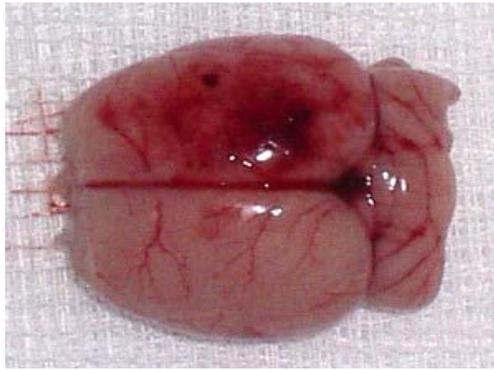


Abbildung 34: Beispiel eines Gehirns mit diffuser moderater Einblutung aus der SHT/Prop BS30-40 %-Gruppe: Aufsicht auf das entnommene Rattengehirn mit umschriebenem traumatisiertem Areal auf dem rechten Parietal-/Temporallappen.

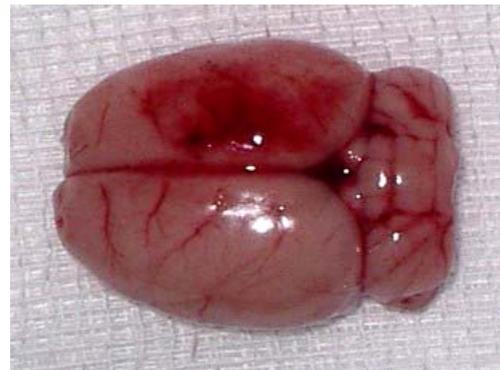


Abbildung 35: Gehirn aus der Gruppe SHT/Halo mit diffuser schwacher Einblutung des Gehirns: Aufsicht auf das entnommene Rattengehirn mit umschriebenem traumatisiertem Areal auf dem rechten Parietal-/Temporallappen.

Mikroskopisch lässt sich in allen drei SHT-Gruppen ein einheitliches Schema der Einblutung erkennen:

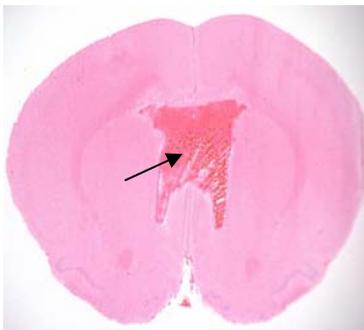


Abbildung 36: Beispielhafte Darstellung eines HE-gefärbten Hirngewebeschnittes aus der Gruppe SHT/Prop BS1-5 %: eingebluteter dritter Ventrikel 6 h post Trauma im Abstand von 1000 µm vom definierten Nullpunkt (s. Pfeil).

Im Abstand von 1000 µm zum festgelegten Nullpunkt (s. Kapitel 3.2.9.3 Schneiden des Gehirns) sind Einblutungen in den dritten Ventrikel (*Ventrikel tertius*) fest zu stellen. Dabei kann der dritte Ventrikel dilatiert oder komplett rupturiert sein.

Ab einer Entfernung von 2000 µm vom festgelegten Nullpunkt sind erste Auflockerungen in der rechten Gehirnhälfte im Korpus kallosum zu erkennen. Dieser Gewebsverlust besteht vor allem oberhalb des rechten Seitenventrikels, breitet sich jedoch im weiteren Verlauf sowohl seitwärts als auch nach rechts unten aus.

Ab 3000 μm kommen auch in der linken Gehirnhemisphäre Auflockerungen im Korpus kallosum vor, die sich im weiteren Verlauf über den gesamten linken Hippokampus und Seitenventrikel ausbreiten.

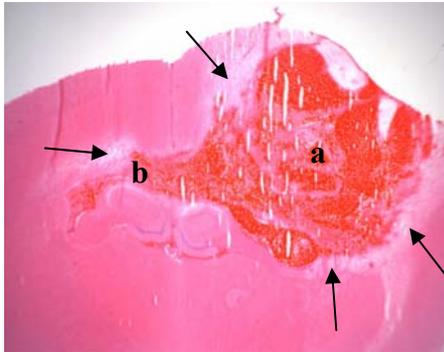


Abbildung 37: Beispielhafte Darstellung eines HE-gefärbten Gehirns eines Tiers der Gruppe SHT/Prop BS30-40 %: massive Einblutung in den rechten Kortex 6 h post Trauma im Abstand von 5000 μm vom definierten Nullpunkt, aufgelockertes Gewebe drumherum gut sichtbar (s. Pfeile).

Ab der 4000 μm Schnittebene werden Einblutungen in den rechten Kortex (**a**) sichtbar. Sie nehmen in den nachfolgenden Schnittebenen fast den gesamten Kortex der rechten Gehirnhälfte ein.

Die Einblutung ist oftmals von aufgelockertem Gewebe (s. Pfeile) umgeben. Teilweise breitet sich die Blutung auch über die Mediane hinaus in die linke Gehirnhemisphäre (**b**) aus.

Einblutungen in die Seitenventrikel können ebenfalls vorkommen.

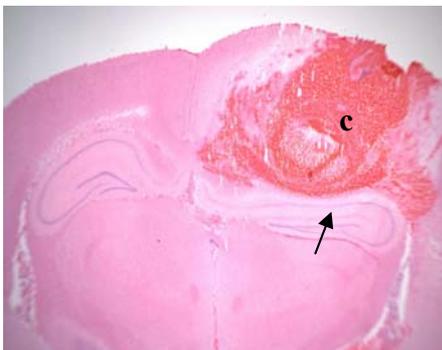


Abbildung 38: Beispielhafte Darstellung eines HE-gefärbten Gehirns aus der Gruppe SHT/Prop BS1-5 % mit „gestauchtem“ Hippokampus (s. Pfeil) 6 h post Trauma im Abstand von 7000 μm vom definierten Nullpunkt.

Die massiven Einblutungen (**c**) führen im weiteren Verlauf oftmals zu einer „Stauchung“ der Hippokampusformation (s. Pfeil) der rechten Gehirnhälfte, erkennbar in den Schnittebenen von 5000-9000 μm .

Mit zunehmender Entfernung vom definierten Nullpunkt nimmt die Einblutung in der rechten Gehirnhemisphäre ab und verschwindet vollständig in der linken Gehirnhälfte.

Nach Betrachtung der in Abb. 32 bis 38 dargestellten Beispiele von massiven Einblutungen in das Gehirn wird deutlich, dass eine Läsionsvolumenbestimmung des induzierten CCI zum Teil nicht möglich war.

4. Diskussion

Die Anästhesie und die Intensivmedizin sind immer in die präklinische, frühklinische, operative und postoperative Behandlung von Patienten mit einem SHT involviert. Neben dem primären irreversiblen Hirnsubstanzdefekt bestimmen die durch das Trauma induzierten pathophysiologischen Prozesse den sekundären Hirnschaden und damit das Ausmaß der endgültigen Hirnschädigung. Es ist erwiesen, dass post-traumatische sekundäre biochemische Prozesse für Tage und Wochen nach einem SHT anhalten und immer neue Zellen für den Zelltod rekrutieren. So konnten sterbende Zellen auf der geschädigten Gehirnseite bis zu einem Jahr post Trauma gefunden werden (WENNERSTEN et al. 2003). Ursprünglich wurden die vom sekundären post-traumatischen Zelluntergang betroffenen Zellen vollständig dem nekrotischen Zelltod zugeordnet. Jedoch wurde in den letzten Jahren auch für die Apoptose eine Schlüsselrolle im Zelluntergang nach CCI nachgewiesen. Kenntnisse über den apoptotischen Zelluntergang (KERR et al. 1972) stellen eine Option dar, das therapeutische Fenster nach einem SHT zu erweitern. Hieraus ergibt sich die Notwendigkeit eines hirnschützenden Therapiekonzepts in der Phase der Erstbehandlung.

Ziel der vorliegenden Studie ist es, anhand eines experimentell induzierten SHT bei der Ratte ein mögliches neuroprotektives Potential für das Anästhetikum Propofol, das in zwei unterschiedlichen Dosierungen zum Einsatz kommt, nachzuweisen. Hierzu wurden zwei histologische Standardfärbungen (Kresylviolett und Hämatoxylin Eosin) und eine immunhistochemische Nachweismethode (Doppelfärbung von akt. Caspase-3 und NeuN) angewandt.

Sowohl in der KV- wie auch in der HE-Färbung wurde eine Läsionsvolumenbestimmung durchgeführt. Des Weiteren erfasste man in der HE-Färbung die Anzahl der eosinophilen Zellen in der Hippokampusformation. Zusätzlich wurde die Aktivierung von Caspase-3, einem Apoptose-spezifischen Protein, in Neuronen untersucht. Schließlich konnte man die Ergebnisse der drei SHT-Gruppen und der Scheinversuchsgruppe miteinander vergleichen.

Durch die Scheinversuchsgruppe, SHAM/Halo, konnte man den Einfluss von dem Anästhetikum Halothan auf den histopathologischen Schaden von dem traumabedingten Schaden abgrenzen.

4.1 Diskussion der Methoden

4.1.1 Schädel-Hirn-Trauma-Modell

Da sowohl Ausprägung als auch Ursache eines SHT in der Humanmedizin vielfältig sind, ist es für vergleichende klinische Studien ungeeignet. Aus diesem Grund ist es unumgänglich, mit reproduzierbaren und kontrollierten In-vivo-Tiermodellen zu arbeiten. Weiterhin sind für eine vollständige histopathologische, biochemische und physiologische Untersuchung invasive Verfahren und der direkte Zugang zum Hirngewebe nötig. Ein weiterer Vorteil des Tiermodells ist die Steuerbarkeit des zeitlichen Verlaufs und die Überwachung und Kontrolle verschiedener Parameter vor, während und nach dem SHT.

In SHT-Modellen kommen die verschiedensten Tierarten zum Einsatz, jedoch werden in der heutigen Zeit hauptsächlich Nagetiere verwendet. Die Verwendung von Ratten in SHT-Modellen hat verschiedene Vorteile (DIXON et al. 1987):

- exakte Daten über Alter, Gewicht und die genetische Herkunft der Tiere sind bekannt
- hohe Resistenz gegenüber Infektionen
- geringere Kosten aufgrund eines sinkenden Arzneimittelverbrauchs wegen des niedrigen Körpergewichts der Tiere
- niedrige Anschaffungs- und Unterhaltskosten
- vergleichbare Anatomie und Physiologie zu höheren Säugetieren
- Vereinbarkeit mit einer Vielzahl von neurochemischen und neuropharmakologischen Techniken, über die eine große Erfahrung im Vergleich zu anderen Tierspezies besteht
- Existenz von Normwerten in einer Vielzahl von physiologischen und verhaltensorientierten Variablen

Für die vorliegende Studie wurde das Controlled-cortical-impact- (CCI-) Modell ausgewählt. Das CCI wurde lateral über der rechten Gehirnhemisphäre ausgeübt. Die exakte Positionierung des Tierschädels im stereotaktischen Rahmen, die präzise Einstellung der Deformationstiefe des Gehirns, die Überwachung der Schlagbolzengeschwindigkeit und die Einhaltung identischer Kontaktzeiten des Bolzen mit dem Gehirn gewährleisten die Erhebung von standardisierten Daten mit geringer Streuung.

Dennoch beschert auch das CCI-Modell Variationsmöglichkeiten, die eine Objektivierbarkeit der Daten erschweren können. Hierunter fallen:

- Einschlagwinkel des Schlagbolzens
- Größe und Lokalisation der Kraniotomie
- Aufsetzen des Bolzens auf der Gehirnoberfläche
- verwendetes Narkoseprotokoll

Die Variationsmöglichkeiten stellen einerseits potentielle Quellen für eine unzureichende Standardisierung dar, andererseits ermöglichen sie die Bearbeitung verschiedener Fragestellungen aufgrund unterschiedlicher Einstellungsparameter. Um zum einen Schwankungen so gering wie möglich zu halten und zum anderen eine exakte Datenerhebung zu gewährleisten, wurde der operative Versuchsabschnitt stets von derselben geblinden Person mit großer Sorgfältigkeit durchgeführt.

Für eine größtmögliche Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurden vor Studienbeginn die Tischposition und der Einschlagwinkel des Bolzens manifestiert.

Weiterhin wurden zur Gewährleistung einer identischen Traumastärke vor jeder SHT-Induktion die computergesteuerten Schussparameter überprüft: 1,75 mm Eindringtiefe, 4 bis 5 m/s Einschlaggeschwindigkeit und 200 ms Eindringdauer. Ein weites Spektrum pathobiologischer Reaktionen kann durch die variierbare und voneinander unabhängige Einstellung von Einschlaggeschwindigkeit und Einschlagtiefe des CCI erhalten werden (LIGHTHALL 1988).

Da im CCI-Modell der mechanische Einschlag quantifizierbar und stufenweise variierbar ist, können Korrelationen zwischen der Traumastärke und den daraus resultierenden pathologischen und funktionalen Veränderungen gemacht werden. Diese analytischen Untersuchungen lassen Interaktionen zwischen dem mechanischen Einschlag und der traumatischen Schädigung erkennen.

Im Vergleich zu den im Schriftum unter Kapitel 2.2.1 beschriebenen Traumamodellen stellt das CCI-Modell durch dessen Aufbau eine technisch aufwendige Methode dar, die jedoch gut zu bedienen ist und mit wenig Aufwand reproduzierbare Daten liefert.

4.1.2 Läsionsvolumenbestimmung anhand der Kresylviolett- (KV-) Färbung

Mit Hilfe der KV-Färbung können Nervenkerne und Tigroidschollen (Nissl-Schollen) in den Nervenzellen dargestellt werden. Das Substrat der Färbung sind Ribonukleoproteine. In der Färbung stellen sich Tigroidschollen, Kernmembranen und Nukleolen intensiv blau oder violett dar. Das Zytoplasma der Ganglienzellen und Gliazellen färbt sich blassblau, Zellfortsätze bleiben ungefärbt (ROMEIS 1989).

Bei der KV-Färbung handelt es sich um eine unkomplizierte und schnell durchführbare histologische Färbetechnik (Dauer ca. 1 h pro Rattengehirn).

Obwohl die KV-Färbung traditionell zur Läsionsbestimmung in der Histologie herangezogen wird, besitzt diese Färbemethode auch Nachteile. Als ungünstig bewerten JONGEN-RELO und FELDON (2002) die Tatsache, dass die KV-Färbung zwar große Neuronen mit reichlich vorhandenen Ribosomen gut hervorhebt, jedoch kleinere Neuronen wie beispielsweise kortikale Interneuronen oder die Körnerzellen im Gyrus dentatus sehr schwer von den ebenfalls gefärbten Gliazellen zu unterscheiden sind. Nach den initial durch Gliazellen eingeleiteten Aufräumungs- und Reparaturarbeiten kommt es im weiteren Zeitverlauf (einige Wochen bis Monate) zur Reorganisation. In diesem Zusammenhang kommt es zur Schrumpfung des Läsionsbereichs oder zur Besetzung der freien Stellen durch Gliazellen. JONGEN-RELO und FELDON (2002) machen darauf aufmerksam, dass diese kompensatorischen Maßnahmen die Ergebnisse der Läsionsbestimmung verfälschen. Auch im Ischämiemodell konnte dieser Pathomechanismus beobachtet werden. So konnte hier nach 15 Tagen eine Einwanderung von Fibroblasten-ähnlichen Zellen beobachtet werden, die ein narbiges Ersatzgewebe in der Peripherie des Infarktkerns bildeten und so zu einer Schrumpfung des Infarktgebietes führten (CLARK et al. 1994).

Aus diesem Grund ist der Untersuchungszeitpunkt der Läsionsvolumenbestimmung von entscheidender Bedeutung für das Ergebnis. JONGEN-RELO und FELDON (2002) vertreten die Ansicht, dass die Läsionsvolumenbestimmung innerhalb der ersten Woche nach Traumasetzung durchgeführt werden soll, da hier aufgrund der aktiven Proliferation von Gliazellen der Läsionsbereich in der KV-Färbung eindeutig abgegrenzt werden kann. Für DAVOLI et al. (2002) ist bei Bestimmung des ischämischen Infarktvolumens in KV gefärbten Schnitten der beste Untersuchungszeitpunkt schon 24 Stunden nach Schädigung erreicht.

Auch im CCI-Modell wurde die KV-Färbung in verschiedenen Studien als Standardfärbung zur Bestimmung des Läsionsvolumens eingesetzt (CLARK et al. 1997; SULLIVAN et al. 2002; CHEN et al. 2003). Im Gegensatz zu der vorliegenden Studie wurde jedoch in den

anderen Studien die Läsionsvolumenbestimmung erst nach einer längeren Überlebenszeit vorgenommen.

In den eigenen Untersuchungen erwies sich der frühe Untersuchungszeitpunkt (sechs Stunden nach CCI) möglicherweise als nachteilig für die Läsionsvolumenbestimmung in KV gefärbten Schnitten. Sechs Stunden nach CCI konnte eine partielle Schwächung der Färbeintensität beobachtet werden. CHEN et al. (2003) assoziieren einen qualitativen Verlust der Färbeintensität in der KV-Färbung mit verletzten oder sterbenden Neuronen. Andere Kriterien, die zur optischen Demarkierung des Schadens hätten beitragen können, wie beispielsweise eine Akkumulation von Gliazellen oder die Ausbildung einer Kavität, waren sechs Stunden nach moderatem CCI in der vorliegenden Studie noch nicht vorhanden. Diese Erkenntnisse werden auch von anderen Autoren bestätigt. So konnten CHEN et al. (2003) in den ersten 24 Stunden nach CCI ebenfalls nur eine Reduktion in der Färbeintensität speziell im Kortextbereich beobachten. Erst ab Tag vier bemerkten sie um den Kontusionsbereich herum eine Zunahme von Leukozyten und Gliazellen und einen extensiven Verlust an vermutlich neuronalen Zellen.

Die zeitabhängigen Schwierigkeiten in der Läsionsbestimmung von KV gefärbten Schnitten sind auch von JONGEN-RELO und FELDON (2002) dokumentiert.

In der eigenen Studie wurde das Läsionsvolumen sowohl in der KV-Färbung wie auch in der HE-Färbung bestimmt. Es stellte sich heraus, dass die Läsionsvolumenbestimmung in der HE-Färbung sechs Stunden nach moderatem CCI zu größeren Läsionsvolumina mit geringeren Standardabweichungen führte als in der KV-Färbung. Die geringere Streuung der errechneten Läsionsvolumina deutet auf eine größere Standardisierung und Objektivierbarkeit der ermittelten Werte hin.

Die folgenden zwei Abbildungen (Abb. 39 und 40) sollen die Schwierigkeiten bei der Bestimmung des Läsionsvolumens in der KV-Färbung in Zusammenhang mit der Wahl des Untersuchungszeitpunktes nochmals verdeutlichen.

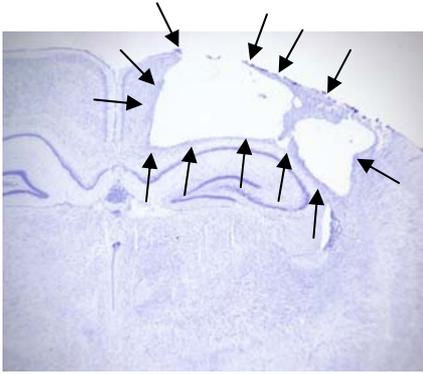


Abbildung 39 (stammt aus eigenem Vorversuch):
 (Vergr.: 25 x): KV-Färbung:
 rechte Hemisphäre 14 d post
 Trauma.

*Evtl. zu spät: Gliazellnarbe,
 totaler Gewebsverlust
 sichtbar (s. Pfeile).*

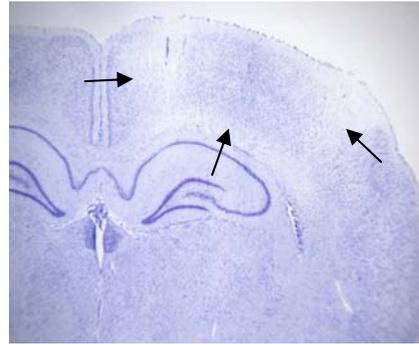


Abbildung 40:

(Vergr.: 40 x): KV-Färbung:
 rechte Hemisphäre 6 h post
 Trauma.

*Evtl zu früh: zu geringer
 Schaden, noch nicht voll
 ausgeprägt (s. Pfeile).*

4.1.3 Hämatoxylin Eosin- (HE-) Färbung

Die HE-Färbung wird in der Histologie und Histopathologie als Standardfärbung eingesetzt. Sie ist preiswert, schnell (Dauer ca.1,5 Stunden pro Gehirn) und einfach durchzuführen. Die HE-Färbung setzt sich aus zwei unterschiedlichen Farbstoffkomponenten zusammen. Dies ist zum einen der natürliche Pflanzenfarbstoff Hämatoxylin. Hämatoxylin gehört zu den Kernfärbungen und färbt Zellkerne und Zytoplasmaanteile, die reich an rauem endoplasmatischen Retikulum sind, blau-violett (WELSCH 2003). Die zweite Farbstoffkomponente ist das Eosin, das für die rote bis pinke Anfärbung azidophiler Strukturen im Zytoplasma verantwortlich ist.

Wenn neuronale Zellen aufgrund eines Neurotraumas unter Energiemangel leiden, stellen sie ihren Stoffwechsel auf anaerobe Glykolyse um. Das hierdurch anfallende Laktat bewirkt eine pH-Wert-Verschiebung in den sauren Bereich. Diese sauren Valenzen lassen sich durch das Eosin der HE-Färbung anfärben. Die HE-Färbung alleine kann jedoch keine Aussage darüber treffen, ob eine Zelle nekrotisch oder apoptotisch zugrunde geht.

SLOOP et al. (1999) gehen davon aus, dass morphologische Kriterien (s. Kapitel 2.2.2 Nekrose und Apoptose) in Routinefärbungen den Goldstandard für die Detektion des apoptotischen Zelluntergangs darstellen.

Eine eindeutige Differenzierung zwischen Nekrose und Apoptose erfolgt mit Hilfe der Elektronenmikroskopie (WYLLIE et al. 1980).

Um bereits in der lichtmikroskopischen Betrachtung mehr oder weniger eindeutig zwischen Nekrose und Apoptose differenzieren zu können, sind spezifische Nachweisverfahren notwendig, wie beispielsweise die Doppelfärbung von aktivierter Caspase-3 und NeuN. Leider gibt es bis zum heutigen Tag noch kein einziges eindeutiges Nachweisverfahren.

4.1.4 Doppelfärbung von aktivierter Caspase-3 und NeuN

Die Doppelfärbung ist relativ aufwendig in der Durchführung (Dauer ca. neun Stunden) und für die lichtmikroskopische Auswertung der gefärbten Schnitte benötigt man eine gewisse Erfahrung.

Die immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen akt. Caspase-3 erlaubt eine selektive Detektion apoptotischer Zellen, in denen das Protein Caspase-3 exprimiert und aktiviert ist. Da die Aktivierung der Caspase-3 in der apoptotischen Kaskade relativ spät erfolgt, ist der Nachweis der akt. Caspase-3 mit großer Wahrscheinlichkeit ein Indiz dafür, dass der Prozess des apoptotischen Zelluntergangs verhältnismäßig weit fortgeschritten ist. In der vorliegenden Studie wurde ein monoklonaler Antikörper gegen die p18-Untereinheit akt. Caspase-3 angewandt (SRINIVASAN et al. 1998).

Dass akt. Caspase-3 nicht ausschließlich in Neuronen exprimiert wird, ist mittlerweile bekannt. So wurde akt. Caspase-3 auch in Astrozyten und Oligodendrozyten lokalisiert (BEER et al. 2000). Um die Art der apoptotischen Zellen genauer zu analysieren, wurde erfolgreich eine Doppelfärbung etabliert (DAVOLI et al. 2002). Bei der Durchführung der Doppelfärbung wird nach der Anfärbung akt. Caspase-3 ein Antikörper gegen das Neuronen spezifische nukleäre Protein (NeuN) aufgetragen. Dabei handelt sich um einen monoklonalen Antikörper, der von MULLEN et al. (1992) entwickelt wurde. NeuN gilt als spezifischer Marker für Neuronen sowohl des zentralen wie auch des peripheren Nervensystems. NeuN wird im Zellkern und -körper postmitotischer Neuronen exprimiert, die dabei sind, sich zellulär und morphologisch zu differenzieren (MULLEN et al. 1992).

Die in der vorliegenden Studie gewählte Antigen-Nachweismethode, die Labeled-Avidin-Biotin/Labeled-Streptavidin-Avidin-Biotin-Nachweismethode (LAB/LSAB) wird als sog. indirekte „Sandwichmethode“ bezeichnet. Bei der indirekten Methode ist nicht der spezifische Primär-Antikörper gegen aktivierte Caspase-3 mit dem später farbgebenden Enzymsystem gekoppelt, sondern ein sekundärer, mit Biotin konjugierter Brücken-Antikörper, der sich spezifisch gegen die Tierart richtet, aus der der erste Antikörper stammt. Der Einsatz von LSAB-Systemen gilt derzeit als eine der spezifischsten und durch seine einfache Handhabung am meisten bevorzugten Methoden. Anderen zurzeit gängigen immunhistochemischen Nachweistechiken ist die LSAB-Methode eindeutig überlegen (HSU et al. 1981; NOLL u. SCHAUB-KUHNNEN 2000).

In der vorliegenden Studie wurden der Kortexbereich und die besonders empfindlichen, selektiv vulnerablen Neuronen des Hippokampus auf Apoptose untersucht. Man fand nur einen geringen Anteil doppelgefärbter positiver Neuronen im Vergleich zur Gesamtzellzahl. Eine mögliche Erklärung hierfür kann der frühe Untersuchungszeitpunkt sechs Stunden nach SHT sein. Ein derart kurzer Zeitraum schränkt Analysen über den zeitlichen Ablauf apoptotischer Vorgänge ein. Zwar konnte im Ischämiemodell akt. Caspase-3 im Kortex bereits nach fünf Minuten nachgewiesen werden (NAMURA et al. 1998), jedoch ist die Apoptose als andauernder dynamischer Prozess auch noch vier Wochen nach zerebraler Schädigung gut nachweisbar (CHOPP u. LI 1996; VELIER et al. 1999).

Im CCI-Modell wurde der Nachweis erbracht, dass der apoptotische Zelluntergang einen Tag nach CCI im Kortex sein Maximum erreicht (NEWCOMB et al. 1999). Für den nekrotischen Zelltod wird ein geringfügig längerer Zeitraum angegeben (DUNN-MEYNELL u. LEVIN 1997).

Eine weitere Begründung für den geringen Prozentsatz apoptotischer Zellen in der Studie ist im verwendeten Tiermodell zu suchen. Eine quantitative Analyse von TUNEL-positiven Zellen ergab, dass nach einem milden lateralen *Fluid-percussion* (FP) 30 % der TUNEL-positiven Zellen apoptotische Merkmale aufwiesen, nach einem moderaten lateralen FP jedoch nur noch 10 % apoptotische Zellen detektiert wurden (RINK et al. 1995). Einige Autoren folgern hieraus, dass niedrigere Traumastärken ein höheres Maß an Apoptose auslösen (RINK et al. 1995; CHOI 1996). Sie nehmen an, dass die Traumastärke die entscheidende Determinante dafür ist, ob eine Zelle nekrotisch oder apoptotisch zugrunde geht. Folglich beeinflussen die biomechanischen Eigenschaften der unterschiedlichen Traumamodelle sowohl die Frequenz wie auch die regionale Verteilung apoptotischer Zellen (NEWCOMB et al. 1999). Weiterführende Untersuchungen könnten sich auf das Ausmaß und das temporale Profil der Nekrose und Apoptose bei unterschiedlichen Traumastärken fokussieren.

Ein weiterer Grund für die geringe Auffindungsrate doppelmarkierter Zellen kann die Funktionalität der Antikörper betreffen. Die Funktionalität der Antikörper wurde jedoch in jedem Färbedurchgang durch das Mitführen einer Positivkontrolle (Thymus) und Negativkontrolle (Nativtier) überprüft (s. Kapitel 4.2.4).

Die Markierung der akt. Caspase-3 stellt eine Alternative zur mittlerweile kontrovers diskutierten TUNEL-Färbung dar, die fragmentierte DNA detektiert (GAVRIELI et al. 1992). Inzwischen wurde allerdings festgestellt, dass DNA-Strangbrüche auch beim nekrotischen Zelluntergang, bei Autolyse und bei der Gewebefixierung und -bearbeitung entstehen (GRASL-KRAUPP et al. 1995; ANSARI et al. 1996). Demzufolge kann die TUNEL-Färbung nicht akkurat zwischen nekrotischen und apoptotischen Zellen unterscheiden und ist somit kein spezifischer Marker für Apoptose (CHARRIAUT-MARLANGUE u. BEN-ARI 1995).

Im Vergleich zur Färbung mit Kresylviolett (s. Kapitel 4.2.2), die als spezifisches Verfahren zur Darstellung des rauen endoplasmatischen Retikulums von Neuronen, der sog. Nissl-Substanz gilt, können Läsionen in geschädigten Arealen mit Hilfe der NeuN-Färbung noch genauer hervorgehoben werden (JONGEN-RELO u. FELDON 2002).

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Physiologische Variablen

Während der operativen Phase und in der 6-stündigen Beatmungsphase werden zu acht genau definierten Messzeitpunkten verschiedene Parameter erhoben und dokumentiert. Vor Versuchsbeginn wird das Körpergewicht der Tiere aufgezeichnet. Während des eigentlichen Versuchs und in der Beatmungsphase bestimmt man den mittleren arteriellen Blutdruck, die Herzfrequenz, die arteriellen Blutgase, die Hämoglobinkonzentration, den Blutglukosespiegel und kontinuierlich die rektale und die perikranielle Temperatur. Diese umfangreichen Messungen sind notwendig, um etwaige Einflüsse auf das Ausmaß des zerebralen Schadens zu erkennen. Dadurch versucht man standardisierte Versuchsbedingungen zu schaffen, die eine Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse in der experimentellen Studie gewährleisten könnten.

Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP)

Aufgrund der Induktion des SHT steigt der MAP zunächst initial in allen drei SHT-Gruppen. Im weiteren Verlauf wird der MAP künstlich durch die Dauerinfusion des Kreislaufstabilisierenden Arterenols zwischen 80-100 mmHg gehalten. Alle gemessenen Werte liegen im physiologischen Bereich und haben keinen Einfluss auf die Versuchsergebnisse.

Herzfrequenz

Hinsichtlich der Herzfrequenz lassen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Versuchsgruppen erkennen. Die Herzfrequenz sinkt nach der Induktion des SHT tendenziell in beiden Propofolgruppen. Grund hierfür ist in der kreislaufdepressiven Wirkung des relativ hoch dosierten Propofols zu suchen (FREY u. LÖSCHER 1996). Jedoch bleiben im Verlauf des Versuchs alle gemessenen Werte im physiologischen Bereich. Eine Beeinflussung des Ergebnisses kann somit ausgeschlossen werden.

Hämoglobinkonzentration

Durch den ständigen Blutentzug für die Ermittlung des Hämoglobingehalts, die Blutgasanalyse, die Blut pH-Wert- und Glukose-Bestimmung ist ein Abfall in der Gesamthämoglobinkonzentration in Bezug auf den Ausgangswert in allen vier

Versuchsgruppen feststellbar. Allerdings ist der Hämoglobinverlust in den SHT-Gruppen stärker als in der SHAM-Gruppe, was auf die zerebrale Hämorrhagie zurückzuführen ist. Jedoch bleiben während der gesamten Versuchsdauer alle Werte im physiologischen Bereich und üben deshalb keinen Einfluss auf die Ergebnisse der Studie aus.

Blutgasanalyse (paO₂ und paCO₂ und pH)

Bei der Blutgasanalyse ist vor allem die Überwachung des paCO₂ von Bedeutung. Bekanntermaßen wird einer Hyperventilation mit konsekutiver Reduktion des paCO₂ eine neuroprotektive Wirkung zugesprochen. Demzufolge wird der paCO₂ während der gesamten Versuchsdauer kontinuierlich überwacht und über die Regulierung von Atemfrequenz und Atemvolumen im physiologischen Bereich gehalten.

Während des gesamten Versuchs lassen sich bei der Messung der paO₂-, paCO₂- und pH-Werte keine gravierende Unterschiede zwischen den vier Versuchsgruppen oder den gemessenen Zeitpunkten feststellen. Alle Werte liegen im physiologischen Bereich, so dass eine Einflussnahme auf das Versuchsergebnis ausschließen ist.

Blutglukose

Die Tiere werden vor dem Versuchsbeginn nicht nüchtern gesetzt. Die Messung der Glukosekonzentration ergibt einen signifikanten Abfall in allen SHT-Gruppen drei Stunden nach Induktion des Traumas. Nach vier bis sechs Stunden sinkt der Glukosewert signifikant in allen vier Versuchsgruppen im Vergleich zum Ausgangswert. Das Absinken der Glukosekonzentration erklärt sich durch die beginnende Glykolyse, die zum einen versuchsbedingt aufgrund der Nahrungskarrenz und zum anderen infolge des ansteigenden Energiebedarfs zur Wiederherstellung der Ionenhomöostase einsetzt. KOCHS et al. (1992) zeigten, dass die neuroprotektive Wirkung von Propofol unabhängig vom Plasma-Glukosespiegel ist. Da in der vorliegenden Studie alle gemessenen Glukosekonzentrationen im physiologischen Bereich liegen und in allen Gruppen gleichmäßig sinken, wird ihnen keine Bedeutung für das Ergebnis beigemessen.

Temperatur

Neben der rektalen Temperaturmessung wird auch die perikranielle Temperatur erfasst, da die beiden Parameter während eines ischämisch-hypoxischen Zustandes voneinander abweichen können (BUSTO et al. 1987). Die kontinuierliche Temperaturüberwachung ist wichtig, da bereits eine geringe Erniedrigung der perikraniellen Temperatur eine neuroprotektive

Wirkung auf das Gehirngewebe ausüben kann. Über einen Rückkopplungsmechanismus mit einer Wärmelampe wird die perikranielle Temperatur konstant auf 37,5 °C gehalten. Nicht nur die rektale sondern auch die perikranielle Temperatur der vier Versuchsgruppen liegt ohne Schwankungen im physiologischen Bereich. Ein Einfluss auf das Ergebnis des Versuchs kann ausgeschlossen werden.

Körpergewicht

Die Tiere der drei SHT-Gruppen und der Scheinversuchsgruppe, SHAM/Halo, zeigen bezüglich ihres Gewichts keine signifikanten Schwankungen, die zu einer Beeinflussung des Versuchs hätten führen können. Das Durchschnittsgewicht der Tiere beträgt 350-450 g.

4.2.2 Kresylviolett- (KV-) Färbung

Die KV-Färbung wird traditionell als Standardfärbung in der Histologie zur Evaluierung von Läsionsvolumen und Läsionsmorphologie eingesetzt (JONGEN-RELO u. FELDON 2002).

Sechs Stunden nach CCI war in der vorliegenden Studie bei mehreren Gehirnen bereits makroskopisch eine Blutung über dem parietalen Kortex sichtbar. Insgesamt mussten sieben Tiere aus allen drei SHT-Gruppen infolge schwerwiegender kortikaler Einblutungen von der Läsionsvolumenbestimmung ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse dieser Tiere bzw. das Ausmaß der Blutung sind im Kapitel 3.3.3.4 beschrieben.

In der lichtmikroskopischen Betrachtung wurde der Primärschaden im ipsilateralen Kortex deutlich. Diese Zone zeigte Anzeichen einer physikalischen Zerstörung und wies stellenweise keine gefärbten Neuronen mehr auf. In der sich anschließenden Penumbra waren noch viele schwach angefärbte Neuronen vorhanden. In diesem Bereich war auch die kortikale Schichtung meistens komplett erhalten. Außerhalb der Penumbra waren im ipsilateralen Kortex keine pathologischen Veränderungen erkennbar. Der kontralaterale Kortex erschien in der histologischen Untersuchung unauffällig. Auch innerhalb der SHAM-Gruppe war in beiden Hemisphären die kortikale Schichtung vollständig erhalten. Ein Verlust von Neuronen oder eine Schwächung der Färbeintensität konnte nicht ausgemacht werden. Es zeigte sich bei allen Tieren der SHAM-Gruppe eine durchweg homogene dunkel-violett-blaue Färbung beider Hemisphären.

Das spezielle Muster des CCI-Schadens, unilateral und zentriert um die Kontusion und den angrenzenden Strukturen stimmt generell mit den Arbeiten von CHEN et al. (2003) und DUNN-MEYNELL und LEVIN (1997) überein.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie ergaben nur tendenziell Unterschiede zwischen den Läsionsvolumina der drei SHT-Gruppen. Hierfür kommen verschiedene Ursachen in Betracht. Eventuell ist der Untersuchungszeitpunkt für die histologische Analyse, sechs Stunden nach CCI, zu früh gewählt, um ein neuroprotektives Potential von Propofol nachzuweisen.

Es gibt Hinweise, dass Propofol durchaus ein neuroprotektives Potential besitzt, diese Wirkung jedoch erst im weiteren Zeitverlauf zum Tragen kommt. So konnte in der eigenen Arbeitsgruppe in verschiedenen Studien anhand des Ischämie Modells die Neuroprotektivität von Propofol ab 24 Stunden bis zu 28 Tagen nach einem ischämischen Insult nachgewiesen werden (KELLERMANN 2004; STEGEMANN 2004).

Ein anderes Kriterium kann die KV-Färbung ansich sein. So ergaben sich bei der Bestimmung der Läsionsflächen in der KV-Färbung oftmals Schwierigkeiten bei der Abgrenzung zwischen geschädigtem und gesundem Gewebe. Auch die Anästhetikadosierungen der Propofolgruppen können möglicherweise für das Ergebnis verantwortlich sein. Es ist durchaus vorstellbar, dass sich erst bei größeren Differenzen in der Anästhetikadosierung zwischen den beiden Propofolgruppen Unterschiede in der Wirkung auf das Zielorgan (Gehirn) nachweisen lassen. In der vorliegenden Studie konnten keine Reaktionen hämatogener Zellen wie beispielsweise die Einwanderung von Granulozyten und Makrophagen beobachtet werden. Laut WERNER (2000b) kommt es jedoch bei einer ischämischen zerebralen Schädigung zu einer Aktivierung und Mobilisation zellulärer Mediatoren und Zellverbände. Frühzeitig kommt es zur Aktivierung polymorphkerniger Granulozyten. Diese lagern sich durch Adhäsionsmoleküle (Makrophage 1-Antigen) an Endothelzellen an und infiltrieren zusammen mit T-Zellen und Makrophagen das ischämische Gewebe. Innerhalb von Stunden und Tagen wird Mikroglia innerhalb der Infarktzone zu Makrophagen transformiert. Astrozyten steigern die Bildung intermediärer Mikrofilamente, synthetisieren Neutropine und bilden gliale Narben. FAWCETT und ASHER (1999) vertreten die Ansicht, dass Gliazellnarben die Wiederherstellung der axonalen Konnektion erschweren. Aus diesem Grund können die Gliazellnarben ein therapeutisches Ziel darstellen. Der Grund, warum in der vorliegenden Arbeit diese pathophysiologischen Reaktionen nicht beobachtet werden konnten, mag am frühen Untersuchungszeitpunkt sechs Stunden nach CCI liegen.

Da die histologischen Untersuchungen nur zu einem Zeitpunkt (6 h nach CCI) stattfanden, erlaubten sie keine Aussagen über die weitere Entwicklung der gesetzten Läsion. In vergleichenden Studien konnten DUNN-MEYNELL und LEVIN (1997) nachweisen, dass der

kortikale Primärschaden nach drei und 24 Stunden kleiner war, als die Kavität nach sieben Tagen. Auch andere Autoren, die das Läsionsvolumen nach unterschiedlich langen Überlebensspannen untersuchten, stellten eine Größenzunahme der Werte mit zunehmender Überlebenszeit fest (CHEN et al. 2003). Das deutet daraufhin, dass zahlreiche Zellen erst mit der Zeit degenerieren, was ein zeitlich günstiges therapeutisches Fenster für klinische Interventionen öffnet.

4.2.3 Hämatoxylin Eosin- (HE-) Färbung

Mit der HE-Färbung wurde der Gewebeschaden durch zwei unterschiedliche Auswertungsverfahren ermittelt. Zum einen wurde mit der HE-Färbung das Läsionsvolumen des Gehirns anhand der eosinophilen Zellgrenze im Kortex bestimmt. Zum anderen lieferte die HE-Färbung einen Überblick über die Ausdehnung und Schwere des Schadens in der selektiv vulnerablen Hippokampusformation.

Die HE-Färbung wird in verschiedenen CCI-Studien als Standardfärbung zur Bestimmung des Läsionsvolumen herangezogen (KOCHANNEK et al. 1995; CHERIAN et al. 1996). Es ergaben sich auch hier nur tendenzielle Unterschiede bei der Läsionsvolumenbestimmung zwischen den SHT-Gruppen (s. KV-Färbung 4.2.2). In der vorliegenden Studie waren schon sechs Stunden nach CCI im Kortex eosinophile Zellen in allen SHT-Gruppen deutlich zu erkennen. Sie legten sich wie ein Zellband um den Primärschaden, der durch die KV-Färbung ermittelt wurde. Der sich hieraus ergebende erweiterte Detektionsradius der HE-Färbung führte in allen drei SHT-Gruppen zu größeren Läsionsvolumina als in der KV-Färbung. Dieser erweiterte eosinophile Detektionsradius stellt den Sekundärschaden dar, der sich bereits sechs Stunden post traumatisch durch eine Abfolge pathologischer Prozesse entwickelt und als eindeutiges Abgrenzungskriterium zwischen geschädigtem und gesundem Areal herangezogen werden kann.

Innerhalb des demarkierten Areals wechselten sich zerstörte Gewebereiche mit Zonen schwacher Färbeintensität ab.

Im Gegensatz dazu wurde in anderen Studien die Läsionsvolumenbestimmung erst nach einer längeren Überlebenszeit vorgenommen und ist ein Grund für die nicht signifikanten Unterschiede der Läsionsvolumenwerte innerhalb der drei SHT-Gruppen. GARCIA et al. (1993) zeigten, dass die zytoplasmatische Eosinophilie frühestens zwölf, jedoch in maximaler Ausprägung erst 24 Stunden nach zerebraler Ischämie auftritt.

Obwohl das CCI eine umschriebene Kontusion im Rattenkortex verursachte, schädigte es auch kontusionsferne Bereiche, wie durch die HE-Färbung ermittelt werden konnte. Durch die Induktion des SHT kommt es in der Hippokampusformation zum Verlust pyramidaler Neuronen. ROSE et al. (2002) gehen davon aus, dass die CCI-Induktion zur Entstehung einer Druckwelle führt, die für die weiter distal gelegenen Verletzungen verantwortlich gemacht werden kann. Da bekannt ist, dass kortikale Neuronen in Richtung Hippokampus projizieren, schließen die Autoren hieraus, dass eine kortikale Schädigung die synaptische Aktivität im Hippokampus verändert und somit zu weiteren Zellschädigungen führt.

In der vorliegenden Studie konnte eine unilaterale fokale Schädigung der Neuronen im Hippokampus beobachtet werden. Die Zahl der eosinophilen Zellen in der CA1-, CA3-, CA4-Region der ipsilateralen Hippokampusformation und des oberen und unteren Astes des Gyrus dentatus als Parameter des sekundären azidophilen Hirnschadens zeigte einen Trend zur geringeren Schädigung in der Gruppe SHT/Prop BS30-40 % im Vergleich zu den Gruppen SHT/Prop BS1-5 % und SHT/Halo. Das Ergebnis lässt darauf schließen, dass die Tiere der SHT/Halo-Gruppe den größten azidophilen Zellschaden erfahren haben.

Die Vulnerabilität von Neuronen in der CA3-Region des Hippokampus ist in *traumatic-brain-injury*- (TBI-) Modellen bekannt (CORTEZ et al. 1989; DIETRICH et al. 1994b). Diese fokale Schädigung im Hippokampus wird auch von GOODMAN et al. (1994) beschrieben, die einen Zellverlust in der CA1- und CA3-Region des Hippokampus nach CCI und unilateraler Kraniotomie feststellten.

In der vorliegenden Studie war eine auf den ersten Blick untypisch erscheinende starke Schädigung innerhalb der SHT-Gruppen in der CA4-Region der Hippokampusformation zu sehen. Da die weiter proximal gelegene CA1-Region schwächer geschädigt ist als die darunter liegende CA4-Region, müssen neben der mechanischen Einwirkung auf das Gehirn noch zusätzliche Faktoren mit schädigen Einfluss hinzukommen.

Die lokale Ischämie kann als Hauptauslöser für das erhöhte Neuronensterben in der CA4-Region ausgeschlossen werden. Wie im Ischämie-Modell hätte man auch im SHT-Modell eine starke Schädigung der CA1-Region des Hippokampus erwarten können. Die CA1-Region ist selektiv vulnerabel gegenüber ischämischen Insulten (KELLERMANN 2004; STEGEMANN 2004). Sie bleibt jedoch weitgehend ungeschädigt trotz einer nachgewiesenen regionalen zerebralen Blutflussreduktion um 40 bis 60 % im ipsilateralen Hippokampus nach CCI (KOCHANNEK et al. 1995). Es ist erwiesen, dass der Schlaganfall beim Menschen und eine experimentell induzierte globale Ischämie bei Nagetieren einen substantiellen Verlust der Pyramidenzellen in der CA1-Region bewirkt (PULSINELLI et al. 1982). Diese Tatsachen deuten auf komplexe sekundäre Schädigungsmechanismen hin.

So sollen exzitatorische Aminosäuren (EAAs) eine entscheidende Bedeutung bei der Schädigung von Neuronen nach traumatic-brain-injury (TBI) haben. CHOI et al. (1987) beschreiben, dass exzessive Konzentrationen von EAAs, wie beispielsweise Glutamat, hoch toxisch in der Zellkultur sind. ROSE et al. (2002) unterstützen diese Hypothese, indem sie ansteigende interstitielle Konzentrationen von EAAs nach CCI im Kortex und Hippokampus beobachten konnten. Als Begründung für die erhöhten Werte von EAAs im Hippokampus geben sie die synaptische Konnektion von Kortex und Hippokampus an. BULLOCK et al. (1998) hingegen führen die erhöhten EAAs-Werte auf eine unspezifische Freisetzung von beschädigten Membranen zurück.

In der vorliegenden Studie konnte weiterhin ein signifikanter Unterschied der eosinophil geschädigten Zellen im oberen Ast des Gyrus dentatus (GD) zwischen der SHT/Halo-Gruppe und der SHT/Prop BS30-40 Gruppe festgestellt werden. CLARK et al. (1997) dokumentierten die höhere Vulnerabilität der Neuronen im Gyrus dentatus in TBI-Modellen im Vergleich zu Modellen der zerebralen Ischämie. Die funktionale Signifikanz des Neuronenverlust im GD ist noch nicht geklärt. Es ist jedoch bekannt, dass der GD der Ratte die Mehrheit der Inputs vom entorhinalen Kortex erhält. Efferente Leitungsbahnen gehen vom GD zu den Neuronen in der CA3-Region des Hippokampus (AMARAL u. WITTER 1995). Es wird angenommen, dass eine Schädigung von erregenden Neuronen inhibitorische Schaltkreise schädigt. Diese inhibitorischen Neuronen kontrollieren die Erregbarkeit der Zellen im GD (LOWENSTEIN et al. 1992). Möglicherweise kommt es mit zunehmender Traumastärke zu einer unkontrollierten Übererregbarkeit und einer daraus resultierenden Zellschädigung in diesem Bereich. Eventuell kann diese Übererregbarkeit zur Exzitotoxizität führen die unter anderem die Neuronen in der CA3-Region schädigt. Jedoch existiert auch eine positive Feedback-Projektion von Neuronen der CA3-Region zu Zellen des GD. Aus diesem Grund könnten auch Neuronen der CA3-Region via Exzitotoxizität direkt die Zellen im GD schädigen.

Eosinophile Zellen traten in allen SHT-Gruppen ausschließlich im Kortex und im Hippokampus der rechten Hemisphäre auf. Dies entspricht ganz dem CCI-Modell, das dafür bekannt ist, eine präzise fokale Verletzung zu setzen.

Ob Eosinophilie als Zeichen irreversibler Zellschädigung in Form der Nekrose gewertet werden darf, wird kontrovers diskutiert. So bewerten GARCIA et al. (1993) die zytoplasmatische Eosinophilie, die 12-24 Stunden nach Ischämie eintritt, als Ausdruck eines beeinträchtigten Zellstoffwechsel und interpretieren diese als Vorboten der Nekrose. MINAMISAWA et al. (1990) fassen pinkfarbene, eosinophile Zellen im Hippokampus als beschädigte Neuronen auf, die laut ITO et al. (1975) aufgrund intensiver enzymatischer Aktivität dennoch überlebensfähig sind. Indessen bezeichnen GARICA et al. (1993)

eosinophil gefärbte Zellen als bereits abgestorben. WYLLIE et al. (1980) sind überzeugt, dass die Eosinophilie in der HE-Färbung als ein Zeichen des Zelltodes gewertet werden darf.

Der Schaden im Kortex korreliert in allen drei SHT-Gruppen mit dem Schaden im Hippokampus. Dies spricht für einen absolut konstanten induzierten Schaden und eine identische Schadensausprägung 6 h post traumatisch.

4.2.4 Doppelfärbung von aktivierter Caspase-3 und NeuN

Bei der Doppelfärbung gegen akt. Caspase-3 und NeuN wurde in jedem Färbedurchgang ein Thymuspräparat als Positivkontrolle und ein Schnitt von einem Nativ-Tier als Negativkontrolle mitgeführt. Der als positive Kontrolle mitgefärbte Thymus juveniler Ratten wies bei jedem Färbedurchgang akt. Caspase-3-positive Zellen auf, jedoch keinerlei Rotfärbung. Dies bestätigt zum einen die Funktionalität des Antikörpers gegen das gesuchte Protein akt. Caspase-3 und zum anderen die Spezifität des Antikörpers gegen NeuN. Bei dem als Negativkontrolle mitgeführten Schnitt des Nativ-Tiers konnten keine akt. Caspase-3 positiven Zellen detektiert werden. Die Neuronen wurden jedoch NeuN-positiv gefärbt (rot). Dies bestätigt die Funktionalität des Antikörpers gegen das neuronale nukleäre Protein und die Spezifität des Antikörpers gegen akt. Caspase-3 (MATZ 2003).

Bei Verwendung der einfach akt. Caspase-3-Färbung ist es dem Betrachter nicht möglich, zwischen einer Nervenzelle und einer Gliazelle zu unterscheiden, da von der Apoptose beide Zelltypen betroffen sind. Dies bestätigten BEER et al. (2000), die akt. Caspase-3 sowohl in Neuronen, Astrozyten und in Oligodendrozyten nachweisen konnten. Aus diesem Grund ist es notwendig einen neuronalen Marker einzusetzen, um gezielt Caspase-3-positive Neuronen anzufärben.

In der vorliegenden Studie konnten in allen drei SHT-Gruppen eine geringe Anzahl akt. Caspase-3-positiver Neuronen in der Hippokampusformation detektiert werden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von COLICOS und DASH (1996), die ebenfalls im Hippokampus apoptotische Neuronen detektieren konnten. Im Gegensatz dazu konnten BEER et al. (2000) sechs bis 72 Stunden nach CCI keine Apoptose im ipsilateralen Hippokampus feststellen.

Die eigenen Untersuchungen ergaben, dass in keiner Versuchsgruppe Zellen zu finden waren, die lediglich akt. Caspase-3-positiv markiert waren. Dieses Resultat stimmt mit den Erkenntnissen von NEWCOMB et al. (1999) überein, die im CCI-Modell keine apoptotischen Astrozyten oder Oligodendrozyten detektieren konnten.

Auch WENNERSTEN et al. (2003) postulierten, dass Neuronen bei moderaten Verletzungen die am stärksten betroffene Zellpopulation darstellen. BEER et al. (2000) unterstützen diese These indem sie sechs Stunden nach CCI folgende Häufigkeitsverteilung der akt. Caspase-3 fanden: 47 % der akt. Caspase-3-positiven Zellen stellten Neuronen dar, 33 % Astrozyten und 4 % Oligodendrozyten. Für die größere Vulnerabilität der Neuronen führen WENNERSTEN et al. (2003) folgende Gründe an:

- Die Neuronen sind empfindlich gegenüber Exzitotoxizität.
- Sie besitzen lange vulnerable Axone.
- Sie haben einen hohen Energiebedarf.
- Sie benötigen trophische Unterstützung zum Überleben.
- Sie exprimieren Fas (Todesrezeptor der extrinsischen Apoptosekaskade s. Abb. 6) als Antwort auf ein SHT.

Im Gegensatz dazu sind die Gliazellen „robuster“ und weisen einen niedrigeren Energiebedarf als die Neuronen auf. Zudem verfügen sie über Mechanismen, um gezielt Noxen abzuschwächen. So konnte FINKBEINER (1992) nachweisen, dass beispielsweise Astrozyten einen Ca^{++} -Overload über Gap junctions verteilen.

Die unterschiedlichen Aussagen über Anzahl und Art der von Apoptose betroffenen Zellen haben verschiedene Gründe. Einerseits liegt die Ursache im verwendeten experimentellen Tiermodell andererseits können auch die unterschiedlichen Einstellungsparameter des CCI-Modells wie Einfallswinkel, Einschlaggeschwindigkeit und Eindringtiefe verantwortlich gemacht werden.

In keiner der drei SHT-Gruppen konnten doppelt markierte Zellen gegen akt.Caspase-3 und NeuN in kortikalen Bereichen detektiert werden. Dies deckt sich mit den Erkenntnissen von DAVOLI et al. (2002), die drei bis sechs Stunden nach einer transienten fokalen Ischämie ebenfalls keine akt. Caspase-3 im Kortex finden konnten. Als Grund hierfür vermuten sie eine hohe enzymatische turnover Rate der akt. Caspase-3, die die immunhistochemische Antigen-detektion erschwert. Des Weiteren spekulieren sie, dass kortikale Neuronen anfangs eine vorübergehende Resistenz gegenüber dem apoptotischen Zelltod besitzen. Eine andere Mutmaßung der Autoren ist, dass kortikale Neuronen bereits bei niedrigeren Caspase-3 Werten apoptotisch zugrunde gehen, diese minimalen Werte jedoch in der Immunhistochemie nicht detektierbar sind. NAPIERALSKI et al. (1999) nehmen an, dass der Hippokampus im Gegensatz zu den nekrotischen Umgebungsbereichen der Kontusion anderen molekularen und mechanischen Kräften ausgesetzt ist. So konnten sie im *Fluid-percussion-* (FP) -Modell nachweisen, dass die Induktion des FP die Hoch-Regulierung des p53-Proteins im

Hippokampus induziert. Außerdem wurde berichtet, dass ein kortikales Trauma eine retrograde Apoptose auch in subkortikalen Regionen auslösen kann (MARTIN et al. 2001).

In der vorliegenden Studie konnte zwar innerhalb der SHT-Gruppen kein Unterschied in der Anzahl der akt. Caspase-3-positiven Neuronen in der Hippokampusformation festgestellt werden, jedoch erwies sich die Doppelfärbung als hervorragende Nachweismethode um apoptotische Neuronen zu detektieren.

4.3 Abschlussbetrachtung

Nachdem in experimentellen Untersuchungen im Ischämiemodell durch die präventive Gabe von Propofol eine Reduktion des histopathologischen Schadens und eine Verbesserung des neurologischen Endergebnisses erreicht wurde (KELLERMANN 2004, STEGEMANN 2004), entschloss man sich zur vorliegenden Studie um nachzuweisen, inwieweit dieser Effekt auch kurzfristig über sechs Stunden nach einem kontrollierten SHT zum Tragen kommt. So wurde dosisabhängig der Einfluss des Injektionsnarkotikums Propofol auf das Läsionsvolumen und den histopathologischen Schaden nach SHT untersucht. Das CCI-Modell liefert in der vorliegenden Studie zuverlässige, reproduzierbare und gut quantifizierbare Daten mit geringer Streuung, die den Vergleich von den vier Studiengruppen zulassen. Die Versuchsdurchführung ist relativ aufwendig, der verbundene Aufwand steht jedoch in vernünftigem Verhältnis zu den erzielten Ergebnissen. Die Tiere können intensiv während der Versuchsdurchführung überwacht werden, so dass eine kontrollierte Untersuchung gewährleistet ist.

In der vorliegenden Studie konnten nur tendenzielle Unterschiede zwischen den Schäden der „niedrig“ und „hoch“ dosierten Propofolgruppe bzw. zwischen der Kontrollgruppe und den Propofolgruppen festgestellt werden. Die angewandten Färbungen (KV-, HE-, akt. Caspase-3 und NeuN-Färbung) erwiesen sich als sehr gute Nachweismöglichkeit, um unterschiedliche histologische Schadensaspekte darstellen zu können. Es konnte gezeigt werden, dass sechs Stunden nach moderatem CCI sowohl nekrotisches als auch potentiell reanimierbares apoptotisches Gewebe nebeneinander existieren und folglich Patienten mit einem akuten SHT von einer frühzeitigen „Anti-Apoptose-Therapie“ profitieren könnten.

In der vorliegenden Studie wurde Halothan als Kontrollnarkose zur Versuchsnarkose Propofol gewählt. Um genaue Aussagen über die Auswirkung von Anästhetika auf den zerebralen Sekundärschaden nach einem SHT machen zu können, wäre es nötig gewesen als Kontrollgruppe nicht narkotisierte Tiere zu verwenden, die ebenfalls einem SHT unterzogen worden wären. Ein derartiger Eingriff ist jedoch aus tierschützerischen Gründen unzulässig. Aus diesem Grund wählte man in dieser Studie für die Kontrollgruppe ein Narkosemittel und eine -dosierung von der man ausgeht, dass die Auswirkung auf das zerebrale Gewebe so gering wie möglich ist.

In der Scheinversuchsgruppe, SHAM/Halo, konnte kein zerebraler Schaden nachgewiesen werden. Das bedeutet, dass sowohl die Präparation, die Trepanation des Schädels wie auch die 6-stündige Nachbeatmungsphase unter der Kontrollnarkose Halothan keinen schädigenden Einfluss auf die Neuronen haben, wenn die physiologischen Parameter überwacht und konstant gehalten werden.

Ein neuroprotektives Potential von Propofol konnte nicht nachgewiesen werden. Die Hauptursache hierfür könnte in dem frühen Untersuchungszeitpunkt, sechs Stunden nach CCI, liegen.

Wie oben erwähnt, wurde in der vorliegenden Studie gezeigt, dass das CCI eine unilaterale fokale Schädigung des Hippokampus verursachte. Nachgewiesener Maßen führt ein Zellverlust im Hippokampus zu Gedächtnisdysfunktionen. Zur Fragestellung, inwieweit Propofol die neurokognitiven Fähigkeiten des Gehirns nach einem SHT beeinflusst, gibt es bisher keine Untersuchungen. Aus diesem Grund sollte in weiterführenden Untersuchungen neben der histologischen Analyse der Gehirne, der Einfluss von Propofol auf die kognitive Leistungsfähigkeit der Tiere untersucht werden. Sinnvoll wäre auch eine Läsionsvolumensbestimmung zu zwei unterschiedlichen Überlebenszeitpunkten um eine Korrelierbarkeit des Läsionsvolumens zu einem frühen und einem späten Zeitpunkt nach dem Trauma zu erhalten.

Der Endpunkt der längeren Überlebenszeit sollte dann neben histologischen Untersuchungen die Bewertung von Motorik, Kognition und Verhaltensparameter der Tiere beinhalten.

5. Zusammenfassung

Der dosisabhängige Einfluss von Propofol auf den histopathologischen Fröhschaden und die Aktivierung des neuronalen Apoptosemarkers Caspase-3 im Gehirn der Ratte nach kontrolliertem zerebralen Trauma

Sprague-Dawley Ratten wurden einem Schädel-Hirn-Trauma (SHT) unterzogen. Vor der Induktion des SHT wurde jedes Tier einer der vier Versuchsgruppen zugewiesen: SHT/Propofol-Gruppe mit einer Burst-Suppression- (BS-) Ratio im EEG von 1-5 %, SHT/Propofol-Gruppe mit einer BS-Ratio im EEG von 30-40 %, Kontrollgruppe SHT/Halothan und die Scheinversuchsgruppe SHAM unter Halothannarkose.

Nach Ablauf der 6-stündigen posttraumatischen Nachbeatmungsphase unter der jeweiligen Versuchsnarkose wurden die Tiere getötet und das Gehirn zur weiteren Analyse tiefgefroren, geschnitten und gefärbt.

Sowohl in der Kresylviolett- (KV-) wie auch in der Hämatoxylin Eosin- (HE-) Färbung wurde eine Läsionsvolumenbestimmung durchgeführt. Des Weiteren wurde in der HE-Färbung die Anzahl der eosinophilen Zellen in der Hippokampusformation erfasst und ausgewertet. Zusätzlich wurde die Aktivierung von Caspase-3, einem Apoptose-spezifischen Protein, in Neuronen untersucht. Im Anschluss daran wurden die Ergebnisse der drei SHT-Gruppen und der Scheinversuchsgruppe, SHAM/Halo, miteinander verglichen.

Die Läsionsvolumenbestimmung lässt weder in der KV-Färbung noch in der HE-Färbung signifikante Unterschiede zwischen den drei SHT-Gruppen erkennen. Die SHT/Prop BS30-40 %-Gruppe weist in beiden Färbungen ein tendenziell geringeres Läsionsvolumen auf, als die SHT/Prop BS1-5 %-Gruppe bzw. die SHT/Halo-Gruppe. Bei der Beurteilung der Hippokampusformation ergeben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Tendenziell weist auch hier die SHT/Prop BS30-40 %-Gruppe die geringste Anzahl an eosinophilen Zellen auf. In der linken Hemisphäre der drei SHT-Gruppen und in der SHAM/Halo-Gruppe können keine eosinophilen Zellen detektiert werden. Das in der KV-Färbung ermittelte Läsionsvolumen ist generell kleiner, als das in der HE-Färbung. Die Expression von aktivierter Caspase-3 in Neuronen ist stichprobenweise in allen SHT-Gruppen im ipsilateralen Hippokampus, sechs Stunden nach SHT, nachweisbar.

Ein neuroprotektives Potential von niedrig und hoch dosiertem Propofol konnte sechs Stunden nach SHT im Vergleich zu Halothan nur vermutet werden. Die Läsionsvolumenbestimmung anhand KV- und HE-Färbung stellt sich jedoch als zuverlässige Methode dar. Weitere SHT-Studien mit längerem Beobachtungszeitraum sind notwendig, um mehr über den Wirkmechanismus dieses Anästhetikums in Erfahrung zu bringen und so gezielt ein Konzept für erfolgreiche Therapie nach einem SHT und seine Folgeerscheinungen zu entwickeln.

6. Summary

The dose-dependant effect of Propofol on acute histopathological damage and the activation of the neuronal apoptotic-marker Caspase-3 in the brain after controlled cortical impact in the rat

Sprague-Dawley rats were subjected to a traumatic brain injury model. Before induction of controlled cortical impact (CCI) the animals were assigned to one of the following groups: CCI/propofol with a burst-suppression- (BS-) ratio in the EEG of 1-5 %, CCI/propofol with a BS-ratio in the EEG of 30-40 %, control group CCI/halothane and the sham operated rats under halothane anaesthesia.

After six hours of post-traumatic ventilation animals were euthanized, brains were removed, frozen, cut into slices and stained with kresylviolett- (KV-) as well as hematoxylin/eosin (HE) to evaluate the lesion volume and count eosinophilic cells in the hippocampus. Additionally, the activation of Caspase-3, an apoptotic-regulating protein was randomly evaluated in neurons by immunohistochemistry double staining.

The evaluation of the ipsilateral hemisphere in the KV- (lesion volume) and HE-staining (lesion volume and number of eosinophilic cells in the hippocampus) did not reveal significant differences between the three CCI groups. However, the brains of the animals in CCI/Prop BS30-40 % showed a tendency towards a lower lesion volume in both stainings as well as a lower number of eosinophilic hippocampal cells in the HE-staining than CCI/Prop BS1-5 % or CCI/Halo.

There were no eosinophilic cells detected in the contralateral hemisphere of the three CCI groups and in both hemispheres of SHAM/Halo. The lesion volumes which were evaluated by the KV-staining were constantly smaller, than the lesion volumes evaluated with the HE-staining. The expression of activated Caspase-3 six hours after the CCI in neurons could be demonstrated in all CCI-groups in the ipsilateral hippocampus. Compared to halothane the neuroprotective effect of EEG-dependant low or high dose propofol anaesthesia six hours after CCI can only be assumed.

However, it has been shown that the evaluation of the lesion volume after CCI using KV- and HE-staining is a reliable method. Further CCI-studies with longer observation periods are necessary in order to find out more about the neuroprotective effect of this anaesthetic agent and by that being able to develop successful therapeutical strategies after traumatic brain injury.

7. Literaturverzeichnis

- Adelson, P. D., Dixon, C. E., Robichaud, P., u. Kochanek, P. M. (1997)
Motor and cognitive functional deficits following diffuse traumatic brain injury in the immature rat.
J Neurotrauma **14**, 99-108
- Amaral, D. G. u. Witter, M. P. (1995)
Hippocampal formation, in the rat nervous system.
Academic Press: Sydney 443-493
- Amorim, P., Chambers, G., Cottrell, J., u. Kass, I. S. (1995)
Propofol reduces neuronal transmission damage and attenuates the changes in calcium, potassium, and sodium during hyperthermic anoxia in the rat hippocampal slice.
Anesthesiology **83**, 1254-1265
- Ansari, B., Coates, P. J., Greenstein, B. D., u. Hall, P. A. (1996)
In situ end-labeling detects DNA strand breaks in apoptosis and other physiological and pathological states.
J Pathol **170**, 1-8
- Antkowiak, B. u. Kirschfeld, K. (2000)
Neuronale Mechanismen der Narkose.
Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther **35**, 731-743
- Baethmann, A., Jantzen, J. P., Piek, J., Prange, H., u. Unterberg, A. (1997)
Physiologie und Pathophysiologie des intrakraniellen Druckes.
Anästh Intensivmed **38**, 357-359
- Baskaya, M. K., Rao, A. M., Dogan, A., Donaldson, D., u. Dempsey, R. J. (1997)
The biphasic opening of the blood - brain barrier in the cortex and hippocampus after traumatic brain injury in rats.
Neurosci Lett **226**, 33-36
- Beer, R., Franz, G., Srinivasan, A., Hayes, R. L., Pike, B. R., Newcomb, J. K., Zhao, X., Schmutzhard, E., Poewe, W., u. Kampfl, A. (2000)
Temporal profile and cell subtype distribution of activated caspase-3 following experimental traumatic brain injury.
J Neurochem **75**, 1264-1273
- Bianchi, M., Battistin, T., u. Galzigna, L. (1991)
2,6-diisopropylphenol, a general anesthetic, inhibits glutamate action an rat synaptosomes.
Neurochem Res **16**, 443-446
- Biestro, A. A., Alberti, R. A., Soca, A. E., Cancela, M., Puppo, C. B., u. Borovich, B. (1995)
Use of indomethacin in brain - injured patients with cerebral perfusion pressure impairment: preliminary report.
J Neurosurg **83**, 627-630
- Bouma, G. J. u. Muizelaar, J. P. (1995)
Cerebral blood flow in severe clinical head injury.
New Horiz **3**, 384-394

- Bouma, G. J., Muizelaar, J. P., Choi, S. C., Newlon, P. G., u. Young, H. F. (1991)
Cerebral circulation and metabolism after severe traumatic brain injury: the elusive role of ischemia.
J Neurosurg **75**, 685-693
- Bouma, G. J. u. Stringer, W. A. (1992)
Ultra-early evaluation of regional cerebral blood flow in severely head-injured patients using xenon-enhanced computerized tomography.
J Neurosurg **77**, 360-368
- Bruder, N., Lassegue, D., Pelissier, D., Graziani, N., u. Francois, G. (1994)
Energy expenditure and withdrawal of sedation in severe head-injured patients.
Crit Care Med **22**, 1114-1119
- Budras, K., Fricke, W., u. Richter, R. (1996)
Atlas der Anatomie des Hundes, Lehrbuch für Tierärzte und Studierende.
Schlütersche Verlagsanstalt, Hannover, **5. Auflage**, 108-117 u. 148-149
- Buki, A., Siman, R., Trojanowski, J. Q., u. Povlishock, J. T. (1999)
The role of calpain-mediated spectrin proteolysis in traumatically induced axonal injury.
J Neuropathol Exp Neurol **58**, 365-375
- Bullock, R., Zauner, A., Woodward, J. J., Myseros, J., Choi, S. C., Ward, J. D., Marmarou, A., u. Young, H. F. (1998)
Factors affecting excitatory amino acid release following severe human head injury.
J Neurosurg **89**, 507-518
- Bundesamt für Statistik Wiesbaden 1996
- Burck, H. C. (1988)
Histologische Technik, Leitfaden für die Herstellung mikroskopischer Präparate in Unterricht und Praxis.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart/New York, **6. Auflage**, 1-205
- Busto, R., Dietrich, W. D., Globus, M. Y. T., Valdés, I., Scheinberg, P., u. Ginsberg, M. D. (1987)
Small differences in intras ischemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury.
J Cereb Blood Flow Metab **7**, 729-738
- Carlsson, C., Smith, D. S., Keyhah, M. M., Englebach, I., u. Harp, J. R. (1982)
The effects of high-dose Fentanyl on cerebral circulation and metabolism in rats.
Anesthesiology **57**, 375-380
- Charriaut-Marlangue, C. u. Ben-Ari, Y. (1995)
A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis.
Neuroreport **29**, 61-64
- Chen, S., Pickard, J. D., u. Harris, N. G. (2003)
Time course of cellular pathology after controlled cortical impact injury.
Exp Neurol **182**, 87-102
- Cherian, L, Robertson, C. S., u. Goodman, J. C. (1996)
Secondary Insults Increase Injury after Controlled Cortical Impact in Rats.

J Neurotrauma **13**, 371-383

Cherian, L., Robertson, C. S., Contant, C. F., u. Bryan, R. M. (1994)
Lateral cortical impact injury in rats: cerebrovascular effects of varying depth of cortical deformation and impact velocity.
J Neurotrauma **11**, 573-585

Chesnut, R. M. (1995)
Secondary brain insults after head injury: clinical perspectives.
New Horiz **3**, 366-375

Chesnut, R. M., Marshall, L. F., Klauber, M. R., Blunt, B. A., Baldwin, N., Eisenberg, H. M., Jane, J. A., Marmarou, A., u. Foulkes, M. A. (1993)
The role of secondary brain injury in determining outcome from severe head injury.
J Trauma **34**, 216-222

Choi, D. W. (1996)
Ischemia-induced neuronal death.
Curr Opin Neurobiol **6**, 667-672

Choi, D. W., Maulucci, G. M., u. Kriegstein, A. R. (1987)
Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture.
J Neurosci **7**, 357-368

Chopp, M. u. Li, Y. (1996)
Apoptosis in focal cerebral ischemia.
Acta Neurochir **66**, 21-26

Clark, R. K., Lee, E. V., White, R. F., Jonak, Z. L., Feuerstein, G. Z., u. Barone, F. C. (1994)
Reperfusion following focal stroke hastens inflammation and resolution of ischemic injured tissue.
Brain Res Bull **35**, 397-392

Clark, R. S., Kochanek, P. M., Dixon, C. E., Chen, M., Marion, D. W., Heinemann, S., DeKosky, S. T., u. Graham, S. H. (1997)
Early neuropathologic effects of mild or moderate hypoxemia after controlled cortical impact injury in rats.
J Neurotrauma **14**, 179-189

Colicos, M. A. u. Dash, P. K. (1996)
Apoptotic morphology of dentate gyrus granule cells following experimental cortical impact injury in rats: possible role in spatial memory deficits.
Brain Res **739**, 120-131

Colicos, M. A., Dixon, C. E., u. Dash, P. K. (1996)
Delayed, selective neuronal death following experimental cortical impact injury in rats: possible role in memory deficits.
Brain Res **739**, 111-119

Conti, A. C., Raghupathi, R., Trojanowski, J. Q., u. McIntosh, T. K. (1998)
Experimental brain injury induces regionally distinct apoptosis during the acute and delayed post-traumatic period.
J Neurosci **18**, 5663-5672

- Cooper, P. R., Moody, S., Clark, W. K., Kirkpatrick, J., Maravilla, K., Gould, A. L., u. Drane, W. (1979)
Dexamethasone and severe head injury. A prospective double-blind study.
J Neurosurg **51**, 307-316
- Cortbus, F. u. Steudel, W. I. (1999)
Internationale und nationale Daten zur Epidemiologie des Schädelhirntraumas.
Klin Forsch Suppl **1**, 1-38
- Cortez, S. C., McIntosh, T. K., u. Noble, L. J. (1989)
Experimental fluid percussion brain injury: Vascular disruption and neuronal and glial alterations.
Bain Res **482**, 271-282
- Davoli, M. A., Fourtounis, J., Tam, J., Xanthoudakis, S., Nicholson, D., Robertson, G. S., NG, G. Y. K., u. Xu, D. (2002)
Immunohistochemical and biochemical assesment of caspase-3 activation and DNA fragmentation following transient focal ischemia in the rat.
Neuroscience **115**, 125-136
- Dawidowicz, A. L., Fornal, E., Mardarowicz, M., u. Fijalkowska, A. (2000)
The role of human lungs in the biotransformation of propofol.
Anesthesiology **93**, 992-997
- Dearden, N. M, Gibson, J. S., u. McDowall, D. G. (1986)
Effect of high - dose dexamethasone on outcome from severe head injury.
J Neurosurg **64**, 81-88
- Denny-Brown, D. u. Russel, W. R. (1941)
Experimental cerebral concussion.
Brain **64**, 93-164
- Dietrich, W. D., Alonso, O., Busto, R., u. Ginsberg, M. D. (1994a)
Widespread metabolic depression and reduced somatosensory circuit activation following traumatic brain injury in rats.
J Neurotrauma **11**, 629-640
- Dietrich, W. D., Alosa, O., Busto, R., Globus, M. Y. T., u. Ginsberg, M. D. (1994b)
Post-traumatic brain hypothermia reduces histopathological damage following concussive brain injury in the rat.
Acta Neuropathol **87**, 250-258
- Dinkel, M. u. Hennes, H. J. (1998)
Innerklinische Akutversorgung des Patienten mit Schädel-Hirn-Trauma.
Anästh Intensivmed **39**, 399-412
- Dixon, C. E., Clifton, G. L., Lighthall, J. W., Yaghmai, A. A., u. Hayes, R. L. (1991)
A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat.
J Neurosci Meth **39**, 253-262
- Dixon, C. E., Lyeth, B. G., Povlishock, J. T., Findling, R. L., Hamm, R. J., Marmarou, A., Young, H. F., u. Hayes, R. L. (1987)
A fluid percussion model of experimental brain injury in the rat.
J Neurosurg **67**, 110-119

- Dunn-Meynell, A. A. u. Levin, B. E. (1997)
 Histological markers of neuronal, axonal and astrocytic changes after lateral rigid impact traumatic brain injury.
Bain Res **761**, 25-41
- Eisenberg, H. M., Frankowski, R. F., Contant, C. F., Marshall, L. F., u. Walker, M. D. (1988)
 High - dose barbiturate control of elevated intracranial pressure in patients with severe head injury.
J Neurosurg **69**, 15-23
- Eldadah, B. A. u. Faden, A. I. (2000)
 Caspase pathways, neuronal apoptosis, and CNS injury.
J Neurotrauma **17**, 811-829
- Engelborghs, K., Verlooy, J., Van Reempts, J., Van Deuren, B., Van den Ven, M., u. Borgers, M. (1998)
 Temporal changes in intracranial pressure in a modified experimental model of closed head injury.
J Neurosurg **89**, 796-806
- Erhardt, W., Henke, J., Kroker, R. (2004)
 Allgemeinanästhetika
 In: Erhardt, W., Henke, J., Haberstroh,
 Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier
 Schattauer Verlag, Stuttgart/New York, 16-138
- Fandino, J. (1995)
 Schädel-Hirn-Trauma (SHT): intrakranielles Druckmonitoring (ICP), 8-13
- Farling, P. A., Johnston, J. R., u. Coppel, D. L. (1989)
 Propofol infusion for sedation of patients with head injury in intensive care.
Anaesthesia **44**, 222-226
- Fawcett, J. W. u. Asher, R. A. (1999)
 The glial scar and central nervous system repair.
Bain Res **49**, 377-391
- Feldmann, Z., Kanter, M. J, Robertson, C. S., Contant, C. F., Hayes, C., Sheinberg, M. A., Villareal, C. A., u. Narayan, R. K. (1992)
 Effect of head elevation on intracranial pressure, cerebral perfusion pressure, and cerebral blood flow in head injured patients.
J Neurosurg **76**, 207-211
- Finkbeiner, S. (1992)
 Calcium waves in astrocytes-filling in the gaps.
Neuron **8**, 1101-1108
- Foda, M. A. u. Marmarou, A. (1994)
 A new model of diffuse brain injury in rats. Part II: morphological characterization.
J Neurosurg **80**, 301-313
- Folkerts, M. M., Berman, R. F., Muizelaar, J. P., u. Rafols, J. A. (1998)
 Disruption of MAP-2 immunostaining in rat hippocampus after traumatic brain injury.
J Neurotrauma **15**, 349-363

- Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., u. Starke, K. (1996)
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin/Oxford, **7. Auflage**, 235-252
- Fox, G. B, Fan, L., Levasseur, R. A., u. Faden, A. I. (1998)
Sustained sensory/motor and cognitive deficits with neuronal apoptosis following controlled cortical impact brain injury in the mouse.
J Neurotrauma **15**, 599-614
- Frey, H. H. u. Löscher, W. (1996)
Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin.
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 139-204
- Garcia, J. H., Yoshida, Y., Chen, H., Li, Y., Zhang, Z. G., Lian, J., Chen, S., u. Chopp, M. (1993)
Progression from ischemic injury to infarct following middle cerebral artery occlusion in the rat.
Am J Pathol **142**, 623-635
- Gavrieli, Y., Sherman, Y., u. Ben-Sasson, S. A. (1992)
Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation.
J Cell Biol **119**, 493-501
- Gennarelli, T. A. (1994)
Animate models of human head injury.
J Neurotrauma **11**, 357-368
- Ginsberg, M. D., Zhao, W., Alonso, O. F., Looor-Estades, J. Y., Dietrich, W. D., u. Busto, R. (1997)
Uncoupling of local cerebral glucose metabolism and blood flow after acute fluid-percussion injury in rats.
Am J Physiol **272**, 2859-2868
- Giri, B. K., Krishnappa, I. K., Bryan, R. M., Robertson, C., u. Watson, J. (2000)
Regional cerebral blood flow after cortical impact injury complicated by a secondary insult in rats.
Stroke **31**, 961-967
- Goldstein, A., Wells, B., u. Keats, A. (1966)
Increased tolerance to cerebral anoxia by pentobarbital.
Arch Int Pharmacodyn Ther **161**, 138-143
- Goodman, J. C., Cherian, L, Bryan, R. M., u. Robertson, C. S. (1994)
Lateral cortical impact injury in rats: pathological effects of varying cortical compression and impact velocity.
J Neurotrauma **11**, 587-597
- Graham, D. I., Adams, J. H., u. Doyle, D. (1978)
Ischaemic brain damage in fatal non-missile head injuries.
J Neurol Sci **39**, 213-234
- Graham, D. I., Ford, I., Adams, J. H., Doyle, D., Teasdale, G. M., Lawrence, A. E., u. McLellan, D. R. (1989)

- Ischemic brain damage is still common in fatal non-missile head injury.
J Neurol Neurosurg Psychiatry **52**, 346-350
- Graham, D. I. u. Lantos, P. L. (1997)
 Greenfield's Neuropathology.
 Arnold, London, **6. Auflage**, 86-90
- Grasl-Kraupp, B, Ruttkay-Nedecky, B., Koudelka, H., Bukowska, K., Bursch, W., u. Schulte-Hermann, R. (1995)
 In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note.
Hepatology **21**, 1465-1468
- Gremmelt, A. u. Braun, U. (1995)
 Analgosedierung des Patienten mit Schädel-Hirn-Trauma.
Anaesthesist **44**, 559-565
- Gudeman, S. K, Miller, J. D., u. Becker, D. P (1979)
 Failure of high-dose steroid therapy to influence intracranial pressure in patients with severe head injury.
J Neurosurg **51**, 301-306
- Hans, P., Bonhomme, V., Collette, J., Albert, A., u. Moonen, G. (1994)
 Propofol protects cultured rat hippocampal neurons against N-methyl-D-aspartate receptor-mediated glutamate toxicity.
J Neurosurg Anesthesiol **6**, 249-253
- Harders, A., Kakarieka, A., u. Braakman, R. (1996)
 Traumatic subarachnoid hemorrhage and its treatment with nimodipine.
J Neurosurg **85**, 82-89
- Hartung, J. H. (1987)
 Intrakranielles Druckverhalten bei Patienten mit Schädel-Hirn-Trauma nach Propofol -bzw. Thiopental-Applikation.
Anaesthesist **36**, 285-287
- Hees, H. u. Sinowatz, F. (1992)
 Histologie, Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie.
 Deutscher Ärzte-Verlag, Köln, **2. Auflage**, 1-415
- Hennes, H. J. (2000)
 Neuroanästhesie.
 Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 418-436
- Hoffman, W. E., Werner, C., Kochs, E., Segil, L., Edelmann, G., u. Albrecht, R. F. (1992)
 Cerebral and spinal cord blood flow in awake and fentanyl-N₂O anesthetized rats: evidence for preservation of blood flow autoregulation during anesthesia.
J Neurosurg Anesth **4**, 31-35
- Hollriegel, G. S., Toth, K., u. Soltesz, I. (1996)
 Neuroprotection by Propofol in Acute Mechanical Injury: Role of GABAergic Inhibition.
J Neurophysiol **76**, 2412-2422

- Hsu, S. M., Raine, L., u. Fanger, H. (1981)
Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures.
J Histochem Cytochem **29**, 577-580
- Ito, U., Spatz, M., Walker, J. T., u. Klatzo, I. (1975)
Experimental cerebral ischemia in mongolian gerbils.
Acta Neuropathol **32**, 209-223
- James, R. u. Glen, J. B. (1980)
Synthesis, biological evaluation, and preliminary structure-activity considerations of a series of alkylpehnols as intravenous anesthetic agents.
J Med Chem **23**, 1350-1357
- Jantzen, J. P. u. Piek, J. (1997)
Leitlinien zur Primärversorgung von Patienten mit Schädel-Hirn-Trauma.
Anästh Intensivmed **38**, 89-93
- Joint Section on Neurotrauma and Critical Care (1995)
Guidelines for the management of severe head injury.
Brain Trauma Foundation, New York, 1-4
- Jongen-Relo, A. L. u. Feldon, J. (2002)
Specific neuronal protein: a new tool for histological evaluation of excitotoxic lesions.
Physiol Behav **76**, 449-456
- Kahveci, F. S., Kahveci, N., Alkan, T., Goren, B., Korfali, E., u. Ozluk, K. (2001)
Propofol versus isoflurane anesthesia under hypothermic conditions: effects on intracranial pressure and local cerebral blood flow after diffuse traumatic brain injury in the rat.
Surg Neurol **56**, 206-214
- Katayama, Y., Becker, D. P., Tamura, T., u. Hovda, D. A. (1990)
Massive increases in extracellular potassium and the indiscriminate release of glutamate following concussive brain injury.
J Neurosurg **73**, 889-900
- Keane, R. W., Kraydieh, S., Lotocki, G., Alonso, O. F., Aldana, P., u. Dietrich, W. D. (2001)
Apoptotic and antiapoptotic mechanisms after traumatic brain.
J Cereb Blood Flow Metab **21**, 1189-1198
- Kellermann, K. (2004)
Einfluss der Anästhetika Sevofluran und Propofol auf den nekrotischen und den apoptotischen Zelltod nach inkompletter zerebraler Hemisphärenischämie und Reperfusion in der Ratte über einen Beobachtungszeitraum von 28 Tagen.
Vet Med Diss LMU München, 1-131
- Kelly, D. F., Goodale, D. B., Williams, J., Herr, D. L., Chappell, E. T., Rosner, M. J., Jacobson, J., Levy, M. L., Croce, M. A., Maniker, A. H., Fulda, G. J., Lovett, J. V., Mohan, O., u. Narayan, R. K. (1999)
Propofol in the treatment of moderate and severe head injury: a randomized, prospective double-blinded pilot trial.
J Neurosurg **90**, 1042-1052

Kelly, D. F., Kordestani, R. K., Martin, N. A., Nguyen, T., Hovda, D. A., Bergschneider, M., McArthur, D. L., u. Becker, D. P. (1996)

Hyperemia following traumatic brain injury: relationship to intracranial hypertension and outcome.

J Neurosurg **85**, 762-771

Kempski, O. (2000)

Grundlagen-Neuromonitoring-Intensivmedizin.

Georg Thieme Verlag, Stuttgart/New York, 90-104

Kempski, O. S (1994)

Neuroprotektion.

Anaesthesist **43**, 25-33

Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., u. Currie, A. R. (1972)

Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.

Br J Cancer **26**, 239-257

Klatzo, I. (1985)

Brain oedema following brain ischemia and influence of therapy.

Br J Anaesth **57**, 18-22

Knobloch, S. M., Nikolaeva, M., Huang, X., Fan, L., Krajewski, S., Reed, J. C., u. Faden, A. I. (2002)

Multiple caspases are activated after traumatic brain injury: evidence for involvement in functional outcome.

J Neurotrauma **19**, 1155-1170

Kochanek, P. M., Marion, D. W., Zhang, W., Schiding, J. K., White, M., Palmer, A. M, Clark, R. S. B., O'Malley, M. E., Styren, S. D., Ho, C., u. DeKosky, S. T. (1995)

Severe Controlled Cortical Impact in Rats: Assessment of Cerebral Edema, Blood Flow, and Contusion Volume.

J Neurotrauma **12**, 1015-1025

Kochs, E., Hoffman, W. E., Werner, C., Thomas, C., Albrecht, R. F., u. Schulte am Esch, J. (1992)

The effect of propofol on brain electrical activity, neurologic outcome, and neuronal damage following incomplete ischemia in rats.

Anesthesiology **76**, 245-252

Kolenda, H. (1999)

Aktuelle Therapieansätze und -konzepte beim Schädel-Hirn-Trauma (SHT).

Klin Forsch **Suppl 1**, 27-33

König, H. E. u. Liebich, H. G. (1999)

Anatomie der Haussäugetiere.

Schattauer Verlag, Stuttgart/New York, **2. Auflage**, 210-238

Lassen, N. A. (1966)

The luxury-perfusion syndrom and its possible relation to acute metabolic acidosis localised within the brain.

Lancet **2**, 1113-1115

- Laurer, H. L. u. McIntosh, T. K. (1999)
Experimental models of brain trauma.
Curr Opin Neurol **12**, 715-721
- Leist, M., Single, B., Castoldi, A. F., Kuhnle, S., u. Nicotera, P. (1997)
Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis.
J Exp Med **185**, 1481-1486
- Lendl, Ch., Henke, J. (2004)
Speziesspezifische Anästhesie: Katze
In: Erhardt, W., Henke, J., Haberstroh, J.
Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier
Schattauer Verlag, Stuttgart/New York, 607-628
- Lewen, A., Fujimura, M., Sugawara, T., Matz, P., Copin, J. C., u. Chan, P. H. (2001)
Oxidative stress-dependent release of mitochondrial cytochrome c after traumatic brain injury.
J Cereb Blood Flow Metab **21**, 914-920
- Lighthall, J. W. (1988)
Controlled cortical impact: A new experimental brain injury model.
J Neurotrauma **5**, 1-15
- Lighthall, J. W., Dixon, C. E., u. Anderson, T. E. (1989)
Experimental models of brain injury.
J Neurotrauma **6**, 83-97
- Lindgren, S. u. Rinder, L. (1966)
Experimental studies in head injury. II. Pressure propagation in "percussion concussion".
Biophysik **3**, 174-180
- Lowenstein, D. H., Thomas, M. J., Smith, D. H., u. McIntosh, T. K. (1992)
Selective vulnerability of dentate hilar neurons following traumatic brain injury: a potential mechanistic link between head trauma and disorders of the hippocampus.
J Neurosci **12**, 4846-4853
- Mac Manus, J. P. u. Linnik, M. D. (1997)
Gene expression induced by cerebral ischemia: an apoptotic perspective.
J Cereb Blood Flow Metab **17**, 815-832
- Majno, G. u. Joris, I. (1995)
Apoptosis, oncosis, and necrosis-an overview of cell death.
Am J Pathol **146**, 3-15
- Marion, D. W., Darby, J., u. Yonas, H. (1991)
Acute regional cerebral blood flow changes caused by severe head injuries.
J Neurosurg **74**, 407-414
- Marion, D. W., Obrist, W. D., Carlier, P. M., Penrod, L. E, u. Darby, J. M. (1993)
The use of moderate therapeutic hypothermia for patient with severe head injuries: a preliminary report.
J Neurosurg **79**, 354-362

- Marmarou, A., Foda, M. A., Van den Brink, W., Campbell, J., Kita, H., u. Demetriadou, K. (1994)
A new model of diffuse brain injury in rats. Part I. Pathophysiology and biomechanics.
J Neurosurg **80**, 291-300
- Martin, L. J., Kaiser, A., Yu, J. W., Natale, J. E., u. Al-Abdulla, N. A. (2001)
Injury-induced apoptosis of neurons in adult brain is mediated by p53-dependent and p53-independent pathways and requires Bax.
J Comp Neurol **433**, 299-311
- Martin, N. A., Doberstein, C., Zane, C., Caron, M. J., Thomas, K., u. Becker, D. P. (1992)
Posttraumatic cerebral arterial spasm: transcranial Doppler ultrasound, cerebral blood flow, and angiographic findings.
J Neurosurg **77**, 575-583
- Martin, N. A., Patwardhan, R. V., Alexander, M. J., Africk, C. Z., Lee, J. H., Shalmon, E., Hovda, D. A., u. Becker, D. P. (1997)
Characterization of cerebral hemodynamic phases following severe head trauma: Hypoperfusion, hyperemia, and vasospasm.
J Neurosurg **87**, 9-19
- Matz, S. (2003)
Methodische Evaluierung der immunhistochemischen Detektion aktivierter Caspase-3 im Hippokampus als Apoptoseparameter nach inkompletter zerebraler Ischämie bei der Ratte.
Vet Med Diss LMU München, 1-115
- McIntosh, T. K., Vink, R., Noble, L., Yamakami, L., Fernyak, S., u. Faden, A. I. (1989)
Traumatic brain injury in the rat characterization of a lateral fluid percussion model.
Neuroscience **28**, 233-244
- Meaney, D. F., Ross, D. T., Winkelsteon, B. A., Brasko, J., Goldstein, D., Bliston, L. B., Thibault, L. E., u. Gennarelli, T. A. (1994)
Modification of the cortical impact model to produce axonal injury in the rat cerebral cortex.
J Neurotrauma **11**, 599-612
- Mergaert, C., Herregods, L., Rolly, G., u. Colardyn, F. (1991)
The effect of a 24-h propofol or fentanyl sedation on intracranial pressure.
Eur J Anaesth **8**, 324-325
- Miller, J. D. (1985)
Head injury and brain ischaemia-implications for therapy.
Br J Anaesth **57**, 120-129
- Miller, J. D. (1993)
Head injury.
J Neurol Neurosurg Psychiatry **56**, 440-447
- Miller, J. D., Becker, D. P., u. Ward, J. D. (1977)
Significance of intracranial hypertension in severe head injury.
J Neurosurg **47**, 503-516
- Miller, J. D., Butterworth, J. F., Gudeman, S. K., Faulkner, J. E., Choi, S. C., Selhorst, J. B., Harbison, J. W., Lutz, H. A., Young, H. F., u. Becker, D. P. (1981)
Further experience in the management of severe head injury.

J Neurosurg **54**, 289-299

Minamisawa, H., Nordström, C.-H., Smith, M.-L., u. Siesjö, B. K. (1990)
The influence of mild body and brain hypothermia on ischemic brain damage.
J Cereb Blood Flow Metab **10**, 365-374

Mirenda, J u. Broyles, G (1995)
Propofol as used for sedation in the ICU.
Chest **108**, 539-548

Mullen, R. J., Buck, C. R., u. Smith, A. M. (1992)
NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates.
Development **116**, 201-211

Murphy, P. G., Myers, D. S., Davies, M. J., Webster, N. R., u. Jones, J. G. (1992)
The antioxidant potential of propofol (2,6-diisopropylphenol).
Br J Anaesth **68**, 613-618

Muzio, M. (1998)
Singnalling by proteolysis: death receptors induce apoptosis.
Int J Clin Lab Res **28**, 141-147

Namura, S., Zhu, J., Fink, K., Endres, M., Srinivasan, A., Tomaselli, K. J., Yuan, J., u.
Moskowitz, M. A. (1998)
Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia.
J Neurosci **18**, 3659-3668

Napieralski, J. A., Raghupathi, R., u. T.K., McIntosh (1999)
The tumor-suppressor gene, p53, is induced in injured brain regions following experimental
traumatic brain injury.
Mol Brain Res **71**, 78-86

Newcomb, J. K., Zhao, X., Pike, B. R., u. Hayes, R. L. (1999)
Temporal profile of apoptotic-like changes in neurons and astrocytes following controlled
cortical impact injury in the rat.
Exp Neurol **158**, 76-88

Nickel, R., Schummer, A., u. Seiferle, E. (1992)
Lehrbuch der Anatomie der Haustiere: Band 4, Nervensystem, Sinnesorgane, Endokrine
Drüsen.
Paul Parey Verlag, Berlin/Hamburg, **3. Auflage**, 17-227

Noll, S. u. Schaub-Kuhnen, S. (2000)
Praxis der Immunhistochemie.
Urban Fischer Verlag, München, 1-143

Obrist, W. D., Langfitt, T. W., Jaggi, J. L., Cruz, J., u. Gennarelli, T. A. (1984)
Cerebral blood flow and metabolism in comatose patients with acute head injury.
Relationship to intracranial hypertension.
J Neurosurg **61**, 241-253

- Orser, B. A., Bertlik, M., Wang, L, u. MacDonald, JF (1995)
Inhibition by propofol (2,6 di-isopropylphenol) of the N-methyl-D-aspartate subtype of glutamate receptor in cultured hippocampal neurones.
Br J Pharmacol **116**, 1761-1768
- Oshima, T., Karasawa, F., u. Satoh, T. (2002)
Effects of propofol on cerebral blood flow and the metabolic rate of oxygen in humans.
Acta Anaesthesiol Scand **46**, 831-835
- Padosch, S. A., Vogel, P., u. Böttiger, B. W. (2001)
Neuronale Apoptose nach zerebraler Ischämie.
Anaesthesist **50**, 905-920
- Palkovits, M. u. Brownstein, M. J. (1988)
Maps and guide to microdissection of the rat brain.
Elsevier Science Publishing, New York, 94
- Paxino, G. u. Watson, C. (1998)
The rat brain in stereotaxic coordinates
Academic Press, San Diego, 1998
- Pierce, J. E. S., Smith, D. H., Trojanowski, J. Q., u. McIntosh, T. K. (1998)
Enduring cognitive, neurobehavioral, and histopathological changes persist for up to one year following severe experimental brain injury in rats.
Neuroscience **87**, 359-369
- Pol, H. (2000)
The role of anaesthetic agents as neuroprotective drugs.
Eur J Anaesthesiol **17**, 6-25
- Povlishock, J. T., Erb, D. B., u. Astruc, J. (1992)
Axonal response to traumatic brain injury: reactive axonal change, deafferentation and neuroplasticity.
J Neurotrauma **9**, 189-200
- Priestley, M. (1981)
Spectral analysis and time series.
London: Academic Press, 5-7
- Pulsinelli, W. A., Brierley, J. B., u. Plum, F. (1982)
Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia.
Ann Neurol **11**, 491-498
- Ribas, G. C. u. Jane, J. A. (1992)
Traumatic contusions and intracerebral hematomas.
J Neurotrauma **9**, 265-278
- Rink, A., Fung, K. M., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M. Y., Neugebauer, E., u. McIntosh, T. K. (1995)
Evidence of apoptotic cell death after experimental traumatic brain injury in the rat.
Am J Pathol. **147**, 1575-1583

- Romeis, B. (1989)
Mikroskopische Technik.
Urban und Schwarzenberg Verlag, München, **17. Auflage**, 1-697
- Rose, M. E., Huerbin, M. B., Melick, J., Marion, D. W., Palmer, A. M., Schiding, J. K., Kochanek, P. M., u. Graham, S. H. (2002)
Regulation of interstitial excitatory amino acid concentrations after cortical contusion injury.
Bain Res **935**, 40-46
- Ross, D. T., Meaney, D. F., Sabol, M., Smith, D. H., Thibault, L. E., u. Gennarelli, T. A. (1994)
Distribution of forebrain diffuse axonal injury following inertial closed head injury in miniature swine.
Exp Neurol **126**, 291-299
- Rüsse, I. u. Sinowatz, F. (1991)
Lehrbuch der Embryologie der Haustiere.
Paul Parey Verlag, Berlin/Hamburg, 247-284
- Schmidt, G. N. u. Bischoff, P. (2004)
Neuromonitoring für die Abschätzung der Narkosetiefe.
Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther **39**, 33-63
- Schüttler, J., Schmitz, B., Bartsch, A., u. Fischer, M. (1995)
Untersuchungen zur Effizienz der notärztlichen Therapie bei Patienten mit Schädel-Hirn-bzw. Polytrauma.
Anaesthesist **44**, 850-858
- Shapira, Y., Shohami, E., Sidi, A., Soffer, D., Freeman, S., u. Cotev, S. (1988)
Experimental closed head injury in rats: mechanical, pathophysiologic, and neurologic properties.
Crit Care Med **16**, 258-265
- Shima, K. u. Marmarou, A. (1991)
Evaluation of brainstem dysfunction following severe fluid percussion head injury to the cat.
J Neurosurg **74**, 270-277
- Silbernagl, S. u. Despopoulos, A. (1991)
Taschenatlas der Physiologie.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart/New York, **4. Auflage**, 272-325
- Simons, P. J., Cockshott, I. D., Douglas, E. J., Gordon, E. A., Hopkins, K., u. Rowland, M. (1988)
Disposition in male volunteers of a subanaesthetic intravenous dose of an oil in water emulsion of ¹⁴C-propofol.
Xenobiotica **18**, 429-440
- Sloop, G. D., Roa, J. C., Delgado, A. G., Balart, J. T., Hines III, M. O., u. Hill, J. M. (1999)
Histologic sectioning produces TUNEL reactivity
A potential cause of false-positive staining.
Arch Pathol Lab Med **123**, 529-532

- Smith, D. H., Chen, X. H., Xu, B. N., McIntosh, T. K., Gennarelli, T. A., u. Meaney, D. F. (1997)
 Characterization of diffuse axonal pathology and selective hippocampal damage following inertial brain trauma in the pig.
J Neuropathol Exp Neurol **56**, 822-834
- Smith, D. H., Okiyama, K., Thomas, M. J., Claussen, B., u. McIntosh, T. K. (1991)
 Evaluation of memory dysfunction following experimental brain injury using the Morris water maze.
J Neurotrauma **8**, 259-269
- Smith, D. H., Soares, H. D., Pierce, J. S., Perlman, K. G., Saatman, K. E., Meaney, D. F., Dixon, C. E., u. McIntosh, T. K. (1995)
 A model of parasagittal controlled cortical impact in the mouse: cognitive and histopathologic effects.
J Neurotrauma **12**, 169-178
- Smith, H. P., Kelly, D. L., McWhorter, J. M., Armstrong, D., Johnson, R., Transou, C., u. Howard, G. (1986)
 Comparison of mannitol regimens in patients with severe head injury undergoing intracranial monitoring.
J Neurosurg **65**, 820-824
- Soares, H. D., Hicks, R. R., Smith, D., u. McIntosh, T. K. (1995)
 Inflammatory leukocytic recruitment and diffuse neuronal degeneration are separate pathological processes resulting from traumatic brain injury.
J Neurosci **15**, 8223-8233
- Srinivasan, A., Roth, K. A., Sayers, R. O., Shindler, K. S., Wong, A. M., Fritz, L. C., u. Tomaselli, K. J. (1998)
 In situ immunodetection of activated caspase-3 in apoptotic neurons in the developing nervous system.
Cell Death Differ **5**, 1004-1016
- Stegemann, U. (2004)
 Die Auswirkung von Propofol auf die Expression von Apoptose-assoziierten Proteinen nach inkompletter cerebraler Hemisphärenischämie im zeitlichen Verlauf von 28 Tagen bei der Ratte.
Vet Med Diss LMU München, 1-114
- Stephan, H., Sonntag, H., Schenk, H. D., u. Kohlhausen, S. (1987)
 Einfluss von Disoprivan (Propofol) auf die Durchblutung und den Sauerstoffverbrauch des Gehirns und die CO₂-Reaktivität der Hirngefäße beim Menschen.
Anaesthesist **36**, 60-65
- Stewart, L., Bullock, R., Rafferty, C., Fitch, W., u. Teasdale, G. M. (1994)
 Propofol sedation in severe head injury fails to control high ICP, but reduces brain metabolism.
Acta Neurochir **60**, 544-546
- Sullivan, P. G., Keller, J. N., Bussen, W. L., u. Scheff, S. W. (2002)
 Cytochrome c release and caspase activation after traumatic brain injury.
Bain Res **949**, 88-96

- Tang, Y. P., Noda, Y., Hasegawa, T., u. Nabeshima, T. (1997a)
A concussive-like brain injury model in mice (I): impairment in learning and memory.
J Neurotrauma **14**, 851-862
- Tang, Y. P., Noda, Y., Hasegawa, T., u. Nabeshima, T. (1997b)
A concussive-like brain injury model in mice (II): selective neuronal loss in the cortex and hippocampus.
J Neurotrauma **14**, 863-873
- Tecoult, E., Mesenge, Christian, Stutzmann, J.-M., Plotkine, M., u. Wahl, F. (2000)
Influence of anesthesia protocol in experimental traumatic brain injury.
J Neurosurg Anesthesiol **12**, 255-261
- Thornberry, N. A. u. Lazebnik, Y. (1998)
Caspases: enemies within.
Science **281**, 1312-1316
- Vandesteene, A., Trempont, V., Engelman, E., Deloot, T., Focroul, M., Schoutens, A., u. de Rood, M. (1988)
Effect of propofol on cerebral blood flow and metabolism in man.
Anaesthesia **43**, 42-43
- Velier, J. J., Ellison, J. A., Kikly, K. K., Spera, P. A., Barone, F. C., u. Feuerstein, G. Z. (1999)
Caspase-8 and caspase-3 are expressed by different populations of cortical neurons undergoing delayed cell death after focal stroke in the rat.
J Neurosci **19**, 5932-5941
- Velly, L. J., Guillet, B. A., Masmajan, F. M., Nieoullon, A. L., Bruder, N. J., Guin, F. M., u. Pisano, P. M. (2003)
Neuroprotective effects of propofol in a model of ischemic cortical cell cultures: a role of glutamate and its transporters.
Anesthesiology **99**, 368-375
- Vespa, P. M., Nuwer, M. R., Nenov, V., Hovda, D. A., Bergsneider, M., Kelly, D. F., Martin, N. A., u. Becker, D. P. (1999)
Increased incidence and impact of nonconvulsive and convulsive seizures after traumatic brain injury as detected by continuous electroencephalographic monitoring.
J Neurosurg **91**, 750-760
- Wahjoepramono, E. J., Piek, J., u. Bock, W. J. (1993)
Pre-hospital airway care and control of ventilation in patients with head injuries - A retrospective analysis in 1623 head trauma victims.
Springer Verlag, Berlin/Heidelberg/New York, 184
- Wells, B., Keats, A., u. Cooley, D. (1963)
Increased tolerance to cerebral ischemia produced by general anesthesia during temporary carotid occlusion.
Surgery **54**, 216-223
- Welsch (2003)
Lehrbuch Histologie.
Urban Fischer Verlag, München/Jena, 1-597

- Wennersten, A., Holmin, S., u. Mathiesen, T. (2003)
 Characterization of Bax and Bcl-2 in apoptosis after experimental traumatic brain injury in the rat.
Acta Neuropathol **105**, 281-288
- Werner, C. (2000a)
 Neuroanaesthesie.
 Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 121-142
- Werner, C. (2000b)
 Pathophysiologie der zerebralen Ischämie: Nekrose, Apoptose, Inflammation und potentiell neuroprotektive Interventionen.
 Institut für Anaesthesiologie der Technischen Universität München, Klinikum rechts der Isar, München, 1-8
- Werner, C., Hoffman, W. E., Kochs, E., Albrecht, R. F., u. Schulte am Esch, J. (1992)
 The effects of propofol on cerebral blood flow in correlation to cerebral blood flow velocity in dogs.
J Neurosurg Anesth **4**, 41-46
- Werner, Ch (1997)
 Milde und moderate Hypothermie in der Anästhesie und Intensivmedizin - Neuroprotektive Ansätze
 Refresher Course; Aktuelles Wissen für Anästhesisten, Springer Verlag, Hamburg, 189-197
- Werner, Ch. u. Engelhard, K. (2001)
 Aktuelle Therapie bei schwerem Schädel-Hirn-Trauma.
Anästh Intensivmed **42**, 11-22
- Winer, J. W., Rosenwasser, R. H., u. Jimenez, F. (2001)
 Electroencephalographic activity and serum and cerebrospinal fluid pentobarbital levels in determining the therapeutic end point during barbiturate coma.
J Neurosurg **29**, 739-741
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F. R., u. Currie, A. R. (1980)
 Cell death: the significance of apoptosis.
Int Rev Cytol **68**, 251-306
- Yakovlev, A. G., Knoblach, S. M., Fan, L., Fox, G. B., Goodnight, R., u. Faden, A. I. (1997)
 Activation of CPP32-like caspases contributes to neuronal apoptosis and neurological dysfunction after traumatic brain injury.
J Neurosci **17**, 7415-7424
- Yamasaki, T., Nakakimura, K., Matsumoto, M., Xiong, L., Ishikawa, T., u. Sakabe, T. (1999)
 Effect of graded suppression of the EEG with propofol on the neurological outcome following incomplete cerebral ischemia in rats.
Eur J Anaesthesiol **16**, 320-329
- Zhu, H., Cottrell, J. E., u. Kass, I. S. (1997)
 The effect of Thiopental and Propofol on NMDA- and AMPA-mediated Glutamate Excitotoxicity.
Anesthesiology **87**, 944-951

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung des SHT nach der Glasgow Coma Scale (GCS).....	18
Tabelle 2: Einsatzmöglichkeiten der verschiedenen SHT-Modelle, um gezielt pathophysiologische Aspekte aus der Humanmedizin zu reproduzieren (übernommen von GENNARELLI 1994).....	24
Tabelle 3: Messzeitpunkte der physiologischen Variablen.....	62
Tabelle 4: Schneideprotokoll.....	70
Tabelle 5: Übersicht über die Gruppeneinteilung und die histologische Untersuchung.....	85
Tabelle 6: Mittlerer arterieller Blutdruck, Herzfrequenz und Hämoglobin.....	91
Tabelle 7: Ergebnisse der Blutgasanalyse sowie der Atemfrequenz.....	92
Tabelle 8: Ergebnisse der Blutglukosekonzentration.....	93
Tabelle 9: Läsionsflächen (mm ²) und Läsionsvolumina (mm ³) der SHT/Prop BS1-5 %-Gruppe in der KV-Färbung.....	100
Tabelle 10: Läsionsflächen (mm ²) und Läsionsvolumina (mm ³) der SHT/Prop BS30-40 %-Gruppe in der KV-Färbung.....	101
Tabelle 11: Läsionsflächen (mm ²) und Läsionsvolumina (mm ³) der SHT/Halo-Gruppe in der KV-Färbung.....	102
Tabelle 12: Läsionsflächen (mm ²) und Läsionsvolumina (mm ³) der SHT/Prop BS1-5 %-Gruppe in der HE-Färbung.....	106
Tabelle 13: Läsionsflächen (mm ²) und Läsionsvolumina (mm ³) der SHT/Prop BS30-40 %-Gruppe in der HE-Färbung.....	107
Tabelle 14: Läsionsflächen (mm ²) und Läsionsvolumina (mm ³) der SHT/Halo-Gruppe in der HE-Färbung.....	108
Tabelle 15: Anzahl der eosinophilen Zellen in der CA1-, CA3- und CA4-Region des Hippokampus in der rechten Hemisphäre.....	110
Tabelle 16: Anzahl der eosinophilen Zellen im Gyrus dentatus der rechten Hemisphäre....	112
Tabelle 17: Gesamtanzahl der eosinophilen Zellen in der Hippokampusformation in den drei SHT-Gruppen.....	114
Tabelle 18: Korrelation nach Spearman zwischen dem Läsionsvolumen der Gehirne (mm ³) und der Anzahl eosinophiler Zellen (MW) bzw. zwischen Läsionsvolumen der Gehirne (mm ³) und Gesamtanzahl eosinophiler Zellen (Summe) der drei SHT-Gruppen.....	115

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Arterien an der Gehirnbasis in der Ventralansicht nach (BUDRAS et al. 1996).....	12
Abbildung 2: Hippokampusformation (CA1-CA4-Region) mit den Ästen des Gyrus dentatus (GD) in der Kresylviolett-Färbung.....	14
Abbildung 3: Funktionelle Gliederung der Großhirnrinde in Projektionsfelder (primäre Rindenzonen einer definierten motorischen und sensorischen Funktion) und Assoziationsfelder (violett) (Quelle: Internet).....	16
Abbildung 4: Platzierung des Stempels beim lateralen Controlled Cortical Impact am Rattengehirn mit Übersicht über die angrenzenden Gehirnregionen.....	20
Abbildung 5: Darstellung des primären und sekundären Hirnschadens nach einem Schädel-Hirn-Trauma (SHT) (nach KOLENDA 1999).....	25
Abbildung 6: Extrinsische und intrinsische Apoptosekaskade (nach PADOSCH et al. 2001).....	31
Abbildung 7: Circulus vitiosus der traumatisch bedingten Raumforderung. ICP=intrakranieller Druck, CPP=zerebraler Perfusionsdruck, CVR=zerebraler Gefäßwiderstand, CBV=zerebrales Blutvolumen (übernommen von BAETHMANN et al. 1997).....	34
Abbildung 8: Molekülstruktur von Propofol.....	41
Abbildung 9: Molekülstruktur von Halothan.....	47
Abbildung 10: Einteilung der klassischen Frequenzbänder (modifiziert nach SCHMIDT u. BISCHOFF 2004).....	50
Abbildung 11: Bildliche Darstellung von Burst-Suppression-Mustern im EEG (modifiziert nach SCHMIDT u. BISCHOFF 2004).....	50
Abbildung 12: Links: Beispielhafte Darstellung von einer Burst-Suppression-Ratio von 1-5 %; Rechts: Burst-Suppression-Ratio von 30-40 % (modifiziert nach SCHMIDT u. BISCHOFF 2004).....	51
Abbildung 13: Schematische Übersicht über den operativen Abschnitt des Versuchs.....	57
Abbildung 14: Anatomische Begrenzungslinien: kranial (links) Bregma, kaudal (rechts) Lambda und in der Mitte die Sutura sagittalis.....	65
Abbildung 15: Links: Druckluftbetriebener Schussapparat, Rechts: Präparationsstelle mit aufgesetzter Führungshülse.....	66
Abbildung 16: Übersicht über die histologische Untersuchung.....	71

Abbildung 17: (Vergr.: 400 x): HE-Färbung rechte CA1-Region 6 h post Trauma, eosinophile Zellen sichtbar (s. Pfeile).....	78
Abbildung 18: (Vergr.: 200 x): HE-Färbung rechter Gyrus dentatus und CA4-Region des Hippokampus 6 h post Trauma, eosinophile Zellen sichtbar (s. Pfeile).....	78
Abbildung 19: (Vergr. 10 x, Kresylviolett-Färbung, Schnittebene: 8500 µm): aufgelockertes Gewebe im rechten Kortex 6 h post Trauma sichtbar (s. Pfeil).....	83
Abbildung 20: (Vergr.: 10 x, Hämatoxylin Eosin-Färbung, Schnittebene: 7000 µm): aufgelockertes Gewebe und minimale Einblutungen im rechten Kortex 6 h post Trauma erkennbar (s. Pfeile).....	83
Abbildung 21: (Vergr.: 10 x, akt. Caspase-3/NeuN-Färbung, Schnittebene: 7000 µm): aufgelockertes Gewebe im rechten Kortex 6 h post Trauma erkennbar (s. Pfeil).....	83
Abbildung 22: Glukosekonzentration (MW±SD) der vier Versuchsgruppen über die Zeit (h nach SHT).....	94
Abbildung 23: Übersicht über die Dosierung des 2 %igen Propofols (mg/kg/h) über die Zeit (h nach SHT) der zwei Propofolgruppen zur Erhaltung der geforderten Burst-Suppression-Ratio.....	96
Abbildung 24: Grafische Darstellung der Burst-Suppression-Ratio (MW±SD) der zwei Propofolgruppen über die Zeit (h nach SHT).....	97
Abbildung 25: Vergleichende grafische Darstellung der Mittelwerte (MW) und des Standardfehlers (SEM) von den Läsionsflächen (mm ²) der Gehirne der Tiere der drei SHT-Gruppen (SHT/Prop BS1-5 % (n = 8), SHT/Prop BS30-40 % (n = 7) und SHT/Halo (n = 8)) im jeweiligen Abstand (mm) vom definierten Nullpunkt in der Kresylviolett- (KV-) Färbung.....	99
Abbildung 26: Vergleichende grafische Darstellung der Mittelwerte (MW) und des Standardfehlers (SEM) von den Läsionsflächen der Gehirne (mm ²) der Tiere der drei SHT-Gruppen (SHT/Prop BS1-5 % (n = 8), SHT/Prop BS30-40 % (n = 7) und SHT/Halo (n = 8)) im jeweiligen Abstand (mm) vom definierten Nullpunkt in der Hämatoxylin Eosin- (HE-) Färbung.....	104
Abbildung 27: Grafische Darstellung der Korrelation zwischen dem Läsionsvolumen der Gehirne (mm ³) der Tiere der drei SHT Gruppen (SHT/Prop BS1-5 % (n = 8), SHT/Prop BS30-40 % (n = 7) und SHT/Halo (n=8)) in der Hämatoxylin Eosin-Färbung und der Gesamtanzahl eosinophiler Zellen (Summe) im Hippokampus.....	116
Abbildung 28: (Vergr.: 400 x) SHT/Halo: akt. Casp-3/NeuN, rechte CA1-Region 6 h post Trauma, Caspase positive Neuronen sichtbar (s. Pfeile).....	118
Abbildung 29: (Vergr.: 400 x) SHT/Prop BS30-40 %:akt. Casp-3/NeuN, rechte CA4-Region 6 h post Trauma, Caspase positive Neuronen sichtbar (s. Pfeile).....	118

Abbildung 30: (Vergr.: 400 x) SHT/Prop BS1-5 %: akt. Casp-3/NeuN, rechter Gyrus dentatus 6 h post Trauma, Caspase positive Neuronen sichtbar (s. Pfeile).....	118
Abbildung 31: (Ausschnitt von Abb. 28) SHT/Prop BS1-5 %: akt. Casp-3/NeuN, rechter Gyrus dentatus 6 h post Trauma, Caspase positive Neuronen sichtbar (s. Pfeile).....	118
Abbildung 32: Beispiel eines Gehirns mit starker Einblutung aus der Gruppe SHT/Prop BS1-5 %: Aufsicht auf das entnommene Rattengehirn mit umschriebenem traumatisierten Areal auf dem rechten Parietal-/Temporallappen.....	119
Abbildung 33: zweites Beispiel eines Gehirns aus der Gruppe SHT/Prop BS1-5 % mit starker Einblutung des Gehirns: Aufsicht auf das entnommene Rattengehirn mit umschriebenem traumatisierten Areal auf dem rechten Parietal-/Temporallappen.....	119
Abbildung 34: Beispiel eines Gehirns mit diffuser moderater Einblutung aus der SHT/Prop BS30-40 %-Gruppe: Aufsicht auf das entnommene Rattengehirn mit umschriebenem traumatisierten Areal auf dem rechten Parietal-/Temporallappen.....	120
Abbildung 35: Gehirn aus der Gruppe SHT/Halo mit diffuser schwacher Einblutung des Gehirns : Aufsicht auf das entnommene Rattengehirn mit umschriebenem traumatisierten Areal auf dem rechten Parietal-/Temporallappen.....	120
Abbildung 36: Beispielhafte Darstellung eines HE-gefärbten Hirngewebeschnittes aus der Gruppe SHT/Prop BS1-5 %: eingebluteter dritter Ventrikel 6 h post Trauma im Abstand von 1000 µm vom definierten Nullpunkt (s. Pfeil).....	120
Abbildung 37: Beispielhafte Darstellung eines HE-gefärbten Gehirns eines Tiers der Gruppe SHT/Prop BS30-40 %: massive Einblutung in den rechten Kortex 6 h post Trauma im Abstand von 5000 µm vom definierten Nullpunkt, aufgelockertes Gewebe drumherum gut sichtbar (s. Pfeile).....	121
Abbildung 38: Beispielhafte Darstellung eines HE-gefärbten Gehirns aus der Gruppe SHT/Prop BS1-5 % mit „gestauchtem“ Hippokampus (s. Pfeil) 6 h post Trauma im Abstand von 7000 µm vom definierten Nullpunkt.....	121
Abbildung 39: (stammt aus eigenem Vorversuch): (Vergr.:25 x): KV-Färbung: rechte Hemisphäre 14 d post Trauma. Evtl. zu spät: Gliazellnarbe, totaler Gewebsverlust sichtbar (s. Pfeile).....	128
Abbildung 40: (Vergr.: 40 x): KV-Färbung: rechte Hemisphäre 6 h post Trauma. Evtl. zu früh: zu geringer Schaden, noch nicht voll ausgeprägt (s. Pfeile).....	128

10. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A.	Arteria
Aa.	Arteriae
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
BHS	Bluthirnschranke
BS	Burst-Suppression
bzw.	beziehungsweise
ca.	Circa
Ca ²⁺	Kalzium
CBF	zerebraler Blutfluss
CCI	Controlled cortical impact
Cl ⁻	Chlorid
cm	Zentimeter
CMR	zerebrale Stoffwechselrate
CMRO ₂	zerebrale Sauerstoffaufnahme
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPP	zerebraler Perfusionsdruck
CVR	zerebraler Gefäßwiderstand
d.h.	das heißt
DNS	Desoxyribonucleinsäure
EAA _s	exzitatorische Aminosäuren
EEG	Elektroenzephalogramm
EKG	Elektrokardiogramm
et al.	und andere
etc.	et cetera
evtl.	eventuell
Fa.	Firma
Fi	inspiratorische Fraktion
FP-Modell	Fluid-percussion-Modell
g	Gramm
GABA _A	Gamma-Amino-Buttersäure

GCS	Glasgow Coma Scale
GD	Gyrus dentatus
h	Stunden
H ⁺	Wasserstoffion
HE	Hämatoxylin Eosin (-Färbung)
HF	Herzfrequenz
ICP	intrakranieller Druck
I. E.	Internationale Einheiten
i. v.	Intravenös
K ⁺	Kalium
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
KV	Kresylviolett (-Färbung)
L	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
li	links
M.	Musculus
MAP	mittlerer arterieller Blutdruck
max.	maximal
mg	Milligramm
min.	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MW	Mittelwert
n	Anzahl
N ₂ O	Stickoxydul (Lachgas)
Na ⁺	Natrium
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
O ₂	Sauerstoff
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
paCO ₂	arterieller Kohlendioxidpartialdruck
paO ₂	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PBS	gepuffertes Natriumphosphat
pH	arterieller pH-Wert

PNS	peripheres Nervensystem
re	rechts
RNS	Ribonukleinsäure
s.	siehe
S.	Seite
SD	Standardabweichung
Sek.	Sekunden
SHT	Schädel-Hirn-Trauma
SHAM	Scheinversuch
SHT/Halo	Tiere der SHT/Halothan-Gruppe
SHT/Prop BS1-5 %	Tiere der SHT/Propofol-Gruppe mit einer Burst-Suppression-Ratio von 1-5 %
SHT/Prop BS30-40 %	Tiere der SHT/Propofol-Gruppe mit einer Burst-Suppression-Ratio von 30-40 %
sog.	sogenannt
Tab.	Tabelle
TBI-Modell	traumatic-brain-injury-Modell
tHb	Gesamt-Hämoglobin
TUNEL	terminal transferase mediated dUTP-biotin nick end labeling
u.a.	unter anderem
u.	und
V.	Vena
Vv.	Venae
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
Vol. %	Volumenprozent
%	Prozent
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

11. Danksagung

Mein großer Dank gilt zugleich Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dipl. phys. E. Kochs, Direktor, und Herrn Univ.-Prof. Dr. med. C. Werner, leitender Oberarzt der Klinik für Anaesthesiologie der TU München, für die Überlassung des Themas und die stets vorhandene Bereitschaft zur hilfreichen Diskussion.

Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. B. Gänsbacher, Direktor des Instituts für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der TU München, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. vet. W. Schmahl danke ich für die hilfreichen histologischen Sitzungen und die Übernahme der Arbeit an die Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Ein ganz herzlicher Dank geht an meine Kolleginnen der Forschungsgruppe „Neuroprotektion“ in der Klinik für Anaesthesiologie der TU München, Frau Dr. med. vet. Eva Eberspächer, Frau Dr. med. Kristin Engelhard und Frau Dr. med. vet. Uta Stegemann. Insbesondere Frau Dr. med. vet. Eva Eberspächer möchte ich für die Ausführung des operativen Teils dieser Studie, für ihren unglaublichen Optimismus, ihre hohe Motivation und ihren permanenten Rückhalt in allen Fragen herzlich danken. Ich hätte keine bessere Betreuerin haben können.

Zudem bedanke ich mich besonders bei Herrn Prof. Dr. med. vet. Dr. med. habil. W. Erhardt für die Durchsicht des Manuskripts und die jederzeit freundliche Beratung.

Ein herzlicher Dank gilt auch Frau Anne Frye für ihre große Hilfe bei der histologischen Aufbereitung, ebenso wie Kristine Kellermann die mir hilfreich in allen, für mich schier unlösbaren, Computerproblemen zur Seite stand.

Dankeschön auch an meinen Vorgänger Dieter Winner für die hilfsbereite Einführung in die histologischen Techniken und für die nette Zusammenarbeit. Auch bei den anderen Kolleginnen und Kollegen des Labors Gebäude 522 möchte ich mich herzlich für ihre Unterstützung bedanken.

Bei meiner Familie und meinem Freund Johannes möchte ich mich besonders für ihre Unterstützung auf meinem Lebensweg bedanken

12. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Kerstin Katja Heimann
Geburtsdatum: 06. April 1976
Geburtsort: München
Nationalität: deutsch
Konfession: evangelisch
Eltern: Kurt Heimann, Maschinenbauing. und Betriebswirt,
verstorben am 10.12.2002
Gudrun Heimann, geb. Deutsch
Sonderschullehrerin
Geschwister: Andreas Heimann
Student der Fahrzeugtechnik

Schulischer Werdegang

1982 – 1986 Grundschule in Schondorf
1986 – 1993 Städt. Ignaz- Kögler Gymnasium, Landsberg am Lech
1993 – 1995 Gymnasium in Schondorf am Ammersee
mit Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife

Berufsausbildung

1995 – 1997 Ausbildung zur Tierarzhelferin
1997 – 2003 Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München
März 2003 Approbation zur Tierärztin

Während des Studiums absolvierte Praktika:

12.02.01 – 01.04.01: Kleintierpraxis von Dr. Ernst Meier in Dießen
11.02.02 – 29.03.02: 1. Medizinischen Kleintierklinik München
15.04.02 – 31.05.02 Schlachthofpraktikum in Buchloe, Fa. Moksel AG
03.06.02 – 19.07.02: bei Dr. Hubertus Nebe, Fachtierarzt für Pferde, Bad Wörishofen

Seit April 2003 Promotionsstudium der Veterinärmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München

Seit dem 01.01.2005 Anstellung als Assistenztierärztin in der Kleintierpraxis von Dr. Stefan Dahnke in Mindelheim

