

Aus dem Institut für Neurochirurgische Pathophysiologie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Zeitliche Auswirkungen von Ethylpyruvat auf den High-mobility-group-box-1 Signalweg und
die Aktivierung von Glyoxalase-I nach kontrollierter kortikaler Hirnverletzung bei der Ratte

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

David Heimpel
aus Wiesbaden

Mainz, 2020

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

06. Juli 2021

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis	VII
1. Einleitung	1
2. Stand der Forschung	3
2.1. Ätiologie und Epidemiologie	3
2.2. Definition Schädelhirntrauma	3
2.3. Präklinische und klinische Versorgung.....	4
2.4. Pathophysiologie des Schädelhirntraumas	5
2.4.1. Astrozyten	9
2.4.2. Mikroglia.....	10
2.4.3. Hyperglycolyse und AGE	11
2.4.4. Glyoxalase und Methylglyoxal	12
2.4.5. Inflammation, DAMPs und HMGB1	12
2.5. Ethylpyruvat.....	13
2.6. Ziele der Untersuchung	16
3. Material und Methoden	17
3.1. Gruppeneinteilung und Behandlung der Versuchstiere.....	17
3.1.1. Induktion des CCI	17
3.2. Probenvorbereitung für die Immunhistochemie (IHC)	18
3.2.1. Euthanasie und Gehirnentnahme.....	18
3.2.2. Schneiden der Gehirne	19
3.3. Färbungen.....	20
3.3.1. HE-Färbung.....	20
3.3.2. IHC-Färbung HMGB 1, RAGE und Glo1.....	21
3.3.3. IHC-Färbung GFAP und Iba1	24
3.4. Volumetrie.....	25
3.5. Immunhistochemische Auswertung	28
3.6. Statistische Auswertung	29
4. Ergebnisse.....	32
4.1. Läsionsvolumetrie	32
4.2. HMGB1	34

4.2.1.	Immunoreaktive Fläche HMGB1	34
4.2.2.	HMGB1 positive Zellen	37
4.3.	RAGE	38
4.3.1.	Immunoreaktive Fläche RAGE	38
4.3.2.	RAGE positive Zellen	41
4.4.	Glo1	42
4.4.1.	Immunoreaktive Fläche Glo1	42
4.4.2.	Glo1 positive Zellen	44
4.5.	GFAP	45
4.5.1.	Immunoreaktive Fläche GFAP	45
4.5.2.	GFAP positive Zellen	47
4.6.	Iba1	48
4.6.1.	Immunoreaktive Fläche Iba1	48
4.6.2.	Iba1 positive Zellen	51
5.	Diskussion	53
5.1.	Diskussion der Methoden	53
5.1.1.	CCI	53
5.1.2.	IHC	54
5.1.3.	Läsionsvolumen	55
5.2.	Diskussion der Ergebnisse	56
5.2.1.	Läsionsvolumen	56
5.2.2.	HMGB1	60
5.2.3.	RAGE	62
5.2.4.	Glo1	64
5.2.5.	Astrozyten	67
5.2.6.	Mikroglia	69
6.	Zusammenfassung	71
7.	Literaturverzeichnis	VI
8.	Anhang A: Tabellarische Auflistungen der Materialien und Methoden	XIV
8.1.	Versuchstiere	XIV
8.2.	Chemikalien	XIV
8.3.	Gebrauchsfertige Lösungen / Pharmaka	XV
8.4.	Antikörper	XVII
8.5.	Verbrauchsmaterialien	XVIII

Inhaltsverzeichnis

8.6. Geräte	XX
8.7. Hardware	XXI
8.8. Software	XXI
8.9. Verwendete Antikörper IHC-Färbungen.....	XXI
Danksagung	XXIII
Lebenslauf.....	XXIV

Abkürzungsverzeichnis

AGE	advanced glycation endproduct
AMPAR	α -Amino-3-OH-5-methyl-4isoxazol-Propionsäure-Rezeptor
AQP	Aquaporin
BHS	Bluthirnschranke
BWC	brain water content
bzw.	beziehungsweise
CAS-Nr.	Chemical Abstracts Service Nummer
CCI	controlled cortical impact
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CGRP	calcitonin-gene-related-peptide
CPP	Cerebraler Perfusionsdruck
CT	Computertomographie
d.	der
DAB	Diaminobenzidin
DAI	Diffuser Axonaler Schaden
DAMP	damage-associated molecular pattern
EP	Ethylpyruvat
etCO ₂	endtidales Kohlenstoffdioxid
EZR	Extrazellularraum
FPI	fluid percussion injury
GCS	Glasgow Coma Scale
GFAP	glial fibrillary acidic protein
Glo1	Glyoxalase 1
HE	Hämatoxylin-Eosin
Hemisphärenvol.	Hemisphärenvolumen
HMGB1	high-mobility group box 1
Iba1	ionized calcium binding adapter molecule
ICB	Intracerebrale Blutung
ICP	Intracranieller Druck
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
innerh.	innerhalb

iNOS	induzierbare NO-Synthase
IRF	Immunoreaktive Fläche
IZR	Intrazellularraum
Kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LPS	Lipopolysaccharid
MAC1	macrophage antigen 1
MG	Methylglyoxal
mmHG	Millimeter Quecksilbersäule
MMP	Matrix-Metallo-Protease
MMP	Matrix-Metallo-Protease
MW	molecular weight
NF- κ B	nuclear factor kappa B
NGF	nerve growth factor
NMDAR	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
NO	Stickstoffmonoxid
o.g.	oben genannt
PRR	pattern recognition receptor
RAGE	receptor for advanced-glycation-endproducts
ROI	region of interest
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
s.	siehe
s.e.m.	standard error of the mean
SHT	Schädelhirntrauma
SP	Sodiumpyruvat
SpO ₂	pulsoxymetrische Sauerstoffsättigung
TBI	traumatic brain injury
TGF- β	transforming growth factor β
TNF	Tumor Nekrose Faktor
u.a.	unter anderem
vs.	versus
WDI	weight drop injury
z.B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der antiinflammatorischen Wirkung von EP.	15
Abbildung 2: Immunhistochemische Färbung von HMGB1.	22
Abbildung 3: Immunhistochemische Färbung von RAGE.....	23
Abbildung 4: Immunhistochemische Färbung von Glo1.	23
Abbildung 5: Immunhistochemische Färbung von GFAP zur Darstellung von Astrozyten.	25
Abbildung 6: Immunhistochemische Färbung von Iba1 zur Darstellung von Mikroglia.....	25
Abbildung 7: Läsion eines EP-behandelten Tieres 24 Stunden nach CCI	27
Abbildung 8: Periläsionelle Kontusion eines Vehikel Tieres drei Stunden nach CCI.....	27
Abbildung 9:Anordnung der ROI.....	28
Abbildung 10: Graphische Zusammenfassung der statistischen Auswertung des zeitlichen Verlaufs	30
Abbildung 11: Graphische Zusammenfassung der statistischen Auswertung des Hemisphärenvergleichs der IRF	30
Abbildung 12: Graphische Zusammenfassung der statistischen Auswertung des Gruppenvergleichs Vehikel vs. EP	31
Abbildung 13: Graphische Darstellung der Mittelwerte (+ s.e.m.) des Läsionsvolumens [mm ³] im zeitlichen Verlauf.	34
Abbildung 14: Vergleich des Läsionsvolumens (HE-Färbung) Vehikel (links), Läsionsvolumen 9,07 mm ³ vs. EP (rechts) Läsionsvolumen 3,81 mm ³ nach 72h	34
Abbildung 15: Graphische Darstellung der HMGB1-positiven IRF (+ s.e.m.) [%]	36
Abbildung 16: Vergleich IHC HMGB1	37
Abbildung 17: Graphische Darstellung der RAGE-positiven IRF (+ s.e.m.) [%]	40
Abbildung 18: Vergleich IHC RAGE Vehikel.....	40
Abbildung 19: Graphische Darstellung der Glo1-positiven IRF (+ s.e.m.) [%]	43
Abbildung 20: Vergleich IHC Glo1 Vehikel (links) vs. EP (rechts) nach 72h	44
Abbildung 21: Graphische Darstellung der GFAP-positiven IRF (+ s.e.m.) [%] im zeitlichen Verlauf	47
Abbildung 22: Vergleich IHC GFAP Vehikel (links) vs. EP (rechts) nach 72h.....	47
Abbildung 23: Graphische Darstellung der Iba1-positiven IRF (+ s.e.m.) [%]	50
Abbildung 24: Vergleich IHC Iba1	51

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Parameter für CCI	18
Tabelle 2: Vorbereitung Objektträger für IHC-Färbungen.....	19
Tabelle 3: Schrittweise Erläuterung der HE-Färbung	20
Tabelle 4: Schrittweise Erläuterung der IHC-Färbungen	21
Tabelle 5: Schrittweise Erläuterung der IHC-Färbungen	24
Tabelle 6: Mittelwerte Läsionsvolumen \pm s.e.m. [mm ³]	33
Tabelle 7: Mittelwerte ödemkorrigiertes Läsionsvolumen \pm s.e.m. [%]	33
Tabelle 8: Mittelwerte Hemisphärenvolumen ipsilateral / kontralateral \pm s.e.m.	33
Tabelle 9: Mittelwerte periläsionelles Kontusionsvolumen \pm s.e.m. [mm ³].....	33
Tabelle 10: Hemisphärenvergleich immunoreaktive Fläche HMGB1	35
Tabelle 11: Mittelwerte HMGB1 positive Zellen \pm s.e.m. nach 3h, 24h, 72h	38
Tabelle 12: Hemisphärenvergleich immunoreaktive Fläche RAGE	39
Tabelle 13: Mittelwerte RAGE positive Zellen \pm s.e.m. nach 3h, 24h, 72h	41
Tabelle 14: Hemisphärenvergleich immunoreaktive Fläche Glo1	42
Tabelle 15: Mittelwerte Glo1 positive Zellen \pm s.e.m. nach 3h, 24h, 72h	44
Tabelle 16: Hemisphärenvergleich immunoreaktive Fläche GFAP	46
Tabelle 17: Mittelwerte GFAP positive Zellen \pm s.e.m. nach 3h, 24h, 72h	48
Tabelle 18: Hemisphärenvergleich immunoreaktive Fläche Iba1	49
Tabelle 19: Mittelwerte Iba1 positive Zellen \pm s.e.m. nach 3h, 24h, 72h	51
Tabelle 20: Versuchstiere	XIV
Tabelle 21: Chemikalien.....	XIV
Tabelle 22: Gebrauchsfertige Lösungen und Pharmaka.....	XV
Tabelle 23: Antikörper.....	XVII
Tabelle 24: Verbrauchsmaterialien.....	XVIII
Tabelle 25: Geräte	XX
Tabelle 26: Hardware	XXI
Tabelle 27: Software.....	XXI
Tabelle 28: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper IHC-Färbung HMGB 1, RAGE und Glo1	XXI
Tabelle 29: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper IHC-Färbung GFAP und Iba1 .	XXII

1. Einleitung

Im Jahr 1975 haben Reilly et al. Fälle von Patienten beschrieben, die an den drastischen Auswirkungen des sekundären Hirnschadens nach einem Schädelhirntrauma (SHT) verstorben sind. Zur Verbesserung des Outcomes nach SHT schlugen sie eine Optimierung des Monitorings und der Therapie des intracraniellen Drucks (ICP) vor (Reilly et al. 1975). Fortschritte in der operativen und intensivmedizinischen Behandlung und die Einführung von evidenzbasierten Leitlinien konnten die Mortalität in den folgenden Jahren zwar senken, seit 1990 konnte aber keine weitere Reduktion der Mortalität nach SHT festgestellt werden (Roozenbeek et al. 2013). Zusätzlich zu der immer noch erheblichen Mortalitätsrate verdeutlichen die hohe Inzidenz, sowie der große Anteil von Patienten mit dauerhaften, schweren Defiziten nach schwerem SHT die Bedeutung der Etablierung einer zielgerichteten Therapie (Lahner and Fritsch 2017). Die derzeitigen Behandlungsmöglichkeiten zur Vermeidung des sekundären Hirnschadens beschränken sich auf symptomatische Therapien zur Homöostase des ICP, des cerebralen Perfusionsdrucks (CPP), der Oxygenierung, des Stoffwechsels und der Körpertemperatur. Die Ursachen des sekundären Schadens sind multifaktoriell. Zu ihnen zählen Exzitotoxizität, Inflammation, Calciumfreisetzung, mitochondriale Dysfunktion, Genaktivierung, Produktion von Sauerstoffradikalen (ROS) und oxidativer Stress. Diese Faktoren führen zu einer, von der Art der Schädigung sowie des zeitlichen Verlaufs abhängigen, Progredienz der sekundären Schädigung. Sie bieten mögliche kausale Therapieansätze und sind Gegenstand der Forschung zur Behandlung des sekundären Hirnschadens nach SHT (Maas et al. 2008). Ethylpyruvat (EP), ein Ester des für die zelluläre Energiegewinnung wichtigen Pyruvats, zeigte in verschiedenen Studien antioxidative, antiapoptotische und antiinflammatorische Effekte (Fink 2007). Ein antiinflammatorischer Ansatzpunkt von EP in der Pathophysiologie des SHT ist die Inhibition des Proteins high-mobility group box1 (HMGB1) (Shin et al. 2015). HMGB1 ist sowohl ein Transkriptionsfaktor als auch ein damage-associated molecular pattern (DAMP). Bei Zellschädigung oder Inflammation wird HMGB1 passiv und aktiv freigesetzt. Über pattern recognition receptors (PRR), wie z. B. den receptor for advanced-glycation-endproducts (RAGE) und eine Steigerung der Genexpression des nuclear factor kappa B (NF- κ B) wirkt HMGB1 proinflammatorisch (Tang et al. 2011). Außerdem hemmt EP das Enzym Glyoxalase 1 (Glo1). Glo1 ist am Abbau von Methylglyoxal (MG) beteiligt. MG entsteht durch gesteigerte Glykolyse auch nach SHT und ist ein neurotoxischer Metabolit, der als Vorläufer von advanced glycation endproducts (AGE) ebenfalls über RAGE zum einen proinflammatorisch wirkt (Pieroh et al. 2014), zum

anderen aber über eine Inhibition von NF- κ B auch antiinflammatorische Effekte hat (Laga et al. 2007). Trotzdem gibt es nur wenige Studien, die eine durchgehend neuroprotektive Wirkung einer akuten Behandlung mit EP nach SHT nachweisen konnten (Moro and Sutton 2010, Shi et al. 2015). Es ist unklar, ob eine kontinuierliche Behandlung effektiver ist und welche Mechanismen an einer protektiven Wirkung von EP nach SHT beteiligt sind.

Die Hypothesen der vorliegenden Arbeit lauten,

- (1) dass die kontinuierliche Behandlung mit EP die inflammatorische Reaktion und dadurch den Hirnschaden in der Frühphase der Schadensentwicklung verringert und
- (2) dass der Signalweg über HMGB1 und RAGE trotz der Hemmung von Glo1 durch EP maßgeblich an einer Neuroprotektion beteiligt ist.

Deshalb untersucht die vorliegende Arbeit die zeitlichen Auswirkungen von EP drei, 24 und 72 Stunden nach kontrollierter kortikaler Hirnverletzung (CCI) bei der Ratte auf:

- das Läsionsvolumen
- den HMGB1-Signalweg, die Expression von RAGE und die Aktivierung von Glo1, sowie
- die Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten

2. Stand der Forschung

2.1. Ätiologie und Epidemiologie

Die Ätiologie des SHT ist sehr vielfältig. Die häufigsten Ursachen sind Verkehrsunfälle, Stürze und Krafteinwirkungen durch andere Gegenstände gegen den Kopf; Explosionen und Schussverletzungen sind Ursachen, die im militärischen Bereich größere Relevanz haben (Summers et al. 2009). Verbesserungen der Unfallprävention haben in den vergangenen Jahren zu einem Rückgang des unfallbedingten SHT geführt. Die steigende Lebenserwartung und häufig besser erhaltene Mobilität im Alter stellen in Kombination mit den zunehmenden Komorbiditäten und der Einnahme blutgerinnungshemmender Medikamente wachsende Risikofaktoren dar (Roozenbeek et al. 2013). Die Inzidenz des SHT beträgt in Europa im Durchschnitt 262 pro 100.000 Einwohner pro Jahr. (Peeters et al. 2015) Etwa 91 Prozent der Fälle sind als leicht, vier Prozent als mittelschwer und fünf Prozent als schwer einzustufen (Rickels et al. 2011). Die Mortalität des schweren SHT beträgt bis zu 50 Prozent, weniger als 10 Prozent der Patienten erholen sich gut und bis zu 30 Prozent tragen schwere dauerhafte neurologische Defizite davon (Hutchinson et al. 2016). Auch nach leichtem SHT erlangen nur 50 Prozent der Patienten eine vollständige Regeneration ihrer kognitiven Fähigkeiten und nur etwa 73 Prozent können in ihr vorheriges Berufsleben zurückkehren (Stocchetti and Zanier 2016). Insgesamt liegt die Mortalität des SHT bei etwa 15 pro 100.000 Einwohner pro Jahr (Tagliaferri et al. 2006). Es werden drei Häufigkeitsgipfel in der Altersverteilung der Patienten zwischen null bis vier Jahren, 15 bis 24 und über 75 Jahren beschrieben (Coronado et al. 2012). 60 Prozent der Patienten sind männlich (Summers et al. 2009). Neben den individuellen Schicksalen verdeutlichen diese Zahlen die erhebliche sozioökonomische Belastung, die aus den Folgen des SHT mit konsekutiver dauerhafter kognitiver Einschränkung, Pflegebedürftigkeit und Erwerbsminderung, vor allem bei jungen Menschen entsteht. Die geschätzten direkten und indirekten Kosten für die medizinische Versorgung, den Erwerbsausfall sowie die Einschränkungen der Lebensqualität, die durch die Folgen des SHT in Deutschland entstehen, belaufen sich auf 2,5 Milliarden € pro Jahr (Rickels 2010).

2.2. Definition Schädelhirntrauma

„Ein Schädelhirntrauma ist die Folge einer Gewalteinwirkung, die zu einer Funktionsstörung und/oder Verletzung des Gehirns geführt hat und mit einer Prellung oder Verletzung der

Kopfschwarte, des knöchernen Schädels, der Gefäße und/oder der Dura mater verbunden sein kann.

Des Weiteren muss zwischen primärer und sekundärer Hirnschädigung unterschieden werden. Der primäre Schaden entsteht zum Zeitpunkt des Traumas als direkte Folge der Gewalteinwirkung. Er umfasst sowohl die irreversible Zerstörung von Zellen, Axonen und Blutgefäßen, als auch eine zum Teil reversible Funktionseinschränkung von Neuronen. Die primäre Hirnschädigung löst eine vielschichtige Kaskade aus, die zu einer Vergrößerung des primären Gewebsverlusts und somit zur sekundären Hirnschädigung führt.“ Hier bieten sich zahlreiche Ansätze zur kausalen Therapie des sekundären Hirnschadens.

(Greve and Zink 2009, Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie 2015)

International hat sich die Einteilung des SHT nach der Glasgow Coma Scale (GCS) in drei Schweregrade etabliert. Es wird die Vigilanz, die beste verbale und die beste motorische Reaktion des Patienten bewertet. Die vergebenen Punkte ergeben in der Summe den GCS mit einem minimalen Score von 3 Punkten und einem maximalen Score von 15 Punkten:

Leicht: 15-13 Punkte

Mittel: 12-9 Punkte

Schwer: 8-3 Punkte

(Teasdale and Jennett 1974, Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie 2015)

2.3. Präklinische und klinische Versorgung

Das Ziel der Therapie des Schädelhirntraumas ist die Aufrechterhaltung der Homöostase des Gehirns, um die sekundäre Hirnschädigung einzugrenzen und reversibel geschädigten Neuronen die Möglichkeit zu bieten, sich zu regenerieren.

Da Hypoxie und eine insuffiziente Perfusion den sekundären Hirnschaden aggravieren (Maas et al. 2008), sollen bewusstlose Patienten ($GCS \leq 8$) bereits im Rahmen der präklinischen Versorgung intubiert werden, um für eine ausreichende Ventilation und Oxygenierung zu sorgen. Die arterielle Sauerstoffsättigung (spO_2) soll nicht unter 90% sinken. Beim Erwachsenen sollte der systolische Blutdruck nicht unter 90mmHg sinken, da eine Hypoxie und eine arterielle Hypotension mit einem schlechteren Outcome verbunden sind (Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie 2015).

Der Goldstandard der bildgebenden Diagnostik zur Beurteilung des SHT ist die Computertomographie (CT). Mit der CT können operationsbedürftige Verletzungen detektiert und Anzeichen für einen erhöhten ICP frühzeitig erkannt werden (Marshall et al. 1992, Maas

et al. 2008). Raumfordernde intracranielle Verletzungen stellen eine absolut dringliche Operationsindikation dar. Ein erhöhter ICP kann die operative Dekompression durch Kraniektomie und Duraerweiterungsplastik nötig machen.

Bei bewusstlosen oder sedierten Patienten, die neurologisch nur bedingt beurteilbar sind, kann eine invasive Messung des ICP notwendig sein. Über die Formel $CPP = MAP - ICP$ lässt sich der CPP berechnen. Ein reduzierter CPP führt über eine Ischämie ebenfalls zur sekundären Hirnschädigung. Die Bestimmung des optimalen CPP setzt die Kenntnis der Gehirnperfusion, der Sauerstoffversorgung und des Sauerstoffbedarfs bzw. des Gehirnstoffwechsels voraus. Regionale Messungen hierzu mittels Parenchymsonden, Transcraniellem-Doppler und perfusionsgewichteter Bildgebung bieten vielversprechende Möglichkeiten zur Beurteilung des cerebralen Stoffwechsels und sind Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen (Chesnut et al. 2014).

Zur Aufrechterhaltung eines ausreichenden CPP sind zum einen ein normotoner arterieller Blutdruck und zum anderen eine Senkung des ggf. erhöhten ICP nötig. Dies kann u.a. durch Ablassen von Liquor über eine Ventrikeldrainage, die Gabe von Osmodiuretika wie Mannitol oder hyperosmolare Lösungen, eine 30° Oberkörper-Hochlagerung zur Verbesserung des venösen Abflusses oder eine tiefe Sedierung im Sinne eines Burst-Suppression-EEG erreicht werden. Eine milde Hyperventilation, die über einen verringerten arteriellen CO_2 -Partialdruck zu einer Vasokonstriktion mit Reduktion des ICP führt, ist wegen der Gefahr einer vasokonstriktorischen Ischämie kritisch zu sehen, kann aber in der Akutphase kurzzeitig angewendet werden (Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie 2015).

2.4. Pathophysiologie des Schädelhirntraumas

Die durch die direkte Gewalteinwirkung entstehende primäre Hirnschädigung wird in fokale und diffuse Läsionen unterteilt. Makroskopische fokale Läsionen sind Ischämien, Kontusionen und die folgenden intrakraniellen Blutungen:

- Epiduralblutung
- Subduralblutung
- Subarachnoidalblutung
- Intrazerebrale Blutung

Traumatische intrakranielle Blutungen kommen bei 25-35 Prozent der schweren und bei fünf bis 10 Prozent der mittelschweren SHT vor. Kontusionen stellen das häufigste makroskopische Korrelat der fokalen Läsionen nach SHT dar (Maas et al. 2008).

Zu den diffusen Läsionen zählen diffuse Ödeme und der diffuse axonale Schaden (DAI), bei dem es meist durch Scherkräfte im Rahmen von Akzeleration-/Dezelerationstraumata zur Verletzung axonaler Faserbündel kommt.

Auf zellulärer Ebene werden alle Strukturen des Hirnparenchyms (Neurone, Gliazellen, Blutgefäße) durch Disruption der Zellwände, des Zytoskeletts und der Axone geschädigt.

Auf molekularer Ebene bedeutet das einen Verlust der Membranintegrität und der Funktion von Ionenkanälen, was die Freisetzung intrazellulärer Metabolite, Elektrolyte und Neurotransmittern aus geschädigten Zellen nach sich zieht (Maas et al. 2008).

In der Frühphase des sekundären Schadens resultieren aus dem erniedrigten CBF Ischämien, Hypoxien und die Depletion energiereicher Phosphate und dadurch ein Zusammenbruch des Zellstoffwechsels. Die Zellmembranpotentiale können nicht aufrechterhalten werden. In Kombination mit erhöhten extrazellulären Elektrolyt- und Neurotransmitterkonzentrationen aus primär geschädigten Zellen führt dies zu einer Exzitotoxizität. Der Einstrom von Na^+ - und Ca^{2+} -Ionen in die Zellen induziert Proteasen-, Phospholipasen- und Peroxidasenaktivität, mitochondriale Funktionsstörungen und Hyperglycolyse. Die vermehrte Bildung und Freisetzung freier Radikale, reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), AGEs und DAMPs wirkt proinflammatorisch und apoptotisch. Wegen der verschobenen Elektrolytkonzentrationen entstehen zytotoxische Ödeme, die wiederum die lokale Perfusion beeinträchtigen (Werner and Engelhard 2007, Greve and Zink 2009).

Die körpereigenen Reaktionen in den anschließenden Phasen sind bivalent. Durch Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten wird die Läsion einerseits eingedämmt, zellulärer Detritus abgeräumt und die metabolische Dysbalance kompensiert, wodurch periläsionelle Areale geschützt werden. Andererseits führen Neuroinflammation, Zytokin- und Chemokinproduktion mit konsekutiver Aktivierung und Einwanderung von Immunzellen, die Aktivierung von Matrix-Metallo-Proteasen (MMP) und der oxidative Stress zu Neurotoxizität und Schädigungen der Bluthirnschranke mit der Entwicklung vasogener Ödeme (Werner and Engelhard 2007, Karve et al. 2016).

Auch in der Spätphase wurden zum Teil Jahre nach SHT proinflammatorische Prozesse nachgewiesen, die als eine mögliche Ursache für die resultierenden Langzeitschäden und neurologischen Defizite gelten (Myer et al. 2006, Karve et al. 2016, Lahner and Fritsch 2017). Viele Ansätze der Forschung beruhen auf einer Durchbrechung des beschriebenen Circulus Vitiosus mit Inhibition der schädigenden Prozesse, möglichst ohne die körpereigenen protektiven Effekte zu unterdrücken (Narayan et al. 2002).

Im Folgenden werden die pathophysiologischen Prozesse während der verschiedenen Phasen nach SHT genauer beleuchtet, die bisherigen Therapieansätze behandelt und der Bezug zur Fragestellung dieser Arbeit hergestellt.

Raumforderungen, Gefäßverletzungen, eine gestörte Autoregulation und Vasospasmen führen zu einem gestörten CBF und Ischämien. Die beeinträchtigte Autoregulation ist durch eine gestörte Funktion der Endothelzellen der Gefäße bedingt. Unterschreitet der CPP 50mmHg, reicht die gesteigerte O₂-Extraktion als Kompensationsmechanismus nicht mehr aus und es kommt zu Ischämien. Abhängig von der metabolischen Situation kann nach SHT in Arealen mit wenig metabolischem Umsatz, bei gestörter Autoregulation, auch eine Hyperperfusion vorliegen (Greve and Zink 2009).

Vasospasmen treten bei mehr als einem Drittel der Patienten nach SHT auf und gehen mit einer erheblichen Schädigung des Gehirns einher. Ursachen sind eine verminderte Kaliumkanalaktivität der Gefäßmuskelzellen mit chronischer Depolarisation, die Freisetzung von Endothelin, eine reduzierte Stickstoffmonoxid (NO) Verfügbarkeit, die Verarmung an cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP) und die Bildung freier Radikale (Werner and Engelhard 2007).

Gehirnödeme sind Hauptfaktoren für Morbidität und Mortalität nach SHT. Das vasogene und das cytotoxische Hirnödem stellen zwei unterschiedliche Entitäten dar, denen verschiedene pathophysiologische Prozesse und zeitliche Dynamiken nach SHT zu Grunde liegen. Beim cytotoxischen Ödem kommt es zu einem Wassereinstrom aus dem Extrazellularraum (EZR) in den Intrazellularraum (IZR). Beim vasogenen Ödem kommt es zu einem Wassereinstrom vom Intravasalraum in das Interstitium (Donkin and Vink 2010). Gemäß der Monroe-Kellie-Doktrin ist das Volumen innerhalb des Schädels konstant. Es setzt sich aus etwa 90 Prozent Hirnparenchym, ca. fünf Prozent Liquor und ca. fünf Prozent Blut zusammen, wobei die intrakranielle Reservekapazität lediglich fünf Prozent beträgt. Vergrößert sich eines dieser Kompartimente, steigt der ICP an (Garcia et al. 1980). Da es beim cytotoxischen Ödem zu einer Umverteilung bereits vorhandenen intrakraniellen Volumens kommt, resultiert hieraus kein Anstieg des ICP. Anders hingegen kommt es durch den Wassereinstrom von intravasal nach intrakranial bei der Ausbildung eines vasogenen Ödems zu einer Zunahme des ICP (Donkin and Vink 2010).

Ursachen des cytotoxischen Ödems sind der reduzierte CPP nach SHT, die folgende zelluläre Depletion energiereicher Phosphate, der Zusammenbruch der Na⁺K⁺-ATPase, sowie die

Akkumulation von Arachidonsäuremetaboliten, Sauerstoffradikalen, Glutamat, Histamin, Elektrolyten und Kininen aus primär geschädigten Zellen. Dies führt zu einem osmotischen Gradienten mit Wassereinstrom in die Zellen. Da es beim Menschen etwa zwanzigmal mehr Astrozyten als Neurone gibt, die ca. auf das fünffache ihrer Größe anschwellen können, ist die Gliaschwellung der Hauptmediator des cytotoxischen Ödems, das während der ersten drei Tage progredient ist und bis zu zwei Wochen nach SHT persistiert (Unterberg et al. 2004). Dixon et al. beschreiben einen Progress der Nekrose mit Zunahme des perifokalen Ödems, das hauptsächlich cytotoxisch ist (Dixon et al. 1991).

Das vasogene Ödem entsteht bereits in der Frühphase nach SHT. Beschädigungen des Cytoskeletts der Endothelzellen und der Gap-junctions führen zu einer erhöhten Permeabilität der Bluthirnschranke (BHS) für Plasmaproteine, die in das Interstitium austreten und Wasser mitziehen. Das Maximum der Permeabilität der BHS wird ca. vier bis sechs Stunden nach dem Trauma erreicht. Danach beginnt die BHS sich für große Moleküle wieder zu schließen, bleibt für kleine Moleküle allerdings bis zu 7 Tage lang permeabel. Nach 3-7 Tagen zeigt sich eine erneute vorübergehende Zunahme der Permeabilität für große Moleküle. Der oben beschriebene Influx von Wasser und Elektrolyten in den IZR im Rahmen des cytotoxischen Ödems führt zu einem weiteren Gradienten für Elektrolyte und Wasser über die defekte BHS. An dieser Stelle wird der Zusammenhang beider Entitäten und der permissive Effekt des vasogenen für das cytotoxische Ödem deutlich (Donkin and Vink 2010). Das Maximum des Hirnödems wird etwa zwei bis drei Tage nach SHT erreicht und korreliert mit den beschriebenen Spitzenwerten des ICP (Marmarou 2003).

Ursachen für sekundäre Schäden der BHS und damit Grundlage für die Entstehung des vasogenen Ödems sind die veränderte Expression von Aquaporinen (AQP) (Taya et al. 2008), Matrix-Metallo-Proteasen (MMP) (Candelario-Jalil et al. 2009), vasoaktiver Substanzen (Bradykinine (Plesnila et al. 2001), Substanz P (Zacest et al. 2010), CGRP (Brain and Williams 1985)) und eine gesteigerte neurogene Inflammation (Donkin and Vink 2010).

Bisherige Therapieansätze des Gehirnödems und der BHS-Schäden nach SHT sind u.a. die Behandlung mit Glutamat-Rezeptor-Antagonisten (weniger exzitatorischer Ca^{2+} -Einstrom), Kaliumkanalmodulatoren (Stabilisierung des Membranpotentials), Vitamin E Derivate und L-Histidin (Wirkung auf Sauerstoffradikale), AQP-Modulatoren (weniger Influx in das Interstitium und den IZR, sowie bessere Clearance von Ödemen), MMP-Inhibitoren (reduzieren BHS-Schäden), Bradykinin-Rezeptor-Antagonisten und Substanz-P-Neurokinin-1-Rezeptor-Antagonisten (beeinflussen die Neuroinflammation und vasoaktive Effekte) (Unterberg et al. 2004) (Donkin and Vink 2010).

Nach SHT kommt es neben einer direkten vermehrten Freisetzung exzitatorischer Neurotransmitter (Glutamat und Aspartat) aus geschädigten Zellen zum Zusammenbruch des Membranpotentials und zum Versagen präsynaptischer Ionenpumpen, was zu einer weiteren Ca^{2+} vermittelten Glutamatexozytose führt. Über α -Amino-3-OH-5-methyl-4isoxazol-Propionsäure-Rezeptoren (AMPA) und N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDAR) vermitteln die exzitatorischen Neurotransmitter einen Ca^{2+} -Einstrom, wobei der Glutamat-abhängige Ca^{2+} -Influx der zentrale Punkt der Exzitotoxizität ist. Es kommt zu mitochondrialer Dysfunktion und vermehrter Bildung freier Sauerstoffradikale. Die Aktivierung von Lipidperoxidasen und Phospholipasen führt zur Akkumulation freier Fettsäuren. Gesteigerte Caspasen-, Translocasen- und Endonukleasenaktivität induziert Strukturschäden an Membranen und der DNA und induziert katabole Prozesse, Autophagie und Apoptose. Außerdem zeigen NMDAR und AMPAR nach SHT eine Hyperexzitabilität, was diese Prozesse verstärkt (Werner and Engelhard 2007, Greve and Zink 2009).

Therapieansätze mit NMDAR-Antagonisten haben in Tierversuchen eine Verbesserung des Outcomes nach SHT gezeigt (Faden et al. 1989), konnten dies in klinischen Studien bisher jedoch nicht bestätigen. (Narayan et al. 2002)

Erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen und eingeschränkte Funktionen der mitochondrialen Atmungskette und Ca^{2+} -Pufferfunktion führen über die Reduktion von Sauerstoff zur Bildung von ROS, zu denen Radikale wie das Superoxid- und Hydroxylradikal sowie nicht Radikale wie Hydrogenperoxid und Peroxynitrit zählen. ROS initiieren über freie Radikale die Lipidperoxidation - eine oxidative Degeneration von mehrfach ungesättigten Fettsäuren. In Kombination mit der oxidativen Veränderung von Proteinen führt dies zu einer Schädigung der mitochondrialen und zellulären Membranen sowie der membranständigen Ionenpumpen. Die Folge ist eine Funktionsbeeinträchtigung bis hin zur Apoptose mikrovaskulärer und parenchymaler Strukturen. Bisherige therapeutische Ansätze zur Verminderung des oxidativen Schadens sind die Inhibition der Bildung von ROS und das Abfangen freier Sauerstoff- und Lipidradikale (Hall 2015) (Mustafa et al. 2010).

2.4.1. Astrozyten

Astrozyten sind ubiquitäre Zellen im ZNS und von essentieller Bedeutung für die Homöostase der extrazellulären Flüssigkeits-, Ionen- und Glutamatkonzentrationen, des Energiemetabolismus und der Relation pro- und antiinflammatorischer Zytokine sowie freier

Radikale. Sie nehmen direkten Einfluss auf neuronales Überleben, die Integrität des ZNS und das funktionelle Outcome nach SHT (Myer et al. 2006). Bereits in der Frühphase nach SHT kommt es zur Aktivierung von Astrozyten proportional zur Schwere des Traumas mit Hypertrophie und Proliferation. Dieser Prozess der reaktiven Astroglieose hat sowohl protektive als auch schädliche Auswirkungen. Sie sezernieren proinflammatorische Zytokine wie TNF (Tumor Nekrose Faktor), IL-1(Interleukin), IL-6 und Chemokine, die weitere Immun- und Gliazellen aktivieren und mobilisieren (Werner and Engelhard 2007, Hellewell and Morganti-Kossmann 2012). Astrozytär produzierte Mikrofilamente und Neuropines bilden ein Glianarbeitsgewebe, das axonales Aussprossen und somit neuronale Plastizität unterbinden kann. Andererseits produzieren Astrozyten in Arealen mit Synaptogenese MMPs, beseitigen Detritus und ermöglichen dadurch neuronale Plastizität (Hellewell and Morganti-Kossmann 2012). Die Glianarbe unterbindet einen Teil der sekundären Schadensausbreitung, indem sie gesundes Gewebe von geschädigtem abgrenzt und eine Invasion proinflammatorischer Immunzellen unterdrückt (Myer et al. 2006). Während nach leichtem SHT protektive Effekte durch die Hochregulation der homöostatischen Aktivität und die schützende Funktion der Glianarbe beschrieben sind, scheinen nach schwerem SHT die schädigenden Effekte der Astrozyten zu überwiegen (Di Giovanni et al. 2005, Myer et al. 2006).

2.4.2. Mikroglia

Mikroglia sind ubiquitär vorkommende, immunkompetente, zur Phagozytose fähige Zellen, die 10-20 Prozent aller Zellen des ZNS ausmachen. Sie reagieren auf verschiedene Noxen, Kontakt zu Plasmaproteinen nach BHS-Schäden und proinflammatorische Faktoren mit einer funktionellen Transformation in einen aktivierten Zustand (Ransohoff and Cardona 2010, Hellewell and Morganti-Kossmann 2012). Innerhalb der ersten Stunden nach SHT proliferieren Mikroglia und wandern in Richtung des Schadens. Extrazelluläres ATP und Glutamat aus geschädigten Zellen ist dabei einer der hauptsächlichen Stimuli (Loane and Byrnes 2010). Im aktivierten Zustand unterscheidet man den proinflammatorischen M1 vom antiinflammatorischen M2 Phänotyp (Wang et al. 2013). Die Differenzierung in den jeweiligen Phänotyp ist abhängig von der Art und Konzentration des Stimulus sowie von der Intensität der Schädigung (Loane and Byrnes 2010). In der Frühphase nach SHT sind Mikroglia der zentrale Aspekt der inflammatorischen Antwort (Giordana et al. 1994, Streit 1996, Loane and Byrnes 2010). Eine chronische Mikrogliaaktivierung kann bis zu mehreren Jahren nach dem Trauma anhalten (Gentleman et al. 2004, Block and Hong 2007, Loane and Byrnes 2010). Die

überschießende inflammatorische Reaktion ist Teil der Pathophysiologie des sekundären Schadens. Eine Lipopolysaccharid (LPS) induzierte Aktivierung führt über TLR-4 (toll like receptor 4) und MAC1 (macrophage antigen 1) – Rezeptor zu einer NF-κB vermittelten proinflammatorischen Genexpression (Pei et al. 2007, Dean et al. 2010). Es kommt zur Freisetzung von TNF-α, IL-1/6/12, zur Induktion der NADPH Oxidase, der iNOS (induzierbare NO-Synthase) mit Bildung von ROS und NOS, zur Induktion der COX 2 mit Freisetzung von Arachidonsäurederivaten und einer dadurch bedingten Neurotoxizität (Loane and Byrnes 2010). IL-4/13 führen zur Differenzierung zum M2 Subtyp, der durch die Produktion der antiinflammatorischen Cytokine TGF-β (transforming growth factor β) sowie IL-10, NGF (nerve growth factor), IL-1 Rezeptorantagonist neuroprotektiv wirkt. Außerdem ist der M2 Subtyp zur Phagozytose von zellulärem Debris und neurotoxischen Stoffen befähigt, inhibiert die weitere Aktivierung von Makrophagen und M1 neurotoxischen Mikroglia und ermöglicht dadurch neuronale Erholung (Loane and Byrnes 2010). Nach SHT ist das Gleichgewicht zwischen den Subtypen und die Unterdrückung einer chronischen proinflammatorischen Mikrogliaaktivierung von großer Bedeutung, um den sekundären Schaden zu reduzieren und die funktionelle Erholung zu verbessern. Bisherige Forschungsansätze sind u.a. die Induktion des M2 Subtyps mit IL-10 und TGFβ und die Unterdrückung der Mikrogliaaktivierung (Loane and Byrnes 2010).

2.4.3. Hyperglycolyse und AGE

Die beeinträchtigte Energiegewinnung durch die reduzierte oxidative Phosphorylierung im Rahmen der Dysfunktion der mitochondrialen Atmungskette mit folgender ATP-Depletion führt bei schweren SHT bereits in der Frühphase zu einer kompensatorisch gesteigerten anaeroben Glykolyse (Amorini et al. 2016). Durch diese Hyperglykolyse fällt vermehrt das Glykolyse Nebenprodukt Methylglyoxal (MG) an. MG fördert die Entstehung von AGE (Belanger et al. 2011). AGE vermitteln über RAGE konzentrationsabhängig verschiedene Effekte. Während hohe Konzentrationen in einem Circulus Vitiosus zur Bildung weiterer ROS führen und über eine Aktivierung von NF-κB proinflammatorisch und neurodegenerativ wirken, haben geringe Konzentrationen positive Wirkungen auf das Neuritenwachstum, die Migration, die Differenzierung und die neuronale Regeneration (Ott et al. 2014).

2.4.4. Glyoxalase und Methylglyoxal

Neben der Entstehung von ROS vermittelt MG weitere negative Effekte in der Pathophysiologie des sekundären Hirnschadens nach SHT. MG führt zur Glykosilierung von Proteinen mit daraus folgender Dysfunktionalität und Schädigung der DNA (Sousa Silva et al. 2013). Außerdem wirkt MG über den Verbrauch von Gluthation, das Auslösen mitochondrialer Dysfunktion und die Aktivierung von Caspasen sowohl proinflammatorisch als auch proapoptotisch und somit neurotoxisch (Di Loreto et al. 2008). Neben den schädigenden Auswirkungen zeigt MG aber auch protektive Effekte. Es wirkt über eine verminderte Bindung von NF- κ B an die DNA antiinflammatorisch (Laga et al. 2007) und reduziert die LPS vermittelte Bildung proinflammatorischer Zytokine (Hollenbach et al. 2008). Das Glyoxalase System ist der bedeutendste Mechanismus zur Detoxifikation von MG. In einer Gluthation abhängigen Reaktion wird MG enzymatisch durch die Glo1 und Glo2 zu D-Lactat abgebaut. Astrozyten haben im Vergleich zu Neuronen eine erhöhte Glyoxalase-Aktivität, eine bessere Fähigkeit zur Hochregulation der Glykolyse, eine geringere Akkumulation von AGE, eine erhöhte Resistenz gegen MG induzierte Zytotoxizität und können dadurch im Rahmen der sekundären Hirnschädigung protektiv auf Neurone wirken (Belanger et al. 2011).

2.4.5. Inflammation, DAMPs und HMGB1

Die in Folge eines SHT ausgelöste Inflammation aggraviert einerseits in der Akutphase den sekundären Schaden, andererseits induziert sie wichtige Faktoren für die längerfristige neuronale Regeneration (Hellewell and Morganti-Kossmann 2012). Die initiale Aktivierung inflammatorischer Prozesse geschieht durch die Extravasation von Blutbestandteilen und intrazellulären Komponenten, die durch Gewebeschädigung in den Extrazellulärraum gelangen, sowie durch ROS und NOS (Juliet et al. 2008, Rock and Kono 2008, Cederberg and Siesjo 2010). Es folgt eine gesteigerte Synthese und Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen (IL-1, IL-6, Interferon γ , TNF- α), Chemokinen und endothelialen Adhäsionsmolekülen, die gemeinsam mit einer inflammatorisch bedingten gesteigerten Permeabilität der Bluthirnschranke zu einer Invasion peripherer neutrophiler Granulozyten und Monozyten führen (Hausmann et al. 1998, Csuka et al. 1999, Buttram et al. 2007, Cederberg and Siesjo 2010). Die aktivierten proinflammatorischen Zellen produzieren vermehrt Zytokine, ROS, RNS, MMP, Prostaglandine, Leukotriene und unterhalten damit die Entzündungsreaktion mit rezeptorvermittelter Apoptose und Progredienz des sekundären Schadens. Des Weiteren kommt es zu einer Aktivierung des Komplementsystems, was ebenfalls Apoptose induzieren

kann (Stahel et al. 1998). Zeitlich verzögert vermittelt die Inflammation die Produktion antiinflammatorischer Zytokine (IL-4, IL-10, TNF- β), die für die neuronale Regeneration bedeutsam sind (Cederberg and Siesjo 2010).

Ein zentraler Aspekt der inflammatorischen Signaltransduktion auf zellulärer Ebene sind die Toll-like-Rezeptoren 2 und 4. DAMPs, zu denen HMGB1 zählt, sind Liganden der TLR und induzieren über NF- κ B die Transkription zahlreicher proinflammatorischer Faktoren (Sahu et al. 2008, Gao et al. 2012, Laird et al. 2014).

Bisherige Studien zur antiinflammatorischen Behandlung des sekundären Schadens mit Corticosteroiden haben keine entscheidenden Erfolge gebracht (Edwards et al. 2005). Die antiinflammatorische Therapie nach SHT muss auf die spezifischen zeitlichen Aspekte abgestimmt sein, um die schädigenden Faktoren zu supprimieren ohne dabei die wichtigen Abläufe der Regeneration zu unterdrücken (Cederberg and Siesjo 2010).

2.5. Ethylpyruvat

In verschiedenen Studien zu Sepsis, ARDS (acute respiratory distress syndrome), Pankreatitis, renaler Schädigung, hämorrhagischem Schock, Schlaganfall und cerebraler Ischämie zeigte Ethylpyruvat positive Effekte (Fink 2007). Auch in Untersuchungen zu TBI (traumatic brain injury) konnte die Behandlung mit EP nach CCI das neurologische Outcome verbessern (Wenda et. al.) (Moro and Sutton 2010), die BHS-Dysfunktion limitieren (Shi et al. 2015) und die Zahl apoptotischer Neurone im Hippocampus reduzieren (Moro and Sutton 2010). Ob EP auch die kortikale Läsion nach CCI begrenzen kann, ist nach aktueller Studienlage nicht klar.

EP wirkt antiinflammatorisch, antioxidativ, fungiert als Radikalfänger und dient als exogene Quelle des für den Energiestoffwechsel wichtigen Pyruvats, welches das Bindeglied zwischen Glykolyse und Citratzyklus ist. Die ursprüngliche These, Pyruvat als Energieträger zu substituieren, brachte das Problem der Instabilität des Pyruvats in wässriger Lösung mit sich. Es kondensiert zu Pyruvathydrat oder Parapyruvat, die eines der Schlüsselenzyme des Citratzyklus hemmen und somit die Energiebereitstellung beeinträchtigen (Fink 2007).

Außerdem fungieren weder Parapyruvat, noch Pyruvathydrat als Radikalfänger. Dieses Problem kann durch den Einsatz von Pyruvatestern, wie z.B. Natriumpyruvat (SP) oder EP umgangen werden, da sie in wässriger Lösung stabiler sind und zusätzliche pharmakologische Eigenschaften haben (Fink 2007).

EP beeinflusst die pathophysiologische Kaskade nach SHT an verschiedenen Punkten, die im Folgenden beschrieben werden.

Durch eine verringerte ATP-Depletion und verminderte Entstehung von Sauerstoffradikalen im Rahmen der Hyperglykolyse könnte EP das cytotoxische Ödem, dessen Hauptmediator die astrozytäre Schwellung ist, reduzieren.

Durch eine Inhibition der TNF- α -abhängigen MMP Aktivierung reduziert EP die BHS-Schäden und das vasogene Ödem (Shi et al. 2015). Das Maximum des Hirnödems ist zwei bis drei Tage nach SHT beschrieben (s. Kapitel 2.4). Im gewählten Untersuchungszeitraum könnte das Hirnödem daher ein relevanter Faktor sein.

EP reduziert die Funktionseinschränkung der Cytochromoxidase nach SHT und vermindert somit die Entstehung von ROS (Moro and Sutton 2010). Die schädigenden Auswirkungen der durch das SHT induzierten Exzitotoxizität und des erhöhten oxidativen Stresses, die beide in der Frühphase nach SHT relevant sind (s. Kapitel 2.4), werden durch EP positiv beeinflusst.

EP hemmt die LPS induzierte ROS Entstehung, Mikroglia- und NF- κ B-Aktivierung, wodurch weniger proinflammatorische Mediatoren gebildet werden (Shen et al. 2010).

Die Mikrogliaaktivierung und Differenzierung in die unterschiedlichen Phänotypen ist ein wesentlicher Aspekt in der Pathophysiologie des sekundären Hirnschadens (Wang et al. 2013) (s. Kapitel 2.6.7). Ob EP durch die Hemmung der LPS, ROS und NF- κ B induzierten Differenzierung zum M1 Phänotyp die Differenzierung zum antiinflammatorischen M2-Phänotyp begünstigt (Loane and Byrnes 2010, Wang et al. 2013), ist bisher unklar. Der Einfluss auf Mikroglia ist jedoch ein weiterer möglicher Ansatzpunkt der neuroprotektiven Wirkung von EP.

Als Transkriptionsfaktor und DAMP ist HMGB1 einer der zentralen Mediatoren der inflammatorischen Kaskade nach SHT (s. Kapitel 2.4.5).

EP inhibiert die HMGB1 Freisetzung, vermutlich durch Chelatbildung mit Ca^{++} , da die HMGB1 Freisetzung auf einer Ca^{++} abhängigen Phosphorylierung beruht (Shin et al. 2015), sowie durch eine verringerte HMGB1 Expression.

Weiter fungiert EP als Inhibitor der Glo1 (Hollenbach et al. 2008). Die Behandlung mit EP nach SHT könnte durch erhöhte MG Konzentrationen jedoch auch neurotoxische Effekte haben. Einige Studien deuten auf die Beeinflussung protektiver Mechanismen durch EP hin (Moro and Sutton 2010, Su et al. 2011, Shi et al. 2015, Moro et al. 2016). Dennoch zeigte sich in den wenigen Versuchen einer EP Behandlung nach SHT ein ambivalentes Bild bezüglich der Neuroprotektion. Die Untersuchungen von Wenda et al. und Müller et al. zeigten zwar ein verbessertes neurologisches Outcome, konnten jedoch keinen Effekt auf inflammatorische Marker oder die Größe des histologischen Schadens feststellen (Müller 2016, Wenda 2016).

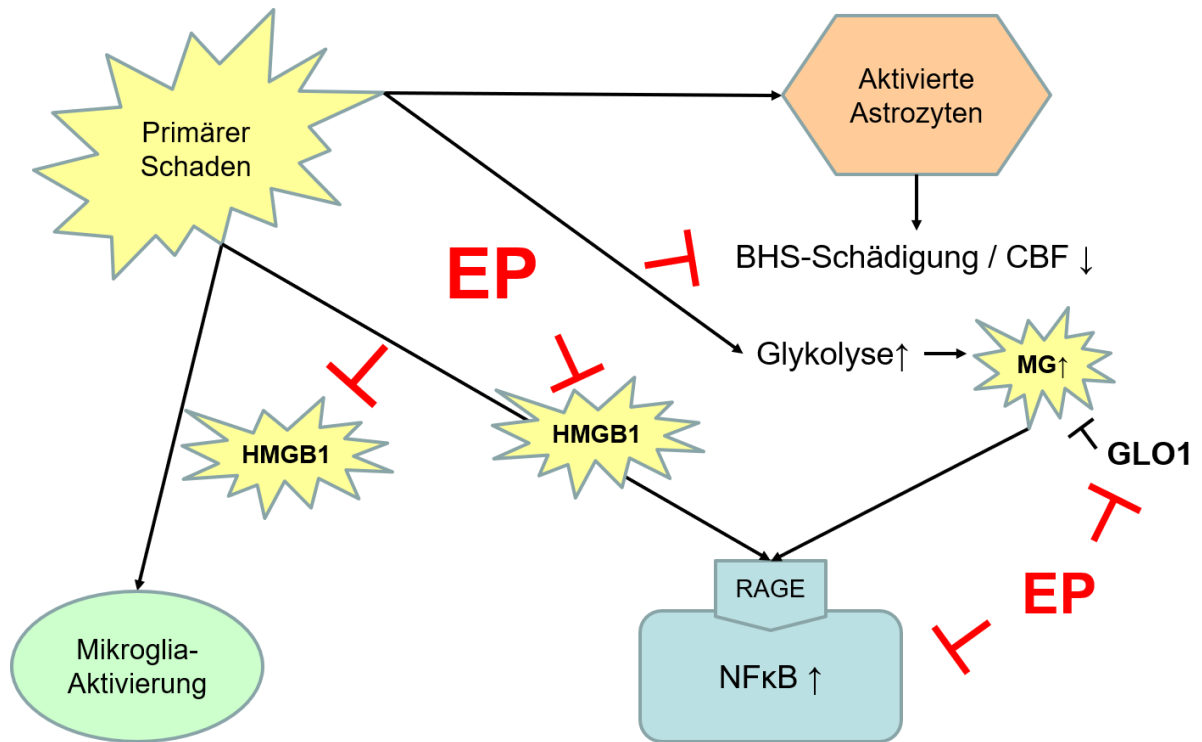


Abbildung 1: Schematische Darstellung der antiinflammatorischen Wirkung von EP. Die primäre Schädigung führt zur Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten. Außerdem kommt es zur Freisetzung von HMGB1 aus geschädigten Zellen. HMGB1 aktiviert weitere Mikroglia, wirkt über RAGE und eine nachgeschaltete NFκB-Kaskade proinflammatorisch und führt zu BHS-Schädigungen. Auch aktivierte Astrozyten beeinträchtigen die Bluthirnschrankenfunktion und den cerebralen Blutfluss. Die primäre Schädigung verursacht zudem eine Hyperglycolyse mit gesteigerter Methylglyoxalproduktion. Die Glyoxalase 1 ist am Abbau des Methylglyoxals beteiligt. Ethylpyruvat hemmt einerseits die schädlichen Effekte von HMGB1 auf die Mikrogliaaktivierung, die Inflammation über RAGE und reduziert die Bluthirnschrankenschädigung. Andererseits hemmt es die Glyoxalase 1 und somit den Abbau des toxischen Methylglyoxals.

2.6. Ziele der Untersuchung

Untersuchungen mit EP zeigten, dass die Hemmung des proinflammatorischen Proteins HMGB1 und die Inhibition von NF- κ B antiinflammatorische Ansatzpunkte von EP in der Pathophysiologie des SHT sein könnten. Dagegen spricht, dass EP das Enzym Glo1 hemmt, das wiederum am Abbau des neurotoxischen und proinflammatorischen MG beteiligt ist.

Die Hypothesen der vorliegenden Arbeit lauten,

- (1) dass die kontinuierliche Behandlung mit EP die inflammatorische Reaktion und dadurch den Hirnschaden in der Frühphase der Schadensentwicklung verringert und
- (2) dass der Signalweg über HMGB1 und RAGE trotz der Hemmung von Glo1 durch EP maßgeblich an einer Neuroprotektion beteiligt ist.

Deshalb untersucht die vorliegende Arbeit die zeitlichen Auswirkungen von EP drei, 24 und 72 Stunden nach kontrollierter kortikaler Hirnverletzung (CCI) bei der Ratte auf:

- das Läsionsvolumen
- den HMGB1-Signalweg, die Expression von RAGE und die Aktivierung von Glo1, sowie
- die Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten

3. Material und Methoden

Eine detaillierte Auflistung der Materialien findet sich im Anhang.

3.1. Gruppenzuteilung und Behandlung der Versuchstiere

Die Tierversuche wurden durch den Tierschutzbeauftragten des Landesuntersuchungsamtes Rheinland-Pfalz genehmigt und erfolgten gemäß des Tierschutzgesetzes der Bundesrepublik Deutschland.

Insgesamt wurden 64 männliche Sprague-Dawley Ratten operiert. In die Versuchsreihe eingeschlossen wurden 54 Tiere (Tabelle 20). Sie wurden für die in den folgenden Kapiteln beschriebene Behandlung randomisiert in drei Gruppen eingeteilt:

1. **Sham (n = 6):** Die Operation wurde gemäß der Beschreibung in Kapitel 3.1.1 durchgeführt, ohne dass den Versuchstieren ein CCI zugefügt wurde. Die Therapie umfasste 30 Minuten nach dem CCI und anschließend alle 24 Stunden eine intraperitoneale Injektion mit 1 ml/kgKG 0,9 %iger NaCl.
2. **Vehikel (n = 24):** Den Versuchstieren dieser Gruppe wurde im Rahmen der Operation ein SHT zugefügt, wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben. Die Therapie umfasste 30 Minuten nach dem CCI und anschließend alle 24 Stunden eine intraperitoneale Injektion mit 1 ml/kgKG 0,9 %iger NaCl.
3. **Ethylpyruvat (EP) (n = 24):** Den Versuchstieren dieser Gruppe wurde im Rahmen der Operation ein SHT zugefügt, wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben. Die Therapie umfasste 30 Minuten nach dem CCI und anschließend alle 24 Stunden eine intraperitoneale Injektion mit 75 mg/kgKG Ethylpyruvat (75 mg/ml).

Im Rahmen der postoperativen Therapie wurden jeweils die drei Untersuchungszeiträume 3 Stunden, 24 Stunden und 72 Stunden festgelegt.

Nach den Untersuchungszeiträumen erfolgte die Euthanasie und Entnahme der Gehirne (Kapitel 3.2.1).

3.1.1. Induktion des CCI

Eine Allgemeinanästhesie der Versuchstiere wurde mittels Inhalationsnarkose mit 1ml Isofluran eingeleitet und mit Chloralhydrat (10 ml/kgKG + fraktionierte Bolusgabe nach Bedarf) über einen Intraperitonealkatheter aufrechterhalten. Zur Parasympathikolyse wurde 1mg Atropin subcutan appliziert. Die Tiere wurden endotracheal intubiert, volumenkontrolliert

beatmet und kapnometrisch überwacht. (Beatmungsfrequenz ca. 60/min, Tidalvolumen ca. 5-6ml, etCO₂ adaptiert). Über einen intraarteriellen Katheter in der Schwanzarterie erfolgte ein Monitoring von Blutdruck und Blutgasen. Nach stereotaktischer Fixierung und Präparation des rechten Os Parietale wurde eine Kraniotomie rechts posterior des Bregma unter Schonung der Sinus durae matris sowie der Dura mater durchgeführt.

Zur Verursachung eines standardisierten schweren SHT wurde das Controlled-Cortical-Impact (CCI) Modell gewählt. Ein pneumatisch angetriebener Aluminiumbolzen bekannten Durchmessers wird dabei mit definierter Geschwindigkeit, Eindringtiefe, Verweildauer und Lage auf die zuvor operativ, durch eine Kraniotomie freigelegte Dura mater gedrückt (Dixon et al. 1991). Das verwendete CCI-Gerät war ein Eigenbau der Universitätsmedizin Mainz (Alessandri et al. 2012).

Tabelle 1: Parameter für CCI

Bezeichnung Parameter	Wert
Bolzendurchmesser	6 mm
Eindringtiefe	2 mm
Geschwindigkeit	4 m/s
Verweildauer	200 ms
Lage	40° Winkel zur Sagittalebene innerhalb der Frontalebene

Der Knochendeckel wurde anschließend reimplantiert und mit Hilfe von Histoacryl® fixiert. Die Operation und das CCI wurden mit freundlicher Unterstützung von [REDACTED] [REDACTED] nach dem Protokoll aus der Dissertation von [REDACTED] [REDACTED], welche die dosisabhängige neuroprotektive Wirkung von Ethylpyruvat 14 Tage nach CCI untersuchte, durchgeführt (Wenda 2016).

3.2. Probenvorbereitung für die Immunhistochemie (IHC)

3.2.1. Euthanasie und Gehirnentnahme

Nach Ablauf der jeweiligen Behandlungszeiträume wurde eine tiefe Narkose mit 1ml Isofluran als Inhalationsnarkose eingeleitet und mit einem 5ml Bolus Chloralhydrat i.p. aufrechterhalten. Nach anschließender medianer Laparotomie, beidseitiger parasternaler Eröffnung des Thorax zur Darstellung des Herzens erfolgte die Punktion des linken Ventrikels mit einer Kanüle, die dann in den Bulbus aorticus vorgeschoben und dort fixiert wurde. Über diese Kanüle wurde das

Blut aus dem Gefäßsystem mit heparinisierter (10 U/ml) 0,9%NaCl-Lösung ausgespült und konnte über eine Inzision des rechten Atriums abfließen. Nach ischämischer Entfärbung der Leber erfolgte die transvaskuläre Fixierung mit 200ml 4%igem Paraformaldehyd. Zur Entnahme der Gehirne wurde von dorsal die Halswirbelsäule bis zum Foramen Magnum freipräpariert, die Kalotte möglichst unter Schonung der Dura mater entfernt, die Medulla spinalis, Blutgefäße und Hirnnerven durchtrennt und das Gehirn von der Schädelbasis gelöst. Anschließend wurden die Gehirne für 24h in 4%igem Paraformaldehyd fixiert.

3.2.2. Schneiden der Gehirne

Die Gehirne wurden nach Entfernung des Bulbus olfactorius so in einen Paraffinblock eingebettet, dass auf der einen Seite des Blocks der frontale und auf der gegenüberliegenden Seite der occipitale Pol lagen. Mittels Mikrotom wurden 5µm starke Schnitte in der Koronarebene erstellt und auf Objektträger aufgezogen. Von frontal beginnend wurden in Richtung occipital Schnittserien mit jeweils 6 Schnitten angefertigt. Der Abstand der Schnittserien betrug 250µm

In der folgenden Tabelle ist die Vorbereitung der Objektträger für die anschließenden Färbungen zusammengefasst.

Tabelle 2: Vorbereitung Objektträger für IHC-Färbungen

Färbemethode	Anzahl der Schnitte pro Serie	Bezeichnung der Objektträger
Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)	3	HE 2, HE 4, HE 6, etc.
Reserve	3	R 1, R 3, R 5, etc.
IHC-Färbungen	20	A 1-10, B1-10

Für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) wurden jeweils drei Schnitte pro Serie auf einen unbeschichteten Objektträger aufgezogen (Objektträger HE 2, HE 4, HE 6 usw.). Die Schnitte für die HE-Färbung wurden im Bereich von Bregma 3,5 bis Bregma -4,88 erstellt. Ein weiterer Objektträger pro Serie mit jeweils 3 Schnitten wurde als Reserve aufbewahrt (Objektträger R 1, R 3, R 5 usw.). Im Läsionsbereich Bregma -3,4 bis -3,88 wurden aus zwei Intervallen zwischen den Schnittserien für die HE-Färbung insgesamt 40 Schnitte pro Gehirn für immunhistochemische (IHC) Färbungen erstellt (IHC-Serien A und B). Je zwei dieser

Schnitte wurden auf jeweils einen beschichteten Objektträger aufgezogen (IHC-Objektträger A 1-10 und B 1-10).

3.3. Färbungen

Zur histologischen Untersuchung und Ermittlung des Läsionsvolumens wurde die HE-Färbung benutzt. Zur Untersuchung der Auswirkung auf die HMGB 1 und RAGE Signalwege, die Glo 1 Aktivität und die Inflammationsreaktion durch Astrozyten und Mikroglia wurden IHC Färbungen mit Antikörpern gegen Glial fibrillary acidic protein (GFAP) zur Darstellung von Astrozyten, ionized calcium binding adapter molecule (Iba1) zur Darstellung von Mikroglia, sowie HMGB1, und Glo1 zur Quantifizierung der Enzymaktivität und RAGE zur Quantifizierung der Rezeptorexpression durchgeführt.

3.3.1. HE-Färbung

Tabelle 3: Schrittweise Erläuterung der HE-Färbung

Schritt	Erläuterung	Chemikalien / Geräte
1	Entparaffinierung der Gehirnschnitte	10 min. in Xylol
2	Hydrierung	In Isopropanol absteigender Konzentrationen (100%, 98%, 80 %, 70%)
3	Färbung	5 min. in Hämatoxylin
4	Bläuen	5 min. in laufendem Leitungswasser
5	Färbung	30 sec. in Eosin
6	Entwässerung	Jeweils 5 min. in Isopropanol aufsteigender Konzentrationen (96%, 98%, 100%)
7	Klären	5 min. in Xylol
8	Eindecken	Mit Eindeckmedium und Deckglas

3.3.2. IHC-Färbung HMGB 1, RAGE und Glo1

Tabelle 4: Schrittweise Erläuterung der IHC-Färbungen mit den Primärantikörpern HMGB1, RAGE und Glo1

Schritt	Erläuterung	Chemikalien / Geräte
1	Entparaffinieren der Gehirnschnitte	10 min. in Xylol
2	Hydrisierung	In Isopropanol absteigender Konzentrationen (100%, 98%, 80 %, 70%)
3	Demaskieren der Proteine	In Citratpuffer (pH 6) 20 min im Dampfgerar unter Wasserdampf erhitzt
4	Abkühlen	30 min
5	Waschen	1 min in Phosphatpuffer (PBS)
6	Blockieren der endogenen Peroxidase	20 min in 100 ml Methanol- PBS (1:1) und 1ml H ₂ O ₂ (30%)
7	Waschen	5 min in Phosphatpuffer (PBS)
8	Waschen	5 min in PBS mit 0,2% Triton (PBST)
9	Inkubieren in 5% Normalem Ziegen Serum	30 min
10	Inkubieren mit Primärantikörper ¹ in einer 1:100 Verdünnung mit PBS	12 h bei 4°C in Feuchte-Kammer (bedeckt mit Cover-Slips)
11	Waschen	2 x 5 min. in PBST
12	Inkubation mit biotinyliertem Sekundärantikörper ²	30 min.
13	Waschen	2 x 5 min. in PBST
14	Inkubieren des Vectastain Avidin-Biotin-Enzym-Komplex (ABC-Komplex)	30 min. (nach Herstellerangabe)
15	Waschen	5 min in PBST
16	Waschen	5 min in PBS
17	Färbung	3 min in Diaminobenzidin (DAB)
18	Waschen	In PBS

¹ Die Primärantikörper werden in Tabelle 28 benannt (siehe Anhang A).

² Die Sekundärantikörper werden in Tabelle 28 benannt (siehe Anhang A).

Schritt	Erläuterung	Chemikalien / Geräte
19	Entwässerung	Jeweils 5 min. in Isopropanol aufsteigender Konzentrationen (96%, 98%, 100%)
20	Klären	5 min. in Xylol
21	Eindecken	Mit Eindeckmedium und Deckglas
22	Negativkontrolle	Durchführung der Schritte 1-22 mit Ausnahme von Schritt 10

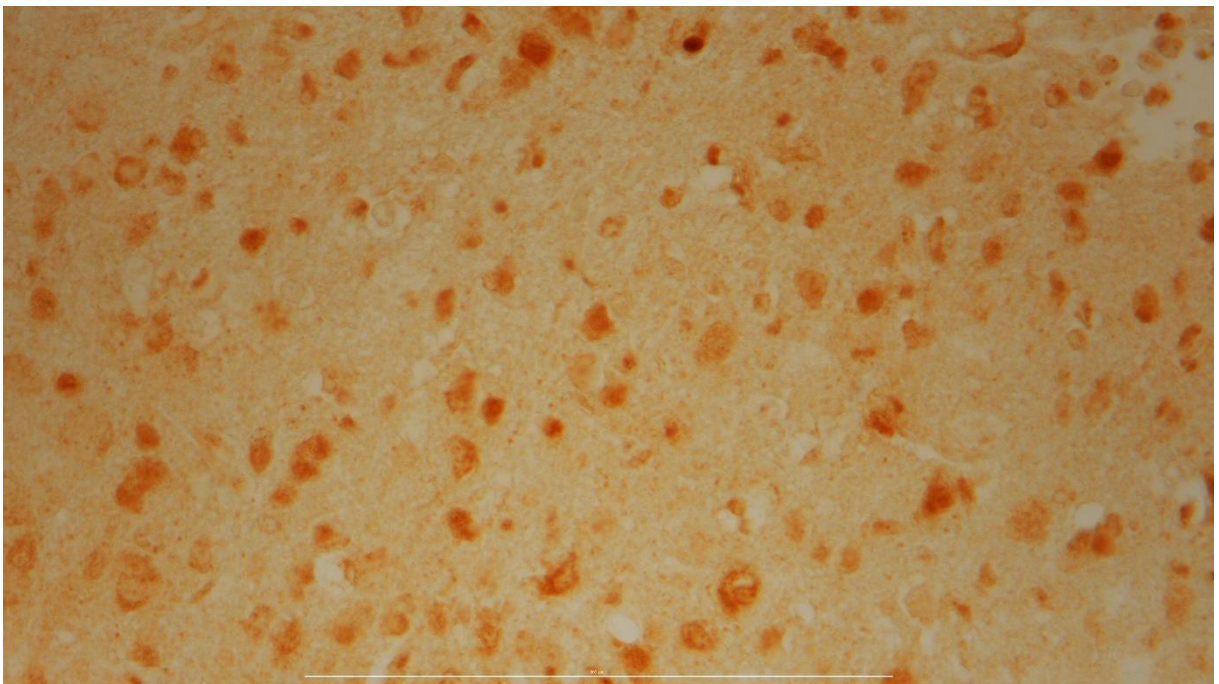


Abbildung 2: Immunhistochemische Färbung von HMGB1. Exemplarisch ist hier der ipsilaterale periläsionelle Kortex eines Vehikel Tieres nach 72 Stunden in 40facher Vergrößerung dargestellt.

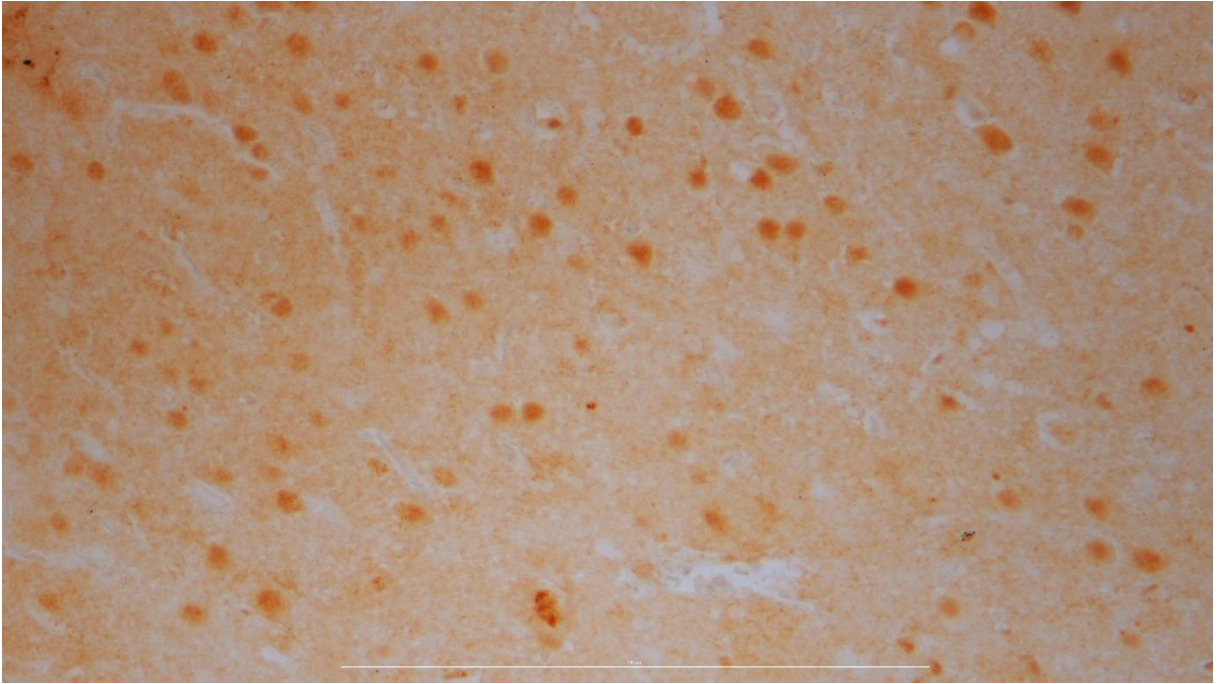


Abbildung 3: Immunhistochemische Färbung von RAGE. Exemplarisch ist hier der ipsilaterale periläsionelle Kortex eines Vehikel Tieres nach 24 Stunden in 40facher Vergrößerung dargestellt.

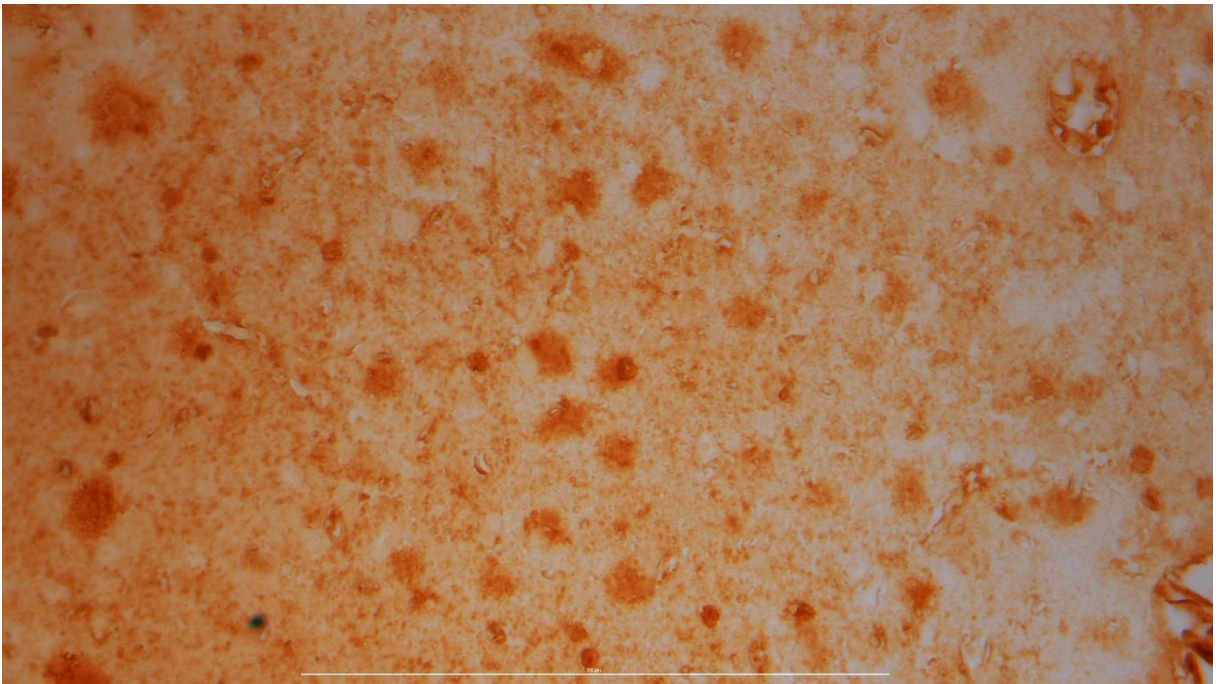


Abbildung 4: Immunhistochemische Färbung von Glo1. Exemplarisch ist hier der ipsilaterale periläsionelle Kortex eines Vehikel Tieres nach 24 Stunden in 40facher Vergrößerung dargestellt.

3.3.3. IHC-Färbung GFAP und Iba1

Tabelle 5: Schrittweise Erläuterung der IHC-Färbungen mit den Primärantikörpern Iba1 und GFAP

Schritt	Erläuterung	Chemikalien / Geräte
1	Entparaffinieren der Gehirnschnitte	10 min. in Xylol
2	Hydrierung	In Isopropanol absteigender Konzentrationen (100%, 98%, 80%, 70%)
3	Demaskieren der Proteine	1min in PBS mit 1% Triton
4	Waschen	3 x 5 min in PBST
5	Blockieren der endogenen Peroxidase	10 min. in 0,3% igem H ₂ O ₂
6	Waschen	3 x 5 min. in PBST
7	Inkubieren in Pferdeserum aus ImPRESS® Polymer Detection Kit	30 min.
8	Inkubieren mit Primärantikörper ³ in einer 1:500 Verdünnung mit PBS	12 h bei 4°C in Feuchte-Kammer (bedeckt mit Cover-Slips)
9	Waschen	3 x 5 min. in PBST
10	Inkubation mit Sekundärantikörper ⁴	30 min (nach Herstellerangabe)
11	Waschen	3 x 5 min. in PBST
12	Färbung	3 min in Diaminobenzidin (DAB)
13	Waschen	In dest. Wasser
14	Waschen	In PBS
15	Entwässerung	Jeweils 5 min. in Isopropanol aufsteigender Konzentrationen (96%, 98%, 100%)
16	Klären	5 min. in Xylol
17	Eindecken	Mit Eindeckmedium und Deckglas
18	Negativkontrolle	Durchführung der Schritte 1-17 mit Ausnahme von Schritt 8

³ Die Primärantikörper werden in Tabelle 29 benannt (siehe Anhang A).

⁴ Die Sekundärantikörper werden in Tabelle 29 benannt (siehe Anhang A).

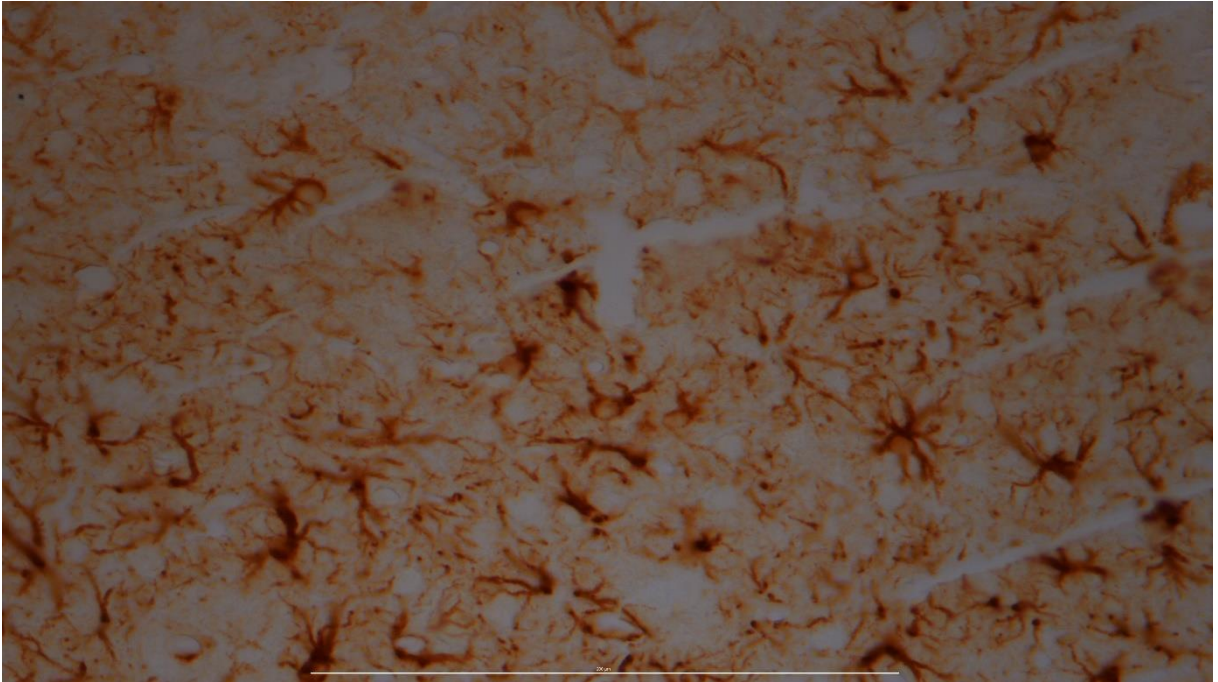


Abbildung 5: Immunhistochemische Färbung von GFAP zur Darstellung von Astrozyten. Exemplarisch ist hier der ipsilaterale periläsionelle Kortex eines Vehikel Tieres nach 72 Stunden in 40facher Vergrößerung dargestellt.

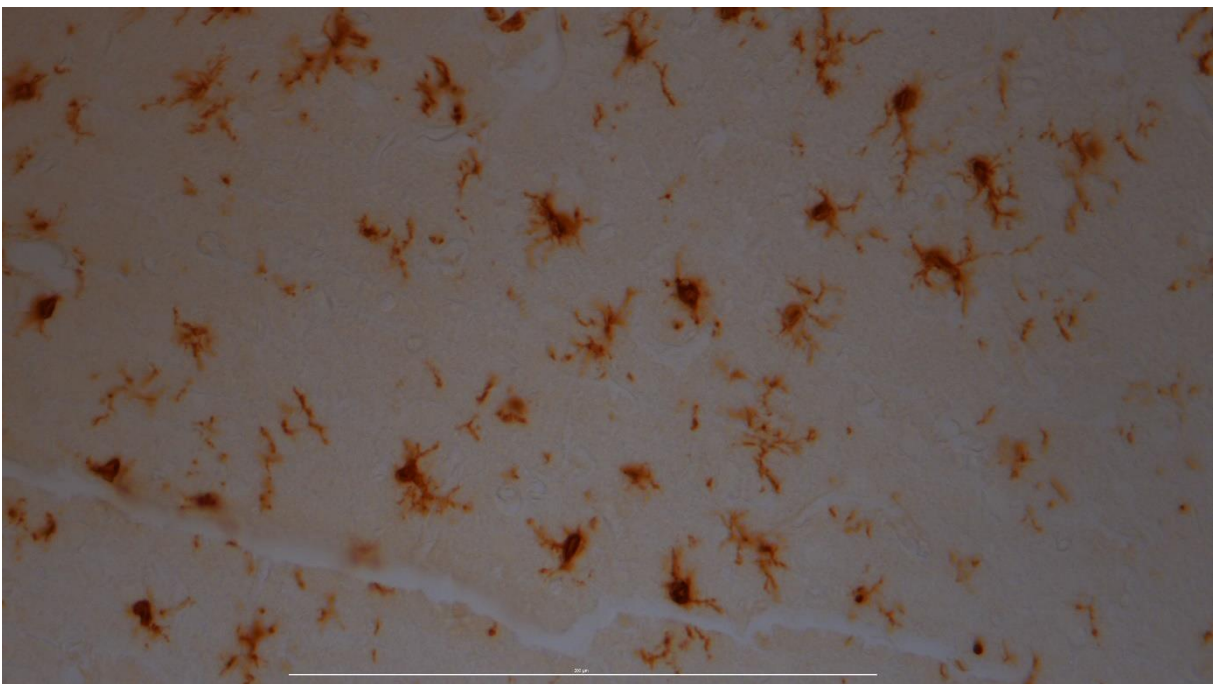


Abbildung 6: Immunhistochemische Färbung von Iba1 zur Darstellung von Mikroglia. Exemplarisch ist hier der ipsilaterale periläsionelle Kortex eines Vehikel Tieres nach drei Stunden in 40facher Vergrößerung dargestellt.

3.4. Volumetrie

Zur Quantifizierung der Größe der Läsion bzw. des Hirnödems wurde die Methode der Volumetrie angewendet. Jeweils ein Lichtmikroskop und ein Makroskop mit angeschlossener

Kamera (CCD Super Color CV 950, JAI, Denmark) dienten zur Darstellung auf dem PC und mithilfe der Software Optimas 6.51 wurde die Fläche der Läsion bzw. der Hemisphäre des Hirnödems bestimmt.

Für die Bestimmung des Läsionsvolumens wurde das Objektiv mit 2,5-facher Vergrößerung verwendet. Mithilfe eines präparierten Objektträgers mit 2 mm Längenmaßstab wurde die Software kalibriert. Die auf dem Bildschirm dargestellte Läsion mit sichtbarer Läsionsgrenze wurde durch Umfahren mit der PC-Maus markiert und die Läsionsfläche in mm² vom Programm berechnet. Durch Multiplikation mit dem bekannten Schnitt-Abstand von 0,25 mm wurde das Läsionsvolumen berechnet.

Da gerade in der Frühphase nach CCI der nekrotische Teil der Läsion von einem periläsionellen Bereich mit ödematös aufgetriebenen Zellen umgeben ist, wurde das Läsionsvolumen als das nekrotische Areal bestimmt und zusätzlich wurde der perikontusionelle Bereich bestimmt, der sich vom gesunden, unbeeinträchtigten Cortex abgrenzt (s. Abbildung 8).

Die Messung der Fläche und Berechnung des Hemisphärenvolumens im Läsionsbereich erfolgte analog der Vorgehensweise für das Läsionsvolumen, jedoch unter Verwendung des Makroskops. Zum Vergleich des Ausmaßes des Gehirnödems wurde der Quotient aus ipsilateralem Hemisphärenvolumen / kontralateralem Hemisphärenvolumen gebildet. Dieser Quotient wurde anschließend für die statistischen Tests herangezogen.

Da ein ausgeprägtes Ödem auch das Volumen der Läsion beeinflusst, wurde in einem weiteren Schritt das Läsionsvolumen unabhängig von dem Einfluss des Ödems ausgewertet. Dazu wurde das ipsilaterale Läsionsvolumen in Relation zum ipsilateralen Hemisphärenvolumen im Läsionsbereich gesetzt. Durch die Berechnung $\frac{\text{Läsionsvolumen}}{\text{Hemisphärenvolumen}} = \text{Läsion} [\%]$ ergibt sich der prozentuale Anteil der Läsion am Hemisphärenvolumen.

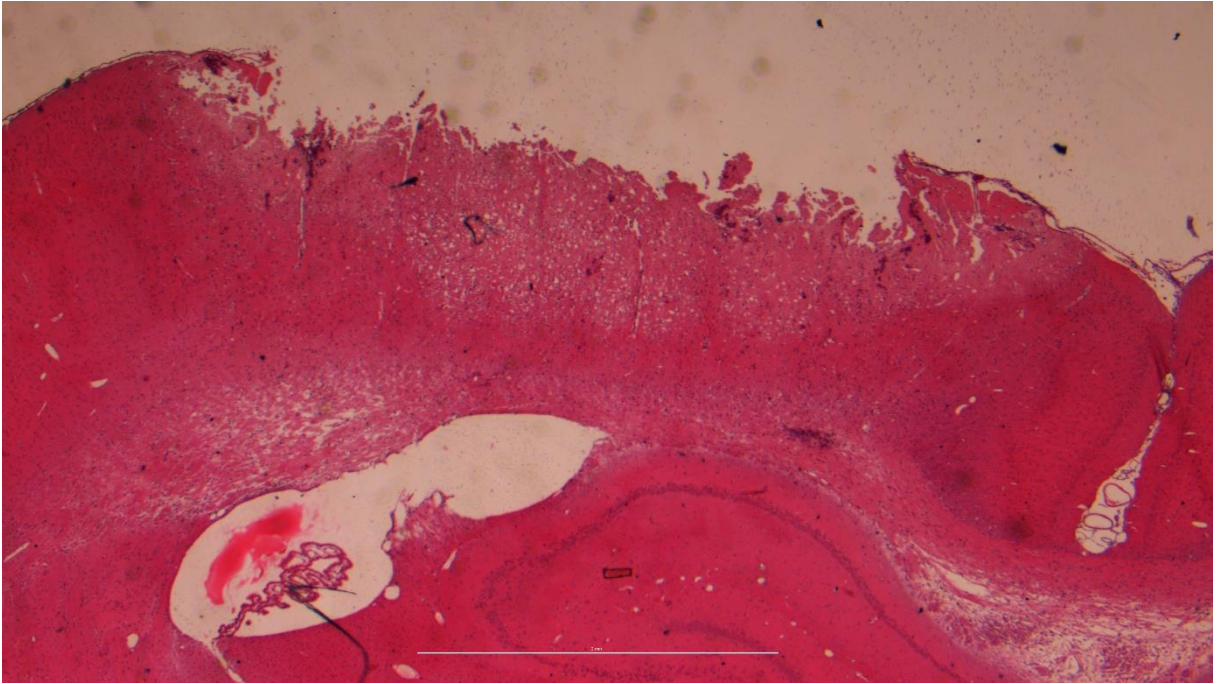


Abbildung 7: Läsion eines EP-behandelten Tieres 24 Stunden nach CCI: Dargestellt ist die ipsilaterale Hemisphäre nach CCI. Im oberen Bildrand ist die Kortexoberfläche mit der Läsion zu erkennen. Zum rechten Bildrand hin angrenzend ist ungeschädigter Kortex und die Mittellinie zu sehen, zum linken Bildrand die laterale Kortexoberfläche.

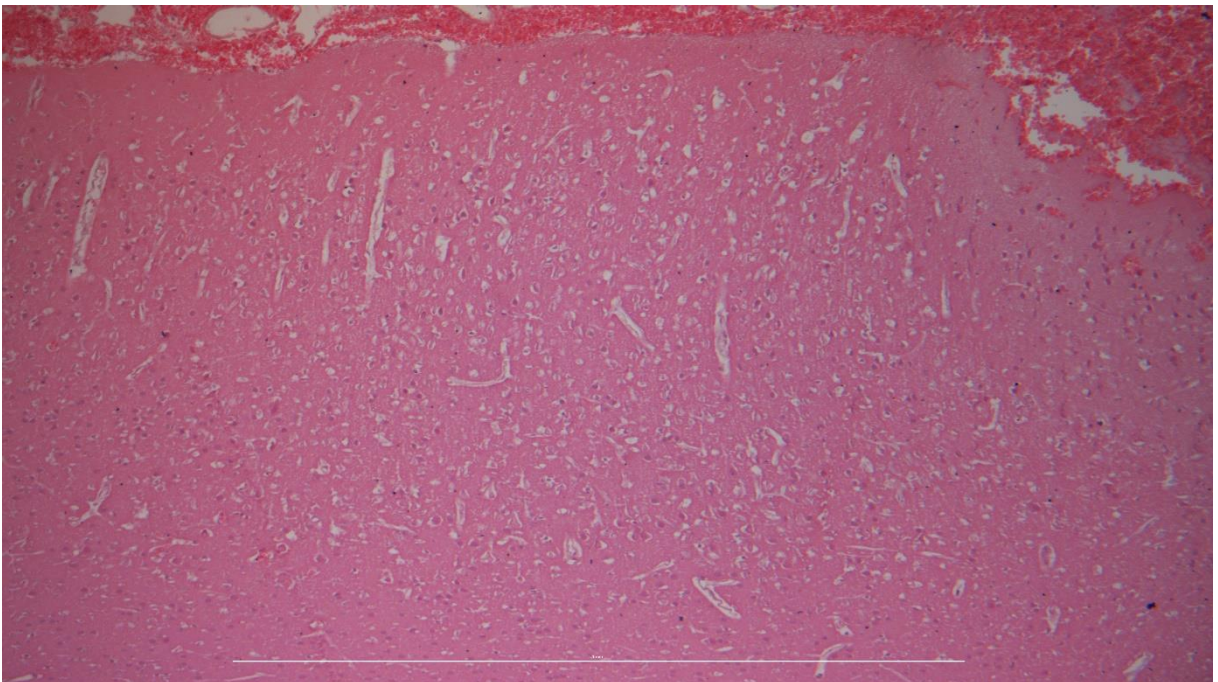


Abbildung 8: Periläsionelle Kontusion eines Vehikel Tieres drei Stunden nach CCI: Im rechten Bildrand ist die Läsionsgrenze mit dem Übergang in den periläsionellen Kortex zu sehen. Die periläsionelle Kontusion ist durch ödematöse Zellen zur erkennen und grenzt sich im unteren und linken Bildrand von dem nicht geschädigten kortikalen Gewebe ab.

3.5. Immunhistochemische Auswertung

Die immunhistochemisch gefärbten Gehirnschnitte wurden mittels Lichtmikroskop und einem Objektiv mit 20-facher Vergrößerung, sowie einer angeschlossenen Kamera auf dem PC dargestellt. Die Auswertung erfolgte verblindet, wie bereits im vorhergehenden Kapitel, mithilfe der Software Optimas 6.51.

Zunächst wurden Regions of Interest (ROI) für die Auswertung bestimmt (s. Abbildung 9). In den ROI wurden anschließend drei Messungen durchgeführt um die Zell- bzw. Enzymaktivität in jedem ROI zu quantifizieren:

- Messung der immunoreaktiven Fläche
- Zellzahl immunoreaktiver Zellen

Das genaue Vorgehen ist im Folgenden detailliert beschrieben.

Eine ROI ist eine von uns vorgegebene rechteckige Fläche von definierter Größe (150x300 Pixel entsprechen 107x217µm). Pro Schnitt wurden acht ROI wie folgt ausgewertet.

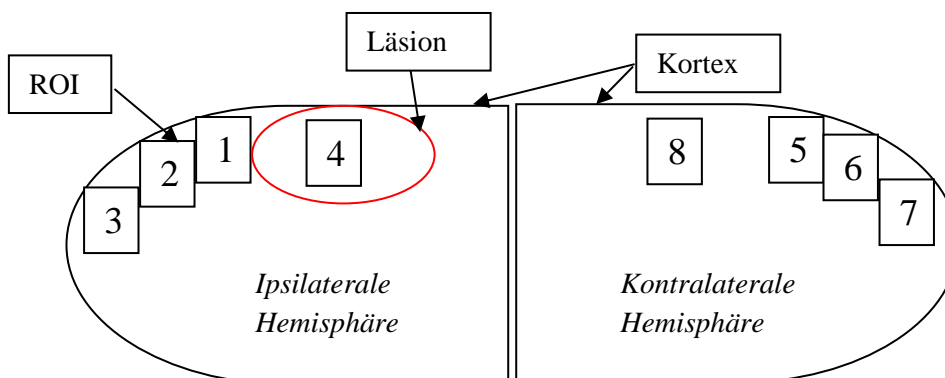


Abbildung 9: Anordnung der ROI

Es wurden vier ROI ipsilateral platziert. ROI 1, 2 und 3 lagen lateral der Läsion. ROI 1 grenzte unmittelbar an den Läsionsrand und die Kortexoberfläche, ROI 2 und 3 jeweils an den lateralen Rand des vorherigen ROI und die Kortexoberfläche. ROI 4 lag im Läsionsbereich. Die ROI 5, 6, 7 und 8 wurden als Referenzwerte für die ipsilaterale Hemisphäre an der Median-Sagittal-Achse gespiegelt in der kontralateralen Hemisphäre angeordnet, sodass sich die ROI 1 und 5, 2 und 6, 3 und 7, 4 und 8 spiegelbildlich gegenüber lagen.

Mithilfe der Software Optimas 6.51 wurde die immunoreaktive Fläche (IRF) jedes Schnitts ermittelt. Hierzu wurde das bereits zuvor auf den PC übertragene farbige Bild zunächst in Graustufen konvertiert. Die positiv angefärbten Zellen erschienen in einem intensiven (dunklen) Grauton. Die Einstellung eines Schwellenwertes für die Grau-Intensität stellte sicher,

dass von der Software ausschließlich die angefärbten, antikörperpositiven Bereiche vollständig erkannt werden. Dieser Schwellenwert wurde für jeden Schnitt ermittelt und durfte während der Auswertung der ROI nicht verändert werden. Für die Messung der IRF waren eine gleichbleibende Intensität der Lichtquelle des Mikroskops und ein unveränderter Fokus einzuhalten. Die IRF wurde prozentual zur Gesamtfläche des ROI erhoben.

Die Anzahl der antikörperpositiven Zellen in dem jeweiligen ROI wurde manuell gezählt. Für den Fall, dass Zellen die Grenzen des ROI überragten, wurden nur die Zellen am medialen und basalen Rand des ROI gezählt.

3.6. Statistische Auswertung

Im Rahmen der statistischen Auswertung wurden die Gehirnschnitte der Versuchsgruppen Vehikel und Ethylpyruvat mit den jeweiligen Versuchszeiträumen drei, 24 und 72 Stunden gegenübergestellt. Es galt, signifikante Unterschiede von Läsions- und Hemisphärenvolumen, sowie der IRF und Anzahl der immunoreaktiven Zellen herauszuarbeiten. Für die statistische Auswertung wurde die Software Sigmaplot in der Version 12.5 verwendet.

Eingangsvoraussetzung für die folgenden statistischen Tests ist die Kenntnis über die Gaußsche Normalverteilung und Varianzgleichheit.

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob sich die zentralen Tendenzen (Mittelwerte) zwischen den Versuchsgruppen signifikant unterscheiden: Die Untersuchung auf signifikante Unterschiede der IRF, der Anzahl immunoreaktiver Zellen und des Hemisphärenvolumens innerhalb der Gruppen zu den verschiedenen Zeitpunkten erfolgte für normalverteilte, varianzgleiche Daten mittels einer einfaktoriellem Varianzanalyse (One Way Anova → analysis of variance). Für nicht normalverteilte Daten wurde die Kruskal-Wallis Varianzanalyse verwendet. Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert $\leq 0,05$ angenommen. In Post hoc Tests wurden bei vorliegender Signifikanz die Mittelwerte der One Way Anova bzw. die Medianwerte der Kruskal-Wallis Varianzanalyse paarweise gegenübergestellt, um signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen herauszuarbeiten. Auf diese Weise konnte weiterhin eine Aussage darüber getroffen werden, welche Gruppen sich nicht signifikant voneinander unterscheiden. Bei normalverteilten Daten wurde der Student-Newman-Keuls Test, bei nicht normalverteilten Daten die Dunn's Methode verwendet.

Im direkten Vergleich der Gruppen zu den jeweiligen Zeiträumen wurden die IRF, die Anzahl immunoreaktiver Zellen und das Hemisphärenvolumen für normalverteilte Daten durch einen

t-Test und für nicht normalverteilte Daten durch den Mann-Whitney Rank Sum Test auf Signifikanz getestet.

Zur Untersuchung auf signifikante Unterschiede der IRF zwischen ipsilateraler und kontralateraler Hemisphäre wurde für normalverteilte Daten der gepaarte t-Test, für nicht normalverteilte Daten der Wilcoxon Signed Rank Test verwendet.

Alle Daten wurden in den Tabellen und Grafiken als Mittelwerte \pm Standardfehler (s.e.m) angegeben. Unterschiede von $p < 0,05$ werden mit *, $p < 0,01$ mit **, $p < 0,001$ mit*** markiert. In der folgenden Matrix ist die Anwendung der statistischen Analysemethoden im Rahmen der Auswertung zusammengefasst.

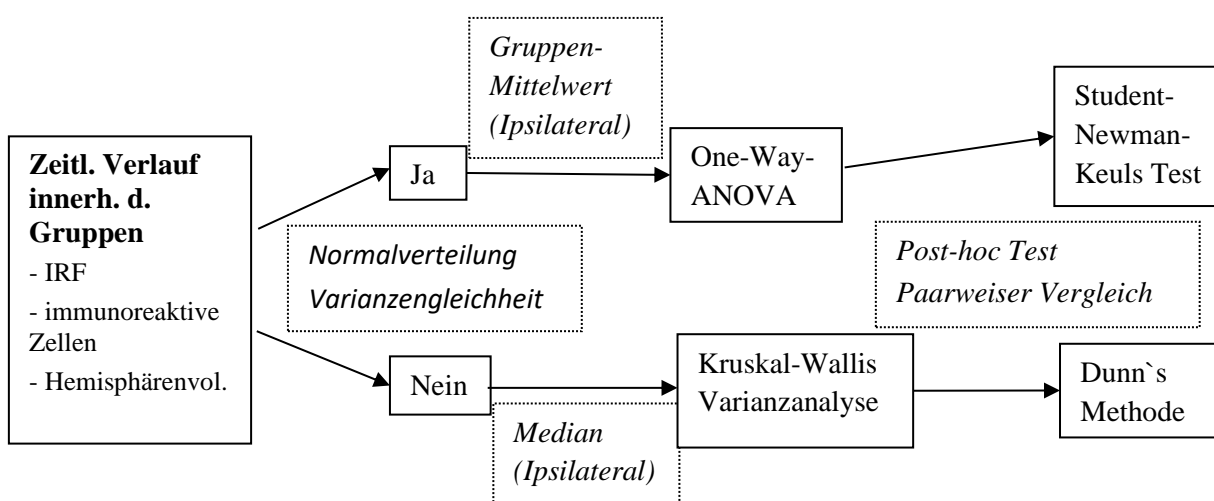


Abbildung 10: Graphische Zusammenfassung der statistischen Auswertung des zeitlichen Verlaufs von IRF, immunoreaktiven Zellen und Hemisphärenvolumen innerhalb der Gruppen

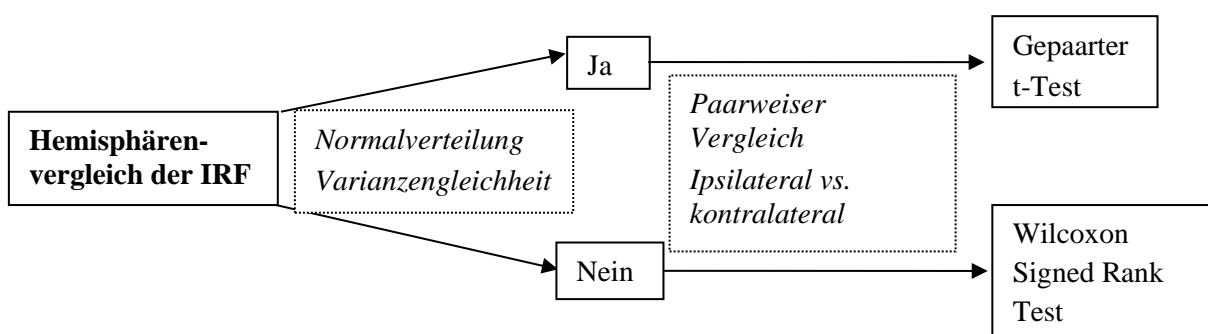


Abbildung 11: Graphische Zusammenfassung der statistischen Auswertung des Hemisphärenvergleichs der IRF

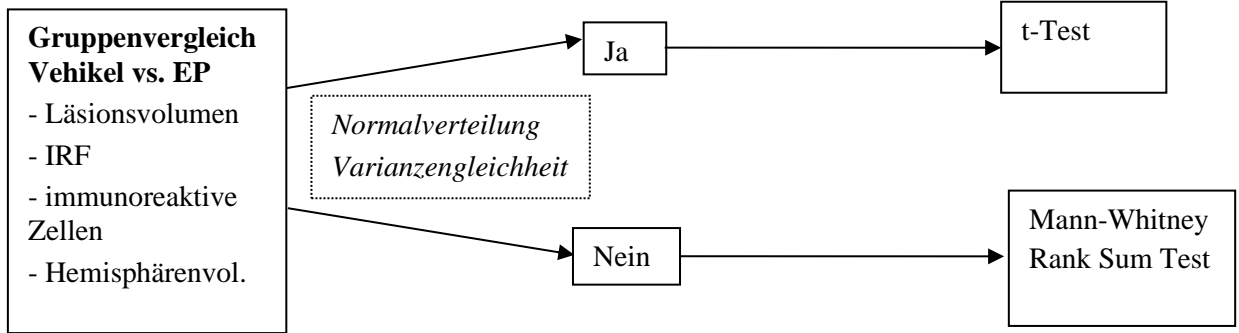


Abbildung 12: Graphische Zusammenfassung der statistischen Auswertung des Gruppenvergleichs Vehikel vs. EP von Läsionsvolumen, IRF, immunoreaktiven Zellen und Hemisphärenvolumen

4. Ergebnisse

4.1. Läsionsvolumetrie

Innerhalb der Vehikel Gruppe war das Läsionsvolumen nach 72 Stunden signifikant größer als nach drei Stunden ($p = 0,013$).

Das ödemkorrigierte Läsionsvolumen war nach 72 Stunden signifikant größer als nach drei Stunden ($p = 0,006$).

Im zeitlichen Verlauf gab es innerhalb der Vehikel Gruppe keine signifikante Veränderung des periläsionellen Kontusionsvolumens.

Das Hemisphärenvolumen änderte sich im Beobachtungszeitraum nicht signifikant.

In der EP Gruppe gab es im zeitlichen Verlauf keine signifikante Änderung des Läsionsvolumens.

Das ödemkorrigierte Läsionsvolumen zeigte keine signifikante Veränderung.

Das periläsionelle Kontusionsvolumen zeigte ebenfalls keine signifikante Veränderung im zeitlichen Verlauf.

Das Hemisphärenvolumen änderte sich im zeitlichen Verlauf innerhalb der EP Gruppe nicht signifikant.

Die Tiere der Sham Gruppe hatten ein mittleres Läsionsvolumen von $0,394 \text{ mm}^3$ (s.e.m.: $0,16 \text{ mm}^3$). Im zeitlichen Verlauf änderte es sich nicht signifikant.

Im Gruppenvergleich war nach 72 Stunden das Läsionsvolumen der EP Gruppe signifikant kleiner als das der Vehikel Gruppe ($p = 0,003$). Nach drei und nach 24 Stunden gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Das ödemkorrigierte Läsionsvolumen war in der EP Gruppe ebenfalls nach 72 Stunden signifikant geringer ($p = 0,003$).

Gleich verhielt es sich mit dem periläsionellen Kontusionsvolumen, das nach 72 Stunden in der EP Gruppe signifikant kleiner war als in der Vehikel Gruppe ($p = 0,028$).

Die EP Gruppe hatte zu dem nach 72 Stunden im Vergleich zur Vehikel Gruppe ein signifikant kleineres ipsilaterales Hemisphärenvolumen ($p = 0,038$).

Nicht signifikant unterschiedliche waren das Läsionsvolumen, das periläsionelle Kontusionsvolumen, das ipsilaterale Hemisphärenvolumen und das ödemkorrigierte Läsionsvolumen nach drei und nach 24 Stunden.

Tabelle 6: Mittelwerte Läsionsvolumen \pm s.e.m. [mm³]

Behandlungszeitraum	Gruppen	
	EP	Vehikel
3 h	1,86 \pm 0,49	1,52 \pm 0,40
24 h	5,43 \pm 1,51	5,21 \pm 1,89
72 h	1,57 \pm 0,43	6,65 \pm 1,30

Tabelle 7: Mittelwerte ödemkorrigiertes Läsionsvolumen \pm s.e.m. [%]

Behandlungszeitraum	Gruppen	
	EP	Vehikel
3 h	1,68 \pm 0,45	1,16 \pm 0,26
24 h	4,69 \pm 1,49	4,15 \pm 1,49
72 h	1,60 \pm 0,52	6,21 \pm 1,41

Tabelle 8: Mittelwerte Hemisphärenvolumen ipsilateral / kontralateral \pm s.e.m.

Behandlungszeitraum	Gruppen	
	EP	Vehikel
3 h	0,99 \pm 0,02	1,03 \pm 0,02
24 h	1,03 \pm 0,02	1,03 \pm 0,02
72 h	0,98 \pm 0,01	1,05 \pm 0,02

Tabelle 9: Mittelwerte periläsionelles Kontusionsvolumen \pm s.e.m. [mm³]

Behandlungszeitraum	Gruppen	
	EP	Vehikel
3 h	3,52 \pm 0,85	2,64 \pm 0,73
24 h	4,51 \pm 1,88	6,41 \pm 3,48
72 h	1,32 \pm 0,39	3,95 \pm 1,00

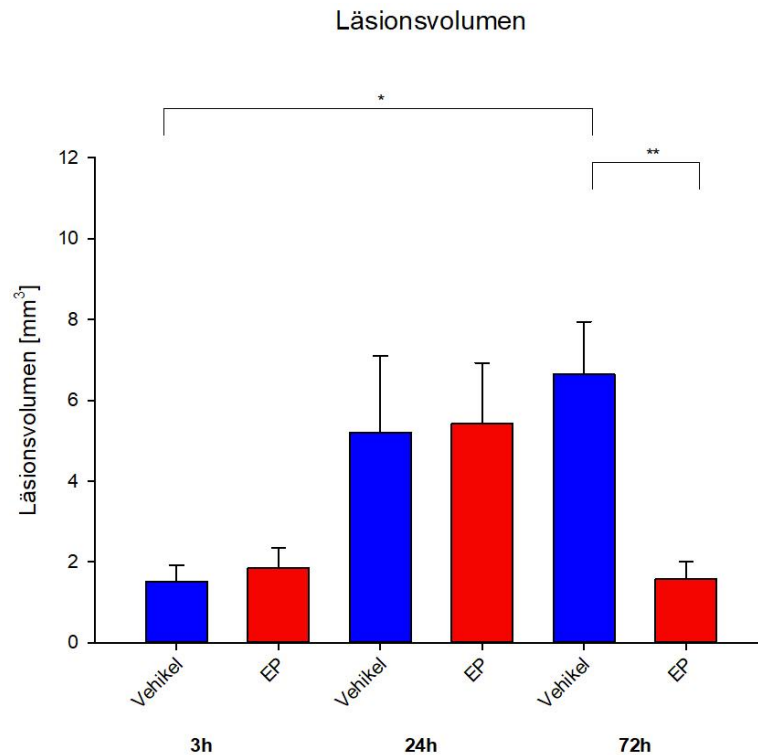


Abbildung 13: Graphische Darstellung der Mittelwerte (+ s.e.m.) des Läsionsvolumens [mm³] im zeitlichen Verlauf. *: p<0,05; **: p<0,01

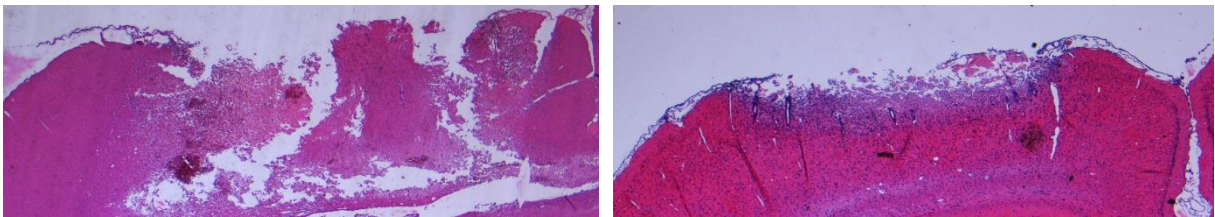


Abbildung 14: Vergleich des Läsionsvolumens (HE-Färbung) Vehikel (links), Läsionsvolumen 9,07 mm³ vs. EP (rechts) Läsionsvolumen 3,81 mm³ nach 72h ; 2,5fache Vergrößerung. In der Bildmitte Läsion, am rechten Bildrand die Mittellinie, am linken Bildrand die laterale Kortexoberfläche.

4.2. HMGB1

4.2.1. Immunoreaktive Fläche HMGB1

Nach drei und nach 24 Stunden lagen in der Vehikel Gruppe keine signifikanten Unterschiede zwischen den Hemisphären vor.

Nach 72 Stunden war die HMGB1 positive IRF ipsilateral, periläsionelle in ROI 1 ($p = 0,003$), ROI 2 ($p = 0,001$) und ROI 3 ($p = 0,007$) signifikant erhöht.

Im zeitlichen Verlauf der Vehikel Gruppe war die HMGB1 positive IRF ipsilateral, periläsionell in ROI 2 ($p = 0,038$) und in der Läsion in ROI 4 ($p = 0,038$) nach drei und nach 72 Stunden signifikant größer als nach 24 Stunden.

Nach drei und nach 24 Stunden gab es in der EP Gruppe keine signifikanten Unterschiede zwischen den Hemisphären.

Nach 72 Stunden lag eine ipsilaterale signifikante Erhöhung nur in der Läsion in ROI 4 ($p = 0,016$) vor.

Während des Untersuchungszeitraums kam es zu keiner signifikanten Änderung der HMGB1 positiven IRF innerhalb der EP Gruppe.

Im Vergleich der Behandlungsgruppen war nach drei Stunden die HMGB1 positive IRF in der EP Gruppe ipsilateral, periläsionell in ROI 1 ($P = 0,034$) und in der Läsion in ROI 4 ($P = 0,024$) signifikant niedriger als in der Vehikel Gruppe.

Nach 24 Stunden gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen der EP und Vehikel Gruppe.

Nach 72 Stunden war die HMGB1 positive IRF in der EP Gruppe ipsilateral, periläsionell in ROI 1 ($P = 0,021$) signifikant geringer als in der Vehikel Gruppe.

Tabelle 10: Hemisphärenvergleich immunoreaktive Fläche HMGB1: Mittelwerte \pm s.e.m [%] nach 3h, 24h und 72h

ROI ipsi vs. ROI kontra	Gruppe			
	EP		Vehikel	
	<i>ipsi</i>	<i>kontra</i>	<i>ipsi</i>	<i>kontra</i>
3h				
ROI 1vs.5	4,53 \pm 0,97	5,39 \pm 1,18	8,70 \pm 1,48	6,09 \pm 1,42
ROI 2vs.6	3,78 \pm 0,89	4,41 \pm 1,04	6,34 \pm 0,89	5,30 \pm 1,04
ROI 3vs.7	4,40 \pm 1,21	4,66 \pm 1,06	5,84 \pm 1,15	6,24 \pm 1,13
ROI 4vs.8	3,63 \pm 0,66	3,73 \pm 0,97	5,76 \pm 0,53	5,43 \pm 1,22
24h				
ROI 1vs.5	5,71 \pm 0,56	5,13 \pm 1,09	5,33 \pm 1,14	3,21 \pm 1,11
ROI 2vs.6	4,03 \pm 0,59	4,43 \pm 0,92	3,41 \pm 0,78	3,71 \pm 1,32
ROI 3vs.7	3,91 \pm 0,6	4,06 \pm 0,72	3,16 \pm 0,78	3,63 \pm 1,52
ROI 4vs.8	2,78 \pm 0,77	3,76 \pm 0,78	3,09 \pm 0,97	3,70 \pm 1,30

ROI ipsi vs. ROI kontra	Gruppe			
	EP		Vehikel	
	<i>ipsi</i>	<i>kontra</i>	<i>ipsi</i>	<i>kontra</i>
	72h			
ROI 1vs.5	4,11 ± 1,21	3,26 ± 0,54	6,96 ± 0,75	3,33 ± 0,78
ROI 2vs.6	3,79 ± 1,43	4,00 ± 1,21	6,30 ± 0,8	3,23 ± 0,85
ROI 3vs.7	3,61 ± 1,19	3,77 ± 0,84	6,46 ± 0,81	3,34 ± 0,94
ROI 4vs.8	5,43 ± 2,08	2,27 ± 0,69	6,93 ± 1,87	3,04 ± 0,78

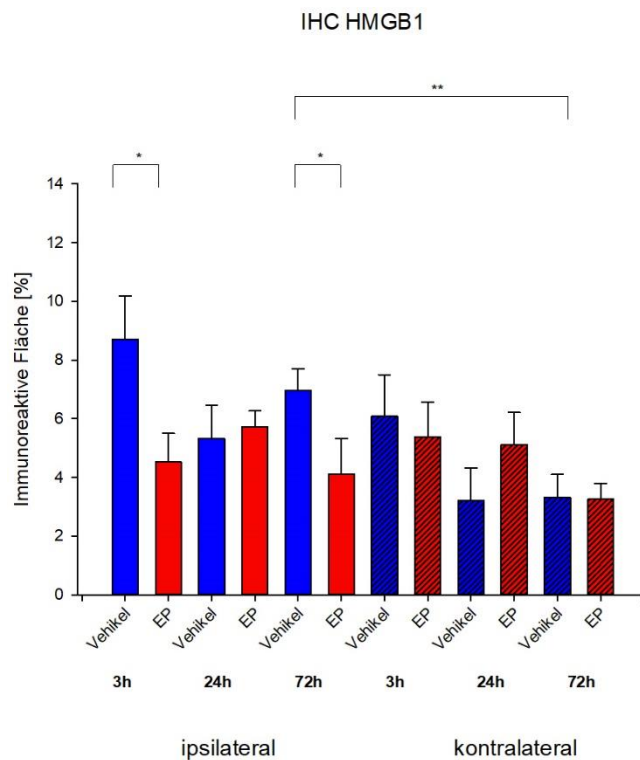


Abbildung 15: Graphische Darstellung der HMGB1-positiven IRF (+ s.e.m.) [%] im zeitlichen Verlauf; ipsilateral jeweils ROI 1 und kontralateral (schraffiert) jeweils ROI 5. *: p<0,05; **: p<0,01

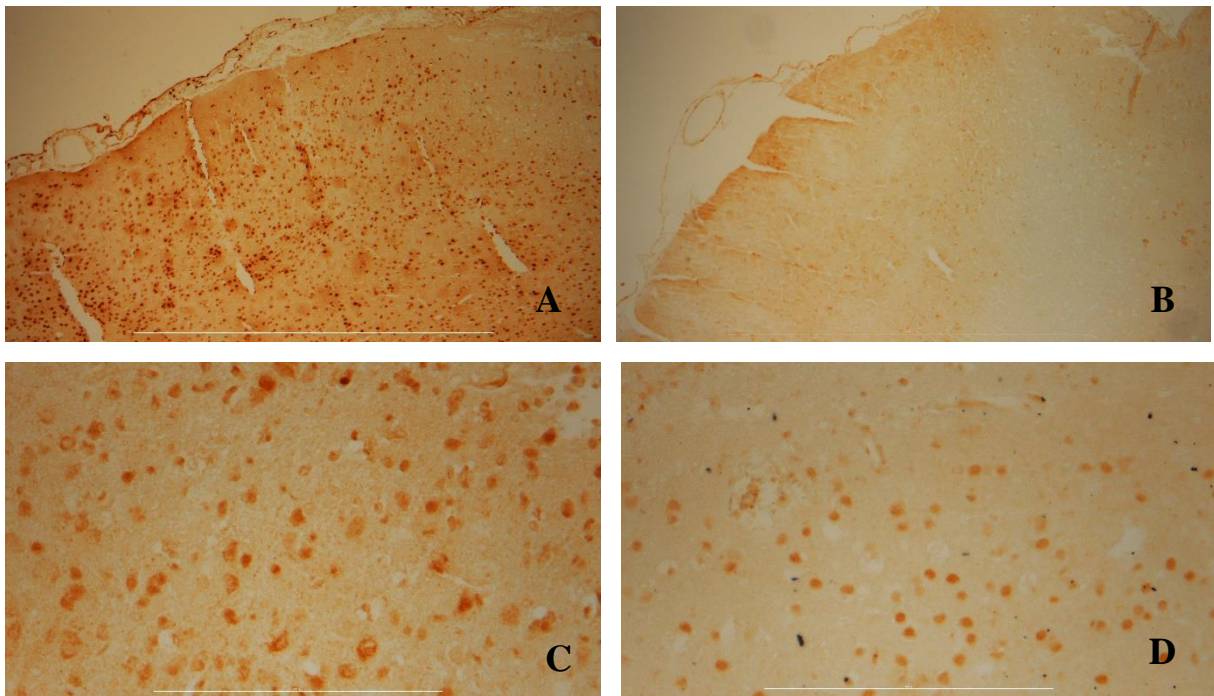


Abbildung 16: Vergleich IHC HMGB1 Vehikel drei Stunden (A) vs. EP drei Stunden (B); 10fache Vergrößerung, Vehikel 72 Stunden (C) vs. EP 72 Stunden (D); 40fache Vergrößerung. Dargestellt ist jeweils der ipsilaterale periläsionelle Kortex lateral der Läsion. EP führt zu einer signifikanten Reduktion von HMGB1 nach drei und 72 Stunden.

4.2.2. HMGB1 positive Zellen

Im zeitlichen Verlauf war die Anzahl der HMGB1 positiven Zellen innerhalb der Vehikel Gruppe nach drei Stunden ipsilateral, periläsionell in ROI 1 ($p = 0,04$) und ROI2 ($p = 0,011$) signifikant größer als nach 24 Stunden.

In der EP Gruppe änderte sich die Anzahl der HMGB1 positiven Zellen nicht signifikant während des Beobachtungszeitraums.

Im Vergleich der Behandlungsgruppen war nach drei Stunden die Anzahl der HMGB1 positiven Zellen in der EP Gruppe ipsilateral, periläsionell in ROI 1 ($P = 0,011$) und ROI 2 ($P = 0,006$) signifikant geringer als in der Vehikel Gruppe.

Nach 24 und 72 Stunden gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Tabelle 11: Mittelwerte HMGB1 positive Zellen \pm s.e.m. nach 3h, 24h, 72h

	Gruppe	
	EP	Vehikel
3h		
ROI 1	19,25 \pm 4,02	39,75 \pm 5,69 ^{*a, *c}
ROI 2	19,13 \pm 3,50	37,13 \pm 4,25 ^{*b, *d}
ROI 3	20,88 \pm 4,09	31,25 \pm 4,96
ROI 4	22,50 \pm 2,4	27,00 \pm 4,53
24h		
ROI 1	25,88 \pm 2,37	23,14 \pm 2,97
ROI 2	24,50 \pm 2,95	18,00 \pm 4,49
ROI 3	25,75 \pm 3,48	18,14 \pm 3,87
ROI 4	12,25 \pm 3,32	13,29 \pm 2,53
72h		
ROI 1	19,29 \pm 3,04	27,88 \pm 3,7
ROI 2	21,57 \pm 4,649	25,88 \pm 3,27
ROI 3	21,71 \pm 4,43	24,63 \pm 2,76
ROI 4	22,43 \pm 6,2	22,25 \pm 4,29

4.3. RAGE

4.3.1. Immunoreaktive Fläche RAGE

In der Vehikel Gruppe war die RAGE positive IRF nach drei Stunden periläsionell in ROI 1 ($p = 0,016$), ROI 2 ($p = 0,031$), ROI 3 ($p = 0,029$) und in der Läsion in ROI 4 ($p = 0,041$) ipsilateral signifikant größer als kontralateral.

Auch nach 24 Stunden war die IRF periläsionell in ROI 1 ($p = 0,003$), ROI 2 ($p = 0,004$), ROI 3 ($p = 0,005$) und in der Läsion ROI 4 ($p < 0,001$) ipsilateral signifikant erhöht.

Die IRF für RAGE blieb auch nach 72 Stunden periläsionell in ROI 1 ($p < 0,001$), ROI 2 ($p = 0,006$), ROI 3 ($p = 0,022$) und in der Läsion in ROI 4 ($p = 0,005$) ipsilateral gegenüber kontralateral signifikant erhöht.

In der Vehikel Gruppe zeigte sich im zeitlichen Verlauf keine signifikante Änderung der RAGE positiven IRF.

In der EP Gruppe waren die Werte der RAGE positiven IRF nach drei Stunden periläsionell in ROI 1 ($p = 0,033$), ROI 3 ($p = 0,032$) und in der Läsion in ROI 4 ($p = 0,012$) ipsilateral signifikant höher als kontralateral.

Nach 24 Stunden zeigte sich das gleiche Bild für die RAGE positive IRF in ROI 1 ($p = 0,007$), ROI 2 ($p = 0,020$) und ROI 4 ($p = 0,037$).

Auch nach 72 Stunden war die IRF periläsionell in ROI 1 ($p = 0,013$), ROI 2 ($p = 0,004$), ROI 3 ($p = 0,015$) und in der Läsion in ROI 4 ($p = 0,001$) ipsilateral signifikant erhöht.

Im zeitlichen Verlauf war in der EP Gruppe die RAGE positive IRF nur in der Läsion in ROI 4 ($p = 0,027$) nach drei Stunden signifikant größer als nach 24 Stunden.

Im Gruppenvergleich unterschieden sich die Werte der RAGE positiven IRF nach drei und nach 72 Stunden nicht signifikant.

Nach 24 Stunden war die RAGE positive IRF in der EP Gruppe periläsionell in ROI 2 ($P = 0,038$) und in der Läsion in ROI 4 ($P = 0,012$) signifikant geringer als in der Vehikel Gruppe.

Tabelle 12: Hemisphärenvergleich immunoreaktive Fläche RAGE: Mittelwerte \pm s.e.m [%] nach 3h, 24h und 72h

ROI ipsi vs. ROI kontra	Gruppe			
	EP		Vehikel	
	<i>ipsi</i>	<i>kontra</i>	<i>ipsi</i>	<i>kontra</i>
<i>3h</i>				
ROI 1vs.5	2,95 \pm 0,82	1,26 \pm 0,64	3,64 \pm 0,68	1,99 \pm 0,49
ROI 2vs.6	2,80 \pm 0,75	1,24 \pm 0,48	2,89 \pm 0,50	2,06 \pm 0,55
ROI 3vs.7	3,25 \pm 0,71	1,29 \pm 0,46	2,98 \pm 0,40	1,93 \pm 0,53
ROI 4vs.8	3,94 \pm 0,73	1,24 \pm 0,40	2,40 \pm 0,47	1,69 \pm 0,34
<i>24h</i>				
ROI 1vs.5	2,54 \pm 0,44	0,86 \pm 0,17	3,70 \pm 0,56	1,03 \pm 0,20
ROI 2vs.6	1,90 \pm 0,31	0,73 \pm 0,14	3,50 \pm 0,66	1,04 \pm 0,20
ROI 3vs.7	1,65 \pm 0,36	0,83 \pm 0,15	2,80 \pm 0,57	0,80 \pm 0,16
ROI 4vs.8	1,51 \pm 0,27	0,70 \pm 0,28	3,14 \pm 0,51	0,94 \pm 0,29

ROI ipsi vs. ROI kontra	Gruppe			
	EP		Vehikel	
	<i>ipsi</i>	<i>kontra</i>	<i>ipsi</i>	<i>kontra</i>
	72h			
ROI 1vs.5	3,75 ± 0,73	1,38 ± 0,33	3,38 ± 0,36	1,15 ± 0,11
ROI 2vs.6	2,81 ± 0,39	1,08 ± 0,22	2,50 ± 0,38	0,91 ± 0,14
ROI 3vs.7	2,69 ± 0,39	1,09 ± 0,26	2,91 ± 0,58	0,94 ± 0,17
ROI 4vs.8	3,24 ± 0,69	1,01 ± 0,34	2,74 ± 0,37	0,94 ± 0,13

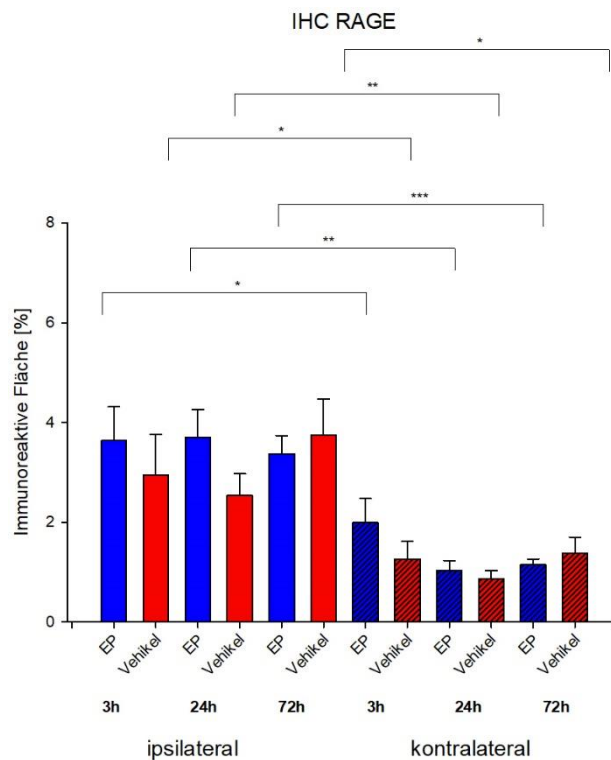


Abbildung 17: Graphische Darstellung der RAGE-positiven IRF (+ s.e.m.) [%] im zeitlichen Verlauf; ipsilateral jeweils ROI 1 und kontralateral (schraffiert) jeweils ROI 5. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$

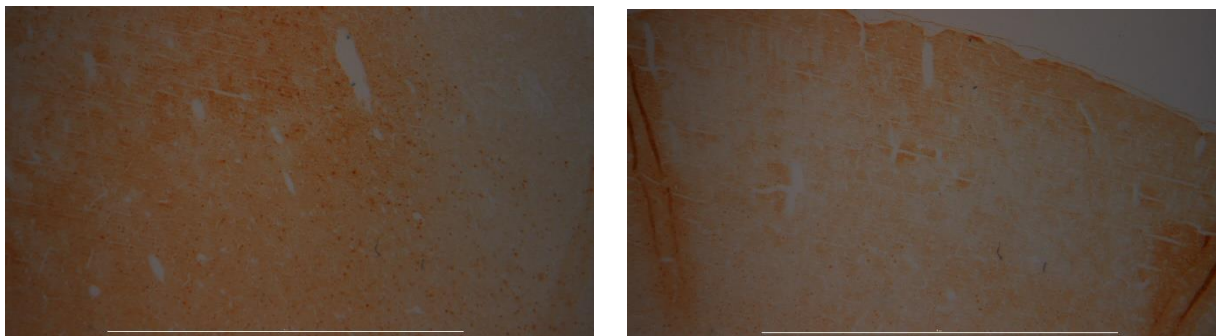


Abbildung 18: Vergleich IHC RAGE Vehikel ipsilateral 72 Stunden (links) vs. Vehikel kontralateral 72 Stunden (rechts); 10fache Vergrößerung. Ipsilateral ist eine deutliche Erhöhung der IRF und RAGE positiven Zellen im periläsionellen Bereich im Vergleich zur kontralateralen Hemisphäre zu sehen.

4.3.2. RAGE positive Zellen

Im zeitlichen Verlauf gab es sowohl innerhalb der Vehikel Gruppe als auch in der EP Gruppe keine signifikante Veränderung der Anzahl der RAGE positiven Zellen.

Im Vergleich der Gruppen miteinander lagen nach drei Stunden keine signifikanten Unterschiede vor.

Nach 24 Stunden war die Anzahl der RAGE positiven Zellen in der EP Gruppe ipsilateral, periläsionell in ROI 1 ($P = 0,015$) und ROI 2 ($P = 0,010$) signifikant niedriger als in der Vehikel Gruppe.

Nach 72 Stunden gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen.

Tabelle 13: Mittelwerte RAGE positive Zellen \pm s.e.m. nach 3h, 24h, 72h

	Gruppe	
	EP	Vehikel
3h		
ROI 1	19,50 \pm 4,04	20,50 \pm 2,93
ROI 2	20,13 \pm 3,35	19,25 \pm 3,08
ROI 3	18,50 \pm 2,26	19,38 \pm 2,46
ROI 4	16,63 \pm 2,41	15,00 \pm 3,86
24h		
ROI 1	18,25 \pm 1,54	23,43 \pm 0,9
ROI 2	14,25 \pm 2,10	22,29 \pm 1,57
ROI 3	12,13 \pm 2,31	16,57 \pm 2,51
ROI 4	10,75 \pm 2,389	17,57 \pm 2,61
72h		
ROI 1	18,75 \pm 2,55	18,50 \pm 2,58
ROI 2	18,13 \pm 2,44	17,25 \pm 1,65
ROI 3	18,25 \pm 2,93	17,88 \pm 2,47
ROI 4	15,38 \pm 3,21	14,88 \pm 2,29

4.4. Glo1

4.4.1. Immunoreaktive Fläche Glo1

Im Hemisphärenvergleich der Vehikel Gruppe war die Glo1 positive IRF nach drei Stunden in der Läsion in ROI 4 ($p = 0,041$) signifikant erhöht.

Nach 24 Stunden war die IRF ebenfalls nur in ROI 4 ($p = 0,036$) signifikant vergrößert.

Nach 72 Stunden war die IRF periläsionell in ROI1 ($p = 0,002$), ROI 2 ($p = 0,004$), ROI 3 ($p = 0,004$) und in der Läsion ROI 4 ($p < 0,001$) ipsilateral gegenüber kontralateral signifikant erhöht.

Im zeitlichen Verlauf kam es innerhalb der Vehikel Gruppe zu einer signifikanten ipsilateralen Zunahme der Glo1 positiven IRF periläsionell in ROI 3 ($p = 0,041$) und in der Läsion in ROI 4 ($p = 0,008$) innerhalb des Beobachtungszeitraums.

Im Hemisphärenvergleich der EP Gruppe war die Glo1 positive IRF nach drei Stunden in der Läsion in ROI 4 ($p = 0,003$) ipsilateral erhöht.

Nach 24 Stunden kam es zu einer signifikanten Vergrößerung der IRF ipsilateral, periläsionell in ROI 1 ($p = 0,026$) und in der Läsion in ROI 4 ($p = 0,04$).

Nach 72 Stunden war die IRF nur in der Läsion in ROI 4 ($p = 0,038$) ipsilateral gegenüber kontralateral signifikant erhöht.

In der EP Gruppe änderte sich die Glo1 positive IRF im zeitlichen Verlauf nicht signifikant.

Im Vergleich der Vehikel mit der EP Gruppe gab es nach drei und nach 24 Stunden keine signifikanten Unterschiede der Glo1 positiven IRF.

Nach 72 Stunden war sie in der EP Gruppe periläsionell in ROI 1 ($p = 0,050$) und ROI 3 ($p = 0,021$) signifikant niedriger als in der Vehikel Gruppe.

Tabelle 14: Hemisphärenvergleich immunoreaktive Fläche Glo1: Mittelwerte \pm s.e.m [%] nach 3h, 24h und 72h

ROI ipsi vs. ROI kontra	Gruppe			
	EP		Vehikel	
	<i>ipsi</i>	<i>kontra</i>	<i>Ipsi</i>	<i>kontra</i>
	3h			
ROI 1vs.5	12,14 \pm 2,65	5,46 \pm 1,98	17,35 \pm 8,71	6,61 \pm 1,19
ROI 2vs.6	12,81 \pm 3,53	5,41 \pm 2,11	18,69 \pm 9,91	5,66 \pm 1,29
ROI 3vs.7	10,83 \pm 3,22	5,79 \pm 2,26	15,79 \pm 8,64	7,60 \pm 2,71

Ergebnisse

ROI ipsi vs. ROI kontra	Gruppe			
	EP		Vehikel	
	<i>ipsi</i>	<i>kontra</i>	<i>Ipsi</i>	<i>kontra</i>
ROI 4vs.8	28,38 ± 5,77	5,26 ± 2,31	16,81 ± 5,22	8,56 ± 2,02
24h				
ROI 1vs.5	9,31 ± 1,43	3,89 ± 1,79	17,80 ± 7,62	3,70 ± 6,83
ROI 2vs.6	6,16 ± 1,46	3,31 ± 1,22	11,56 ± 5,03	3,61 ± 4,47
ROI 3vs.7	6,00 ± 1,51	3,46 ± 1,14	9,90 ± 4,18	4,10 ± 1,55
ROI 4vs.8	20,19 ± 5,48	4,38 ± 2,43	24,44 ± 8,67	3,94 ± 1,58
72h				
ROI 1vs.5	14,19 ± 6,05	11,94 ± 4,16	27,71 ± 1,95	9,54 ± 2,52
ROI 2vs.6	12,80 ± 6,14	11,09 ± 4,45	22,36 ± 2,76	10,21 ± 3,18
ROI 3vs.7	9,98 ± 5,01	12,93 ± 5,14	23,76 ± 3,42	11,01 ± 3,33
ROI 4vs.8	30,98 ± 10,62	15,04 ± 5,59	49,30 ± 3,56	10,53 ± 2,66

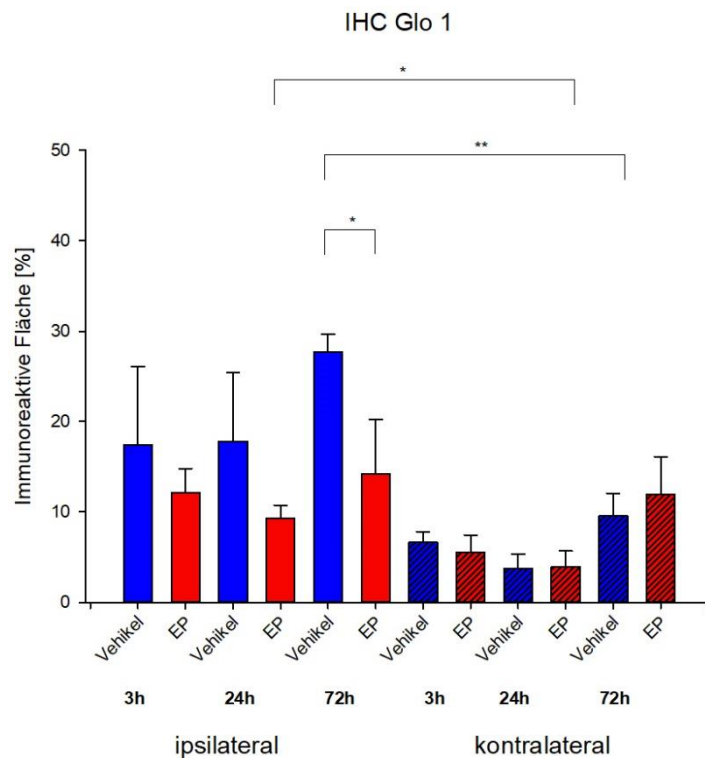


Abbildung 19: Graphische Darstellung der Glo1-positiven IRF (+ s.e.m.) [%] im zeitlichen Verlauf; ipsilateral jeweils ROI 1 und kontralateral (schraffiert) jeweils ROI 5. *: p<0,05; **: p<0,01

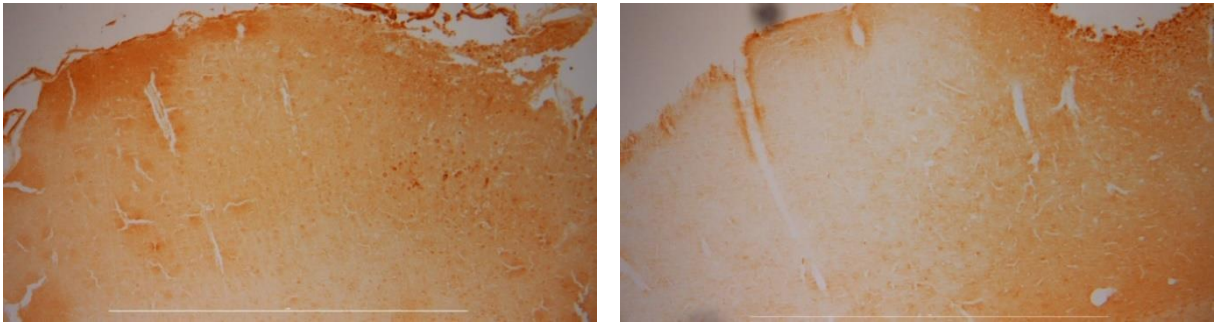


Abbildung 20: Vergleich IHC Glo1 Vehikel (links) vs. EP (rechts) nach 72h; 10fache Vergrößerung der ipsilateralen Hemisphäre. Im rechten oberen Bildrand liegt der Übergang in die Läsion, dargestellt ist der periläsionelle Kortex. In der Vehikel Gruppe war die IRF nach 72 Stunden signifikant größer.

4.4.2. Glo1 positive Zellen

Die Anzahl der Glo1 positiven Zellen nahm in der Vehikel Gruppe im zeitlichen Verlauf ipsilateral, periläsionell in ROI1 ($p = 0,026$), ROI 3 ($p = 0,024$) und in der Läsion in ROI 4 ($p = 0,003$) signifikant zu.

In der EP Gruppe kam es zu keiner signifikanten Änderung der Anzahl der Glo1 positiven Zellen während des Untersuchungszeitraums.

Im Gruppenvergleich lagen nach drei Stunden keine signifikanten Unterschiede zwischen der Vehikel und der EP Gruppe vor.

Nach 24 Stunden war die Anzahl der Glo1 positiven Zellen in der EP Gruppe in der Läsion in ROI 4 ($P = 0,044$) signifikant geringer als in der Vehikel Gruppe.

Nach 72 Stunden lag eine signifikant geringere Anzahl Glo1 positiver Zellen in der EP Gruppe periläsionell in ROI 1 ($P = 0,012$), ROI 2 ($P = 0,009$), ROI 3 ($P = <0,001$) und in der Läsion in ROI 4 ($P = <0,001$) vor.

Tabelle 15: Mittelwerte Glo1 positive Zellen \pm s.e.m. nach 3h, 24h, 72h

	Gruppe	
	EP	Vehikel
	<i>3h</i>	
ROI 1	8,13 \pm 1,29	8,50 \pm 3,15
ROI 2	6,50 \pm 1,24	9,25 \pm 2,87
ROI 3	6,25 \pm 1,21	7,00 \pm 2,38
ROI 4	12,38 \pm 2,26	11,75 \pm 2,58

			Gruppe	
	EP		Vehikel	
24h				
ROI 1	8,13 ± 1,39		10,57 ± 1,81	
ROI 2	7,75 ± 1,28		9,86 ± 2,11	
ROI 3	7,50 ± 1,28		9,00 ± 2,04	
ROI 4	8,38 ± 1,438		13,43 ± 1,78	
72h				
ROI 1	7,50 ± 1,69		16,63 ± 2,69	
ROI 2	6,75 ± 1,59		16,88 ± 2,91	
ROI 3	6,38 ± 1,34		15,63 ± 1,71	
ROI 4	11,63 ± 2,56		25,75 ± 1,24	

4.5. GFAP

4.5.1. Immunoreaktive Fläche GFAP

Im Hemisphärenvergleich der Vehikel Gruppe war die GFAP positive IRF ipsilateral nach drei Stunden periläsionell in ROI 1 ($p = 0,016$) und in der Läsion in ROI 4 ($p = 0,01$) signifikant erhöht.

Nach 24 Stunden war die IRF nur in der Läsion in ROI 4 ($p = 0,04$) ipsilateral vergrößert.

Nach 72 Stunden war die IRF periläsionell in ROI 1 ($p < 0,001$), ROI 2 ($p < 0,001$), ROI 3 ($p < 0,001$) und in der Läsion in ROI 4 ($p = 0,023$) ipsilateral gegenüber kontralateral signifikant erhöht.

Innerhalb der Vehikel Gruppe nahm die IRF periläsionell in ROI 1 ($p = 0,003$), ROI 2 ($p < 0,001$) und ROI 3 ($p = 0,002$) nach 72h gegenüber drei und 24 Stunden signifikant zu.

Im Hemisphärenvergleich der EP Gruppe zeigten sich nach drei Stunden keine signifikanten Unterschiede der GFAP positiven IRF.

Nach 24 Stunden war die IRF in der Läsion in ROI 4 ($p = 0,049$) ipsilateral gegenüber kontralateral signifikant erhöht.

Nach 72 Stunden kam es zu einer signifikanten Erhöhung der IRF ipsilateral, periläsionell in ROI 1 ($p = 0,007$), ROI 2 ($p = 0,004$) und ROI 3 ($p = 0,017$).

Im zeitlichen Verlauf gab es innerhalb der EP Gruppe keine signifikante Veränderung der GFAP positiven IRF.

Im Vergleich der Vehikel und der EP Gruppe gab es nach drei und 24 Stunden keinen signifikanten Unterschied.

Nach 72 Stunden war die GFAP positive IRF periläsionell in ROI 1 ($P = 0,005$), ROI 2 ($P = <0,001$) und ROI 3 ($P = 0,012$) in der Vehikel Gruppe signifikant größer als in der EP Gruppe.

Tabelle 16: Hemisphärenvergleich immunoreaktive Fläche GFAP: Mittelwerte \pm s.e.m [%] nach 3h, 24h und 72h

ROI ipsi vs. ROI kontra	Gruppe			
	EP		Vehikel	
	<i>ipsi</i>	<i>kontra</i>	<i>ipsi</i>	<i>kontra</i>
3 h				
ROI 1vs.5	1,54 \pm 0,63	1,16 \pm 0,37	1,23 \pm 0,5	0,51 \pm 0,35
ROI 2vs.6	1,44 \pm 0,69	0,98 \pm 0,33	1,05 \pm 0,46	0,54 \pm 0,30
ROI 3vs.7	1,25 \pm 0,5	0,93 \pm 0,30	0,78 \pm 0,33	0,58 \pm 0,36
ROI 4vs.8	1,23 \pm 0,32	0,78 \pm 0,42	0,90 \pm 0,34	0,40 \pm 0,25
24 h				
ROI 1vs.5	1,23 \pm 0,58	0,56 \pm 0,21	1,20 \pm 0,59	0,26 \pm 0,08
ROI 2vs.6	0,73 \pm 0,3	0,44 \pm 0,19	1,03 \pm 0,53	0,30 \pm 0,11
ROI 3vs.7	0,74 \pm 0,34	0,50 \pm 0,23	0,76 \pm 0,27	0,29 \pm 0,11
ROI 4vs.8	1,84 \pm 0,74	0,63 \pm 0,27	1,63 \pm 0,58	0,20 \pm 0,06
72 h				
ROI 1vs.5	1,96 \pm 0,56	0,20 \pm 0,12	4,75 \pm 0,61	0,30 \pm 0,14
ROI 2vs.6	1,45 \pm 0,37	0,15 \pm 0,06	4,75 \pm 0,57	0,31 \pm 0,16
ROI 3vs.7	1,53 \pm 0,45	0,14 \pm 0,05	3,94 \pm 0,70	0,31 \pm 0,14
ROI 4vs.8	0,04 \pm 0,14	0,08 \pm 0,03	0,95 \pm 0,39	0,11 \pm 0,03

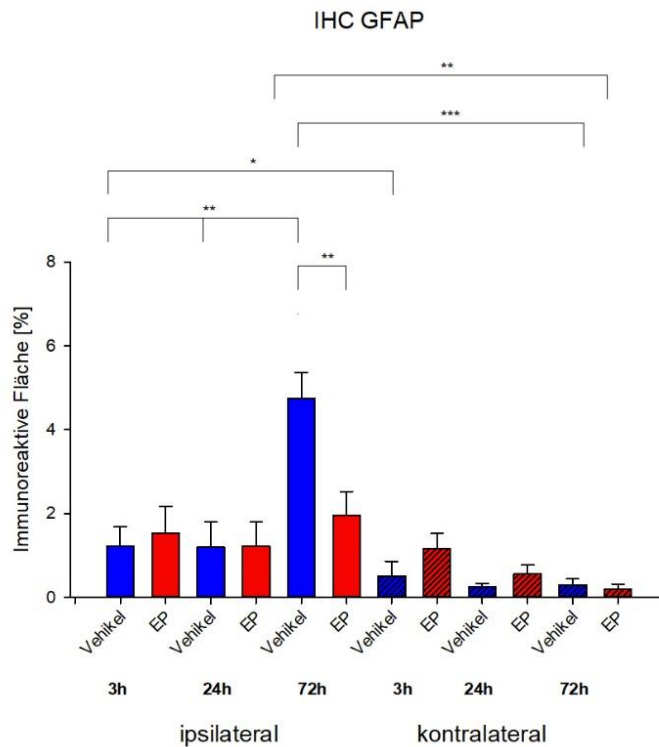


Abbildung 21: Graphische Darstellung der GFAP-positiven IRF (+ s.e.m.) [%] im zeitlichen Verlauf ; ipsilateral jeweils ROI 1 und kontralateral (schraffiert) jeweils ROI 5. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$

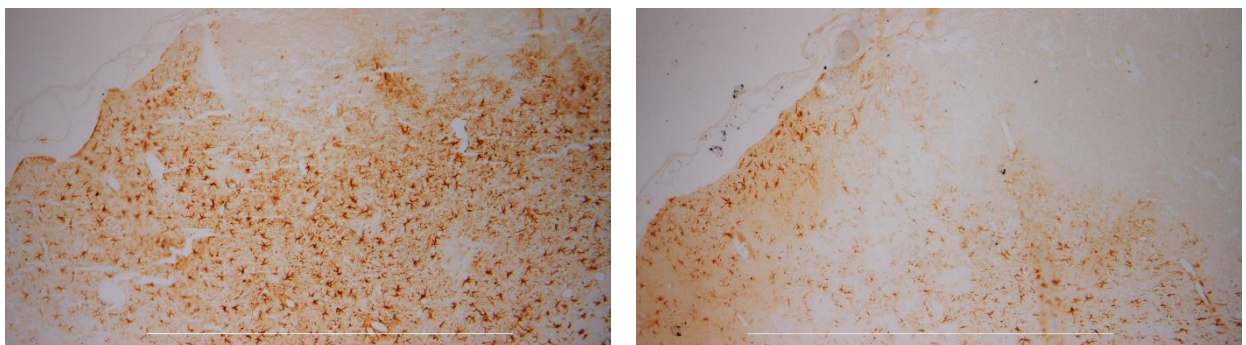


Abbildung 22: Vergleich IHC GFAP Vehikel (links) vs. EP (rechts) nach 72h; 10fache Vergrößerung. Läsionsgrenze im rechten oberen Bildrand mit Übergang zu periläsionellem Kortex, deutlich erhöhte GFAP Immunoreaktivität in der Vehikelgruppe.

4.5.2. GFAP positive Zellen

Die Anzahl der GFAP positiven Zellen in der Vehikel Gruppe hat nach 72 Stunden perilesionell in ROI 1, ROI 2 und ROI 3 (jeweils $p < 0,001$) im Vergleich zu drei und 24 Stunden signifikant zugenommen.

Im zeitlichen Verlauf zeigte sich für die EP Gruppe eine signifikante Zunahme der Zellzahl nur in ROI 2 ($p = 0,039$) nach 72 Stunden gegenüber 24 Stunden.

Nach drei und nach 24 Stunden gab es im Gruppenvergleich keine signifikanten Unterschiede. Die Anzahl der GFAP positiven Zellen war nach 72 Stunden in der EP Gruppe periläsionell in ROI 1 ($p = 0,003$), ROI 2 ($p = <0,001$) und ROI 3 ($p = 0,003$) signifikant niedriger als in der Vehikel Gruppe.

Tabelle 17: Mittelwerte GFAP positive Zellen \pm s.e.m. nach 3h, 24h, 72h

	Gruppe	
	EP	Vehikel
<i>3 h</i>		
ROI 1	3,75 \pm 1,57	3,00 \pm 1,24
ROI 2	3,50 \pm 1,81	3,00 \pm 1,48
ROI 3	3,00 \pm 1,07	2,75 \pm 1,26
ROI 4	2,63 \pm 1,18	1,15 \pm 0,80
<i>24 h</i>		
ROI 1	2,75 \pm 1,26	3,71 \pm 1,57
ROI 2	1,88 \pm 0,92	4,14 \pm 1,63
ROI 3	2,25 \pm 1,01	2,88 \pm 0,99
ROI 4	5,50 \pm 1,96	4,71 \pm 2,17
<i>72 h</i>		
ROI 1	6,63 \pm 1,03	13,00 \pm 1,34
ROI 2	5,88 \pm 1,19	14,50 \pm 1,64
ROI 3	5,50 \pm 1,34	14,00 \pm 1,96
ROI 4	0,88 \pm 0,48	1,75 \pm 1,24

4.6. Iba1

4.6.1. Immunoreaktive Fläche Iba1

Im Hemisphärenvergleich der Vehikel Gruppe war die Iba1 positive IRF nach drei Stunden periläsionell in ROI 1 ($p = 0,04$), ROI 2 ($p = 0,026$) und in der Läsion in ROI 4 ($p = 0,017$) ipsilateral signifikant erhöht.

Auch nach 24 Stunden war die IRF periläsionell in ROI 1 ($p < 0,001$), ROI 2 ($p = 0,016$) und ROI 3 ($p = 0,01$) ipsilateral signifikant vergrößert.

Diese Hemisphärenunterschiede mit einer ipsilateralen signifikanten Erhöhung der IRF setzten sich nach 72 Stunden sowohl periläsionell in ROI 1 ($p = 0,008$), ROI 2 ($p = 0,008$), ROI 3 ($p = 0,023$), als auch in der Läsion in ROI 4 ($p = 0,004$) fort.

Innerhalb der Vehikel Gruppe nahm die IRF periläsionell in ROI 1 ($p = 0,036$) und ROI 3 ($p = 0,029$) jeweils im Vergleich 72 Stunden gegenüber drei Stunden und in der Läsion in ROI 4 ($p = 0,001$) im Vergleich 72 Stunden gegenüber drei Stunden und 24 Stunden signifikant zu.

Im Hemisphärenvergleich der EP Gruppe war die Iba1 positive IRF nach drei Stunden periläsionell in ROI 1 ($p = 0,001$), ROI 2 ($p = 0,008$) und in der Läsion in ROI 4 ($p < 0,001$) ipsilateral signifikant erhöht.

Nach 24 Stunden war die IRF periläsionell in ROI 1 ($p = 0,01$), ROI 2 ($p = 0,016$) und ROI 3 ($p = 0,041$) ipsilateral gegenüber kontralateral signifikant vergrößert.

Nach 72 Stunden zeigte sich periläsionell in ROI 1 ($p = 0,025$), ROI 2 ($p = 0,02$), ROI 3 ($p = 0,023$) und in der Läsion in ROI 4 ($p = 0,01$) eine ipsilateral signifikant erhöhte IRF.

Im zeitlichen Verlauf nahm die IRF in der EP Gruppe nur in der Läsion in ROI 4 ($p = 0,035$) nach 72 Stunden gegenüber 24 Stunden signifikant zu.

Im Vergleich der Vehikel und der EP Gruppe gab es zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied der IRF.

Tabelle 18: Hemisphärenvergleich immunoreaktive Fläche Iba1: Mittelwerte \pm s.e.m [%] nach 3h, 24h und 72h

ROI ipsi vs. ROI kontra	Gruppe			
	EP		Vehikel	
	<i>ipsi</i>	<i>kontra</i>	<i>ipsi</i>	<i>kontra</i>
3h				
ROI 1vs.5	2,36 \pm 0,35	0,83 \pm 0,14	1,70 \pm 0,65	0,55 \pm 0,27
ROI 2vs.6	2,00 \pm 0,36	0,81 \pm 0,23	1,36 \pm 0,53	0,71 \pm 0,44
ROI 3vs.7	1,71 \pm 0,38	0,83 \pm 0,18	0,99 \pm 0,46	0,64 \pm 0,35
ROI 4vs.8	2,31 \pm 0,34	0,85 \pm 0,25	1,43 \pm 0,47	0,61 \pm 0,26
24h				
ROI 1vs.5	2,69 \pm 0,64	1,00 \pm 0,31	3,29 \pm 0,62	1,44 \pm 0,37
ROI 2vs.6	2,01 \pm 0,52	0,95 \pm 0,27	2,24 \pm 0,44	1,29 \pm 0,42
ROI 3vs.7	2,09 \pm 0,56	0,80 \pm 0,21	2,34 \pm 0,35	1,24 \pm 0,36
ROI 4vs.8	1,78 \pm 0,32	1,06 \pm 0,46	1,71 \pm 0,32	1,17 \pm 0,27

ROI ipsi vs. ROI kontra	Gruppe			
	EP		Vehikel	
	<i>ipsi</i>	<i>kontra</i>	<i>ipsi</i>	<i>kontra</i>
	72h			
ROI 1vs.5	3,45 ± 1,01	1,06 ± 0,55	5,84 ± 2,05	2,14 ± 0,67
ROI 2vs.6	2,24 ± 0,42	0,83 ± 0,43	5,66 ± 2,11	1,91 ± 0,69
ROI 3vs.7	2,64 ± 0,84	0,90 ± 0,44	4,15 ± 1,65	1,70 ± 0,64
ROI 4vs.8	4,76 ± 1,31	0,85 ± 0,37	7,59 ± 1,91	2,04 ± 0,66

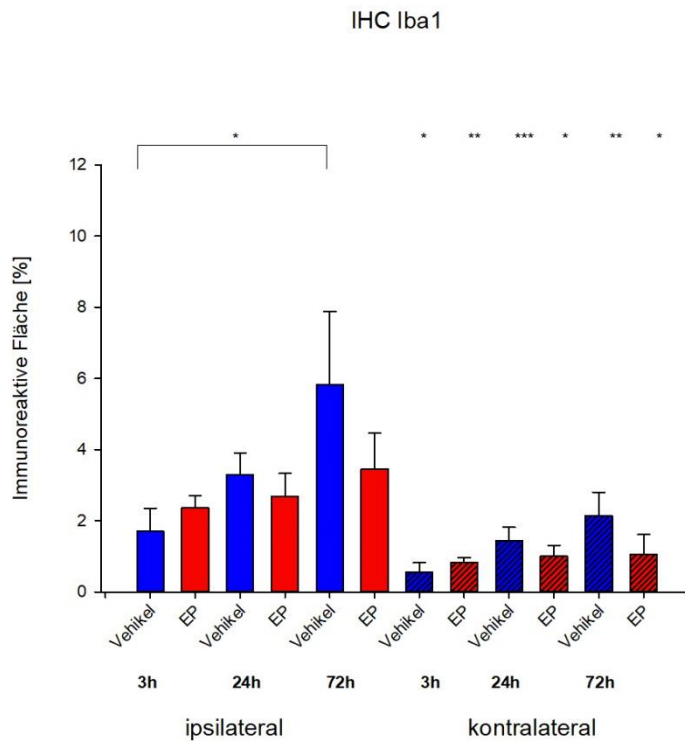


Abbildung 23: Graphische Darstellung der Iba1-positiven IRF (+ s.e.m.) [%] im zeitlichen Verlauf; ipsilateral jeweils ROI 1 und kontralateral (schraffiert) jeweils ROI 5. Im zeitlichen Verlauf nimmt die IRF nur in der Vehikel Gruppe signifikant zu. Im Hemisphärenvergleich ist in beiden Gruppen zu allen drei Zeitpunkten die Ipsilaterale IRF signifikant erhöht. *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001

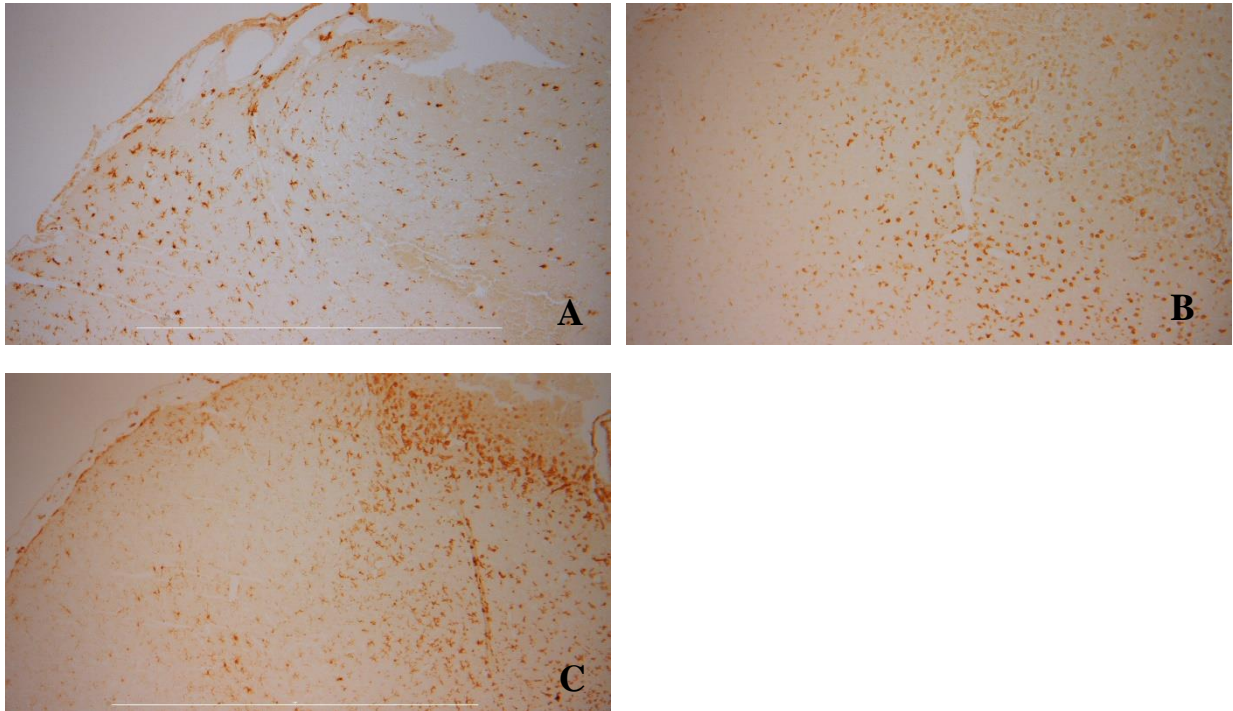


Abbildung 24: Vergleich IHC Iba1 Vehikel drei Stunden(A), Vehikel 72 Stunden (B) vs. EP 72h (C); jeweils 10fache Vergrößerung. Im rechten oberen Bildrand ist die Grenze zur Läsion erkennbar. In der Vehikel Gruppe kommt es zu einer signifikanten Iba1 Zunahme nach 72 Stunden. In der EP Gruppe ist Iba1 nach 72 Stunden nur in ROI4 im Läsionsbereich gesteigert.

4.6.2. Iba1 positive Zellen

Die Vehikel Gruppe verzeichnete eine signifikante Zunahme der Iba1 positiven Zellen periläsionell in ROI 1 ($p = 0,042$) und in der Läsion in ROI 4 ($p < 0,001$) über die Beobachtungszeit.

Im zeitlichen Verlauf zeigte sich für die EP Gruppe eine signifikante Zunahme der Iba1 positiven Zellen nur in der Läsion in ROI 4 ($p = 0,01$) nach 72 Stunden gegenüber 24 Stunden.

Im direkten Vergleich der Vehikel und der EP Gruppe gab es keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der Iba1 positiven Zellen.

Tabelle 19: Mittelwerte Iba1 positive Zellen \pm s.e.m. nach 3h, 24h, 72h

	Gruppe	
	EP	Vehikel
	<i>3h</i>	
ROI 1	6,63 \pm 1,15	4,88 \pm 1,94
ROI 2	6,88 \pm 1,14	3,63 \pm 1,61

Ergebnisse

Gruppe		
	EP	Vehikel
ROI 3	6,13 ± 1,70	3,38 ± 1,70
ROI 4	8,38 ± 1,3	5,13 ± 1,53
24h		
ROI 1	6,88 ± 1,91	8,86 ± 1,12
ROI 2	6,13 ± 1,37	8,86 ± 1,20
ROI 3	6,13 ± 1,27	7,29 ± 0,57
ROI 4	5,75 ± 1,19	5,00 ± 1,13
72h		
ROI 1	11,50 ± 2,78	12,88 ± 3,52
ROI 2	11,50 ± 2,24	13,63 ± 4,68
ROI 3	8,75 ± 1,59	9,75 ± 3,54
ROI 4	15,13 ± 3,01	17,38 ± 2,75

5. Diskussion

5.1. Diskussion der Methoden

5.1.1. CCI

Zur Induktion eines SHT wurde das CCI Modell gewählt, weil es eine zuverlässige, reproduzierbare und standardisierte fokale, kortikale Läsion mit begleitender periläsioneller Entzündungsreaktion, oxidativem Stress und Bluthirnschrankenschädigung auslöst (Osier et al. 2015). Damit entspricht die Pathophysiologie zum größten Teil der eines mittelschweren bis schweren SHT. Die o.g. Aspekte der Schädigung durch das CCI und die ausgelöste Kaskade mit sekundärer Schadensentwicklung bilden am besten die pathophysiologischen Prozesse ab, welche durch EP beeinflusst werden können.

Weitere häufig verwendete Modelle zur Induktion eines SHT sind das Fluid Percussion Injury (FPI) und das Weight Drop Injury (WDI) Modell. Bei dem FPI wird über eine Kraniotomie mittels einer Flüssigkeitssäule eine definierte Kraft auf die intakte Dura mater ausgeübt. Bei dem WDI wird ein Gewicht aus einer definierten Höhe auf die intakte Kalotte fallen gelassen (Alder et al. 2011).

Beim FPI kommt es durch die Verteilung des applizierten Drucks über den Epiduralraum zu diffusen Hirnschädigungen und in Abhängigkeit der Intensität bei sehr schweren Schädigungen auch zu fokalen Läsionen. Histopathologisch kommt es daher zu unterschiedlichen Verletzungsmustern im Vergleich zum SHT beim Menschen (Dixon et al. 1991).

Beim WDI wird ebenfalls eher eine diffuse axonale Schädigung ausgelöst (Marmarou et al. 1994). In dieser Arbeit wurde das CCI verwendet, da es das primäre Schadensgebiet mit einer umgebenden Zone des sekundären Schadenswachstums und periläsioneller inflammatorischer Reaktion am besten erzeugt. Dies ermöglicht die Untersuchung des Einflusses der EP Behandlung auf das fokale Läsionswachstum und die begleitende Entzündungsreaktion.

Die Gruppenzuteilung erfolgte randomisiert, jeweils vor Induktion des Traumas. Nach Abschluss der Untersuchung kann bestätigt werden, dass die Tiere der verschiedenen Untersuchungszeiträume einer Gruppe an verschiedenen Tagen operiert wurden. Ebenso wurden an jedem Operationstag Tiere aus verschiedenen Gruppen operiert. Dies schließt den Einfluss eines methodischen Fehlers auf die Ergebnisse nur einer bestimmten Gruppe aus. Die Operationen wurden von nur einem Operateur durchgeführt, somit sind Auswirkungen verschiedener Operationstechniken auszuschließen. Der s.e.m. betrug in beiden Gruppen zu allen drei Zeitpunkten etwa 30% des Läsionsvolumens, was für ein vergleichbares,

standardisiertes Trauma spricht. Die Progression der Läsion in der Vehikel Gruppe über die Zeit mit einem Maximum nach 72 Stunden entspricht in ihrem Verlauf den Angaben der Literatur (Thomale et al. 2007, Villapol et al. 2014). Thomale et. al zeigten in einem CCI Modell an Ratten, dass das Läsionsmaximum nach 24 Stunden auftrat. Sie ermittelten das Läsionsausmaß durch MRT Bildgebungen nach sechs Stunden, 24 Stunden und sieben Tagen. Villapol et al. beobachteten in einem CCI Modell an Mäusen das Maximum der Läsion nach 72 Stunden und beschrieben vergleichbare Standardfehler, wie die hier vorliegende Studie. Im direkten Vergleich ist in der EP Gruppe nach 72 Stunden ein geringeres Läsionsvolumen zu verzeichnen. Innerhalb der EP Gruppe zeigen sich in Hinblick auf den zeitlichen Verlauf keine signifikanten Unterschiede. Die statistisch nicht signifikant höheren Werte des Läsionsvolumens, der periläsionellen Kontusion und des ipsilateralen Hemisphärenvolumens in der EP Gruppe nach 24 Stunden könnten ein zeitlich vorübergehender Ausdruck des Ödems sein. Im weiteren Verlauf werden diese Auswirkungen durch EP beeinflusst. Nach 72 Stunden lagen die Werte der EP Gruppe in dem Bereich der Werte nach drei Stunden. Das Läsionsvolumen bleibt demnach in der EP Gruppe auf dem Niveau von drei Stunden konstant und das verringerte Läsionsvolumen nach 72 Stunden im Vergleich zur Vehikel Gruppe ist als eine Auswirkung der EP Behandlung zu werten.

5.1.2. IHC

Die IHC ist eine weitverbreitete gängige Methode zur Darstellung von antikörperspezifischen Molekülen.

Sie lässt keine direkten Rückschlüsse auf die qualitative Enzymaktivität zu. Über die quantitative Bestimmung von Enzymen, Substraten, Rezeptoren oder zellspezifischen Markern gibt sie Rückschlüsse auf die Veränderung von Zellaktivitäten und Enzymexpression, die sich durch die Behandlung mit EP im Vergleich zur Vehikel Gruppe ergeben.

Mit der Bestimmung der IRF lassen sich mit mikroskopischer Präzision gewählte Areale in der Läsion sowie der periläsionellen Zone untersuchen. Die Anzahl und Morphologie von Zellen lässt sich, im Gegensatz zu anderen Analysemethoden wie z.B. dem Western Blot, einfach beurteilen. Durch die Einstellung des Threshold werden immunreaktive Zellen möglichst vollständig registriert ohne dabei unspezifische Areale zu erfassen. Allerdings werden nach der Konversion in Graustufen, je nach Einstellung des Threshold, Strukturen berücksichtigt, die aufgrund ihrer Dichte unter dem Lichtmikroskop lichtundurchlässig sind.

Demnach ist die Threshold-Einstellung subjektiv und variiert zwischen verschiedenen Untersuchern. Der Vergleich der ipsilateralen mit der kontralateralen Hemisphäre objektiviert diesen Einfluss, da zwischen den Messungen der jeweiligen Hemisphären keine Veränderung des Threshold vorgenommen wird.

Verschiedene Studien beschreiben den Einfluss einer Sham-Kraniotomie auf inflammatorische Cytokine und zelluläre Veränderungen mit der Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten.

Cole et al. zeigten, dass die Sham Kraniotomie signifikante proinflammatorische und morphologische Schäden verursachen kann (Cole et al. 2011). In der Studie von Susarla et al. kam es durch die Sham-Kraniotomie nach einem und drei Tagen zu einem Anstieg aktivierter Astrozyten, welcher der Veränderung in der CCI Gruppe entsprach. Vergleichbar zeigten die hier vorliegenden Daten eine Zunahme der Mikroglia innerhalb der ersten drei Tage nach Sham-Kraniotomie, wobei die CCI Gruppe nach drei Tagen eine signifikant höhere Anzahl Mikroglia aufwies (Susarla et al. 2014, Villapol et al. 2014). Die vorliegende Untersuchung zeigte mit der Literatur vergleichbare Auswirkungen in der Sham Gruppe.

Die Werte der Sham Tiere hatten im zeitlichen Verlauf und zu den einzelnen Zeitpunkten eine große Varianz. Zwischen der Läsionsgröße und den IHC Färbungen gab es in der Sham Gruppe keine Korrelation. Die Fallzahl von zwei Tieren pro Untersuchungszeitraum lässt in der Zusammenschau mit der Varianz der Daten ohne Korrelation zwischen den IHC Ergebnissen mit dem Läsionsvolumen und den Beobachtungen von Cole et al. und Susarla et al. keinen Vergleich der Ergebnisse von Vehikel, EP und Sham Gruppe zu. Vielmehr diente die Sham Gruppe dazu, den reinen Einfluss der Kraniotomie auf das Läsionsvolumen zu ermitteln. Hier zeigten sich durchweg deutlich geringe Läsionsvolumina ohne signifikante Veränderung über die Zeit. Die Veränderungen des Läsionsvolumens zwischen der EP und der Vehikel Gruppe sind demnach der EP Behandlung zuzuschreiben. Im Vergleich zwischen der EP und der Vehikel Gruppe ist die einzige Variable die medikamentöse Behandlung. Eine Interpretation der Ergebnisse im Vergleich aller drei Gruppen ist zudem nur bedingt möglich, da bei der Sham Gruppe im Vergleich zur EP Gruppe mit der medikamentösen Behandlung und dem CCI zwei Variablen verändert sind.

5.1.3. Läsionsvolumen

Die Berechnung des Läsionsvolumens durch die Messung der Läsionsfläche in einzelnen Hirnschnitten aus Schnittserien-Intervallen mit einem definierten Abstand ist eine gängige Methode um post mortem das Läsionsvolumen zu bestimmen (Villapol et al. 2014). Im

Gegensatz zu in vivo Messungen des Läsionsvolumens ermöglicht die hier verwendete Methode die mikroskopisch genaue Differenzierung zwischen dem nekrotisch bzw. apoptotischen Läsionsbereichen und der periläsionellen Zone mit ödematös beeinträchtigten Zellen (Villapol et al. 2014). Vor allem in der Frühphase nach SHT beeinflusst das Gehirnödem die Größe der Läsion (s. Kapitel 2.4). In Kombination mit der Hemisphärenvolumetrie lässt sich das Läsionsvolumen in Relation zum Hemisphärenvolumen messen. Somit ist der Einfluss des Ödems herausrechenbar, wenn man davon ausgeht, dass ein Ödem, das zur Schwellung der Hemisphäre führt, gleichermaßen auch zur Schwellung und Größenprogredienz der Läsion führt.

Die Verwendung der ausgemessenen Fläche jeder Hemisphäre mit einer Läsion zur Bestimmung des Ödems ermöglicht die Relativierung der Läsion im Verhältnis zur Hirnschwellung, was andere Methoden zur Ödembestimmung, wie z.B. die Brain Water Content Methode nicht leisten können.

Die Daten dieser Untersuchung zeigen, dass das CCI ein signifikantes Hirnödem verursacht. Vergleicht man das Hemisphärenvolumen ipsilateral gegen kontralateral mit einem gepaarten t-Test für abhängige Stichproben, so ist es ipsilateral signifikant größer (in beiden Gruppen $p = 0,001$). Außerdem korreliert das Ausmaß der periläsionellen Kontusion mit dem Ödem bzw. dem Hemisphärenvolumen (in der Vehikel Gruppe $p < 0,001$; $R = 0,787$; in der EP Gruppe $p < 0,001$; $R = 0,734$).

Bei der Berechnung der linearen Regression zwischen dem Läsionsvolumen und dem ödemkorrigierten Läsionsvolumen zeigte sich keine Korrelation ($R = 0,008$). Das Gehirnödem ist demnach als ein relevanter Einflussfaktor zu betrachten.

5.2. Diskussion der Ergebnisse

5.2.1. Läsionsvolumen

Durch die Krafteinwirkung auf das Gehirn wird mit Eintreten des SHT die primäre Hirnschädigung verursacht. Dabei werden Hirnstrukturen irreversibel zerstört. Im CCI Modell entsteht eine Läsion mit einer zentralen Nekrosezone, die mikroskopisch von einer periläsionellen, die Nekrosezone umgebenden Kontusionszone abzugrenzen ist. Die Nekrosezone ist in dieser Arbeit als Läsion beschrieben. Zum Zeitpunkt des CCI entspricht sie in ihrem Ausmaß dem primären Schaden. Die in Kapitel 2.4 beschriebenen pathophysiologischen Prozesse der sekundären Hirnschädigung mit den begleitenden inflammatorischen Reaktionen führen zur Ausbildung der periläsionellen Kontusionszone. Im

zeitlichen Verlauf kommt es dort zu einem weiteren Zelluntergang und daraus folgend zur Expansion der Läsion. Morphologisch gekennzeichnet ist die periläsionelle Kontusionszone durch ödematös geschwollene Zellen, ein Zeichen des cytotoxischen Ödems (s. Kapitel 2.4) und Zellen mit pyknotischen Zellkernen. Letztere werden mit dem Zelluntergang in Verbindung gebracht, der durch Prozesse der sekundären Schädigung ausgelöst wird.

Das Hirnödem ist ein wesentlicher Aspekt der Pathophysiologie in diesem Zeitraum nach CCI (Marmarou 2003, Donkin and Vink 2010) und das Läsionsvolumen kann ödembedingt zunehmen. Da EP das Gehirnödem in anderen Studien reduzierte (Su et al. 2011, Jayakumar et al. 2014, Shi et al. 2015), wurde im Rahmen dieser Untersuchung zusätzlich eine Ödem-unabhängige Auswertung des Läsionsvolumens durchgeführt.

In diesem Kapitel wird zunächst die Auswirkung der EP Behandlung auf den Hirnschaden diskutiert. Die verschiedenen antiinflammatorischen Wirkmechanismen der EP Behandlung und ihr Effekt auf die zellulären Prozesse, die den Hirnschaden beeinflussen und den Hypothesen dieser Arbeit zu Grunde liegen, sind hier aufgeführt und werden in den folgenden Kapiteln ausführlich diskutiert.

HMGB1 bindet nach seiner Freisetzung in das Interstitium als Ligand an verschiedenen Rezeptoren (u.a. RAGE und TLR) und bewirkt über eine NF- κ B aktivierende Signalkaskade sowohl proinflammatorische Effekte als auch über die Expression von AQP4 und MMP das Gehirnödem (Laird et al. 2014, Shi et al. 2015). Fink et al. beschreiben eine verminderte Freisetzung von HMGB1 durch EP (Fink 2007). Somit wäre die Wirkung von EP auf die proinflammatorische Kaskade, die durch HMGB1 vermittelt ist, ein möglicher Mechanismus zur Verringerung der Läsion nach CCI.

Der Einfluss von EP als Inhibitor der Glo1 ist nach SHT ambivalent, da möglicherweise erhöhte MG Konzentrationen neurotoxisch sein könnten. Dieser Wirkmechanismus muss daher als ggf. einschränkender Faktor in der EP Behandlung betrachtet werden (s. Kapitel 5.2.4).

EP greift in verschiedene Signalwege ein, die an der Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia im Rahmen des sekundären Schadens nach CCI beteiligt sind. Somit kann EP auch über Astrozyten und Mikroglia und die nachgeschalteten inflammatorischen und metabolischen Effekte die Schadensentwicklung beeinflussen (s. Kapitel 5.2.5, 5.2.6).

Ein weiterer möglicher Ansatzpunkt zur Verringerung des sekundären Schadens ist die antiapoptotische Wirkung von EP durch eine Hemmung der Caspase 3 abhängigen, durch den Apoptose-induzierenden Faktor (AIF) vermittelten Apoptose (Slemmer et al. 2008, Wang et al. 2013).

Betrachtet man die Entwicklung der Läsion im zeitlichen Verlauf, so sind in anderen Studien zum SHT die Läsionsmaxima zwischen sechs Stunden nach FPI (Thompson et al. 2006), nach 24 Stunden (Zweckberger et al. 2006) bzw. 72 Stunden nach CCI an Mäusen (Villapol et al. 2014) und 24 Stunden nach CCI an Ratten (Thomale et al. 2007) beschrieben. Während der Regeneration nach CCI kommt es zur Atrophie des geschädigten Gewebes ab dem siebten Tag nach dem Trauma (Villapol et al. 2014).

Die Vermutung, dass EP den kortikalen Schaden nach SHT vermindert, wird durch die Studie von Su et al. bestätigt, die eine reduzierte Anzahl apoptotischer Zellen im periläsionellen Kortex 24 Stunden nach WDI auf die freipräparierte Dura mater beobachteten. Sie applizierten hierzu dreimal 75mg/kgKG EP innerhalb der ersten sechs Stunden nach dem Trauma (Su et al. 2011). Wenda et. al hingegen haben nach 14 Tagen keine Reduktion des Läsionsvolumens durch die Behandlung mit 75mg/kgKG EP einmal täglich festgestellt (Wenda 2016). Die bisherige Literatur liefert uneinheitliche Ergebnisse bezüglich des Einflusses von EP auf das Läsionsvolumen.

In der vorliegenden Studie nahm das Läsionsvolumen im zeitlichen Verlauf in der Vehikel Gruppe zu und war durch die sekundäre Schädigung nach 72 Stunden signifikant größer als nach drei Stunden. Der Progress der Läsion der Vehikel Gruppe ist demnach mit den Ergebnissen anderer Studien vergleichbar.

Bezogen auf die Entwicklung der Läsion gab es in der EP Gruppe zwischen den Untersuchungszeitpunkten keine signifikanten Unterschiede. Die Behandlung mit EP unterdrückte im Beobachtungszeitraum einen weiteren signifikanten Progress der Läsion, sodass sich das Ausmaß auf dem Niveau von drei Stunden hielt. Der Gruppenvergleich nach 72 Stunden zeigte eine signifikante Reduktion des Läsionsvolumens der EP gegenüber der Vehikel Gruppe.

In der aktuellen Studie zeigt sich der Effekt von 75mg/kgKG EP einmal täglich appliziert auf das Läsionsvolumen im Vergleich zur Vehikel Gruppe erst nach drei Tagen. Zur Reduktion nach 24 Stunden, wie von Su et al. beschrieben, sind vermutlich höhere Dosierungen bzw. repetitive Applikationen notwendig.

Um auszuschließen, dass es sich bei dieser Reduktion des Läsionsvolumens lediglich um eine Volumenabnahme durch eine Reduktion des Ödems handelte, wurde das ödemkorrigierte Läsionsvolumen berechnet.

Verschiedene Studien zeigten, dass EP das Gehirnödem nach SHT verringert. Su et al. stellten eine Abnahme des Ödems 24 Stunden nach WDI und Shi et al. 48 Stunden nach CCI fest (Su et al. 2011, Shi et al. 2015). In der vorliegenden Studie war der Quotient aus ipsilateralem und

kontralateralem Hemisphärenvolumen in der EP Gruppe nach 72 Stunden signifikant geringer. Dies spricht für ein verringertes Ödem durch die EP Behandlung.

Davon ausgehend, dass die Ödem-bedingte Zunahme des Hemisphärenvolumens gleichermaßen zu einer Vergrößerung des Läsionsvolumens führt, lässt sich ein ödemkorrigiertes Läsionsvolumen berechnen. Dazu wird der prozentuale Anteil des Läsionsvolumens am Hemisphärenvolumen bestimmt. In der Vehikel Gruppe nahm das ödemkorrigierte Läsionsvolumen ebenfalls im zeitlichen Verlauf zu.

In der EP Gruppe zeigte sich zwar eine tendenzielle Zunahme nach 24 Stunden mit einer folgenden Abnahme nach 72 Stunden, allerdings gab es hier keine statistisch signifikanten Unterschiede des ödemkorrigierten Läsionsvolumens zwischen den drei Untersuchungszeitpunkten. Im Vergleich zu der Vehikel Gruppe war das ödemkorrigierte Läsionsvolumen nach 72 Stunden in der EP Gruppe signifikant kleiner. EP verringerte den durch die sekundäre Hirnschädigung ausgelösten Progress der kortikalen Läsion, unabhängig von der Auswirkung auf das Gehirnödem.

Das periläsionelle Kontusionsvolumen war ebenfalls durch EP nach 72 Stunden signifikant reduziert.

Im Gegensatz zu den Studien von Su et al. und Shi et al. kam der Einfluss von EP auf das Ödem in dieser Studie erst zwischen 24 und 72 Stunden zum Tragen. Ursächlich hierfür könnte eine unterschiedliche Schwere des ausgelösten Traumas sein, da methodisch auf ein abweichendes Trauma Modell mit anderen Parametern zurückgegriffen wurde. Eine weitere Vermutung ist, dass es an der repetitiven Applikation von EP innerhalb der ersten 24 h in den beiden anderen Studien liegt. Auch verwendeten beide zitierten Studien die BWC-Methode zur Quantifizierung des Ödems. Möglicherweise ist diese Methode sensitiver als die Hemisphärenvolumetrie, da je nach Lokalisation und Ausmaß des Ödems durch Kompression der Reserveräume - in erster Linie der Ventrikel – eine Volumenzunahme des Ödems nicht in gleichem Maße zu einer Volumenzunahme der Hemisphäre führt. Auch der biphasische Verlauf der Bluthirnschrankenschädigung zunächst nach vier bis sechs Stunden und im weiteren Verlauf nach drei Tagen (Baskaya et al. 1997) muss als Einflussparameter in Betracht gezogen werden. In der Zusammenschau der Ergebnisse des verkleinerten Hemisphärenvolumens und der verringerten periläsionellen Kontusion konnte man auch in dieser Studie eine EP bedingte Reduktion des Ödems erkennen.

Als Wirkmechanismen wiesen Shi et al. die durch EP reduzierte TNF α abhängige MMP 9 Aktivierung mit entsprechend verringerten MMP 9 Konzentrationen nach (Shi et al. 2015).

Higashida et al. zeigten, dass das Gehirnödem nach WDI an Ratten durch MMP 9 vermittelt ist und dass eine Inhibition der MMP 9 das Ödem reduziert (Higashida et al. 2011).

5.2.2. HMGB1

Für die Entfaltung der proinflammatorischen Effekte als DAMP muss HMGB1 aus dem Nucleus in das Interstitium gelangen. Nach der Synthese im Nucleus transloziert HMGB1 nach Phosphorylierung durch calciumabhängige Kinasen in das Cytoplasma. Es wird von geschädigten Zellen passiv freigesetzt und kann auch aktiv von Mikroglia calciumabhängig sezerniert werden. Im EZR bindet HMGB1 an RAGE und TLR und aktiviert NF- κ B abhängige proinflammatorische Signalkaskaden. Über RAGE kann HMGB1 sowohl auto- als auch parakrin durch eine gesteigerte Inflammation den sekundären Schaden aggravieren (Gao et al. 2012). Im EZR ist HMGB1 in seiner reduzierten Form als DAMP aktiv. Im oxidativen Milieu des EZR wird die Aktivität von HMGB1 rasch durch Oxidation beendet (Carta et al. 2009). In seiner oxidierten Form führt es zu vermehrter Apoptose (Tang et al. 2011). HMGB1 führt über eine Aktivierung von TLR4 auf Mikroglia und eine nachgeschaltete NF- κ B abhängige, gesteigerte IL-6 Expression zum vermehrten Einbau von AQP in Astrozyten, sowie zu einer gesteigerten MMP Expression mit folgendem Hirnödem (Gao et al. 2012, Laird et al. 2014, Shi et al. 2015). Die gesteigerte IL-6 Konzentration wirkt aktivierend auf weitere Mikroglia (Shen et al. 2010, Laird et al. 2014).

Die Translokation von HMGB1 aus dem Nucleus in das Cytoplasma ist nach TBI in der Akutphase in Neuronen stärker ausgeprägt als in Gliazellen. In Gliazellen tritt die Translokation in das Cytoplasma verzögert ein, was vermuten lässt, dass Neurone vulnerabler für inflammatorisch vermittelten Zelltod sind (Gao et al. 2012).

Gao et al. zeigten, dass HMGB1 sechs Stunden nach WDI auf die freipräparierte Dura mater bei Ratten im Vergleich zu einer Sham Kraniotomie vermindert ist. Innerhalb der folgenden zwei Tage stiegen die HMGB1 Konzentrationen an. Im Verlauf fand sich HMGB1 vermehrt in phagozytierenden Mikroglia. In der Läsion kam es zu einer relevanten Abnahme von HMGB1 zwischen einer und sechs Stunden nach TBI. Das verbleibende nachweisbare HMGB1 war nach zwei Stunden hauptsächlich im Randbereich der Läsion im Cytoplasma von Neuronen und Gliazellen nachweisbar. Neutrophile wanderten in den Läsionsbereich ein, wo die HMGB1 Konzentration verringert war. Dieser Effekt war nach einem Tag am stärksten ausgeprägt. Nach drei Tagen kam es zu einer Proliferation von Gliazellen und die HMGB1 Expression nahm im Bereich der Läsion wieder zu (Gao et al. 2012).

EP hemmt, vermutlich durch Chelatbildung mit Calcium, die Translokation sowie die Sekretion und damit die proinflammatorische Wirkung von HMGB1 als DAMP (Shin et al. 2015). Außerdem unterdrückt EP die Expression von HMGB1, wie Su et al. durch verringerte HMGB1 mRNA Konzentrationen nachweisen konnten (Su et al. 2011)

Antioxidative Substanzen wie EP beeinflussen vermutlich das Verhältnis von reduziertem zu oxidiertem HMGB1 und mildern durch die geringere Konzentration der oxidierten Form dessen apoptotischen Effekt. Dem gegenübergestellt verstärkt die erhöhte Konzentration der reduzierten Form die proinflammatorische Wirkung als DAMP. Allerdings zeigten verschiedene Studien bereits, dass EP über die Effekte auf HMGB1 neuroprotektive, antiinflammatorische und den sekundären Schaden reduzierende Eigenschaften hat (Wang et al. 2013, Moro et al. 2016). Im oxidativen Milieu des EZR nach SHT liegt demnach anscheinend kein direkter relevanter antioxidativer Effekt von EP auf HMGB1 vor, der die Inflammation verstärkt.

In der vorliegenden Studie kam es durch das CCI ipsilateral zu einer signifikanten Zunahme von HMGB1 nach 72 Stunden in der Vehikel Gruppe. Zudem nahm die Anzahl der HMGB1 positiven Zellen nach 24 Stunden im Vergleich zu drei Stunden signifikant ab. Diese Beobachtung wird durch die Studie von Gao et. al bestätigt, die ebenfalls eine Reduktion von HMGB1 nach WDI auf die freigelegte Dura mater an Ratten (20g Gewicht, 30cm Fallhöhe) beschrieben. In einer Untersuchung von Su et. al hingegen wurde eine Erhöhung von HMGB1 24 Stunden nach WDI an Ratten (4mm Durchmesser, 5mm Eindringtiefe, 25cm Fallhöhe 40g Gewicht) beobachtet (Su et al. 2011). Möglicherweise sind die Unterschiede in einer verschiedenen Schwere des Traumas begründet. Die Intensität des Traumas der zitierten Untersuchungen ist wegen der verschiedenen Parameter nicht direkt mit dem Trauma aus der hier vorliegenden Studie vergleichbar. Vermutlich ist die abweichende zeitliche Kinetik von HMGB1 von der Art des Traumas und dessen Intensität abhängig. Die Abnahme von HMGB1 nach 24 Stunden könnte durch die Freisetzung in den EZR begründet sein, die zum einen durch die direkte Zellschädigung und zum anderen durch die Inflammation des Traumas ausgelöst wird.

In der vorliegenden Studie reduzierte EP die Zunahme von HMGB1, die in der Vehikel Gruppe nach 72 Stunden vorlag. In der EP Gruppe war HMGB1 gegenüber der kontralateralen Hemisphäre nur in der Läsion nach 72 Stunden signifikant erhöht. Es überlebten entweder einige Zellen länger als in der Vehikel Gruppe, oder HMGB1 positive Zellen wanderten ein. Letzteres würde durch die Beobachtung von Gao et. al bestätigt, die eine Proliferation von Gliazellen und Zunahme von HMGB1 in der Läsion nach drei Tagen beschrieben haben (Gao

et al. 2012). Auch die vorliegenden Daten zeigten ein Einwandern bzw. eine Proliferation von Mikroglia mit ipsilateral, periläsionell und in der Läsion erhöhter Iba1 positiven IRF im zeitlichen Verlauf in der Vehikel Gruppe. In der EP Gruppe blieb diese Zunahme auf die Läsion begrenzt (s. Kapitel 4.6).

In der EP Gruppe war sowohl die IRF als auch die Anzahl der HMGB1 positiven Zellen im Vergleich zur Vehikel Gruppe nach drei Stunden signifikant reduziert. Su et. al zeigten, dass die mRNA für HMGB1 drei Stunden nach TBI durch die Behandlung mit EP reduziert ist. In der Zusammenschau spricht dies dafür, dass EP auch die frühe Expression von HMGB1 hemmt, die durch das CCI verursacht wird.

Experimentelle Studien zeigten, dass EP das Gehirnödem nach SHT verringert. Es wird in diesem Zusammenhang der inhibierende Einfluss von EP auf HMGB1 und die dadurch verringerte Konzentration von AQP und geminderte BHS Schäden durch MMP diskutiert (Su et al. 2011, Gao et al. 2012, Wang et al. 2013, Laird et al. 2014). Die vorliegenden Daten zeigten neben der Reduktion von HMGB1 ebenfalls einen positiven Effekt von EP auf das Gehirnödem. Nach 72 Stunden war in der EP Gruppe das ipsilaterale Hemisphärenvolumen signifikant geringer als in der Vehikel Gruppe. Dieser Effekt ist anscheinend zum Teil durch HMGB1 vermittelt, eine direkte Korrelation besteht jedoch nicht ($R=0,498$).

Die vorliegenden Analysen bestätigen eine EP bedingte Hemmung der inflammatorischen Reaktion durch HMGB1 nach CCI. Sie scheint somit zumindest teilweise an der Reduktion des Läsionsvolumens durch EP beteiligt zu sein, auch wenn keine direkte Korrelation zwischen der HMGB1 IRF und dem Läsionsvolumen besteht.

5.2.3. RAGE

Die Literatur beschreibt eine gesteigerte RAGE Expression nach CCI (Gao et al. 2012) und nach vielen weiteren ZNS Pathologien wie z.B. Morbus Parkinson, Alzheimer und cerebraler Ischämie (Ding and Keller 2005, Byun et al. 2017). Die gesteigerte RAGE Expression ist neben HMGB1 (Gao et al. 2012) u.a. auch AGE vermittelt (Ding and Keller 2005, Byun et al. 2017). Durch die große Zahl der Liganden, die an RAGE wirken und die zahlreichen intrazellulären RAGE vermittelten Signalwege, ist dessen Einfluss auf die Pathophysiologie nach SHT vielschichtig (Byun et al. 2017). Der AGE induzierte und RAGE vermittelte oxidative Stress führt zu mitochondrialen Dysfunktionen (Lane et al. 2015). In der vorliegenden Studie induzierte das CCI bereits drei Stunden nach dem Trauma eine ipsilaterale, signifikant gesteigerte Expression von RAGE, die über den gesamten Untersuchungszeitraum persistierte

und sich im zeitlichen Verlauf nicht relevant veränderte. Die Behandlung mit EP reduzierte lediglich nach 24 Stunden in ROI 1 und 2 die Anzahl der RAGE positiven Zellen und in ROI 2 und 4 die IRF. Es zeigten sich tendenzielle Einflüsse von EP auf RAGE nach 24 Stunden, auch wenn sie nicht in allen periläsionellen ROI vorlagen. Gao et al. beschrieben, dass die RAGE Expression nach CCI durch erhöhte HMGB1 Konzentrationen vermittelt wird. Die in Kapitel 5.2.2 beschriebene Reduktion von HMGB1 durch EP erklärt möglicherweise die beobachtete Reduktion von RAGE nach 24 Stunden. In der Berechnung der linearen Regression mit $R = 0,06$ zeigt sich jedoch keine signifikante Korrelation. Es müssen daher mehrere Mechanismen an der Hochregulation beteiligt sein. Weiterhin findet sich auch ein Zusammenhang zwischen RAGE und der Wirkung von EP auf den Glyoxalase-Stoffwechsel, die Entstehung von AGE und die Beeinflussung des oxidativen Stresses, auch wenn in dieser Studie kein direkter Effekt von EP auf RAGE nachweisbar war. Ein Effekt der RAGE Aktivierung durch einen extrazellulären Liganden ist die Expression weiterer RAGE auf der Zelloberfläche (Ding and Keller 2005). Anscheinend reduziert EP die AGE nicht ausreichend, um die gesteigerte, AGE vermittelte RAGE Expression grundlegend zu hemmen. Zu diskutieren bleiben die positiven und negativen RAGE Effekte über diverse intrazelluläre Signalwege, die u.a. in eine NF- κ B Aktivierung münden. Der intrazellulären Signalkaskade vorgeschaltet sind drei Isoformen des RAGE Rezeptors: Der full-length RAGE, der soluble RAGE und der dominant negative RAGE. Der full-length RAGE hat eine Transmembrandomäne und eine intrazelluläre Domäne. In der Zellmembran befindlich, aktiviert er nach Stimulation durch einen extrazellulären Liganden intrazelluläre Enzyme. Zu ihnen zählen Januskinasen, NADPH-Oxidasen und p21RAS. Die vielfältigen Signalwege, die der Enzymaktivierung folgen, haben unterschiedliche Auswirkungen. Diese reichen von proinflammatorischen, apoptotischen bis hin zu antiinflammatorischen, zellproliferativen Effekten (Ding and Keller 2005).

Der sRAGE besitzt keine Transmembrandomäne. Im menschlichen Gehirn kommt er hauptsächlich im Cytoplasma von Neuronen vor. Das Verhältnis zum full-length RAGE liegt etwa bei 3:1. Er wird in den Extrazellulärraum sezerniert, bindet dort RAGE Liganden und reduziert somit die Konzentration wirksamer Liganden am full-length RAGE. Der dnRAGE befindet sich ebenfalls in der Zellmembran und besitzt keine intrazelluläre Domäne und somit nicht die Fähigkeit intrazelluläre Signalkaskaden zu aktivieren. Er kann Liganden binden und deren Wirkung am full length RAGE vermindern. Im menschlichen Gehirn ist das Verhältnis dnRAGE zu full-length RAGE etwa 1:1. Die RAGE Isoformen und deren Konzentrationsverhältnisse beeinflussen maßgeblich die Auswirkungen von RAGE Liganden (Ding and Keller 2005). Die vorliegende Studie hat nicht zwischen den Isoformen differenziert,

da der RAGE Antikörper, der für die IHC Färbungen verwendet wurde, nicht Isoformenspezifisch war.

Die Effekte nach RAGE Aktivierung sind abhängig von der Kombination verschiedener Liganden, sowie deren Konzentrationen und dem Zelltyp. Die Kombination der beiden RAGE Liganden Amphoterin und S100B ist in nanomolaren Konzentrationen neuroprotektiv, fördert das Neuritenwachstum und führt zu einer vermehrten Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2. Mikromolare Konzentrationen hingegen führen über oxidative und MAP-Kinase abhängige Signalwege zu einer gesteigerten Apoptose. Abhängig vom Zelltyp induzieren die gleichen Liganden unterschiedliche Signalwege. Auf diese Weise verstärkt die RAGE Stimulation durch HMGB1 in Neuronen das Neuritenwachstum und in Mikroglia inflammatorische Kaskaden (Huttunen et al. 2000, Ding and Keller 2005).

Inwiefern EP das Verhältnis der RAGE Isoformen und die RAGE Liganden-Konzentration im Rahmen der Pathophysiologie des SHT beeinflusst, bleibt in weiteren Studien zu klären. Einen neuroprotektiven, RAGE vermittelten Wirkmechanismus könnte EP durch die Reduktion vom HMGB1 entfalten, falls gezeigt werden kann, dass niedrigere HMGB1 Konzentrationen nach SHT, ähnlich wie niedrige S100B Konzentrationen, über RAGE neuroprotektiv wirken und das Neuritenwachstum fördern. Das würde z.B. auch ein verbessertes neurologisches Outcome durch bessere neuronale Interaktion trotz unveränderten Läsionsvolumens erklären, wie es in einigen Studien beschrieben ist (Moro and Sutton 2010, Su et al. 2011, Shi et al. 2015, Wenda 2016).

5.2.4. Glo1

Die beeinträchtigte Energiegewinnung durch die reduzierte oxidative Phosphorylierung im Rahmen der Dysfunktion der mitochondrialen Atmungskette mit folgender ATP-Depletion führt bei schweren SHT bereits in der Frühphase zu einer kompensatorisch gesteigerten anaeroben Glykolyse (Amorini et al. 2016). Durch diese Hyperglykolyse fällt vermehrt das Glykolyse-Nebenprodukt Methylglyoxal (MG) an. MG fördert die Entstehung von AGE und ROS (Belanger et al. 2011). Zudem vermittelt MG weitere negative Effekte in der Pathophysiologie des sekundären Hirnschadens nach SHT. MG führt zur Glykosylierung von Proteinen mit daraus folgender Dysfunktionalität und Schädigung der DNA (Sousa Silva et al. 2013). Außerdem wirkt MG über den Verbrauch von Glutathion, das Auslösen mitochondrialer Dysfunktion und die Aktivierung von Caspasen sowohl proinflammatorisch als auch proapoptotisch und somit neurotoxisch (Di Loreto et al. 2008). Neben den schädigenden

Auswirkungen zeigt MG aber auch protektive Effekte. Es wirkt über eine verminderte Bindung von NF- κ B an die DNA antiinflammatorisch (Laga et al. 2007) und reduziert die LPS vermittelte Bildung proinflammatorischer Zytokine (Hollenbach et al. 2008). Das Glyoxalase System ist der bedeutendste Mechanismus zur Detoxifikation von MG. In einer Glutathion-abhängigen Reaktion wird MG enzymatisch durch Glo1 und Glo2 zu D-Lactat abgebaut. Zunächst reagiert MG mit Glutathion zu einem Hemithioacetal, das durch Glo1 zu S-Lactoylglutathion und anschließend durch Glo2 zu D-Laktat und Glutathion umgesetzt wird (Belanger et al. 2011). Die Reaktionen sind proportional von der cytosolischen Glutathionkonzentration abhängig. Oxidativer Stress kann die Glutathionkonzentration reduzieren und dadurch die Glo1 Aktivität beeinträchtigen. Außerdem wird vermutet, dass MG und andere RAGE Liganden die Glo1 Aktivität reduzieren und dass eine RAGE Inhibition die Glo1 Aktivität wiederherstellt (Ott et al. 2014). EP ist ein Inhibitor der Glo1 und könnte somit durch den verminderten Abbau von MG den sekundären Schaden aggravieren. Verschiedene Studien zeigen, dass ein SHT zu Veränderungen der Glo1 Expression führt.

Amorini et al. stellten in einer Untersuchung nach moderatem SHT nach 48 bis 120 Stunden einen verzögerten Anstieg der Expression glycolytischer Enzyme und deren Aktivität fest. Nach schwerem SHT trat dieser Anstieg nach 6-24 Stunden auf und ging mit einer mitochondrialen Dysfunktion mit ATP und Glutathion-Depletion und Lactatanstieg einher. Sie verwendeten dazu ein WDI-Modell (Amorini et al. 2016).

Pieroh et al. beobachteten einen Anstieg der Glyoxalase 24h nach CCI (Pieroh et al. 2017). Das Trauma war in der Studie von Pieroh et al. schwerer (5m/s, 2,5mm Eindringtiefe, 400ms Verweildauer) als in der vorliegenden Untersuchung mit 5m/s, 2mm und 200ms. Wie die vorliegenden Ergebnisse zeigen, ist nach CCI die Glo1 Expression in der Vehikel Gruppe nach drei Stunden nur in der Läsion und erst nach 72 Stunden in allen ipsilateralen ROI erhöht. Der spätere Anstieg nach 72 Stunden in der hier vorliegenden Studie kann in dem schwächeren Trauma begründet sein. Amorini et al. konnten für ein WDI Modell den Zusammenhang zwischen der Expression glycolytischer Enzyme – einhergehend mit ATP und Glutathion-Depletion sowie einem Lactat Anstieg - und der Schwere des Traumas aufzeigen. Die vorliegenden Daten in Verbindung mit den Ergebnissen von Pieroh et al. lassen vermuten, dass es sich nach CCI vergleichbar verhält.

Hollenbach et al. wiesen in einem in vitro Modell nach, dass EP die Glo1 Aktivität hemmt (Hollenbach et al. 2008). Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass EP auch nach CCI hemmend auf die Glo1 Expression wirkt. Die Behandlung mit EP führte zu einer signifikant geringeren Glo1 Expression nach 72 Stunden. Der Einfluss auf das Glyoxalase

System könnte ein limitierender Faktor der möglicherweise neuroprotektiven Wirkung von EP nach SHT sein. Die sowohl positiven als auch negativen Effekte der Hemmung der Glo1 nach SHT wurden bereits in Kapitel 2.4.4 beschrieben. Im Folgenden werden die protektiven und schädlichen Auswirkungen miteinander in Verbindung gebracht.

In der Frühphase nach SHT, die sich mit dem Untersuchungszeitraum dieser Studie deckt, kommt es durch oxidativen Stress und Hyperglycolyse zu einer Glutathion Depletion (Amorini et al. 2016). Die reduzierte Menge an Glutathion könnte der limitierende Faktor für die Glo1 Aktivität sein, sodass eine verminderte Expression, wie wir sie durch die EP Behandlung gesehen haben, die Gesamt-Enzymaktivität unter Umständen nicht wesentlich beeinflusst. Fukushima et al. zeigten einen Einfluss von Natriumpyruvat (SP) auf den Glukosestoffwechsel nach CCI. SP erhöht die intracerebrale Glucosekonzentration, verringert die Laktatkonzentration und nimmt somit Einfluss auf den Metabolismus nach SHT (Fukushima et al. 2009). Die Vermutung liegt nahe, dass EP vergleichbare Effekte entfaltet. EP könnte als Energieträger fungieren, die metabolische Situation nach SHT verbessern und die Hyperglycolyse vermindern. Bak et. al postulieren, dass die Glo1 Expression ein Indikator für den neuronalen Stress und die Anpassung der Glycolyse ist (Bak et al. 2009). Die hier gemessene, durch EP reduzierte Glo1 Expression ist möglicherweise Ausdruck verminderten metabolischen Stresses nach SHT. In diesem Fall fiel bei reduziertem metabolischen Stress weniger MG an. Folglich wäre weniger Glo1 Aktivität für die MG Detoxifikation erforderlich und die gegebenenfalls schädliche EP Wirkung durch die Hemmung der Glo1 käme nicht zum Tragen, da EP die metabolische Ausgangslage verbessert. Weiterführende Untersuchungen müssten diesen Zusammenhang genauer beleuchten.

Ein Ansatzpunkt, der die neuroprotektive Wirkung von EP erklären könnte, ist die Beeinflussung des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NF- κ B.

Eine EP induzierte Glo1 Hemmung könnte erhöhte MG Konzentrationen nach sich ziehen. MG fördert wiederum die Entstehung weiterer AGE, die in hohen Konzentrationen über RAGE und NF- κ B proinflammatorisch wirken (Ott et al. 2014). Andererseits inhibiert MG NF- κ B durch Beeinflussung der Bindung von NF- κ B an die DNA (Laga et al. 2007). Über die Hemmung von HMGB1 wirkt EP über einen weiteren Ansatzpunkt reduzierend auf die NF- κ B Aktivität. Die NF- κ B vermittelte proinflammatorische Wirkung von MG wird demnach über einen parallelen Weg abgemildert. Zu diskutieren bleibt die Modulation der Wirkung von MG, weiteren AGE und HMGB1 über RAGE. Wie in Kapitel 2.4.3 beschrieben, wirken niedrige Konzentrationen eher neuroprotektiv, höhere Konzentration hingegen proinflammatorisch. Wie oben beschrieben, reduziert eine RAGE Aktivierung die Glo1 Aktivität (Ott et al. 2014). Die

vorliegenden Daten zeigen, dass der RAGE Ligand HMGB1 ebenfalls durch EP gehemmt wird. Die hierdurch verringerte RAGE Aktivierung könnte die Glo1 Aktivität steigern. Möglicherweise wird die von Hollenbach et al. gezeigte Hemmung der Glo1 durch EP in einem in vitro Modell in der Pathophysiologie des sekundären Schadens nach CCI durch die reduzierten HMGB1 Konzentrationen teilweise ausgeglichen. Ob neben der erhöhten Expression in der Vehikel Gruppe die enzymatische Glo1 Aktivität ebenfalls gesteigert ist oder möglicherweise trotz der erhöhten Expression durch die hemmende Wirkung von AGE (Ott et al. 2014) und die Glutathion Depletion eine verringerte Aktivität vorliegt, müssen weitere Untersuchungen zeigen. Die durch EP verringerte Glo1 Expression hat in dieser Untersuchung das Läsionsvolumen und die inflammatorischen Marker im Vergleich zur Vehikel Gruppe nicht negativ beeinflusst.

5.2.5. Astrozyten

Das Einwandern, die Aktivierung und die Proliferation von Astrozyten im periläsionellen Gewebe nach SHT mit einem Maximum nach drei Tagen ist in verschiedenen Studien beschrieben. Susarla und Villapol et. al verwendeten ein CCI Modell an Mäusen (Susarla et al. 2014, Villapol et al. 2014). Auch in der vorliegenden Arbeit zeigen die Astrozyten eine durch das CCI verursachte Veränderung mit einer ipsilateral signifikanten Zunahme im zeitlichen Verlauf. Die Aktivierung von Astrozyten ist ein relevanter Faktor in der Pathophysiologie des sekundären Schadens nach CCI innerhalb des gewählten Beobachtungszeitraums.

Die positiven sowie negativen Einflüsse von Astrozyten im Rahmen der Pathophysiologie des sekundären Schadens nach SHT sind in Kapitel 2.4 aufgeführt. Die astrozytäre Wirkung nach einem Trauma wird durch ihre Lokalisation in Abhängigkeit zur Läsion, die Art der Signale, die sie von Cytokinen, DAMP, anderen proinflammatorischen Molekülen, Metaboliten und Wachstumsfaktoren empfangen und durch die Art der cerebralen Schädigung sowie deren Intensität beeinflusst. Nach LPS induzierter Schädigung entwickeln aktivierte Astrozyten eine überwiegend schädliche Morphologie, wohingegen nach fokalen Verletzungen die protektiven Eigenschaften überwiegen (Karve et al. 2016). Die vollständige Ablation aktivierter Astrozyten in transgenen Mäusen führte nach mittelschwerem CCI an Mäusen zu einer Aggravation der Inflammation, der neuronalen Degeneration und des kortikalen Schadens nach sieben und nach 28 Tagen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Nach schwerem SHT zeigte sich dieser Unterschied nicht (Myer et al. 2006). Die Hemmung einzelner Zellzyklusschritte in aktivierten, proliferierenden Astrozyten wirkte neuroprotektiv in einem FPI Modell (Di Giovanni et al.

2005). Vermutlich ist nicht eine Hemmung oder Stimulation per se, sondern die Modulation der unterschiedlichen astrozytären Funktionen bedeutsam, damit Astrozyten die Erholung nach SHT günstig beeinflussen. EP wirkt über verschiedene Ansatzpunkte modulierend auf Astrozyten.

Astrozyten sind der Hauptmediator des cytotoxischen Ödems. Zudem nehmen sie Einfluss auf die BHS und die Regeneration der BHS nach SHT (Laird et al. 2008). In verschiedenen Studien beobachtete man eine Astrozyten-abhängige Zunahme von AQP4, die als maßgeblicher Faktor des Gehirnödem gesehen wird (Blixt et al. 2015, Yao et al. 2015). Des Weiteren triggert HMGB1 über den TLR4-Rezeptor und eine NF- κ B aktivierende Signalkaskade die AQP4 und MMP 9 Expression und damit das Gehirnödem (Laird et al. 2014, Shi et al. 2015). In der vorliegenden Studie wurde eine Hemmung von HMGB1 und eine Reduktion des Gehirnödem durch EP beobachtet. Zusammen mit der Reduktion der aktivierten Astrozyten durch EP bestätigt sich, dass EP positiv modulierend auf Astrozyten wirkt und somit wahrscheinlich das Ödem und die BHS-Funktion verbessert.

Astrozyten beeinflussen die Konzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen wie z.B. IL-1 β , TNF- α , Wachstumsfaktoren wie NGF und von MMP. Für diese Substanzen sind einerseits schädliche und andererseits positive Effekte nach SHT beschrieben (Hellewell and Morganti-Kossmann 2012)

Eine länger andauernde Wirkung von TNF- α fördert über die Aktivierung von NF- κ B proapoptotische Faktoren. Eine transiente kurzzeitige TNF- α induzierte Aktivierung verstärkt über den JNK-Signalweg antiapoptotische Faktoren (Laird et al. 2008). Inwiefern EP über eine Beeinflussung der Astrozyten die zeitliche Kinetik von TNF- α verändert, kann mit den Resultaten der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden.

IL-1 β entfaltet als proinflammatorisches Zytokin zum einen schädliche Effekte, zum anderen nimmt es über die Steigerung der Expression von Wachstumsfaktoren wie z.B. NGF positiven Einfluss auf die neuronale Regeneration nach SHT (Laird et al. 2008). In den Studien von N. Wenda und L. Müller wurde eine verbesserte neurologische Regeneration 14 Tage nach CCI durch die Behandlung mit EP beobachtet. IL-1 β war dabei in der EP Gruppe unverändert zur Vehikel Gruppe (Müller 2016, Wenda 2016). Möglicherweise reduziert EP die proinflammatorische IL-1 β Wirkung in der Akutphase. In der späteren Phase ist IL-1 β nicht durch EP reduziert und verbessert durch die Förderung von NGF die neuronale Regeneration. Ähnlich verhält es sich für MMP. In niedrigen Konzentrationen ist die MMP 3 wichtig, um die Phagozytose zellulären Detritus, anschließendes Neuritenwachstum und die Synaptogenese zu ermöglichen (Laird et al. 2008). MMP sind daher essentiell für die neuronale Regeneration. In

hohen Konzentrationen hingegen führen sie zu BHS-Dysfunktionen und beeinträchtigen die neuronale Erholung. Shi et al. zeigten eine Reduktion der MMP 9 durch EP 24 und 48 Stunden nach SHT, damit einhergehend eine reduzierte BHS-Schädigung und ein vermindertes Gehirnödem (Shi et al. 2015). Das reduzierte Ödem in der vorliegenden Studie könnte ebenfalls zum Teil durch die EP vermittelte Reduktion von MMP bedingt sein und wäre ein möglicher Ansatzpunkt weiterführender Untersuchungen zur verbesserten neuronalen Erholung, die Wenda et al. nach 14 Tagen beobachtet haben.

Die von uns erhobenen Daten zeigten, dass EP die aktivierten Astrozyten nach 72 Stunden signifikant reduzierte. Damit kann EP über die beschriebenen astrozytären Mechanismen eine antiinflammatorische Wirkung entfalten und den sekundären Schaden und somit das Läsionsvolumen reduzieren. Liegt auch keine direkt signifikante Korrelation zwischen den Werten der aktivierten Astrozyten und dem Läsionsvolumen vor, so ist die Wirkung von EP auf die Astrozyten anscheinend zu einem gewissen Teil an der Reduktion des Läsionsvolumens nach drei Tagen beteiligt.

5.2.6. Mikroglia

Nach SHT kommt es zu einer Aktivierung und Proliferation von Mikroglia. In Abhängigkeit von der Art und der Konzentration der Stimuli kommt es zu einer Differenzierung entweder in einen proinflammatorischen oder in einen antiinflammatorischen, phagozytierenden Mikroglia-Subtyp, der die neuronale Regeneration positiv beeinflusst. Eine überschießende Differenzierung in den proinflammatorischen Subtyp fördert in einem Circulus Vitiosus die Aktivierung weiterer Mikroglia bis hin zu einer Chronifizierung. Die Regulation der Stimuli, ist daher von Bedeutung für die Begrenzung der inflammatorischen Regulation und die Förderung der neuronalen Regeneration (Wang et al. 2013) (s. Kapitel 2.4.2).

Das in dieser Studie verursachte Trauma führte im Hemisphärenvergleich ipsilateral zu einer gesteigerten Mikroglia-Aktivität mit Zunahme im zeitlichen Verlauf in der Vehikel Gruppe. Die Beobachtung ist vergleichbar mit den Ergebnissen von Jin et al., die bei Mäusen eine wachsende Anzahl aktivierter Mikroglia in der Akutphase mit einem Peak nach einer Woche beschrieben, mit einer vorübergehende Reduktion am ersten Tag nach CCI (Jin et al. 2012). Im zeitlichen Verlauf der EP Gruppe war die Mikroglia-Aktivierung nach 72 Stunden gegenüber 24 Stunden nur in der Läsion gesteigert. Periläsionell wurde die Zunahme in der zeitlichen Entwicklung durch EP reduziert. Die Mikroglia Aktivierung blieb in der EP Gruppe auf dem Niveau von 3h stabil. Die Anzahl der Mikroglia nahm nach 72 Stunden im Vergleich zu 24

Stunden in der Vehikel Gruppe in der Läsion und unmittelbar periläsionell in ROI 1 signifikant zu. In der EP Gruppe war die Zunahme der Zellzahl auf die Läsion beschränkt, in der Mikroglia für die Phagozytose der Nekrose wichtig sind. Möglicherweise reduziert EP periläsionell die aktivierenden Stimuli, durchbricht den o.g. Circulus Vitiosus und fördert die Differenzierung in den phagozytierenden antiinflammatorischen Phänotyp. In einem MCAO Ischämiemodell an Ratten erhöhte die Behandlung mit EP die antiinflammatorischen Cytokine IL-4/13 (Yu et al. 2005), was die Differenzierung in den M2 Phänotyp bedeuten könnte. Studien zur Untersuchung des Einflusses von EP auf die Subtypen spezifische Differenzierung von Mikroglia nach SHT geben eventuell weiteren Aufschluss über die protektive Wirkung von EP. HMGB1 führt über eine Aktivierung von TLR4 auf Mikroglia und eine nachgeschaltete NF- κ B abhängige gesteigerte IL-6 Expression zum vermehrten Einbau von AQP in Astrozyten mit folgendem Hirnödem (Gao et al. 2012, Laird et al. 2014). Zu dem wirkt die gesteigerte IL-6 Konzentration aktivierend auf weitere Mikroglia (Shen et al. 2010, Laird et al. 2014).

Loane et al. wiesen nach, dass eine Blockade der TLR4 bzw. MAC1 Rezeptor abhängigen Mikroglia-Aktivierung mit nachfolgender NF- κ B Signalkaskade den dadurch induzierten Zelltod hemmt (Loane and Byrnes 2010). EP wirkt inhibierend auf die NF- κ B Signalkaskade (Shen et al. 2010) (s. Kapitel 2.5): Eine Hemmung der o.g. Mikroglia Aktivierung und der damit verbundenen Neurotoxizität ist wahrscheinlich. Bekräftigt wird diese Vermutung durch eine Studie, in der nach hypoxisch ischämischer Hirnschädigung die NF- κ B abhängige Mikroglia-Aktivierung sowie die Konzentrationen von TNF- α , IL-1 α , IL-1 β und IL-6 durch EP reduziert wurden (Shen et al. 2010).

In der vorliegenden Studie wurde eine verringerte HMGB1 Konzentration durch EP nach 72h Stunden identifiziert. Das trat zwar in zeitlichem Zusammenhang mit der durch EP reduzierten ipsilateralen Mikroglia-Aktivierung auf, es zeigte sich jedoch keine direkte signifikante Korrelation. Es liegt nahe, dass die EP bedingte Hemmung der Mikroglia-Aktivierung dennoch teilweise HMGB1 abhängig ist. Moro et al. stellten die gleichen Beobachtungen 72 Stunden nach CCI an Ratten fest (Moro and Sutton 2010). Außerdem tritt die durch EP reduzierte Mikroglia-Aktivierung im zeitlichen Zusammenhang mit der Reduktion des Hirnödems, des Läsionsvolumens und des Volumens der periläsionell Kontusion nach 72 Stunden auf (s. Kapitel 5.2.1). Zwischen diesen Ergebnissen liegt zwar keine direkte Korrelation vor jedoch spricht es für eine durch EP verminderte und teilweise durch Mikroglia vermittelte posttraumatische Ödem-Bildung, für einen reduzierten Progress des sekundären Schadens und eine Abschwächung der begleitenden Zytotoxizität und Inflammation.

6. Zusammenfassung

Das SHT hat eine hohe Inzidenz und führt bei einem Großteil der betroffenen Patienten, viele davon jungen Lebensalters, zu dauerhaften neurologischen und kognitiven Defiziten, weswegen auch die sozioökonomische Belastung von großer Bedeutung ist.

Das Ausmaß des SHT und somit das Outcome der Patienten wird maßgeblich durch die Entwicklung des sekundären Schadens bestimmt, der vor allem durch inflammatorische Prozesse verursacht wird.

Ein möglicher therapeutischer Ansatz liegt aus diesem Grund in der Behandlung mit antiinflammatorischen Substanzen: Ethylpyruvat hat sich in verschiedenen Studien durch entsprechende Eigenschaften ausgezeichnet. In vorangegangenen Untersuchungen von [REDACTED] und [REDACTED] am Institut für neurochirurgische Pathophysiologie der Universität Mainz verbesserte die Behandlung mit EP das neurologische Outcome 14 Tage nach CCI an Ratten, hatte jedoch keinen Einfluss auf das Ausmaß des histologischen Schadens.

In der vorliegenden Arbeit wurde eingangs die Hypothese formuliert, dass EP durch einen Einfluss auf den HMGB1 Signalweg und RAGE, trotz der Hemmung von Glo1, die inflammatorische Reaktion reduziert und den Hirnschaden verringert.

Den Versuchstieren wurde, mithilfe der Methode des CCI, ein SHT mit fokaler Läsion und periläsioneller inflammatorischer Reaktion verursacht. Drei, 24 und 72 Stunden nach CCI und der täglichen Applikation von EP 75mg/kgKG i.p. wurde an den Schnitten der Rattenhirne das Läsionsvolumen mikroskopisch bestimmt, sowie immunhistochemisch die immunoreaktive Fläche, die Anzahl der HMGB1, RAGE, Glo1, GFAP und Iba1 immunoreaktiven Zellen ermittelt. Die Vehikel Kontrollgruppe erfuhr die gleiche Behandlung, jedoch wurde anstelle von EP eine isotone NaCl-Lösung appliziert.

Die statistischen Erhebungen zeigten, dass EP das Läsionsvolumen nach 72 Stunden signifikant verringert und auch das proinflammatorische HMGB1 signifikant reduziert, die Expression dessen Rezeptors RAGE jedoch nicht wesentlich beeinflusst. Des Weiteren mindert EP die Aktivierung von Astrozyten und unterdrückt die Zunahme der Mikroglia im zeitlichen Verlauf. Durch den Einfluss von EP sinkt allerdings die Konzentration der Glo1, das zum Abbau des neurotoxischen Methylglyoxal essentiell ist.

Die Hypothesen der vorliegenden Arbeit aufgreifend, lassen sich die Ergebnisse wie folgt zusammenfassen:

- (1) Die kontinuierliche Behandlung mit EP verringert die inflammatorische Reaktion und dadurch den Hirnschaden

(2) Der Signalweg über HMGB1 und RAGE ist trotz der Hemmung von Glo1 maßgeblich an der Neuroprotektion beteiligt

Innerhalb der ersten 72 Stunden wirkt die Behandlung mit EP nach CCI an der Ratte über HMGB1, Astrozyten und Mikroglia antiinflammatorisch und den Hirnschaden verringern. EP stellt zusammenfassend einen vielversprechenden Therapieansatz des SHT dar.

In weiterführenden Studien müsste gezeigt werden, ob EP auch über das CCI Modell an der Ratte hinaus und ggf. in der klinischen Praxis langfristig das Outcome nach SHT verbessert.

7. Literaturverzeichnis

- Alder, J., W. Fujioka, J. Lifshitz, D. P. Crockett and S. Thakker-Varia (2011). "Lateral fluid percussion: model of traumatic brain injury in mice." J Vis Exp(54).
- Alessandri, B., E. Schwandt, Y. Kamada, M. Nagata, A. Heimann and O. Kempfski (2012). "The neuroprotective effect of lactate is not due to improved glutamate uptake after controlled cortical impact in rats." J Neurotrauma **29**(12): 2181-2191.
- Amorini, A. M., G. Lazzarino, V. Di Pietro, S. Signoretti, G. Lazzarino, A. Belli and B. Tavazzi (2016). "Metabolic, enzymatic and gene involvement in cerebral glucose dysmetabolism after traumatic brain injury." Biochim Biophys Acta **1862**(4): 679-687.
- Bak, L. K., A. B. Walls, A. Schousboe, A. Ring, U. Sonnewald and H. S. Waagepetersen (2009). "Neuronal glucose but not lactate utilization is positively correlated with NMDA-induced neurotransmission and fluctuations in cytosolic Ca²⁺ levels." J Neurochem **109 Suppl 1**: 87-93.
- Baskaya, M. K., A. M. Rao, A. Dogan, D. Donaldson and R. J. Dempsey (1997). "The biphasic opening of the blood-brain barrier in the cortex and hippocampus after traumatic brain injury in rats." Neurosci Lett **226**(1): 33-36.
- Belanger, M., J. Yang, J. M. Petit, T. Laroche, P. J. Magistretti and I. Allaman (2011). "Role of the glyoxalase system in astrocyte-mediated neuroprotection." J Neurosci **31**(50): 18338-18352.
- Blixt, J., M. Svensson, E. Gunnarson and M. Wanecek (2015). "Aquaporins and blood-brain barrier permeability in early edema development after traumatic brain injury." Brain Res **1611**: 18-28.
- Block, M. L. and J. S. Hong (2007). "Chronic microglial activation and progressive dopaminergic neurotoxicity." Biochem Soc Trans **35**(Pt 5): 1127-1132.
- Brain, S. D. and T. J. Williams (1985). "Inflammatory oedema induced by synergism between calcitonin gene-related peptide (CGRP) and mediators of increased vascular permeability." Br J Pharmacol **86**(4): 855-860.
- Buttram, S. D., S. R. Wisniewski, E. K. Jackson, P. D. Adelson, K. Feldman, H. Bayir, R. P. Berger, R. S. Clark and P. M. Kochanek (2007). "Multiplex assessment of cytokine and chemokine levels in cerebrospinal fluid following severe pediatric traumatic brain injury: effects of moderate hypothermia." J Neurotrauma **24**(11): 1707-1717.
- Byun, K., Y. Yoo, M. Son, J. Lee, G. B. Jeong, Y. M. Park, G. H. Salekdeh and B. Lee (2017). "Advanced glycation end-products produced systemically and by macrophages: A common contributor to inflammation and degenerative diseases." Pharmacol Ther **177**: 44-55.
- Candelario-Jalil, E., Y. Yang and G. A. Rosenberg (2009). "Diverse roles of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia." Neuroscience **158**(3): 983-994.

- Carta, S., P. Castellani, L. Delfino, S. Tassi, R. Vene and A. Rubartelli (2009). "DAMPs and inflammatory processes: the role of redox in the different outcomes." J Leukoc Biol **86**(3): 549-555.
- Cederberg, D. and P. Siesjo (2010). "What has inflammation to do with traumatic brain injury?" Childs Nerv Syst **26**(2): 221-226.
- Chesnut, R., W. Videtta, P. Vespa and P. Le Roux (2014). "Intracranial pressure monitoring: fundamental considerations and rationale for monitoring." Neurocrit Care **21 Suppl 2**: S64-84.
- Cole, J. T., A. Yarnell, W. S. Kean, E. Gold, B. Lewis, M. Ren, D. C. McMullen, D. M. Jacobowitz, H. B. Pollard, J. T. O'Neill, N. E. Grunberg, C. L. Dalgard, J. A. Frank and W. D. Watson (2011). "Craniotomy: true sham for traumatic brain injury, or a sham of a sham?" J Neurotrauma **28**(3): 359-369.
- Coronado, V. G., L. C. McGuire, K. Sarmiento, J. Bell, M. R. Lionbarger, C. D. Jones, A. I. Geller, N. Khoury and L. Xu (2012). "Trends in Traumatic Brain Injury in the U.S. and the public health response: 1995-2009." J Safety Res **43**(4): 299-307.
- Csuka, E., M. C. Morganti-Kossmann, P. M. Lenzlinger, H. Joller, O. Trentz and T. Kossmann (1999). "IL-10 levels in cerebrospinal fluid and serum of patients with severe traumatic brain injury: relationship to IL-6, TNF-alpha, TGF-beta1 and blood-brain barrier function." J Neuroimmunol **101**(2): 211-221.
- Dean, J. M., X. Wang, A. M. Kaindl, P. Gressens, B. Fleiss, H. Hagberg and C. Mallard (2010). "Microglial MyD88 signaling regulates acute neuronal toxicity of LPS-stimulated microglia in vitro." Brain Behav Immun **24**(5): 776-783.
- Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie (2015). "Leitlinie Schädel-Hirn-Trauma im Erwachsenenalter."
- Di Giovanni, S., V. Movsesyan, F. Ahmed, I. Cernak, S. Schinelli, B. Stoica and A. I. Faden (2005). "Cell cycle inhibition provides neuroprotection and reduces glial proliferation and scar formation after traumatic brain injury." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(23): 8333-8338.
- Di Loreto, S., V. Zimmiti, P. Sebastiani, C. Cervelli, S. Falone and F. Amicarelli (2008). "Methylglyoxal causes strong weakening of detoxifying capacity and apoptotic cell death in rat hippocampal neurons." Int J Biochem Cell Biol **40**(2): 245-257.
- Ding, Q. and J. N. Keller (2005). "Evaluation of rage isoforms, ligands, and signaling in the brain." Biochim Biophys Acta **1746**(1): 18-27.
- Dixon, C. E., G. L. Clifton, J. W. Lighthall, A. A. Yaghmai and R. L. Hayes (1991). "A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat." J Neurosci Methods **39**(3): 253-262.
- Donkin, J. J. and R. Vink (2010). "Mechanisms of cerebral edema in traumatic brain injury: therapeutic developments." Curr Opin Neurol **23**(3): 293-299.
- Edwards, P., M. Arango, L. Balica, R. Cottingham, H. El-Sayed, B. Farrell, J. Fernandes, T. Gogichaisvili, N. Golden, B. Hartzenberg, M. Husain, M. I. Ulloa, Z. Jerbi, H. Khamis, E. Komolafe, V. Laloe, G. Lomas, S. Ludwig, G. Mazairac, L. Munoz Sanchez Mde, L. Nasi, F. Oldashi, P. Plunkett, I. Roberts, P. Sandercock, H. Shakur, C. Soler, R. Stocker, P. Svoboda,

- S. Trenkler, N. K. Venkataramana, J. Wasserberg, D. Yates and S. Yutthakasemsunt (2005). "Final results of MRC CRASH, a randomised placebo-controlled trial of intravenous corticosteroid in adults with head injury-outcomes at 6 months." Lancet **365**(9475): 1957-1959.
- Faden, A. I., P. Demediuk, S. S. Panter and R. Vink (1989). "The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury." Science **244**(4906): 798-800.
- Fink, M. P. (2007). "Ethyl pyruvate: a novel anti-inflammatory agent." J Intern Med **261**(4): 349-362.
- Fukushima, M., S. M. Lee, N. Moro, D. A. Hovda and R. L. Sutton (2009). "Metabolic and histologic effects of sodium pyruvate treatment in the rat after cortical contusion injury." J Neurotrauma **26**(7): 1095-1110.
- Gao, T. L., X. T. Yuan, D. Yang, H. L. Dai, W. J. Wang, X. Peng, H. J. Shao, Z. F. Jin and Z. J. Fu (2012). "Expression of HMGB1 and RAGE in rat and human brains after traumatic brain injury." J Trauma Acute Care Surg **72**(3): 643-649.
- Garcia, J. H., K. A. Conger, R. Morawetz and J. H. Halsey, Jr. (1980). "Postischemic brain edema: quantitation and evolution." Adv Neurol **28**: 147-169.
- Gentleman, S. M., P. D. Leclercq, L. Moyes, D. I. Graham, C. Smith, W. S. Griffin and J. A. Nicoll (2004). "Long-term intracerebral inflammatory response after traumatic brain injury." Forensic Sci Int **146**(2-3): 97-104.
- Giordana, M. T., A. Attanasio, P. Cavalla, A. Migheli, M. C. Vigliani and D. Schiffer (1994). "Reactive cell proliferation and microglia following injury to the rat brain." Neuropathol Appl Neurobiol **20**(2): 163-174.
- Greve, M. W. and B. J. Zink (2009). "Pathophysiology of traumatic brain injury." Mt Sinai J Med **76**(2): 97-104.
- Hall, E. D. (2015). *Frontiers in Neuroengineering*
The Contributing Role of Lipid Peroxidation and Protein Oxidation in the Course of CNS Injury Neurodegeneration and Neuroprotection: An Overview. Brain Neurotrauma: Molecular, Neuropsychological, and Rehabilitation Aspects. F. H. Kobeissy. Boca Raton (FL), CRC Press/Taylor & Francis
- (c) 2015 by Taylor & Francis Group, LLC.
- Hausmann, E. H., N. E. Berman, Y. Y. Wang, J. B. Meara, G. W. Wood and R. M. Klein (1998). "Selective chemokine mRNA expression following brain injury." Brain Res **788**(1-2): 49-59.
- Hellewell, S. C. and M. C. Morganti-Kossmann (2012). "Guilty molecules, guilty minds? The conflicting roles of the innate immune response to traumatic brain injury." Mediators Inflamm **2012**: 356494.
- Higashida, T., C. W. Kreipke, J. A. Rafols, C. Peng, S. Schafer, P. Schafer, J. Y. Ding, D. Dornbos, 3rd, X. Li, M. Guthikonda, N. F. Rossi and Y. Ding (2011). "The role of hypoxia-inducible factor-1alpha, aquaporin-4, and matrix metalloproteinase-9 in blood-brain barrier disruption and brain edema after traumatic brain injury." J Neurosurg **114**(1): 92-101.

- Hollenbach, M., A. Hintersdorf, K. Huse, U. Sack, M. Bigl, M. Groth, T. Santel, M. Buchold, I. Lindner, A. Otto, D. Sicker, W. Schellenberger, J. Almendinger, B. Pustowoit, C. Birkemeyer, M. Platzer, I. Oerlecke, N. Hemdan and G. Birkenmeier (2008). "Ethyl pyruvate and ethyl lactate down-regulate the production of pro-inflammatory cytokines and modulate expression of immune receptors." Biochem Pharmacol **76**(5): 631-644.
- Hutchinson, P. J., A. G. Koliass, I. S. Timofeev, E. A. Corteen, M. Czosnyka, J. Timothy, I. Anderson, D. O. Bulters, A. Belli, C. A. Eynon, J. Wadley, A. D. Mendelow, P. M. Mitchell, M. H. Wilson, G. Critchley, J. Sahuquillo, A. Unterberg, F. Servadei, G. M. Teasdale, J. D. Pickard, D. K. Menon, G. D. Murray and P. J. Kirkpatrick (2016). "Trial of Decompressive Craniectomy for Traumatic Intracranial Hypertension." N Engl J Med **375**(12): 1119-1130.
- Huttunen, H. J., J. Kuja-Panula, G. Sorci, A. L. Agneletti, R. Donato and H. Rauvala (2000). "Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphoterin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation." J Biol Chem **275**(51): 40096-40105.
- Jayakumar, A. R., X. Y. Tong, R. Ruiz-Cordero, A. Bregy, J. R. Bethea, H. M. Bramlett and M. D. Norenberg (2014). "Activation of NF-kappaB mediates astrocyte swelling and brain edema in traumatic brain injury." J Neurotrauma **31**(14): 1249-1257.
- Jin, X., H. Ishii, Z. Bai, T. Itokazu and T. Yamashita (2012). "Temporal changes in cell marker expression and cellular infiltration in a controlled cortical impact model in adult male C57BL/6 mice." PLoS One **7**(7): e41892.
- Juliet, P. A., X. Mao and M. R. Del Bigio (2008). "Proinflammatory cytokine production by cultured neonatal rat microglia after exposure to blood products." Brain Res **1210**: 230-239.
- Karve, I. P., J. M. Taylor and P. J. Crack (2016). "The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury." Br J Pharmacol **173**(4): 692-702.
- Laga, M., A. Cottyn, F. Van Herreweghe, W. Vanden Berghe, G. Haegeman, P. Van Oostveldt, J. Vandekerckhove and K. Vancompernelle (2007). "Methylglyoxal suppresses TNF-alpha-induced NF-kappaB activation by inhibiting NF-kappaB DNA-binding." Biochem Pharmacol **74**(4): 579-589.
- Lahner, D. and G. Fritsch (2017). "[Pathophysiology of intracranial injuries]." Unfallchirurg.
- Laird, M. D., J. S. Shields, S. Sukumari-Ramesh, D. E. Kimbler, R. D. Fessler, B. Shakir, P. Youssef, N. Yanasak, J. R. Vender and K. M. Dhandapani (2014). "High mobility group box protein-1 promotes cerebral edema after traumatic brain injury via activation of toll-like receptor 4." Glia **62**(1): 26-38.
- Laird, M. D., J. R. Vender and K. M. Dhandapani (2008). "Opposing roles for reactive astrocytes following traumatic brain injury." Neurosignals **16**(2-3): 154-164.
- Lane, R. K., T. Hilsabeck and S. L. Rea (2015). "The role of mitochondrial dysfunction in age-related diseases." Biochim Biophys Acta **1847**(11): 1387-1400.
- Loane, D. J. and K. R. Byrnes (2010). "Role of microglia in neurotrauma." Neurotherapeutics **7**(4): 366-377.

- Maas, A. I., N. Stocchetti and R. Bullock (2008). "Moderate and severe traumatic brain injury in adults." Lancet Neurol **7**(8): 728-741.
- Marmarou, A. (2003). "Pathophysiology of traumatic brain edema: current concepts." Acta Neurochir Suppl **86**: 7-10.
- Marmarou, A., M. A. Foda, W. van den Brink, J. Campbell, H. Kita and K. Demetriadou (1994). "A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics." J Neurosurg **80**(2): 291-300.
- Marshall, L. F., S. B. Marshall, M. R. Klauber, M. Van Berkum Clark, H. Eisenberg, J. A. Jane, T. G. Luerksen, A. Marmarou and M. A. Foulkes (1992). "The diagnosis of head injury requires a classification based on computed axial tomography." J Neurotrauma **9 Suppl 1**: S287-292.
- Moro, N., S. S. Ghavim, N. G. Harris, D. A. Hovda and R. L. Sutton (2016). "Pyruvate treatment attenuates cerebral metabolic depression and neuronal loss after experimental traumatic brain injury." Brain Res **1642**: 270-277.
- Moro, N. and R. L. Sutton (2010). "Beneficial effects of sodium or ethyl pyruvate after traumatic brain injury in the rat." Exp Neurol **225**(2): 391-401.
- Müller, L. (2016). Effekt von Ethylpyruvat auf die Entzündungsreaktion nach kontrollierter kortikaler Kontusion bei der Ratte
- Mustafa, A. G., I. N. Singh, J. Wang, K. M. Carrico and E. D. Hall (2010). "Mitochondrial protection after traumatic brain injury by scavenging lipid peroxyl radicals." J Neurochem **114**(1): 271-280.
- Myer, D. J., G. G. Gurkoff, S. M. Lee, D. A. Hovda and M. V. Sofroniew (2006). "Essential protective roles of reactive astrocytes in traumatic brain injury." Brain **129**(Pt 10): 2761-2772.
- Narayan, R. K., M. E. Michel, B. Ansell, A. Baethmann, A. Biegon, M. B. Bracken, M. R. Bullock, S. C. Choi, G. L. Clifton, C. F. Contant, W. M. Coplin, W. D. Dietrich, J. Ghajar, S. M. Grady, R. G. Grossman, E. D. Hall, W. Heetderks, D. A. Hovda, J. Jallo, R. L. Katz, N. Knoller, P. M. Kochanek, A. I. Maas, J. Majde, D. W. Marion, A. Marmarou, L. F. Marshall, T. K. McIntosh, E. Miller, N. Mohberg, J. P. Muizelaar, L. H. Pitts, P. Quinn, G. Riesenfeld, C. S. Robertson, K. I. Strauss, G. Teasdale, N. Temkin, R. Tuma, C. Wade, M. D. Walker, M. Weinrich, J. Whyte, J. Wilberger, A. B. Young and L. Yurkewicz (2002). "Clinical trials in head injury." J Neurotrauma **19**(5): 503-557.
- Osier, N. D., J. R. Korpon and C. E. Dixon (2015). Frontiers in Neuroengineering
Controlled Cortical Impact Model. Brain Neurotrauma: Molecular, Neuropsychological, and Rehabilitation Aspects. F. H. Kobeissy. Boca Raton (FL), CRC Press/Taylor & Francis
- (c) 2015 by Taylor & Francis Group, LLC.
- Ott, C., K. Jacobs, E. Haucke, A. Navarrete Santos, T. Grune and A. Simm (2014). "Role of advanced glycation end products in cellular signaling." Redox Biol **2**: 411-429.
- Peeters, W., R. van den Brande, S. Polinder, A. Brazinova, E. W. Steyerberg, H. F. Lingsma and A. I. Maas (2015). "Epidemiology of traumatic brain injury in Europe." Acta Neurochir (Wien) **157**(10): 1683-1696.

- Pei, Z., H. Pang, L. Qian, S. Yang, T. Wang, W. Zhang, X. Wu, S. Dallas, B. Wilson, J. M. Reece, D. S. Miller, J. S. Hong and M. L. Block (2007). "MAC1 mediates LPS-induced production of superoxide by microglia: the role of pattern recognition receptors in dopaminergic neurotoxicity." *Glia* **55**(13): 1362-1373.
- Pieroh, P., M. Koch, D. C. Wagner, J. Boltze, A. Ehrlich, C. Ghadban, C. Hobusch, G. Birkenmeier and F. Dehghani (2014). "Temporal dynamics of glyoxalase 1 in secondary neuronal injury." *PLoS One* **9**(2): e87364.
- Pieroh, P., D. C. Wagner, B. Alessandri, M. Dabbagh Nazari, A. Ehrlich, C. Ghadban, C. Hobusch, G. Birkenmeier and F. Dehghani (2017). "Comparative Examination of Temporal Glyoxalase 1 Variations Following Perforant Pathway Transection, Excitotoxicity, and Controlled Cortical Impact Injury." *Neurotox Res.*
- Plesnila, N., J. Schulz, M. Stoffel, J. Eriskat, D. Pruneau and A. Baethmann (2001). "Role of bradykinin B2 receptors in the formation of vasogenic brain edema in rats." *J Neurotrauma* **18**(10): 1049-1058.
- Ransohoff, R. M. and A. E. Cardona (2010). "The myeloid cells of the central nervous system parenchyma." *Nature* **468**(7321): 253-262.
- Reilly, P. L., D. I. Graham, J. H. Adams and B. Jennett (1975). "Patients with head injury who talk and die." *Lancet* **2**(7931): 375-377.
- Rickels, E., K. von Wild and P. Wenzlaff (2011). "[Treatment of traumatic brain injury in Germany]." *Unfallchirurg* **114**(5): 417-423.
- Rickels, E., von Wild, K., Wenzlaff, P (2010). Das Schädel-Hirn-Trauma, Epidemiologie und Versorgung.
- Rock, K. L. and H. Kono (2008). "The inflammatory response to cell death." *Annu Rev Pathol* **3**: 99-126.
- Roozenbeek, B., A. I. Maas and D. K. Menon (2013). "Changing patterns in the epidemiology of traumatic brain injury." *Nat Rev Neurol* **9**(4): 231-236.
- Sahu, D., P. Debnath, Y. Takayama and J. Iwahara (2008). "Redox properties of the A-domain of the HMGB1 protein." *FEBS Lett* **582**(29): 3973-3978.
- Shen, H., X. Hu, C. Liu, S. Wang, W. Zhang, H. Gao, R. A. Stetler, Y. Gao and J. Chen (2010). "Ethyl pyruvate protects against hypoxic-ischemic brain injury via anti-cell death and anti-inflammatory mechanisms." *Neurobiol Dis* **37**(3): 711-722.
- Shi, H., H. L. Wang, H. J. Pu, Y. J. Shi, J. Zhang, W. T. Zhang, G. H. Wang, X. M. Hu, R. K. Leak, J. Chen and Y. Q. Gao (2015). "Ethyl pyruvate protects against blood-brain barrier damage and improves long-term neurological outcomes in a rat model of traumatic brain injury." *CNS Neurosci Ther* **21**(4): 374-384.
- Shin, J. H., I. D. Kim, S. W. Kim, H. K. Lee, Y. Jin, J. H. Park, T. K. Kim, C. K. Suh, J. Kwak, K. H. Lee, P. L. Han and J. K. Lee (2015). "Ethyl pyruvate inhibits HMGB1 phosphorylation and release by chelating calcium." *Mol Med* **20**: 649-657.

- Slemmer, J. E., C. Zhu, S. Landshamer, R. Trabold, J. Grohm, A. Ardeshiri, E. Wagner, M. I. Sweeney, K. Blomgren, C. Culmsee, J. T. Weber and N. Plesnila (2008). "Causal role of apoptosis-inducing factor for neuronal cell death following traumatic brain injury." Am J Pathol **173**(6): 1795-1805.
- Sousa Silva, M., R. A. Gomes, A. E. Ferreira, A. Ponces Freire and C. Cordeiro (2013). "The glyoxalase pathway: the first hundred years... and beyond." Biochem J **453**(1): 1-15.
- Stahel, P. F., M. C. Morganti-Kossmann and T. Kossmann (1998). "The role of the complement system in traumatic brain injury." Brain Res Brain Res Rev **27**(3): 243-256.
- Stocchetti, N. and E. R. Zanier (2016). "Chronic impact of traumatic brain injury on outcome and quality of life: a narrative review." Crit Care **20**(1): 148.
- Streit, W. J. (1996). "The role of microglia in brain injury." Neurotoxicology **17**(3-4): 671-678.
- Su, X., H. Wang, J. Zhao, H. Pan and L. Mao (2011). "Beneficial effects of ethyl pyruvate through inhibiting high-mobility group box 1 expression and TLR4/NF-kappaB pathway after traumatic brain injury in the rat." Mediators Inflamm **2011**: 807142.
- Summers, C. R., B. Ivins and K. A. Schwab (2009). "Traumatic brain injury in the United States: an epidemiologic overview." Mt Sinai J Med **76**(2): 105-110.
- Susarla, B. T., S. Villapol, J. H. Yi, H. M. Geller and A. J. Symes (2014). "Temporal patterns of cortical proliferation of glial cell populations after traumatic brain injury in mice." ASN Neuro **6**(3): 159-170.
- Tagliaferri, F., C. Compagnone, M. Korsic, F. Servadei and J. Kraus (2006). "A systematic review of brain injury epidemiology in Europe." Acta Neurochir (Wien) **148**(3): 255-268; discussion 268.
- Tang, D., R. Kang, H. J. Zeh, 3rd and M. T. Lotze (2011). "High-mobility group box 1, oxidative stress, and disease." Antioxid Redox Signal **14**(7): 1315-1335.
- Taya, K., S. Gulsen, K. Okuno, R. Prieto, C. R. Marmarou and A. Marmarou (2008). "Modulation of AQP4 expression by the selective V1a receptor antagonist, SR49059, decreases trauma-induced brain edema." Acta Neurochir Suppl **102**: 425-429.
- Teasdale, G. and B. Jennett (1974). "Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale." Lancet **2**(7872): 81-84.
- Thomale, U. W., M. Griebenow, A. Mautes, T. F. Beyer, N. K. Dohse, R. Stroop, O. W. Sakowitz, A. W. Unterberg and J. F. Stover (2007). "Heterogeneous regional and temporal energetic impairment following controlled cortical impact injury in rats." Neurol Res **29**(6): 594-603.
- Thompson, H. J., N. Marklund, D. G. LeBold, D. M. Morales, C. A. Keck, M. Vinson, N. C. Royo, R. Grundy and T. K. McIntosh (2006). "Tissue sparing and functional recovery following experimental traumatic brain injury is provided by treatment with an anti-myelin-associated glycoprotein antibody." Eur J Neurosci **24**(11): 3063-3072.
- Unterberg, A. W., J. Stover, B. Kress and K. L. Kiening (2004). "Edema and brain trauma." Neuroscience **129**(4): 1021-1029.

Villapol, S., K. R. Byrnes and A. J. Symes (2014). "Temporal dynamics of cerebral blood flow, cortical damage, apoptosis, astrocyte-vasculature interaction and astrogliosis in the pericontusional region after traumatic brain injury." Front Neurol **5**: 82.

Wang, G., J. Zhang, X. Hu, L. Zhang, L. Mao, X. Jiang, A. K. Liou, R. K. Leak, Y. Gao and J. Chen (2013). "Microglia/macrophage polarization dynamics in white matter after traumatic brain injury." J Cereb Blood Flow Metab **33**(12): 1864-1874.

Wang, Y., B. Li, Z. Li, S. Huang, J. Wang and R. Sun (2013). "Improvement of hypoxia-ischemia-induced white matter injury in immature rat brain by ethyl pyruvate." Neurochem Res **38**(4): 742-752.

Wenda, N. (2016). Die dosis-abhängigen Auswirkungen von Ethylpyruvat auf das histologische Läsionsvolumen und die neurologischen Defizite nach kontrollierter kortikaler Kontusion (Controlled Cortical Impact) bei der Ratte

Werner, C. and K. Engelhard (2007). "Pathophysiology of traumatic brain injury." Br J Anaesth **99**(1): 4-9.

Yao, X., K. Uchida, M. C. Papadopoulos, Z. Zador, G. T. Manley and A. S. Verkman (2015). "Mildly Reduced Brain Swelling and Improved Neurological Outcome in Aquaporin-4 Knockout Mice following Controlled Cortical Impact Brain Injury." J Neurotrauma **32**(19): 1458-1464.

Yu, Y. M., J. B. Kim, K. W. Lee, S. Y. Kim, P. L. Han and J. K. Lee (2005). "Inhibition of the cerebral ischemic injury by ethyl pyruvate with a wide therapeutic window." Stroke **36**(10): 2238-2243.

Zacest, A. C., R. Vink, J. Manavis, G. T. Sarvestani and P. C. Blumbergs (2010). "Substance P immunoreactivity increases following human traumatic brain injury." Acta Neurochir Suppl **106**: 211-216.

Zweckberger, K., C. Eros, R. Zimmermann, S. W. Kim, D. Engel and N. Plesnila (2006). "Effect of early and delayed decompressive craniectomy on secondary brain damage after controlled cortical impact in mice." J Neurotrauma **23**(7): 1083-1093.

8. Anhang A: Tabellarische Auflistungen der Materialien und Methoden

8.1. Versuchstiere

Tabelle 20: Versuchstiere

Tier	Geschlecht	Anzahl	Herkunft
Sprague-Dawley Ratte	Männlich	54	Charles River Deutschland, Sulzfeld

8.2. Chemikalien

Tabelle 21: Chemikalien

Chemikalie	Summenformel	MW [g/mol]	CAS-Nr.	Hersteller	Artikelnummer
<i>Narkose</i>					
Chloralhydrat	C ₂ H ₃ Cl ₃ O ₂	165,4	302-17-0	Apotheke der Universitätsmedizin Mainz	-
Wasser zu Injektionszwecken	H ₂ O	18,0	7732-18-5	B. Braun; Melsungen	-
<i>Gewebefixierung und Histologie</i>					
Xylol (Isomere)	C ₈ H ₁₀	106,2	1330-20-7	Merck KGaA, Darmstadt	9713.3
Isopropanol	C ₃ H ₈ O	60,1	67-63-0	Aug. Hedinger GmbH & Co. KG; Stuttgart	-
Hämatoxylin	C ₁₆ H ₁₄ O ₆ ·xH ₂ O	302,3	517-28-2	ThermoFisher Scientific™;	7211
Eosin Y	C ₂₀ H ₆ Br ₄ Na ₂ O ₅	691,9	17372-87-1	ThermoFisher Scientific™;	-
Zitronensäure wasserfrei	C ₆ H ₈ O ₇	192,1	77-92-9	Sigma-Aldrich; Schnelldorf	C-0759

Chemikalie	Summenformel	MW [g/mol]	CAS- Nr.	Hersteller	Artikelnummer
Wasserstoffperoxid 35%	H ₂ O ₂	34,0	7722-84-1	Merck KGaA; Darmstadt	1.08600.1000
Triton X-100 (Octocxinol)	C ₁₄ H ₂₁ (C ₂ H ₄ O) _n OH (n = 9-10)	647,0	9036-19-5	Merck KGaA; Darmstadt	1.08603.1000
Natronlauge	NaOH	39,9	1310-73-2	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe	6771.1
Aqua dest. Ecotainer®	H ₂ O	18,0	7732-18-5	B. Braun; Melsungen	0082479E

8.3. Gebrauchsfertige Lösungen / Pharmaka

Tabelle 22: Gebrauchsfertige Lösungen und Pharmaka

Wirkstoff	Handelsname	Hersteller	Anmerkung
<i>Narkose</i>			
Isofluran	Forene ®	Abbott GmbH & Co. KG; Wiesbaden	Inhalationsanästhetikum; Halogener Kohlenwasserstoff
Atropinsulfat	Atropinum sulfuricum Eifelfango®	Eifelfango; Bad Neuenahr-Ahrweiler	Parasympatholytikum; 1mg; Art.-Nr. F00007
<i>Operation</i>			
Ethylpyruvat-Lösung			Injektionslösung; 75mg/ml
Natriumchlorid-Lösung	--	B. Braun, Melsungen	Injektionslösung; 0,9%; Art.-Nr. 3570440
Paraformaldehyd-Lösung	Roti®-Histofix 4%	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe	Fixierlösung; 4%; 400g/l Paraformaldehyd, 54,65g/l Dinatriumhydrogencarbonat, 27,4g/l Natriumhydrogenphosphat, 1000ml destilliertes Wasser; Art.-Nr. P087

Wirkstoff	Handelsname	Hersteller	Anmerkung
<i>Gewebefixierung und Histologie</i>			
Paraffin	Medim-Pharm 58	Medim-Pharm, Gießen	Fixiermedium
Phosphatpuffer- Lösung (PBS)	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Gibco® by Life Technologies ™ Invitrogen, UK	pH 7,4; bestehend aus Kaliumdihydrogenphosphat, Natriumchlorid und Dinatriumhydrogenphosphat- Heptahydrat; Art.-Nr. 14190
Methanol	ROTISOLV® ≥99,95 %, LC- MS-Grade	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe	Methylalkohol, Carbinol; Art.- Nr. AE71.1
Normales Ziegen Serum	Normal Goat Serum Blocking Solution	Vector Laboratories; USA	Protein blockierende Lösung (unspezifisch); CAT-Nr. S-1000
Avidin-Biotin- Peroxidase- Komplex inkl. Sekundäranti- körper	Vectastain®Elite ® ABC HRP Kit; (Peroxidase, Rabbit IgG)	Vector Laboratories; USA	3-Komponenten-Kit
Avidin-Biotin- Peroxidase- Komplex inkl. Sekundäranti- körper	Vectastain® Elite® ABC HRP Kit; (Peroxidase, Mouse IgG)	Vector Laboratories; USA	4-Komponenten-Kit
3,3- Diaminobenzidin	DAB Peroxidase (HRP) Substrate Kit	Vector Laboratories; USA	Enzym-Substrat
Färbereagenz inkl. Sekundäranti- körper	ImmPRESS® HRP Anti-Mouse IgG (Peroxidase) Polymer	Vector Laboratories; USA	2-Komponenten-Kit

Wirkstoff	Handelsname	Hersteller	Anmerkung
	Detection Kit, made in Horse		
Färbereagenz inkl. Sekundäranti- körper	ImmPRESS® HRP Anti-Rabbit IgG (Peroxidase) Polymer Detection Kit, made in Horse	Vector Laboratories; USA	2-Komponenten-Kit

8.4. Antikörper

Tabelle 23: Antikörper

Antikörper	Wirtsspezies	Hersteller	Anmerkung
Anti-HMGB1	Kaninchen	Abcam; UK	Primärantikörper
Anti-Iba1	Kaninchen	FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH	Primärantikörper
Anti-Mouse Glyoxalase1	Maus	Bio Mac GmbH; Leipzig	Primärantikörper
Purified Mouse Anti-GFAP	Maus	BD Biosciences	Primärantikörper
RAGE Polyclonal	Kaninchen	Bioss Antibodies Inc.; USA	Primärantikörper
Vectastain® Rabbit IgG	Ziege	Vector Laboratories; USA	Sekundärantikörper; siehe „Gebrauchsfertige Lösungen“
Vectastain® Mouse IgG	Ziege	Vector Laboratories; USA	Sekundärantikörper; siehe „Gebrauchsfertige Lösungen“
ImmPRESS® HRP Anti-Mouse IgG	Pferd	Vector Laboratories; USA	Sekundärantikörper; siehe

Antikörper	Wirtsspezies	Hersteller	Anmerkung
			„Gebrauchsfertige Lösungen
ImmPRESS® HRP Anti-Rabbit IgG	Pferd	Vector Laboratories; USA	Sekundärantikörper; siehe „Gebrauchsfertige Lösungen

8.5. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 24: Verbrauchsmaterialien

Material	Typ	Hersteller	Anmerkung
<i>Versuchstiere</i>			
Tierfutter	Altromin Standard Diät	Altromin Gesellschaft für Tierernährung mbH, Lage	--
<i>Narkose</i>			
Injektionskanüle	Sterican® 23G	B. Braun, Melsungen	--
Einmalspritze 1ml/5ml	Inject 1ml/5ml	B. Braun, Melsungen	
<i>Operation</i>			
Braunüle	Vasofix Braunüle, 17G	B. Braun, Melsungen	--
Arterieller Katheter	Nonsterile Polythene Tubing OD = 0,96mm	Portex ® Smith Medical, UK	--
Augensalbe	Corneregel® Augencreme	Bausch+Lomb, Berlin	--
Nahtmaterial	4.0 Prolene-Faden	Ethicon GmbH, Norderstedt	--
Geflochtener Faden	Nähfaden	Gütermann AG, Gutach Breisgau	--

Material	Typ	Hersteller	Anmerkung
Operationsbesteck	Präparationsschere, Mikroschere, Nadelhalter, Pinzetten, Overholtklemmen, Knochensplitterzange, Raspatorium, Dissektor, Bohrkopf	Aesculap, Tuttlingen	--
Infusionsbesteck	--	B. Braun, Melsungen	--
Einmalskalpell	Cutfix ®	B. Braun, Melsungen	--
Rasierer	Favorita II, GT 104/GH 204	Aesculap, Tuttlingen	--
Gewebekleber	Histoacryl® Gewebekleber	B. Braun, Melsungen	--
Dreiwegehahn	Discofix-3	B. Braun, Melsungen	--
Glaskapillaren	Clinitubes D 957-11, 5-210, heparinisiert	Radiometer, Kopenhagen	--
<i>Gewebefixierung und Histologie</i>			
Objekträger	--	Diagonal, Münster	--
Deckplatten	--	Diagonal, Münster	--
Eindeckmittel	--	Kindler AG, Deitingen	--

8.6. Geräte

Tabelle 25: Geräte

Gerät	Typ	Hersteller	Anmerkung
<i>Versuchstiere</i>			
Waage	Scaltec SPO61	Labotec, Wiesbaden	--
<i>Narkose</i>			
Beatmungsgerät	Artema MM 206C	Heyer, Bad Ems	--
Temperaturhomöostase- Gerät	Homeothermic Blanket System	Harvard Apparatus, UK	--
Tubus	Certofix Trio Paed, 1,7mm Durchmesser	B. Braun, Melsungen	--
<i>Operation</i>			
Operationsmikroskop	OMPI 1-FC	Carl Zeiss, Oberkochen	--
Blutdrucksensor	RS 3800, Gould 134615-50	Gould Inc., Cleveland USA	--
Blutdruckmonitor	Sirecust 404-1	Siemens, Hamburg	--
Blutgasanalysegerät	ABL 615	Radiometer, Kopenhagen	--
Elektrolytanalysator	EML 105	Radiometer, Kopenhagen	--
Stereotaktischer Rahmen	430005-GR-GP-K	TSE-Systems, Bad Homburg	--
Bohrer	Microtron GD612	60 Aesculap, Tuttlingen	--
Bohrerhandstück	GD604	Aesculap, Tuttlingen	--
Bipolarer Koagulator	Eigenbau	Universität Mainz	--
Traumagerät	Eigenbau	Universität Mainz	--
<i>Gewebefixierung und Histologie</i>			
Paraffinmikrotom	Jung Biocut 2035	Leica, Wetzlar	--

Gerät	Typ	Hersteller	Anmerkung
Lichtmikroskop	Axioskop 2 Plus	Zeiss, Oberkochen	--
Kamera	CCD Super Color CV 950	JAI, Dänemark	--
Objektmikrometer	2mm, 0,01mm Intervallen	Leica, Wetzlar	--
Makroskop	Wild M420	Leica, Wetzlar	--

8.7. Hardware

Tabelle 26: Hardware

Hardware	Prozessor; Betriebssystem	Anmerkung
PC	Pentium Pro 64 MB RAM, Microsoft Win95	--

8.8. Software

Tabelle 27: Software

Software	Typ	Hersteller
<i>Bildbearbeitung</i>		
Bildbearbeitungssoftware	Optimas 6.51	VSG, UK
<i>Auswertung</i>		
Statistische Auswertung	SigmaPlot for Windows Version 12.5	Systat Software, Erkrath

8.9. Verwendete Antikörper IHC-Färbungen

Tabelle 28: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper IHC-Färbung HMGB 1, RAGE und Glo1

Färbung	Antikörper
IHC-HMGB1	Anti-HMGB1 (Wirtsspezies: Kaninchen); Primärantikörper
IHC-RAGE	RAGE Polyclonal (Wirtsspezies: Kaninchen); Primärantikörper
IHC-Glo1	Anti-Mouse Glyoxalase 1 (Wirtsspezies: Maus); Primärantikörper
IHC-HMGB1, -RAGE	Anti Rabbit IgG (Wirtsspezies: Ziege); Sekundärantikörper
IHC-Glo1	Anti Mouse IgG (Wirtsspezies: Ziege); Sekundärantikörper

Tabelle 29: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper IHC-Färbung GFAP und Iba1

Färbung	Antikörper
IHC-GFAP	Purified Mouse Anti-GFAP (Wirtsspezies: Maus); Primärantikörper
IHC-Iba1	Anti-Iba1 (Wirtsspezies: Kaninchen); Primärantikörper
IHC-Iba1	Anti-Rabbit IgG (Wirtsspezies: Pferd); Sekundärantikörper
IHC-GFAP	Anti-Mouse IgG (Wirtsspezies: Pferd); Sekundärantikörper

Danksagung

Lebenslauf