

Aus der Neurochirurgischen Klinik

Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

Direktor Univ. – Prof. Dr. med. Joachim Oertel

**Einfluss dekompressiver Kraniektomie und fokaler Hypothermie auf die  
neurologische Langzeitfunktion in einem Mausmodell des geschlossenen  
Schädel-Hirn-Traumas**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2019

Vorgelegt von: Vanessa Hubertus

geb. am 17.11.1991 in Saarlouis

Tag der Promotion: 19.12.2019

Dekan: Prof. Dr. Michael M. Menger

Erster Berichterstatter: Prof. Dr. J. Oertel

Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. M. Laschke

## Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung / Abstract	6
2. Abkürzungsverzeichnis	9
3. Einleitung	11
3.1 Epidemiologie und Ätiologie des Schädel-Hirn-Traumas	11
3.2 Einteilung des Schädel-Hirn-Traumas	11
3.3 Pathophysiologie des Schädel-Hirn-Traumas	12
3.3.1 Erhöhung des intrakraniellen Drucks	13
3.3.2 Zerebrale Perfusion bei erhöhtem intrakraniellem Druck	13
3.3.3 Entstehung des posttraumatischen Hirnödems	15
3.3.4 Inflammatorische Gewebeantwort nach Schädel-Hirn-Trauma	16
3.3.5 Zelltodmechanismen nach Schädel-Hirn-Trauma	16
3.4 Therapie des Schädel-Hirn-Traumas	17
3.4.1 Allgemeine konservative Therapiemaßnahmen	17
3.4.2 Therapie des erhöhten intrakraniellen Drucks	18
3.4.3 Dekompressive Kraniektomie	18
3.4.4 Therapeutische Hypothermie	19
4. Eigene Fragestellung	20
5. Material und Methoden	21
5.1 Versuchstiere	21
5.2 Operativer Versuchsabschnitt	22
5.2.1 Versuchsvorbereitung und Markierung des Trauma-Areals	22
5.2.2 Applikation des Traumas	23
5.2.3 Dekompressive Kraniektomie	24
5.2.4 Applikation fokaler Hypothermie	24
5.2.5 Narkoseausleitung	25
5.3 Gewichtsdocumentation	25
5.4 Neurologische Statuserhebung	25

5.4.1 Neurological Severity Score	25
5.4.2 Beam Balance Score	26
5.4.3 Beam Balance Time	27
5.5 Euthanasie der Versuchstiere	27
5.5.1 Intrakardiale Formaldehydperfusion	27
5.5.2 Präparation des Gehirns	27
5.6 Histologische Aufbereitung	28
5.6.1 Anfertigung von Paraffinschnitten	28
5.6.2 Histologische Standardfärbungen	28
5.6.2.1 Färbungen mit Hämatoxilin – Eosin	28
5.6.2.2 Nissl – Färbungen	30
5.6.3 Immunhistochemische Färbungen	30
5.6.3.1 Material Immunhistochemie	30
5.6.3.2 Indirekte Immunhistochemie nach der ABC-Methode	31
5.6.3.3 Darzustellende Zielstrukturen	32
5.6.3.4 Schema immunhistochemische Färbungen	32
5.6.4 Mikroskopie der Präparate	33
5.6.5 Mikroskopische Auswertung der Präparate	33
5.6.5.1 Qualitative Auswertungen	33
5.6.5.2 Quantitative Auswertungen	33
5.7 Statistische Auswertungen	34
6. Ergebnisse	35
6.1 Validierung der Versuchsmethodik	35
6.2 Überleben der Versuchstiere	37
6.3 Entwicklung des Körpergewichts im Verlauf	37
6.4 Ergebnisse der neurologischen Untersuchungen	38
6.4.1 Neurological Severity Score	38
6.4.2 Beam Balance Score	40
6.4.3 Beam Balance Time	41

6.5 Mikroskopische Auswertung der histologischen Präparate	43
6.5.1 Qualitative Beurteilung anhand der Standardfärbungen	43
6.5.2 Quantitative Auswertung der nach Nissl gefärbten Präparate	45
6.5.3 Auswertung der immunhistochemischen Anfärbung von Aquaporin-4	46
6.5.4 Auswertung der immunhistochemischen Anfärbung von GFAP	47
6.5.5 Auswertung der immunhistochemischen Anfärbung von Bcl-2	49
6.6 Zusammenfassung der Ergebnisse	51
7. Diskussion	52
7.1 Versuchsmethodik	52
7.2 Traumamodell	52
7.3 Histomorphologische Schädigung im verwendeten Traumamodell	54
7.4 Neurological Severity Score im verwendeten Traumamodell	55
7.5 Dekompressive Kraniektomie	55
7.6 Fokale Hypothermie	61
7.7 Schlussfolgerungen	68
8. Literaturverzeichnis	69
9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	88
10. Publikationen und Ausblick	90
11. Dank	92

## 1. Zusammenfassung / Abstract

### **Zusammenfassung**

Das Schädel-Hirn-Trauma zählt zu den häufigsten Ursachen für Tod und bleibende Behinderung weltweit. In der vorliegenden Arbeit sollen die Auswirkungen einer dekompressiven Kraniektomie alleine und in Kombination mit nachfolgender Anwendung therapeutischer fokaler Hypothermie auf die langfristige neurologische Funktion nach Schädel-Hirn-Trauma evaluiert werden. Weiterhin wird der Einfluss dieser beiden Therapieoptionen auf strukturellen Hirnschaden, Neuronenverlust, Hirnödembildung, Neuroinflammation und Apoptose diskutiert.

Die Versuchstiere – Mäuse der Rasse CD-1 – wurden hierfür in fünf Versuchsgruppen mit einer Gruppengröße von jeweils acht Tieren randomisiert: Sham-Gruppe, Kontrollgruppe ohne Trauma mit Kraniektomie, Kontrollgruppe mit Trauma ohne Therapie, Therapiegruppe mit Trauma und Kraniektomie, Therapiegruppe mit Trauma, Kraniektomie und fokaler Hypothermie. Die Applikation eines mittelschweren, geschlossenen Schädel-Hirn-Traumas erfolgte durch ein etabliertes, standardisiertes Modell (*weight drop* - Modell). Im Anschluss wurden in den entsprechenden Gruppen eine dekompressive temporoparietale Hemikraniektomie durchgeführt und milde fokale Hypothermie (Zieltemperatur 32 °C) über eine Kühlsonde appliziert. Eine neurologische Verlaufsbeurteilung wurde durch die Erhebung des Neurological Severity Score, des Beam Balance Score und der Beam Balance Time an den postoperativen Tagen 1, 3, 7, 14 und 28 angeschlossen. Nach Ablauf des Untersuchungszeitraums erfolgte die Euthanasie durch intrakardiale Formaldehydperfusion und die Präparation des Gehirns. Anhand der histologischen Standardfärbungen Hämatoxylin – Eosin und Nissl wurden struktureller Hirnschaden und hippocampaler Neuronenverlust beurteilt. Zur Beurteilung von Hirnödembildung, Neuroinflammation und Apoptose schloss sich die Auswertung immunhistochemischer Anfärbungen der Strukturen Aquaporin – 4, saures Gliafaserprotein und Bcl-2 an.

Folge dekompressiver Kraniektomie in der vorliegenden Arbeit ist eine signifikant verschlechterte neurologische Langzeitfunktion. Die zusätzliche Anwendung fokaler Hypothermie führt zu einem Ausgleich dieses negativen Effektes zugunsten einer verbesserten neurologischen Funktion. Zusätzlich führt die Anwendung fokaler Hypothermie im Vergleich zur alleinigen Dekompression zu einer deutlichen Mortalitätsreduktion im Verlauf. In der histologischen Auswertung zeigen sich struktureller Hirnschaden, Hirnödembildung und Neuroinflammation unbeeinflusst von den durchgeführten Therapieoptionen. In allen Gruppen mit Schädel-Hirn-Trauma ist eine unspezifische Erhöhung der Expression von Aquaporin-4 und saurem Gliafaserprotein nachweisbar. Ein hippocampaler Neuronenverlust liegt nicht vor. Dekompressive Kraniektomie führt zu einer verminderten Expression von antiapoptotisch wirksamem Bcl-2. Durch die zusätzliche Anwendung fokaler Hypothermie folgt

eine hoch signifikant vermehrte Expression von Bcl-2, vereinbar mit vorbeschriebenen antiapoptotischen, neuroprotektiven Effekten milder Hypothermie.

Die vorliegende Arbeit ergänzt die aktuelle Diskussion über die Anwendung dekompressiver Kraniektomie und therapeutischer Hypothermie nach Schädel-Hirn-Trauma. Um die dargestellten positiven Auswirkungen fokaler Hypothermie in einem kombinierten Verfahren mit dekompressiver Kraniektomie beim Menschen zu verifizieren, benötigt es randomisierter, klinischer Studien.

## **Abstract:**

### **„Influence of decompressive craniectomy and focal hypothermia on long-term neurologic impairment in a mouse model of closed head injury.“**

Traumatic brain injury is one of the leading causes of death and disability worldwide. The aim of this study is to evaluate the influence of decompressive temporoparietal hemicraniectomy and the subsequent application of therapeutic focal hypothermia on neurologic impairment in a long-term closed head injury model. Furthermore, the influence of these therapeutic options on structural brain damage, neuronal loss, brain oedema formation, neuroinflammation and apoptosis will be discussed.

Laboratory animals – CD-1 mice – were randomized in five experimental groups with the size of eight animals each: Sham, craniectomy without trauma, trauma without therapy, trauma with craniectomy, trauma with craniectomy and subsequent focal hypothermia. Moderate Closed Head Injury was applied using an established weight drop model. Thereafter decompressive temporoparietal craniectomy was performed and subsequent mild focal hypothermia (32°C) was applied. Neurological assessment followed on posttraumatic time points 1, 3, 7, 14 and 28 days by performance of Neurological Severity Score, Beam Balance Score and Beam Balance Time. After 28 days animals were sacrificed via intracardial perfusion of formaldehyde. Brain preparation and histological and immunohistochemical staining followed. Standard haematoxylin and eosin as well as Nissl staining were used to analyse structural brain damage and neuronal loss in the hippocampus. Oedema formation, neuroinflammation and apoptosis were evaluated by assessment of immunohistochemical staining of Aquaporin-4, glial fibrillary acidic protein and Bcl-2.

In this study, the performance of decompressive craniectomy is followed by significant neurological impairment. Subsequent application of focal hypothermia diminishes this negative effect. Additional, therapeutic focal hypothermia reduces mortality compared to sole decompression. Histological assessment showed no influence of decompression or focal hypothermia on structural brain damage, neuroinflammation or brain oedema formation. Posttraumatic elevation of immunohistochemical markers Aquaporin-4 and glial fibrillary acidic protein remained unaltered by therapy. No neuronal loss could be detected in the hippocampus. Antiapoptotic Bcl-2 was elevated following decompressive craniectomy. Subsequent focal hypothermia led to further, highly significant increase of Bcl-2, consistent with previously described antiapoptotic, neuroprotective effects of mild hypothermia.

This study adds to the present debate about decompressive craniectomy and therapeutic hypothermia after traumatic brain injury. To verify these positive effects of focal hypothermia subsequent to decompressive craniectomy in humans, controlled randomized clinical trials will be necessary.



## 2. Abkürzungsverzeichnis

ABC = Avidin-Biotin-Komplex (*avidin biotin complex*)

ANOVA = Varianzanalyse (*analysis of variance*)

AQP4 = Aquaporin-4

ARDS = Akutes Atemnotsyndrom (*Acute Respiratory Distress Syndrome*)

ATP = Adenosintriphosphat

BB-Score = Beam Balance Score

BB-Time = Beam Balance Time

Ca<sup>2+</sup> = Kalzium-Ion

CBF = Zerebraler Blutfluss (*cerebral blood flow*)

CFR = *Case fatality rate*

CPP = Zerebraler Perfusionsdruck (*cerebral perfusion pressure*)

DC = Dekompressive Kraniektomie (*decompressive craniectomy*)

DNA = Desoxyribonukleinsäure (*deoxyribonucleic acid*)

GCS = Glasgow Koma Skala (*Glasgow Coma Scale*)

GFAP = Saures Gliafaserprotein (*glial fibrillary acidic protein*)

H<sup>+</sup> = Wasserstoff-Ion

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = Wasserstoffperoxid

HE = Hämatoxilin-Eosin

ICP = Intrakranieller Druck (*intracranial pressure*)

IL = Interleukin

K<sup>+</sup> = Kalium-Ion

M. = Musculus

MAP = Mittlerer Arterieller Blutdruck (*mean arterial pressure*)

MAPK = *mitogen activated protein kinase*

MRT = Magnet Resonanz Tomographie

Mx = *Doppler mean flow index*

Na<sup>+</sup> = Natrium-Ion

NaCl = Natriumchlorid

NCN = Vergleichsgruppe ohne Trauma mit Kraniektomie (*no trauma / craniectomy / no hypothermia*)

NNN = Sham-Gruppe (*no trauma / no craniectomy / no hypothermia*)

NO = Stickstoffmonoxid

NSS = Neurological Severity Score

p = p-Wert (*probability*)

PRx = *Pressure Reactivity Index*

ROS = Reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*)

SHT = Schädel-Hirn-Trauma

TCH = Therapiegruppe mit Trauma, Kraniektomie und Hypothermie (*trauma / craniectomy / hypothermia*)

TCN = Therapiegruppe mit Trauma und Kraniektomie (*trauma / craniectomy / no hypothermia*)

TNF $\alpha$  = Tumornekrosefaktor  $\alpha$

TNN = Versuchsgruppe mit Trauma ohne Therapie (*trauma / no craniectomy / no hypothermia*)

TUNEL = *TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*

ZNS = Zentrales Nervensystem

$\Delta P$  = Druckänderung

$\Delta V$  = Volumenänderung

### **3. Einleitung**

#### **3.1 Epidemiologie und Ätiologie des Schädel-Hirn-Traumas**

Das Schädel-Hirn-Trauma (SHT) zählt zu den häufigsten Ursachen für Tod und bleibende Behinderung weltweit [1–3]. Jährlich betrifft es etwa 10 Millionen Menschen [4] und verursacht durch die Versorgung akut traumatisierter und langfristig behinderter Patienten hohe Kosten [5]. So steht das Schädel-Hirn-Trauma in einer aktuellen Auflistung unfallbedingter Kosten in Europa auf Platz drei, 2008 lag die Inzidenz in Europa bei 235/100.000 und in den USA bei 403/100.000, wovon schätzungsweise jeweils 10-15% der Betroffenen multiple Begleitverletzungen aufwiesen [6]. Peeters et al. schätzt die Mortalität des SHT auf 10,5/100.000, mit einer „Case Fatality Rate“ (CFR) von 0,9-7,6/100 Patienten bei leichtem SHT und 29-55/100 Patienten bei schwerem SHT [7]. In einer aktuelleren Einschätzung sprechen Brazinova et al. von einer sehr variablen Inzidenz von 47,3-694/100.000 mit einer Mortalität von 9-28,1/100.000 [8]. Weltweit zählen vor Allem junge Menschen unter 45 Jahren zu den Betroffenen [1]. Im internationalen Vergleich scheint die Anzahl junger Patienten in Entwicklungs- und Schwellenländern zuzunehmen, unter anderem zurückzuführen auf eine zunehmende Motorisierung und eine damit verbundene erhöhte Rate an Verkehrsunfällen [6]. In den Industrienationen zeigt sich die Inzidenz des SHT bei jüngeren Menschen abnehmend, was nicht zuletzt den positiven Entwicklungen in der Sicherheit des dortigen Straßenverkehrs sowie den modernen Möglichkeiten der Akutversorgung von Unfallopfern zuzuschreiben ist [8]. Im Gegensatz dazu zeigt sich die Anzahl des sturzbedingten SHT des älteren Menschen über 65 Jahren in den Industrienationen stark zunehmend, sodass diese Altersgruppe dort mittlerweile den größten Anteil an Verletzten ausmacht [7, 9]. In den Industrienationen stehen mittlerweile Stürze mit einem Anteil von 52,2% an allen SHT auf Platz eins der häufigsten Ursachen, gefolgt von Verkehrsunfällen mit einem Anteil von 26%. Der Anteil an Fahrradunfällen an letzterer Gruppe ist mit 42% beträchtlich [1]. Hinzu kommen als eigene Entitäten das SHT durch Gewalteinfluss mit 7–10%, wobei sich weltweit der Anteil penetrierender Verletzungen durch Schusswaffen zunehmend zeigt, sowie das explosionsbedingte SHT, welches eine große Rolle in militärischen Konflikten und Terrorismus spielt [6, 10].

#### **3.2 Einteilung des Schädel-Hirn-Traumas**

In der Literatur finden sich verschiedene Einteilungsmöglichkeiten des SHT. Zum einen lässt sich das SHT anhand der an der Verletzung beteiligten anatomischen Strukturen in ein geschlossenes und ein offenes SHT einteilen. So zeigt sich die Dura mater beim geschlossenen SHT intakt, wohingegen das offene SHT mit einer Verletzung und Eröffnung der Dura mater einhergeht, so zum Beispiel als Folge einer offenen Fraktur des Schädelknochens. Auf das offene SHT folgt eine erhöhte Gefahr für die Ausbildung von Infektionen [1, 11].

Die klinisch höchste Relevanz besitzt die Einteilung des SHT anhand des Grades der neurologischen Schädigung durch die Glasgow Koma Skala (GCS = *Glasgow Coma Scale*). Dieser in der klinischen Praxis verwendete Index summiert die bestmögliche motorische und verbale Reaktion des Patienten und erlaubt so eine grobe Einschätzung seines neurologischen Status (**Tab. 1**). Per definitionem spricht man bei einem GCS von 13-15 von einem leichten SHT, ein GCS von 9-13 entspricht einem mittleren SHT und ein GCS  $\leq 8$  wird mit einem schweren SHT gleichgesetzt, welches durch ausgefallene Schutzreflexe einer Intubation bedarf [1].

<b>Punkte</b>	<b>Augen</b>	<b>Bewusstsein</b>	<b>Motorik</b>
<b>1</b>	Geschlossen	Nicht ansprechbar	Keine Reaktion
<b>2</b>	Öffnen auf Schmerzreiz	Unverständliche Laute	Strecken auf Schmerzreiz
<b>3</b>	Öffnen auf Ansprache	Zusammenhangslose Worte	Beugen auf Schmerzreiz
<b>4</b>	Spontanes Öffnen	Desorientiert	Ungezielte Abwehr
<b>5</b>		Orientiert	Gezielte Abwehr
<b>6</b>			Befolgt Anweisungen

**Tabelle 1: Glasgow Koma Skala (GCS) [1]**

### **3.3. Pathophysiologie des Schädel-Hirn-Traumas**

Bezüglich der Pathophysiologie des Schädel-Hirn-Traumas lässt sich die durch das Trauma entstehende primäre Schädigung von der sich nachfolgend entwickelnden sekundären Schädigung unterscheiden.

Die primäre Hirnschädigung entsteht während des Traumas durch den direkten Einfluss mechanischer Kräfte auf das Hirngewebe. Ihre Ausprägung ist direkt abhängig von Intensität und Art der Gewalteinwirkung. Diese initiale Schädigung besteht vorwiegend aus lokalen Kontusionen, Gefäßzerreißen und diffusem Axonschaden in Folge des Einwirkens mechanischer Scherkräfte auf die Axone. Die primäre Hirnschädigung ist irreversibel und keiner Therapie zugänglich [1, 9, 11].

Die Ausbildung der sekundären Hirnschädigung beginnt sofort im Anschluss an die primäre Hirnschädigung und findet über einen Zeitraum von Stunden bis mehrere Tage statt. Die sekundäre Schädigung betrifft auch weiter vom Ort des initialen Traumas entfernte Hirnregionen. Sie beruht auf

mannigfaltigen pathophysiologischen Mechanismen, welche sich gegenseitig bedingen und als Reaktionskaskade zu verstehen sind. Zu diesen pathophysiologischen Prozessen zählen die Erhöhung des intrakraniellen Drucks (ICP) mit nachfolgender Reduktion des zerebralen Blutflusses (CBF), die Entwicklung eines posttraumatischen Hirnödems durch Störung der Blut-Hirn-Schranke sowie eine auf die Gewebeschädigung folgende Neuroinflammation mit konsekutivem Gewebeuntergang [1, 10–12].

### **3.3.1 Erhöhung des intrakraniellen Drucks**

Der physiologische ICP beträgt beim Erwachsenen weniger als 15mmHg [13, 14]. Die auf das SHT folgende Erhöhung des ICP beruht auf zerebralen Verletzungsmustern wie intrazerebralen Hämorrhagien, posttraumatischem Hydrozephalus und einem sich posttraumatisch ausbildenden Hirnödem. Im Verlauf an Größe zunehmende Kontusionen und sekundäre Infarzierungen durch zerebrale Minderperfusion bilden ihrerseits einen raumfordernden Effekt aus, führen zu einer Zunahme des Hirnödems und zu einer weiteren Erhöhung des ICP im Sinne eines Circulus vitiosus [1, 11, 13].

Die Monroe-Kelly Doktrin (nach Monroe 1783 und Kelly 1824) formuliert das Verständnis der intrakraniellen Druck-Volumen-Beziehung durch die Verteilung der intrakraniellen Kompartimente Hirngewebe, Liquor cerebrospinalis und venösem und arteriellem Blutvolumen, eingeschlossen in eine nicht dehbare, knöchernen Hülle [2, 14, 15]. Bei Volumenzunahme eines dieser Kompartimente kommt es bei normalen anatomischen Verhältnissen durch den geschlossenen Raum zu einem Druckanstieg, welcher bis zu einem gewissen Grad durch Verdrängung der Reserveräume von Liquorsystem und venösem System kompensiert werden kann. Bei Erschöpfung dieser begrenzten kompensatorischen Möglichkeiten folgt ein Anstieg des ICP mit typischen klinischen Symptomen wie Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen über Bewusstseinsstörungen und autonome Regulationsstörungen hin zur Ausbildung von Dezerebrationssyndromen [2, 16].

Die Zunahme des ICP durch eine determinierte Volumenzunahme folgt einer nichtlinearen, hyperbolischen Beziehung ( $\Delta P/\Delta V$ ). So folgt auf ein determiniertes  $\Delta V$  bei niedrigem intrakraniellen Ausgangsdruck ein nur geringer ICP-Anstieg ( $\Delta P$ ). Besteht jedoch ein schon erhöhter Ausgangsdruck, so folgt auf das gleiche  $\Delta V$  ein deutlich höherer  $\Delta P$  [2, 14, 17].

### **3.3.2 Zerebrale Perfusion bei erhöhtem intrakraniellen Druck**

Die zerebrale Perfusion leidet unter einem erhöhten ICP. Der zerebrale Perfusionsdruck (CPP) steht mit arteriellem Mitteldruck (MAP) und ICP in folgender Beziehung:

CPP = MAP - ICP

Dies bedeutet, dass bei gleichbleibendem MAP die zerebrale Perfusion, näherungsweise gleichzusetzen mit dem CPP, bei steigendem ICP abnimmt. Übersteigt der ICP den systemischen Blutdruck, folgt das Erliegen der zerebralen Perfusion mit der Folge globaler zerebraler Ischämie [1, 11, 14].

In gesundem Hirngewebe kann durch die Fähigkeit zur Autoregulation des zerebralen Gefäßsystems der zerebrale Blutfluss (CBF) in weiten Bereichen konstant gehalten werden. So beträgt der physiologische mittlere CBF bei Erwachsenen näherungsweise 50ml/100 g Hirngewebe/Minute [18], wenn der CPP sich in einem Bereich von etwa 60–160mmHg befindet [19]. Auf eine Reduktion des CBF unter 18ml/100g Hirngewebe/Minute folgen irreversible hypoxische Gewebeschäden [18]. Die Aufrechterhaltung des physiologischen CBF in weiten Grenzen des CPP beruht auf mediatorbedingter Vasokonstriktion und Vasodilatation, deren zugrundeliegende Mechanismen auf einem veränderten Gleichgewicht an Stickstoffmonoxid, Stoffwechselendprodukten und nicht zuletzt auf der myogenen Autoreaktivität der Gefäße beruhen [20, 21]. Möglichkeiten zur klinischen Beurteilung der myogenen Autoreaktivität und damit einer erhaltenen zerebrovaskulären Autoregulation des CBF bei kontinuierlicher Druckmessung sind gegeben durch die Erhebung des transkraniellen *Doppler mean flow index* (Mx) sowie durch die Erhebung des *pressure reactivity index* (PRx), welcher bei Division von MAP durch ICP entsteht. Einschränkungen in diesen beiden Indizes sprechen für eine geschädigte zerebrovaskuläre Autoregulation und gehen mit einer schlechten Prognose bei SHT einher [20, 22, 23].

Ein weiterer Kompensationsmechanismus bei erniedrigtem CBF ist die Fähigkeit des Hirngewebes zur Erhöhung der zerebralen Sauerstoffextraktion, welche in begrenztem Maß möglich ist. Bei Überschreiten dieser Kompensationsmöglichkeiten folgt eine zerebrale Minderperfusion mit klinischen Zeichen zerebraler Hypoxie wie Schwindel und Benommenheit bis hin zu den klinischen Folgen manifester zerebraler Ischämie [19].

Ein Problem nach SHT ist die teilweise Aufhebung dieser physiologischen Autoregulations- und Kompensationsmöglichkeiten des Hirngewebes durch Störungen der Homöostase sowie der zerebrovaskulären Autoregulation [6, 20, 23, 24] mit nachfolgend starker Abhängigkeit der Hirnperfusion vom systemischen Blutdruck, weshalb bei diesen Patienten ein CPP von 60mmHg nicht unterschritten werden sollte, um eine adäquate Hirnperfusion zu gewährleisten [1, 14, 25–27]. So sind sowohl ein isolierter Anstieg des ICP (>20mmHg) als auch ein verminderter CPP (<60mmHg) unabhängige Prädiktoren für eine schlechte Prognose bei SHT [1, 11, 13, 14]. Der ideale anzustrebende Wert des CPP nach SHT ist von Patient zu Patient individuell und Gegenstand aktueller Forschung [20, 22, 23, 28].

### 3.3.3 Entstehung des posttraumatischen Hirnödems

Das posttraumatische Hirnödem umfasst mehrere Entitäten, welche sich in ihrem Entstehungsmechanismus unterscheiden und im Zuge des SHT meist kombiniert vorliegen. Dem SHT folgt eine Ausschüttung multipler Mediatoren, welche durch Störung der Blut-Hirn-Schranke und zelluläre Schädigung die Ausbildung eines vasogenen und eines zytotoxischen Hirnödems bedingen. Hierzu zählen die Freisetzung exzitatorischer Aminosäuren wie Glutamat und ein Anstieg von Lactat,  $H^+$ -,  $K^+$ - und  $Ca^{2+}$ - Ionen, NO und reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) [29, 30].

Das vasogene Hirnödem ist eine extrazelluläre Wasseransammlung, welche durch Schädigung der Blut-Hirn-Schranke entsteht. Ursächlich für diese Schrankenstörung ist die Zerstörung der an der Schrankenbildung beteiligten zellulären Strukturen durch das mechanische Trauma einerseits und durch die posttraumatische Akkumulation zellschädigender Mediatoren andererseits. Weiterhin bedingt die auf die Verletzung des Hirngewebes folgende Immunreaktion eine Hyperpermeabilität der Blut-Hirn-Schranke. Durch die resultierende Schrankenstörung wird der Austritt eines proteinreichen Extravasats begünstigt [9, 12, 29, 31, 32].

Die Ausbildung des zytotoxischen Hirnödems ist bedingt durch die auf das SHT folgende Störung der zellulären Glukoseverwertung und somit der ATP-Produktion in Neuronen und Gliazellen. Durch diesen zellulären Energiemangel und die daraus resultierende Dysfunktion der Natrium-Kalium-ATPase folgt eine intrazelluläre Akkumulation von  $Na^+$ -Ionen, welche zu osmotischem Wassereinstrom und intrazellulärer Ödembildung führt. Durch die im Verlauf des SHT häufigen ischämischen Komplikationen werden diese Vorgänge noch verstärkt. Das zytotoxische Hirnödem bildet sich bereits früh im Krankheitsprozess nach SHT unabhängig von der Ausbildung einer Störung der Schädel-Hirn-Schranke aus und bleibt auch nach deren Restitution weiter bestehen [29, 33].

Dem Wasserkanal Aquaporin-4 (AQP4) scheint bei Entstehung und Abklingen des posttraumatischen Hirnödems ein interessanter Effekt zuzukommen. Das Protein AQP4 ist ein im Nervengewebe ubiquitär exprimierter Wasserkanal, welcher vor Allem in den Astrozytenfortsätzen um Kapillare herum zu finden ist und den Ein- und Ausstrom von Flüssigkeit im Hirnparenchym steuert. In einigen Studien konnte eine erhöhte Expression von AQP4 im Hirnödem dargestellt werden [34], während andere eine erniedrigte Expression zeigten [31, 35]. In Studien mit AQP4-defizienten Tieren konnte AQP4 bei der Entstehung des zytotoxischen Hirnödems mit einem vermehrten intrazellulären Wassereinstrom in Zusammenhang gebracht werden. Beim vasogenen Hirnödem unterstützt AQP4 die extrazelluläre Elimination des Wassers, wodurch seine Überexpression eine Verringerung des Hirnödems begünstigt [36].

### **3.3.4 Inflammatorische Gewebeantwort nach Schädel-Hirn-Trauma**

Auf die Gewebeschädigung während des SHT folgt, ähnlich wie in anderen Organsystemen auch, eine inflammatorische Reaktion. Diese komplexe Reaktion, bestehend aus einer auf die oben beschriebene Störung der Blut-Hirn-Schranke folgenden mannigfaltigen Interaktion verschiedener Zytokine und Chemokine, führt zu der Einwanderung peripherer Immunzellen ins Hirngewebe. Durch weitere Expression verschiedener inflammatorischer Mediatoren wie  $\text{TNF}\alpha$ , IL-4, IL-6 und ROS (Reaktive Sauerstoffspezies) erfolgt die weitere Aktivierung der Immuneffektorzellen Astrozyten und Gliazellen im Hirngewebe. Folge dieser Immunprozesse sind Zellregeneration einerseits und Zelluntergang andererseits. So finden sich neuronale und gliale Inflammation, Nekrose und Apoptose auch in weit von der traumatisierten Stelle entfernten Hirnregionen [37–39].

Als reaktive Gliose wird die immunmodulierte Aktivierung von Astrozyten und Gliazellen, den Immuneffektorzellen des ZNS, bezeichnet. Dieser reaktiven Gliose kommt in der sekundären Schädigung nach SHT eine ambivalente Rolle zu. Die aktivierten Gliazellen tragen einerseits durch phagozytotische Aktivität im geschädigten Gewebe zur Defektheilung bei. Durch inflammatorische Überregulation entfalten die aktivierten Immuneffektorzellen andererseits auch eine neurotoxische Wirkung, indem sie durch weitere Ausschüttung von Entzündungsmediatoren zur Aufrechterhaltung der Neuroinflammation beitragen, ROS sezernieren und dadurch zur weiteren Zerstörung bereits geschädigter oder auch gesunder Neurone beitragen [40–42]. Aktivierte Astrozyten exprimieren saures Gliafaserprotein (GFAP) und transformieren in eine amöboide Form, woran sie im Gewebe erkannt werden können [40].

### **3.3.5 Zelltodmechanismen nach Schädel-Hirn-Trauma**

Direkte Zellschädigung und Neuroinflammation nach SHT führen zu Zelluntergang im geschädigten Hirngewebe. Dieser Zelluntergang erfolgt in den zwei unterschiedlichen Zelltodmechanismen Nekrose und Apoptose. Verschiedene Studien führen den überwiegenden Anteil des Zelluntergangs nach SHT auf Nekrose zurück [12, 43]. Nekrotischer und apoptotischer Zelluntergang findet sich nach SHT in einem gemischt fokal-diffusen Verteilungsmuster im direkten Umfeld und auch in tieferen Hirnregionen ipsi- und kontralateral des Traumas [43–45].

Als Apoptose bezeichnet man den Vorgang des programmierten Zelltods. Dem Mechanismus der Apoptose liegen verschiedene pathophysiologische Mechanismen zugrunde. Detektierbar sind apoptotische Zellen unter anderem durch typische DNA-Strangbrüche, darstellbar durch vermehrte TUNEL-Expression [46] und typische zellmorphologische Veränderungen. Ein pathophysiologischer Mechanismus, welcher zu apoptotischem neuronalem und glialem Zelltod führt, ist ein posttraumatischer oder postischämischer zellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx, welcher zu intrazellulärer Aktivierung



neuronaler Caspasen und der Protease Calpain und in Folge zur Aktivierung proteolytischer Enzyme führt [12, 47, 48]. Auch spielen MAPK-Signalwege, die Expression von Transkriptionsfaktoren wie p53 und die Regulation durch Proteine der Bcl-2 Familie eine Rolle für das Zustandekommen des programmierten neuronalen Zelltods [12, 49, 50]. Proteine der Bcl-2 Familie sind gemischt pro- oder antiapoptotisch wirksame Effektoren, welche posttraumatisch überexprimiert werden und Regeneration und programmierten Zelltod regulieren. Bcl-2 wirkt antiapoptotisch, während andere Proteine derselben Familie, wie Bax und Bid, proapoptotisch wirken [12, 35, 51, 52]. Eine erhöhte Expression von Bcl-2 konnte in vorhergehenden Studien mit vermindertem kortikalem Zellverlust korreliert werden [12, 53, 54].

### **3.4 Therapie des Schädel-Hirn-Traumas**

Die durch das initiale SHT entstehende primäre Hirnschädigung ist keiner Therapie zugänglich. Einzige mögliche Maßnahmen zur Verringerung des primären Hirnschadens sind Verbesserungen in der Prävention von Kopfverletzungen. Die Therapie des SHT hat zum Ziel, in die pathophysiologische Kaskade der auf das initiale Trauma folgenden sekundären Hirnschädigung einzugreifen.

#### **3.4.1 Allgemeine konservative Therapiemaßnahmen**

Patienten mit schwerem SHT ( $GCS \leq 8$ ) sollten aufgrund fehlender Schutzreflexe möglichst schon am Unfallort schutzintubiert und beatmet werden. Eine Überwachung des Blutdrucks und der Sauerstoffsättigung sollten sofort erfolgen, wobei wegen des zu erwartenden hohen ICP eher hohe als tiefe Werte des MAP angestrebt werden sollten. Ein Abfall des MAP und/oder der Sauerstoffsättigung sind prognostisch ungünstig, die Zielwerte des systolischen Blutdrucks von  $>90\text{mmHg}$  und der Sauerstoffsättigung  $>90\%$  sollten nicht unterschritten werden [1, 11, 26, 55]. Eine Indikation zur kontinuierlichen Messung des ICP ist nach den aktuellen Leitlinien der Brain Trauma Foundation (2016) bei schwerem SHT ( $GCS \leq 8$ ) nach Erhebung von Pathologien in der zerebralen Bildgebung oder bei schwerem SHT ( $GCS \leq 8$ ) ohne pathologische Bildgebung bei Vorliegen eines initialen systolischen Blutdrucks von  $<90\text{mmHg}$ , bilateraler Streckkrämpfe oder bei einem Patientenalter  $>40$  Jahren gegeben [25]. Als Goldstandard hierbei gilt die kontinuierliche Messung des ICP über eine externe Ventrikeldrainage, was im Gegensatz zu einer intraparenchymatösen ICP-Messung den Vorteil der Möglichkeit einer sofortigen Entlastung durch Ablassen von Liquor cerebrospinalis ermöglicht [1, 11, 14, 26, 55]. In ihren aktuellen Leitlinien (2016) empfiehlt die Brain Trauma Foundation die Therapie eines erhöhten ICP ab einem Wert von  $\geq 22\text{ mmHg}$  [56].

### **3.4.2 Therapie des erhöhten intrakraniellen Drucks**

Zur Senkung eines erhöhten ICP nach SHT werden konservative Methoden wie die Hochlagerung des Oberkörpers um 30° und eine osmotische Therapie mit Mannitol oder hyperosmolarer Kochsalzlösung angewandt, um das posttraumatische Hirnödem zu vermindern [26]. Die langfristige Therapie mit Osmodiuretika bei nicht kritisch erhöhtem ICP ist jedoch durch unerwünschte Nebenwirkungen, wie erhöhter Thrombogenität und dem Vorkommen reaktiver Vasodilatation, nicht empfohlen [14]. Bei refraktär erhöhtem ICP trotz der erwähnten Maßnahmen sollte zu eskalierenden konservativen Therapieoptionen gegriffen werden. So kann eine temporäre Hyperventilation zur Anwendung kommen, um den CBF zu reduzieren und damit den ICP zu senken. Eine langfristige oder gar präventive Hyperventilation wird aufgrund der Gefahr einer Induktion von Ischämien durch die CBF – Reduktion nicht mehr empfohlen [14]. Alternativ ist es möglich, Patienten mit refraktärer, nicht anders zu behobender ICP-Krise unter kontinuierlicher EEG-Kontrolle in ein Barbituratcoma zu versetzen, um den zerebralen Sauerstoffbedarf zu reduzieren [14, 26]. Die Anwendung von Glukokortikoiden zur Senkung eines erhöhten ICP ist nach SHT zu jeder Zeit kontraindiziert, da sie in verschiedenen Studien mit einer signifikant erhöhten 14-Tages Letalität einhergeht [26, 56, 57].

### **3.4.3 Dekompressive Kraniektomie**

Bei konservativ nicht zu kontrollierendem ICP-Anstieg bietet die operative Therapie des SHT die Möglichkeit der Durchführung einer dekompressiven Kraniektomie mit Duraerweiterungsplastik (DC). Diese Prozedur führt durch Entfernen eines großen Knochenstücks zur Unterbrechung der Kontinuität der Schädeldecke und zieht so eine Druckentlastung des Hirngewebes nach sich, welches sich fortan über die anatomischen Grenzen hinweg ausdehnen kann [1, 11, 26, 56]. Etablierte Methoden zur Durchführung einer dekompressiven Kraniektomie sind die bifrontale dekompressive Kraniektomie sowie die temporoparietale Hemikraniektomie [56, 58].

Unumstritten führt die Durchführung einer dekompressiven Kraniektomie nach SHT zu einer effektiven Senkung des ICP [59, 60]. Der Nutzen dieser Therapiemöglichkeit über die ICP-Senkung hinaus ist in der Literatur jedoch umstritten. So konnte nach überwiegend positiven Ergebnissen experimenteller und kleinerer klinischer Studien bezüglich der Anwendung der DC nach SHT [61–69] in einer großen randomisierten Studie von Cooper et al. (DECRA-Studie, 2011) weder eine verminderte Mortalität noch eine Verbesserung der neurologischen Funktion durch die Durchführung der DC nach SHT im Gegensatz zur konservativen Therapie dargestellt werden [60]. Die langfristige neurologische Funktion zeigte sich im Gegenteil in der operativen Gruppe verschlechtert. Eine neuere randomisierte klinische Studie von Hutchinson et al. (RESCUEicp, 2016) konnte im Gegensatz dazu eine deutliche Mortalitätsreduktion durch die Durchführung einer DC nach SHT aufweisen [59]. Einher ging dies mit einem erhöhten Vorkommen von vegetativem Status und schwerer Behinderung

in der operativen Gruppe. Das Vorkommen leichter Behinderung und vollständiger Erholung unterschied sich in den Gruppen jedoch nicht.

In ihren aktuellen Leitlinien (2016) empfiehlt die Brain Trauma Foundation die Durchführung einer dekompressiven Kraniektomie zur Senkung eines trotz maximaler konservativer Therapie refraktär erhöhten ICP von > 20 mmHg über 15 Minuten innerhalb einer Stunde [56].

#### **3.4.4 Therapeutische Hypothermie**

Hypothermie wird ein ausgeprägter neuroprotektiver Effekt nachgesagt. Hypothermie senkt einen erhöhten ICP [70–73], reduziert zerebralen Metabolismus und Sauerstoffbedarf [74–76] und sorgt durch eine Reduktion von Störungen der Blut-Hirn-Schranke für eine verminderte Hirnödembildung [77]. Auch vermindert Hypothermie die neuroinflammatorische Gewebeantwort [71, 78, 79], reduziert Neuronenverlust und hemmt Apoptose [80–85].

Der Nutzen der Anwendung therapeutischer Hypothermie nach SHT ist in der Literatur aktuell umstritten. Nachdem verschiedene experimentelle und kleinere klinische Studien zur Anwendung systemischer Hypothermie nach SHT einen neuroprotektiven und mortalitätsreduzierenden Effekt darstellen konnten [86–92], gelang dieser Nachweis in multizentrischen randomisierten klinischen Studien nicht [70, 72, 93]. Aufgrund der Studienlage empfiehlt die Brain Trauma Foundation (2016) die Anwendung systemischer Hypothermie nach SHT aktuell nicht [25].

#### **4. Eigene Fragestellung**

Die vorliegende Arbeit soll die Auswirkungen einer dekompressiven temporoparietalen Hemikraniektomie allein und in Kombination mit der Anwendung therapeutischer fokaler Hypothermie auf die neurologische Langzeitfunktion in einem Mausmodell des geschlossenen Schädel-Hirn-Traumas evaluieren.

Teil Eins unserer Fragestellung beinhaltet, inwiefern die Durchführung einer dekompressiven Hemikraniektomie nach Schädel-Hirn-Trauma die neurologische Langzeitfunktion beeinflusst.

In Teil Zwei unserer Fragestellung interessiert, ob die zusätzliche Anwendung therapeutischer fokaler Hypothermie nach operativer Dekompression in einem kombinierten Therapieverfahren durch die Entfaltung neuroprotektiver Effekte zu einer Verbesserung der neurologischen Langzeitfunktion im Vergleich zur alleinigen Durchführung der operativen Dekompression führt.

Daran anschließend folgt eine Betrachtung der Auswirkungen dieser Therapieoptionen auf die Ausbildung von strukturellem Hirnschaden, Neuronenverlust, Hirnödem, Neuroinflammation und Apoptose in einer histologischen und immunhistochemischen Aufarbeitung.

Hierbei soll der Einfluss dekompressiver Kraniektomie und kombiniert applizierter therapeutischer fokaler Hypothermie auf die Ausbildung dieser pathophysiologischen Folgen des Schädel-Hirn-Traumas evaluiert werden.

## **5. Material und Methoden**

### **5.1 Versuchstiere**

Die Versuche wurden durchgeführt an männlichen Wildtyp CD-1 Mäusen der Züchtung Charles River im Alter zwischen sechs bis acht Wochen und mit einem mittleren Gewicht von 37,5g.

Für die Zeit der laufenden Versuche wurden die Tiere im Tierstall des Instituts für Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlands unter tierärztlicher Leitung versorgt. Alle an den Tieren durchgeführten Prozeduren wurden zu Beginn durch eine Ethikkommission bewilligt (Tierversuchsantrag 17/2013). Die Handhabung der Tiere durch die an der Versuchsdurchführung beteiligten Personen wurde durch die Tierschutzbeauftragte der Universität des Saarlands kontrolliert und die selbstständige Handhabung der Versuchstiere durch die Autorin dieser Arbeit durch die Ausstellung einer Sondergenehmigung autorisiert. Zur Versuchsdurchführung wurden die Tiere in fünf Versuchsgruppen randomisiert (**Tab. 2**). Die angestrebte Gruppengröße lag bei acht überlebenden Tieren pro Gruppe.

Folgende fünf Gruppen wurden über einen Zeitraum von 28 Tagen postoperativ beobachtet:

Versuchsgruppe	Kürzel	Erklärung
Sham	NNN	Sham-Gruppe nur mit Hautschnitt, ohne Trauma oder Therapie
Trauma	TNN	Kontrollgruppe mit Trauma ohne Therapie
Kraniektomie	NCN	Kontrollgruppe mit Kraniektomie ohne Trauma
Kraniektomie + Trauma	TCN	Therapiegruppe mit Trauma und Kraniektomie
Kraniektomie + Trauma + Hypothermie	TCH	Therapiegruppe mit Trauma, Kraniektomie und fokaler Hypothermie

**Tabelle 2: Übersicht über die Versuchsgruppen**

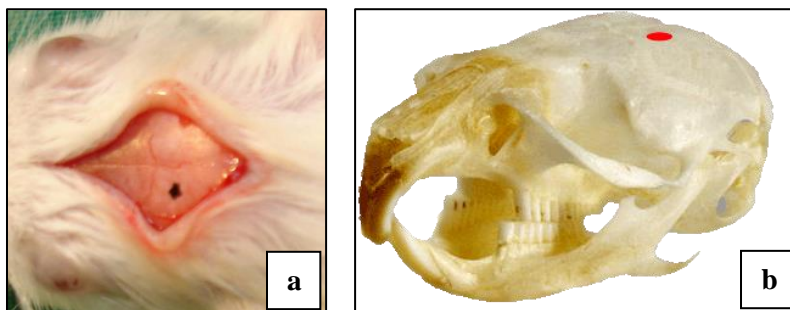
## 5.2 Operativer Versuchsabschnitt

### 5.2.1 Versuchsvorbereitung und Markierung des Trauma-Areals

Zu Beginn des Versuches wurde mit einer Waage (Siena Plus, Soehnle) das Ausgangsgewicht des Versuchstiers erfasst. Anschließend wurde unter einem Trichter die Narkose eingeleitet. Dazu wurde das Tier mit einem Gasgemisch aus 3 Vol-% Isofluran (Baxter) und 1 Liter Sauerstoff beatmet. Nach Eintreten der Bewusstlosigkeit und Prüfung einer ausreichenden Sedierungstiefe anhand ausgefallener Schmerzempfindlichkeit wurde das Tier auf dem Operationstisch in einem stereotaktischen Rahmen im Meatus acusticus externus fixiert und die Inhalationsnarkose über eine Maske aufrechterhalten. Während der Operation wurde die Narkosetiefe individuell an die jeweiligen Bedürfnisse des Tieres zwischen 1,5 und 2,5 Vol-% Isofluran bei 0,5 bis 1 Liter Sauerstofffluss angepasst. Zum Schutz vor Austrocknung wurden die Corneae mit einer anfeuchtenden Salbe (Bepanthen, Bayer AG) bedeckt. Das Versuchstier wurde während der Operation auf einer mit einer rektal eingeführten Temperatursonde gekoppelten Heizplatte platziert (TCAT - 2LV, Phystemp Instruments Inc.). Eine physiologische Körperkerntemperatur von 37°C wurde angestrebt.

Die folgenden Operationsschritte wurden in mikrochirurgischer Technik unter der Vergrößerung eines Operationsmikroskops (SuperLux 300, Zeiss) durchgeführt.

Nach Überprüfen einer ausreichenden Narkosetiefe durch Nachweis eines negativen Zwischenzehenreflexes erfolgte anschließend an die Hautdesinfektion (Octenisept, Schülke) ein medianer Hautschnitt mittels Skalpell, von frontal auf Augenhöhe bis kaudal zum Ansatz der Nackenmuskulatur reichend. Die Schädelkalotte wurde durch vorsichtiges Abtragen der Galea mittels scharfem Löffel freigelegt und mit einem wasserfesten Stift die gewünschte Lokalisation des Traumas 1mm links der Sutura sagittalis und 2mm okzipital des Bregmas markiert (**Abb. 1 a+b**).



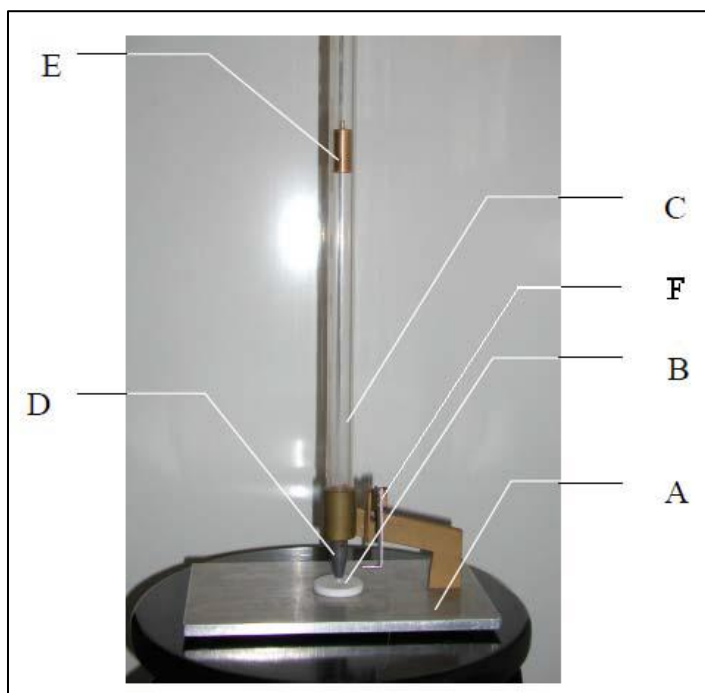
**Abb. 1 a+b:** Traumalokalisation in situ und im Schädelmodell: Markierung der gewünschten Traumastelle 1 mm lateral der Sutura sagittalis und 2 mm okzipital des Bregmas im Operationssitus (a) und im Schädelmodell einer Maus (b).

## 5.2.2 Applikation des Traumas

Nach erneutem Überprüfen einer ausreichenden Narkosetiefe erfolgte in den entsprechenden Gruppen (TNN, TCN, TCH) die Applikation des Traumas. Für das Zufügen eines geschlossenen Schädel-Hirn-Traumas wurde die etablierte Methode des „weight drop impact“ nach Chen et al. verwendet (**Abb. 2**) [94, 95]. Hierzu wurde das Versuchstier so in die Apparatur eingespannt, dass ein definiertes Gewicht von 75g aus der definierten Höhe von 30cm im freien Fall auf die markierte Lokalisation des Kraniaums einwirken konnte [96, 97]. Anschließend wurde das Tier unter fortlaufender Narkose wieder in den stereotaktischen Rahmen eingespannt.

In Vergleichsgruppen ohne Trauma (NNN, NCN) wurde ein sogenanntes Pseudotrauma ausgeführt. Hierfür wurde das Versuchstier aus dem stereotaktischen Rahmen entfernt, in das Gerät zur Applikation eingeführt und anschließend ohne dessen Ausführung zurück in den stereotaktischen Rahmen eingespannt.

Als weiterer Operationsschritt wurde nach punktförmiger Inzision der Haut medial des rechten Ohres mittels Skalpell eine zweite Temperatursonde (ET 1, Erbe Medizintechnik Tübingen) im rechten M. Temporalis angebracht, um möglichst genau die kraniale Temperatur des Tieres zu erfassen. Auch hier wurde eine physiologische Temperatur von 37°C angestrebt. Zum Schutz vor Unterkühlung durch den offenen Schädel wurde eine Infrarotlampe (25W, Philips) verwendet. Das Verstreichen einer Stunde nach der Applikation des Traumas wurde abgewartet, bevor weitere Schritte im Versuchsablauf folgten. Während der gesamten Operationsdauer wurde die Temperatur über die eingeführten Sonden kontinuierlich gemessen und viertelstündlich notiert.



**Abb. 2: Traumamodell nach Chen et al. [94]:** Auf einer stabilen Bodenplatte aus Aluminium (A), auf der das Versuchstier fixiert wird, ist eine aus Kunststoff bestehende Auflagefläche für den Kopf des Tieres (B) angebracht. Durch eine mit cm-Angaben beschrifteten Plexiglasröhre (C) wird ein definiertes Gewicht von 75 g (E) aus der definierten Höhe von 30 cm fallen gelassen. Das an einer Schnur mit dem Auslösemechanismus (F) verbundene Gewicht trifft beim Fall auf den frei beweglichen Metallkonus (D), der dem Kanium des Tieres direkt aufliegt.

### 5.2.3 Dekompressive Kraniektomie

Nach Verstreichen der ersten Operationsstunde wurde in den entsprechenden Gruppen (NCN, TCN, TCH) eine dekompressive temporoparietale Hemikraniektomie durchgeführt, deren Dauer zwischen 45 und 60 Minuten betrug. Hierzu wurden Os temporale und Os parietale über der Traumastelle mit einem im Durchmesser 1,5mm messenden Diamantbohrer eröffnet. Das so entstandene Knochenstück mit einer Größe von etwa 5mm x 7mm wurde anschließend entfernt und die Dura mater mittels Skalpell eröffnet (**Abb. 3**).

In Vergleichsgruppen, für die diese Prozedur nicht vorgesehen war (NNN, TNN), wurde das Verstreichen einer weiteren Stunde abgewartet, bevor der nächste Operationsschritt folgte.

Nach Ablauf der zweiten Operationsstunde wurde der Hautschnitt durch mehrere Einzelknopfnähte (Premilene 6-0, B. Braun) verschlossen. Im Anschluss erfolgte die intraperitoneale Applikation von auf die Körpertemperatur des Tieres erwärmter 0,9% Kochsalzlösung (B. Braun) in der Dosierung 0,2ml/g Körpergewicht.



**Abb. 3: Schädelmodell einer Maus:** Darstellung der im Versuch durchgeführten dekompressiven Hemikraniektomie.

### 5.2.4 Applikation fokaler Hypothermie

In der Hypothermie-Gruppe (TCH) folgte auf die dekompressive Hemikraniektomie und den Hautverschluss die einstündige Applikation therapeutischer fokaler Hypothermie über der Lokalisation des Traumas. Hierzu wurde eine Kühlsonde (Erbokryo AE, Erbe Medizintechnik Tübingen) mit einem Durchmesser von 3mm auf die betreffende Stelle aufgelegt und fixiert. Die Kühlsonde wurde auf eine Temperatur von 0-4°C eingestellt und so eine Kopftemperatur (gemessen über die Temperatursonde im M. temporalis ipsilateral) von 32°C angestrebt. Die Infrarotlampe wurde während dieses Vorgangs abgestellt. Die fokale Kühlung wurde für die Dauer der letzten Stunde der Operation aufrechterhalten.



### **5.2.5 Narkoseausleitung**

Nach Ablauf der dritten Stunde und Entfernung der Temperatursonden wurde das Versuchstier unter Zufuhr von 1 Liter Sauerstoff aufgeweckt. Sobald die Narkose nachließ, wurde das Tier in seinen zum Schutz der Wunde mit Zellstoff ausgelegten Käfig gesetzt und bis zur ersten postoperativen Nahrungsaufnahme überwacht. Während dieser Überwachung diente eine weitere Infrarotlampe (25W, Philips) der passiven Erwärmung des Tieres. Anschließend wurde das Tier zur Pflege in den Tierstall zurückgebracht.

### **5.3 Gewichtsdokumentationen**

Sowohl vor der Operation als auch an den postoperativen Überwachungstagen 1, 3, 7, 14 und 28 wurde zur Verlaufsbeurteilung das Gewicht der Versuchstiere bestimmt. (Waage Siena Plus, Soehnle)

### **5.4 Neurologische Statuserhebungen**

Zur Beurteilung der neurologischen Beeinträchtigung postoperativ und deren Erholung im Verlauf wurden die Versuchstiere jeweils nach 24 und 48 Stunden sowie an den nachfolgenden Tagen 7, 14 und 28 neurologischen Untersuchungen unterzogen. Bei der Erhebung aller Scores erfolgte zwischen jeder Aktion je eine Erholungspause von 60 Sekunden.

Die durchgeführten neurologischen Tests, der Neurological Severity Score (NSS) und der Beam Balance Score (BBS), sind angelehnt an die neurologische Statuserhebung nach Chen et al. und haben sich bereits in Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe bewährt [97, 98].

#### **5.4.1 Neurological Severity Score (NSS)**

Zur Erhebung des NSS musste das Versuchstier einen Parcours bewältigen. Jede nicht befriedigend ausgeführte Aktion zog die Erteilung eines Strafpunktes nach sich. So ist das bestmögliche zu erzielende Ergebnis des NSS ein Score von 0 und das schlechtmögliche zu erzielende Ergebnis ein Score von 10 Strafpunkten.

Den ersten Teil dieser Untersuchung absolvierte das Versuchstier in einem runden Behältnis, welches eine kleine Öffnung enthielt, durch welche es innerhalb von 60 Sekunden den Ausgang finden sollte. Beurteilt wurden das Suchverhalten, die Fähigkeit zum Geradeauslaufen und eventuell vorhandene Paresen. Das Vorhandensein einer intakten Schreckreaktion wurde durch lautes in die Hände klatschen evaluiert (Tab. 3, Abb. 4a).

Ausgang finden	Gekonnt = 0	Nicht gekonnt = 1
Parsen	Nicht vorhanden = 0	Vorhanden = 1
Auf Linie laufen	Gekonnt = 0	Nicht gekonnt = 1
Schreckreaktion	Vorhanden = 0	Nicht vorhanden = 1
Suchverhalten	Vorhanden = 0	Nicht vorhanden = 1

**Tabelle 3: Erhebung des NSS, Teil 1**

Im zweiten Teil der Erhebung des NSS wurde die Fähigkeit des Balancierens auf einem runden sowie einem kantigen Stab beurteilt, was jeweils für 60 Sekunden geschafft werden sollte. Des Weiteren galt es, über hölzerne Balken verschiedener Breite zu balancieren (**Tab. 4, Abb. 4b+c**).

Balancieren runder Stab	Gekonnt = 0	Nicht gekonnt = 1
Balancieren kantiger Stab	Gekonnt = 0	Nicht gekonnt = 1
Balancieren Balken 3cm	Gekonnt = 0	Nicht gekonnt = 1
Balancieren Balken 2cm	Gekonnt = 0	Nicht gekonnt = 1
Balancieren Balken 1cm	Gekonnt = 0	Nicht gekonnt = 1

**Tabelle 4: Erhebung des NSS, Teil 2**



**Abb. 4 Erhebung des NSS:** Suche nach dem Ausgang (a), Balancieren auf kantigem Stab (b) und Balancieren auf hölzernem Balken (c).

#### 5.4.2 Beam Balance Score (BB-Score)

Zur Erhebung des BB-Score musste das Versuchstier für maximal 60 Sekunden auf einem runden Stab balancieren. Für Schwächen im Akt des Balancierens wurden Strafpunkte verteilt (**Tab. 5**). Dieser Vorgang wurde mit einer jeweiligen Ruhepause von 60 Sekunden dreimal wiederholt und die jeweils erhobenen Strafpunkte wurden zur Erhebung des Gesamt-Scores gemittelt.

Aktion	Strafpunkte
Sofortiges Hinunterfallen	5
Nur kurzes Festhalten mit Vorderpfoten	4
Hängen unterhalb des Balkens	3
Zeitweises Balancieren auf Balken	2
Dauerhaftes Balancieren auf Balken	1

**Tabelle 5: Erhebung des Beam Balance Scores**

### 5.4.3 Beam Balance Time (BB-Time)

Zuletzt wurde im Zuge der oben beschriebenen Erhebung des BB-Score die summierte Balancierzeit der Versuchstiere bestimmt. So betragen die maximal zu erzielende BB-Time 180 und die minimal zu erzielende BB-Time 0 Sekunden.

## 5.5 Euthanasie der Versuchstiere

### 5.5.1 Intrakardiale Formaldehydperfusion

Nach Erfassung des aktuellen Körpergewichts und Narkotisierung mittels Isofluran (Baxter) wurde gewichtsadaptiert eine letale Dosis (0,2ml/10g Körpergewicht) der Medikamente Ketamin (Ketavet, Zoetis) und Xylazin (Rompun, Bayer) in einem Mischungsverhältnis von 1ml Ketamin und 0,5ml Xylazin mit 10ml 0,9% NaCl (Mischung T61) intraperitoneal appliziert. Nach der Bestätigung einer adäquaten Sedierungstiefe durch fehlende Schmerzreaktion wurde das Tier in Rückenlage fixiert und der Brustkorb über eine mediane Sternotomie eröffnet. Am freigelegten noch schlagenden Herzen wurde das rechte Atrium eröffnet und zeitgleich isotone NaCl-Lösung in den linken Ventrikel injiziert. Nach so erfolgtem Entbluten wurde nachfolgend für zwei Minuten 4% Formaldehyd-Lösung (Roth) in den linken Ventrikel injiziert.

### 5.5.2 Präparation des Gehirns

Im direkten Anschluss an die Euthanasie des Versuchstieres wurde der Schädel eröffnet, das Gehirn präpariert und für die nachfolgende histologische Aufbereitung in 4% Formaldehyd-Lösung aufbewahrt.

## 5.6 Histologische Aufbereitung

### 5.6.1 Anfertigung von Paraffinschnitten

Zur Histologischen Aufbereitung wurden die präparierten Gehirne der Versuchstiere im Rahmen einer Standardprozedur zur histologischen Nachbereitung entwässert und in Paraffinblöcke eingebettet (Shandon Hypercenter XD, Histocenter 2).

Die anatomische Orientierung über die Präparate erfolgte anhand des Atlas „The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates“ [99] und über die Website „The Allen Mouse Brain Atlas“ [100] (Abb. 5). Anschließend wurden mit einem Schlittenmikrotom (CUT 5062 SLEE medical) von jedem Versuchstier in je drei Regionen auf Höhe des Hippocampus jeweils 10 koronare Serienschnitte in einem Abstand von 5µm angefertigt (Tab. 6). Die Schnitte wurden in einem erhitzten Wasserbad aufgetragen und auf silanisierte Objektträger aufgezogen.

Schnittserie 1	BREGMA - 0,64
Schnittserie 2	BREGMA - 1,34
Schnittserie 3	BREGMA - 1,94

Tabelle 6: Regionen der verschiedenen Schnittserien

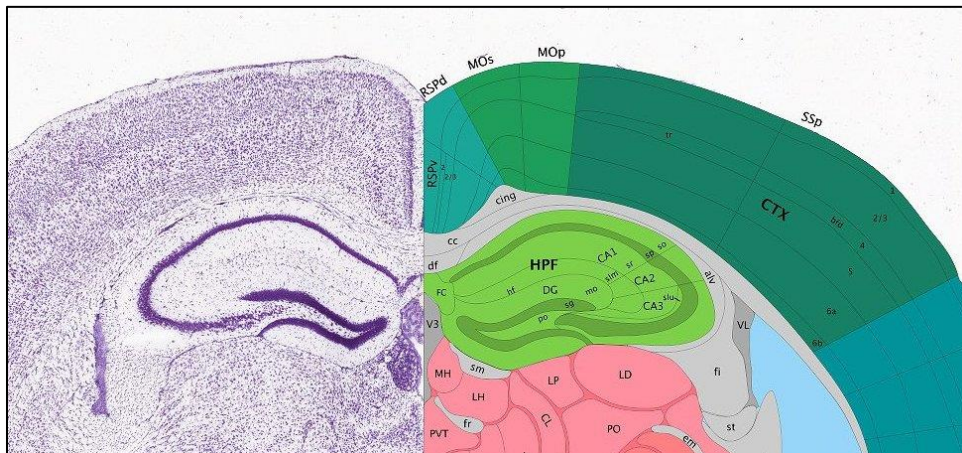


Abb. 5: Anatomie des mäusehirns, Areal Hippocampus. Graphik: Allen Mouse Brain Atlas [100]

### 5.6.2 Histologische Standardfärbungen

An jedem Präparat wurden von je einem Paraffinschnitt pro Region die histologischen Standard-Übersichtsfärbungen Hämatoxylin-Eosin (HE) und Nissl durchgeführt.

Vor jeder histologischen Färbung wurden die Schnitte nach demselben Schema entparaffiniert und rehydriert, um sie auf die nachfolgende Färbeprozedur vorzubereiten (Tab. 7).

<b>Arbeitsschritt</b>	<b>Material</b>	<b>Dauer [Minuten]</b>
Erhitzen 60°C	Wärmeschrank	30
Eintauchen	Xylol	15
Eintauchen	Ethanol 100 %	10
Eintauchen	Ethanol 96 %	5
Eintauchen	Ethanol 70 %	5
Eintauchen	Aqua dest.	5

**Tabelle 7: Arbeitsschritte Entparaffinieren und Rehydrieren**

Nach Beendigung der Färbungen erfolgten die umgekehrte Dehydrierung der Schnitte und das abschließende Aufbringen eines Deckglases zur Mikroskopie (**Tab. 8**).

<b>Arbeitsschritt</b>	<b>Material</b>	<b>Dauer [Minuten]</b>
Eintauchen	Ethanol 100%	6
Eintauchen	Xylol	2
Eindecken	Deckglas	-

**Tab. 8: Arbeitsschritte Dehydrieren und Eindecken**

### 5.6.2.1 Färbungen mit Hämatoxylin-Eosin (HE)

Die HE-Färbung ist eine histologische Standard-Übersichtsfärbung, im Zuge derer durch den basischen Farbstoff Hämatoxylin (Mayers Hämalaun, Carl Roth) Zellkerne blau und durch den sauren Farbstoff Eosin (Eosin G, Carl Roth) Zytoplasma rot angefärbt wird. Diese Standardfärbung eignet sich zur einfachen morphologischen Beurteilung der Präparate [101] (**Tab. 9**).

<b>Arbeitsschritt</b>	<b>Material</b>	<b>Dauer [Minuten]</b>
Eintauchen	Mayers Hämalaun (Carl Roth)	15
Bläuen	Fließendes Leitungswasser	10
Eintauchen	Aqua dest.	2
Eintauchen	Eosin-G (Carl Roth)	5

Eintauchen	Aqua dest.	2
Dehydrierung	Ethanol (100 %)	6
Eintauchen	Xylol	2
Eindecken	Rothi Histokitt (Roth)	-

**Tabelle 9: Arbeitsschritte HE-Färbung**

### 5.6.2.2 Nissl-Färbungen

Bei der Nissl-Färbung handelt es sich um eine neurohistologische Standardfärbemethode, im Zuge derer durch basische Farbstoffe insbesondere die Perikarya von Neuronen deutlich dargestellt werden können [101, 102] (Tab. 10).

Arbeitsschritt	Material	Dauer [Minuten]
Eintauchen	Kresylviolett (Merck)	10
Eintauchen	Natrium-Acetat-Puffer	5
Eintauchen	Isopropylalkohol	5
Eintauchen	Aqua dest.	2
Dehydrierung	Ethanol (100 %)	6
Eintauchen	Xylol	2
Eindecken	Rothi Histokitt (Carl Roth)	-

**Tabelle 10: Arbeitsschritte Nissl-Färbung**

### 5.6.3 Immunhistochemische Färbungen

#### 5.6.3.1 Material Immunhistochemie (Tab. 11 – 13)

Antikörper	Spezifität	Verdünnung	Herkunft
Anti-Bcl-2 (N-19)	Kaninchen	1 : 100	Santa Cruz Biotechnology (sc-492)
Anti-GFAP (H-80)	Kaninchen	1 : 100	Abcam (ab-16997)
Anti-AQP4	Kaninchen	1 : 100	Santa Cruz Biotechnology (sc-20812)

**Tabelle 11: Verwendete Primärantikörper**

<b>KIT</b>	<b>Herkunft</b>
Vectastain Elite ABC HRP Kit (Peroxidase Rabbit IgG)	Vector Laboratories (PK-6101)
Avidin / Biotin Blocking Kit	Vector Laboratories (SP-2001)
Vector VIP Peroxidase (HRP) Substrate Kit	Vector Laboratories (SK-4600)

**Tabelle 12: Verwendete KITs**

<b>Lösung</b>	<b>pH</b>	<b>Verdünnung und Zusatz</b>
Tris-Puffer	7,5	-
Tris-Gebrauchslösung	7,5	1 : 10 plus 15 g NaCl
Tris-Spüllösung	7,5	Gebrauchslösung plus 1 ml Tween 20
Citratpuffer	6	-
Citratpuffer-Gebrauchslösung	6	1 : 10

**Tabelle 13: Verwendete Lösungen**

### **5.6.3.2 Indirekte Immunhistochemie nach der ABC-Methode (Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex)**

Diese indirekte Antigennachweismethode zählt zu den Enzym-Immunglobulin-Komplex-Methoden, welche im Gegensatz zu direkten oder anderen indirekten Nachweismethoden eine erhöhte Sensitivität besitzen. Grundlage dieser Nachweismethode ist die hohe Bindungsaffinität des Glykoproteins Avidin zum Vitamin Biotin.

Im Zuge dieser Färbemethode wird zunächst das darzustellende Antigen mittels entsprechender Primärantikörper markiert. Ein biotinylierter Sekundärantikörper bindet spezifisch an diesen Primärantikörper und dient als Bindestelle für den nachfolgenden Avidin-Peroxidase-Komplex. Die entstehende stabile Bindung wird durch Zugabe des Peroxidase-Substrates enzymhistochemisch dargestellt [101–103].

Nach diesem Schema wurde mit den drei Primärantikörpern jeweils ein ausgewählter repräsentativer Schnitt pro Versuchstier angefärbt. Im Anschluss an die immunhistochemische Färbung erfolgten die einfache Kernfärbung mit Hämatoxylin, die anschließende Dehydrierung der Schnitte in 100% Ethanol und schließlich das Aufbringen von Deckgläsern zur abschließenden Mikroskopie.

### 5.6.3.3 Darzustellende Zielstrukturen

Zur Darstellung des antiapoptotisch wirksamen Proteins Bcl-2 wählten wir den polyklonalen Antikörper Anti-Bcl-2 (N-19). Mithilfe des polyklonalen Antikörpers Anti-GFAP (H-80) werden aktivierte Astrozyten spezifisch dargestellt, die das Protein GFAP auf ihren Zielfortsätzen exprimieren. Der Wasserkanal Aquaporin-4 wurde durch den Antikörper Anti-AQP4 spezifisch dargestellt. (Rolle der darzustellenden Zielstrukturen beim SHT siehe Einleitung 1.3.2 Sekundäre Hirnschädigung)

### 5.6.3.4 Schema immunhistochemische Färbungen (Tab. 14)

Arbeitsschritt	Material	Dauer [Minuten]
Antigendemaskierung	Citratpuffer-Gebrauchslösung	40
Spülen	Tris-Spüllösung	5
Blockierung endogene Peroxidaseaktivität	99 ml Methanol, 1 ml H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	20
Blockierung endogener Biotin- und Avidin-Bindungsstellen	Normalserum, Avidin / Biotin Blocking KIT	30
Auftragen der Primär-Antikörper	Siehe Tabelle ( <i>Tabellen-Nr.</i> )	Inkubation über Nacht
Spülen	Tris-Spüllösung	5
Auftragen biotinylierter Sekundär-Antikörper	Vectastain Elite ABC HRP Kit (Peroxidase Rabbit IgG)	60
Spülen	Tris-Spüllösung	10
Auftragen des ABC-Reagenz zur Komplexbildung	Vectastain Elite ABC HRP Kit (Peroxidase Rabbit IgG)	20
Spülen	Tris-Spüllösung	10
Hinzugabe des Peroxidase-Substrats	Vector VIP Peroxidase (HRP) Substrate Kit	20
Eintauchen	Aqua dest.	5
Kernfärbung	Mayers Hämalaun ( <i>Carl Roth</i> )	2
Bläuen	Fließendes Leitungswasser	10
Dehydrierung	Ethanol (100 %)	6
Eindecken	Rothi-Histokitt ( <i>Carl Roth</i> )	-

**Tab. 14: Schema immunhistochemische Färbungen nach der ABC-Methode**



## **5.6.4 Mikroskopie der Präparate**

Die nach den oben aufgeführten Methoden angefärbten Paraffinschnitte wurden mit einem Lichtmikroskop (BX-43, Olympus Life Science) mikroskopiert und mit dazugehöriger Kamera (XC-30, Olympus Life Science) und Software (CellSens Dimension 1.9, Olympus Life Science) in den Vergrößerungen 4x, 10x und 20x fotografiert.

Um die für uns interessanten hippocampalen Regionen CA1 und CA3 aufzusuchen, orientierten wir uns am Anatomieatlas „The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates“ [99] sowie am Online Atlas „Allen Mouse Brain Atlas“ [100] (**Abb. 5**). Zur Eingrenzung dieser Regionen und um eine maximale Vergleichbarkeit zu erwirken, wurden die Bilder der 20x vergrößerten Schnitte anschließend mittels Bildbearbeitungssoftware (Adobe Photoshop Elements 9) auf ein Rechteck mit einer definierten Fläche von 100 x 50µm zurechtgeschnitten.

## **5.6.5 Mikroskopische Auswertung der Präparate**

### **5.6.5.1 Qualitative Auswertungen**

In jeder Versuchsgruppe wurde von jedem Versuchstier jeweils ein Paraffinschnitt der Region BREGMA - 1,34 in den beiden Standardfärbungen und auch in den drei immunhistochemischen Färbungen in jeder Vergrößerung qualitativ beurteilt. Anschließend wurden Vergleiche zwischen den verschiedenen Gruppen angestellt.

### **5.6.5.2 Quantitative Auswertungen**

Die 20x vergrößerten und auf die für die vorliegende Arbeit interessanten Areale CA1 und CA3 zugeschnittenen Bilder der Standardfärbung Nissl und der immunhistochemischen Färbungen Anti-Bcl-2 und Anti-GFAP wurden softwareassistent (ImageJ, Java) auf die Anzahl erhaltener neuronaler Perikarya (Nissl), der Expression des Proteins Bcl-2 (Anti-Bcl-2) und der reaktiven Astrozytenreaktion (Anti-GFAP) hin ausgezählt.

Der Versuch einer Quantifizierung der Anfärbung des Zielantigens AQP4 erfolgte durch die Erhebung eines Scores, der den Grad der Anfärbung wiederzuspiegeln versucht (**Tab. 15**).

<b>Antreffen der angefärbten Struktur</b>	<b>Punkte</b>
Vereinzelt	1
Leicht vermehrt	2
Vermehrt	3
Stark vermehrt	4

**Tabelle 15: Erhebung des Anfärbegrads von AQP4**

### **5.7 Statistische Auswertungen**

Alle statistischen Auswertungen erfolgten mit dem Programm Graphpad Prism (Version 7.03, Windows). Zur Auswertung der numerischen Ergebnisse wurde one way ANOVA mit Bonferroni multiple comparison test verwendet. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p = 0,05$  festgelegt, mit statistisch hoher Signifikanz bei  $p < 0,01$ .

## 6. Ergebnisse

### 6.1 Validierung der Versuchsmethodik

Um die Vergleichbarkeit der Ausgangsbedingungen in den einzelnen Gruppen zu beurteilen, wurden bestimmte intraoperative Faktoren, wie das initiale Körpergewicht, die Zufuhr von Sauerstoff und des Narkosegases Isofluran, sowie die Körper- und Kopftemperatur der Versuchstiere während der Operation erfasst und statistisch ausgewertet. (Siehe 3.2 Material und Methoden, Operativer Versuchsabschnitt)

Die Versuchstiere hatten zum Operationszeitpunkt ein mittleres Gewicht von  $38,6\text{g} \pm 5,79\text{g}$ . Zwischen den einzelnen Gruppen gab es diesbezüglich keinen statistisch signifikanten Unterschied ( $p = 0,4704$ ) (Abb. 6).

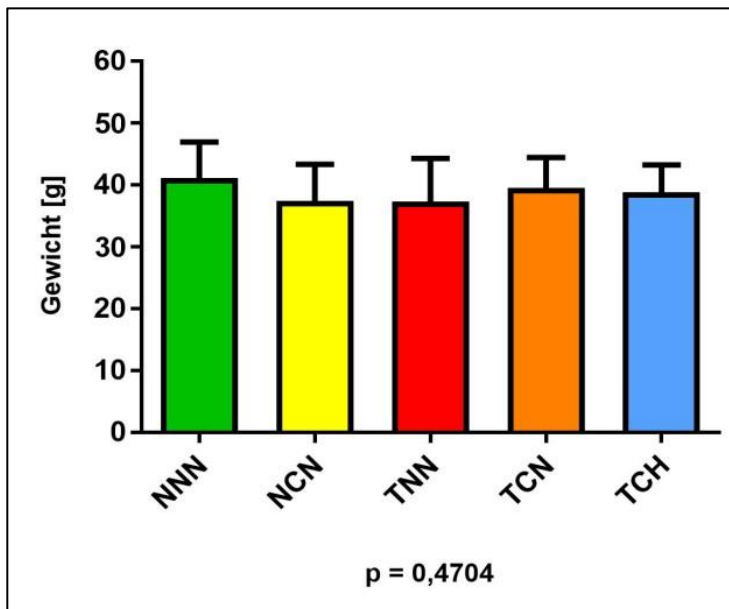


Abb. 6: Mittleres Körpergewicht in g zum Operationszeitpunkt

Die Zuteilung von Sauerstoff und des Narkosemittels Isofluran erfolgte individuell an den Bedarf des jeweiligen Tieres angepasst. So wurde bei Tieren, deren Allgemeinzustand sich während der Narkose verschlechterte, die Zufuhr von Isofluran verringert und gleichzeitig die Zufuhr von Sauerstoff erhöht. Die mittlere Zufuhr von Sauerstoff während der Operation lag bei  $0,6\text{ l/min} \pm 0,2\text{ l/min}$  und die des Narkosemittels Isofluran bei  $1,82\text{ l/min} \pm 0,17\text{ l/min}$ . Im Vergleich der einzelnen Gruppen mit der Kontrollgruppe NNN gab es bezüglich der Zuteilung beider Gase während der Operation keinen statistisch signifikanten Unterschied.

Die rektal gemessene mittlere Körpertemperatur in allen Gruppen lag während der Operation bei  $37,29^{\circ}\text{C} \pm 0,33^{\circ}\text{C}$  und die über die Temperatursonde im M. Temporalis festgestellte mittlere Kopf­temperatur bei  $35,85^{\circ}\text{C} \pm 1,2^{\circ}\text{C}$  (Abb. 7 und 8).

Auch bezüglich der mittleren Körpertemperatur während der Operation gab es zwischen den einzelnen Gruppen keinen statistisch signifikanten Unterschied. Die mittlere Kopf­temperatur war in der Hypothermie-Gruppe TCH jedoch hoch signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe NNN (TCH:  $33,7^{\circ}\text{C} \pm 1,3^{\circ}\text{C}$ , NNN:  $35,7^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ,  $p < 0,0001$ ), was die positive Validierung der angewandten fokalen Hypothermie erlaubt (Abb. 8).

Um eine optimale Kühlung bei der Anwendung der fokalen Hypothermie sicherzustellen, wurde ein scharfer Gradient zwischen Körper- und Kopf­temperatur angestrebt, der in der Gruppe TCH  $3,6^{\circ}\text{C}$  (Körpertemperatur  $37,3^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ , Kopf­temperatur  $33,7^{\circ}\text{C} \pm 1,3^{\circ}\text{C}$ ) betrug.

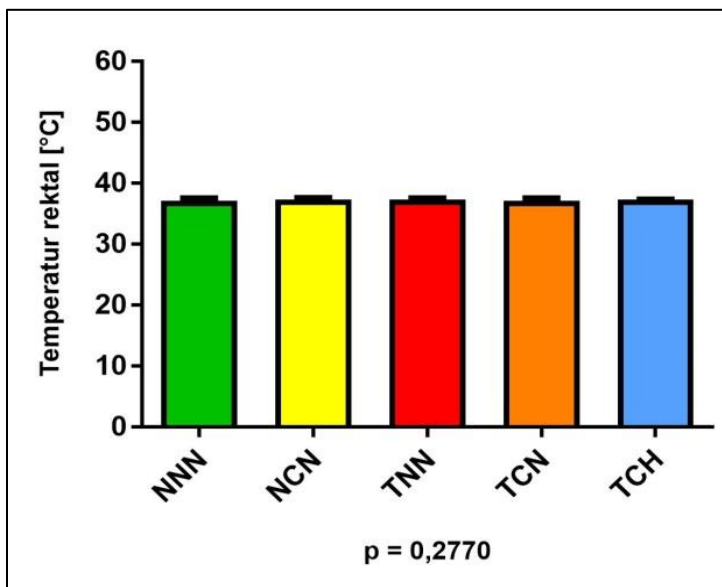


Abb. 7: Mittlere Körperkerntemperatur in  $^{\circ}\text{C}$  während der Operation

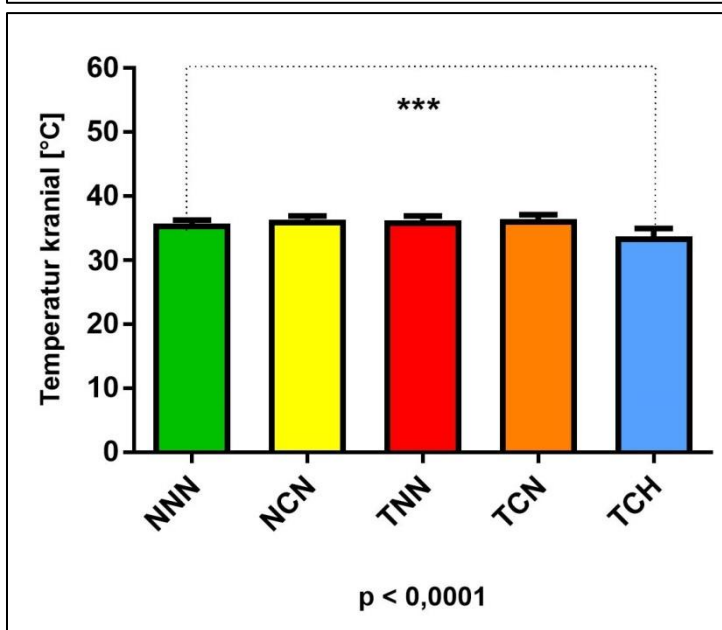


Abb. 8: Mittlere Kopf­temperatur in  $^{\circ}\text{C}$  während der Operation.

## 6.2 Überleben der Versuchstiere

Im Zuge der Überwachung über 28 Tage hinweg war je nach Versuchsgruppe zu verschiedenen Zeitpunkten eine unterschiedlich hohe Sterblichkeit zu verzeichnen. Bei Ausführung des Traumas während der Operation wurde bereits im Vorfeld eine 30-Prozentige Sterblichkeit kalkuliert. Tatsächlich verstarben bei Versuchsdurchführung auch 29,6% aller Versuchstiere während oder direkt im Anschluss an die Operation (im Folgenden primäre Sterblichkeit). Bis zum Abschluss des Beobachtungszeitraums verstarben weitere 23% (im Folgenden sekundäre Sterblichkeit) (**Tab. 16**).

Gruppe	Anzahl Tiere	Anzahl nach OP	Anzahl nach 28 Tagen
NNN	10	9	8
NCN	19	15	9
TNN	27	18	15
TCN	25	16	11
TCH	17	11	10

**Tabelle 16: Versuchstieranzahl pro Gruppe nach 24 Stunden und nach 28 Tagen postoperativ**

Die beste Aussicht, die Operation zu überleben, bestand in der Sham-Gruppe NNN mit einer primären Sterblichkeit von 10%. Die höchste primäre Sterblichkeit bestand in der Therapiegruppe TCN mit 36%, gefolgt von der Therapiegruppe TCH mit 35,3%.

Im weiteren Verlauf verstarben mit weiteren 40% bis zum Ende der 28 Tage die meisten Versuchstiere in der Vergleichsgruppe NCN, gefolgt von 32% in der Therapiegruppe TCN. Die niedrigste sekundäre Sterblichkeit verzeichnete die Therapiegruppe TCH mit weiteren 10%, gefolgt von der Sham-Gruppe NNN mit 12%.

## 6.3 Entwicklung des Körpergewichts im Verlauf

Bei der Erfassung des Körpergewichts zu verschiedenen Zeitpunkten des Beobachtungszeitraums wurde zunächst in allen Gruppen eine postoperative Gewichtsabnahme beobachtet. Diese war abhängig von der Versuchsgruppe von unterschiedlicher Ausprägung, so am geringsten ausgeprägt in der Sham-Gruppe NNN und am stärksten ausgeprägt in den Gruppen NCN und TCH. Im Verlauf nahmen alle Versuchstiere wieder an Gewicht zu, bis annähernd wieder das Ausgangsgewicht erreicht wurde. Zu keinem Zeitpunkt ergab sich zwischen den einzelnen Gruppen eine statistisch signifikante Gewichtsdivergenz (**Abb. 9**).

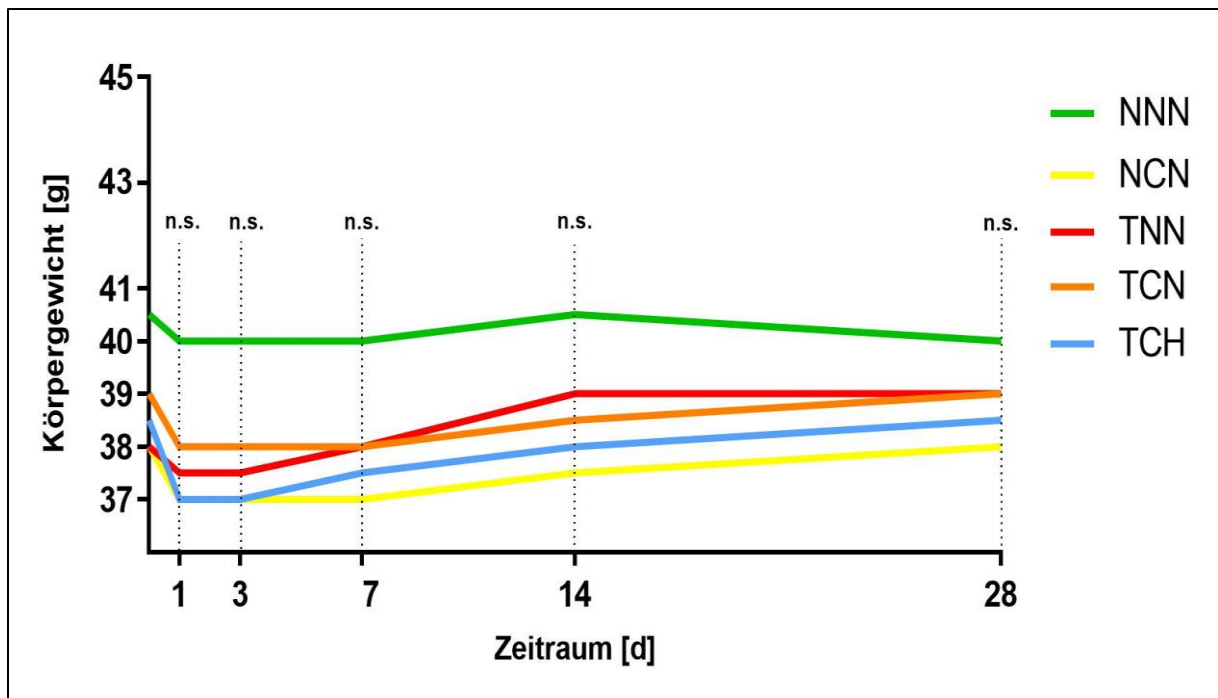


Abb. 9: Änderungen des mittleren Körpergewichts in g im Verlauf des Beobachtungszeitraums postoperativ

## 6.4 Ergebnisse der Neurologischen Untersuchungen

Die Ergebnisse der neurologischen Untersuchungen, welche bei jedem Versuchstier an den postoperativen Tagen 1, 3, 7, 14 und 28 erhoben wurden, erlauben die Beurteilung der neurologischen Beeinträchtigung nach Operation sowie der neurologischen Erholung im Verlauf des Beobachtungszeitraums. (Siehe 3.4 Material und Methoden, Neurologische Stuserhebungen)

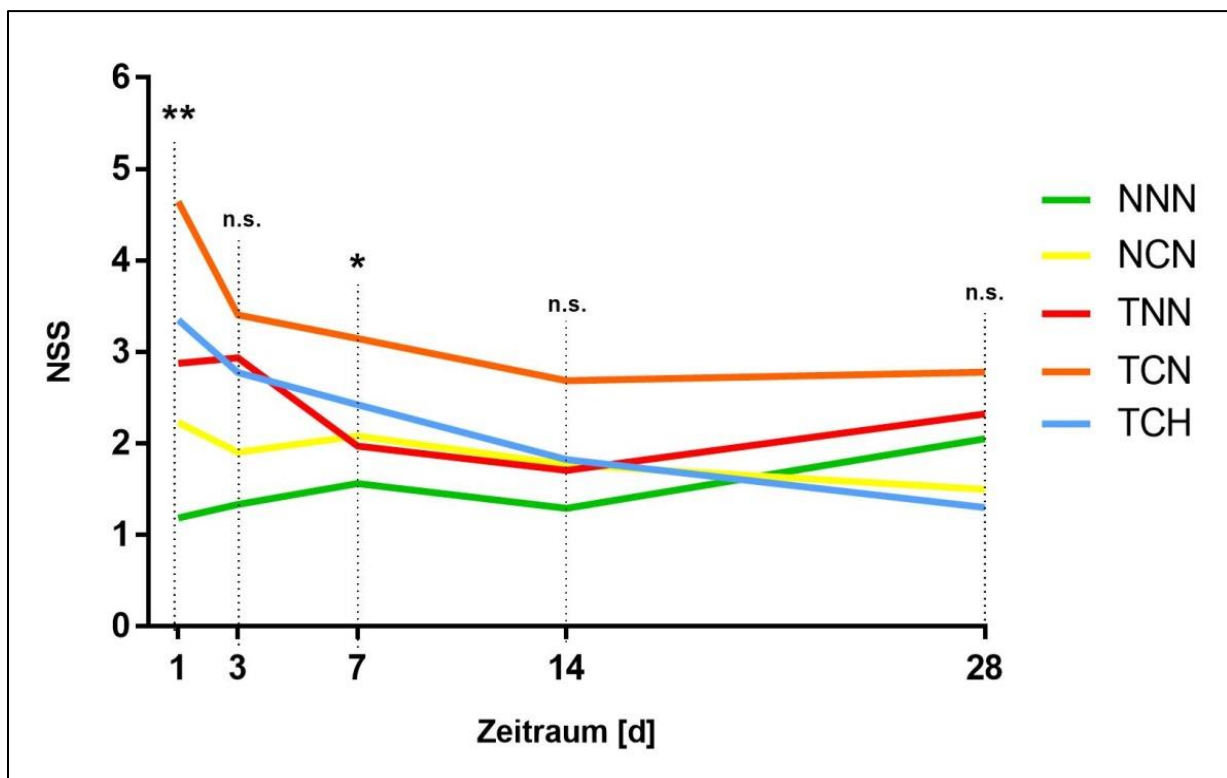
### 6.4.1 Neurological Severity Score (NSS)

Bei der ersten Erhebung des NSS 24 Stunden postoperativ erzielte die Sham- Gruppe NNN mit einem Score von  $1,19 \pm 0,75$  das beste Ergebnis, gefolgt von der Vergleichsgruppe NCN mit einem Score von  $2,23 \pm 1,2$  und der Trauma-Gruppe TNN mit einem Score von  $2,88 \pm 2,4$ . Das schlechteste Ergebnis erzielten die Therapiegruppen TCN und TCH mit einem jeweiligen Score von  $4,64 \pm 2,4$  (TCN) und  $3,35 \pm 2,4$  (TCH).

Die Therapiegruppe TCN erzielte zu diesem Zeitpunkt im Gegensatz zur Sham-Gruppe NNN ein hoch signifikant schlechteres Ergebnis ( $p = 0,0035$ ). Auch im Vergleich zur Kontrollgruppe NCN war das

Ergebnis signifikant schlechter. Bei zusätzlicher Anwendung von Hypothermie in der Gruppe TCH war der Unterschied zu den Kontrollgruppen nicht mehr signifikant ( $p > 0,05$ ).

Im Verlauf des Beobachtungszeitraums zeigten die Versuchstiere der Therapiegruppe TCN durchgehend das schlechteste Ergebnis. Der Unterschied zwischen der Therapiegruppe TCN zur Sham-Gruppe NNN war noch bis Tag 7 signifikant ( $p = 0,045$ ), erst im weiteren Verlauf ließ sich kein signifikanter Unterschied mehr zwischen beiden Gruppen nachweisen. Wie in (Abb. 10) dargestellt verbesserte sich der NSS der Hypothermie-Gruppe TCH im Verlauf durchgehend, bis an Tag 28 mit einem Score von  $1,3 \pm 1,1$  der beste Wert aller Gruppen erreicht wurde (Tag 28 TCN:  $2,78 \pm 1,8$ , NNN:  $2,05 \pm 1,3$ ). Eine signifikante Verschlechterung des NSS im Gegensatz zur Sham-Gruppe NNN war in der Hypothermie-Gruppe TCH zu keinem Zeitpunkt zu verzeichnen.



**Abb. 10: NSS im Verlauf des Beobachtungszeitraums postoperativ.** Man beachte die signifikante Verschlechterung in TCN bis zum 7. Postoperativen Tag und die deutlich bessere Leistung in TCH

#### 6.4.2 Beam Balance Score (BB-Score)

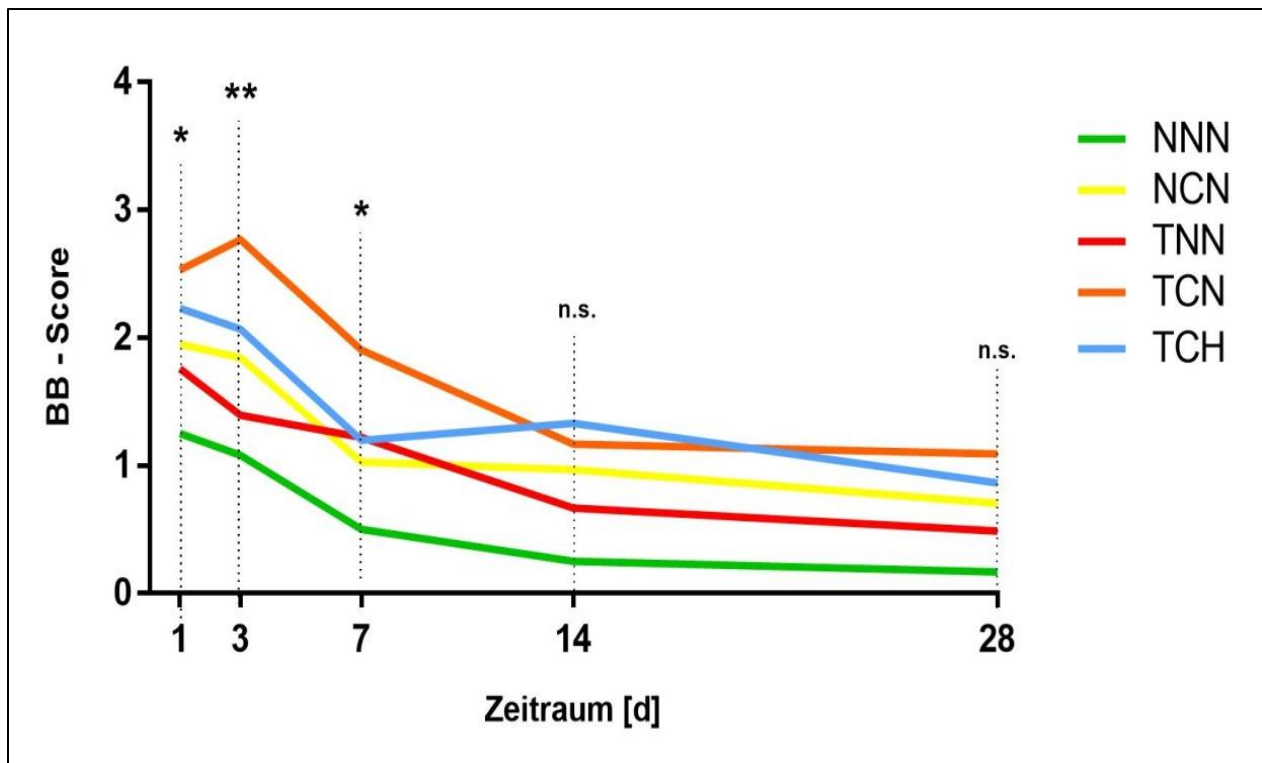
Bei der Betrachtung des Beam Balance Score bei der ersten Erhebung 24 Stunden postoperativ erzielte abermals die Sham-Gruppe NNN das beste neurologische Ergebnis mit einem Score von  $1,25 \pm 0,7$ , hier gefolgt von der Trauma-Gruppe TNN ( $1,8 \pm 0,8$ ) und der Kontrollgruppe NCN ( $1,95 \pm 0,8$ ). Das schlechteste Ergebnis erzielte die Therapiegruppe TCN mit einem Score von  $2,53 \pm 1,0$ , gefolgt von der Therapiegruppe TCH mit einem Score von  $2,23 \pm 1,3$ .

Im Gegensatz zur Sham-Gruppe NNN erzielte die Therapiegruppe TCN in der Erhebung nach 24 Stunden ein signifikant schlechteres Ergebnis ( $p = 0,0141$ ). Dieser Effekt wurde durch die Kombination der Kraniektomie mit Hypothermie abgeschwächt, sodass das Ergebnis der Therapiegruppe TCH im Vergleich zur Kontrollgruppe NNN erneut nicht signifikant ausfiel ( $p > 0,05$ ).

Im Verlauf des Überwachungszeitraums (**Abb. 11**) erzielten weiterhin die Versuchstiere der Therapiegruppe TCN das schlechteste Ergebnis. Einzige Ausnahme hier war der Beobachtungstag 14, an dem die Therapiegruppe TCH das schlechteste Ergebnis aufwies ( $1,33 \pm 0,9$ ). Das beste Ergebnis des BB-Score wurde zu jedem Zeitpunkt des Untersuchungszeitraums in der Sham-Gruppe NNN erzielt, gefolgt von der Trauma-Gruppe TNN und der Kontrollgruppe NCN. In allen Gruppen nahm die mithilfe des BB – Score erhobene neurologische Beeinträchtigung mit der Zeit ab.

An den Tagen 1, 3 und 7 des Beobachtungszeitraums zeigte sich zwischen der Therapiegruppe TCN und der Sham-Gruppe NNN ein statistisch signifikanter Unterschied ( $p = 0,0141$  Tag 1 und  $p = 0,0272$  Tag 7), der am Beobachtungstag 3 sogar hoch signifikant war ( $p = 0,0036$ ). Zwischen der Therapiegruppe TCH und der Sham-Gruppe NNN ergab sich wie bereits bei der Erhebung des NSS zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied ( $p > 0,05$ ).





**Abb. 11: BB-Score im Verlauf des Beobachtungszeitraums postoperativ.** Man beachte die signifikante Verschlechterung in TCN bis zum 7. Postoperativen Tag und die erneut deutlich bessere Leistung in TCH.

#### 6.4.3 Beam Balance Time (BB-Time)

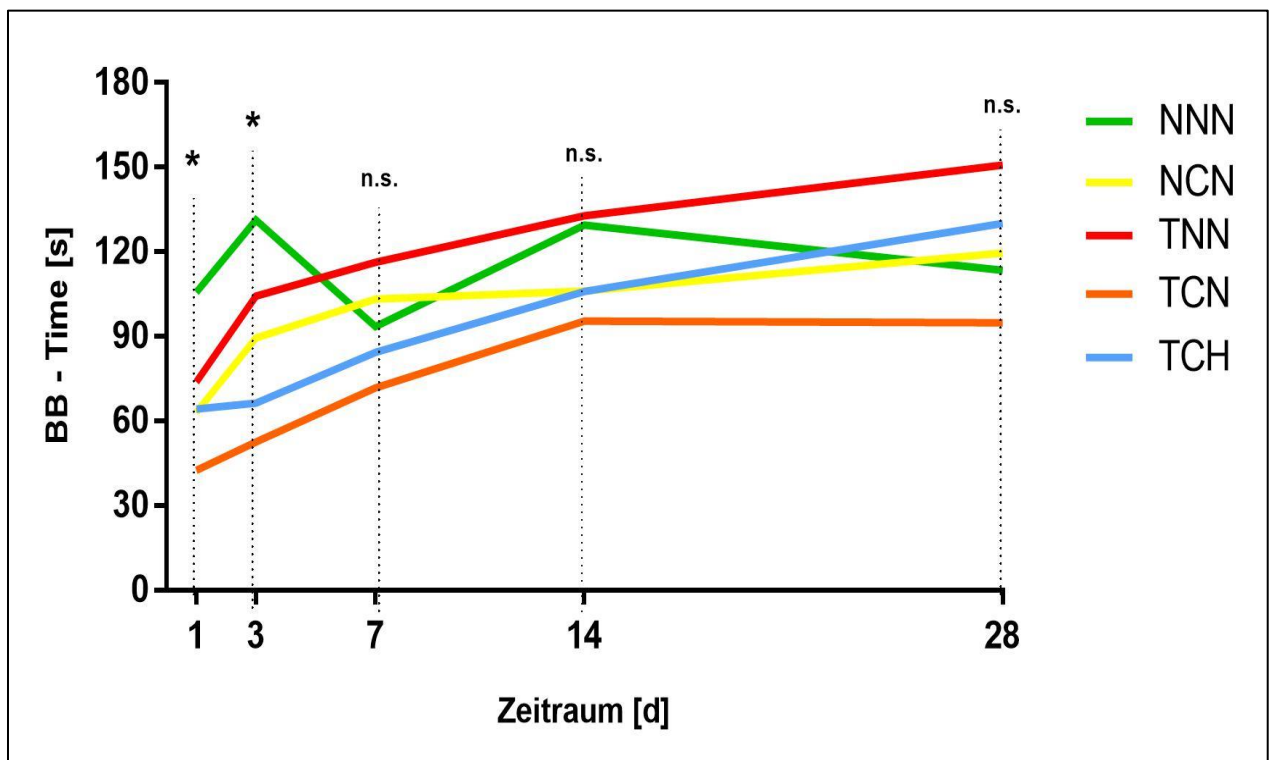
Bei der summierten Betrachtung der Balancierzeiten (BB-Time in Sekunden) der Versuchstiere zum ersten Untersuchungszeitpunkt nach 24 Stunden wurde das beste Ergebnis in der Sham-Gruppe NNN erzielt ( $105,6s \pm 58,4s$ ), gefolgt von der Trauma-Gruppe TNN ( $73,9s \pm 56,7s$ ) und der Therapiegruppe TCH ( $64,2s \pm 57,9s$ ). Am schlechtesten schnitt die Therapiegruppe TCN ab ( $42,5s \pm 39,2s$ ), gefolgt von der Kontrollgruppe NCN ( $63s \pm 38,3s$ ).

In der Therapiegruppe TCN wurde im Vergleich zur Sham-Gruppe NNN ein statistisch signifikant schlechteres Ergebnis erzielt ( $p < 0,05$  nach Bonferroni-Korrektur). Dieser Effekt war erneut nicht zu beobachten bei der zusätzlichen Therapie mit Hypothermie (TCH).

Im Verlauf über 28 Tage (Abb. 12) wurde in der Sham-Gruppe NNN an den Beobachtungstagen 1 und 3 das beste Ergebnis erzielt, bis sie ab Tag 7 von der Trauma-Gruppe TNN übertroffen wurde (TNN mit  $116,3s \pm 60,4s$  gegenüber NNN mit  $93,5s \pm 72,1s$  an Tag 7). Das schlechteste Ergebnis wurde durchgehend in der Therapiegruppe TCN erzielt, gefolgt bis Tag 14 von der Therapiegruppe TCH, die

an Tag 28 jedoch ein deutlich besseres Ergebnis erzielt und zu diesem Zeitpunkt das zweitbeste Ergebnis zeigt.

Wieder ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Therapiegruppe TCN im Vergleich zur Sham-Gruppe NNN an den Beobachtungstagen 1 und 3 ( $p = 0,0318$  Tag 3). Zu keinem Zeitpunkt war ein signifikanter Unterschied zwischen der Therapiegruppe TCH und der Sham-Gruppe NNN nachweisbar.



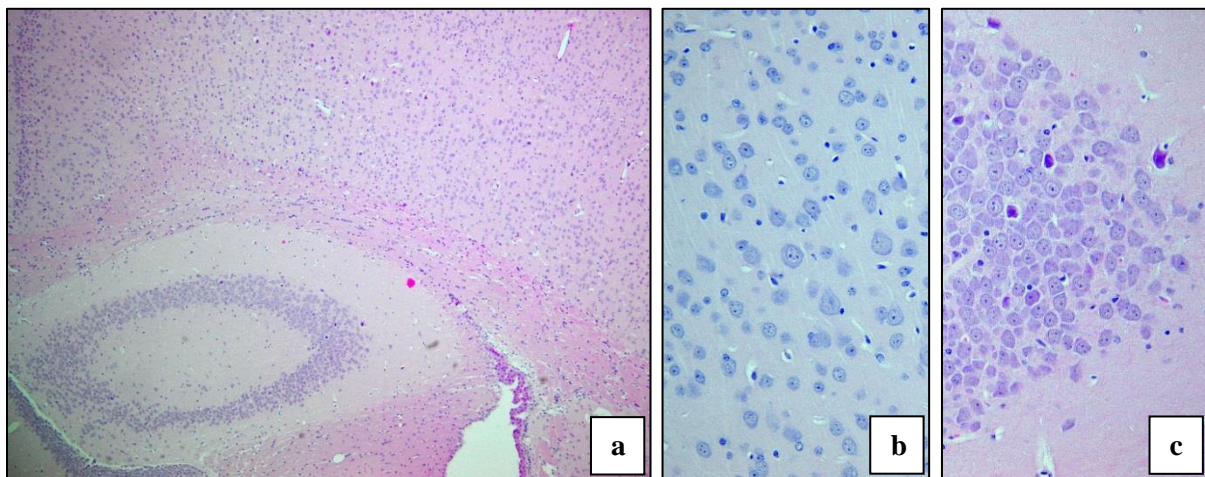
**Abb. 12: BB -Time in Sekunden im Verlauf des Beobachtungszeitraums postoperativ.** Man beachte die signifikante Verschlechterung in TCN bis zum 3. Postoperativen Tag und wiederum die deutlich bessere Leistung in TCH.

## 6.5. Mikroskopische Auswertung der histologischen Präparate

### 6.5.1 Qualitative Beurteilung anhand der Standardfärbungen

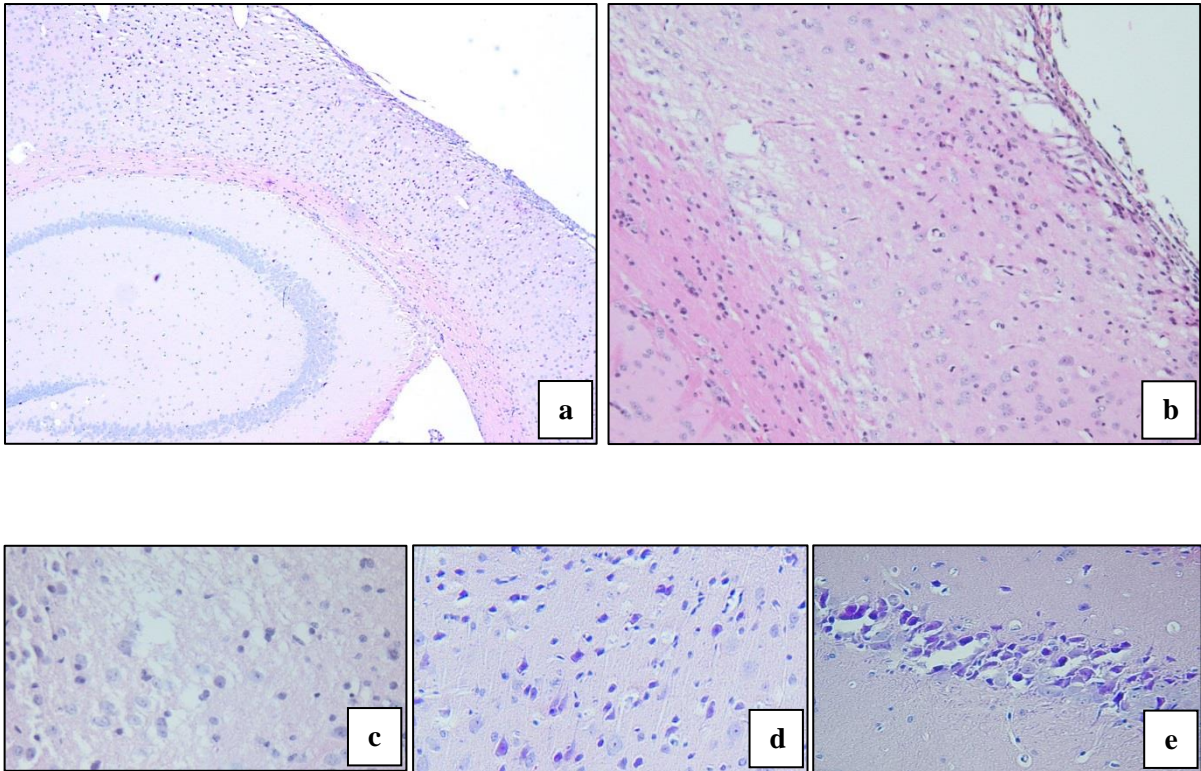
Um eine Vergleichbarkeit der Morphologie in den einzelnen Gruppen zu gewinnen, wurden die nach den histologischen Standardfärbungen HE und Nissl gefärbten Präparate von allen Versuchstieren der fünf Versuchsgruppen auf ihre qualitativen Merkmale hin beurteilt. Anschließend wurde diesbezüglich zwischen den einzelnen Gruppen verglichen.

In den Exemplarischen HE Aufnahmen eines Tieres der Sham-Gruppe NNN (**Abb. 13**) ipsilateral des in anderen Gruppen erfolgten Traumas ist in der Übersichtsaufnahme (**Abb. 13.a**) die intakte Struktur des Gehirns zu erkennen. In (**Abb. 13.b**) zeigt sich eine physiologisch hohe kortikale Zellkerndichte und auch die hippocampale Region CA3 (**Abb. 13.c**) präsentiert sich intakt und mit hoher Zellkerndichte.

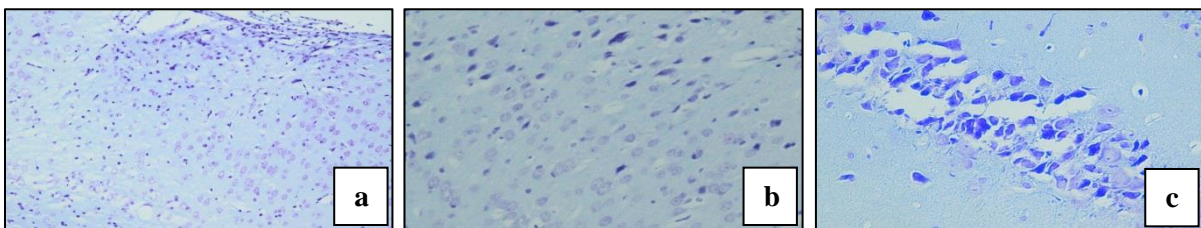


**Abb. 13: HE Präparate NNN:** Übersicht (a), Kortex (b) und CA3 (c) ipsilateral

Bei der Betrachtung des Kortex und der Hippocampusformation bei Versuchstieren, die einem Trauma ausgesetzt waren, sei dies nun rein chirurgischer (NCN), rein traumatischer Natur (TNN) oder Folge einer Kombination aus beidem (TCN, TCH), ließen sich ipsilateral sowohl in HE als auch in der Anfärbung nach Nissl charakteristische histologische Veränderungen nachweisen (**Abb. 14 und 15**). Als Zeichen des neuronalen Zelluntergangs zeigte sich eine deutliche perineurale Vakuolisierung sowie eine Abnahme der kortikalen Nervenzelldichte (**Abb. 14. a-d**). Auch hippocampal ließen sich posttraumatische Veränderungen wie eine Verminderung der Nervenzelldichte, eine Schrumpfung der neuronalen Perikarya oder eine ödematöse Auflockerung des Gewebes finden (**Abb. 14.e**).

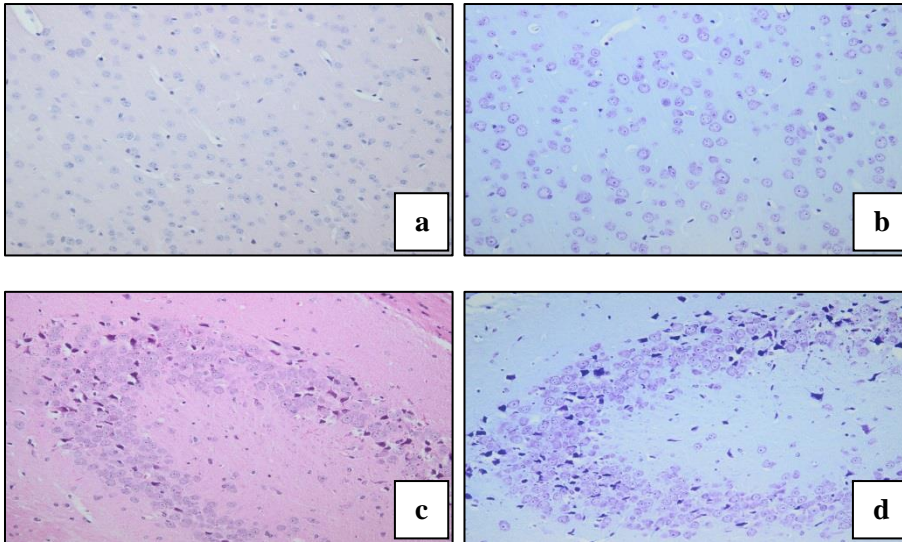


**Abb 14. a-e: HE Präparate verschiedener Gruppen.** Abbildung der kortikalen Traumazone in der Übersichtsaufnahme bei einem Versuchstier der Gruppe TCN (a), Vergrößerung der kortikalen Traumazone eines Versuchstieres der Gruppe NCN (b), dunkel angefärbte Neuronenzellkerne mit perineuraler Vakuolisierung und ödematöser Gewebeauflockerung in der kortikalen Traumazone bei Versuchstieren der Gruppen TCN (c) und NCN (d) sowie in CA1 (e) bei einem Tier der Gruppe TCN.



**Abb. 15: Nissl Präparate TCN:** Abbildung der kortikalen Traumazone mit deutlicher perifokaler Ödemformation (a), Vergrößerung der kortikalen Traumazone desselben Tieres mit Darstellung geschrumpfter neuronaler Perikarya und ödematöser Gewebeauflockerung (b), posttraumatischer Nervenzelluntergang hippocampal in CA1 (c).

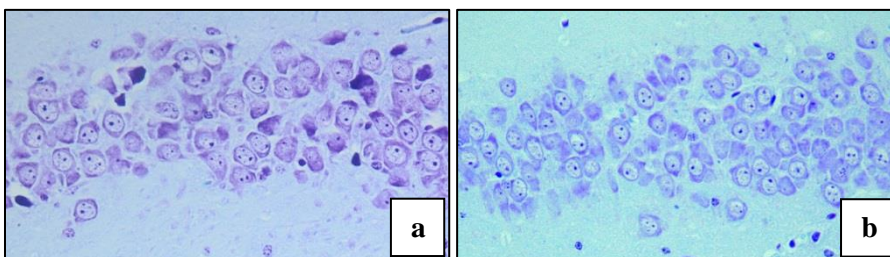
Das oben aufgeführte fokale Schädigungsmuster am Ort des Traumas, in direkter Nachbarschaft dazu sowie die ipsilaterale diffuse Komponente der ipsilateralen hippocampalen Schädigung fand sich in den nach HE und Nissl gefärbten Übersichtspräparaten durch ein diffuses Schädigungsmuster tieferer Hirnregionen auch in der kontralateralen Hemisphere ergänzt (**Abb. 16.c-d**).



**Abb. 16 (a-d): Exemplarische Aufnahmen HE und Nissl kontralaterale Hemisphäre TCN:** Darstellung von intakter kortikaler Struktur in HE (a) und Nissl (b) und diffusem Schädigungsmuster hippocampal in HE (c) und Nissl (d).

### 6.5.2 Quantitative Auswertung der nach Nissl gefärbten Präparate

In der softwareassistierten Auszählung (siehe Material und Methodik, Abschnitt 3.6.6.2) der nach Nissl gefärbten neuronalen Perikarya in den ausgewählten hippocampalen Regionen CA1 und CA3 ließ sich bezüglich der numerischen Anzahl der Perikarya in den einzelnen Gruppen kein statistisch signifikanter Unterschied feststellen ( $p = 0,9833$ ).



**Abb. 17: Exemplarische Aufnahmen Nissl CA1 in NNN (a) und TCN (b)**

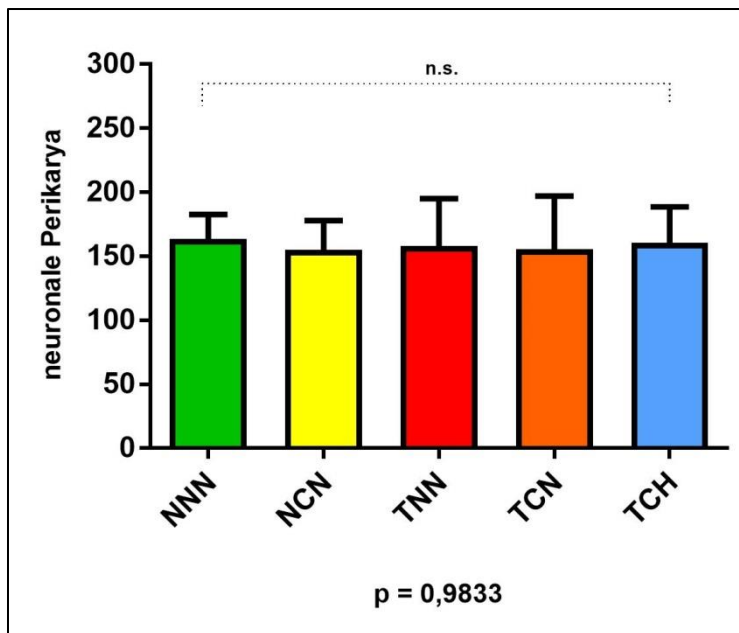


Abb. 18: Mittlere Anzahl neuronaler Perikarya CA1 und CA3

### 6.5.3 Auswertung der immunhistochemischen Anfärbung von Aquaporin -4

Bei der Betrachtung des Anfärbegrades des Antigens Aquaporin-4 (AQP4) konnten zwischen den einzelnen Gruppen deutliche Unterschiede ausgemacht werden. Die nach standardisiertem Verfahren gefärbten Präparate der Therapiegruppe TCH wiesen die höchste Ausprägung der angefärbten Zielstruktur AQP4 auf (Abb. 19. c+f), gefolgt von den Präparaten der Therapiegruppe TCN (Abb. 19 b+e). Die geringste Färbeausprägung war bei den Präparaten der Sham-Gruppe NNN zu finden (Abb. 19 a+d).

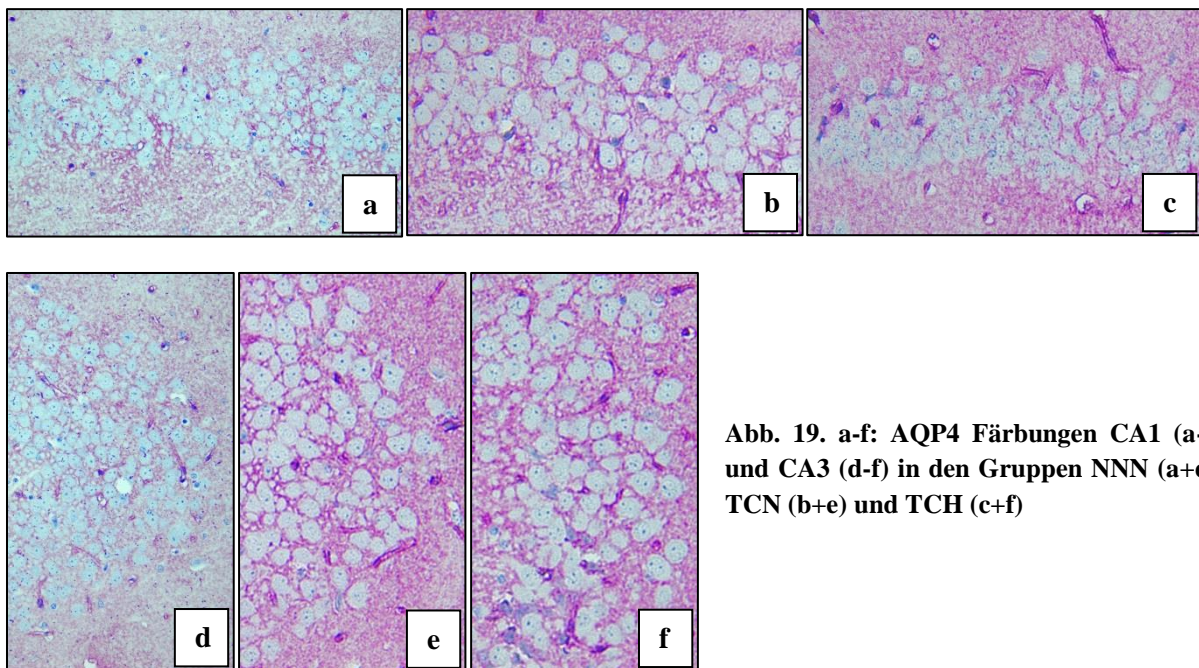
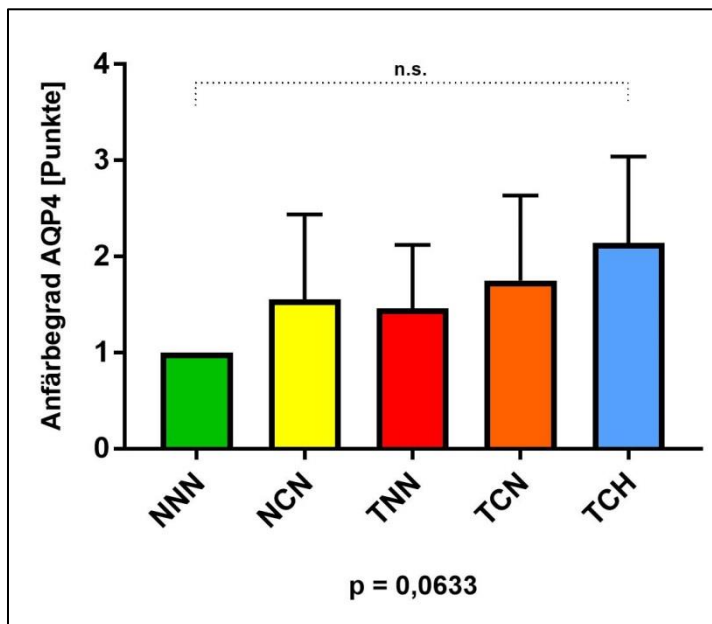


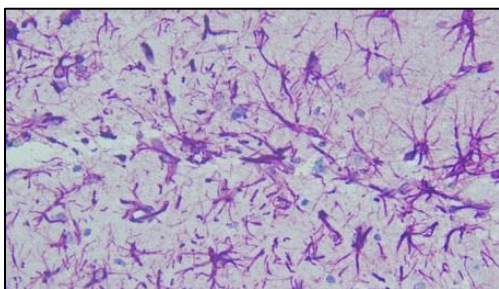
Abb. 19. a-f: AQP4 Färbungen CA1 (a-c) und CA3 (d-f) in den Gruppen NNN (a+d), TCN (b+e) und TCH (c+f)

Durch den anhand des Grades der Anfärbung erhobenen Score, (Siehe Material und Methoden, 3.6.6.2 Quantitative Auswertungen), ermittelt durch die Erhebung des Mittelwerts jeder Gruppe, konnte, vergleichbar mit der qualitativen Beurteilung der Präparate, die höchste Expression von AQP4 mit einem Score von 2,1 in der Therapiegruppe TCH gefunden werden. Die zweithöchste Expression fand sich in der Therapiegruppe TCN mit einem Score von 1,8. Die niedrigste Expression wurde in der Sham-Gruppe NNN gefunden (Score 1). Zwischen den verschiedenen Gruppen ergab sich bezüglich der Expression von AQP4 kein statistisch signifikanter Unterschied ( $p = 0,0633$ ) (**Abb. 20**).



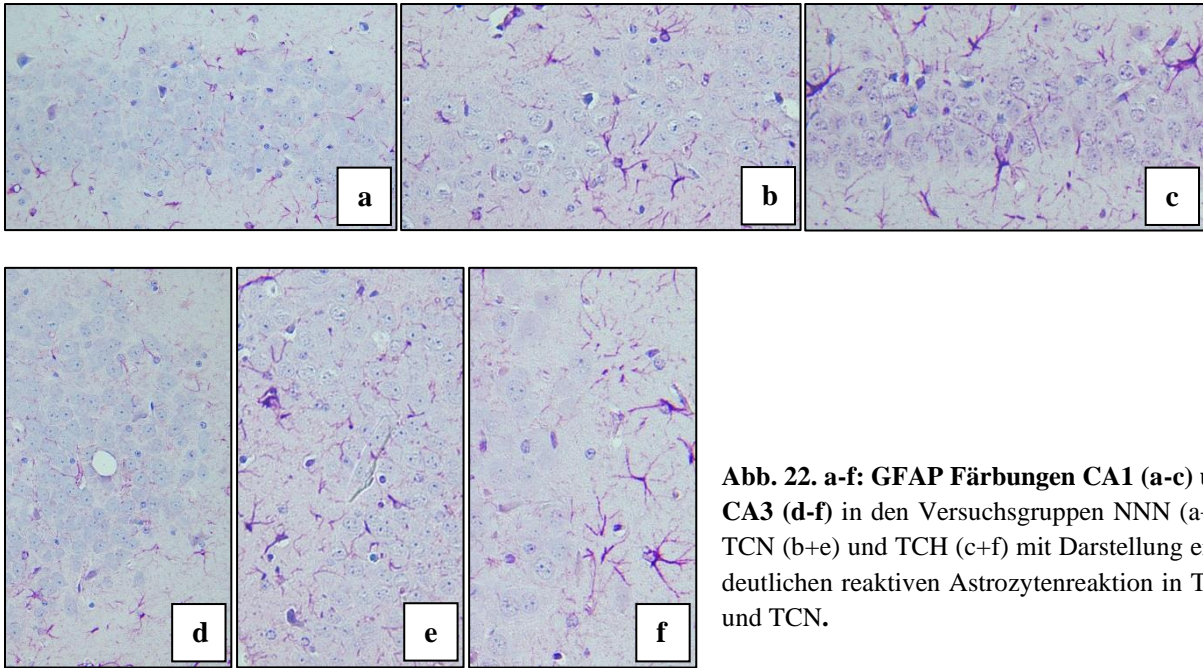
**Abb. 20:** Vergleich des Anfärbegrades von AQP4 zwischen den einzelnen Gruppen

#### 6.5.4 Auswertung der immunhistochemischen Anfärbung von GFAP



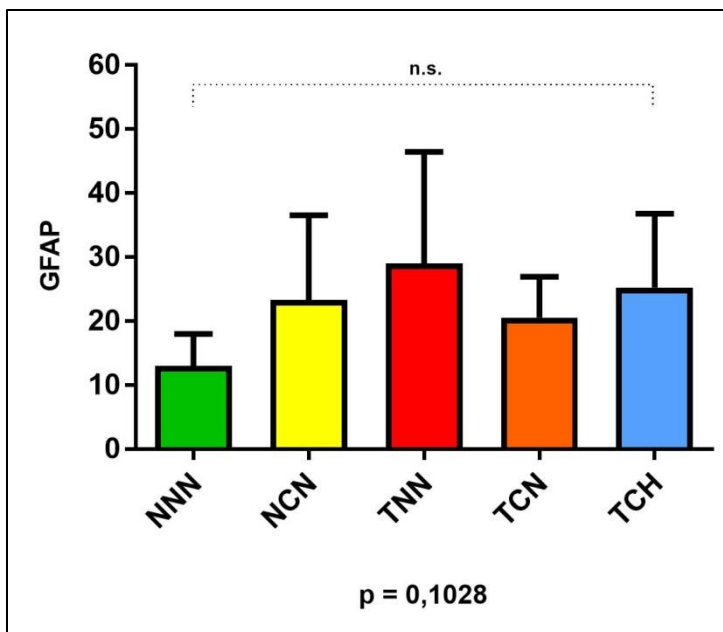
**Abb. 21: Exemplarische Aufnahme GFAP Färbung TNN:** Stark ausgeprägte reaktive astrozytäre Reaktion in CA1 ipsilateral

Bei der qualitativen Beurteilung der Anfärbung der Zielstruktur GFAP war in einigen Gruppen eine deutliche reaktive Astrozytenreaktion auszumachen (Exemplarisch: **Abb. 21**). So zeigte sich die deutlichste Anfärbung in der Therapiegruppe TCH sowie in der Trauma-Gruppe TNN. Die geringste Ausprägung der Zielstruktur war in der Sham-Gruppe NNN auszumachen (Exemplarische Aufnahmen: **Abb. 22**).



**Abb. 22. a-f: GFAP Färbungen CA1 (a-c) und CA3 (d-f) in den Versuchsgruppen NNN (a+d), TCN (b+e) und TCH (c+f) mit Darstellung einer deutlichen reaktiven Astrozytenreaktion in TCH und TCN.**

Mit der Auszählung der angefärbten Zielstruktur GFAP in den verschiedenen Versuchsgruppen wurde versucht, die entstandene reaktive Astrozytenreaktion abhängig von der Therapiegruppe zu quantifizieren. Im Gegensatz zur Sham-Gruppe NNN war so eine erhöhte Expression der Zielstruktur in allen anderen Versuchsgruppen nachweisbar. Die höchste reaktive Astrozytenreaktion zeigte sich in der Trauma-Gruppe TNN, gefolgt von der Therapiegruppe TCH, der Vergleichsgruppe NCN und zuletzt der Therapiegruppe TCN (Abb. 23). Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen war diesbezüglich nicht auszumachen ( $p = 0,1028$ ).

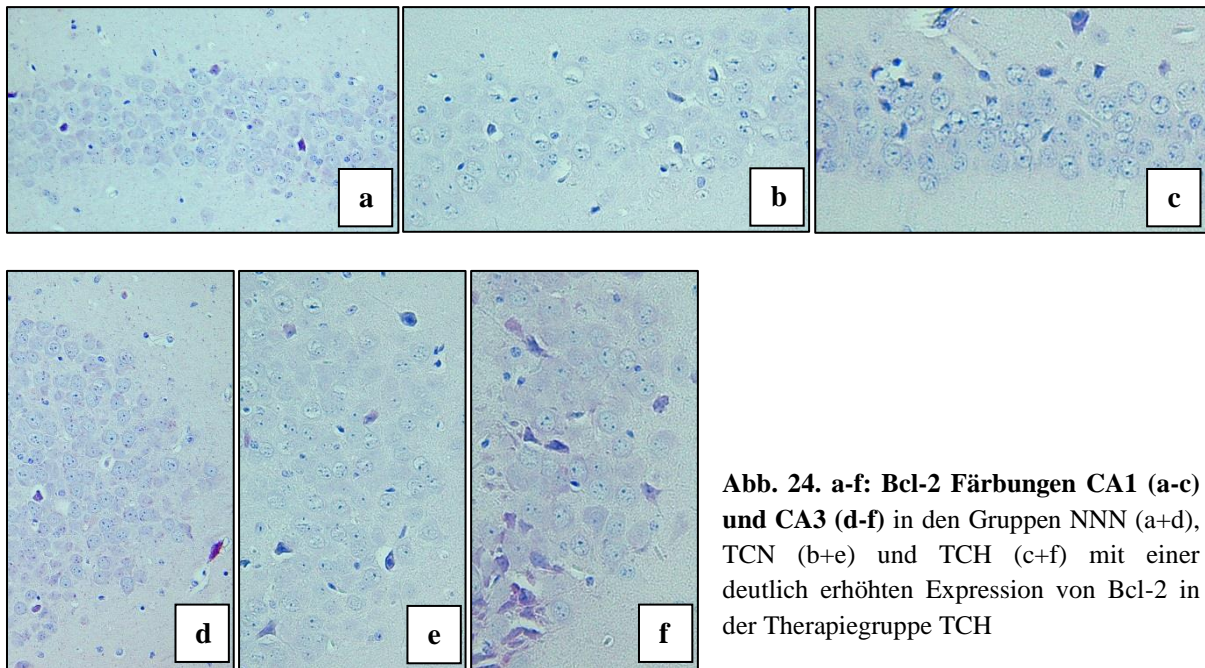


**Abb. 23: Mittlere Anzahl nach GFAP angefärbter Strukturen in den einzelnen Gruppen**



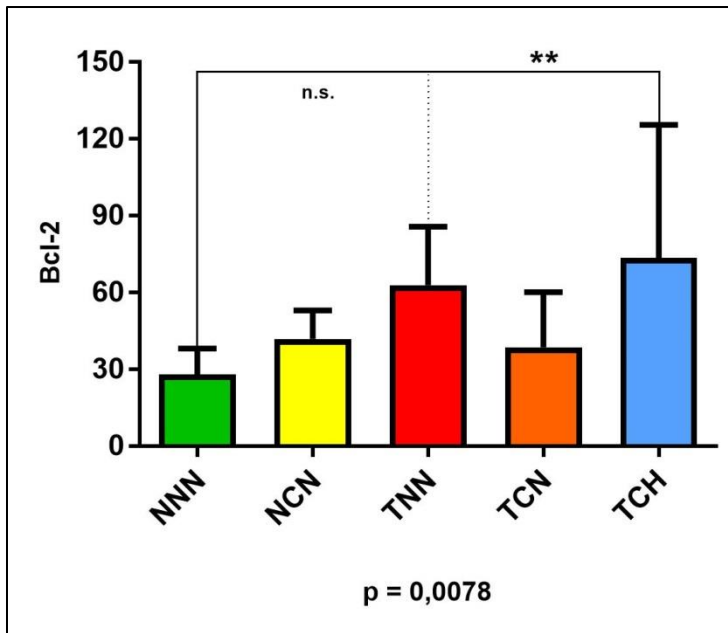
### 6.5.5 Auswertung der immunhistochemischen Anfärbung von Bcl-2

Beim Vergleich der qualitativen Ausprägung des Anfärbegrades des Antigens Bcl-2 fiel erneut eine deutlich erhöhte Expression des Zielantigens in der Therapiegruppe TCH auf. Der zweithöchste Anfärbegrad wurde in der Traumagruppe TNN erzielt. Der geringste Anfärbegrad war in der Sham-Gruppe NNN zu finden (Exemplarische Aufnahmen: **Abb. 24 a-f**).



**Abb. 24. a-f: Bcl-2 Färbungen CA1 (a-c) und CA3 (d-f) in den Gruppen NNN (a+d), TCN (b+e) und TCH (c+f) mit einer deutlich erhöhten Expression von Bcl-2 in der Therapiegruppe TCH**

Bezüglich der quantitativen Auswertung der Expression des Antigens Bcl-2 fiel im Vergleich zur Sham-Gruppe NNN eine deutlich erhöhte Expression in der Therapiegruppe TCH auf, gefolgt von der Trauma-Gruppe TNN. In der Traumagruppe TNN zeigte sich eine nicht statistisch signifikant erhöhte Expression des Zielantigens im Vergleich zur Sham-Gruppe NNN. In der Therapiegruppe TCH bestand eine hoch signifikant erhöhte Expression von Bcl-2 im Vergleich zur Sham-Gruppe NNN ( $p = 0,0078$ ; **Abb. 25**).



**Abb. 25: Mittlere Anzahl nach Bcl-2 angefärbter Strukturen in den einzelnen Versuchsgruppen.** Man beachte die nicht signifikant vermehrte Expression in TNN sowie die hoch signifikant vermehrte Expression in TCH im Vergleich zu Sham.

## 6.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Bezüglich der während der Operation erfassten Parameter mittleres Körpergewicht, Zuteilung der Narkosegase Sauerstoff und Isofluran sowie der rektal gemessenen Körpertemperatur fand sich in den Versuchsgruppen kein signifikanter Unterschied zur Vergleichsgruppe NNN. Die Kopftemperatur war in der Hypothermiegruppe TCH hoch signifikant niedriger als in den anderen Gruppen mit einem erwünschten scharfen Temperaturgradienten zwischen Körper- und Kopftemperatur.

Die höchste Sterblichkeit während der Operation bestand in der Therapiegruppe TCN, gefolgt von der Therapiegruppe TCH. Bis zum Ende des Überwachungszeitraums überlebten die meisten Tiere in der Therapiegruppe TCH sowie der Sham-Gruppe NNN. Die höchste Sterblichkeit im Anschluss an die Operation im Verlauf des Untersuchungszeitraums bestand in den Versuchsgruppen NCN und TCN.

In allen Versuchsgruppen zeigte sich im Verlauf des Überwachungszeitraums eine Zunahme des Körpergewichts. Zu keinem Zeitpunkt war ein signifikanter Unterschied bezüglich des mittleren Körpergewichts zwischen den einzelnen Versuchsgruppen auszumachen.

In allen drei durchgeführten neurologischen Untersuchungen zeigten die Versuchstiere der Therapiegruppe TCN sowohl initial als auch im Verlauf das schlechteste Ergebnis. Jeweils bis zu einem bestimmten Zeitpunkt des Beobachtungszeitraums ließ sich eine statistisch signifikante Verschlechterung der neurologischen Funktion in der Therapiegruppe TCN im Vergleich zur Sham-Gruppe NNN ausweisen (NSS und BB-Score bis Beobachtungstag 7, BB-Time bis Beobachtungstag 3). Zu Beginn des Beobachtungszeitraums zeigten sich die Tiere der Therapiegruppe mit Hypothermie TCH ebenfalls mit einem schlechten Ergebnis, welches sich im Verlauf der Beobachtung jedoch in allen erhobenen Tests deutlich verbesserte und zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Verschlechterung im Vergleich zur Sham-Gruppe aufwies.

Das zugefügte Trauma war anhand der Übersichtsfärbungen HE und Nissl sowohl ipsi- als auch kontralateral der Traumalokalisation histologisch zu verifizieren. Bezüglich der Anzahl der Perikarya in den hippocampalen Regionen CA1 und CA3 ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen.

In den drei durchgeführten immunhistochemischen Färbungen zeigte sich in der Therapiegruppe mit Hypothermie TCH gegenüber den weiteren Versuchsgruppen eine erhöhte Expression der Zielstrukturen AQP4 und GFAP. Die Expression von Bcl-2 war in der Hypothermie-Gruppe im Vergleich zur Sham-Gruppe hoch signifikant erhöht.

## **7. Diskussion**

### **7.1 Versuchsmethodik**

Das verwendete Anästhesieverfahren der volatilen Zufuhr des Anästhetikums Isofluran über einen Vaporisator zählt zu den gebräuchlichsten bei Tierversuchen. Durch eine niedrige Blut- und hohe Lipidlöslichkeit des Medikaments erfolgt eine schnelle Anflutung im Gehirn, wohingegen eine niedrige Metabolisierungsrate von 0,2% und die dadurch bedingte rasche Abatmung des Anästhetikums zu einer schnellen, kurzen Wirkdauer der gewählten Narkose mit guter Steuerbarkeit führen [104]. Die mögliche atemdepressive Wirkung des verwendeten Anästhetikums wurde intraoperativ durch regelmäßige Kontrollen der Atemfrequenz mit der Möglichkeit einer individuellen Anpassung der Narkosetiefe überwacht. Durch eine Zuteilung des Narkosegases von  $1,82\text{l/min} \pm 0,17\text{l/min}$  wurde eine mittlere Sedierungstiefe erreicht, um den vorbeschriebenen negativen Effekt auf das neuronale Überleben durch eine zu tiefe Sedierung mit Isofluran zu vermeiden [105].

Die Verteilung der Versuchstiere auf die verschiedenen Versuchsgruppen erfolgte randomisiert und der Ablauf der Operation standardisiert. Zur postoperativen Bestimmung des Körpergewichts der Versuchstiere wurde zwecks Vermeidung eines systematischen Fehlers stets dieselbe Waage verwendet. Die neurologischen Verlaufsuntersuchungen bis zum 28. postoperativen Tag wurden standardisiert und verblindet durchgeführt. Ebenso erfolgten die weiteren Schritte Euthanasie, Präparation, histologische Aufbereitung sowie histologische und immunhistochemische Färbung unter verblindeten Bedingungen.

### **7.2 Traumamodell**

Zur Erzeugung des Schädel-Hirn-Traumas existieren einige etablierte tierexperimentelle Modelle, welche sich in entscheidenden Punkten von dem von uns verwendeten Modell *weight drop impact* nach Chen et al. unterscheiden [106]. So dient das *weight drop* Modell nach Marmarou et al. primär der Erzeugung eines diffusen Verletzungsmusters [107]. Das *fluid percussion* Modell nach McIntosh et al. und nach Dixon et al. macht im Gegensatz zu dem von uns verwendeten Modell eine primäre Schädeltrepanation zur Erzeugung des Traumas vonnöten und zeigt ein eher gemischt fokal-diffuses Verletzungsmuster [108–110]. Zur Erzeugung eines Schädel-Hirn-Traumas mit primär diffusem Verletzungsmuster kann weiterhin das Modell des *controlled cortical impact* nach Dixon et al. und Smith et al. verwendet werden, wobei hier ebenfalls eine primäre Schädelöffnung zur Durchführung benötigt wird [111, 112]. Weiterhin sei noch die Erzeugung einer direkten fokalen Schädigung des entblößten zerebralen Kortex durch Zuführen einer Stichwunde, eines direkten mechanischen Impulses oder von Erfrierung zu nennen [106]. Ein entscheidender Nachteil dieser zuletzt genannten Modelle ist das durch sie erzeugte rein fokale Verletzungsmuster, welches die komplexe Situation des Schädel-

Hirn-Traumas beim Menschen mit seiner Mischung aus fokaler und diffuser Schädigung nicht widerspiegelt, weswegen sie sich eher für speziellere Fragestellungen eignen.

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Traumamodell *weight drop impact* nach Chen et al. zählt zu den meist genutzten tierexperimentellen Modellen zur Erzeugung eines primär geschlossenen Schädel-Hirn-Traumas [94]. Wir entschieden uns zur Nutzung dieses Modells, da es gegenüber anderen Modellen bezüglich unserer Fragestellung einige Vorteile birgt. Weiterhin stellten wir an den in der vorliegenden Arbeit gewählten Versuchsaufbau den Anspruch, möglichst realitätsnah den Ablauf des unfallbedingten SHT beim Menschen widerspiegeln zu können. Das gewählte Traumamodell sprach auch diesbezüglich in einigen Punkten für sich.

Ein entscheidender Vorteil des verwendeten Modells ist seine schnelle und unkomplizierte Anwendbarkeit. Für die Ausführung des Traumas wurden pro Tier nur wenige Sekunden benötigt. Ohne weitere Notwendigkeiten der Vorbereitung konnte sich die Versuchsdurchführung anschließen. Durch diese schnelle Applikation ähnelt die Entstehung des erzeugten SHT der unvermittelten Entstehung des unfallbedingten SHT beim Menschen. Als weiterer realitätsnaher Faktor wurde im Versuchsaufbau die Zeitspanne von einer Stunde bis zur Durchführung der DC gewählt, welche die Rettungsphase und den Transport in ein versorgendes Zentrum repräsentieren sollte.

Ein weiterer Vorteil des verwendeten Modells besteht in der fehlenden Notwendigkeit zur Durchführung einer primären Schädelöffnung allein zur Erzeugung des Traumas, wie dies etwa bei dem auch weithin anerkannten und genutzten *fluid percussion* Modell und dem *controlled cortical impact* Modell der Fall ist [63, 64, 108, 110]. Das durch das in dieser Arbeit verwendete Modell entstehende primär geschlossene SHT erlaubt eine unverfälschte pathophysiologische Ausbildung primärer und sekundärer Folgen des Traumas inklusive ungehinderter Erhöhung des ICP und zeigt so eine hohe Vergleichbarkeit zum geschlossenen SHT des verunfallten Menschen [97].

Durch Variation von Fallhöhe und Gewicht im verwendeten Modell kann zudem einfach die Intensität des zugefügten Traumas von leichtem hin zu schwerem SHT modifiziert werden. So konnte gezeigt werden, dass die bei Anwendung des Modells entstehende histologische Schädigung bei leichter Intensität des Traumas eher diffus verteilt war, wohingegen höhere Intensitäten des Traumas mit überwiegend fokal lokalisierter Schädigung einhergingen [95]. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurden unter Berücksichtigung des gewünschten überwiegend fokalen Verletzungsmusters das in diesem Versuchsaufbau verwendete Fallgewicht sowie die verwendete Fallhöhe festgelegt [96, 97, 113]. Das überwiegend fokale Verletzungsmuster bei primär geschlossener Schädeldecke macht das gewählte Modell ideal zur Studie fokaler Therapiemethoden, wie in der vorliegenden Arbeit gewählt durch dekompressive Hemikraniektomie und anschließende Anwendung fokaler Hypothermie. Zugleich ist durch den zusätzlich erzeugten kleineren Anteil diffuser Hirnschädigung dieser typische Einflussfaktor gegeben, welcher auch das menschliche unfallbedingte SHT verkompliziert.

Diese Vergleichbarkeit des im verwendeten Traumamodell entstehenden kontusionalen Verletzungsmusters mit den bekannten Vorgängen im menschlichen Gehirn nach SHT wurde von unserer Arbeitsgruppe auch über den Umfang der hier vorliegenden Arbeit hinaus untersucht. Durch die Anfertigung von MRT-Aufnahmen im Verlauf der postoperativen Überwachung konnten frühe posttraumatische Kontusionen im direkten Umfeld des Traumas, wie auch in tieferen Hirnregionen dargestellt werden. So konnten frühe posttraumatische hämorrhagische Formationen, posttraumatische Ödembildung sowie eine sekundäre Volumenzunahme des Hirnödems mit anschließender partieller Resorption nachgewiesen werden [97, 114, 115].

### **7.3 Histomorphologische Schädigung im verwendeten Traumamodell**

Chen et al. beschreibt die histomorphologischen Auswirkungen des SHT nach dem Modell des *weight drop impact* als überwiegend fokal den zerebralen Kortex betreffend mit einer zusätzlichen diffusen Schädigung im Umfeld des Traumas sowie in tieferen Hirnstrukturen [94]. So wurde im Areal des Traumas kortikaler Zellverlust nachgewiesen. Zusätzlich konnte ein diffuses Schädigungsmuster sowohl in weiter von der Traumalokalisation entfernten Anteilen des Kortex ipsilateral des Traumas als auch in tieferen Hirnregionen im Bereich des Hippocampus sowohl ipsilateral als auch kontralateral des Traumas aufgezeigt werden [45, 94, 116]. Dieses charakteristische Schädigungsmuster fand sich in den histomorphologischen Auswertungen der hier vorliegenden Arbeit bestätigt, wie auch schon in anderen Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe, was die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse durch das verwendete Traumamodell aufzeigt [96, 97, 113]. Allerdings konnte ein wie durch Chen et al. vorbeschriebener signifikanter neuronaler Zellverlust im Bereich des Hippocampus ipsilateral des Traumas in der vorliegenden Arbeit nicht reproduziert werden.

Der überwiegende Anteil des direkten Neuronenuntergangs durch das SHT wurde in Vorarbeiten auf den Vorgang der Zellnekrose zurückgeführt. Zusätzlich zeigte sich in diesen Arbeiten eine deutlich erhöhte Rate an Nekrose und Apoptose überwiegend im direkten Umfeld, aber auch in entfernteren Gebieten ipsilateral und kontralateral des Traumas [12, 94, 95, 117]. Als für diese erhöhte Apoptoserate ursächlich konnten in verschiedenen Studien sowohl eine erhöhte TUNEL-Expression, eine erhöhte Expression des proapoptotisch wirksamen *bcl-2* und *bax* sowie eine erniedrigte Expression des antiapoptotisch wirksamen *Bcl-2* in betroffenen Arealen nachgewiesen werden [43, 44, 118]. In angrenzenden Arealen mit einem höheren Anteil an überlebenden Neuronen konnte analog zu unseren Ergebnissen eine erhöhte Expression des antiapoptotisch wirksamen *Bcl-2* nachgewiesen werden, was durch *bax*-Suppression zum Überleben der Neuronen beiträgt [54, 119].

In vorhergehenden Publikationen konnte die posttraumatische Akkumulation reaktiv aktivierter Astrozyten als pathophysiologische Immunreaktion nach SHT nachgewiesen werden [12, 120, 121].

Unsere Ergebnisse zeigen ein gemischt fokal-diffuses Verteilungsmuster dieser reaktiven Astrozytose mit Akkumulation im direkten Umfeld des Traumas einerseits und in tiefer gelegenen Hirnregionen mit Höhepunkt in den Strukturen des ipsilateralen Hippocampus andererseits. Dieses Verteilungsmuster spricht wiederum für die erzielte gewollte fokale Schädigung mit zusätzlich diffusem Anteil bei der Anwendung des *weight drop impact* Modells in der vorliegenden Arbeit [94, 95].

#### **7.4 Neurological Severity Score im verwendeten Traumamodell**

Der in dieser Arbeit verwendete NSS ist eine Adaptation nach Chen et al., welcher zur Erfassung der neurologischen Einschränkungen folgend auf das von ihm etablierte *weight drop impact* Modell dient [94]. Dieser Score nach Chen et al. besteht aus 25 Teilaufgaben, welche das Versuchstier zu erfüllen hat. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete adaptierte Score besteht aus 10 einfach durchzuführenden und damit weitestgehend untersucherunabhängigen Teilaufgaben und ist in verschiedenen Arbeiten vorbeschrieben [95–97, 113, 122]. Die aus den Vorarbeiten zu erwartende deutliche Verschlechterung des NSS durch die Anwendung des *weight drop impact* Modells mit nachfolgender Erholung der neurologischen Funktionen im Verlauf von sieben Tagen zeigte sich auch in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit [95, 122, 123].

#### **7.5 Dekompressive Kraniektomie (DC)**

Die Rolle der DC als Therapieoption des SHT ist in der Literatur umstritten. Nach zunächst negativen Ergebnissen experimenteller Studien zur Anwendung der DC nach SHT [124–126] warfen in jüngster Vergangenheit Ergebnisse tierexperimenteller Studien ein positives Bild auf den Einfluss dieser Therapieoption auf neurologische Funktion und posttraumatische Ödembildung [61–64]. Gestützt wird diese Annahme der positiven Auswirkung der DC nach SHT durch Ergebnisse kleinerer monozentrischer klinischer Studien, wie von Arabi et al. oder Timofeev et al. bei Erwachsenen und Taylor et al. oder De Luca et al. bei Kindern [65–69].

Enttäuschend fielen für alle Befürworter der DC die Ergebnisse einer multizentrischen randomisierten klinischen Studie (DECRA-Studie) aus dem Jahr 2011 von Cooper et al. aus [60]. Die Durchführung der DC brachte in der DECRA-Studie weder einen Überlebensvorteil, noch eine Verbesserung der neurologischen Langzeitfunktion im Vergleich zu konservativer Therapie. Die langfristige neurologische Funktion zeigte sich durch die Durchführung der Operation im Gegensatz zur Kontrollgruppe sogar signifikant verschlechtert.

Zuletzt warf eine neuere multizentrische randomisierte klinische Studie von Hutchinson et al. (RESCUEicp 2016) ein positiveres Bild auf die Anwendung der DC als letzte Therapiemöglichkeit bei refraktär erhöhtem ICP. In der RESCUEicp-Studie konnte im Gegensatz zur DECRA-Studie ein Überlebensvorteil durch die DC dargestellt werden. Die Mortalität in der Gruppe mit DC zeigte sich im Gegensatz zur Kontrollgruppe mit konservativer Standardtherapie um 22 Prozentpunkte reduziert. Die Durchführung der DC führte jedoch auch in dieser Studie nach 6 und 12 Monaten im Gegensatz zur Kontrollgruppe zu einem erhöhten Vorkommen von vegetativem Status und schwerer Behinderung. Allerdings fand sich darüber hinaus kein signifikanter Unterschied zwischen operativer und Kontrollgruppe bezüglich der Anzahl an Patienten mit leichter Behinderung und vollständiger Erholung [59].

Multizentrische randomisierte klinische Studien zu anderen intrazerebralen Pathologien, wie zerebraler Ischämie, nahmen sich in jüngster Vergangenheit ebenfalls dem Einfluss der DC an. So konnten Jüttler et al. in randomisierten klinischen Studien zur Anwendung der DC nach malignem Mediainfarkt (DESTINY 2007 und DESTINY II 2014) eine signifikante Verbesserung von Überlebenswahrscheinlichkeit und neurologischer Langzeitfunktion nach Durchführung der DC im Gegensatz zur konservativen Therapie darstellen [127, 128]. Ähnliche Ergebnisse lieferten zwei weitere randomisierte klinische Studien ebenfalls zur Anwendung der DC nach malignem Mediainfarkt, HAMLET und DECIMAL [127–129]. Zu berücksichtigen sind hierbei die pathophysiologischen Unterschiede zwischen zerebraler Ischämie und SHT mit der relativen Homogenität der zerebralen Ischämie im Gegensatz zum heterogenen Schädigungsmuster infolge des SHT [33].

Trotz der umstrittenen Studienlage ist und bleibt die DC eine der effektivsten Methoden zur Senkung eines erhöhten ICP, deren Anwendung es gegen den potentiell lebensbedrohlichen Verlauf des schweren SHT abzuwägen gilt. So rät die Brain Trauma Foundation in den aktuellen Leitlinien (2016) auch weiterhin zur Anwendung der DC bei refraktärem, nicht anders zu kontrollierendem ICP-Anstieg von > 20mmHg über 15 Minuten innerhalb einer Stunde [56].

Die aktuelle Studienlage veranlasste uns dazu, unter den kontrollierten Bedingungen eines in Vorversuchen bewährten Tiermodells [96, 97, 113] die Auswirkungen einer unilateralen dekompressiven temporoparietalen Hemikraniektomie eine Stunde nach geschlossenem SHT als Therapieoption zu evaluieren.

Ein Problem des Versuchsaufbaus bestand darin, den richtigen Zeitpunkt für die Durchführung der DC zu finden. Die meisten der bereits erwähnten experimentellen Studien, welche einen positiven Effekt durch die Anwendung der DC nach SHT konstatierten, bezogen sich auf die Durchführung einer sofortigen oder aber einer frühen DC innerhalb weniger Stunden nach Applikation des Traumas als Primärtherapie des SHT [63, 64]. Die oben erwähnten randomisierten klinischen Studien wendeten die



Therapieoption angelehnt an die Leitlinien der Brain Trauma Foundation [56] jeweils als letzte Möglichkeit nach Ausschöpfung konservativer Therapiemöglichkeiten bei refraktär erhöhtem ICP an. So vergingen in der RESCUEicp-Studie im Mittel 2,2 Stunden und in der DECRA-Studie im Mittel 35 Stunden zwischen Randomisierung und Durchführung der DC [59, 60]. Zweckberger et al. konnten in ihren tierexperimentellen Arbeiten einen positiven Einfluss einer frühen DC auf die posttraumatische neurologische Funktion der Versuchstiere aufweisen, welche in bis zu drei Stunden nach Applikation des SHT durchgeführt wurde [63, 64].

In der vorliegenden Arbeit wurde ein an reale Bedingungen angepasster frühestmöglicher Entlastungszeitpunkt eine Stunde nach Applikation des SHT gewählt, um die durch Bergung, Erstversorgung und Transport in ein behandelndes Zentrum benötigte Mindestzeit von einer Stunde nachzustellen, welche auch in der DECRA-Studie angegeben wurde [60]. Dieser gewählte Zeitraum zwischen Entstehung des SHT und Entlastung ist unserer Meinung nach lang genug, um einen positiven Einfluss der Operation auf die posttraumatische Erholung, verglichen zu den Vorarbeiten von Zweckberger et al., nachweisen zu können. Gleichzeitig befindet sich das Hirngewebe zum gewählten Entlastungszeitpunkt in einer vulnerablen Phase nach SHT, was die Entstehung eines „Second Hit“-Phänomens erlaubt, welches im Zuge der DC durch ein zusätzliches chirurgisches Trauma ausgelöst werden kann [130, 131].

Unsere Ergebnisse der im postoperativen Verlauf durchgeführten neurologischen Untersuchungen NSS, BB-Score und BB-Time weisen eine signifikante Verschlechterung der neurologischen Funktion bei den Versuchstieren der Gruppe mit Trauma und DC (TCN) im Gegensatz zur Sham-Gruppe (NNN) auf. Dieser negative Einfluss der DC zeigt sich ebenfalls durch eine deutlich, wenn auch nicht signifikant verschlechterte neurologische Funktion in der Gruppe mit Trauma und DC (TCN) im Gegensatz zur Trauma-Kontrollgruppe (TNN). Interessanterweise führt die alleinige Durchführung einer DC in der Kraniektomie-Kontrollgruppe (NCN) ohne vorherige Applikation eines Traumas in der vorliegenden Arbeit zu keinem negativen Effekt auf die neurologische Langzeitfunktion der Versuchstiere. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu vorhergehenden Publikationen, welche negative Auswirkungen wie eine Verschlechterung der neurologischen Funktion bereits durch die Durchführung einer DC allein beschrieben [132, 133]. Bei dem in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen negativen Einfluss der DC nach SHT auf die langfristige neurologische Funktion der Versuchstiere scheint es sich um einen additiven Schädigungseffekt durch Applikation eines zusätzlichen chirurgischen Traumas nach bereits stattgehabter mechanischer Hirnschädigung zu handeln [130, 131].

Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu Ergebnissen von Zweckberger et al., welche in ihren tierexperimentellen Arbeiten einen positiven Einfluss einer frühen DC, welche in bis zu drei Stunden nach SHT durchgeführt wurde, auf die posttraumatische neurologische Funktion der Versuchstiere aufweisen konnten [63, 64]. Diese Diskrepanz begründen wir auf entscheidende Unterschiede im

Versuchsaufbau dieser Studien, wie dem verwendeten Traumamodell. Zweckberger et al. verwendeten das *Controlled Cortical Impact* Modell, welches die primäre Durchführung einer Schädelöffnung zur Applikation des Traumas verlangt. In dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Modell war durch Benutzung des *weight drop impact* Modells nach Chen et al. [94] eine primäre Eröffnung der Schädeldecke zur Traumaapplikation nicht vonnöten. So erlaubte der von uns gewählte Zeitraum von einer Stunde zwischen der Applikation des geschlossenen SHT und der Durchführung der DC die uneingeschränkte Entfaltung posttraumatischer pathophysiologischer Prozesse, bevor die getestete Therapieoption diese beeinflussen konnte.

Es existieren einige Erklärungsansätze für die negative Auswirkung der DC nach SHT, welche sich in unseren Ergebnissen wiederfinden.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine vermehrte Expression von AQP4-Rezeptoren im Hirngewebe der Versuchstiere mit Trauma und DC dargestellt werden, was auf eine durch die DC ausgelöste Störung im zerebralen Rezeptorgleichgewicht mit nachfolgend vermehrter Ödemformation hinzuweisen scheint. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe und in erweiterten Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte nach Durchführung der DC bildmorphologisch eine Zunahme des posttraumatischen Hirnödems dargestellt werden [97, 115, 134].

Das Hirnödem nach SHT ist typischerweise ein gemischtes Ödem mit kombiniert vorliegenden vasogenen und zytotoxischen Anteilen [29, 30]. Während für die Entstehung des extrazellulären vasogenen Hirnödems die auf das SHT folgende Störung der Blut-Hirn-Schranke ursächlich ist [9, 12, 29, 31, 32], führt eine posttraumatische Störung der zellulären Glukoseverwertung mit darauf folgendem metabolischem Stress, Störung der Natrium-Kalium-ATPase, intrazellulärer Na<sup>+</sup>-Akkumulation und darauf folgendem Wassereinstrom zur Entstehung des intrazellulären zytotoxischen Ödems, welches sich unabhängig von der posttraumatischen Schrankenstörung bereits früh nach SHT ausbildet [29, 33]. AQP4 wird hierbei laut Studien mit AQP4 defizienten Versuchstieren eine ambivalente Rolle zuteil. Dem Kanal konnte eine begünstigende Wirkung auf die Entstehung des zytotoxischen Hirnödems nachgewiesen werden. Seine Überexpression im vasogenen Hirnödem scheint hingegen die Elimination des Ödems zu begünstigen[36].

Eine Folge des vermehrten Hirnödems nach DC ist das in verschiedenen Studien beobachtete Phänomen der externen zerebralen Herniation, welches ebenfalls in der vorliegenden Arbeit sowie in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe präsent war [97, 134]. Als Grundlage dieses Phänomens wird die auf die Dekompression folgende Hyperperfusion der entsprechenden Hemisphäre mit nachfolgend verschobenem Gewebedruckgradienten und so entstehendem Kapillarleck angesehen. Folge dieser externen Herniation des Hirngewebes durch die eröffnete Schädeldecke ist seine Ischämie und Nekrose [135]. Eine Zunahme des posttraumatischen Hirnödems nach DC bei SHT wurde bereits von Cooper et al. vorbeschrieben [125] und steht im Gegensatz zu Arbeiten von Zweckberger et al., die

eine Reduktion der Ödemformation nach 24 Stunden postoperativ beschreiben konnten [63, 64], sowie von Tomura et al., welche eine auf die DC folgende Abnahme der AQP4-Rezeptordichte beschreiben [61].

Eine proinflammatorische sowie proapoptotische Wirkung der DC nach SHT ist in einigen experimentellen Arbeiten vorbeschrieben und liegt auch nahe, wenn man die Durchführung der DC als ein zusätzlich appliziertes chirurgisches Trauma nach SHT ansieht [132, 133]. In der vorliegenden Arbeit konnte eine erhöhte reaktive Astrozytose als Zeichen aktivierter Neuroinflammation bei Versuchstieren der Gruppen mit Trauma und DC (TNN, TCN) nachgewiesen werden.

Die in unseren Ergebnissen präsenzte erniedrigte Expression des proapoptotischen Antigens Bcl-2 in der Gruppe mit Trauma und DC (TCN) weist auf eine infolge der DC erhöhte Apoptoserate hin. Der Vorgang der Apoptose wird unter anderem durch pro- und antiapoptotisch wirksame Proteine der Bcl-2 Familie gesteuert, deren Synthese das Gleichgewicht zwischen Neuroregeneration einerseits und programmiertem Zelltod andererseits beeinflussen. Infolge einer verminderten Synthese des Proteins Bcl-2 wie in den vorliegenden Ergebnissen kann ein Überwiegen der proapoptotisch wirksamen Proteine der Bcl-2 Familie, Bax und Bid, angenommen werden mit Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten des apoptotischen Gewebeuntergangs [12, 35, 51, 52, 136].

Ein weiterer negativer Effekt der DC ist das Phänomen des „axonal stretching“, welches auch in der DECRA-Studie als mitursächlich für die postoperativ verschlechterte langfristige neurologische Funktion diskutiert wird [60]. Die erwähnte externe zerebrale Herniation nach DC entsteht durch die Aufhebung der Kontinuität der Schädeldecke mit darauffolgender ungehinderter Ausdehnung des Hirngewebes in den geschaffenen Raum und bedingt das sogenannte „axonal stretching“. Durch diese auf die Neuronen wirkenden Zugkräfte folgt die Ausbildung eines diffusen axonalen Schadens [137]. Die über die Kraniektomie hinausreichende postoperative Ausdehnung des Hirngewebes konnte in der DECRA-Studie und auch in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe bildmorphologisch nachgewiesen werden [97, 114, 134]. Ein Unterschied zwischen der hier vorliegenden Arbeit und der DECRA-Studie liegt darin, dass durch die in der DECRA-Studie verwendete Duraplastik die Ausdehnung des Hirngewebes im Gegensatz zu unserer Arbeit noch etwas eingedämmt werden konnte [60].

Die operative Dekompression kann weiterhin durch die entstehenden Zugkräfte auf das Gewebe eine Zunahme bereits bestehender Kontusionsblutungen in der betroffenen Hemisphäre bedingen. Auch können in Folge dieser Zugkräfte epidurale und subdurale Blutungsherde in der kontralateralen Hemisphäre entstehen [135, 138, 139]. Eine weitere Erklärung für die Zunahme kontusionaler Blutungen nach operativer Dekompression ist der Wegfall der tamponierenden Wirkung von Dura mater und Kraniaum auf den Kontusionsherd. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte eine Korrelation zwischen der Ausbildung hämorrhagischer Formationen und der Verschlechterung der neurologischen Funktion dargestellt werden [97].

Weitere mögliche auf die Durchführung der DC folgende Komplikationen, welche potenziell lebensbedrohlich verlaufen oder aber langfristig eine verschlechterte neurologische Funktion zur Folge haben können, sollen weiterhin nicht unerwähnt bleiben. So kommt es durch Blutungen, Ödemformationen und externe zerebrale Herniation regelmäßig zur Ausbildung sekundärer ischämischer Formationen, welche wiederum zu einer verschlechterten neurologischen Funktion beitragen. Eine weitere häufige Komplikation nach DC bei SHT ist eine postoperative Liquorzirkulationsstörung mit der Ausbildung von Hygromen oder postoperativem Hydrozephalus, was wiederum regelmäßig einer operativen Therapie bedarf. Das Risiko der Ausbildung von Wundinfektionen mit nachfolgender Entwicklung von Meningitiden, Enzephalitiden und Hirnabszessen, welche fatal verlaufen oder aber operative Wundrevisionen und eine längerfristige antibiotische Therapie notwendig machen können, sei ebenfalls zu erwähnen. Das „Syndrome of the Trepined“, welches mit motorischen, kognitiven und psychologischen Defiziten einhergehen und schlimmstenfalls in einen permanenten vegetativen Status münden kann, stellt eine zwar seltene, aber schwerwiegende Komplikation nach DC dar [135, 138, 140].

Zusammenfassend sehen wir den in unseren Ergebnissen gezeigten negativen Einfluss der DC bei SHT auf die neurologische Funktion der Versuchstiere im Anstoß eines Circulus vitiosus begründet, welcher mit dem Wegfall der tamponierenden Wirkung von Schädeldecke und Dura mater auf das traumatisierte Hirngewebe beginnt. Die darauffolgende Ausdehnung des Hirngewebes entlang des Druckgefälles führt zu vermehrter Ödembildung, möglichem diffusem Axonschaden und der Ausbildung und/oder Zunahme bereits bestehender hämorrhagischer und ischämischer Formationen. Hinzu kommt eine Aggravierung dieser pathophysiologischen Vorgänge im Sinne der Applikation eines zusätzlichen chirurgischen Traumas nach primärem mechanischem Trauma durch die Durchführung der DC innerhalb der vulnerablen Phase nach SHT.

Aufmerksamkeit verdient weiterhin die durch die Durchführung der DC nach SHT (TCN) in der vorliegenden Arbeit nicht erhöhte Sterblichkeit während der Operation (primäre Sterblichkeit) im Gegensatz zur Trauma-Kontrollgruppe (TNN), was mit den experimentellen Ergebnissen von Zweckberger et al. übereinstimmt [63, 64]. Auch bei Hutchinson et al. (RESCUEicp) kam es zu keiner Zunahme der Mortalität durch die DC, sondern im Gegenteil zu einem deutlichen Überlebensvorteil durch die Operation [59], im Gegensatz zur DECRA-Studie, welche bezüglich der Mortalität keinen Vorteil in der Durchführung der DC darstellen konnte [60]. Die Sterblichkeit im Verlauf des Überwachungszeitraums von 28 Tagen (sekundäre Sterblichkeit) zeigt sich in der vorliegenden Arbeit bei den Versuchstieren mit DC nach SHT mit 32% im Gegensatz zu 13% in der Sham-Gruppe (NNN) und 17% in der Trauma-Kontrollgruppe (TNN) jedoch deutlich erhöht. Als ursächlich hierfür sehen wir die fehlende Möglichkeit zu intensivmedizinischen Maßnahmen und intensiver, langfristiger pflegerischer Betreuung im verwendeten Kleintiermodell.

## 7.6 Fokale Hypothermie

Die in der vorliegenden Arbeit dargelegten und durch Ergebnisse der DECRA – Studie bestätigten negativen Auswirkungen der DC auf die langfristige neurologische Funktion nach SHT verdeutlichen die Notwendigkeit der Suche nach einer zusätzlichen Therapieoption, welche diesen negativen Auswirkungen der bei refraktär erhöhtem ICP doch oft benötigten DC entgegenwirkt.

Als eine vielversprechende zusätzliche Therapieoption wird in diesem Zusammenhang die Anwendung therapeutischer Hypothermie diskutiert.

Die Anwendung prophylaktischer systemischer Hypothermie zur Neuroprotektion hat sich nach Herzstillstand (*out of hospital cardiac arrest*) bewährt [141, 142]. So empfehlen die 2015 überarbeiteten Leitlinien der American Heart Association ein gezieltes Temperaturmanagement (*Targeted Temperature Management*) und die prophylaktische Anwendung milder systemischer Hypothermie mit einer Zielkörpertemperatur zwischen 32 – 36 °C über mindestens 24 Stunden nach Herzstillstand [143]. Erfolgreiche klinische Anwendung findet die prophylaktische Hypothermie zum Zweck der Neuroprotektion und Mortalitätsreduktion ebenfalls bei frühkindlichem hypoxischem Hirnschaden [144–146].

Die neuroprotektive Wirkung milder Hypothermie lässt sich auf mannigfaltige Mechanismen zurückführen [147]. Therapeutische Hypothermie senkt zunächst nachgewiesenermaßen effektiv einen erhöhten ICP [70, 71, 93, 148–151]. Durch eine Verlangsamung des zerebralen Metabolismus sorgt Hypothermie für einen verringerten Gewebesauerstoffbedarf, wodurch das Risiko für sekundäre Ischämien und damit einhergehende neurologische Funktionseinbußen verringert wird [74–76]. Therapeutische Hypothermie verringert die Ausbildung traumatisch oder hypoxisch bedingter Störungen der Blut-Hirn-Schranke, was in verschiedenen Studien mit verringerter Protein- und Hämoglobinoxtravasation [32, 152, 153] sowie verringerter Ödembildung [77, 96] einhergeht. Weiterhin senkt therapeutische Hypothermie die Ausschüttung exzitatorischer Aminosäuren [154, 155] und vermindert die neuroinflammatorische Gewebeantwort [71, 78, 156, 157]. Neuronale Apoptose wird inhibiert [80, 82, 83] und Neuronenverlust reduziert [81, 84, 85]. Zusammen führen diese Mechanismen zu einer Reduktion des traumatisch und / oder hypoxisch bedingten strukturellen Hirnschadens mit Verminderung von Axonschaden, Neuronenverlust, Ödembildung und der Ausbildung nekrotischer Areale [77, 85, 158, 159].

Bezüglich der therapeutischen Anwendung von Hypothermie nach SHT zeigt sich die Studienlage jedoch kontrovers. Ähnlich der im vorigen Abschnitt diskutierten Anwendung der DC nach SHT zeigen auch bezüglich therapeutischer Hypothermie die meisten experimentellen Studien eine überaus positive Wirkung dieser Therapieoption durch verringerte Mortalität einerseits und langfristige Verbesserung der neurologischen Funktion andererseits [86, 91, 92, 160, 161]. Ebenfalls vielversprechend sind die Ergebnisse experimenteller Studien zur Anwendung therapeutischer

Hypothermie zur Neuroprotektion nach ischämischem und hämorrhagischem Schlaganfall sowie nach traumatischen intrazerebralen Hämorrhagien [82, 152, 162–165]. Kleinere monozentrische klinische Studien zur Anwendung therapeutischer Hypothermie nach SHT lieferten ebenfalls Ergebnisse, die einen positiven Einfluss der systemischen Anwendung der Therapieoption auf langfristige neurologische Funktion und Mortalität zeigten [87, 90, 151, 166–168], auch in Kombination mit chirurgischer Dekompression via DC [88, 89]. Weiterhin konnten monozentrische klinische Studien zur Anwendung von Hypothermie, auch teilweise in Kombination mit DC, nach ischämischem und hämorrhagischem Schlaganfall sowie nach traumatischen intrazerebralen Hämorrhagien ähnlich positive Ergebnisse aufweisen [169–172].

Diese vielversprechende neuroprotektive und mortalitätssenkende Wirkung therapeutischer Hypothermie nach SHT durch multizentrische, randomisierte klinische Studien zu bestätigen, gelang bisher jedoch nicht. Clifton et al. konnten in zwei großen randomisierten Studien NABIS: H 2001 und NABIS: H II 2011 (*The National Acute Brain Injury Study: Hypothermia*) keine positive Wirkung einer therapeutischen systemischen Hypothermie von im Mittel 35 °C auf langfristige neurologische Funktion oder Mortalität nachweisen, wohl aber ein vermehrtes Auftreten der kreislaufrelevanten Nebenwirkungen Hypotonie und Bradykardie [148, 173]. Shiozaki et al. berichteten in einer randomisierten klinischen Studie aus Japan ebenfalls von einem fehlenden positiven Effekt systemischer Hypothermie und einer Tendenz zu verschlechterter neurologischer Langzeitfunktion mit vermehrtem Auftreten von Komplikationen im Sinne von Elektrolytstörungen, Blutbildstörungen und Infektionen [174]. Ebenso konnte in einer großen Studie über die Anwendung systemischer Hypothermie nach SHT bei Kindern von Hutchison et al. kein positiver Einfluss dieser Therapie dargestellt werden. Vielmehr warnt der Autor vor vermehrt auftretender kreislaufrelevanter Hypotonie und einer eventuellen Mortalitätssteigerung [175]. Zuletzt scheiterten 2015 Makaewa et al. und Andrews et al. am Nachweis einer positiven Wirkung systemischer Hypothermie nach SHT [70, 176]. Andrews et al. konnten in ihrer randomisierten klinischen Studie Eurotherm3235 keinen signifikanten Unterschied bezüglich langfristiger neurologischer Funktion und Mortalität zwischen der Therapie von Patienten mit schwerem SHT mit systemischer Hypothermie in einem Bereich von 32 – 35 °C oder Normothermie nachweisen. Vielmehr kam es zum Abbruch der Studie aus Sicherheitsgründen, als sich eine Tendenz zu einer schlechteren langfristigen neurologischen Funktion in der Hypothermie-Gruppe ausbildete. Zusätzlich berichteten Andrews et al. in Eurotherm3235 von einem erhöhten Vorkommen schwerwiegender Komplikationen wie Blutungen und Kreislaufinstabilität durch die Anwendung systemischer Hypothermie [70].

Diese Diskrepanz zwischen den nachgewiesenen positiven Effekten therapeutischer Hypothermie auf pathophysiologische Prozesse nach SHT, den optimistischen Ergebnissen experimenteller Studien und den zuletzt enttäuschenden Ergebnissen multizentrischer randomisierter klinischer Studien ist auffällig und bedarf näherer Betrachtung. So wird der fehlende positive Einfluss systemischer Hypothermie auf

langfristige neurologische Funktion und Mortalität nach SHT in den erwähnten randomisierten klinischen Studien auf das Überwiegen schwerer systemischer Nebenwirkungen über die positiven Auswirkungen der Hypothermie auf posttraumatische pathophysiologische Prozesse zurückgeführt.

Systemische Hypothermie birgt die Gefahr einiger gravierender Nebenwirkungen [147, 149, 177]. Von vermehrtem Auftreten von Kreislaufdepression im Sinne von Hypotonie und Bradykardie wurde bereits in vielen Arbeiten mit systemischer Hypothermie berichtet [70, 93, 148, 178]. Systemische Hypothermie bedingt regelmäßig Elektrolytverschiebungen wie Hypo- und Hyperkaliämie sowie Hyponatriämie. So ausgelöste kreislaurelevante Herzrhythmusstörungen sind nicht selten und können zur Notwendigkeit antiarrhythmischer Therapie bis hin zu Reanimationspflichtigkeit führen [70, 149, 174, 177, 179]. Durch verminderte Insulinsekretion folgt auf systemische Hypothermie regelmäßig eine hyperglykämische Stoffwechsellage [180]. Störungen des Blutbilds im Sinne von Thrombozytopenie und Leukozytopenie mit entsprechenden Komplikationen wie vermehrtem Blutungsrisiko und verminderter Immunkompetenz sind weitere typische Folgen [70, 174, 179]. Eine erhöhte Infektanfälligkeit ist die wohl am meisten dokumentierte und eine der schwerwiegendsten Komplikationen systemischer Hypothermie. So zeigt sich die Inzidenz für Pneumonie, Meningitis und Sepsis in vielen Studien mit systemischer Hypothermie deutlich erhöht [149, 174, 181], ebenso wie die Inzidenz für weitere pulmonale Komplikationen wie die Ausbildung eines Pneumothorax oder von ARDS (*Acute Respiratory Distress Syndrome*) [182].

Aufgrund der widersprüchlichen Studienlage und dem fehlenden Überwiegen positiver Effekte über die zum Teil doch gravierenden Nebenwirkungen in randomisierten klinischen Studien empfiehlt die Brain Trauma Foundation in ihren aktuellen Leitlinien (2016) von der Anwendung prophylaktischer oder therapeutischer systemischer Hypothermie bei schwerem SHT abzusehen (Evidenzklasse II b) [56].

Eine vielversprechende Möglichkeit, von den positiven Einflüssen therapeutischer Hypothermie auf die pathophysiologischen Prozesse nach SHT zu profitieren, jedoch ohne die potentiellen gravierenden Nebenwirkungen einer systemischen Applikation, ist die fokale Anwendung. Jüngere experimentelle Studien zeigen diesbezüglich vielversprechende Ergebnisse mit vermindertem strukturellen Hirnschaden, vermindertem Neuronenverlust, verbesserter langfristiger neurologischer Funktion und geringerer Mortalität durch die Anwendung fokaler Hypothermie, zum Teil auch in der Kombination mit DC [71, 183, 184]. Verschiedene Methoden für die Anwendung fokaler Hypothermie befinden sich aktuell in präklinischer bzw. klinischer Testung [185, 186], darunter sowohl nicht-invasive Methoden wie die direkte Kühlung durch Eispackungen (*ice packing*), über eine Kühllhaube (*cooling helmet*) [187–189], ein Kühlpad [190] oder durch externe Kühlung von Kopf und Nacken [191–193], als auch invasive Methoden wie die Kühlung über eine nasopharyngeale Sonde [194], die epidurale Kühlung [195] und die transarterielle oder transvenöse intravasale Kühlung [196].

In tierexperimentellen Vorarbeiten zur vorliegenden Arbeit konnten Szczygielski et al. im Mausmodell durch eine nur 60-minütige Anwendung externer fokaler Hypothermie über eine lokale, kutan aufliegende Kühlsonde nach DC bei geschlossenem SHT eine Verminderung des posttraumatischen Hirnödems, eine Reduktion des posttraumatischen strukturellen Hirnschadens sowie eine Verbesserung der langfristigen neurologischen Funktion nach 24 Stunden erzielen [96, 113].

Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel, diese von Szczygielski et al. im Tiermodell vorbeschriebenen positiven Effekte der fokalen Hypothermie [113] in einem Langzeitmodell mit postoperativer Überwachung von 28 Tagen zu verifizieren. Die externe fokale Kühlung erfolgte wie in der erwähnten Vorarbeit 120 Minuten nach SHT im Anschluss an die Durchführung der DC für 60 Minuten mit  $0-2^{\circ}\text{C}$  über eine Kühlsonde, aufliegend auf der Kopfhaut des Tieres. Diese rein fokale Anwendung der Hypothermie konnte durch eine kraniale Temperaturbestimmung über die bewährte Methode einer Temporalissonde einerseits und durch Bestimmung der Kerntemperatur über eine rektale Sonde andererseits verifiziert werden [111, 113, 160]. So blieb bei einer signifikant verminderten kranialen Temperatur (TCH  $33,7 \pm 1,3^{\circ}\text{C}$ ) im Gegensatz zur Sham-Gruppe (NNN  $35,7 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ) die Körperkerntemperatur konstant (TCH  $37,3 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ ) mit einem scharfen Gradienten von  $3,6^{\circ}\text{C}$ , vergleichbar mit dem erzeugten Temperaturgradienten vorhergehender Studien mit fokaler Hypothermie [113, 187, 197].

In den vorliegenden Ergebnissen zeigt sich eine durch die zusätzliche Anwendung fokaler Hypothermie nach DC bei geschlossenem SHT (TCH) verringerte primäre Letalität bei Operation von 25,3% im Gegensatz zur Therapiegruppe mit DC (TCN) von 36%. Die sekundäre Letalität im Verlauf zeigte sich durch die Anwendung fokaler Hypothermie (TCH) mit nur 10% gegenüber 32% in der Therapiegruppe mit DC (TCN) stark vermindert. Diese deutliche Verminderung der Mortalität durch die zusätzliche Anwendung fokaler Hypothermie deckt sich mit den Ergebnissen experimenteller Studien zur systemischen Anwendung [91, 161].

Bezüglich der langfristigen neurologischen Funktion profitierten die Versuchstiere in der vorliegenden Arbeit deutlich von der zusätzlichen Anwendung fokaler Hypothermie nach DC. Während durch die Durchführung der DC nach SHT (TCN) eine signifikant verschlechterte neurologische Funktion in allen durchgeführten Untersuchungen bis zum siebten postoperativen Tag nachweisbar war, kam es bei zusätzlicher Anwendung fokaler Hypothermie im Anschluss an die DC (TCH) zu keinem Zeitpunkt zu einer signifikanten Verschlechterung der neurologischen Funktion im Gegensatz zur Sham-Gruppe (NNN). Dies spricht stark für die erfolgreiche Reduktion des negativen Effekts der chirurgischen Dekompression nach SHT durch die zusätzliche Anwendung fokaler Hypothermie im verwendeten kombinierten Therapieverfahren.

In der histomorphologischen Betrachtung konnte ein signifikanter Einfluss fokaler Hypothermie auf die hippocampale Neuronenzahl nicht dargestellt werden. Es zeigte sich jedoch eine hoch



signifikant vermehrte Expression des Proteins Bcl-2 in den ipsilateralen hippocampalen Formationen der mit fokaler Hypothermie therapierten Versuchstiere (TCH). Bereits in vorhergehenden Arbeiten zur Anwendung therapeutischer Hypothermie nach SHT, zerebraler Ischämie, intrazerebraler Blutung und Rückenmarkstrauma konnte durch die Anwendung von Hypothermie eine vermehrte Expression von Bcl-2 nachgewiesen werden [83, 120, 198–201]. Ebenso gelang in Vorarbeiten der Nachweis eines verschobenen Verhältnisses von Bax und Bcl-2 zugunsten vermehrter Bcl-2 und verminderter Bax-Expression durch die Anwendung therapeutischer Hypothermie im Sinne einer neuroprotektiven, Apoptose inhibierenden Wirkung dieser Therapieoption [80, 82, 83, 199]. Diese Wirkung sehen wir durch die in unseren Ergebnissen nachgewiesene vermehrte Expression des antiapoptotisch wirksamen Bcl-2 bestätigt.

Eine verminderte reaktive Astrozytose im Sinne einer antiinflammatorischen Wirkung fokaler Hypothermie nach DC konnte in unseren Ergebnissen nicht nachgewiesen werden. Vielmehr zeigte sich eine nicht signifikant vermehrte reaktive Astrozytenreaktion in allen Versuchsgruppen mit Trauma und / oder DC als Ausdruck vermehrter Neuroinflammation, wie in verschiedenen Arbeiten vorbeschrieben [132, 133].

Weiterhin konnte bei Versuchstieren mit Trauma und DC eine vermehrte ipsilaterale hippocampale Expression des Wasserkanals Aquaporin-4 nachgewiesen werden, was einen Einfluss von Trauma und operativer Intervention auf das zerebrale Rezeptorgleichgewicht aufzeigt, welcher durch die zusätzliche Anwendung fokaler Hypothermie scheinbar nicht beeinflusst wird.

Zusammenfassend wirkt die in der vorliegenden Arbeit angewandte therapeutische fokale Hypothermie als zusätzliche Therapieoption den negativen Effekten der zuvor durchgeführten DC erfolgreich entgegen. Die Anwendung fokaler Hypothermie führt in der vorliegenden Arbeit sowohl zu einer verringerten primären Mortalität bei Operation als auch zu einer deutlich verringerten sekundären Mortalität im Verlauf im Gegensatz zur alleinigen Durchführung einer operativen Dekompression (TCN). Des Weiteren findet sich eine im Gegensatz zur rein operativen Versuchsgruppe (TCN) verbesserte neurologische Funktion nach Anwendung der fokalen Hypothermie. Durch die signifikant erhöhte Expression des antiapoptotisch wirksamen Proteins Bcl-2 nach Anwendung fokaler Hypothermie lässt sich darüber hinaus ein über Apoptoseinhibition wirkender neuroprotektiver Effekt dieser Therapieoption darstellen. Bemerkenswert ist, dass diese Effekte in der vorliegenden Arbeit bereits nach einer nur 60-minütigen Anwendung der fokalen Hypothermie erreicht wurden, welche erst 120 Minuten nach SHT begonnen wurde. Dies steht im Gegensatz zur Arbeit von Markgraf et al., welche für den positiven Effekt therapeutischer Hypothermie ein Zeitfenster von 60 Minuten nach Schädigung formulierten [173]. Hieraus leiten wir eine große Effektivität der in der vorliegenden Arbeit verwendeten fokalen Kühlmethode ab, welche nicht zuletzt durch die nach DC fehlende Schädeldecke bedingt zu sein scheint.

Um die Anwendbarkeit dieser vielversprechenden experimentellen Ergebnisse auf den Menschen zu diskutieren, müssen auch die spezifischen thermodynamischen Eigenschaften der Strukturen des menschlichen Schädels berücksichtigt werden. Hierzu existieren bereits theoretische Modelle, welche mithilfe mathematischer Berechnungen die Auswirkungen verschiedener Anwendungsformen fokaler Hypothermie auf die Strukturen des menschlichen Schädels simulieren [202–206].

Grundlagen dieser mathematischen Berechnungen sind Pennes Bio-Wärme-Gleichung [207] und die Annahme, dass die Gewebetemperatur von der metabolischen Aktivität des Gewebes sowie von der Gewebepерfusionrate als Wärmequelle abhängig ist [202]. In diese Berechnungen werden sowohl die anatomischen Strukturen des menschlichen Schädels mit ihren jeweiligen Ausdehnungen als auch die thermischen Eigenschaften der Gewebe wie Gewebedichte, spezifische Wärmekapazität, spezifische Wärmeleitfähigkeit, Gewebepерfusionrate, metabolische Wärmeproduktionsrate, Gewebeausgangstemperatur und arterielle Bluttemperatur einbezogen [204, 205].

In Bezug auf das Verhältnis der Gewebetemperatur zur metabolischen Aktivität des Gewebes wird von einer Reduktion der metabolischen Aktivität um 7% durch eine Temperaturreduktion von 1°C ausgegangen. Eine Reduktion der metabolischen Aktivität um 50% wird durch eine Temperaturreduktion von 10°C erreicht [197, 208]. In vorausgegangenen Arbeiten konnte die Abhängigkeit des Blutflusses von der Gewebetemperatur in Form einer Reduktion des Blutflusses durch Temperaturreduktion dargestellt werden, sowohl bei der Anwendung systemischer [209–212] als auch fokaler [213, 214] Hypothermie. Gleichzeitig scheint eine verringerte Gewebepерfusion per se zu einer Temperaturreduktion zu führen, wie dies bei Gewebeischämie der Fall ist [215, 216].

Diao et al. etablierten 2003 ein solches mathematisches 3D-Modell des menschlichen Schädels und seiner anatomischen Strukturen und simulierten die Anwendung fokaler Hypothermie durch direkte Kühlung mit Eis bzw. durch die Verwendung einer Kühlhaube [197, 202]. Diese Simulation führten sie unter verschiedenen Voraussetzungen durch, unter normaler Gewebepерfusion und unter Gewebeischämie einerseits sowie in den Ausdehnungen des erwachsenen Schädels und denen des kindlichen Schädels andererseits. Ergebnis dieser Simulation war das Erzielen einer schnellen (<30 Minuten) und signifikanten Temperaturreduktion durch die fokale Hypothermie in oberflächlichen Hirnregionen der grauen Substanz. Eine Penetranz der Hypothermie in tiefe Hirnregionen der weißen Substanz konnte durch diese fokalen Methoden jedoch nicht erzielt werden [202]. Die dargestellte fehlende Penetration der fokalen Hypothermie in tiefe Hirnregionen deckt sich mit den Ergebnissen anderer Simulationen und experimenteller Anwendungen [197, 204, 205]. Van Leeuwen et al. konnten in ihrer Simulation zeigen, dass eine Reduktion der arteriellen Bluttemperatur vonnöten ist, um die Temperatur in der weißen Substanz zu verringern [205]. Abhängig scheint die Temperaturreduktion in oberflächlichen Regionen durch die Anwendung fokaler Hypothermie zum einen vom Radius der Schädelstrukturen. So kam es bei geringerem Radius im kindlichen Schädel zu einer schnelleren (<15 Minuten) und tieferen Penetration der Hypothermie. Weiterhin scheint die Penetration der

Hypothermie in hypoxischem Gewebe deutlich erleichtert, worauf wiederum eine schnellere und tiefere Penetration folgt [202]. Eine Penetration der fokalen Hypothermie in die weiße Substanz konnte jedoch auch unter diesen Bedingungen nicht erreicht werden.

Zusammenfassend scheint die erfolgreiche Übertragung der Anwendung fokaler Hypothermie in tierexperimentellen Studien auf den Menschen unter Einbezug der spezifischen thermodynamischen Eigenschaften des menschlichen Schädels möglich. Bei der dargestellten Abhängigkeit der Penetranz fokaler Hypothermie von der lokalen zerebralen Perfusion ist ein Nutzen der Anwendung vor Allem bei ischämischen Prozessen wahrscheinlich. Bei posttraumatischer oder postoperativer lokaler Hyperperfusion ist hingegen von einer geringeren Penetranz der fokalen Hypothermie auszugehen. Auch wird eine Anwendung fokaler Hypothermie bei diffusem oder tiefer gelegenem Schädigungsmuster wegen der eingeschränkten Penetranz in die Tiefe nur wenig von Nutzen sein. Die Anwendung bei lokalisierter, oberflächlicher Hirnschädigung, wie dies bei der postoperativen Hirnschädigung durch DC der Fall ist, scheint jedoch vielversprechend.

Interessant wäre weiterhin, wie sich eine wie in der vorliegenden Arbeit unterbrochene knöcherne Schädeldecke nach DC auf die Thermodynamik des menschlichen Schädels und die Penetranz der fokalen Hypothermie auswirkt. Zu erwarten wäre eine verbesserte Penetration der Hypothermie in das umliegende Gewebe.

## 7.7 Schlussfolgerungen

In Bezug auf die Fragestellung der vorliegenden Arbeit (siehe 4. Eigene Fragestellung, S. 19) können abschließend folgende Aussagen getroffen werden:

Die Durchführung einer dekompressiven temporoparietalen Hemikraniektomie im Anschluss an die Applikation eines Schädel-Hirn-Traumas führt in der vorliegenden Arbeit zu einer verschlechterten neurologischen Langzeitfunktion. Durch die zusätzliche Anwendung therapeutischer fokaler Hypothermie in einem kombinierten Therapieverfahren können diese negativen Auswirkungen der durch die operative Prozedur erfolgten kombinierten traumatischen und mechanischen Hirnschädigung auf die neurologische Langzeitfunktion zugunsten einer besseren Leistung ausgeglichen werden.

Zusätzlich konnte durch die zusätzliche Anwendung der fokalen Hypothermie eine deutliche Mortalitätsreduktion im Verlauf des Überwachungszeitraums im Gegensatz zur rein operativen Gruppe bewirkt werden.

Bezüglich posttraumatischem strukturellem Hirnschaden und hippocampalem Neuronenverlust kann durch die Durchführung einer dekompressiven Kraniektomie und durch zusätzliche fokale Hypothermie kein Unterschied zum Verlauf nach Schädel-Hirn-Trauma ohne Therapie nachgewiesen werden. Auch zeigt sich die Expression des Wasserkanals Aquaporin – 4 sowie die Expression des sauren Gliafaserproteins in der vorliegenden Arbeit in allen Versuchsgruppen mit Schädel-Hirn-Trauma erhöht. Anhand dieser untersuchten Kennmarker präsentieren sich die Vorgänge der Ausbildung von posttraumatischem Hirnödem und Neuroinflammation somit scheinbar unbeeinflusst von der durchgeführten Therapie.

In Folge der dekompressiven Kraniektomie nach Schädel-Hirn-Trauma kann in der vorliegenden Arbeit eine verminderte Expression des antiapoptotischen Antigens Bcl-2 nachgewiesen werden. Nach zusätzlicher Anwendung therapeutischer fokaler Hypothermie in einem kombinierten Verfahren ist eine hoch signifikant erhöhte Bcl-2 Expression die Folge. In der Annahme eines verschobenen Gleichgewichts zwischen pro- und antiapoptotischer Proteinsynthese zugunsten der Synthese des antiapoptotischen Bcl-2 ist von einer apoptosehemmenden und damit neuroprotektiven Wirkung der therapeutischen Hypothermie in der vorliegenden Arbeit auszugehen.

In der Zukunft sind randomisierte klinische Studien vonnöten, um die in der vorliegenden Arbeit aufgezeigten positiven Auswirkungen therapeutischer fokaler Hypothermie in einem kombinierten Verfahren mit dekompressiver Hemikraniektomie bei lokalisierter oberflächlich gelegener Hirnschädigung auf Mortalität und langfristige neurologische Funktion beim Menschen zu belegen.

## **8. Literaturverzeichnis**

1. Zweckberger K, Unterberg AW (2012) 2.2 Schädel-Hirn-Trauma. In: Chir. Kapitel 2 Neurochir. pp 197–206
2. Zweckberger K, Sakowitz O, Unterberg A, Kiening K (2009) Intrakranielle Druck-Volumen-Beziehung. *Der Anästhesist* 58:392–397
3. Tagliaferri F, Compagnone C, Korsic M, Servadei F, Kraus J (2006) A Systematic Review Of Brain Injury Epidemiology In Europe. *Acta Neurochir (Wien)* 148:255–68
4. Hyder AA, Wunderlich CA, Puvanachandra P, Gururaj G, Kobusingye OC (2007) The Impact Of Traumatic Brain Injuries: A Global Perspective. *Neuro Rehabil* 22:341–353
5. Masel BE, DeWitt DS (2010) Traumatic Brain Injury: A Disease Process, Not An Event. *J Neurotrauma* 27:1529–1540
6. Maas AIR, Stocchetti N, Bullock R (2008) Moderate And Severe Traumatic Brain Injury In Adults. *Lancet Neurol* 7:728–41
7. Peeters W, van den Brande R, Polinder S, Brazinova A, Steyerberg EW, Lingsma HF, Maas AIR (2015) Epidemiology Of Traumatic Brain Injury In Europe. *Acta Neurochir (Wien)* 157:1683–96
8. Brazinova A, Rehorcikova V, Taylor MS, et al (2016) Epidemiology Of Traumatic Brain Injury In Europe: A Living Systematic Review. *J Neurotrauma* 33:1–30
9. Stubbe H, Wölfer J (2012) Schädel-Hirn-Trauma beim Erwachsenen. In: *Intensivmed.* up2date. pp 253–269
10. Bramlett HM, Dietrich WD (2015) Long-Term Consequences Of Traumatic Brain Injury: Current Status Of Potential Mechanisms Of Injury And Neurological Outcomes. *J Neurotrauma* 32:1834–1848
11. Schwerdtfeger K, Ketter R (2013) Schädel-Hirn-Trauma und Kiefer- und Gesichtstrauma. In: *Prax. der Intensivmed.* 2. Auflage. pp 721–733
12. Raghupathi R (2004) Cell Death Mechanisms Following Traumatic Brain Injury. *Brain Pathol* 14:215–222
13. Finfer SR, Vincent J-L, Stocchetti N, Maas AI (2014) Traumatic Intracranial Hypertension. *N Engl J Med* 370:2121–30
14. Engelhard K (2013) Intrakranieller Druck und Koma. In: *Prax. der Intensivmed.* 2. Auflage. pp

15. Mokri B (2001) The Monro-Kellie Hypothesis: Applications In CSF Volume Depletion. *Neurology* 56:1746–1748
16. Langfitt T, Weinstein J, Kassell N, Gagliardi L (1964) Transmission Of Increased Intracranial Pressure. I. Within The Craniospinal Axis. *J Neurosurg* 21:989–997
17. Ryder H, Espey F (1952) Influence Of Changes In Cerebral Blood Flow On The Cerebrospinal Fluid Pressure. *Arch Neurol Psychiatry* 68:165
18. Kelly B, Wee andjohn M (1993) Current Concepts In Cerebral Protection. *Chest* 103:1246–54
19. Cipolla MJ (2009) Chapter 5: Control Of Cerebral Blood Flow. *Cereb. Circ.*
20. Budohoski KP, Czosnyka M, De Riva N, Smielewski P, Pickard JD, Menon DK, Kirkpatrick PJ, Lavinio A (2012) The Relationship Between Cerebral Blood Flow Autoregulation And Cerebrovascular Pressure Reactivity After Traumatic Brain Injury. *Neurosurgery* 71:652–660
21. Bayliss B (1901) On The Local Reactions Of The Arterial Wall To Changes Of Internal Pressure. *Proc. Physiol. Soc.*
22. Czosnyka M, Dias C (2015) Role Of Pressure Reactivity Index In Neurocritical Care. In: *Neuroanesthesia Cerebrospinal Prot.* Springer Japan, Tokyo, pp 223–236
23. Czosnyka M, Brady K, Ae MR, Smielewski P, Steiner LA (2009) Monitoring Of Cerebrovascular Autoregulation: Facts, Myths, And Missing Links. *Neurocrit Care* 10:373–386
24. Schmidt EA, Czosnyka M, Smielewski P, Piechnik SK, Pickard JD (2002) Asymmetry Of Cerebral Autoregulation Following Head Injury. In: *Intracranial Press. Brain Biochem. Monit.* Springer Vienna, Vienna, pp 133–134
25. Carney N, Totten AM, Hawryluk GWJ, et al (2016) Guidelines For The Management Of Severe Traumatic Brain Injury 4th Edition. *Braintrauma.org* 09/2016:
26. Firsching R, Rickels E, Mauer UM, Sakowitz OW, Messing-Jünger M (2015) Leitlinie Schädel-Hirn-Trauma im Erwachsenenalter: Update 2015. *Dtsch. Gesellschaft für Neurochir.*
27. Kelly B, Luce J (1993) Current Concepts In Cerebral Protection.
28. Aries MJH, Czosnyka M, Budohoski KP, et al (2012) Continuous Determination Of Optimal Cerebral Perfusion Pressure In Traumatic Brain Injury. *Crit Care Med* 40:2456–2463
29. Unterberg AW, Stover J, Kress B, Kiening KL (2004) Edema And Brain Trauma.

30. Betz AL, Iannotti F, Hoff JT (1989) Brain Edema: A Classification Based On Blood-Brain Barrier Integrity. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1:133–54
31. Michinaga S, Koyama Y (2015) Pathogenesis Of Brain Edema And Investigation Into Anti-Edema Drugs. *Int J Mol Sci* 16:9949–75
32. Lotocki G, De JP, Vaccari R, Perez ER, Sanchez-Molano J, Furones-Alonso O, Bramlett HM, Dietrich WD (2009) Alterations In Blood-Brain Barrier Permeability To Large And Small Molecules And Leukocyte Accumulation After Traumatic Brain Injury: Effects Of Post-Traumatic Hypothermia. *J Neurotrauma* 26:1123–34
33. Bramlett HM, Dietrich WD (2004) Pathophysiology Of Cerebral Ischemia And Brain Trauma: Similarities And Differences. *J Cereb Blood Flow Metab* 24:133–50
34. Hu H, Yao H, Zhang W, Zhang L, Ding W, Zhang S, Chen Z, Wei E (2005) Increased Expression Of Aquaporin-4 In Human Traumatic Brain Injury And Brain Tumors. *J Zhejiang Univ* 6:33–7
35. Kiening KL, van Landeghem FK., Schreiber S, Thomale UW, von Deimling A, Unterberg AW, Stover JF (2002) Decreased Hemispheric Aquaporin-4 Is Linked To Evolving Brain Edema Following Controlled Cortical Impact Injury In Rats. *Neurosci Lett*. doi: 10.1016/S0304-3940(02)00180-5
36. Verkman AS, Binder DK, Bloch O, Auguste K, Papadopoulos MC (2006) Three Distinct Roles Of Aquaporin-4 In Brain Function Revealed By Knockout Mice. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 1758:1085–1093
37. Gyoneva S, Ransohoff RM (2015) Inflammatory Reaction After Traumatic Brain Injury: Therapeutic Potential Of Targeting Cell-Cell Communication By Chemokines. *Trends Pharmacol Sci* 36:471–480
38. Das M, Mohapatra S, Mohapatra SS (2012) New Perspectives On Central And Peripheral Immune Responses To Acute Traumatic Brain Injury. *J Neuroinflammation* 9:1–12
39. Morganti-Kossmann MC, Rancan M, Stahel PF, Kossmann T (2002) Inflammatory Response In Acute Traumatic Brain Injury: A Double-Edged Sword. *Curr Opin Crit Care* 8:101–5
40. Loane DJ, Kumar A (2016) Microglia In The TBI Brain: The Good, The Bad, And The Dysregulated. *Exp Neurol* 275:316–327
41. Brown GC, Vilalta A (2015) How Microglia Kill Neurons. *Brain Res* 1628:288–297

42. David S, Kroner A (2011) Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci* 12:388–399
43. Conti AC, Raghupathi R, Trojanowski JQ, McIntosh TK (1998) Experimental Brain Injury Induces Regionally Distinct Apoptosis during the Acute and Delayed Post-Traumatic Period. *J Neurosci* 18:5663–5672
44. Raghupathi R, Conti AC, Graham DI, Krajewski S, Reed JC, Grady MS, Trojanowski JQ, McIntosh TK (2002) Mild Traumatic Brain Injury Induces Apoptotic Cell Death In The Cortex That Is Preceded By Decreases In Cellular Bcl-2 Immunoreactivity. *Neuroscience* 110:605–616
45. Adams G, Graham D, Gennarelli T, Maxwell W (1991) Diffuse Axonal Injury In Non-Missile Head Injury. *J Neurol Neurosurgery, Psychiatry* 54:481–483
46. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA (1992) Identification Of Programmed Cell Death In Situ Via Specific Labeling Of Nuclear DNA Fragmentation. *J Cell Biol* 119:493–501
47. Momeni HR (2011) Role Of Calpain In Apoptosis. *Cell J* 13:65–72
48. Kampf A, Posmantur R, Zhao X, Schmutzhard E, Clifton G, Hayes R (1997) Mechanisms Of Calpain Proteolysis Following Traumatic Brain Injury: Implications For Pathology And Therapy: A Review And Update. *J Neurotrauma* 14:121–134
49. Liu M, Wu W, Li H, Li S, Huang L-T, Yang Y-Q, Sun Q, Wang C-X, Yu Z, Hang C-H (2015) Necroptosis, a novel type of programmed cell death, contributes to early neural cells damage after spinal cord injury in adult mice. *J Spinal Cord Med* 38:745–753
50. Bredesen DE (1995) Neural Apoptosis. *Ann Neurol* 38:839–851
51. Hardwick JM, Soane L (2013) Multiple Functions Of bcl-2 Family Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5:a008722
52. Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR (2010) The bcl-2 Family Reunion. *Mol Cell* 37:299–310
53. Raghupathi R, Graham D, McIntosh T (2000) Apoptosis After Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma* 17:928–38
54. Raghupathi R, Fernandez SC, Murai H, Trusko SP, Scott RW, Nishioka WK, McIntosh TK (1998) bcl-2 Overexpression Attenuates Cortical Cell Loss After Traumatic Brain Injury in Transgenic Mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:1259–1269



55. Reis C, Wang Y, Akyol O, Ho WM, Ii RA, Stier G, Martin R, Zhang JH (2015) What's New In Traumatic Brain Injury: Update On Tracking, Monitoring And Treatment. *Int J Mol Sci* 16:11903–65
56. Carney N, Totten AM, Ullman JS, Hawryluk GWJ, Bell MJ, Bratton SL (2016) Guidelines for the Management of Severe Traumatic Brain Injury, Fourth Edition. *Neurosurgery* 0:1–10
57. Alderson P, Roberts I (2005) Corticosteroids for acute traumatic brain injury. *Cochrane Database Syst Rev*. doi: 10.1002/14651858.CD000196.pub2
58. Timofeev I, Santarius T, Koliass A, Hutchinson P (2012) Decompressive Craniectomy - Operative Technique And Perioperative Care. *Adv Tech Stand Neurosurg* 38:115–36
59. Hutchinson PJ, Koliass AG, Timofeev IS, et al (2016) Trial Of Decompressive Craniectomy For Traumatic Intracranial Hypertension. *N Engl J Med* 375:1119–30
60. James Cooper D, Rosenfeld J V, Murray L, Arabi YM, Davies AR, Kossmann T, Ponsford J, Seppelt I, Reilly P, Wolfe R (2011) Decompressive Craniectomy In Diffuse Traumatic Brain Injury. *N Engl J Med* 364:16364:1493–502
61. Tomura S, Nawashiro H, Otani N, Uozumi Y, Toyooka T, Ohsumi A, Shima K (2011) Effect Of Decompressive Craniectomy On Aquaporin-4 Expression After Lateral Fluid Percussion Injury In Rats. *J Neurotrauma* 28:237–243
62. Plesnila N (2007) Decompression Craniectomy After Traumatic Brain Injury: Recent Experimental Results. *Prog Brain Res* 161:393–400
63. Zweckberger K, Erös C, Zimmermann R, Kim S-W, Engel D, Plesnila N (2006) Effect Of Early And Delayed Decompressive Craniectomy On Secondary Brain Damage After Controlled Cortical Impact In Mice. *J Neurotrauma* 23:1083–1093
64. Zweckberger K, Stoffel M, Baethmann A, Plesnila N (2003) Effect Of Decompression Craniotomy On Increase Of Contusion Volume And Functional Outcome After Controlled Cortical Impact In Mice. *J Neurotrauma*. doi: 10.1089/089771503322686102
65. Timofeev I, Kirkpatrick PJ, Corteen E, Hiler M, Czosnyka M, Menon DK, Pickard JD, Hutchinson PJ (2006) Decompressive Craniectomy In Traumatic Brain Injury: Outcome Following Protocol-Driven Therapy. *Acta Neurochir Suppl* 96:11–6
66. Ucar T, Akyuz M, Kazan S, Tuncer R (2005) Role Of Decompressive Surgery In The Management Of Severe Head Injuries: Prognostic Factors And Patient Selection. *J Neurotrauma* 22:1311–18

67. Taylor A, Butt W, Rosenfeld J, Shann F, Ditchfield M, Lewis E, Klug G, Wallace D, Henning R, Tibballs J (2001) A Randomized Trial Of Very Early Decompressive Craniectomy In Children With Traumatic Brain Injury And Sustained Intracranial Hypertension. *Child's Nerv Syst* 17:154–162
68. De Luca GP, Volpin L, Fornezza U, Cervellini P, Zanusso M, Casentini L, Curri D, Piacentino M, Bozzato G, Colombo F (2000) The Role Of Decompressive Craniectomy In The Treatment Of Uncontrollable Post-Traumatic Intracranial Hypertension. *Acta Neurochir (Wien)* 76:401–4
69. Guerra WK-W, Gaab MR, Dietz H, Mueller J-U, Piek J, Fritsch MJ (1999) Surgical Decompression For Traumatic Brain Swelling: Indications And Results. *J Neurosurg* 90:187–196
70. Andrews P, Sinclair L, Rodriguez A (2015) Hypothermia for Intracranial Hypertension after Traumatic Brain Injury. *N Engl J Med* 373:2403–12
71. Kim J-H, Yun S-H, Jang K-H, Park J, Han HS, Rhee D, Suk K (2014) Delayed And Prolonged Local Brain Hypothermia Combined With Decompressive Craniectomy: A Novel Therapeutic Strategy That Modulates Glial Dynamics. *Exp Neurobiol* 23:115–123
72. Clifton GL, Valadka A, Zygun D, et al (2011) Very Early Hypothermia Induction In Patients With Severe Brain Injury (The National Acute Brain Injury Study: Hypothermia II): A Randomised Trial. *Lancet Neurol* 10:131–139
73. Peterson K, Carson S, Carney N (2008) Hypothermia treatment for traumatic brain injury: a systematic review and meta-analysis. *J Neurotrauma* 25:62–71
74. Jiang J-Y, Liang Y-M, Luo Q-Z, Zhu C (2004) Effect Of Mild Hypothermia On Brain Dialysate Lactate After Fluid Percussion Brain Injury In Rodents. *Neurosurgery* 54:713–18
75. Sakoh M, Gjedde A (2003) Neuroprotection In Hypothermia Linked To Redistribution Of Oxygen In Brain. *Am J Physiol Hear Circ Physiol* 285:H17–H25
76. Bauer R, Fritz H, Walter B, Schlonski O, Jochum T, Hoyer D, Zwiener U, Reinhart K (2000) Effect Of Mild Hypothermia On Cerebral Oxygen Uptake During Gradual Cerebral Perfusion Pressure Decrease In Piglets. *Crit Care Med* 28:1128–35
77. Mansfield TT, Schiding LK, Hamilton RL, Kochanek PM, Kochanek PM (1996) Effects of Hypothermia on Traumatic Brain Injury in Immature Rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 16:244–252
78. Tomura S, Pablo De Rivero Vaccari J, Keane RW, Bramlett HM, Dietrich WD (2012) Effects

- Of Therapeutic Hypothermia On Inflammasome Signaling After Traumatic Brain Injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 32:1939–1947
79. Chatzipanteli K, Alonso OF, Kraydieh T, Dietrich TD (2000) Importance Of Posttraumatic Hypothermia And Hyperthermia On The Inflammatory Response After Fluid Percussion Brain Injury: Biochemical And Immunocytochemical Studies. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:531–542
  80. Huang T, Solano J, He D, Loutfi M, Dietrich WD, Kuluz JW (2009) Traumatic Injury Activates MAP Kinases In Astrocytes: Mechanisms Of Hypothermia And Hyperthermia. *J Neurotrauma* 26:1535–45
  81. Jia F, Mao Q, Liang Y-M, Jiang J-Y (2009) Effect Of Post-Traumatic Mild Hypothermia On Hippocampal Cell Death After Traumatic Brain Injury In Rats. *J Neurotrauma* 26:243–252
  82. Jieyong Wang Zhong Zhang Shiming Zhou Dai Yoko Kato Tetsuo Kanno Hirotooshi Sano B (2006) Decompressive Craniectomy And Mild Hypothermia Reduces Infarction Size And Counterregulates Bax And Bcl-2 Expression After Permanent Focal Ischemia In Rats. *Neurosurg Rev* 29:168–172
  83. Lotocki G, De Rivero Vaccari JP, Perez ER, Alonso OF, Curbelo K, Keane RW, Dietrich WD (2006) Therapeutic Hypothermia Modulates TNFR1 Signaling In The Traumatized Brain Via Early Transient Activation Of The JNK Pathway And Suppression Of XIAP Cleavage. *Eur J Neurosci* 24:2283–2290
  84. Bramlett HM, Dietrich WD, Green EJ, Busto R (1997) Chronic Histopathological Consequences Of Fluid-Percussion Brain Injury In Rats: Effects Of Post-Traumatic Hypothermia. *Acta Neuropathol* 93:190–199
  85. Dietrich WD, Alonso O, Busto R, Globus MY, Ginsberg MD (1994) Post-Traumatic Brain Hypothermia Reduces Histopathological Damage Following Concussive Brain Injury In The Rat. *Acta Neuropathol* 87:250–8
  86. Lee JH, Wei L, Gu X, Wei Z, Dix TA, Yu SP (2014) Therapeutic Effects Of Pharmacologically Induced Hypothermia Against Traumatic Brain Injury In Mice. *J Neurotrauma* 31:1417–1430
  87. Idris Z, Zenian MS, Muzaimi M, Hamid WZWA (2014) Better Glasgow Outcome Score, Cerebral Perfusion Pressure And Focal Brain Oxygenation In Severely Traumatized Brain Following Direct Regional Brain Hypothermia Therapy: A Prospective Randomized Study. *Asian J Neurosurg* 9:115–23

88. Suehiro E, Fujisawa H, Koizumi H, Nomura S, Kajiwara K, Fujii M, Suzuki M (2011) Significance Of Differences Between Brain Temperature And Core Temperature During Mild Hypothermia In Patients With Diffuse Axonal Injury. *Neurol Medico-Chirurgica* 51:551–555
89. Masaoka H (2010) Cerebral Blood Flow And Metabolism During Mild Hypothermia In Patients With Severe Traumatic Brain Injury. *J Med Dent Sci* 57:133–138
90. Polderman KH, Tjong R, Joe T, et al (2002) Effects Of Therapeutic Hypothermia On Intracranial Pressure And Outcome In Patients With Severe Head Injury. *Intensive Care Med* 28:1563–1573
91. Clark RSB, Kochanek TM, Marion DW, Schiding K, White M, Palmer AM, Dekosky ST (1996) Mild Posttraumatic Hypothermia Reduces Mortality After Severe Controlled Cortical Impact in Rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 16:253–261
92. Bramlett HM, Green EJ, Dietrich WD, Busto R, Globus MY-T, Ginsberg MD (1995) Posttraumatic Brain Hypothermia Provides Protection from Sensorimotor and Cognitive Behavioral Deficits. *J Neurotrauma* 12:290–306
93. Clifton G, Miller E, Choi S, et al (2001) Lack Of Effect Of Induction Of Hypothermia After Acute Brain Injury. *N Engl J Med* 344:556–563
94. Chen Y, Constantini S, Trembovler V, Weinstock M, Shohami E (1996) An experimental model of closed head injury in mice: pathophysiology, histopathology, and cognitive deficits. *J Neurotrauma* 13:557–568
95. Flierl M a, Stahel PF, Beauchamp KM, Morgan SJ, Smith WR, Shohami E (2009) Mouse Closed Head Injury Model Induced By A Weight-Drop Device. *Nat Protoc* 4:1328–1337
96. Szczygielski J, Mautes A, Schwerdtfeger K, Steudel W (2010) The Effects Of Selective Brain Hypothermia And Decompressive Craniectomy On Brain Edema After Closed Head Injury In Mice. *Acta Neurochir (Wien)* 106:225–9
97. Szczygielski J, Mautes A, Müller A, Sippl C, Glameanu C, Schwerdtfeger K, Steudel W, Oertel J (2016) Decompressive Craniectomy Increases Brain Lesion Volume and Exacerbates Functional Impairment in Closed Head Injury in Mice. *J Neurotrauma* 33:122–131
98. Chen Y, Lomnitski L, Michaelson D., Shohami E (1997) Motor and cognitive deficits in apolipoprotein E-deficient mice after closed head injury. *Neuroscience* 80:1255–1262
99. Franklin KBJ, Paxinos G (1997) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press Limited, London

100. Allen Mouse Brain Atlas atlas.brain-map.org. <http://atlas.brain-map.org/atlas?atlas=1&plate=100960224#atlas=1&plate=100960224&resolution=16.75&x=6106.3095703125&y=2522.613037109375&zoom=-3>.
101. Lüllmann-Rauch R (2009) 27.1 Methoden. In: Taschenlehrb. Histol. pp 599–601
102. Lüllmann-Rauch R (2009) 9.1 Methodische Besonderheiten Neurohistologie. In: Taschenlehrb. Histol. p 172
103. Nilaver G, Kozlowski GP (1989) Comparison of the PAP and ABC Immunocytochemical Techniques. In: Tech. Immunocytochem. pp 199–214
104. Frey H, Löscher W (2010) Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin. In: Lehrb. der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin. p 127
105. Hertle D, Beynon C, Zweckberger K, Vienenkötter B, Jung CS, Kiening K, Unterberg A, Sakowitz OW (2012) Influence of Isoflurane on Neuronal Death and Outcome in a Rat Model of Traumatic Brain Injury. In: Acta Neurochir. Suppl. pp 383–386
106. Albert-Weissenberger C, Sirén A-L (2010) Experimental traumatic brain injury. Exp {&} Transl Stroke Med 2:16
107. Marmarou A, Foda MA, van den Brink W, Campbell J, Kita H, Demetriadou K (1994) A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics. J Neurosurg 80:
108. McIntosh TK, Noble L, Andrews B, Faden AI (1987) Traumatic brain injury in the rat: characterization of a midline fluid-percussion model. Cent Nerv Syst Trauma 4:
109. McIntosh TK, Vink R, Noble L, Yamakami I, Fernyak S, Soares H, Faden AL (1989) Traumatic Brain Injury In The Rat: Characterization Of A Lateral Fluid-Percussion Model. Neuroscience 28:233–44
110. Dixon CE, Lyeth BG, Povlishock JT, Findling RL, Hamm RJ, Marmarou A, Young HF, Hayes RL (1987) A fluid percussion model of experimental brain injury in the rat. J Neurosurg 67:
111. Dixon CE, Clifton GL, Lighthall JW, Yaghamai AA, Hayes RL (1991) A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat. J Neurosci Methods 39:253–62
112. Smith DH, Soares HD, Pierce JS, Perlman KG, Saatan KE, MEANEY DF, DIXON CE, McINTOSH TK (1995) A Model of Parasagittal Controlled Cortical Impact in the Mouse: Cognitive and Histopathologic Effects. J Neurotrauma 12:169–178

113. Szczygielski J, Müller A, Mautes A, Sippl C, Glameanu C, Schwerdtfeger K, Steudel W, Oertel J (2017) Selective Brain Hypothermia Mitigates Brain Damage And Improves Neurological Outcome After Post-Traumatic Decompressive Craniectomy In Mice. *J Neurotrauma* 1–13
114. Szczygielski J, Mautes A, Müller A, Hubertus V, Kruchten E, Schwerdtfeger K, Oertel J (2014) Radiological evolution of contusional changes in murine model of moderate closed head injury. 65 Jahrestagung der Dtsch Gesellschaft für Neurochir (DGNC); Dresden; Dtsch Gesellschaft für Neurochir P 111
115. Szczygielski J, Glameanu C, Müller A, Klotz M, Sippl C, Hubertus V, Schäfer K-H, Mautes AE, Schwerdtfeger K, Oertel J (2018) Changes in Posttraumatic Brain Edema in Craniectomy-Selective Brain Hypothermia Model Are Associated With Modulation of Aquaporin-4 Level. *Front Neurol* 9:799
116. Tang YP, Noda Y, Hasegawa T NTA (1997) A concussive-like brain injury model in mice. Selective neuronal loss in the cortex and hippocampus. *J Neurotrauma* 11:863–873
117. Stahel PF, Shohami T, Younis TM, et al (2000) Experimental Closed Head Injury: Analysis of Neurological Outcome, Blood-Brain Barrier Dysfunction, Intracranial Neutrophil Infiltration, and Neuronal Cell Death in Mice Deficient in Genes for Pro-Inflammatory Cytokines. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:369–380
118. Krajewski S, Mai JK, Krajewska M, Sikorska M, Mossakowski MJ, Reed4 JC (1995) Upregulation of Bax Protein Levels in Neurons following Cerebral Ischemia. *J Neurosci* 15:6364–6376
119. Cernak I, Chapman S, Hamlin G, Vink R (2002) Temporal Characterisation Of Pro- And Anti-Apoptotic Mechanisms Following Diffuse Traumatic Brain Injury In Rats. *J Clin Neurosci* 9:565–572
120. Chen C, Ma T-Z, Wang L-N, Wang J-J, Tu Y, Zhao M-L, Zhang S, Sun H-T, Li X-H (2016) Mild Hypothermia Facilitates The Long-Term Survival Of Newborn Cells In The Dentate Gyrus After Traumatic Brain Injury By Diminishing A Pro-Apoptotic Microenvironment. *Neuroscience* 335:114–121
121. Aihara N, Hall J, Pitts L, Fukuda K, Noble L (1995) Altered Immunoexpression of Microglia and Macrophages after Mild Head Injury. *J Neurotrauma* 12:53–63
122. Tsenter J, Beni-Adani L, Assaf Y, Alexandrovich AG, Trembovler V, Shohami E (2008) Dynamic Changes In The Recovery After Traumatic Brain Injury In Mice: Effect Of Injury Severity On T2-Weighted MRI Abnormalities, And Motor And Cognitive Functions. *J*

Neurotrauma 25:324–333

123. Levy A, Bercovich-Kinori A, Alexandrovich AG, Tsenter J, Trembovler V, Lund FE, Shohami E, Stein R, Mayo L (2009) CD38 Facilitates Recovery From Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma* 26:1521–33
124. Rinaldi A, Mangiola A, Anile C, Maira G, Amante P, Ferraresi A (1990) Hemodynamic Effects Of Decompressive Craniectomy In Cold Induced Brain Oedema. *Acta Neurochir Suppl* 51:394–6
125. Cooper PR, Hagler H, Clark WK, Barnett P (1979) Enhancement Of Experimental Cerebral Edema After Decompressive Craniectomy: Complications For The Management Of Severe Head Injuries. *Neurosurgery* 4:296–300
126. Gaab M, Knoblich OE, Fuhrmeister U, Pflughaupt KW, Dietrich K (1979) Comparison Of The Effects Of Surgical Decompression And Resection Of Local Edema In The Therapy Of Experimental Brain Trauma. Investigation Of ICP, EEG And Cerebral Metabolism In Cats. *Childs Brain* 5:484–98
127. Jüttler E, Schwab S, Schmiedek P, Unterberg A, Hennerici M, Woitzik J, Witte S, Jenetzky E, Hacke W (2007) Decompressive Surgery For The Treatment Of Malignant Infarction Of The Middle Cerebral Artery (DESTINY): A Randomized, Controlled Trial. *Stroke* 38:2518–2525
128. Jüttler E, Unterberg A, Woitzik J, et al (2014) Hemicraniectomy In Older Patients With Extensive Middle-Cerebral-Artery Stroke. *N Engl J Med* 370:1091–100
129. Vahedi K, Hofmeijer J, Juettler E, et al (2007) Early Decompressive Surgery In Malignant Infarction Of The Middle Cerebral Artery: A Pooled Analysis Of Three Randomised Controlled Trials. *Lancet Neurol* 6:215–22
130. Shitaka Y, Tran HT, Bennett RE, Sanchez L, Levy MA, Dikranian K, Brody DL (2011) Repetitive Closed-Skull Traumatic Brain Injury In Mice Causes Persistent Multifocal Axonal Injury And Microglial Reactivity. *J Neuropathol Exp Neurol* 70:551–567
131. Manville J, Laurer HL, Steudel W-I, Mautes AEM (2007) Changes In Cortical And Subcortical Energy Metabolism After Repetitive And Single Controlled Cortical Impact Injury In The Mouse. *J Mol Neurosci* 31:95–100
132. Wu J, Chen K-Y, Yo Y-W, Huang S-W, Shih H-M, Chiu W-T, Chiang Y-H, Shiau C-Y (2013) Different Sham Procedures For Rats In Traumatic Brain Injury Experiments Induce Corresponding Increases In Levels Of Trauma Markers. *J Surg Res* 179:138–144

133. Cole J, Yarnell A, Kean W, et al (2011) Craniotomy: True Sham For Traumatic Brain Injury, Or A Sham Of A Sham? *J Neurotrauma* 28:359–369
134. Szczygielski J, Hubertus V, Kruchten E, Müller A, Oertel J (2016) Prolonged increase of the brain edema after decompressive craniectomy in mouse model of closed head injury. 67 Jahrestagung der Dtsch Gesellschaft für Neurochir (DGNC), 1 Jt Meet mit der Koreanischen Gesellschaft für Neurochir (KNS); Frankfurt am Main; Dtsch Gesellschaft für Neurochir P 127
135. Yang XF, Wen L, Shen F, Li G, Lou R, Liu WG, Zhan RY (2008) Surgical Complications Secondary To Decompressive Craniectomy In Patients With Head Injury: A Series Of 108 Consecutive Cases. *Acta Neurochir (Wien)* 150:1241–48
136. Zhu Y, Soderblom C, Krishnan V, Ashbaugh J, Bethea JR, Lee JK (2015) Hematogenous macrophage depletion reduces the fibrotic scar and increases axonal growth after spinal cord injury. *Neurobiol Dis* 74:114–125
137. von Holst H, Li X, Kleiven S (2012) Increased Strain Levels And Water Content In Brain Tissue After Decompressive Craniotomy. *Acta Neurochir (Wien)* 154:1583–93
138. Stiver SI (2009) Complications Of Decompressive Craniectomy For Traumatic Brain Injury. *Neurosurg Focus* 26:E7
139. Flint AC, Manley GT, Gean AD, Hemphill JC, Rosenthal G (2008) Post-Operative Expansion of Hemorrhagic Contusions after Unilateral Decompressive Hemicraniectomy in Severe Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma* 25:503–512
140. Ashayeri K, Jackson E, Huang J, Brem H, Gordon C (2016) Syndrome of the Trepined: A Systematic Review. *Neurosurgery* 79:525–534
141. Holzer M, Cerchiari E, Martens P, Roine R, Sterz F, Eisenburger P, Havel C, Kofler E, Oschatz E, Rohrbach K (2002) Mild Therapeutic Hypothermia To Improve The Neurologic Outcome After Cardiac Arrest. *N Engl J Med* 346:549–556
142. Bernard S, Gray T, Buist M, Jones B, Silvester W, Gutteridge G, Smith K (2002) Treatment Of Comatose Survivors Of Out-Of-Hospital Cardiac Arrest With Induced Hypothermia. *N Engl J Med* 346:557–563
143. (2015) Part 8: Post-Cardiac Arrest Care 2010 & 2015 American Heart Association Guidelines For Cardiopulmonary Resuscitation And Emergency Cardiovascular Care. *Am Hear Assoc Guidel Cardiopulm Resusc Emerg Cardiovasc Care* 16–18
144. Pfister R, Soll R (2010) Hypothermia For The Treatment Of Infants With Hypoxic–Ischemic



- Encephalopathy. *J Perinatol* 30:82–87
145. Shankaran S, Laptook AR, Ehrenkranz RA, et al (2005) Whole-Body Hypothermia For Neonates With Hypoxic–Ischemic Encephalopathy. *N Engl J Med* 353:1574–84
  146. Gluckman PD, Wyatt JS, Azzopardi D, et al (2005) Selective Head Cooling With Mild Systemic Hypothermia After Neonatal Encephalopathy: Multicentre Randomised Trial. *Lancet* 365:663–70
  147. Corry J, Antonio J (2012) Use Of Hypothermia In The Intensive Care Unit. *World J Crit Care Med* 4:106–122
  148. Clifton GL, Valadka A, Zygun D, et al (2011) Very Early Hypothermia Induction In Patients With Severe Brain Injury (The National Acute Brain Injury Study: Hypothermia II): A Randomised Trial. *Lancet Neurol* 10:131–139
  149. Peterson K, Carson S, Carney N (2008) Hypothermia Treatment For Traumatic Brain Injury: A Systematic Review And Meta-Analysis. *J Neurotrauma* 25:62–71
  150. Chio C-C, Kuo J-R, Hsiao S-H, Chang C-P, Lin M-T (2007) Effect Of Brain Cooling On Brain Ischemia And Damage Markers After Fluid Percussion Brain Injury in Rats. *Shock* 28:284–290
  151. Shiozaki T, Taneda M, Yoshida H, Iwai A, Yoshioka T, Sugimoto T (1993) Effect Of Mild Hypothermia On Uncontrollable Intracranial Hypertension After Severe Head Injury. *J Neurosurg* 79:363–368
  152. Kinoshita K, Chatzipanteli K, Alonso O, Howard M, Dietrich WD (2002) The Effect Of Brain Temperature On Hemoglobin Extravasation After Traumatic Brain Injury. *J Neurosurg* 97:945–953
  153. Jiang JY, Lyeth BG, Kapasi MZ, Jenkins LW, Povlishock JT (1992) Moderate Hypothermia Reduces Blood-Brain Barrier Disruption Following Traumatic Brain Injury In The Rat. *Acta Neuropathol* 84:495–500
  154. Koizumi H, Fujisawa H, Ito H, Maekawa T, Di X, Bullock R (1997) Effects Of Mild Hypothermia On Cerebral Blood Flow-Independent Changes In Cortical Extracellular Levels Of Amino Acids Following Contusion Trauma In The Rat. *Brain Res* 747:304–312
  155. Globus MY, Alonso O, Dietrich WD, Busto R, Ginsberg MD (1995) Glutamate Release And Free Radical Production Following Brain Injury: Effects Of Posttraumatic Hypothermia. *J Neurochem* 65:1704–11
  156. Chatzipanteli K, Alonso OF, Kraydieh T, Dietrich TD Importance of Posttraumatic

- Hypothermia and Hyperthermia on the Inflammatory Response After Fluid Percussion Brain Injury: Biochemical and Immunocytochemical Studies. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:531–542
157. Whalen MJ, Carlos TM, Clark RS, Marion DW, DeKosky MS, Heineman S, Schiding JK, Memarzadeh F, Dixon CE, Kochanek PM (1997) The Relationship Between Brain Temperature And Neutrophil Accumulation After Traumatic Brain Injury In Rats. *Acta Neurochir Suppl* 70:260–1
  158. Bramlett HM, Dietrich WD (2012) The Effects Of Posttraumatic Hypothermia On Diffuse Axonal Injury Following Parasagittal Fluid Percussion Brain Injury In Rats. *Ther Hypothermia Temp Manag* 2:14–23
  159. Doll H, Maegele M, Bohl J, Storkel S, Kipfmüller F, Schaefer U, Angelov D, Wirth S, Truebel H (2010) Pharyngeal Selective Brain Cooling Is Associated With Reduced CNS Cortical Lesion After Experimental Traumatic Brain Injury In Rats. *J Neurotrauma* 27:2245–2254
  160. Lyeth BG, Jiang JY, Liu S (1993) Behavioral Protection by Moderate Hypothermia Initiated After Experimental Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma* 10:57–64
  161. Clifton GL, Jiang JY, Lyeth BG, Jenkins LW, Hamm RJ, Hayes RL (1991) Marked Protection by Moderate Hypothermia After Experimental Traumatic Brain Injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 11:114–121
  162. Yao C, Wei G, Lu X-CM, Yang W, Tortella FC, Dave JR (2011) Selective Brain Cooling In Rats Ameliorates Intracerebral Hemorrhage And Edema Caused By Penetrating Brain Injury: Possible Involvement Of Heme Oxygenase-1 Expression. *J Neurotrauma* 28:1237–1245
  163. Kawanishi M, Kawai N, Nakamura T, Luo C, Tamiya T, Nagao S (2008) Effect Of Delayed Mild Brain Hypothermia On Edema Formation After Intracerebral Hemorrhage In Rats. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 17:187–195
  164. Hashimoto T, Yonetani M, Nakamura H (2003) Selective Brain Hypothermia Protects Against Hypoxic-Ischemic Injury In Newborn Rats By Reducing Hydroxyl Radical Production. *Kobe J Med Sci* 49:83–91
  165. Doerfler A, Schwab S, Hoffmann TT, Engelhorn T, Forsting M (2001) Combination Of Decompressive Craniectomy And Mild Hypothermia Ameliorates Infarction Volume After Permanent Focal Ischemia In Rats. *Stroke* 32:2675–81
  166. Shiozaki T, Sugimoto H, Taneda M, Oda J, Tanaka H, Hiraide A, Shimazu T (1998) Selection of severely head injured patients for mild hypothermia therapy. *J Neurosurg* 89:206–211

167. Marion D, Penrod L, Kelsey S, Obrist W, Kochanek P, Palmer A, Wisniewski S, DeKosky S (1997) Treatment Of Traumatic Brain Injury With Moderate Hypothermia. *N Engl J Med* 336:540–546
168. Clifton GL, Allen S, Barrodale P, Plenger P, Berry J, Koch S, Fletcher J, Hayes RL, Choi SC (1993) A Phase II Study Of Moderate Hypothermia In Severe Brain Injury. *J Neurotrauma* 10:263–271
169. Kollmar R, Staykov D, Dörfler A, Schellinger PD, Schwab S, Bardutzky J (2010) Hypothermia Reduces Perihemorrhagic Edema After Intracerebral Hemorrhage. *Stroke* 41:1684–1689
170. Els T, Oehm E, Voigt S, Klisch J, Hetzel A, Kassubek J (2006) Safety And Therapeutical Benefit Of Hemicraniectomy Combined With Mild Hypothermia In Comparison With Hemicraniectomy Alone In Patients With Malignant Ischemic Stroke. *Cerebrovasc Dis* 21:79–85
171. Wagner KR, Zuccarello M (2005) Local Brain Hypothermia For Neuroprotection In Stroke Treatment And Aneurysm Repair. *Neurol Res* 27:238–245
172. Kammersgaard LP, Rasmussen BH, Jørgensen HS, Reith J, Weber U, Olsen TS (2000) Feasibility And Safety Of Inducing Modest Hypothermia In Awake Patients With Acute Stroke Through Surface Cooling: A Case-Control Study: The Copenhagen Stroke Study. *Stroke* 31:2251–2256
173. Markgraf C, Clifton G, Moody M (2001) Treatment Window For Hypothermia In Brain Injury. *J Neurosurg* 95:979–983
174. Shiozaki T, Hayakata T, Taneda M, Nakajima Y, Hashiguchi N, Fujimi S, Nakamori Y, Tanaka H, Shimazu T, Sugimoto H (2001) A Multicenter Prospective Randomized Controlled Trial Of The Efficacy Of Mild Hypothermia For Severely Head Injured Patients With Low Intracranial Pressure. *J Neurosurg* 94:50–54
175. Hutchison JS, Ward RE, Lacroix J, et al (2008) Hypothermia Therapy After Traumatic Brain Injury In Children. *N Engl J Med* 358:2447–2456
176. Maekawa T, Yamashita S, Nagao S, Hayashi N, Ohashi Y (2015) Prolonged Mild Therapeutic Hypothermia Versus Fever Control With Tight Hemodynamic Monitoring And Slow Rewarming In Patients With Severe Traumatic Brain Injury: A Randomized Controlled Trial. *J Neurotrauma* 32:422–429
177. Polderman KH (2009) Mechanisms Of Action, Physiological Effects, And Complications Of Hypothermia. *Crit Care Med* 37:S186-202

178. Thoresen M, Whitelaw A (2000) Cardiovascular Changes During Mild Therapeutic Hypothermia And Rewarming In Infants With Hypoxic–Ischemic Encephalopathy. *Pediatrics* 106:92–99
179. Bernard SA, Jones BM, Buist M (1999) Experience With Prolonged Induced Hypothermia In Severe Head Injury. *Crit Care* 3:167–172
180. Curry D, Curry K (1970) Hypothermia And Insulin Secretion. *Endocrinology* 87:750–755
181. Geurts M, Macleod MR, Kollmar R, Kremer PHC, van der Worp HB (2014) Therapeutic Hypothermia And The Risk Of Infection. *Crit Care Med* 42:231–242
182. O’Phelan KH, Merenda A, Denny KG, Zaila KE, Gonzalez Kristine O CH, Gonzalez C, Contributions A (2015) Therapeutic Temperature Modulation Is Associated With Pulmonary Complications In Patients With Severe Traumatic Brain Injury. *World J Crit Care Med* 4:296–301
183. Dvilevicius AE, Prandini MN (2008) Selective Hypothermia: An Experimental Study On Traumatic Brain Injury In Rats. *Arq Neuropsiquiatr* 66:391–396
184. Chen SF, Hsu CW, Huang WH, Wang JY (2008) Post-injury baicalein improves histological and functional outcomes and reduces inflammatory cytokines after experimental traumatic brain injury. *Br J Pharmacol* 155:
185. Christian E, Zada G, Sung G, Giannotta SL (2008) A Review Of Selective Hypothermia In The Management Of Traumatic Brain Injury. *Neurosurg Focus* 25:E9:1-8
186. Marion DW, Leonov Y, Ginsberg M, et al (1996) Resuscitative Hypothermia. *Crit Care Med* 24:S81-89
187. Wang H, Olivero W, Lanzino G, Elkins W, Rose J, Honings D, Rodde M, Burnham J, Wang D (2004) Rapid And Selective Cerebral Hypothermia Achieved Using A Cooling Helmet. *J Neurosurg* 100:272–277
188. Gelman B, Schleien CL, Lohe A, Kuluz JW (1996) Selective Brain Cooling In Infant Piglets After Cardiac Arrest And Resuscitation. *Crit Care Med* 24:1009–17
189. Ku YT, Montgomery LD, Webbon BW (1996) Hemodynamic And Thermal Responses To Head And Neck Cooling In Men And Women. *Am J Phys Med Rehabil* 75:443–450
190. King C, Robinson T, Dixon CE, Rao GR, Larnard D, Nemoto CEM (2010) Brain Temperature Profiles During Epidural Cooling With The ChillerPad In A Monkey Model Of Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma* 27:1895–1903

191. Wang Y, Zhu L, Rosengart AJ (2008) Targeted Brain Hypothermia Induced By An Interstitial Cooling Device In The Rat Neck: Experimental Study And Model Validation. *Int J Heat Mass Transf* 51:5662–5670
192. Qiu W, Shen H, Zhang Y, Wang W, Liu W, Jiang Q, Luo M, Manou M (2006) Noninvasive Selective Brain Cooling By Head And Neck Cooling Is Protective In Severe Traumatic Brain Injury. *J Clin Neurosci* 13:995–1000
193. Liu W, Qiu W, Zhang Y, Wang W, Lu F, Yang X (2006) Effects Of Selective Brain Cooling In Patients With Severe Traumatic Brain Injury: A Preliminary Study. *J Int Med Res* 34:58–64
194. Dohi K, Jimbo H, Abe T, Aruga T (2006) Positive Selective Brain Cooling Method: A Novel, Simple, And Selective Nasopharyngeal Brain Cooling Method. *Acta Neurochir (Wien)* 96:409–412
195. Iatrou C, Domaingue C, Thomas R, Nye D (2002) The Effect Of Selective Brain Cooling On Intracerebral Temperature During Craniotomy. *Anaesth Intensive Care* 30:167–170
196. Allers M, Boris-Möller F, Lunderquist A, Wieloch T (2006) A New Method Of Selective, Rapid Cooling Of The Brain: An Experimental Study. *Cardio Vasc Interv Radiol* 29:260–263
197. Diao C, Zhu L (2006) Temperature Distribution And Blood Perfusion Response In Rat Brain During Selective Brain Cooling. *Med Phys* 33:2565–2573
198. Guo C, Geng Y, Song F, Huo Y, Wu X, Lv J, Ge A, Fan W (2016) Mild Hypothermia Protects Rat Neuronal Injury After Intracerebral Hemorrhage Via Attenuating Endoplasmic Reticulum Response Induced Neuron Apoptosis. *Neurosci Lett* 635:17–23
199. Zhu P, Zhao M, Li X, et al (2015) Effect Of Low Temperatures On BAX And BCL2 Proteins In Rats With Spinal Cord Ischemia Reperfusion Injury. *Genet Mol Res* 14:10490–10499
200. Zhu Y, Liu C, Sun Z (2015) Early Combined Therapy With Pharmacologically Induced Hypothermia And Edaravone Exerts Neuroprotective Effects In A Rat Model Of Intracerebral Hemorrhage. *Cell Biochem Biophys* 73:581–587
201. Wei S, Sun J, Li J, Wang L, Hall CL, Dix TA, Mohamad O, Wei L, Yu ASP (2013) Acute And Delayed Protective Effects Of Pharmacologically Induced Hypothermia In An Intracerebral Hemorrhage Stroke Model Of Mice. *Neuroscience* 252:489–500
202. Diao C, Zhu L, Wang H (2003) Cooling And Rewarming For Brain Ischemia Or Injury: Theoretical Analysis. *Ann Biomed Eng* 31:346–353
203. Mariak Z (2002) Intracranial Temperature Recordings In Human Subjects. The Contribution Of

- The Neurosurgeon To Thermal Physiology. *J Therm Biol* 27:219–228
204. Zhu L, Diao C (2001) Theoretical Simulation Of Temperature Distribution In The Brain During Mild Hypothermia Treatment For Brain Injury. *Med Biol Eng Comput* 39:681–687
  205. Leeuwen GMJ Van, Hand JW, Lagendijk JJW, Azzopardi D V, Edwards AD (2000) Numerical Modeling Of Temperature Distributions Within The Neonatal Head. *Pediatr Res* 48:351–356
  206. Nelson DA, Nunneley SA (1998) Brain Temperature And Limits On Transcranial Cooling In Humans: Quantitative Modeling Results. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 78:353–9
  207. Pennes H (1948) Analysis Of Tissue And Arterial Blood Temperatures In The Resting Human Forearm. *J Appl Physiol* 1:93–122
  208. Hoffman WE, Miletich DJ, Albrecht RF, Ripper R, Visintine D, Dominguez G (1982) Differential Cerebral Hypothermia. *Cryobiology* 19:392–401
  209. Soukup J, Zauner A, Doppenberg EMR, Menzel M, Gilman C, Young HF, Bullock R (2002) The Importance Of Brain Temperature In Patients After Severe Head Injury: Relationship To Intracranial Pressure, Cerebral Perfusion Pressure, Cerebral Blood Flow, And Outcome. *J Neurotrauma* 19:559–571
  210. Okubo K, Itoh S, Isobe K, Kusaka T, Nagano K, Kondo M, Onishi S (2001) Cerebral Metabolism And Regional Cerebral Blood Flow During Moderate Systemic Cooling In Newborn Piglets. *Pediatr Int* 43:496–501
  211. Verhaegen MJ, Todd MM, Hindman BJ, Warner DS (1993) Cerebral Autoregulation During Moderate Hypothermia In Rats. *Stroke* 24:407–414
  212. Busija DW, Leffler CW (1987) Hypothermia Reduces Cerebral Metabolic Rate And Cerebral Blood Flow In Newborn Pigs. *Am J Physiol* 253:H869-73
  213. Janssen FEM, Leeuwen J Van, Steenhoven AA Van (2005) Modelling Of Temperature And Perfusion During Scalp Cooling. *Phys Med Biol* 50:4065–4073
  214. Laptook AR, Shalak L, Corbett RJT (2001) Differences in Brain Temperature and Cerebral Blood Flow During Selective Head Versus Whole-Body Cooling. *Pediatrics* 108:1103–10
  215. Seif El Nasr M, Nuglisch J, Krieglstein J (1992) Prevention Of Ischemia-Induced Cerebral Hypothermia By Controlling The Environmental Temperature. *J Pharmacol Toxicol Methods* 27:23–26
  216. Minamisawa H, Mellergård P, Smith ML, Bengtsson F, Theander S, Boris-Möller F, Siesjö BK

(1990) Preservation Of Brain Temperature During Ischemia In Rats. Stroke 21:758–64

## **9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis**

### **Abbildungen:**

1. Markierung Traumalokalisation in situ und im Schädelmodell	22
2. Traumamodell	23
3. Schädelmodell einer Maus	24
4. Erhebung des NSS	26
5. Anatomie des mäuslichen Gehirns, Areal Hippocampus	28
6. Mittleres Gewicht zum Operationszeitpunkt	35
7. Mittlere Körperkerntemperatur während der Operation	36
8. Mittlere Kopftemperatur während der Operation	36
9. Änderungen des mittleren Körpergewichts postoperativ	38
10. NSS im Verlauf des Beobachtungszeitraums postoperativ	39
11. BB-Score im Verlauf des Beobachtungszeitraums postoperativ	41
12. BB-Time Verlauf des Beobachtungszeitraums postoperativ	42
13. HE Präparate NNN	43
14. HE Präparate verschiedener Gruppen	44
15. Nissl Präparate TCN	44
16. Exemplarische Aufnahmen HE und Nissl kontralaterale Hemisphäre TCN	45
17. Exemplarische Aufnahmen Nissl CA1 NNN und TCN	45
18. Mittlere Anzahl neuronale Perikarya CA1 und CA3	46
19. AQP4-Färbungen CA1 und CA3	46
20. Vergleich des Anfärbegrades von AQP4	47
21. Exemplarische Aufnahme GFAP Färbung TNN	47
22. GFAP Färbungen CA1 und CA3	48
23. Mittlere Anzahl nach GFAP angefarbter Strukturen	48



24. Bcl-2 Färbungen CA1 und CA3	49
25. Mittlere Anzahl nach Bcl-2 angefärbter Strukturen	50

**Tabellen:**

1. Glasgow Koma Skala	12
2. Übersicht über die Versuchsgruppen	21
3. Erhebung des NSS, Teil 1	26
4. Erhebung des NSS, Teil 2	26
5. Erhebung des Beam Balance Scores	27
6. Regionen der verschiedenen Schnittserien	28
7. Arbeitsschritte Entparaffinieren und Rehydrieren	29
8. Arbeitsschritte Dehydrieren und Eindecken	29
9. Arbeitsschritte HE-Färbung	29
10. Arbeitsschritte Nissl-Färbung	30
11. Verwendete Primärantikörper	30
12. Verwendete KITs	31
13. Verwendete Lösungen	31
14. Schema immunhistochemische Färbungen	32
15. Erhebung des Anfärbegrads von AQP4	34
16. Versuchstierzahl nach 24 Stunden und nach 28 Tagen postoperativ	37

## **10. Publikationen und Ausblick**

### **Publikationen:**

Szczygielski J, Hubertus V, Kruchten E, Müller A, Albrecht LF, Mautes AE, Schwerdtfeger K, Oertel J (2019) **Brain Edema Formation and Functional Outcome After Surgical Decompression in Murine Closed Head Injury Are Modulated by Acetazolamide Administration.** Front Neurol 10:1–14

Szczygielski J, Glameanu C, Müller A, Klotz M, Sippl C, Hubertus V, Schäfer K-H, Mautes AE, Schwerdtfeger K, Oertel J (2018) **Changes in Posttraumatic Brain Edema in Craniectomy-Selective Brain Hypothermia Model Are Associated With Modulation of Aquaporin-4 Level.** Front Neurol 9:799

Szczygielski J, Hubertus V, Oertel J (2018) **Letter to the Editor Regarding Cisternostomy for Refractory Posttraumatic Intracranial Hypertension.** World Neurosurg 112:311–312

### **Kongressbeiträge:**

#### **65. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie 2014, Dresden:**

„Radiological Evolution of contusional changes in murine model of moderate Closed Head Injury.“ (Szczygielski J., Mautes A., Müller A., Hubertus V., Kruchten E., Schwerdtfeger K., Oertel J.)

#### **19th Annual EMN Congress (Euroacademia Multidisciplinaria Neurotraumatologica) 2014, Ulm:**

„Long lasting neurological impairment after decompressive craniectomy in murine model of Closed Head Injury.“ (Szczygielski J., Mautes A., Müller A., Hubertus V., Kruchten E., Schwerdtfeger K., Oertel J.)

#### **20th Annual EMN Congress (Euroacademia Multidisciplinaria Neurotraumatologica) 2015, Zagreb:**

„Biochemical markers in neurotrauma: How far from fingerstick approach?“ (Szczygielski J., Hubertus V., Kruchten E., Schwerdtfeger K., Oertel J.)

#### **67. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie 2016, Frankfurt / Main:**

„Radiological evolution of contusional changes in murine model of moderate Closed Head Injury“ (Szczygielski J., Mautes A., Müller A., Hubertus V., Kruchten E., Schwerdtfeger K., Oertel J.)

#### **21st Annual EMN Congress (Euroacademia Multidisciplinaria Neurotraumatologica) 2016, Novi Sad:**

„Selective brain hypothermia transiently improves the neurological recovery in the mouse model of decompressive craniectomy after Closed Head Injury“ (Szczygielski J., Hubertus V., Kruchten E., Schwerdtfeger K., Oertel J.)

**68. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie 2017, Magdeburg:**

„Diverse effect of acetazolamide administration in murine Closed Head Injury with versus without surgical decompression.” (Szczygielski J., Hubertus V., Kruchten E., Müller A., Oertel J.)

**Ausblick:**

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Kleintiermodell bietet mannigfaltige Möglichkeiten für weiterführende Untersuchungen, so etwa zur kontrollierten Evaluation Apoptose inhibierender oder das posttraumatische Hirnödem modifizierender Wirkstoffe.

Aktuell hat unsere Arbeitsgruppe ein neues Projekt begonnen, um in analogem Versuchsaufbau zur vorliegenden Arbeit den Einfluss der Größe der durchgeführten dekompresiven Kraniektomie auf neurologische Funktion und Ödembildung zu untersuchen.

## **11. Dank**

Bedanken möchte ich mich zunächst bei Klinikdirektor Herr Prof. Dr. med. Joachim Oertel für die Überlassung des Themas und für die Unterstützung meiner Arbeit.

Außerdem bedanken möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. rer. nat. Steffi Urbschat für ihre stete Unterstützung, ihren wertvollen Rat und die freundliche Aufnahme in ihr Forschungsteam.

Herr Dr. med. Jacek Szczygielski, dem Betreuer der vorliegenden Arbeit, danke ich für die inspirierende Zusammenarbeit, seine vielen Ideen, seine Erreichbarkeit bei allen aufkommenden Fragen und für seine unermüdliche Unterstützung in allen Belangen.

Herr Dr. rer. med. Andreas Müller möchte ich für seine Hilfe bei der Anleitung und Durchführung der MRT-Aufnahmen sowie für seine freundschaftliche Unterstützung, seine Anregungen und für das Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit danken.

Dank gebührt weiterhin Frau Sigrid Welsch, Frau Sonja Hoffmann und Frau Marion Schwarz für ihre Unterstützung und Anleitung bei der Herstellung der histologischen Präparate und für ihre geduldige Anleitung bei der Anfertigung der histologischen und immunhistochemischen Färbungen.

Weiterhin danke ich meinem Partner Herr Niko Triesch für den Rückhalt, den er mir stets gibt. Ich danke meinen Großeltern, Herr Emil und Frau Anna Maria André und nicht zuletzt meinen Eltern, Herr Patrick und Frau Adelheid Hubertus, die durch ihre bedingungslose und liebevolle Unterstützung alles möglich machen.