

Aus der Klinik für Neurochirurgie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Einfluss der Gabe von HyperHAES™ und N-Acetylcystein[©] auf
die kortikale Perfusion und den sekundären Hirnschaden nach
'controlled cortical impact injury' bei der Ratte

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von

Martin Griebenow

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. A. Unterberg
2. Prof. Dr. med. O. Kempfski
3. Prof. Dr. med. E. Rickels

Datum der Promotion: 17.01.2007

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	6
1.1	<i>Fragestellung der Arbeit</i>	14
2	Material und Methoden	15
2.1	<i>Versuchstiere</i>	15
2.2	<i>Controlled Cortical Impact Injury (CCII)</i>	15
2.3	<i>Präparation der Versuchstiere</i>	18
2.4	<i>In Vivo Messungen</i>	22
2.4.1	Laser Doppler Flussmessung (LDF)	22
2.4.2	Messung des intrakraniellen Druckes (ICP)	22
2.5	<i>Quantifizierung von Hemisphärenschwellung und Wassergehalt</i>	23
2.6	<i>Gewebefärbung mit Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)</i>	24
2.7	<i>Histologie</i>	26
2.8	<i>Therapiestudie mit HyperHAES™ (HHAES) und N-Acetylcystein® (NAC)</i>	27
2.8.1	HHAES	27
2.8.2	NAC	27
2.8.3	Versuchsdurchführung	27
2.9	<i>Statistische Methoden</i>	30
3	Ergebnisse	31
3.1	<i>Untersuchungen in der HHAES-Gruppe</i>	31
3.1.1	Physiologische Daten	31
3.1.2	ICP	32
3.1.3	Mittlerer arterieller Blutdruck (MAD)	33
3.1.4	LDF	34
3.1.5	Hemisphärenschwellung und Wassergehalt	35
3.1.6	Kontusionsvolumen	36
3.1.7	Histologie	39
3.2	<i>Untersuchungen in der NAC-Gruppe</i>	41
3.2.1	Physiologische Daten	41
3.2.2	ICP	42
3.2.3	MAD	43
3.2.4	LDF	44
3.2.5	Hemisphärenschwellung und Wassergehalt	45
3.2.6	Kontusionsvolumen	46
4	Diskussion	48
4.1	<i>Schädel-Hirn-Trauma-Modelle</i>	48
4.1.1	Modell der kortikalen Kälteläsion	49
4.1.2	Weight Drop Injury Modell (WDI)	50
4.1.3	Fluid Percussion Injury Modell (FPI)	50
4.1.4	CCII	51
4.2	<i>Narkose</i>	53
4.3	<i>HHAES-Gruppe</i>	55
4.3.1	Zeitpunkt der Infusion	55
4.3.2	Physiologische Parameter	55
4.3.3	Hirnödem und ICP	56
4.3.4	MAD	62
4.3.5	LDF	63
4.3.6	Kontusionsvolumen	64

4.3.7	Histologie	66
4.4	<i>NAC-Gruppe</i>	68
4.4.1	Zeitpunkt der NAC-Applikation	68
4.4.2	Physiologische Parameter	68
4.4.3.	Oxidativer Stress und Hirnödem nach Trauma	68
4.4.4	MAD.....	71
4.4.5	LDF	71
4.4.6	Kontusionsvolumen.....	72
5	Zusammenfassung.....	75
6	Literaturverzeichnis.....	79

A B S T R A C T

Objective: Secondary brain damage is characterized by delayed tissue damage developing after the mechanically caused primary lesion. Due to its hyperosmotic-hyperoncotic properties HyperHaes™ (HHAES) can restore impaired posttraumatic local cerebral perfusion and thereby influence secondary brain damage. N-Acetylcysteine (NAC) improves microcirculatory hemodynamics, reduces oxidative stress and reduces posttraumatic inflammatory response. Can NAC lower vascular damage and influence the size of posttraumatic contusion volume? Possible beneficial effects of both substances on cerebral blood flow, brain edema and impact on development of secondary brain damage after the so-called controlled cortical impact injury (CCII) were investigated in rats.

Materials and methods: 132 male isoflurane-anaesthetized Sprague Dawley rats were subjected to a left temporo-parietal focal contusion. Within 15 minutes following trauma, either HHES or physiological saline (4ml/kg b.w.) was administered intravenously. Two additional groups received three intraperitoneal injections of NAC or physiological saline (163 mg/kg b.w.) directly after trauma as well as 2 and 4 hours after trauma. Arterial blood gases (ABG), core body temperature, mean arterial blood pressure (MABP) and intracranial pressure (ICP) were monitored. Regional cerebral blood flow was recorded by a laser Doppler probe in pericontusional areas before trauma and at 30 minutes, 4, and 24 hours after trauma. 24 hours following trauma animals were sacrificed for brain removal. Brain swelling and water content were measured gravimetrically. Posttraumatic contusion volume was determined planimetrically using triphenyl-tetrazoliumchloride staining at 24 hours and additionally at 7 days after trauma in HHES and controls.

Results: Temperature and ABG remained stable. No significant changes in MABP were seen between the groups. ICP was significantly lower directly after HHES infusion. Pericontusional perfusion at 4 hours in the placebo group was significantly impaired ($56.5 \pm 6.2\%$) in comparison to baseline as well as to HHES treated animals ($85.2 \pm 12.1\%$). Focal perfusion in NAC treated animals did not differ statistically from controls. A period of posttraumatic hyperperfusion was observed in all groups 24 hours after trauma. A tendency towards a decrease in posttraumatic hemispheric swelling was observed in the HHES group (placebo: $8.9 \pm 0.6\%$ vs.

HHES: $8.3 \pm 0.3\%$ and NAC: $8.9 \pm 0.6\%$). Posttraumatic water content was significantly increased in traumatized vs. non-traumatized hemispheres in all groups. No significant changes were seen in traumatized hemispheres comparing all groups (placebo: $80.1 \pm 0.08\%$ vs. HHES: $79.95 \pm 0.05\%$ and NAC $80.15 \pm 0.3\%$). Contusion volume was significantly decreased following HHES administration ($23.4 \pm 3.5 \text{ mm}^3$) versus placebo group ($39.6 \pm 6.2 \text{ mm}^3$) 7 days after trauma, although no significant reduction could be shown after 24 hours. In the NAC group contusion volume and the percentage of damaged tissue following CCI were reduced versus placebo ($53.5 \pm 4.7 \text{ mm}^3$ vs. $66.3 \pm 5.3 \text{ mm}^3$), however, without reaching statistical significance.

Conclusion: HHES reverses posttraumatic pericontusional hypoperfusion and significantly reduces contusion volume 7 days after trauma. Although NAC with its antioxidant potency shows no effect on perfusion alterations, it still induces a reduction in contusion volume following CCI.

Schlagwörter: small volume resuscitation, hyperosmotisch-hyperonkotische Lösung, Hydroxyethylstärke, Acetylcystein, Schädel-Hirn-Trauma, zerebraler Blutfluss, Hirnödem, oxidativer Stress

Key Words: small volume resuscitation, hyperosmotic-hyperoncotic solution, hydroxyethyl starch, acetylcysteine, brain trauma, cerebral blood flow, brain edema, oxidative stress

A B B I L D U N G S V E R Z E I C H N I S

- Abb. 1: Übersicht auf den Wirkmechanismus von HHAES auf freies Wasser im Intra- und Extravasalraum sowie intrazelluläres Wasser, S. 10
- Abb. 2: Übersicht auf die Wirkmechanismen von NAC auf zellulärer Ebene, S. 12
- Abb. 3: Schematischer Aufbau des CCII-Traumagerätes, S. 16
- Abb. 4: Ansicht der CCII-Kontusionseinheit, S. 17
- Abb. 5: Lokalisation der Skalpinzisuren (links) und der Trepanationsöffnung (rechts), S. 19
- Abb. 6: Lokalisation der Trepanation, S. 18
- Abb. 7: Intraoperative Sicht auf die Kalotte nach Abpräparation des linken M. temporalis (A); nach osteoklastischer Trepanation (B); mit ausgeprägtem subduralen Hämatom nach Trauma (C), S. 20
- Abb. 8: Schematische Zeichnung des Kontaktpunktes zwischen Kontusionsbolzen und der Kortexoberfläche in koronarer Schnittebene, S. 21
- Abb. 9: TTC-gefärbter koronarer Hirnschnitt durch die Kontusion, S. 25
- Abb. 10: Schematischer Versuchsaufbau aller Versuchsgruppen mit allen Monitoringparametern und Prozeduren zu den einzelnen Versuchszeitpunkten, S. 28
- Abb. 11: Körpergewichtsverlust der Tiere beider Versuchsgruppen zum Zeitpunkt 24h und 7d nach Trauma, S. 32
- Abb. 12: Intrakranieller Druck in beiden Versuchsgruppen vor Trauma, nach Trauma, nach Substanzgabe und 24 h posttraumatisch, S. 33
- Abb. 13: Mittlerer arterieller Blutdruck in beiden Versuchsgruppen vom Traumazeitpunkt bis etwa 10 Minuten nach Substanzgabe und nach 24 h, S. 34
- Abb. 14: Perikontusioneller Laser-Doppler-Fluss zu den Zeitpunkten vor Trauma, nach Substanzgabe, 4 h und 24 h posttraumatisch in % vom Ausgangswert, S.35
- Abb. 15: Hemisphärenschwellung und Wassergehalt der 24 h nach Trauma entnommenen Hirne, S. 36
- Abb. 16: Posttraumatisches Kontusionsvolumen [mm³] 24 h nach Trauma und Anteil läsionierten Gewebes in % vom Gesamthemisphärenvolumen, S. 37
- Abb. 17: Posttraumatisches Kontusionsvolumen [mm³] 7 d nach Trauma und Anteil läsionierten Gewebes in % vom Gesamthemisphärenvolumen, S. 38
- Abb. 18: Makroskopische Ansicht des links temporo-parietalen hämorrhagischen Kontusionsherdes direkt nach Hirnentnahme, S. 38

- Abb. 19: Histologische Präparate den verschiedenen klassifizierten Blutungstypen in beiden Versuchsgruppen, S.39
- Abb. 20: Häufigkeitsverteilung der histologisch nachgewiesenen Blutungstypen, S. 40
- Abb. 21: Körpergewichtsverlust der Tiere beider Versuchsgruppen zum Zeitpunkt 24 h nach Trauma als Prozentwert des Ausgangsgewichtes, S. 42
- Abb. 22: Intrakranieller Druck in beiden Versuchsgruppen vor Trauma, nach Trauma, nach Substanzgabe und 24 h posttraumatisch, S. 43
- Abb. 23: Mittlerer arterieller Blutdruck in beiden Versuchsgruppen vom Traumazeitpunkt bis etwa 6 Minuten nach Substanzgabe und nach 24 h, S. 44
- Abb. 24: Perikontusioneller Laser-Doppler-Fluss zu den Zeitpunkten vor Trauma, nach Substanzgabe, 4 h und 24 h posttraumatisch in % vom Ausgangswert, S. 45
- Abb. 25: Hemisphärenschwellung und Wassergehalt der 24 h nach Trauma entnommenen Hirne, S. 46
- Abb. 26: Posttraumatisches Kontusionsvolumen [mm³] 7 d nach Trauma und Anteil läsionierten Gewebes in % vom Gesamthemisphärenvolumen für beide Versuchsgruppen, S. 47

T A B E L L E N V E R Z E I C H N I S

- Tabelle 1: CCII Parameter in den durchgeführten Versuchen, S. 18
- Tabelle 2: Zuordnung der Untersuchungsparameter zu den Versuchsblöcken mit entsprechenden Tierzahlen, S. 29
- Tabelle 3: Physiologische Parameter der Blutgasanalysen und intrakranieller Druck in beiden Versuchsgruppen, S. 31
- Tabelle 4: Physiologische Parameter der Blutgasanalysen und intrakranieller Druck in beiden Versuchsgruppen, S. 41
- Tabelle 5: Ausprägung einzelner Aspekte des SHT bei den drei diskutierten Modellen im Vergleich zum CCII-Modell, S. 49

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent	LDF	Laser-Doppler-Fluss
°C	Grad Celsius	li	links
Abb.	Abbildung	M	molare Lösung (1mol/l)
ABG	arterial blood gases	M.	Muskulus
ADC	apparent water diffusion coefficient	m/s	Meter/Sekunde
ADP	Adenosindiphosphat	MABP/MAD	mittlerer arterieller Blutdruck
ANOVA	Analysis of Variance	mg	Milligramm
apCO ₂	arterieller Kohlendioxid-Partialdruck	min.	Minute
apO ₂	arterieller Sauerstoff-Partialdruck	ml	Milliliter
ATP	Adenosintriphosphat	mm	Millimeter
b.w.	body weight	mm ³	Kubikmillimeter
BE	base excess (Basenüberschuss)	mm/s	Millimeter/Sekunde
BGA	Blutgasanalyse	mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
BHS	Blut-Hirn-Schranke	MRT	Magnetresonanztomographie
bzw.	beziehungsweise	ms	Millisekunden
CA1	Hippokampusregion	n	Anzahl der Versuchstiere
Ca ²⁺	Kalzium	N ₂	Stickstoff
ca.	circa	N ₂ O	Distickstoffoxid („Lachgas“)
CCII/CCI	Controlled Cortical Impact (Injury)	Na ⁺	Natriumion
cm	Zentimeter	NAC	N-Acetylcystein
Cl ⁻	Chloridionen	NaCl	Natriumchlorid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid	NF-κB	Nuclear Factor Kappa Beta
COX	Cyclooxygenase	NMDA	N-methyl-D-aspartat
CPP	zerebraler Perfusionsdruck	nNOS	neuronale Stickoxylsynthetase
d	Tag	NO	Stickoxyl
dl	Deziliter	O ₂	Sauerstoff
DWI	diffusion weighted imaging	O ₂ ⁻	Superoxid Anion
eNOS	endotheliale Stickoxylsynthetase	OD	Außendurchmesser (outer diameter)
etc.	et cetera	o.g.	oben genannt(e/r)
Fa.	Firma	OH [•]	Hydroxylradikal
FG	Feuchtgewicht	ONOO ⁻	Peroxyinitrit
FPI	Fluid Percussion Injury	P	hydrostatischer Druck
g	Gramm	p	Signifikanzniveau
GABA	Gamma Amino Buttersäure	PAF	Platelet Activating Factor
GSH	Glutathion	PE	Polyethylen
G-S-S-G	Glutathiondisulfid	P/O ratio	Phosphorylierung von ADP / Sauerstoff
h	Stunde	pH	Wasserstoffionenkonzentration (-log [H ⁺])
H ⁺	Wasserstoffion	psi	pouns per square inch
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid	rCBF	regionaler zerebraler Blutfluss
Hb	Hämoglobinkonzentration (Gramm/Liter)	re	rechts
HCl	Chlorwasserstoff / Salzsäure	ROS	reactive oxygen species
HE	Hämatoxin-Eosin	s	Sekunde
Hg	Quecksilber	s.	siehe
HHAES/HHES	HyperHAES™	SAB	Subarachnoidalblutung
HO	Hydroxylradikal	SDH	subdurales Hämatom
HOCl	Hypochlorige Säure	SEM	Standardfehler der Mittelwerte
ICAM-1	interzelluläres Adhäsionsmolekül-1	-SH	Schwefelwasserstoff- / Thiolgruppe
ICB	intrazerebrale Blutung	SHT	Schädel-Hirn-Trauma
ICP	intrakranieller Druck	SVR	small volume resuscitation
ID	Innendurchmesser (inner diameter)	t	Zeit
IFN-γ	Interferon Gamma	Tab.	Tabelle
IL-1β	Interleukin 1 Beta	TNF-α	Tumor Nekrose Faktor Alpha
iNOS	induzierbare Stickoxylsynthetase	TG	Trockengewicht
i.v.	intravenös	TTC	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
Kap.	Kapitel	u.a.	unter anderem
kD	Kilodalton (Molekulargewicht)	vs.	versus
kg	Kilogramm	WDI	Weight Drop Injury
KG	Körpergewicht	z.B.	zum Beispiel
l	Liter	µm	Mikrometer
l/min	Liter/Minute		

DANKSAGUNG

Mein größter Dank gilt meinen Eltern für Ihr Vertrauen und ihre bedingungslose Unterstützung, die mir mein Studium und diese Arbeit ermöglichten.

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. Andreas Unterberg für das mir entgegengebrachte Vertrauen zur selbständigen Durchführung dieser Promotion. Er war stets ein gesprächsbereiter Lehrer für mich, dessen kritische Anleitung diese Arbeit geformt hat.

Herrn Dr. Ulrich Thomale möchte ich für die exzellente direkte Betreuung danken. Er führte mich an wissenschaftliche Arbeiten heran und war immer ein offener und toleranter Lehrer und Freund, der mir ein hohes Maß an Selbständigkeit gewährte.

Herrn PD Dr. Stefan Kroppenstedt möchte ich dafür danken, mich für die Neurochirurgie begeistert zu haben. Er half mir, immer den Blick für das Wesentliche zu bewahren, war ein stets hilfsbereiter Gesprächspartner und gab mir die notwendige Anleitung für die klinische Praxis.

Ich möchte mich bei Dr. John Stover für die Einweisung ins tierexperimentelle Arbeiten und die theoretische Einarbeitung bedanken. Seine ruhige Art und seine Erfahrung sorgten stets für eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre und hohen Wissenszuwachs.

Herrn Professor Dr. med Dr. h.c. mult. Mario Brock möchte ich für die freundliche Aufnahme in seiner Klinik danken.

E I D E S S T A T T L I C H E E R K L Ä R U N G

Hiermit erkläre ich, Martin Griebenow, an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema

„Einfluss der Gabe von HyperHAES™ und N-Acetylcystein© auf die kortikale Perfusion und den sekundären Hirnschaden nach 'controlled cortical impact injury' bei der Ratte“

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, den 12.06.2006

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.