

Aus der Neurochirurgischen Klinik,
Universitätskliniken, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. med. W.I. Steudel
Fachbereich 4 (Klinische Medizin)
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Regionale Energiestoffwechselferänderungen an Cortex und Subcortex der Maus
nach repetitivem und singulärem
Controlled-Cortical-Impact Injury
Eine Biolumineszenz-Untersuchung**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

2005

vorgelegt von

Jérôme Manville

geboren am 08.09.1976
in Saarbrücken

Inhaltsverzeichnis

1. **Zusammenfassung**
 - 1.1 Summary

2. **Einleitung**
 - 2.1 Grundlagen
 - 2.2 Fragestellungen

3. **Material und Methoden**
 - 3.1 Versuchsplanung
 - 3.1.1 Versuchstiere und untersuchte Hirnregionen
 - 3.1.2 Traumamodell
 - 3.1.3 Untersuchungszeitpunkte nach dem Trauma
 - 3.1.4 Kontrollversuche
 - 3.1.5 Auswertungsmodell
 - 3.2 Versuchsprotokoll
 - 3.2.1 Präoperative Vorbereitung und Narkose
 - 3.2.2 Controlled-Cortical-Impact
 - 3.3 Biolumineszenzuntersuchung
 - 3.3.1 In vivo Kryofixation
 - 3.3.2 Präparation des Gewebes
 - 3.3.3 Herstellung der Gefrierschnitte
 - 3.3.4 Methode der Biolumineszenz
 - 3.3.4.1 Biochemische Grundlagen

- 3.3.4.2 Transport der Gewebeschnitte
- 3.3.4.3 Gefriertrocknen der Gewebeschnitte
- 3.3.4.4 Hitzedenaturierung
- 3.3.4.5 Vorbereitung der Biolumineszenzreaktion
- 3.3.4.6 Belichtung der Filme
- 3.3.4.7 Entwicklung der Filme
- 3.3.4.8 Standardisierung
- 3.4 Auswertung
 - 3.4.1 Zuordnung der Biolumineszenzfilme
 - 3.4.2 Auswertung der Biolumineszenzfilme
- 3.5 Fehlerquellen
- 3.6 Verarbeitung und Statistische Auswertung der Daten

4. **Ergebnisse**

- 4.1 Doppeltes Schädel-Hirn-Trauma
 - 4.1.1 ATP
 - 4.1.2 Glucose
 - 4.1.3 Laktat
- 4.2 Einfaches Schädel-Hirn-Trauma
 - 4.2.1 ATP
 - 4.2.2 Glucose
 - 4.2.3 Laktat
- 4.3 Vergleich zwischen singulärem und repetitivem Schädel-Hirn-Trauma
 - 4.3.1 ATP
 - 4.3.2 Glucose
 - 4.3.3 Laktat

5. Diskussion

- 5.1 Vergleich zwischen singulärem und repetitivem Schädel-Hirn-Trauma
- 5.2 Zeitlicher Verlauf und Seitenvergleich der Stoffwechseleränderungen
- 5.3 Vergleich zwischen Cortex und Subcortex
- 5.4 Sekundärmechanismen
 - 5.4.1 Zytokine
 - 5.4.2 Exzitatorische Aminosäuren
 - 5.4.3 Ionenveränderungen
 - 5.4.4 Mitochondrialer oxidativer Metabolismus
 - 5.4.5 Katecholamine
- 5.5 Beeinflussung durch systemische Parameter
- 5.6 Interindividualität
- 5.7 Therapeutische Ansätze
- 5.8 Klinische Bedeutung
- 5.9 Schlussfolgerungen

6. Literatur

7. Danksagung

8. Lebenslauf

9. Anhang

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|------------------------|--|
| ADP | Adenosindiphosphat |
| AMP | Adenosinmonophosphat |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BBB | Blood brain barrier (Blut-Hirn-Schranke) |
| $C_6H_{12}O_6$ | Glucose |
| Ca^{2+} | Calcium |
| CBF | Cerebral blood flow |
| CCI | Controlled Cortical Impact |
| Cl^- | Chlorid |
| CO_2 | Kohlendioxid |
| CSF | Cerebrospinalflüssigkeit |
| CTE | Chronisch traumatische Enzephalopathie |
| DNA | Desoxyribonucleotidsäure |
| DTT | Dithiotreitol |
| EEG | Elektroenzephalographie |
| FAD^+ | Flavoprotein der Atmungskette |
| FMN/FMNH ₂ | Flavinmononukleotid |
| GCS | Glasgow Coma Score |
| GFAP | Glial Fibrillary Acidic Protein |
| Glc-6-P | Glucose-6-Phosphat |
| Glc-6-P-DH | Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase |
| GPT | Glutamat-Pyruvat-Transaminase |
| H^+ | Wasserstoff |
| H ₂ O | Wasser |
| ISF | Interstitielle Flüssigkeit |
| K^+ | Kalium |
| LCGU | Local cerebral glucose utilization |
| LDH | Lactat-Dehydrogenase |
| mM | Millimol |
| MRT | Magnetresonanz-Tomographie |
| Na^+ | Natrium |
| NAD ⁺ /NADH | Nikotinamidadenindinucleotid |

| | |
|----------------|--------------------------------------|
| NADP/NADPH | Nikotinamidadenindinucleotidphosphat |
| NSE | Neuronen-spezifische Enolase |
| O ₂ | Sauerstoff |
| PCr | Phosphocreatin |
| Pi | Phosphation |
| PMN | Polymorphkernige Neutrophile |
| RNA | Ribonuclein-Acid |
| SDH | Succinat-Dehydrogenase |
| SEM | Standard error of the mean |
| SHT | Schädel-Hirn-Trauma |
| SIS | Second Impact Syndrome |

1. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Untersuchung wurde der Einfluss eines repetitiv erzeugten geschlossenen Schädel-Hirn-Traumas auf den Energiestoffwechsel des cerebralen Cortex und Subcortex der Maus analysiert.

Die Analyse erfolgte an 28 männlichen Mäusen mit einem Körpergewicht von 45 bis 63g. Zunächst erfolgte die Narkose mit Pentobarbital intraperitoneal (6,5 mg/kg). Anschließend wurde den Tieren ein geschlossenes Schädel-Hirn-Trauma mittels Controlled-Cortical-Impact-Modell in der links-medialen parieto-temporalen Schädelregion appliziert.

Die Versuchstiere der repetitiven Traumagruppe wurden in zwei Untersuchungsgruppen eingeteilt: 1) Kontrolltiere (Sham) zur Untersuchung des physiologischen Stoffwechsels sowie als Referenzgruppe im Vergleich zur traumatisierten Population

2) das von LIGHTHALL et al. (1988) erstmals beschriebene Controlled-Cortical-Impact-Modell wurde 18 Mäusen appliziert, durchschnittlich 5 Tiere pro Gruppe, eine Gruppe mit einem singulären Trauma und eine zweite Gruppe mit einem repetitiven Trauma; der zweite Impact erfolgte 24 Stunden nach dem ersten. Anschließend wurden die Gehirne in der Gruppe mit singulärem Trauma nach 1 Stunde, in der Gruppe mit repetitivem Trauma nach 15 Minuten, 1 Stunde, 24 Stunden und 48 Stunden mit flüssigem Stickstoff in situ eingefroren. Zur Charakterisierung des Energiestatus der ausgewählten Regionen wurden die Metabolite ATP, Glucose und Laktat analysiert, indem deren optische Dichte mittels enzymatischer Biolumineszenztechnik auf Schwarz-Weiß-Filmen dargestellt wurde. Die Schwärzung der Filme wurde danach mittels computergestützter Densitometrie quantifiziert.

Als Messregionen wurden von uns der Cortex und das gesamte subcorticale Areal gewählt, sowohl auf der ipsilateralen, als auch auf der kontralateralen Seite zur Traumaregion. Die so gewonnenen Messdaten wurden mittels t-Test statistisch auf signifikante Unterschiede analysiert. Mittel-

wertvergleiche wurden bei einem Signifikanzniveau $p < 0,05$ als signifikant unterschiedlich erachtet.

In den einfach traumatisierten Tieren finden sich zum gemessenen Zeitpunkt 1 Stunde nach Trauma keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Sham-Gruppe für alle drei Metabolite. Das bedeutet, dass bei der gewählten Traumastärke keine signifikanten metabolischen Frühveränderungen zu erkennen sind.

Bei den repetitiv traumatisierten Tieren kommt es nach Trauma zu einem bilateralen Abfall der ATP-Konzentration im Cortex bereits nach 15 Minuten, allerdings wird erst nach 24 Stunden ein signifikant erniedrigtes ATP gemessen. Nach 48 Stunden stellt sich wieder eine Erholung bis auf das Sham-Niveau ein. Die Veränderungen sind ipsilateral etwas stärker ausgeprägt als kontralateral. Subcortical sind für ATP keine signifikanten Änderungen festzustellen. Glucose zeigt sowohl cortical als auch subcortical zu keinem der untersuchten Zeitpunkte einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Sham-Gruppe. Die Konzentration von Glucose ist subcortical zu allen Zeitpunkten niedriger als cortical. Bei 48 Stunden nach repetitivem Trauma lässt sich cortical eine signifikant erhöhte optische Dichte von Glucose im Vergleich zum Subcortex erkennen.

Laktat zeigt die frühesten signifikanten Veränderungen. Bereits nach 15 Minuten steigt Laktat ipsilateral signifikant im Vergleich zu Sham an. Nach 1 Stunde ist dieser Anstieg bilateral signifikant im Vergleich zu Sham, was eine Laktatakkumulation, möglicherweise durch anaerobe Glykolyse, widerspiegeln könnte. Danach erfolgt ein steiler Abfall bis zu 24 Stunden, was einem starken Verbrauch entsprechen könnte, allerdings ohne Signifikanz im Vergleich zu Sham. Laktat ist der einzige der drei Metabolite, für den sich auch subcortical signifikante Veränderungen im Vergleich zu Sham ergeben. Im Gegensatz zu der corticalen Messregion findet sich allerdings kein subcorticaler Anstieg, sondern nach 24 und 48 Stunden ist Laktat signifikant niedriger verglichen mit der Sham-Gruppe. Die Veränderungen können bilateral erkannt werden, sind jedoch ipsilateral ausgeprägter.

Aus den ausgeführten Untersuchungsergebnissen lassen sich verschiedene Schlussfolgerungen ziehen:

- 1) Nach einem corticalen Controlled Cortical Impact Injury kommt es zu deutlichen und tiefgreifenden Veränderungen im cerebralen Energiestoffwechsel
- 2) Die Veränderungen der Konzentrationen der gemessenen Metabolite ATP, Glucose und Laktat weisen ein Muster auf, wie es im Rahmen ischämischer Läsionen des Gehirns beobachtet werden kann
- 3) Laktat zeigte von allen drei Metaboliten die früheste signifikante Veränderung mit einem Anstieg und könnte daher als Frühindikator für die Störung des cerebralen Stoffwechsels als Nachweis einer anaeroben Glykolyse angesehen werden
- 4) Da die gemessenen Veränderungen auch kontralateral ausgeprägt sind, jedoch mit stärkeren Veränderungen auf der Traumaseite, könnte man rückschließen, dass es nach Trauma zu einer global cerebralen Reaktion kommt, die ipsilateral akzentuiert ist
- 5) Im Vergleich zwischen singulärem und repetitivem Schädel-Hirn-Trauma gleicher Intensität zeigt sich eine deutlichere metabolische Alteration im Rahmen des doppelten Traumas; das könnte bedeuten, dass es nach mehreren Traumen zu Summationseffekten der Schädigung kommt
- 6) Die metabolischen Veränderungen dauern länger als 24 Stunden, lassen aber bis zum Zeitpunkt von 48 Stunden nach Trauma eine teilweise Reversibilität der pathologischen Vorgänge erkennen

1.1 SUMMARY

Many experimental and clinical observations investigate the changes of cerebral metabolism after mechanical induced brain injury. They suggest a worsening of cerebral damage by secondary pathophysiological processes proceeding after trauma. But the effects of a second impact to the brain on cerebral metabolism isn't well known yet. We initiated this investigation for studying the effects of a repetitive mechanical head injury on the cerebral energy metabolism.

28 male mice (mean body weight 45-63g) were anesthetized with pentobarbitale intraperitoneally (6,5 mg/kg). Afterwards, one group of animals received a singular controlled cortical impact injury without craniotomy to the left medial parieto-temporal cortex, a second group received a second impact 24 hours after the first one. After that the animals were reanesthetised and their brains were frozen in situ with liquid nitrogen. Regional optical density of ATP, glucose and lactate was measured by computer assisted bioluminescent imaging in the ipsilateral and contralateral cortex and subcortical area 15 minutes, 1h, 24h and 48 hours postinjury in the group with the repetitive impact. To recognize the early effects of the second impact, the animals with only one impact were investigated at 1 hour postinjury and compared to the animals with a second impact.

The grey values of the bioluminescent images of each metabolite were statistically analyzed by Student's t-test ($p < 0,05$).

In repetitive traumatized animals a decreased optical density of ATP in the cortical area was found after 15 minutes postinjury bilaterally with a significant minum at 24 hours postinjury. Till 48 hours an increase of ATP was found and reached sham level again. These changes were emphasized at the ipsilateral hemisphere. No changes were found in the subcortical area. The optical density of Glucose showed no significant changes at any time compared to sham in the cortical as well as in the subcortical region. And no differences between ipsilateral and contralateral hemisphere could be measured. The optical density of glucose in the subcorti-

cal area is lower than in the cortical area at each time point. At 48 hours after the second impact the subcortical optical density of glucose bilaterally reaches a significant minimum compared to cortex.

Lactate showed the earliest significant changes. Already at 15 minutes postinjury there was an increased optical density of lactate in Cortex with statistical significance in the ipsilateral hemisphere and a bilateral significant maximum at 1 hour postinjury, which may reflect a lactate accumulation by anaerobic glycolysis.

After that there is a sharp decrease of the optical density of lactate without reaching significance level compared to sham, which maybe shows a lactate consumption. Lactate is the only metabolite showing significant changes in subcortical area compared to sham, but in contrast to cortex no significant maximum but significant minimum at 24 and 48 hours postinjury.

These changes were found bilaterally but pronounced in the ipsilateral hemisphere.

These findings lead to the following conclusions: 1) after a repetitive controlled cortical impact injury there is a distinct impairment of the cerebral energy metabolism 2) the changes of concentration of the measured metabolites ATP, glucose and lactate refer to metabolic changes like found in an ischemic cerebral lesions 3) lactate showed the earliest changes of all metabolites so maybe it could be interpreted as an early indicator of cerebral metabolic impairment caused by anaerobic glycolysis 4) because of the bilaterally developing of the metabolic changes with emphasis in the ipsilateral hemisphere, it seems that the changes after traumatic brain injury are global but ipsilaterally pronounced 5) comparing singular and repetitive brain injury, additive effects of multiple head trauma to brain injury can be supposed 6) the metabolic changes last for longer than 24 hours postinjury, but there is a tendency for a recovery between 24 and 48 hours.

2. Einleitung:

2.1 Grundlagen

Frühere Untersuchungen des Stoffwechsels, unter anderem auch in unserem Laboratorium, zeigten, dass ein Schädel-Hirn-Trauma mit deutlichen Veränderungen im cerebralen Metabolismus einhergeht (MAUTES et al. 2001). Unter anderem kommt es zu einer Gewebeischämie durch eine Abnahme des cerebralen Blutflusses (JIANG et al. 2000), die nicht auf die unmittelbar traumatisierte Region beschränkt bleibt (KOCHANNEK et al. 1995) und von der Ausbildung eines Ödems begleitet wird. Um die pathophysiologischen Veränderungen genauer zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit die Auswirkungen eines repetitiv erzeugten geschlossenen Schädel-Hirn-Traumas auf den cerebralen Metabolismus untersucht.

Das Gehirn besteht aus drei Kompartimenten, die geschützt im knöchernen Schädel liegen:

- 1) das Gehirngewebe,
- 2) das in den Blutgefäßen vorhandene Blutvolumen,
- 3) die Zerebrospinalflüssigkeit (CSF) mit interstitieller Flüssigkeit (ISF)

Die Trennung dieser drei Kompartimente wird durch die sogenannte Blut-Hirn-Schranke (Blood-Brain-Barrier, BBB) erreicht.

Die heutige Vorstellung von der Blut-Hirn-Schranke geht davon aus, dass die Trennung zwischen den einzelnen Kompartimenten durch die zwischen den cerebralen Endothelzellen gelegenen tight junctions gewährleistet wird, die eine Passage hydrophiler Moleküle vom Blut ins Gehirn und um-

gekehrt verhindern (REESE and KARNOFSKY, 1967; BRIGHTMAN and REESE, 1969).

Die Entwicklung der Blut-Hirn-Schranke ist ein komplexer Prozess, der letztendlich zur Entwicklung endothelialer Zellen mit unilateralen Permeabilitätscharakteristika aufgrund eines hohen elektrischen Widerstandes und der Expression spezifischer Transporter, führt (RISAU und WOLBURG, 1990; DERMIETZEL und KRAUSE, 1991).

Die kapillären Endothelzellen sind kontinuierlich über interzelluläre tight-junctions miteinander verbunden und zeigen unter normalen Umständen keine oder wenige transendotheliale Kanäle oder Pinocytosevesikel (POLLAY und ROBERTS, 1980; GOLDSTEIN und BETZ, 1983). Die Geschwindigkeit, mit der die verschiedenen Substanzen die Blut-Hirn-Schranke überwinden, ist abhängig von der Molekülgröße, der Lipophilie und der Anwesenheit spezifischer Carrier-vermittelter Transportsysteme (POLLAY und ROBERTS, 1980).

So sind die Na^+ - K^+ -ATPase und das A-System-Amino-Säure-Transportsystem prädominant an der abluminalen Membran der kapillären Endothelzellen lokalisiert (GOLDSTEIN et al. 1986; BETZ, 1983; BETZ et al. 1980). Das Vorkommen dieser spezifischen Carrier-Systeme ist koexistent mit einer geringen Permeabilität für Kalium und für kleine Aminosäuren in Blut-Hirn-Richtung (GOLDSTEIN et al. 1986).

Aufgrund dieser Selektivität haben zirkulierende Moleküle nur 2 Möglichkeiten, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren (PARDRIDGE, 1999):

- 1) Lipid-vermittelter Transport kleiner Moleküle durch freie Diffusion
- 2) Katalysierter Transport

Diese Selektivität wird ermöglicht durch die Eigenschaften der kapillären Endothelzellen, inklusive der Anwesenheit von (BETZ, 1985):

- 1) kontinuierlichen tight junctions
- 2) geringer transzellulärer Permeabilität

- 3) transzellulären Konzentrationsgradienten
- 4) einer transzellulären Potentialdifferenz
- 5) einem großen transzellulären Widerstand
- 6) einer asymmetrischen Verteilung von Transportsystemen zwischen der luminalen und abluminalen Plasmamembran

Diese Selektion der Passage der verschiedenen Substanzen ist notwendig, um die Zusammensetzung der CSF und der ISF konstant zu halten (FISHMAN, 1975).

Diese konstante Konzentration der gelösten Substanzen in CSF und ISF ist essentiell zur Aufrechterhaltung eines beständigen Umgebungsmilieus für das Gehirn, was notwendig zur optimalen Funktionserhaltung ist. Dagegen ist ein Stoffaustausch zwischen CSF und ISF nahezu unbeschränkt möglich (WAGNER et al. 1974), so dass diese beiden Kompartimente als eine funktionelle Einheit betrachtet werden können.

Die Zusammensetzung der CSF ist zur Aufrechterhaltung der neuronalen Aktivität sehr wichtig. Die Neurone benötigen ein konstantes osmotisches und ionisches Milieu und eine dauernde Versorgung mit dem Hauptenergielieferanten Glukose, da Neurone nur über eine geringe Energiereserve verfügen.

Die Ionenverhältnisse der CSF entstehen durch aktive Transport- und Sekretionsprozesse. Die Na^+ - K^+ -ATP-ase, die an der apikalen Oberfläche der Plexuszellen und an der abluminalen Seite der Kapillarendothelien lokalisiert ist, baut einen Ionengradienten auf, der zum passiven Einstrom von Wasser führt (ROSENBERG, 1990). Für den Glucosetransfer stehen aktive Carrier-vermittelte Transportmechanismen zur Verfügung, die durch die konzentrationsabhängige Diffusion von Glucose ergänzt werden (ROSENBERG, 1990). Die passiven Glucose-Transporter befinden sich sowohl an der luminalen, als auch an der abluminalen Seite Blut-Hirnschranke (HAWKINS et al. 2002).

Mit Hilfe dieser Mechanismen kann die K^+ -Konzentration der CSF konstant gehalten werden, auch wenn es zu Schwankungen in der Plasmakonzentration kommen sollte (BRADBURY et al. 1981, KATZMAN und HUSSEY, 1970; KEEP, XIANG, BETZ, 1993). Die gleichen Mechanismen gelten für die Aufrechterhaltung der Ca^{2+} -Konzentration innerhalb der CSF. Dagegen zeigt die Konzentration von Na^+ in der CSF eine deutliche Korrelation zur Na^+ -Plasma-Konzentration (DAVSON und POLLAY, 1963).

Eine der Hauptaufgaben der CSF besteht im Stofftransport und der Versorgung bzw. Entsorgung der Neurone. Der Austausch der an der neuronalen Versorgung beteiligten Nähr- und Abfallstoffe geschieht entlang der extrazellulären Spalten und der perivascular gelegenem Virchow-Robin-Räume. Die beiden treibenden Kräfte sind die Diffusion und die Konvektion.

Diffusion ist ein passiver Vorgang ohne Energieverbrauch; sie ist abhängig von Molekulargewicht, Austauschfläche und Diffusionskoeffizienten der diffundiblen Substanzen. Die Diffusion ist vor allem zum Stoffaustausch über kürzere Distanzen geeignet.

Unter Konvektion versteht man Stoffaustauschvorgänge, die unabhängig vom Molekulargewicht stattfinden, aber Osmo- und Druckgradienten folgen. Die Konvektion eignet sich zum Stoffaustausch über längere Distanzen.

Die Transportgeschwindigkeit der Stoffe ist in der weißen und grauen Substanz unterschiedlich (ROSENBERG, 1980, ROSENBERG und KYNER, 1980). Das ist bedingt durch die geringere Synapsendichte und der geringeren Konzentration an Hyaluronsäure in der extrazellulären Substanz (ROSENBERG et al. 1980), wodurch die Flüssigkeitsbewegungen in ihrer Geschwindigkeit limitiert werden.

Diese Homöostase kann nun vielseitig gestört werden. Schädel-Hirn-Traumen, ischämische Insulte, Infektionen oder Tumoren können zu erhöhter intrakranieller Flüssigkeitsansammlung mit konsekutiver Zunahme des Gehirnvolumens – das Hirnödem – führen.

1967 beschrieb KLATZO ein Klassifizierungssystem für das Hirnödem. Er unterteilte es in 2 Formen.

1. cytotoxisch: Diese Form der Hirnschwellung war charakterisiert durch eine rein intrazelluläre Flüssigkeitsansammlung. Die akkumulierte Flüssigkeit hatte die Eigenschaften eines Ultrafiltrates des Blutplasmas.

2. vasogen: Die Ursache dieser Form der Hirnschwellung ist eine gestörte Funktion der Blut-Hirn-Schranke. Diese Ödemflüssigkeit ist ein Plasmafiltrat mit einer hohen Konzentration an Natrium und Kalium und einer Proteinkonzentration, die der des Plasmas ähnelt (CLASEN et al. 1960).

Die von KLATZO definierten Charakteristika der beiden Ödemtypen sind in Tab. 1 dargestellt.

Tab. 1: Charakteristika der beiden Hirnödem-Typen

| | VASOGEN | CYTOTOXISCH |
|---|--|---|
| LOKALISATION | Prädominant weiße Substanz | Graue oder weiße Substanz, abh. vom cytotoxisch wirksamen Agens |
| GEFÄß-PERMEABILITÄT | erhöht, inklusive Proteinleckage | mgl. unbeeinflusst, keine Proteinleckage |
| ULTRASTRUKTUR | Vergrößerung der extrazell. Räume in der weißen Substanz; Zellschwellung v.a. Astrozyten | keine Vergrößerung der extrazell. Räume; Zellschwellung unterschiedlicher Zelltypen, abh. vom zytotoxisch wirkenden Agens |
| BIOCHEMISCHE EIGENSCHAFTEN DER ÖDEM-FLÜSSIGKEIT | Plasma-Filtrat inklusive Serumproteine | Plasma-Ultrafiltrat, Zusammensetzung abh. vom zytotox. wirkenden Agens |

Neben den histomorphologischen Veränderungen führen pathologische Ereignisse auch zu funktionellen Beeinträchtigungen der Zelle. Diese Störungen in der Zellfunktion können sich schon frühzeitig manifestieren und sind nicht zwangsläufig mit morphologischen Veränderungen korreliert.

Die biochemischen Vorgänge in einer Nervenzelle zur Deckung ihres Energiebedarfes sind sehr komplex. Das wichtigste Substrat als Ausgangssubstanz für die zelluläre Energiegewinnung ist Glucose. Liegt Glucose in ausreichenden Mengen vor und ist die Sauerstoffversorgung der jeweiligen Zelle gewährleistet, d.h. laufen die Reaktionen unter aeroben Bedingungen ab, so setzt die Zelle normalerweise die notwendige Energie durch Hydrolyse von ATP frei ($\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ADP} + \text{P}_i + \text{H}^+$). Dabei ist die Menge des hydrolysierten ATP keine konstante Größe, sondern die Zelle ist in der Lage, die Energiegewinnung entsprechend ihren Bedürfnissen herauf- bzw. herunter zu regulieren.

Die Energiereserven, die der Zelle im Bedarfsfall zur Verfügung stehen, sind sehr beschränkt. Ein Substrat zur alternativen Energiegewinnung ist das Creatinphosphat ($\text{PCr} + \text{ADP} \rightarrow \text{ATP} + \text{Creatin}$). Das im Rahmen der Energiegewinnung anfallende ADP kann durch das Enzym Adenylatzyklase wieder zu ATP umgewandelt werden ($2 \text{ADP} \leftarrow \text{ATP} + \text{AMP}$).

Die cerebrale Zelle hat nur eine sehr geringe Ischämietoleranz, d.h. bei mangelnder Blut- und damit Sauerstoffzufuhr sind die Energiereserven (ATP und PCr) und die Energielieferanten (Glucose, Glykogen) sehr schnell verbraucht (LOWRY et al. 1964).

Werden erniedrigte Konzentrationen an ATP gemessen, so deutet dies auf einen bereits deutlich fortgeschrittenen zellulären Schaden hin, da ATP den unmittelbaren Energielieferanten darstellt. Ein Abfall der ATP-Konzentration bedeutet daher, dass die genannten Kompensationsmechanismen, die der Zelle zur Verfügung stehen, ihren Energiebedarf zu decken, bereits nicht mehr greifen.

Die wichtigsten Mechanismen, für welche die Zelle ihre Energie benötigt, sind:

1. aktive Transportprozesse, um Ionen und andere Substanzen gegen ein Konzentrationsgradienten bzw. über Membranen transportieren zu können
2. Biosynthese
3. Neurotransmittersysteme

Das Gehirn hat im Vergleich mit anderen Organen einen sehr hohen Sauerstoffbedarf. Es wird mit etwa 15% des Herz-Zeit-Volumens versorgt und verbraucht etwa 20% des gesamten Sauerstoffangebotes im Körper. Dabei hat es nur etwa einen Anteil von 2% am Gesamtkörpergewicht (SCHMIDT, 1964).

Als Hauptsubstrat zur Energiegewinnung dient Glucose, die enzymatisch glykolysiert wird:



Theoretisch können aus einem Mol Glucose über diese aerobe Glykolyse 36 Mol ATP gewonnen werden. Die Zelle oxidiert jedoch nur etwa 90% der ihr angebotenen Glucose durch diese, auch unter thermodynamischen Gesichtspunkten nicht optimal ablaufende, Reaktion. Daher liegt der realistische Wert der gewonnenen Menge an ATP im Bereich von 30-35 Mol pro Mol Glucose (SIESJÖ, 1978). Die restlichen 10% werden anaerob verstoffwechselt. Die Energieausbeute im Rahmen der anaeroben Reaktion ist deutlich geringer und als Nebenprodukt entsteht Laktat. Pro Mol Glucose können bei der anaeroben Glykolyse maximal 2 Mol ATP gewonnen werden.



Die Oxidation von Glucose läuft in verschiedenen Einzelschritten ab:

1. Glykolyse im Zytosol: Die Glykolyse beginnt mit einem Energieverbrauch von 2 Mol ATP für die Bildung von Fructose-1,6-bisphosphat durch die Enzyme Hexokinase und Phosphofruktokinase. Das heißt, um die Glykolyse initiieren zu können, müssen noch Energiereserven vorhanden sein. Im weiteren Verlauf entstehen bei der Reaktion des Enzyms Phosphoglyzeratkinase und Pyruvatkinase 4 Mol ATP. In der Gesamtbilanz ergibt sich daher ein Nettogewinn von 2 Mol ATP. Weiterhin wird das Coenzym NAD^+ zu $\text{NADH} + \text{H}^+$ oxidiert. Eine Akkumulation von $\text{NADH} + \text{H}^+$ wird allerdings verhindert, da das Enzym Lactatdehydrogenase, das die Reaktion von Pyruvat zu Laktat katalysiert auch gleichzeitig $\text{NADH} + \text{H}^+$ wieder zu NAD^+ reduziert (Abb.1). Unter aeroben Bedingungen kann das $\text{NADH} + \text{H}^+$ in der Atmungskette oxidiert werden. Hierzu ist allerdings der Transport der Reduktionsäquivalente des $\text{NADH} + \text{H}^+$ vom cytosolischen in den mitochondrialen Raum erforderlich. Da $\text{NADH} + \text{H}^+$ nicht durch die innere Mitochondrienmembran permeieren kann, stehen für diesen Prozeß der Malatcyclus sowie der α -Glycerophosphatcyclus zur Verfügung. Der erstere führt zur Bildung von mitochondrialem $\text{NADH} + \text{H}^+$ auf Kosten von cytosolischem, der zweite liefert aus cytosolischem $\text{NADH} + \text{H}^+$ intramitochondriales FADH_2 .

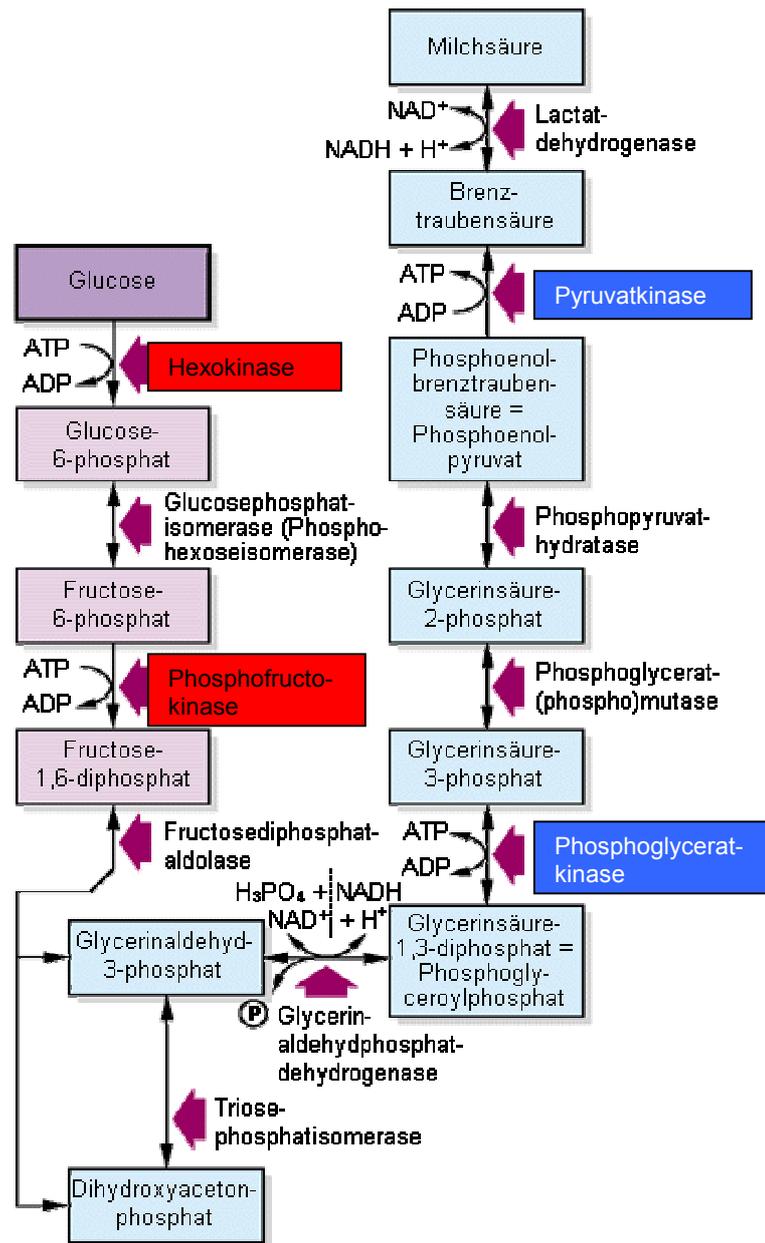


Abb.1: Schematische Darstellung der Glykolyse. Die energieverbrauchenden Reaktionen der Hexokinase und Phosphofruktokinase sind rot, die energieliefernden Reaktionen der Phosphoglyceratkinase und Pyruvatkinase sind blau hervorgehoben (modifiziert nach Löffler und Petrides, 1998).

2. Citratcyklus: Das im Rahmen der Glykolyse entstehende Pyruvat tritt in den Citratzyklus ein. Die Bedeutung des Citratzyklus liegt darin, dass er das einzige Bindeglied zwischen Substratabbau und biologischer Oxidation darstellt. Am Ende des Citratzyklus steht der Elektronentransport in die Atmungskette, in der die Energiebereitstellung in Form von ATP erfolgt (Abb.2).

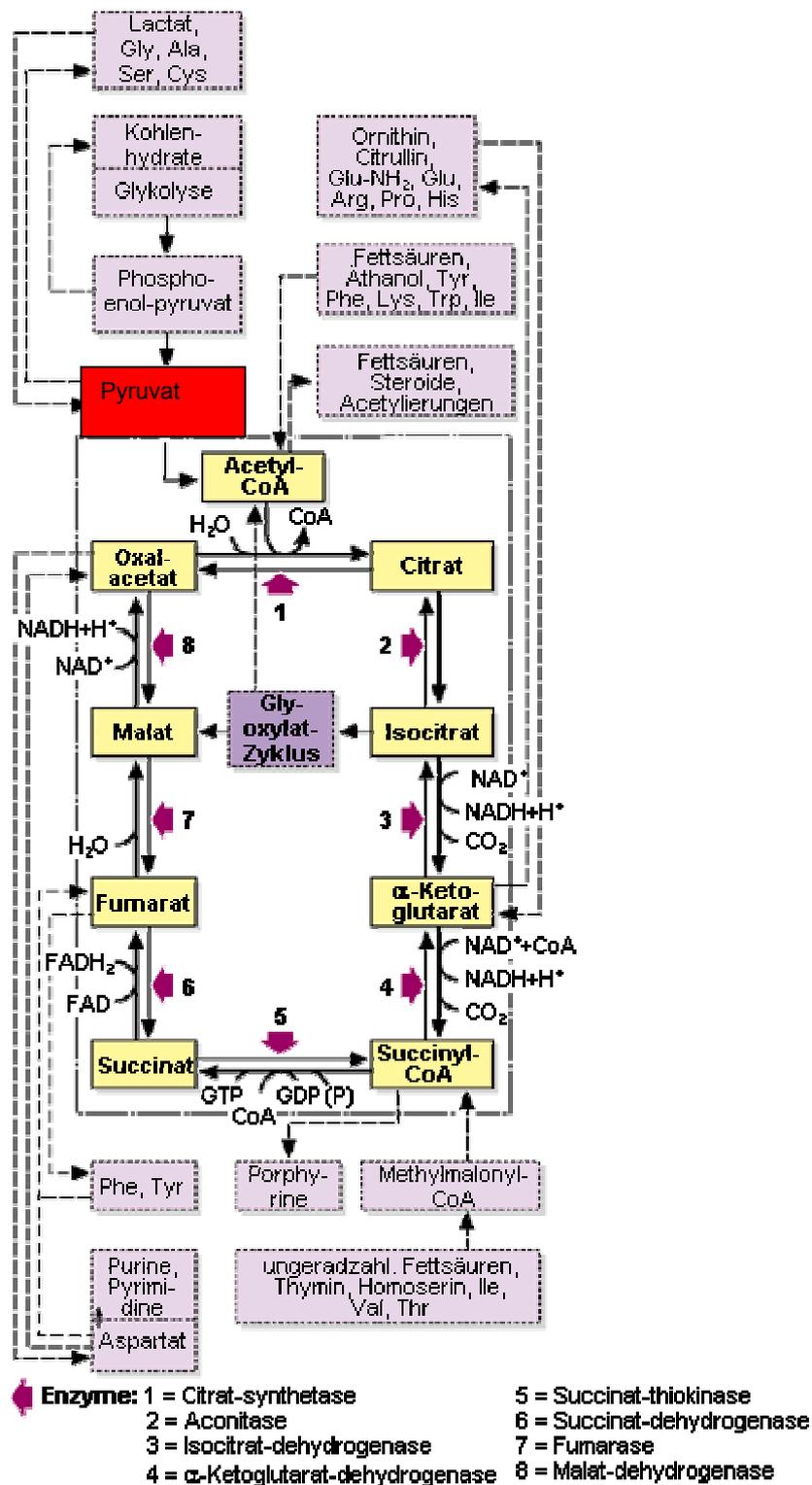


Abb.2 : Schematische Darstellung des Citratcyclus. Das Pyruvat, das aus der Glykolyse in den Citratcyclus eintritt, ist rot hervorgehoben (modifiziert nach Löffler und Petrides, 1998).

3. Atmungskette: Die Atmungskette findet an der inneren Mitochondrienmembran statt. Es handelt sich um eine Sequenz von Enzymen und Carriern, die für den Transport der Reduktionsäquivalente von $\text{NADH} + \text{H}^+$ zum molekularen Sauerstoff verantwortlich sind. Es handelt sich um eine sehr stark exergone Reaktion, die daher über ein Kaskadensystem ablaufen muß, um Zellschäden bei der Energiefreisetzung zu verhindern (Abb.3).

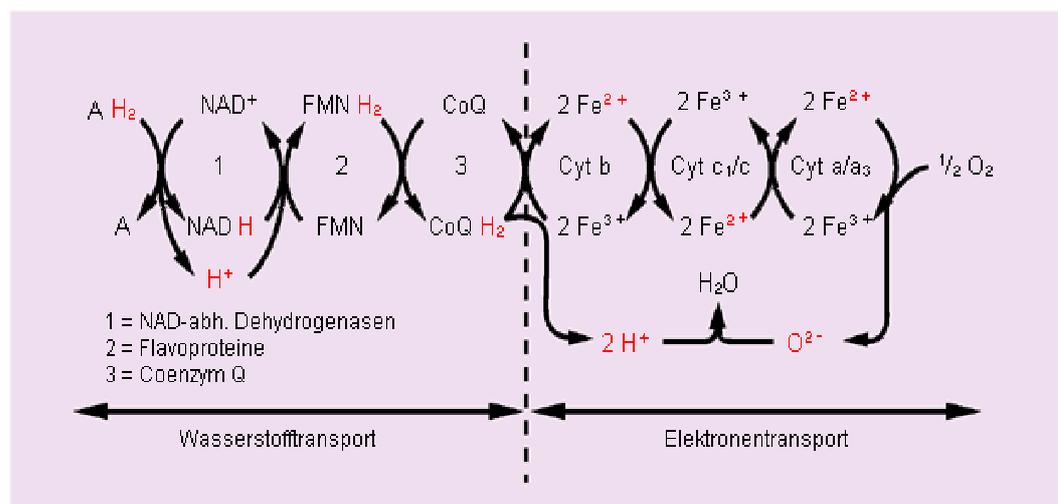


Abb.3 : Schematische Darstellung der Atmungskette. Oxidative Phosphorylierung als letzter Schritt der Energiegewinnung mit der Bildung von ATP (modifiziert nach Löffler und Petrides, 1998).

Glucose, Laktat und ATP sind essentielle Bestandteile innerhalb des Stoffwechsels, die die funktionelle Integrität der cerebralen Neurone gewährleisten.

Daher lassen Veränderungen im Verhältnis der Konzentrationen der einzelnen Metabolite zueinander Rückschlüsse auf die pathogenetischen Vorgänge zu. In unserer Arbeit untersuchten wir diese pathogenetischen Vorgänge nach repetitivem Schädel-Hirn-Trauma.

Im Laufe der Jahre wurden viele unterschiedliche Modelle zur experimentellen Erzeugung eines cerebralen Traumas entwickelt. LIGHTHALL entwickelte 1988 ein neues experimentelles Modell zur Erzeugung eines mechanischen Schädel-Hirn-Traumas. Dieses sogenannte Controlled Cortical Impact Modell verwendet einen pneumatischen Impactor. Der Vorteil dieses Modells liegt in der Tatsache, dass eine bekannte Trefferfläche und eine messbare, kontrollierbare Schlaggeschwindigkeit verwendet werden. Diese bekannten Variablen ermöglichen die genaue Bestimmung des Ausmaßes der entstehenden Deformation. Die quantifizierbaren Parameter des entstehenden mechanischen Inputs, der zur Traumaapplikation verwendet wird, erlaubt die Beurteilung der Korrelationen zwischen dem Grad der Deformation und der resultierenden Pathologie und den funktionellen Veränderungen. Dieses Modell liegt auch dem Trauma in dieser Arbeit zu Grunde. Der Versuchsaufbau dieses Modells wird explizit in Abb. 6 und Abb. 7 gezeigt.

Das Besondere an unserer experimentellen Arbeit ist die Tatsache, dass wir kein singuläres Trauma unseren Untersuchungen zugrunde gelegt haben, sondern ein repetitives Trauma, d.h. 2 Controlled Cortical Impacts im Abstand von 24 Stunden. Nur zum frühen Zeitpunkt 1 Stunde nach Trauma haben wir den Vergleich zu einem singulären Controlled Cortical Impact Injury gleicher Stärke herangezogen. Der Grund hierfür liegt in der Tatsache, dass wir untersuchen wollten, ob es in der Frühphase nach repetitiver Schädigung zu Summationseffekten in der Schädigung des cerebralen Stoffwechsels kommt, oder ob ein vorangegangenes Trauma ei-

nen protektiven Effekt gegenüber einem folgenden Trauma induziert, im Sinne einer Konditionierung.

Es existieren Arbeiten, die Ergebnisse in beide Richtungen zeigen. KANAYAMA et al. (1996) zeigten in ihren Ergebnissen, dass es im Vergleich zum einfachen Schädel-Hirn-Trauma beim repetitiven Schädel-Hirn-Trauma zu kumulativen Effekten der Schädigung und deutlich stärkeren pathologischen Veränderungen im Verhalten der Versuchstiere gab, in Abhängigkeit von der Stärke und der Häufigkeit der Wiederholungen.

ALLEN et al. (2000) zeigten dagegen, dass ein repetitives mildes Schädel-Hirn-Trauma das Gehirn in einer Weise konditioniert, dass ein folgendes mildes Schädel-Hirn-Trauma auf der gleichen Seite keinen negativen Effekt auf die motorische Funktion mehr hat.

Tabelle 2: Übersicht verschiedener Studien zum cerebralen Metabolismus

| STUDIE | TRAUMAMODELL | HIRNREGION | MEßMETHODE | ERGEBNISSE |
|---|---|-------------------------|--------------------|---|
| Chen et al. J Neurotr 2000 | lateral fluid percus- sion injury | Cortex und Subcortex | cerebral dialysate | 10min-1h: ↑↑ Laktat (238% mit Laktatinfusion, 171% ohne Laktatinfusion) 10min-30min: ↓ Glucose (231%) |
| Dhillon HS, Donaldson D, J Neurotrauma, 1994 | Controlled cortical impact injury | Cortex und Subcortex | Microdialysis | Ipsilateral Free fatty acids ↑↑ 30min/2,5h/24h Evans blue extravasation ↑↑ 30min/10h kontralateral free fatty acids ↑↑ 2,5h/24h Evans blue ↔ |
| Krishnappa et al., J Neurotrauma, 1999 | Cortical impact injury, bilateral carotid occlusion | Cortex | Microdialysis | CCI 1h: Laktat (3-5fach) ↑ 1h: Glucose (50%) ↓ CCI+carotid occlusion 1h: ↑↑ Laktat 1h: ↓↓ Glucose |
| McIntosh et al. J Neurochem 1994 | Fluid percussion injury | Cortex Subcortex | Homogenat, HPLC | Cortex 1h-2w: Dopamin ↓, Adrenalin ↔, Noradrenalin ↔ Subcortex 6h: Dopamin ↑ 1h-1w: Dopamin ↑, Noradrenalin ↑ |
| Nilsson P, Hillered L, J Cereb Blood Flow Metab, 1990 | Controlled cortical impact injury | Cortex | Microdialysis | Lactate, pyruvate, adenosine, inosine, hypoxanthine, amino acids: ↑↑ in Abhängigkeit von der Traumastärke |

| STUDIE | TRAUMAMODELL | HIRNREGION | MEßMETHODE | ERGEBNISSE |
|---|---|---------------------|--|--|
| Prasad et al. J Neurochem, 1994 | Controlled cortical impact injury | Gesamtes Gehirn | microdialysis | Ipsilateral 30min: ATP ↔ 30min,2.5h,24h:Laktat ↑ Kontralateral 30min: ATP ↔ 30min,2.5h,24h:Laktat ↑ |
| Pulsinelli WA, Levy DE Ann. Neurol 1982 | forebrain ischemia by occluding both common carotid arteries | Gesamtes Gehirn | indicator- fractionation method (CSF) 2- [¹⁴ C]deoxyglucose | Cerebrale Glucoseutilisation neocortex, striatum: ↓ 1h/48h white matter: ↓ 1h, ↔ 48h Hippocampus: ↔ 1h, ↓ 24h/48h |
| Shapira et al. Anesth Analg 1998 | Closed Head Injury | Cortex Subcortex | Evans Blue Extraction, NSS, spezifische Gewebsdichte | 4h: Evans Blue Extraction ↑ 15min-4d: Blut-Hirn-Schranke ↓ 24h: Ödem ↑ 4d-7d:Ödem ↔ 1h: NSS ↑ |

| STUDIE | TRAUMAMODELL | HIRNREGION | METHODEN | ERGEBNISSE |
|--|-------------------------|-------------------------------|---|--|
| Sutton et al. Acta Neurochir 1994 | Cerebraler Metabolismus | Kortex, Thalamus, Hippocampus | 2- ¹⁴ Cdeoxyglucose, ¹⁴ Cjodoantipyrine- autoradio-graphy | Ipsilateral 30min: Glucose↑ 6h,1d,6d: Glucose ↓ Kontralateral 10d: Glucose ↓ |
| Unterberg AW, Andersen BJ, J Neurosurg, 1988 | fluid percussion trauma | Gesamtes Gehirn | phosphorus-31-magnetic resonance spectrography, radioactive microsphere technique | PH ↓ 30 min; ↔ 3h CBF/CMRO2/CMRG1 ↔ bis 8h posttraumatisch Pcr ↔ Pi ↔ |

| STUDIE | TRAUMAMODELL | HIRNREGION | METHODE | ERGEBNISSE |
|--|-------------------------|-----------------------------------|--|---|
| Yoshino et al Brain Res 1991 | Fluid percussion injury | Cortex Hippocampus Thalamus | [¹⁴ C]2-Deoxy-D-Glucose- Methode | <p>Cortex ipsilateral 1,30min: Glucose ↑ 6h,1,2,3,5d: Glucose ↓ 10d: Glucose ↔</p> <p>Cortex kontralateral 1min: Glucose ↑</p> <p>Hippocampus ipsilateral 1,30min: Glucose ↑ 6h: Glucose ↓ 1,2,3,5,10d: Glucose ↔</p> <p>Hippocampus kontralateral 1min: Glucose ↑</p> <p>Thalamus ipsilateral 6h: Glucose ↓ 1,2,3,5,10d: Glucose ↔</p> |
| Zauner A, Clausen T, J Neurosurg, 2002 | fluid percussion trauma | Gesamtes Gehirn | Microdialysis | <p>Trauma alleine:</p> <p>PO₂ ↓ von 33 ± 5 mmHg auf 10 ± 4 mmHg</p> <p>PCO₂ ↑ von 55 ± 2 auf 81 ± 9</p> <p>pH ↓ von 7,1 ± 0,06 auf 6,84 ± 0,14</p> <p>nach sekundärer Ischämie von 40min</p> <p>PO₂ ↓ auf 0 mmHg</p> <p>PH ↓ auf 6,48 ± 0,18</p> <p>PCO₂ ↔ 83 ± 13 mmHg</p> |

2.2 Fragestellungen

1. Auswirkungen des SHT auf den cerebralen Metabolismus:

Welche Veränderungen ergeben sich für den posttraumatischen cerebralen Metabolismus? Lassen sich Unterschiede zwischen dem Cortex und dem subcorticalen Areal erkennen?

2. Zeitlicher Verlauf der Veränderungen:

Läßt sich ein zeitliches Muster der posttraumatischen Veränderungen erkennen? Zeigen sich Hinweise auf eine Restitution oder handelt es sich eher um ein progredientes Geschehen mit fortschreitender Alteration des cerebralen Metabolismus?

3. Vergleich zwischen singulärem und repetitivem SHT in der Frühphase:

Gibt es Unterschiede der Veränderungen im cerebralen Metabolismus nach singulärem und repetitivem SHT? Lassen sich Summationseffekte erkennen, d.h. eine deutlich stärkere Schädigung nach dem zweiten Trauma? Oder lassen sich eher Konditionierungseffekte erkennen, d.h. schützt ein vorausgegangenes SHT das Gehirn vor einer starken Schädigung im Falle eines kurzzeitig später eintretenden SHT?

4. Klinische Relevanz:

Welche Bedeutung hat der hier verwendete Versuchsaufbau für die klinische Praxis? Gibt es klinische Erscheinungsformen, die sich anhand der hier festgestellten Ergebnisse erklären lassen?

5. Therapeutische Ansätze:

Kann man anhand des zeitlichen Verlaufsmusters einen optimalen Zeitpunkt zur therapeutischen Intervention ausmachen? Lassen die hier gefundenen Ergebnisse eine therapeutische Ansatzmöglichkeit erkennen?

3. Material und Methoden

3.1 Versuchsplanung

3.1.1 Versuchstiere und untersuchte Hirnregionen

Die Untersuchung wurde an 28 männlichen Mäusen mit einem Körpergewicht von 45 bis 63g durchgeführt. Die Untersuchung wurde am Cortex und an der subcorticalen Region durchgeführt. Cortical, um die metabolischen Veränderungen dieser sehr stoffwechselintensiven und damit metabolisch vulnerablen Hirnregion zu erkennen und subcortical, um die tatsächliche regionale Ausbreitung der metabolischen Veränderungen zu erfassen.

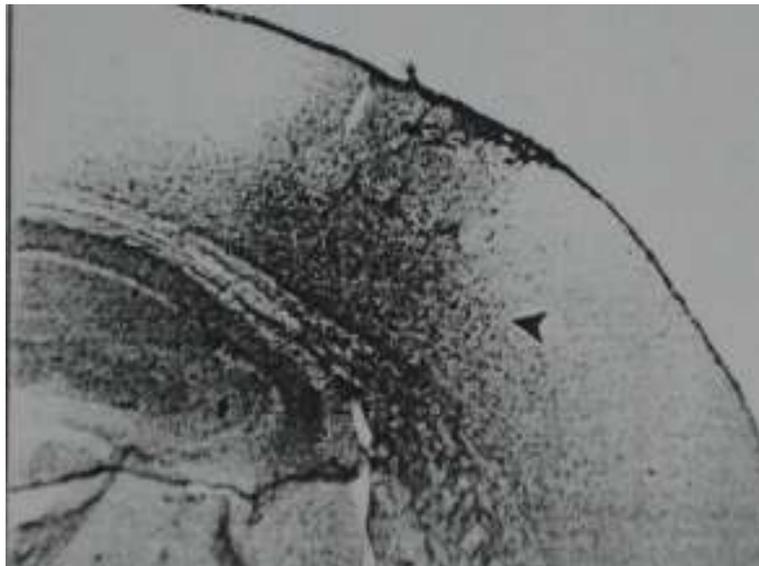


Abb.4 Histologische Abbildung eines 20µm Coronarschnittes zur Kennzeichnung der Ödemzone rechts cortical (zur besseren Übersicht herausvergrößert). Der Pfeil markiert das posttraumatische Ödem

Die zu untersuchende corticale Hirnregion wurde anhand der Ödemausbreitung im histologischen Bild festgelegt (Abb.4).

Es wurden bilateral jeweils 6 Messpunkte festgelegt. Ihre Größe wurde so gewählt, dass der Durchmesser eines Punktes die Tiefenausbreitung des Ödems vollständig erfasst. Gleichzeitig wurden diese 6 Punkte gleichmäßig über die Ödemzone verteilt. Da an den Gefrierschnitten eine genaue Differenzierung von subcorticalen Strukturen teilweise nur sehr schwer möglich ist, wurde zur Messung die gesamte subcorticale Region in ihrer optischen Dichte gemessen. Die Messung der genannten Regionen wurde für alle Tiere sowohl auf der Traumaseite als auch an den korrespondierenden corticalen Punkten bzw. der korrespondierenden subcorticalen Fläche der kontralateralen Seite durchgeführt. (Abb.5)

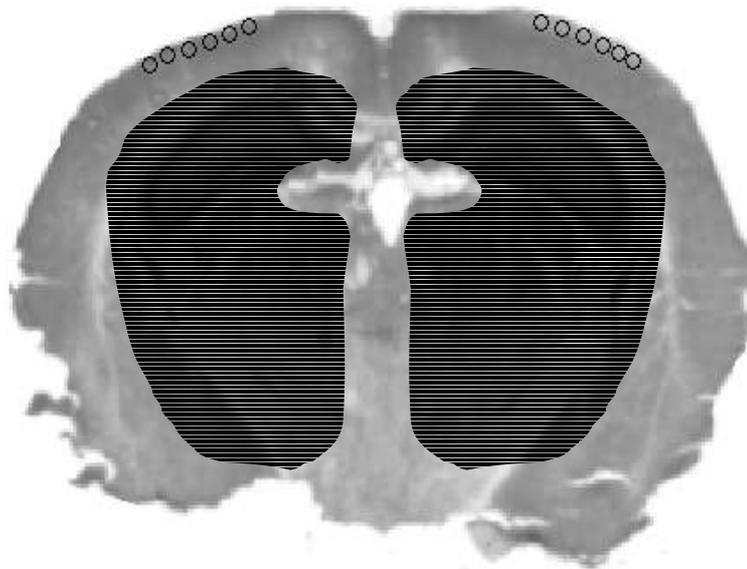


Abb.5 20µm Coronarschnitt mit eingezeichneten Meßpunkten cortical und markiertem subcorticalen Meßbereich der Traumaseite (rechts) und der kontralateralen Seite (links).

3.1.2 Traumamodell

Den Mäusen wurde ein Controlled-Cortical-Impact- Injury (CCI) durch einen computergesteuerten pneumatischen Impactor in der links-medialen parieto-temporalen Region zwischen Bregma und Lambda auf die intakte Dura mater erzeugt (LIGHTHALL 1988). Die Maus wurde in ein Stereotaxiegerät eingespannt, um eine Lageveränderung während der Traumaapplikation zu verhindern. Der Vorteil dieses Traumamodells liegt in der Tatsache, dass eine definierte Trefferfläche, eine meßbare, kontrollierbare Schlaggeschwindigkeit und eine reproduzierbare corticale Kompression verwendet werden. Daher erlaubt das CCI den Nachweis einer Korrelation zwischen dem Grad der Deformation und der resultierenden Pathologie und entstehenden funktionellen Defiziten (LIGHTHALL et al. 1989) (Abb. 6 und Abb. 7).

3.1.3 Untersuchungszeitpunkte nach dem Trauma

Nach einem Schädel-Hirn-Trauma entwickelt sich ein Hirnödem. Dieses Ödem besteht sowohl aus einer vasogenen, als auch aus einer zytotoxischen Komponente (BARZO et al. 1997, UNTERBERG et al. 1997). Untersuchungen zeigen einen zeitabhängigen Verlauf in der Entwicklung dieses Hirnödems. Die Entwicklung beginnt früh innerhalb von 1-6 Stunden nach Trauma und entwickelt sich 24 bis 48 Stunden nach dem Trauma bis zum Maximum aus (BAREYRE et al. 1997; VAN DEN BRINK et al. 1990, CHEN et al. 1996).

Dieser zeitliche Verlauf betrifft auch die metabolischen Veränderungen nach Trauma.

Um eine Dynamik der metabolischen Vorgänge und Veränderungen ermitteln zu können, wurden verschiedene Untersuchungszeitpunkte gewählt. Zur Erkennung früher Veränderun-

gen wurden die Zeitpunkte 15 Minuten und eine Stunde, um Spätveränderungen zu erkennen, die Zeitpunkte 24 und 48 Stunden nach Trauma gewählt. Andere Autoren weisen Veränderungen im cerebralen Stoffwechsel sogar bis mehrere Tage nach Schädel-Hirn-Trauma nach (ROBERTSON et al. 1988, SCHELP et al. 1995, SUTTON et al. 1994, McINTOSH et al. 1990).

3.1.4 Kontrollversuche

Das Hirnödem und die metabolischen Veränderungen nach Schädel-Hirn-Trauma können sich auch auf die kontralaterale Hemisphäre ausbreiten und dort zu Veränderungen des Energiestoffwechsels führen (BARTNIK et al. 2001, MAUTES et al. 2001). Auch histomorphologische Veränderungen können nach Schädel-Hirn-Trauma die kontralaterale Hemisphäre erreichen (SMITH et al. 1995, CHEN et al. 1996). Daher konnten die Werte der kontralateralen Hemisphäre nicht als Normalwerte gelten. Dies machte es notwendig, die kontralateralen Werte als eine eigene Untersuchungsgruppe zu betrachten.

Zur Ermittlung der Normalwerte wurden Sham-operierte Mäuse herangezogen.

3.1.5 Auswertungsmodell

Es gibt viele Modelle zur Untersuchung des Energiestoffwechsels. Viele dieser Modelle haben jedoch den Nachteil, dass die Art der Probengewinnung und die Untersuchung am Gewebehomogenat keine Aussagen über regionale Unterschiede verschiedener anatomischer Gebiete zulassen. Liegt der Auswertung des Metabolismus die Untersuchung eines Homogenates

aus Hirngewebe zugrunde, so ermittelt man immer nur einen Mittelwert aus einem anatomischen Gebiet bestimmter Größe (LOWRY und PASSONNEAU, 1972, MEINIG et al. 1978, PRASAD et al. 1994). Es bestehen jedoch innerhalb der verschiedenen anatomischen Gebiete schon unter physiologischen Bedingungen deutliche Unterschiede innerhalb des Metabolismus, wobei das Glia-Neuronen-Verhältnis eine wichtige Rolle spielt (SOKOLOFF et al. 1977, BOROWSKY und COLLINS , 1989). Bei den im Tiermodell kleinen Dimensionen ist eine sichere Entnahme der Gewebeprobe technisch anspruchsvoll und anfällig für methodische Unsicherheiten.

Dagegen erlaubt die Methode der Biolumineszenz, wie wir sie in unserer Untersuchung angewandt haben, die Detektion von Metaboliten innerhalb intakter definierter anatomischer Gebiete (PASCHEN 1985). PASCHEN konnte auch eine deutliche Korrelation zwischen der in der Biolumineszenz gemessenen optischen Dichte von Laktat bzw. Glucose und deren Konzentration im Gewebehomogenat nachweisen, mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,96$ für Glucose und $r = 0,92$ für Laktat. In unserem Laboratorium konnte ein Korrelationskoeffizient von $r = 0,964$ für ATP nachgewiesen werden.

3.2 Versuchsprotokoll

3.2.1 Präoperative Vorbereitung und Narkose

Die präoperative Narkose erfolgte mit Pentobarbital – Na in einer Dosierung von 6,5 mg/kg KG intraperitoneal. Dieses intraperitoneale Narkoseverfahren wurde 1988 von WAYNFORTH beschrieben.

Der Einfluß des gewählten Narkoseverfahrens auf den cerebralen Stoffwechsel darf bei der Interpretation der posttraumatischen Veränderungen nicht außer Acht gelassen werden.

In dieser Studie wurden die Tiere mit einer moderaten und ans individuelle Körpergewicht angepassten Barbituratdosis narkotisiert. Es ist daher anzunehmen, dass die Wirkung der Narkose auf den gemessenen cerebralen Metabolismus gering geblieben ist.

Nach Einleitung der Narkose wurde den Tieren eine Augenschutzsalbe appliziert, um eine Schädigung des Visus während der Operation zu verhindern.

Dann wurden die Tiere immobilisiert, indem sie in ein Stereotaxiegerät eingespannt wurden. Dieses war mit Ohrhauben anstatt Ohrstangen ausgestattet, um Frakturen der Schädelbasis bei der Induktion des Traumas zu verhindern.

3.2.2 Controlled-Cortical-Impact

Mit einem medianen Hautschnitt wurde die Kopfhaut eröffnet und die Schädelkalotte freipräpariert. Dann erhielten die Tiere ein mildes CCI - Trauma ohne Kraniotomie in der links medialen temporo-parietalen Region zwischen Bregma und Lambda durch einen Computer-gesteuerten pneumatischen Impactor (Cortical Impact Device, General Motors Research Laboratories, Abb.6 und Abb.7). Anschließend wurde die Wunde mit einer Hautnaht verschlossen, die Tiere aus der Apparatur entfernt und bis zur Erholung unter Beobachtung gehalten.

Bei den Mäusen, die ein repetitives Trauma erlitten, wurde die gleiche Prozedur 24 h nach dem ersten Trauma noch einmal wiederholt.

Bei den Tieren der Sham-Gruppe wurde eine Narkose durchgeführt, die Haut inzidiert und wieder vernäht, ohne Induktion ei-

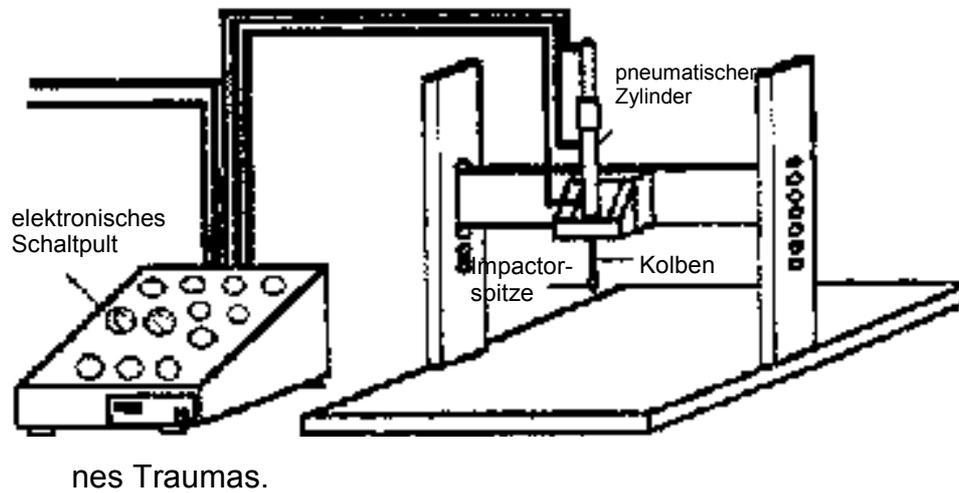


Abb.6 Elektronisch gesteuerter pneumatischer Impactor

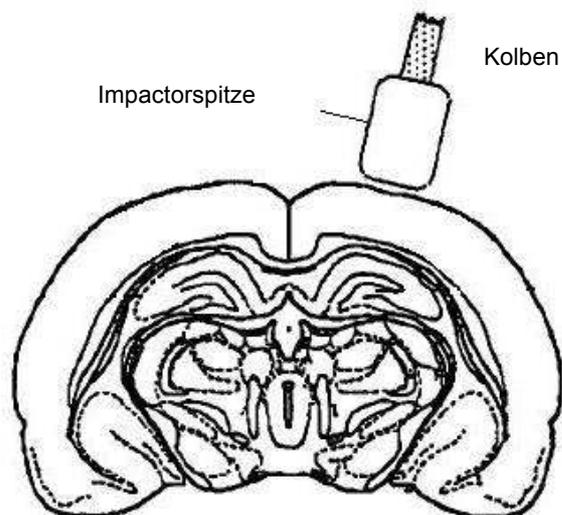


Abb.7 Platzierung und gewählte Seite des CCI

3.3 Biolumineszenzuntersuchung

3.3.1 In vivo Kryofixation

Der Sinn der in vivo Kryofixation liegt in der augenblicklichen Unterbrechung aller Lebens- und damit Stoffwechselfvorgänge. Dies ist notwendig, da im Falle einer Gewebeentnahme ohne Fixation alle Stoffwechselfvorgänge fort dauern und es dadurch zu einer Veränderung der zu untersuchenden Parametern kommen würde. Deshalb erfolgte vor Entnahme der Gehirne die in vivo Kryofixation in flüssigem Stickstoff. Zu diesem Zweck wurde die mediane Hautnaht am Schädel wiedereröffnet und die Kopfhaut mit Klammern an einem Ring befestigt, um ein Verrutschen des Schädels zu verhindern. Anschließend wurde 2 Minuten lang kontinuierlich flüssiger Stickstoff über den Schädel gegossen (PONTÉN et al. 1973, PASSONNEAU et al. 1980). Die Zeit von 2 Minuten ist notwendig, da sich beim Gießen ein Gefriergradient von den oberflächlichen zu den tiefen Strukturen entwickelt und die Gefriertemperatur erst nach einer gewissen Zeit die basalen Hirnstrukturen erreicht (PASSONNEAU et al. 1980). Unmittelbar danach erfolgte die Dekapitation. Der nun gefrorene Kopf wurde in toto bei -70°C in einer Tiefkühltruhe gelagert.

3.3.2 Präparation des Gewebes

Die Entnahme der Gehirne aus dem Schädel erfolgte in gefrorenem Zustand in einer Kühlkammer bei -20°C . Durch diese Temperatur und unter Zuhilfenahme von Trockeneis, um die Präparationsinstrumente zu kühlen, wurde ein Antauen der Gehirne und damit ein erneuter Beginn von Stoffwechselfvorgängen vermieden. Zunächst wurde Fell und Haut von der Muskulatur gelöst. Anschließend erfolgte das Lösen der Muskulatur vom Knochen. Dann wurde die Kalotte in Höhe des Bregmas eröffnet und der Schädelknochen Stück für Stück gelöst, ohne das Gehirn zu verletzen. Zuletzt wurden Groß- und Kleinhirn von der Schädelbasis gelöst und in einem Behälter wieder in der Truhe bei -70°C gelagert.

3.3.3 Herstellung der Gefrierschnitte

Ein Gehirn wurde zusammen mit dem Einbettmedium (Firma Jung) auf der Kleinhirnseite auf einen Metallzylinder aufgeblickt. Im Gefriermikrotom wurden bei -20°C $20\mu\text{m}$ dünne Coronarschnitte angefertigt. Die Erfahrung aus vorhergehenden Untersuchungen hat gezeigt, dass diese Schnittstärke sich als die günstigste zur vollständigen Beurteilung des Großhirns und zur Erfassung der Ödemzone erwiesen hat. Histologische Vorarbeiten zeigten pathologische Veränderungen am ehesten bei Bregma minus 2,0 bis Bregma minus 2,5 mm. Daher wurden die Schnittebenen von Bregma minus 3,5 mm bis 0,0 Bregma im jeweiligen Abstand von $500\mu\text{m}$ gewählt, um die Ödemausbreitung auch sicher zu erfassen. Die zur histologischen Färbung bestimmten Schnitte wurden auf Objektträger aufgezogen und auf einer Wärmeplatte 30 Minuten lang getrocknet. Die Methode der Färbung ist ausführlich im Anhang beschrieben. Die Gewebeschnitte für die Biolumineszenzfärbung wurden auf Deckgläser aufgezogen. Das bei der Enzymreaktion freiwerdende Licht unterliegt in dem dünneren Deckglas im Vergleich zu Objektträgerglas beim Durchdrin-

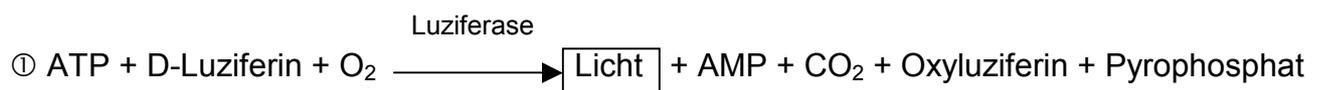
gen weniger Streuungseinflüssen. Das Ergebnis ist eine schärfere Abbildung auf dem Film (PASCHEN 1990).

3.3.4 Methode der Biolumineszenz

3.3.4.1 Biochemische Grundlagen

Die regionale Verteilung von ATP, Glucose und Laktat wurde in einer für jeden der drei Metabolite spezifischen Biolumineszenzreaktion erfasst. Es handelt sich hierbei um eine Kette von Redoxreaktionen, an deren Ende die Emission von Licht in Form von Photonen steht. Die Intensität des emittierten Lichtes, d.h. die Menge der emittierten Photonen hängt von der Stärke der ablaufenden Reaktion ab. Die bei den Reaktionen beteiligten Enzyme liegen im Überschuß vor. Daher ist die Reaktionsstärke allein von der Konzentration der Metaboliten ATP, Glucose und Laktat abhängig. Das Enzym, das die Biolumineszenzreaktion induziert, ist die Luziferase. Diese wird aus den Lumineszenzorganen der Feuerfliege (*Photinus pyralis*) gewonnen (KOGURE und ALONSO, 1978).

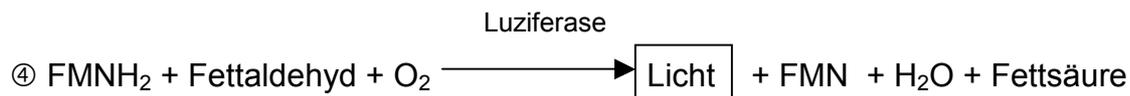
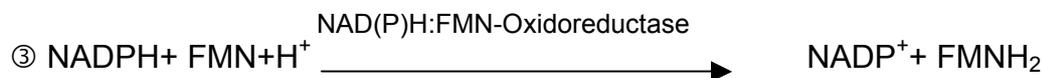
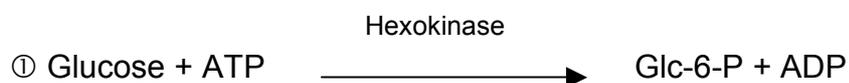
ATP-abhängige Biolumineszenz:



D-Luziferin wird unter Anwesenheit von Sauerstoff und Energie in Form von ATP zu Oxyluziferin oxidiert und es entstehen AMP, CO₂, Pyrophosphat und **LICHT**.

Glucose-abhängige Biolumineszenz:

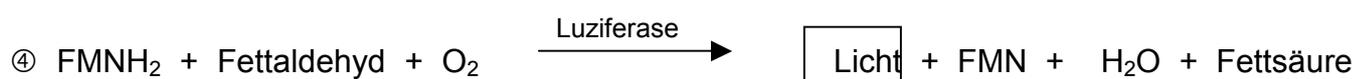
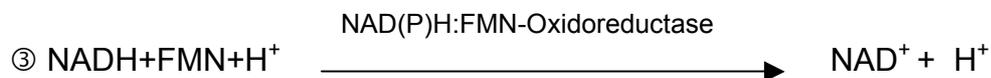
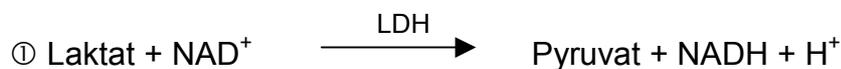
Sie erfolgt in 4 Schritten:



- 1) Glucose wird durch das Enzym Hexokinase zu Glucose-6-Phosphat (Glc-6-P) phosphoryliert
- 2) NADP^+ wird durch die Oxidation von Glc-6-P zu 6-Phospho-Gluconat (6-P-Gluconat) über das Enzym Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Glc-6-P-DH) gleichzeitig zu $\text{NADPH} + \text{H}^+$ reduziert
- 3) NADPH wird durch das Enzym NAD(P)H:FMN-Oxidoreductase oxidiert, wobei FMN gleichzeitig reduziert wird
- 4) Im letzten Schritt wird FMNH_2 durch das Enzym Luziferase, das anders als bei der ATP-abhängigen Biolumineszenz aus dem

Photobacterium Vibrio fischeri stammt (PASCHEN et al. 1981, PASCHEN et al. 1985), reoxidiert und es entstehen Wasser, eine Fettsäure und **LICHT**

Die Laktat-abhängige Biolumineszenz erfolgt ebenfalls in 4 Schritten:



- 1) Laktat wird durch die Laktatdehydrogenase (LDH) oxidiert, wobei NADH und Pyruvat entstehen
- 2) Bei der Reaktion ② handelt es sich um eine Hilfsreaktion. Durch die Entfernung von Pyruvat durch die Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) wird das Gleichgewicht wieder nach links verlagert.
- 3) FMN wird mit Hilfe von NADH aus Reaktion ① zu FMNH₂ reduziert, wobei das Enzym NAD(P)H:FMN-Oxidoreductase, das hier aus Vibrio fischeri stammt, katalysiert.

- 4) Im letzten Schritt wird FMNH₂ mit Hilfe des Enzyms Luziferase oxidiert und es entstehen FMN, Wasser, eine Fettsäure und **LICHT**

3.3.4.2 Transport der Gewebeschnitte

Um der Gefahr zu entgehen, dass die Gewebeschnitte auf dem Transport in die Dunkelkammer auftauen, wurden sie in einem speziellen, mit flüssigem Stickstoff gefüllten, Isolierbehälter transportiert. Durch ein Auftauen würden die Konzentrationen der Metabolite verändert und damit die Meßergebnisse der anschließenden Biolumineszenz-Reaktion verfälscht.

3.3.4.3 Gefriertrocknen der Gewebeschnitte

Die angefertigten Gewebeschnitte enthalten noch Wasser. Dies würde den Reaktionsablauf bei der Biolumineszenz erheblich behindern. Um dieses Problem zu umgehen, wird den Schnitten vor der Biolumineszenz das Wasser entzogen. Hierzu werden die Schnitte 24 h in einem Gefriertrockner bei -30°C gelagert. Anschließend können die gefriergetrockneten Schnitte, die nun an ihrer weißen Farbe zu erkennen sind, ohne Bedenken für die Biolumineszenz verwendet werden.

3.3.4.4 Hitzedenaturierung

Die Gewebeschnitte enthalten noch die im Gewebe gelösten physiologischen Enzyme. Diese könnten mit den zu bestimmenden Metaboliten reagieren, diese verbrauchen und daher zu einer abge-

schwächten Biolumineszenzreaktion führen. Daher wurden die Schnitte für Glucose und Laktat in einem Inkubator für 5 Minuten bei etwa 110°C erhitzt, dadurch die im Schnitt enthaltenen Enzyme denaturiert und somit inaktiviert. Durch die sehr kurze Zeit der Erhitzung ist der Verlust an Substrat als unwesentlich zu betrachten. Die ATP-Schnitte wurden nicht inkubiert. NACIMIENTO zeigte 1988 an Rückenmarksversuchen der Ratte, dass die fehlende Hitzedenaturierung bei diesem Metaboliten keinen negativen Einfluß auf die folgende Biolumineszenz hat.

3.3.4.5 Vorbereitung der Biolumineszenzreaktion

Um die Reaktion unter optimalen Bedingungen ablaufen zu lassen, d.h. um zu gewährleisten, dass nur die Konzentrationen der Metaboliten ATP, Glucose und Laktat für die Stärke der ablaufenden Reaktion entscheidend sind, wurden die Gewebeschnitte vollständig und gleichmäßig mit einer 60µm dicken Scheibe der jeweiligen Enzymlösung bedeckt. Die Enzymlösungen wurden zuvor nach den im Anhang beschriebenen definierten Anleitungen hergestellt, zu einer Blockform gegossen und bei -70°C tiefgefroren. Die Bedeckung der Gewebeschnitte mit dem Enzymschnitt wurde im Gefriermikrotom durchgeführt. Die Reaktion zwischen Enzym und Metabolit ist temperaturabhängig, d.h. sie wird erst bei Erreichen von Zimmertemperatur in Gang gesetzt, so dass bei der Temperatur von -20°C im Mikrotom eine vorzeitige Reaktion zwischen Enzym und Metabolit verhindert wird. Nach der Herstellung des Gewebe-Enzymschnittes wurde dieser in einem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Isolierbehälter in die Dunkelkammer transportiert. Auch so wurde die vorzeitige enzymatische Reaktion während des Transportes verhindert.

3.3.4.6 Belichtung der Filme

In der Dunkelkammer wurden die Deckgläser aus der Isolierbox genommen und mit der Rückseite kurz auf dem Handrücken erwärmt. Dadurch wird ein gleichmäßiges Einsetzen der Reaktion erreicht. Dann wurden die Deckgläser leicht auf einen photographischen Film (AGFA Agfapan APX 100) gedrückt. Um bei der späteren Entwicklung eine Verwechslung der Filme zu vermeiden, wurden die mit Glucose belichteten Filme an der rechten oberen Ecke einmal, die mit Laktat belichteten Filme zweimal und die mit ATP belichteten Filme nicht eingeschnitten. Während die Deckgläser auf die Filme gedrückt werden, tauen Gewebe- und Enzymschnitt unter der Raumtemperatur auf, die Enzymlösung durchdringt das Gewebe und die Biolumineszenzreaktion beginnt. Das frei werdende Licht führt zu einer Schwärzung des unter dem Objektträger liegenden Filmes (Abb. 8). Als optimale Belichtungszeiten konnten NACIMIENTO et al. (1988) 30 Sekunden für ATP und 5 Minuten für Glucose und Laktat festlegen.

BIOLUMINESZENZ-TECHNIK

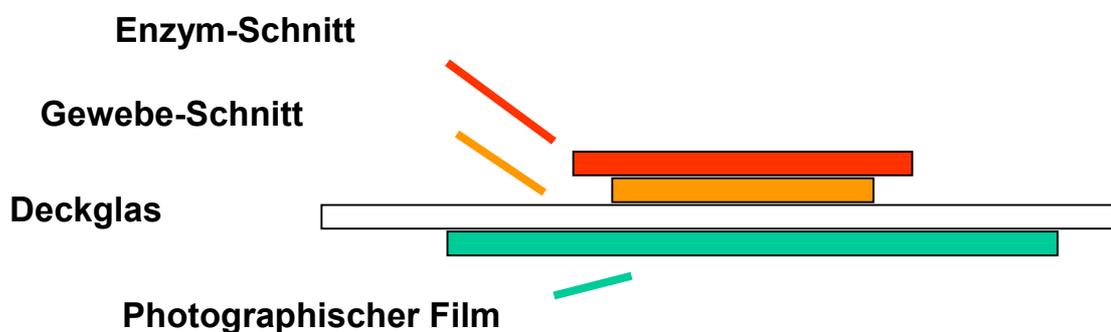


Abb.8 Methode der Biolumineszenz

3.3.4.7 Entwicklung der Filme

Die belichteten Filme wurden in der Dunkelkammer 6 Minuten lang in einer 4% Lösung Entwicklerkonzentrat (AGFA Rodinal) in Leitungswasser entwickelt. Danach wurden sie 1 Minute lang in Leitungswasser gespült, bevor sie 7 Minuten lang in einer 12,5% Lösung Fixierkonzentrat (Tetenal Superfix) in Leitungswasser fixiert wurden. Um ein Aneinanderkleben der Filme und damit die Entstehung von Artefakten bei der Entwicklung und Fixierung zu verhindern, womit die Auswertung erschwert würde, wurden die Filme einzeln in den Lösungen geschwenkt. Danach folgte eine 30-minütige Spülzeit unter fließendem Leitungswasser. Anschließend wurden die Filme kurz in Aqua destillata geschwenkt und über 12 Stunden an der Luft getrocknet.

3.3.4.8 Standardisierung

Um eine Standardisierung dieser Methode zu erreichen, müssen die Belichtungszeiten für die Metaboliten und die Mischungsvorschriften für die Enzymlösungen exakt eingehalten werden.

Die Stärke des Traumas beim Controlled Cortical Impact ist abhängig von der Auftreffgeschwindigkeit des Stempels, des gewählten Stempeldurchmessers und der eingestellten corticalen Contusionstiefe.

Bei allen Versuchsvorgängen im Rahmen der Biolumineszenz ist auf eine konstante Umgebungstemperatur zu achten, um Kondensati-

onsartefakte zu vermeiden und ein Antauen der Schnitte und damit einen Beginn von Stoffwechselfvorgängen zu verhindern.

3.4 Auswertung

3.4.1 Zuordnung der Biolumineszenzfilme

SOKOLOFF et al. (1977), BOROWSKI und COLLINS (1989) haben gezeigt, dass die Stoffwechseleränderungen von biochemischen und strukturellen Besonderheiten abhängig und je nach den anatomischen Gebieten unterschiedlich sind. Daher ist es für die statistische Auswertung unbedingt notwendig, die gleichen anatomischen Hirnregionen der einzelnen Schnitte zu erfassen und zu messen. Zu diesem Zweck wurde die Lage der histologischen Schnitte im Gehirn anhand eines anatomischen Atlanten des Gehirns der Maus zugeordnet (FRANKLIN und PAXINOS). Da die histologischen Schnitte aus den gleichen Hirnregionen stammen wie die Gewebeschnitte für die Biolumineszenzreaktion, konnte die Zuordnung der Hirnregion der histologischen Schnitte auf die belichteten Biolumineszenzfilme übertragen werden.

3.4.2 Auswertung der Biolumineszenzfilme

Die Auswertung der Biolumineszenzfilme erfolgte mittels computer-gestützter Densitometrie. Die Filme wurden auf einen Scanner (Epson GT 9000) gelegt, der die Filme in ein Bildbearbeitungsprogramm (Image Pro Plus 4.0) überträgt. Verschiedene Helligkeitsstufen des vom Computer erfassten Bildes werden in Grauwerten wiedergege-

ben (Abb.9). Die Grauwerte des Computerbildes wurden mit Hilfe des im ANHANG aufgeführten mathematischen Verknüpfung in die optische Dichte umgerechnet und im Ergebnisteil als solche angegeben.

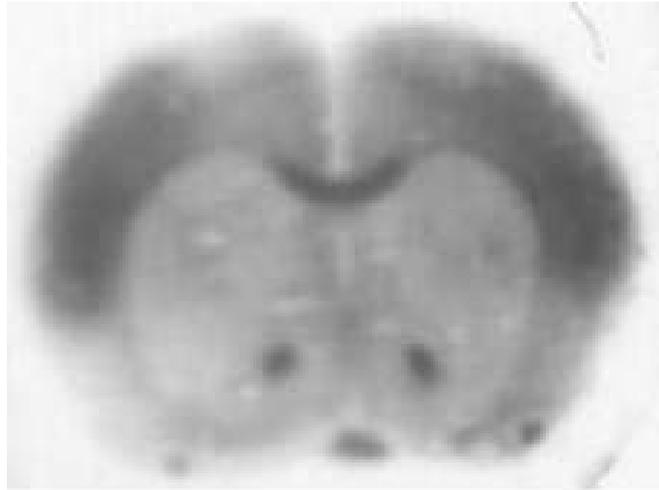


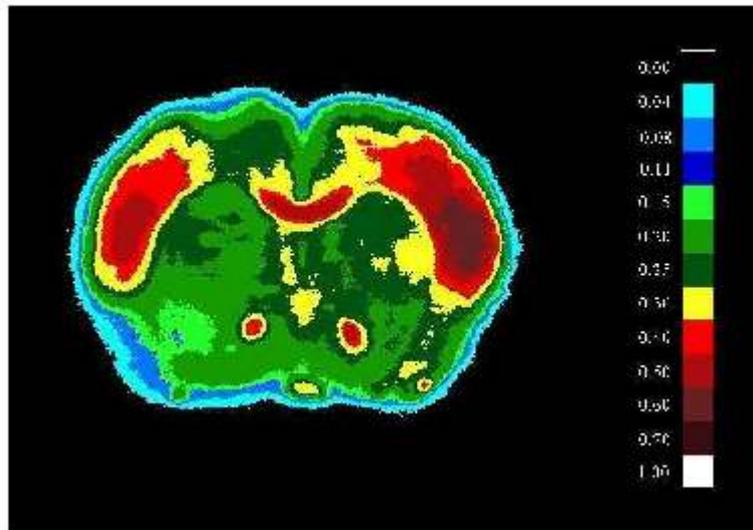
Abb.9 Natives Biolumineszenzbild

Dabei ist die optische Dichte der negativ dekadische Logarithmus des Quotienten aus dem Grauwert und dem Referenzwert. Der Referenzwert wurde für jeden Film individuell als Mittelwert der Grauwerte in den vier Ecken desselben ermittelt. Diese Maßnahme war notwendig, da das Material der einzelnen Filme nicht einheitlich lichtdurchlässig ist und ein korrektes Vorgehen deshalb die Einbeziehung der Lichtabsorption durch den Film als Referenzwert verlangt.

Die Erfassung der Werte erfolgte durch Messung einer runden Fläche. Mit Hilfe des Computers wurden die Meßwerte aller der in dieser Meßfläche liegenden Pixel zu einem Wert gemittelt.

Die corticalen Meßpunkte wurden mittels des histologischen Schnittes und der darauf erkennbaren Ödemzone (Abb. 4) festgelegt; da an den Gefrierschnitten eine genaue Differenzierung von subcorticalen Strukturen nur sehr schwer möglich ist, wurde zur Messung die gesamte subcorticale Region in ihrer optischen Dichte gemessen

(Abb.5). Die Messung der genannten Region wurde für alle Tiere sowohl auf der Traumaseite als auch an den korrespondierenden Punkten der kontralateralen Seite durchgeführt. Für jeden Schnitt wurde das histologische Bild halbtransparent über den zu messenden Schnitt projiziert und so die jeweiligen Meßpunkte ermittelt. Die-



se Vorgehensweise ermöglichte die Messung der gleichen corticalen und subcorticalen Hirnregion in allen Schnitten. Für eine bessere graphische Darstellung der Metabolitenverteilung im jeweiligen Schnitt wurde die Grauwertskala falschfarbkodiert (Abb.10).

Abb. 10 Falschfarbkodiertes Bild eines nativen Biolumineszenzbildes. Rechts die Farbskala; die optische Dichte des jeweiligen Metaboliten nimmt von blau nach rot hin zu.

3.5 Fehlerquellen

1. Während der gesamten Versuchsdauer der Traumaapplikation muß auf eine ausreichende Spontanatmung der Tiere geachtet und die Atemwege freigehalten werden, um eine suffiziente Oxygenierung des Blutes und damit Sauerstoffversorgung des Gehirns zu gewährleisten. Denn eine Störung der Ventilation

kann zu einer nicht überschaubaren Beeinflussung der zu messenden Stoffwechselabläufe führen und muß deshalb zu einem Ausschluß aus der Versuchsreihe führen. Auch muß auf eine gleichmäßige Körpertemperatur der Versuchstiere geachtet werden, da Hypothermie oder Hyperthermie durch eine Beeinflussung von enzymatischen Vorgängen eine Beeinträchtigung des Metabolismus zur Folge haben.

2. Bei der Applikation des Traumas ist auf die Einhaltung der standardisierten Bedingungen, die für diese Versuchsreihe festgelegt wurden, unbedingt zu achten. Veränderungen dieser Bedingungen führen zu unterschiedlicher Traumastärke, wodurch eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse unmöglich wird.
3. Beim Gefrieren in situ in flüssigen Stickstoff ist unbedingt darauf zu achten, dass der Schädel während der ganzen Zeit gleichmäßig und vollständig mit Stickstoff bedeckt ist, denn nur so kann ein gleichmäßiges und rasches Einfrieren, und damit das Beenden der Stoffwechselvorgänge erfolgen. Auch muß unbedingt darauf geachtet werden, die notwendige Zeit von 2 Minuten kontinuierlichen Bedeckens mit flüssigem Stickstoff einzuhalten, ansonsten könnten basale Hirnstrukturen noch nicht ausreichend fixiert sein.
4. Beim Herauspräparieren der Gehirne aus dem Schädel sollten Verletzungen des Gehirns vermieden werden. Durch Verletzungen könnten Strukturen, die für die Auswertung herangezogen werden, zerstört und somit eine Auswertung am entsprechenden Gehirn unmöglich werden.
5. Vor dem Anfertigen der seriellen Gewebeschnitte im Kryostat muß überprüft werden, ob das zu schneidende Gehirn auch ordnungsgemäß tiefgefroren, oder ob es möglicherweise ange-taut war. Besteht der Verdacht, dass das Gehirn angetaut war,

so muß es verworfen werden, da man davon ausgehen muß, dass in dieser Zeit bereits Stoffwechselfvorgänge stattgefunden haben und die Messergebnisse verfälschen. Ein angetautes und wieder gefrorenes Gehirn erkennt man an einer rötlichen, glasigen Verfärbung im Sinne einer Nekrose, wogegen die korrekt gefrorenen Gehirne eine weiße Farbe besitzen.

6. Beim Anfertigen der Gewebeschnitte im Kryostat ist auf eine optimale Temperatur zu achten. Eine zu hohe Temperatur kann zum Antauen des Gewebes und damit zu einem ungewollten Einsetzen von Stoffwechselfvorgängen führen, was die Ergebnisse verfälschen würde. Eine zu niedrige Temperatur könnte zu Einrissen im Gewebe führen, wodurch die Auswertung der Biolumineszenz erschwert wäre. Die optimale Temperatur liegt hier bei -20°C .
7. Waren Gewebeschnitte gestaucht oder gedehnt oder klappten Bereiche der Schnitte beim Schneiden übereinander, so wurden diese Schnitte verworfen, da die dadurch veränderte Gewebedichte die Stärke der Biolumineszenzreaktion beeinträchtigt und so zu Verfälschungen des Ergebnisses führt.
8. Auch angetaute Gewebeschnitte, die man an ihrer milchig-trüben Verfärbung erkennt, müssen aus der Versuchsreihe ausgeschlossen werden, da die Gefahr bereits ungewollt abgelaufener Stoffwechselprozesse zu groß ist und das Versuchsergebnis nicht mehr verwertbar wäre.
9. Bei der Herstellung der Enzymblöcke ist auf das exakte Einhalten eines konstanten pH-Wertes zu achten, da die verwendeten Enzyme ein für ihre Wirkung notwendiges pH-Optimum besitzen und der pH-Wert somit einen entscheidenden Einfluß auf die Biolumineszenzreaktion hat.

10. Die Gewebeschnitte müssen gleichmäßig und vollständig von den Enzymschnitten bedeckt werden, da nur so ein exaktes und vollständiges Bild über den zu messenden Metabolismus abgebildet werden kann.
11. Die Belichtungszeiten der einzelnen Metabolite müssen eingehalten werden, um eine Standardisierung zu erreichen. Erfolgt eine zu lange bzw. zu kurze Belichtung, so kann der falsche Eindruck und die fehlerhafte Auswertung einer zu starken bzw. zu schwachen Biolumineszenzreaktion entstehen.
12. Die leichte gleichmäßige Erwärmung des Enzym-Gewebe-Blockes auf dem Handrücken vor der Belichtung ist notwendig, um ein gleichmäßiges Einsetzen der Biolumineszenz zu erreichen. Erfolgt die Erwärmung ungleichmäßig, so beginnt die Reaktion nicht an allen Stellen gleichzeitig, was v.a. bei der kurzen Belichtungszeit von 30 Sekunden bei ATP zu Fehlern in der Abbildung führen kann.
13. Beim Aufsetzen der Enzymschnitte auf die Gewebeschnitte und während der Biolumineszenzreaktion besteht die Gefahr der Blasenbildung zwischen Enzym- und Gewebeschnitt. In diesen Regionen ist eine Auswertung unmöglich und diese Schnitte sind unter Umständen nicht zu verwerten.
14. Werden beim Belichten der Filme die Deckgläser zu zart auf den Film gedrückt, oder verrutscht das Deckglas während der Belichtung unbemerkt, kommt es zu Streueffekten mit einer unscharfen Abbildung oder die beiden Positionen des Schnittes vor und nach dem Verrutschen sind übereinander belichtet, so dass der Film unbrauchbar wird.

15. Bei der Entwicklung der Filme muß unbedingt darauf geachtet werden, dass die Filme ständig in der Entwicklerlösung bewegt werden, um ein Aneinanderkleben zu vermeiden. Kleben zwei Filme aufeinander, wird die Stelle, auf der die beiden Filme aufeinanderliegen, nicht entwickelt, und der Film kann unbrauchbar werden.
16. Beim Einscannen ist unbedingt darauf zu achten, dass der Film mit der richtigen Seite auf die Scannerplatte gelegt wird, sonst werden Trauma- und kontralaterale Seite vertauscht und die Meßergebnisse werden verfälscht.

3.6 Verarbeitung und Statistische Auswertung der Daten

Die optische Dichte als negativ dekadischer Logarithmus des Grauwertes in Abhängigkeit vom Referenzwert wurde mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogramms Image Pro Plus 4.0 computergestützt gemessen, tabellarisch erfasst und für die statistische Verarbeitung vorbereitet. Für jedes Gehirn wurden für jeden Metaboliten der qualitativ beste Schnitt verwendet. Dann wurde die zu messende Region durch Projektion des histologischen Bildes (Abb. 4) über den zu messenden Schnitt bestimmt und die jeweils corticalen 6 Meßpunkte und die subcorticale Meßregion auf der Trauma- und kontralateralen Seite platziert (Abb.5).

Die 6 Werte für die optische Dichte der corticalen und der subcorticalen Meßpunkte wurden dann für jeden Metaboliten zu den entsprechenden Zeitpunkten zu je einem Wert gemittelt. Um Veränderungen im Metabolismus darstellen zu können, wurden diese Meßpunkte mit den korrelierenden Meßpunkten der entsprechenden Sham-Tiere verglichen. Die Überprüfung der Unterschiede zwischen Traumaseite bzw. kontralateraler Seite und den Sham-Tieren erfolgte mit dem t-Test für unabhängige Stichproben. Das Signifikanzniveau wurde auf $p \leq 0,05$ festgelegt. In der graphischen Dar-

stellung der Ergebnisse wurden die Mittelwerte der Meßergebnisse, sowie die jeweilige Standardabweichung (SEM) verwendet.

4. ERGEBNISSE

4.1 Doppeltes Schädel-Hirn-Trauma

4.1.1 ATP

Cortical:

Zeitlicher Verlauf

Die optische Dichte von ATP zeigt posttraumatisch bilateral tendentiell die gleiche Entwicklung. Zum Zeitpunkt 15 Minuten nach repetitivem CCI sieht man eine Abnahme der optischen Dichte gegenüber Sham. 1 Stunde nach Trauma kommt es bilateral zu einem leichten Anstieg. Nach 24 Stunden kommt es zu einem deutlichen Abfall der optischen Dichte bis zum Signifikanzniveau im Vergleich zu Sham und nach 48 Stunden zu einem bilateralen Wiederanstieg bis nahezu zum Sham-Niveau (Abb. 11).

Das Ausmaß der Veränderungen ist ipsilateral leicht betont.

Es ist zu keinem der gemessenen Zeitpunkte ein signifikanter Unterschied zwischen ipsilateraler und kontralateraler Seite zu erkennen.

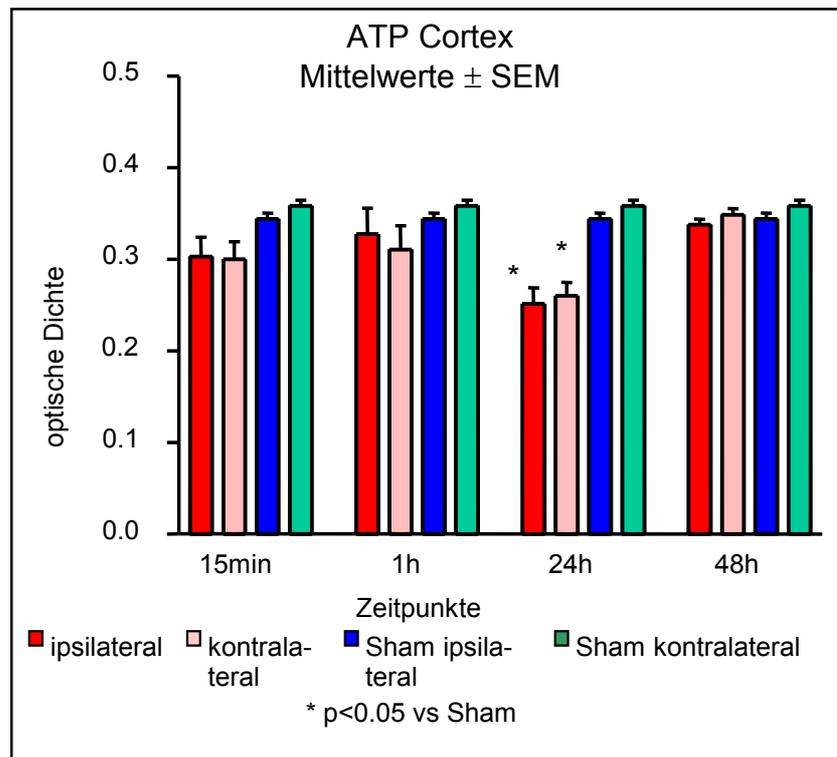


Abb. 11: Darstellung der optischen Dichte von ATP im Gebiet Cortex bilateral zu den verschiedenen Zeitpunkten nach repetitivem CCI.

Subcortical:

Zeitlicher Verlauf:

Die optische Dichte von ATP zeigt posttraumatisch bilateral tendentiell die gleiche Entwicklung. 15 Minuten posttraumatisch sieht man eine Abnahme der optischen Dichte gegenüber Sham, die bis 24 Stunden anhält. Zu diesem Zeitpunkt wird auch das Minimum erreicht, allerdings ohne das Signifikanzniveau zu erlangen. Danach bilateraler Wiederanstieg der optischen Dichte bis nahezu Ausgangsniveau bei 48 Stunden (Abb. 12).

Es ist zu keinem der gemessenen Zeitpunkte ein signifikanter Unterschied zwischen ipsilateraler und kontralateraler Seite zu erkennen.

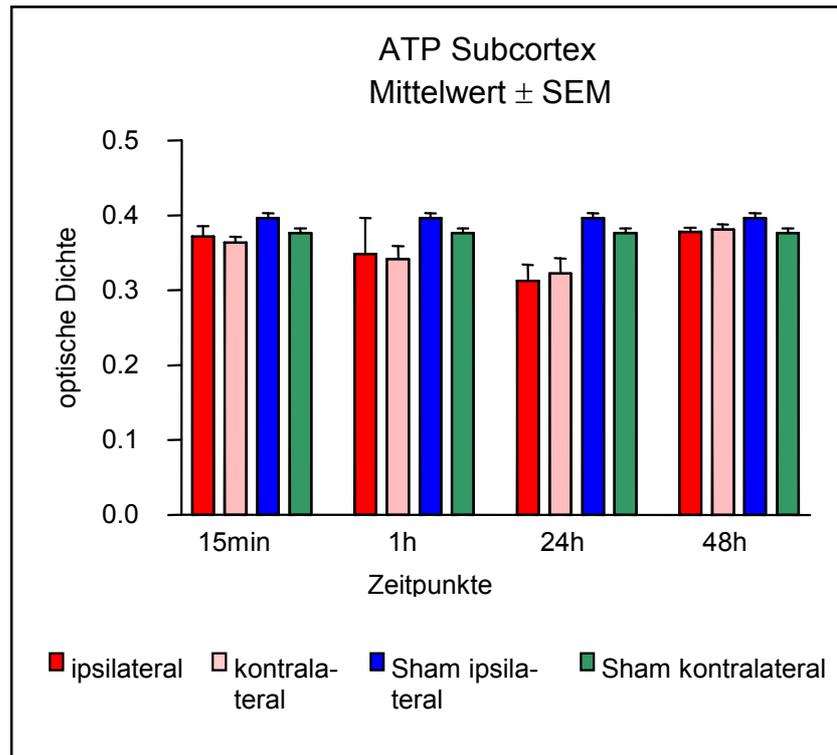


Abb. 12: Darstellung der optischen Dichte von ATP im Gebiet Subcortex bilateral zu den verschiedenen Zeitpunkten nach repetitivem CCI.

Vergleich zwischen corticalem und subcorticalem Areal:

Die posttraumatischen Veränderungen verhalten sich cortical und subcortical tendentiell gleich.

Die subcorticalen Meßergebnisse der optischen Dichte von ATP zeigen zu allen Zeitpunkten etwas höhere Werte als in den cortical gemessenen Bereichen. Den geringsten Unterschied zwischen bei-

den Meßbereichen erkennt man zum Zeitpunkt 1 Stunde nach Trauma.

Nach 24 Stunden erkennt man die größte Differenz in der optischen Dichte von ATP zwischen Cortex und Subcortex, ohne jedoch Signifikanz zu erreichen. Nach 48 Stunden steigt die optische Dichte subcortical und cortical wieder an und nähert sich einander wieder an (Abb.13).

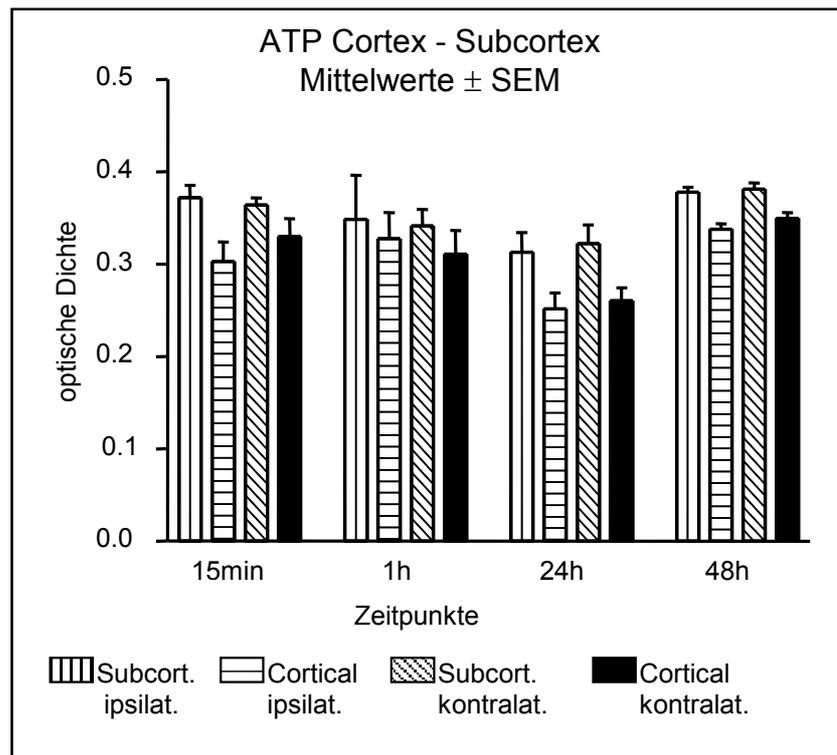


Abb. 13: Darstellung der optischen Dichte von ATP im Gebiet Cortex und Subcortex bilateral zu den verschiedenen Zeitpunkten nach repetitivem CCI.

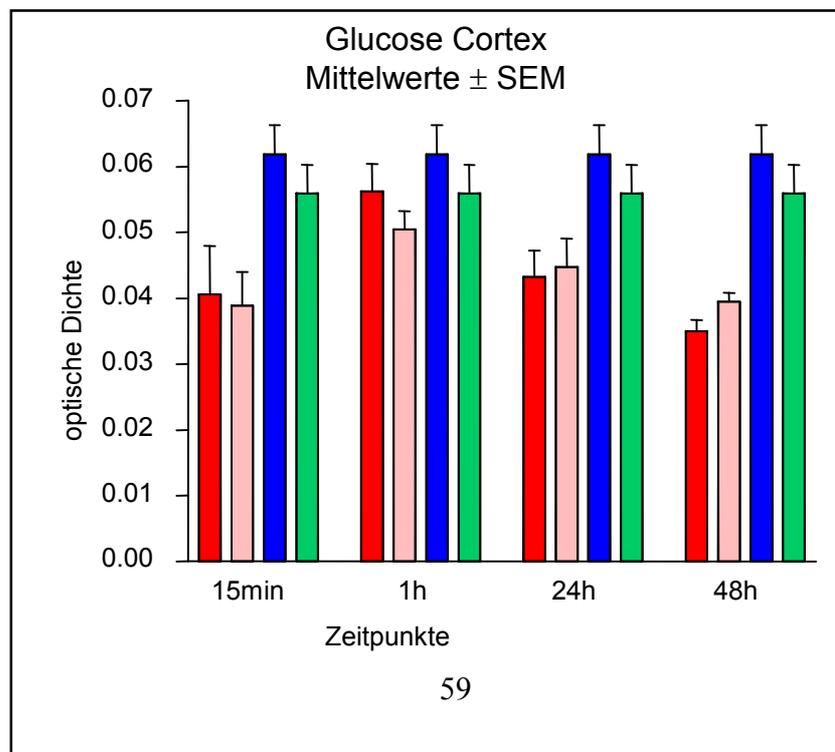
4.1.2 Glucose

Cortical:

Zeitlicher Verlauf

Tendentiell zeigt die optische Dichte von Glucose bilateral die gleichen Veränderungen. Nach 15 Minuten erkennt man eine Abnahme der optischen Dichte gegenüber Sham. 1 Stunde nach Trauma kommt es bilateral zu einem leichten Anstieg der optischen Dichte. Nach 24 Stunden erneuter Abfall der optischen Dichte bis zum Zeitpunkt 48 Stunden, ohne jedoch das Signifikanzniveau zu erreichen. (Abb.14).

Es lässt sich zu keinem gemessenen Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen ipsilateraler und kontralateraler Hemisphäre bestimmen.



■ ipsilateral □ kontralateral ■ Sham ipsilateral ■ Sham kontralateral

Abb. 14: Darstellung der optischen Dichte im Gebiet Cortex bilateral zu den verschiedenen Zeitpunkten nach repetitivem CCI.

Subcortical:

Zeitlicher Verlauf:

Man erkennt bilateral ähnliche posttraumatische Veränderungen der optischen Dichte von Glucose. Nach 15 Minuten erkennt man ipsilateral gegenüber der Sham-Gruppe keine Veränderung der optischen Dichte, allerdings kann man kontralateral einen leichten Abfall der optischen Dichte unter das Sham-Niveau erkennen.

Danach folgt bilateral eine Zunahme der optischen Dichte bis eine Stunde. Wiederum Abfall der optischen Dichte nach 24 Stunden bis 48 Stunden. Zu diesem Zeitpunkt wird auch das Minimum der optischen Dichte im Vergleich zu Sham erreicht, jedoch ohne Signifikanz. Die Veränderungen sind ipsilateral und kontralateral etwa gleich stark ausgeprägt.

Es läßt sich allerdings zu keinem der Meßzeitpunkte ein signifikanter Unterschied zwischen ipsilateraler und kontralateraler Hemisphäre bestimmen (Abb.15).

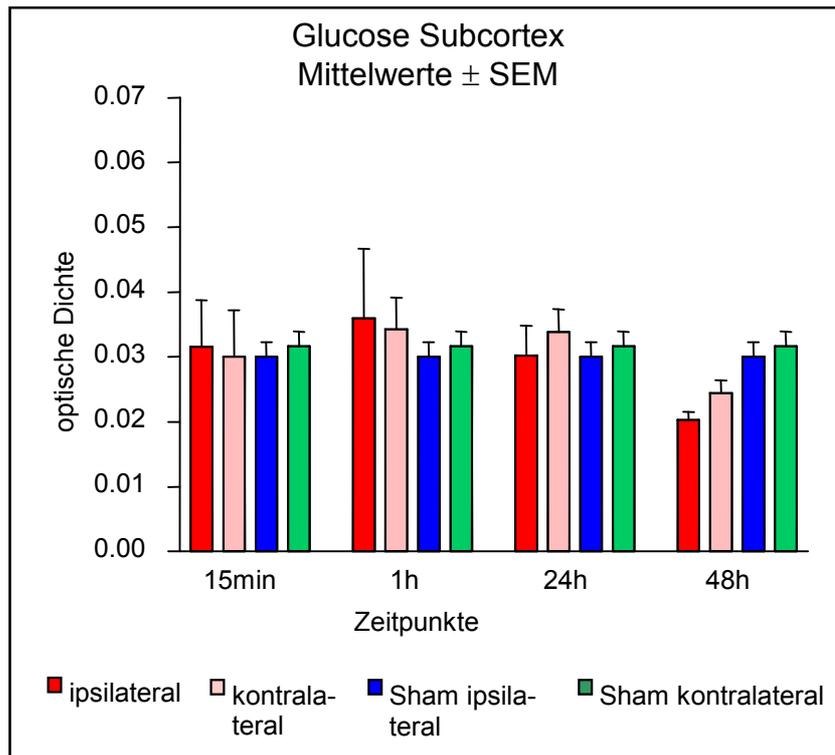


Abb. 15: Darstellung der optischen Dichte von Glucose im Gebiet Subcortex bilateral zu den verschiedenen Zeitpunkten nach repetitivem CCI.

Vergleich zwischen corticalem und subcorticalem Areal:

Die Veränderungen der posttraumatischen Werte der optischen Dichte von Glucose im corticalen und subcorticalen Meßbereich zeigen ähnliche Veränderungen.

Die corticalen Meßergebnisse der optischen Dichte von Glucose zeigen zu allen Zeitpunkten etwas höhere Werte als in den subcortical gemessenen Bereichen.

1 Stunde posttraumatisch steigt bilateral die optische Dichte an, cortical etwas stärker als subcortical, jedoch ohne signifikanten Unterschied. Nach 24 Stunden fällt beidseits die gemessene optische Dichte wieder ab, cortical etwas stärker als subcortical, so daß sich die gemessenen Werte der optischen Dichte wieder etwas einander annähern. Bis 48 Stunden posttraumatisch erkennt man einen weiteren bilateralen Abfall der optischen Dichte. Der Abfall fällt im subcorticalen Areal stärker aus als im corticalen Meßgebiet, so daß sich der Unterschied zwischen Cortex und Subcortex wieder vergrößert. Zu diesem Zeitpunkt kann bilateral auch eine signifikant höhere optische Dichte cortical im Vergleich zum subcorticalen Gebiet gemessen werden (Abb.16).

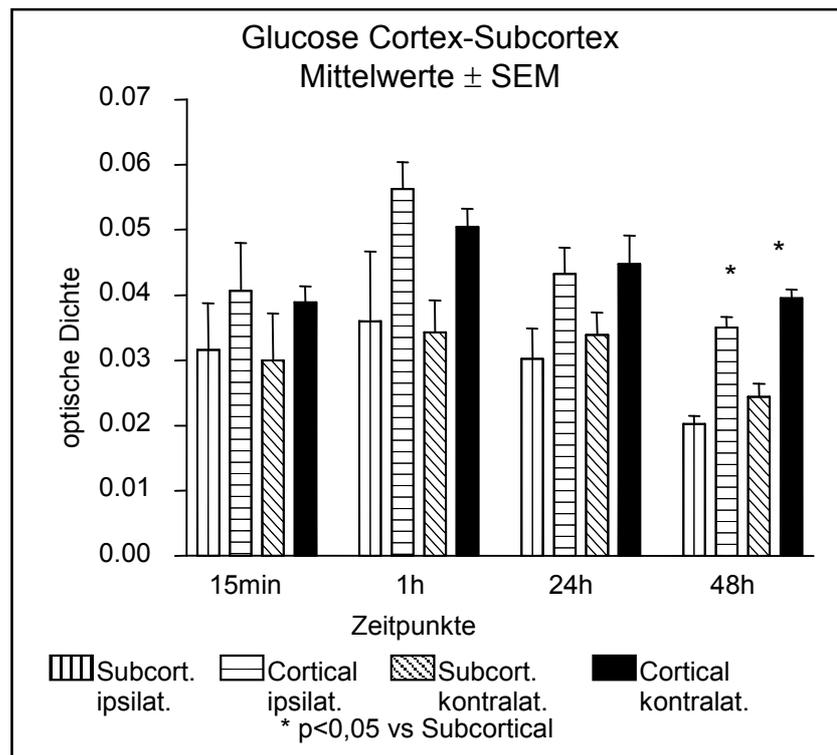


Abb. 16: Darstellung der optischen Dichte von Glucose im Gebiet Cortex und Subcortex bilateral zu den verschiedenen Zeitpunkten nach repetitivem CCI.

4.1.3 Laktat

Cortical:

Zeitlicher Verlauf

Die Veränderungen der optischen Dichte von Laktat im Vergleich zu Sham zeigen in beiden Hemisphären eine unterschiedliche Verlaufsform. Nach 15 Minuten kommt es ipsilateral zu einer deutlichen Zunahme der optischen Dichte von Laktat gegenüber Sham und erreicht statistische Signifikanz, die bis 1 Stunde noch deutlicher zunimmt. Nach 24 Stunden jedoch nimmt die optische Dichte von Laktat deutlich ab, es wird jedoch keine Signifikanz erreicht. Nach 48 Stunden Wiederanstieg. Kontralateral findet sich nach 15 Minuten eine erniedrigte optische Dichte, die nach einer Stunde über das Sham-Niveau bis zur Signifikanz wieder ansteigt. Nach 24 Stunden Abfall unter das Sham-Niveau ohne Signifikanz und nach 48 Stunden ein Wiederanstieg über das Sham-Niveau (Abb. 17).

Es wird zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Hemisphären erreicht.

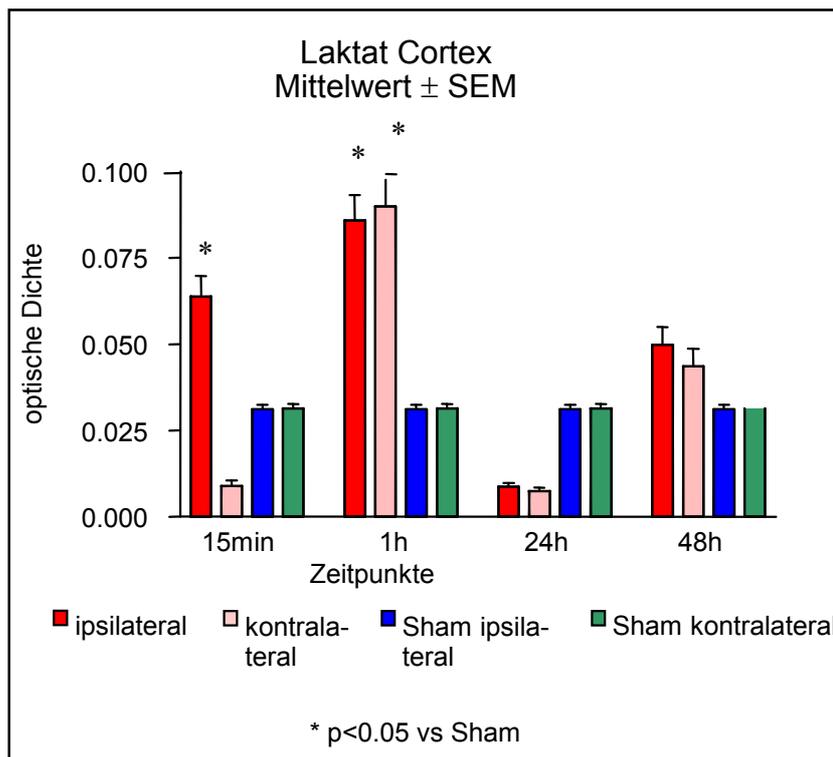


Abb. 17: Darstellung der optischen Dichte von Laktat im Gebiet Cortex bilateral zu den verschiedenen Zeitpunkten nach repetitivem CCI.

Subcortical:

Zeitlicher Verlauf:

Die posttraumatischen Veränderungen der optischen Dichte von Laktat zeigen bilateral eine ähnliche Entwicklung. Nach 15 Minuten kommt es zu einem leichten Abfall gegenüber der Sham-Gruppe, ohne Signifikanzniveau zu erreichen. Danach steigt die optische Dichte von Laktat wieder über das Niveau der Sham-Gruppe, ohne Signifikanz zu erreichen. Nach 24 Stunden erkennt man bilateral eine

Abnahme der optischen Dichte von Laktat unter das Niveau der Sham-Gruppe, die ipsilateral Signifikanz erreicht. Nach 48 Stunden kommt es bilateral zu einem leichten Anstieg der optischen Dichte, die allerdings unter dem Sham-Niveau und ipsilateral signifikant bleibt. Allerdings lässt sich zu keinem der Meßzeitpunkte ein signifikanter Unterschied zwischen ipsilateraler und kontralateraler Hemisphäre bestimmen (Abb. 18).

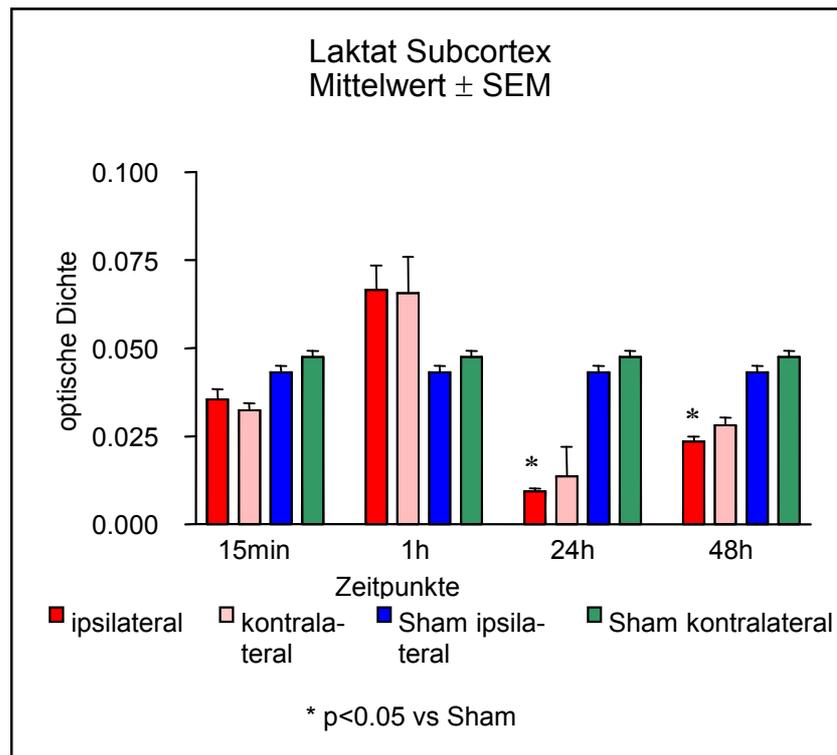


Abb. 18: Darstellung der optischen Dichte von Laktat im Gebiet Subcortex bilateral zu den verschiedenen Zeitpunkten nach repetitivem CCI.

Vergleich zwischen corticalem und subcorticalem Areal:

Die Veränderungen der posttraumatischen Werte von Laktat im corticalen und subcorticalen Meßbereich zeigen tendentiell die gleichen Veränderungen.

Die corticalen Meßergebnisse der optischen Dichte zeigen bis auf den Zeitpunkt 24h etwas höhere Werte als in den subcortical gemessenen Bereichen. 1 Stunde posttraumatisch steigt bilateral die

optische Dichte an, cortical etwas stärker als subcortical, so daß die Werte der optischen Dichte einen größeren Unterschied zeigen, jedoch keinen signifikanten Unterschied. Danach fällt beidseits die gemessene optische Dichte von Laktat wieder bis zum Zeitpunkt 24 Stunden, cortical etwas stärker als subcortical, so daß sich die gemessenen Werte der optischen Dichte wieder etwas einander annähern. Bis 48 Stunden posttraumatisch erkennt man einen Wideranstieg der optischen Dichte bilateral. Der Anstieg fällt im corticalen Areal stärker aus als im subcorticalen Meßgebiet, so daß sich der Unterschied zwischen Cortex und Subcortex wieder vergrößert. Es kann allerdings zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen Cortex und Subcortex gemessen werden (Abb.19).

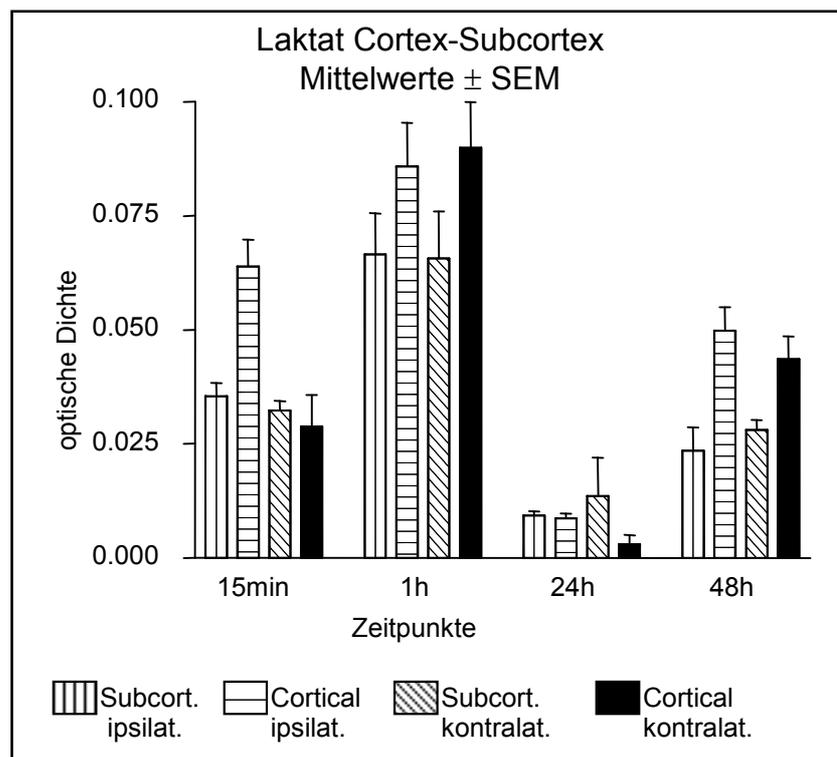


Abb. 19: Darstellung der optischen Dichte von Laktat im Gebiet Cortex-Subcortex bilateral zu den verschiedenen Zeitpunkten nach repetitivem CCI.

4.2 Einfaches Schädel-Hirn-Trauma

4.2.1 ATP

Cortical:

Zeitlicher Verlauf:

Die optische Dichte von ATP ist nach 1 Stunde posttraumatisch gegenüber den Werten der Sham-Gruppe erniedrigt. Diese Entwicklung gilt sowohl für die ipsilaterale als auch für die kontralaterale Hemisphäre. Allerdings erreicht die Abnahme keine Signifikanz gegenüber der Sham-Gruppe. Die Veränderungen sind auf der ipsilateralen und kontralateralen Seite etwa gleich stark ausgeprägt; es gibt keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Seiten (Abb. 20).

Diese Veränderungen gelten auch für die Messwerte der subcorticalen Region (Abb. 21).

Es können auch keine signifikanten Unterschiede zwischen corticalem und subcorticalem Messgebiet erkannt werden (Abb.22).

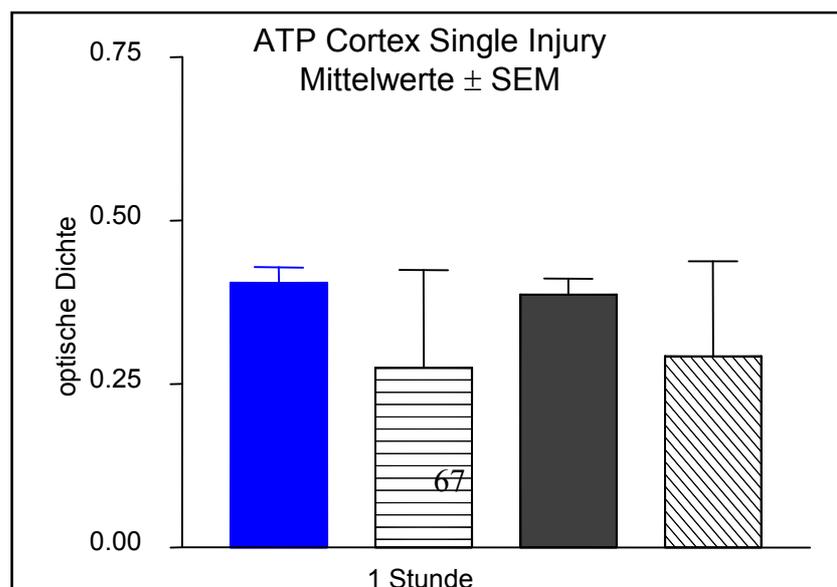




Abb. 20: Darstellung der optischen Dichte von ATP im Gebiet Cortex bilateral zum Zeitpunkt eine Stunde nach singulärem Trauma.

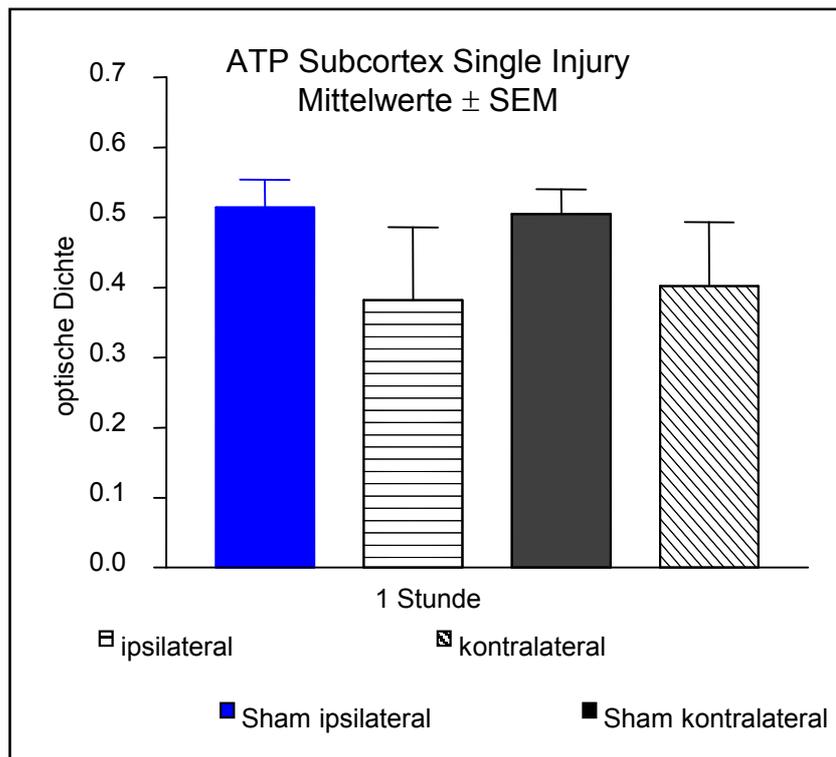


Abb. 21: Darstellung der optischen Dichte von ATP im Gebiet Subcortex bilateral zum Zeitpunkt eine Stunde nach singulärem Trauma.

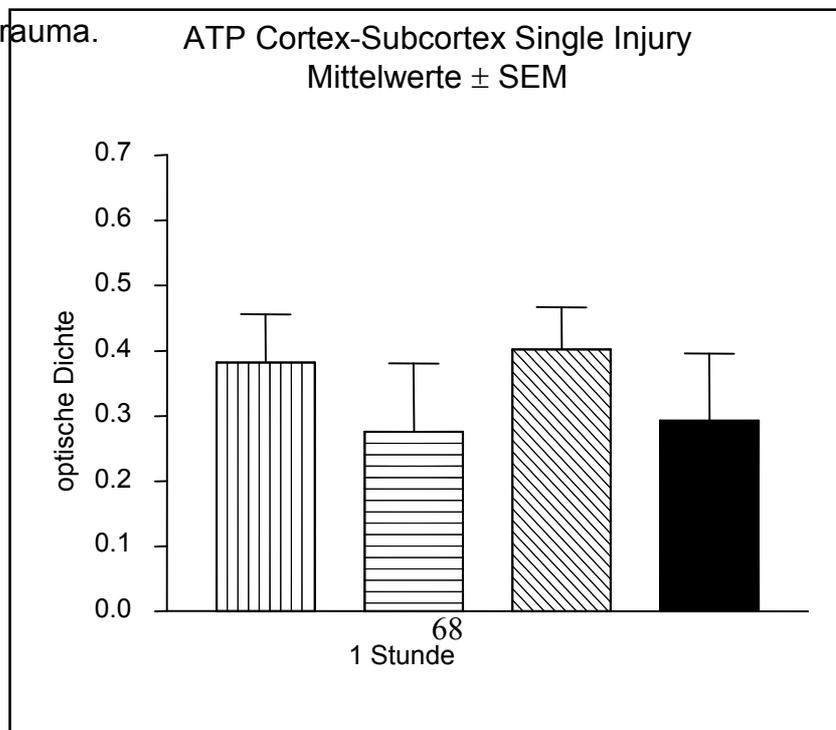




Abb. 22: Darstellung der optischen Dichte von ATP im Gebiet Cortex-Subcortex bilateral zum Zeitpunkt eine Stunde nach singulärem Trauma.

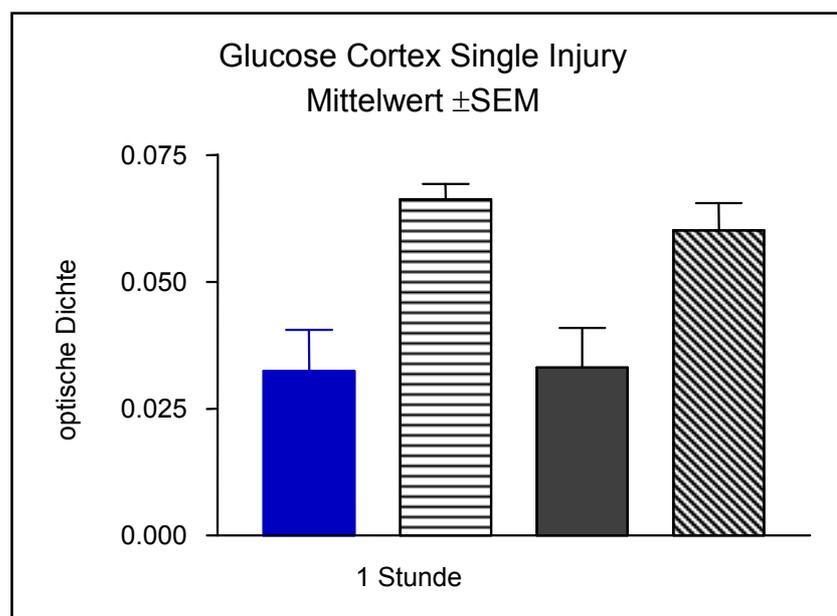
4.2.2 GLUCOSE

Cortical:

Zeitlicher Verlauf:

Die Werte der optischen Dichte von Glucose sind 1 Stunde posttraumatisch gegenüber den Werten der Sham-Gruppe erhöht. Dies gilt sowohl für die ipsilaterale als auch für die kontralaterale Hemisphäre. Allerdings erreichen die Veränderungen nicht das Signifikanzniveau gegenüber der Sham-Gruppe. Die Veränderungen sind auf der ipsilateralen und kontralateralen Seite etwa gleich stark ausgeprägt, es gibt keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Hemisphären (Abb. 23).

Diese Veränderungen sind auch im subcorticalen Messgebiet zu erkennen (Abb. 24) und es können keine signifikanten Unterschiede zwischen corticalem und subcorticalem Gebiet gemessen werden.



ipsilateral
 kontralateral
 Sham ipsilateral
 Sham kontralateral

Abb. 23: Darstellung der optischen Dichte von Glucose im Gebiet Cortex bilateral zum Zeitpunkt eine Stunde nach singulärem Trauma.

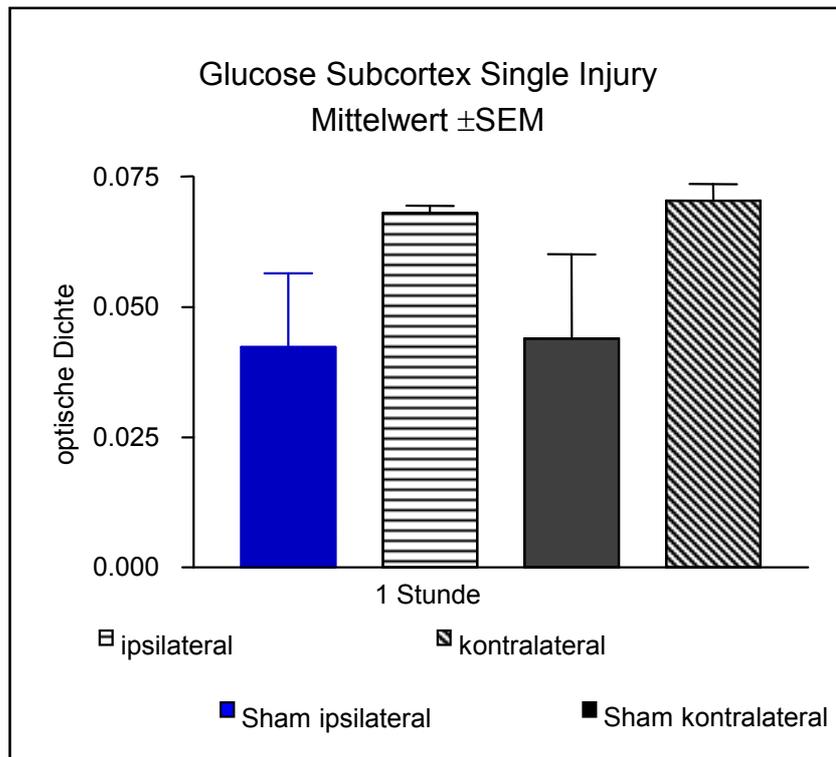
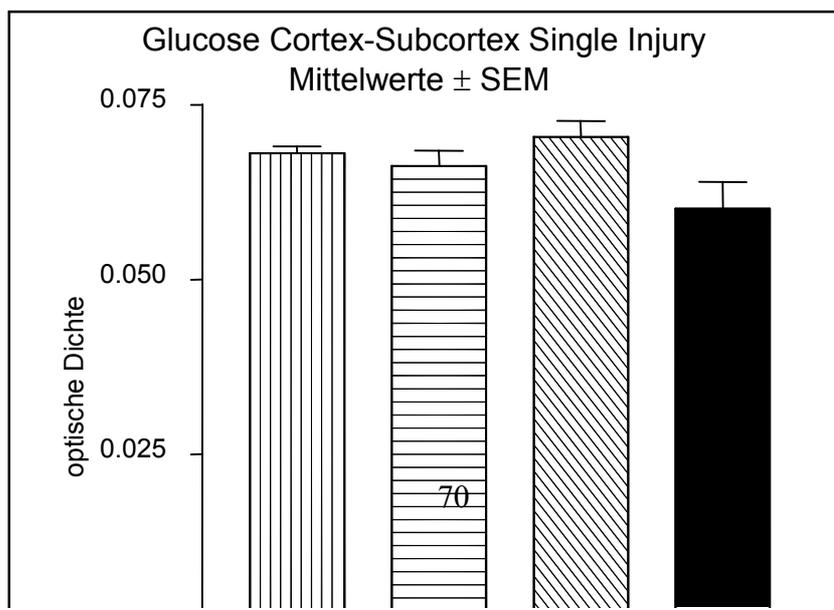


Abb. 24: Darstellung der optischen Dichte von Glucose im Gebiet Subcortex bilateral zum Zeitpunkt eine Stunde nach singulärem Trauma.



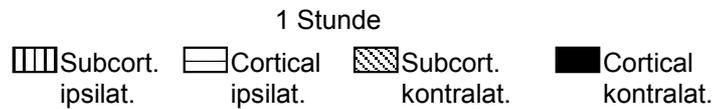


Abb. 25: Darstellung der optischen Dichte von Glucose im Gebiet Cortex - Subcortex bilateral zum Zeitpunkt eine Stunde nach singulärem Trauma.

4.2.3 LAKTAT

Cortical:

Zeitlicher Verlauf:

Die optische Dichte von Laktat ist nach 1 Stunde gegenüber den Werten der Sham-Gruppe erhöht. Dies gilt sowohl für die ipsilaterale als auch für die kontralaterale Hemisphäre. Die Veränderung erreicht allerdings nicht das Signifikanzniveau. Die Veränderungen sind auf der ipsilateralen und kontralateralen Seite etwa gleich stark ausgeprägt, es gibt keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Hemisphären (Abb. 26).

Dieser Verlauf der Veränderungen ist auch im subcorticalen Messgebiet zu erkennen (Abb. 27); es ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Cortex und Subcortex (Abb. 28).

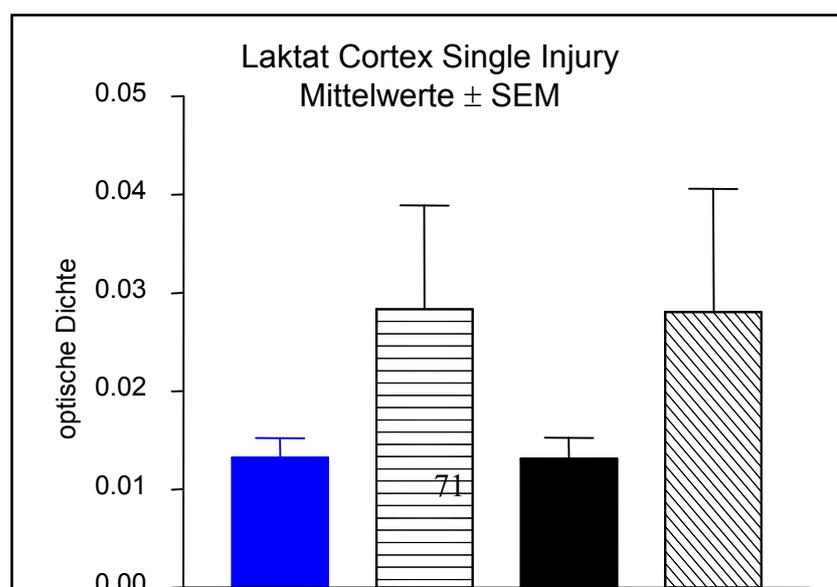




Abb. 26: Darstellung der optischen Dichte von Laktat im Gebiet Cortex bilateral zum Zeitpunkt eine Stunde nach singulärem Trauma.

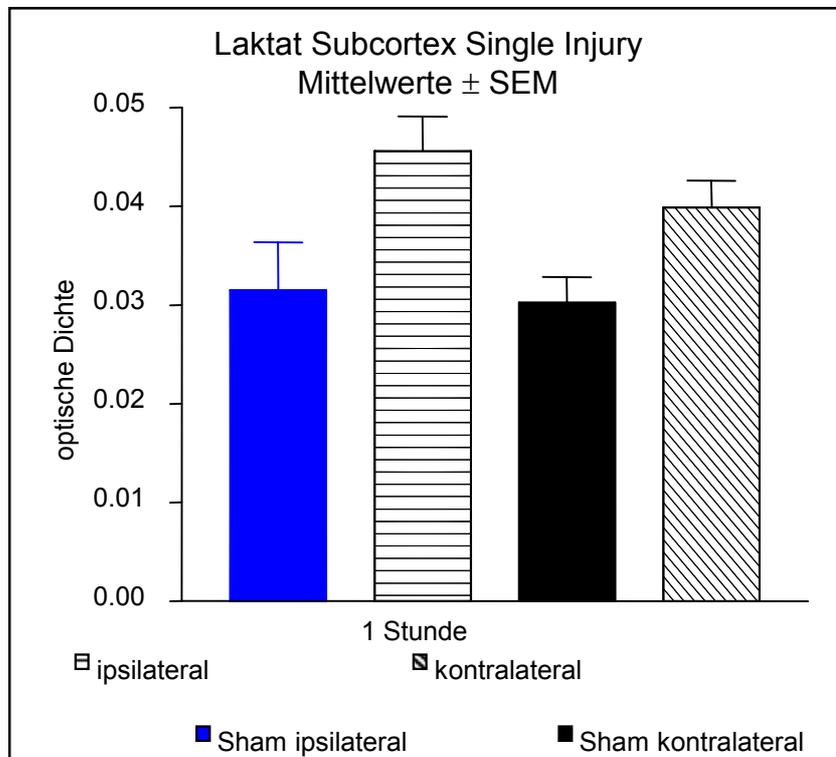


Abb. 27: Darstellung der optischen Dichte von Laktat im Gebiet Subcortex bilateral zum Zeitpunkt eine Stunde nach singulärem Trauma.

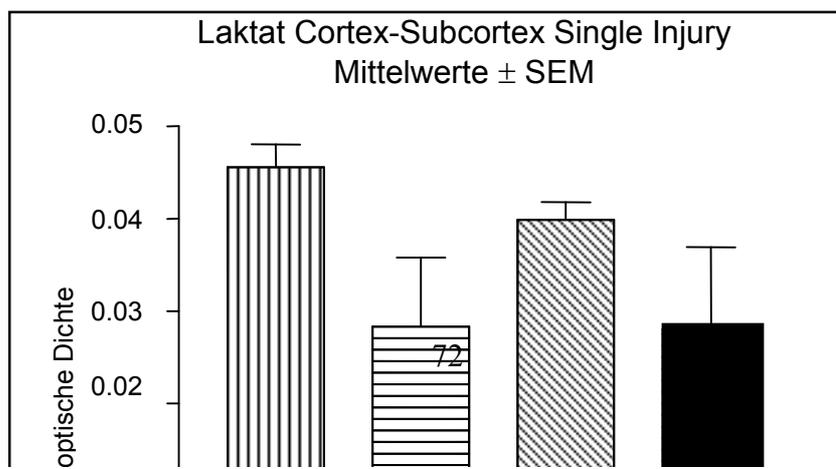




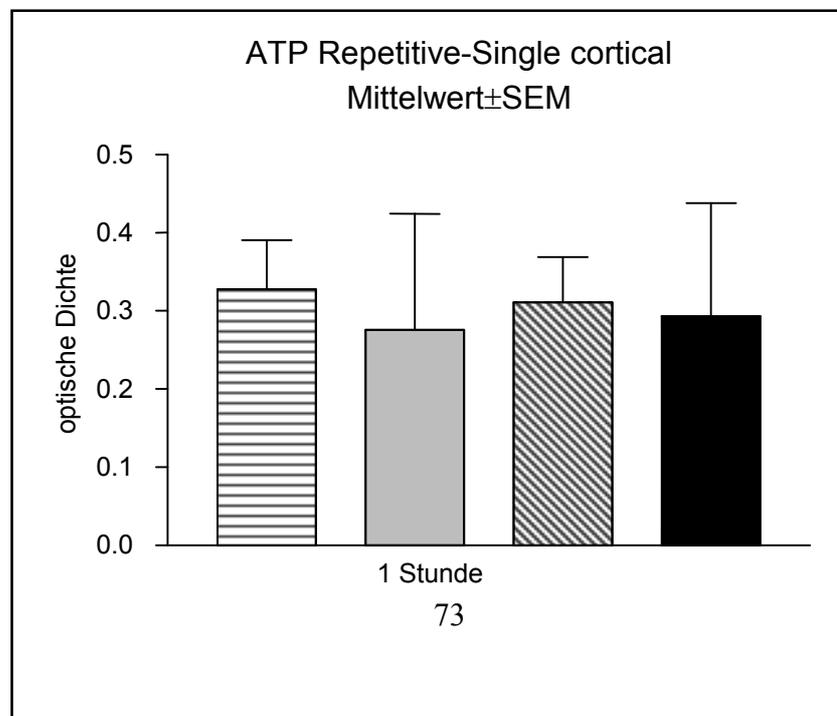
Abb. 28: Darstellung der optischen Dichte von Laktat im Gebiet Cortex-Subcortex bilateral zum Zeitpunkt eine Stunde nach singulärem Trauma.

4.3 Vergleich zwischen singulärem und repetitivem Schädel-Hirn-Trauma

4.3.1 ATP

Cortical:

Die optische Dichte von ATP nach repetitivem CCI ist gegenüber der optischen Dichte von ATP nach singulärem CCI erhöht, jedoch nicht signifikant. Dies gilt für die ipsilaterale Seite und für die kontralaterale Hemisphäre. Der Unterschied ist auf der ipsilateralen Seite etwas stärker ausgeprägt, als auf der kontralateralen Seite (Abb. 29).



ipsilateral repetitive
 kontralateral repetitive
 ipsilateral single
 kontralateral single

Abb. 29: Vergleich der optischen Dichte von ATP im Gebiet Cortex nach repetitivem und singulärem Trauma zum Zeitpunkt 1 Stunde.

Subcortical:

Die optische Dichte von ATP nach repetitivem CCI ist gegenüber der optischen Dichte von ATP nach singulärem CCI erniedrigt, jedoch nicht signifikant. Dies gilt für die ipsilaterale Seite und für die kontralaterale Hemisphäre. Der Unterschied ist auf der ipsilateralen Seite weniger stark ausgeprägt, als auf der kontralateralen Seite (Abb. 30).

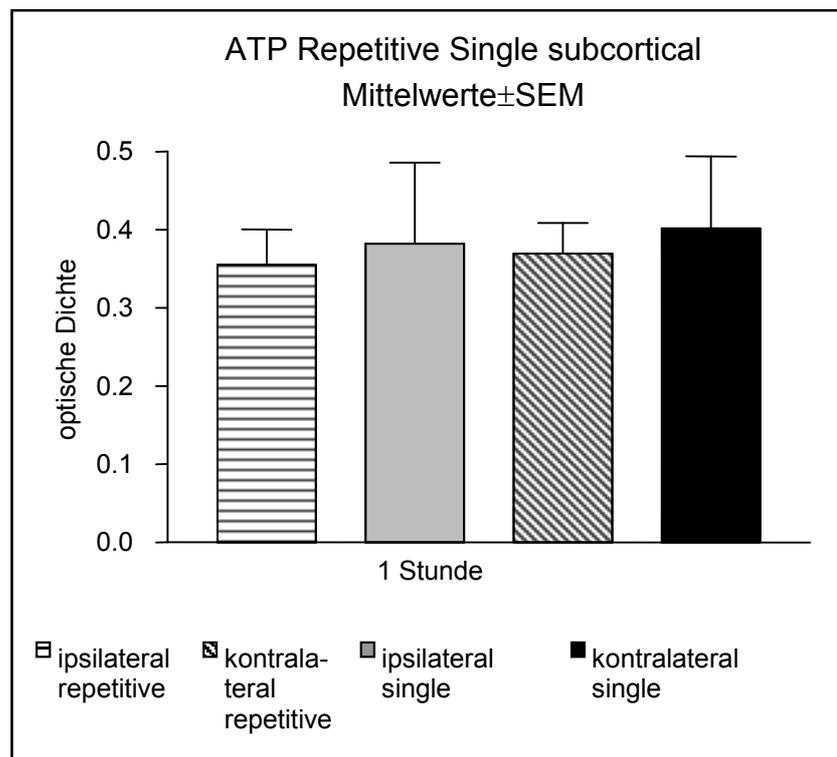


Abb. 30: Darstellung der optischen Dichte von ATP im Gebiet Subcortex bilateral nach repetitivem und singulärem Trauma zum Zeitpunkt 1 Stunde.

4.3.2 Glucose

Cortical:

Die optische Dichte von Glucose nach repetitivem CCI ist gegenüber der nach einfachem CCI erniedrigt, jedoch ohne das Signifikanzniveau zu erreichen. Die Veränderungen sind auf der ipsilateralen Seite und der kontralateralen Seite etwa gleich stark ausgeprägt (Abb. 31).

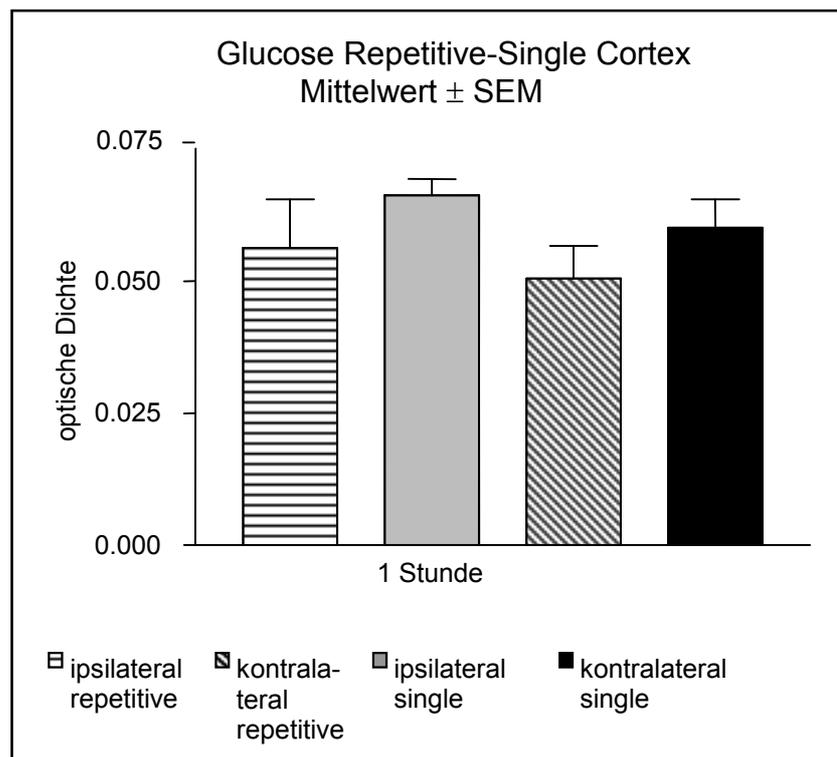


Abb. 31: Darstellung der optischen Dichte von Glucose im Gebiet Cortex bilateral nach repetitivem und singulärem Trauma zum Zeitpunkt 1 Stunde.

Subcortical:

Die optische Dichte von Glucose nach repetitivem CCI ist gegenüber der nach einfachem CCI erniedrigt, jedoch ohne das Signifikanzniveau zu erreichen. Die Veränderungen sind auf der ipsilateralen Seite und der kontralateralen Seite etwa gleich stark ausgeprägt (Abb. 32).

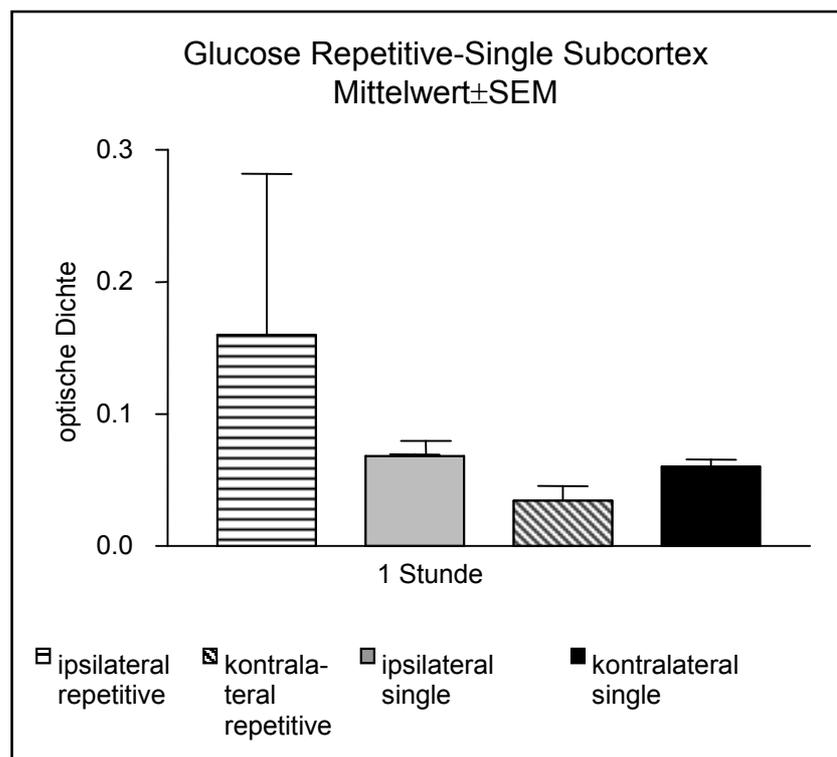


Abb. 32: Darstellung der optischen Dichte von Glucose im Gebiet Subcortex bilateral nach repetitivem und singulärem Trauma zum Zeitpunkt 1 Stunde.

4.3.3 Laktat

Cortical:

Die optische Dichte von Laktat nach repetitivem Schädel-Hirn-Trauma ist gegenüber den Werten nach singulärem Schädel-Hirn-Trauma erhöht, jedoch nicht signifikant. Die Unterschiede sind in der ipsilateralen und kontralateralen Hemisphäre etwa gleich stark ausgeprägt (Abb. 33).

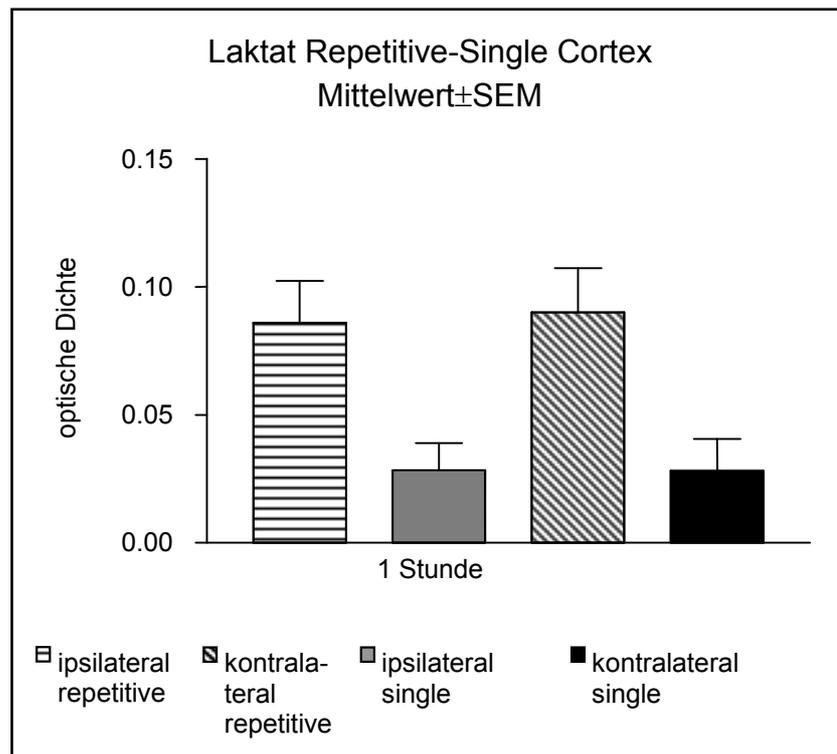


Abb. 33: Darstellung der optischen Dichte von Laktat im Gebiet Cortex bilateral nach repetitivem und singulärem Trauma zum Zeitpunkt 1 Stunde.

Subcortical:

Die optische Dichte von Laktat nach repetitivem CCI ist gegenüber der nach einfachem CCI erhöht, jedoch ohne das Signifikanzniveau zu erreichen. Die Veränderungen sind auf der ipsilateralen Seite und der kontralateralen Seite etwa gleich stark ausgeprägt (Abb. 34).

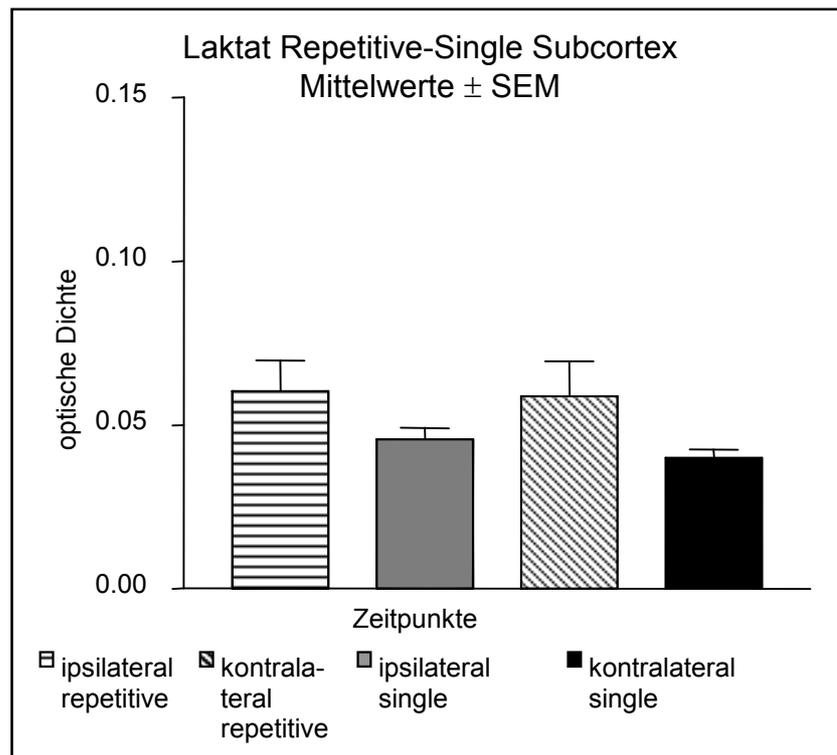


Abb. 34: Darstellung der optischen Dichte von Laktat im Gebiet Subcortex bilateral nach repetitivem und singulärem Trauma zum Zeitpunkt 1 Stunde.

5. DISKUSSION

5.1 Vergleich zwischen singulärem und repetitivem Schädel-Hirn-Trauma

Um die frühen Effekte zu untersuchen, die ein repetitives Trauma auf den cerebralen Metabolismus hat, haben wir zum Frühzeitpunkt 1 Stunde nach Trauma den Vergleich mit einem einfachen Controlled Cortical Impact Injury gleicher Stärke herangezogen.

Die Unterschiede in der Signifikanz zwischen singulärem und repetitivem CCI erlauben den Rückschluß, dass das doppelte Schädel-Hirn-Trauma eine stärkere Störung im Stoffwechsel verursacht, früher eine anaerobe Glykolyse einsetzt und Laktat dadurch stärker steigt.

Die fehlende Signifikanz nach singulärem Schädel-Hirn-Trauma zum Frühzeitpunkt 1 h nach Trauma deckt sich mit den Ergebnissen von MAUTES et al. (2001). In ihrer Untersuchung der metabolischen Veränderungen nach einem Closed Head Injury an der Maus, zeigte sich erst nach 4 bis 12 Stunden eine signifikant erniedrigte optische Dichte von ATP.

Dies zeigten auch WAGNER et al. (1985) an einem weight drop model an Katzen. Sie untersuchten die Konzentrationen verschiedener cerebraler

Metabolite (Laktat, ATP, ADP, AMP, PCr, Glucose, Glykogen, NAD, NADP) 15 Minuten nach Trauma mittels enzymatisch-fluorometrischer Methoden. Die Ergebnisse zeigten bei Tieren ohne sichtbare Kontusion keine Veränderungen in der Konzentration dieser Metaboliten, mit Ausnahme von Laktat, das im rostralen Segment der weißen Substanz signifikant erhöht war. Dagegen zeigten sich Veränderungen von ATP und Phosphocreatin erst bei Tieren mit sichtbarer Kontusion. Hier kam es zu einer signifikanten Abnahme der Metabolitenkonzentrationen, wogegen Laktat signifikant erhöht war. Signifikante Veränderungen der Konzentration von Glucose konnten nicht gemessen werden. Die hier erfassten Ergebnisse decken sich mit unserer Untersuchung, dass Laktat bereits frühzeitig 15 Minuten posttraumatisch ansteigt, und dass abhängig von der Traumaintensität, die metabolischen Veränderungen zunehmen, mit einem Verlust an energiereichen Substraten ohne signifikante Veränderungen des Glukosegehaltes.

Auch TORNHEIM et al. (1990) zeigten an einem experimentellen geschlossenen Schädel-Hirn-Trauma an Katzen einen Zusammenhang zwischen der Depression der cerebralen Durchblutung und der Traumastärke. Sie bestimmten 10, 30 und 60 Minuten nach Trauma den cerebralen Blutfluss im rechten und linken cerebralen Cortex und in der rechten und linken weißen Substanz. Hierbei zeigte sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen cerebraler Durchblutung und der Traumastärke. Der Abfall der cerebralen Perfusion nahm zu, je höher die Intensität des applizierten Traumas war.

CHERIAN et al. (1994) zeigten an einem Controlled cortical impact Modell an Ratten ebenfalls einen Zusammenhang zwischen der Depression der cerebralen Durchblutung und der Traumastärke.

Sie untersuchten nach Traumen verschiedener Intensität unter anderem die corticale Perfusion mittels kontinuierlicher Laser-Doppler-Flowmetrie bis zum Zeitpunkt 8 Stunden nach Trauma. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sich die cerebrale Perfusion in Abhängigkeit von der Traumastärke veränderte. Die cerebrale Perfusion wurde umso stärker supprimiert, je höher die Intensität des applizierten Traumas war.

ERISKAT et al. (2003) zeigten an einem Cold-Lesion-Modell einen positiven linearen Zusammenhang zwischen der Dauer des Kontaktes des Kältestempels mit dem cerebralen Cortex und dem folgenden Nekrosevolumen. Je länger die Kontaktzeit zwischen Kältestempel und Hirnoberfläche andauerte, was einer gesteigerten Traumaintensität entspricht, desto ausgeprägter zeigte sich das folgende Nekrosevolumen. Dies wird in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wiedergespiegelt. Beim einfachen Schädel-Hirn-Trauma zeigt sich histologisch kein corticales Ödem und auch die Metaboliten ATP, Glucose und Laktat zeigen eine Stunde nach Trauma keinen signifikanten Unterschied im corticalen und subcorticalen Messgebiet, sowohl auf der ipsilateralen als auch auf der kontralateralen Seite.

Dagegen bildet sich nach repetitivem Schädel-Hirn-Trauma ein histomorphologisch fassbares corticales Ödem aus, das mit signifikanten Veränderungen der regionalen Stoffwechselprodukte einhergeht.

LAURER et al. (2001) zeigten ebenfalls eine stärkere Beeinträchtigung des cerebralen Metabolismus nach repetitivem CCI. In ihrer Untersuchung erzeugten sie ein repetitives geschlossenes Schädel-Hirn-Trauma im Abstand von 24 Stunden. Sie zeigten kleine Areale mit corticalem Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke und axonaler Schädigung, deren Ausmaß nach repetitivem Schädel-Hirn-Trauma deutlich stärker war, was für kumulative Effekte eines repetitiven Schädel-Hirn-Traumas spricht.

Und URYU et al. (2002) zeigten nach einem geschlossenen repetitiven Schädel-Hirn-Trauma an Mäusen, verglichen mit einem singulären Schädel-Hirn-Trauma, eine deutliche Betonung der Akkumulation von Abeta Precursor Protein und eine Zunahme des oxidativen Stresses.

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass es nach Trauma zu einer Schädigung von Zellen im Sinne einer Nekrose kommt, sowohl von Neuronen, als auch von Glia-Zellen. Dies kann man anhand von erhöhten Zellmarkern, wie Neuronen-spezifische Enolase (NSE) und Glial fibrillary acidic protein (GFAP) nachweisen (WOERTGEN et al. 2001 und 2002). Dabei korreliert der Anstieg der Zellmarker mit der zugrundeliegenden Traumastärke, was bedeutet, dass eine höhere Traumaintensität eine stärkere Zellschädigung hervorruft.

Die deutlichere Beeinträchtigung des cerebralen Metabolismus nach repetitivem Trauma zeigten SOOD et al. (1980) in ihrer klinischen Untersuchung an Patienten nach Schädel-Hirn-Trauma. Sie erkannten eine positive proportionale Korrelation zwischen der Traumastärke und der Laktatkonzentration im Liquor innerhalb von 48 Stunden nach Schädel-Hirn-Trauma, die umso höher war, je stärker ausgeprägt das zugrunde liegende Trauma war. Gleichzeitig war mit einer höheren Laktatkonzentration auch eine deutliche Verschlechterung des klinischen Outcomes der Patienten verbunden.

5.2 Zeitlicher Verlauf und Seitenvergleich der Stoffwechselveränderungen

In unserer Untersuchung wurde gezeigt, dass die optische Dichte der drei Metabolite jeweils auf der ipsilateralen und kontralateralen Seite eine gleichsinnige Entwicklung zeigt, jedoch sind die Veränderungen auf der ipsilateralen Seite stärker ausgeprägt als auf der kontralateralen Seite. Dies gilt für das singuläre und das repetitive Trauma.

Dieser Unterschied könnte durch die Seitenunterschiede in der Beeinträchtigung des cerebralen Stoffwechsels und des cerebralen Blutflusses nach einem Schädel-Hirn-Trauma erklärt werden.

Nach Schädel-Hirn-Trauma kommt es zu direkt messbaren metabolischen Veränderungen. Die Glykolyse steigt nach Trauma in der Frühphase stark an (SUTTON et al. 1994, JIANG et al. 2000). Sie zeigten in ihren Untersuchungen nach Schädel-Hirn-Trauma an Ratten mittels CCI und fluid-percussion-injury in der Frühphase nach Trauma eine deutliche Zunahme der lokalen cerebralen Glucose-Utilisation, die auf die Traumaseite und eng benachbarte ipsilaterale Strukturen beschränkt bleibt. Im weiteren zeitlichen Verlauf, nach ein paar Stunden, kommt es zu einer Abnahme der Glucose-Utilisation, die bis zu 2 Wochen anhält und erst dann auch tiefere ipsilaterale und schließlich auch kontralaterale Strukturen erfasst. Dies könnte ein Grund dafür sein, daß es erst im weiteren Verlauf zu einer

Alteration des kontralateralen Metabolismus kommt und der Metabolismus zunächst ipsilateral deprimiert ist. Damit besteht die Möglichkeit, dass durch diese Latenz kontralateral gleichermaßen stark ausgeprägte metabolische Veränderungen unserer Untersuchung entgehen.

Und auch Yoshino et al. (1991) zeigten am fluid-percussion-Modell an Ratten, dass die metabolische Depression zwar bilateral stattfindet, jedoch auf der kontralateralen Seite weniger stark ausgeprägt ist, als auf der Traumaseite.

Neben direkten Einflüssen auf den cerebralen Metabolismus spielen auch posttraumatische Auswirkungen auf die cerebrale Perfusion eine wichtige Rolle.

Nach einem Schädel-Hirn-Trauma kommt es zu einem signifikant erniedrigten cerebralen Blutfluß (CBF) (BRYAN et al. 1995) durch einen erhöhten Gefäßwiderstand nach einsetzender Engstellung proximaler Arterien und distaler Arteriolen (GOLDING et al. 2003). Dadurch kommt es zu einer Zunahme des cerebralen Gefäßwiderstandes (PFENNINGER et al. 1989). Als Folge entsteht sowohl eine Abnahme des im Gehirn zirkulierenden Blutvolumens, als auch eine Verlängerung der Passagezeit des Blutvolumens durch den cerebralen Blutpool (TAYLOR et al. 1966).

Auch kommt es nach Trauma zu einem Verlust der cerebrovaskulären Autoregulation (PRAT et al. 1998), wobei das Traumaausmaß einen direkten Einfluss auf den Durchmesser pialer Arteriolen hat (SCHMOKER et al. 1996).

Dabei nimmt der cerebrale Blutfluß in der traumatisierten Hemisphäre deutlicher ab, als in der kontralateralen Hemisphäre. Das zeigten PLESNILA et al. (2003) in ihrer Untersuchung zur Messung der cerebralen Durchblutung nach geschlossenem Schädel-Hirn-Trauma an Ratten. In der ipsilateralen Hemisphäre wurde eine signifikante Hypoperfusion bis zu 6 Stunden nach Trauma gezeigt, dagegen in der kontralateralen Hemisphäre sogar eine Hyperperfusion.

Auch NILSSON et al. (1996) zeigten nach einem geschlossenen Schädel-Hirn-Trauma mittels weight-drop-model an Ratten in der ipsilateralen Hemisphäre eine frühzeitig einsetzende Hypoperfusion nach zwei Minuten bis 20 Minuten, auf der kontralateralen Seite kam es zu einer initialen Hy-

perfusion nach 4 Minuten, gefolgt von einer leichten Hypoperfuion bis 60 Minuten, die nicht so stark ausgeprägt war, wie auf der ipsilateralen Seite. Durch die ipsilateral stärker gedrosselte Perfusion steht der traumatisierten Hemisphäre weniger Substrat, sowie auch Sauerstoff zur Verfügung, wodurch es zu einer stärkeren ipsilateralen Depression des Energiestoffwechsels und einer stärkeren anaeroben Glykolyse als in der kontralateralen Hemisphäre kommt.

Auch SCHNEIDER und MAUTES (2002) zeigten eine ipsilateral betonte Depression der cerebralen Perfusion nach Fluid percussion injury an der Ratte, gemessen durch ein perfusionsgewichtetes MRT. Insgesamt untermauern diese Perfusionsänderungen die posttraumatischen metabolischen Veränderungen unserer Untersuchung.

Für die ipsilaterale Betonung der Energiestoffwechseldepression sprechen auch histologische Untersuchungen von SMITH et al. (1995) nach einem Controlled cortical impact. Sie zeigten einen corticalen Gewebsverlust in der Impactregion und zusätzlich einen hippocampalen Zellverlust auf der ipsilateralen Seite. Zu einem kontralateralen Zellverlust kam es nur an dem Übergang von grauer zu weißer Substanz entlang des Corpus callosum. Das bedeutet, dass das Trauma einen bilateralen Zellverlust bewirkt, allerdings deutlich ipsilateral akzentuiert.

Auch SHREIBER et al. (1999) beobachteten in ihrer Untersuchung nach Schädel-Hirn-Trauma durch corticale Deformierung mittels eines Vakuum-Pulses an Ratten, einen ipsilateralen Zellverlust im Cortex, dagegen keinen Zellverlust auf der kontralateralen Seite.

5.3 Vergleich zwischen Cortex und Subcortex

Der Verlauf der optischen Dichte der drei gemessenen Metabolite zeigt stärkere Veränderungen im Cortex, als im Subcortex. Nach singulärem Trauma kommt es zu keiner signifikanten Veränderung im subcorticalen Areal im Vergleich zu Sham und im Vergleich zum Cortex. Der von uns gemessene Verlauf der metabolischen Veränderungen lässt die Vermutung zu, dass das Trauma in der subcorticalen Region eine deutlich schwächere Depression des Stoffwechsels verursacht, als cortical.

JIANG et al. (2000) zeigten nach einem Closed-Head-Injury an Ratten anhand der Aktivität der Succinatdehydrogenase (SDH) eine posttraumatische Suppression des mitochondrialen Stoffwechsels. SDH ist ein mitochondriales Enzym, das zur aeroben ATP-Produktion benötigt wird. Posttraumatisch kommt es zu einer signifikanten Suppression der SDH-Aktivität im ipsilateralen Cortex, kontralateral auch zu einer Suppression, allerdings schwächer ausgeprägt. Im subcorticalen Areal kommt es zu einer wesentlich milder ausgeprägten Suppression und eine signifikante Erniedrigung wird nur zu den Zeitpunkten 1h, 48h und 72h nach Trauma erreicht.

Die dadurch nachgewiesene Blockade der ATP-Produktion durch gehemmten mitochondrialen Stoffwechsel mit deutlich corticaler Betonung, erklärt den corticalen ATP-Verlust nach Trauma, wogegen der subcortical ATP-Gehalt ohne signifikante Erniedrigung bleibt.

In unserer Untersuchung zeigt Glucose nach repetitivem Trauma subcortical nach 48 Stunden bilateral signifikant erniedrigte Werte im Vergleich zum corticalen Messgebiet.

In der Untersuchung von JIANG et al. (2000) wurde auch der lokale cerebrale Glukoseverbrauch (ICGU) gemessen. Nach einer frühzeitigen posttraumatischen Steigerung des ICGU kommt es anschließend zu einer kontinuierlichen Abnahme. Diese Abnahme ist cortical wesentlich stärker ausgeprägt, so daß der Unterschied zwischen dem corticalen und subcorticalen ICGU immer größer wird. In ihrer Untersuchung hält diese Depression und der Unterschied zwischen Cortex und Subcortex bis zwei Wochen nach Trauma an.

Mit diesem steigenden Unterschied zwischen corticalem und subcorticalem ICGU könnte man den signifikanten Unterschied zwischen der corticalen und subcorticalen optischen Dichte von Glucose zum Zeitpunkt 48 Stunden nach Trauma in unserer Untersuchung erklären. Auch andere Untersucher erkannten diesen Unterschied in der corticalen und subcorticalen Depression des Energiemetabolismus, auch über einen längeren Zeitraum als die 48 Stunden in unserer Untersuchung.

BUCZEK et al. (1991) untersuchten den regionalen Energiemetabolismus 3 Tage nach Kälteläsion. Sie erkannten einen wesentlich stärker suppri-

mierten Metabolismus im Cortex, als in den subcorticalen Arealen, sowohl in der ipsilateralen, als auch in der kontralateralen Hemisphäre. Das entspricht, wie auch in unserer Untersuchung zu erkennen, einer stärkeren cortikalen Schädigung nach Trauma.

Ein weiterer möglicher Erklärungsversuch liefert auch die Untersuchung von DIETRICH et al. (1998). Sie untersuchten den lokalen cerebralen Blutfluss in verschiedenen Hirnregionen vor und nach fluid-percussion-injury an Ratten. Hierbei kam es posttraumatisch zu einer Abnahme der lokalen cerebralen Durchblutung. Allerdings fiel die Abnahme der Durchblutung im Cortex wesentlich stärker aus, als in der subcorticalen Region. Das bedeutet, daß cortical eine stärkere ischämische Schädigung nach Trauma einsetzt und damit auch zu erklären ist, warum posttraumatisch das corticale Laktat deutlicher ansteigt als subcortical.

5.4 Sekundärmechanismen

Ein Schädel-Hirn-Trauma führt zu unmittelbaren biochemischen Störungen innerhalb neuronaler Übertragungswege und der vaskulären Versorgung. Zusätzlich zu dem mechanischen Trauma kommt es zu einer sekundären neuronalen oder zellulären Schädigung im Verlauf einiger Stunden nach der initialen Schädigung. Dieser verzögert einsetzende Schaden scheint mit neurochemischen Veränderungen assoziiert zu sein, die durch das Trauma ausgelöst werden. Hierzu gehören pathologische Effekte auf den cerebralen Blutfluss, die cerebrale Ionenhomöostase und den cerebralen Metabolismus; oder es kommt zu einer direkten neurotoxischen Wirkung gegenüber regionalen Neuronenpopulationen oder Gruppen von Gliazellen.

Es scheint wahrscheinlich, dass diese posttraumatischen neurochemischen Veränderungen zu Störungen im Rahmen der Bildung oder des Transportes „neuroprotektiver“ und „neurotoxischer“ Komponenten führen. Die Identifizierung dieser neurochemischen Kaskade ermöglicht die Ermittlung eines Zeitfensters zur Festlegung der optimalen Zeitpunkte für eine therapeutische Intervention.

Im Folgenden soll auf verschiedene Faktoren eingegangen werden, die an der sekundären Schädigung nach Schädel-Hirn-Trauma beteiligt sind.

5.4.1 Zytokine

Veränderungen der Konzentration zirkulierender immunkompetenter Zellen konnten im Plasma von Patienten mit Schädel-Hirn-Trauma nachgewiesen werden (PIEK et al. 1992), welche einen relevanten, direkten Einfluss auf die posttraumatische neuronale Schädigung haben können.

Die Akkumulation polymorphkerniger Leukozyten (PMN) ist an Faktoren, die zu einer sekundären Hirnschädigung führen, wie die Reduktion des cerebralen Blutflusses, der Hirnödembildung und der Erhöhung des intrakraniellen Druckes, beteiligt.

ZHUANG et al. (1993) untersuchten die PMN-Akkumulation nach Kälteläsion. In ihrer Untersuchung kam es bilateral zu einer Akkumulation von PMNs, jedoch deutlich stärker in der ipsilateralen Hemisphäre ausgeprägt. Gleichzeitig stieg die PMN-Akkumulation signifikant durch Addition eines sekundären Insultes, ausgelöst durch einen Schock. Die signifikante Korrelation zwischen der PMN-Akkumulation und den Faktoren, die an einer sekundären Hirnschädigung beteiligt sind (steigender intrakranieller Druck, reduzierter cerebraler Blutfluss, gesteigerter cerebraler Wassergehalt) suggeriert, dass Leukozyten an diesem Prozess beteiligt sind. Das kann bedeuten, dass Schock und Trauma synergistisch in der Aktivierung von Leukozyten wirken und zur Förderung der Upregulation von Leukozyten-Adhäsions-Molekülen im cerebralen mikrovaskulären Endothel führen.

PMN können Sauerstoffradikale bilden und freisetzen (WEISS et al. 1989), ebenso wie proteolytische Enzyme, die toxisch auf Zellen wirken. Wenn diese destruktiven Prozesse gegen das cerebrovaskuläre Endothel gerichtet sind, kann es durch Gefäßschäden zu einer Reduktion des cerebralen Blutflusses kommen.

Aktivierte PMNs zeigen wesentlich andere rheologische Eigenschaften gegenüber nicht aktivierten PMNs und sind deutlich adhärenter an Endothelzellen. Das kann zu einer mechanischen Obstruktion der Mikrozirkulation führen. So zeigten ENGLER et al. (1986), dass die kapilläre Obstruktion durch Leukozyten ein wesentlicher Faktor für den signifikant reduzierten Blutfluß nach Reperfusion war.

Insgesamt ist zu sagen, dass posttraumatische Veränderungen mit einer PMN-Akkumulation korreliert sind und es damit anzunehmen ist, dass die PMNs zumindest partiell an der sekundären Schädigung beteiligt sind.

5.4.2 Exzitatorische Aminosäuren

Nach Schädel-Hirn-Trauma kommt es zu einem exzessiven Anstieg von exzitatorischen Aminosäuren, vor allem Glutamat (BAKER et al. 1993, ROSE et al. 2002, LIMBRICK et al. 2003), wobei das Ausmaß des Anstiegs abhängig von der Traumastärke ist (NILSSON et al. 1990, PALMER et al. 1993). Diese Anflutung von Aminosäuren führt zu einer Störung im Ionengleichgewicht der Zellmembran mit konsekutiver Veränderung des Membranpotentials durch einen massiven Ionenfluss über die Plasmamembranen mit folgender Depolarisation der Zellmembran.

Dabei gibt es eine streng positive Korrelation zwischen Glutamat und Glucose und Glutamat und Laktat, so dass Glutamat wahrscheinlich auch die Glykolyse in Astrozyten durch einen Einfluss auf den Glucose-Uptake steuert (ALESSANDRI et al. 1999).

Eine Beteiligung der gestörten Ionenbalance durch Glutamatanstieg am entstehenden anaeroben Metabolismus zeigten KAWAMATA et al. (1995), da es nach der Applikation eines Glutamatantagonisten zu einer Reduktion des Laktatanstiegs kam.

Nach einem Cortical Impact Injury fand man eine abrupte Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration von 3 auf 60 mM und eine Abnahme der extrazellulären Calciumkonzentration (NILSSON et al. 1993). Erhöhtes freies intrazelluläres Calcium führt zu einer Astrozytenschwellung (HANSSON et al. 1997) und zur Entwicklung eines cytotoxischen Ödems.

Diese Veränderungen führen, wie bereits oben beschrieben zu einer Steigerung des Energiestoffwechsels und zu einer strukturellen cytologischen Schädigung mit Beeinträchtigung des cerebralen zellulären Stoffwechsels. Im weiteren Verlauf kommt es zu einem Energieversagen der Zelle.

Frühere Studien, die Energiemetabolite nach fluid-percussion-injury mit Hilfe der ^{31}P Magnetresonanz-Spektroskopie und Mikrodialyse maßen, berichten über Ergebnisse, die mit einem deutlichen Energiemangel vereinbar sind, wie ein vermindertes Serum- Mg^{2+} , ein vermindertes cytosolisches ATP und ein gesteigertes cytosolisches ADP und 5'AMP (HEADRICK et al. 1994).

Nach Trauma kommt es für eine kurze Periode zum Anstieg des cerebralen Glucosemetabolismus (SHAR et al. 1983; YOSHINO et al. 1991; KAWAMATA et al. 1992). Diese Steigerung der lokalen cerebralen Glukoseutilisation unmittelbar nach Trauma, ist möglicherweise auch auf die Freisetzung exzitatorischer Aminosäuren zurückzuführen (vide supra). Der unmittelbare Anstieg der ICGU nach Trauma suggeriert, daß die durch die freigesetzten exzitatorischen Aminosäuren aktivierten Ionenkanäle hierbei eine Rolle spielen. Dies spiegelt den zellulären Energiebedarf zur Unterhaltung der Ionenpumpen mit dem Ziel der Wiederherstellung der gestörten Ionenbalance nach Trauma wieder.

5.4.3 Ionenveränderungen

a) Kalium: Verschiedene Studien haben mittels Microdialyse eine massive Freisetzung von Kalium in den extrazellulären Raum nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma nachgewiesen, welche mit einer ausgeprägten Depolarisation assoziiert zu sein scheint (ASTRUP et al. 1980;

KATAYAMA et al. 1990; TAKAHASHI et al. 1981). Dadurch kann es zu einer Reihe pathologischer elektrophysiologischer Phänomene kommen. Hierzu gehören Depolarisation und funktionelle Depression (SUGAYA et al. 1975; TAKAHASHI et al. 1981). Unter normalen Umständen wirken die Gliazellen unterstützend in der Beseitigung des Kaliums, das während der Aktivierung von Neuronen freigesetzt wird (HERTZ, 1982). Dennoch kommt es nach Schädel-Hirn-Trauma zu einem deutlichen Anstieg des extrazellulären Kaliums. Und die daraufhin folgende rapide Aufnahme dieses Kaliums durch Astrozyten kann zu einer intrazellulären Schwellung (Status spongiosus) führen (BOURKE et al. 1975; KIMELBERG et al. 1979).

Weil die Kaliumaufnahme in die Gliazellen ein sauerstoffabhängiger Prozess ist (HERTZ et al. 1973), ist es möglich, dass der Kaliumverlust aus Neuronen diese durch die folgende exzessive Gliaaktivierung zusätzlich teilweise ihrer Sauerstoffversorgung beraubt (SIESJÖ, 1981).

b) Magnesium: Im ZNS ist Magnesium involviert in eine Vielzahl von kritischen zellulären Prozessen, wie der Glykolyse, der oxidativen Phosphorylierung, der Zellatmung und der DNA-, RNA- und Proteinsynthese (AIKAWA, 1981; GARFINKEL und GARFINKEL, 1985). Die Anwesenheit von Magnesium ist außerdem essentiell für die mitochondriale Funktionstüchtigkeit und Plasmamembranintegrität (AIKAWA, 1981). Magnesium reguliert die Konstanz der normalen intrazellulären Natrium- und Kaliumgradienten (AIKAWA et al. 1981); Störungen der Homöostase des Gewebemagnesiums gefährden die Einhaltung dieser Gradienten und können potentiell zur sekundären Entwicklung von Ionenstörungen und eines posttraumatischen Ödems führen.

Nach einem parasagittalen Fluid-percussion-Injury in Ratten wurde eine markante und akut eintretende Abnahme des freien intrazellulären Magnesiums nachgewiesen (VINK et al. 1988). Eine Reduktion des cytosolischen freien Magnesiums kann zu einer Verschlechterung der Glukoseutilisation, des Energiemetabolismus und der Proteinsynthese führen. Weil Magnesium eine wichtige regulatorische Rolle in Bezug auf den Calcium-

transport und die cerebrovaskuläre Kontraktibilität innehat (ALTURA et al. 1984), können Veränderungen der intrazellulären Magnesiumkonzentration zu posttraumatischer Calcium-medierter Neurotoxizität führen oder den regionalen posttraumatischen Blutfluss durch Veränderungen des Gefäßdurchmessers beeinflussen.

5.4.4 Mitochondrialer oxidativer Metabolismus

Ob der oxidative Metabolismus nun durch die Verschlechterung der Sauerstoffversorgung oder durch eine Inhibition der mitochondrialen Funktion zurückzuführen ist, wird kontrovers diskutiert. Sehr wahrscheinlich handelt es sich um eine Kombination aus beiden Faktoren, da wie oben bereits beschrieben, die Durchblutung nach Trauma deutlich abnimmt. Zum Anderen werden in anderen Untersuchungen Inhibitionen des mitochondrialen oxidativen Metabolismus dokumentiert (SCREMIN et al. 1997).

XIONG et al. (1997) erkannten eine deutliche Abnahme des mitochondrialen Metabolismus in der ipsilateralen Hemisphäre nach Applikation eines CCI, beginnend einen Tag nach Trauma und bis 14 Tage nach Trauma anhaltend.

Auch JIANG et al. (2000) zeigten bis zu zwei Wochen nach Closed-Head-Injury an Ratten eine signifikante ipsilaterale corticale und subcorticale Abnahme der Aktivität von SDH (Succinat Dehydrogenase), ein mitochondriales Enzym, als weiteren Hinweis einer metabolischen Depression.

5.4.5 Katecholamine

Störungen innerhalb des cerebralen Katecholaminsystems wie Überaktivierung oder Inhibition der Neurotransmitterfreisetzung, Veränderungen der prä- oder postsynaptischen Rezeptorbindung, des Neurotransmittertransportes oder die Signaltransduktion, beeinflussen entweder den ce-

rebralen Blutfluss und Metabolismus oder üben eine direkte toxische Wirkung auf Neurone oder Gliazellen aus.

Verschiedene Untersuchungen haben bewiesen, daß Katecholamine eine wichtige Rolle bei der sekundären Entwicklung eines Schädel-Hirn-Traumas zu spielen scheinen (FEENEY und SUTTON, 1987; GOLDSTEIN und DAVIS, 1990; BOYESON et al. 1993). Diese Autoren haben beobachtet, daß Medikamente, die die Freisetzung der zentralen Katecholamine steigern, zu einer Beschleunigung der neurologischen Erholung führen, wogegen Medikamente, die zu einer Blockade der synaptischen Transmission führen, die posttraumatische Erholung vermindern.

HAMILL et al. (1987) untersuchten den Zusammenhang zwischen der Traumastärke und der Katecholaminkonzentration im Plasma. Sie erkannten eine vier- bis fünffach höhere NoradrenalinKonzentration und eine dreifache Dopaminkonzentration im Plasma bei Patienten mit schwerem Schädel-Hirn-Trauma (Glasgow-Coma-Scale (GCS) 3-4), die signifikant höher waren als in Patienten mit leichtem Schädel-Hirn-Trauma (GCS 8-11). Und bestimmte man die Katecholaminkonzentration nach einer Woche wieder, so waren stark erhöhte Katecholaminkonzentrationen nur in den Patienten zu erkennen, die entweder anschließend verstarben oder ein schweres neurologisches Defizit davontrugen. Das läßt die Vermutung zu, daß die posttraumatische Katecholaminkonzentration entweder das Outcome der Patienten beeinflusst oder umgekehrt, ein schlechtes Outcome durch einen hohen Katecholaminspiegel angedeutet wird.

Es sind verschiedene mögliche Mechanismen denkbar, durch welche Katecholamine zu einer posttraumatischen neuronalen Schädigung führen können, wie Modifikation des peripheren oder regionalen cerebralen Blutflusses (KOBAYASHI et al. 1985; WEISS und MILTON, 1988), Modulation anderer Neurotransmittersysteme (MADISON und NICOLL, 1986; STANTON et al. 1989) oder Alterationen des cerebralen oxidativen Metabolismus (FEENEY et al. 1985).

5.5 Beeinflussung durch systemische Parameter

Die systemischen Parameter der verwendeten Versuchstiere wurden in unserer Versuchsanordnung kontrolliert und konstant gehalten. Dies ist auch notwendig, da diese Parameter einen Einfluss auf die cerebrale Funktion und den cerebralen Stoffwechsel, und damit auf die von uns gemessenen Parameter haben, so dass durch unkontrollierte Veränderungen die Messergebnisse verfälscht werden könnten.

Dies gilt natürlich v.a. für die Blutgase, da eine Hypoxie durch unsachgemäße Beatmung der Tiere schon zu einem anaeroben Stoffwechsel des Gehirns führt und damit zu einem Laktatanstieg. Außerdem werden die Hirnzellen nach überschreiten der Ischämietoleranz geschädigt. Dadurch ist auf eine ausreichende Oxygenierung zu achten, da sonst die Messergebnisse verfälscht würden. Auch ist auf eine Konstanthaltung des systemischen Blutdruckes zu achten, da auch er einen Einfluss auf die cerebrale Funktion hat. Ein zu starker Abfall kann zu einer cerebralen Ischämie führen, wie GOBIET et al. (1975) nachwiesen, dass der cerebrale Blutfluß durch ein zu starkes Absinken des arteriellen Blutdruckes, v.a. unter Werte von 110mmHg systolisch, abnimmt.

Dagegen kann ein zu starker Anstieg zu einer pathologischen Eröffnung der Blut-Hirn-Schranke führen, wie HÄGGENDAL et al. (1972) nach einer medikamentös induzierten Steigerung des Blutdruckes zeigten und damit ein vasogenes Ödem verstärkten.

Auch in der Untersuchung von KROPPESTEDT et al. (1999) wurde der Einfluß des arteriellen Blutdruckes auf das Kontusionsvolumen nach CCI bewiesen. In ihrer Untersuchung verwendeten sie zur Senkung des Blutdruckes das Modell der hypobaren Hypotension und zur Steigerung des Blutdruckes die Infusion von Dopamin. Nach Reduktion des Blutdruckes auf 70 mmHg systolisch und dadurch Reduktion des Cerebralen Perfusionsdruckes auf 60 mmHg, für 30 Minuten kam es zu einer signifikanten Steigerung des Kontusionsvolumen um 47%, wogegen in nichttraumatisierten Ratten der cerebrale Perfusionsdruck für 30 Minuten auf 35 mmHg verringert werden konnte, ohne histologische Veränderungen zu induzie-

ren. Auch eine Steigerung des Blutdruckes auf 140 mmHg, dadurch ein cerebraler Perfusionsdruck von 120 mmHg, führte zu einem signifikanten Anstieg des Kontusionsvolumen um 33%, wobei die Autoren nicht ausschließen können, dass dieser Effekt zum Teil auf einer durch die Dopamininfusion bewirkten Vasokonstriktion zurückzuführen ist.

Aber auch umgekehrt hat die Applikation eines Schädel-Hirn-Traumas Auswirkungen auf den arteriellen Blutdruck. So zeigten DIXON et al. (1991), dass ein Cortical Impact Injury von 2mm Tiefe eine passagere Blutdruckverminderung von 100 auf 80 mmHg für einen Zeitraum von 30min bewirkte.

Daher muss man davon ausgehen, dass Veränderungen des systemischen Blutdruckes auch zu Veränderungen des cerebralen Metabolismus führen.

5.6 Interindividualität

Im Rahmen der Messung der posttraumatischen Stoffwechselsituation wurde deutlich, dass nicht alle Tiere zu den untersuchten Zeitpunkten in gleichem Maße auf das Trauma reagierten. Diese individuellen Unterschiede konnten auch schon in anderen Untersuchungen festgestellt werden (PASCHEN 1990; FOLBERGROVA et al. 1992; KOZUKA 1995).

Diese Beobachtung im Rahmen der experimentellen Forschung deckt sich mit Beobachtungen aus der Klinik, dass Patienten nach Schädel-Hirn-Trauma einen unterschiedlich ausgeprägten klinischen Verlauf zeigen.

5.7 Therapeutische Ansätze

Die primäre Hirnschädigung, die durch die direkte Gewalteinwirkung auf das Gehirn entsteht, ist der therapeutischen Intervention nicht mehr zu-

gänglich. Das heißt, Strategien zur Behandlung eines Schädel-Hirn-Traumas müssen sich auf die sekundären Mechanismen, die ein Trauma nach sich zieht, und die zu einer sekundäre Hirnschädigung nach Trauma führen, konzentrieren.

Dabei ist zu beachten, dass die in dieser Untersuchung festgestellten metabolischen Beeinträchtigungen nach Trauma eine dynamische Entwicklung zeigen und sich daher für eine sinnvolle therapeutische Intervention eine optimales zeitliches Fenster ergeben kann.

5.8 Klinische Bedeutung

Die Summationseffekte der cerebralen Störungen nach einem repetitiven Trauma haben nicht nur experimentelle Bedeutung, sondern spielen auch in der klinischen Praxis eine wichtige Rolle.

Es gibt verschiedene klinische Syndrome, deren Verlauf durch ein repetitives Schädel-Hirn-Trauma bestimmt wird.

Zum Einen das sogenannte Second-Impact-Syndrom (SIS). Die Bezeichnung „Second Impact Syndrome“ wurde von verschiedenen Autoren verwendet (SAUNDERS et al. 1984, CANTU et al. 1998, MCCRORY et al. 1998). Von diesen wurde es definiert als ein Ereignis, bei dem ein Sportler, der ein Schädeltrauma erleidet – oftmals eine Erschütterung oder ein schlimmeres Trauma, wie eine cerebrale Contusion – ein zweites Trauma erleidet, bevor die Symptome, die mit dem ersten Trauma zusammenhängen, sistieren.

Typischerweise entwickelt diese Person nach dem ersten Trauma verschiedene Symptome, wie Kopfschmerzen, Schwindel, visuelle, motorische oder sensorische Störungen oder auch kognitive Veränderungen, v.a. Gedächtnisprozesse betreffend. Und bevor diese Symptome vollständig rückläufig sind, kommt es zu einem zweiten Trauma gegen den Schädel.

Dieser zweite Schlag kann auch deutlich schwächer sein als das erste Trauma, möglicherweise kommt es nur zu einem Schlag gegen die Brust,

der eine zusätzliche Erschütterung des Schädels bewirkt und zu Beschleunigungskräften auf das Gehirn führt.

Innerhalb weniger Sekunden bis zu mehreren Minuten nach dem zweiten Trauma kommt es jetzt zu einem plötzlichen Zusammenbruch des Sportlers, er wird komatös mit sich rasch entwickelnden weiten Pupillen und respiratorischer Insuffizienz.

Pathophysiologisch scheint bei der Ausbildung eines SIS eine gestörte Autoregulation der cerebralen Blutversorgung eine wichtige Rolle zu spielen. Dieser Verlust der Autoregulation führt zu einem Blutstau innerhalb des Craniums, was wiederum eine deutliche Erhöhung des intrakraniellen Druckes zur Folge hat und zu einer Herniation des Uncus der Temporallappen oder der Kleinhirntonsillen im Foramen magnum führt.

Dann kommt es im weiteren Verlauf zum Funktionsverlust des Hirnstammes mit Atemdepression und letalem Ausgang.

Obwohl extrem selten, hat das SIS mit diffuser cerebraler Schwellung eine Mortalität von fast 100%.

Das heißt, die Prävention eines zweiten Traumas und die richtige Reaktion auf ein vorangegangenes Trauma hat einen Entscheidenden Stellenwert zur Vermeidung eines solchen Verlaufes.

Das SIS ist eine seltene, aber wenn auftretend äußerst schwere und in fast 100% aller Fälle letal verlaufende Komplikation eines repetitiven Schädel-Hirn-Traumas. Dieser schwere Verlauf kann durch die konsequente Prävention und den Schutz vor einem zu frühen Folgetrauma vermieden werden.

Das repetitive Schädel-Hirn-Trauma im Sport birgt nicht nur die Gefahr des Second Impact Syndroms, sondern z.B. bei Boxern kann es durch die jahrelang einwirkenden repetitiven Schädel-Hirn-Traumen zur Entwicklung einer chronischen traumatischen Enzephalopathie oder auch einer Dementia pugilistica kommen. Die chronisch traumatische Enzephalopathie (CTE) ist gekennzeichnet durch die Entwicklung von motorischen, kognitiven und psychiatrischen Symptomen. Die ersten Symptome der CTE des Boxers sind motorische und affektive Störungen, sowie Persönlichkeitsveränderungen, als auch ein Verlust der emotionalen Impulskontrolle. Die

motorischen Symptome bestehen aus Dysarthrie und Tremor. Zusätzlich kann es zur Entwicklung einer Koordinationsstörung der oberen Extremität v.a. der nicht-dominanten Hand und eventuell eines frühzeitigen Parkinson-Syndroms und Pyramidenbahnzeichen kommen (MENDEZ et al. 1995).

Das Krankheitsbild der Dementia pugilistica beschreibt den neuropathologischen Nachweis von zahlreichen Neurofibrillen ohne Vorhandensein von Plaques im Gegensatz zu der Vielzahl von Neurofibrillen und Plaques, die man der Alzheimer Demenz zuordnen kann (CORSELLIS et al. 1973).

Auch können sich im Rahmen jahrelangen Boxens CT-diagnostisch fassbare morphologische Veränderungen wie Hirnatrophie und auch messbare EEG-Veränderungen entwickeln (KASTE et al. 1982).

Aber nicht nur Boxen, das zu einer Vielzahl von repetitiven milden oder auch schwereren Schädel-Hirn-Traumen führt, sondern auch andere Sportarten, die zu Schlägen gegen den Schädel führen können, wie z.B. Fußball, können zu einem chronischen traumatischen Hirntrauma führen. CORSELLIS et al. (1976) beschrieben bei Fußballspielern eine traumatische Enzephalopathie, die der in Boxern festgestellten Enzephalopathie sehr ähnlich ist.

MATSER et al. (1998 und 1999) konnten auch eine neuropsychologische Wirkung des repetitiven Traumas bei Fußballspielern erkennen. Sie zeigten eine signifikant schlechtere Verarbeitung von neuropsychologischen Tests bei den Fußballspielern im Vergleich zu einer Sportlergruppe, die keinen Schädel-Hirn-Traumen ausgesetzt ist.

Dagegen konnten JORDAN et al. (1996) bei einer Untersuchung an Fußballspielern des U.S. National-Teams keinen Zusammenhang zwischen der repetitiven Schädel-Hirn-Schädigung und morphologischen Veränderungen im MRT bzw. der Verarbeitung neuropsychologischer Tests feststellen.

Als letztes wichtiges klinisches Syndrom als Folge repetitiver Schädel-Hirn-Traumata ist das Shaken-Baby-Syndrom zu nennen.

1972 wurde von CAFFEY erstmals die Bezeichnung Shaken-Baby-Syndrom verwendet. Er verwies auf die nicht unfallverursachte Genese

des Traumas und unterstrich die Rolle eines gewaltsamen Schüttelns des Opfers als Ursprung von intrakraniellen und okulären Blutungen.

Studien vermitteln, dass das ursächliche Schütteln nicht unbedingt ein länger anhaltendes Ereignis sein muss, sondern auch nur einen kurzen Moment andauern kann (MONTELEONE et al. 1994).

Es kann als nur einmaliges Ereignis vorkommen mit rasch einsetzenden fatalen Konsequenzen oder es kommt zu immer wiederkehrenden Vorfällen über Tage, Wochen oder Monate.

Das charakteristische Bild des Schädeltraumas im Rahmen des Shaken-Baby-Syndroms besteht in einer Blutung im Raum zwischen Dura mater und Arachnoidea, die ein subdurales Hämatom bildet.

Das klinische Erscheinungsbild kann akut, subakut oder chronisch sein, abhängig von Größe der Blutung, dem Vorhandensein zusätzlicher Verletzungen und der Dauer zwischen Blutungsbeginn und medizinischer Intervention.

Typischerweise ist die Blutung im hinteren Interhemisphärenspalt lokalisiert oder entlang der cerebralen Konvexität und befindet sich oft bilateral. Wird eine bestimmte Größe erreicht, kann es zu einem Midline-Shift mit Bewusstseinsstörungen kommen, im Extremfall sogar zur Herniation mit folgendem Koma und Tod.

Zusätzlich kommt es auch zu Verletzungen des Hirnparenchyms selbst, die lokal oder diffus verteilt sein können. Die Parenchymverletzung entsteht als Folge diffuser axonaler Schädigung durch direkte Kontusion des Gehirnparenchyms und wird eventuell noch verstärkt durch eine sekundäre ischämische Schädigung infolge Apnoe.

Alleine diese drei klinischen Beispiele verdeutlichen die Tatsache, dass ein multiples repetitives Schädel-Hirn-Trauma kein rein experimentelles Konstrukt ist, sondern sehr wohl in der Praxis vorkommt. Der zum Teil sehr schwere Verlauf eines solchen repetitiven Traumas, auch bei geringer Intensität, wie anhand des Second Impact Syndroms geschildert, unterstreicht die Bedeutung, die pathophysiologischen Vorgänge im Rahmen des repetitiven Schädel-Hirn-Traumas zu erforschen, um die äußerst komplexen Vorgänge verstehen zu lernen, damit die klinische Versorgung und das Outcome der Patienten optimal gestalten werden können.

5.9 SCHLUSSFOLGERUNGEN

1. Nach einem corticalen Controlled Cortical Impact Injury kommt es zu deutlichen und tiefgreifenden Veränderungen im cerebralen Energiestoffwechsel.
2. Die Veränderungen der Konzentrationen der gemessenen Metabolite ATP, Glucose und Laktat weisen ein Muster auf, wie es im Rahmen ischämischer Läsionen des Gehirns beobachtet werden kann.
3. Laktat zeigte von allen drei Metaboliten die früheste signifikante Veränderung mit einem Anstieg und könnte daher als Frühindikator für die Störung des cerebralen Stoffwechsels als Nachweis eines anaeroben Stoffwechsels angesehen werden.
4. Da die gemessenen Veränderungen auch kontralateral ausgeprägt sind, jedoch mit stärkeren Veränderungen auf der Traumaseite, könnte man rückschließen, dass es nach Trauma zu einer global cerebralen Reaktion kommt, die ipsilateral akzentuiert ist.

5. Im Vergleich zwischen singulärem und repetitivem Schädel-Hirn-Trauma gleicher Intensität zeigt sich eine deutlichere metabolische Alteration im Rahmen des doppelten Traumas. Das könnte bedeuten, daß es nach mehreren Traumen zu Summationseffekten der Schädigung kommt.

6. Die metabolischen Veränderungen dauern länger als 24 Stunden, lassen aber bis zum Zeitpunkt von 48 Stunden nach Trauma eine teilweise Reversibilität der pathologischen Vorgänge erkennen.

6. Literatur

1. ALLEN GV, GERAMI D., ESSER MJ: Conditioning effects of repetitive mild neurotrauma on motor function in an animal model of focal brain injury.
Neuroscience 2000;99(1):93-105
2. AIKAWA JK: Magnesium: Its biological significance.
Boca Raton: CRC Press 1981
3. ALESSANDRI B, DOPPENBERG E, BULLOCK R, WOODWARD J, CHOI S, KOURA S, YOUNG HF: Glucose and lactate metabolism after severe human head injury: influence of excitatory neurotransmitters and injury type.
Acta Neurochir Suppl (Wien) 1999;75:21-4

4. ALTURA BM, ALTURA BT, GEBREWOLD A, ISING H, GUNTER T: Magnesium deficient diets and microcirculatory changes in situ. Science 1984;223:1315-1317
5. ASTRUP J, REHNCRONA S, SIESJÖ BK: The increase in extracellular potassium concentration in the ischemic brain in relation to the preischemic functional activity and cerebral metabolic rate. Brain Res 1980;199:161-174
6. BAKER AJ, MOULTON RJ, MACMILLAN VH, SHEDDEN PM: Excitatory amino acids in cerebrospinal fluid following traumatic brain injury in humans. J Neurosurg 1993 Sep;79(3):369-72
7. BAREYRE F, WAHL F, MCINTOSH TK, STUTZMANN JM: Time course of cerebral edema after traumatic brain injury in rats: effects of riluzole and mannitol. J Neurotrauma 1997 Nov;14(11):839-49
8. BARTNIK BL, KENDALL EJ, OBENAU A: Cortical devascularization: quantitative diffusion weighted magnetic resonance imaging and histological findings. Brain Res 2001 Oct 12; 915(2):133-42
9. BARZO P, MARMAROU A, FATOUROS P, HAYASAKI K, CORWIN F: Biphasic pathophysiological response of vasogenic and cellular edema in traumatic brain swelling. Acta Neurochir Suppl (Wien) 1997;70:119-22
10. BETZ AL, FIRTH JA, GOLDSTEIN GW: Polarity of the blood-brain barrier: distribution of enzymes between the luminal and antiluminal membranes of brain capillary endothelial cells. Brain Res 1980 Jun 16;192(1):17-28

11. BETZ AL: Sodium transport in capillaries isolated from rat brain.
J Neurochem 1983 Oct;41(4):1150-7
12. BETZ AL: Epithelial properties of brain capillary endothelium.
Fed Proc 1985 Jul;44(10):2614-5
13. BOROWSKY IW, COLLINS RC: Metabolic anatomy of brain: a comparison of regional capillary density, glucose metabolism and enzyme activities.
J Comp Neurol 1989;15,288:401-13
14. BOURKE RS, KIMELBERG HK, WEST CR, BREMER AM: The effect of HCO₃ on the swelling and ion uptake of monkey cerebral cortex under conditions of raised extracellular potassium.
J Neurochem 1975;25:323-328
15. BOYESON MG, KROBERT KA, SCHERER PJ, GRADE CM: Reinstatement of motor deficits in recovered brain-injured animals: the role of cerebellar norepinephrine.
Restor Neurol Neurosci 1993;5:283-290
16. BRADBURY MW, CSERR HF, WESTROP RJ: Drainage of cerebral interstitial fluid into deep cervical lymph of the rabbit.
Am J Physiol 1981;240:329-336
17. BRIGHTMAN MW, REESE TS: Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain.
J Cell Biol 1969 Mar;40(3):648-77
18. BRYAN RM JR, CHERIAN L, ROBERTSON C: Regional cerebral blood flow after controlled cortical impact injury in rats.

Anesth Analg 1995 Apr;80(4):687-95

19. BUCZEK M, RATCHESON RA, LUST WD, MCHUGH M, PAPPYUS HM: Effects of focal cortical freezing lesion on regional energy metabolism. J Cereb Blood Flow Metab 1991 Sep;11(5):845-51
20. CAFFEY J: On the theory and practice of shaking infants. Its potential residual effects of permanent brain damage and mental retardation. Am J Dis Child. 1972 Aug; 124(2):161-9
21. CANTU RC: Second-Impact Syndrome Clin Sports Med 1998 Jan;17(1):37-44
22. CHEN T, QIAN YZ, DI X, RICE A, ZHU JP, BULLOCK R: Lactate/glucose dynamics after rat fluid percussion brain injury. J Neurotrauma 2000 Feb; 17(2):135-42
23. CHEN Y, CONSTANTINI S, TREMBOVLER V, WEINSTOCK M, SHOHAMI E: An experimental model of closed head injury in mice: pathophysiology, histopathology, and cognitive deficits. J Neurotrauma 1996 Oct;13(10):557-68
24. CHERIAN L, ROBERTSON CS, CONTANT CF JR, BRYAN RM JR: Lateral cortical impact injury in rats: cerebrovascular effects of varying depth of cortical deformation and impact velocity. J Neurotrauma 1994 Oct;11(5):573-85
25. CLASEN RA, COOKE PM, TYLER S, PANDOLFI S: Changes in intracerebral NaCl and water associated with experimental cerebral edema. J Neuropathol 1960;19:164-165

26. CORSELLIS JA, BRUTON CJ, FREEMAN-BROWNE D : The aftermath of boxing.
Psychol Med. 1973 Aug; 3(3):270-303
27. CORSELLIS JA : Brain damage in sport.
Lancet 1976; 1:401-402
28. DAVSON H, POLLAY M: Influence of various drugs on the transport of ¹³¹I and PAH across the cerebrospinal fluid-blood barrier.
J Physiol (Lond) 1963;167:239-246
29. DERMIETZEL R, KRAUSE D: Molecular anatomy of the blood-brain barrier as defined by immunocytochemistry.
Int Rev Cytol 1991;127:57-109
30. DHILLON HS, DONALDSON D, DEMPSEY RJ, PRASAD MR: Regional levels of free fatty acids and Evans blue extravasation after experimental brain injury.
J Neurotrauma 1994 Aug;11(4):405-15
31. DIETRICH WD, ALONSO O, BUSTO R, PRADO R, ZHAO W, DEWANJEE MK, GINSBERG MD: Posttraumatic cerebral ischemia after fluid percussion brain injury: an autoradiographic and histopathological study in rats.
Neurosurgery 1998 Sep;43(3):585-594
32. DIXON CE, CLIFTON GL, LIGHTHALL JW: A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat.
J Neurosci Methods 1991;39:253-262
33. ENGLER RL, SCHMID-SCHONBEIN GW, PAVELEC RS : Role of leukocytes in response to acute myocardial ischemia and reflow in dog.
Am J Physiol 1986;251:H314

34. ERISKAT J, FURST M, STOFFEL M, BAETHMANN A: Correlation of lesion volume and brain swelling from a focal brain trauma.
Acta Neurochir Suppl 2003;86:265-6
35. FEENEY DM, HOVDA DA: Reinstatement of binocular depth perception by amphetamine and visual experience after visual cortex ablation.
Brain Res 1985;342:352-356
36. FEENEY DM, SUTTON RL: Pharmacotherapy for recovery of function after brain injury.
CRC Crit Rev Neurobiol 1987;3:135-197
37. FISHMAN RA: Brain Edema
N Engl J Med 1975;293:706-711
38. FOLBERGROVA J, MEMEZAWA H, SMITH ML, SIESJÖ BK: Focal and perifocal changes in tissue energy state during the cerebral artery occlusion in normo- and hyperglycaemic rats.
J Cereb Blood Flow Metab 1992;12:25-33
39. FRANKLIN K, PAXINOS G: The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates.
Academic Press, 2001
40. GARFINKEL L, GARFINKEL D: Magnesium regulation of the glycolytic pathway and the enzymes involved.
Magnesium 1985;14:60-72
41. GOBIET W, GROTE W, BOCK WJ: The relation between intracranial pressure, mean arterial pressure and cerebral blood flow in patients with severe head injury.
Acta Neurochir (Wien) 1975;32(1-2):13-24
42. GOLDING EM, ROBERTSON CS, FITCH JC, GOODMAN JC, BRYAN RM JR: Segmental vascular resistance after mild controlled cortical im-

pact injury in the rat.

J Cereb Blood Flow Metab 2003 Feb;23(2):210-8

43. GOLDSTEIN GW, BETZ AL: Recent advances in understanding brain capillary function.
Ann Neurol 1983 Oct;14(4):389-95
44. GOLDSTEIN GW, BETZ AL, BOWMAN PD, DOROVINI-ZIS K: In vitro studies of the blood-brain barrier using isolated brain capillaries and cultured endothelial cells.
Ann NY Acad Sci 1986;481:202-13
45. GOLDSTEIN LB, DAVIS JN: Clonidine impairs recovery of beam-walking after a sensorimotor cortex lesion in the rat.
Brain Res 1990;508:305-309
46. GOLDSTEIN LB, DAVIS JN: Influence of lesion size and location on amphetamine-facilitated recovery of beam-walking in rats.
Behav Neurosci 1990;104:320-327
47. HÄGGENDAL E, JOHANSSON B: Effect of increased intravascular pressure on the blood-brain barrier to protein in dogs.
Acta Neurol Scand 1972;48:271-5
48. HAMILL RW, WOOLF PD, MCDONALD JV, LEE LA, KELLY M: Catecholamines predict outcome in traumatic brain injury.
Ann Neurol 1987;21:438-443
49. HANSSON E, BLOMSTRAND F, KHATIBI S, OLSSON T, RONNBACK L: Glutamate induced astroglial swelling – methods and mechanisms.
Acta Neurochir Suppl (Wien) 1997;70:148-51
50. HAWKINS RA, PETERSON DR, VINA JR: The complementary membranes forming the blood-brain barrier.

IUBMB Life 2002 Sep;54(3):101-7

51. HEADRICK JP, BENDALL MR, FADEN AL, VINK R: Dissociation of adenosine levels from bioenergetic state after experimental brain trauma: potential role in secondary brain injury.
J Cereb Blood Flow Metab. 1994 Sep; 14(5):853-61
52. HERTZ L, DITTMANN L, MANDEL P: K⁺-induced stimulation of oxygen uptake in cultured cerebral glial cells.
Brain Res 1973;60:517-520
53. HERTZ L: Astrocytes
Handbook of neurochemistry. New York: Plenum Press 1982;319-355
54. JIANG XB, OHNO K, QIAN L, TOMINAGA B, KUROIWA T, NARIAI T, HIRAKAWA K: Changes in local cerebral blood flow, glucose utilization, and mitochondrial function following traumatic brain injury in rats.
Neurol Med Chir (TOKYO) 2000 Jan;40(1):16-28; discussion 28-9
55. JORDAN SE, GREEN GA, GALANTY HL, MANDELBAUM BR, JABOUR BA: Acute and chronic brain injury in United States national team soccer players.
Am J Sports Med 1996 Mar-Apr;24(2):205-10
56. KANAYAMA G, MASATOSHI T, HISAYOSHI N, YASUMITSU I; HISASHI T, NORIO T, TAKASHI K, YASUYUKI M, TAKASHI M, TSUYASHI N: The effects of repetitive mild brain injury on cytoskeletal protein and behavior.
Meth Pind Exp Clin Pharmacol 1996; 18(2):105-115
57. KASTE M, VILKKI J, SAINIO K, KUURNE T, KATEVUO K, MEURALA H: Is chronic brain damage in boxing a hazard of the past?
The Lancet 1982 Nov:1186-88

58. KATAYAMA Y, BECKER DP, TAMURA T, HOVDA DA: Massive increases in extracellular potassium and the indiscriminate release of glutamate following concussive brain injury.
J Neurosurg 1990;73:889-900
59. KATZMAN R, HUSSEY F: A simple constant-infusion manometric test for measurement of CSF absorption. I. Rationale and method.
Neurology 1970;20:534-544
60. KAWAMATA T, KATAYAMA Y, HOVDA DA, YOSHINO Y, BECKER DP: Administration of excitatory amino acid antagonists via microdialysis attenuates the increase in glucose utilization seen following concussive brain injury.
J Cereb Blood Flow Metab 1992; 12:12-24
61. KAWAMATA T, KATAYAMA Y, HOVDA DA, YOSHINO A, BECKER DP: Lactate accumulation following concussive brain injury: the role of ionic fluxes induced by excitatory amino acids.
Brain Res 1995;674:196-204
62. KEEP RF, XIANG J, BETZ AL: Potassium transport at the blood-brain and blood-CSF barriers.
Adv Exp Med Biol 1993;331:43-54
63. KIMELBERG HK, BIDDLECOME S, BOURKE RS: SITS-inhibitable C1 transport and Na-dependent H production in primary astroglial cultures.
Brain Res 1979; 173:111-124
64. KLATZO I: Neuropathological aspects of brain edema.
J Neuropath Exp Neurol 1967; 26(1);1-13
65. KOBAYASHI H, MAGNONI MS, GOVONI F, IZUMI F, WADA A, TRABUCCHI M: Neuronal control of brain vascular vessel function.
Experientia 1985;41:427-558

66. KOCHANЕК PM, MARION DW, ZHANG W, SCHIDING JK, WHITE M, PALMER AM, CLARK RS, O'MALLEY ME, STYREN SD, HO C: Severe controlled cortical impact in rats: assessment of cerebral edema, blood flow, and contusion volume.
J Neurotrauma 1995 Dec;12(6):1015-25
67. KOGURE K, ALONSO OF: A pictorial representation of endogenous brain ATP by a bioluminescent method.
Brain Res 1978;154:273-84
68. KOZUKA M: Changes in brain energy metabolism, neurotransmitters, and choline during and after incomplete cerebral ischemia in spontaneously hypertensive rats.
Neurochem Res 1995;20(1):23-30
69. KRISHNAPPA IK, CONTANT CF, ROBERTSON CS: Regional changes in cerebral extracellular glucose and lactate concentrations following severe cortical impact injury and secondary ischemia in rats.
J Neurotrauma 1999;16(3):213-224
70. KROPPESTEDT SN, KERN M, THOMALE UW, SCHNEIDER GH, LANKSCH WR, UNTERBERG AW: Effect of cerebral perfusion pressure on contusion volume following impact injury.
J Neurosurg 1999 Mar;90(3):520-6
71. LAURER HL, BAREYRE FM, LEE VM, TROJANOWSKI JQ, LONGHI L, HOVDA R, SAATMAN KE, RAGHUPATHI R, HOSHINO S, GRADY MS, MCINTOSH TK: Mild head injury increasing the brain's vulnerability to a second concussive impact.
J Neurosurg 2001 Nov; 5(5):859-70
72. LIGHTHALL JW: Controlled cortical impact: a new experimental brain injury model.
J Neurotrauma 1988; 5(1):1-15

73. LIGHTHALL JW, DIXON CE, ANDERSON TE: Experimental models of brain injury.
J Neurotrauma 1989;6(2):83-97
74. LIMBRICK DD JR, SOMBATI S, DELORENZO RJ: Calcium influx constitutes the ionic basis for the maintenance of glutamate-induced extended neuronal depolarization associated with hippocampal cell death.
Cell Calcium 2003 Feb;33(2):69-81
75. LÖFFLER G, PETRIDES P: Biochemie und Pathobiochemie
Springer Verlag, 1998
76. LOWRY OH, PASSONNEAU JV: A flexible system of enzymatic analysis.
New York, Academic Press 1972; 123-124
77. MADISON DV, NICOLL RA: Actions of noradrenaline recorded intracellularly in rat hippocampal CA₁ pyramidal neurons in vitro.
J Physiol (Lond) 1986;372:221-244
78. MATSER JT, KESSELS AG, LEZAK MD, JORDAN BD, TROOST J: Neuropsychological impairment in amateur soccer players.
JAMA 1999;282:971-973
79. MATSER JT, KESSELS AGH, JORDAN BD, LEZAK MD, TROOST J: Chronic traumatic brain injury in professional soccer players.
Neurology 1998;51:791-796
80. MAUTES AE, THOME D, STEUDEL WI, NACIMIENTO AC, YANG Y, SHOHAMI E: Changes in regional energy metabolism after closed head injury in the rat.
J Mol Neurosci 2001 Feb;16(1):33-9
81. MCCRORY PR, BERKOVIC SF: Second impact syndrome.

Neurology 1998;50:677-683

82. MCINTOSH TK, SOARES H, THOMAS M, CLOHERTY K: Development of regional cerebral oedema after lateral fluid-percussion brain injury in the rat.
Acta Neurochir Suppl (Wien) 1990;51:263-4
83. MCINTOSH TK, YU T, GENNARELLI TA: Alterations in regional brain catecholamine concentrations after experimental brain injury in the rat.
J Neurochem 1994 Oct;63(1):1426-33
84. MEINIG G, REULEN HJ, MAGAWLY C, ZOLLNER EJ: Brain energy metabolism in global brain oedema.
Acta Neurochir (Wien) 1978;41(4):273-86
85. MENDEZ MF: The neuropsychiatric aspects of boxing.
Int J Psychiatry Med 1995;25(3):249-62
86. MONTELEONE JA, BRODEUR AE: Child Maltreatment : A Clinical Guide and Reference:
St. Louis, MO: G.W. Medical Publishing, 1994
87. NACIMIENTO AC, ADLER G, MAUTES AE: Regional changes in glucose and ATP contents following experimental spinal cord compression trauma in the rat.
Soc Neurosc Abstr 1988; 14
88. NILSSON P, HILLERED L, PONTEN U, UNGERSTEDT U: Changes in cortical extracellular levels of energy-related metabolites and amino acids following concussive brain injury in rats.
J Cereb Blood Flow Metab 1990 Sep;10(5):631-7

89. NILSSON P, HILLERED L, OLSSON Y, SHEARDOWN MJ, HANSEN AJ : Regional changes in interstitial K⁺ and Ca²⁺ levels following cortical compression contusion trauma in rats.
J Cereb Blood Flow Metab 1993; 13:183-192
90. NILSSON P, GAZELIUS B, CARLSON H, HILLERED L: Continuous measurement of changes in regional cerebral blood flow following cortical compression continuous trauma in the rat.
J Neurotrauma 1996 Apr;13(4):201-7
91. PALMER AM, MARION DW, BOTSCHELLER ML, SWEDLOW PE-STYREN SD, DEKOSKY ST: Traumatic brain injury-induced excitotoxicity assessed in a controlled cortical impact model.
J Neurochem 1993; 61:2015-2024
92. PARDRIDGE WM: Blood-brain barrier biology and methodology.
J Neurovirol 1999 Dec;5(6):556-69
93. PASCHEN W, NIEBUHR I, HOSSMANN KA: A bioluminescence method for the demonstration of regional glucose distribution in brain slices.
J Neurochem 1981;36:513-7
94. PASCHEN W: Regional quantitative determination of lactate in brain sections. A bioluminescent approach.
J Cereb Blood Flow Metab 1985; 5:609-612
95. PASCHEN W: Imaging of energy metabolites (ATP, glucose and lactate) in tissue sections: a bioluminescent technique.
Prog Histochem Cytochem 1990;20:1-122
96. PASSONNEAU JV, HAWKINS RA, LUST WD, WELSH F : Cerebral Metabolism and Neural Function.

Williams & Wilkins, Waverly Press Inc., 1980

97. PFENNINGER EG, REITH A, BREITIG D, GRUNERT A, AHNEFELD FW: Early changes of intracranial pressure, perfusion pressure, and blood flow after acute head injury. Part 1: An experimental study of the underlying pathophysiology.
J Neurosurg 1989 May;70(5):774-9
98. PIEK J, CHESNUT RM, MARSHALL LF, VAN BERKUM-CLARK M, KLAUBER MR, BLUNT BA, EISENBERG HM, JANE JA, MARMAROU A, FOULKES MA: Extracranial complications of severe head injury.
J Neurosurg 1992; 77:901-907
99. PLESNILA N, FRIEDRICH D, ERISKAT J, BAETHMANN A, STOFFEL M: Relative cerebral blood flow during the secondary expansion of a cortical lesion in rats.
Neurosci Lett 2003 Jul 17;345(2):85-8
100. POLLAY M, ROBERTS PA: Blood-brain barrier: a definition of normal and altered function.
Neurosurgery 1980 Jun;6(6):675-85
101. PONTEN U, RATCHESON RA, SALFORD LG, SIESJÖ BK: Optimal freezing condition for cerebral metabolites in rats.
J Neurochem 1973;21:1127-38
102. PRASAD MR, RAMAIAH C, MCINTOSH TK, DEMPSEY RJ, HIPKENS S, YUREK D: Regional levels of lactate and norepinephrine after experimental brain injury.
J Neurochem 1994 Sep;63(3):1086-94
103. PRAT R, MARKIV V, DUJOVNY M, MISRA M: Failure of cerebral auto-

regulation in an experimental diffuse brain injury model.

Acta Neurochir Suppl (Wien) 1998;71:123-6

104. PULSINELLI WA, LEVY DE, DUFFY TE: Regional cerebral blood flow and glucose metabolism following transient forebrain ischemia.
Ann Neurol 1982 May;11(5):499-502
105. REESE TS, KARNOVSKY MJ: Fine structural localization of blood brain barrier to exogenous peroxidase.
J Cell Biol 1967;34:307-317
106. RISAU W, WOLBURG H : Development of the blood-brain barrier.
Trends Neurosci 1990 May; 13(5):174-8
107. ROBERTSON CS, CLIFTON GL, GROSSMAN RG, OU CN, GOODMAN JC, BORUM P, BEJOT S, BARRODALE P: Alterations in cerebral availability of metabolic substrates after severe head injury.
J Trauma 1988 Nov;28(11):1523-32
108. ROSE ME, HUERBIN MB, MELICK J, MARION DW, PALMER AM, SCHIDING JK, KOCHANNEK PM, GRAHAM SH: Regulation of interstitial excitatory amino acid concentrations after cortical contusion injury.
Brain Res 2002 May 10;935(1-2):40-6
109. ROSENBERG GA, KYNER WT, ESTRADA E: Bulk flow of brain interstitial fluid under normal and hyperosmolar conditions.
Am J Physiol 1980 Jan;238(1):F42-9
110. ROSENBERG GA, KYNER WT: Gray and white matter brain-blood transfer constants by steady-state tissue clearance in cat.
Brain Res 1980 Jul 7;193(1):59-66
111. ROSENBERG GA: Brain fluids and metabolism.

Oxford, University Press, 1990

112. SAUNDERS RL, HARBAUGH RE: The second impact in catastrophic contact-sports head trauma.
JAMA 1984 Jul 27;252(4):538-39
113. SCHELP AO, BURINI RC: Cerebral glucose metabolism in craniocerebral trauma. An evaluation.
Arq Neuropsiquiatr. 1995 Sep;53(3-B):698-705
114. SCHMIDT CF: Cerebral blood supply and cerebral oxidative metabolism, in DICKENS F, NEIL E (eds): Oxygen in the Animal Organism.
London, Pergamon Press 1964;433
115. SCHMOKER JD, SHACKFORD SR, ZHUANG J: The effect of lesion volume on cerebral vasomotor tone after focal brain injury and shock.
J Neurotrauma 1996 Feb;13(2):67-78
116. SCHNEIDER G, FIES P, WAGNER-JOCHEM D, THOME D, LAURER H, KRAMANN B, MAUTES A, HAGEN T: Pathophysiological changes after traumatic brain injury: comparison of two experimental animal models by means of MRI.
Magnetic Materials in Physics, Biology and Medicine 2002;14:233-41
117. SCREMIN OU, LI MG, JENDEN DJ : Cholinergic modulation of cerebral cortical blood flow changes induced by trauma.
J Neurotrauma 1997; 14:573-586
118. SHAPIRA Y, SHOHAMI E, SIDI A, SOFFER D, FREEMAN S, COTEV S: Experimental closed head injury in rats: Mechanical pathophysiologic and neurologic properties.
Crit Care Med 1998; 16:258-265

119. SHAR K, WEST M : The effect of concussion on cerebral uptake of 2-deoxy-d-glucose in rat.
Neurosci Lett 1983; 40:287-291
120. SHREIBER DI, BAIN AC, ROSS DT, SMITH DH, GENNARELLI TA, MCINTOSH TK, MEANEY DF: Experimental investigation of cerebral contusion: histopathological and immunohistochemical evaluation of dynamic cortical deformation.
J Neuropathol Exp Neurol 1999 Feb;58(2):153-64
121. SIESJÖ BK: Brain energy metabolism.
New York, John Wiley and sons 1978
122. SIESJÖ BK: Cell damage to the brain: A speculative hypothesis.
J Cereb Blood Flow Metab 1981; 1:155-185
123. SMITH DH, SOARES HD, PIERCE JS, PERLMAN KG, SAATMAN KE, MEANEY DF, DIXON CE, MCINTOSH TK: A model of parasagittal controlled cortical impact in the mouse: cognitive and histopathologic effects.
J Neurotrauma 1995 Apr;12(2):169-78
124. SOKOLOFF L, REIVICH M, KENNEDY C, DES ROSIERS MH, PATLAK CS, PETTIGREW KD, SKURADA O, SHINOHARA M: The [¹⁴C] deoxyglycose method for the measurement of local cerebral glucose utilisation: Theory, procedure and normal values in the conscious and anaesthetized Albino rat.
J Neurochem 1977;28:897-916
125. SOOD SC, GULATI SC, KUMAR M, KAK VK: Cerebral metabolism fol-

lowing brain injury. II. Lactic acid changes.
Acta Neurochir (Wien) 1980;53(1-2):47-51

126. STANTON PK, MODY I, HEINEMANN U: A role for N-methyl-D-aspartate receptors in norepinephrine-induced long-lasting potentiation in the dentate gyrus.
Exp Brain Res 1989;77:517-530
127. SUGAYA E, TAKATO M, NODA Y : Neuronal and glial activity during spreading depression in cerebral cortex of cat.
J Neurophysiol 1975; 38:822-841
128. SUTTON RL, HOVDA DA, ADELSON PD, BENZEL EC, BECKER DP:
Metabolic changes following cortical contusion: relationships to edema and morphological changes.
Acta Neurochir Suppl (Wien) 1994;60:446-8
129. TAKAHASHI H, TANAKA S, SANO K: Changes in extracellular potassium concentration in cortex and brain stem during the acute phase of experimental closed head injury.
J Neurosurg 1981; 55:708-717
130. TAYLOR AR, BELL TK: Slowing of cerebral circulation after concussional head injury.
The Lancet 1966 Jul 23;178-180
131. TORNHEIM PA, MCDERMOTT F, SHIGUMA M: Effect of experimental blunt head injury on acute regional cerebral blood flow and edema.
Acv Neurol 1990;52:377-84
132. UNTERBERG AW, ANDERSEN BJ, CLARKE GD, MARMAROU A:

- Cerebral energy metabolism following fluid-percussion brain injury in cats.
J Neurosurg 1988 Apr;68(4):594-600
133. UNTERBERG AW, STROOP R, THOMALE UW, KIENING KL, PAUSER S, VOLLMANN W: Characterisation of brain edema following “controlled cortical impact injury” in rats.
Acta Neurochir Suppl (Wien) 1997;70:106-8
134. URYU K , LAURER H, MCINTOSH T, PRATICO D, MARTINEZ D, LEIGHT S, LEE VM, TROJANOWSKI JQ : Repetitive mild brain trauma accelerates Abeta deposition, lipid peroxidation, and cognitive impairment in a transgenic mouse model of Alzheimer amyloidosis.
J Neurosci 2002 Jan 15 ;22(2) :446-54
135. VAN DEN BRINK WA, MARMAROU A, AVEZAAT CJ: Brain oedema in experimental closed head injury in the rat.
Acta Neurochir Suppl (Wien) 1990;51:261-2
136. VINK R, MCINTOSH TK, DEMEDIUK P, WEINER MW, FADEN AL : Decline in intracellular free Mg^{2+} is associated with irreversible tissue injury following brain trauma.
J Biol Chem 1988; 263:757-761
137. VINK R, GOLDING EM, HEADRICK JP: Bioenergetic analysis of oxidative metabolism following traumatic brain injury in rats.
J Neurotrauma 1994 Jun;11(3):265-74
138. WAGNER JA, ROBINSON S, MARINO RP: Age and temperature regulation of humans in neutral and cold environments.
J Appl Physiol 1974;37:562-5
139. WAGNER KR, TORNHEIM PA, EICHHOLD MK: Acute changes in re-

gional cerebral metabolite values following experimental blunt head trauma.

J Neurosurg 1985 Jul;63(1):88-96

140. WAYNFORTH HB: Experimental and surgical technique in the rat. 1. Rats as laboratory animals.
Academic Press, London, 1988
141. WEISS HR, MILTON EB: Role of α -adrenoceptors in the control of the cerebral blood flow response to hypoxia.
Eur J Pharmacol 1988; 148:107-113
142. WEISS SJ : Tissue destruction by neutrophils.
N Engl J Med 1989;320:365
143. WOERTGEN C, ROTHOERL RD, BRAWANSKI A : Neuron-specific enolase serum levels after controlled cortical impact injury in the rat.
J Neurotrauma 2001 May; 18(5):569-73
144. WOERTGEN C, ROTHOERL RD, WIESMANN M, MISSLER U, BRAWANSKI A: Glial and neuronal serum markers after controlled cortical impact injury in the rat.
Acta Neurochir Suppl 2002;81:205-7
145. XIONG Y, GO Q, PETERSON PL, MUIZELAAR JP, LEE CP: Mitochondrial dysfunction and calcium perturbation induced by traumatic brain injury.
J Neurotrauma 1997 Jan;14(1):23-24
146. YOSHINO A, HOVDA DA, KAWAMATA T, KATAYAMA Y, BECKER DP: Dynamic changes in local cerebral glucose utilization following cerebral concussion in rats: evidence of a hyper- and subsequent hypometabolic state.

Brain Res 1991 Oct 4;561(1):106-19

147. ZAUNER A, CLAUSEN T, ALVES OL, RICE A, LEVASSEUR J, YOUNG HF, BULLOCK R: Cerebral metabolism after fluid –percussion injury and hypoxia in a feline model.
J Neurosurg 2002 Sep;97(3):643-9
148. ZHUANG J, SHACKFORD SR, SCHMOKER JD, ANDERSON ML: The association of leukocytes with secondary brain injury.
J Trauma 1993 Sep;35(3):415-22

7. Danksagung

Frau PD Dr. rer. nat. A. Mautes danke ich für die Überlassung des Themas, für die Unterstützung und Beratung v.a. bei methodischen und statistischen Fragen.

Herrn Dipl. Ing. H. Ludt danke ich für seine Unterstützung in der Datenverarbeitung und bei statistischen Fragen.

Frau Welsch und Frau Hoffmann danke ich für die ausgezeichnete technische Assistenz, Herrn P. Hidiroglu bei der Bewältigung von diversen Problemen im Rahmen der Labortätigkeiten.

Curriculum vitae

Persönliche Daten

| | |
|---------------|--------------------|
| Name | Manville |
| Vorname | Jérôme Dominik |
| Geburtsdatum | 08. September 1976 |
| Geburtsort | Saarbrücken |
| Familienstand | verheiratet |

Ausbildung

| | |
|-------------------|--|
| 09/1983 – 07/1987 | Grundschule Ludweiler/Warndt |
| 09/1987 – 06/1996 | Warndtgymnasium Völklingen-Geislautern Abschluß: Allgemeine Hochschulreife, Note: 2,4 |
| 08/1996 – 06/1997 | Zivildienst bei der Rettungswache Völklingen als Rettungssanitäter |

| | |
|-------------------|--|
| 10/1997 | Immatrikulation an der Universität des Saarlandes Studiengang: Humanmedizin |
| 09/1999 | Ärztliche Vorprüfung, Note: 2,66 |
| 03/2001 | 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: 2,0 |
| 09/2002 | 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: 1,66 |
| 10/2002 – 02/2003 | 1. Tertial PJ, Universitätskliniken des Saarlandes - Klinik für Neurochirurgie - Klinik für Abdominalchirurgie |
| 03/2003 – 06/2003 | 2. Tertial PJ, Universitätskliniken des Saarlandes - Klinik für Innere Medizin, Gastroenterologie |
| 07/2003 – 10/2003 | 3. Tertial PJ, Universitätskliniken des Saarlandes - Klinik für Neurologie |
| 04/2004 | 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: 1,83 |

Wissenschaftliche Tätigkeit

| | |
|---------------------|---|
| 20. – 22. März 2003 | „Regionale Veränderungen des Energiestoffwechsels nach einer Äther-Narkose im heranwachsenden Rattengehirn“ J. Manville, W.-I. Steudel, AEM Mautes Neurologie & Rehabilitation, 2/2003, A FB.7 Vorgetragen auf der 30. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurotraumatologie und Klinische Neuropsychologie e.V. in Hannover. |
| 26. – 28. Mai 2003 | „Cortical changes of energy metabolites after CHI in toddlers“ D. München, J. Manville, W.-I. Steudel, AEM Mautes Vorgetragen auf der 54. Jahrestagung der DGNC in Saarbrücken |

- 09/2004 „Regional Energy Metabolism following Short-Term Neural Stem Cell Transplantation into the Injured Spinal Cord”
AEM Mautes, J. Liu, J. Brandwiede, J. Manville, E. Snyder, M. Schachner
J Mol Neurosci 2004;24(2):227-36
19. – 21. Mai 2005 „Regional Energy Metabolism after Spinal Cord Compression Injury and Stem Cell Transplantation”
J. Manville, M. Schachner, W.-I. Steudel, AEM Mautes
Vorgetragen auf dem 10. Kongress der EMN in Rotterdam
- Promotion “Regionale Energiestoffwechseleränderungen an Cortex und Subcortex der Maus nach repetitivem und singulärem Controlled-Cortical-Impact Injury. Eine Biolumineszenzuntersuchung.”
PD Dr. rer. nat. Angelika Mautes, Neurochirurgisches Forschungslaboratorium
Noch nicht abgeschlossen

Jetzige Tätigkeit

- 06/2004 – 09/2004 Arzt im Praktikum in der Klinik für Neurochirurgie der Universitätskliniken des Saarlandes unter Leitung von Prof. Dr. W.-I. Steudel

seit 10/2004

Assistenzarzt in der Klinik für Neurochirurgie der
Universitätskliniken des Saarlandes unter Leitung von
Prof. Dr. W.-I. Steudel

9. ANHANG

9.1 Histochemische Nachweisreaktionen und Enzymlösungen für die Biolumineszenz

1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung:

Für die Herstellung der Präparate werden die Objektträger entfettet und beschriftet

Ansetzen von Hämatoxylin nach Ehrlich:

2 g Hämatoxylin, 100 ml Isopropanol 96 % und 100 ml Aqua bidest

100 ml Glycerin 87%

3 g Kalialaun

10 ml Eisessig

Lösung mit Filterpapier bedeckt ein Jahr reifen lassen.

Färbevorgang:

1. 10 min bei Raumtemperatur trocknen
2. 10 min Fixation in Formol 10% bei pH 7.0
3. 2 mal in Leitungswasser spülen
4. 2 mal in Aqua dest spülen
5. 15 min in Hämatoxylin
6. 2 mal in Aqua dest spülen
7. 30 min unter fließendem Leitungswasser spülen
8. 2 mal in Aqua dest spülen
9. 5 min in Äthanol 96 %
10. 15 min in Eosin
11. 2 mal in Äthanol 70%, 96% und 100%
12. 2 mal in Xylol
13. mit Entellan eindecken

2. Enzymlösung für Glucose:

7 ml Phosphatpuffer 0.3 M pH 7.0

200 mg Gelatine

100 mg Glycerin 100

100 mg Polyvinylpyrrolidon auf 40° C erwärmen

150 ATP in 0.5 ml Phosphatpuffer 0.3 M pH 7.0

120 mg NADP in 0.5 ml Phosphatpuffer 0.3 M pH 7.0

20 µl Magnesiumchlorid 1 M zugeben und auf pH 7.0 einstellen

20 µl Dithiotreitol (DTT, 10mg/ml Phosphatpuffer 0.3 M pH 7.0)

200 µl Flavinmononukleotid (FMN, 2 mg/ml Phosphatpuffer
0.3 M pH 7.0)

30 µl Decanal (100 mg/ml Methanol) zugeben

Lösung A:

250 µl Hexokinase

75 µl Glucose-6-Phosphat zentrifugieren, Überstand verwerfen

0.5 ml Phosphatpuffer 0.3 M pH 7.0

Lösung B:

10 mg Luciferase in 1 ml Phosphatpuffer 0.3 M pH 7.0

10 mg FMN-Oxireduktase

Zuerst Lösung A, dann Lösung B zugeben. Lösung in Formen geben und bei -80° C einfrieren.

3. Enzymlösung für Laktat:

8 ml Phosphatpuffer 0.3 M pH 7.0

0.05 M Glutamat pH 7.0

200 mg Gelatine

100 mg Glycerin

100 mg Polyvinylpyrrolidon

250 mg NAD

500 μ l Phosphatpuffer 0.3 M pH 7.0

pH auf 7.0 einstellen

20 μ l Decanal (100 mg/ml Methanol)

200 μ l FMN (2 mg/ml Phosphatpuffer 0.3 M pH 7.0)

20 μ l DTT (10 mg/ml Phosphatpuffer 0.3 M pH 7.0)

Lösung A:

200 μ l LDH (10 mg/ml Phosphatpuffer 0.3 M pH 7.0)

Zentrifugieren und Rückstand mit 0.5 ml Phosphatpuffer 0.3 M pH 7.0

mischen

Lösung B:

500 μ l Glutamat-Pyruvat-Transaminase (10 mg/ml Phosphatpuffer 0.3 M pH 7.0)

Zentrifugieren und Überstand mit 0.5 ml Phosphatpuffer 0.3 M pH 7.0 mischen

Lösung C:

10 mg Luciferase in 1 ml Phosphatpuffer 0.3 M pH 7.0

10 mg FMN Oxireduktase

Lösungen A, B und C der Reihe nach zugeben. Lösung in Formen gießen und bei -80°C einfrieren.

4. Enzymlösung für ATP:

10 ml HEPES-Arsenatpuffer

200 mg Gelatine

100 mg Glycerin

100 mg Polyvinylpyrrolidon 40 bei 50°C lösen und abkühlen lassen.

220 mg FFT (Firefly Lanterns) zu Pulver mörsern und zugeben. 3 mal homogenisieren, auf Eppendorfgefäße verteilen und 2 mal 2 Minuten lang zentrifugieren. Überstand in ein Gefäß mit $20\ \mu\text{l}$ Magnesiumchlorid 1 M pipettieren und 10 bis 15 Minuten im Kühlschrank aufbewahren. Bei -80°C einfrieren.

5. Liste der verwendeten Chemikalien:

Acteon

Arsenatpuffer Sigma Nr. FF-AS-100

ATP Serva Nr. 10920

Decanal Serva Nr. 18150

DTT Sigma Nr. D 9779

Einbettmedium Jung Nr. 0201 08926

Eisessig

Entellan Merck Nr. 7961

Eosin

FMN Sigma Nr. F 8399

FMN-Oxireduktase Boehringer Nr. 476480
Gelatine Serva Nr. 22151
Glukose-6-Phosphat Boehringer Nr. 125663
Glutamat-Pyruvat-Transaminase Boehringer Nr. 737127
Glycerin Merck Nr. 4091
Hämatoxylin Merck Nr. 4305
Hepes Sigma Nr. H 3375
Hexokinase Boehringer Nr. 127183
Kalialaun
LDH Boehringer Nr. 107077
Luciferase Sigma Nr. L 8507
Magnesiumchlorid
NAD Boehringer Nr. 128040
Phosphatpuffer 0.3 M pH 7.0
Polyvinylpyrolidon 40 Sigma Nr. PVP 40
Rodinal
Tetenal Superfix
Xylol Merck Nr. 8685

9.2 Funktion zur Berechnung der optischen Dichte

$$\text{Optische Dichte} = \frac{-\log_{10} \text{ gemessener Grauwert}}{\text{Referenzgrauwert}}$$

Referenzgrauwert:

Mittelwert der Graumessungen der vier Filmecken. Da die Filme in ihrer Lichtdurchlässigkeit nicht einheitlich sind, wurde dieser Wert für jeden Biolumineszenzfilm individuell bestimmt, und die Messwerte in obiger Gleichung auf den so ermittelten Referenzwert bezogen.