

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

Veränderungen der zerebralen Mikrozirkulation nach experimentellem Schädel-Hirn Trauma bei der Maus

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

vorgelegt von
Susanne Schwarzmaier
aus München
2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Nikolaus Plesnila

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Martin Dichgans

Mitberichterstattung: Prof. Dr. med. Bernhard Becker

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

Tag der mündlichen Prüfung: 18.06.2009

Mama und Papa

Inhaltsverzeichnis:

1. EINLEITUNG:.....	6
1.1. Epidemiologie.....	6
1.2.1. Zerebrale Durchblutung.....	8
1.2.2. Leukozyten.....	11
1.3. Ziel der Arbeit:.....	13
2. MATERIAL UND METHODEN.....	15
2.1. Tiere.....	15
2.2. Experimenteller Aufbau.....	16
2.2.1. Narkose und Erfassung physiologischer Parameter.....	16
2.2.2. Präparation der kraniellen Fenster.....	17
2.2.4. Färbungen.....	18
2.2.5. Intravitalmikroskopie.....	18
2.3. Versuchsprotokoll.....	19
2.3.1. Untersuchung der Mikrozirkulation bis 120 Minuten nach Schädel-Hirn Trauma.....	19
2.3.2. Untersuchung der Leukozyten-Endothel Interaktion bis 14 h nach Schädel-Hirn Trauma.....	20
2.3.3. Inhibition der posttraumatischen Leukozyten-Endothel Interaktion mit Anti-CD18 Antikörpern.....	21
2.4. Analyse der intravitlamikroskopischen Aufnahmen.....	22
2.5. Bestimmen des Kontusionsvolumens und der Leukozytenakkumulation im Gewebe.....	24
2.6. Statistische Analyse.....	25
3. ERGEBNISSE.....	26
3.1. Modelletablierung.....	26
3.2. Veränderungen der Mikrozirkulation bis 120 Minuten nach Schädel-Hirn Trauma.....	29
3.2.1. Arterieller Gefäßdurchmesser.....	29
3.2.2. Leukozyten-Endothel Interaktionen.....	31
3.2.3. Leukozyten/Thrombozyten Aggregate.....	33
3.2.4. Entstehung von Mikrothromben.....	36
3.2.5. Blutflussgeschwindigkeit.....	38
3.3. Entzündungsreaktion bis 14h nach Schädel-Hirn Trauma.....	40
3.3.1. Leukozyten-Endothel Interaktion (LEI).....	40
3.3.2. Bildung von Aggregaten.....	42
3.3.3. Nekrosewachstum nach Schädel-Hirn Trauma.....	44
3.3.4. Leukozytenakkumulation in Kontusion und Penumbra.....	44

3.4. Hemmung der Leukozyten-Endothel Interaktion mit Anti-CD18 Antikörpern oder Kontroll IgG	47
3.4.1. Veränderungen der Leukozyten-Endothel Interaktion	47
3.4.2. Veränderungen der Aggregat-Endothel Interaktion.....	49
3.4.3. Sekundäres Nekrosewachstum nach Injektion von Anti-CD18 Antikörpern oder Kontroll IgG.....	50
4. DISKUSSION	52
4.1. Zerebrale Durchblutung nach Schädel-Hirn Trauma.....	52
4.1.1. Modelletablierung	54
4.1.2. Arterieller Gefäßdurchmesser	56
4.1.3. Bildung von Aggregaten	58
4.1.4. Mikrothromben.....	59
4.1.5. Blutflussgeschwindigkeit.....	61
4.2. Leukozyten	64
4.2.1. Bedeutung der Leukozyten für die Pathophysiologie des sekundären Nekrosewachstums	64
4.2.2. Leukozytenakkumulation im Gewebe.....	66
4.2.3. Intravaskuläre Leukozyten, Leukozyten-Endothel Interaktion	67
5. ZUSAMMENFASSUNG	70
5.1. Zerebraler Blutfluss nach Schädel-Hirn Trauma	70
5.2. Bedeutung der Leukozyten für das sekundäre Nekrosewachstum	70
6. LITERATUR	72
7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	92
8. DANKSAGUNG.....	94
9. PUBLIKATIONEN.....	96
10. LEBENSLAUF	97

1. EINLEITUNG:

1.1. Epidemiologie

Die häufigste Todesursache bei Unfällen ist das schwere Schädel-Hirn Trauma (Statistisches Bundesamt Wiesbaden 1998). Im Jahr 2000 erlitten etwa 180.000 Menschen in Deutschland ein Schädel-Hirn Trauma, das entspricht einer Inzidenz von 225/100.000. Jährlich versterben in Deutschland etwa 8000 Patienten daran, weitere 2500 Patienten überleben mit teilweise schweren Behinderungen und bleiben lebenslang pflegebedürftig (Baethmann et al., 2002).

In einer prospektiven, multizentrischen Studie im Großraum Hannover und Münsterland im Zeitraum 2000-2001 betrug die Inzidenz des Schädel-Hirn Traumas 332/100.000. Gemessen am Glasgow Coma Scale erlitten 90,9% der Patienten ein leichtes, 3,9% ein mittelschweres und 5,2% ein schweres Schädel-Hirn Trauma. Damit betrug die Inzidenz für das schwere Schädel-Hirn Trauma 17/100.000. In der Studie fanden sich drei Häufigkeitsgipfel in der Altersverteilung. Demnach waren vor allem Kleinkinder im Alter von 1-5 Jahren, junge Erwachsene im Alter von 25-45 Jahren sowie Personen in der Altersgruppe über 75 Jahre vermehrt betroffen. Insgesamt war nahezu jeder dritte Patient (29,7%) jünger als 16 Jahre (Möllmann, 2006).

Der Häufigkeitsgipfel bei Jugendlichen und jungen Erwachsenen zeigt sich auch in den Angaben des U.S. National Center for Health Statistics. Dort wird das Schädel-Hirn Trauma eindeutig als die häufigste Todesursache in der Altersgruppe von 0-45 Jahren dargestellt.

1.2. Pathophysiologie

Bereits während eines traumatischen Ereignisses kommt es durch die mechanische Krafteinwirkung zu einer irreversiblen Schädigung des Hirnparenchyms, dem sogenannten Primärschaden. Dieser Schaden breitet sich auf Grund sekundärer Vorgänge mit der Zeit weiter aus. Dass der posttraumatische Hirnschaden aus zwei Komponenten besteht, konnte experimentell durch eine ganze Reihe von Untersuchungen an Ratten und Mäusen nachgewiesen werden. 15 Minuten nach experimentellem Schädel-Hirn Trauma wurde die Größe des Primärschadens bestimmt. Dessen Volumen wurde mit dem Kontusionsvolumen genau 24 Stunden nach experimentellem Schädel-Hirn Trauma, welches dem Ausmaß des Gesamtschadens entspricht, verglichen. Dabei zeigt sich, dass der Primärschaden etwa 60% des Gesamtschadens ausmacht (Eriskat et al., 1994; Murakami et al., 1997; Friedrich et al., 2000; Stoffel et al., 2001; Plesnila et al., 2003; Zweckberger et al., 2003; Zweckberger et al., 2006; Engel et al., 2008; von Baumgarten et al., 2008), die restlichen 40% entstehen verzögert, d.h. sekundär. Das Gewebe, das sekundär untergeht, liegt in der sogenannten Penumbra rings um die Primärkontusion. Diesen Anteil am Gesamtschaden könnte man möglicherweise therapeutisch beeinflussen, wenn die genauen Pathomechanismen der Entstehung bekannt wären (Abb.1).

Verschiedene pathophysiologische Mechanismen, wie metabolische Entgleisung, oxidativer Stress, NMDA vermittelte Exzitotoxizität, Apoptose und Entzündungsreaktionen, spielen eine wichtige Rolle für die Entstehung des sekundären Hirnschadens (Baethmann et al., 1988; Sahuquillo et al., 2001; Gaetz, 2004). Zusätzlich kommt es innerhalb kurzer Zeit nach Schädel-Hirn Trauma zur Entstehung eines Hirnödems und eines intrakraniellen Druckanstieges. Die daraus resultierende Minderdurchblutung des Gehirns führt gemeinsam mit den oben genannten Mechanismen auf molekularer Ebene zum Untergang der traumatischen Penumbra (Lynch and Dawson, 1994; Ghajar, 2000; Zweckberger et al., 2003; Zweckberger et al., 2006).

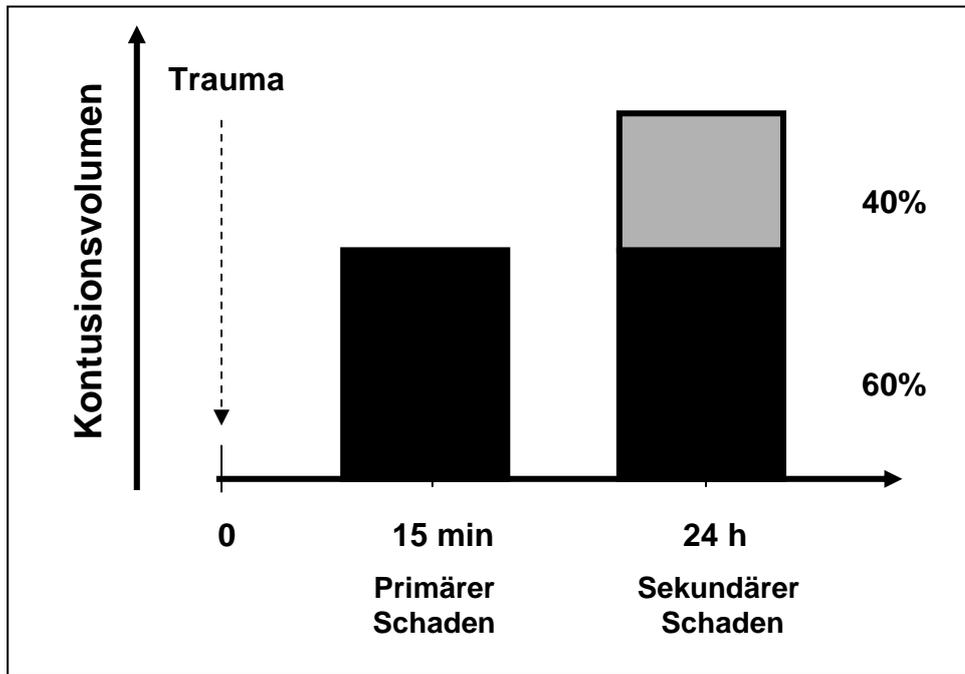


Abb.1: Sekundäres Nekrosewachstum nach experimentellem Schädel-Hirn Trauma (CCI).

1.2.1. Zerebrale Durchblutung

Eine ganze Reihe klinischer Studien sprechen für einen direkten Zusammenhang zwischen einer frühen Reduktion der zerebralen Durchblutung und dem Krankheitsverlauf nach Schädel-Hirn Trauma. Insbesondere ist der frühe CBF-Abfall in den ersten Stunden nach Trauma mit einer höheren Mortalität und einem schlechteren neurologischen Outcome bei den Überlebenden vergesellschaftet (Graham and Adams, 1971; Bouma et al., 1991; Marion et al., 1991; Bullock et al., 1992; Bouma and Muizelaar, 1992; Schroder et al., 1995; Garnett et al., 2001; von Oettingen et al., 2002).

Auch mehrere tierexperimentelle Studien geben Anhalt dafür, dass der reduzierte CBF eine wichtige Rolle für die Entstehung des sekundären Hirnschadens spielt, und zwar vor allem innerhalb der ersten 120 Minuten nach Trauma. Es gibt zahlreiche Berichte über einen reduzierten CBF in der Kontusion selbst sowie in der Penumbra. Innerhalb der ersten Stunden nach Trauma konnte sowohl nach Fluid Percussion Injury (FPI) (Wei et al., 1980; Dewitt et al., 1986; Ishige et al., 1987; McIntosh et al., 1987; Yuan et al., 1988; Yamakami

and McIntosh, 1989; Yamakami and McIntosh, 1991; Dewitt et al., 1992; Muir et al., 1992; Dietrich et al., 1996) als auch nach Kälteläsion (Zhuang et al., 1992; Plesnila et al., 2003) eine massive Minderdurchblutung gezeigt werden. Laser-Doppler Messungen nach fokaler Kälteläsion zeigen vor allem in der Kontusion aber auch in der Penumbra eine sofortige Verminderung der zerebralen Durchblutung auf Werte bis zu 40% der Ausgangsmessung, während es im restlichen Gehirn sogar zur Hyperperfusion kommt (Plesnila et al., 2003). Dieser initiale Abfall der Durchblutung zeigt sich ebenfalls bei Versuchen mit dem in der vorliegenden Studie verwendeten Controlled Cortical Impact Model (Sutton et al., 1993; Cherian et al., 1994; Kochanek et al., 1995; Bryan, Jr. et al., 1995; Hendrich et al., 1999; Liu et al., 2002; Lundblad et al., 2004; Zweckberger et al., 2006; Engel et al., 2008; von Baumgarten et al., 2008).

Da die Neuronen der Penumbra nicht initial sondern erst im Verlauf der folgenden Stunden absterben, wird der Durchblutung gerade in dieser Region eine wichtige Rolle zugesprochen. Sowohl in klinischen als auch in experimentellen Studien ist der CBF offensichtlich ein wichtiger Prognosefaktor für das neurologische Outcome (Dewitt and Prough, 2003). Weil eine reduzierte zerebrale Durchblutung zur posttraumatischen Minderversorgung in der sehr empfindlichen Penumbra führen kann, wird die frühe zerebrale Durchblutung sogar als der wichtigste Parameter in der Pathophysiologie des sekundären Hirnschadens nach Trauma postuliert (Miller, 1985).

Die Durchblutungsveränderungen in der perikontusionellen Penumbra werden in der Literatur in mehrere Phasen eingeteilt. Dabei wird aus einer Reihe experimenteller Studien ersichtlich, dass die frühe Phase nach Trauma, d.h. die ersten 120 Minuten, vor allem von einem akuten Abfall der zerebralen Durchblutung auf etwa 40-50% des Ausgangswertes bestimmt wird (Yamakami and McIntosh, 1989; Armstead and Kurth, 1994; Kochanek et al., 1995; Bryan, Jr. et al., 1995; Dietrich et al., 1996; Nilsson et al., 1996; Plesnila et al., 2003; Ahn et al., 2004; Engel et al., 2008; von Baumgarten et al., 2008).

In klinischen Studien zeigt sich ebenfalls ein drastischer Abfall der zerebralen Durchblutung innerhalb der ersten 12 h bis maximal 24 h nach Trauma. Dieser anfänglichen

Minderperfusion folgt eine Phase der Hyperperfusion bis etwa zum 3.-5.Tag. Im Anschluss kommt es erneut zur Reduktion der Durchblutung, die in dieser Spätphase allerdings mehrere Tage oder sogar Wochen andauern kann (Obrist et al., 1984; Mendelow et al., 1985; Marion et al., 1991; Kelly et al., 1997; Martin et al., 1997; van Santbrink et al., 2002; Hattori et al., 2003).

Bisher wurden verschiedene Hypothesen zur Pathophysiologie der akut reduzierten zerebralen Durchblutung nach Trauma diskutiert, da sich die initiale Minderperfusion in den ersten Minuten bis Stunden nach Trauma nicht auf den intrakraniellen Druckanstieg zurückführen lässt (Zweckberger et al., 2003). Daher müssen andere, bisher nicht untersuchte Mechanismen für diesen frühen Durchblutungsabfall verantwortlich sein.

Prinzipiell können drei verschiedene Mechanismen die posttraumatische Minderdurchblutung verursachen. Eine Vasokonstriktion, sowohl arteriell als auch venös, sowie Vasospasmen könnten die Durchblutung deutlich beeinträchtigen. Bisher wurde nach experimentellem Schädel-Hirn Trauma vor allem eine Konstriktion zerebraler Arterien und Arteriolen beobachtet (Smith et al., 1969; Wei et al., 1980; Armstead and Kurth, 1994; Dietrich et al., 1994; Zwienerberg and Muizelaar, 2001; Golding, 2002; Thomale et al., 2002). Diesen Daten stehen allerdings andere Veröffentlichungen, die von einer posttraumatischen Vasodilatation berichten, gegenüber (Dewitt et al., 1986; Thomale et al., 2002).

Eine dritte mögliche Ursache der initialen Minderperfusion nach Schädel-Hirn Trauma könnte die Entstehung von Mikrothromben sein, die vor allem die kleinen Gefäße und Kapillaren verschließen. Mehrere Studien berichten von solchen Mikrothromben oder Thromben, die nach Trauma beobachtet wurden. Alle diese Daten wurden histologisch durch Untersuchungen des Gewebes nach experimentellem Schädel-Hirn Trauma (Hekmatpanah and Hekmatpanah, 1985; Dietrich et al., 1994; Dietrich et al., 1996; Bramlett and Dietrich, 2004; Stein et al., 2004) oder nach Schädel-Hirn Trauma bei Patienten erhoben (Graham and Adams, 1971; Stein et al., 2004).

Smith et al. haben bereits 1969 die posttraumatische Entstehung von Mikrothromben *in vivo* beschrieben. In einer deskriptiven Studie beobachteten sie den thrombotischen Verschluss

von Gefäßen in der noch nicht nekrotischen Penumbra (Smith et al., 1969). Eine quantitative Erfassung der Ergebnisse wurde aufgrund der damaligen Möglichkeiten jedoch nicht erstellt. Es wurden nur einzelne Versuche an verschiedenen Tierarten durchgeführt. Zudem wurden keine speziellen Färbungen verwendet, die es ermöglicht hätten, die verschiedenen pathophysiologischen Reaktionen einzeln zu beobachten. Wichtige physiologische Parameter wie der mittlere arterielle Blutdruck (MAP), end-expiratorischer pCO₂ und arterielle Blutgase, welche die zerebrale Mikrozirkulation maßgeblich beeinflussen, wurden ebenfalls nicht gemessen.

1.2.2. Leukozyten

Verschiedenen Entzündungsprozessen, und dabei insbesondere der Leukozyten-Endothel Interaktion (LEI), wird eine wichtige Rolle für die Entstehung des sekundären Hirnschadens nach Schädel-Hirn Trauma zugesprochen.

Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) ist ein endotheliales Adhäsionsmolekül, das eine wichtige Rolle für die Adhärenz der Leukozyten spielt (Rothlein et al., 1986). Der Entsprechende Ligand auf Leukozyten ist das Macrophage-1 Antigen (Mac-1, CD11b/CD18), ein β 2-Integrin (Diamond and Springer, 1993).

Antikörper gegen ICAM-1 oder den entsprechenden Gegenrezeptor auf Leukozyten, CD18, führten zu einer signifikanten Verminderung des Infarktolumens nach transientser fokaler Ischämie, einem experimentellen Modell des Schlaganfalls (Chopp et al., 1994; Zhang et al., 1994b; Soriano et al., 1996; Soriano et al., 1999). Der Zusammenhang zwischen einer akuten postischämischen Entzündungsreaktion und der Entstehung des sekundären Hirnschadens nach Ischämie wurde von Feuerstein ausführlich diskutiert (Feuerstein et al., 1997).

Im Gegensatz dazu sind die Daten und Hypothesen zur Rolle inflammatorischer Prozesse nach Schädel-Hirn Trauma deutlich kontroverser (Whalen et al., 1999a; Whalen et al., 1999c; Whalen et al., 2000; Morganti-Kossmann et al., 2002; Konsman et al., 2007).

Nach Closed Head Injury, einem experimentellen Schädel-Hirn Trauma Modell, führte die Hemmung von TNF-alpha zu einer Reduktion des Hirnödems und verminderte die Permeabilität der Blut-Hirn Schranke sowie den Zellverlust im Hippokampus bei gleichzeitiger Verbesserung der neurologischen Funktion (Shohami et al., 1996; Shohami et al., 1997). Zhuang zeigte 1993, dass die Akkumulation von polymorphonuklearen Leukozyten im Gehirn positiv mit einem Anstieg des ICP und der Entstehung eines Hirnödems korrelierte, während gleichzeitig ein Abfall des CBF zu beobachten war (Zhuang et al., 1993). 24h nach Trauma zeigten Mäuse mit T- und B- Zell Defizit eine signifikante Verminderung des Kontusionsvolumens im Vergleich zu C57/Bl6 Kontrolltieren. Zudem konnte der Hirnschaden bei Wildtypmäusen durch die Behandlung mit T-Zell hemmenden Medikamenten deutlich verringert werden (Fee et al., 2003).

Sowohl Antikörper gegen ICAM-1 als auch unspezifische Kontroll IgG verbesserten die neurologische Funktion nach Fluid Percussion Injury (FPI), einem weiteren, weit verbreiteten experimentellen Schädel-Hirn Trauma Modell, im Vergleich zur Therapie mit isotoner Kochsalzlösung. Hierbei war auch die Leukozytenakkumulation im Gewebe vermindert (Knobloch and Faden, 2002). Die Therapie mit Anti-CD18 Antikörpern resultierte in einer starken Reduktion der Leukozytenadhärenz am Endothel und verhinderte gleichzeitig eine posttraumatische arterielle Vasodilatation (Hartl et al., 1997b). Im Gegensatz dazu hatte die Hemmung des CD18 Rezeptors überraschender Weise keinen Einfluss auf die Integrität der Blut-Hirn-Schranke (Hartl et al., 1997a; Whalen et al., 1999c). Es wird daher vermutet, dass ICAM-1 auch eine von den Leukozyten unabhängige Rolle in der Pathophysiologie des sekundären Hirnschadens spielt (Whalen et al., 2000; Morganti-Kossmann et al., 2002). Diese Hypothese wurde durch eine Studie von Whalen bestärkt, in der gezeigt wurde, dass das posttraumatische Hirnödem in P-Selektin und ICAM-1 doppel knock-out Mäusen reduziert war, während die Leukozytenakkumulation im Gewebe nicht beeinflusst wurde (Whalen et al., 2000).

Nur wenige klinische Studien enthalten Daten, die Beobachtungen von Leukozyten innerhalb der ersten Stunden nach Trauma betreffen. In der frühen Phase nach Schädel-Hirn Trauma

scheint sich die Entzündungsreaktion vor allem intravaskulär abzuspielen (Holmin et al., 1998). Diese Beobachtung wird auch durch experimentelle Daten unterstützt, die zeigen, dass die maximale Leukozytenakkumulation im Gewebe in der Zeit zwischen 24 h und 48 h nach Trauma auftritt (Clark et al., 1994; Soares et al., 1995; Carlos et al., 1997).

Es bleibt jedoch offen, wann genau die Leukozyten beginnen, mit dem Gefäßendothel zu interagieren und in das Gewebe zu migrieren und ob und wie sie dadurch die Entstehung des sekundären Hirnschadens beeinflussen.

1.3. Ziel der Arbeit:

Diese Arbeit verfolgte mehrere Ziele:

1. Bisher ist nicht geklärt, wie es bereits in den ersten Minuten bis Stunden nach Trauma zu dem häufig beobachteten deutlichen Abfall der zerebralen Durchblutung in der traumatischen Penumbra kommt. Für diese Untersuchung wurde ein Model etabliert, mit dem die zerebrale Mikrozirkulation *in vivo* vor und nach Trauma in genau denselben Gefäßen beobachtet werden kann, während die systemischen Parameter Blutdruck, endexpiratorischer CO₂, Temperatur und arterielle Blutgase, von denen bekannt ist, dass sie die zerebrale Mikrozirkulation beeinflussen, kontinuierlich erfasst und konstant gehalten werden können.

Mit diesem Modell sollte die Hypothese untersucht werden, dass eine Vasokonstriktion und/oder die Bildung von Mikrothromben am frühen posttraumatischen Abfall der zerebralen Durchblutung beteiligt sind. Mit Hilfe der Intravitalmikroskopie (IVM) wurden der Gefäßdurchmesser und die Entstehung von Mikrothromben in der perikontusionellen Penumbra beobachtet und mit der Mikrozirkulation unter Ausgangsbedingungen in exakt denselben Gefäßen verglichen.

2. Wie oben zitiert könnten Leukozyten eine wichtige Rolle für den sekundären Hirnschaden nach Ischämie spielen. Die Auswirkungen der Leukozyten auf den sekundären Hirnschaden nach Trauma sind jedoch bislang unzureichend geklärt. Deshalb wurde das oben entwickelte

Modell modifiziert und zunächst die posttraumatische Leukozyten-Endothel Interaktion innerhalb der Penumbra bis 14 h nach Trauma in vivo beobachtet.

Desweiteren wurde untersucht, ob Leukozyten, die nach Trauma in das vulnerable Gewebe der Penumbra migrieren, dort auch sekundäre Hirnschäden verursachen. Hierfür wurde die Leukozytenakkumulation im Gewebe mit der Ausbreitung des Gewebeschadens nach Trauma korreliert.

3. Basierend auf experimentellen Untersuchungen nach zerebraler Ischämie entstand die Hypothese, dass bereits die intravaskulären Leukozyten, die am Endothel haften, einen sekundären Hirnschaden verursachen könnten. Um diese Hypothese auch nach experimentellem Schädel-Hirn Trauma zu überprüfen, wurde die Leukozytenadhärenz mit Antikörpern gegen den CD18 Rezeptor inhibiert. Die darauf folgenden Veränderungen der Leukozyten-Endothel Interaktion wurden mit Hilfe der Intravitalmikroskopie beobachtet und das Ausmaß des sekundären Nekrosewachstums wurde bestimmt. Die Ergebnisse wurden anschließend mit entsprechenden Daten nach Gabe von Kontroll IgG verglichen. Somit konnten der Einfluss von Anti-CD18 Antikörpern auf die posttraumatische Leukozytenadhärenz und die Bedeutung dieser Adhärenz für die Entstehung des sekundären Hirnschadens nach Trauma untersucht werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

Die Experimente zu dieser Arbeit wurden im Zeitraum von Februar 2005 bis August 2006 am Institut für chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München in der Arbeitsgruppe für experimentelle Neurochirurgie durchgeführt. Nach Vorversuchen zur Standardisierung des Traumas wurde zunächst das Modell der Intravitalmikroskopie (IVM) nach Schädel-Hirn Trauma etabliert. Im Anschluß wurden die intravitalmikroskopischen Versuche durchgeführt, zunächst für die Beobachtung der Mikrozirkulation innerhalb der ersten 120 Minuten nach Trauma, später die Untersuchungen im weiteren Verlauf bis 14h nach Trauma. Nach deren Auswertung wurde die Wirkung der Therapie mit Anti-CD18 Antikörpern untersucht.

2.1. Tiere

Für diese Studie wurden männliche C57 Bl6 Mäuse mit einem Körpergewicht von 23-26g verwendet. Die Mäuse wurden von Charles River (C.R., Kisslegg, Germany) bezogen oder stammten aus hauseigener Zucht mit Zuchtpaaren, die von Charles River gekauft worden waren.

Die Tiere hatten jederzeit freien Zugriff auf Wasser und Futter (Ssnif, Soest) und wurden während der Wartephasen bei Langzeitversuchen in Einzelkäfigen gehalten. Die Tierversuche wurden wie von der Regierung von Oberbayern genehmigt durchgeführt (Protokollnummer 48/03).

2.2. Experimenteller Aufbau

2.2.1. Narkose und Erfassung physiologischer Parameter

Die Narkose und Beatmung der Tiere erfolgte gewichtsadaptiert und wurde im Verlauf des Versuches nach Bedarf angepasst. Die Tiere wurden durch intraperitoneale Injektion von Medetomidin (0.5 mg/kg KG, Domitor®, Dr. E. Graeub AG, Basel, Schweiz), Fentanyl (0.05mg/kg KG, Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland), und Midazolam (5mg/kg KG, Dormicum®, Roche, Basel, Schweiz) narkotisiert, endotracheal intubiert und während des ganzen Versuchs invasiv mit 33% O₂ ventiliert (MiniVent 845, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland). Um die Narkose aufrecht zu erhalten wurde nach etwa 45 Minuten ein Drittel der initialen Medikamentendosis erneut i.p. appliziert. Weitere Auffrischungen der Narkose erfolgten nach jeweils 60 min.

Für die Überwachung der Beatmung in Narkose wurde der endexpiratorische pCO₂ mit einem Mikrokapnometer (Micro-Capnograph CI 240, Columbus Instruments, Columbus, Ohio 43204, USA) während des gesamten Versuches gemessen, so dass die Ventilation entsprechend individuell adaptiert werden konnte. Der mittlere arterielle Druck wurde invasiv über einen Katheter in der linken Arteria femoralis erfasst (Portex Non Sterile, Polythene Tubing, 0,28mm ID, 0,61mm OD, Smiths Medical International Ltd, Hythe, Kent CT216JI, UK). Über diesen Katheter erhielten die Mäuse zudem eine Dauerinfusion isotoner Kochsalzlösung von 0,4ml/h, um den Flüssigkeitsverlust durch Operation und Beatmung auszugleichen. Außerdem konnten die entsprechenden Farbstoffe über die A. femoralis injiziert werden. Die Körpertemperatur wurde mit Hilfe einer durch Rückkopplung kontrollierten Heizmatte auf 37 +/- 0,1° Celsius gehalten (Thal and Plesnila, 2007).

2.2.2. Präparation der kraniellen Fenster

Nach Narkose und Katheterisierung wurden die Tiere in einem stereotaktischen Rahmen immobilisiert (Stoelting, Wood Dale, Illinois, U.S.A.) und zwei kranielle Fenster wurden präpariert, ohne die Dura mater zu verletzen. Das etwa 8x8 mm große Fenster, welches über der rechten Hemisphäre für die Traumaapplikation präpariert wurde, grenzte rostral an die coronare und medial an die sagittale Sutur. Ein weiteres, 2x2 mm großes kranielles Fenster wurde über dem rechten fronto-parietalen Kortex platziert, 1mm lateral der sagittalen Sutur und 1mm rostral der coronaren Sutur; damit befand es sich etwa 1-2mm rostral der primären Kontusion. Somit haben wir die Veränderungen in der Mikrozirkulation in den Gefäßen innerhalb der Penumbra, in welcher der sekundäre Hirnschaden auftritt und innerhalb des umgebenden Gewebes beobachtet. Das Fenster für die Applikation des Traumas wurde bis zum Trauma verschlossen gehalten, sofort danach mit dem initial entnommenen Knochendeckel wieder verschlossen und mit Histoacrylkleber fixiert (Abb. 2).

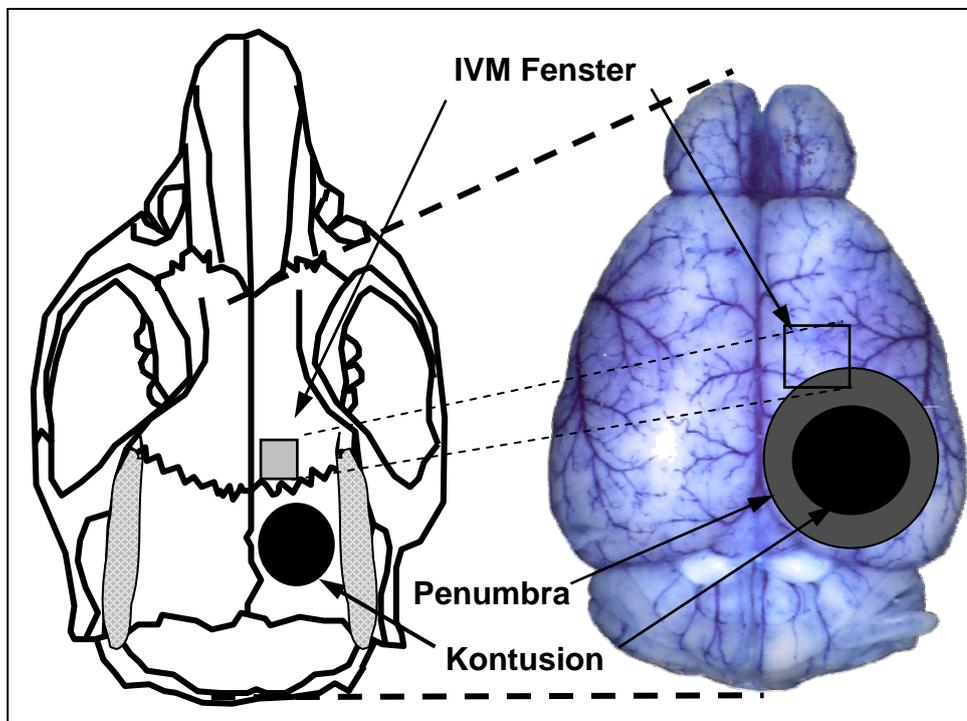


Abb.2: Schematische Darstellung zur Lokalisation von Trauma und kranielem Fenster.

2.2.3. Trauma (Controlled Cortical Impact, CCI)

Die Tiere wurden mit dem für Mäuse adaptierten CCI Model traumatisiert (Zweckberger et al., 2003; Zweckberger et al., 2006). Hierbei wurde ein in einem Rahmen befestigter Bolzen per Luftdruck mit einer zuvor eingestellten Geschwindigkeit und Eindringtiefe durch das geöffnete kraniale Fenster auf das Gehirn einer Maus geschossen (Stoelting, Wood Dale, Illinois, Geschwindigkeit: 6,0 m/s, Eindringtiefe : 0,5 mm, Kontaktzeit: 150 ms). Die Tiere wurden für die Traumainduktion in einem stereotaktischen Rahmen fixiert.

Nach der Traumaapplikation wurde der Knochendeckel reimplantiert und mit Histoacrylkleber fixiert. Die scheinoperierten Tiere unterliefen der gleichen Prozedur, nur das Trauma selbst wurde weggelassen.

2.2.4. Färbungen

Farbstoffe wurden über den Katheter in der linken Arteria femoralis appliziert. Dabei wurden die Gefäßdurchmesser durch die einmalige Plasmafärbung mit Fluoreszin Isothiocyanatgefärbtem Dextran (FITC-Dextran; Molekulargewicht 150,000, Sigma Chemical, St. Louis, Missouri, U.S.A.) vor der ersten Messung sichtbar gemacht (0,1ml einer 0,5% Lösung).

Leukozyten und Thrombozyten wurden durch wiederholte Gabe von 0,05 ml einer 0,01% Lösung von Rhodamin 6G (Merck, Darmstadt, Germany) vor jeder Messung angefärbt. Rhodamin 6G färbt Blutzellen an, welche einen Nukleus oder zumindest ein Zellkernfragment enthalten (Hartl et al., 1997b), d.h. Leukozyten und Thrombozyten, aber keine Erythrozyten.

2.2.5. Intravitalmikroskopie

Die intravitalmikroskopie (IVM) wurde wie bereits beschrieben durchgeführt (Kataoka et al., 2004).

Die weiterhin in einem stereotaktischen Rahmen fixierten Tiere wurden auf einer Plattform unter einem Intravitalmikroskop platziert. Diese Plattform war mit Hilfe einer Computer

assistierten Steuerung in einem Koordinatensystem bewegbar. Somit waren wir in der Lage, exakt die selben Gefäßabschnitte der Arteriolen und Venolen wiederholt zu analysieren.

Um die Dura mater transparent zu halten wurde sie kontinuierlich mit angewärmter 0,9% isotoner Kochsalzlösung befeuchtet. Die zu allen Seiten nach oben fixierte Kopfhaut bildete eine Art Wanne, so dass die Kochsalzlösung nicht ablaufen konnte.

Das Intravitalmikroskop (Leitz, Wetzlar, Germany) war mit einer 75 W Xenon Lampe und einem Ploemo-Pack Filter Block für die Epi-illumination ausgestattet.

Für die Beobachtung der Gefäßdurchmesser und der Leukozyten-Endothel Interaktion haben wir ein Salzwasser Immersionsobjektiv (W25 × /0.6 Leitz, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) mit einem Leitz/Leica I3 Filter Block (Anregungswelle: 470 ± 20 nm; Emissionswelle > 515 nm) bzw. einem Leitz/Leica N3 Filter Block (Anregungswelle 546 ± 12 nm; Emissionswelle 600 ± 40 nm) verwendet.

Die mit einer silicone-intensified-tube (SIT) Videokamera (C2400, Hamamatsu Photonics, Herrsching, Deutschland) aufgenommenen Bilder wurden auf Videokassetten (MQSE-120, Sony, Tokyo, Japan) gespeichert und später offline ausgewertet.

2.3. Versuchsprotokoll

2.3.1. Untersuchung der Mikrozirkulation bis 120 Minuten nach Schädel-Hirn Trauma

Sowohl der Traumagruppe als auch der Kontrollgruppe wurden jeweils sechs Mäuse randomisiert zugeordnet.

Nach zwei baseline Aufnahmen 30 und 5 Minuten vor Trauma, bei denen jeweils mindestens eine zerebrale Arteriole und mindestens drei zerebrale Venolen gefilmt wurden, wurden die Mäuse entweder traumatisiert oder scheinoperiert.

Daraufhin wurden die Mäuse wieder unter dem Intravitalmikroskop platziert und die zuvor aufgenommenen Gefäßabschnitte wurden nach 30, 60, 90 und 120 Minuten beobachtet. Jeder Gefäßabschnitt wurde 45 Sekunden lang gefilmt, davon entfielen 40 Sekunden auf die Aufnahme der Leukozyten und Thrombozyten und 5 Sekunden auf die Erfassung des Gefäßlumens (Abb.3).

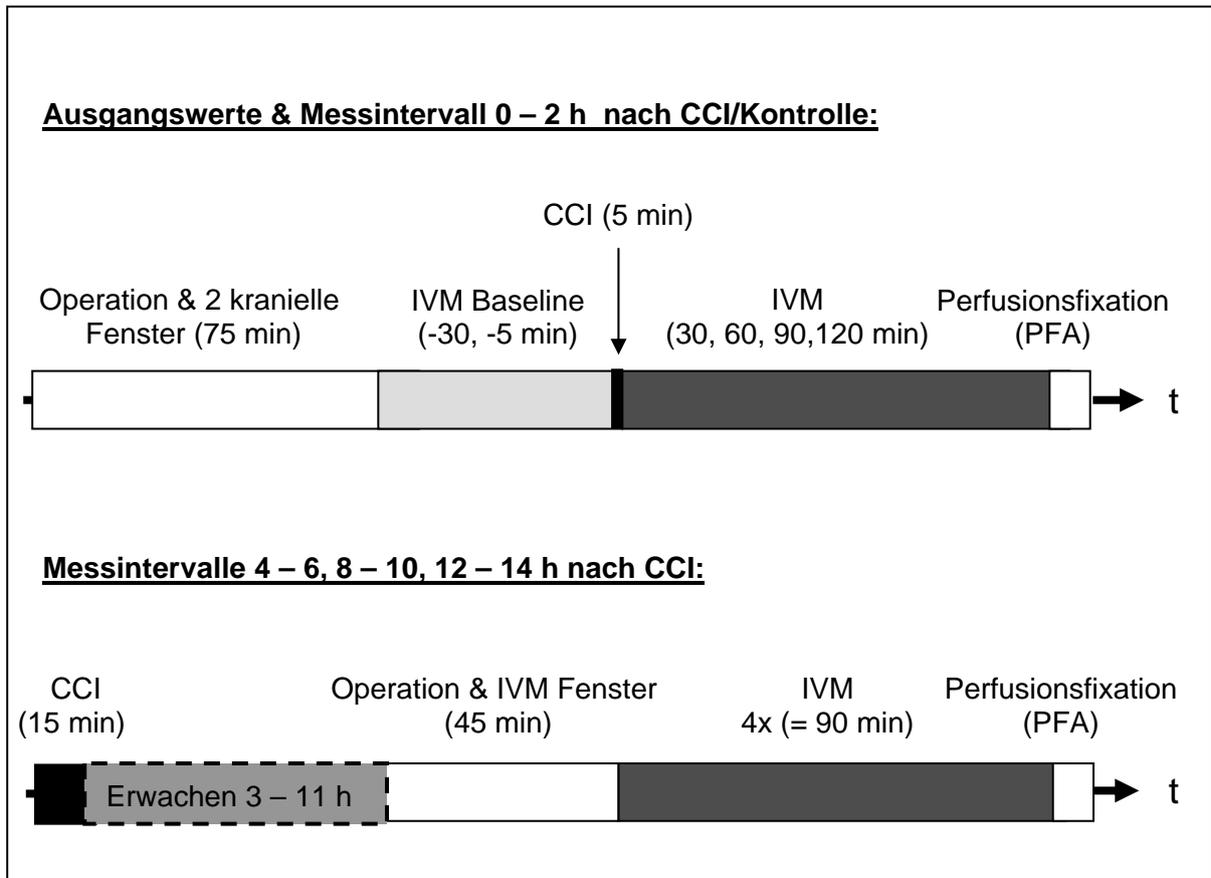


Abb.3: Versuchsprotokoll zu intravitalmikroskopischen Untersuchungen bis 14 h nach CCI (n=6).

2.3.2. Untersuchung der Leukozyten-Endothel Interaktion bis 14 h nach Schädel-Hirn

Trauma

Um auch die Leukozyten-Endothel Interaktion zu späteren Zeitpunkten nach Trauma untersuchen zu können wurde das Versuchsprotokoll entsprechend variiert. Bei 6 Mäusen pro Zeitintervall wurden wiederum jeweils mehrere Gefäße beobachtet. Die Tiere wurden zunächst mit Isofluran und N₂O narkotisiert und wie oben beschrieben nach dem CCI Protokoll traumatisiert. Im Anschluss daran erwachten die Mäuse wieder aus der Narkose und konnten sich für ca. 45 Minuten in einem Inkubator mit 33°C und 50% Raumfeuchtigkeit erholen. 3 h, 7 h oder 11 h nach Trauma wurden die Tiere intraperitoneal narkotisiert, die entsprechenden Katheter wurden gelegt und das IVM Fenster wurde präpariert. Auch in diesen Versuchen wurden die Gefäße 4 mal im Abstand von 30 Minuten beobachtet (Abb.3).

2.3.3. Inhibition der posttraumatischen Leukozyten-Endothel Interaktion mit Anti-CD18 Antikörpern

Unter Narkose mit Isofluran, N₂O und 33% O₂ wurde den Mäusen ein Katheter in die Vena femoralis gelegt, über den sie entweder Anti-CD18 Antikörper oder Kontroll IgG erhielten (jeweils 1,2 µg/g Körpergewicht gelöst in 0,1 ml isotoner Kochsalzlösung; n=6). 15 min nach der Applikation wurden die Mäuse traumatisiert. Zu Beginn der anschließenden Wachphase konnten sie sich für circa 45 Minuten im Inkubator erholen. 15 h später wurden die Mäuse intraperitoneal narkotisiert und wie beschrieben für die IVM präpariert, so dass 16 h und 16,5 h nach Trauma IVM-Aufnahmen gemacht werden konnten (Abb.4). Es wurde wieder die Anzahl der rollenden und haftenden Leukozyten und Aggregate bestimmt, um den Effekt der Hemmung von CD18 auf die Leukozyten-Endothel Interaktion zu quantifizieren.

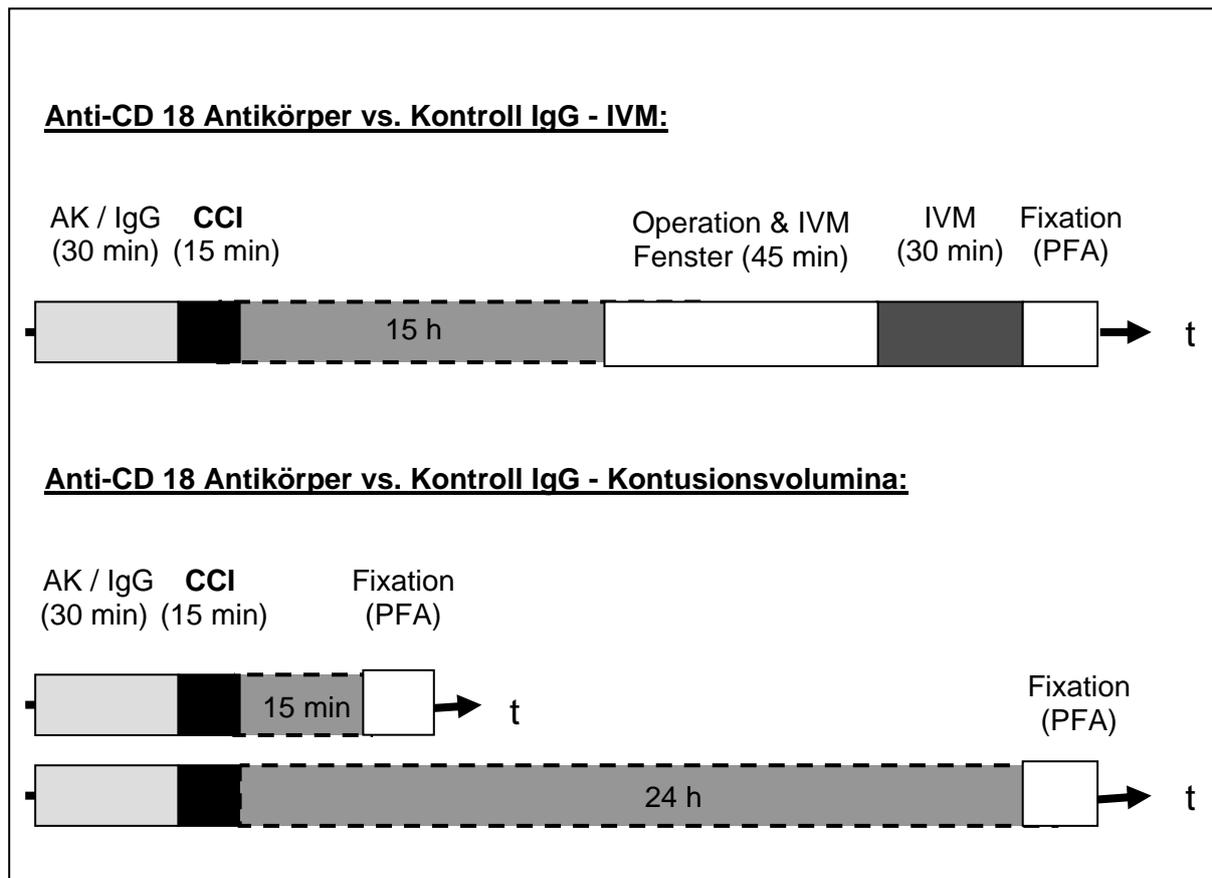


Abb.4: Versuchsprotokoll zu Untersuchungen nach Hemmung von CD18 bis 24 h nach CCI (n=6).

In einer weiteren Reihe von Experimenten wurden entsprechend narkotisierten Mäusen entweder Anti-CD18 Antikörper oder Kontroll IgG über die Vena femoralis injiziert (n=6). 15 min oder 24 h nach dem anschließenden Trauma wurden die Hirne entnommen und die Kontusionsvolumina bestimmt. Um einen möglichen therapeutischen Effekt der Anti-CD18 Antikörper zu evaluieren, wurde die jeweilige Ausbreitung des sekundären Hirnschadens im Vergleich zum Primärschaden nach 15 Minuten bestimmt (Abb.4).

2.4. Analyse der intravitlamikroskopischen Aufnahmen

Mit einem Computer-assistierten System für die Analyse der Mikrozirkulation (Capimage; Ingenieurbüro Dr. Zeintl, Heidelberg, Germany) wurden die IVM Bilder offline bei 625-facher Vergrößerung quantifiziert. Hierbei wurden die arteriellen Gefäßdurchmesser und die Anzahl der rollenden und der adhärenen Leukozyten, die Bildung von Aggregaten und Mikrothromben und die Blutflussgeschwindigkeit in Arteriolen und Venolen analysiert.

Da die Gefäßdurchmesser initial sehr unterschiedlich waren, haben wir für die Quantifizierung nicht mit absoluten sondern mit normalisierten Werten gearbeitet.

Rechnung I:

Berechnung des Ausgangswertes (100%):

$$\frac{\text{Gefäßdurchmesser der Arterie 1 vor Trauma I + II}}{2} = 100\% \text{ Ausgangsdurchmesser der Arterie 1}$$

Veränderungen zu den verschiedenen Zeitpunkten nach Trauma in % des Ausgangswertes:

$$\frac{\text{Durchmesser 30 min nach Trauma der Arterie 1}}{100\% \text{ Ausgangsdurchmesser der Arterie 1}} = \text{Veränderung zum Zeitpunkt 30 min nach Trauma in der Arterie 1[\%]}$$

Vor Trauma bzw. Scheinoperation wurde der initiale Durchmesser eines Gefäßes zweimal gemessen. Anschließend wurde der Mittelwert beider Werte bestimmt und als Ausgangswert (100%) definiert. Die Veränderungen der Durchmesser, die wir in beiden Gruppen nach Trauma bzw. Scheinoperation beobachtet haben, wurden in Prozent des Ausgangswertes berechnet (Rechnung I).

In einem zweiten Schritt wollten wir die Veränderungen der arteriellen Durchmesser nach Trauma direkt mit den Werten nach Scheinoperation vergleichen. Hierfür haben wir die Mittelwerte der zuvor für die Kontrollgruppe berechneten Durchmesser zu jedem Zeitpunkt als 100% Referenz für jeden einzelnen Messpunkt verwendet. Somit konnten wir die berechneten Werte der Traumagruppe in % der berechneten Werte der Kontrollgruppe angeben (Rechnung II).

Rechnung II:

Der Vergleich der einzelnen Zeitpunkte in beiden Gruppen ergibt die Veränderungen nach Trauma im Verhältnis zur Kontrollgruppe:

$$\frac{\text{Veränderung zum Zeitpunkt 30 min nach Trauma [\%]}}{\text{Veränderung zum Zeitpunkt 30 min nach Scheinoperation [\%]}} = \text{tatsächliche Veränderung im Vergleich beider Gruppen [\%]}$$

Um Leukozyten, Aggregate und Mikrothromben zu quantifizieren wurde von jedem Gefäß ein 50 µm langes Segment für 30 Sekunden beobachtet, die Ergebnisse wurden pro 100 µm und Minute angegeben (Kataoka et al., 2004).

Durch die Färbung mit Rhodamine 6G haben wir Zellelemente unterschiedlicher Form und Größe beobachtet, die folgendermaßen eingeteilt wurden: Zellen einer Größe von 7-12 µm

wurden als Leukozyten gewertet, größere Gebilde von 15-25 µm oder >25 µm wurden als Aggregate bzw. Mikrothromben definiert.

Leukozyten mit multiplen, intermittierenden Kontakten zum vaskulären Endothel, die sich dabei deutlich langsamer fortbewegt haben als die frei beweglichen Leukozyten in der Mitte des Blutstroms wurden als *rollende* Leukozyten gewertet. Leukozyten, die für mehr als 30 Sekunden am Gefäßendothel haften blieben, wurden als *adhärente (haftende)* Leukozyten definiert. Die Interaktionen von Aggregaten und Mikrothromben mit dem Endothel wurde entsprechend ausgewertet.

Mikrothromben wurden zusätzlich in jedem Gefäß, das unter Ausgangsbedingungen aufgenommen worden war, ausgewertet und dabei in folgende Kategorien eingeteilt: 1 bedeutet keine Thrombose, 2 und 3 stehen für eine Thrombose in einem Gefäß, welches entweder noch perfundiert ist oder in dem der Blutfluss deutlich sichtbar sistiert. Kategorie 4 umfasste Gefäße, die nicht mehr perfundiert und damit nicht mehr angefärbt waren.

Um die Gefäßperfusion zu quantifizieren wurde die Blutflussgeschwindigkeit ebenfalls in 4 Qualitäten unterteilt: 0 bedeutet gar keinen Blutfluss oder retrograd strömendes Blut, 1 und 2 stehen für eine Flussreduktion auf etwa 33% (langsam) bzw. etwa 66% (vermindert) des Ausgangswertes und 3 bedeutet normale Perfusion, wie sie unter Ausgangsbedingungen zu sehen ist.

2.5. Bestimmen des Kontusionsvolumens und der Leukozytenakkumulation im Gewebe

Um die Leukozytenakkumulation im Gewebe und die Ausbreitung der Kontusion über die Zeit genau korrelieren zu können, haben wir die Tiere am Versuchsende zunächst mit isotoner Kochsalzlösung und anschließend mit PFA perfundiert. Die Hirne wurden entnommen und für 24 h in PFA fixiert. Im Anschluss wurden sie für 1 h unter fließendem Wasser gespült und bis zur weiteren Verwertung in 70% Ethanol aufbewahrt. Nachdem die Hirne in Paraffin eingebettet worden waren wurden sie mit einem Rotationsmikrotom

geschnitten. Alle 500 µm wurden 4 koronare Schnitte mit einer Dicke von 4 µm angefertigt, die im Anschluss immunhistochemisch mit Anti-CD45 Antikörpern oder mit der Färbung nach Nissl mit Kresylviolett gefärbt wurden. An nach Nissl gefärbten Schnitten konnten wir die Kontusionsränder genau bestimmen (Zweckberger et al., 2003; Zweckberger et al., 2006; Engel et al., 2008) und somit das Kontusionsvolumen nach folgender Formel berechnen:

$$0,5 \times (A_1/2 + A_2 + A_3 + \dots + A_{10}/2) = \text{Kontusionsvolumen [mm}^3\text{]}$$

Hierbei entspricht A jeweils dem Volumen der Kontusion welches auf einem Schnitt ausgemessenen wurde (Zweckberger et al., 2003; Zweckberger et al., 2006).

Außerdem konnte die Begrenzung der Kontusion auf das zugehörige mit Anti-CD45 Antikörpern gefärbte Präparat übertragen werden. Somit war eine exakte Bestimmung der Regionen möglich, in welchen die Leukozytenakkumulation quantifizieren wurde. In einem Gesichtsfeld am Rand der ausgemessenen Kontusion wurden die Leukozyten der Penumbra ausgezählt und in vier weiteren die Leukozytenakkumulation in der Kontusion bestimmt. Ein zusätzliches Gesichtsfeld auf der kontralateralen Seite diente als Referenz für Leukozyten- und Neuronenzahl im gesunden Gewebe. Einem Gesichtsfeld entsprach hierbei die Anzahl von 141±5,8 (SEM) Neuronen.

2.6. Statistische Analyse

Der Mann-Whitney U-Test wurde für die Analyse von Unterschieden zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen verwendet. Die Friedman One-Way Analysis of Variance on Ranks gefolgt vom Student-Newman-Keuls Test wurden für die Analyse von Unterschieden innerhalb einer Gruppe über die Zeit verwendet.

Die Daten sind als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwerts angegeben (MW±SEM). Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde für $p < 0,05$ angenommen.

3. ERGEBNISSE

3.1. Modelletablierung

Mit dem für diese Arbeit etablierten Modell ist es möglich, die zerebrale Mikrozirkulation in unmittelbarer Nähe einer primären traumatischen Kontusion zu untersuchen. Die Platzierung des IVM-Fensters auf der ipsilateralen Seite mit einem Abstand von etwa 1-2 mm zur Kontusion ermöglichte es, die Mikrozirkulation am Rand der Penumbra zu beobachten, d.h. in genau dem Gebiet, welches für das sekundäre Nekrosewachstum von größtem Interesse ist. Etwa ein Drittel des Fensters umfasste Gewebe, welches im Verlauf von 24 h nekrotisch wurde. Innerhalb dieser Zeitspanne fanden auch die Untersuchungen statt. Die frühesten Beobachtungen begannen 30 min nach Trauma, die spätesten Aufnahmen wurden 14 h nach Trauma aufgezeichnet. Somit haben wir die Arteriolen und Venolen in genau der Region und zu der Zeit beobachtet, in der es zur Ausbildung von sekundärem Hirnschaden kommt.

Die untersuchten Arteriolen und Venolen hatten unter physiologischen Bedingungen Ausgangsdurchmesser von 15-30 μm bzw. 20-50 μm .

Um Veränderungen in der Mikrozirkulation aufgrund von systemischen Parametern auszuschließen, wurden endexpiratorischer CO_2 , mittlerer arterieller Blutdruck und Körpertemperatur kontinuierlich überwacht und innerhalb von physiologischen Grenzen gehalten (Tab.1).

Zusätzlich wurden am Ende jedes Versuches die arteriellen Blutgase bestimmt, s. Tab.2 und Tab. 3. Bezüglich dieser systemischen Parameter gab es keine Unterschiede zwischen den Gruppen oder zwischen den verschiedenen Messpunkten innerhalb einer Gruppe.

**Mittlerer arterieller Blutdruck, endexpiratorischer pCO₂ und
Beatmungsfrequenz vor und nach Trauma bzw. Kontrolle [MW+/-SEM]**

		Nach Kraniotomie			
Zeit	Ausgangswerte	30	60	90	120
Endexp. pCO ₂ nach Schein-OP [mmHg]	31,7+/-1,1	31,3+/-1,2	31,2+/-1,3	30,8+/-1,3	30,7+/-1,1
Endexp. pCO ₂ nach Trauma [mmHg]	31,3+/-0,6	32,0+/-0,6	31,2+/-0,6	30,6+/-0,7	31,6+/-0,8
MABP n. Schein-OP [mmHg]	73,7+/-2,2	62,3+/-2,0	59,2+/-2,6	58,3+/-2,0	60,5+/-3,2
MABP n. Trauma [mmHg]	66,7+/-3,3	60,2+/-1,8	54,7+/-2,6	54,5+/-1,5	55,3+/-2,9
Ventilation n. Schein-OP [1/min]	147+/-5	147+/-7	148+/-8	148+/-8	148+/-8
Ventilation n. Trauma [1/min]	160+/-1	162+/-22	160+/-20	161+/- 21	167+/-17

Tab.1

**Arterielle Blutgaswerte 130 Minuten nach Trauma/Kontrolle
[MW+/- SEM]**

	pH	pCO ₂ [mmHg]	pO ₂
Schein-OP	7,22+/-0,02	37,8+/-3,4	91,5+/-10,4
Trauma	7,23+/-0,01	36,9+/-1,8	106,2+/-5,9

Tab.2

Der relativ saure pH Wert, den unsere Mäuse aufwiesen, ist bei Nagern nicht unüblich und lässt sich wahrscheinlich auf eine durch das Tierfutter verursachte metabolische Azidose zurückführen. Vor allem in den Versuchen zu den ersten 120 Minuten nach Trauma waren die Tiere sehr lange in Narkose (insgesamt bis ca. 4.5 h), was möglicherweise die relativ niedrigen Blutdruckwerte gegen Versuchsende erklärt. In späteren Versuchen waren die Werte für den mittleren arteriellen Blutdruck deutlich höher, s. Tab. 3. Es gab jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Werte waren immer im physiologischen Bereich.

Mittlerer arterieller Blutdruck, endexpiratorischer pCO₂ und Beatmungsfrequenz nach Trauma + Gabe von Kontroll IgG/anti-CD18 Antikörper[MW+/-SEM]

	16 h	16.5 h	Mittelwert
endexp. pCO ₂ IgG Kontrolle [mmHg]	33,6+/-2,1	32,8+7-1,9	33,2+/-1,9
endexp. pCO ₂ anti-CD18 AK [mmHg]	32,8+/-1,2	31,0+/-1,0	31,9+/-1,1
MABP IgG Kontrolle [mmHg]	74,0+/-7,2	69,6+/-3,4	71,8+/-5,2
MABP anti-CD18 AK [mmHg]	78,0+/-3,4	71,0+/-4,0	74,5+/-3,4
Ventilation f IgG Kontrolle [1/min]	149+/-8,4	144+/-8,3	146,5+/-8,1
Ventilation f anti-CD18 AK [1/min]	141,6+/-8,8	145,0+/-8,8	143,3+/-8,5

Tab. 3

Arterielle Blutgaswerte 16.5 h nach Trauma + Gabe von Kontroll IgG/anti-CD18 Antikörpern [MW+/- SEM]

	pH	pCO ₂ [mmHg]	pO ₂ [mmHg]
IgG Kontrolle	7,3+/-0,01	39,1+/-2,6	162,2+/-20,4
anti-CD18 AK	7,2+/-0,01	44,3+/-3,2	141,4+/-24,9

Tab. 4

3.2. Veränderungen der Mikrozirkulation bis 120 Minuten nach Schädel-Hirn Trauma

3.2.1. Arterieller Gefäßdurchmesser

Vor Trauma wurde die Größe der Arteriolen zweimal bestimmt, wobei die Messungen jeweils zwei nahezu gleich große Werte ergaben. Mit diesen konstanten Werten wurde gezeigt, dass es mit dem für diese Arbeit etablierten Modell möglich ist, Beobachtungen unter gut kontrollierten physiologischen Bedingungen durchzuführen. Veränderungen der Mikrozirkulation aufgrund von systemischen Faktoren wurden somit ausgeschlossen.

Bereits 30 Minuten nach Trauma zeigte sich eine ausgeprägte arterielle Vasodilatation. Der Gefäßdurchmesser erweiterte sich von 100% Ausgangswert auf 126,2 +/- 2,5% ($p < 0,01$). Bis zum Versuchsende 120 Minuten nach Trauma blieben die Arteriolen dilatiert, und zwar auf einem Niveau von etwa 119% bezogen auf die Kontrollgruppe (Abb.5).

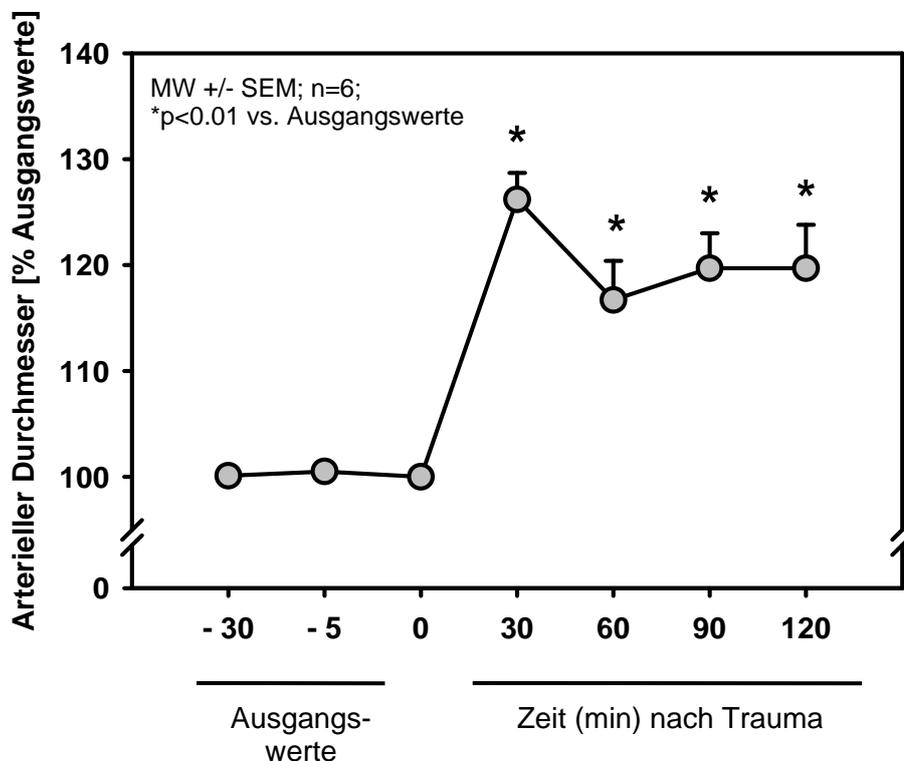
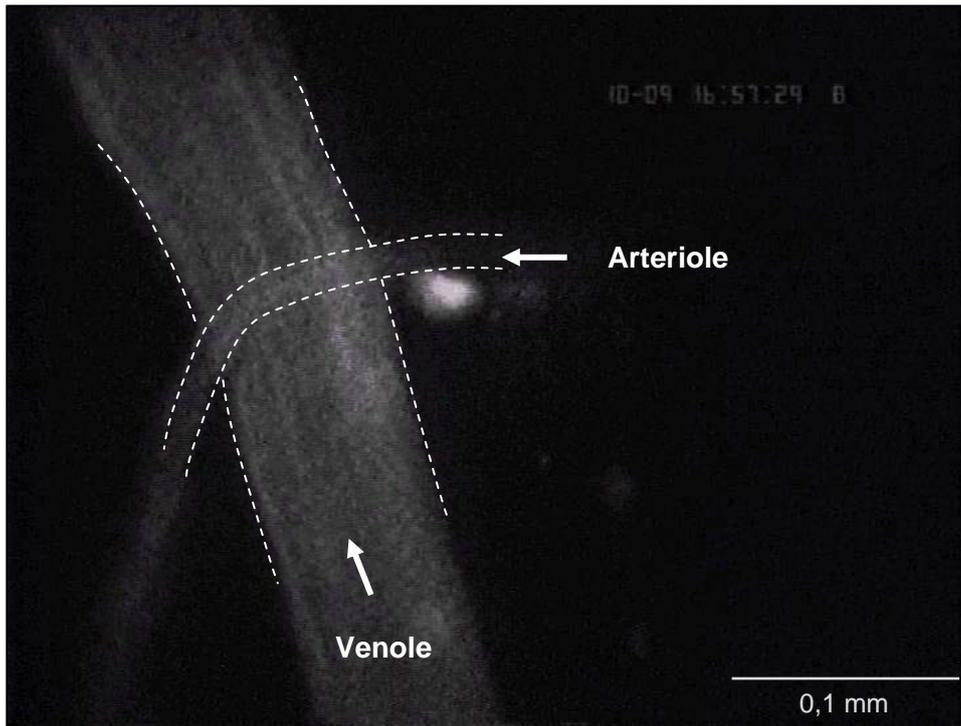


Abb.5: Arterieller Durchmesser in % des Ausgangswertes bis 120 Minuten nach CCI.



A



B

Abb.6: A zeigt ein Beispiel für eine Arteriole und eine Venole unter physiologischen Bedingungen. Unter B sind exakt dieselben Gefäße 1 h nach CCI dargestellt. Die Arteriole ist dilatiert. In der Venole beginnen Leukozyten sowie Aggregate, am Endothel entlang zu rollen.

3.2.2. Leukozyten-Endothel Interaktionen

Für die Auswertung wurden Leukozyten über ihre Größe von 7-12 μm definiert. Unter physiologischen Bedingungen ist es normal, dass einige Leukozyten am venösen Gefäßendothel entlang rollen. Dementsprechend wurden in den Venolen sowohl unter Ausgangsbedingungen als auch in der Kontrollgruppe 8,1 \pm 0,4 rollende Leukozyten/100 μm und Minute beobachtet. Es wurden jedoch kaum adhärenenten Leukozyten (1,1 \pm 0,4/100 μm und Minute) gesehen. In den Arteriolen wurden wie erwartet unter Ausgangsbedingungen weder rollende noch haftende Leukozyten beobachtet.

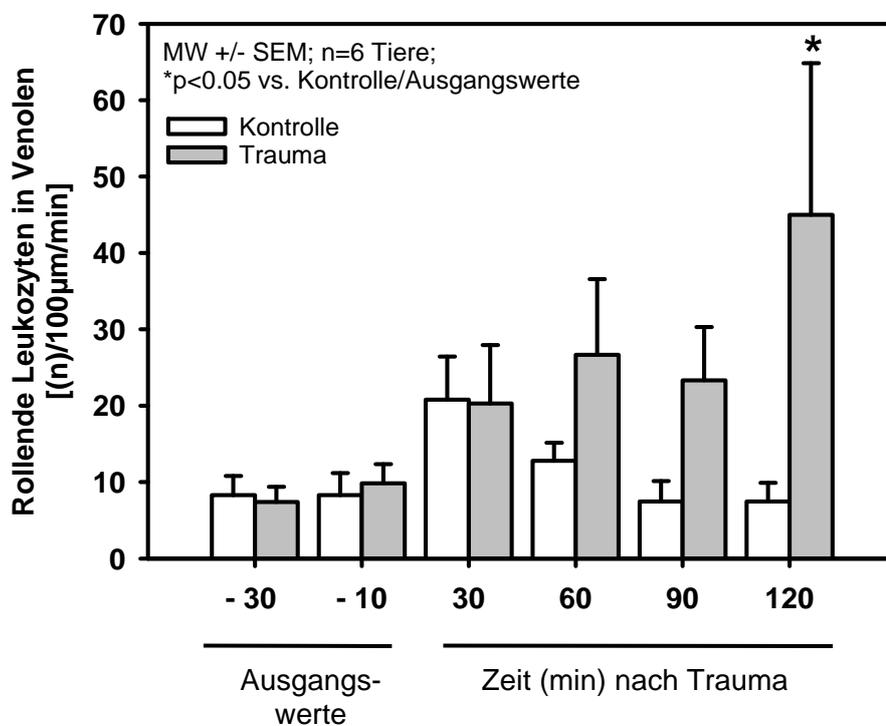


Abb.7: Anzahl Rollender Leukozyten in Venolen bis 120 Minuten nach CCI.

Sofort nach Trauma zeigte sich eine Zunahme von Leukozyten, die am venösen Endothel entlang rollten. Im weiteren Verlauf bis 120 Minuten nach Trauma war ihre Anzahl kontinuierlich gestiegen; sie war im Mittel etwa 3,5 mal höher als der Ausgangswert (28 \pm 5,6 /100 μm und Minute, $p < 0.01$ vs. Ausgangswert und vs. Kontrolle) (Abb.7). In diesem sehr frühen Zeitraum bis 120 Minuten nach Trauma fanden sich nur sehr wenige adhärenente

Leukozyten in den Venolen ($1,6 \pm 1,2/100 \mu\text{m}$ und Minute). Die Unterschiede der Werte erreichten keine statistische Signifikanz.

Die Leukozyten-Endothel Interaktion in den Arteriolen nahm ebenfalls zu, die Anzahl der rollenden Leukozyten hat sich sogar auf das 8-fache des Ausgangswertes erhöht ($8,0 \pm 1,4/100 \mu\text{m}$ und Minute). Diese Veränderung war allerdings nur zu einem Zeitpunkt, 60 Minuten nach Trauma, statistisch signifikant ($p < 0,01$ vs. Ausgangswert und $p < 0,05$ vs. Kontrolle) (Abb.8). Auch adhärenente Leukozyten waren vermehrt in den Arteriolen zu sehen, deren Anzahl hat jedoch aufgrund der hohen Standardabweichung keine statistisch signifikanten Werte erreicht ($7,2 \pm 2,7/100 \mu\text{m}$ und Minute).

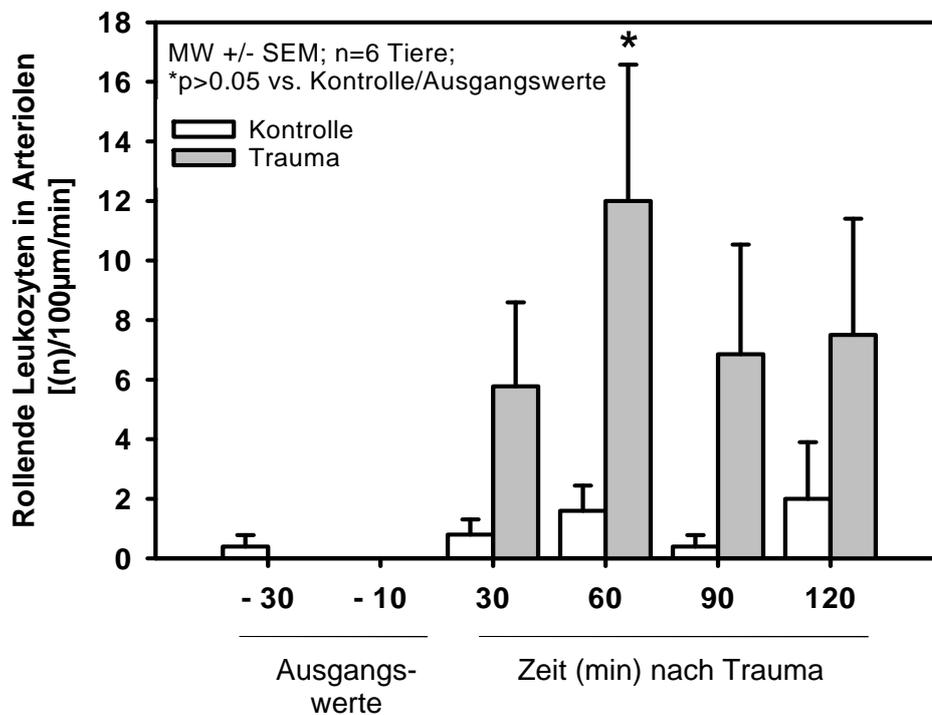


Abb.8: Anzahl rollender Leukozyten in Arteriolen bis 120 Minuten nach CCI.

In den ersten 30 Minuten nach Trauma kam es auch in den Kontrolltieren zu einem Anstieg der rollenden Leukozyten in den Venolen von etwa 20 Leukozyten/100 μm und Minute, der sehr wahrscheinlich durch den Stress der Mobilisation und der Reimplantation des Knochens über dem Traumafenster bedingt war. Schon zum nächsten Messpunkt 60 Minuten nach

Trauma waren die Werte wieder auf das Ausgangsniveau von etwa 8 Leukozyten/100 μm und Minute gesunken.

Aufgrund dieser einmaligen Abweichung wurden in den Berechnungen zu den statistischen Unterschieden zwischen den Gruppen im Bezug auf die Leukozyten-Endothel Interaktion der Wert der Kontrollgruppe 30 Minuten nach Trauma ausgeschlossen.

3.2.3. Leukozyten/Thrombozyten Aggregate

In den ersten 120 Minuten nach Trauma wurde die Bildung von Aggregaten aus Leukozyten und Thrombozyten beobachtet. Aggregate waren über ihre Größe von 15-25 μm definiert, vgl. Abb.9 & 10.



Abb.9: Beispiel für eine Intravitalmikroskopische Aufnahme von einer Venole 1 h nach CCI mit einzelnen rollenden Leukozyten und Aggregaten sowie einer beginnenden Thrombosierung.

Unter Ausgangsbedingungen fanden sich weder in Arteriolen noch in Venolen entsprechende Strukturen. In der Kontrollgruppe waren ebenfalls nur sehr wenige Aggregate zu sehen ($0,3 \pm 0,2$ Aggregate/100 μm und Minute). Diese traten nahezu ausschließlich in Venolen auf.

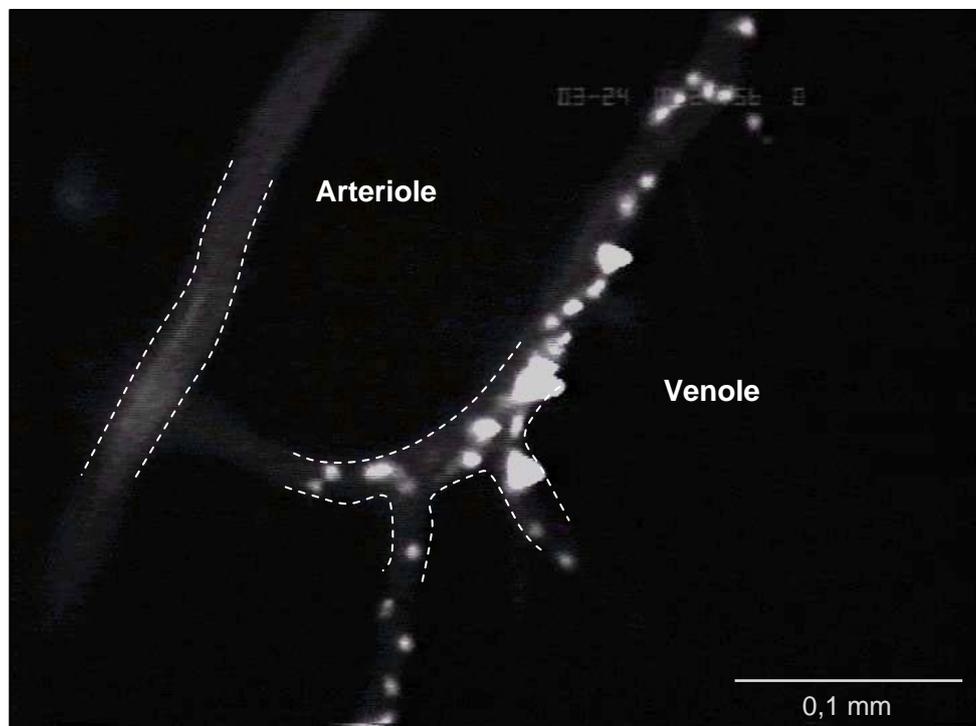


Abb.10: Beispiel von einer Intravitalmikroskopischen Aufnahme 1 h nach CCI von einer dilatierten Arteriole sowie einer Venole mit rollenden Leukozyten und Aggregaten.

Im Gegensatz dazu hat die Anzahl der rollenden Leukozyten/Thrombozyten Aggregate nach Trauma vor allem in den Venolen deutlich zugenommen (23,0+/-7,3/100 μ m und Minute, $p < 0.05$ vs. Ausgangswerte und vs. Kontrolle) (Abb.11). Es war nur eine sehr geringe, statistisch nicht signifikante Anzahl haftender Aggregate in den Venolen zu verzeichnen (1,2+/-0,4/100 μ m Minute).

In Arteriolen waren auch nach Trauma nur sehr wenige rollende Aggregate (0,9+/-0,5 /100 μ m und Minute) zu sehen, während eine Adhärenz der Aggregate dort völlig ausblieb.

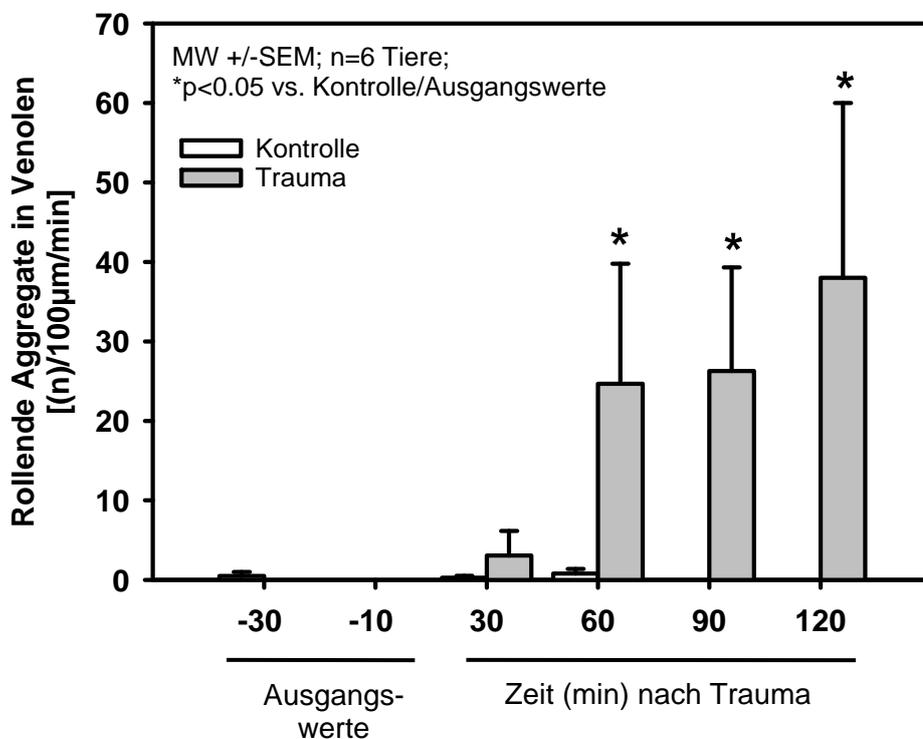


Abb.11: Anzahl rollender Aggregate in Venolen bis 120 Minuten nach CCI.

3.2.4. Entstehung von Mikrothromben

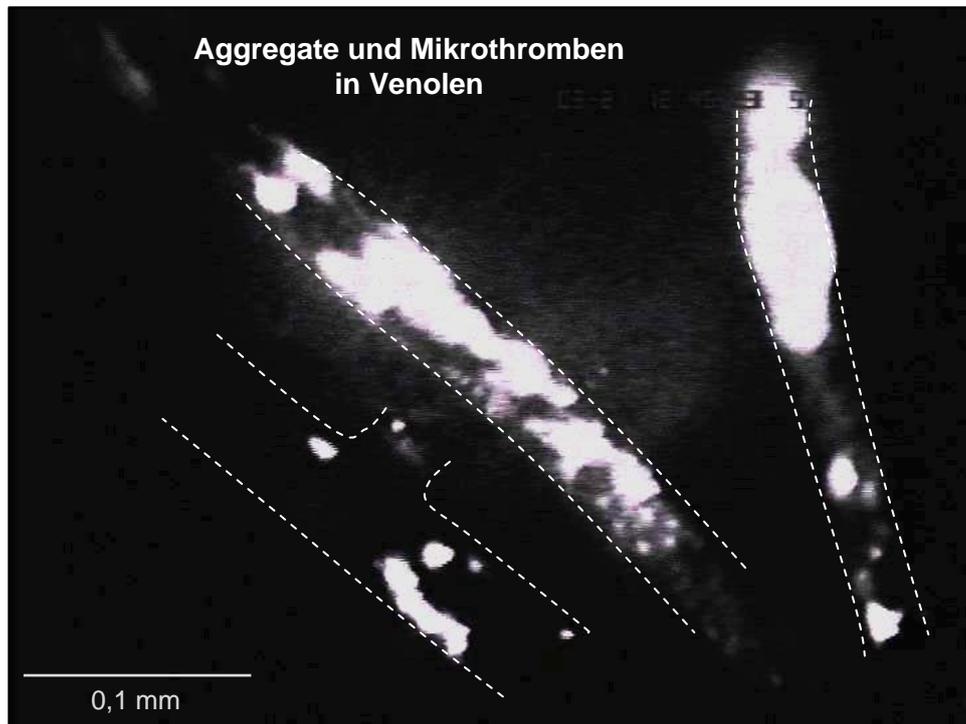


Abb.12: Beispiel einer intravitalmikroskopischen Aufnahme von 3 Venolen 2 h nach CCI: links unten weitgehend normaler Blutfluss mit einigen rollenden Aggregaten und Leukozyten. In der Mitte sieht man eine deutliche Thrombosierung, der Blutfluss ist maßgeblich eingeschränkt. Die Venole rechts oben ist vollständig von einem Thrombus verschlossen.

Weder unter Ausgangsbedingungen noch in der Kontrollgruppe zeigte sich eine Entstehung von Mikrothromben. Nach Trauma hingegen entstanden sowohl in Arteriolen als auch in Venolen Mikrothromben, die entweder langsam am Endothel entlang rollten oder haften blieben und dadurch das Gefäß teilweise oder ganz verschlossen. In Venolen wurden Werte von $2,5 \pm 0,5$ (au) rollenden und $2,2 \pm 0,4$ (au) haftenden Mikrothromben/100 μm und Minute gemessen ($p < 0,01$ vs. Ausgangswerte und vs. Kontrolle), vgl. Abb.12 & 13. Auch in zerebralen Arteriolen wurde die Thrombozytenaggregation beobachtet ($1,8 \pm 0,1$ (au)/100 μm und Minute, $p < 0,05$ vs. Ausgangswerte und vs. Kontrolle), s. Abb 14.

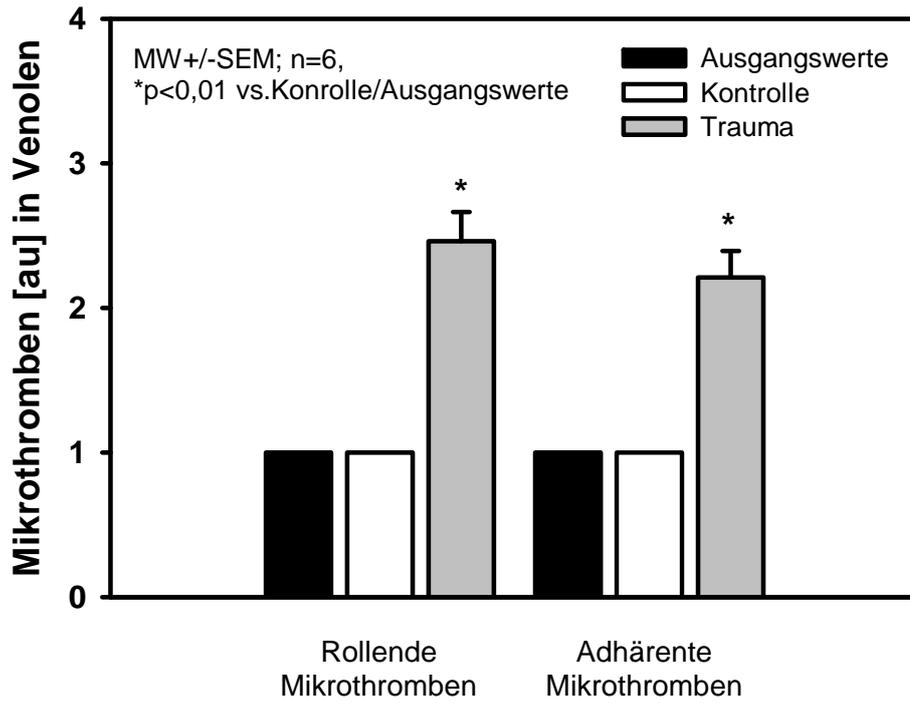


Abb.13: Rollende sowie haftente Mikrothromben in Venolen bis 120 Minuten nach CCI.

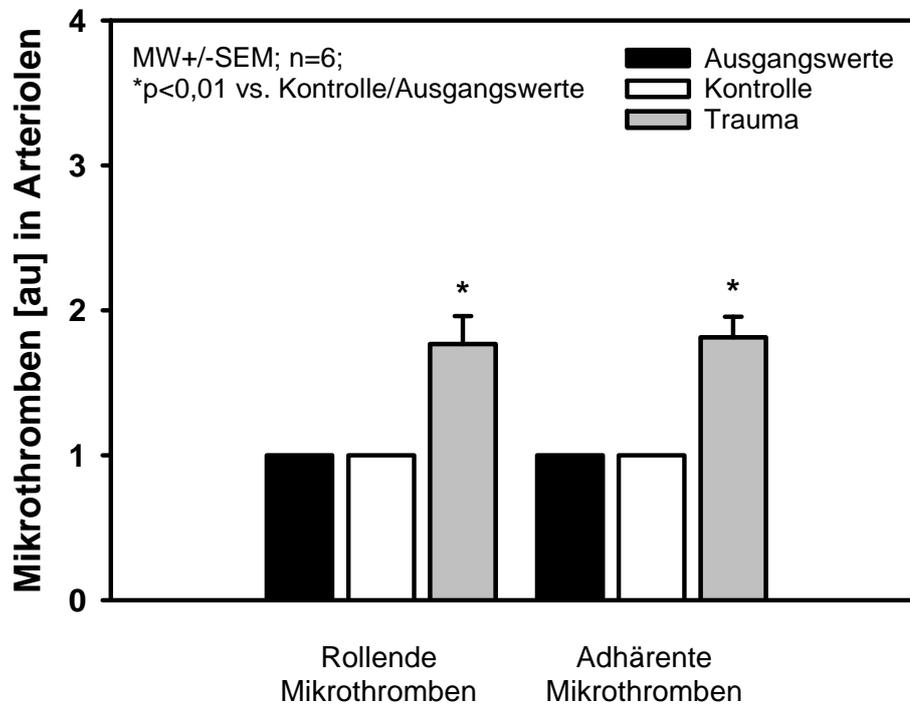


Abb.14: Rollende sowie haftente Mikrothromben in Arteriolen bis 120 Minuten nach CCI.

3.2.5. Blutflussgeschwindigkeit

Unter Ausgangsbedingungen sowie bei Kontrolltieren zeigte sich normale, unbeeinträchtigte Durchblutung in zerebralen Arteriolen und Venolen.

Bereits 30 Minuten nach Trauma fand sich vor allem in Venolen ein deutlich verlangsamter, teilweise sogar retrograder Blutfluss oder ein vollständiges Sistieren der Durchblutung. Die Blutflussgeschwindigkeit hat sich hier von 3 au/100 μm Minute auf 1,4 \pm 0,3 au/100 μm Minute verlangsamt, das entspricht etwa 40-50% der normalen Flussgeschwindigkeit ($p < 0,01$ vs. Ausgangswert und Kontrolle) (Abb.15).

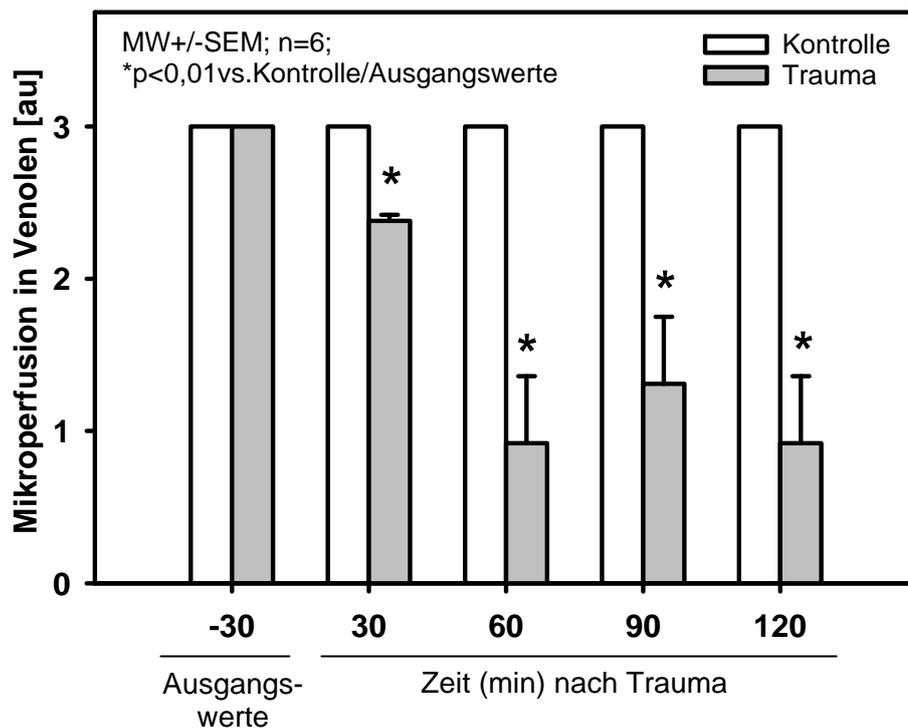


Abb.15: Mikroperfusion in Venolen bis 120 Minuten nach CCI.

Auch in Arteriolen war die Perfusion tendenziell reduziert. Hier ist sie auf $2,0 \pm 0,0$ au/100 μm und Minute zurückgegangen (etwa 66%). Dies erreichte jedoch statistisch keine Signifikanz (vgl. Abb.16).

Die Blutflussgeschwindigkeit hat sich bis zum Ende der Beobachtungszeit 120 Minuten nach Trauma nicht wieder erholt.

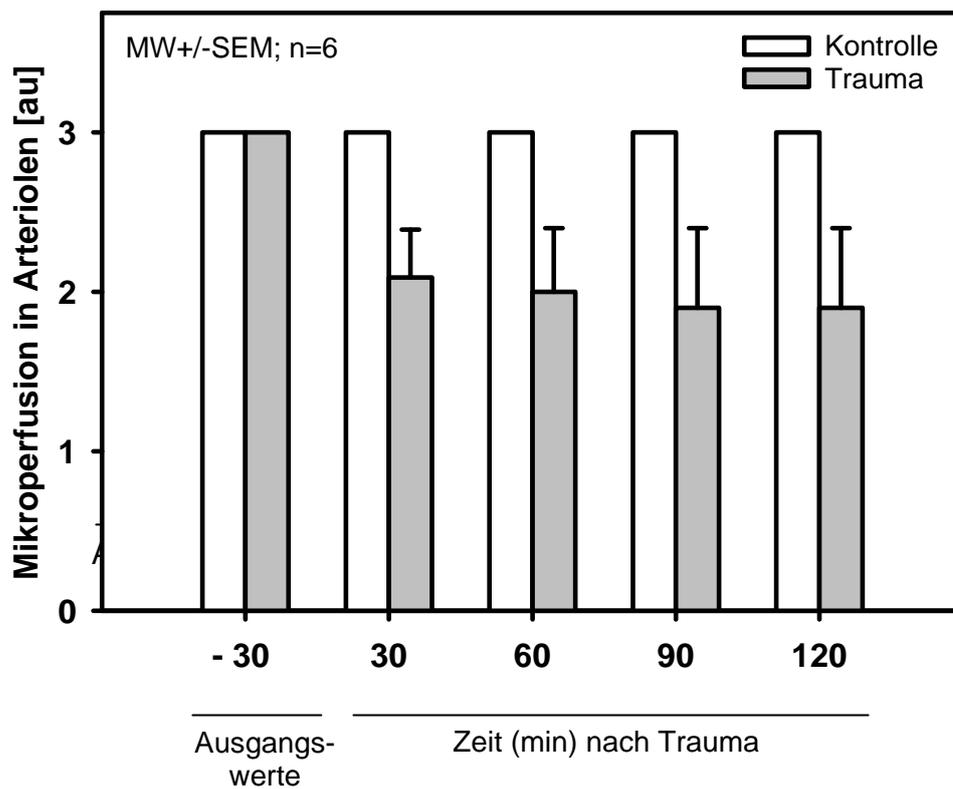


Abb.16: Mikroperfusion in Arteriolen bis 120 Minuten nach CCI.

3.3. Entzündungsreaktion bis 14h nach Schädel-Hirn Trauma

3.3.1. Leukozyten-Endothel Interaktion (LEI)

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Leukozyten-Endothel Interaktion in den ersten 120 Minuten nach Trauma untersucht. Im zweiten Teil wurde die Beobachtungszeit bis zu 13,5 h nach Trauma ausgedehnt. In den verschiedenen Gruppen wurde die Leukozyten-Endothel Interaktion alle 30 Minuten intravitalmikroskopisch gefilmt und quantifiziert. Aus den erhaltenen Werten wurden anschließend Mittelwerte für die verschiedenen Zeitspannen 30 min -2 h, 4 h -5,5 h, 8 h -10,5 h und 12 h -13,5 h nach Trauma errechnet.

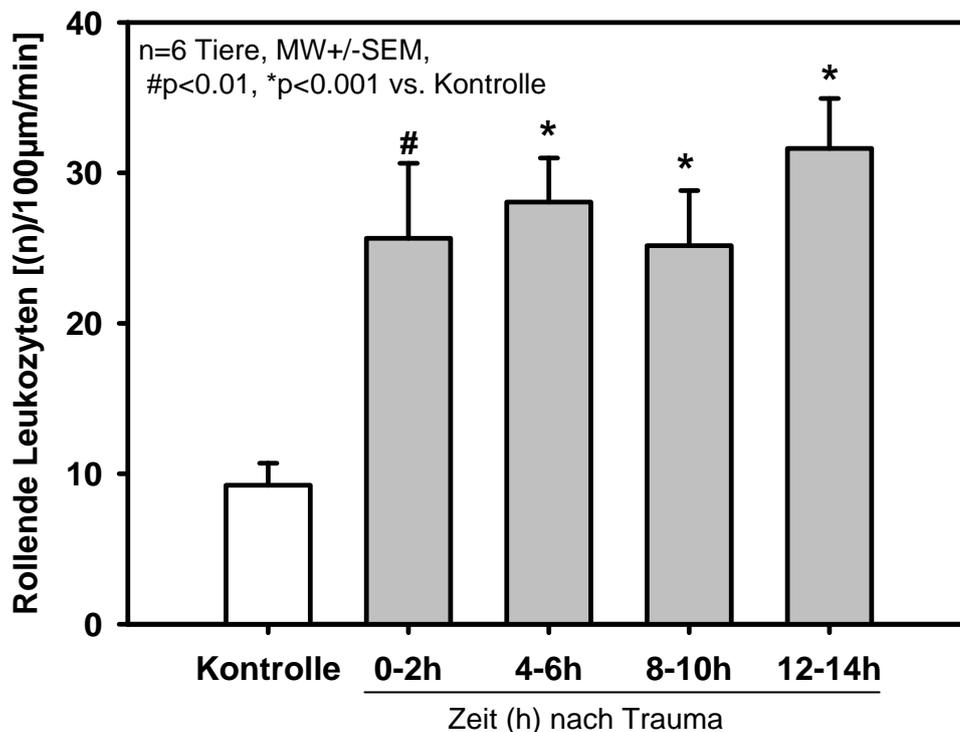


Abb.17: Rollende Leukozyten in Venolen bis 14 h nach CCI.

Bereits in den ersten zwei Stunden nach Trauma stieg die Anzahl rollender Leukozyten in Venolen signifikant auf 25,66+/-4,98/100 µm und Minute an. Wie oben erwähnt entspricht das etwa dem Dreifachen des Ausgangswertes ($p < 0,01$). Diese gesteigerte Leukozyten-

Endothel Interaktion hielt sich auf einem Niveau von $25,15 \pm 3,68$ bis $31,63 \pm 3,31$ rollenden Leukozyten/100 μm und Minute bis zum Ende der Beobachtungszeit 13,5 h nach Trauma ($p < 0,001$), vgl. Abb.17.

In den ersten beiden Stunden nach Trauma war es offensichtlich noch zu früh, um einen signifikanten Anstieg der haftende Leukozyten in Venolen zu beobachten. Innerhalb dieser Zeitspanne war nur eine Tendenz zu vermehrter Leukozytenadhärenz von $2,3 \pm 1,02$ haftenden Leukozyten/100 μm und Minute zu verzeichnen.

Schon im Zeitraum von 4 h - 5,5 h vermehrte sich die Zahl der haftenden Leukozyten in Venolen signifikant auf $10,6 \pm 2,1/100 \mu\text{m}$ und Minute, was etwa dem Zehnfachen des Ausgangswertes entspricht ($p < 0,02$). Nach 8 Stunden schließlich wurde in Venolen ein stabiler Wert von $16,3 \pm 2,7$ bis $17,5 \pm 3,2$ haftenden Leukozyten/100 μm und Minute erreicht, der sich bis zum Ende der Beobachtungszeit nicht mehr veränderte ($p < 0,001$) (Abb.18).

Auch zu den späteren Meßzeiten nach Trauma wurden keine nennenswerte Veränderung der Anzahl der rollenden oder adhärennten Leukozyten in Arteriolen gesehen.

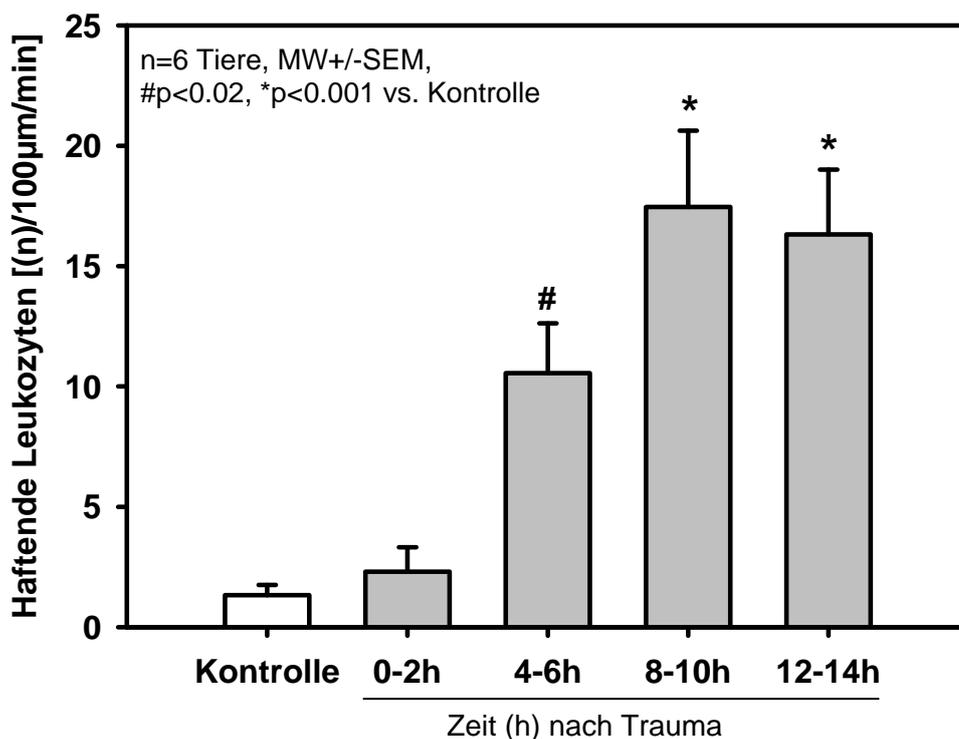


Abb.18: Haftende Leukozyten in Venolen bis 14 h nach CCI.

3.3.2. Bildung von Aggregaten

Wie oben beschrieben wurden posttraumatisch vor allem in Venolen die Entstehung von Leukozyten/Thrombozyten Aggregaten beobachtet, welche über ihre Größe von 15-25µm definiert waren. Bereits in den ersten beiden Stunden nach Trauma waren rollende Aggregate in Venolen zu sehen (17,5±5,5/100 µm und Minute), dieser deutliche Anstieg war jedoch sehr unregelmäßig und aufgrund der großen Standardabweichung statistisch nicht signifikant (p=0,053). Nach 4 h wurden gleichmäßig erhöhte Level von 7,3±1,44 rollende Aggregate/100 µm und Minute erreicht, die hochsignifikant waren (p<0,001). Ihre Anzahl stieg kontinuierlich bis auf 17,9±3,3 rollende Aggregate/100 µm und Minute im letzten Messintervall bis 13,5 h nach Trauma an. Bis zum Ende der Beobachtungszeit wurde kein Plateau erreicht, s. Abb.19.

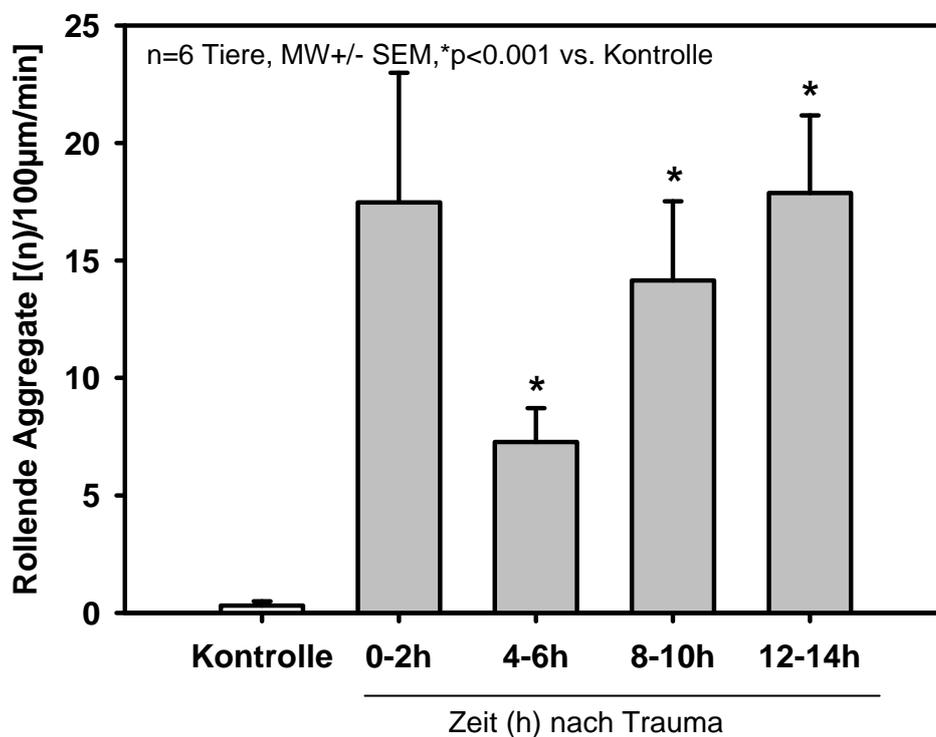


Abb.19: Rollende Aggregate in Venolen bis 14 h nach CCI.

Auch adhärenente Aggregate wurden in Venolen quantifiziert. In den ersten 120 Minuten war wiederum nur eine ansteigende Tendenz von 1,1 haftenden Aggregaten/100 μm und Minute zu sehen. Für adhärenente Aggregate wurden die Werte ebenfalls 4 h nach Trauma statistisch signifikant (1,6 \pm 0,4/100 μm und Minute, $p < 0,01$). Entsprechend der Daten zu rollenden Aggregaten stieg auch die Zahl der haftenden Aggregate kontinuierlich an ohne bis zum Ende der Beobachtungszeit ein Plateau zu erreichen. Im letzten Messintervall 13,5 h nach Trauma wurden 7,3 \pm 1,2 adhärenente Aggregate/100 μm und Minute ($p < 0,001$) gezählt (Abb.20).

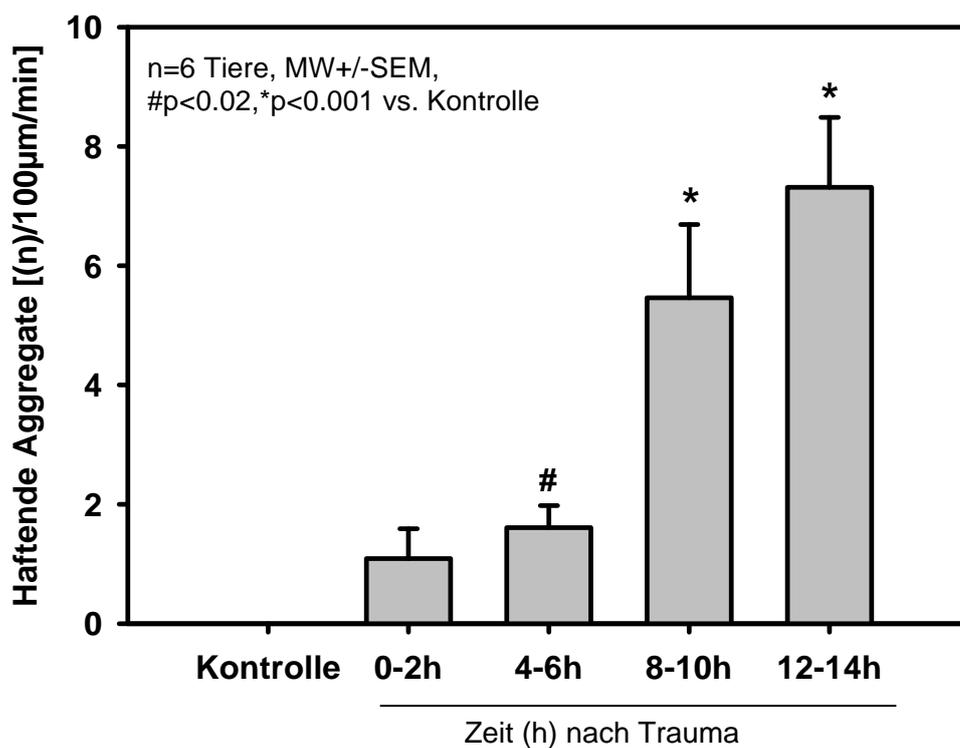


Abb.20: Haftende Aggregate in Venolen bis 14 h nach CCI.

3.3.3. Nekrosewachstum nach Schädel-Hirn Trauma

Am Ende jedes Versuchs wurden die Tiere mit PFA perfundiert und die Hirne wurden entnommen. An histologischen Schnitten wurden anschließend die Kontusionsvolumina bestimmt. Das Volumen der Läsion, das man bereits 15 Minuten nach Trauma quantifizieren konnte, wurde als Ausmaß des initial entstandenen Schadens angesehen. Dieser Primärschaden betrug $6,7 \pm 1,3 \text{ mm}^3$. Schon 2 h später hatte sich das Nekrosevolumen auf $8,2 \pm 0,5 \text{ mm}^3$ vergrößert. Die Kontusion breitete sich im Verlauf der Zeit weiter aus, nach insgesamt 5,5 h bzw. 9,5 h erreichte sie eine Größe von $9,6 \pm 0,5$ bzw. $10,0 \pm 1,0 \text{ mm}^3$, 13,5 h nach Trauma war ein Ausmaß von $9,9 \pm 1,0 \text{ mm}^3$ erreicht. Nach 24 h umfasste das Nekrosevolumen schließlich etwa $10,2 \text{ mm}^3$.

Um eine bessere Vorstellung dieses Verlaufes zu bekommen wurde das Ausmaß des Nekrosevolumens in % des Volumens der kontralateralen Hemisphäre ausgedrückt. 15 Minuten nach Trauma beträgt das Ausmaß etwa 12,6 %, im weiteren Verlauf ergaben sich Werte von 14,8% bzw. 15,3% nach 2 h bzw. 5,5 h und jeweils 15,7% nach 9,5 h und 13,5 h. Nach 24 h schließlich war die Kontusion auf eine Größe von 16,0% des kontralateralen Volumens angewachsen.

Betrachtet man alleine die Penumbra, die erst durch die Ausbreitung des sekundären Hirnschadens nekrotisch wird, kann man die Volumenzunahme über die Zeit genau bestimmen. 15 Minuten nach Trauma ist das Gewebe noch nicht nekrotisch. Die Kontusion breitet sich innerhalb von 24 h um etwa $3,5 \text{ mm}^3$ aus, das entspricht etwa 33% des Gesamtvolumens der Nekrose nach 24 h, vgl. Abb.1 in der Einleitung und Abb. 21.1.

3.3.4. Leukozytenakkumulation in Kontusion und Penumbra

Da pro Schnittfläche mehrere aufeinanderfolgende Schnitte verwertet und unterschiedlich gefärbt wurden, konnte die Leukozytenakkumulation für jeden Zeitpunkt genau mit der Ausbreitung der Kontusion bzw. dem Untergang der Penumbra korreliert werden. Die Angaben der Leukozytenzahl beziehen sich auf ein kontralateral gelegenes Referenzgesichtsfeld von $141 \pm 5,8$ Neuronen.

Nach 15 Minuten wurden $0,8 \pm 0,8$ Leukozyten/Gesichtsfeld in der Penumbra gezählt, in der Kontusion waren es $0,75 \pm 2,91$ Leukozyten/Gesichtsfeld. 2 h, 5,5 h, 9,5 h und 13,5 h nach Trauma wurden im Gewebe der Penumbra jeweils $0,2 \pm 0,2$ Leukozyten/Gesichtsfeld, gar keine Leukozyten, $0,4 \pm 0,2$ Leukozyten/Gesichtsfeld und $1,6 \pm 0,8$ Leukozyten/Gesichtsfeld gezählt. In der Kontusion stieg ihre Anzahl über $1,0 \pm 0,5$ Leukozyten/Gesichtsfeld nach 2 h, $1,5 \pm 1,0$ Leukozyten/Gesichtsfeld nach 5,5 h und $4,9 \pm 2,5$ Leukozyten/Gesichtsfeld nach 9,5 h auf $23,1 \pm 8,8$ Leukozyten/Gesichtsfeld nach 13,5 h an ($p < 0,05$ vs. Kontrolle/Ausgangswerte) (Abb.21.2).

24 h nach Trauma wurden $3,9 \pm 3,0$ Leukozyten/Gesichtsfeld bzw. $1,7 \pm 0,6$ Leukozyten/Gesichtsfeld in der Penumbra gezählt, quantifiziert nach Gabe von Kontroll IgG bzw. Anti-CD18 Antikörpern. In der Kontusion selbst sank die Anzahl der Leukozyten nach 24 h wieder auf $15,5 \pm 6,9$ Leukozyten/Gesichtsfeld bzw. $15,3 \pm 6,1$ Leukozyten/Gesichtsfeld ab.

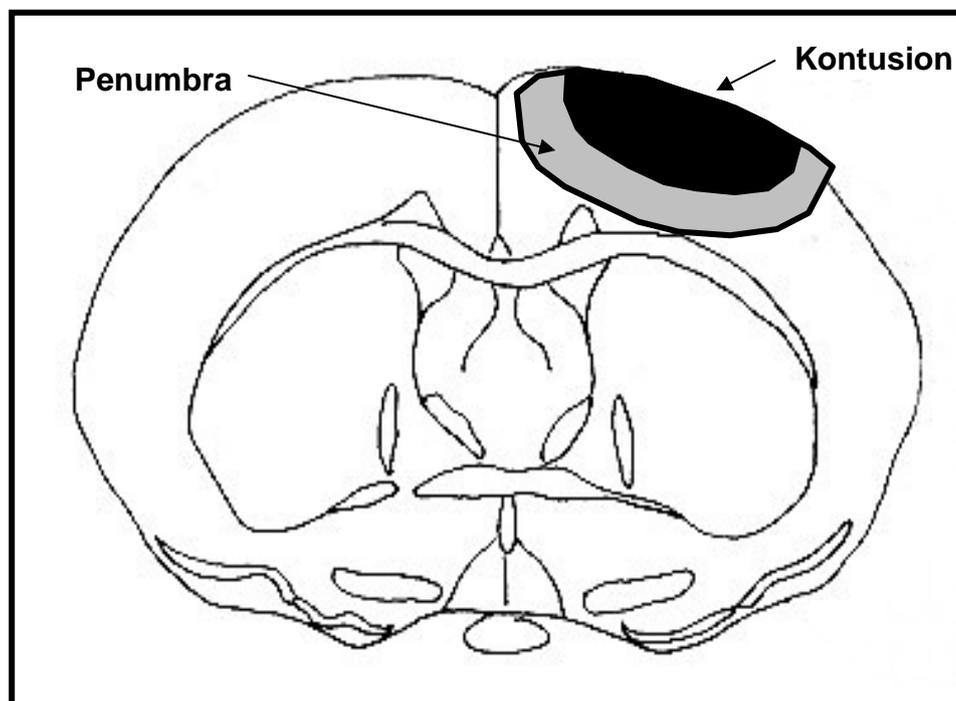
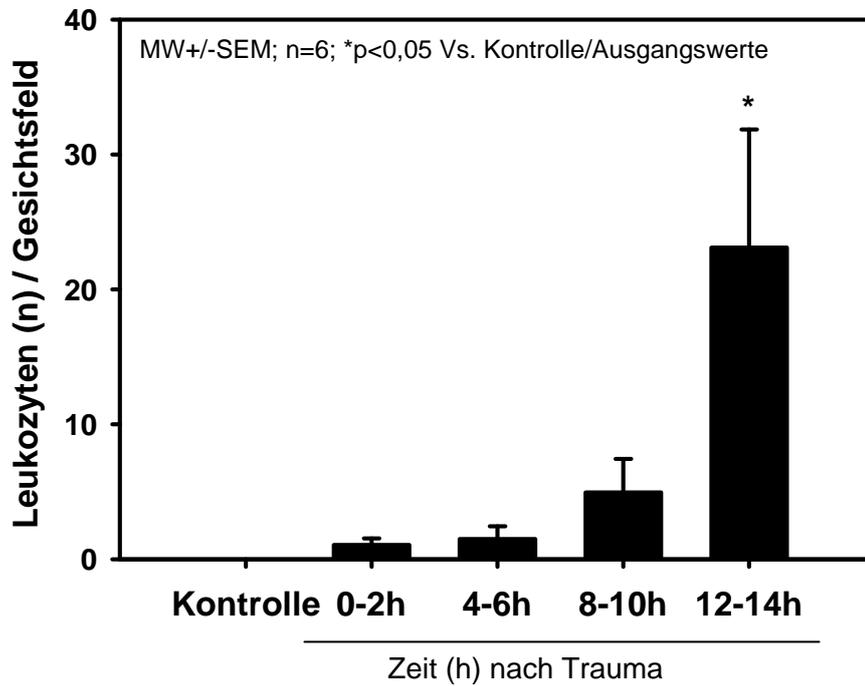


Abb. 21.1: Schematische Darstellung des sekundären Nekrosewachstums nach CCI.

A: Anzahl der Leukozyten in der Kontusion:



B: Anzahl der Leukozyten in der Penumbra:

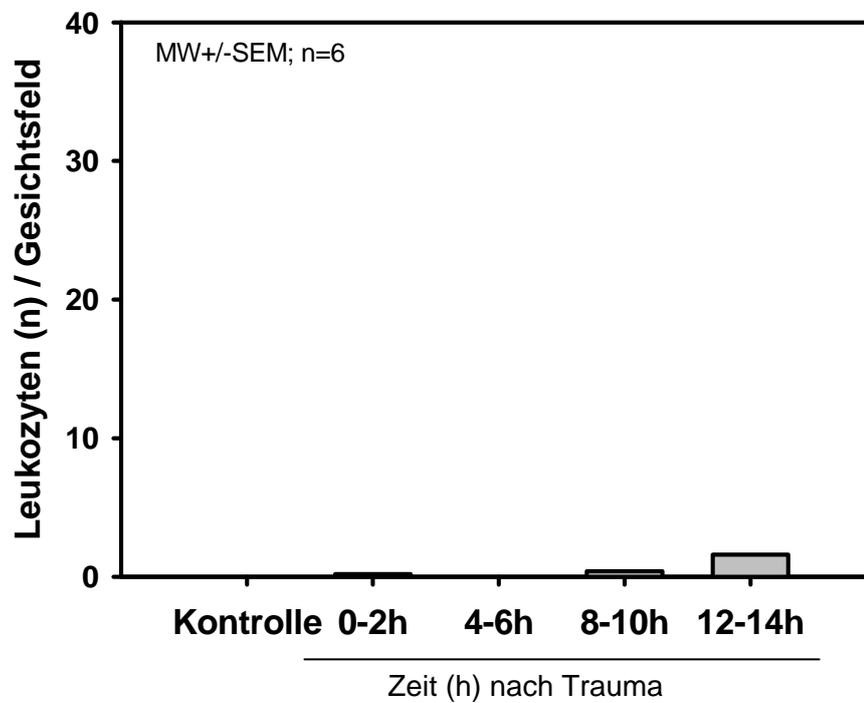


Abb.21.2: Leukozytenakkumulation in (A) der Kontusion und (B) der Penumbra bis 14 h nach CCI.

3.4. Hemmung der Leukozyten-Endothel Interaktion mit Anti-CD18 Antikörpern oder Kontroll IgG

3.4.1. Veränderungen der Leukozyten-Endothel Interaktion

Entsprechend der oben beschriebenen Daten zur Interaktion von Leukozyten und Aggregaten mit dem venösen Endothel wurden 16 h nach Trauma große Mengen an rollenden und haftenden Leukozyten und Aggregaten in den zerebralen Venolen beobachtet. Nach Gabe von Anti-CD18 Antikörpern oder Kontroll IgG fanden sich keine signifikanten Veränderungen, was die Anzahl der rollenden Leukozyten in Venolen betrifft. Das war so zu erwarten, da das Leukozytenrollen nicht durch CD18 vermittelt wird sondern durch Selektine. Es wurden $37,6 \pm 5,3$ rollende Leukozyten/100 μm und Minute nach Injektion von Anti-CD18 Antikörpern bzw. $31,5 \pm 3,3$ rollende Leukozyten/100 μm und Minute nach Gabe von Kontroll IgG gezählt (Abb.22).

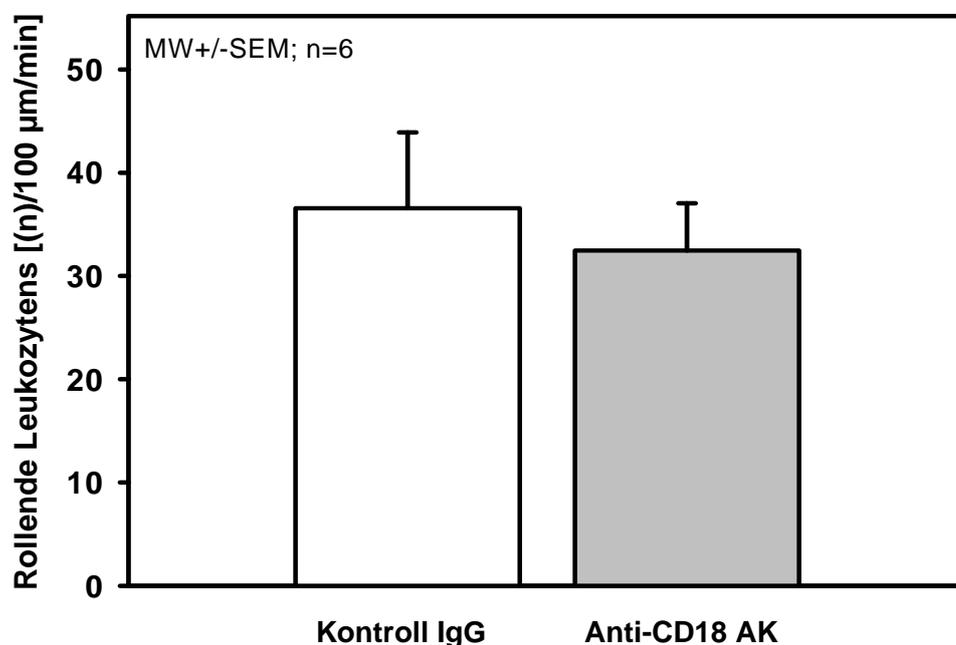


Abb.22: Rollende Leukozyten in Venolen 16 h nach CCI nach Gabe von entweder Kontroll IgG oder Anti-CD18 Antikörpern.

Im Gegensatz dazu hat die Gabe von Anti-CD18 Antikörpern die Zahl der haftenden Leukozyten deutlich reduziert. Nach Injektion von Anti-CD18 Antikörpern wurden $11,1 \pm 1,9$ adhärenente Leukozyten/100 μm und Minute beobachtet, während nach Applikation von Kontroll IgG $33,7 \pm 7,9$ adhärenente Leukozyten/100 μm und Minute zu sehen waren ($p < 0,01$), vgl. Abb.23. Das bedeutet eine Reduktion der Leukozytenadhärenz nach Gabe von Anti-CD18 Antikörpern auf etwa ein Drittel, verglichen mit der Anzahl haftender Leukozyten nach Injektion von Kontroll IgG.

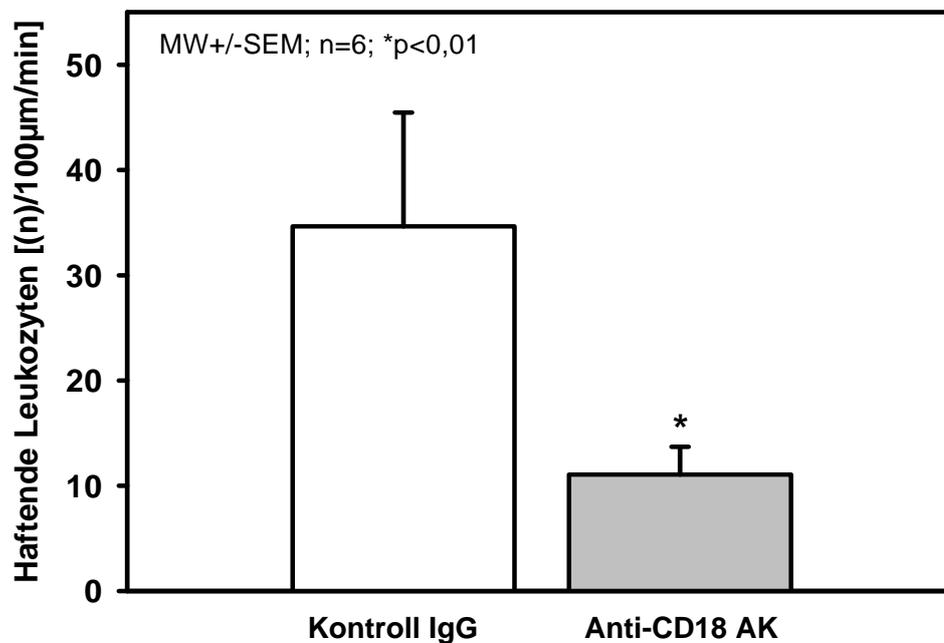


Abb.23: Haftende Leukozyten in Venolen 16 h nach CCI nach Gabe von entweder Kontroll IgG oder Anti-CD18 Antikörpern.

3.4.2. Veränderungen der Aggregat-Endothel Interaktion

Im Bezug auf die Anzahl der rollenden Aggregate waren wie erwartet (s.o.) keine signifikanten Veränderungen zu sehen. Nach Injektion von Anti-CD18 Antikörpern bzw. Kontroll IgG wurden 11,2 \pm 2,5 rollende Aggregate/100 μ m und Minute bzw. 7,0 \pm 2,6 rollende Aggregate/100 μ m und Minute quantifiziert (Abb.24).

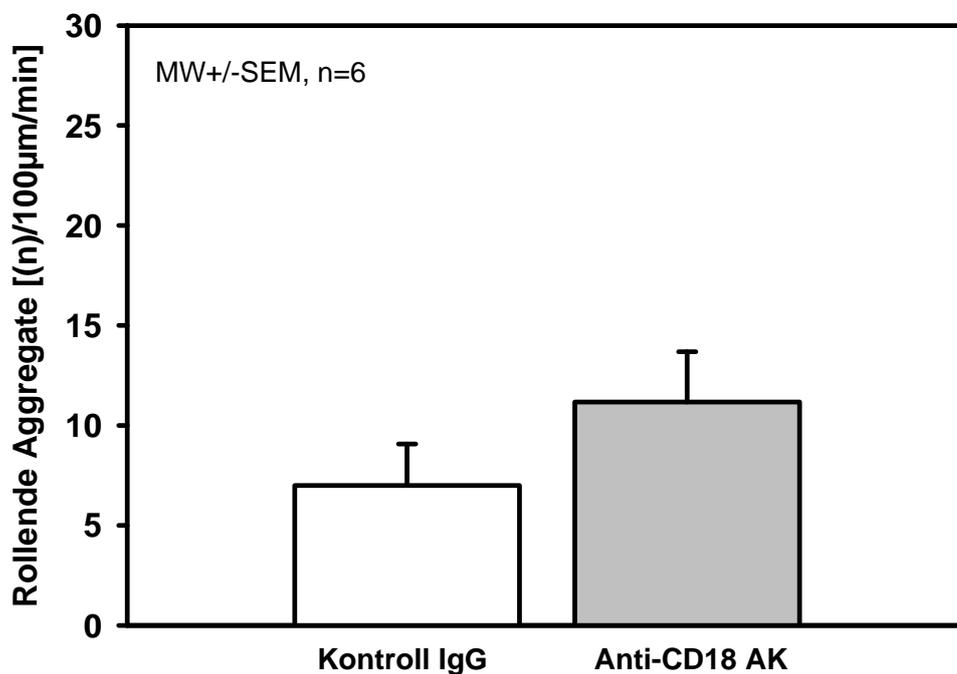


Abb.24: Rollende Aggregate in Venolen 16 h nach CCI nach Gabe von entweder Kontroll IgG oder Anti-CD18 Antikörpern.

Entsprechend den Ergebnissen für Leukozyten war jedoch bei der Anzahl der haftenden Aggregate eine signifikante Veränderung zu beobachten. Der Applikation von Anti-CD18 Antikörpern folgte eine ebenso deutlich Reduktion der haftenden Aggregate wie sie für adhärenente Leukozyten zu verzeichnen war, und zwar auf 3,4 \pm 0,7 haftende Aggregate/100 μ m und Minute verglichen mit 9,0 \pm 1,9 haftenden Aggregaten/100 μ m und Minute ($p < 0,02$)

(Abb.25). Auch in diesem Fall entspricht das einer Reduktion auf etwa ein Drittel im Vergleich zur Anzahl adhärenter Aggregate nach Injektion von Kontroll IgG.

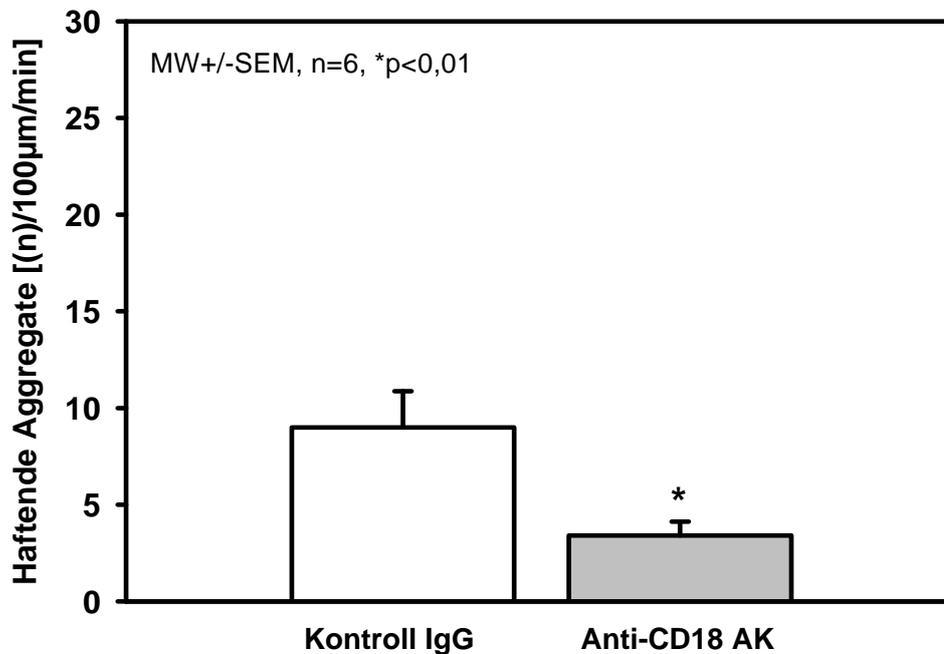


Abb.25: Haftende Aggregate in Venolen bis 16 h nach CCI nach Gabe von entweder Kontroll IgG oder Anti-CD18 Antikörpern.

3.4.3. Sekundäres Nekrosewachstum nach Injektion von Anti-CD18 Antikörpern oder Kontroll IgG

Das Volumen des Primärschadens, der durch unser Trauma mit einer Geschwindigkeit von 6m/s und einer Eindringtiefe von 0,5 mm verursacht wurde, war 15 min nach Trauma $6,7 \pm 1,3 \text{ mm}^3$, das entspricht 12,6% des Volumens der kontralateralen Hemisphäre.

Durch den sekundären Hirnschaden vergrößerte sich das Kontusionsvolumen nach Gabe von Kontroll IgG im Verlauf von 24 h auf $10,3 \pm 0,6 \text{ mm}^3$, s. Abb. 22. und Abb.1. Wie erwartet entspricht das einer Volumenzunahme um etwa 33% im Vergleich zum Ausmaß des Primärschadens 15 Minuten nach Trauma (Plesnila et al., 2003).

Das Kontusionsvolumen 24 h nach Trauma war auch nach Injektion von Anti-CD18 Antikörpern genauso groß wie das der Kontrollgruppe, der sekundäre Hirnschaden führte hier unverändert zu einem Kontusionswachstum um etwa 33% auf $10,1 \pm 1,0 \text{ mm}^3$ (Abb.26). 24 h nach Trauma erreichte das Kontusionsvolumen sowohl nach Gabe von Kontroll IgG als auch nach Injektion von CD18 Antikörpern eine Größe, die in beiden Gruppen gleichermaßen dem Ausmaß von 16,0% des Volumens der kontralateralen Hemisphäre entsprach.

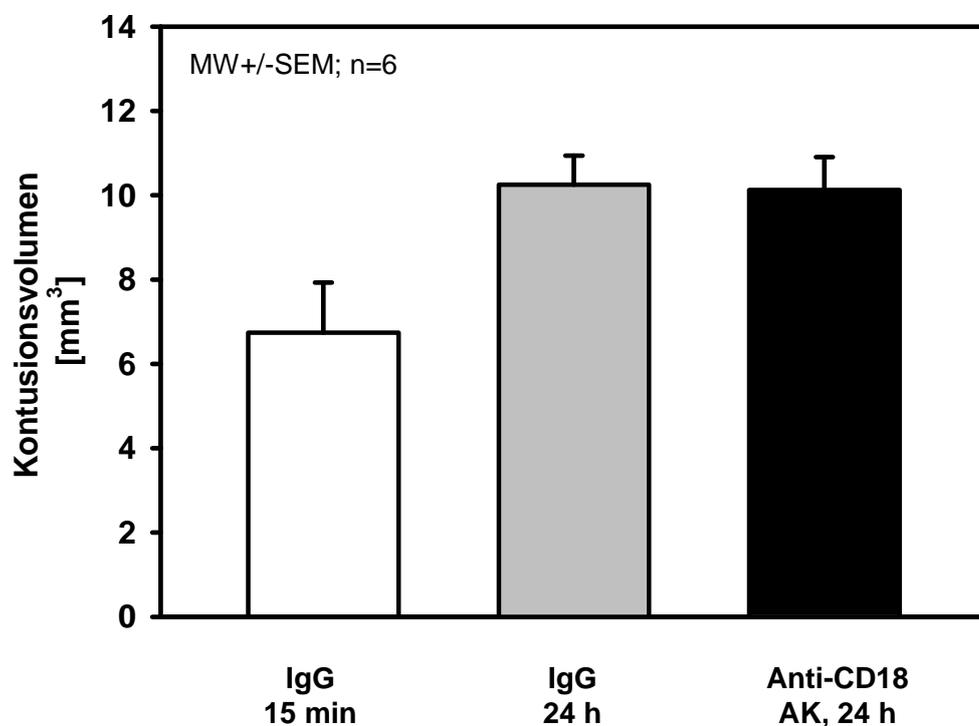


Abb.26: Sekundäres Nekrosewachstum bis 24 h nach CCI im Vergleich zum Kontusionsvolumen nach 15 Minuten nach Gabe von Kontroll IgG oder Anti-CD18 Antikörpern.

4. DISKUSSION

4.1. Zerebrale Durchblutung nach Schädel-Hirn Trauma

In der Literatur gibt es viele Daten zu posttraumatischen Veränderungen der zerebralen Durchblutung. Bei Patienten kommt es in der akuten Phase nach Trauma zu einem Abfall der zerebralen Durchblutung, häufig vergesellschaftet mit einem schlechteren neurologischen Outcome (Graham and Adams, 1971; Obrist et al., 1984; Mendelow et al., 1985; Marion et al., 1991; Bouma et al., 1992; Schroder et al., 1995; Kelly et al., 1997; Martin et al., 1997; von Oettingen et al., 2002; van Santbrink et al., 2002; Hattori et al., 2003).

Auch tierexperimentelle Studien berichten von verminderter Durchblutung des Gewebes in der Kontusion selbst und der perikontusionellen Penumbra, so zum Beispiel nach Weight Drop Injury (Smith et al., 1969; Nilsson et al., 1996), nach Fluid Percussion Injury (Wei et al., 1980; Dewitt et al., 1986; Ishige et al., 1987; McIntosh et al., 1987; Yuan et al., 1988; Yamakami and McIntosh, 1989; Yamakami and McIntosh, 1991; Dewitt et al., 1992; Muir et al., 1992; Dietrich et al., 1996), nach Kälteläsion (Zhuang et al., 1992; Plesnila et al., 2003), oder nach Versuchen mit dem Controlled Cortical Impact Model (Sutton et al., 1993; Cherian et al., 1994; Kochanek et al., 1995; Bryan, Jr. et al., 1995; Hendrich et al., 1999; Liu et al., 2002; Lundblad et al., 2004; Zweckberger et al., 2006; Engel et al., 2008).

Bisher ist allerdings erst eine einzige Studie publiziert worden, in der Veränderungen der Mikrozirkulation *in vivo* beschrieben wurden (Smith et al., 1969). Die Ergebnisse dieser Studie wurden aufgrund der damaligen technischen Möglichkeiten allerdings weder genau quantifiziert noch mit Daten einer Kontrollgruppe verglichen. Auch auf Grund der kleinen Gruppengrößen kann diese Studie nach heutigen Maßstäben nicht als valide angesehen werden.

Im ersten Teil der vorliegenden Studie sollten vor allem die Veränderungen in der zerebralen Mikrozirkulation *in vivo* untersucht werden, um die pathophysiologischen Mechanismen, welche die unmittelbare Reduktion der zerebralen Durchblutung innerhalb der ersten 120 Minuten nach Trauma verursachen, beobachten und quantifizieren zu können.

Exakt dieselben Gefäßsegmente wurden zuerst unter Ausgangsbedingungen und dann im weiteren Verlauf nach Trauma untersucht. Damit war es möglich, die posttraumatischen Veränderungen direkt mit der jeweiligen Mikrozirkulation vor Trauma zu vergleichen. Zusätzlich wurde die Mikrozirkulation in einer Kontrollgruppe beobachtet und zum Vergleich herangezogen.

Venolen zeigten unter Ausgangsbedingungen und in Kontrolltieren eine normale, unbeeinträchtigte Blutflussgeschwindigkeit, die Leukozyten-Endothel Interaktion beschränkte sich auf wenige rollende Leukozyten, wie es unter physiologischen Bedingungen zu erwarten ist. Entsprechend wurden auch in Arteriolen ein normaler Gefäßtonus und keine Leukozyten-Endothel Interaktion beobachtet. Nach Trauma hat sich das Lumen von Arteriolen, welche initial einen Gefäßdurchmesser von 15-30 μm aufwiesen, signifikant erweitert. Vor allem in Venolen war eine pathologisch erhöhte Leukozyten-Endothel Interaktion, insbesondere eine deutliche Zunahme der rollenden Leukozyten, zu beobachten. Zusätzlich kam es posttraumatisch zur Bildung von Leukozyten/Thrombozyten Aggregaten. Massive Thrombenbildung und eine gravierende Verlangsamung der Blutflussgeschwindigkeit wurden vor allem in zerebralen Venolen festgestellt, während die beobachteten Arteriolen eine mildere Reduktion der Blutflussgeschwindigkeit und weniger Mikrothromben aufwiesen.

Die Aufnahmen unter physiologischen Bedingungen vor Trauma waren nicht nur für die Quantifizierung der Änderungen im arteriellen Gefäßdurchmesser und der Leukozyten-Endothel Interaktion wichtig, von besonderer Bedeutung waren die Aufnahmen auch für die Erfassung von Mikrothromben. Waren die Gefäße durch einen Mikrothrombus verschlossen, so waren die Thromben selbst nicht notwendigerweise im Bild zu sehen. Teilweise waren die Gefäße nach Trauma nicht mehr angefärbt und damit auch nicht mehr sichtbar. Im letzteren Fall war nur aufgrund der Aufnahmen vor Trauma zu erkennen, dass an einer bestimmten Stelle ein gut durchblutetes Gefäß gewesen war, welches posttraumatisch offensichtlich durch einen Mikrothrombus verschlossen wurde.

4.1.1. Modelletablierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein reproduzierbares, gut geeignetes Mausmodell mit klinischer Relevanz etabliert (Lighthall, 1988; Lighthall et al., 1989; Dixon et al., 1991; Sutton et al., 1993; Zweckberger et al., 2003). Es ist leicht zu modifizieren und ermöglicht es somit, verschiedene pathophysiologische Aspekte des Schädel-Hirn Traumas zu untersuchen oder unterschiedliche therapeutische Interventionen zu testen. Mäuse haben den Vorteil, dass sie aufgrund ihrer Größe günstig zu halten sind und es eine ganze Reihe von knock-out bzw. transgenen Tieren gibt, die für verschiedenste Studien und Untersuchungsansätze verwendet werden können.

Berücksichtigt man den Einfluss, den systemische Parameter wie beispielsweise $p\text{CO}_2$ oder Blutdruck auf die zerebrale Mikrozirkulation haben können, so ist es wichtig, diese während eines Versuches zu kontrollieren und vor allem auch innerhalb ihrer physiologischen Grenzen zu halten. Deshalb wurde in dem hier verwendeten Model Körpertemperatur, endexpiratorisches $p\text{CO}_2$ (Thal and Plesnila, 2007) und mittlerer arterieller Blutdruck (Kataoka et al., 2004) kontinuierlich überwacht sowie die arteriellen Blutgase am Ende jedes Versuches überprüft. Hierbei wurde darauf geachtet, diese Parameter innerhalb ihrer physiologischen Grenzen zu halten.

Im Gegensatz zum Model des Controlled Cortical Impact ist beispielsweise das Fluid Percussion Injury Model (FPI), welches ebenfalls sehr häufig für die Untersuchung der pathophysiologie des Schädel-Hirn Traumas verwendet wird, mit zwei entscheidenden Nachteilen behaftet (Dixon et al., 1991). Zum einen ist es sehr schwierig, das induzierte Trauma biomechanisch exakt zu analysieren bzw. zu quantifizieren, da sich die Flüssigkeit, mit der das Trauma induziert wird, sehr unregelmäßig im Epiduralraum ausbreitet. Zum anderen werden mit dem FPI Model nicht nur diffuser axonaler Schaden und Blutungen im Bereich des Parenchyms verursacht, sondern auch histopathologische Veränderungen, die nicht notwendigerweise dem klinischen Bild des schweren Schädel-Hirn Traumas beim

Menschen entsprechen. Dazu gehört beispielsweise eine primäre Schädigung des Hirnstamms (Mitchell and Adams, 1973; Dixon et al., 1991; Shima and Marmarou, 1991).

Das mit dem CCI Model induzierte Trauma ist exakt quantifizierbar und entspricht in vielen Details dem klinischen Verlauf des Schädel-Hirn Traumas beim Menschen. Das betrifft sowohl die akuten pathophysiologischen Veränderungen (Dixon et al., 1991; Hlatky et al., 2003) als auch den weiteren Krankheitsverlauf (Dixon et al., 1991; Fox et al., 1998; Dixon et al., 1999).

Da das kanielle Fenster für die Intravitalmikroskopie ipsilateral und so nah wie möglich an der Kontusion platziert war, war es möglich, die Gefäße innerhalb oder zumindest am Rand der Penumbra zu untersuchen. Somit wurde genau der Teil des Gewebes beobachtet, in dem nach Trauma gravierend erniedrigte Laser-Doppler Werte (ca 40-60% des Ausgangswertes) für den Blutfluss gemessen wurden (Sutton et al., 1993; Cherian et al., 1994; Nilsson et al., 1996; Stover et al., 2000; Plesnila et al., 2003; Zweckberger et al., 2003; Engel et al., 2008; Hall et al., 2008; von Baumgarten et al., 2008).

Die Mikrozirkulation wurde nicht näher an der Kontusion gemessen, da zumindest eine kleine knöcherne Brücke zwischen den Fenstern belassen werden sollte. Diese Brücke diente zum einen dazu, dass eventuelle Blutungen, die beim CCI Model auftreten können, vom IVM Fenster ferngehalten werden. Zum anderen verhinderte sie, dass Histoacrylkleber, welcher für den Verschluss der CCI Trepanation nach Trauma verwendet wurde, das IVM Fenster bzw. die Dura beschädigt. Die Messungen beziehen sich demnach vor allem auf den Rand der Penumbra, d.h. auf Gewebssausschnitte, deren kontusionsnahe Anteile im Verlauf von 24 h nekrotisch werden und deren kontusionsferne Anteile vital bleiben. Wie Engel et al. 2008 beschreiben, scheint das Gebiet der extremen posttraumatischen Minderperfusion (<10% des Ausgangswertes) kleiner als das Gebiet des sekundären Nekrosewachstums zu sein (Engel et al., 2008). In der hier vorliegenden Studie wurden demnach Gewebe bzw. Gefäße in einer Region mit weniger drastischem Abfall der zerebralen Durchblutung untersucht (ca. 40-60% des Ausgangswertes, s. oben). Es ist jedoch sehr wahrscheinlich, dass die Veränderungen, die 30-120 Minuten nach Trauma etwa 2 mm von der primären

Kontusion entfernt, d.h. in der Region mit moderaten Veränderungen der Durchblutung, auftreten, entsprechend früher und möglicherweise sogar verstärkt zu beobachten wären, je näher zur Kontusion man die Mikrozirkulation beobachtet.

Auch auf der kontralateralen Seite wurde die Mikrozirkulation untersucht. Dort wurden allerdings keine Veränderungen verzeichnet, weder Änderungen des arteriellen Durchmessers noch vermehrte Bildung von Mikrothromben oder gesteigerte Leukozyten-Endothel Interaktion. Das steht im Einklang mit Ergebnissen aus früheren Studien zu sekundärem Hirnschaden nach CCI, in denen sich der Gewebsschaden ausschließlich auf der ipsilateralen Seite manifestiert (Sutton et al., 1993; Goodman et al., 1994; Kochanek et al., 1995; Zweckberger et al., 2006; Engel et al., 2008; Hall et al., 2008).

Die selektive Färbung einerseits von Leukozyten und Thrombozyten und andererseits von Plasma erlaubten eine sehr differenzierte Untersuchung verschiedener Kompartimente der Mikrozirkulation. Demnach konnten arterieller Gefäßdurchmesser, Leukozyten-Endothel Interaktion und die Bildung von Aggregaten und Mikrothromben zu verschiedenen Zeitpunkten gefilmt, auf Video aufgenommen und anschließend quantifiziert werden.

4.1.2. Arterieller Gefäßdurchmesser

In vielen Studien zu Veränderungen des Gefäßdurchmessers wird vor allem von posttraumatischer arterieller Vasokonstriktion oder sogar Vasospasmen berichtet, welche von den Autoren meist mit dem gleichzeitigen Auftreten von posttraumatischen Blutungen assoziiert werden. Das heißt das Trauma selbst wird selten bzw. nur indirekt als Ursache für die von den Autoren beschriebene Vasokonstriktion oder den Vasospasmus gesehen (Zwienenberg and Muizelaar, 2001; Golding, 2002). Dies betrifft Beobachtungen sowohl bei Patienten (Oertel et al., 2005) als auch im Tierexperiment (Dietrich et al., 1994; Zwienenberg and Muizelaar, 2001; Golding, 2002). Armstead et al. berichten ebenfalls von posttraumatischer Vasokonstriktion, allerdings wurde in ihrem Studiendesign das Auftreten von Blutungen innerhalb des Messbereichs minimiert (Armstead and Kurth, 1994). In ihrer Studie untersuchten Armstead und Kurth vor allem Gefäße eines initialen Durchmessers von

140 μm bzw. 70 μm . Vor allem erstere zeigten eine deutliche Vasokonstriktion, die wesentlich ausgeprägter ausfiel als bei den kleineren Arteriolen von 70 μm Durchmesser. Dies stimmt mit anderen Angaben aus der Literatur zur posttraumatischen Veränderung des arteriellen Durchmessers überein. Die meisten Daten zu posttraumatischer Vasokonstriktion betreffen Gefäße mit einem Durchmesser größer als 100 μm (Smith et al., 1969; Wei et al., 1980; Dewitt et al., 1986; Thomale et al., 2002), während gleichzeitig für kleinere Arteriolen sogar eine Dilatation beschrieben wird (Dewitt et al., 1986; Thomale et al., 2002). Demnach scheint neben möglichen Blutungen vor allem der initiale Durchmesser der untersuchten Arteriolen eine wesentliche Rolle für deren posttraumatische Reaktion zu spielen. In einer Patientenstudie von Hattori wird der arterielle Durchmesser indirekt berechnet, auch hier wird von posttraumatischer Vasodilatation berichtet, allerdings ohne genaue Angaben über Ausgangswerte (Hattori et al., 2003).

In der vorliegenden Studie wurden Arteriolen mit einem initialen Durchmesser von 15-30 μm untersucht. Sofort nach Trauma kam es zu einer deutlichen Vasodilatation, die zumindest für 120 Minuten bestehen blieb. Dies steht im Einklang mit den oben zitierten Angaben der Literatur. Arteriolen und Arterien mit einem initialen Durchmesser größer als 50 μm wurden in der vorliegenden Studie nicht beobachtet.

Eine Vasokonstriktion der größeren Gefäße, beispielsweise aufgrund von Blutungen, könnte zu einer relativen Ischämie des perikontusionellen Gewebes führen. Die Dilatation der kleineren Arteriolen der Mikrozirkulation ist möglicherweise eine autoregulatorische Reaktion auf diese Unterversorgung. Sowohl die Vasokonstriktion der größeren Arterien und Arteriolen und der damit verbundene verminderte Blutfluss als auch die Dilatation der kleineren Gefäße, welche zu einer Vergrößerung des intravasalen Raums führt, könnten somit - unter anderem - für die in dieser Studie beobachtete Reduktion der Blutflussgeschwindigkeit verantwortlich sein.

4.1.3. Bildung von Aggregaten

Im Zusammenhang mit dem sekundären Nekrosewachstum nach CCI sind Aggregate, wie sie in der vorliegenden Studie intravitalmikroskopisch beobachtet wurden, bisher noch nicht in der Literatur beschrieben worden.

Es handelt sich dabei um Gebilde, die wahrscheinlich aus Leukozyten und Thrombozyten zusammengesetzt sind, eine Größe von 15-25 µm haben und nach Trauma entstehen. Sie wurden weder unter physiologischen Bedingungen noch bei Kontrolltieren beobachtet. Bei den traumatisierten Tieren traten sowohl rollende als auch haftende Aggregate auf, allerdings gab es eindeutig mehr rollende Strukturen.

Leukozyten-Thrombozyten Aggregate wurden bisher vor allem im Zusammenhang mit einer Entzündungsreaktion beschrieben. Der verantwortliche Rezeptor auf Thrombozyten ist P-Selectin, ein Adhäsionsprotein, das nach Thrombozytenaktivierung hochreguliert wird. Dieses bindet an seinen Liganden P-Selectin Glykoprotein Ligand-1 (PSGL-1), welcher auf Leukozyten (Monozyten und Neutrophilen) exprimiert wird (Rinder et al., 1991; McEver and Cummings, 1997; Yang et al., 1999; Chen and Geng, 2006).

In einer Studie an Mesenterialgefäßen von Ratten wurde TNF-alpha systemisch und PAF lokal injiziert, was zur Bildung von Leukozyten-Thrombozyten-Aggregaten geführt hat, die am Endothel haften blieben. Dies war mit einer gesteigerten Permeabilität vergesellschaftet, die wesentlich ausgeprägter war als die Permeabilitätssteigerung nach der Gabe von PAF alleine (He et al., 2006). Mit der Gabe von Anti-CD18 Antikörpern im 2. Teil der Studie konnte die Adhäsion der Aggregate an das Endothel deutlich gemindert werden. Da dies speziell die Leukozyten-Endothel-Interaktion hemmt wurde so gezeigt, dass Leukozyten in den Aggregaten enthalten gewesen sein müssen.

In jedem Fall könnten Aggregate über eine mechanische Schädigung oder einer Aktivierung des Endothels die Entstehung von Mikrothromben unterstützen. Ausserdem könnten sie, ebenso wie die Leukozyten, die Strömung des Blutes beeinträchtigen bzw. den Blutfluss verlangsamen und die intravasale Gerinnung fördern. Ihre Größe reicht eventuell auch aus, kleinere Arteriolen und Kapillaren zu verschließen.

4.1.4. Mikrothromben

Die Entstehung von Mikrothromben nach Schädel-Hirn Trauma wurde bereits mehrmals in der Literatur erwähnt. Die meisten Daten zur Thrombosierung nach Trauma wurden allerdings an histologischen Präparaten gewonnen, sowohl in Patientenstudien (Lafuente and Cervos-Navarro, 1999; Stein et al., 2004) als auch im Tierexperiment (Hekmatpanah and Hekmatpanah, 1985; Dietrich et al., 1994; Dietrich et al., 1996; Maeda et al., 1997; Stein et al., 2004). Thrombozytenaggregationen wurden vor allem in der Nähe von Blutungen (Dietrich et al., 1994) oder intravaskulär gefunden (Hekmatpanah and Hekmatpanah, 1985; Dietrich et al., 1996), allerdings ohne zeitliche Korrelation mit dem posttraumatischen Verlauf des sekundären Nekrosewachstums. Maeda et al. beschreiben die Bildung von Mikrothromben 1 h, 6 h und 24 h nach CCI an histologischen Präparaten. Die Plättchenaggregation gehört nach ihrer Aussage zu den ersten pathologischen Veränderungen, die nach Trauma auftreten. So wurden Mikrothromben anfangs vor allem im Zentrum der Kontusion gesehen, später auch in der perikontusionellen Penumbra (Maeda et al., 1997).

In Untersuchungen an nach Trauma verstorbenen Patienten zeigte sich, dass das Auftreten von Mikrothromben mit neuronalem Zelltod vergesellschaftet ist (Rosenblum et al., 1982; Stein et al., 2004; Stein and Smith, 2004). Vor allem die ipsilaterale Hemisphäre ist nach einer Patientenstudie von Lafuente und Cerrós Navarro von posttraumatischer Plättchenaggregation betroffen (Lafuente and Cervos-Navarro, 1999).

Smith et al. haben als erste in Tierversuchen *in vivo* die posttraumatische Entstehung von Mikrothromben im zeitlichen Verlauf beschrieben (Smith et al., 1969). Physiologische Parameter wie Blutdruck und endexpiratorischer CO₂ wurden jedoch in dieser Studie nicht kontrolliert und es wurden insgesamt nur wenige Versuche an unterschiedlichen Tierarten durchgeführt. Die Ergebnisse wurden weder quantifiziert noch mit den Daten einer Kontrollgruppe verglichen. In einer intravitalmikroskopischen Studie an Katzen nach FPI wurde 1982 von Roseblum eine Verstärkung der Thrombozytenaggregation beobachtet. Diese Thrombozytenaggregation wurde allerdings nicht initial auf das Trauma zurückgeführt

sondern auf das Zusammenspiel von Phototoxizität der Quecksilberlampe und dem applizierten intravaskulären Farbstoff. Dem Trauma selbst wurde nur eine Rolle als Katalysator dieser Reaktion zugeschrieben (Rosenblum et al., 1982).

Mit unserem Modell war es erstmals möglich, die posttraumatische Entstehung von Mikrothromben *in vivo* unter kontrollierten physiologischen Bedingungen zu beobachten, sie zu quantifizieren und mit dem zeitlichen Verlauf des sekundären Nekrosewachstums zu korrelieren.

Für ihre Entstehung gibt es verschiedene Erklärungsansätze:

Es ist bekannt, dass es nach Trauma zu einem Anstieg des Spiegels von Thromboxan A₂ bzw. des stabilen Metaboliten Thromboxan B₂ kommt (Shohami et al., 1987; Dewitt et al., 1988). Dies wurde bisher vor allem mit der von anderen beschriebenen arteriellen Vasokonstriktion in Verbindung gebracht. Die Vasokonstriktion scheint nur Gefäße mit einem initialen Durchmesser >40µm zu betreffen, wie unsere Beobachtungen bezüglich kleinerer Arteriolen vermuten lassen (s.oben). Erhöhte Spiegel von gerinnungsförderndem Thromboxan können die Entstehung von Mikrothromben begünstigen. Dieser Effekt könnte einerseits durch die Verlangsamung der Blutflussgeschwindigkeit und andererseits durch Turbulenzen, die durch die Reaktion der Leukozyten und der Aggregate mit dem Endothel entstehen, verstärkt werden. Das würde die Bildung von "weissen", eher instabilen Thromben fördern.

Durch die mechanische Komponente eines Traumas kann es zur kurzzeitigen Dehnung der Gefäße kommen, was eventuell kleinere Verletzungen des Endothels verursacht. Dadurch könnte subendotheliales Kollagen freigelegt werden und die intrinsische Gerinnungskaskade aktivieren. Das würde zur Umwandlung der instabilen Thromben in stabilere "rote" Thromben führen. Derartige mechanische Gefäßwandschädigungen bzw. Unterbrechungen der Endothelschicht nach experimentellem Trauma wurden, im Zusammenhang mit Blutungen, bereits von Dietrich beschrieben (Dietrich et al., 1994; Dietrich et al., 1996).

Traumata, die direkt zu Gewebsverletzungen beziehungsweise zur Freisetzung von Gewebsthrombokinase (Thromboplastin, Faktor III, tissue factor) führen, könnten auch eine Aktivierung der extrinsischen Gerinnungskaskade verursachen. Bereits 1939 verwendete Quick für seine Methode zur Messung der Prothrombinzeit Hirngewebe, da dieses besonders reich an Faktor III ist, welcher eine sehr wichtige Rolle in der Gerinnungskaskade spielt (Quick AJ, 1939). Thromboplastin kann auch bei Endothelverletzungen auf Endothelzellen selbst oder nach Aktivierung von zellulären Abwehrsystemen auf Monozyten und Endothelzellen exprimiert werden.

Der Plättchen aktivierende Faktor (PAF), welcher von Granulozyten oder Monozyten bei einer Entzündungsreaktion beziehungsweise von aktivierten Thrombozyten freigesetzt wird (Benveniste et al., 1972; Benveniste, 1974; Pinckard et al., 1979; Hanahan et al., 1980), könnte ebenfalls die Thrombozytenaktivierung und Plättchenaggregation verstärken. Ein Antagonist gegen den Plättchen aktivierenden Faktor hat die zerebrale Durchblutung nach traumatischer Laserverletzung verbessert und das Kontusionsvolumen, die Permeabilität der Blut-Hirn Schranke und den Hirn-Wasser Gehalt reduziert (Frerichs et al., 1990). Bentzer et al. berichten von einer Verbesserung der zerebralen Durchblutung nach Trauma, welche nach Gabe von Prostaglandin beobachtet wurde. Sie führen dies unter anderem auf einen möglichen Zusammenhang mit der gerinnungshemmenden Wirkung von Prostaglandin zurück (Bentzer et al., 2003). In einer Studie mit dem CCI Modell berichten Maeda et al. von einer verbesserten zerebralen Durchblutung sowie von einer Reduktion der Plättchenaggregation nach Gabe von PAF-Antagonisten im Vergleich zu Kontrolltieren.

Weitere Untersuchungen zur Hemmung der Thrombozytenaktivierung und der Thrombose und deren Auswirkung auf den neuronalen Zelltod nach Trauma wären demnach dringend notwendig.

4.1.5. Blutflussgeschwindigkeit

Die Blutflussgeschwindigkeit war unter physiologischen Bedingungen so schnell, dass es mit unseren apparativen Möglichkeiten nicht möglich war, einzelne Zellen im Blutstrom

auszumachen und ihre Geschwindigkeit genau zu bestimmen. Dementsprechend wurde die Blutflussgeschwindigkeit nur qualitativ angegeben und nicht berechnet. Für die vorliegende Studie wurden vier Kategorien definiert. Demnach entsprechen jeweils normaler, reduzierter, langsamer oder kein/retrograder Blutfluss den Werten 3, 2, 1 oder 0. Wiederum wurden die deutlichsten Veränderungen in Venolen beobachtet. Dort hat sich die Blutflussgeschwindigkeit nach Trauma massiv verlangsamt und sich auch bis zum Ende der Beobachtungszeit nicht wieder erholt. Auch der arterielle Blutfluss war eingeschränkt, die Reduktion war jedoch geringer und statistisch nicht signifikant. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit vielen Berichten aus der Literatur (Dewitt and Prough, 2003; Engel et al., 2008). Nach der Veröffentlichung von Engel et al. ist der Bereich der extremen posttraumatischen zerebralen Minderperfusion insgesamt kleiner als das Gebiet, in welches sich das Nekrosevolumen sekundär ausdehnt. Dies wurde nach Injektion eines radioaktiv markierten Tracers an histologischen Schnitten quantifiziert und ausgewertet (Engel et al., 2008). Diese Studie steht bisherigen Studien gegenüber, die eine Minderung der zerebralen Durchblutung in der Kontusion selbst und in der perikontusionellen Penumbra postulieren, allerdings nicht mit solch extremen Werten (s. oben). Die Verminderung der Blutflussgeschwindigkeit spiegelte sich bei diesen Studien vor allem in der bei Patienten und im Tierexperiment wiederholt gemessenen posttraumatischen Reduktion von Laser-Doppler Werten der zerebralen Durchblutung wieder. Bisher wurde die Blutflussgeschwindigkeit nur einmal direkt gemessen (van Santbrink et al., 2002). In ihrer Patientenstudie berichten van Sandbrink et al. von einer Verlangsamung der Blutflussgeschwindigkeit, die in direktem Zusammenhang mit der Stärke des Traumas steht.

Die initiale Reduktion des CBF nach Trauma kann nach den hier vorliegenden Ergebnissen nicht allein auf arterielle Vasokonstriktion oder Vasospasmen zurückgeführt werden, da zumindest kleinere Arteriolen nach Trauma dilatieren. Zudem kann die Blutflussreduktion innerhalb der ersten 40-60 Minuten nicht durch erhöhten ICP verursacht sein, da dieser erst nach 60 bzw. 120 Minuten signifikant von ca. 3-5 mmHg auf Werte von ca. 13 mmHg bzw.

16 mmHg ansteigt, wie Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe gezeigt haben (Zweckberger et al., 2003).

Im Gegensatz dazu könnten sowohl Mikrothromben als auch Aggregate größere bzw. kleinere Gefäße verschließen und damit zu einer Verminderung des CBF führen. Niedrige Flussgeschwindigkeit sowie Veränderungen im Blutstrom durch Leukozyten-Endothel Interaktion und Aggregate, die zu zusätzlicher Verlangsamung des Blutflusses sowie zu Turbulenzen führen können, könnten zusammen mit einem posttraumatischen Anstieg von TxA_2 bzw. TxB_2 (Shohami et al., 1987; Dewitt et al., 1988) sehr gut zur Bildung von weiteren Mikrothromben führen. Diese könnten weitere Gefäße ganz oder teilweise verschließen und damit wiederum den Blutfluss deutlich vermindern. Somit würde einerseits die Reduktion des CBF durch die Mikrothromben verstärkt bzw. das Gebiet der Minderperfusion vergrößert und andererseits die Bildung weiterer Mikrothromben gefördert. Diese posttraumatischen Veränderungen der Mikrozirkulation münden demnach in einen circulus vitiosus und spielen sehr wahrscheinlich eine Rolle für das sekundäre Nekrosewachstum.

Ob die Hemmung der Thrombozytenaggregation den CBF und letztlich auch den Krankheitsverlauf nach Trauma verbessern könnte, müsste genauer untersucht werden. Dabei sollte man vor allem Medikamente testen, die primär nur die intravaskuläre Thrombenbildung vor allem durch die intrinsische Kaskade hemmen, aber die primäre Hämostase, das heißt die Blutungszeit, nicht verlängern. Da es nach Trauma häufig zu intrakraniellen Blutungen kommt ist es unbedingt notwendig, ein schnelles Sistieren dieser Blutungen nicht zu beeinträchtigen.

4.2. Leukozyten

Mit Hilfe von Intravitalmikroskopie in den Zeiträumen 30 min-2 h, 4-5,5 h, 8-9,5 h und 12-13,5 h nach Schädel-Hirn Trauma konnte man den zeitlichen Verlauf der Leukozyten-Endothel Interaktion in den zerebralen Arteriolen und Venolen beobachten. Zusätzlich wurde an histologischen Schnitten das Kontusionsvolumen und die Leukozytenakkumulation im Hirngewebe untersucht. Diese Daten ermöglichten es, die einzelnen Veränderungen über die Zeit miteinander zu vergleichen und mögliche kausale Zusammenhänge zwischen Leukozyten beziehungsweise Leukozyten-Endothel Interaktion und der Entstehung des sekundären Hirnschadens zu erschließen.

4.2.1. Bedeutung der Leukozyten für die Pathophysiologie des sekundären

Nekrosewachstums

Leukozyten scheinen eine wichtige Rolle für die Pathophysiologie des sekundären Hirnschadens nach einem ischämischen Infarkt zu spielen. So führte eine Anti-ICAM-1 Therapie beispielsweise zu einem verbesserten Outcome nach Apoplex (Bowes et al., 1993; Zhang et al., 1994b; Chopp et al., 1996a; Chopp et al., 1996b). Desweiteren haben ICAM-1 inhibierende Therapien den neuronalen Schaden im Hirn, der nach einer Gewebsschädigung durch Leukozyten verursacht wurde, reduziert. So wurde beispielsweise der sekundäre Hirnschaden sowohl nach Ischämie-/Reperfusionsschaden als auch nach Meningitis vermindert (Matsuo et al., 1994; Weber et al., 1995). Das vermehrte Auftreten von Leukozyten 8 h nach Trauma, korrigiert um die ebenfalls gemessene relative Zunahme des Blutvolumens, korreliert laut einer Studie von Schoettle signifikant mit der Entwicklung eines Hirnödems. Ob hierbei die Leukozyten selbst auch kausal für die Entstehung des Hirnödems verantwortlich sind, bleibt allerdings unklar (Schoettle et al., 1990).

In der Literatur wird ICAM-1 eine doppelte Rolle in der Pathophysiologie des sekundären Hirnschadens nach Apoplex, Meningitis oder auch nach Schädel-Hirn Trauma

zugesprochen. Zum einen ist die Interaktion mit Leukozyten wichtig, welche die Adhäsion an das Gefäßendothel ermöglicht. Zum anderen scheint ICAM-1 auch einen von Leukozyten unabhängigen Einfluss auf den sekundären Hirnschaden zu haben und das sekundäre Nekrosewachstum zu fördern (Connolly, Jr. et al., 1996; Soriano et al., 1996; Chopp et al., 1996a; Chopp et al., 1996b; Whalen et al., 2000; Morganti-Kossmann et al., 2002). Mehrere Hypothesen hierzu wurden in der Literatur bereits erörtert, wie beispielsweise die Entstehung des posttraumatischen Hirnödems. Unabhängig von der Leukozytenadhäsion könnte ICAM-1 zu einer Öffnung der Blut-Hirn-Schranke, vermittelt durch intrazelluläre Signalkaskaden in Endothelzellen, führen (van Buul and Hordijk, 2004). Whalen et al. beobachteten eine signifikante Verminderung des posttraumatischen Hirnödems bei ICAM-1 und P-Selektin -/- Knockout Mäusen ohne eine gleichzeitige Reduktion der Leukozytenakkumulation im Gewebe (Whalen et al., 1999b; Whalen et al., 2000). Die gesteigerte Permeabilität der Blut-Hirn Schranke scheint größtenteils unabhängig von adhärenenten Leukozyten bzw. Leukozytenakkumulation im Gewebe zu sein (Hartl et al., 1997a; Whalen et al., 1999c).

Es ist bekannt, dass nach Schädel-Hirn Trauma eine Entzündungsreaktion auftritt (Feuerstein et al., 1997; Shohami et al., 1997; Whalen et al., 1998; Whalen et al., 1999a; Morganti-Kossmann et al., 2002; Schmidt et al., 2005; Konsman et al., 2007), allerdings sind die Daten zur Entzündungsreaktion nach Trauma und vor allem zu deren Einfluss auf den sekundären Hirnschaden noch sehr widersprüchlich. Es sind einerseits mehrere Wege denkbar, über welche Leukozyten das sekundäre Nekrosewachstum verstärken könnten. Hierzu zählen die Freisetzung von gewebschädigenden Proteasen, freien Radikalen und von Entzündungsmediatoren wie Chemokinen und Cytokinen, außerdem Veränderungen des zerebralen Blutflusses und der Gefäßpermeabilität (Harlan, 1985; Lucchesi and Mullane, 1986; Hallenbeck and Dutka, 1990; del Zoppo et al., 1991; Kochanek and Hallenbeck, 1992; Grau et al., 1992; Ferrante et al., 1992; Uhl et al., 1994; Zhang et al., 1994a; Clark and Lutsep, 2001). Andererseits stellt sich die Frage nach dem zeitlichen Zusammenhang von Leukozytenmigration und sekundärem Nekrosewachstum sowie die Frage nach

intravaskulären Leukozyten und deren Auswirkung auf die Pathophysiologie nach Schädel-Hirn Trauma.

Die posttraumatische Entzündungsreaktion und ihr potentieller Einfluss auf die Pathophysiologie des sekundären Nekrosewachstums wurden bisher mehrmals in der Literatur diskutiert (Soares et al., 1995; Feuerstein et al., 1997; Whalen et al., 2000; Knobloch and Faden, 2002; Morganti-Kossmann et al., 2002; Kataoka et al., 2004; Konsman et al., 2007). Ob und welche Rolle dabei Leukozyten selbst spielen, sei es via Adhäsion an das Endothel oder Migration ins Gewebe, ist nicht vollständig geklärt. Genauso bleibt es offen, welche Rolle entsprechende Moleküle wie beispielsweise ICAM-1 oder P-Selektin, die posttraumatisch hochreguliert werden, oder Entzündungsfaktoren wie beispielsweise Interleukine bei der Entwicklung des sekundären Hirnschadens spielen.

4.2.2. Leukozytenakkumulation im Gewebe

Zunächst sollte untersucht werden, ob Leukozyten bereits in die Penumbra migrieren und dort akkumulieren, bevor das Gewebe nekrotisch wird. Da die Ausbreitung des sekundären Nekrosewachstums um die Primärlesion herum sehr genau bestimmt werden konnte war es möglich, die Vergrößerung des Kontusionsvolumens über die Zeit mit der Akkumulation von Leukozyten im Gewebe zu korrelieren. Vergleicht man diese beiden Größen, so wird deutlich, dass die Leukozyten erst in das Gewebe migrieren, nachdem dieses nekrotisch geworden ist. Innerhalb der Kontusion ist ihre Anzahl stets deutlich höher als in der Penumbra. Dort wurde erst nach 24 h, wenn das sekundäre Nekrosewachstum in dem hier verwendeten Model weitgehend abgeschlossen ist, eine nennenswerte Anzahl von akkumulierenden Leukozyten gefunden. Das bedeutet letztendlich, dass die Leukozyten zu spät in das vulnerable Gewebe migrieren, um dort für die Ausbreitung des sekundären Hirnschadens verantwortlich zu sein.

Dies steht im Einklang mit Ergebnissen aus experimentellen Studien an Tieren (Biagas et al., 1992; Clark et al., 1994; Soares et al., 1995; Kochanek et al., 1995; Carlos et al., 1997; Whalen et al., 1999c) und aus einer klinischen Studie (Holmin et al., 1998) in denen die

größte Anzahl von Leukozyten im Gewebe 24-48 h nach Trauma gemessen wurde. Auch diese Daten deuten darauf hin, dass die Leukozyten zu spät im Gewebe der Penumbra akkumulieren, um dort den sekundären Hirnschaden zu verursachen.

4.2.3. Intravaskuläre Leukozyten, Leukozyten-Endothel Interaktion

Es gibt allerdings noch eine zweite Möglichkeit, wie Leukozyten zu verstärktem sekundären Nekrosewachstum nach Schädel-Hirn Trauma führen könnten. Dabei handelt es sich um die intravaskulären Leukozyten und deren posttraumatische Leukozyten-Endothel Interaktion (LEI), vor allem die Leukozytenadhärenz am Endothel. Mit Hilfe der IVM wurde die LEI bis 13,5 h nach CCI untersucht und quantifiziert. Viele Leukozyten begannen sofort nach Trauma am Endothel entlang zu rollen, dagegen wurden während der ersten 120 Minuten nur wenige am Endothel haftende Leukozyten beobachtet. Auch in den Kontrolltieren kam es zu einem vorübergehenden Anstieg der LEI, der wahrscheinlich auf die Mobilisation und die Reimplantation des Knochens zurückzuführen war. Bereits 30 Minuten später, d.h. 60 Minuten nach Scheinoperation, war das Ausgangsniveau wieder erreicht. Im Gegensatz dazu ist die posttraumatische LEI, d.h. die Anzahl sowohl der rollenden als auch der adhärennten Leukozyten, weiter angestiegen, wobei nur die rollenden Leukozyten in der Zeit bis 120 Minuten nach Trauma statistisch signifikant erhöhte Werte erreicht haben. Sowohl rollende als auch adhärennte Leukozyten können den Blutstrom in einem Gefäß beeinflussen und beispielsweise zu Verlangsamung oder Turbulenzen des Blutstromes führen. Insgesamt scheinen die Leukozyten jedoch in diesem sehr frühen Zeitraum nach Trauma allenfalls eine untergeordnete Rolle für die Reduktion des CBF zu spielen.

Viel bedeutender war die Beobachtung, dass die Leukozyten schon 4 h nach Trauma deutlich begannen, am Endothel zu haften. Diese Ereignisse liefen ab, *bevor* das Gewebe letztendlich nekrotisch wurde.

Die Ergebnisse aus anderen Studien, die bereits die Leukozyten-Endothel Interaktion und ihre Bedeutung für den sekundären Hirnschaden nach Trauma untersucht haben, konnten die Rolle der Leukozyten noch nicht eindeutig klären.

Fee beschreibt 24 h nach aseptic cerebral injury ein verringertes Nekrosevolumen und weniger Apoptose bei T- und B-Zell defizienten Mäusen (RAG^{-/-}) im Vergleich zu Wildtyp-Tieren. Die Gabe von aktivierten T-Zellen führte bei den immunodefizienten Tieren 24 h nach Trauma zu einem signifikanten Anstieg des sekundären Nekrosewachstums während die Therapie mit T-Zell hemmenden Medikamenten wie Cyclosporin A das Ausmaß des Kontusionsvolumens verringerte (Fee et al., 2003).

Sowohl Untersuchungen nach Depletion der Leukozyten als auch Studien mit Anti-ICAM-1 Antikörpern führten zu dem Ergebnis, dass die Leukozyten-Endothel Interaktion nach Trauma keinen Einfluss auf die Integrität der Blut-Hirn Schranke zu haben scheint (Hartl et al., 1997a; Whalen et al., 1999c). ICAM-1/P-Selectin doppel knock-out Mäuse entwickelten zwar nach Trauma ein deutlich geringeres Hirnödem als Wildtyp-Tiere. Diese Verbesserung der Integrität der Blut-Hirn Schranke konnte allerdings nicht auf eine Veränderung der Leukozytenakkumulation im Gewebe zurückgeführt werden. Die Permeabilitätssteigerung der Blut-Hirn Schranke schien unabhängig von Leukozyten zu entstehen (Whalen et al., 2000). Verglichen mit der Gabe von isotonischer Kochsalzlösung haben sowohl Anti ICAM-1 als auch Kontroll IgG Antikörper das neurologische Outcome nach FPI verbessert und die Leukozytenakkumulation, die via Myeloperoxidase-Aktivität gemessen wurde, vermindert. Dabei zeigte jedoch die Therapie mit ICAM-1 Antikörpern immer die besten Resultate (Knoblach and Faden, 2002). Allerdings scheint ICAM-1, genauso wie nach Ischämie oder Meningitis (s.oben), auch nach Trauma zumindest teilweise eine leukozytenunabhängige Rolle in der Entstehung des sekundären Hirnschadens, und dabei vor allem in der Steigerung der Gefäßpermeabilität, zu spielen (Whalen et al., 2000; Morganti-Kossmann et al., 2002; van Buul and Hordijk, 2004).

Mayhan untersuchte die Integrität der Blut-Hirn Schranke nach Aktivierung von Mastzellen mit Compound 48/80. Er zeigte, dass die Gabe von Anti-CD18 Antikörpern die Permeabilität der Gefäße im Vergleich zur Kontrolle mit isotonischer Kochsalzlösung deutlich reduzierte. Daraus folgerte er, dass die adhärennten Leukozyten zumindest teilweise zu einer Permeabilitätssteigerung der Blut-Hirn Schranke führen könnten (Mayhan, 2000). In dem für

die vorliegende Studie verwendeten Model wurde der sekundäre Hirnschaden über die Volumenzunahme der Kontusion quantifiziert. Eventuelle Auswirkungen der Hemmung der Leukozytenadhärenz auf die Entstehung eines Hirnödems wurden nicht untersucht.

Um den Einfluss der intravaskulären Leukozyten, die am Endothel haften, bevor das Gewebe nekrotisch wird, zu untersuchen wurden Anti-CD18 Antikörper verwendet und keine Antikörper gegen ICAM-1, da ICAM-1, wie oben erwähnt, auch eine von den Leukozyten unabhängige Rolle in der Pathophysiologie nach Schädel-Hirn Trauma zu spielen scheint. Mit diesen Anti-CD18 Antikörpern konnte die Anzahl der adhärenenten Leukozyten im Vergleich zur Gabe von Kontroll IgG auf etwa ein Drittel reduziert werden.

Dies hatte jedoch keinerlei Einfluss auf die Kontusionsgröße nach 24 h. Die primäre Läsion, gemessen 15 Minuten nach Trauma, hat in der Regel eine Größe von etwa 66% des Kontusionsvolumens nach 24 h, das heißt die Kontusion wächst innerhalb der ersten 24 h um circa 33-40% (Stover et al., 2000; Plesnila et al., 2003; Zweckberger et al., 2003; Zweckberger et al., 2006; Engel et al., 2008; von Baumgarten et al., 2008).

In der vorliegenden Studie erreichte das Nekrosevolumen nach 24 h sowohl nach Gabe von Kontroll IgG als auch nach Therapie mit Anti-CD18 Antikörpern genau das gleiche Ausmaß. Das bedeutet, dass die Ausbreitung des sekundären Hirnschadens nach CCI *nicht* durch die Hemmung der Leukozytenadhärenz beeinflusst wurde.

5. ZUSAMMENFASSUNG

5.1. Zerebraler Blutfluss nach Schädel-Hirn Trauma

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass der posttraumatische Abfall der Durchblutung in der Umgebung einer zerebralen Kontusion nicht allein durch eine arterielle Vasokonstriktion erklärt werden kann, da zumindest kleinere Arteriolen (<35 µm) dilatieren. Massive Thrombozytenaktivierung mit anschließender venöser und arterieller Thrombose führen zu einer Verlangsamung der Blutflussgeschwindigkeit und zur zerebralen Minderperfusion. Die Verlangsamung des Blutflusses ihrerseits fördert die Gerinnung und die intravaskuläre Plättchenaggregation, somit enden die posttraumatischen Reaktionen in einem Circulus Vitiosus.

Eine verstärkte Leukozyten-Endothel Interaktion und das Auftreten von Leukozyten/Thrombozyten-Aggregaten könnten beide sowohl das Endothel aktivieren als auch die Blut-Hirn-Schranke beschädigen. Somit könnten sie einerseits direkt zu Entzündungsreaktion und sekundärem neuronalen Schaden führen und andererseits die Bildung von Mikrothromben verstärken.

All diese die normale Durchblutung beeinträchtigenden pathophysiologischen Reaktionen resultieren in einer regionalen zerebralen Minderperfusion bzw. Ischämie. Deshalb spielen sie sehr wahrscheinlich eine wichtige Rolle für das sekundäre Nekrosewachstum nach Schädel-Hirn-Trauma.

5.2. Bedeutung der Leukozyten für das sekundäre Nekrosewachstum

Sofort nach Schädel- Hirn-Trauma beginnen Leukozyten, am Endothel zerebraler Venolen entlang zu rollen. Die Anzahl der haftenden Leukozyten beginnt etwa 4 h nach Trauma signifikant anzusteigen, und erreicht nach 16 h ihr Maximum.

Außerdem kommt es posttraumatisch zur Entstehung von Leukozyten/Thrombozyten-Aggregaten. Ähnlich der Ergebnisse für adhärente Leukozyten erreicht ihre Anzahl etwa 4 h nach Trauma statistisch signifikante Werte und steigt im weiteren Verlauf kontinuierlich an.

Diese Interaktionen von Leukozyten mit dem Gefäßendothel in der Penumbra finden bereits statt, bevor das Gewebe nekrotisch wird. Erst deutlich später, nachdem die Neuronen bereits untergegangen sind, beginnen Leukozyten in das Gewebe zu migrieren.

Mit Anti-CD18 Antikörpern wurde die Rolle der Leukozyten-Endothel Interaktion bzw. vor allem die Rolle der adhärennten Leukozyten für die Entstehung des sekundären Hirnschadens nach Schädel-Hirn Trauma genauer untersucht. Obwohl die Anzahl der haftenden Leukozyten und Aggregate mit Gabe von Anti-CD18 Antikörpern signifikant reduziert werden kann, hat die Therapie keinen Effekt auf das Nekrosevolumen nach 24 h. Die Ausbreitung des sekundären Hirnschadens bleibt von Inhibition des CD18-Rezeptors und der damit verbundenen Reduktion der Leukozytenadhärenz am Endothel unbeeinträchtigt.

Das bedeutet, die vorliegenden Daten sprechen *nicht* für eine wichtige Rolle der intravaskulären Leukozyten in der Pathophysiologie des sekundären Hirnschadens.

Weitere Studien wären notwendig, um die genaue Rolle der Leukozyten und vor allem der Thrombozyten für die Entstehung des sekundären Hirnschadens zu untersuchen.

Insbesondere Untersuchungen zu einer posttraumatischen Gerinnungshemmung wären dringend nötig. Vor allem sollte versucht werden, die Entstehung der Mikrothromben, eventuell auch der Aggregate, zu reduzieren. Da es posttraumatisch häufig zu Blutungen kommt und eine zu intensive Antikoagulation wahrscheinlich die Entstehung solcher Blutungen fördern würde, wäre hierbei vor allem die Hemmung der intrinsischen Gerinnung von großem Interesse. Die primäre Hämostase sollte dabei möglichst nicht beeinträchtigt werden.

Eine Verminderung der Thrombozytenaggregation sowie der Bildung von Aggregaten könnte die Durchblutung in der vulnerablen Penumbra deutlich verbessern. Die daraus folgende Reduktion oder sogar Verhinderung von Ischämie im perikontusionellen Gewebe könnte die Ausbreitung des sekundären Nekrosewachstums nach Schädel-Hirn-Trauma deutlich vermindern.

6. LITERATUR

References

1. AHN,M.J., SHERWOOD,E.R., PROUGH,D.S., LIN,C.Y., and DEWITT,D.S. (2004). The effects of traumatic brain injury on cerebral blood flow and brain tissue nitric oxide levels and cytokine expression. *J. Neurotrauma* **21**, 1431-1442.
2. ARMSTEAD,W.M. and KURTH,C.D. (1994). Different cerebral hemodynamic responses following fluid percussion brain injury in the newborn and juvenile pig. *J. Neurotrauma* **11**, 487-497.
3. BAETHMANN,A., MAIER-HAUFF,K., KEMPSKI,O., UNTERBERG,A., WAHL,M., and SCHURER,L. (1988). Mediators of brain edema and secondary brain damage. *Crit Care Med.* **16**, 972-978.
4. BAETHMANN,A., WIRTH,A., and SCHLESINGER-RAAB,A. (2002). Prospective system analysis of the pre- and early hospital care in severe head injury in Bavaria at a population-based level. *Eur. Surg. Res.* **34**, 42-46.
5. BENTZER,P., VENTUROLI,D., CARLSSON,O., and GRANDE,P.O. (2003). Low-dose prostacyclin improves cortical perfusion following experimental brain injury in the rat. *J. Neurotrauma* **20**, 447-461.
6. BENVENISTE,J. (1974). Platelet-activating factor, a new mediator of anaphylaxis and immune complex deposition from rabbit and human basophils. *Nature* **249**, 581-582.

7. BENVENISTE,J., HENSON,P.M., and COCHRANE,C.G. (1972). Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelets. The role of IgE, basophils, and a platelet-activating factor. *J. Exp. Med.* **136**, 1356-1377.
8. BIAGAS,K.V., UHL,M.W., SCHIDING,J.K., NEMOTO,E.M., and KOCHANNEK,P.M. (1992). Assessment of posttraumatic polymorphonuclear leukocyte accumulation in rat brain using tissue myeloperoxidase assay and vinblastine treatment. *J. Neurotrauma* **9**, 363-371.
9. BOUMA,G.J. and MUIZELAAR,J.P. (1992). Cerebral blood flow, cerebral blood volume, and cerebrovascular reactivity after severe head injury. *J. Neurotrauma* **9 Suppl 1**, S333-S348.
10. BOUMA,G.J., MUIZELAAR,J.P., CHOI,S.C., NEWLON,P.G., and YOUNG,H.F. (1991). Cerebral circulation and metabolism after severe traumatic brain injury: the elusive role of ischemia. *J. Neurosurg.* **75**, 685-693.
11. BOUMA,G.J., MUIZELAAR,J.P., STRINGER,W.A., CHOI,S.C., FATOUROS,P., and YOUNG,H.F. (1992). Ultra-early evaluation of regional cerebral blood flow in severely head-injured patients using xenon-enhanced computerized tomography. *J. Neurosurg.* **77**, 360-368.
12. BOWES,M.P., ZIVIN,J.A., and ROTHLEIN,R. (1993). Monoclonal antibody to the ICAM-1 adhesion site reduces neurological damage in a rabbit cerebral embolism stroke model. *Exp. Neurol.* **119**, 215-219.
13. BRAMLETT,H.M. and DIETRICH,W.D. (2004). Pathophysiology of cerebral ischemia and brain trauma: similarities and differences. *J. Cereb. Blood Flow Metab* **24**, 133-150.

14. BRYAN,R.M., JR., CHERIAN,L., and ROBERTSON,C. (1995). Regional cerebral blood flow after controlled cortical impact injury in rats. *Anesth. Analg.* **80**, 687-695.
15. BULLOCK,R., SAKAS,D., PATTERSON,J., et al. (1992). Early post-traumatic cerebral blood flow mapping: correlation with structural damage after focal injury. *Acta Neurochir. Suppl (Wien.)* **55**, 14-17.
16. CARLOS,T.M., CLARK,R.S., FRANICOLA-HIGGINS,D., SCHIDING,J.K., and KOCHANEK,P.M. (1997). Expression of endothelial adhesion molecules and recruitment of neutrophils after traumatic brain injury in rats. *J. Leukoc. Biol.* **61**, 279-285.
17. CHEN,M. and GENG,J.G. (2006). P-selectin mediates adhesion of leukocytes, platelets, and cancer cells in inflammation, thrombosis, and cancer growth and metastasis. *Arch. Immunol. Ther. Exp (Warsz.)* **54**, 75-84.
18. CHERIAN,L., ROBERTSON,C.S., CONTANT,C.F., JR., and BRYAN,R.M., JR. (1994). Lateral cortical impact injury in rats: cerebrovascular effects of varying depth of cortical deformation and impact velocity. *J. Neurotrauma* **11**, 573-585.
19. CHOPP,M., LI,Y., JIANG,N., ZHANG,R.L., and PROSTAK,J. (1996a). Antibodies against adhesion molecules reduce apoptosis after transient middle cerebral artery occlusion in rat brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab* **16**, 578-584.
20. CHOPP,M., ZHANG,R.L., CHEN,H., LI,Y., JIANG,N., and RUSCHE,J.R. (1994). Postischemic administration of an anti-Mac-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* **25**, 869-875.

21. CHOPP,M., ZHANG,R.L., and JIANG,N. (1996b). The role of adhesion molecules in reducing cerebral ischemic cell damage. *Adv. Neurol.* **71**, 315-326.
22. CLARK,R.S., SCHIDING,J.K., KACZOROWSKI,S.L., MARION,D.W., and KOCHANEK,P.M. (1994). Neutrophil accumulation after traumatic brain injury in rats: comparison of weight drop and controlled cortical impact models. *J. Neurotrauma* **11**, 499-506.
23. CLARK,W.M. and LUTSEP,H.L. (2001). Potential of anticytokine therapies in central nervous system ischaemia. *Expert. Opin. Biol. Ther.* **1**, 227-237.
24. CONNOLLY,E.S., JR., WINFREE,C.J., SPRINGER,T.A., et al. (1996). Cerebral protection in homozygous null ICAM-1 mice after middle cerebral artery occlusion. Role of neutrophil adhesion in the pathogenesis of stroke. *J. Clin. Invest* **97**, 209-216.
25. DEL ZOPPO,G.J., SCHMID-SCHONBEIN,G.W., MORI,E., COPELAND,B.R., and CHANG,C.M. (1991). Polymorphonuclear leukocytes occlude capillaries following middle cerebral artery occlusion and reperfusion in baboons. *Stroke* **22**, 1276-1283.
26. DEWITT,D.S., JENKINS,L.W., WEI,E.P., LUTZ,H., BECKER,D.P., and KONTOS,H.A. (1986). Effects of fluid-percussion brain injury on regional cerebral blood flow and pial arteriolar diameter. *J. Neurosurg.* **64**, 787-794.
27. DEWITT,D.S., KONG,D.L., LYETH,B.G., et al. (1988). Experimental traumatic brain injury elevates brain prostaglandin E2 and thromboxane B2 levels in rats. *J. Neurotrauma* **5**, 303-313.

28. DEWITT,D.S. and PROUGH,D.S. (2003). Traumatic cerebral vascular injury: the effects of concussive brain injury on the cerebral vasculature. *J. Neurotrauma* **20**, 795-825.
29. DEWITT,D.S., PROUGH,D.S., TAYLOR,C.L., and WHITLEY,J.M. (1992). Reduced cerebral blood flow, oxygen delivery, and electroencephalographic activity after traumatic brain injury and mild hemorrhage in cats. *J. Neurosurg.* **76**, 812-821.
30. DIAMOND,M.S. and SPRINGER,T.A. (1993). A subpopulation of Mac-1 (CD11b/CD18) molecules mediates neutrophil adhesion to ICAM-1 and fibrinogen. *J. Cell Biol.* **120**, 545-556.
31. DIETRICH,W.D., ALONSO,O., BUSTO,R., et al. (1996). Widespread hemodynamic depression and focal platelet accumulation after fluid percussion brain injury: a double-label autoradiographic study in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab* **16**, 481-489.
32. DIETRICH,W.D., ALONSO,O., and HALLEY,M. (1994). Early microvascular and neuronal consequences of traumatic brain injury: a light and electron microscopic study in rats. *J. Neurotrauma* **11**, 289-301.
33. DIXON,C.E., CLIFTON,G.L., LIGHTHALL,J.W., YAGHMAI,A.A., and HAYES,R.L. (1991). A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat. *J. Neurosci. Methods* **39**, 253-262.
34. DIXON,C.E., KOCHANKEK,P.M., YAN,H.Q., et al. (1999). One-year study of spatial memory performance, brain morphology, and cholinergic markers after moderate controlled cortical impact in rats. *J. Neurotrauma* **16**, 109-122.

35. ENGEL,D.C., MIES,G., TERPOLILLI,N.A., et al. (2008). Changes of cerebral blood flow during the secondary expansion of a cortical contusion assessed by ¹⁴C-iodoantipyrine autoradiography in mice using a non-invasive protocol. *J. Neurotrauma* **25**, 739-753.
36. ERISKAT,J., SCHURER,L., KEMPSKI,O., and BAETHMANN,A. (1994). Growth kinetics of a primary brain tissue necrosis from a focal lesion. *Acta Neurochir. Suppl (Wien.)* **60**, 425-427.
37. FEE,D., CRUMBAUGH,A., JACQUES,T., et al. (2003). Activated/effector CD4+ T cells exacerbate acute damage in the central nervous system following traumatic injury. *J. Neuroimmunol.* **136**, 54-66.
38. FERRANTE,A., KOWANKO,I.C., and BATES,E.J. (1992). Mechanisms of host tissue damage by cytokine-activated neutrophils. *Immunol. Ser.* **57**, 499-521.
39. FEUERSTEIN,G.Z., WANG,X., and BARONE,F.C. (1997). Inflammatory gene expression in cerebral ischemia and trauma. Potential new therapeutic targets. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **825**, 179-193.
40. FOX,G.B., FAN,L., LEVASSEUR,R.A., and 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.
41. FRERICHS,K.U., LINDSBERG,P.J., HALLENBECK,J.M., and FEUERSTEIN,G.Z. (1990). Platelet-activating factor and progressive brain damage following focal brain injury. *J. Neurosurg.* **73**, 223-233.

42. FRIEDRICH,D.H., PLESNILA,N., ERISKAT,J., STOFFEL,M., and BAETHMANN,A. (2000). Cerebral blood flow and the secondary growth of brain tissue necrosis after trauma. *Acta Neurochir. Suppl* **76**, 257-259.
43. GAETZ,M. (2004). The neurophysiology of brain injury. *Clin. Neurophysiol.* **115**, 4-18.
44. GARNETT,M.R., BLAMIRE,A.M., CORKILL,R.G., et al. (2001). Abnormal cerebral blood volume in regions of contused and normal appearing brain following traumatic brain injury using perfusion magnetic resonance imaging. *J. Neurotrauma* **18**, 585-593.
45. GHAJAR,J. (2000). Traumatic brain injury. *Lancet* **356**, 923-929.
46. GOLDING,E.M. (2002). Sequelae following traumatic brain injury. The cerebrovascular perspective. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **38**, 377-388.
47. GOODMAN,J.C., CHERIAN,L., BRYAN,R.M., JR., and ROBERTSON,C.S. (1994). Lateral cortical impact injury in rats: pathologic effects of varying cortical compression and impact velocity. *J. Neurotrauma* **11**, 587-597.
48. GRAHAM,D.I. and ADAMS,J.H. (1971). Ischaemic brain damage in fatal head injuries. *Lancet* **1**, 265-266.
49. GRAU,A.J., BERGER,E., SUNG,K.L., and SCHMID-SCHONBEIN,G.W. (1992). Granulocyte adhesion, deformability, and superoxide formation in acute stroke. *Stroke* **23**, 33-39.
50. HALL,E.D., BRYANT,Y.D., CHO,W., and SULLIVAN,P.G. (2008). Evolution of post-traumatic neurodegeneration after controlled cortical impact traumatic brain injury in

mice and rats as assessed by the de Olmos silver and fluorojade staining methods. *J. Neurotrauma* **25**, 235-247.

51. HALLENBECK, J.M. and DUTKA, A.J. (1990). Background review and current concepts of reperfusion injury. *Arch. Neurol.* **47**, 1245-1254.
52. HANAHAN, D.J., DEMOPOULOS, C.A., LIEHR, J., and PINCKARD, R.N. (1980). Identification of platelet activating factor isolated from rabbit basophils as acetyl glyceryl ether phosphorylcholine. *J. Biol. Chem.* **255**, 5514-5516.
53. HARLAN, J.M. (1985). Leukocyte-endothelial interactions. *Blood* **65**, 513-525.
54. HARTL, R., MEDARY, M., RUGE, M., ARFORS, K.E., and GHAJAR, J. (1997a). Blood-brain barrier breakdown occurs early after traumatic brain injury and is not related to white blood cell adherence. *Acta Neurochir. Suppl* **70**, 240-242.
55. HARTL, R., MEDARY, M.B., RUGE, M., ARFORS, K.E., and GHAJAR, J. (1997b). Early white blood cell dynamics after traumatic brain injury: effects on the cerebral microcirculation. *J. Cereb. Blood Flow Metab* **17**, 1210-1220.
56. HATTORI, N., HUANG, S.C., WU, H.M., et al. (2003). PET investigation of post-traumatic cerebral blood volume and blood flow. *Acta Neurochir. Suppl* **86**, 49-52.
57. HE, P., ZHANG, H., ZHU, L., JIANG, Y., and ZHOU, X. (2006). Leukocyte-platelet aggregate adhesion and vascular permeability in intact microvessels: role of activated endothelial cells. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **291**, H591-H599.

58. HEKMATPANAHAH,J. and HEKMATPANAHAH,C.R. (1985). Microvascular alterations following cerebral contusion in rats. Light, scanning, and electron microscope study. *J. Neurosurg.* **62**, 888-897.
59. HENDRICH,K.S., KOCHANNEK,P.M., WILLIAMS,D.S., SCHIDING,J.K., MARION,D.W., and HO,C. (1999). Early perfusion after controlled cortical impact in rats: quantification by arterial spin-labeled MRI and the influence of spin-lattice relaxation time heterogeneity. *Magn Reson. Med.* **42**, 673-681.
60. HLATKY,R., LUI,H., CHERIAN,L., et al. (2003). The role of endothelial nitric oxide synthase in the cerebral hemodynamics after controlled cortical impact injury in mice. *J. Neurotrauma* **20**, 995-1006.
61. HOLMIN,S., SODERLUND,J., BIBERFELD,P., and MATHIESEN,T. (1998). Intracerebral inflammation after human brain contusion. *Neurosurgery* **42**, 291-298.
62. ISHIGE,N., PITTS,L.H., BERRY,I., et al. (1987). The effect of hypoxia on traumatic head injury in rats: alterations in neurologic function, brain edema, and cerebral blood flow. *J. Cereb. Blood Flow Metab* **7**, 759-767.
63. KATAOKA,H., KIM,S.W., and PLESNILA,N. (2004). Leukocyte-endothelium interactions during permanent focal cerebral ischemia in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab* **24**, 668-676.
64. KELLY,D.F., MARTIN,N.A., KORDESTANI,R., et al. (1997). Cerebral blood flow as a predictor of outcome following traumatic brain injury. *J. Neurosurg.* **86**, 633-641.

65. KNOBLACH,S.M. and FADEN,A.I. (2002). Administration of either anti-intercellular adhesion molecule-1 or a nonspecific control antibody improves recovery after traumatic brain injury in the rat. *J. Neurotrauma* **19**, 1039-1050.
66. KOCHANЕК,P.M. and HALLENBECK,J.M. (1992). Polymorphonuclear leukocytes and monocytes/macrophages in the pathogenesis of cerebral ischemia and stroke. *Stroke* **23**, 1367-1379.
67. KOCHANЕК,P.M., MARION,D.W., ZHANG,W., et al. (1995). Severe controlled cortical impact in rats: assessment of cerebral edema, blood flow, and contusion volume. *J. Neurotrauma* **12**, 1015-1025.
68. KONSMAN,J.P., DRUKARCH,B., and VAN DAM,A.M. (2007). (Peri)vascular production and action of pro-inflammatory cytokines in brain pathology. *Clin. Sci. (Lond)* **112**, 1-25.
69. LAFUENTE,J.V. and CERVOS-NAVARRO,J. (1999). Craniocerebral trauma induces hemorheological disturbances. *J. Neurotrauma* **16**, 425-430.
70. LIGHTHALL,J.W. (1988). Controlled cortical impact: a new experimental brain injury model. *J. Neurotrauma* **5**, 1-15.
71. LIGHTHALL,J.W., DIXON,C.E., and ANDERSON,T.E. (1989). Experimental models of brain injury. *J. Neurotrauma* **6**, 83-97.
72. LIU,H., GOODMAN,J.C., and ROBERTSON,C.S. (2002). The effects of L-arginine on cerebral hemodynamics after controlled cortical impact injury in the mouse. *J. Neurotrauma* **19**, 327-334.

73. LUCCHESI,B.R. and MULLANE,K.M. (1986). Leukocytes and ischemia-induced myocardial injury. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **26**, 201-224.
74. LUNDBLAD,C., GRANDE,P.O., and BENTZER,P. (2004). A mouse model for evaluation of capillary perfusion, microvascular permeability, cortical blood flow, and cortical edema in the traumatized brain. *J. Neurotrauma* **21**, 741-753.
75. LYNCH,D.R. and DAWSON,T.M. (1994). Secondary mechanisms in neuronal trauma. *Curr. Opin. Neurol.* **7**, 510-516.
76. MAEDA,T., KATAYAMA,Y., KAWAMATA,T., AOYAMA,N., and MORI,T. (1997). Hemodynamic depression and microthrombosis in the peripheral areas of cortical contusion in the rat: role of platelet activating factor. *Acta Neurochir. Suppl* **70**, 102-105.
77. MARION,D.W., DARBY,J., and YONAS,H. (1991). Acute regional cerebral blood flow changes caused by severe head injuries. *J. Neurosurg.* **74**, 407-414.
78. MARTIN,N.A., PATWARDHAN,R.V., ALEXANDER,M.J., et al. (1997). Characterization of cerebral hemodynamic phases following severe head trauma: hypoperfusion, hyperemia, and vasospasm. *J. Neurosurg.* **87**, 9-19.
79. MATSUO,Y., ONODERA,H., SHIGA,Y., et al. (1994). Role of cell adhesion molecules in brain injury after transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Brain Res.* **656**, 344-352.
80. MAYHAN,W.G. (2000). Leukocyte adherence contributes to disruption of the blood-brain barrier during activation of mast cells. *Brain Res.* **869**, 112-120.

81. MCEVER,R.P. and CUMMINGS,R.D. (1997). Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J. Clin. Invest* **100**, S97-103.
82. MCINTOSH,T.K., HEAD,V.A., and FADEN,A.I. (1987). Alterations in regional concentrations of endogenous opioids following traumatic brain injury in the cat. *Brain Res.* **425**, 225-233.
83. MENDELOW,A.D., TEASDALE,G.M., RUSSELL,T., FLOOD,J., PATTERSON,J., and MURRAY,G.D. (1985). Effect of mannitol on cerebral blood flow and cerebral perfusion pressure in human head injury. *J. Neurosurg.* **63**, 43-48.
84. MILLER,J.D. (1985). Head injury and brain ischaemia--implications for therapy. *Br. J. Anaesth.* **57**, 120-130.
85. MITCHELL,D.E. and ADAMS,J.H. (1973). Primary focal impact damage to the brainstem in blunt head injuries. Does it exist? *Lancet* **2**, 215-218.
86. MÖLLMANN,F.T. Epidemiologie, Unfallursachen und akutklinische Initialversorgung beim Schädel-Hirn Trauma. Dissertation, Wilhelms-Universität Münster . 15-12-2006.
87. MORGANTI-KOSSMANN,M.C., RANCAN,M., STAHEL,P.F., and KOSSMANN,T. (2002). Inflammatory response in acute traumatic brain injury: a double-edged sword. *Curr. Opin. Crit Care* **8**, 101-105.
88. MUIR,J.K., BOERSCHEL,M., and ELLIS,E.F. (1992). Continuous monitoring of posttraumatic cerebral blood flow using laser-Doppler flowmetry. *J. Neurotrauma* **9**, 355-362.

89. MURAKAMI,T., MURAKAMI,T., HONG,L.J., et al. (1997). Perineuronal sulfated proteoglycans and cell surface glycoproteins in adult and newborn mouse brains, with special reference to their postnatal developments. *Arch. Histol. Cytol.* **60**, 347-354.
90. NILSSON,P., GAZELIUS,B., CARLSON,H., and HILLERED,L. (1996). Continuous measurement of changes in regional cerebral blood flow following cortical compression contusion trauma in the rat. *J. Neurotrauma* **13**, 201-207.
91. OBRIST,W.D., LANGFITT,T.W., JAGGI,J.L., CRUZ,J., and 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.
92. OERTEL,M., BOSCARDIN,W.J., OBRIST,W.D., et al. (2005). Posttraumatic vasospasm: the epidemiology, severity, and time course of an underestimated phenomenon: a prospective study performed in 299 patients. *J. Neurosurg.* **103**, 812-824.
93. PINCKARD,R.N., FARR,R.S., and HANAHAN,D.J. (1979). Physicochemical and functional identity of rabbit platelet-activating factor (PAF) released in vivo during IgE anaphylaxis with PAF released in vitro from IgE sensitized basophils. *J. Immunol.* **123**, 1847-1857.
94. PLESNILA,N., FRIEDRICH,D., ERISKAT,J., BAETHMANN,A., and STOFFEL,M. (2003). Relative cerebral blood flow during the secondary expansion of a cortical lesion in rats. *Neurosci. Lett.* **345**, 85-88.
95. QUICK A.J. Determination of Prothrombine. *Proc Soc Exp Biol Med* 42, 788-789. 1939.

96. RINDER,H.M., BONAN,J.L., RINDER,C.S., AULT,K.A., and SMITH,B.R. (1991). Dynamics of leukocyte-platelet adhesion in whole blood. *Blood* **78**, 1730-1737.
97. ROSENBLUM,W.I., WEI,E.P., and KONTONS,H.A. (1982). Platelet aggregation in cerebral arterioles after percussive brain trauma. *Tex. Heart Inst. J.* **9**, 345-348.
98. ROTHLEIN,R., DUSTIN,M.L., MARLIN,S.D., and SPRINGER,T.A. (1986). A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. *J. Immunol.* **137**, 1270-1274.
99. SAHUQUILLO,J., POCA,M.A., and AMOROS,S. (2001). Current aspects of pathophysiology and cell dysfunction after severe head injury. *Curr. Pharm. Des* **7**, 1475-1503.
100. SCHMIDT,O.I., HEYDE,C.E., ERTEL,W., and STAHEL,P.F. (2005). Closed head injury--an inflammatory disease? *Brain Res. Brain Res. Rev.* **48**, 388-399.
101. SCHOETTLE,R.J., KOCHANNEK,P.M., MAGARGEE,M.J., UHL,M.W., and NEMOTO,E.M. (1990). Early polymorphonuclear leukocyte accumulation correlates with the development of posttraumatic cerebral edema in rats. *J. Neurotrauma* **7**, 207-217.
102. SCHRODER,M.L., MUIZELAAR,J.P., BULLOCK,M.R., SALVANT,J.B., and POVLISHOCK,J.T. (1995). Focal ischemia due to traumatic contusions documented by stable xenon-CT and ultrastructural studies. *J. Neurosurg.* **82**, 966-971.
103. SHIMA,K. and MARMAROU,A. (1991). Evaluation of brain-stem dysfunction following severe fluid-percussion head injury to the cat. *J. Neurosurg.* **74**, 270-277.

104. SHOHAMI,E., BASS,R., WALLACH,D., YAMIN,A., and GALLILY,R. (1996). Inhibition of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) activity in rat brain is associated with cerebroprotection after closed head injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab* **16**, 378-384.
105. SHOHAMI,E., GALLILY,R., MECHOULAM,R., BASS,R., and BEN HUR,T. (1997). Cytokine production in the brain following closed head injury: dexanabinol (HU-211) is a novel TNF-alpha inhibitor and an effective neuroprotectant. *J. Neuroimmunol.* **72**, 169-177.
106. SHOHAMI,E., SHAPIRA,Y., SIDI,A., and COTEV,S. (1987). Head injury induces increased prostaglandin synthesis in rat brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab* **7**, 58-63.
107. SMITH,D.R., DUCKER,T.B., and KEMPE,L.G. (1969). Experimental in vivo microcirculatory dynamics in brain trauma. *J. Neurosurg.* **30**, 664-672.
108. SOARES,H.D., HICKS,R.R., SMITH,D., and 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.
109. SORIANO,S.G., COXON,A., WANG,Y.F., et al. (1999). Mice deficient in Mac-1 (CD11b/CD18) are less susceptible to cerebral ischemia/reperfusion injury. *Stroke* **30**, 134-139.
110. SORIANO,S.G., LIPTON,S.A., WANG,Y.F., et al. (1996). Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice are less susceptible to cerebral ischemia-reperfusion injury. *Ann. Neurol.* **39**, 618-624.

111. STEIN,S.C., GRAHAM,D.I., CHEN,X.H., and SMITH,D.H. (2004). Association between intravascular microthrombosis and cerebral ischemia in traumatic brain injury. *Neurosurgery* **54**, 687-691.
112. STEIN,S.C. and SMITH,D.H. (2004). Coagulopathy in traumatic brain injury. *Neurocrit. Care* **1**, 479-488.
113. STOFFEL,M., RINECKER,M., PLESNILA,N., ERISKAT,J., and BAETHMANN,A. (2001). Role of nitric oxide in the secondary expansion of a cortical brain lesion from cold injury. *J. Neurotrauma* **18**, 425-434.
114. STOVER,J.F., BEYER,T.F., and UNTERBERG,A.W. (2000). Riluzole reduces brain swelling and contusion volume in rats following controlled cortical impact injury. *J. Neurotrauma* **17**, 1171-1178.
115. SUTTON,R.L., LESCAUDRON,L., and STEIN,D.G. (1993). Unilateral cortical contusion injury in the rat: vascular disruption and temporal development of cortical necrosis. *J. Neurotrauma* **10**, 135-149.
116. THAL,S.C. and PLESNILA,N. (2007). Non-invasive intraoperative monitoring of blood pressure and arterial pCO₂ during surgical anesthesia in mice. *J. Neurosci. Methods* **159**, 261-267.
117. THOMALE,U.W., KROPPENSTEDT,S.N., BEYER,T.F., SCHASER,K.D., UNTERBERG,A.W., and STOVER,J.F. (2002). Temporal profile of cortical perfusion and microcirculation after controlled cortical impact injury in rats. *J. Neurotrauma* **19**, 403-413.

118. UHL,M.W., BIAGAS,K.V., GRUNDL,P.D., et al. (1994). Effects of neutropenia on edema, histology, and cerebral blood flow after traumatic brain injury in rats. *J. Neurotrauma* **11**, 303-315.
119. VAN BUUL,J.D. and HORDIJK,P.L. (2004). Signaling in leukocyte transendothelial migration. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 824-833.
120. VAN SANTBRINK,H., SCHOUTEN,J.W., STEYERBERG,E.W., AVEZAAT,C.J., and MAAS,A.I. (2002). Serial transcranial Doppler measurements in traumatic brain injury with special focus on the early posttraumatic period. *Acta Neurochir. (Wien.)* **144**, 1141-1149.
121. VON BAUMGARTEN,L., TRABOLD,R., THAL,S., BACK,T., and PLESNILA,N. (2008). Role of cortical spreading depressions for secondary brain damage after traumatic brain injury in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab* **28**, 1353-1360.
122. VON OETTINGEN,G., BERGHOLT,B., GYLDENSTED,C., and ASTRUP,J. (2002). Blood flow and ischemia within traumatic cerebral contusions. *Neurosurgery* **50**, 781-788.
123. WEBER,J.R., ANGSTWURM,K., BURGER,W., EINHAUPL,K.M., and DIRNAGL,U. (1995). Anti ICAM-1 (CD 54) monoclonal antibody reduces inflammatory changes in experimental bacterial meningitis. *J. Neuroimmunol.* **63**, 63-68.
124. WEI,E.P., DIETRICH,W.D., POVLISHOCK,J.T., NAVARI,R.M., and KONTOS,H.A. (1980). Functional, morphological, and metabolic abnormalities of the cerebral microcirculation after concussive brain injury in cats. *Circ. Res.* **46**, 37-47.

125. WHALEN,M.J., CARLOS,T.M., CLARK,R.S., and KOCHANNEK,P.M. (1999a). An acute inflammatory response to the use of granulocyte colony-stimulating factor to prevent infections in patients with brain injury: what about the brain? *Crit Care Med.* **27**, 1014-1018.
126. WHALEN,M.J., CARLOS,T.M., DIXON,C.E., et al. (2000). Reduced brain edema after traumatic brain injury in mice deficient in P-selectin and intercellular adhesion molecule-1. *J. Leukoc. Biol.* **67**, 160-168.
127. WHALEN,M.J., CARLOS,T.M., DIXON,C.E., et al. (1999b). Effect of traumatic brain injury in mice deficient in intercellular adhesion molecule-1: assessment of histopathologic and functional outcome. *J. Neurotrauma* **16**, 299-309.
128. WHALEN,M.J., CARLOS,T.M., KOCHANNEK,P.M., et al. (1999c). Neutrophils do not mediate blood-brain barrier permeability early after controlled cortical impact in rats. *J. Neurotrauma* **16**, 583-594.
129. WHALEN,M.J., CARLOS,T.M., KOCHANNEK,P.M., and HEINEMAN,S. (1998). Blood-brain barrier permeability, neutrophil accumulation and vascular adhesion molecule expression after controlled cortical impact in rats: a preliminary study. *Acta Neurochir. Suppl* **71**, 212-214.
130. YAMAKAMI,I. and MCINTOSH,T.K. (1989). Effects of traumatic brain injury on regional cerebral blood flow in rats as measured with radiolabeled microspheres. *J. Cereb. Blood Flow Metab* **9**, 117-124.
131. YAMAKAMI,I. and MCINTOSH,T.K. (1991). Alterations in regional cerebral blood flow following brain injury in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab* **11**, 655-660.

132. YANG,J., FURIE,B.C., and FURIE,B. (1999). The biology of P-selectin glycoprotein ligand-1: its role as a selectin counterreceptor in leukocyte-endothelial and leukocyte-platelet interaction. *Thromb. Haemost.* **81**, 1-7.
133. YUAN,X.Q., PROUGH,D.S., SMITH,T.L., and DEWITT,D.S. (1988). The effects of traumatic brain injury on regional cerebral blood flow in rats. *J. Neurotrauma* **5**, 289-301.
134. ZHANG,R.L., CHOPP,M., CHEN,H., and GARCIA,J.H. (1994a). Temporal profile of ischemic tissue damage, neutrophil response, and vascular plugging following permanent and transient (2H) middle cerebral artery occlusion in the rat. *J. Neurol. Sci.* **125**, 3-10.
135. ZHANG,R.L., CHOPP,M., LI,Y., et al. (1994b). Anti-ICAM-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Neurology* **44**, 1747-1751.
136. ZHUANG,J., SCHMOKER,J.D., SHACKFORD,S.R., and PIETROPAOLI,J.A. (1992). Focal brain injury results in severe cerebral ischemia despite maintenance of cerebral perfusion pressure. *J. Trauma* **33**, 83-88.
137. ZHUANG,J., SHACKFORD,S.R., SCHMOKER,J.D., and ANDERSON,M.L. (1993). The association of leukocytes with secondary brain injury. *J. Trauma* **35**, 415-422.
138. ZWECKBERGER,K., EROS,C., ZIMMERMANN,R., KIM,S.W., ENGEL,D., and PLESNILA,N. (2006). Effect of early and delayed decompressive craniectomy on secondary brain damage after controlled cortical impact in mice. *J. Neurotrauma* **23**, 1083-1093.

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

140. ZWIENENBERG,M. and MUIZELAAR,J.P. (2001). Cerebral perfusion and blood flow
in neurotrauma. *Neurol. Res.* **23**, 167-174.

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

(international gebräuchliche Abkürzungen wurden beibehalten)

A./Aa.	Arteria/Arteriae
AK	Antikörper
au	willkürlich gewählte Einheit (arbitrary unit)
CBF	Hirndurchblutung (cerebral blood flow)
CCD	Charge coupled device (Chip in elektronischen Videokameras)
CCI	Modell zur Induktion eines experimentellen Schädel-Hirn Traumas (Controlled Cortical Impact)
CD18	Beta 2 Untereinheit eines Integrins (=Oberflächenrezeptor auf Zellen) (Cluster of Differentiation 18)
CO ₂	Kohlendioxid
f	Atemfrequenz
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FPI	Modell zur Induktion eines experimentellen Schädel-Hirn Traumas (Fluid Percussion Injury)
ICAM-1	Adhäsionsmolekül auf Leukozyten und Endothelzellen (Inter Cellular Adhesion Molecule 1)
IgG	Immunglobulin G
IVM	Intravitalmikroskopie/Intravitalmikroskop
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
KG	Körpergewicht
LDF	Laser-Doppler Fluxmetrie
LEI	Leukozyten-Endothel Interaktion
MABP	mittlerer arterieller Blutdruck in mmHg (Mean Arterial Blood Pressure)
MW	Mittelwert
N ₂ O	Lachgas

O ₂	Sauerstoff
PFA	Paraformaldehyd
PSGL-1	P-Selectin Glykoprotein Ligand 1
pCO ₂	Partialdruck von Kohlenstoffdioxid im arteriellen Blut
pO ₂	Partialdruck von Sauerstoff im arteriellen Blut
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (standard error of mean)
SHT	Schädel-Hirn Trauma
V.	Vena

8. DANKSAGUNG

Die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden am Institut für chirurgische Forschung (ICF) der Ludwig-Maximilians Universität, München, in der Arbeitsgruppe von Professor Nikolaus Plesnila durchgeführt.

Vor allem möchte ich mich bei Professor Nikolaus Plesnila bedanken, der mir dieses interessante Thema überlassen hat und die gesamte Doktorarbeit hervorragend betreut hat. Danke für die stets offene Tür! Danke auch für die fortwährende Motivation zur medizinischen Forschung und die weitere Förderung meines beruflichen Weges. Unvergessen bleiben auch die vielen netten Kongresse und Events, an denen ich während meiner Zeit im Labor teilnehmen durfte, es war immer ein großer Spaß!

Herrn Prof Dr. med. Alexander Baethmann, dem damaligen kommissarischen Leiter des Instituts, möchte ich für die freundliche Aufnahme in das Institut danken sowie für die herzliche Aufnahme und Integration in seine Arbeitsgruppe.

Desweiteren danke ich Herrn Dr. med. Seong-Woong Kim sowie Herrn Dr. med. Raimund Trabold für ihre wertvolle Hilfe bei der Etablierung des Versuchsprotokolls. Ohne Euch wäre die Arbeit schwer möglich gewesen!

Frau Uta Mamrak sowie Frau Alke Schropp möchte ich besonders für ihre Unterstützung bei der histologischen Aufarbeitung der Gehirne danken.

Danke auch an Herrn Dr. Jürgen Peters für seine große Geduld und Hilfe bei allem, was mit Computern zu tun hat.

Die freundschaftliche und nette Atmosphäre, welche in der Arbeitsgruppe für Experimentelle Neurochirurgie herrscht, war einfach schön. Die Hilfsbereitschaft und Kollegialität jedes

einzelnen hat vieles sehr erleichtert. Neben allen großartigen Ski-Wochenenden, Grillabenden, Canyoning-Abenteuern und Segelturns hat auch schlicht das Arbeiten in dieser Gruppe viel Spaß gemacht.

Nicht zuletzt möchte ich mich noch von ganzem Herzen bei meiner Familie bedanken. Meine Eltern haben mir nicht nur das Medizinstudium ermöglicht, zusammen mit meinen Geschwistern und Freunden haben sie mich auch motiviert und ermutigt, wenn mal wieder „überhaupt nichts“ funktionierte.

9. PUBLIKATIONEN

Bereits veröffentlichte Aspekte der Arbeit:

Vorträge:

- *Mechanismen des akuten Durchblutungsabfalls nach experimentellem Schädel-Hirn Trauma*
32. Jahrestagung der Sektion Intrakranieller Druck, Hirnödem und Hirndurchblutung der deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (Heidelberg, 13.10.2006)
- *Rolle intravaskulärer Leukozyten für den sekundären Hirnschaden nach experimentellem Schädel-Hirn Trauma*
32. Jahrestagung der Sektion Intrakranieller Druck, Hirnödem und Hirndurchblutung der deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (Heidelberg, 13.10.2006)

Posterpräsentationen:

- *Microvasculatory alterations following experimental TBI*
8. International Neurotrauma Symposium, Rotterdam, Niederlande (22.05.2006)
- *Intravascular leucocytes and secondary brain damage after TBI*
8. International Neurotrauma Symposium, Rotterdam, Niederlande (22.05.2006)

10. LEBENSLAUF

Susanne Monika Schwarzmaier

Geboren 25. August 1981 in München – Pasing

Eltern: Dr. med. Christa Schwarzmaier
Dr. med. Klaus Schwarzmaier

Geschwister: Thomas Schwarzmaier
Barbara Schwarzmaier

Schulbildung:

09/1988 – 02/1990 Grundschule Nymphenburg
03/1990 – 07/1992 Grundschule Stockdorf
09/1992 – 05/2001 Feodor – Lynen Gymnasium Planegg,
mathematisch-naturwissenschaftlich
abgeschlossen mit Abitur 2001

Studium:

10/2001-11/2008 Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians Universität
München
09/2003 Physikum
abgeschlossen mit Staatsexamen 2008

Promotion:

06/2004-08/2007: Institut für Chirurgische Forschung, Abteilung für Experimentelle
Neurochirurgie, Ludwig-Maximilians Universität, München
bei Prof. Nikolaus Plesnila

Famulaturen:

02/2004	Hals-Nasen-Ohren Heilkunde, Universitätsklinikum Großhadern, Ludwig-Maximilians Universität München
03/2004	Chirurgie, Kreisklinik München-Pasing
08/2004-10/2004	Kinderchirurgie, CHD F. Guyon, St Denis, île de la Réunion, Frankreich
09/2005	Anästhesie, Kreisklinik München-Pasing
09/2006	Allgemeinmedizin, Praxis Dres. med. Ilmer, Mindelheim

Praktisches Jahr:

1. Tertial: Anästhesie und Intensivmedizin

06/2007-09/2007	Anästhesie und Intensivmedizin, Klinikum 3.Orden, München
-----------------	---

2. Tertial: Chirurgie

10/2007-11/2007	Viszeralchirurgie, Klinikum Schwabing, München
12/2007-01/2008	Chirurgie, Universitätsspital Basel, Basel, Schweiz

3. Tertial: Innere

02/2008-03/2008	Innere Medizin, Gastroenterologie, Hôpital Hôtel Dieu, Université Paris V René Descartes, Paris, Frankreich
04/2008-05/2008	Innere Medizin, Kardiologie, Hôpital Cochin, Université Paris V René Descartes, Paris, Frankreich

Fremdsprachen:

Englisch
Französisch

Beruf:

Ab 01/2009	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Royal College of Surgeons in Ireland (RCSI), Dublin, Irland Lehrstuhl für Neurodegeneration (Leiter: Prof. N. Plesnila)
------------	--