

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden 132 männliche Sprague Dawley Ratten mit einem Gewicht von 300-400 g verwendet (Harlan Winkelmann GmbH, Borchon, BRD).

2.2 Controlled Cortical Impact Injury (CCII)

Das CCII-Modell entstand Ende der 80er Jahre unter technischer Leitung von James Lighthall in den General Motors Research Laboratories, USA (Lighthall et al., 1989). In leicht modifizierter Form wurde es 1991 erstmals bei der Ratte angewendet (Dixon et al., 1991).

Charakteristisch für das Modell ist die Imitation der fokalen Kontusion. Wie beim mittleren bis schweren SHT kommt es durch mechanische Gewebedeformation zu einer fokalen Schädigung des Gehirns. Somit lässt sich ein sehr realitätsnaher Verletzungsmechanismus imitieren. Die Steuerungsparameter für die Traumastärke umfassen den Bolzendurchmesser, die Bolzengeschwindigkeit, die Eindringtiefe sowie die Deformationsdauer. Diese exakte Steuerung der physikalischen Parameter des Modells ermöglicht eine gut kontrollier- und reproduzierbare Traumastärke.

Das Traumagerät ist in eine pneumatische Kontrollstation, eine computergesteuerte Datenerfassungseinheit und die Kontusionseinheit gegliedert:

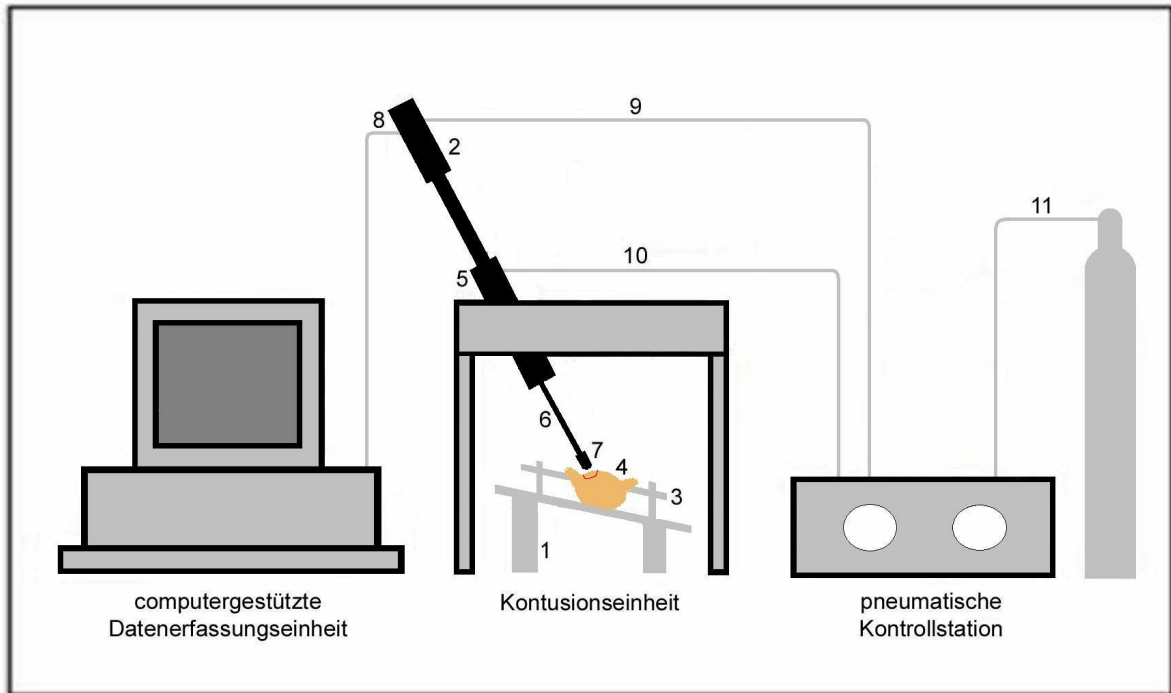


Abb. 3: Schematischer Aufbau des CCl₄-Traumagerätes mit Kontusionseinheit, pneumatischer Kontrollstation und computergestützter Datenerfassungseinheit

Sie besteht aus dem Kontusionstisch (1) und dem an einem Stahlrahmen befestigten Kontusionsschlitten (2). Der Kontusionstisch ist höhenverstellbar, in der Oberflächenneigung variabel sowie im Ganzen verschieblich. Auf ihm befestigt ist eine stereotaktische Halterung (3) befestigt, in welcher die Tiere (4) nach operativer Präparation an den äußeren Gehörgängen und den Schneidezähnen fixiert werden. Der Kontusionsschlitten besteht aus einem Druckzylinder (5), einer Kontusionsstange (6), dem Schlagbolzen (7) und einer analogen Daten-Transformationsseinheit (8). Der Schlagbolzen hat einen Durchmesser von 5 mm und ist über ein Gewinde mit der Kontusionsstange verbunden. Das Gewinde dient zur Höhenregulation des Schlagbolzens und ist pro Millimeter Höhenverschiebung mit einer Drehung um 360° normiert. Somit ist eine genaue Einstellung der Eindringtiefe ins Hirn gewährleistet. Diese Einstellung kann mit einer gegenläufigen Mutter fixiert werden. Der Schlagbolzen besitzt eine konvexe Oberfläche, die zum Traumazeitpunkt auf die Dura auftrifft. Die Kontusionsstange ist über 5 cm linear frei beweglich und mündet in einen Druckzylinder, der in zwei Druckkammern unterteilt ist. Über zuführende Schläuche (9, 10) nehmen beide Kammern Druckveränderungen aus der pneumatischen Kontrollstation auf, die als Bewegung auf die Kontusionsstange

übertragen werden. Das mit dem oberen Teil des Zylinders verbundene Hochdrucksystem (9) verursacht die schnelle Abwärtsbewegung des Bolzens, das Niederdrucksystem (10) analog dazu die langsamere Aufwärtsbewegung über die untere Druckzylinderkammer. Als Druckmedium wurde hochgereinigter Stickstoff (N_2) verwendet (N_2 PLUS 5.0, N_2 99.9%, Fa. AGA Gas GmbH, Hamburg, BRD), der über ein Schlauchsystem (11) in die pneumatische Kontrolleinheit gespeist wurde. Über eine stufenlose Regulation verschiedener Druckstufen in beiden Drucksystemen können verschiedene Bolzengeschwindigkeiten eingestellt werden. In den hier beschriebenen Versuchen wurde der Hochdruck mit 100 pounds per square inch (psi) gewählt, der Niederdruck mit 30 psi. Das entspricht einer Bolzengeschwindigkeit von 7 m/s in der Abwärtsbewegung. Weiterhin kann das Zeitfenster der Verweildauer des Bolzens auf der Dura variiert werden. In allen Versuchen wurde eine Durakontaktzeit des Bolzens von 300 ms verwendet. Die Bolzenbewegung kann mit einer magnetischen Steuerung ausgelöst werden.



Abb. 4: Ansicht der CCII-Kontusionseinheit mit Kontusionsschlitten, Schlagbolzen und Kontusionstisch zur Lagerung der Tiere

CCII Parameter in den durchgeführten Versuchen	
Bolzengeschwindigkeit bei Abwärtsbewegung	7 m/s (= 100 psi)
Bolzengeschwindigkeit bei Rückholbewegung	2.1 m/s (= 30 psi)
Durakontaktzeit	300 ms
Bolzendurchmesser	5 mm
Eindringtiefe in das Hirngewebe	1 mm

Tabelle 1: CCII Parameter in den durchgeführten Versuchen; m/s = Meter pro Sekunde, mm = Millimeter; ms = Millisekunden; psi = pounds per square inch

2.3 Präparation der Versuchstiere

Die Versuchstiere erhielten eine Inhalationsnarkose über eine Maske mit Isofluran (Forene[®], Abbott GmbH & Co KG, Wiesbaden, BRD) in einem 2:1 N₂O/O₂ Gemisch. Die Spontanatmung der Tiere war zu jedem Zeitpunkt erhalten. Zur Narkoseeinleitung wurde jedes Tier in einen gasdurchströmten Behälter gesetzt, in dem es für 3 Minuten ein Gemisch von 5% Isofluran in 2 l/min N₂O und 1 l/min O₂ erhielt. Nach Umlagerung auf den Operationstisch erhielten die Tiere für 3 Minuten 3% Isofluran bei unverändertem N₂O/O₂ Gemisch über eine Maske. Zur weiteren Aufrechterhaltung der Narkose wurde die Isoflurandosis auf 1% reduziert und die N₂O/O₂ Flussraten auf 0,5 und 0,25 l/min begrenzt. Das expirierte Atemgas wurde von einer Vakuumpumpe kontinuierlich abgesaugt. Die Körpertemperatur wurde mit einer Wärmematte konstant auf 36.0–37.0°C gehalten, die an einen rektalen Temperaturfühler gekoppelt war.

Zunächst wurde in Rückenlage bei 84 Tieren über einen 2,5 cm langen Hautschnitt die Arteria und Vena femoralis präpariert und mit Polyethylenkathetern (PE-50, 0.28 mm ID, 0.61 mm OD, Portex, Hythe, Kent, UK) kannüliert, wobei die venöse Kannülierung nur in der HHAES-Gruppe sowie den Kontrolltieren mit intravenöser Plazeboapplikation erfolgte. Nach Hautnaht wurde mit dem arteriellen Katheter der MAD bis nach Substanzgabe aufgezeichnet. Dazu dienten eine Transpac-Einheit (Fa. Abbott, Wiesbaden, BRD) sowie PC-Software (Labview, Version 3.1.1, National Instruments, TX, USA). Des Weiteren wurden vor Trauma, nach

Trauma und nach Substanzgabe BGAs zur Analyse der arteriellen Partialdrücke von O_2 und CO_2 (apO_2 , $apCO_2$), dem Blut-pH-Wert, base excess (BE) und Plasmahämoglobinkonzentration (Hb) entnommen (ABL™ 520, Radiometer, Kopenhagen, DK).

Der venöse Gefäßzugang diente der Applikation von HHAES sowie von NaCl in der Kontrollgruppe, die Tiere der NAC-Gruppe und entsprechende Plazebetiere erhielten die Substanz über eine intraperitoneale Injektion.

Zur Trepanation des Schädels wurde der Kopf der Versuchstiere in einem stereotaktischen Halter (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA) an beiden Meatus acusticus externi fixiert. Die Inzision der Kopfhaut erfolgte in der Medianlinie zwischen Augen und Ohren über eine Länge von ca. 3 cm. Nach stumpfer Mobilisation und Präparation der Kopfhaut wurde der linke M. temporalis reseziert und eventuell entstandene Blutungen mit bipolarer Koagulation gestillt. Es folgten die Darstellung des Schädelknochens und eine ca. 7 x 7 mm messende osteoklastische Trepanation unter mikroskopischer Kontrolle. Zur anatomischen Orientierung dienten median die Sagittalnaht, frontal die Koronarnaht, occipital die Lambdanaht und temporokaudal der Ansatz des Arcus zygomaticus. Beim Herauslösen des ausgebohrten Knochendeckels wurde besonderes Augenmerk auf die Unversehrtheit der Dura mater gelegt. Bei 84 Tieren wurde zusätzlich rechts frontal ein Bohrloch zur intraparenchymatösen Messung des ICP angelegt.

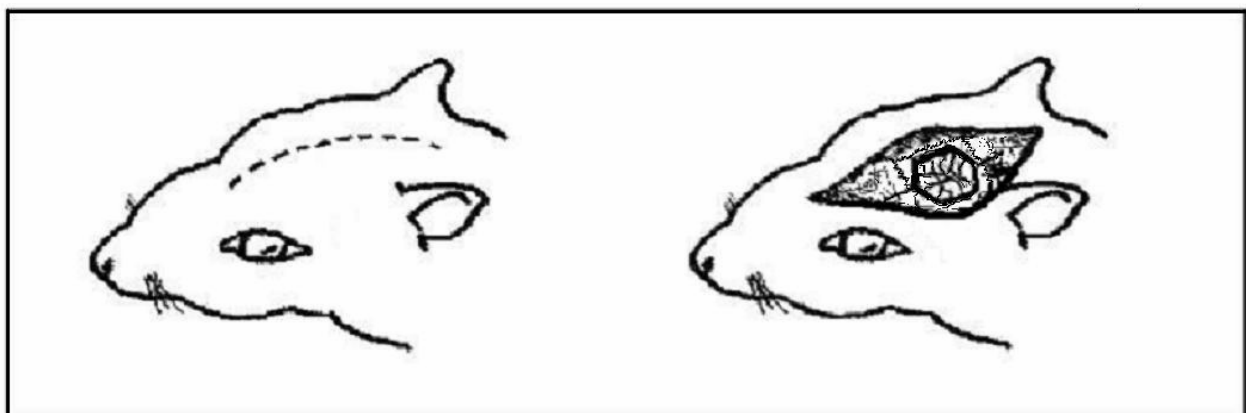


Abb. 5: Lokalisation der Skalpinzisur (links) und der Trepanationsöffnung (rechts)

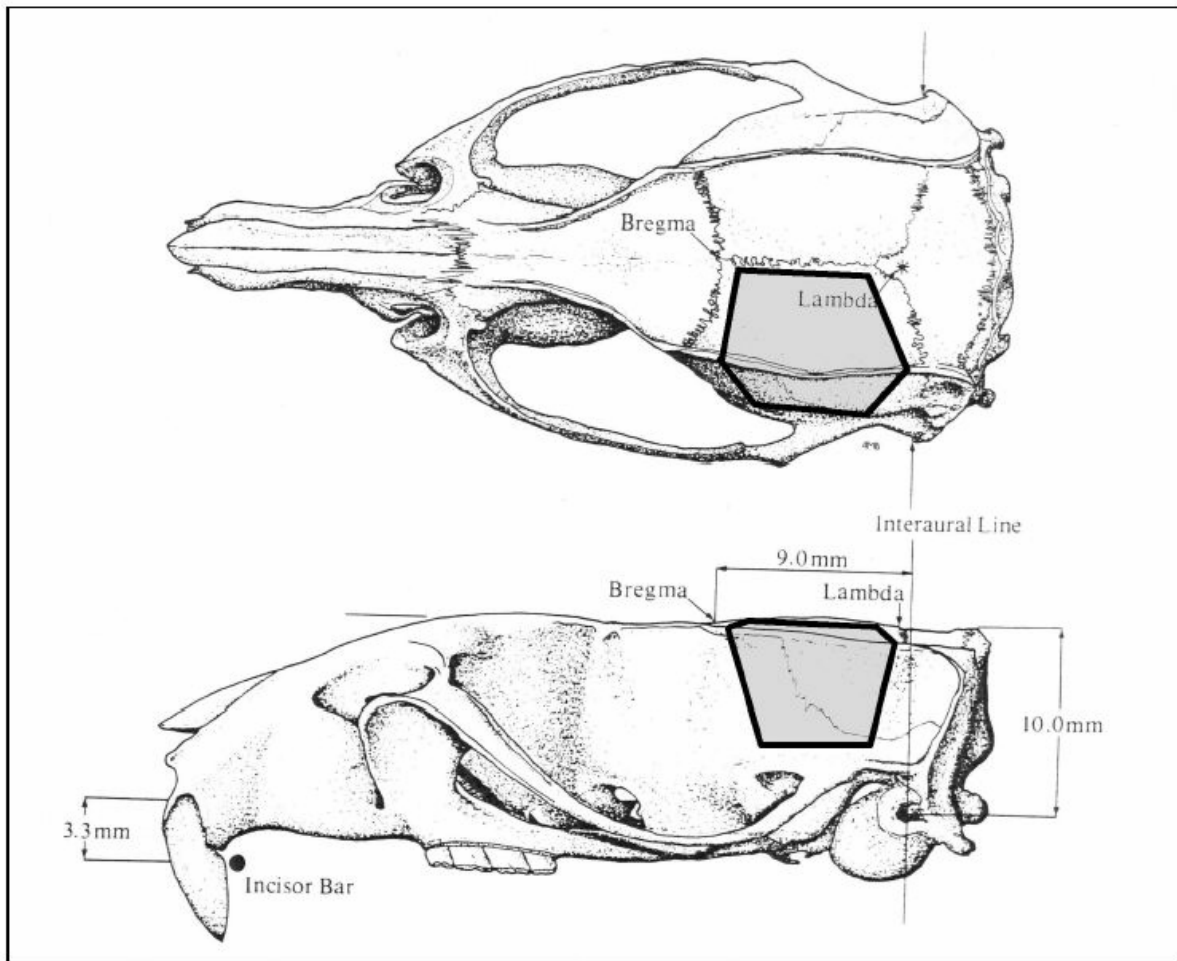


Abb. 6: Lokalisation der Trepanation zwischen Sagittalnaht, Bregma, Lambda und temporalem Ansatz des Arcus zygomaticus von oben (oben) und von der Seite (unten) gesehen



Abb. 7: Intraoperative Sicht auf die Kalotte mit den Schädelnähten nach Abpräparation des linken M. temporalis (A); Situs nach osteoklastischer Trepanation links temporo-parietal mit menigealen und kortikalen Gefäßen vor Applikation des Traumas (B); posttraumatischer Situs mit ausgeprägtem subduralen Hämatom und intakter Dura (C)

Nach Umlagerung der Tiere in das Kontusionsgerät wurde der Kopf jedes Tieres wiederum stereotaktisch fixiert. Dabei wurden Tischposition und -neigung so gewählt, dass der Kontusionsbolzen rechtwinklig zur Kortexoberfläche in der Mitte der Trepanationsöffnung auftraf. Die Position, in welcher der Bolzen bei maximal ausgezogenem Kontusionsschlitten die Dura mater gerade berührte, wurde als „Nullposition“ definiert. Anschließend erfolgte bei zurückgezogenem Kontusionsschlitten die Einstellung der Eindringtiefe und die Applikation des Traumas mit einem pneumatischen Druck von 100 psi und einer Eindringtiefe von 1 mm.

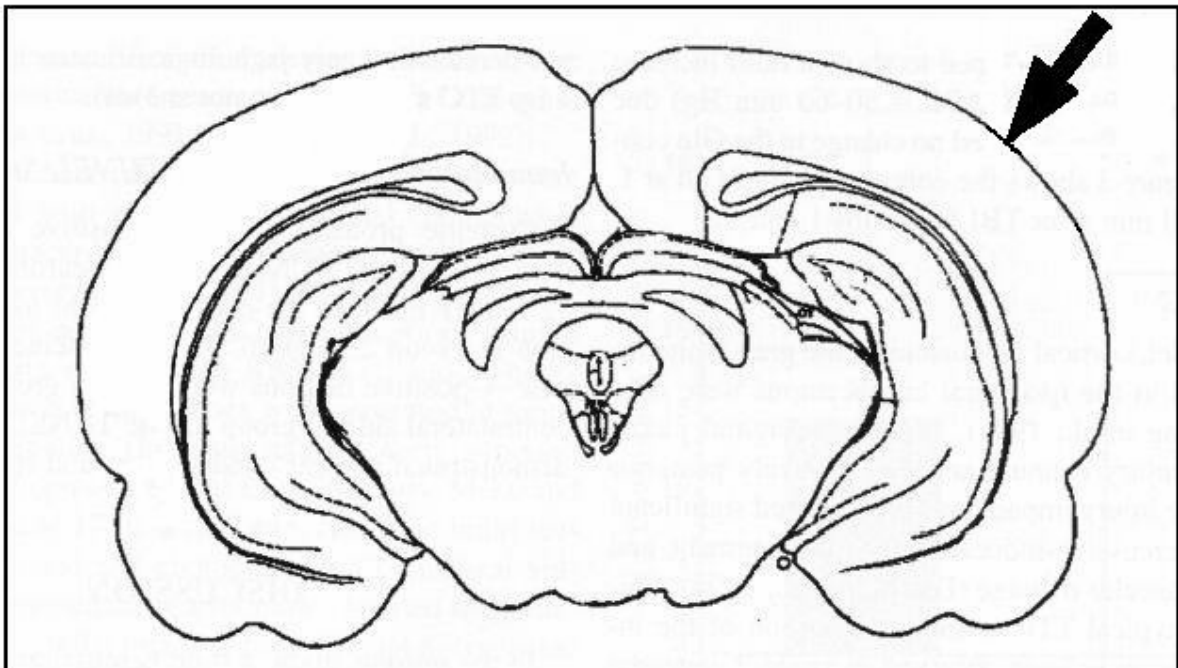


Abb. 8: Schematische Zeichnung des Kontaktpunktes zwischen Kontusionsbolzen und der Kortexoberfläche in koronarer Schnittebene. Der Kontusionsbolzen trifft rechtwinklig auf die Kortexoberfläche.

Nach Substanzgabe erfolgten die Hautnaht am Kopf (Prolene 3/0, Fa. Ethicon, Norderstedt, BRD) und Kürzen sowie Verschließen der Gefäßkatheter unter Hautniveau mittels einer erhitzten Pinzette. Die Tiere wurden mit 2 l O₂ pro Minute für etwa 3 Minuten nachbeatmet und dann in ihre Käfige zurückgesetzt.

Etwa 20 Minuten vor der Hirnentnahme wurden die Tiere erneut narkotisiert und mit einem arteriellen Katheter zur Blutdruckmessung und Blutentnahme versorgt. Über einen ca. 5 cm langen transversalen Bauchschnitt wurden die linken Renalgefäße aufgesucht und zur Entblutung der Tiere durchtrennt. Nach dem Sistieren der Herzaktionen sowie der Spontanatmung wurde die Schädeldecke vom

Foramen magnum aus komplett abgelöst und entfernt. Nach Absetzen des Zerebellums in Ebene des IV. Ventrikels und Abtrennen der olfaktorischen Bulbi, der Nervi optici sowie der übrigen Hirnnerven konnte das Großhirn in toto mit einem Spatel entnommen werden.

2.4 In Vivo Messungen

2.4.1 Laser Doppler Flussmessung (LDF)

Für die semiquantitative Bestimmung regionaler kortikaler Perfusion wurden Flussmessungen mit Laser-Doppler-Technik vorgenommen. Dieses Verfahren erfasst in kleinen oberflächlichen Gewebevolumina den Blutfluss in der Mikrozirkulation (Skarphedinsson et al., 1988). Dabei werden Blutflussgeschwindigkeiten von 0.01 bis 10 mm/s erfasst (Moor Instruments Ltd., Millwey, UK).

Technische Grundlage der Messungen ist das Doppler-Prinzip: von einem Laser (Moor Instruments Ltd., Millwey, UK) emittiertes monochromatisches Licht wird von den Erythrozyten reflektiert und durch deren Bewegung in der Frequenz verändert. Aus dem Spektrum der Frequenzänderung kann die Flussgeschwindigkeit errechnet werden (Oberg, 1990).

Für die Quantifizierung der lokalen kortikalen Flussmessung wurde bei 20 Tieren die Trepanation parallel zur Sutura sagittalis nach frontal und occipital erweitert, um Flusswerte im Bereich der Kontusion sowie perikontusionell zu erfassen. Es wurden mindestens 34 Einzelmessungen mit jeweils 0.2 mm Abstand zu den Zeitpunkten vor Trauma, nach Trauma, nach Substanz, 4 h nach Trauma und nach 24 h durchgeführt. Aufgrund der Verwendung eines stereotaktischen Halters für die Laser-Doppler-Sonde und der Fixation des Kopfes der Versuchstiere im stereotaktischen Rahmen konnten zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten Flussmessungen in denselben kortikalen Arealen durchgeführt werden.

2.4.2 Messung des intrakraniellen Druckes (ICP)

Bei 84 Tieren wurde der ICP über eine intraparenchymatöse Drucksonde gemessen (Codman, Johnson & Johnson Professional, Inc., Raynham, MA, USA). Dazu wurde bei den Tieren ein kontralateral zur Kontusion gelegenes Bohrloch etwa 1 mm frontal

der Koronarnaht angelegt. Hierbei wurde auf atraumatische Arbeitsweise geachtet, um eine lokale Blutung zu vermeiden und den Gewebeschaden durch die Sondeninsertion möglichst klein zu halten. Um eine Verlaufskontrolle der ICP-Werte zu gewährleisten, wurden die Messwerte vor Trauma, nach Trauma, nach Substanzgabe und vor Hirnentnahme 24 h nach Trauma dokumentiert.

2.5 Quantifizierung von Hemisphärenschwellung und Wassergehalt

Zur Quantifizierung des posttraumatischen Hirnödems wurde bei 48 Tieren die Hemisphärenschwellung gegenüber der nichttraumatisierten Seite sowie der Wassergehalt beider Hemisphären bestimmt. Dafür wurden unter mikroskopischer Kontrolle verbliebene Durareste aus dem Interhemisphärenspalt entfernt und die Reste der Nervi optici am Chiasma opticum abgetrennt. Des Weiteren wurde die dorsale Hemisphärgrenze im Bereich des IV. Ventrikels mit einer mikrochirurgischen Schere bei Bedarf so angepasst, dass beide Hirnhälften unter mikroskopischer Sicht anatomisch symmetrisch erschienen. Danach wurden die Hemisphären in der Fissura longitudinalis cerebri voneinander gelöst und das Corpus callosum sowie darunterliegende Hirnanteile median durchtrennt.

Bei der gesamten Präparation wurde auf eine zügige Arbeitsweise geachtet, um den Wassergehalt nicht durch Gewebeeintrocknung zu verfälschen.

Nun konnten die Feuchtgewichte der linken und rechten Hemisphäre bestimmt werden (FG_{li} , FG_{re}). Zur Ermittlung der Trockengewichte (TG_{li} , TG_{re}) wurden beide Hirnhälften bei 110°C über 24 h getrocknet und nach Abkühlung erneut gewogen. Aus diesen Gewichten konnten nun die Hirnschwellung, Wassergehalt und der prozentuale Trennfehler berechnet werden.

Die Hirnschwellung ist der prozentuale Anteil des Mehrgewichts der traumatisierten gegenüber der nichttraumatisierten Seite:

$$(1) \quad \text{Schwellung [\%]} = [(FG_{li} - FG_{re}) / FG_{re}] \times 100$$

Der Wassergehalt beschreibt den prozentualen Flüssigkeitsanteil einer Hemisphäre am Gesamtgewicht dieser Hirnhälfte:

$$(2) \quad \text{Wassergehalt [\%]} = [(FG_{li}-TG_{li})/FG_{li}] \times 100 \text{ bzw. } [(FG_{re}-TG_{re})/FG_{re}] \times 100$$

Der Trennfehler dient zur Überprüfung der Genauigkeit, mit der beide Hemisphären separiert wurden. Ein Trennfehler unter 5% war Bedingung für die Verwertbarkeit der ermittelten Hemisphärenschwellungen.

$$(3) \quad \text{Trennfehler [\%]} = [(TG_{li}-TG_{re})/(TG_{re})] \times 100$$

2.6 Gewebefärbung mit Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)

Zur Darstellung und Quantifizierung kontusionierten Hirngewebes wurde die ursprünglich für Ischämie Modelle konzipierte TTC-Färbung angewandt. Das verwendete 2,3,5-TTC fungiert als unspezifischer Protonenakzeptor mitochondrialer Enzymsysteme, wie z.B. Dehydrogenasen. Diese dienen der Synthese von Energieträgern des zellulären Struktur- und Arbeitsstoffwechsels, z.B. durch Phosphorylierung von Adenosindiphosphat (ADP) zu Adenosintriphosphat (ATP). Durch enzymatische Reduktion wird das hydrophile TTC zu rotem, lipophilem Formazan umgewandelt, das sehr lichtempfindlich ist. Kommt es nun posttraumatisch zu einer Störung des mitochondrialen Stoffwechsels, bleibt in den angefärbten Arealen die erwartete Rotfärbung des Gewebes aus. Damit lässt sich mittels der TTC-Färbung geschädigtes, stoffwechsellinaktives Gewebe (weiße Areale) von gesundem Gewebe mit vorhandener Enzymaktivität (rote Areale) abgrenzen (Bederson et al., 1986; Başkaya et al., 2000).

Bei 64 Tieren wurde das entnommene Gehirn für 15 min in einer N-Methyl-Butan-Lösung (Uvasol[®], Merck KGaA, Darmstadt, BRD) bei -35°C gefroren und anschließend in Frontalebene in 7 Schnitte à 2 mm Schichtdicke geschnitten. Diese wurden unter Lichtschutz bei 37°C jeweils 25 Minuten in 2%iger TTC-Lösung (Fa. Sigma Diagnostics, St. Louis, MO, USA) inkubiert. Zur Herstellung der Lösung wurden 2 g TTC in 100 ml 0,2 M Phosphatpuffer (pH 7,4, Fa. Chroma, Berlin, BRD) gelöst.

Nach der Inkubationszeit demarkierte sich ungefärbtes, geschädigtes Hirngewebe von enzymatisch aktiven, roten Anteilen. Alle Schnitte wurden nun von beiden Seiten mit standardisiertem Abstand und gleicher Vergrößerung mit einer Digitalkamera fotografiert. Die Fläche nichtgefärbter Areale konnte jetzt computergestützt ausgemessen werden (SigmaScan for Windows, Jandel Scientific, Erkrath, BRD). Das Kontusionsvolumen eines Schnittpräparates wurde errechnet, indem der Mittelwert der Fläche von Vorder- und Rückseite eines Schnittes mit der Schichtdicke von 2 mm multipliziert wurde. Das Kontusionsvolumen des gesamten Hirns errechnet sich aus der Addition der Kontusionsvolumina jedes Schnittes. Anschließend konnte zusätzlich aus dem Verhältnis der Größe der Kontusion zum gesamten Volumen der linken Hemisphäre der prozentuale Anteil kontusionierten Gewebes am Gesamthemisphärenvolumen der traumatisierten Seite errechnet werden.

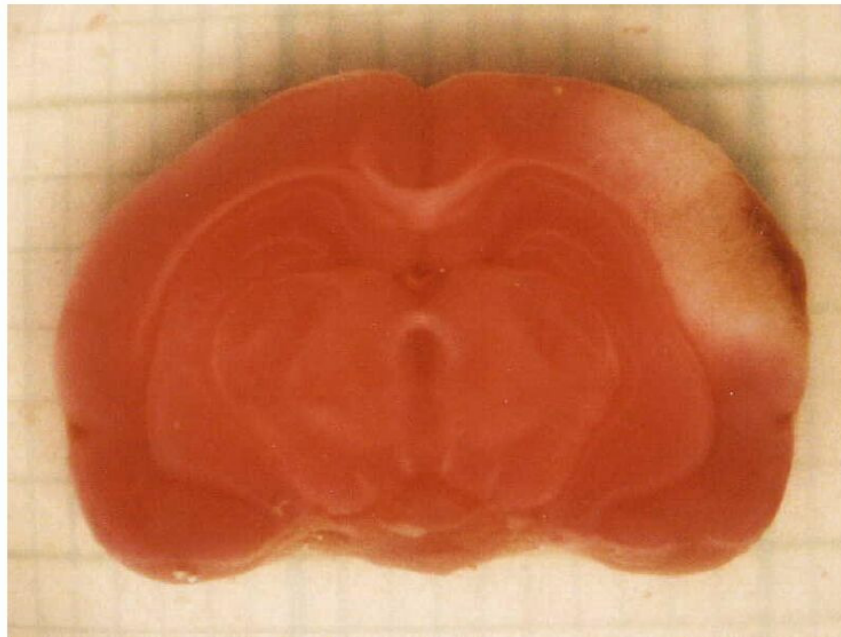


Abb. 9: TTC-gefärbter koronarer Hirnschnitt durch die Kontusion (2 mm Schichtdicke, Ansicht von rostral). Das kontusionierte Areal demarkiert sich links kortikal und subkortikal durch geringere Anfärbung. Der Kontusion aufgelagert befindet sich ein subdurales Hämatom.

2.7 Histologie

Zur morphologischen Begutachtung des posttraumatischen Hirnschadens wurden die Schnittpräparate der entnommenen Hirne histologisch aufgearbeitet. Die Detektion aufgetretener Blutungen erfolgte in der HHAES- und Placebogruppe mit 24 h Überlebenszeit nach Hämatoxilin-Eosin-Färbung (HE) und mikroskopischer Auswertung der Schnitte (n=24). Dabei wurden alle nachgewiesenen Blutungstypen in vier Klassen aufgeteilt: i) SDH, ii) Kontusionsblutung, iii) ICB/SAB (= kortikale bzw. subkortikale Einblutung außerhalb der Kontusion, intraventrikuläre Blutung, kortikale SAB) sowie iv) perivaskuläre Mikroeinblutungen. Pro Tier wurde derselbe Blutungstyp an verschiedenen Loci nur einmal gezählt. Pro Präparat konnten mehrere Blutungstypen vorhanden sein.

Für die histologische Untersuchung wurden die 2 mm starken Hirnschnitte nach der TTC-Färbung für mindestens 48 h in 4%ige Formaldehydlösung (Fa. Herbeta, Berlin, BRD) zur Entfärbung eingelegt. Daraufhin folgte eine Wässerung und anschließend eine Entwässerung über 48 h mit aufsteigender Ethylalkoholreihe (Fa. Herbeta, Berlin, BRD). Danach wurden die Schnitte in Paraffin (Fa. Sherwood Medical Co., St. Louis, MO, USA) eingebettet und bei 4°C für 24 h ausgehärtet. Mit einem Schlittenmikrotom (Fa. Leica, Bensheim, BRD) erfolgte aus jedem Paraffinblock die Gewinnung drei 7 µm starker koronarer Schnitte: ein Schnitt jeweils aus dem vorderen und hinteren Randbereich des Präparates sowie ein Schnitt aus der Mitte des Blockes mit anschließender Färbung, wie im Folgenden aufgeführt.

Die angefertigten 7 µm-Schnitte wurden auf einen Objektträger (SuperFrostPlus, Fa. Menzel-Gläser, Braunschweig, BRD) aufgebracht und bei 37°C über 24 h getrocknet. Es folgte die Entparaffinierung der Präparate in Xylol (Merck KGaA, Darmstadt, BRD) und Ethylalkohol (Fa. Herbeta, Berlin, BRD). Die Kernfärbung wurde für 5 Minuten in einer gebrauchsfertigen Mayers Hämalaunlösung (Fa. Chroma-Gesellschaft, Schmid AG, Köngen, BRD) vorgenommen. Daraufhin erfolgte zunächst die Spülung der Objektträger in Aqua destillata (Fa. Braun, Melsungen, BRD), dann in 1%iger HCl-Alkohol Lösung (Merck KGaA, Darmstadt, BRD) und schließlich dreimalig unter Leitungswasser für insgesamt 5 Minuten. Die Schnitte wurden nun für 8 Minuten in 0,5%iger Eosin-Lösung gefärbt sowie für jeweils 5 Minuten in aufsteigender Alkoholreihe (70%, 95%, 100% Ethanol), einem Ethanol-

Xylol-Gemisch (1:1) und abschließend in Xylol eingestellt. Zuletzt wurden die Präparate mit einem wasserfreien Eindeckmittel fixiert und eingedeckt.

2.8 Therapiestudie mit HyperHAES™ (HHAES) und N-Acetylcystein[®] (NAC)

2.8.1 HHAES

Aufgrund zahlreicher tierexperimenteller und klinischer Daten haben sich hyperosmolare NaCl-Lösungen mit einer Konzentration von 7.2 – 7.5% etabliert (Kreimeier et al., 1996). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass bereits mit einem Volumen von 4 ml/kg Körpergewicht (KG) der erwünschte Kreislauffeffekt erreicht werden konnte. SVR wird daher heute als peripher-venöse Bolusinfusion von 4 ml/kg KG einer hypertonen Kochsalz-Kolloid-Lösung definiert (Kreimeier et al., 1996). In unseren Versuchen wurde daher eine Dosis von 4 ml/kg KG als intravenöse Bolusinfusion verwendet. Kontrolltiere erhielten auf gleichem Applikationsweg 4 ml/kg KG einer 0.9%-igen NaCl-Lösung.

2.8.2 NAC

Die neuroprotektive Wirkung von NAC konnte sowohl in einem Traumamodell (Ellis et al., 1991; Xiong et al., 1999) als auch in einem Ischämie-Modell (Knuckey et al., 1995, Cuzzocrea et al., 2000) nachgewiesen werden. Dabei wurde eine Dosis von 163 mg/kg KG verwendet. Eine maximale Hemmung der NO-Produktion durch iNOS konnte bei 150 mg/kg KG gezeigt werden (Bergamini et al., 2001). Daher wurde NAC analog zur Arbeit von Xiong et al. in allen Versuchen mit einer Dosis von 163 mg/kg KG verwendet.

2.8.3 Versuchsdurchführung

Die Versuche wurden an 132 Sprague Dawley Ratten in Inhalationsnarkose wie unter Abschnitt 2.3 beschrieben durchgeführt. 10 Minuten nach Applikation des Traumas erfolgte in allen Gruppen die Substanzapplikation. Die Tiere der HHAES- bzw. Plazebogruppe erhielten über je etwa 3 Minuten ein Volumen von 4 ml/kg KG langsam i.v. injiziert. Die Kontrolltiere erhielten physiologische Kochsalzlösung (NaCl 0.9%, Braun AG, Melsungen, BRD). In der NAC-Gruppe wurde an drei Zeitpunkten

eine Dosis von 163 mg/kg KG der Substanz über eine intraperitoneale Injektion verabreicht. Die Gabe erfolgte direkt, 2 h und 4 h nach dem Trauma. Kontrolltiere erhielten NaCl ebenfalls gewichtsadaptiert als intraperitoneale Bolusinjektion (s. Abb. 10).

Direkt vor und nach Trauma sowie nach Substanzgabe wurden arterielle BGA (apO₂, apCO₂, pH, BE, Hb) vorgenommen. Der Blutdruck wurde bei allen Tieren mit arteriellem Katheter bis zum Zeitpunkt 5 Minuten nach Ende der Substanzgabe aufgezeichnet. Anschließend erfolgte die Ausleitung der Narkose unter Sauerstoffnachbeatmung, bis die wachen Tiere in den Käfig zurückgesetzt werden konnten.

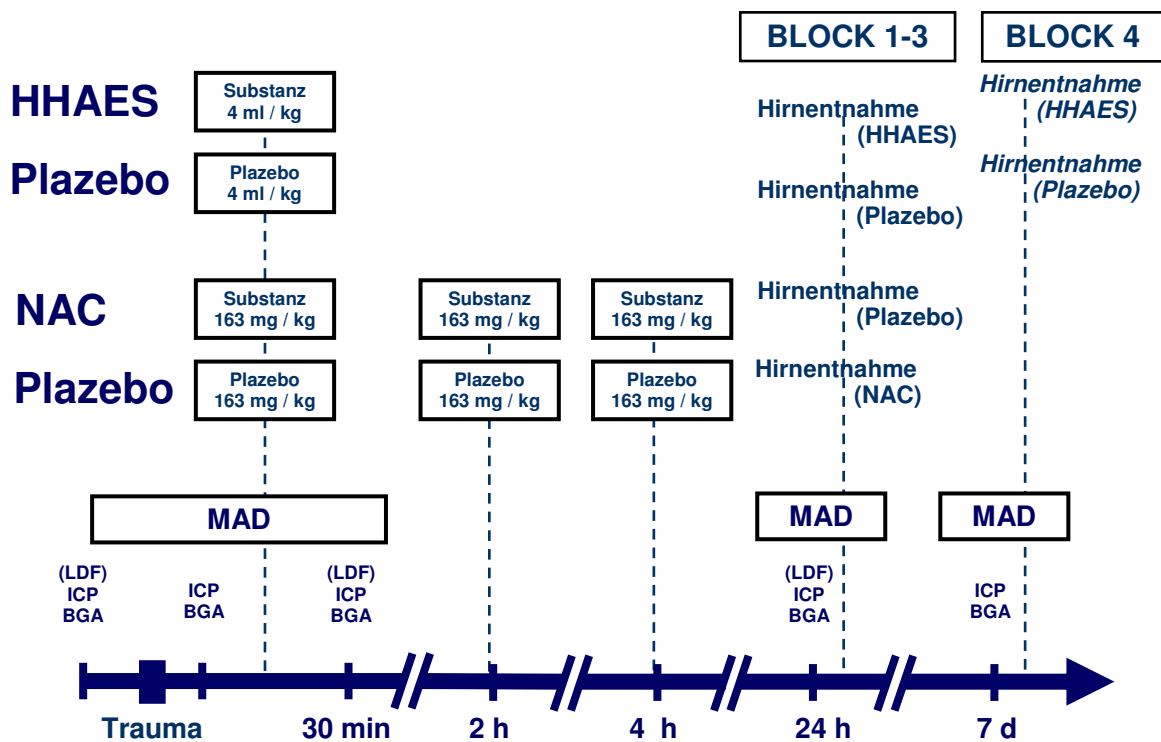


Abb. 10: Schematischer Versuchsaufbau der Versuchsgruppen mit allen Monitoringparametern und Prozeduren zu den einzelnen Versuchszeitpunkten (BGA = arterielle Blutgasanalyse; h = Stunden; ICP = Messung des intrakraniellen Druckes; LDF = Laser Doppler Flußmessung; MAD = mittlerer arterieller Blutdruck; mg / kg = Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht; min = Minuten; ml / kg = Milliliter pro Kilogramm Körpergewicht)

Bei allen Tieren erfolgte die Versuchsdurchführung wie oben beschrieben. Die Tiere wurden unter Narkose nach 24 h bzw. 7 d direkt vor Hirnentnahme entblutet (Block 1-4). Bei 48 Tieren wurde das posttraumatische Hirnödem quantifiziert (Block 1, s. Tab. 2). Zur Bestimmung des Kontusionsvolumens wurden zwei Blöcke mit jeweils 4 und 2 Versuchsgruppen gebildet (n=64, Block 2-3, s. Tab. 2). Block 2 bestand aus den Verum-Gruppen beider Substanzen und beiden Kontrollgruppen mit 24 h Überlebenszeit. In Block 3 befanden sich nur HHAES- und Kontrolltiere mit Hirnentnahme nach 7 Tagen.

Bei 20 zusätzlichen Tieren (=Block 4) wurde die lokale kortikale Perfusion mittels Laser-Doppler-Flussmessung bestimmt. Um größere Kortextbereiche zu erfassen, wurde das Knochenfenster am medianen Rand geringgradig nach ventral erweitert. Die Messungen erfolgten wie in Kapitel 2.4.1 beschrieben. Bei 84 Tieren (Block 2-4) wurden kontinuierlich die Blutdruckwerte überwacht und es erfolgten arterielle BGA zu den in Kap. 2.3 genannten Zeitpunkten.

	BLOCK 1	BLOCK 2	BLOCK 3	BLOCK 4
	Schwellung Wassergehalt	Kontusionsvolumen 24 h 7 d		Laser Doppler
		<i>BGA, ICP, MAD (n = 84)</i>		
HHAES	12	12	8	5
Plazebo	12	12	8	5
NAC	12	12	0	5
Plazebo	12	12	0	5
Summe	Σ 48	Σ 64		Σ 20

Tabelle 2: Zuordnung der Untersuchungsparameter zu den Versuchsblöcken mit entsprechenden Tierzahlen

2.9 *Statistische Methoden*

In allen Tabellen und Graphiken sind arithmetische Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte (SEM = standard error mean) angegeben. Sämtliche gewonnenen Rohdaten wurden auf Normalverteilung getestet und daraufhin die Auswahl der statistischen Tests getroffen: Veränderungen von Messwerten über die Zeit (BGA, ICP, MAD, CPP, LDF) wurden mittels Anwendung der einseitigen Varianzanalyse (ANOVA) für wiederholte Messungen (One Way Repeated Measures Analysis of Variance according to Turkey) auf statistische Signifikanz analysiert. Vergleiche von Daten zwischen den Gruppen erfolgten unter Anwendung der einseitigen Varianzanalyse für multiple paarweise Vergleiche (One Way Analysis of Variance for multiple comparison according to Turkey).

Die statistische Analyse der Messwerte für das Hirnödem und das Kontusionsvolumen wurde mit dem „Student´s t-Test“ durchgeführt. Zur Berechnung von Mittelwerten, SEM, Signifikanzniveau p und Ausführung der Testverfahren diente die Software Sigma Stat für Windows Vers. 3.0 (Fa. Jandel Scientific Deutschland, Erkrath, BRD). Unterschiede wurden ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5% als signifikant betrachtet.