

Aus der Klinik für Anästhesiologie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Einfluss der Beta-3 Untereinheit des GABA-A- Rezeptors auf die Propofol vermittelte Neurotoxizität im Schädel-Hirn-Trauma-Modell der Maus

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

Vorgelegt von

Anna Drees
aus Wiesbaden

Mainz, 2021

Tag der Promotion:

12. Juli 2022

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|------|
| Abkürzungsverzeichnis | vi |
| Abbildungsverzeichnis | viii |
| Tabellenverzeichnis | viii |
| 1. Einleitung..... | 1 |
| 2. Literaturdiskussion | 3 |
| 2.1. Schädel-Hirn-Trauma..... | 3 |
| 2.2. Schädel-Hirn-Trauma-Modelle | 5 |
| 2.2.1. Controlled Cortical Impact..... | 5 |
| 2.2.2. Fluid Percussion Injury..... | 5 |
| 2.2.3. Penetrating Ballistic-Like Brain Injury..... | 6 |
| 2.2.4. Weight Drop | 6 |
| 2.3. Anästhetika..... | 7 |
| 2.3.1. Injektionsanästhetika | 7 |
| 2.3.2. Inhalationsanästhetika | 13 |
| 2.4. GABA-Rezeptoren..... | 14 |
| 2.5. Sekundärschaden | 15 |
| 2.5.1. Neuroinflammation | 17 |
| 2.5.2. Blut-Hirn-Schranken-Störung | 21 |
| 2.5.3. P75NTR-Signalweg..... | 23 |
| 3. Material und Methoden | 25 |
| Tabelle Chemikalien | 25 |
| Tabelle Lösungen..... | 26 |
| Tabelle Antikörper..... | 27 |
| Tabelle PCR..... | 27 |
| Tabelle Verbrauchsmaterialien und Geräte | 28 |
| 3.1. Versuchsbeschreibung | 31 |
| 3.2. Tiere und Mutationsbeschreibung | 32 |
| 3.2.1. Genotypisierung | 33 |
| 3.3. Schädel-Hirn-Trauma-Modell | 34 |
| 3.4. Intervention..... | 35 |
| 3.5. Motorfunktionsanalysen | 35 |
| 3.5.1. Neurologic Severity Score | 35 |
| 3.5.2. Rotarod..... | 37 |

| | | |
|---------|---|----|
| 3.6. | Euthanasie und Hirnentnahme | 38 |
| 3.7. | Kryoprozessierung und Färbungen..... | 38 |
| 3.7.1. | Kryoschnitte..... | 38 |
| 3.7.2. | Färbungen..... | 39 |
| 3.8. | Volumetrie..... | 39 |
| 3.9. | Protein-Analytik..... | 40 |
| 3.9.1. | Proteinextraktion | 40 |
| 3.9.2. | Bestimmung der Proteinkonzentration..... | 40 |
| 3.9.3. | IgG-Dotplot | 40 |
| 3.9.4. | Gelelektrophorese..... | 41 |
| 3.9.5. | Western Blot..... | 42 |
| 3.10. | RNA-Analytik..... | 43 |
| 3.10.1. | RNA-Extraktion | 43 |
| 3.10.2. | cDNA-Synthese | 43 |
| 3.10.3. | Quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion | 44 |
| 3.11. | Statistische Auswertung | 45 |
| 4. | Ergebnisse..... | 46 |
| 4.1. | Physiologische Parameter | 47 |
| 4.1.1. | Körpergewicht und Temperatur..... | 47 |
| 4.1.2. | Narkosetiefe | 48 |
| 4.2. | Motorfunktion..... | 49 |
| 4.3. | Volumetrie und Apoptosemarker | 50 |
| 4.4. | Neuroinflammation | 51 |
| 4.5. | BHS-Störung | 53 |
| 4.6. | p75NTR-Signalweg..... | 54 |
| 5. | Diskussion..... | 55 |
| 5.1. | Kontrolle der physiologischen Parameter | 55 |
| 5.1.1. | Körpergewicht und Temperatur..... | 55 |
| 5.1.2. | Narkosetiefe | 55 |
| 5.2. | Auswirkung einer Veränderung der GABA _A -β3-Transmission auf die Hirnläsion und das funktionelle Outcome | 56 |
| 5.3. | Auswirkung einer Veränderung der GABA _A -β3-Transmission auf den p75NTR-Signalweg .. | 59 |
| 5.4. | Auswirkung einer Veränderung der GABA _A -β3-Transmission auf die Neuroinflammation .. | 61 |
| 5.5. | Auswirkung einer GABA-β3-Mutation auf die BHS | 64 |
| 6. | Zusammenfassung..... | 67 |

| | |
|---------------------|----|
| 7. Literatur | 69 |
| 8. Lebenslauf | 87 |

Abkürzungsverzeichnis

| Abkürzung | Bedeutung (deutsch) | Bedeutung (englisch) |
|--|--|---|
| °C | Grad Celsius | |
| μ- | Mikro- | |
| 129Sv-GABA- B3 ^{tm(N265M)} | Mausstamm mit Mutation (s.Kap.3.3.) | |
| ² | Quadrat- | |
| ³ | Kubik- | |
| A | Fläche | |
| ANOVA | Varianzanalyse | <i>Analysis of variance</i> |
| APS | Ammoniumpersulfat | |
| AQP | Aquaporin | |
| Arg-1 | Arginase-1 | |
| ATP | Adenosintriphosphat | |
| BDNF | | <i>Brain-derived neurothrophic factor</i> |
| BHS | Blut-Hirn-Schranke | |
| bp | Basenpaare | |
| c- | Zenti- | |
| ca. | Circa | |
| CBF | Zerebraler Blutfluss | <i>Cerebral blood flow</i> |
| CCI | Kontrollierter kortikaler Aufschlag | <i>Controlled cortical impact</i> |
| cDNA | Komplementäre DNA | |
| CMRO ₂ | Zerebraler Sauerstoffmetabolismus | <i>Cerebral oxygen metabolism</i> |
| CPP | Zerebraler Perfusionsdruck | <i>Cerebral perfusion pressure</i> |
| Da | Dalton | |
| DAMP | | <i>Danger-associated molecular patterns</i> |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure | <i>Desoxyribonucleic acid</i> |
| EDTA | Ethylendiaminetetraacetat | |
| EEG | Elektroenzephalogramm | |
| engl. | Englisch | |
| FPI | | <i>Fluid percussion injury</i> |
| g | Gramm | |
| GABA | Gamma-Amino-Buttersäure | <i>Gamma amino butyric acid</i> |
| Gabrb3 | β3-Untereinheit des GABA _A -Rezeptors | |
| GCS | | <i>Glasgow Coma Scale</i> |
| gDNA | Genomische DNA | |
| h | Stunde | |
| HCl | Salzsäure | |
| ICP | Intrakranieller Druck | <i>Intracranial pressure</i> |
| IgG | Immunglobulin G | |
| IL | Interleukin | |
| iNOS | Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthethase | |
| k- | Kilo- | |
| KG | Körpergewicht | |
| KO | | <i>Knock out</i> |
| l | Liter | |
| Lipo | Lipofundin | |
| m | Meter | |

| | | |
|-----------|--|---|
| m- | Milli- | |
| mA | Milliampere | |
| MAPK | Mitogen aktivierte Proteinkinase | |
| min | Minute | |
| mRNA | | <i>Messenger ribonucleic acid</i> |
| n- | Nano- | |
| NaCl | Natriumchlorid | |
| NfκB | | <i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i> |
| NGF | | <i>Nerve growth factor</i> |
| NK-Zellen | Natürliche Killerzellen | |
| NMDA | N-methyl-D-Aspartat | |
| NO | Stickstoffmonoxid | |
| NOS | Stickstoffmonoxid-Synthetase | |
| NP-40 | Nonidet P-40 | |
| NSS | | <i>Neuro severity score</i> |
| P | Protein | |
| p75NTR | P75 Neurotrophinrezeptor | <i>P75 neurotrophin receptor</i> |
| PBS | Phosphatgepufferte Salzlösung | <i>Phosphate buffered saline</i> |
| PCR | Polymerasekettenreaktion | <i>Polymerase chain reaction</i> |
| pH | Potenzial des Wasserstoffs | |
| PPIA | Peptidylprolyl Isomerase A | |
| Prop | Propofol | |
| qRT-PCR | Quantitative Echtzeit-PCR | <i>Real-time PCR</i> |
| RIPA | | <i>Radioimmunoprecipitationassay</i> |
| RNA | Ribonukleinsäure | <i>Ribonucleic acid</i> |
| RNase | Ribonuklease | |
| ROS | Reaktive Sauerstoffspezies | |
| rpm | Umdrehungen pro Minute | <i>Rounds per minute</i> |
| s | Sekunde | |
| s. | Siehe | |
| SDS-PAGE | Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese | <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> <i>Polyacrylamid gel electrophoresis</i> |
| SHT | Schädel-Hirn-Trauma | |
| TBS | Tris-gepufferte Salzlösung | <i>Tris buffered saline</i> |
| TBST | TBS + Tween 20 | |
| TEMED | Tetramethylethylendiamin | |
| TJ | | <i>Tight Junction</i> |
| TM | Transmembranäres Segment | |
| TNFR | TNF-Rezeptor | |
| TNF-α | Tumornekrosefaktor α | |
| Tris | Trishydroxymethylaminomethan | |
| Trk | Tyrosinkinase | |
| TVA | Tierversuchsantrag | |
| V | Volumen | |
| WT | Wildtyp | |
| ZNS | Zentrales Nervensystem | |
| ZO-1 | | <i>Zonula occludens 1</i> |
| β3N265M | Mutation der Aminosäure 265 der β3-Untereinheit des GABA _A -Rezeptors | |

Tabelle 1: Abkürzungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Strukturformel Propofol..... | 7 |
| Abbildung 2: Zeitstrahl Versuchsaufbau | 31 |
| Abbildung 3: Ergebnisse Körpergewicht und Temperatur | 47 |
| Abbildung 4: Narkosetiefe..... | 48 |
| Abbildung 5: Motorfunktionsanalysen..... | 49 |
| Abbildung 6: Volumetrie und Apoptosemarker | 50 |
| Abbildung 7: Proinflammatorische Zytokine..... | 52 |
| Abbildung 8: Mikrogliale Polarisationsmarker | 52 |
| Abbildung 9: IgG-Dotblot..... | 53 |
| Abbildung 10: Marker des p75NTR-Signalweges | 54 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Tabelle 1: Abkürzungsverzeichnis | vii |
| Tabelle 2: Glasgow Coma Scale | 4 |
| Tabelle 3: Funktionen von α -Untereinheiten des GABA _A -Rezeptors | 15 |
| Tabelle 4: verwendete Chemikalien..... | 26 |
| Tabelle 5: verwendete Lösungen | 26 |
| Tabelle 6: verwendete Antikörper | 27 |
| Tabelle 7: verwendete Primer und Analysekits..... | 27 |
| Tabelle 8: verwendete Materialien und Geräte..... | 30 |
| Tabelle 9: Studiendesign | 32 |
| Tabelle 10: Zusammensetzung Polyacrylamidgele..... | 41 |
| Tabelle 11: Ergebnisse Körpergewicht und Temperatur..... | 47 |
| Tabelle 12: Veränderung der Motorfunktion im Vergleich zu präoperativ | 49 |
| Tabelle 13: Volumetrie und Apoptosemarker als Vielfaches der Nativtiere..... | 50 |
| Tabelle 14: Proinflammatorische Zytokine und mikrogliale Polarisationsmarker als Vielfaches der Nativtiere..... | 51 |
| Tabelle 15: IgG-Dotblot als Vielfaches der Nativtiere als Marker für eine BHS-Störung | 53 |
| Tabelle 16: Marker des p75NTR-Signalweges als Vielfaches der Nativtiere | 54 |

1. Einleitung

Das Schädel-Hirn-Trauma (SHT) ist eine der häufigsten Todesursachen junger Erwachsener in der westlichen Welt. Allein in Deutschland sind pro Jahr ca. 250.000 Menschen betroffen, in ungefähr 10 % der Fälle mittel- bis hochgradig und häufig in Verbindung mit einem Polytrauma (1). Die Hauptursachen sind Verkehrsunfälle und Stürze, betroffen sind vor allem jüngere Männer (2). Die sozioökonomischen Folgen für die Gesellschaft sowie die persönlichen Folgen für den Patienten sind immens. Zum einen ist das schwere SHT eine aufwendig behandelbare Erkrankung mit einer hohen Rate an Folgeerkrankungen wie schweren neurologischen Beeinträchtigungen und Behinderungen, aber auch das junge Erkrankungsalter mit dem Verlust an Arbeits- und Lebensjahren tragen zu erheblichen Belastungen bei. Die gesamtgesellschaftlichen Kosten des SHT betragen in Deutschland pro Jahr hochgerechnet 2,8 Milliarden Euro (1).

Die Pathophysiologie des SHT umfasst eine mechanische Verletzung, hervorgerufen durch direkte Krafteinwirkung oder indirekte Schädigung durch physikalische Kräfte wie Rotation oder Beschleunigung. Es werden grundsätzliche Schadensmuster unterschieden: zum einen der akute Primärschaden, der zum Zeitpunkt der Verletzung entsteht und therapeutisch nicht zugänglich ist. Zum anderen werden zeitgleich auf molekularer Ebene inflammatorische und pathophysiologische Prozesse in Gang gesetzt, die zur Entstehung des Sekundärschadens führen und Ansatzpunkt jedweder therapeutischen Intervention sind (3).

Sowohl in der Erstversorgung als auch in der Langzeittherapie sind Sedierung und Narkose häufig vonnöten, um das Outcome zu beeinflussen. Vitalparameter müssen kontrolliert und aufrechterhalten werden, um Hypoxien und Hyperkapnien zu vermeiden, und häufig werden Patienten mit mittelschwerem oder schwerem SHT einer chirurgischen Versorgung unterzogen, auch in Verbindung mit Intensivaufenthalten (1, 4, 5).

Anästhetika haben dabei eigene Effekte, die zu Neurotoxizität oder auch Neuroprotektion führen können und das klinische Outcome der Patienten so beeinflussen können. Propofol ist ein häufig benutztes Standardhypnotikum, das sowohl in der Notfallmedizin als auch in OP und Intensivstation einen hohen Stellenwert besitzt (6, 7). Durch unsere Arbeitsgruppe konnte ein neurotoxischer Effekt von Propofol auf den Sekundärschaden nach SHT nachgewiesen werden, der über den p75-Neurotrophinrezeptor (p75NTR)-Signalweg vermittelt wird (8, 9). Die wesentliche Bindungsstelle von Propofol ist die $\beta 3$ -Untereinheit des Gamma-Amino-Buttersäure (GABA)_A-Rezeptors; eine Mutation dieser Untereinheit führt dazu, dass eine Propofolbindung nicht mehr stattfinden kann und die klinischen Wirkungen gänzlich aufgehoben sind. Zielsetzung dieser Studie ist es, zu zeigen, ob die

durch Propofol hervorgerufene Neurotoxizität über diese Mutation beeinflussbar ist und damit über den GABA_A-Rezeptor vermittelt wird. Hierfür wurden 52 männliche und weibliche 129/Sv-Mäuse verwendet, die eine Punktmutation an der β 3-Untereinheit besitzen und eine verzögerte Propofolapplikation 24 h nach SHT vorgenommen, wenn die p75NTR-Level maximal sind. Als primäre Zielgröße wurde das Läsionsvolumen 72 h nach SHT definiert. In weiteren Schritten wurde die Motorfunktion der Tiere untersucht, um neurologische Beeinträchtigungen zu erkennen. Als Neuroinflammationsmarker wurden die Zytokine Interleukin (IL)-1 β , IL-6 und Tumornekrosefaktor (TNF)- α gemessen sowie die mikroglialen Polarisationsmarker induzierbare Stickstoffsynthetase (iNOS) und Arginin-1 (Arg-1), um die mikrogliale Beteiligung der Neuroinflammation zu detektieren. Die Integrität der Blut-Hirn-Schranke (BHS) wurde mittels Immunglobulin G (IgG)-Dotplot untersucht. Um den Einfluss des p75NTR-Signalwegs zu bestimmen, wurde die Induktion des Rezeptors sowie seines Liganden *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) gemessen. Für diesen Signalweg konnten die vorausgehenden Arbeiten durch Sebastiani et al. eine erhöhte Beteiligung an der Sekundärschädigung nach SHT nachweisen, weshalb die Expression des Rezeptors ebenfalls relevant für diese Studie ist.

Im Rahmen der SHT-Behandlung sind Anästhetika für die Notfall- und Folgetherapie essentiell und wichtige Ziele für die zukünftige pharmakologische Beeinflussung des Sekundärschadens. Gemäß dem hippokratischen Grundsatz „*Primum nihil nocere*“ ist es daher unabdingbar, das vorhandene Wissen über die Pathophysiologie sowie die Auswirkungen von Anästhetika auf molekularer Ebene weiter auszubauen und so das Outcome der Patienten langfristig zu verbessern.

2. Literaturdiskussion

2.1. Schädel-Hirn-Trauma

Das SHT stellt ein weltweites gesundheitliches Problem mit weitreichenden sozioökonomischen und persönlichen Folgen dar. Es existiert sowohl in einkommensschwachen als auch in reicheren Ländern und wird häufig als „stille Epidemie“ bezeichnet. In Deutschland beträgt die Inzidenz 332 Patienten mit Schädel-Hirn-Verletzungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr. Dies entspricht hochgerechnet ungefähr 248.000 Patienten, von denen ca. 2.750 Patienten versterben. Die Sterblichkeitsrate liegt gemittelt in Europa bei 15/100.000 Einwohnern pro Jahr. Bei 91 % der Verletzungen handelt es sich um leichte SHT, 4 % sind mittelschwer und 5 % schwer und in 35 % der Fälle sind diese Patienten zusätzlich polytraumatisiert (1, 10–12). Die Hauptursache sind Stürze und Verkehrsunfälle und mehrheitlich sind 15-24-jährige Patienten betroffen. Männer sind dabei mit ca. 75 % deutlich häufiger betroffen (2, 13). Patienten mit mittelschwerem oder schwerem SHT haben oft jahrelange kognitive und psychologische Beeinträchtigungen, Behinderungen sowie Folgeerkrankungen. Durch das junge Erwachsenenalter, in dem sich der Altersgipfel befindet, erleidet der Patient einen deutlichen persönlichen Verlust an Lebensjahren und –qualität, jedoch ist das SHT durch den Verlust an Arbeitsjahren auch mit weiteren ökonomischen Folgen verbunden. In Europa macht das SHT die größte Anzahl an insgesamt gelebten Jahren mit Behinderung aufgrund von Traumata aus und gehört zu den drei häufigsten Ursachen für verletzungsbedingte Kosten (14, 15). Die gesamtgesellschaftlichen Kosten zur Behandlung und Nachsorge des SHT betragen allein in Deutschland ca. 2,8 Milliarden €/Jahr (1).

Das SHT ist als eine äußere Krafteinwirkung auf den Schädel definiert, die mit einer Hirnfunktionsstörung oder anderen Pathologie des Gehirns einhergeht. Als Funktionsstörung werden sowohl jede Form der Bewusstseinsstörung oder des Bewusstseinsverlustes angesehen, aber auch Amnesien, neurologische Ausfälle und kognitive Defizite sind wichtige Faktoren, die es zu berücksichtigen gilt (16).

Die Einteilung kann in offenes und geschlossenes SHT vorgenommen werden. Das geschlossene SHT zeichnet sich durch eine intakte *Dura Mater* (harte Hirnhaut) aus und beinhaltet Verletzungen wie die Gehirnerschütterung, diffuse axonale Schädigungen und intrakranielle Hämatome. Bei einem offenen SHT besteht dagegen eine Verletzung der Kopfhaut, des Schädelknochens und der *Dura Mater*. Dadurch ist eine Verbindung zwischen Schädelinnerem und Außenwelt entstanden, also zwischen Liquor- und Luftraum, in extremen Fällen wird Hirnsubstanz äußerlich sichtbar. Zu den offenen SHT gehören beispielsweise perforierende Verletzungen des Schädels oder Schädelbasisfrakturen mit Duraverletzung (13, 17).

Klinisch wird die Einteilung des SHT in leicht, mittel und schwer vorgenommen. Dies erfolgt üblicherweise mit Hilfe der Glasgow Coma Scale (GCS), bei der für bestimmte Reaktionen (Augenöffnen, beste motorische Reaktion und beste verbale Reaktion) Punkte vergeben werden:

| Prüfung | Reaktion | Punkte |
|---------------------------|--------------------------|------------|
| Augen öffnen | Spontan | 4 |
| | Auf Aufforderung | 3 |
| | Auf Schmerzreiz | 2 |
| | Keine Reaktion | 1 |
| Beste motorische Reaktion | Auf Aufforderung | 6 |
| | Gezielte Schmerzabwehr | 5 |
| | Ungezielte Schmerzabwehr | 4 |
| | Beugesynergismen | 3 |
| | Strecksynergismen | 2 |
| | Keine Reaktion | 1 |
| | Beste verbale Reaktion | Orientiert |
| Desorientiert | | 4 |
| Einzelne Worte | | 3 |
| Einzelne Laute | | 2 |
| Keine Reaktion | | 1 |

Tabelle 2: Glasgow Coma Scale (nach 18)

Mit Hilfe des Summenscores lässt sich die Schwere des SHT folgendermaßen einschätzen:

- Leichtes SHT: GCS 15-13
- Mittelschweres SHT: GCS 12-9
- Schweres SHT: GCS 8-3 (18, 19)

Symptome des SHT sind vielfältig und imponieren sowohl durch offensichtliche Verletzungen wie Deformitäten des Schädels oder Austritt von Blut, Liquor oder Hirngewebe, als auch durch neurologische Symptome wie Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen, Schwindel oder Seh- und Hörstörungen. Auch die Motorik oder Sensorik können bei der neurologischen Untersuchung beeinträchtigt sein, ebenso höhere kognitive Funktionen wie das Gedächtnis oder die Orientierung. Bei höhergradigem SHT sind Bewusstseinsstörungen und Bewusstlosigkeit möglich. Aufgrund der verminderten oder fehlenden Schutzreflexe beim schweren SHT besteht bei einem Punktwert ≤ 8 Punkten Intubationspflicht (1).

Zeichen für eine schwere zentrale Nervensystem (ZNS)-Schädigung bis hin zum lebensbedrohlichen Verlauf mit intrakranieller Drucksteigerung und Herniation sind lichtstarre oder erweiterte Pupillen, Beuge- u. Strecksynergismen, Kreislaufstörungen und Krampfanfälle (1, 13).

2.2. Schädel-Hirn-Trauma-Modelle

2.2.1. Controlled Cortical Impact

Das Modell des kontrollierten kortikalen Schadens (CCI, engl. *Controlled cortical Impact*) ist ein bereits seit 30 Jahren etabliertes Verfahren im Tierversuch, das entwickelt wurde, um die biomechanischen Vorgänge bei der Induktion eines direkten lokalen Traumas im Hirngewebe zu untersuchen (20). Der kontrollierte Aufschlag erfolgt mittels eines pneumatisch oder elektromagnetisch betriebenen Stempels auf die zuvor operativ per Kraniotomie freigelegte und intakte *Dura Mater*. Dadurch entspricht das Modell klinisch einem geschlossenen SHT (21). Neben direktem Zelluntergang kommt es zu diffusen axonalen Schädigungen, subduralen und intraparenchymatösen Blutungen, Ödemen, Entzündungsreaktionen und Veränderungen der zerebralen Durchblutung. Nach CCI lässt sich extravasales IgG rund um die Läsion sowie in der ipsilateralen weißen Substanz nachweisen, was auf eine Störung der BHS hinweist. Ferner entstehen beim CCI neurologische und kognitive Ausfälle, die dem klinischen Bild des SHT entsprechen (22, 23).

Der Vorteil des Modells liegt darin, dass die Variablen Geschwindigkeit, Eindringtiefe, Ort und Dauer des Aufschlags leicht definiert und jederzeit reproduzierbar eingesetzt werden können. Nachteilig ist aber, dass durch die Notwendigkeit einer Kraniotomie zur Herstellung des Primärschadens ein Trauma produziert wird, welches normalerweise nicht bei einem geschlossenen SHT vorliegt. Effekte die dadurch entstanden sein könnten, können durch den Einschluss einer Sham-Kontrollgruppe untersucht werden (24, 25).

2.2.2. Fluid Percussion Injury

Beim Fluid Percussion Injury (FPI)-Modell wird sagittal, parasagittal oder lateral per Kraniektomie der Schädel eröffnet und mittels eines Pendels ein Impuls auf ein auf die intakte *Dura Mater* aufgesetztes Flüssigkeitsreservoir appliziert. Dabei entsteht ein Schaden, der im Ausmaß von der Stärke des eingesetzten Impulses abhängt. Die Pathophysiologie entspricht der eines geschlossenen SHT und es entsteht primär eine Kombination aus direkter Hirnschädigung und diffusen subkortikalen Verletzungen und intrakranieller Blutungen, gefolgt von Ödembildung und Steigerung des intrakraniellen Drucks mit Induktion eines Sekundärschadens, der langfristig neurologische Einschränkungen zur Folge hat (24). Das laterale FPI ist eins der am häufigsten angewandten Tiermodelle in der SHT-Forschung und zeichnet sich durch eine hohe Reproduzierbarkeit bei leichter

Einstellung der Schadensparameter aus. Problematisch ist die verglichen mit anderen SHT-Modellen erhöhte Mortalität. Zudem ist auch für dieses Modell eine Kraniotomie notwendig. (21, 26).

2.2.3. Penetrating Ballistic-Like Brain Injury

Das Penetrating Ballistic-Like Brain Injury -Modell wurde entwickelt, um die Einwirkung penetrierender Schussverletzung auf das Hirngewebe zu untersuchen. Dabei wird ein Projektil mit hoher Energie das Gewebe eingebracht. Die dabei im Hirngewebe entstehende Schockwelle erzeugt einen Schaden, der höhlenförmig und um ein Vielfaches größer ist als das Projektil selbst. Der Schaden geht einher mit Ödembildung, intrakranieller Drucksteigerung, Schädigung von grauer und weißer Substanz und einer Neuroinflammationsreaktion. Verglichen mit anderen SHT-Modellen kommt es bei diesem Modell zu überdurchschnittlich großen intrazerebralen Blutungen, die durch das penetrierende Verletzungsmuster entstehen (21).

2.2.4. Weight Drop

Es existieren verschiedene Weight Drop Modelle (nach Shohami, Feeney & Marmarou), die im Wesentlichen darauf beruhen, ein definiertes Gewicht mit definierter Größe aus einer vorbestimmten Höhe auf die freigelegte *Dura Mater* oder den intakten Schädelknochen fallen zu lassen. Die Modelle sind einfach durchzuführen und dem menschlichen SHT ähnlich, aber haben eine erhöhte Mortalität und eine große Variabilität der Schadensmuster und somit sind sie nicht gut reproduzierbar. Zudem besteht grundsätzlich die Gefahr, dass das Gewicht erneut vom Schadensareal ab- und erneut aufprallt (21).

2.3. Anästhetika

Das Wort Anästhesie („άναισθησία“) kommt aus dem altgriechischen und bedeutet Empfindungslosigkeit. Im heutigen Gebrauch unterscheidet man zwischen Allgemeinanästhesie und regionalen Anästhesieformen. Die Allgemeinanästhesie umfasst die Analgesie, also Schmerzfreiheit des Patienten, sowie einen Zustand der Bewusstlosigkeit mit Amnesie und Ausschaltung von Motorik und vegetativen Reflexen. Hierbei werden optimale Bedingungen geschaffen, um sowohl Operationen als auch diagnostische oder therapeutische Maßnahmen durchzuführen. Zu diesem Zweck führt man heutzutage als Standardnarkose eine sogenannte balancierte Anästhesie durch, die aus einer Kombination aus Hypnotikum, Analgetikum und Muskelrelaxans besteht (27).

2.3.1. Injektionsanästhetika

2.3.1.1. Propofol

Propofol (2,6-Diisopropylphenol) wurde 1986 zugelassen und ist ein stark lipophiles, kurz wirksames Narkotikum ohne große analgetische Potenz. Durch sein günstiges pharmakokinetisches Profil und eine gute Steuerbarkeit hat es sich im klinischen Gebrauch als Standardnarkotikum unter den Injektionsanästhetika etabliert. Es wird in einer Öl-Wasser-Emulsion auf Sojaölbasis hergestellt und hat einen pH-Wert von 7,0–8,5 (Disoprivan[®]) bzw. 6,0–8,5 (Generika) und eine Osmolarität von etwa 300 Milliosmol/Liter (L) (28).

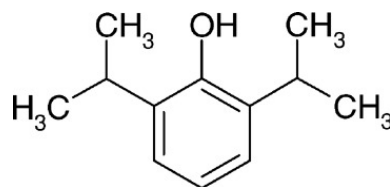


Abbildung 1: Strukturformel Propofol (29)

Pharmakokinetik:

Die pharmakokinetischen Eigenschaften von Propofol folgen einem 3-Kompartimente-Modell (29, 30). Nach intravenöser Applikation wird Propofol zu circa 97 % an Plasmaproteine gebunden (31). Durch seine hohe Lipophilie erreicht es nach Bolusgabe zunächst die stark durchbluteten und lipophilen Areale des ZNS und wird von dort aus wieder ins Blut und in die durchbluteten Gewebe (zum Beispiel Muskulatur) und in die schlecht durchbluteten langsam ausgleichenden Gewebe (Fettgewebe) rückverteilt. Dadurch erklärt sich der schnelle Wirkeintritt und der Vorteil der geringen Akkumulation (29). Die Dauer der Wirkung wird nach Einmalapplikation wie bei allen Injektionsanästhetika ebenfalls vor allem durch diese Umverteilung bestimmt und weniger durch die Halbwertszeit.

Die Eliminationshalbwertszeit ist abhängig von den applizierten Mengen und somit kontextsensitiv (32). Die Metabolisierung erfolgt sowohl hepatisch als auch extrahepatisch durch Glukuronidierung und Sulfatierung, die entstandenen Metabolite werden zu 88% renal eliminiert (31).

Pharmakodynamik:

Der Wirkmechanismus von Propofol ist bis heute nicht vollständig geklärt. Hauptsächlich wirkt Propofol als positiv allosterischer Modulator an GABA_A-Rezeptoren, wodurch die Freisetzung der exzitatorischen Aminosäure Glutamat inhibiert wird (28). Es bindet dabei sowohl an heteropentameren $\alpha_1\beta_3$ - als auch an homopentameren β_3 -Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors. Die Bindungsstelle wurde an der Schnittstelle des transmembranären und extrazellulären Abschnitts lokalisiert und liegt innerhalb der transmembranären Segmente (TM)1 und TM2. (33, 34). Darüber hinaus scheint Propofol mit geringer Selektivität noch einige Bindungsstellen innerhalb des GABA_A-Rezeptors besetzen zu können, von denen viele nicht eindeutig identifizierbar sind (35).

Zudem wurden noch weitere Wirkmechanismen identifiziert. Neben unspezifischen Effekten auf die zelluläre Lipidmembran hat Propofol eine inhibitorische Wirkung auf den glutamatergen N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptor und moduliert Kalzium- und Natriumkanäle (36). Eine Aktivierung des Endocannabinoidsystems wird in der Literatur ebenso beschrieben (37) wie Interaktionen mit Glyzin- und Dopamin1- Rezeptoren (38, 39).

Wirkungen und Nebenwirkungen:

Propofol führt nach intravenöser Injektion nach 30 – 40 Sekunden (s) zu einer Narkose durch Bewusstlosigkeit mit Amnesie. Wie die meisten Narkotika besitzt Propofol eine atemdepressive Wirkung mit Gefahr der Atemlähmung (32). Antiemetische Eigenschaften werden in der Literatur beschrieben, aber kontrovers diskutiert (40, 41). Im Vergleich zu anderen Narkotika gilt es aber als weniger emetogen und wird daher zur Prophylaxe von postoperativer Übelkeit und Erbrechen (englisch (engl.) *Postoperative nausea and vomiting*) eingesetzt.

Durch die gute Reflexdämpfung werden sowohl atemwegssichernde Hilfsmittel (zum Beispiel Endotrachealtubus, Larynxmaske) als auch diagnostische Werkzeuge wie Endoskope unter Propofolgabe gut toleriert (31).

In subhypnotischer Dosierung wirkt es anxiolytisch (42), aber auch euphorisierend bis sexuell enthemmend (43). Zudem besitzt es antikonvulsive Eigenschaften über den GABA_A-Agonismus und den NMDA-Antagonismus bis hin zum *Burst Suppression* Elektroencephalogramms (EEG) und kann so zur Behandlung eines therapierefraktären *Status Epilepticus* eingesetzt werden (44, 45).

Ein analgetischer Effekt wurde Propofol lange Zeit abgesprochen, weswegen die Kombination mit analgetischen Medikamenten (zum Beispiel Opioiden oder Ketamin) bei Schmerz indiziert ist. Jedoch lassen Studien vermuten, dass Propofol zumindest den Analgetikabedarf reduzieren kann (46, 47). Im Mausmodell konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass Propofol eine Unterdrückung der spinalen nozizeptiven Transmission und eine Analgesie durch Modulation der spinalen GABA_A-Rezeptoren bewirken kann (48, 49).

Zu den unerwünschten Wirkungen zählen Schmerzen während der Injektion (vor allem bei Kindern), die durch eine Reizung der Gefäßwand hervorgerufen werden, was durch eine Veränderung der Konzentration (50), der Formulierung mit mittel- und langkettigen Fettsäuren statt nur mit langkettigen Fettsäuren und einer vorherigen Injektion von intravenösem Lidocain beeinflusst werden kann (51). Auch eine vorherige Opioidgabe senkt das Risiko des propofolinduzierten Injektionschmerzes (52).

Durch seine vasodilatatorischen Eigenschaften führt Propofol zu Hypotonien bis hin zur Kreislaufdepression (53), die durch allgemeine Maßnahmen wie Lagerung, Volumengabe und Gabe vasokonstriktorischer Pharmaka behandelbar sind (54). In hoher Dosierung wirkt es negativ inotrop und besitzt durch Sympathikolyse und Inhibition kardialer L-Typ-Kalziumkanäle sowohl pro- als auch antiarrhythmische Eigenschaften (55, 56). Gerade bei älteren Patienten wird durch Propofol bei Blutdruckabfall die Wirkung auf den Barorezeptorenreflex abgeschwächt, sodass eine Reflertachykardie und somit die kardiale Kompensation vermindert wird (57, 58).

Zu einer seltenen, aber gefürchteten Nebenwirkung gehört das Propofol-Infusionssyndrom, bei dem es unter anderem zu Arrhythmien, Leberfunktionsstörungen, Hypertriglyzeridämie, Lipidämie, Laktazidose, Rhabdomyolyse, Myoglobinurie und Nierenversagen kommen kann. Vor allem sind hiervon Kinder mit Atemwegserkrankungen und Patienten mit schweren Kopfverletzungen betroffen, die im Rahmen einer Intensivbehandlung über einen längeren Zeitraum mit Propofol sediert werden (28, 59, 60). Die Mortalität ist mit 30 % sehr hoch, Risikofaktoren für das Versterben sind Alter <18, männliches Geschlecht und die Gabe von Vasopressoren (61). Als Therapie steht die symptomatische Behandlung zum Beispiel durch Nierenersatzverfahren im Vordergrund. Die Propofolgabe muss sofort beendet werden und auch nach Besserung der Symptomatik darf kein weiteres Propofol injiziert werden (28).

Verwendung:

Aufgrund seiner pharmakologischen Eigenschaften und dem günstigen Nebenwirkungsprofil ist Propofol in der modernen Anästhesie zu einem gerne und häufig verwendeten Medikament geworden. Neben der Narkoseeinleitung wird es im Rahmen von totalen intravenösen Anästhesien

verwendet (62). Auch aus der Intensivtherapie ist Propofol nicht mehr wegzudenken. Dort wird es vor allem zur Aufrechterhaltung einer länger andauernden (Analgo-)Sedierung gebraucht, aber auch für Interventionen und diversen Therapien (7). Vor allem Letzteres ist für die vorliegende Arbeit von Bedeutung, da Patienten nach schwerem SHT häufig im Rahmen einer längeren Intensivbehandlung sediert und behandelt werden und daher für größere Zeiträume einer Propofolapplikation ausgesetzt sind.

Neuroprotektion:

Für Propofol konnten diverse neuroprotektive Effekte in unterschiedlichen Modellen dargestellt werden. Die Studien beziehen sich nicht nur auf das SHT, sondern auch auf Ischämie Modelle und *in-vitro*-Untersuchungen. Hierbei sind unterschiedliche Wege der Neuroinflammation und Signalkaskaden zu nennen.

In-vitro konnte gezeigt werden, dass Propofol nach SHT einen neuroprotektiven Effekt hat, der sowohl den Gesamt- als auch den Sekundärschaden umfasst und in Hypothermie verstärkt wird (63). Als Narkotikum senkt Propofol den zerebralen Sauerstoff- und Glukosebedarf mittels einer Hemmung der Funktion der *Gap Junctions* in Astrozyten (64). Es wirkt antioxidativ und als Fänger freier Sauerstoffradikale kann es der Lipidperoxidation im Hirn direkt entgegen wirken und oxidativen Stress nach einer Verletzung reduzieren (65). Eine Propofolapplikation, die kurz nach dem SHT stattfindet, kann durch Hemmung der IL-1 β und TNF- α -Expression die Aquaporin-4(AQP-4)-Expression modulieren und so die Ausbildung eines posttraumatischen Ödems abschwächen (66).

Eine Folge des SHT können Krampfanfälle unterschiedlicher Ausprägung sein. Durch seine antikonvulsive Wirkung und sein günstiges Nebenwirkungsprofil hat sich Propofol als protektiv in der Therapie des refraktären *Status Epilepticus* erwiesen (67).

Für Propofol konnte im zerebralen Ischämie Modell der Ratte eine neuroprotektive Langzeitwirkung über 28 Tage nach Reperfusion nachgewiesen werden, die mit einer verringerten Eosinophilie in den hippocampalen Neuronen einherging (68).

Neurotoxizität:

Für Propofol konnten nicht nur neuroprotektive Effekte herausgefunden werden. In diversen Studien wurde auch die mögliche Neurotoxizität untersucht und die molekularen Mechanismen, die dafür verantwortlich sind. Im unreifen Gehirn neonataler Ratten wurde festgestellt, dass Propofol eine proapoptotische und neurodegenerative Wirkung während der Synaptogenese haben und zu langanhaltenden Lerndefiziten führen kann (69, 70). In Kombination mit anderen GABA_A-Agonisten oder NMDA-Antagonisten wurde diese apoptotische Wirkung deutlich potenziert (71). Die Expression von GABA_A- und NMDA-Rezeptoren unterscheidet sich erheblich zwischen dem juvenilen und dem adulten Gehirn, und während der Synaptogenese sind die Neuronen besonders empfindlich für toxische Reize. Dies kann eine Erklärung darstellen, weshalb Propofol vor allem beim juvenilen Gehirn neurotoxische Effekte zeigt. Die neuroapoptotische Wirkung wird hierbei vor allem über die Aktivierung des Caspase-3-Weges eingeleitet (69).

Thal et al. konnten in einer Studie zeigen, dass eine Propofolgabe während oder kurz nach einem SHT im Rattenmodell sowohl zu einer Verschlechterung der neurologischen Funktion als auch zu einer erhöhten Mortalitätsrate führt. Auch die posttraumatische Neurogenese verlief verzögert. Diese Effekte waren dosisabhängig (72). Ursächlich hierfür scheint die auf das SHT folgende vermehrte Expression des p75NTR zu sein (9). Dieser ist die Bindungsstelle für Neurotrophine (*nerve growth factor*[NGF], BDNF und Neurotrophin-3) und deren unreife Proformen. Bei einem erhöhten Aufkommen des p75NTR und der Liganden, wie das während der Synaptogenese oder nach Gehirnverletzungen der Fall ist, kann der p75NTR gemeinsam mit seinem Co-Rezeptor Sortilin nach Bindung seiner Liganden eine proapoptotische Signalkaskade auslösen (73, 74).

2.3.1.2. Barbiturate

Barbiturate wie Thiopental oder Methohexital sind allosterische Agonisten an der β -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors und modulieren dosisabhängig Kalziumkanäle. Bei der intravenösen Anwendung zur Narkoseinduktion wirken sie aufgrund ihrer hohen Lipophilie sehr schnell und durch eine rasche Umverteilung auch kurz. Die Elimination erfolgt überwiegend hepatisch und zu einem geringen Anteil renal (75).

Im ZNS können Barbiturate den zerebralen Sauerstoffbedarf (CMRO₂, engl. *cerebral metabolic rate of oxygen*) und damit die zerebrale Durchblutung (CBF, engl. *cerebral blood flow*) senken. Dies kann eine hirndrucksenkende und somit neuroprotektive Wirkung haben (76). Allerdings ist das Outcome nicht zwangsläufig dadurch besser, da sie auch zu einer systemischen Hypotonie führen und dadurch der zerebrale Perfusionsdruck (CPP, engl. *cerebral perfusion pressure*) sinkt (77). Nach aktueller Leitlinie wird die Verwendung von Barbituraten zur Behandlung eines unkontrollierbar hohen

intrakraniellen Drucks (ICP, engl. *intracranial pressure*) nicht mehr empfohlen, da es hierfür nicht genügend Evidenz gibt (1). Barbiturate wirken antikonvulsiv bis zum Erzeugen eines Burst-Suppression-EEGs, weswegen sie nach wie vor zum Durchbrechen des therapierefraktären *Status Epilepticus* verwendet werden können (32, 75).

2.3.1.3. Benzodiazepine

Benzodiazepine vermitteln ihre Wirkung über eine allosterische Bindung an der GABA_A-Benzodiazepin-Bindungstasche, die sich an der Grenzfläche zwischen α - und γ -Untereinheit befindet. Nach der Bindung erhöhen Benzodiazepine indirekt den Chlorideinstrom in die Nervenzelle, indem sie die Affinität von GABA zum GABA_A-Rezeptor verstärken und so die Öffnungsfrequenz der Ionenkanäle gesteigert wird (78, 79).

Benzodiazepine zeichnen sich durch ihr breites Wirkprofil aus. Ihr Einsatz beschränkt sich nicht nur auf die Anästhesie zur Prämedikation und Narkoseinduktion, sondern sie werden auch zur Anxiolyse, antikonvulsiven Therapie, Myotonolyse und Behandlung von Schlafstörungen verwendet. Durch einen *Ceiling*-Effekt besitzen sie bei Monotherapie eine große therapeutische Breite ohne Gefahr einer letalen Atemdepression selbst bei suizidaler Absicht. Ihre Einteilung erfolgt nach Halbwertszeit in kurz, mittellang und lang wirksame Benzodiazepine (32, 62)

Für die Anästhesiologie besonders relevant ist das kurz und schnell wirksame Midazolam (Dormicum®), das zur Prämedikation, Narkoseinduktion und Sedierung verwendet wird. Durch eine dosisabhängige Senkung des CMRO₂ und des CBF wird Midazolam eine leicht hirndrucksenkende Wirkung zugesprochen. Bei schwerem SHT gibt es aber Hinweise darauf, dass mittlerer arterieller Druck und CPP durch Bolusgaben reduziert werden (80). Auch die antikonvulsive Wirkung macht es zu einem potentiell neuroprotektiven Medikament, das wie Propofol zur Sedierung nach SHT im Rahmen einer Intensivbehandlung eingesetzt werden kann. (79, 81)

2.3.1.4. Etomidat

Etomidat ist ein lipophiles Narkotikum ohne analgetisches Potenzial. Seine Wirkung vermittelt es ebenfalls über einen Agonismus am GABA_A-Rezeptor, hier vor allem an der β 2- und β 3-Untereinheit (82, 83).

Grundsätzlich kann es durch eine Senkung des CMRO₂ und des CBF den ICP senken und den CPP erhalten (84). Wegen einer Suppression der Nebennierenrindenfunktion durch die Inhibition der 11- β -Hydroxylase ist der Einsatz von Etomidat allerdings bei kritisch kranken Patienten kontraindiziert. Im Besonderen ist es daher ungeeignet für eine Langzeitsedierung von Patienten im Rahmen der Intensivtherapie, da hierbei das Risiko einer erhöhten Mortalität besteht (85, 86)

2.3.1.5. Ketamin

Ketamin ist ein seit 1970 zugelassenes schnell wirksames Anästhetikum mit zusätzlich analgetischer Wirkung. Aufgrund seiner amnestischen und psychotropen Eigenschaften spricht man von einer dissoziativen Anästhesie. Dies kann zu unangenehmen Erfahrungen des Patienten führen, weswegen es vorzugsweise in Kombination mit anderen Anästhetika wie Midazolam eingesetzt wird (87). Als einziges Einleitungsmedikament verfügt es über sympathomimetische Effekte mit Blutdrucksteigerung und Tachykardie. Sein analgetisches Potenzial und die geringe Atemdepression bei erhaltenen Schutzreflexen machen es nach wie vor zu einem gerne genutzten Medikament in der Notfallmedizin oder im perioperativen Setting (88).

Die vielschichtige Wirkung des Ketamins ist noch nicht vollständig geklärt, erfolgt jedoch hauptsächlich über eine kompetitive Hemmung des NMDA-Rezeptors. Zudem hemmt es die periphere Wiederaufnahme von Katecholaminen an der synaptischen Endplatte, wodurch sich die Steigerung der Katecholamineffekte erklärt (89, 90).

Der Einsatz von Ketamin bei SHT-Patienten galt lange Zeit als kontraindiziert, da es durch die Induktion einer geringen Atemdepression mit hyperkapnischer Vasodilatation beim nicht beatmeten Patienten eine Hirndrucksteigerung ausgelöst hat. Dieser Effekt trat vor allem bei Patienten mit intrakraniellen Pathologien auf (91, 92). Allerdings konnten neuere Studien diesen Effekt nicht belegen, es wurden sogar neuroprotektive und antiinflammatorische Wirkungen beschrieben. Durch die Hemmung des NMDA-Rezeptors reguliert es die exzitotoxische Signalübertragung herunter und reduziert so die Neuroapoptose. Auch die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α und IL-6, die den Sekundärschaden vergrößern, wird durch Ketamin unterdrückt (93, 94). Die hämodynamisch stabilisierenden Eigenschaften gelten zudem beim SHT als protektiv (95). Beim kontrolliert beatmeten Patienten scheint Ketamin daher entgegen der früheren Meinung daher eher vorteilhaft zu sein.

2.3.2. Inhalationsanästhetika

Mit der Entdeckung des Lachgases als Analgetikum und dem Einsatz von Diethylether und Chloroform wurde im 19. Jahrhundert die moderne Anästhesie begründet. Diese Substanzen waren erstmalig in der Lage, das Empfinden und Bewusstsein der Patienten zu vermindern oder auszuschalten und die Arbeit des Chirurgen wesentlich zu vereinfachen. Die Entwicklung komplexerer Eingriffe wurde durch diese frühen Inhalationsanästhetika erst möglich gemacht (96). Heutzutage besitzen diese, bedingt durch ihre schlechte Steuerbarkeit und ihr ungünstiges Nebenwirkungsprofil keinen Stellenwert in der modernen Anästhesie. Von klinischer Bedeutung sind vor allem die volatilen halogenierten Kohlenwasserstoffe. Zu dieser Gruppe gehören Isofluran,

Sevofluran und Desfluran, sowie deren nicht mehr genutzte Vorläufersubstanzen Enfluran und Halothan. Sie sind bei Raumtemperatur flüssig und benötigen daher die Anwendung eines Vapors, um in den gasförmigen Zustand gebracht zu werden. Ihre hohe Lipophilie ist eine wesentliche Voraussetzung der narkotischen Wirkung und korreliert linear mit der Wirkstärke der einzelnen Substanzen. Vorteilhaft ist die nahezu vollständige pulmonale Elimination der heutigen volatilen Anästhetika gegenüber den älteren Substanzen (62, 97, 98).

Im Rahmen eines SHT wurde die Verwendung von Inhalationsanästhetika lange Zeit als kritisch erachtet, da es bei hoher Dosierung zu einer Erhöhung des ICP kommen kann. Dieser Effekt ist jedoch dosisabhängig und bei den neueren und heute verwendeten volatilen Anästhetika geringer ausgeprägt (79, 99). Neuere Studien konnten auch neuroprotektive Wirkungen von volatilen Anästhetika belegen. Dabei wurde für Isofluran und Sevofluran gezeigt, dass bei beiden volatilen Anästhetika ein Einfluss auf die BHS besteht. Während Isofluran einen höheren Wassergehalt im Gewebe zur Folge hat, wurde durch die Anwendung von Sevofluran dagegen die BHS-Integrität verbessert und der Wassergehalt im Gewebe erniedrigt (72). Auch eine Postkonditionierung mit Sevofluran im Rattenmodell konnte die SHT-vermittelte Apoptose und damit den Sekundärschaden verringern (100). Verschiedene Ischämie Modelle konnten in Ratten und Mäusen ähnliche Effekte für Isofluran belegen (101, 102).

2.4. GABA-Rezeptoren

GABA ist einer der wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitter und wirkt auf nahezu alle Neurone des Gehirns. GABA_A- und GABA_C-Rezeptoren sind ligandengesteuerte ionotrope Rezeptoren, während der GABA_B-Rezeptor metabotrop ist. Aufgrund der Relevanz für die vorliegende Arbeit wird hier vor allem auf den GABA_A-Rezeptor eingegangen.

GABA_A-Rezeptoren sind pentamere transmembranäre Rezeptoren, das heißt, sie bestehen aus 5 Untereinheiten, die sich in verschiedenen Kombinationen zusammensetzen können und so in verschiedenen Gehirnarealen exprimiert werden (103). Die Untereinheiten im humanen GABA_A-Rezeptor werden aus insgesamt 19 verschiedenen Subtypen gebildet (α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ϵ , θ , π und ρ 1-3), wobei die meisten heteromeren Rezeptoren aus zwei α -, zwei β - und einer anderen, am häufigsten einer γ -Untereinheit, bestehen (104). Die spezifische Anordnung der Untereinheiten bestimmt die physiologischen und pharmakologischen Eigenschaften der Rezeptoren. Die GABA-Bindungstasche als aktives Zentrum befindet sich an der Grenzfläche zwischen β - und benachbarten α -Untereinheit und besteht hauptsächlich aus Aminosäuren aus der extrazellulären Domäne der β -Untereinheit. Sie gehören zur Superfamilie der cys-loop-Rezeptoren, was bedeutet, dass die

Aminosäuresequenz der extrazellulären Domänen der GABA_A-Untereinheiten charakteristische Cysteinreste besitzt (105). Nach Aktivierung durch seine Liganden wird der Einstrom von Chloridionen durch den zentralen Ionenkanal in die Zelle und somit eine Hyperpolarisation ausgelöst (103).

Der GABA_A-Rezeptor ist neben GABA durch eine Vielzahl von Liganden modulierbar. Ein Beispiel hierfür sind Benzodiazepine, die allosterisch die Benzodiazepin-Bindungstasche besetzen, die sich an der Grenzfläche zwischen α - und γ -Untereinheit befindet. Dadurch erhöht sich die Affinität von GABA an seinen Rezeptor und die Öffnungswahrscheinlichkeit des Ionenkanals wird gesteigert. Flunitrazepam als Vertreter der Benzodiazepine bindet dabei an $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\alpha 5$, während die $\alpha 4$ - und $\alpha 6$ -Untereinheit Ziel von Antagonisten und inversen Agonisten ist (106). Dadurch erklären sich die vielfältigen pharmakologischen Eigenschaften der Benzodiazepine, die über diese Untereinheiten vermittelt werden (siehe Tabelle 3).

| Untereinheit | Wirkung |
|--------------|--|
| $\alpha 1$ | Sedierung, antikonvulsive Wirkung, anterograde Amnesie |
| $\alpha 2$ | Anxiolyse, Muskelrelaxation |
| $\alpha 3$ | Muskelrelaxation |
| $\alpha 5$ | Muskelrelaxation, Beeinträchtigung kognitiver Funktionen |

Tabelle 3: Funktionen von α -Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors (32)

Für Propofol wurden mehrere Bindungsstellen am GABA_A-Rezeptor diskutiert. In neueren Arbeiten wurden einige davon identifiziert, so bindet es sowohl an $\beta 3$ -Homopentamere als auch an $\alpha 1\beta$ -Heteropentamere (33). Es konnte gezeigt werden, dass eine Punktmutation an der $\beta 3$ -Untereinheit, bei der ein Asparaginrest durch Methionin ersetzt wurde, dazu führt, dass die betreffenden Mäuse resistent gegen eine Anästhesie durch Propofol sind (107). Dies zeigt eindrücklich die Relevanz der $\beta 3$ -Untereinheit als Bindungsstelle für Propofol. Mäuse mit dieser Punktmutation wurden aus diesem Grund für die vorliegende Arbeit ausgewählt, um den Einfluss der GABA-vermittelten Wirkungen des Propofols im Rahmen des SHT zu untersuchen.

2.5. Sekundärschaden

Die im Moment der Gewalteinwirkung entstandene Schädigung des Hirngewebes bezeichnet man als primäre Läsion. Sie kann sowohl durch ein fokales mechanisches Trauma in Folge von einer Kontaktverletzung entstanden sein, als auch Resultat indirekter Schädigung durch Akzeleration, Dezeleration oder Rotationskräfte. Schädigungsmuster, die durch lineare Akzeleration hervorgerufen werden, führen eher zu Läsionsmustern wie Quetschungen, Platzwunden und intrakraniellen

Blutungen, während Rotationsverletzungen eher die tieferen Gewebsschichten betreffen und diffuse axonale Schäden auslösen können (3, 5).

Die Primärläsion ist therapeutisch nicht beeinflussbar. Durch das Trauma wird eine Kaskade von Reaktionen aktiviert, in Folge derer die Schädigung vergrößert wird. Der dabei entstehende Sekundärschaden kann durch eine frühe Therapie und das damit verbundene Durchbrechen der kaskadenartigen Sekundärschädigungsmechanismen verringert werden und damit das klinische Outcome des Patienten beeinflusst werden. Daher ist die Sekundärläsion Ziel jeder Therapie von SHT-Patienten (1, 5).

Die Kräfte, die den initialen Schaden hervorrufen, wirken meist nur Millisekunden auf das Hirngewebe ein. Dieses Ereignis kann nicht mehr beeinflusst werden, doch es gibt einige Maßnahmen und Prädiktoren, die der Beeinflussung des Sekundärschadens dienen. Vor allem in der frühen Akutphase des SHT ist die Behandlung der extrakraniellen Ursachen von großer Bedeutung. Hypoxie und Hypotonie in der Erstversorgung sind mit einer deutlich erhöhten Mortalität assoziiert (4). Sie führen in Verbindung mit einer verletzungsbedingten Steigerung des ICP zu einer Reduktion des CPP und damit zu Ischämie und Hypoxie des Hirngewebes, was das klinische Outcome deutlich verschlechtert. Frühe Behandlungsstrategien müssen sich daher auf Maßnahmen zur Kreislaufstabilisierung und Atemwegsmanagement konzentrieren (4, 108, 109). Die rasche Therapie von SHT-Patienten mit früher Intubation, Kreislaufüberwachung und –unterstützung im Rahmen moderner Intensivtherapie, früher Bildgebung mittels Computertomografie und operativer Entlastung konnten die Mortalität des SHT von 50 % in den 1970er Jahren auf 17 % in 2003 senken (5, 110).

Aber auch auf zellulärer Ebene kann der Sekundärschaden vergrößert werden. Frühe vaskuläre Reaktionen beeinflussen den CBF und können zu einer sekundären Ischämie des Gewebes führen (111, 112). Die Energieversorgung der Zellen zeigt eine deutliche Abnahme des Energieträgers Adenosintriphosphat (ATP) im verletzten Gewebe, und findet vermehrt über anaerobe Glykolyse mit Laktatanreicherung statt (113). ATP-abhängige membranständige Pumpen versagen, es kommt zu zellulärer Depolarisation und Ansammlung von exzitotoxischen Aminosäuren wie Glutamat und Aspartat. Durch den Anstieg von Glutamat werden postsynaptische ionotrope Rezeptoren wie NMDA aktiviert. Dadurch wird die Kalium-, Natrium- und Calciumhomöostase in den Zellen gestört und es kommt zu Zellschwellung und Apoptose (114). Diese Veränderungen können zu Ödembildung des Hirngewebes und damit zu einer Steigerung des ICP beitragen und so eine zerebrale Minderperfusion hervorrufen. Vor allem die Erhöhung des intrazellulären Kalziums und dessen Fehlregulation führt zudem zu einer weiteren Kaskade, die beispielsweise die Stickstoffmonoxid-Synthetase (NOS)

aktiviert und die Entstehung freier Radikale fördert, aber auch direkt die Apoptose einleiten kann (115).

2.5.1. Neuroinflammation

2.5.1.1. Zelluläre Infiltration

Als Reaktion auf eine akute Verletzung des Hirngewebes im Rahmen eines SHT reagieren sowohl ansässige als auch von peripher einwandernde Zellen auf das Geschehen. Dies bezeichnet man als sterile Immunreaktion. Sie leitet anfangs den Reparaturprozess ein, kann jedoch auch als überschießende Reaktion schädliche Auswirkungen auf den Hirnschaden haben. Beteiligt an der akuten Reaktion sind Astrozyten, Mikroglia, Monozyten oder Makrophagen, neutrophile Granulozyten und T-Zellen (116).

Die primäre Verletzung führt zum Untergang von Gliazellen und Neuronen, Verletzung von Gefäßen und einer Störung der Integrität der BHS. Dadurch kommt es zu der Freisetzung verschiedener intrazellulärer Bestandteile wie ATP, Desoxyribonukleinsäure (DNA, engl. *desoxyribonucleic acid*) und Ribonukleinsäure (RNA, engl. *ribonucleic acid*), die als schadensassoziierte molekulare Muster (DAMPs, *damage-associated molecular pattern*) bezeichnet werden und an entsprechende purinerge Rezeptoren auf Astrozyten, Mikroglia und Neuronen binden. Dies lässt die Zellen Chemokine und Zytokine wie TNF- α , IL-1 β , IL-6, Interferon γ produzieren und ausschütten, was wiederum weitere, auch periphere Zellen aktiviert und rekrutiert (116, 117).

Bereits nach 24 Stunden (h) befindet sich die Anzahl eingewanderter neutrophiler Granulozyten auf dem Höhepunkt und geht bis zum siebten Tag kontinuierlich zurück. Periphere Makrophagen wandern ab dem ersten Tag nach SHT in das verletzte Gewebe ein, zeigen am dritten Tag ein Maximum und bilden sich bis zum siebten Tag wieder zurück. Die Konzentration von eingewanderten Natürlichen Killer(NK)-Zellen, T-Zellen und dendritischen Zellen ist ebenfalls am dritten Tag nach SHT am höchsten, flacht dann ab und ist noch nach Monaten nachweisbar. Mikroglia werden in einem biphasischen Verlauf aktiviert. Zunächst steigt die Anzahl M2-ähnlicher Mikroglia und nach 24 h auch die des M1-Phänotyps. Nach 7 Tagen kommt es zu einem ersten Gipfel, welcher in den folgenden 2 Wochen abflacht, um dann nach circa 3-4 Wochen einen zweiten Gipfel auszubilden. Dieser ist hauptsächlich von M1-polarisierten Mikroglia geprägt (117–119).

2.5.1.2. Aktivierung der Mikroglia

Mikroglia sind eine Hauptkomponente des angeborenen Immunsystems im ZNS. Dadurch spielen sie eine große Rolle bei der Neuroinflammation und Entwicklung des Sekundärschadens nach traumatischer Hirnverletzung. Durch Phagozytose und Freisetzung verschiedener Mediatoren wie antiinflammatorische Zytokine und Neurotrophine können sie die Heilung von verletztem Gewebe

fördern. Je nach ihrem Aktivierungszustand können sie jedoch auch dysreguliert sein und große Mengen an proinflammatorischen und zytotoxischen Stoffen freisetzen, was wiederum die Entstehung des Sekundärschadens beeinflussen und vergrößern kann (120).

Periphere Makrophagen sind in der Lage, durch Aktivierung unterschiedliche Polarisierungen anzunehmen, wodurch sie effizient auf verschiedene Reize wie Krankheitserreger oder Gewebeschädigungen reagieren können. Dabei sind die Polarisationszustände M1 und M2 bekannt. Ähnliche Mechanismen konnten auch bei Mikroglia beobachtet werden, die ebenfalls in M1- und M2-ähnliche Phänotypen polarisiert werden können (120, 121).

Um vom Grundzustand M0 zum M1-Phänotyp aktiviert zu werden, der vor allem mit Phagozytose und Freisetzung von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) reagiert, reagieren sie auf Stimulation durch bakterielle Lipopolysaccharide oder Interferon γ . Durch ihre Aktivierung wird zudem die Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β , IL-6 und TNF- α , sowie der iNOS hochreguliert. Dadurch kommt es langfristig zu oxidativem Stress, Neuroinflammation und Apoptose. Zytokine und iNOS gelten daher als spezifische Marker der M1-Polarisierung (120, 122, 123).

M2-ähnliche Mikroglia werden durch Stimulation mit IL-4, IL-10 und IL-13 aktiviert. Es sind 3 Untergruppen bekannt, die in M2a, M2b und M2c unterschieden werden. Grundsätzlich scheinen M2-ähnliche Mikroglia eher immunsupprimierende, antiinflammatorische Eigenschaften aufzuweisen und haben dadurch eher neuroprotektive Eigenschaften. Sie können Umbau- und Reparaturprozessen durch Phagozytose, Neurogenese, Angiogenese, Oligodendrogenese und Remyelinisierung einleiten und modulieren. Durch die Produktion sowohl antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10 als auch phänotypischer Marker wie Arg-1 wirken M2-polarisierte Mikroglia direkt dem proinflammatorisch wirkenden M1-Typ entgegen (120). Arg-1 und iNOS als mikrogliale Enzyme sind Konkurrenten um ihr gemeinsames Substrat Arginin als Stickstoffdonator. Stickstoffmonoxid (NO) wird im SHT vermehrt durch die iNOS gebildet, verstärkt die Neuroinflammation und kann so einen neurotoxischen Effekt haben, während die Überexpression von Arg-1 eine protektive Wirkung zu haben scheint (124).

Die unterschiedlichen Aktivierungszustände sind dynamische Prozesse und bei Mikroglia handelt es sich um plastische Zelltypen. Als Reaktion auf ein SHT wurde gezeigt, dass Mikroglia im verletzten Hirngewebe dynamisch auf die Schädigung reagieren und vorübergehend einen M2-Phänotyp ausbilden, um dann ab dem 3. – 7. Tag in eine chronische M1-Aktivierung überzugehen. Im Rahmen dieser Kinetik kann sowohl ein Transit von M2 zu M1 als auch eine Aktivierung von eingewanderten Zellen stattfinden, wobei viele der Mikroglia einen kombinierten M1/M2-Phänotyp aufweisen. Der M1-Phänotyp begünstigt die Neuroinflammation und erhält sie aufrecht, wohingegen die M2-

Aktivierung eher antiinflammatorische Eigenschaften zu haben scheint. Das Ausmaß der M1-Aktivierung korreliert dabei mit dem Umfang des Sekundärschadens, weshalb davon ausgegangen wird, dass eine Unterdrückung dieser Aktivierung einen protektiven Effekt zur Folge haben könnte (117, 119, 125).

Im Tiermodell konnten bis zu einem Jahr nach der experimentellen Verletzung im Gewebe aktivierte Mikroglia nachgewiesen werden. Diese Veränderungen waren mit einer Expansion des Läsionsvolumen, Myelinverlust und degenerativen Prozessen im Hippocampus verbunden (126) Auch beim Menschen konnte gezeigt werden, dass die neuroinflammatorischen Prozesse durch aktivierte Mikroglia jahrelang bestehen bleiben und dadurch die Vergrößerung des primären Schadens ein chronisch-neurodegenerativer Prozess werden kann (127, 128).

2.5.1.3. Zytokine

TNF- α

TNF- α ist ein proinflammatorisches Zytokin, das bei einer ZNS-Schädigung bereits sehr früh vor allem von Makrophagen und Mikroglia produziert wird (129), aber auch von Astrozyten und Neuronen synthetisiert werden kann (130, 131). Es wird als 17 Kilodalton (kDa) großes Polypeptid vom 26 kDa transmembranären TNF enzymatisch abgespalten und bindet an zwei unterschiedliche TNF-Rezeptoren (TNF-R), TNF-R1 und TNF-R2 (132). TNF-R1 besitzt eine zytoplasmatische Todesdomäne, bei TNF-R2 fehlt diese Domäne (133). Nach Bindung von TNF- α an TNF-R1 kann über die Aktivierung von Caspase 8 und 10 die Apoptose eingeleitet werden. Neben der Aktivierung von NF κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells) werden über die MAPK (mitogen-activated protein kinase) Signalkaskaden eingeleitet und regulieren so die Expression verschiedener proinflammatorischer Faktoren wie reaktiver Stickstoffspezies und iNOS (134, 135).

Während der TNF-R1 überwiegend an der Neurodegeneration beteiligt ist, vermittelt der TNF-R2 eher Geweberegeneration und neuroprotektive Effekte (136). Es konnte gezeigt werden, dass TNF- α durch die Bindung an diesen Rezeptor sowohl die Remyelinisierung als auch die Regeneration und Proliferation von Oligodendrozyten fördert(137).

Die Ausschüttung von TNF- α kann im Sinne einer positiven Rückkopplung über den TNF-R1-Signalweg und die damit verbundene Aktivierung von NF κ B autokrin induziert werden. Dadurch wird die mikroglial vermittelte Neuroinflammation verstärkt und entkoppelt (138).

IL-1 β

Das proinflammatorisch wirkende Zytokin IL-1 β wird hauptsächlich von Zellen des angeborenen Immunsystems wie Makrophagen, Monozyten und im ZNS hauptsächlich Mikroglia hergestellt. Dabei

reagiert der Toll-like-Rezeptor auf die Bindung an seine Liganden wie bakterieller Lipopolysaccharide mit der Synthese von inaktivem Pro-IL-1 β . Dieses bildet im Zytosol einen Proteinkomplex mit Pro-Caspase-1, der IL-1 β -Inflammasom genannt und in Lysosomen gespeichert wird. Auch das Erkennen von DAMP ist ein Stimulus für die IL-1 β -Bildung (139). Durch die Bindung von freiem ATP an den Purinrezeptor P2X7 erfolgt die Öffnung des ATP-abhängigen Kaliumkanals mit Ausstrom von Kaliumionen als Sekretionsstimulus der lysosomalen Exozytose. Es kommt zum Einstrom von Calciumionen, die wiederum Phospholipasen aktivieren für die weitere Prozessierung von Caspase-1 und Erleichterung der Exozytose (140–142). Auch die Bildung und Sekretion von IL-1 durch IL-1 selbst im Sinne einer autokrinen Induktion mit positiver Rückkopplung wurde *in-vivo* und in Monozyten *in-vitro* beschrieben (143, 144).

IL-1 β induziert selbst die Cyclooxygenase-2, die zur Bildung von proinflammatorisch wirkenden Prostaglandinen führt und die iNOS, die wiederum die Produktion von zytotoxischem NO katalysiert (s. Abschnitt 2.5.2.1) (145, 146). Auch die IL-6-Synthese wird durch IL-1 β induziert (147). Es konnte gezeigt werden, dass die intrazerebrale Injektion von IL-1 β nach SHT Entzündungsreaktionen verstärkt und Apoptose einleiten kann (148). Die posttraumatische Gabe von neutralisierenden IL-1 β -Antikörpern führt zu einem kleineren Schadensvolumen und einer Verringerung der kognitiven Defizite. Dies zeigt, dass IL-1 β eine zentrale Rolle in der immunologischen Reaktion nach SHT innehat und damit Ziel einer therapeutischen Intervention darstellen kann (149).

IL-6

IL-6 wurde ursprünglich als B-Zell-differenzierender Faktor definiert, von dem angenommen wurde, dass er zur Reifung von B-Zellen zu antikörperproduzierenden Zellen führt und so rein immunologische Funktionen erfüllt (150). Jedoch ist mittlerweile klar, dass er darüber hinaus auch wichtige Eigenschaften hat, zu denen im ZNS Neurogenese und Kontrolle reifer Neuronen und Gliazellen sowohl im Normalzustand, als auch nach Verletzungen gehören. Im ZNS kann er von Neuronen, Mikroglia, Astrozyten und auch Endothelzellen gebildet werden. Verletzungen dienen dabei als Stimulus für die Ausschüttung großer Mengen an IL-6, aber auch Lipopolysaccharide oder Zytokine wie TNF- α und IL-1 β induzieren die IL-6-Bildung und Ausschüttung. Zudem kann es, ähnlich wie bei IL-1 β , zur autokrinen Induktion durch IL-6 selbst kommen. Es kann sowohl an den membrangebundenen als auch an den löslichen Rezeptor binden und in Verbindung mit ubiquitär vorhandenem Glykoprotein gp130 eine Signalkaskade in Gang bringen, bei der intrazelluläre Tyrosinkinase oder Januskinase aktiviert werden. Dieser Vorgang wird als *trans-signaling* bezeichnet. Auch die Aktivierung der MAPK wird über diesen Weg vermittelt (151, 152).

Es gibt verschiedene Aussagen darüber, ob IL-6 neuroprotektive oder neurodegenerative Eigenschaften besitzt. Insbesondere in Verbindung mit seinem löslichen Rezeptor kann es *in-vitro* das

Überleben von Neuronen und Retinazellen fördern (153, 154). IL-6 induziert BDNF und wirkt synergistisch damit, was zu einem deutlich geringeren Schadensvolumen im Mausmodell gegenüber IL-6-Knockout-Mäusen führt. Diese sind im Umkehrschluss auch nicht in der Lage, BDNF zu induzieren (155). Im Modell konnte eine direkte Neuroprotektion und Neurogenese durch IL-6-produzierende Mikroglia nachgewiesen werden, und auch eine verbesserte Regeneration peripherer Nerven durch IL-6 konnte beobachtet werden (156, 157), wohingegen auch neurotoxische Wirkungen nach experimenteller Sehnervenverletzung beschrieben werden (158). Nach SHT ist die Expression von IL-6 deutlich hochreguliert und lässt sich im Liquor von Patienten bis zu 3 Wochen nach schwerem SHT nachweisen. Von dort aus kann es eine systemische Akute-Phase-Reaktion bei gestörter BHS auslösen (159, 160). Nach leichtem SHT in Verbindung mit einer kurzen Hypoxie im Modell konnte gezeigt werden, dass IL-6 Neuroinflammation und motorische Defizite begünstigt, was nach Gabe von IL-6-Antikörpern aufgehoben werden konnte (161). Damit kann für IL-6 nicht abschließend definiert werden unter welchen Bedingungen es eher neuroprotektiv oder neurotoxisch wirkt.

2.5.2. Blut-Hirn-Schranken-Störung

Die BHS ist eine Endothelschranke aus spezialisierten Endothelzellen, deren Basalmembran und den Fortsätzen der angrenzenden Astrozyten. Diese neurovaskuläre Einheit sichert mit einem komplexen System aus aktiven und passiven Transportsystemen die Homöostase und den Gas- und Nährstoffaustausch der Neurone (162, 163). Sie stellen eine mechanische Abgrenzung gegen Entzündungen, Toxine und Krankheitserreger dar und sind essentiell für die physiologischen neuronalen Funktionen. Verletzungen und neurodegenerative Erkrankungen gefährden die Integrität dieser Barriere und sind damit Bestandteil verschiedener Pathologien (164, 165). Auch pharmakologische Interventionen werden im ZNS deutlich von der intakten BHS beeinflusst und sind daher nur mit Einschränkungen möglich (166).

Die spezialisierten Endothelzellen des ZNS sind nicht fenestriert und werden durch Tight Junctions (TJ) zusammen gehalten, wodurch der parazelluläre Transport deutlich eingeschränkt wird. Transzelluläre Transportvorgänge wie Nährstoffaustausch und Ionentransporte werden aktiv durch rezeptorvermittelte Transzytose, Transporter und Ionenpumpen gesteuert (167, 168). Große und hydrophile Moleküle werden nahezu vollständig vom Passieren der BHS ausgeschlossen, für potentiell toxische Moleküle wie Xenobiotika existieren spezielle Effluxsysteme als Transportbarriere. Insbesondere zu nennen sind dabei die *multi drug resistance*-Proteine, welche spezialisierte p-Glykoproteine darstellen (165, 169). Anästhetika sind aufgrund ihrer Lipophilie und Größe in der Lage, gut die BHS zu durchdringen und ihre Wirkung im ZNS zu entfalten. Zusätzlich zu den Endothelzellen wird die Gefäßwand auf der dem Lumen abgewandten Seite von Perizyten, glatten Gefäßmuskelzellen und von den Ausläufern von Astrozyten umkleidet. Perivaskuläre Makrophagen

und Mikroglia interagieren mit der BHS, um bei Bedarf eine direkte Immunantwort ausbilden zu können (165). Zwei Basalmembranen umgeben und schützen die Gefäße zusätzlich als Extrazellulärmatrix, die innere vaskuläre Basalmembran, deren Bestandteile von Endothelzellen und Perizyten sezerniert werden, und die äußere parenchymatöse, die von Astrozytenendfüßen gebildet wird. Sie bestehen aus Kollagen IV, verschiedenen Lamininen, Proteoglykanen und anderen Glykoproteinen (164, 170).

Eine Störung der Integrität der BHS mit erhöhter Permeabilität kann bereits sehr früh nach SHT entstehen, je nach Modell ist dies bereits nach 30 Minuten (min) bis 1 h nachweisbar (171). Sowohl 4-6 h als auch 3 Tage nach SHT konnten eine maximale Durchlässigkeit der BHS nachgewiesen werden, was für einen biphasischen Verlauf spricht (172). Sowohl die primäre Verletzung als auch der Sekundärschaden mit seiner neuroinflammatorischen Kaskade sind daran beteiligt (171). Osmotisch wirkende Plasmaproteine im ZNS führen früh zu einer interstitiellen Wasseransammlung und so zu der Ausbildung eines vasogenen Ödems. Durch Veränderungen des Zellstoffwechsels und Energiemangel mit einer gestörten Funktion von Ionenpumpen und -transportern wie das auf Astrozyten exprimierte AQP-4 kann sich im Verlauf ein zytotoxisches Hirnödem entwickeln. Zytotoxische Mediatoren wie Glutamat, Laktat, ROS und NO verstärken diese Effekte, und auch proinflammatorische Zytokine wie TNF- α , IL-1 β und IL-6 erhöhen die Permeabilität weiter (173). Dieses zytotoxische Ödem ist im CCI-Modell 2 - 4 h nach Trauma nachweisbar und bleibt deutlich länger bestehen als das vasogene Ödem. (Unterberg et al. 2004; Chodobski et al. 2011).

Durch die Verletzung wird sehr schnell die Gerinnungskaskade aktiviert und es kann eine erhöhte Koagulation im perikontusionalen Hirngewebe nachgewiesen werden, was zu einer Verringerung des Blutflusses in diesem Areal führt. Dadurch steigt das Risiko einer ischämischen Unterversorgung des Gewebes und einer daraus resultierenden Verschlimmerung des Schadens (174, 175). Das bei der Gerinnung entstehende Thrombin sowie andere hochmolekulare im Blut befindliche Proteine wie Albumin und Fibrinogen, die normalerweise von einer intakten BHS am Eindringen ins ZNS gehindert werden, können nun die BHS durchdringen. Thrombin aktiviert Mikroglia, fördert ihre Proliferation und induziert die Synthese von proinflammatorischen Effektoren wie TNF- α und IL-6 und IL-12. Auch die iNOS und so die NO-Synthese wird durch Thrombin übermittlelt (176). Zudem kann es direkt über die Aktivierung von RhoA- und Tyrosinkinase-Signalweges zur Apoptose führen (177). Albumin aktiviert in Mikroglia den MAPK-Weg und die Synthese der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β (178). Fibrinogen kann Mikroglia aktivieren und zu einer erhöhten Phagozytose führen (179). Es bindet zudem an Rezeptoren, die auf Leukozyten exprimiert werden und kann dadurch die posttraumatische Neuroinflammation fördern (180). Auch Immunglobuline wie IgG sind nach einer

BHS-Störung nachweisbar, daher sind IgG und Fibrinogen Marker für die Extravasation bei Schrankenstörung (181).

Matrix-Metalloproteinasen (MMP) werden von mehreren Zellen des ZNS produziert, darunter Endothelzellen, Astrozyten, Mikroglia und Neuronen. Aber auch Immunzellen wie Monozyten und neutrophile Granulozyten, deren Zustrom durch die BHS-Störung erhöht ist, sind daran beteiligt. Ihre Synthese wird im verletzten Gewebe schnell hochreguliert und die Aktivität ihrer Inhibitoren herunter reguliert. Sie können Komponenten der Basallamina angreifen und TJ abbauen, was eine zusätzliche Beeinträchtigung der BHS zur Folge hat (182).

Hier werden das komplexe Zusammenspiel und die gegenseitige Beeinflussung verschiedener Signalkaskaden deutlich, die sich schlussendlich gegenseitig verstärken. Die durch das Trauma entstandene BHS-Störung führt über eine Vielzahl von eindringenden Plasmaproteinen zu einer verstärkten Inflammationsreaktion, die wiederum zu vermehrter Apoptose, Entzündungsreizen und weiterem Verlust der BHS-Integrität führt. In einem Teufelskreis kommt es durch die ödematösen Veränderungen zu einer Erhöhung des ICP und einer weiteren Verringerung der intrazerebralen Durchblutung, was wiederum eine Verschlechterung der BHS-Integrität verursacht. Irreversible Zellschäden und eine erhöhte Mortalität sind die Folge. Da antiödematöse Interventionen nach SHT bislang vor allem symptomatisch und unspezifisch sind, bieten die Beeinflussung des vasogenen und zytotoxischen Ödems und damit die Wiederherstellung einer intakten BHS möglicherweise therapeutische Optionen, die zur Neuroprotektion beitragen könnten (182–184).

2.5.3. P75NTR-Signalweg

2.5.3.1. Neurotrophine

Neurotrophine sind eine Gruppe von Wachstumsfaktoren, zu der bei Säugetieren Neurotrophin 3 und 4 (NT3/4), NGF und BDNF zählen. Sie werden als Proformen synthetisiert, aus denen das reife Neurotrophin proteolytisch freigesetzt wird. Als Rezeptoren dienen ihnen die 3 Rezeptor-Tyrosinkinasen (Trk) A, B und C und der 75 kDa große Neurotrophinrezeptor (p75NTR). Dabei kann der p75NTR alle Neurotrophine als Liganden binden, während die Trk selektiver sind und mit unterschiedlichen funktionellen Ergebnissen mit ihren jeweiligen Liganden interagieren (185, 186). Proneurotrophine wurden lange als reine Vorläuferproteine angesehen, doch jüngere Studien zeigen, dass sie eigene biologische Wirkungen entfalten können. So aktivieren die Proformen vorzugsweise p75NTR, um Apoptose zu vermitteln und reife Formen Trk-Rezeptoren, um das Überleben zu fördern. Die Wirkung wird somit durch die proteolytische Spaltung reguliert (187).

2.5.3.2. P75NTR

Der 75 kDa große Neurotrophinrezeptor p75NTR gehört zur Familie der TNF-Rezeptoren. Seine vier Cystein-reichen extrazellulären Domänen können alle vier Neurotrophine binden. Dabei binden sie NGF, BDNF, NT-3 oder NT-4 mit niedriger Affinität und die jeweiligen Proformen mit hoher Affinität. Der intrazelluläre Teil des Rezeptors enthält eine Todesdomäne, die sich bei diesem Rezeptor nicht selbst aktiviert und daher auf andere Effektorproteine angewiesen ist. Todesdomänen können indirekt über eine Caspaseaktivierung zur Apoptose führen (188, 189).

Der p75NTR kann sich nicht selbst aktivieren, aber auf unterschiedliche Arten interagieren, um verschiedene Effekte zu generieren. Zum einen ist eine Homodimerisierung des Rezeptors über Disulfidbrücken zwischen den Cysteinresten möglich. Dies kann bei Überexpression des Rezeptors stattfinden und proapoptotische Signalwege einleiten (190). Auch eine Heterodimerisierung mit anderen Rezeptoren ist möglich, wodurch der p75NTR in der Lage ist, auf seine Liganden unterschiedlich zu reagieren. Durch die Dimerisierung mit Trk-Rezeptoren kann die Affinität der murenen Neurotrophin/Trk-Bindung stark erhöht werden und Wachstums- und Überlebenssignale gesteigert werden (191, 192). Auch mit Sortilin kann der p75NTR eine heterodimere Verbindung eingehen. Durch Bindung an Proneurotrophine wird dieser Rezeptorkomplex aktiviert und über die Aktivierung der c-jun N-terminalen Kinase eine Signalkaskade in Gang gesetzt, die zur Apoptose führt (193). Somit wird die überlebens- oder zelltodfördernde Wirkung des Rezeptors sowohl über die Bindung der Pro- oder reifen Neurotrophine und über verschiedene Rezeptorkomplexe vermittelt (194).

3. Material und Methoden

Tabelle Chemikalien

| Chemikalie | Hersteller |
|--|---|
| Absolute Blue qPCR SybrgreenMix | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |
| Ammoniumpersulfat (APS) | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE |
| Aqua destillata | B.Braun Melsungen AG, Melsungen, DE |
| Bovines Serumalbumin | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE |
| Chameleon™ Duo Prestained Protein Ladder | Li-Cor, Lincoln, USA |
| Chloroform | Merck, Darmstadt, DE |
| DC™ Protein Assay Reagent (A,B,S) | BioRad, Hercules, USA |
| DyNamo™ ColorFlash Probe qPCR Kit | Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE |
| Ethanol absolut | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE |
| Ethylendiaminetetraacetat (EDTA) | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE |
| Flüssigstickstoff | Air Liquide, Düsseldorf, DE |
| g (genomische) DNA Eliminator | Qiagen N.V., Venlo, NL |
| Glycin | Applichem, Darmstadt, DE |
| Kresylviolett | Merck, Darmstadt, DE |
| LightCycler® 480 Probes Master | F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, CH |
| Lipofundin® MCT 20 % | B.Braun Melsungen AG |
| Magermilchpulver | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE |
| Magic Marker XP Western Standard | Invitrogen, Carlsbad, USA |
| Maxima Probe qPCR Master Mix | Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE |
| Methanol | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| MyTaq™ Extract-PCR Kit | Bioline, Tennessee, USA |
| Natriumchlorid (NaCl) | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | BioRad, Hercules, USA |
| Nonidet P-40 (NP-40) | Applichem, Darmstadt, DE |
| Pageruler Plus Prestained Protein Ladder | Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE |
| PonceauS | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE |
| Prestained Full-Range Rainbow Marker | GE Healthcare, Buckinghamshire, GB |

| | |
|---------------------------------------|--|
| Propofol (2,6-Diisopropylphenol) | SAFC®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| Proteaseinhibitor | Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, DE |
| QuantiTect Reverse Transcription Kit | Qiagen N.V., Venlo, NL |
| Ribonuklease (RNase) freies Wasser | Fermentas, St. Leon Rot, DE |
| RNeasy Mini Kit | Qiagen N.V., Venlo, NL |
| Roti®-Histokitt | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE |
| Roti®-Histol | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE |
| Rotiphorese® 10 x SDS-PAGE | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE |
| Rotiphorese® Gel 30 | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE |
| RPE Puffer | Qiagen N.V., Venlo, NL |
| RWT Puffer | Qiagen N.V., Venlo, NL |
| Salzsäure (HCl) | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE |
| Tetramethylethyldiamin (TEMED) | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE |
| Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan (Tris) | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE |
| Tween-20 | GE Healthcare, Buckinghamshire, GB |
| β-Mercaptoethanol | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |

Tabelle 4: verwendete Chemikalien

Tabelle Lösungen

| Lösung | Rezept |
|---|--|
| Blotpuffer | 25 mMolar (M) Tris, 192 mM Glycin, 20 % Volumen/Volumen (v/v) MeOH |
| Kresylviolettfarbelösung | 0,031 mM Kresylviolett , 20 % (v/v) Ethanol |
| Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) | 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, Na ₂ HPO ₄ 10 mM, KH ₂ PO ₄ 1,8 mM |
| Radioimmunoprecipitationassay- (RIPA) Puffer | 1 M Tris pH 7,4 , 1 M NaCl, 0,5 M EDTA, 10 % (v/v) NP-40, 15 % (v/v) Protease-Inhibitor |
| Sammelpuffer | 50 mM Tris 4 % (v/v) SDS, pH 6,8 |
| SDS-Ladepuffer | 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 10 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Glycerin, 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 0.1 % (w/v) Bromphenolblau |
| SDS-Laufpuffer | 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0.1 % (w/v) SDS |
| Tris-gepufferte Salzlösung (TBS) | 15 mM NaCl, 5 mM Tris, 0,2 mM HCl, pH 7,4 / + 0,05 % (v/v) |
| TBST | TBS + 0,05 % (v/v) Tween-20 |
| Trenngelpuffer | 150 mM Tris, 4 % (v/v) SDS, pH 8,8 |

Tabelle 5: verwendete Lösungen

Tabelle Antikörper

| Target | Spezies | Verdünnung | AK | Hersteller |
|-----------------------|-----------|------------|------------------------------|---|
| αII-Spectrin | Maus | 1:500 | BML-FG6090 | Enzo Life Science, Farmingdale, USA |
| GAPDH | Maus | 1:1000 | ACR001PS | Acris Antibodies Inc., San Diego, USA |
| Kaninchen Fc-Fragment | Ziege | 1:15000 | IRDye 800CW (Anti-Kaninchen) | Li-Cor Bioscience GmbH, Bad Homburg, DE |
| Maus Fc-Fragment | Ziege | 1:10000 | IRDye 680RD (Anti-Maus) | Li-Cor Bioscience GmbH, Bad Homburg, DE |
| Maus Fc-Fragment | Ziege | 1:15000 | IRDye 800CW (Anti-Maus) | Li-Cor Bioscience GmbH, Bad Homburg, DE |
| P75NTR | Kaninchen | 1:500 | Ab38335 | Abcam, Cambridge, UK |

Tabelle 6: verwendete Antikörper

Tabelle PCR

| Target | Sequenz | Analysekits |
|-----------------------------------|---|-------------------------------|
| Gabrb3 | 5'-GTTTCAGCTTCCATTCTCACTG-3' 3'-GAGGTGGTCTTTCCGGTATCG-5' | MyTaq™ Extract-PCR Kit |
| Arg-1 | 5'-CTCCAAGCCAAAGTCCTTAGAG-3' 3'-AGGAGCTGTCATTAGGGACATC-5' | Absolute Blue qPCR Sybrgreen |
| BDNF | 5'-ACTTGGCCTACCCAGTG-3' 3'-GTTGGGCCGAACCTTCT-5' | DyNAmo™ ColorFlash Prope qPCR |
| IL-1β | 5'-GTGCTGTCGGACCCATATGAG-3' 3'-CAGGAAGACAGGCTTGTGCTC-5' | Maxima Probe qPCR Master Mix |
| IL-6 | 5'-TCGTGGAATGAGAAAAGAGTTG-3' 3'-TATGCTTAGGCATAACGCACTAG-5' | LightCycler® 480 Probes |
| iNOS | 5'-TGTGTCAGCCCTCAGAGTAC-3' 3'-CACTGACACTYCGCACAA-5' | Absolute Blue qPCR Sybrgreen |
| P75NTR | 5'-GGGGTGGGCTCAGGACT-3' 3'-TATGAGGTCTCGCTCTGGAGGT-5' | LightCycler® 480 Probes |
| Peptidylprolyl Isomerase A (PPIA) | 5'-GCGTCTSCCTTCGAGCTGTT-3' 3'-RAAGTCACCACCCTGGCA-5' | Absolute Blue qPCR Sybrgreen |
| TNF-α | 5'-TCTCATCAGTTCTATGGCCC-3' 3'-GGGAGTAGACAAGGTACAAC-5' | Absolute Blue qPCR Sybrgreen |

Tabelle 7: verwendete Primer und Analysekits

Tabelle Verbrauchsmaterialien und Geräte

| Materialien und Geräte | Hersteller |
|--|---|
| 96-Well Platte | Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, DE |
| 96-Well Platte | Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, DE |
| Blotkammer Mini Trans Blot System | BioRad, Hercules, USA |
| Chirurgisches Nahtmaterial Prolene 6-0 | Ethicon, San Lorenzo, USA |
| Deckgläser 24 x 60 mm (Milimeter) | Waldemar Knittel Glasbearbeitungs GmbH, Braunschweig, DE |
| Detektionssystem GloMax [®] -Multi+ Detection System | Promega, Mannheim, DE |
| Einbettmedium NEG 50 [™] | Richard Allan Scientific, Thermo Scientific, Dreieich, DE |
| Einstreu Lignocel [®] FS 14 | J.Rettenmaier & Söhne GmbH&Co. KG, Rosenberg, DE |
| Einwegkanüle Sterican [®] 19G , 26 G | B.Braun Melsungen AG, Melsungen, DE |
| Einwegpipetten Cellstar [®] 25 ml (Mili-/Liter), 10 ml, 5ml | Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, DE |
| Einwegspritze Discardit [™] II BD | B.Braun Melsungen AG, Melsungen, DE |
| Einwegspritze Injekt [®] -F | B.Braun Melsungen AG, Melsungen, DE |
| Elektrophoresekammer Mini Protean Elektrophoresis | BioRad, Hercules, USA |
| Faltenfilter | Macherey-Nagel, Düren, DE |
| Filterpapier | Schleicher & Schuell Bioscience GmbH, Dassel, DE |
| Filtertopkäftig Typ-II lang | Bioscience GmbH, Castrop-Rauxel, DE |
| Fluoreszenz-Detektionssystem Odyssey [®] | Li-Cor Biosciences, Bad Homburg, DE |
| Gelanalysator QIAxcel Advanced System | Qiagen N.V., Venlo, NL |
| Heizblock Thermomixer comfort | Eppendorf, Hamburg, DE |
| Homogenisator Mastermill MM 300 | Retsch Technology GmbH, Haan, DE |
| Inkubator IC 8000 | Drägerwerk AG Lübeck, DE |
| Klingen Apollo | Herkenrath GmbH & Co. KG, Solingen, DE |
| Kryo-Boxen | Ratiolab GmbH, Dreieich, DE |
| Kryotom CryoStar Microm HM 560 | Thermo Scientific, Walldorf, DE |
| Kryotom CryoStar Microm NX 70 | Thermo Scientific, Walldorf, DE |
| Magnetrührer Ikamag [®] Ret | Janke und Kunkel, Staufen, DE |
| Mikrobohrer Uni-Drive N Komplettgerät | Paggen, Starnberg, DE |

| | |
|---|---|
| Mikropipetten Research, Research Plus, Reference | Eppendorf, Hamburg, DE |
| Mikropipettenspitzen 1000 µ (Mikro-), 200 µl, 10 µl | Sarstedt, Nürnberg, DE |
| Mikropipettenspitzen Safe Seal SurPhop 1000 µl, 300 µl, 10 µl | Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, DE |
| Mikropipettenspitzen Tip One 1000 µl, 200 µl, 10 µl | Starlab International GmbH, Hamburg, DE |
| Mikroskopkamera AxioCam 105 color | Karl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, DE |
| Narkosegasvapor 19.3 | Drägermedizintechnik GmbH, Lübeck, DE |
| Nitrozellulosemembran | Thermo Fisher Scientific, Walldorf, DE |
| Objektträger Superfrost® plus | Thermo Scientific, Braunschweig, DE |
| Objektträgerkasten | VWR, Darmstadt, DE |
| Ohrlochzange | Zoonlab, Castrop-Rauxel, DE |
| Operationsmikroskop Technoskop OPMI 11 | Karl Zeiss Meditec AG, Jena, DE |
| Papierhandtücher grün, 1-lagig | Schuch Laborhandel und Klinikbedarf, Langgöns, DE |
| pH-Meter CG 832 | Schott, Mainz, DE |
| Photometer NanoVue™ | GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK |
| quantitative RT-PCR (real-time- Polymerase-kettenreaktion) LightCycler® 480 | Roche Diagnostics, Mannheim, DE |
| Reaktionsgefäße Falcon® 50 ml; 15 ml | Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, DE |
| Reaktionsgefäße Safe-Lock (2,0; 1,5; 0,5 ml) | Eppendorf, Hamburg, DE |
| Restrainer, Tube Type Holder | Harvard Apparatus, Holliston, USA |
| Rota-Rod RS232/LE8200 | Hugo Sachs, March Hugstetten, DE |
| Saugtupfer Sugi® Sponge Points | Kettenbach, Eschenburg, DE |
| Schmalbandklinge Feather® Microtome Blade C35 | Feather Safety Razor Co., Osaka, J |
| Schnittstreckerplättchen Microm | Thermo Fisher Scientific, Walldorf, DE |
| Stereomikroskop Stemi 305 | Karl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, DE |
| Stereotaxierahmen | Kopf Instruments, Tujunga, USA |
| Stromversorgung Power Pac™ 300 | BioRad, Hercules, USA |
| Stromversorgung Power Pac™ HC | BioRad, Hercules, USA |
| Taumler Unimax 2010 | Heidolph, Schwabach, DE |
| Tiefkühlschrank -20 °C UPUL 540 | Liebherr, Ochsenhausen, DE |

| | |
|--|------------------------------------|
| Tiefkühlschrank -20 Grad Celsius (°C) Liebherr GG 5210 ProfiLine | Liebherr, Ochsenhausen, DE |
| Tiefkühlschrank -80 °C MDF-U74V | Sanyo Electric Co.,Osaka ,J |
| Tierfutter Maus Zucht Extrudat | ssniff Spezialdiät GmbH, Soest, DE |
| Tierhaltungsschrank UniProtect THF 3378-VO2 | Bioscape, Castrop-Rauxel, DE |
| Traumamaschine Leica stereotactic impactor 39463920 | Leica Microsystems, Wetzlar, DE |
| Vortex Reax control | Heidolph, Schwabach, DE |
| Waagen Sartorius labratory | Sartorius, Göttingen, DE |
| Waagen Sartorius research | Sartorius, Göttingen, DE |
| Wärmeplatte TCAT-2DF Controller | Physitemp, New Jersey, USA |
| Zentrifuge Centrifuge 5804 R | Eppendorf, Hamburg, DE |
| Zentrifuge Heraeus Pico 17 | Thermo Scientific, Walldorf, DE |
| Zentrifuge Megafuge 1.0 | Thermo Scientific, Walldorf, DE |
| Zentrifuge Micro Star 17 R | VWR, Darmstadt, DE |

Tabelle 8: verwendete Materialien und Geräte

3.1. Versuchsbeschreibung

Alle Versuche wurden durch das Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz genehmigt (TVA G12-1-010). Ziel der Studie war den Einfluss einer verzögerten Propofolgabe auf den sekundären Hirnschaden zu ermitteln und in diesem Zusammenhang den Einfluss einer genetischen Hemmung der Propofoltransmission durch die Mutation der Propofolbindungsstelle an der $\beta 3$ -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors.

Die primäre Zielgröße war das histologisch ermittelte Läsionsvolumen 72 h nach SHT. Als sekundäre Zielgrößen wurden die neurologische Funktion der Tiere, die BHS-Integrität, Inflammations-, Apoptosemarker und der p75NTR-Signalweg festgelegt.

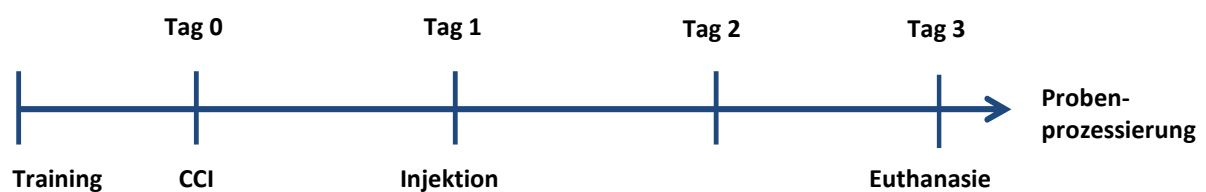


Abbildung 2: Zeitstrahl Versuchsaufbau

Die Tiere wurden präoperativ auf dem Rotarod trainiert um die motorische Übung zu erlernen und verlässliche Ergebnisse zu erzeugen.

Am Tag der Operation wurde den Tieren in Allgemeinanästhesie ein CCI appliziert (s. Abschnitt 3.4.) und die Tiere wurden postoperativ im Inkubator überwacht. Der Applikationszeitpunkt des Propofols bzw. der Kontrollsubstanz Lipofundin wurde auf 24 h postoperativ festgelegt. Hierfür wurden die Tiere in einen Restraîner überführt und es erfolgte eine Schwanzvenenpunktion mit intravenöser Applikation der Substanzen. Bis zum Erwachen wurden die Tiere im Inkubator beobachtet und danach in den Tierschrank überführt (siehe Abbildung 2). Nach 72 h wurden die Tiere euthanasiert und die Gehirne zur Aufarbeitung entnommen.

Die Durchführung des CCI und die Applikation der Medikamente sowie die motorischen Tests erfolgten durch geschulte Labormitarbeiter, um eine Verblindung der Doktorandin für die entsprechenden Interventionen zu erreichen.

| Gruppe | CCI | Genetik | Pharmakon | Gruppengröße |
|--------|------|------------------------------------|----------------------------|--------------|
| 1 | Nein | Wildtyp | | 6 |
| 2 | Ja | Wildtyp | Lipofundin 10% | 9 |
| 3 | Ja | Wildtyp | Propofol in Lipofundin 10% | 9 |
| 4 | Nein | 129Sv-GABA-B3 ^{tm(N265M)} | | 5 |
| 5 | Ja | 129Sv-GABA-B3 ^{tm(N265M)} | Lipofundin 10% | 10 |
| 6 | Ja | 129Sv-GABA-B3 ^{tm(N265M)} | Propofol in Lipofundin 10% | 10 |

Tabelle 9: Studiendesign

3.2. Tiere und Mutationsbeschreibung

Für die Studie wurden 52 männliche und weibliche Mäuse mit einem Gewicht von 17,2 g bis 30,7 g homogen in die Gruppen verteilt und verwendet.

Die Tiere werden in unserem Labor standardmäßig in Typ2 Filtertop-Käfigen gehalten, die mit Holzspänen eingestreut sind. Alle Tiere erhalten Futter und Wasser *ad libitum*. Zusätzlich erhalten alle Tiere Zellstofftücher und Plastikrohre zum Nestbau. Nach den Vorgaben der GV-SOLAS werden alle Tiere in einem Tierhaltungsschrank gehalten. Während der Versuchsphase werden die Tiere nicht wie üblich in Gruppenhaltung, sondern in Einzelhaltung gehalten, um Manipulationen an der Operationswunde zu vermeiden. Zusätzlich bekommen die Tiere während der Versuchsphase Nassfutter angeboten. Die Tiere werden täglich gewogen und auf Verhaltensauffälligkeiten, insbesondere auf Schmerzsymptomatik kontrolliert. Bei Auffälligkeiten, wie z.B. einem Gewichtsverlust größer 15 % findet eine tierärztliche Vorstellung statt und eine Entscheidung über den Ausschluss aus der Studie.

Eine genetische Hemmung wurde erzielt, indem Tiere verwendet wurden, deren Propofolbindungsstelle am GABA_A-Rezeptor mutiert ist. Hierfür wurden Tiere mit der Bezeichnung 129Sv-GABA-B3^{tm(N265M)} genutzt. Die Erstbeschreibung und Mutation erfolgte durch Jurd und Arras et al. und kann dort im Detail nachvollzogen werden. Zusammengefasst wurde die Aminosäure 265 des Exons 8 der β3-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors durch die Aminosäure Methionin im Sinne einer Punktmutation ersetzt und eine Neomycinresistenz-Kassette zur Selektion der korrekt mutierten Zellen eingefügt. Der so entstandene Vektor wurde mittels Elektroporation in embryonale Stammzellen einer 129/Sv-Linie übertragen. Diese Stammzellen wurden dann selektioniert und in Blastozysten injiziert. Die Mäuse, die das korrekt mutierte Exon trugen, konnten mit Ella-cre Mäusen verpaart werden, um die mit loxP-Stellen flankierte Neomycinresistenz-Kassette wieder zu

eliminieren. Die schlussendlich entstandenen heterozygoten F2-Mäuse wurden dann verpaart, um homozygot mutierte Tiere, sowie deren Wildtyp-Brutgeschwister, zu erzeugen. Insbesondere wurde bei diesen Mäusen untersucht, dass die anderen Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors qualitativ und quantitativ ähnlich zu Wildtyp-Mäusen ausgeprägt werden. Mit dieser Mutation kann eine Propofolbindung in klinisch relevanter Form, gezeigt an dem Aufstehreflex der Tiere nach einer Propofolapplikation, nicht mehr stattfinden (107).

Wie beschrieben handelt es sich hierbei nur um eine Punktmutation. Aufgrund der Tatsache, dass die Bindungsstelle des Propofols aber eliminiert wird, wird im weiteren Teil der Arbeit für diese Mutation der Begriff *knock-out* (KO) verwendet. Als Kontrollen dienten die entsprechenden Wildtyp-Brutgeschwister.

3.2.1. Genotypisierung

Um den Genotyp der Tiere zu identifizieren, werden die Ohrlochstanzen verwendet, die zur Markierung der Tiere nach der Geburt durchgeführt werden. Zusätzlich wird nach Euthanasie eine Schwanzspitzenprobe entnommen, die einer zweiten Genotypisierung dient, um eine Verwechslung während des Experiments auszuschließen. Die entsprechenden Gewebeproben werden mit dem MyTaq™ Extract-PCR Kit von Bioline nach Herstellerangaben aufgereinigt und so die gDNA extrahiert, die dann sofort verwendet wird, um sie mittels PCR zu amplifizieren (s. Kapitel 3.10.3.). Hierfür werden pro 3 µl Gewebeextrakt 10 µl Mastermix des Kits, je 0,5 µl der beiden Primer (siehe Tabelle 7) und 7 µl destilliertes Wasser eingesetzt. Es werden 40 PCR-Zyklen mit einer Schmelztemperatur von 95 °C, einer Hybridisierungstemperatur von 60 °C und einer Elongationstemperatur von 72 °C durchgeführt. Die entsprechenden Produkte können nun im QIAxcel Advanced Gelanalysator automatisiert analysiert werden. Dabei werden die DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe per Gelelektrophorese aufgetrennt und gleichzeitig mit einem Interkalator angefärbt und detektiert. Anhand der Ergebnisse kann dann die Genotypisierung durchgeführt werden. Hierbei stehen Produkte mit einer Größe von 308 Basenpaaren (bp) für das Wildtyp-Allel, wohingegen eine Länge von 370 bp der Mutation entspricht. Da jedes Tier zwei Allele des infrage kommenden Gens besitzt, können demnach drei Genotypen unterschieden werden. Hierbei handelt es sich um homozygote Wildtypiere, die durch eine einzige Bande mit der Größe 308 bp definiert sind, homozygote Mutationsträger, die durch eine Bande mit der Größe 370 bp auffallen, und heterozygote Tiere, die zwei Banden bei 308 und 370 bp zeigen.

3.3. Schädel-Hirn-Trauma-Modell

Für die vorliegende Arbeit wurde das Modell des CCI gewählt, da es ein gut etabliertes und reproduzierbares Verfahren ist, welches ein lokal destruktives Trauma setzt. Zu Beginn werden die Versuchstiere zunächst gewogen. Die Einleitung der Narkose erfolgt dann mit der Zufuhr von einem Gasgemisch aus 4 % Isofluran, 0,5 l Sauerstoff und 0,5 l Raumluft für 1 min über einen Latexfingerling als Gesichtsmaske. Daraufhin werden die Versuchstiere mit den Vorderzähnen in einen Stereotaxierahmen eingespannt, um sie für die folgende Operation zu fixieren. Zum Schutz vor Schädigungen werden die Augen mit Bepanthen-Augensalbe bedeckt und zur kontinuierlichen Temperaturüberwachung und –aufrechterhaltung wird den Tieren eine rektale Temperatursonde eingeführt, die mit einer Wärmeplatte unter dem Tier rückgekoppelt ist. Das Fell wird über dem Operationsfeld mit Kochsalzlösung befeuchtet, um eine bessere Erreichbarkeit der Haut zu gewährleisten. Die Narkosetiefe wird mithilfe des Zwischenzehenreflexes überprüft; hierbei wird mit einer Pinzette ein Schmerzreiz in den Hinterlauf des Tieres gesetzt und bei fehlender Reaktion wird die Narkosetiefe als ausreichend beurteilt. Die Atmung sollte trotz Narkose erhalten bleiben und wird ebenfalls vor Beginn der Operation getestet und beurteilt. Für die Operation wird die Narkose aufrechterhalten mit 2,5 % Isofluran und 40 Volumen- % Sauerstoffzufuhr.

Es erfolgt ein mediansagittaler Hautschnitt über der Schädelkalotte von der *Sutura coronaria* bis zur *Sutura lambdoidea*. Die Haut wird nach lateral verlegt und der Kopf in Kieferfixierungen eingespannt. Mithilfe von Wattestäbchen wird das Periost stumpf abpräpariert. Der darunterliegende Knochen wird mit einer Knochenfräse auf der rechten Seite von der *Sutura sagittalis* entlang der *Sutura coronaria* bis zum *Musculus temporalis* und dann nach kaudal und zur *Sutura sagittalis* zurück eröffnet. Dies ergibt ein Knochenfenster von circa 7x7 mm, bei dem allerdings eine dünne Knochenlamelle auf dem darunterliegenden Hirngewebe bestehen bleiben sollte, um Gewebe mit der Knochenfräse nicht zu verletzen. Dieses Knochenfenster wird mit einer Pinzette nach medial aufgeklappt und der CCI-Impaktor auf dem parietalen Kortex so aufgesetzt, dass das Gewebe nicht beschädigt wird, der Impaktorstempel aber komplett aufliegt. Der Durchmesser des Stempels beträgt 3 Millimeter (mm), was einer ungefähren Fläche von 7 mm² entspricht. Die Eindringtiefe wird mit 1,5 mm festgelegt und die Geschwindigkeit des Aufpralls mit 6 m/s bei einer Verweildauer von 150 ms bestimmt.

Nach der Applikation des Schadens erfolgt die Blutstillung, sowie ein sofortiger Verschluss des Knochenfensters durch Zurückklappen in seine ursprüngliche Position und Fixierung mit Histoacrylkleber, um eine Verfälschung der Ergebnisse durch eine Druckentlastung des Gewebes wie bei einer Kraniektomie zu vermeiden. Zur Bestimmung der perikraniellen Temperatur wird eine

Temperatursonde rechts lateral an der Kalotte entlang in den *Musculus temporalis* eingeführt und nach der Messung wieder entfernt. Der Verschluss der Haut erfolgt mit Einzelknopfnähten.

Nach Ausspannen der Tiere aus dem Stereotaxierahmen werden diese in einen auf 35 (°C) vorgeheiztem Inkubator verbracht und 1,5 h lang überwacht und gewärmt.

3.4. Intervention

24 h nach der CCI-Applikation werden die Tiere der CCI Gruppen in die Propofol- oder in die Lipofundingruppen randomisiert. Sie erhalten durch einen verblindeten Experimentator entweder eine gewichtsadaptierte intravenöse Injektion von 10 Milligramm (mg) /Kilogramm (kg) Körpergewicht (KG) Propofol oder das äquivalente Volumen der Trägerlösung Lipofundin 20 %. Propofol 1 % wird im Verhältnis 1:1 mit Lipofundin 20 % verdünnt, um eine Konzentration von 5 mg/ml zu erhalten. Dann können pro 10 g Körpergewicht 20 µl Volumen injiziert werden.

Die Tiere werden dafür unter einer Wärmelampe gewärmt, damit die Schwanzvenen aufgrund der wärmebedingten Vasodilatation besser sichtbar werden. Sie werden dann in einen Restrainer überführt und nach der Schwanzveneninjektion bis zum Erwachen in einem 35 °C warmen Inkubator überwacht.

3.5. Motorfunktionsanalysen

Die motorischen Funktionen werden von einem komplexen Netzwerk unterschiedlicher Hirnareale gesteuert, bei dem unter anderem Kortex, subkortikale Kerne, Kleinhirn und Hirnstamm sowie deren verschaltende Bahnen beteiligt sind. Durch Verletzungen einer oder mehrerer dieser Strukturen entstehen nach SHT motorische Defizite. (21) Beim CCI handelt es sich um ein lokal destruktives SHT-Modell, bei dem vor allem der rechte Parietal- und Temporallappen betroffen ist. Um die Auswirkungen des zugefügten Schadens quantifizieren zu können, bedient man sich verschiedener Testsysteme, die die neuromotorischen Funktionen abbilden und Veränderungen aufzeigen können. Dabei wird vor Operationsbeginn zunächst ein Basiswert erstellt, damit die individuellen Unterschiede in der Leistungsfähigkeit einzelner Tierstämme berücksichtigt werden können (74).

3.5.1. Neurologic Severity Score

Der Neurologic Severity Score (NSS) ist ein Leistungstest, bei dem die neuromotorischen Fähigkeiten untersucht und nach einem Scoringsystem bewertet werden. Ursprünglich wurde der Test zur Bewertung des geschlossenen SHT der Ratte beim Fluid-Perkussion-Modell entwickelt und für die Anwendung an Mäusen modifiziert (195, 196). In 6 Aufgaben werden Koordination, allgemeines

Verhalten, Motorik und Gleichgewicht beobachtet, und je nach Defizit können insgesamt maximal 16 Punkte vergeben werden.

1. Verlassen des Kreises

Das Versuchstier wird in die Mitte eines Kreises gesetzt, der im Durchmesser 24cm misst. Die Zeit, die das Tier benötigt, um die Grenze des Kreises mit beiden Vorderpfoten zu verlassen, ist maßgeblich für die Punktevergabe:

- < 30 s: 0 Punkte
- 31 – 60 s: 1 Punkt
- 61 – 120 s: 2 Punkte
- > 121 s: 3 Punkte

2. Reflexe

Über dem Versuchstier wird mit den Händen zusammen geklatscht. Dabei wird die Schreckreaktion, meist bestehend aus einem Zusammenzucken, wie folgt bewertet:

- Schreckreaktion vorhanden: 0 Punkte
- Schreckreaktion abwesend: 1 Punkt

3. Allgemeines Verhalten

Das allgemeine Verhalten des Versuchstieres wird durch Defizite bei Erkundungsverhalten und Geradeauslaufen bewertet.

- Erkundungsverhalten vorhanden: 0 Punkte
- Erkundungsverhalten abwesend: 1 Punkt
- Geradeauslaufen normal: 0 Punkte
- Geradeauslaufen defizitär: 1 Punkt

4. Koordination

Die Koordination des Versuchstieres wird mithilfe von Holzbalken definierter Breite getestet. Dabei bleibt die Länge mit 50 cm gleich, die Breite wird zum Erhöhen des Schwierigkeitsgrades jedoch verringert. Die Maße betragen dabei 30 mm, 20 mm und 10 mm. Dabei wird bewertet, wie das Tier in der Lage ist, den Balken zu überqueren:

- ohne Defizit: 0 Punkte
- ≥ 1 Fehltritt: 1 Punkt
- Herunterfallen/Reglosigkeit: 2 Punkte

5. Gleichgewicht

Das Versuchstier wird zuerst auf einen viereckigen, dann auf einen runden Holzstab von 0,5cm Breite gesetzt. Es wird für beide Formen jeweils beurteilt, ob das Tier sich mit allen 4 Pfoten mindestens 10 s an dem Stab festhalten kann:

- Festhalten mit 4 Pfoten über 10 s möglich: 0 Punkte
- Festhalten mit 4 Pfoten über 10 s nicht möglich: 1 Punkt

6. Motorische Defizite

Die Beweglichkeit der Gliedmaßen des Versuchstieres wird beurteilt und bewertet. Da beim CCI der Schaden auf dem rechtsparietalen Kortex gesetzt wird, sind motorische Defizite linksseitig zu erwarten. Dabei werden paretische Ausfälle bewertet:

- Keine Paresen: 0 Punkte
- Parese einer Pfote: 1 Punkt
- Hemiparese: 2 Punkte

3.5.2. Rotarod

Der Rotarod-Test ist ein standardisiertes System für Mäuse und Ratten, mit dessen Hilfe vestibulomotorische Defizite evaluiert werden können. Ursprünglich wurde er entwickelt, um die motorischen Auswirkungen verschiedener Medikamente zu ermitteln, bevor er auch für das SHT-Modell weiterentwickelt wurde. Mit dem Rotarod-Test lassen sich funktionelle motorische Defizite gegenüber anderen etablierten Tests, wie dem Beam-Balance-Test oder dem Beam-Walking-Test, länger und genauer beurteilen. Er ist am effizientesten an Tag 1-5 nach dem Schaden einsetzbar (197, 198).

Das System besteht für Mäuse aus einem festen rotierenden Kunststoffzylinder mit einem Durchmesser von 3 cm, auf den das Versuchstier platziert wird. Da es seitlich durch Plasticscheiben begrenzt wird, muss das Tier gegen die Rotation vorwärts laufen, während das System linear von 4 Umdrehungen pro Minute (rpm, engl. *rounds per minute*) auf eine Geschwindigkeit von maximal 40 rpm innerhalb von 5 min beschleunigt. Unter diesem Kunststoffzylinder befindet sich ein Hebel, bei dessen Berührung die Rotation und Zeit automatisch gestoppt werden. Fällt das Tier von der zylindrischen Lauffläche, führt dies zur Auslösung des Hebels, die Zeit wird angehalten und der Test ist beendet.

Der Rotarod-Test unterliegt Veränderungen durch Lernprozesse der Versuchstiere. Daher müssen die sie vor den eigentlichen Untersuchungen in verschiedenen Übungsdurchläufen trainiert werden. Damit die Tiere den Ablauf kennenlernen können und es keine lernbedingten Verfälschungen gibt, werden am Tag vor der Operation insgesamt 4 Testdurchläufe durchgeführt. Präoperativ werden am

Tag der Operation in zwei Testdurchläufen die Werte ermittelt, um schließlich an Tag 1 und Tag 3 in ebenfalls je zwei Durchläufen das funktionelle Outcome der Versuchstiere erfassen zu können.

3.6. Euthanasie und Hirnentnahme

Nach 72 h werden die Versuchstiere zur Gehirnentnahme euthanasiert. Dazu wird eine Narkose mit 4 % Isofluran und 1 l Raumluft eingeleitet und die Tiere werden mittels Dekapitation getötet. Zur Hirnentnahme wird ein mediansagittaler Hautschnitt über der Schädelkalotte gesetzt und diese dann frei präpariert. Mit einer Schere wird die Kalotte aufgebrochen und die *Dura Mater* sorgfältig durchtrennt, insbesondere im Bereich des *Sinus sagittalis* und des *Tentorium cerebelli*, da diese Strukturen durch ihre Lage das Gehirn bei Entnahme beschädigen können. Nach dieser Präparation kann das Gehirn vorsichtig mit einem stumpfen Spatel heraus gehoben werden. Zum zügigen Durchfrieren wird das Gehirn zunächst auf Trockeneis verbracht und dann bei -30 °C gelagert.

3.7. Kryoprozessierung und Färbungen

3.7.1. Kryoschnitte

Zunächst werden die gefrorenen Gehirne in dem Einbettmedium NEG50 im rechten Winkel zur Klinge des Kryostats fixiert und dann vollständig und luftblasenfrei umhüllt, um sie so schneiden zu können. Nachdem das Medium komplett durchgefroren ist, wird nach dem laboreigenen Schnittprotokoll vorgegangen. Dabei werden zwei Mal 5 Objektträgersets bereit gelegt und beschriftet. Die erste Reihe (A) enthält die Schnittebenen 1-10, die zweite (B) die Ebenen 11-16. Zunächst wird das Präparat zum Schneiden der Trimschnitte in die Halterung eingespannt. Diese werden bis Bregma +3,1 mm geschnitten, und die dort befindliche Ebene als Ebene 1 definiert (entspricht 0 µm). Von dort aus werden alle 500 µm insgesamt auf 16 Ebenen 5 Schnitte mit einer Dicke von 10 µm angefertigt. Ab Ebene 6 (bei 2500 µm) bis Ebene 13 (bei 6000 µm) werden zudem je 4 Trimschnitte mit einer Schnittdicke von 60 µm entnommen. Dabei werden die Ebenen 2500 µm, 3500 µm, 4500 µm und 5500 µm der Reihe A zugeordnet für die RNA-Extraktion und die Ebenen 3000 µm, 4000 µm, 5000 µm und 6000 µm der Reihe B für die Protein-Analytik. Die Trimschnitte einer Ebene werden in gleicher Ausrichtung sorgfältig aufeinander gestapelt und das ventrale Drittel mit einer Klinge abgetrennt und verworfen. Der übriggebliebene dorsale Anteil wird in der Mitte zwischen der linken und rechten Hemisphäre durchgeschnitten und jede Seite jeweils in ein Kryoröhrchen gegeben. Diese werden dann bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C eingelagert.

3.7.2. Färbungen

Zum Färben des Hirnnervengewebes und nachfolgender Schadensvolumenbestimmung verwendet man die sogenannte Nissl-Färbung, die mit Hilfe von Kresylviolett durchgeführt wird. Dabei bindet das basische Kresylviolett an die negativ geladenen Anteile von DNA und RNA und macht so Zellkerne und endoplasmatisches Retikulum (in Form der „Nissl-Schollen“) sichtbar. (199)

Zur Herstellung werden 5 g Kresylviolett mit 100 ml 100 %igem Ethanol vermischt und bei 50 °C für 30 min mit dem Magnetrührer aufgelöst. Die entstandene Lösung wird mit destilliertem Wasser auf 500 ml Gesamtvolumen aufgefüllt und anschließend filtriert, um feste Rückstände zu entfernen. Die zu färbenden Schnitte werden nach einer 30 minütigen Trocknungszeit bei Raumluft zunächst für 2 min in 70 %iges Ethanol getaucht, gefolgt von einem Tauchbad in der Kresylviolett-Lösung für 10 min. Danach werden sie zwei Mal in destilliertem Wasser gewaschen, um überschüssige Färbelösung zu entfernen und dann zuerst in 70 %igem, dann in 96 %igem Ethanol zur Entwässerung jeweils zwei Mal kurz eingetaucht. Fixiert wird die Farbe durch Roti®-Histol ebenfalls in einem Tauchbad, einmal für 5 min und einmal für 2 min. Die fertig gefärbten Schnitte können dann mit Roti®-Histokitt konserviert und mit einem Deckglas abgedeckt werden.

3.8. Volumetrie

Zur Vermessung werden die gefärbten und konservierten Schnitte mit der Mikroskopiekamera aufgenommen und mit Hilfe der ZEN®-Software ausgemessen. Das gesunde Gewebe ist dabei erkennbar als eingefärbt, da es die Färbung mit Kresylviolett angenommen hat, während sich das Schadensareal als ungefärbt darstellt. Zunächst werden die Gesamtflächen beider Hemisphären sowie die Fläche des gesunden Anteils der rechten Hemisphäre ermittelt. Die Fläche des Schadensareals (A) wird dann aus diesen Werten errechnet, indem von der Gesamtfläche beider Hemisphären die Fläche des gesunden Anteils der rechten Hemisphäre abgezogen wird. Das Schadensvolumen (V) wird dann aus den Schadensarealen der Ebenen 1-16 errechnet, die man mit dem Abstand der Ebenen zueinander (500 µm) multipliziert.

Dies entspricht folgender Formel: $V = \sum_1^{16} A \times 500 \mu m$

3.9. Protein-Analytik

3.9.1. Proteinextraktion

Für die Proteinextraktion werden Eppendorfer Reaktionsgefäße nach Beschriftung tariert und mit den während des Schneidprozesses gewonnenen Gewebeproben der ipsi- und kontralateralen Kortexquadranten befüllt und gewogen, um dann eine gewichtsadaptierte Lyse mit 5 µl RIPA-Puffer pro µg Protein durchzuführen. Zudem werden Protease- und Phosphataseinhibitoren hinzugefügt, um einer sekundären Degradation entgegenzuwirken. Die Proben werden zunächst gut durchmischt und dann 30 min auf Eis inkubiert. Währenddessen werden sie alle 10 min durchmischt. Die Reaktionsgefäße werden nun gleichmäßig in die Zentrifuge eingeordnet und 20 min bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand mit den darin gelösten Proteinen kann nun in neue Eppendorfer Reaktionsgefäße abpipettiert werden.

3.9.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wird die photometrische Proteinbestimmung nach Lowry verwendet. Dazu werden jeweils 2 µl der Proteinproben mit 18 µl destilliertem Wasser in Reaktionsgefäße pipettiert und homogenisiert. Für die Konzentrationsreihe wird eine 96 Well-Platte verwendet und jeweils 5 µl der verdünnten Proteinproben sowie 5 µl einer Standardreihe Proteine mit definiertem Proteingehalt pipettiert. Dazu wird jeweils 25 µl einer vorher angefertigten Lösung Reagent A und Reagent S gegeben, die im Verhältnis 50:1 gemischt wurden, sowie 200 µl Reagent B. Die Proteinproben können dann entsprechend der ermittelten Werte auf eine einheitliche Proteinkonzentration verdünnt werden.

3.9.3. IgG-Dotblot

Für den IgG-Dotblot werden die Proben auf eine gleiche Proteinkonzentration von 2,5 µg/µ mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) eingestellt. Hierzu werden die gewonnenen Proteinproben entsprechend dem vorher in der Proteinanalyse berechneten Pipettierschemas in 0,5 ml Eppendorfer Gefäße pipettiert und mit PBS aufgefüllt, so dass insgesamt 10 µl Volumen in jedem Gefäß enthalten sind. Vor der Entnahme muss jede Probe mit dem Vortexer durchmischt werden. Nach dem Pipettieren und Zusammenführen mit PBS wird ebenfalls gevortext und zentrifugiert. Auf eine Nitrozellulose-Membran werden 2 µl jeder Proteinprobe als Tropfen aufgetragen, was jeweils 5 µg Protein entspricht. Nach einer 90 minütigen Trocknungszeit wird die Membran mit 2,5 %iger Magermilch und TBS für 1 h in den Schüttler gelegt, um sie zu blockieren und danach drei Mal für 5 min mit TBST ausgewaschen. Dem Waschen folgt eine Inkubation mit dem entsprechenden Sekundärantikörper (Ziege-Anti-Maus) in einer Konzentration von 1:15000 in 2 %iger Magermilch mit TBST lichtgeschützt im Schüttler für 1 h bei Raumtemperatur. Danach wird die Membran erneut zwei

Mal für 5 min. mit TBST gewaschen und die Fluoreszenz der Proteinproben im Odyssey Imaging System detektiert.

3.9.4. Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese werden die vorhandenen Proteine entsprechend ihrer Größe aufgeteilt und getrennt. Standard ist hierfür die SDS-PAGE (engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*). Dies ist eine Gelelektrophorese, bei der der Laufpuffer das negativ geladene Tensid Natriumdodecylsulfat (SDS) enthält, das durch Bindung an die Proteine zu einem negativ geladenen Komplex führt, sodass sie ladungsgleich im elektrischen Feld wandern können. Trennmedium ist bei diesem Verfahren ein Gel auf Polyacrylamidbasis, das je nach der zu untersuchenden Proteingröße unterschiedlich dicht vernetzt hergestellt werden kann. (103)

Für die Herstellung der Gele werden zwei abgedichtete Glasplatten mit Abstandshaltern aus Kunststoff so zusammengebaut, dass dazwischen ein Hohlraum entsteht, in den die Gele eingegossen werden. Entsprechend den laborüblichen Rezepten werden je 2 Gele angemischt:

| Trenngel 10% | Sammelgel |
|-----------------------------------|------------------------|
| 8 ml H ₂ O | 5 ml H ₂ O |
| 5 Trenngelpuffer | 2,5 ml Sammelgelpuffer |
| 6,5 ml Acrylamid (Rotiphorese 30) | 2,5 ml Acrylamid |
| 300 µl APS | 150 µl APS |
| 7,5 µl TEMED | 5 µl TEMED |

Tabelle 10: Zusammensetzung Polyacrylamidgele

Nachdem das Trenngel zwischen die Platten gegossen wurde, wird die Oberfläche mit Isopropanol abgedeckt, um die Oberfläche des Gels zu glätten. Sobald dies ausgehärtet ist, kann das Sammelgel darauf gegossen und vor dessen Aushärtung ein 17er Kunststoffkamm eingesteckt werden, der die Vertiefungen für das Einfüllen der Proteinproben bildet.

Entsprechend des Pipettierschemas werden 50 µg Protein mit PBS auf 12 µl Volumen aufgefüllt und mit 4 µl vierfachem Ladungspuffer in 1,5 ml Eppendorfer Gefäße pipettiert. Dies wird für 5 min bei 95 °C erhitzt, um die Proteine thermisch zu denaturieren. Durch das im Ladungspuffer enthaltene β-Mercaptoethanol werden zudem die Disulfidbrücken in den Proteinen gelöst, was sie schließlich in ihre Primärstruktur überführt.

Die Gele werden dann für die eigentliche Elektrophorese in eine Elektrophoresekammer eingespannt, die mit 0,1 %igem SDS-Laufpuffer befüllt wird. Nach Entfernung der Käme werden die Proteinproben in die entstandenen Taschen pipettiert. In eine der Taschen wird ein Prestained Marker gegeben, der als Proteingemisch mit definierter Größe den Fortschritt der Auftrennung anzeigt und als Größenvergleich zu den anderen Proteinen dient. Die Elektrophorese wird mit einer

konstanten Stromstärke von 60 Milliampere (mA) für 75 min durchgeführt, bis der Prestained Marker vollständig aufgetrennt ist.

3.9.5. Western Blot

Nachdem die Proteine ihrer Größe nach bei der Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, werden sie beim Western Blot auf eine Trägermembran aus Nitrozellulose übertragen und können darauf dann detektiert und so sichtbar gemacht werden (200).

Dafür werden in einem speziellen Rahmen ein Schwämmchen, zwei Filterpapiere, das Acrylamidgel aus der Elektrophorese, eine Nitrozellulosemembran, zwei Filterpapiere und ein Schwämmchen sorgfältig und ohne Luftblasen aufeinander geschichtet. Die einzelnen Komponenten werden vor dem Schichten zunächst mit Blotpuffer getränkt und nach Überführung des Rahmens in eine Blotkammer mit Blotpuffer aufgegossen. Für den Elektrotransfer wird ein elektrisches Feld mit 380 mA für 90 min an die Kammer angelegt, sodass die negativ geladenen Proteine zur Anode wandern können und vom Gel auf die Membran übertragen werden. Während dieser Zeit wird die Kammer mit einem Kühlpad gekühlt und der Blotpuffer mithilfe eines Magnetrührers gemixt, um die Kühlung gleichmäßig zu gewährleisten. Danach wird die Nitrozellulosemembran entnommen und mit dem Farbstoff Ponceau S eingefärbt, was die Proteinbanden sichtbar macht und als reversible Erfolgskontrolle des Blots dient. Nach dem Auswaschen des Farbstoffs muss die Nitrozellulosemembran als Schutz vor Kontamination gegen unspezifische Proteinbindungen mit Milchprotein geblockt werden. Dies geschieht mit 2,5 %iger Magermilch in TBST für 1 h bei Raumtemperatur, gefolgt von dreimaligem Waschen in TBST für je 5 min, um das nicht gebundene überschüssige Milchprotein wieder zu entfernen. Die Membranen werden bei in einer Primärantikörperlösung über Nacht bei 4 C inkubiert. Nach der Inkubation werden die Membranen erneut drei Mal für je 5 min gewaschen, um Rückstände zu entfernen. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgt dann für 1 h bei Raumtemperatur. Die verwendeten Antikörper und ihre Konzentration sind in Tabelle 6 aufgeführt und werden vor Verwendung in 2,5 %iger Magermilch und TBST gelöst. Die Inkubationsschritte erfolgen jeweils auf dem Schüttler, damit eine gleichmäßige Verteilung gewährleistet wird.

Nachdem die Membranen erneut 2 Mal für je 5 min in TBST ausgewaschen wurden, kann der Fluoreszenzfarbstoff, der an die Sekundärantikörper gekoppelt ist, mithilfe des laborüblichen Detektionsverfahrens (Odyssey®) ermittelt und die Proteinbanden so nachgewiesen werden. Rot wird dabei bei 680 nm gemessen und Grün bei 800 nm. Als Kontrollprotein zur Auswertung wird das in der Expression stabile GAPDH verwendet. Dabei wird computergestützt das Verhältnis aus GAPDH und jeweils dem zu analysierenden Protein gebildet und normalisiert.

3.10. RNA-Analytik

3.10.1. RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion der gesammelten Gewebeproben erfolgt anhand des laborüblichen Protokolls mit dem Phenol-Chloroform-Extraktionsverfahren. Dafür werden 2 ml Eppendorfer Gefäße mit 0,9 ml Quiazol-Reagenz befüllt und das zu extrahierende Gewebe sowie eine Metallkugel hinzugegeben, um dann im MasterMill-Gewebshomogenisator zweimal für je 1 min bei 20 Hertz homogenisiert zu werden. Nach 5 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur werden 100 µl gDNA-Eliminator hinzugegeben, damit die in der Gewebeprobe vorkommende gDNA entfernt wird. Dies wird 15 s mit dem Vortexer vermischt. Danach werden 180 µl Chloroform hinzugefügt, welches gemeinsam mit dem Phenol aus dem Quiazol-Reagenz Proteine löst. Nach Zugabe des Chloroforms wird erneut für 15 s lang durch vortexen durchmischt und 2-3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch 15 minütiges Zentrifugieren bei 4 °C und 12000 \vec{g} werden die Proben in 3 Phasen aufgetrennt: die farblose, wässrige Phase mit der enthaltenen RNA, eine weiße Interphase, die die DNA enthält und eine rote, organische Phase, die lipophil ist und vor allem aus der Phenol-Chloroform-Mischung und Proteinen besteht.

Zur Fällung der RNA wird die wässrige Phase vorsichtig abpipettiert und in neue Eppendorfer Gefäße mit 600 µl Ethanol vermischt. Bis zu 700 µl dieser Proben werden in die vorher beschrifteten Trennsäulen gegeben und bei 8000 \vec{g} 15 s lang zentrifugiert. Dabei bindet die RNA an die Silicamembran der Trennsäulen. Um Verunreinigungen zu entfernen, wird zunächst 700 µl RWT-Puffer und dann mit 500 µl RPE-Puffer in die Trennsäulen pipettiert und dann ebenfalls bei 8000 \vec{g} zentrifugiert. Zum Trocknen der Membran wird zunächst eine weitere Waschung mit 500 µl RPE-Puffer vorgenommen, bei der mit 8000 \vec{g} für 2 min lang zentrifugiert wird und darauf in neuen Sammel tubes bei maximaler Leistung 1 min zentrifugiert, um letzte Reste zu trocknen.

Nach der Trocknung der Membran werden die Spin-Röhrchen in neue Sammel tubes gestellt und 30 µl RNasefreies Wasser genau auf die Membran pipettiert und dies bei 8000 \vec{g} für 1 min zentrifugiert, um die RNA aus den Membranen heraus zu lösen. Aus diesem Eluat wird photometrisch die Konzentration der gewonnenen Gesamt-RNA bestimmt.

3.10.2. cDNA-Synthese

Die komplementäre DNA (cDNA) wird mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase aus der gewonnenen RNA umgeschrieben, um sie später in einer PCR analysieren zu können. Hierzu wird das QuantiTec Reverse Transcription Kit von Quiagen nach Standardprotokoll verwendet.

Grundsätzlich wird dafür auf Eis gearbeitet. Die RNA-Proben werden zunächst aufgetaut und dann den photometrisch bestimmten Konzentrationen entsprechend jeweils 0,5 µg RNA zusammen mit

RNAse freies Wasser in Eppendorfer Gefäße gegeben, bis ein Gesamtvolumen von 12 µl entsteht. In Jede Probe wird jeweils 2 µl gDNA-Eliminationspuffer hinzugefügt und dann 8 min bei 42 °C inkubiert, um eventuelle Verunreinigungen mit gDNA zu eliminieren.

Für die reverse Transkription wird ein Mastermix hergestellt. Dieser besteht aus 1 µl reverse Transkriptase, 4 µl zugehöriger Puffer und 1 µl Primermix. Davon wird jeweils 6 µl zu jeder RNA-Probe hinzugefügt, sodass ein Gesamtvolumen von 20 µl entsteht. Nach Durchmischung der Proben werden sie für 30 min bei 42 °C inkubiert, so dass die reverse Transkription stattfinden kann und sofort wieder auf Eis herunter gekühlt. Zur Inaktivierung des Enzyms reverse Transkriptase werden die Proben danach auf 95 °C erhitzt und für 3 min inkubiert. Nach erneutem Herunterkühlen auf Eis werden alle Proben im Verhältnis 1:1 mit RNAse freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 40 µl verdünnt. So kann die hergestellte cDNA bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert werden.

3.10.3. Quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur *in-vitro* Vervielfältigung einzelner DNA-Sequenzen mithilfe des Enzyms Polymerase. Dies führt zu einer Kettenreaktion, bei der durch exponentielle Vervielfältigung auch schon kleine Mengen DNA nachgewiesen werden können.

Dazu benötigt man:

- den entsprechenden DNA-Strang (Matrize)
- eine thermostabile DNA-Polymerase (z.B. aus dem hitzestabilen Bakterium *Thermophilus aquaticus* isoliert)
- 2 spezifische Primer zur Markierung des 3'- und des 5'-Endes (Sense und Antisense-Primer)
- Desoxyadenosin-, Desoxyguanin-, Desoxycytosin- und Desoxythymidintriphosphat als Edukte für die DNA-Polymerase

Die doppelsträngige DNA wird zunächst auf ca. 95 °C erhitzt und damit denaturiert. Dabei werden die Wasserstoffbrücken zwischen den Einzelsträngen aufgebrochen, sodass sie voneinander getrennt werden. Für das *Annealing* (Primer-Hybridisierung) wird das Reaktionsgemisch auf 58 °C herunter gekühlt, damit die spezifischen Primer an den komplementären DNA-Abschnitt binden können. So wird nur der von den Primern eingefasste Abschnitt der DNA amplifiziert. Die Extension findet durch den Zusatz von DNA-Polymerase und Desoxyribonukleotiden statt, wodurch die beiden Einzelstränge nun zum jeweiligen Doppelstrang komplementiert werden. Dieser Reaktionszyklus aus Denaturierung, Annealing und Extension wiederholt sich danach mehrfach und automatisiert. Dadurch ergibt sich eine exponentielle Zunahme der zu amplifizierenden DNA.

Bei der quantitativen EchtzeitPCR (qRT-PCR) wird in Echtzeit die absolute Menge der amplifizierten DNA gemessen. Dies erfolgt anhand der emittierten Fluoreszenz, die von zugegebenen Fluoreszenzfarbstoffen oder Hybridisierungssonden ausgeht. Im laborüblichen Standardprotokoll wird der Farbstoff SYBR-Green verwendet, der unspezifisch an jede DNA bindet, sowie als Hybridisierungssonden spezifische Oligonukleotide, die nebeneinander spezifisch an eine Zielsequenz binden und bei erfolgreicher Bindung Licht emittieren, welches computergestützt (Light Cycler 480 Software) detektierbar ist. Da die Messung am Ende der Annealing-Phase in jedem Zyklus in Echtzeit stattfindet, kann eine typische sigmoidale Fluoreszenzkurve für jede Probe bestimmt werden. Die Software kann daraus einen Umschlagspunkt ermitteln, der im Vergleich zu einer Standardkurve normalisiert wird. Dadurch kann die Konzentration an amplifizierter DNA quantifiziert werden. Zusätzlich wird jedes untersuchte Target gegen ein Haushaltsgen normalisiert. Im Standardprotokoll wird als Haushaltsgen Peptidylprolyl Isomerase A (PPIA) eingesetzt, da dies kontinuierlich exprimiert wird und auch nach CCI keinen Schwankungen unterliegt.

Für die Durchführung der qRT-PCR mit SYBR-Green-Farbstoff wird ein Mastermix aus 5 µl Master SYBR-Green, jeweils 0,25 µl Sense- und Antisense-Primer und 3,5 µl H₂O hergestellt. Im Falle der Benutzung von Hybridisierungssonden werden 5µl spezifischer Assaymix, jeweils 0,25 µl Sense- und Antisense-Primer, jeweils 0,5 µl benötigte Hybridisierungssonden und 2,5 µl H₂O verwendet.

In jedes Well einer 96-Well Platte werden nun 9 µl Mastermix und 1 µl cDNA pipettiert und dann die Platte mit Klebefolie verschlossen, 2 min bei 1500 rpm zentrifugiert und dann im Light Cycler 480 gemessen. Dabei wird immer eine Duplikatbestimmung jeder Probe durchgeführt und daraus der Mittelwert gebildet.

3.11. Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung und die graphischen Darstellungen wurde die Graphpad Prism Software Version 7.0 verwendet. Die Untersuchung der Daten auf Normalverteilung erfolgte mittels Shapiro-Wilk-Testung. Statistische Ausreißer wurden durch Anwendung des ROUT-Tests mit einem Q-Wert von 1 % ermittelt. Normalverteilte Daten wurden mittels einfaktorierlicher Varianzanalyse (engl. *One Way ANOVA*) analysiert und anschließend mit Hilfe des Tukey-Kramer-Tests korrigiert. Das Signifikanzniveau beträgt $\alpha = 5\%$. Nicht normalverteilte Daten wurden mittels Kruskal-Wallis-Test getestet und korrigiert nach Dunn, ebenfalls zu einem Signifikanzniveau von $\alpha = 5\%$.

In den folgenden Abbildungen sind p-Werte < 0,05 mit *, p-Werte < 0,01 mit **, p-Werte < 0,001 mit *** und p-Werte < 0,0001 mit **** dargestellt.

4. Ergebnisse

Im Folgenden werden alle Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts angegeben (gerundet auf zwei Nachkommastellen) und mittels Balkendiagramm dargestellt. Bei allen RNA- und Proteinanalysen werden die Ergebnisse zu der entsprechenden Gruppe der Nativtiere normalisiert. Bei den entsprechenden Analysen wurden die Nativtiergruppen ebenfalls auf signifikante Unterschiede untersucht. In keiner RNA- oder Proteinanalyse konnten signifikante Unterschiede zwischen den Nativtier-Kontrollgruppen festgestellt werden.

Aus der Nativtier-KO-Gruppe wurde ein Tier aus den Analysen ausgeschlossen, da sich bei der Genotypisierung nach Euthanasie herausstellte, dass es heterozygot für die Mutation war. Bei den WT-Interventionsgruppen ist jeweils ein Tier im Rahmen der Versuche gestorben und konnte daher nicht in die Analysen eingeschlossen werden.

Die eingesetzten Tiere werden mit WT (Wildtyp) und KO (Knockout) abgekürzt und mit Lipo (Lipofundin) oder Prop (Propofol) für die jeweilige Interventionsgruppe.

4.1. Physiologische Parameter

4.1.1. Körpergewicht und Temperatur

Die Gewichtsentwicklung wurde als Parameter für das allgemeine Wohlbefinden der Tiere bestimmt. Angegeben ist die prozentuale Gewichtsabnahme 72 h nach CCI im Vergleich zum präoperativen Gewicht. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Die perikranielle Temperatur wird während der Operation mittels einer Sonde im *Musculus temporalis* gemessen um eine mögliche neuroprotektive Hypothermie zu erkennen. Auch sie unterscheidet sich zwischen den Gruppen nicht signifikant.

| Parameter | WT Lipo | KO Lipo | WT Prop | KO Prop |
|-------------------------------|--------------|-------------|--------------|--------------|
| Gewichtsabnahme [%] | -6,18 ± 1,35 | -6,5 ± 1,19 | -4,67 ± 1,32 | -7,57 ± 1,1 |
| Perikranielle Temperatur [°C] | 34,43 ± 0,16 | 34,8 ± 0,1 | 34,46 ± 0,07 | 34,76 ± 0,17 |

Tabelle 11: Ergebnisse Körpergewicht und Temperatur

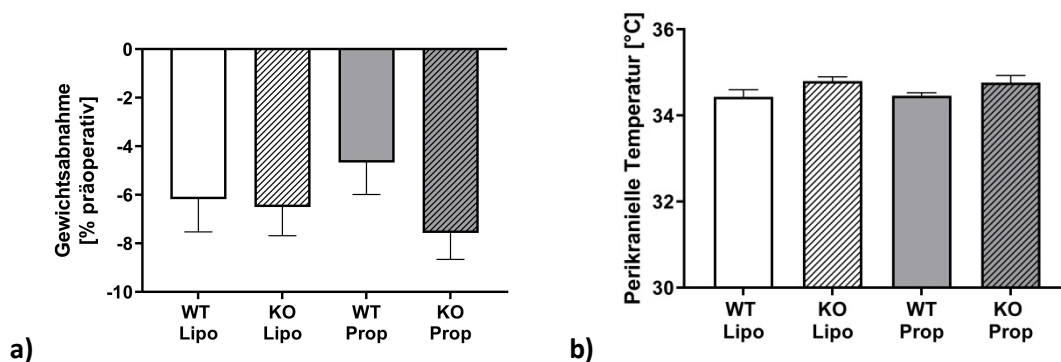


Abbildung 3: Ergebnisse Körpergewicht und Temperatur

- a) Gewichtsabnahme 72 h nach CCI im Vergleich zum präoperativen Gewicht
- b) Perikranielle Temperatur periprozedural mittels Sonde im *Musculus temporalis* gemessen

4.1.2. Narkosetiefe

Die Narkose der Tiere wurde klinisch überprüft und in einem numerischen System erfasst. Dabei steht -1 für das schlafende Tier, 0 für das normal wache Tier und +1 für das agitierte Tier. Dieses Zahlensystem soll nur die Darstellung im Diagramm erleichtern und zeigt keine weitere Wertung der Narkosetiefe auf. Dabei hat sich gezeigt, dass alle Tiere, die Lipofundin erhalten haben, auch tatsächlich wach waren und alle Tiere aus der Wildtypgruppe, die Propofol erhielten, in Narkose waren. Die Tiere der KO-Gruppe zeigten eine Agitation. Die auffällige Standardabweichung im Diagramm lässt sich dadurch erklären, dass drei Tiere aus dieser Gruppe auf Propofol mit einer Narkose reagierten und erst nach Erwachen agitiert waren.

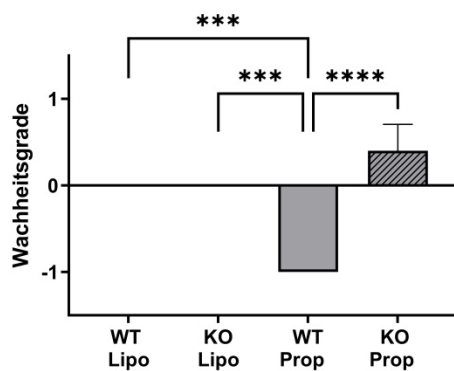


Abbildung 4: Narkosetiefe

4.2. Motorfunktion

Die Motorfunktion wird mittels NSS und Rotarod getestet. Beim NSS bedeutet ein höherer Punktwert eine größere Beeinträchtigung der neurologischen Fähigkeiten. Der Rotarod zeigt die Verweildauer des Tieres auf dem Testgerät auf, die bei einer neurologischen Beeinträchtigung kürzer ist als vor der Operation. Verglichen werden hier die ermittelten Werte 72 h nach CCI abzüglich der präoperativen Werte, um bei der Darstellung der Verschlechterung die individuellen Unterschiede der Tiere vor der Operation nicht mit einfließen zu lassen. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Abbildung 5b) ist ausnahmsweise als Boxplot dargestellt, um die Schwankung um den Wert 0 besser darzustellen.

| Parameter | WT Lipo | KO Lipo | WT Prop | KO Prop |
|--|------------|-------------|------------|------------|
| Punktwert im NSS an Tag 0 | 0,4 ± 0,3 | 1,3 ± 0,4 | 0,9 ± 0,4 | 0,7 ± 0,4 |
| Punktwert im NSS an Tag 3 | 2,4 ± 0,5 | 2,5 ± 0,5 | 3,4 ± 0,4 | 2,8 ± 0,5 |
| NSS Δ(Tag 3 zu Tag 0) | 2 ± 0,7 | 1,2 ± 0,7 | 2,6 ± 0,5 | 2,1 ± 0,5 |
| Laufzeit auf dem Rotarod [s] an Tag 0 | 25,3 ± 2,7 | 34,9 ± 3,3 | 24,6 ± 4,5 | 18,9 ± 1,9 |
| Laufzeit auf dem Rotarod [s] an Tag 3 | 26,9 ± 4,8 | 24,1 ± 5,4 | 26,6 ± 8,5 | 20,2 ± 5,2 |
| Laufzeit auf dem Rotarod [s] Δ(Tag 3 zu Tag 0) | 1,6 ± 4,1 | -10,8 ± 5,5 | 2 ± 6,0 | 1,3 ± 5,3 |

Tabelle 12: Veränderung der Motorfunktion im Vergleich zu präoperativ

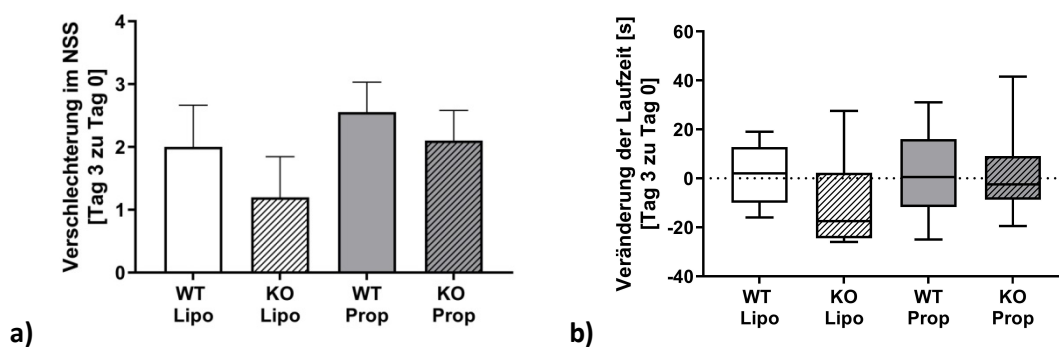


Abbildung 5: Motorfunktionsanalysen

- a) Veränderung im NSS Tag 3 zu Tag 0
- b) Veränderung im Rotarod Tag 3 zu Tag 0

4.3. Volumetrie und Apoptosemarker

Für die Bestimmung des Schadensvolumens wurden die mit Kresylviolett angefertigten Schnitte mikroskopisch ausgemessen, um zu ermitteln, ob Propofol einen Einfluss auf die Größe des globalen Schadens der einzelnen Gruppen hat. Das basische Kresylviolett bindet an die negativ geladene RNA, was die Färbung und Unterscheidung von vitalem zu nicht-vitalem Gewebe ermöglicht. Das Läsionsvolumen unterscheidet sich dabei nicht signifikant zwischen den Gruppen.

Als Apoptosemarker wurden die 145/150 kDa α II-Spektrin-Spaltprodukte gewählt. Spektrin ist ein Zytoskelettprotein, das bei Zellschädigung im Rahmen des programmierten Zelltods Calpain- und Caspase3-induziert gespalten wird. Dabei entstehen Fragmente mit 145 und 150 kDa. Diese Spektrinproteolyse findet man sowohl bei einer Reihe von neurodegenerativen Erkrankungen als auch bei akuten Ereignissen wie SHT, weshalb Spektrin-Spaltprodukte als Biomarker für apoptotische Vorgänge nach SHT mittels Western Blot untersucht werden können (201, 202). Auch in dieser Schadensanalyse konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen aufgezeigt werden.

| Parameter | WT Lipo | KO Lipo | WT Prop | KO Prop |
|------------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Schadensvolumen [mm ³] | 30,07 ± 1,71 | 30,59 ± 2,01 | 28,89 ± 1,99 | 31,03 ± 1,34 |
| 145/150 kDa Spektrin-Spaltprodukte | 11,79 ± 0,88 | 10,24 ± 0,83 | 11,08 ± 0,47 | 13,99 ± 1,26 |

Tabelle 13: Volumetrie und Apoptosemarker als Vielfaches der Nativtiere

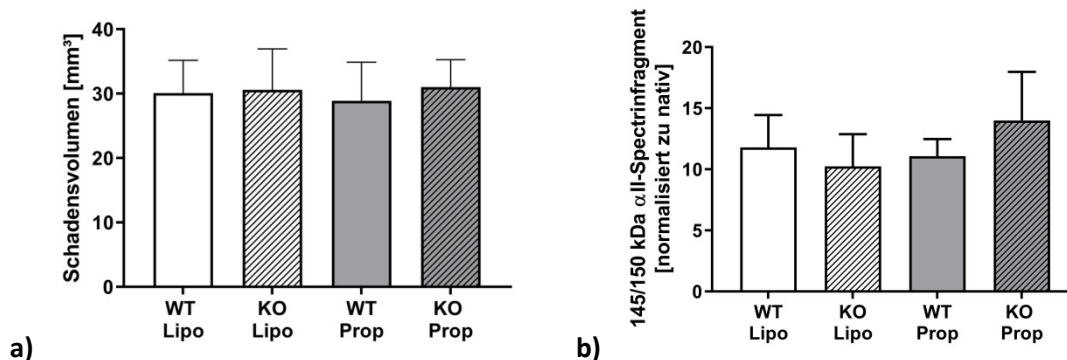


Abbildung 6: Volumetrie und Apoptosemarker

- a) Schadensvolumen in mm³
- b) 145/150 kDa α II-Spektrin-Spaltprodukte

4.4. Neuroinflammation

Als Reaktion auf ein SHT werden Gliazellen aktiviert, Entzündungsmediatoren freigesetzt und periphere Immunzellen rekrutiert. Es können zwar alle Zelltypen, die im Gehirn vorkommen, proinflammatorische Zytokine produzieren, aber die wichtigste Population bei der immunologischen Antwort auf Verletzungen ist die der Mikroglia. Sie regulieren proinflammatorischen Zytokine wie IL-1 β , IL-6 und TNF- α herauf und setzen damit eine Signalkaskade in Gang, die eine wichtige Rolle bei der Entstehung des Sekundärschadens spielt (203, 204).

Die Expression dieser Zytokine steigt am dritten Tag nach SHT gegenüber den Nativtieren deutlich an und zeigt eine massive posttraumatische Inflammationsreaktion. Bei der Expression von IL-6 ist in der KO-Gruppe mit Propofolintervention gegenüber der WT-Gruppe mit Propofolintervention ein signifikanter Unterschied feststellbar ($p=0,005$). Ansonsten sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen erkennbar. Auch die Expression der anderen Zytokine unterscheiden sich nicht signifikant in den einzelnen Gruppen.

Die mikroglialen Polarisationsmarker iNOS und Arg-1 werden im Rahmen von traumatischen Hirnverletzungen vermehrt exprimiert. Dabei katalysiert die iNOS Stickstoffmonoxid aus der Aminosäure Arginin im Rahmen der Neuroinflammation und Immunabwehr, während eine Überexpression von Arg-1 als Konkurrent um das gemeinsame Substrat Arginin die Kontusionsgröße signifikant verringern kann (124). Die Expression beider Enzyme unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den CCI Gruppen.

| Parameter | WT Lipo | KO Lipo | WT Prop | KO Prop |
|---------------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|
| IL-1 β (RNA) | 11,78 \pm 1,08 | 9,86 \pm 0,79 | 8,88 \pm 0,73 | 9,66 \pm 0,81 |
| IL-6 (RNA) | 35,61 \pm 6,49 | 49,69 \pm 7,34 | 23,04 \pm 2,1 | 57,97 \pm 8,55 |
| TNF- α (RNA) | 55,92 \pm 5,87 | 60,11 \pm 6,73 | 49,08 \pm 1,65 | 56,78 \pm 5,57 |
| iNOS (RNA) | 3,97 \pm 0,29 | 3,74 \pm 0,32 | 3,89 \pm 0,25 | 4 \pm 0,22 |
| Arg-1 (RNA) | 457 \pm 72,71 | 412 \pm 42,68 | 385,1 \pm 47,77 | 459,2 \pm 31,57 |

Tabelle 14: Proinflammatorische Zytokine und mikrogliale Polarisationsmarker als Vielfaches der Nativtiere

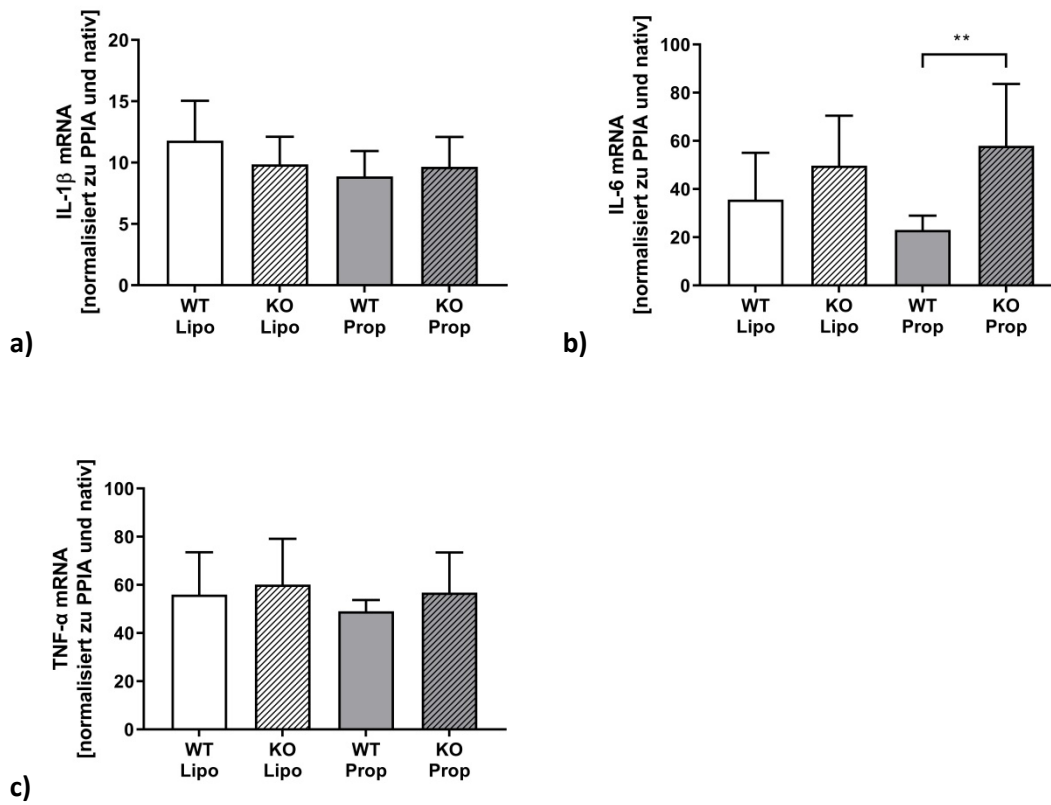


Abbildung 7: Proinflammatorische Zytokine

- a) IL-1 β mRNA-Expression 72 h postoperativ
- b) IL-6 mRNA-Expression 72 h postoperativ
- c) TNF- α mRNA-Expression 72 h postoperativ

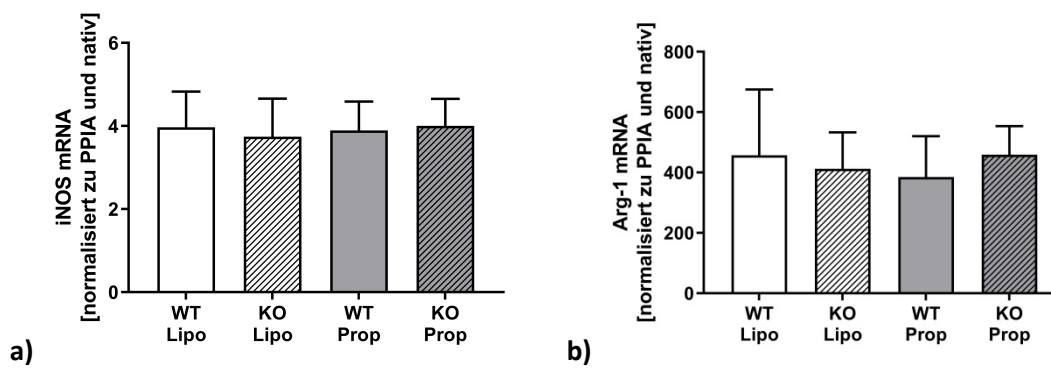


Abbildung 8: Mikrogliale Polarisationsmarker

- a) iNOS mRNA-Expression 72 h postoperativ
- b) Arg-1 mRNA-Expression 72 h postoperativ

4.5. BHS-Störung

Der IgG-Dotplot wird als Parameter für eine gestörte BHS herangezogen, da durch die Störung der Integrität eine Extravasation von Serumproteinen wie IgG stattfindet und im Schadensgewebe mittels Dotplot detektiert werden kann (181). Es kann kein signifikanter Unterschied beim Vorkommen von IgG zwischen den untersuchten Gruppen nachgewiesen werden.

| Parameter | WT Lipo | KO Lipo | WT Prop | KO Prop |
|-------------|-------------|------------|------------|------------|
| IgG-Dotplot | 7,89 ± 0,91 | 5,6 ± 0,43 | 6,5 ± 0,65 | 5,6 ± 0,67 |

Tabelle 15: IgG-Dotplot als Vielfaches der Nativtiere als Marker für eine BHS-Störung

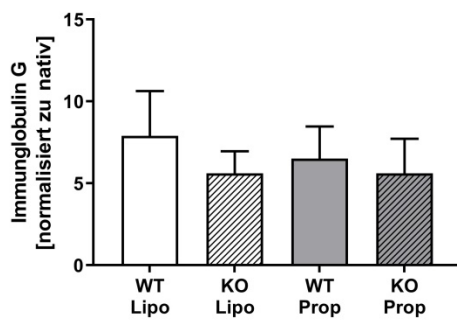


Abbildung 9: IgG-Dotplot

4.6. P75NTR-Signalweg

Der 75 kDa große Neurotrophin-Rezeptor ist über verschiedene Mechanismen entweder an pro- oder antiapoptischen Signalwegen beteiligt (s. Abschnitt 2.5.4.2). BDNF ein Neurotrophin, das gemeinsam mit seinem Vorläufer proBDNF den p75NTR-Signalweg reguliert und damit einen Einfluss auf das posttraumatische Schadensvolumen haben kann (9). Weder die Propofolgabe noch die genetische Veränderung des GABA_A-Rezeptors führen zu einer signifikanten Regulation des p75NTR/BDNF-Signalweges.

| Parameter | WT Lipo | KO Lipo | WT Prop | KO Prop |
|-------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| P75NTR (RNA) | 1,23 ± 0,15 | 1,23 ± 0,25 | 1,18 ± 0,12 | 1,38 ± 0,2 |
| BDNF (RNA) | 0,55 ± 0,04 | 0,55 ± 0,04 | 0,52 ± 0,05 | 0,59 ± 0,05 |
| P75NTR (Protein) | 0,92 ± 0,08 | 0,76 ± 0,02 | 0,8 ± 0,04 | 0,89 ± 0,06 |

Tabelle 16: Marker des p75NTR-Signalweges als Vielfaches der Nativtiere

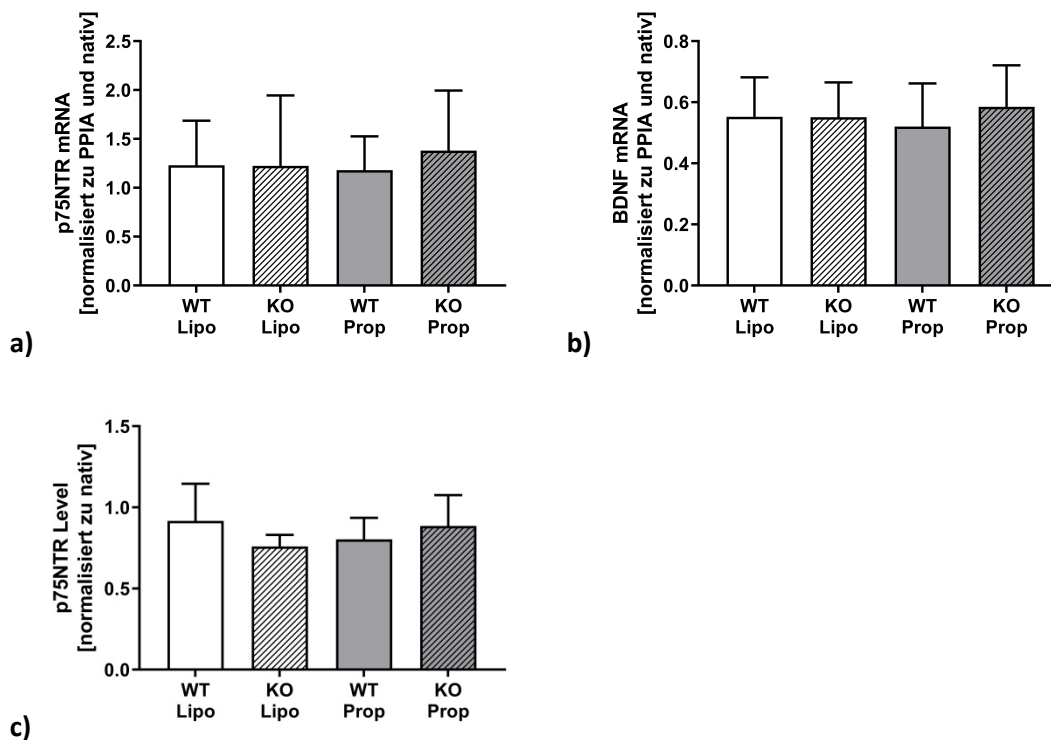


Abbildung 10: Marker des p75NTR-Signalweges

- a) P75NTR mRNA-Expression 72 h postoperativ
- b) BDNF mRNA-Expression 72 h postoperativ
- c) P75NTR Proteinlevel 72 h postoperativ

5. Diskussion

5.1. Kontrolle der physiologischen Parameter

5.1.1. Körpergewicht und Temperatur

Die Kontrolle der physiologischen Parameter der Versuchstiere ist wichtig, um auszuschließen, dass Abweichungen zwischen den Interventionsgruppen Einfluss auf die Ergebnisse haben. Das CCI als standardisiertes SHT-Modell bedingt zur Auswertung, dass alle anderen Faktoren, die die Entwicklung des Sekundärschadens beeinflussen könnten, statistisch in den Gruppen gleich verteilt sind. So kann eine Reduktion der intraoperativen Körperkerntemperatur durch die Absenkung des zerebralen Stoffwechsels und eine Verringerung des ICP nach SHT potentiell neuroprotektiv wirken. Dies wird häufig therapeutisch genutzt (205, 206). Um die intraoperative Temperatur zu kontrollieren und zu beeinflussen, wurden die Tiere während der Operation mit einer rückgekoppelten Wärmeplatte gewärmt und die perikranielle Temperatur mittels einer Sonde im *Musculus temporalis* gemessen. Dadurch konnte eine Homogenität der Studienpopulation erreicht und somit eine Beeinflussung der Ergebnisse durch die Körpertemperatur ausgeschlossen werden.

Die Entwicklung des Körpergewichtes dient als allgemeiner Parameter für das postoperative Wohlbefinden der Tiere und wurde ebenfalls als physiologischer Verlaufsmarker erfasst. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die körperliche Gesamtreaktion ähnlich zwischen den einzelnen Interventionsgruppen verlief und die Studienpopulation homogen betroffen war.

5.1.2. Narkosetiefe

Sämtliche Tiere der Lipofundin-Gruppe und der WT-Gruppe mit Propofolgabe reagierten erwartungsgemäß auf ihre jeweilige Intervention. Dabei waren die Lipofundin-Tiere wach und die WT-Tiere, denen Propofol appliziert wurde, schliefen. Daraus lässt sich eine regelrechte Durchführung der Wirkstoffgabe retrospektiv bestätigen.

Die Tiere der KO-Gruppe zeigten während der Operation eine paradoxe Reaktion auf das verabreichte Propofol, das heißt, sie reagierten mit einer Agitation statt mit einer Narkose wie die Tiere der WT-Gruppe. Dies bestätigt den genetischen KO der Propofolbindungsstelle am GABA_A-β3-Rezeptor. Dabei war auffällig, dass aus dieser Gruppe drei Tiere entgegen dem Rest in Narkose waren. Um auszuschließen, dass eine Fehlzusammenordnung zu den Versuchsgruppen vorlag, wurden die Tiere nach der Euthanasie nachgenotypisiert und es handelte sich bei allen auffälligen Tieren um homozygote KO-Tiere. Weshalb diese drei Tiere im Vergleich zu den restlichen KO Tieren der Gruppe narkotisiert waren, ließ sich in der vorliegenden Arbeit nicht abschließend evaluieren, jedoch wurde durch die Genotypisierung eine Fehlzusammenordnung ausgeschlossen.

Wie in Kapitel 2.3.1. beschrieben, bindet Propofol an verschiedenen Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors und besitzt darüber hinaus die Eigenschaft, andere Rezeptoren wie den NMDA-Rezeptor zu modulieren. Die wesentlichen Bindungsstellen befinden sich jedoch, wie in der Literatur beschrieben, an heteropentameren $\alpha_1\beta_3$ - als auch an homopentameren β_3 -Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors (33, 34). Auch in einer neueren Arbeit wurde mit Hilfe des CRISPR/cas9-Verfahren bei Mäusen die β_3 -Untereinheit genetisch inhibiert und festgestellt, dass dieser Knockout zu einer signifikanten Verringerung der inhibitorischen Übertragung führt (207). Die in der vorliegenden Arbeit klinisch beobachtete paradoxe Reaktion der KO-Gruppe auf die Verabreichung von Propofol bestätigt die Relevanz der β_3 -Untereinheit für die narkotische Potenz von Propofol in Nagetieren.

5.2. Auswirkung einer Veränderung der GABA_A- β_3 -Transmission auf die Hirnläsion und das funktionelle Outcome

Die histologisch ermittelte Läsionsgröße 72 h nach SHT war mit ungefähr 30 mm³ in der Kontrollgruppe vergleichbar mit vorausgehenden Arbeiten (8). Dieses Schadensvolumen war somit nach der Applikation des CCI zu erwarten, was die Verwendung des CCI als gut reproduzierbares Verfahren zur Darstellung eines SHT-Modells aufzeigt. Die Läsionsgröße veränderte sich weder durch eine Propofolgabe in der WT-Gruppe noch in der KO-Gruppe, bei der die Propofolbindung nicht mehr relevant stattfinden kann.

Das 280 kDa große α II-Spektrin ist ein membranständiges Zytoskelettprotein und wird als Biomarker für Apoptose und nekrotischen Zelltod verwendet. Bei Zellschädigung kommt es posttraumatisch zu einem vermehrten Kalziumeinstrom, infolge dessen die Proteolyse von α II-Spektrin durch Calpain oder Caspase-3 aktiviert wird. Dadurch entstehen 145 kDa und 150 kDa große Fragmente, die als Spektrin-Spaltprodukte bezeichnet werden. Sie sind bei einer Vielzahl neurologischer Schädigungen nachweisbar, so auch im periläsionalen Hirngewebe nach experimentellem SHT (201, 202). Diese waren nach SHT gegenüber den Nativtieren auf das ca. 11-fache erhöht, was durch die vermehrte Zellschädigung durch das CCI erklärbar ist. In unserer Arbeitsgruppe wurde von Sebastiani et al. gezeigt, dass die posttraumatische Propofolapplikation, verglichen mit der Gabe von Lipofundin oder Kochsalzlösung, 24 h nach SHT das Volumen der Läsion signifikant vergrößerte (9). Eine posttraumatische Propofolapplikation verstärkte bei Sebastiani et al. zudem die Proteolyse zu Spektrin-Spaltprodukten und zeigt damit eine verstärkte Apoptose an. Dieser Effekt ließ sich in dieser Arbeit nicht reproduzieren, wobei sowohl das Läsionsvolumen, als auch die Spektrinspaltproduktbildung als Zelluntergangparameter durch die Propofolgabe unbeeinflusst blieben.

Zur Bestimmung des funktionellen Outcomes nach SHT wurden zudem verschiedene motorische und Verhaltenstests durchgeführt, um eventuelle Auffälligkeiten zu erfassen, die nicht allein durch eine histologische Analyse quantifizierbar sind. Der Fokus wurde hierbei auf das motorische System gelegt, da das CCI im Bereich des rechten motorischen und sensorischen Kortex der Maus appliziert wird und daher primär Auswirkungen auf die linke Körperhälfte der Maus zeigen sollte. Als in unserer Arbeitsgruppe etablierte Tests wurden hierbei der NSS verwendet und das auf Mäuse angepasste System Rotarod (siehe Kapitel 3.5.2.). Hierdurch kann eine breite Testung des motorischen Systems und den dafür notwendigen sensorischen Impulsen durchgeführt werden. Zudem werden höhere Funktionskreise, wie beispielsweise Koordinationsleistungen, Angstverhalten und Schreckreaktion, sowie allgemeine speziestypische Verhaltensweisen untersucht. Hierbei werden grundsätzlich Ausgangswerte erhoben, da die Tiere interindividuell auch ohne Schädigung verschieden gut in den komplexen Testungen abschneiden. Es wird dann die Differenz zum individuellen Ausgangswert erhoben und zwischen den Gruppen verglichen. In der vorliegenden Studie fällt auf, dass die Ausgangswerte des NSS im Bereich zwischen 0 und 3 schwanken, also bei der noch gesunden Maus bereits ein funktionelles Defizit erhoben wird. Alle Interventionsgruppen zeigen aber eine erwartbare weitergehende Verschlechterung im NSS nach CCI, wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen erfasst wurden.

Bei der Rotarod-Analyse werden die Tiere bereits vor CCI trainiert, um eine möglichst homogene Studienpopulation zu erreichen, da die Testung auf dem Rotarod voraussetzt, dass die Tiere ihre Aufgabe erlernen (reviewed in (208)). Dieser Lerneffekt konnte in der Literatur aufgezeigt werden und könnte daher zu einer Verfälschung der postoperativ erhobenen Ergebnisse führen, wenn die Tiere nicht ausreichend trainiert wurden, da die Tiere sich im schlechtesten Fall noch im Lernprozess befänden (209). In der vorliegenden Studie ist auffällig, dass die Tiere bereits präoperativ nur eine sehr kurze Zeit auf dem rotierenden Rad verweilen konnten, im Mittel 26 s. Ein laborinterner Vergleich mit anderen Mauslinien zeigt, dass sich Mäuse der Linie C57BL/6 präoperativ weitaus länger auf dem Rotarod halten können. Dies wird jedoch rein exemplarisch genannt, da hierfür keine randomisierte Studie mit statistischer Testung durchgeführt wurde. Es ist allerdings bekannt, dass sowohl motorische Testungen, als auch Verhaltenstestungen eine Abhängigkeit der Ergebnisse von der verwendeten Spezies und von der verwendeten Zuchtlinie innerhalb einer Spezies zeigen (209–211). Vöikar et al. konnten in einem Vergleich verschiedener Mauslinien zeigen, dass insbesondere die Mauslinie 129 in der Rotarod-Analyse am schlechtesten abschneidet, was die o.g. Beobachtung suffizient erklärt. In der Rotarod-Analyse konnten in der vorliegenden Studie keine signifikanten Unterschiede zwischen den Interventionsgruppen festgestellt werden, wobei eine hohe Standardabweichung der Ergebnisse auffällt, die auch trotz vielfachem Training der Tiere nicht reduziert werden konnte und auf das schlechte präoperative Abschneiden der Tiere zurückzuführen

sein könnte. Die funktionelle Testung der Tiere bestätigt allerdings die Ergebnisse der bereits erhobenen histologischen und Proteinanalysen und zeigt, dass die Veränderung der GABA_A-β3-Transmission keinen Einfluss auf das Outcome nach CCI hat.

Die Diskrepanz zwischen der vorliegenden Studie und den Daten von Sebastiani et al. lässt sich nicht durch das angewandte Material oder Methoden erklären, da diese in beiden Arbeiten im Wesentlichen gleich waren. Als Unterschied und damit als potenzielle Ursachen lassen sich der genetische Hintergrund, das Geschlecht und das Alter der Tiere identifizieren. Bei Sebastiani et al. wurden jung adulte männliche C57BL/6-Mäuse verwendet, in dieser Arbeit wurden aufgrund der aufwändigen Zucht genetisch veränderter Organismen sowohl männliche als auch weibliche Tiere verschiedener Altersgruppen mit dem Hintergrundstamm 129/Sv verwendet.

In der Literatur herrschen kontroverse Meinungen über Neuroprotektion oder Neurotoxizität von Propofol nach SHT. Trotz der gleich aufgebauten Experimente waren die Effekte auf die Hirnläsion nicht erneut nachweisbar; es gibt jedoch in der Literatur mehrere Hinweise, dass sowohl Alter als auch Geschlecht oder der Hintergrundstamm der Tiere Versuchsergebnisse beeinflussen können. Nach experimentellem SHT durch CCI wurden bei männlichen Mäusen größere Hirnläsionen gefunden als bei weiblichen, was durch eine Modulation pathogener Prozesse im verletzten Gewebe durch Sexualhormone erklärt werden kann (212). Es gibt Hinweise auf eine neuroprotektive Wirkung von Östrogen und Progesteron, und es wird vermutet, dass diese Hormone zumindest einen Anteil an den geschlechtsspezifischen Unterschieden nach traumatischer Hirnverletzung haben (213). In der vorliegenden Arbeit war es nicht möglich, eine geschlechtsspezifische Analyse durchzuführen, da die Größe der Subgruppen dann zu klein wäre (n=3-6), um eine ausreichend gepowerte statistische Aussage zu treffen.

Der genetische Hintergrund der verwendeten Mäuse kann die Ergebnisse beeinflussen. Innerhalb der C57BL/6-Familie konnte im Rahmen von Schlaganfallstudien gezeigt werden, dass einzelne Hintergrundstämme unterschiedlich große Läsionsvolumina aufweisen (214, 215). Bei der Betrachtung der Unterschiede in der Zuchtauswahl lässt sich feststellen, dass alle Versuche bei Sebastiani et al. mit Tieren des Stammes C57BL/6 durchgeführt wurden, in dieser Arbeit dagegen Tiere mit dem Hintergrundstamm 129/Sv verwendet wurden. Es wurden Studien durchgeführt, bei denen der Einfluss dieser genetischen Stämme auf verschiedene Versuchsparameter untersucht wurde. Dazu gehören neben Verhaltensweisen in unterschiedlichen Umgebungen und Lernprozessen auch eine Veränderung der BDNF-Expression (211, 216), das als Neurotrophin Ligand des p75NTR ist und damit die Signaltransduktion des Rezeptors direkt beeinflusst (s. Kapitel 5.3.).

Eine Beeinflussung verschiedener Parameter ist vielfach belegt, sowohl von Verhaltenstestungen, als auch die Ausprägung molekularer Marker, sodass eine Beeinflussung des Schadensvolumens nach CCI durch unterschiedliche Stämme der Versuchstiere damit naheliegt und die verschiedenen Versuchsergebnisse im Vergleich zu Sebastiani et al. erklären kann.

5.3. Auswirkung einer Veränderung der GABA_A- β 3-Transmission auf den p75NTR-Signalweg

Der p75NTR ist ein Mitglied der TNF-Rezeptorfamilie und ist an vielfältigen und komplexen Vorgängen im ZNS beteiligt, die sowohl regenerativ als auch pathologisch sein können. Er bindet an alle Neurotrophine NGF, BDNF, NT-3 und NT-4, sowie an deren Proformen. Über seine intrazellulär gelegene Todesdomäne und mithilfe von Wechselwirkungen mit Co-Rezeptoren wie Sortilin ist er in der Lage, Zelltod und Apoptose einzuleiten (188). Er kann jedoch auch über die Interaktion mit Trk-Rezeptoren antiapoptotische Signalwege mit Überlebens- und Wachstumssignalen einleiten (188, 217). Während des Wachstums des juvenilen ZNS wird der p75NTR vermehrt exprimiert und im gesunden adulten Organismus deutlich herunter reguliert. Kommt es zu Verletzungen oder anderen pathologischen Vorgängen, wird er erneut verstärkt exprimiert und kann so seine wachstumsfördernden und regenerativen, aber auch seine proapoptotischen Wirkungen entfalten (73, 218, 219). Es existieren einige Studien, die neurotoxische Auswirkungen von verschiedenen Anästhetika während der Synaptogenese belegen konnten. So konnte beispielsweise für Ketamin gezeigt werden, dass es bei unreifen Hirnen 7 Tage alter Ratten dosisabhängig zu einer starken Neurodegeneration führt, die vor allem im frontalen Kortex nachweisbar ist (220, 221). *In-vitro* wurde gezeigt, dass Ketamin sogar in subanästhetischen Dosen, die nicht zur Apoptose führen, das dendritische Wachstum sich entwickelnder GABAerger Neurone beeinflusst und damit die Entwicklung des ZNS grundlegend beeinträchtigen kann (222). Auch für Ketamin in Verbindung mit dem GABAergen Benzodiazepin Midazolam wurden von Young et al. proapoptotische und neurodegenerative Effekte während der Entwicklung nachgewiesen, die zwar bei Einzelgabe ebenfalls vorhanden waren, aber in Kombination beider Substanzen die größten Auswirkungen auf das unreife Mäusegehirn hatten (223). Die Neurotoxizität auf das sich entwickelnde Gehirn des ebenso GABAergen volatilen Anästhetikums Isofluran wurde in mehreren Studien untersucht. Dabei konnten apoptotische Vorgänge, die über den p75NTR-Signalweg ablaufen, beschrieben werden (224, 225).

Propofol hat, ebenso wie andere GABAerge Substanzen, im unreifen Gehirn schon bei subanästhetischer Dosis neuroapoptotische Wirkungen gezeigt (226). *In-vitro* wurde nachgewiesen,

dass es die Apoptose über eine Caspase-3-Aktivierung einleitet und irreversible Schädigungen an unreifen Neuronen verursacht, wenn es in kritischen Phasen der Entwicklung appliziert wird (227, 228). Dies legt den Schluss nahe, dass der p75NTR-Signalweg dabei zumindest mit verantwortlich ist. Dieser Frage sind Pearn et al. nachgegangen. Dabei konnten sie beobachten, dass die genetische und pharmakologische Hemmung des p75NTR sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* die durch Propofol hervorgerufene Neuroapoptose abschwächen, was darauf schließen lässt, dass die apoptotische Wirkung von Propofol tatsächlich über den p75NTR-Signalweg vermittelt wird (229). Auch Milanović et al. konnten zeigen, dass die Propofol-Exposition dosisabhängig die Expression des p75NTR im sich entwickelnden Rattengehirn steigert (230).

Alle oben genannten Studien zur Expression des p75NTR wurden an juvenilen Zellen oder Organismen durchgeführt. Im juvenilen Tier sind die p75NTR-Proteinlevel im Vergleich zum adulten Tier höher (231, 232). Daher liegt die Schlussfolgerung nahe, dass eine höhere Expression des p75NTR zu Neurotoxizität von Propofol führt. Es konnte gezeigt werden, dass der p75NTR in der akuten und chronischen Phase nach SHT im Erwachsenenalter erneut aktiviert und hochreguliert wird (73, 233). In unserer Arbeitsgruppe wurde durch Sebastiani et al. die Neurotoxizität von Propofol nach SHT und die Beteiligung des p75NTR-Signalweges nachgewiesen (8, 9). Dabei war der p75NTR nach 24 h um das 9-fache und 72 h nach SHT noch ungefähr auf das Doppelte erhöht.

Im Gegensatz zu Sebastiani et al. konnte in der vorliegenden Studie kein Hinweis auf eine Veränderung der Läsionsgröße durch Propofolgabe zum Zeitpunkt der höchsten p75NTR-Expression gezeigt werden. Auffällig ist der Unterschied zwischen den CCI-Gruppen der beiden Studien. Während bei Sebastiani et al. 72 h nach CCI eine Erhöhung der p75NTR-Expression auf das Doppelte nachweisbar war, konnte in der vorliegenden Studie durch CCI keine Induktion des p75NTR gezeigt werden, wobei die Proteinlevel noch niedriger als die RNA-Expression sind. In Verbindung mit den Arbeiten von Abramov et al. und Heinla et al. ist es naheliegend, dass sich in den verschiedenen Mauslinien C57BL/6 und 129/Sv der p75NTR-Signalweg und die Regulation des Rezeptors anders verhält. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die BDNF-Expression im Kortex der 129/Sv-Mäuse signifikant niedriger ist als in den C57BL/6-Linien (211, 216). Wie in Kapitel 5.2. beschrieben, bestätigt das klinische Bild in den Verhaltenstestungen unseres Labors diese Beobachtung, da BDNF elementar für synaptische Plastizität, Langzeitpotenzierung und Lernverhalten ist (234, 235). Aus der durch Heinla et al. gezeigten niedrigeren BDNF-Expression bei 129/Sv-Linien kann sich daher zusätzlich eine niedrigere Signaltransduktion aufgrund fehlender p75NTR-Liganden nach CCI im Kortex ergeben (216).

Im Menschen ist der p75NTR im Erwachsenenalter nach neuronaler Schädigung heraufreguliert. Kandravicius et al. konnten bei Patienten mit Temporallappenepilepsie erhöhte Proteinlevel des

p75NTR nachweisen (236). Aufgrund der oben beschriebenen fehlenden Induktion des p75NTR des 129/Sv Mausstamms, ist die Übertragbarkeit unserer Ergebnisse der p75NTR vermittelten Propofoltoxizität auf den Menschen limitiert. Daher sollten in weiteren Experimenten die in Kapitel 3.2. beschriebene Mutation auf einen Modellorganismus übertragen werden, beispielsweise eine Maus mit C57BL/6-Hintergrundstamm, sodass die Induktion des p75NTR-Signalweges nach CCI wieder gegeben wäre.

Zusammenfassend bestätigen unsere Ergebnisse die Relevanz des p75NTR für die neurotoxische Wirkung des Propofols auf das Gehirn. Nur wenn der p75NTR im pathologischen Zustand hochreguliert ist, kann dies zu einer neurotoxischen Wirkung von Propofol führen, wohingegen eine normale Expression des p75NTR die Propofoltoxizität verhindert. Dies unterstützt die Ergebnisse von Sebastiani et al., die auch nur eine Neurotoxizität bei Propofolgabe nachweisen konnten, wenn der p75NTR maximal exprimiert war (24 h nach SHT), wohingegen keine Toxizität bei Propofolgabe 6 h nach SHT nachgewiesen werden konnte (8, 9). Die p75NTR-Level könnten somit als Prädiktor für eine zusätzliche Toxizität von Anästhetika dienen, was Ansatzpunkt für eine individuelle Therapieentscheidung sein könnte.

5.4. Auswirkung einer Veränderung der GABA_A- β 3-Transmission auf die Neuroinflammation

Das ZNS besitzt eine Reihe von komplexen immunologischen Fähigkeiten, um auf eine Schädigung von gesundem Gewebe zu reagieren. Dabei existieren sowohl reparative Prozesse als auch im Rahmen einer überschießenden Reaktion die Vergrößerung des Läsionsvolumens (s. Kapitel 2.5). Eine herausragende Rolle spielen dabei die ortsständigen Mikroglia, die bereits innerhalb von Minuten nach dem Trauma aktiviert werden und sich durch die M1- oder M2-Polarisierung unterscheiden. Dabei zeichnet sich eine M1-Polarisierung durch die Produktion proinflammatorisch wirkender Zytokine wie TNF- α , IL-1 β und IL-6 aus (120). Auch die Expression der iNOS und damit verbunden die Produktion von zytotoxischem NO wird erhöht, weshalb die iNOS in der vorliegenden Arbeit als Marker für die M1-Polarisierung herangezogen wurde. Als Konkurrent um das gemeinsame Substrat Arginin und damit Gegenspieler der iNOS fungiert Arg-1, das von M2-polarisierten Mikroglia ausgeht und dessen Überexpression als neuroprotektiv angesehen wird (124). M2-polarisierte Mikroglia fördern durch ihre phagozytotische Aktivität Reparatur- und Umbauprozesse wie Remyelinisierung und Neurogenese. Auch die Arg-1 trägt entscheidend zu einer neuroprotektiven Wirkung von M2-Mikroglia bei (120, 124). Daher wurde sie als Markerenzym für den Nachweis dieses Aktivierungszustandes gewählt. In der Literatur wird ein schneller Anstieg der M2-polarisierten

Mikroglia beschrieben, der bereits vor Tag 1 CCI nachweisbar ist und an Tag 5 einen Peak erreicht. Die Aktivierung M1-polarisierter Mikroglia beginnt dagegen erst an Tag 1 und erreicht an Tag 7 ihren Höhepunkt. Auch die messenger RNA(mRNA)-Expression der proinflammatorischen Zytokine ist bereits früh nachweisbar und zeigt an Tag 1 einen Höhepunkt (117, 237, 238). In der vorliegenden Studie wurde die Expression der iNOS und Arg-1 als Marker für die mikrogliale Aktivierung an Tag 3 nach der Intervention gemessen. Dabei konnte gezeigt werden, dass beide Marker deutlich erhöht waren, was dem aktuellen wissenschaftlichen Stand entspricht und die Ergebnisse bestätigt (117, 119, 125). Insbesondere konnte eine höhere Induktion des M2-Polarisationsmarkers Arg-1 gezeigt werden, wohingegen die iNOS als M1-Polarisationsmarker eine niedrige Induktion aufwies. Dies bestätigt den oben dargestellten zeitlichen Verlauf der mikroglialen Polarisation. Eine signifikante Veränderung der angegebenen Polarisationsmarker durch Propofol oder den KO der Propofolbindungsstelle konnte aber nicht gezeigt werden, so dass man davon ausgehen muss, dass die Veränderung der GABA_A-β3-Transmission *in-vivo* keinen Effekt auf die mikrogliale Polarisation besitzt.

Anders verhält es sich bei den proinflammatorischen Zytokinen. Hier konnte für Propofol im Schlaganfallmodell der Ratte eine Hemmung der mRNA-Expression der Zytokine TNF-α, IL-1β und IL-6 24 h nach Intervention gezeigt werden (239). Auch Ding et al. konnten im SHT-Modell der Ratte eine Hemmung der Expression von IL-1β und TNF-α nach Propofolinjektion nachweisen (66). Die vorliegende Studie bestätigt diese Ergebnisse nicht. Es zeigen sich keine signifikanten Veränderungen der mikroglialen Aktivierung durch eine Intervention mit Propofol, weder in der WT- noch in der KO-Gruppe. Die mRNA-Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF-α und IL-1β war gegenüber den Nativtieren an Tag 3 deutlich erhöht und bewegte sich in dem aus Vorarbeiten bekannten Bereich (8). Es war jedoch kein statistisch signifikanter Effekt zwischen den Interventionsgruppen zu erkennen. Ein möglicher Grund für die verschiedenen Ergebnisse könnte die höhere Dosierung von Propofol (50mg/kgKG/h für 30 min) in der Studie von Zhou et al. sein, sodass ein antiinflammatorischer Effekt erst bei hohen Dosierungen auftritt. Auch bei Ding et al. wurde in den Interventionsgruppen mit höheren Dosierungen gearbeitet (50mg/kgKG bzw. 100mg/kgKG)

Viele Studien haben die antiinflammatorische Potenz von GABA und dessen Agonisten in verschiedenen *in-vivo* und *in-vitro* Experimenten belegt (reviewed in (240)). Ye et al. konnten eine Suppression der proinflammatorischen Zytokine TNF-α, IL-1β und IL-6 durch Propofol in einer Mikroglia-Zelllinie *in-vitro* nachweisen (241). Daher ist es wahrscheinlich, dass auch GABA-Agonisten wie Midazolam oder Propofol einen Einfluss auf die Zytokin-Expression im ZNS haben.

Im Zusammenhang mit den in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnissen ist der Einfluss GABAerger Substanzen auf die Ausschüttung von IL-6 relevant. Es konnte für den Neurotransmitter GABA eine

Unterdrückung der IL-6-Ausschüttung in einer Astrozytom-Zelllinie gezeigt werden (242). In weiterführenden Untersuchungen wurden auch die GABA-Agonisten Propofol und Midazolam untersucht. Während der spezifische GABA-Agonist Midazolam zu einer signifikanten Suppression der IL-6-Ausschüttung führt, konnte dieser Effekt für Propofol nicht bewiesen werden (243), was zu der Schlussfolgerung führt, dass Propofol nicht ausschließlich über GABA-Rezeptoren die Inflammation beeinflusst, sondern gegebenenfalls weitere Signalwege aktiviert werden. Hier scheint der Purinrezeptor P2X7 als ein mögliches Zielmolekül von Bedeutung zu sein, da dieser durch Propofol aktiviert werden kann (244) und in der Literatur mit einer gesteigerten Neuroinflammation in Verbindung gebracht wird (244–246).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie legen ebenfalls einen dualen Wirkeffekt von Propofol nahe. Während durch die Propofolapplikation keine gesteigerte IL-6-Produktion im Vergleich zu den Lipofundin behandelten Gruppen hervorgerufen wurde, zeigten die Tiere, die eine nicht-funktionale Propofolbindungsstelle besitzen (KO Prop-Gruppe), nach Propofolapplikation eine gesteigerte IL-6 Expression. Daher ist ein dualer Wirkmechanismus denkbar, wobei die GABAerge Wirkkomponente des Propofols einen antiinflammatorischen Effekt besitzt, der mit einer zweiten proinflammatorischen Komponente im Gleichgewicht zu stehen scheint. Wird die GABAerge Wirkung des Propofols durch den KO der Propofolbindungsstelle am GABA_A-Rezeptor abgeschwächt, so werden beide Komponenten aus dem Gleichgewicht gebracht und die proinflammatorische Komponente überwiegt. Ein denkbarer Signalweg könnte hierfür der in Kapitel 2.5.1 beschriebene P2X7-Rezeptor und dessen Wirkung auf die Zytokine sein, wobei es hier einer weiteren wissenschaftlichen Klärung bedarf. Eine solche Beeinflussung verschiedener Signalwege durch Propofol würde auch die sich teilweise widersprechenden Ergebnisse verschiedener Veröffentlichungen erklären, nach denen Propofol einerseits proinflammatorische und andererseits antiinflammatorische Wirkungen besitzt (239, 241, 245).

Da in der vorliegenden Studie aber ausschließlich eine Erhöhung der IL-6-Expression durch den KO der Propofolbindungsstelle gezeigt werden konnte, die anderen proinflammatorischen Marker wie IL-1 β , TNF- α und iNOS in dieser Interventionsgruppe aber nicht signifikant verändert waren, scheint der Effekt der GABA_A- β 3-Transmission *in-vivo*, in einem komplexen Organ mit verschiedenen Zelltypen und entsprechend verschiedener Rezeptorenausstattung, eher gering ausgeprägt zu sein. Die klinische Signifikanz ist fraglich, insbesondere, da eine Auswirkung auf die Läsionsgröße und das funktionelle Outcome der Mäuse nicht beobachtet werden konnte (siehe auch Kapitel 5.2.).

5.5. Auswirkung einer GABA- β 3-Mutation auf die BHS

Die BHS als hoch spezialisierte und einzigartige Endothelbarriere bietet dem gesunden ZNS einen Schutz vor Krankheitserregern und Toxinen. Sie hält die Homöostase im ZNS aufrecht und ermöglicht so die regelrechte neuronale Funktion (s. Kapitel 2.5.2) (164). Nach SHT kommt es durch Endothelschädigung zu einer Erweiterung der TJ, die zu erhöhter Permeabilität und damit zur Ausbildung eines posttraumatischen vasogenen Hirnödems führt. Das zytotoxische Hirnödem dagegen entsteht durch Veränderungen im Zellstoffwechsel und einer gestörten Funktion von Ionenpumpen und -transportern wie AQP-4 sowie durch eine Ansammlung zytotoxischer und proinflammatorischer Mediatoren (182).

Die Durchlässigkeit für hochmolekulare Proteine konnte bereits 30 min bis 1 h nach Trauma beobachtet werden und erreicht in einem biphasischen Verlauf zwei Höhepunkte, sowohl nach 4-6 h und erneut nach 3 Tagen (171, 172).

Eine gesteigerte lokale Neuroinflammation kann zu einer Zerstörung der BHS führen und damit zu einem gesteigerten Hirnödem beitragen (247, 248). GABAerge Substanzen sind in der Lage, die Neuroinflammation zu beeinflussen. Ebenso konnte gezeigt werden, dass Mikroglia als wichtige Akteure des ortsständigen Immunsystems GABAzeptive Zellen sind (249). Daher ist eine sekundäre Beeinflussung der BHS über die Beeinflussung der Neuroinflammation durch den GABA-Agonisten Propofol denkbar. Weiterhin konnte für GABAerge Substanzen wie die volatilen Anästhetika Isofluran und Sevofluran gezeigt werden, dass ein direkter Einfluss auf die BHS und TJ-Proteine besteht, der insbesondere für Zonula occludens 1 (ZO-1)-Protein nachweisbar ist. Beide Anästhetika verhalten sich aber unterschiedlich. Während Isofluran zu einem gesteigerten Wassergehalt im Hirngewebe führt, konnte dieser Effekt durch Sevofluran vermindert werden (250), so dass keine allgemeingültige Schlussfolgerung auf den Effekt von GABA-Agonisten gezogen werden kann, was den GABA-Rezeptor als Zielmolekül einer direkten Beeinflussung unwahrscheinlich werden lässt.

Mit Propofol wurden bereits viele Versuche zur Integrität der BHS durchgeführt. Dabei konnte in Zellkulturversuchen an Endothelzellen der neurovaskulären Einheit gezeigt werden, dass Propofol direkte Auswirkungen auf die Integrität der BHS besitzt, wobei Propofol zu einer Verringerung des konsekutiven Hirnödems führt (251, 252). Auch hier scheinen TJ-Proteine wie ZO-1 eine zentrale Rolle zu spielen. Auch indirekte Effekte von Propofol, die die Kaskade der Neuroinflammation und deren Einfluss auf die BHS unterbrechen, konnten nachgewiesen werden (253). Beispielsweise konnten Lu et al. für Propofol eine Verringerung der Permeabilität der BHS nach TNF- α Stimulation im Zellversuch nachweisen (254). Ähnliche Effekte konnten auch im Tiermodell gezeigt werden (255).

In der vorliegenden Arbeit wurde IgG als allgemeiner Marker für extravasiertes Serumprotein im Schadensareal gewählt, da IgG aufgrund des hohen Molekulargewichts bei ausgeprägten Störungen der BHS ins Gewebe übertreten können (256) und sich daher bei großen Hirnödemen im Gewebe ansammeln. Diese wurden mittels IgG-Dotblot 72 h nach Intervention detektiert, was dem Zeitpunkt des zweiten Höhepunkts der BHS-Störung entspricht und damit der erwartbare Effekt maximal sein sollte. Dabei konnte gezeigt werden, dass nach CCI eine deutliche Extravasation von IgG gegenüber den Nativtieren stattfand, jedoch kein Unterschied zwischen den einzelnen Interventionsgruppen nachweisbar war, so dass die in der Literatur beschriebene Evidenz des protektiven Effekts von Propofol auf die Ausbildung eines Hirnödems nicht nachgewiesen werden konnte. Insbesondere der fehlende Effekt des Propofols auf die proinflammatorischen Zytokine in diesem Experiment (s. Kapitel 5.4.) unterstreicht dieses Ergebnis und zeigt, dass die GABA_A-β₃-Transmission in dem vorliegenden Experiment weder einen direkten noch einen indirekten Effekt auf die BHS hat. Einschränkend ist zu sagen, dass IgG als alleiniger Marker für die Ödemformation genutzt wurde und dadurch aufgrund des großen Molekulargewichts nur hochgradige BHS-Störungen detektiert würden. Weiterführende Analysen, wie beispielsweise Bestimmungen des Hirnwassergehalts und TJ-Proteine wurden nicht durchgeführt.

Ein offensichtlicher Grund für die fehlende Wirksamkeit von Propofol in dieser Arbeit könnte der Zeitpunkt der Propofolgabe sein. Eine Präkonditionierung mit Propofol konnte die BHS-Störung in einem Ischämiemodell an der Ratte signifikant reduzieren, vermutlich durch die Hemmung der AQP-4 Expression (257). Diese verminderte AQP-4 Expression konnte auch schon von Ding et al. nachgewiesen werden. Dabei wurde gezeigt, dass die posttraumatische Injektion von Propofol 10 min nach Schadensereignis zu einer Hemmung der Zytokine IL-1β- und TNF-α- Expression führen, die beide zu einer Stimulation der AQP-4-Expression führen, sodass dieses vermindert nachweisbar war (66). In einer Studie von Ji et al. wurde die Reduktion des Hirnödems an Ratten im Ischämie-Reperfusion-Modell dargestellt, wobei hier eine Postkonditionierung mit Propofol 30 min nach dem Schadensereignis stattfand und neben dem Hirnwassergehalt auch weitergehende Proteinanalysen diesen Effekt bestätigten (255). In einer ähnlichen Studie konnte in der Ratte eine protektive Wirkung von Propofol auf die Ausbildung eines Hirnödems, der BHS-Disruption und der Inflammationsreaktion nach Subarachnoidalblutung belegt werden, wobei die Tiere eine Propofolinjektion 2 h und 12 h nach Schadensereignis erhielten (258). Gleiche Ergebnisse wurden in Schlaganfallmodellen beschrieben, wobei auch hier die Postkonditionierung eine Stunde nach Schlaganfall begann (259). Alle beschriebenen Studien gleichen sich methodisch in der kurzen Zeit zwischen Schadensereignis und der Postkonditionierung durch Propofol, die zwischen 10 min und 2 h nach Schadensereignis begann, sodass wie oben beschrieben beim ersten Auftreten einer BHS-Störung 30 min nach Schadensereignis und damit vor der Ausbildung des ersten Höhepunktes der BHS-Störung die

Ausbildung eines Hirnödems therapiert wurde. In der vorliegenden Studie wurde die Propofolinjektion erst 24 h nach Schadensereignis durchgeführt, weshalb man davon ausgehen kann, dass sich bereits vor der Propofolgabe ein Ödem formiert hat und auch eine Inflammationskaskade begonnen hat, die ein vorliegendes Ödem weiter verstärkt.

In Zusammenschau der Studien ist davon auszugehen, dass Propofol das Potenzial besitzt, eine BHS-Störung zu vermindern. Das therapeutische Fenster des Narkotikums Propofol zur Verbesserung einer BHS-Störung beträgt aber weitaus weniger als 24 h und eine Postkonditionierung muss bereits frühzeitig begonnen werden, um einen molekularbiologisch nachweisbaren und klinisch relevanten Effekt zu erzielen.

6. Zusammenfassung

Das SHT als eine der häufigsten Todesursachen im jungen Erwachsenenalter hat in der Humanmedizin weiterhin eine hohe Bedeutung, da insbesondere die Langzeitfolgen für die oft noch jungen Patienten bedeutende Einschränkungen des Lebens und der Gesundheit nach sich ziehen.

Obwohl es einige Behandlungspfade wie die dekompressive Kraniektomie oder die Anlage einer Ventrikeldrainage mit Optimierung der physiologischen Parameter zur Reduzierung der Läsion gibt, fehlen oftmals medikamentöse Ansatzpunkte, um das Läsionsvolumen und die damit einhergehenden funktionellen Einschränkungen wirksam zu reduzieren. Hinzu kommt, dass nur der sekundäre Schaden durch medizinische Behandlung reduziert werden kann. Hier spielt die Anästhesie als Bindeglied zwischen präklinischer und operativ klinischer Behandlung zur Beeinflussung des Outcomes der Patienten eine zentrale Rolle.

Durch die primäre Schädigung wird ein komplexes Netzwerk an sekundären Schädigungsmechanismen initiiert. Der Zusammenbruch der Gewebs- und Gefäßintegrität führt dazu, dass exzitotoxische Substanzen freigesetzt werden. Es kommt zu einer lokalen Energiedepletion und zu einer dysfunktionalen BHS mit konsekutivem Hirnödem. Die gleichzeitig einsetzenden Inflammationsprozesse weiten die Ödemformation und den Zelluntergang aus, sodass die sich gegenseitig verstärkenden Prozesse schließlich in einem globalen Hirnödem mit globaler Minderperfusion münden können. Insbesondere die durch Propofolgabe induzierte p75NTR vermittelte Neuroapoptose konnte in verschiedenen Studien zu einer drastischen Läsionsvolumenvergrößerung beitragen. Hierbei spielt die pathologische Induktion des p75NTR 24 nach SHT eine entscheidende Rolle.

In dieser Arbeit sollte der Einfluss der GABA_A-β3 vermittelten Transmission des Propofols auf das SHT untersucht werden, um die Verbindung einer GABAergen Stimulation und der verstärkten Neuroapoptose zu präzisieren. Hierfür wurden Mäuse benutzt, deren Propofolbindungsstelle an der β3-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors so mutiert ist, dass der Rezeptor noch intakt ist, es aber nicht mehr zu einer klinisch wirksamen Bindung von Propofol kommen kann. Die Propofolgabe 24 h nach SHT führte in dieser Arbeit nicht zu einer Läsionszunahme und widerspricht damit augenscheinlich den Vorergebnissen. Die Ergebnisse der Studie in sich sind aber konsistent. Weder konnte Propofol, noch die Hemmung der Propofolbindung zu einer relevanten Veränderung des Läsionsvolumens, der Apoptosemarker, des funktionellen Outcomes oder der Sekundärschädigungsmechanismen führen.

Hieraus ergibt sich, dass verschiedene Sekundärschädigungsmechanismen zu verschiedenen Zeitpunkten beeinflusst werden können. Die fehlende Wirkung der Propofolintervention auf die Inflammation und die BHS-Integrität deutet darauf hin, dass das therapeutische Fenster hierfür nicht

bis 24 h nach SHT reicht, sondern eine Propofolgabe weitaus früher erfolgen muss. Die Modulation des proinflammatorischen Zytokins IL-6 nach Inhibition der Propofolbindungsstelle zeigt, dass neben der GABAergen Transmission weitere Rezeptorsignalkaskaden durch Propofol aktiviert werden und demonstriert die Komplexität der Wirkweise des Anästhetikums.

Die Ergebnisse deuten zudem darauf hin, dass Propofol nicht bei allen Individuen eine neurotoxische Wirkung entfaltet, sondern bestimmte Grundvoraussetzungen gegeben sein müssen. Besonders auffällig ist die Tatsache, dass das SHT an der benutzten Mauslinie nicht zu einer Induktion des p75NTR führte. Vordaten von Sebastiani et al. zeigen aber die Abhängigkeit der Propofoltoxizität von einer Hochregulation des p75NTR. Diese Studie liefert ein weiteres Indiz, dass die hohe Rezeptordichte des p75NTR eine notwendige Voraussetzung für die Propofoltoxizität ist.

Humandaten zeigen jedoch, dass p75NTR im Menschen nach neuronaler Schädigung ebenfalls hochreguliert ist. Daher müssen weitere Experimente mit Modellorganismen folgen, die der humanen p75NTR-Regulation gleichen, um den Einfluss der β 3-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors auf die p75NTR vermittelte Toxizität zu klären.

Zusammenfassend zeigt Propofol im komplexen Schädigungsbild des SHT ein sehr dynamisches Wirkspektrum auf die Läsionsgröße, und es werden zunehmend individuelle, auf molekularen Markern beruhende Entscheidungen nötig sein, um auch weiterhin das Outcome der Traumapatienten positiv zu beeinflussen.

7. Literatur

1. Firsching R, Rickels E, Mauer UM, Sakowitz OW, Messing-Jünger M, Engelhard K et al. Guidelines for the Treatment of Head Injury in Adults. *J Neurol Surg A Cent Eur Neurosurg* 2017; 78(5):478–87. doi: 10.1055/s-0037-1599239.
2. Abelson-Mitchell N. Epidemiology and prevention of head injuries: literature review. *J Clin Nurs* 2008; 17(1):46–57. doi: 10.1111/j.1365-2702.2007.01941.x.
3. Werner C, Engelhard K. Pathophysiology of traumatic brain injury. *Br J Anaesth* 2007; 99(1):4–9. doi: 10.1093/bja/aem131.
4. Chesnut RM, Marshall LF, Klauber MR, Blunt BA, Baldwin N, Eisenberg HM et al. The role of secondary brain injury in determining outcome from severe head injury. *J Trauma* 1993; 34(2):216–22. doi: 10.1097/00005373-199302000-00006.
5. Greve MW, Zink BJ. Pathophysiology of traumatic brain injury. *Mt Sinai J Med* 2009; 76(2):97–104. doi: 10.1002/msj.20104.
6. Bernhard M, Matthes G, Kanz KG, Waydhas C, Fischbacher M, Fischer M et al. Notfallnarkose, Atemwegsmanagement und Beatmung beim Polytrauma. Hintergrund und Kernaussagen der interdisziplinären S3-Leitlinie Polytrauma. *Anaesthesist* 2011; 60(11):1027–40. doi: 10.1007/s00101-011-1957-1.
7. Chawla N, Boateng A, Deshpande R. Procedural sedation in the ICU and emergency department. *Curr Opin Anaesthesiol* 2017; 30(4):507–12. doi: 10.1097/ACO.0000000000000487.
8. Sebastiani A, Gözl C, Werner C, Schäfer MKE, Engelhard K, Thal SC. Proneurotrophin Binding to P75 Neurotrophin Receptor (P75ntr) Is Essential for Brain Lesion Formation and Functional Impairment after Experimental Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma* 2015; 32(20):1599–607. doi: 10.1089/neu.2014.3751.
9. Sebastiani A, Granold M, Ditter A, Sebastiani P, Golz C, Pottker B et al. Posttraumatic Propofol Neurotoxicity Is Mediated via the Pro-Brain-Derived Neurotrophic Factor-p75 Neurotrophin Receptor Pathway in Adult Mice. *Crit Care Med* 2016; 44(2):e70-82. doi: 10.1097/CCM.0000000000001284.
10. Rickels E, Wild K von, Wenzlaff P. Versorgung Schädel-Hirn-Verletzter in Deutschland. *Unfallchirurg* 2011; 114(5):417–23. doi: 10.1007/s00113-010-1872-y.
11. Gennarelli TA, Champion HR, Sacco WJ, Copes WS, Alves WM. Mortality of patients with head injury and extracranial injury treated in trauma centers. *J Trauma* 1989; 29(9):1193-201; discussion 1201-2. doi: 10.1097/00005373-198909000-00002.
12. Tagliaferri F, Compagnone C, Korsic M, Servadei F, Kraus J. A systematic review of brain injury epidemiology in Europe. *Acta Neurochir (Wien)* 2006; 148(3):255-68; discussion 268. doi: 10.1007/s00701-005-0651-y.
13. Striebel HW. Nebenerkrankungen, fachspezifische Anästhesie, Aufwachraum, lebensrettende Sofortmaßnahmen, Anhang: Mit 318 Tabellen. 3., vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Schattauer; 2014. (Die AnästhesieGrundlagen und Praxis / Hans Walter Striebel. Mit einem Geleitwort von Klaus Eyrich ; Bd. 2).

14. Polinder S, Meering WJ, van Baar ME, Toet H, Mulder S, van Beeck EF. Cost estimation of injury-related hospital admissions in 10 European countries. *J Trauma* 2005; 59(6):1283-90; discussion 1290-1. doi: 10.1097/01.ta.0000195998.11304.5b.
15. Polinder S, Meering WJ, Mulder S, Petridou E, van Beeck E. Assessing the burden of injury in six European countries. *Bull World Health Organ* 2007; 85(1):27-34. doi: 10.2471/blt.06.030973.
16. Menon DK, Schwab K, Wright DW, Maas AI. Position statement: definition of traumatic brain injury. *Arch Phys Med Rehabil* 2010; 91(11):1637-40. doi: 10.1016/j.apmr.2010.05.017.
17. Ginsburg J, Huff JS. StatPearls: Closed Head Trauma. Treasure Island (FL); 2021.
18. Teasdale G, Jennett B. Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. *Lancet* 1974; 2(7872):81-4. doi: 10.1016/s0140-6736(74)91639-0.
19. Teasdale G, Maas A, Lecky F, Manley G, Stocchetti N, Murray G. The Glasgow Coma Scale at 40 years: standing the test of time. *Lancet Neurol* 2014; 13(8):844-54. doi: 10.1016/S1474-4422(14)70120-6.
20. Lighthall JW. Controlled cortical impact: a new experimental brain injury model. *J Neurotrauma* 1988; 5(1):1-15. doi: 10.1089/neu.1988.5.1.
21. Xiong Y, Mahmood A, Chopp M. Animal models of traumatic brain injury. *Nat Rev Neurosci* 2013; 14(2):128-42. doi: 10.1038/nrn3407.
22. Smith DH, Soares HD, Pierce JS, Perlman KG, Saatman KE, Meaney DF et al. A model of parasagittal controlled cortical impact in the mouse: Cognitive and histopathologic effects. *J Neurotrauma* 1995; 12(2):169-78. doi: 10.1089/neu.1995.12.169.
23. Dixon CE, Clifton GL, Lighthall JW, Yaghami AA, Hayes RL. A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat. *J Neurosci Methods* 1991; 39(3):253-62. doi: 10.1016/0165-0270(91)90104-8.
24. Lighthall JW, Dixon CE, Anderson TE. Experimental models of brain injury. *J Neurotrauma* 1989; 6(2):83-97. doi: 10.1089/neu.1989.6.83.
25. Osier ND, Dixon CE. The Controlled Cortical Impact Model: Applications, Considerations for Researchers, and Future Directions. *Front Neurol* 2016; 7:134. doi: 10.3389/fneur.2016.00134.
26. Alder J, Fujioka W, Lifshitz J, Crockett DP, Thakker-Varia S. Lateral fluid percussion: Model of traumatic brain injury in mice. *J Vis Exp* 2011; (54). doi: 10.3791/3063.
27. Striebel HW. Die Anästhesie. 3., vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Schattauer; 2014.
28. Motsch J, Roggenbach J. Propofol-Infusionssyndrom. *Anaesthesist* 2004; 53(10):1009-22; quiz 1023-4. doi: 10.1007/s00101-004-0756-3.
29. Adembri C, Venturi L, Pellegrini-Giampietro DE. Neuroprotective effects of propofol in acute cerebral injury. *CNS Drug Rev* 2007; 13(3):333-51. doi: 10.1111/j.1527-3458.2007.00015.x.
30. Kanto J, Gepts E. Pharmacokinetic implications for the clinical use of propofol. *Clin Pharmacokinet* 1989; 17(5):308-26. doi: 10.2165/00003088-198917050-00002.
31. Bushuven S, Heise D. Propofol up2date. Teil 1: Geschichte und pharmakologische Charakteristika. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 2013; 48(6):378-85. doi: 10.1055/s-0033-1349000.

32. Freissmuth M, Offermanns S, Böhm S. *Pharmakologie und Toxikologie: Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie*. 3., überarb. Auflage 2020. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2020.
33. Yip GMS, Chen Z-W, Edge CJ, Smith EH, Dickinson R, Hohenester E et al. A propofol binding site on mammalian GABAA receptors identified by photolabeling. *Nature chemical biology* 2013; 9(11):715–20. doi: 10.1038/nchembio.1340.
34. Jayakar SS, Dailey WP, Eckenhoff RG, Cohen JB. Identification of propofol binding sites in a nicotinic acetylcholine receptor with a photoreactive propofol analog. *The Journal of biological chemistry* 2013; 288(9):6178–89. doi: 10.1074/jbc.M112.435909.
35. Jayakar SS, Zhou X, Chiara DC, Dostalova Z, Savechenkov PY, Bruzik KS et al. Multiple propofol-binding sites in a γ -aminobutyric acid type A receptor (GABAAR) identified using a photoreactive propofol analog. *The Journal of biological chemistry* 2014; 289(40):27456–68. doi: 10.1074/jbc.M114.581728.
36. Kotani Y, Shimazawa M, Yoshimura S, Iwama T, Hara H. The experimental and clinical pharmacology of propofol, an anesthetic agent with neuroprotective properties. *CNS Neurosci Ther* 2008; 14(2):95–106. doi: 10.1111/j.1527-3458.2008.00043.x.
37. Hauer D, Ratano P, Morena M, Scaccianoce S, Briegel I, Palmery M et al. Propofol enhances memory formation via an interaction with the endocannabinoid system. *Anesthesiology* 2011; 114(6):1380–8. doi: 10.1097/ALN.0b013e31821c120e.
38. Dolin SJ, Smith MB, Soar J, Morris PJ. Does glycine antagonism underlie the excitatory effects of methohexitone and propofol? *Br J Anaesth* 1992; 68(5):523–6. doi: 10.1093/bja/68.5.523.
39. Lian Q, Wang B, Zhou W, Jin S, Xu L, Huang Q et al. Self-administration of propofol is mediated by dopamine D1 receptors in nucleus accumbens in rats. *Neuroscience* 2013; 231:373–83. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.11.002.
40. Fujii Y, Itakura M. Comparison of propofol, droperidol, and metoclopramide for prophylaxis of postoperative nausea and vomiting after breast cancer surgery: A prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study in Japanese patients. *Clin Ther* 2008; 30(11):2024–9. doi: 10.1016/j.clinthera.2008.11.011.
41. Borgeat A, Stirnemann HR. Antiemetische Wirkung von Propofol. *Anaesthesist* 1998; 47(11):918–24. doi: 10.1007/s001010050643.
42. Larsen R, Fink T, Müller-Wolff T. Analgesie, Sedierung, Muskelrelaxierung und Delirbehandlung. *Anästhesie und Intensivmedizin für die Fachpflege*:608–17. doi: 10.1007/978-3-662-50444-4_44.
43. Schneemilch C, Schiltz K, Meinshausen E, Hachenberg T. Sexualbezogene Halluzinationen und Träume unter Anästhesie und Sedierung: Medizinische und rechtliche Aspekte. *Anaesthesist* 2012; 61(3):234–41. doi: 10.1007/s00101-012-1999-z.
44. Claassen J, Hirsch LJ, Emerson RG, Mayer SA. Treatment of refractory status epilepticus with pentobarbital, propofol, or midazolam: A systematic review. *Epilepsia* 2002; 43(2):146–53. doi: 10.1046/j.1528-1157.2002.28501.x.

45. Rossetti AO, Milligan TA, Vulliémoz S, Michaelides C, Bertschi M, Lee JW. A randomized trial for the treatment of refractory status epilepticus. *Neurocrit Care* 2011; 14(1):4–10. doi: 10.1007/s12028-010-9445-z.
46. Li M, Mei W, Wang P, Yu Y, Qian W, Zhang ZG et al. Propofol reduces early post-operative pain after gynecological laparoscopy. *Acta Anaesthesiol Scand* 2012; 56(3):368–75. doi: 10.1111/j.1399-6576.2011.02603.x.
47. Cheng SS, Yeh J, Flood P. Anesthesia matters: Patients anesthetized with propofol have less postoperative pain than those anesthetized with isoflurane. *Anesth Analg* 2008; 106(1):264–9, table of contents. doi: 10.1213/01.ane.0000287653.77372.d9.
48. Nadeson R, Goodchild CS. Antinociceptive properties of propofol: involvement of spinal cord gamma-aminobutyric acid(A) receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 282(3):1181–6.
49. Jewett BA, Gibbs LM, Tarasiuk A, Kendig JJ. Propofol and barbiturate depression of spinal nociceptive neurotransmission. *Anesthesiology* 1992; 77(6):1148–54. doi: 10.1097/00000542-199212000-00016.
50. Soltész S, Silomon M, Gräf G, Mencke T, Boulaadass S, Molter GP. Effect of a 0.5% dilution of propofol on pain on injection during induction of anesthesia in children. *Anesthesiology* 2007; 106(1):80–4. doi: 10.1097/00000542-200701000-00015.
51. Kunitz O, Lösing R, Schulz-Stübner S, Haaf-Von-Below S, Rossaint R, Kuhlen R. Propofol-LCT versus Propofol-MCT/LCT mit oder ohne Lidocain - Vergleichende Untersuchung zum Injektionsschmerz. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 2004; 39(1):10–4. doi: 10.1055/s-2004-815712.
52. Roehm KD, Piper SN, Maleck WH, Boldt J. Prevention of propofol-induced injection pain by remifentanyl: a placebo-controlled comparison with lidocaine. *Anaesthesia* 2003; 58(2):165–70. doi: 10.1046/j.1365-2044.2003.02964_2.x.
53. Muzi M, Berens RA, Kampine JP, Ebert TJ. Venodilation contributes to propofol-mediated hypotension in humans. *Anesth Analg* 1992; 74(6):877–83. doi: 10.1213/00000539-199206000-00017.
54. Jor O, Maca J, Koutna J, Gemrotova M, Vymazal T, Litschmannova M et al. Hypotension after induction of general anesthesia: occurrence, risk factors, and therapy. A prospective multicentre observational study. *J Anesth* 2018; 32(5):673–80. doi: 10.1007/s00540-018-2532-6.
55. Liu Q, Kong A, Chen R, Qian C, Liu S, Sun B et al. Propofol and arrhythmias: Two sides of the coin. *Acta Pharmacol Sin* 2011; 32(6):817–23. doi: 10.1038/aps.2011.42.
56. Fassl J, High KM, Stephenson ER, Yarotskyy V, Elmslie KS. The intravenous anesthetic propofol inhibits human L-type calcium channels by enhancing voltage-dependent inactivation. *J Clin Pharmacol* 2011; 51(5):719–30. doi: 10.1177/0091270010373098.
57. Larsen B, Büch U, Wilhelm W, Larsen R. Wirkungen von Propofol und Fentanyl auf die Baroreflexaktivität geriatrischer Patienten. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 1994; 29(7):408–12. doi: 10.1055/s-2007-996771.

58. Jonsson MM, Lindahl SGE, Eriksson LI. Effect of propofol on carotid body chemosensitivity and cholinergic chemotransduction. *Anesthesiology* 2005; 102(1):110–6. doi: 10.1097/00000542-200501000-00019.
59. Diaz JH, Prabhakar A, Urman RD, Kaye AD. Propofol infusion syndrome: A retrospective analysis at a level 1 trauma center. *Crit Care Res Pract* 2014; 2014:346968. doi: 10.1155/2014/346968.
60. Pothineni NVKC, Hayes K, Deshmukh A, Paydak H. Propofol-related infusion syndrome: Rare and fatal. *Am J Ther* 2015; 22(2):e33-5. doi: 10.1097/MJT.0b013e318296f165.
61. Fong JJ, Sylvia L, Ruthazer R, Schumaker G, Kcomt M, Devlin JW. Predictors of mortality in patients with suspected propofol infusion syndrome. *Crit Care Med* 2008; 36(8):2281–7. doi: 10.1097/CCM.0b013e318180c1eb.
62. Herdegen T. *Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie. 2., aktualis Aufl.* Stuttgart: Thieme; 2010.
63. Rossaint JP, Rossaint R, Weis J, Fries M, Rex S, Coburn MM. Propofol: neuroprotection in an in vitro model of traumatic brain injury. Aachen: Universitätsbibliothek der RWTH Aachen; 2009.
64. Fan Y, Zhu S, Wang J, Zhao Y, Wang X. Propofol protects against oxygen/glucose deprivation-induced cell injury via gap junction inhibition in astrocytes. *Mol Med Rep* 2020; 22(4):2896–904. doi: 10.3892/mmr.2020.11357.
65. Wilson JX, Gelb AW. Free radicals, antioxidants, and neurologic injury: possible relationship to cerebral protection by anesthetics. *J Neurosurg Anesthesiol* 2002; 14(1):66–79. doi: 10.1097/00008506-200201000-00014.
66. Ding Z, Zhang J, Xu J, Sheng G, Huang G. Propofol administration modulates AQP-4 expression and brain edema after traumatic brain injury. *Cell Biochem Biophys* 2013; 67(2):615–22. doi: 10.1007/s12013-013-9549-0.
67. Zhang Q, Yu Y, Lu Y, Yue H. Systematic review and meta-analysis of propofol versus barbiturates for controlling refractory status epilepticus. *BMC Neurol* 2019; 19(1):55. doi: 10.1186/s12883-019-1281-y.
68. Engelhard K, Werner C, Eberspächer E, Pape M, Stegemann U, Kellermann K et al. Influence of propofol on neuronal damage and apoptotic factors after incomplete cerebral ischemia and reperfusion in rats: a long-term observation. *Anesthesiology* 2004; 101(4):912–7. doi: 10.1097/00000542-200410000-00016.
69. Karen T, Schlager GW, Bendix I, Sifringer M, Herrmann R, Pantazis C et al. Effect of propofol in the immature rat brain on short- and long-term neurodevelopmental outcome. *PLoS One* 2013; 8(5):e64480. doi: 10.1371/journal.pone.0064480.
70. Bercker S, Bert B, Bittigau P, Felderhoff-Müser U, Bühner C, Ikonomidou C et al. Neurodegeneration in newborn rats following propofol and sevoflurane anesthesia. *Neurotox Res* 2009; 16(2):140–7. doi: 10.1007/s12640-009-9063-8.
71. Fredriksson A, Pontén E, Gordh T, Eriksson P. Neonatal exposure to a combination of N-methyl-D-aspartate and gamma-aminobutyric acid type A receptor anesthetic agents potentiates apoptotic neurodegeneration and persistent behavioral deficits. *Anesthesiology* 2007; 107(3):427–36. doi: 10.1097/01.anes.0000278892.62305.9c.

72. Thal SC, Timaru-Kast R, Wilde F, Merk P, Johnson F, Frauenknecht K et al. Propofol impairs neurogenesis and neurologic recovery and increases mortality rate in adult rats after traumatic brain injury. *Crit Care Med* 2014; 42(1):129–41. doi: 10.1097/CCM.0b013e3182a639fd.
73. Underwood CK, Coulson EJ. The p75 neurotrophin receptor. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40(9):1664–8. doi: 10.1016/j.biocel.2007.06.010.
74. Gölz MC. Untersuchungen zur Rolle des p75 Neurotrophinrezeptors nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma in der Maus [Dissertation]. Gießen: Universitätsbibliothek; VVB LAUFERSWEILER Verlag; 2016.
75. Dumps C. Medikamente zur intravenösen Narkoseinduktion: Barbiturate. *Anaesthesist* 2018; 67(7):535–52.
76. Wilberger JE, Cantella D. High-dose barbiturates for intracranial pressure control. *New Horiz* 1995; 3(3):469–73.
77. Roberts I, Sydenham E. Barbiturates for acute traumatic brain injury. *Cochrane Database Syst Rev* 2012; 12:CD000033. doi: 10.1002/14651858.CD000033.pub2.
78. Halbeck E. Medikamente zur intravenösen Narkoseinduktion: Ketamin, Midazolam und Synopsis der gängigen Hypnotika. *Anaesthesist* 2018; 67(8):617–34.
79. Rossaint R, Werner C, Zwißler B. Die Anästhesiologie. 4. Auflage; 2019. (Springer Reference Medizin).
80. Papazian L, Albanese J, Thirion X, Perrin G, Durbec O, Martin C. Effect of bolus doses of midazolam on intracranial pressure and cerebral perfusion pressure in patients with severe head injury. *Br J Anaesth* 1993; 71(2):267–71. doi: 10.1093/bja/71.2.267.
81. Oddo M. Optimizing sedation in patients with acute brain injury. *Critical care* 2016; 20(1):1–11.
82. Dumps C. Medikamente zur intravenösen Narkoseinduktion: Etomidat. *Anaesthesist* 2017; 66(12):969–80.
83. Forman SA. Clinical and molecular pharmacology of etomidate. *Anesthesiology* 2011; 114(3):695–707. doi: 10.1097/ALN.0b013e3181ff72b5.
84. Moss E, Powell D, Gibson RM, McDowall DG. Effect of etomidate on intracranial pressure and cerebral perfusion pressure. *Br J Anaesth* 1979; 51(4):347–52. doi: 10.1093/bja/51.4.347.
85. Malerba G, Romano-Girard F, Cravoisy A, Dousset B, Nace L, Lévy B et al. Risk factors of relative adrenocortical deficiency in intensive care patients needing mechanical ventilation. *Intensive Care Med* 2005; 31(3):388–92. doi: 10.1007/s00134-004-2550-8.
86. Bloomfield R, Noble DW. Etomidate and fatal outcome--even a single bolus dose may be detrimental for some patients. *Br J Anaesth* 2006; 97(1):116–7. doi: 10.1093/bja/ael124.
87. Adams HA, Werner C. Vom Razemat zum Eutomer: (S)-Ketamin. Renaissance einer Substanz? *Anaesthesist* 1997; 46(12):1026–42. doi: 10.1007/s001010050503.
88. Gorlin AW, Rosenfeld DM, Ramakrishna H. Intravenous sub-anesthetic ketamine for perioperative analgesia. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol* 2016; 32(2):160–7. doi: 10.4103/0970-9185.182085.

89. White PF, Way WL, Trevor AJ. Ketamine--its pharmacology and therapeutic uses. *Anesthesiology* 1982; 56(2):119–36. doi: 10.1097/00000542-198202000-00007.
90. Himmelseher S, Pfenninger E. Die klinische Anwendung von S-(+)-Ketamin--eine Standortbestimmung. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 1998; 33(12):764–70. doi: 10.1055/s-2007-994851.
91. Wyte SR, Shapiro HM, Turner P, Harris AB. Ketamine-induced intracranial hypertension. *Anesthesiology* 1972; 36(2):174–6. doi: 10.1097/00000542-197202000-00021.
92. Shapiro HM, Wyte SR, Harris AB. Ketamine anaesthesia in patients with intracranial pathology. *Br J Anaesth* 1972; 44(11):1200–4. doi: 10.1093/bja/44.11.1200.
93. Chang Y, Lee J-J, Hsieh C-Y, Hsiao G, Chou D-S, Sheu J-R. Inhibitory effects of ketamine on lipopolysaccharide-induced microglial activation. *Mediators Inflamm* 2009; 2009:705379. doi: 10.1155/2009/705379.
94. Hudetz JA, Pagel PS. Neuroprotection by ketamine: a review of the experimental and clinical evidence. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2010; 24(1):131–42. doi: 10.1053/j.jvca.2009.05.008.
95. Morris C, Perris A, Klein J, Mahoney P. Anaesthesia in haemodynamically compromised emergency patients: does ketamine represent the best choice of induction agent? *Anaesthesia* 2009; 64(5):532–9. doi: 10.1111/j.1365-2044.2008.05835.x.
96. Bovill JG. Inhalation anaesthesia: from diethyl ether to xenon. *Handb Exp Pharmacol* 2008; (182):121–42. doi: 10.1007/978-3-540-74806-9_6.
97. Tempel G, Brosch R, Kolb E. Inhalationsanästhetika heute. *Deutsche medizinische Wochenschrift* 1988; 113(25):1034–7.
98. Prasser C, Hobbhahn J. Inhalationsanästhetika. *Anästhesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie* 2001; 36(08):477–513.
99. Scheller MS, Tateishi A, Drummond JC, Zornow MH. The effects of sevoflurane on cerebral blood flow, cerebral metabolic rate for oxygen, intracranial pressure, and the electroencephalogram are similar to those of isoflurane in the rabbit. *Anesthesiology* 1988; 68(4):548–51. doi: 10.1097/00000542-198804000-00012.
100. He H, Liu W, Zhou Y, Liu Y, Weng P, Li Y et al. Sevoflurane post-conditioning attenuates traumatic brain injury-induced neuronal apoptosis by promoting autophagy via the PI3K/AKT signaling pathway. *Drug Des Devel Ther* 2018; 12:629–38. doi: 10.2147/DDDT.S158313.
101. Jiang M, Sun L, Feng D-X, Yu Z-Q, Gao R, Sun Y-Z et al. Neuroprotection provided by isoflurane pre-conditioning and post-conditioning. *Med Gas Res* 2017; 7(1):48–55. doi: 10.4103/2045-9912.202910.
102. Li H, Yin J, Li L, Deng J, Feng C, Zuo Z. Isoflurane postconditioning reduces ischemia-induced nuclear factor- κ B activation and interleukin 1β production to provide neuroprotection in rats and mice. *Neurobiol Dis* 2013; 54:216–24. doi: 10.1016/j.nbd.2012.12.014.
103. Löffler G, Hrsg. *Biochemie und Pathobiochemie: Mit 218 Tabellen. 7., völlig neu bearb. Aufl.* Berlin, Heidelberg, New York, Hongkong, London, Mailand, Paris, Tokio: Springer; 2002. (Springer-Lehrbuch).
104. Zhu S. Structure of a human synaptic GABAA receptor. *Nature <London>* 2018; 559(7712):67–72.

105. Knoflach F, Hernandez M-C, Bertrand D. GABAA receptor-mediated neurotransmission: Not so simple after all. *Biochem Pharmacol* 2016; 115:10–7. doi: 10.1016/j.bcp.2016.03.014.
106. Olsen RW. Analysis of γ -aminobutyric acid (GABA) type A receptor subtypes using isosteric and allosteric ligands. *Neurochem Res* 2014; 39(10):1924–41. doi: 10.1007/s11064-014-1382-3.
107. Jurd R, Arras M, Lambert S, Drexler B, Siegwart R, Crestani F et al. General anesthetic actions in vivo strongly attenuated by a point mutation in the GABA(A) receptor beta3 subunit. *FASEB J* 2003; 17(2):250–2. doi: 10.1096/fj.02-0611fje.
108. Jeremitsky E, Omert L, Dunham CM, Protetch J, Rodriguez A. Harbingers of poor outcome the day after severe brain injury: hypothermia, hypoxia, and hypoperfusion. *J Trauma* 2003; 54(2):312–9. doi: 10.1097/01.TA.0000037876.37236.D6.
109. Miller JD, Sweet RC, Narayan R, Becker DP. Early insults to the injured brain. *JAMA* 1978; 240(5):439–42.
110. Rutland-Brown W, Langlois JA, Thomas KE, Xi YL. Incidence of traumatic brain injury in the United States, 2003. *J Head Trauma Rehabil* 2006; 21(6):544–8. doi: 10.1097/00001199-200611000-00009.
111. Bouma GJ, Muizelaar JP. Cerebral blood flow, cerebral blood volume, and cerebrovascular reactivity after severe head injury. *J Neurotrauma* 1992; 9 Suppl 1:S333-48.
112. Dietrich WD, Alonso O, Busto R, Prado R, Zhao W, Dewanjee MK et al. Posttraumatic cerebral ischemia after fluid percussion brain injury: an autoradiographic and histopathological study in rats. *Neurosurgery* 1998; 43(3):585-93; discussion 593-4. doi: 10.1097/00006123-199809000-00105.
113. Lee SM, Wong MD, Samii A, Hovda DA. Evidence for energy failure following irreversible traumatic brain injury. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 893:337–40. doi: 10.1111/j.1749-6632.1999.tb07849.x.
114. Dorsett CR, McGuire JL, DePasquale EAK, Gardner AE, Floyd CL, McCullumsmith RE. Glutamate Neurotransmission in Rodent Models of Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma* 2017; 34(2):263–72. doi: 10.1089/neu.2015.4373.
115. Arundine M, Tymianski M. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium* 2003; 34(4-5):325–37. doi: 10.1016/s0143-4160(03)00141-6.
116. Corps KN, Roth TL, McGavern DB. Inflammation and neuroprotection in traumatic brain injury. *JAMA Neurol* 2015; 72(3):355–62. doi: 10.1001/jamaneurol.2014.3558.
117. Simon DW, McGeachy MJ, Bayir H, Clark RSB, Loane DJ, Kochanek PM. The far-reaching scope of neuroinflammation after traumatic brain injury. *Nat Rev Neurol* 2017; 13(9):572. doi: 10.1038/nrneurol.2017.116.
118. Jin X, Ishii H, Bai Z, Itokazu T, Yamashita T. Temporal changes in cell marker expression and cellular infiltration in a controlled cortical impact model in adult male C57BL/6 mice. *PLoS One* 2012; 7(7):e41892. doi: 10.1371/journal.pone.0041892.
119. Wang G, Zhang J, Hu X, Zhang L, Mao L, Jiang X et al. Microglia/macrophage polarization dynamics in white matter after traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 2013; 33(12):1864–74. doi: 10.1038/jcbfm.2013.146.

120. Loane DJ, Kumar A. Microglia in the TBI brain: The good, the bad, and the dysregulated. *Exp Neurol* 2016; 275 Pt 3:316–27. doi: 10.1016/j.expneurol.2015.08.018.
121. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 2012; 122(3):787–95. doi: 10.1172/JCI59643.
122. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 2003; 3(1):23–35. doi: 10.1038/nri978.
123. Colton CA. Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. *J Neuroimmune Pharmacol* 2009; 4(4):399–418. doi: 10.1007/s11481-009-9164-4.
124. Madan S, Kron B, Jin Z, Al Shamy G, Campeau PM, Sun Q et al. Arginase overexpression in neurons and its effect on traumatic brain injury. *Mol Genet Metab* 2018; 125(1-2):112–7. doi: 10.1016/j.ymgme.2018.07.007.
125. Turtzo LC, Lescher J, Janes L, Dean DD, Budde MD, Frank JA. Macrophagic and microglial responses after focal traumatic brain injury in the female rat. *J Neuroinflammation* 2014; 11:82. doi: 10.1186/1742-2094-11-82.
126. Loane DJ, Kumar A, Stoica BA, Cabatbat R, Faden AI. Progressive neurodegeneration after experimental brain trauma: association with chronic microglial activation. *J Neuropathol Exp Neurol* 2014; 73(1):14–29. doi: 10.1097/NEN.000000000000021.
127. Johnson VE, Stewart JE, Begbie FD, Trojanowski JQ, Smith DH, Stewart W. Inflammation and white matter degeneration persist for years after a single traumatic brain injury. *Brain* 2013; 136(Pt 1):28–42. doi: 10.1093/brain/aws322.
128. Gentleman SM, Leclercq PD, Moyes L, Graham DI, Smith C, Griffin WST et al. Long-term intracerebral inflammatory response after traumatic brain injury. *Forensic Sci Int* 2004; 146(2-3):97–104. doi: 10.1016/j.forsciint.2004.06.027.
129. Gregersen R, Lambertsen K, Finsen B. Microglia and macrophages are the major source of tumor necrosis factor in permanent middle cerebral artery occlusion in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000; 20(1):53–65. doi: 10.1097/00004647-200001000-00009.
130. Dziejulska D, Mossakowski MJ. Cellular expression of tumor necrosis factor α and its receptors in human ischemic stroke. *Clin Neuropathol* 2003; 22(1):35–40.
131. Sairanen T, Carpén O, Karjalainen-Lindsberg ML, Paetau A, Turpeinen U, Kaste M et al. Evolution of cerebral tumor necrosis factor- α production during human ischemic stroke. *Stroke* 2001; 32(8):1750–8. doi: 10.1161/01.str.32.8.1750.
132. Lambertsen KL, Meldgaard M, Ladeby R, Finsen B. A quantitative study of microglial-macrophage synthesis of tumor necrosis factor during acute and late focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005; 25(1):119–35. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600014.
133. Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF- κ B activation. *Cell* 1995; 81(4):495–504. doi: 10.1016/0092-8674(95)90070-5.
134. Olmos G, Lladó J. Tumor necrosis factor α : a link between neuroinflammation and excitotoxicity. *Mediators Inflamm* 2014; 2014:861231. doi: 10.1155/2014/861231.

135. Mir M, Tolosa L, Asensio VJ, Lladó J, Olmos G. Complementary roles of tumor necrosis factor alpha and interferon gamma in inducible microglial nitric oxide generation. *J Neuroimmunol* 2008; 204(1-2):101–9. doi: 10.1016/j.jneuroim.2008.07.002.
136. Fischer R, Maier O, Siegemund M, Wajant H, Scheurich P, Pfizenmaier K. A TNF receptor 2 selective agonist rescues human neurons from oxidative stress-induced cell death. *PLoS One* 2011; 6(11):e27621. doi: 10.1371/journal.pone.0027621.
137. Arnett HA, Mason J, Marino M, Suzuki K, Matsushima GK, Ting JP. TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Nat Neurosci* 2001; 4(11):1116–22. doi: 10.1038/nn738.
138. Kuno R, Wang J, Kawanokuchi J, Takeuchi H, Mizuno T, Suzumura A. Autocrine activation of microglia by tumor necrosis factor-alpha. *J Neuroimmunol* 2005; 162(1-2):89–96. doi: 10.1016/j.jneuroim.2005.01.015.
139. Mortezaee K, Khanlarkhani N, Beyer C, Zendedel A. Inflammasome: Its role in traumatic brain and spinal cord injury. *J Cell Physiol* 2018; 233(7):5160–9. doi: 10.1002/jcp.26287.
140. Dinarello CA. Blocking IL-1 in systemic inflammation. *J Exp Med* 2005; 201(9):1355–9. doi: 10.1084/jem.20050640.
141. Brough D, Rothwell NJ. Caspase-1-dependent processing of pro-interleukin-1beta is cytosolic and precedes cell death. *J Cell Sci* 2007; 120(Pt 5):772–81. doi: 10.1242/jcs.03377.
142. Perregaux DG, McNiff P, Laliberte R, Conklyn M, Gabel CA. ATP acts as an agonist to promote stimulus-induced secretion of IL-1 beta and IL-18 in human blood. *J Immunol* 2000; 165(8):4615–23. doi: 10.4049/jimmunol.165.8.4615.
143. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* 2009; 27:519–50. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132612.
144. Toda Y, Tsukada J, Misago M, Kominato Y, Auron PE, Tanaka Y. Autocrine induction of the human pro-IL-1beta gene promoter by IL-1beta in monocytes. *J Immunol* 2002; 168(4):1984–91. doi: 10.4049/jimmunol.168.4.1984.
145. O'Banion MK, Miller JC, Chang JW, Kaplan MD, Coleman PD. Interleukin-1 beta induces prostaglandin G/H synthase-2 (cyclooxygenase-2) in primary murine astrocyte cultures. *J Neurochem* 1996; 66(6):2532–40. doi: 10.1046/j.1471-4159.1996.66062532.x.
146. Jana M, Anderson JA, Saha RN, Liu X, Pahan K. Regulation of inducible nitric oxide synthase in proinflammatory cytokine-stimulated human primary astrocytes. *Free Radic Biol Med* 2005; 38(5):655–64. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.11.021.
147. Tosato G, Jones KD. Interleukin-1 induces interleukin-6 production in peripheral blood monocytes. *Blood* 1990; 75(6):1305–10.
148. Holmin S, Mathiesen T. Intracerebral administration of interleukin-1beta and induction of inflammation, apoptosis, and vasogenic edema. *J Neurosurg* 2000; 92(1):108–20. doi: 10.3171/jns.2000.92.1.0108.
149. Clausen F, Hånell A, Björk M, Hillered L, Mir AK, Gram H et al. Neutralization of interleukin-1beta modifies the inflammatory response and improves histological and cognitive outcome following

- traumatic brain injury in mice. *Eur J Neurosci* 2009; 30(3):385–96. doi: 10.1111/j.1460-9568.2009.06820.x.
150. Kishimoto T. Factors affecting B-cell growth and differentiation. *Annu Rev Immunol* 1985; 3:133–57. doi: 10.1146/annurev.iy.03.040185.001025.
151. Erta M, Quintana A, Hidalgo J. Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. *Int J Biol Sci* 2012; 8(9):1254–66. doi: 10.7150/ijbs.4679.
152. Kishimoto T, Akira S, Taga T. IL-6 receptor and mechanism of signal transduction. *Int J Immunopharmacol* 1992; 14(3):431–8. doi: 10.1016/0192-0561(92)90173-i.
153. März P, Cheng JG, Gadiant RA, Patterson PH, Stoyan T, Otten U et al. Sympathetic neurons can produce and respond to interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(6):3251–6. doi: 10.1073/pnas.95.6.3251.
154. Perígolo-Vicente R, Ritt K, Pereira MR, Torres PMM, Paes-de-Carvalho R, Giestal-de-Araujo E. IL-6 treatment increases the survival of retinal ganglion cells in vitro: the role of adenosine A1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 430(2):512–8. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.12.004.
155. Murphy PG, Borthwick LA, Altares M, Gauldie J, Kaplan D, Richardson PM. Reciprocal actions of interleukin-6 and brain-derived neurotrophic factor on rat and mouse primary sensory neurons. *Eur J Neurosci* 2000; 12(6):1891–9. doi: 10.1046/j.1460-9568.2000.00074.x.
156. Hirota H, Kiyama H, Kishimoto T, Taga T. Accelerated Nerve Regeneration in Mice by upregulated expression of interleukin (IL) 6 and IL-6 receptor after trauma. *J Exp Med* 1996; 183(6):2627–34. doi: 10.1084/jem.183.6.2627.
157. Willis EF, MacDonald KPA, Nguyen QH, Garrido AL, Gillespie ER, Harley SBR et al. Repopulating Microglia Promote Brain Repair in an IL-6-Dependent Manner. *Cell* 2020; 180(5):833-846.e16. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.013.
158. Fisher J, Mizrahi T, Schori H, Yoles E, Levkovitch-Verbin H, Haggiag S et al. Increased post-traumatic survival of neurons in IL-6-knockout mice on a background of EAE susceptibility. *J Neuroimmunol* 2001; 119(1):1–9. doi: 10.1016/s0165-5728(01)00342-3.
159. Hans VH, Kossmann T, Lenzlinger PM, Probstmeier R, Imhof HG, Trentz O et al. Experimental axonal injury triggers interleukin-6 mRNA, protein synthesis and release into cerebrospinal fluid. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19(2):184–94. doi: 10.1097/00004647-199902000-00010.
160. Kossmann T, Hans VH, Imhof HG, Stocker R, Grob P, Trentz O et al. Intrathecal and serum interleukin-6 and the acute-phase response in patients with severe traumatic brain injuries. *Shock* 1995; 4(5):311–7. doi: 10.1097/00024382-199511000-00001.
161. Yang SH, Gangidine M, Pritts TA, Goodman MD, Lentsch AB. Interleukin 6 mediates neuroinflammation and motor coordination deficits after mild traumatic brain injury and brief hypoxia in mice. *Shock* 2013; 40(6):471–5. doi: 10.1097/SHK.0000000000000037.
162. Huang Y, Chen S, Luo Y, Han Z. Crosstalk between Inflammation and the BBB in Stroke. *Curr Neuropharmacol* 2020; 18(12):1227–36. doi: 10.2174/1570159X18666200620230321.
163. Armulik A, Genové G, Mäe M, Nisancioglu MH, Wallgard E, Niaudet C et al. Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature <London>* 2010; 468(7323):557–61. doi: 10.1038/nature09522.

164. Daneman R, Prat A. The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2015; 7(1):a020412. doi: 10.1101/cshperspect.a020412.
165. Daneman R. The blood-brain barrier in health and disease. *Ann Neurol* 2012; 72(5):648–72. doi: 10.1002/ana.23648.
166. Larsen JM, Martin DR, Byrne ME. Recent advances in delivery through the blood-brain barrier. *Curr Top Med Chem* 2014; 14(9):1148–60. doi: 10.2174/1568026614666140329230311.
167. Betz AL. Transport of ions across the blood-brain barrier. *Fed Proc* 1986; 45(7):2050–4.
168. Betz AL, Firth JA, Goldstein GW. Polarity of the blood-brain barrier: distribution of enzymes between the luminal and antiluminal membranes of brain capillary endothelial cells. *Brain Res* 1980; 192(1):17–28. doi: 10.1016/0006-8993(80)91004-5.
169. Régina A, Demeule M, Laplante A, Jodoin J, Dagenais C, Berthelet F et al. Multidrug resistance in brain tumors: roles of the blood-brain barrier. *Cancer Metastasis Rev* 2001; 20(1-2):13–25. doi: 10.1023/a:1013104423154.
170. Del Zoppo GJ, Milner R, Mabuchi T, Hung S, Wang X, Koziol JA. Vascular matrix adhesion and the blood-brain barrier. *Biochem Soc Trans* 2006; 34(Pt 6):1261–6. doi: 10.1042/BST0341261.
171. Readnower RD, Chavko M, Adeeb S, Conroy MD, Pauly JR, McCarron RM et al. Increase in blood-brain barrier permeability, oxidative stress, and activated microglia in a rat model of blast-induced traumatic brain injury. *J Neurosci Res* 2010; 88(16):3530–9. doi: 10.1002/jnr.22510.
172. Başkaya MK, Rao AM, Doğan A, Donaldson D, Dempsey RJ. The biphasic opening of the blood-brain barrier in the cortex and hippocampus after traumatic brain injury in rats. *Neurosci Lett* 1997; 226(1):33–6. doi: 10.1016/s0304-3940(97)00239-5.
173. Vries HE de, Blom-Roosemalen MC, van Oosten M, Boer AG de, van Berkel TJ, Breimer DD et al. The influence of cytokines on the integrity of the blood-brain barrier in vitro. *J Neuroimmunol* 1996; 64(1):37–43. doi: 10.1016/0165-5728(95)00148-4.
174. Oettingen G von, Bergholt B, Gyldensted C, Astrup J. Blood flow and ischemia within traumatic cerebral contusions. *Neurosurgery* 2002; 50(4):781-8; discussion 788-90. doi: 10.1097/00006123-200204000-00019.
175. Schröder ML, Muizelaar JP, Fatouros PP, Kuta AJ, Choi SC. Regional cerebral blood volume after severe head injury in patients with regional cerebral ischemia. *Neurosurgery* 1998; 42(6):1276-80; discussion 1280-1. doi: 10.1097/00006123-199806000-00042.
176. Möller T, Hanisch UK, Ransom BR. Thrombin-induced activation of cultured rodent microglia. *J Neurochem* 2000; 75(4):1539–47. doi: 10.1046/j.1471-4159.2000.0751539.x.
177. Donovan FM, Pike CJ, Cotman CW, Cunningham DD. Thrombin induces apoptosis in cultured neurons and astrocytes via a pathway requiring tyrosine kinase and RhoA activities. *J Neurosci* 1997; 17(14):5316–26.
178. Ralay Ranaivo H, Wainwright MS. Albumin activates astrocytes and microglia through mitogen-activated protein kinase pathways. *Brain Res* 2010; 1313:222–31. doi: 10.1016/j.brainres.2009.11.063.
179. Adams RA, Bauer J, Flick MJ, Sikorski SL, Nuriel T, Lassmann H et al. The fibrin-derived gamma377-395 peptide inhibits microglia activation and suppresses relapsing paralysis in central

- nervous system autoimmune disease. *J Exp Med* 2007; 204(3):571–82. doi: 10.1084/jem.20061931.
180. Altieri DC, Plescia J, Plow EF. The structural motif glycine 190-valine 202 of the fibrinogen gamma chain interacts with CD11b/CD18 integrin (alpha M beta 2, Mac-1) and promotes leukocyte adhesion. *The Journal of biological chemistry* 1993; 268(3):1847–53.
181. Johnson VE. Mechanical disruption of the blood–brain barrier following experimental concussion. *Acta neuropathologica* 2018:1–16. doi: 10.1007/s00401-018-1824-0.
182. Chodobski A, Zink BJ, Szmydynger-Chodobska J. Blood-brain barrier pathophysiology in traumatic brain injury. *Transl Stroke Res* 2011; 2(4):492–516. doi: 10.1007/s12975-011-0125-x.
183. Jha RM, Kochanek PM, Simard JM. Pathophysiology and treatment of cerebral edema in traumatic brain injury. *Neuropharmacology* 2019; 145(Pt B):230–46. doi: 10.1016/j.neuropharm.2018.08.004.
184. Cash A, Theus MH. Mechanisms of Blood-Brain Barrier Dysfunction in Traumatic Brain Injury. *Int J Mol Sci* 2020; 21(9). doi: 10.3390/ijms21093344.
185. Bothwell M. Recent advances in understanding neurotrophin signaling. *F1000Res* 2016; 5. doi: 10.12688/f1000research.8434.1.
186. Bothwell M. Recent advances in understanding context-dependent mechanisms controlling neurotrophin signaling and function. *F1000Res* 2019; 8. doi: 10.12688/f1000research.19174.1.
187. Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 2001; 294(5548):1945–8. doi: 10.1126/science.1065057.
188. Meeker R, Williams K. Dynamic nature of the p75 neurotrophin receptor in response to injury and disease. *J Neuroimmune Pharmacol* 2014; 9(5):615–28. doi: 10.1007/s11481-014-9566-9.
189. Liepinsh E, Ilag LL, Otting G, Ibáñez CF. NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor. *EMBO J* 1997; 16(16):4999–5005. doi: 10.1093/emboj/16.16.4999.
190. Vilar M, Charalampopoulos I, Kenchappa RS, Simi A, Karaca E, Reversi A et al. Activation of the p75 neurotrophin receptor through conformational rearrangement of disulphide-linked receptor dimers. *Neuron* 2009; 62(1):72–83. doi: 10.1016/j.neuron.2009.02.020.
191. Bibel M, Hoppe E, Barde YA. Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR. *EMBO J* 1999; 18(3):616–22. doi: 10.1093/emboj/18.3.616.
192. Esposito D, Patel P, Stephens RM, Perez P, Chao MV, Kaplan DR et al. The cytoplasmic and transmembrane domains of the p75 and Trk A receptors regulate high affinity binding to nerve growth factor. *The Journal of biological chemistry* 2001; 276(35):32687–95. doi: 10.1074/jbc.M011674200.
193. Jansen P, Giehl K, Nyengaard JR, Teng K, Liubinski O, Sjoegaard SS et al. Roles for the pro-neurotrophin receptor sortilin in neuronal development, aging and brain injury. *Nat Neurosci* 2007; 10(11):1449–57. doi: 10.1038/nn2000.
194. Hempstead BL. Dissecting the diverse actions of pro- and mature neurotrophins. *Curr Alzheimer Res* 2006; 3(1):19–24. doi: 10.2174/156720506775697061.

195. Shohami E, Novikov M, Bass R. Long-term effect of HU-211, a novel non-competitive NMDA antagonist, on motor and memory functions after closed head injury in the rat. *Brain Res* 1995; 674(1):55–62. doi: 10.1016/0006-8993(94)01433-i.
196. Chen Y, Constantini S, Trembovler V, Weinstock M, Shohami E. An experimental model of closed head injury in mice: pathophysiology, histopathology, and cognitive deficits. *J Neurotrauma* 1996; 13(10):557–68. doi: 10.1089/neu.1996.13.557.
197. DUNHAM NW, MIYA TS. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc* 1957; 46(3):208–9. doi: 10.1002/jps.3030460322.
198. Hamm RJ, Pike BR, O'Dell DM, Lyeth BG, Jenkins LW. The rotarod test: an evaluation of its effectiveness in assessing motor deficits following traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 1994; 11(2):187–96. doi: 10.1089/neu.1994.11.187.
199. DEITCH AD, MOSES MJ. The Nissl substance of living and fixed spinal ganglion cells. II. An ultraviolet absorption study. *J Biophys Biochem Cytol* 1957; 3(3):449–56. doi: 10.1083/jcb.3.3.449.
200. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76(9):4350–4. doi: 10.1073/pnas.76.9.4350.
201. Yan X-X, Jeromin A, Jeromin A. Spectrin Breakdown Products (SBDPs) as Potential Biomarkers for Neurodegenerative Diseases. *Curr Transl Geriatr Exp Gerontol Rep* 2012; 1(2):85–93. doi: 10.1007/s13670-012-0009-2.
202. Schober ME, Requena DF, Davis LJ, Metzger RR, Bennett KS, Morita D et al. Alpha II Spectrin breakdown products in immature Sprague Dawley rat hippocampus and cortex after traumatic brain injury. *Brain Res* 2014; 1574:105–12. doi: 10.1016/j.brainres.2014.05.046.
203. Xiong Y, Mahmood A, Chopp M. Current understanding of neuroinflammation after traumatic brain injury and cell-based therapeutic opportunities. *Chin J Traumatol* 2018; 21(3):137–51. doi: 10.1016/j.cjtee.2018.02.003.
204. Ginhoux F, Prinz M. Origin of microglia: current concepts and past controversies. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2015; 7(8):a020537. doi: 10.1101/cshperspect.a020537.
205. Andrews PJ, Sinclair HL, Rodríguez A, Harris B, Rhodes J, Watson H et al. Therapeutic hypothermia to reduce intracranial pressure after traumatic brain injury: the Eurotherm3235 RCT. *Health Technol Assess* 2018; 22(45):1–134. doi: 10.3310/hta22450.
206. Khellaf A, Khan DZ, Helmy A. Recent advances in traumatic brain injury. *J Neurol* 2019; 266(11):2878–89. doi: 10.1007/s00415-019-09541-4.
207. Nguyen Q-A, Nicoll RA. The GABAA Receptor β Subunit Is Required for Inhibitory Transmission. *Neuron* 2018; 98(4):718–725.e3. doi: 10.1016/j.neuron.2018.03.046.
208. Fujimoto ST, Longhi L, Saatman KE, Conte V, Stocchetti N, McIntosh TK. Motor and cognitive function evaluation following experimental traumatic brain injury. *Neurosci Biobehav Rev* 2004; 28(4):365–78. doi: 10.1016/j.neubiorev.2004.06.002.

- 209.Vöikar V, Köks S, Vasar E, Rauvala H. Strain and gender differences in the behavior of mouse lines commonly used in transgenic studies. *Physiol Behav* 2001; 72(1-2):271–81. doi: 10.1016/s0031-9384(00)00405-4.
- 210.Kacew S, Dixit R, Ruben Z. Diet and rat strain as factors in nervous system function and influence of confounders. *Biomed Environ Sci* 1998; 11(3):203–17.
- 211.Abramov U, Puussaar T, Raud S, Kurrikoff K, Vasar E. Behavioural differences between C57BL/6 and 129S6/SvEv strains are reinforced by environmental enrichment. *Neurosci Lett* 2008; 443(3):223–7. doi: 10.1016/j.neulet.2008.07.075.
- 212.Gözl C, Kirchhoff FP, Westerhorstmann J, Schmidt M, Hirnet T, Rune GM et al. Sex hormones modulate pathogenic processes in experimental traumatic brain injury. *J Neurochem* 2019; 150(2):173–87. doi: 10.1111/jnc.14678.
- 213.Brotfain E, Gruenbaum SE, Boyko M, Kutz R, Zlotnik A, Klein M. Neuroprotection by Estrogen and Progesterone in Traumatic Brain Injury and Spinal Cord Injury. *Curr Neuropharmacol* 2016; 14(6):641–53. doi: 10.2174/1570159x14666160309123554.
- 214.Nowak TS, Mulligan MK. Impact of C57BL/6 substrain on sex-dependent differences in mouse stroke models. *Neurochem Int* 2019; 127:12–21. doi: 10.1016/j.neuint.2018.11.011.
- 215.Zhao L, Mulligan MK, Nowak TS. Substrain- and sex-dependent differences in stroke vulnerability in C57BL/6 mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 2019; 39(3):426–38. doi: 10.1177/0271678X17746174.
- 216.Heinla I, Leidmaa E, Visnapuu T, Philips M-A, Vasar E. Enrichment and individual housing reinforce the differences in aggressiveness and amphetamine response in 129S6/SvEv and C57BL/6 strains. *Behav Brain Res* 2014; 267:66–73. doi: 10.1016/j.bbr.2014.03.024.
- 217.Majdan M, Walsh GS, Aloyz R, Miller FD. TrkA mediates developmental sympathetic neuron survival in vivo by silencing an ongoing p75NTR-mediated death signal. *J Cell Biol* 2001; 155(7):1275–85. doi: 10.1083/jcb.200110017.
- 218.Ibáñez CF, Simi A. p75 neurotrophin receptor signaling in nervous system injury and degeneration: paradox and opportunity. *Trends Neurosci* 2012; 35(7):431–40. doi: 10.1016/j.tins.2012.03.007.
- 219.Becker K, Cana A, Baumgärtner W, Spitzbarth I. p75 Neurotrophin Receptor: A Double-Edged Sword in Pathology and Regeneration of the Central Nervous System. *Vet Pathol* 2018; 55(6):786–801. doi: 10.1177/0300985818781930.
- 220.Zou X, Patterson TA, Sadovova N, Twaddle NC, Doerge DR, Zhang X et al. Potential neurotoxicity of ketamine in the developing rat brain. *Toxicol Sci* 2009; 108(1):149–58. doi: 10.1093/toxsci/kfn270.
- 221.Shi Q, Guo L, Patterson TA, Dial S, Li Q, Sadovova N et al. Gene expression profiling in the developing rat brain exposed to ketamine. *Neuroscience* 2010; 166(3):852–63. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.01.007.
- 222.Vutskits L, Gascon E, Tassonyi E, Kiss JZ. Effect of ketamine on dendritic arbor development and survival of immature GABAergic neurons in vitro. *Toxicol Sci* 2006; 91(2):540–9. doi: 10.1093/toxsci/kfj180.

223. Young C, Jevtovic-Todorovic V, Qin Y-Q, Tenkova T, Wang H, Labruyere J et al. Potential of ketamine and midazolam, individually or in combination, to induce apoptotic neurodegeneration in the infant mouse brain. *Br J Pharmacol* 2005; 146(2):189–97. doi: 10.1038/sj.bjp.0706301.
224. Head BP, Patel HH, Niesman IR, Drummond JC, Roth DM, Patel PM. Inhibition of p75 neurotrophin receptor attenuates isoflurane-mediated neuronal apoptosis in the neonatal central nervous system. *Anesthesiology* 2009; 110(4):813–25. doi: 10.1097/ALN.0b013e31819b602b.
225. Lemkuil BP, Head BP, Pearn ML, Patel HH, Drummond JC, Patel PM. Isoflurane neurotoxicity is mediated by p75NTR-RhoA activation and actin depolymerization. *Anesthesiology* 2011; 114(1):49–57. doi: 10.1097/ALN.0b013e318201dcb3.
226. Cattano D, Young C, Straiko MMW, Olney JW. Subanesthetic doses of propofol induce neuroapoptosis in the infant mouse brain. *Anesth Analg* 2008; 106(6):1712–4. doi: 10.1213/ane.0b013e318172ba0a.
227. Honegger P, Matthieu JM. Selective toxicity of the general anesthetic propofol for GABAergic neurons in rat brain cell cultures. *J Neurosci Res* 1996; 45(5):631–6. doi: 10.1002/(SICI)1097-4547(19960901)45:5<631::AID-JNR12>3.0.CO;2-1.
228. Kahraman S, Zup SL, McCarthy MM, Fiskum G. GABAergic mechanism of propofol toxicity in immature neurons. *J Neurosurg Anesthesiol* 2008; 20(4):233–40. doi: 10.1097/ANA.0b013e31817ec34d.
229. Pearn ML, Hu Y, Niesman IR, Patel HH, Drummond JC, Roth DM et al. Propofol neurotoxicity is mediated by p75 neurotrophin receptor activation. *Anesthesiology* 2012; 116(2):352–61. doi: 10.1097/ALN.0b013e318242a48c.
230. Milanović D, Pešić V, Popić J, Tanić N, Kanazir S, Jevtović-Todorović V et al. Propofol anesthesia induces proapoptotic tumor necrosis factor- α and pro-nerve growth factor signaling and prosurvival Akt and XIAP expression in neonatal rat brain. *J Neurosci Res* 2014; 92(10):1362–73. doi: 10.1002/jnr.23409.
231. Davies AM. Nerve growth factor synthesis and nerve growth factor receptor expression in neural development. *Int Rev Cytol* 1991; 128:109–38. doi: 10.1016/s0074-7696(08)60498-2.
232. Johnson D, Lanahan A, Buck CR, Sehgal A, Morgan C, Mercer E et al. Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell* 1986; 47(4):545–54. doi: 10.1016/0092-8674(86)90619-7.
233. Rostami E, Krueger F, Plantman S, Davidsson J, Agoston D, Grafman J et al. Alteration in BDNF and its receptors, full-length and truncated TrkB and p75(NTR) following penetrating traumatic brain injury. *Brain Res* 2014; 1542:195–205. doi: 10.1016/j.brainres.2013.10.047.
234. Erickson KI, Miller DL, Roecklein KA. The aging hippocampus: interactions between exercise, depression, and BDNF. *Neuroscientist* 2012; 18(1):82–97. doi: 10.1177/1073858410397054.
235. Rex CS, Lauterborn JC, Lin C-Y, Kramár EA, Rogers GA, Gall CM et al. Restoration of long-term potentiation in middle-aged hippocampus after induction of brain-derived neurotrophic factor. *J Neurophysiol* 2006; 96(2):677–85. doi: 10.1152/jn.00336.2006.
236. Kandratavicius L, Hallak JE, Carlotti CG, Assirati JA, Leite JP. Neurotrophin receptors expression in mesial temporal lobe epilepsy with and without psychiatric comorbidities and their relation with

- seizure type and surgical outcome. *Acta Neuropathol Commun* 2014; 2:81. doi: 10.1186/s40478-014-0081-2.
237. Frugier T, Morganti-Kossmann MC, O'Reilly D, McLean CA. In situ detection of inflammatory mediators in post mortem human brain tissue after traumatic injury. *J Neurotrauma* 2010; 27(3):497–507. doi: 10.1089/neu.2009.1120.
238. Helmy A, Carpenter KLH, Menon DK, Pickard JD, Hutchinson PJA. The cytokine response to human traumatic brain injury: temporal profiles and evidence for cerebral parenchymal production. *J Cereb Blood Flow Metab* 2011; 31(2):658–70. doi: 10.1038/jcbfm.2010.142.
239. Zhou R, Yang Z, Tang X, Tan Y, Wu X, Liu F. Propofol protects against focal cerebral ischemia via inhibition of microglia-mediated proinflammatory cytokines in a rat model of experimental stroke. *PLoS One* 2013; 8(12):e82729. doi: 10.1371/journal.pone.0082729.
240. Crowley T, Cryan JF, Downer EJ, O'Leary OF. Inhibiting neuroinflammation: The role and therapeutic potential of GABA in neuro-immune interactions. *Brain Behav Immun* 2016; 54:260–77. doi: 10.1016/j.bbi.2016.02.001.
241. Ye X, Lian Q, Eckenhoff MF, Eckenhoff RG, Pan JZ. Differential general anesthetic effects on microglial cytokine expression. *PLoS One* 2013; 8(1):e52887. doi: 10.1371/journal.pone.0052887.
242. Roach JD, Aguinaldo GT, Jonnalagadda K, Hughes FM, Spangelo BL. Gamma-aminobutyric acid inhibits synergistic interleukin-6 release but not transcriptional activation in astrocytoma cells. *Neuroimmunomodulation* 2008; 15(2):117–24. doi: 10.1159/000148194.
243. Tanabe K, Kozawa O, Iida H. Midazolam suppresses interleukin-1 β -induced interleukin-6 release from rat glial cells. *J Neuroinflammation* 2011; 8:68. doi: 10.1186/1742-2094-8-68.
244. Nakanishi M, Mori T, Nishikawa K, Sawada M, Kuno M, Asada A. The effects of general anesthetics on P2X7 and P2Y receptors in a rat microglial cell line. *Anesth Analg* 2007; 104(5):1136–44, tables of contents. doi: 10.1213/01.ane.0000260615.12553.4e.
245. Liu J, Gao X-F, Ni W, Li J-B. Effects of propofol on P2X7 receptors and the secretion of tumor necrosis factor- α in cultured astrocytes. *Clin Exp Med* 2012; 12(1):31–7. doi: 10.1007/s10238-011-0139-4.
246. Zheng B, Lai R, Li J, Zuo Z. Critical role of P2X7 receptors in the neuroinflammation and cognitive dysfunction after surgery. *Brain Behav Immun* 2017; 61:365–74. doi: 10.1016/j.bbi.2017.01.005.
247. Yang C, Hawkins KE, Doré S, Candelario-Jalil E. Neuroinflammatory mechanisms of blood-brain barrier damage in ischemic stroke. *Am J Physiol Cell Physiol* 2019; 316(2):C135–C153. doi: 10.1152/ajpcell.00136.2018.
248. Yang GY, Gong C, Qin Z, Liu XH, Lorris Betz A. Tumor necrosis factor alpha expression produces increased blood-brain barrier permeability following temporary focal cerebral ischemia in mice. *Brain Res Mol Brain Res* 1999; 69(1):135–43. doi: 10.1016/s0169-328x(99)00007-8.
249. Lee M, Schwab C, McGeer PL. Astrocytes are GABAergic cells that modulate microglial activity. *Glia* 2011; 59(1):152–65. doi: 10.1002/glia.21087.
250. Thal SC, Luh C, Schaible E-V, Timaru-Kast R, Hedrich J, Luhmann HJ et al. Volatile anesthetics influence blood-brain barrier integrity by modulation of tight junction protein expression in traumatic brain injury. *PLoS One* 2012; 7(12):e50752. doi: 10.1371/journal.pone.0050752.

251. Chen W, Ju X-Z, Lu Y, Ding X-W, Miao C-H, Chen J-W. Propofol improved hypoxia-impaired integrity of blood-brain barrier via modulating the expression and phosphorylation of zonula occludens-1. *CNS Neurosci Ther* 2019; 25(6):704–13. doi: 10.1111/cns.13101.
252. Zhang Y, Ding X, Miao C, Chen J. Propofol attenuated TNF- α -modulated occludin expression by inhibiting Hif-1 α / VEGF/ VEGFR-2/ ERK signaling pathway in hCMEC/D3 cells. *BMC Anesthesiol* 2019; 19(1):127. doi: 10.1186/s12871-019-0788-5.
253. Zhang H-B, Tu X-K, Chen Q, Shi S-S. Propofol Reduces Inflammatory Brain Injury after Subarachnoid Hemorrhage: Involvement of PI3K/Akt Pathway. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2019; 28(12):104375. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2019.104375.
254. Lu Y, Xu Z, Shen F, Lin R, Li H, Lv X et al. Propofol Protects Against TNF- α -induced Blood-brain Barrier Disruption via the PIM-1/eNOS/NO Pathway. *Curr Neurovasc Res* 2020; 17(4):471–9. doi: 10.2174/1567202617999200819142021.
255. Ji F-T, Liang J-J, Miao L-P, Wu Q, Cao M-H. Propofol post-conditioning protects the blood brain barrier by decreasing matrix metalloproteinase-9 and aquaporin-4 expression and improves the neurobehavioral outcome in a rat model of focal cerebral ischemia-reperfusion injury. *Mol Med Rep* 2015; 12(2):2049–55. doi: 10.3892/mmr.2015.3585.
256. Sumbria RK, Grigoryan MM, Vasilevko V, Krasieva TB, Scadeng M, Dvornikova AK et al. A murine model of inflammation-induced cerebral microbleeds. *J Neuroinflammation* 2016; 13(1):218. doi: 10.1186/s12974-016-0693-5.
257. Zheng Y-Y, Lan Y-P, Tang H-F, Zhu S-M. Propofol pretreatment attenuates aquaporin-4 over-expression and alleviates cerebral edema after transient focal brain ischemia reperfusion in rats. *Anesth Analg* 2008; 107(6):2009–16. doi: 10.1213/ane.0b013e318187c313.
258. Shi S-S, Zhang H-B, Wang C, Yang W, Liang R, Chen Y et al. Propofol Attenuates Early Brain Injury After Subarachnoid Hemorrhage in Rats. *J Mol Neurosci* 2015; 57(4):538–45. doi: 10.1007/s12031-015-0634-2.
259. Lee JH, Cui HS, Shin SK, Kim JM, Kim SY, Lee JE et al. Effect of propofol post-treatment on blood-brain barrier integrity and cerebral edema after transient cerebral ischemia in rats. *Neurochem Res* 2013; 38(11):2276–86. doi: 10.1007/s11064-013-1136-7.

8. Lebenslauf